

酸度、氧化还原电位和水力停留时间 对葡萄糖厌氧混合发酵的影响

周洪波¹, Cord-ruwisch Ralf², 陈坚¹

(1. 无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室, 江苏 无锡 214036;
2. Biotechnology, Division of Science, Murdoch University, Perth, 6150, Australia)

摘要: 以两种厌氧絮状污泥和一种绵羊中的胃液为种子, 在恒化器中对葡萄糖进行了连续混合厌氧发酵. 在 pH=6~7, Eh = -400 mV 条件下降解速率最快. 乳酸和乙酸在大多数实验中总为主要产物. 酸度和水力停留时间对发酵的影响主要通过影响厌氧菌优势种群和同一种群的代谢途径实现.
关键词: 酸度; 氧化还原电位; 水力停留时间; 厌氧混合发酵; 葡萄糖; 产物分布
中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)02-0180-05

1 前言

由于产酸和产甲烷细菌在生理和营养要求方面的广泛差异, Pohland 等^[1]提出了相分离的方法. 优化这种“两相”厌氧消化工艺曾经是许多研究者的目标. 何种发酵产物可以避免甲烷细菌被抑制及工艺的失败, 不同研究者有不同的看法. 大多数研究者^[2, 3]认为丙酸对于产甲烷不利, 乙酸、甲酸和氢可以被甲烷菌直接利用, 丁酸首先被转变成乙酸再生成甲烷, 而厌氧消化池中丁酸的降解限速步骤是乙酸降解为甲烷. 此外, 乙醇和乳酸也被认为是产甲烷有利的产物^[4, 5].

酸化相中发酵产物的分布有赖于操作条件. 酸度(pH)、温度、水力停留时间(HRT)、有机负荷、基质浓度甚至氧化还原电位(Eh)都是影响产物分布的环境因子. 然而, 有关大范围酸度、温度和停留时间对产物分布的影响的研究少有报道.

2 材料和方法

实验装置如图 1 所示, 采用全混反应器, 体积 0.3 L. 温度保持在(35±0.1)°C, 用 4 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节 pH, 稀释率用恒流泵控制, 氧化还原电位采用通气和搅拌调节.

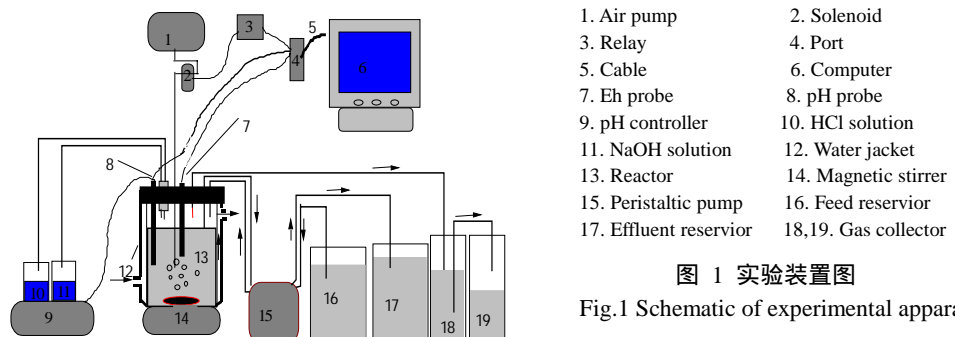


图 1 实验装置图
Fig.1 Schematic of experimental apparatus

分批和连续培养的培养基组成如下(g/L): 葡萄糖 21, 酵母膏 1, K₂HPO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.4, NH₄Cl 3, KCl 0.5, CaCl₂ 0.2, Mg₂SO₄·7H₂O 0.1, NaCl 1, Na₂SO₄ 0.5. 微量元素 1 ml/L^[6]. 刃天青(2 mg/L)用于指示氧化还原电位.

收稿日期: 2000-04-03, 修回日期: 2000-06-01

作者简介: 周洪波(1969-), 男, 湖南湘潭人, 博士研究生, 讲师, 发酵工程专业.

接种物由两种厌氧污泥和一种绵羊瘤胃胃液 (Rumen) 混合而成, 比例为 5:5:2, 200 ml 培养基接种 20 ml. 为保持厌氧环境, 接种前通 80% N₂+20% CO₂ 混合气体 10 min, 以消除培养基中的溶解氧, 直到 Eh 为 -100 mV.

每次实验从新的分批培养开始. 当葡萄糖消耗完毕, 开始启动恒流泵连续培养. 当反应器中的葡萄糖和产物浓度达到稳定后, 继续运行 10 个水力停留时间 (HRT), 即认为该连续培养为一恒化器. 随后停留时间由长至短变换, 在进行氧化还原电位实验时, Eh 的设定值从低至高调节.

葡萄糖用葡萄糖酶分析仪 (YSI 2700 SELECT, John Morris Scientific Pty Limited) 检测, 挥发性脂肪酸用气相色谱分析, 乳酸、甲酸、琥珀酸和苹果酸用高压液相色谱 (HPLC) 分析. 微生物用 OLYMPUS 光学显微镜观察、摄影、计数. 菌体生物量在 105°C 烘干过夜称重.

达到稳态后, 停止恒流泵, 加入一定量培养基使葡萄糖浓度为 2 g/L 后进行分批培养, 测定葡萄糖随时间的变化, 用 Monod 方程计算最大比基质降解速率 V_{max} .

3 结果和分析

为了判别不同 pH 条件下反应器平稳运行的最短停留时间 (即最大稀释率), 以葡萄糖降解率 95% 为基准, 即认为使葡萄糖降解率恰好小于 95% 的停留时间为最短停留时间. 在本实验条件下, pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的最短停留时间分别为 60, 10, 2.5, 2.5, 5, 10, 70 h.

表 1 显示, 发酵液中可检测到乙酸、丁酸、乳酸、甲酸、丙酸、戊酸、苹果酸、琥珀酸等, 同时观察发现在 pH 6~8 时产气量最多. 由于主要考虑液相的产物, 没有测量气相中的成份.

表 1 酸度和水力停留时间对葡萄糖厌氧发酵的影响
Table 1 Effects of pH and HRT on anaerobic fermentation of glucose

pH	HRT (h)	V_{max} (h ⁻¹)	Ethanol (mmol/L)	Lactate (mmol/L)	Formate (mmol/L)	Succinate (mmol/L)	Acetate (mmol/L)	Propionate (mmol/L)	Butyrate (mmol/L)	Carbon recovery (%)
4	60	0.043	97.74	33.57	0.00	12.56	19.02	0.77	4.72	96.46
5	10	0.705	7.10	79.59	16.44	20.41	111.7	0.77	12.85	100.00
5	15	0.589	5.89	47.42	21.48	12.49	75.09	1.44	36.89	99.63
5	20	0.377	57.19	94.99	4.52	12.07	73.20	0.00	2.28	99.52
6	2.5	3.501	1.15	27.76	32.06	15.96	36.54	0.00	47.23	71.48
6	5.0	2.193	7.50	3.47	51.64	10.14	24.87	1.23	51.30	69.78
6	10	0.893	7.45	49.10	0.00	8.18	23.77	2.77	30.60	64.09
6	20	0.565	8.20	45.56	6.54	0.00	21.23	1.32	22.47	68.45
7	2.5	3.477	33.24	55.52	35.61	15.83	15.10	2.92	4.17	69.39
7	5.0	1.495	29.45	102.83	25.31	16.11	38.67	5.33	7.69	86.63
7	10	0.988	31.06	31.91	30.80	18.02	84.87	5.96	16.96	77.70
7	20	0.790	35.05	0.00	19.94	20.25	92.12	27.8	18.02	84.32
8	2.5	1.168	20.54	10.35	104.22	9.52	31.19	2.19	5.41	64.74
8	5.0	1.133	4.36	39.44	107.02	47.36	54.74	7.58	0.67	79.35
8	10	0.791	4.44	54.23	116.12	29.48	105.00	2.04	2.57	83.17
9	10	0.529	51.45	44.30	113.82	0.00	64.58	2.38	2.50	77.07
9	20	0.346	53.37	28.15	133.95	10.26	90.30	4.33	4.35	86.14
9	40	0.362	67.41	8.19	149.37	1.93	75.18	12.4	11.94	90.24
9	60	0.484	47.56	16.65	83.10	5.27	62.85	14.4	9.64	76.65
10	70	0.026	39.07	79.02	141.07	19.24	43.30	0.00	1.80	100.00

3.1 pH 对产物分布的影响

图 2 为反应器能够稳定运行的最大稀释率条件下产物分布和酸度的关系. 在一定的 pH 和水力停留时间条件下, 乙酸、乙醇、丁酸、乳酸和琥珀酸都可能是主要产物, 而丙酸在所有的实验中浓度都很低. 这与 Zoetemeyer 等^[7]的研究结果相似. 乳酸和乙酸虽然也受 pH 的影响, 但在大多数情况下总是主要产物, 这与有关研究结果相同^[5].

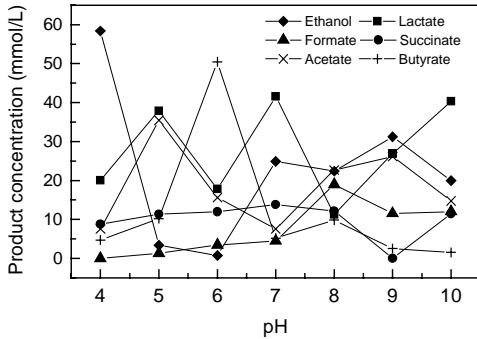


图 2 最大稀释率时酸度对厌氧发酵代谢产物的影响
Fig.2 Product distribution as a function of pH under the maximum dilution rates

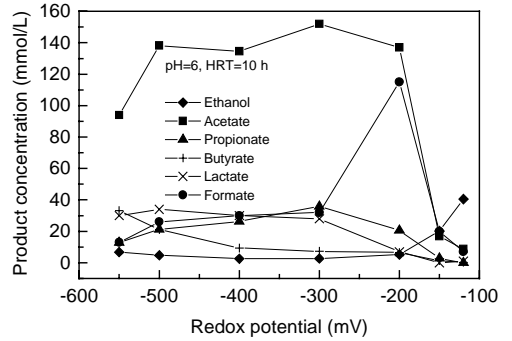


图 3 产物分布和氧化还原电位的关系
Fig.3 Product distribution as a function of E_h

3.2 氧化还原电位对产物分布的影响

pH 实验表明, $pH=6$ 时反应速率最快, 在 $pH=6$ 和 $(35\pm 0.1)^\circ C$ 的恒化器中考察了 E_h 对葡萄糖厌氧发酵的影响. 在 E_h 为 $-550\sim -300$ mV, HRT 为 10 h 时, 乙酸和乳酸是主要产物, 丁酸随 E_h 的增加而降低, 而丙酸和甲酸随 E_h 增加而增加. 当 $E_h > -200$ mV 时, 除乙醇外的所有产物浓度都急剧下降, 而碳回收率约为 30%, 此时可能以好氧发酵为主, 主要产物是二氧化碳(图 3).

3.3 水力停留时间对产物分布的影响

水力停留时间虽强烈影响产物分布, 但无明显规律(表 1). 在氧化还原电位实验中, 在 pH 为 6 及 E_h 为 -400 mV 时可以获得最大的葡萄糖降解速率, 在此条件下, 除了琥珀酸不稳定, 所有产物随水力停留时间(0.75~5 h)的增加而增加(图 4).

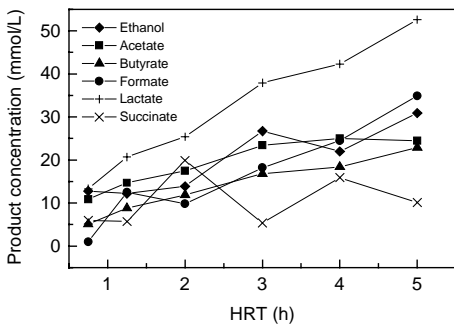


图 4 产物分布和水力停留时间的关系
Fig.4 Product distribution as a function of HRT

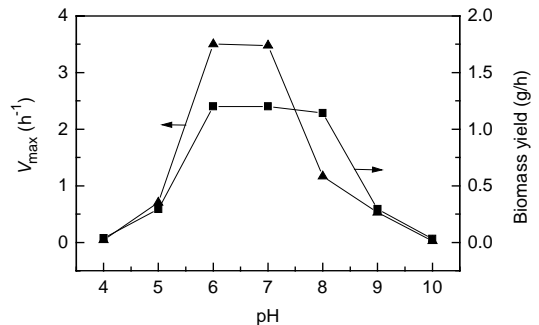


图 5 pH 对葡萄糖比降解速率和微生物得率的影响
Fig.5 Effect of pH on specific degradation rate of glucose and growth of anaerobes

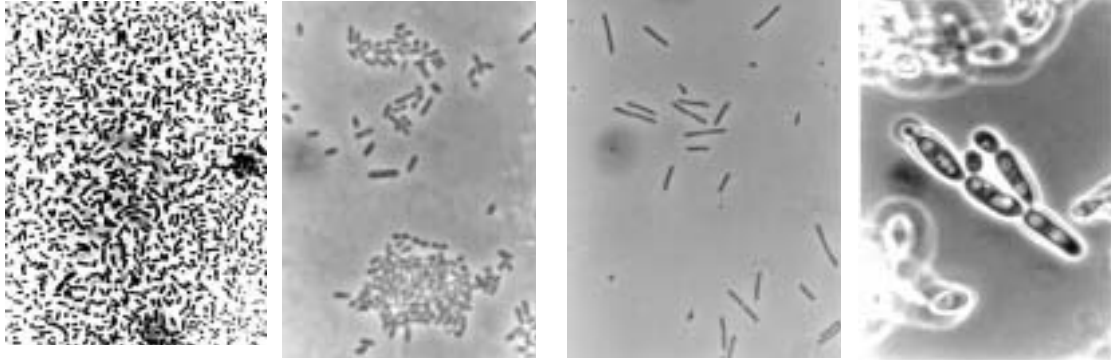
3.4 pH , E_h 和水力停留时间对微生物生长和葡萄糖降解的影响

图 5 显示在反应器稳定运行的最短持水时间内, pH 对葡萄糖比降解速率和厌氧微生物生长得率的影响. 在 pH 为 6 和 7 时葡萄糖比降解速率和微生物生长得率最大, 葡萄糖的比降解速率在 pH 为 4 及 10 时很小, 而且反应器不稳定.

3.5 不同 pH , E_h 和 HRT 条件下种群动态的变化

酸度对厌氧菌种群动态有强烈的影响, 不同微生物形态见图 6. 在 pH 为 4 和 5 时, 短杆菌占总菌数 80% 以上, 当 pH 为 7 时, 短杆菌、球菌、中等长度杆菌菌量比例为 10:3:1, 球菌在 pH 8 和 10 时占总菌数 70%. 氧化还原电位对种群的变化也有强烈的影响. 在低 E_h 时, 杆菌为优势菌,

而在较高 Eh 时, 酵母为优势菌. 水力停留时间对种群动态有影响, 但比 pH 和 Eh 的影响弱. 如在 $pH=8$ 、 $HRT=2.5$ h 时, 球菌量为杆菌的 5 倍, 而在 $HRT=10$ h 时, 杆菌:球菌为 2:1. Inanc 等^[3]认为反应器的 pH 是选择产酸菌优势种的可能参数, 本研究发现 Eh 对种群也有强烈的影响.



(a) Short rod shaped bacteria (b) Short rod shaped bacteria and cocci (c) Medium long rod (d) Yeast

图 6 不同厌氧微生物形态

Fig.6 Anaerobes with different morphology

4 讨论

按照热力学定律, 反应的自由能变化值越负, 反应越快. 表 2 计算了葡萄糖产生丙酮酸而后产生乙酸、丁酸、丙酸、乙醇和乳酸等反应的自由能变化. 从热力学的角度出发, 酸化相中的产物应以乙酸、丙酸和丁酸为主. 而事实上本研究中乳酸总是一种主要产物, 乙醇在低的和高的 pH 条件下也是主要产物之一. 可见实验中乙酸和乳酸成为主要产物的现象不能单纯从热动力学的角度来分析.

表 2 葡萄糖(从丙酮酸开始)可能的厌氧代谢途径自由能的变化

Table 2 Gibbs free energy changes of possible metabolic pathways of glucose (starting from pyruvate)

Substrates	Products	G^0 (kJ)
Pyruvate ⁻ + 2H ₂ O	Acetate ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ₂ + H ⁺	-47.3
Pyruvate ⁻ + 2H ₂	Propionate ⁻ + H ₂ O	-123
Pyruvate ⁻ + acetate ⁻ + H ₂	Butyrate ⁻ + HCO ₃ ⁻	-95.4
Pyruvate ⁻ + H ₂	Lactate ⁻	-43.1
Pyruvate ⁻ + H ₂ O + H ₂	Ethanol + HCO ₃ ⁻	-56.9
Pyruvate ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ₂	Malate ²⁻ + H ₂ O	-20.9
Pyruvate ⁻ + HCO ₃ ⁻ + 2H ₂	Succinate ²⁻ + H ₂ O	-102.9

Conditions: pH 7, $T=298$ K, all substrates and products 0.1 mmol/L, H₂ 10130 Pa.

5 结论

(1) 本研究在较宽的酸度、氧化还原电位和水力停留时间范围内, 对葡萄糖进行了连续混合厌氧发酵, 确定在 $pH=6\sim 7$, $Eh = -400$ mV 条件下有最快的降解速率.

(2) 酸度、氧化还原电位和水力停留时间对发酵产物的影响非常明显. 乳酸、乙酸在大多数条

件下为主要产物, 丁酸、乙醇、琥珀酸和甲酸在一定酸度下可能成为主要产物. 在大范围的酸度和氧化还原电位范围内, 水力停留时间对产物分布的影响缺乏规律, 而在一定的酸度和氧化还原电位下, 其对产物分布的影响有一定的趋势. 在 pH 6, $Eh = -550 \sim -300$ mV 条件下, 丁酸随 Eh 的增加而降低, 而丙酸和甲酸随 Eh 增加而增加.

(3) 酸度、氧化还原电位和水力停留时间主要是通过影响厌氧菌优势种群和同一种群的代谢途径而影响厌氧发酵产物的分布.

参考文献:

- [1] Pohland F G, Gosh S. Anaerobic Stabilisation of Organic Wastes, Two-phase Concept [J]. Environ. Lett., 1971, 1: 255–266.
- [2] Dinopoulou Georgia, Rudd Thomasine, Lester John N, et al. Anaerobic Acidogenesis of a Complex Wastewater: 1. The Influence of Operational Parameters on Reactor Performance [J]. Biotech. Bioeng., 1988, 31: 958–968.
- [3] Inanc B, Matsui S, Ide S. Propionic Acid Accumulation and Controlling Factors in Anaerobic Treatment of Carbohydrate: Effects of H_2 and pH [J]. Water Science and Technology, 1996, 34(5–6): 317–325.
- [4] REN Nan-qi, WANG Bao-zhen, HUANG Ju-chang. Ethanol-type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor [J]. Biotech. Bioeng., 1997, 54(5): 428–433.
- [5] LUN Shi-yi, WU Jing, CHEN Jian. Anaerobic Waste Treatment: Efficient Separation of the Acid Methane Forming Phases Using Two UASB Reactors [J]. Process Biochemistry, 1995, 30(6): 523–529.
- [6] Widdel F, Pfennig N. Studies on Dissimilatory Sulfate-reducing Bacteria that Decompose Fatty Acids: 1. Isolation of New Sulfate-reducing Bacteria Enriched with Acetate from Saline Environments [J]. Description of *Desulfobacter Postgatei* Gen. Nov., sp. Nov. Archive Microbiology, 1981, 129: 395–400.
- [7] Zoetemeyer R J, Van Den Heuvel J C, et al. pH Influence on Acidogenic Dissimilation of Glucose in an Anaerobic Digester [J]. Water Research, 1982, 16: 303–311.

Influence of pH, Redox Potential and Hydraulic Retention Time on Anaerobic Fermentation of Glucose

ZHOU Hong-bo¹, Cord-ruwisch Ralf², CHEN Jian¹

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, Jiangsu 214036, China;

2. Biotechnology, Division of Science, Murdoch University, Perth, 6150, Australia)

Abstract: In wide ranges of pH, Eh and HRT values, glucose was anaerobically fermented by mixed anaerobes. Fastest specific glucose degradation rate and anaerobe growth rate were obtained under the conditions of pH=6~7 and $Eh = -400$ mV. Product distribution was strongly influenced by pH, Eh and HRT. Lactate and acetate were always major products under all conditions, while ethanol, butyrate, formate and succinate could be major products under certain conditions. The effect of HRT on product distribution was not regular in a wide range of conditions. Under the conditions of pH=6 and $Eh = -550 \sim -300$ mV, butyrate concentration was decreased and propionate concentration increased. The shift in product distribution was due to variation in the population of anaerobes and changes in metabolic pathways of the same group.

Key words: pH; redox potential; hydraulic retention time; anaerobic mixed fermentation; glucose; product distribution