

玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢工艺优化

张全国, 孙堂磊, 荆艳艳, 王毅, 张洋, 胡建军

(1.河南农业大学农业部农村可再生能源新材料与装备重点实验室, 郑州 450002;

2.生物质能源河南省协同创新中心, 郑州 450002)

摘要: 该文主要以粒度小于 0.088 mm 秸秆粉的酶解上清液为底物与热预处理后的活性污泥进行厌氧发酵产氢试验, 以累积产氢量为考察指标, 基于响应面 Box-Behnken 模型研究不同影响因素对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的影响, 对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢工艺进行优化。结果表明: 温度、初始 pH 值和还原糖浓度三因素中, 温度和还原糖浓度对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的影响最大。采用 Box-Behnken 模型获得的最佳产氢条件为: 温度 38.32℃, 初始 pH 值 4.93, 还原糖浓度 20.70 mg/mL, 最大产氢量 685.59 mL, 此时最大产氢率为 57.13 mL/g (玉米秸秆)。通过试验验证, 实际最大产氢量为 659.24 mL, 产氢率为 54.94 mL/g (玉米秸秆), 与模型预测值相比, 相对误差为 3.84%, 说明该模型具有较好的拟合性。该优化工艺可为后期连续流状态下的生物制氢系统提供参考。

关键词: 秸秆; 发酵; 氢; 酶解; 上清液; 活性污泥; 响应面法

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.033

中图分类号: TK6; TK91

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-05-0233-06

张全国, 孙堂磊, 荆艳艳, 王毅, 张洋, 胡建军. 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(5): 233—238. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.033 <http://www.tcsae.org>
Zhang Quanguo, Sun Tanglei, Jing Yanyan, Wang Yi, Zhang Yang, Hu Jianjun. Process optimization of bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of enzymatic hydrolysate supernatants of corn stalk[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(5): 233—238. (in Chinese with English abstract)
doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.033 <http://www.tcsae.org>

0 引言

近年来, 厌氧发酵生物制氢技术已成为可再生能源领域的一个研究热点^[1]。秸秆类生物质是中国主要的农业废弃物, 一般采取直接燃烧或制取成型燃料等能源化方式进行综合利用^[2-4]。玉米秸秆中纤维素含量比小麦、大豆、高粱等秸秆高 (约占 36%)^[5-6], 研究开发玉米秸秆的纤维素能源高效转化与提质技术具有重要科学意义, 并且以秸秆类生物质为原料的生物制氢技术研究已成为当前国内外关注的研究热点之一。包红旭等^[7]研究了不同预处理方法对玉米秸秆制氢的影响; 孙学习等^[8]对玉米秸秆生物制氢的影响因素及变化规律进行了研究; 胡庆丽等^[9]进行了 5 和 30 L 规模的玉米秸秆生物制氢放大试验。随着秸秆类生物制氢技术的发展, 研究工作开始逐渐转向低成本、规模化的连续流生物制氢系统的开发。在实验室前期的工作基础上发现, 利用渣液不分离的玉米秸秆酶解液进行生物制氢, 制氢过程中会存在流场分布不均, 制氢体系的黏度和浊度均较大, 如用于连续式生物制氢过程, 会存在死区过大, 反应不完全等问题^[10], 因此, 连续式生物制氢过程要求产氢基质必须具有良好的

流动性。对玉米秸秆酶解过程进行分析得出, 若采用秸秆类生物质酶解液的渣液分离双重利用手段, 不仅能通过新鲜底物重吸附手段实现纤维素酶的回收利用, 有效降低酶的使用量^[11], 同时还使得过滤后的酶解上清液流动性及可控性加强, 有利于连续流生物制氢过程^[12]。将秸秆类生物质酶解液渣液分离后, 用于连续流生物制氢过程, 是实现秸秆类生物质高效低成本制氢的有效手段, 但目前利用秸秆类生物质酶解上清液进行生物制氢的研究鲜有报道, 因此, 对该手段下的生物制氢工艺参数进行优化, 是完善连续式生物制氢技术的必然要求。

为优化酶解上清液的厌氧生物制氢工艺条件, 本文采用序批式试验手段, 以产氢量为响应值, 利用响应面法 Box-Behnken 模型, 考察了初始 pH 值、还原糖浓度和发酵温度等因素对玉米秸秆酶解上清液产氢过程的影响, 并对各因素间的交互作用进行了分析探讨, 优化了玉米秸秆酶解上清液的活性污泥厌氧发酵制氢工艺, 最大限度的提高了原料利用率, 降低了制氢成本, 为后期连续流状态下的生物制氢系统提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

取自郑州市五龙口污水处理厂的剩余污泥 (取样时环境温度为 35℃), 在黑暗条件下静置 12 h, 倒去上面清水, 用筛子除去石头、沙子等杂质后, 接种到固定容积的培养瓶中, 接种量为 30 g/L, 并添加 5 g/L 的牛粪搅

收稿日期: 2015-06-05 修订日期: 2015-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51376056); 教育部博士点基金优先领域项目 (20134105130001)

作者简介: 张全国, 男, 博士, 教授、博士生导师, 主要从事可再生能源工程领域的研究工作。郑州 河南农业大学农业部农村可再生能源新材料与装备重点实验室, 450002。Email: zquanguo@163.com

拌均匀,再加入污泥富集培养基,放于 40℃的保温箱中,一周更换一次培养基,驯化 2 个月后,对其进行 100℃水浴加热 15 min 的预处理,并开始试验。污泥富集培养基的配比为^[13]: NaCl 4.0 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, MgCl₂ 0.1 g/L, CH₃COONa 2.0 g/L, 胰蛋白胨 4.0 g/L, 酵母汁 1.0 g/L。活性污泥主要的细菌类群为变形菌门(*Proteobacteria*)(91.9%)、厚壁菌门(*Firmicures*)(4.6%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)(2%)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)(0.5%)、硝化螺菌门(*Nitrospirae*)(1%)。其中,明显的优势菌群为 *Alcaligenes feacalis*(55%)、*Pseudomonas aeruginosa*(12.8%)和 *Stenotrophomonas*(12.8%)^[14]。活性污泥的特性见表 1。

表 1 活性污泥和玉米秸秆的特性								
Table 1 Characteristics of inoculated sludge and corn straw								
	总固体 Total solids TS/%	挥发性 固体 Volatile solids VS/%	化学 需氧 量 COD/ (g·L ⁻¹)	混合液 悬浮固 体 MLSS/ (g·L ⁻¹)	挥发分 比 VSS/V S/%	半纤维 素 Hemic- ellulose/ %	纤维 素 Cellu- lose/%	木质素 Lignin/ %
活性 污泥 Inoculated sludge	6.77	47.90	36.67	51.40	78.09	-	-	-
玉米 秸秆 Corn straw	95.28	89.34	-	-	-	17.56	32.08	15.37

1.1.2 反应底物

试验所用秸秆取自郑州市中牟县三官庙镇教场袁村,切碎后放入 55℃恒温鼓风干燥箱烘干 72 h,采用 LG-02 型粉碎机微细粉碎,筛网孔径为 180 目,玉米秸秆的粉碎粒径小于 88 μm。试验所用纤维素酶购自上海源叶生物科技有限公司,酶活≥35 U/mg。玉米秸秆的特性见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米秸秆的酶解

取玉米秸秆试样 10、12、14 g,置于 250 mL 洗净烘干的锥形瓶中,向瓶中加入 200 mL pH 值为 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[15],在 50℃水浴锅中水浴保温 30 min,取出。准确称取秸秆试样质量 5%的纤维素酶酶粉,加入锥形瓶,振荡使充分溶解,用封口纸密封,放入 50℃,150 r/min 的恒温振荡器中酶解 48 h^[16]。取玉米秸秆酶解糖化后的上清液作为底物进行试验,酶解液的还原糖质量浓度采用 DNS 比色法测定的值为 18、22、26 mg/mL。

1.2.2 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢试验装置及方法

玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢试验装置如图 1 所示(气体净化器中装入质量分数 50% NaOH 溶液,用于脱除气体中的 CO₂)。试验方法为先取 250 mL 的锥形瓶,按体积比向其中接种 25%的经过 100℃水浴加热 15 min 的活性污泥,再加入玉米秸秆的酶解液(用 1.0 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节初始 pH 值),并迅速通氩气 10 min 使反应瓶保持厌氧状态,振荡均匀后密封瓶口,放入恒温培养箱中,用排水法收集气体,定期振荡反应瓶,厌氧发酵 120 h。同时做 3 组试验作为对照

组,每组数据取样 3 次,取平均值。玉米秸秆的酶解上清液发酵后产生的气体成分采用 RD-2059G 型氢气分析器和上海安捷伦科技有限公司生产的 6820GC-14B 气象色谱仪分析,控温范围:8~420℃,控温精度:在 200℃以内为±0.1℃,在 200℃以上为±0.2℃,升温速率:1~30℃/min。氮气做载气,5A 分子筛。COD 采用 KHCN-200A 型 COD 氨氮测定仪测定,pH 值采用 HI9024 酸度计测量,TS、VS、SS、VSS 采用标准方法测定^[17],纤维素、半纤维素以及木质素含量采用王玉万法测定^[18]。

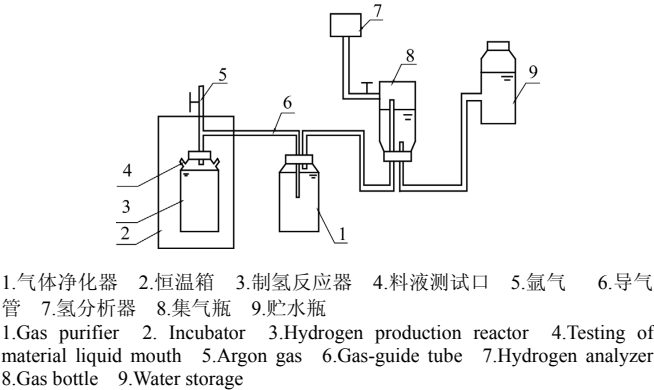


图 1 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢试验装置
Fig.1 Experimental facility anaerobic fermentation to produce hydrogen for maize straw's enzymatic hydrolysate supernatants

1.2.3 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢单因素试验

考察初始 pH 值、还原糖浓度、发酵温度 3 个因素对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的影响,以累积产氢量为考察目标,选择最佳单因素试验条件。分别设定初始 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0),还原糖质量浓度(14、18、22、26、30 mg/mL),发酵温度(30、35、40、45、50℃)3 个因素进行试验。单因素试验的最佳工艺条件为:初始 pH 值 5.0,还原糖质量浓度 22 mg/mL,发酵温度 40℃。

1.2.4 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢响应面试验设计

根据 Box-Behnken 试验设计原理^[19-21],在单因素试验基础上,确定响应面设计中每个因素的适宜范围,即初始 pH 值(4.0、5.0、6.0),还原糖质量浓度(18、22、26 mg/mL),发酵温度(35、40、45℃)。根据 Design Expert 8.05 软件设计试验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

初始 pH 值为 5.0 时,累积产氢量最大,过高或过低的 pH 值均不利于混合菌系产氢,当 pH 值在一定范围内变化时,会造成微生物生长繁殖速率及代谢途径发生一些改变,使其代谢产物发生相应的变化;还原糖质量浓度为 22 mg/mL 时产氢量最大,超过 22 mg/mL,产氢量下降,这是由于虽然底物浓度增加,但絮凝体颗粒内物质的传质速率并没发生明显变化,造成底物的转化不完全^[22]。此外,高浓度的还原糖的快速降解导致溶液迅速酸化而使产气率下降,过低的 pH 值对产氢发酵细菌产生不利的影响,使产氢活性丧失;产氢量随着温度的增加

呈现先增大后减小，温度为 40℃时产氢量最大，这是因为温度是影响微生物生长和繁殖的一个重要因素，温度过高时，微生物种群则会加快衰亡，不利于产氢代谢的继续；温度偏低时，微生物的细胞活性降低，生长、代谢活动不旺盛，发酵过程的延迟期长，同时产氢周期也会延长。

2.2 响应面 Box-Behnken 模型的选取及建立

Box-Behnken 试验设计是通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数的方法^[23-26]。试验结果如表 2 所示。分析数据表明：温度和酶解液质量浓度的 P 值均小于 0.0001，为极显著影响因素，初始 pH 值的 P 值为 0.0609，为不显著影响因素。

表 2 Box-Behnken 试验设计表和结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken							
编号 No.	温度 Temperature		pH 值 pH value		还原糖质量浓度 Reducing sugar concentration		总产氢量 Total amount of hydrogen/mL
	实际值 $A/^{\circ}\text{C}$	编码 Code	实际值 B	编码 Code	实际值 $C/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	编码 Code	
1	35	-1	5	0	26	+1	400.08
2	40	0	5	0	22	0	658.12
3	45	+1	6	+1	22	0	263.63
4	45	+1	5	0	26	+1	180.72
5	35	-1	4	-1	22	0	542.34
6	35	-1	5	0	18	-1	552.82
7	40	0	6	+1	18	-1	518.27
8	40	0	5	0	22	0	647.63
9	40	0	4	-1	18	-1	523.98
10	40	0	6	+1	26	+1	358.92
11	35	-1	6	+1	22	0	463.21
12	40	0	5	0	22	0	650.16
13	45	+1	4	-1	22	0	284.72
14	40	0	4	-1	26	+1	351.28
15	40	0	5	0	22	0	660.28
16	45	+1	5	0	18	-1	312.69
17	40	0	5	0	22	0	652.46

根据响应面法 Box-Behnken 模型，将各因素经回归拟合后，得到的回归模型如下：

$$X=-14007.79+503.73A+796.88B+299.63C+2.90AB+0.26AC+0.83BC-6.84A^2-94.36B^2-7.58C^2$$

该回归方程的 $R^2=0.9958$ ，数值接近 1，说明在试验范围内预测值与实测值拟合得很好；模型中的 $P<0.0001$ ，表明该回归模型高度显著 ($P<0.01$)；修正决定系数为 0.9904，此回归方程拟合度较高（表 3）。变异系数 CV 是表明不同水平处理组之间的变异程度，该模型 CV 为 3.30%，说明试验的重复性较好。

回归方程显著并不意味着每个自变量对响应值的影响都显著，从表 3 可以看出， A 、 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 这 5 个因素是影响玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的显著因素 ($P<0.05$)， AB 、 AC 、 BC 这 3 个因素为不显著因素 ($P>0.1$)，为了建立一个更为简单有效的回归方程，需从回归方程中剔除掉不显著的自变量。以产氢量为响应值的模型等式可写为

$$X=-14908.45+523.95A+931.31B+314.18C-6.84A^2-94.36B^2-7.58C^2$$

经简化后的回归方程的显著性检验 $P<0.0001$ ，故该模型回归显著。模型的决定系数 $R^2=0.9933$ ，表明模型与实际情况拟合较好，因此可用回归方程代替真实试验点对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的条件进行分析和预测。

表 3 Box-Behnken 试验方差分析结果

Table 3 Significant analysis of Box-Behnken experiment					
来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P -value
模型 Model	4.012E+005	9	44576.84	183.67	<0.0001
A	1.050E+005	1	1.050E+005	432.81	<0.0001
B	1207.62	1	1207.62	4.98	0.0609
C	47549.11	1	47549.11	195.92	<0.0001
AB	842.16	1	842.16	3.47	0.1048
AC	107.85	1	107.85	0.44	0.5264
BC	44.56	1	44.56	0.18	0.6812
A^2	1.230E+005	1	1.230E+005	506.68	<0.0001
B^2	37489.72	1	37489.72	154.47	<0.0001
C^2	61908.97	1	61908.97	255.09	<0.0001
残留 Residual	1698.86	7	242.69		
失真 Lack of fit	1585.12	3	528.37	18.58	0.082
纯误差 Pure error	113.74	4	28.44		
所有项 Cor total	4.029E+005	16			

注： $R^2=0.9958$ ； $R_{adj}^2=0.9904$ ； $CV=3.30\%$ 。

2.3 不同影响因素交互作用分析

根据响应面回归方程可以利用 Design-Expert8.05 软件绘制响应曲面图，见图 2。每个响应面代表了一个变量处于最佳水平时，另外 2 个独立变量之间的相互作用。图 2a 所示为温度和 pH 值交互作用对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵制氢的影响。可以看出，图中显示二维等高曲线呈椭圆形，这说明温度和 pH 值两因素存在一定的交互。产氢量随温度变化的曲面变化明显，而随 pH 值变化的曲面坡度相对平缓。表明当 pH 值为定值时，产氢量会先随着温度的升高而增大，达到最大值后开始下降，存在最优值；当温度为定值时，产氢量也会随着 pH 值的增大而增大，达到最高值后开始下降，存在最优值。

从图 2b 可以看出，产氢量随温度和还原糖浓度变化的曲面均变化明显，说明结果目标对于这 2 个反应条件比较敏感。表明当还原糖浓度为定值时，产氢量会先随着温度的升高而增大，达到最大值后开始下降，存在最优值；当温度为定值时，产氢量也会随着还原糖浓度的增加而增大，达到最高值后开始下降，存在最优值。

从图 2c 可以看出，产氢量随还原糖浓度变化的曲面变化明显，而随 pH 值变化的曲面坡度则相对平缓。表明当 pH 值为定值时，产氢量会先随着还原糖浓度的增加而增大，达到最大值后开始下降，存在最优值；当还原糖

浓度为定值时,产氢量也会随着 pH 值的增大而增大,达到最高值后开始下降,存在最优值。

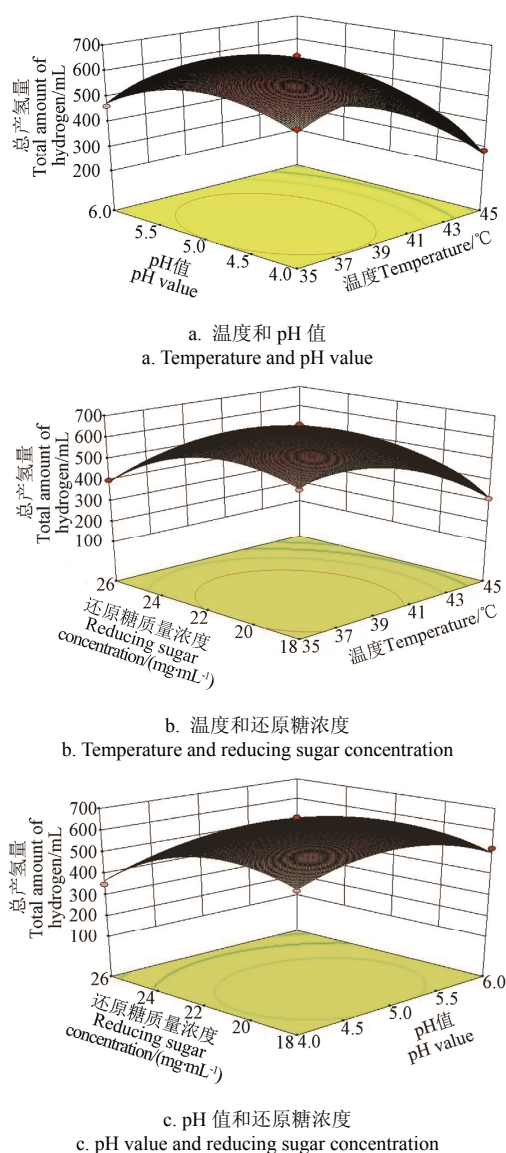


图 2 不同影响因素交互作用对产氢量的响应面

Fig.2 Response surface plot of hydrogen production between different influential factors

2.4 玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的最佳条件及其检验

当温度为 38.32℃,初始 pH 值为 4.93,还原糖质量浓度为 20.70 mg/mL 时,最大产氢量为 685.59 mL,此时最大产氢率为 57.13 mL/g (玉米秸秆)。为了检验模型预测值与实际试验值之间的相关性,即检验响应面优化模型的可靠性,采用上述反应条件进行验证试验,得到产氢量为 659.24 mL,产氢率为 54.94 mL/g (玉米秸秆),与模型预测值相比,相对误差仅为 3.84%,这说明预测值与试验值接近,模型拟合度较高,具有较好的参考价值。

3 讨论

利用产氢菌进行生物制氢过程,其稳定生长与代谢是维持高效产氢的必要条件,有研究表明^[27]:剧烈的机械搅拌及磁力搅拌不利于菌体的生长代谢,严重影响其产氢能力。因此,连续化、规模化的生物制氢系统多采

用折流板式生化反应器^[28-29]。流动性是影响连续流生物制氢效率的关键,黏度过大、流动性差、产氢底物无效堆积是利用秸秆类生物质发酵制氢过程的常见问题^[30-31]。因此,利用流动性好的酶解上清液进行厌氧发酵产氢是评价其用于连续流生物制氢过程的探索性试验,旨在考查其产氢可行性及优化其产氢工艺。经验证,酶解上清液可有效用于生物制氢过程,后期将开展其在连续流制氢系统内的运行试验。

为实现玉米秸秆的高效利用,采用新鲜底物重吸附法^[11]对游离于酶解上清液中的纤维素酶进行回收利用,将玉米秸秆酶解液渣液分离后的残渣再次进行厌氧发酵制氢,得到产氢量为 837.04 mL,酶解上清液与残渣的总产氢量为 1 496.28 mL,总产氢率为 124.69 mL/g 玉米秸秆,这高于文献^[32]利用渣液不分离玉米秸秆水解液所得的研究结果 (112.87 mL/g 玉米秸秆),说明玉米秸秆得到有效酶解。酶解上清液满足了连续流生物制氢过程对产氢基质流动性的要求,纤维素酶的回收再利用有效的提高了酶解效率,该技术为秸秆类生物质发酵制氢工艺理论的进一步完善提供了参考。

4 结论

采用响应面法对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢进行单因素影响分析,并考察了温度、初始 pH 值和还原糖浓度 3 个因素对玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的影响。结果表明:温度和还原糖浓度的 P 值均小于 0.0001,为极显著影响因素,初始 pH 值的 P 值为 0.0609,为不显著影响因素。

建立活性污泥利用玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的响应面 Box-Behnken 模型,根据该模型,玉米秸秆酶解上清液厌氧发酵产氢的最佳条件:温度为 38.32℃,初始 pH 值为 4.93,还原糖浓度为 20.70 mg/mL,最大产氢量为 685.59 mL,此时最大产氢率为 57.13 mL/g。通过试验验证,实际最大产氢量为 659.24 mL,产氢率为 54.94 mL/g,与模型预测值相比,相对误差为 3.84%,说明回归方程拟合度较高,模型较为合理。

参考文献

- [1] 孙学习,凡广生,任保增,等. 玉米秸秆厌氧发酵产氢动力学模型的建立及数理验证[J]. 郑州大学学报, 2014, 35(3): 14-17.
Sun Xuexi, Fan Guangsheng, Ren Baozeng, et al. Study on kinetics model of hydrogen production with corn straw by anaerobic fermentation[J]. Journal of Zhengzhou University, 2014, 35(3): 14-17. (in Chinese with English abstract)
- [2] 田松峰,罗伟光,荆有印,等. 玉米秸秆燃烧过程及燃烧动力学分析[J]. 太阳能学报, 2008, 29(12): 1570-1572.
Tian Songfeng, Luo Weiguang, Jing Youyin, et al. Combustion process and kinetic sanalysis of cornstalk[J]. Acta Energiac Solaris Sinica, 2008, 29(12): 1570-1572. (in Chinese with English abstract)
- [3] 田潇瑜,侯振东,徐杨. 玉米秸秆成型块微观结构研究[J]. 农业机械学报, 2011, 42(3): 105-108.
Tian Xiaoyu, Hou Zhendong, Xu Yang. Microstructure of corn stover briquette[J]. Transactions of the Chinese Society

- for Agricultural Machinery, 2011, 42(3): 105—108. (in Chinese with English abstract)
- [4] 王飞, 蔡亚庆, 仇焕广. 中国沼气发展的现状、驱动及制约因素分析[J]. 农业工程学报, 2012, 28(1): 184—189. Wang Fei, Cai Yaqing, Qiu Huanguang. Current status, incentives and constraints for future development of biogas industry in China[J]. Transaction of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transaction of the CSAE), 2012, 28(1): 184—189. (in Chinese with English abstract)
- [5] Saha Badal C. Hemicellulose bioconversion[J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(5): 279—291.
- [6] Sun Ye, Cheng Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review[J]. Bioresource Technology, 2002, 3(6): 22—23.
- [7] 包红旭, 王爱杰, 任南琪. 预处理方法对细菌降解玉米秸秆产氢能力的影响[J]. 大连海事大学学报, 2008, 34(4): 41—52. Bao Hongxu, Wang Aijie, Ren Nanqi. Effects of pretreatment methods on bio-hydrogen production from corn stalk by *Clostridium* sp. X9[J]. Journal of Dalian Maritime University, 2008, 34(4): 41—52. (in Chinese with English abstract)
- [8] 孙学习, 李涛, 计新静, 等. 玉米秸秆发酵制氢影响因素及变化规律研究[J]. 现代化工, 2010, 30(6): 60—62. Sun Xuexi, Li Tao, Ji Xinjing, et al. Parameter effects and mechanism of fermentative bio-hydrogen production from cornstalks[J]. Modern Chemical Industry, 2010, 30(6): 60—62. (in Chinese with English abstract)
- [9] 胡庆丽. 玉米秸秆厌氧发酵生物制氢放大实验研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2007. Hu Qingli. Study on Scale-up Experiment of Bio-hydrogen Production from Cornstalk by Fermentation[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [10] 荆艳艳. 超微秸秆光合生物产氢体系多相流数值模拟与流变特性实验研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011. Jing Yanyan. Mathematical Simulation and Rheological Properties of Photosynthetic Bacteria Hydrogen Production System with Supemicro Straw[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [11] Zhang Zhiping, Yue Jianzhi, Zhou Xuehua, et al. Photo-fermentative bio-hydrogen production from agricultural residue enzymatic hydrolyzate and the enzyme reuse[J]. BioResources, 2014, 9(2): 2299—2310.
- [12] Sudhanshu S P, Valentine N N, Ahmad A Z, et al. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* followed by biogas production in a two-step uncoupled process[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38: 9121—9130.
- [13] 任晓. 厌氧与光合微生物联合制氢工艺实验研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012. Ren Xiao. Experimental Study of Hydrogen Production by Anaerobic and Photosynthetic Microorganisms Combined with Fecalsewage[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [14] 金浩, 李柏林, 欧杰, 等. 污水处理活性污泥微生物群落多样性研究[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(4): 1—5. Jin Hao, Li Bolin, Ou Jie, et al. Microbial population diversity of activated sludge for wastewater treatment[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(4): 1—5. (in Chinese with English abstract)
- [15] 刘佳. 表面活性剂在废木质纤维素制酒精中的应用基础研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2008. Liu Jia. The Fundamental Research on the Application of Surfactants in the Production of Ethanol from Lignocellulose[D]. Changsha: Hunan University, 2008. (in Chinese with English abstract)
- [16] 张志萍. 秸秆类生物质超微预处理技术及其产氢可行性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012. Zhang Zhiping. Study on the Technology of Ultramicro Pretreatment by Straw Biomass and Feasibility Study of Hydrogen Production[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [17] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [18] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量测定分析程序[J]. 微生物学报, 1987(2): 82—84. Wang Yuwan, Xu Wenyu. The quantitative analysis program of hemicelluloses, cellulose and lignin in the lignocellulose solid substrate yeast[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1987(2): 82—84. (in Chinese with English abstract)
- [19] Liu Wei, Yu Yanying, Yang Ruzhen, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(11): 4750—4763.
- [20] Mao Weihua, Han Lujia, Shi Bo. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoid from *Radix Astragali* using response surface methodology[J]. Sep Sci Technol, 2008, 43(3): 671—681.
- [21] Ashan S E, Miganad T, Ariffa A, et al. Optimization of enzymatic synthesis of palm-based kojic acid ester using response surface methodology[J]. J Oleo Sci, 2009, 58(10): 503—510.
- [22] 汤桂兰, 孙振钧. 厌氧污泥发酵制氢工艺试验研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(9): 201—204. Tang Guilin, Sun Zhenjun. Experimental study of anaerobic sludge fermentation hydrogen production process[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2007, 23(9): 201—204. (in Chinese with English abstract)
- [23] 沈其君. SAS 统计分析[M]. 南京: 东南大学出版社, 2009: 9—56.
- [24] Auja S K, Ferreira G M, Moreira A R. Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium[J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 85(6): 666—675.
- [25] Silva E M, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology[J]. Sep Purif Technol, 2007, 55(3): 381—387.
- [26] 路朝阳, 王毅, 荆艳艳, 等. 基于 BBD 模型的玉米秸秆光合生物制氢优化实验研究[J]. 太阳能学报, 2014, 35(8): 1511—1516. Lu Chaoyang, Wang Yi, Jing Yanyan, et al. Experiment optimization of bio-hydrogen production from corn stalks based on BBD model[J]. Acta Energiæ Solaris Sinica, 2014, 35(8): 1511—1516. (in Chinese with English abstract)
- [27] Zhang Zhiping, Wang Yi, Hu Jianjun, et al. Influence of mixing method and hydraulic retention time on hydrogen production through photo-fermentation with mixed strains[J].

- International Journal of Hydrogen Energy, 2015, 40: 6521—6529.
- [28] 才金玲, 王广策. 发酵生物制氢反应器研究进展[J]. 环境科学与技术, 2013, 36(6): 78—84.
Cai Jinling, Wang Guangce. Bioreactor for fermentative hydrogen production: A review[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 36(6): 78—84. (in Chinese with English abstract)
- [29] 刘晓烨, 张洪, 李永峰. 水力停留时间对复合式厌氧折流板反应器乙醇型发酵制氢系统的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(6): 2433—2438.
Liu Xiaoye, Zhang Hong, Li Yongfeng. Influences of hydraulic retention time on the ethanol type fermentation hydrogen production system in a hybrid anaerobic baffled reactor[J]. Environmental Science, 2014, 35(6): 2433—2438. (in Chinese with English abstract)
- [30] 荆艳艳, 李丁丁, 罗晓, 等. 超微玉米秸秆的沉降稳定性及产氢能力研究[J]. 太阳能学报, 2014, 35(6): 960—964.
Jing Yanyan, Li Dingding, Luo Xiao, et al. Sedimentation stability and capacity of photosynthetic hydrogen production with superfine corn straw[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2014, 35(6): 960—964. (in Chinese with English abstract)
- [31] 荆艳艳, 周雪花, 赵民善, 等. 高粱秸秆光合产氢体系流变特性的影响因素[J]. 农业工程学报, 2011, 27(增刊 2), 139—143.
Jing Yanyan, Zhou Xuehua, Zhao Minshan, et al. Influencing factors of rheological properties of photosynthetic bacteria hydrogen production system with sorghum straw[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2011, 27(Suppl.2): 139—143. (in Chinese with English abstract)
- [32] 罗娟, 田宜水, 宋成军, 等. 玉米秸秆厌氧产氢工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2015, 31(2): 235—240.
Luo Juan, Tian Yishui, Song Chengjun, et al. Parameter optimization of hydrogen production by anaerobic fermentation with corn straw[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(2): 235—240. (in Chinese with English abstract)

Process optimization of bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of enzymatic hydrolysate supernatants of corn stalk

Zhang Quanguo, Sun Tanglei, Jing Yanyan, Wang Yi, Zhang Yang, Hu Jianjun

(1. Key Laboratory of New Materials and Facilities for Rural Renewable Energy of China's Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Collaborative Innovation Center of Biomass Energy, Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In recent years, hydrogen as eco-friendly clean energy has received the widespread attention. In numerous hydrogen production methods, anaerobic fermentation bio-hydrogen production has become a research hotspot in the field of renewable energy because it can utilize biomass raw materials effectively, reduce the agricultural waste pollution to the environment. The straw biomass is the main agricultural waste of crop production in China, which can be used to take direct or prepare molding fuel combustion and convert into biogas for comprehensive utilization generally. Cellulose content in maize straw (about 36%) is higher than that in wheat, soybean and sorghum straws, the research of cellulose energy efficient transformation in maize straw has important scientific significance and practical value. In this study, anaerobic fermentation experiments were performed for bio-hydrogen production from enzymatic hydrolyzate of corn stalk powder (<0.088 mm) using heat pretreated activated sludge as fermentation microorganism, choosing cumulative amount of hydrogen production as main experiment parameter, the influences of different factors on anaerobic fermentation bio-hydrogen production of corn stalk's enzymolysis were studied based on Box-Behnken model of response surface method. The significance of interactions between different factors during the anaerobic bio-hydrogen production process was examined and the anaerobic fermentation bio-hydrogen production process of corn stalk's enzymolysis was optimized. The results showed that temperature and enzymatic hydrolysate concentration were the factors that mostly impacted on the corn stalk anaerobic fermentation bio-hydrogen production process comparing with initial pH value. The interaction of two factors on the effect of hydrogen yield were all significant ($P < 0.05$). Box-Behnken model was used to obtain the optimal conditions of hydrogen production. The optimal conditions were temperature of 38.32°C, the initial pH value of 4.93, and the enzymatic hydrolysate concentration of 20.70 mg/mL. Under such condition, the maximum hydrogen yield was 685.59 mL and the maximum hydrogen production rate was 57.13 mL/g straw. The model was validated through experiment, the actual maximum hydrogen yield can reach 659.24 mL and the hydrogen production rate was 54.94 mL/g straw, with the prediction error of 3.84%, which proved that this model had a good fitness.

Keywords: straw; fermentation; hydrogen; enzymatic hydrolysate; supernatants of corn stalk; activated sludge; response surface method