



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105713926 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 29

(21) 申请号 201410717950. 6

(22) 申请日 2014. 12. 01

(71) 申请人 中粮集团有限公司

地址 100020 北京市朝阳区朝阳门南大街 8 号

申请人 中粮营养健康研究院有限公司

(72) 发明人 苏会波 程军 周俊虎 岑可法 林海龙

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

代理人 杨国强 张淑珍

(51) Int. Cl.

C12P 3/00(2006. 01)

C12R 1/145(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

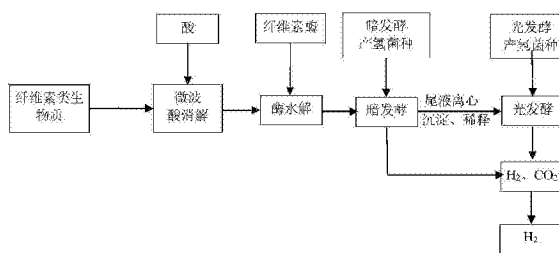
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种利用纤维素作为原料制取氢气的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用纤维素类生物质制取氢气的方法,所述方法包含如下步骤:(1)微波酸消解;(2)酶水解;(3)暗发酵产氢;(4)光发酵产氢;(5)纯化。本发明的方法产氢率、产氢速率、底物利用率和能量转化效率均十分优异。



1. 一种利用纤维素类生物质制取氢气的方法,所述方法包含如下步骤:

(1) 微波酸消解:对纤维素类生物质进行烘干粉碎,随后加入稀酸溶液,在微波加热消解仪中进行微波加热辅助酸消解;

(2) 酶水解:利用纤维素酶对经步骤(1)消解后的纤维素进行水解,获得含有可发酵的还原糖的水解后纤维素;

(3) 暗发酵产氢:在暗发酵反应器中加入步骤(2)获得的溶液,接入暗发酵产氢菌种和暗发酵培养基进行暗发酵,将气相产物导出;

(4) 光发酵产氢:将步骤(3)得到的暗发酵尾液沉淀、离心后,作为光发酵产氢的底物,接入光发酵产氢菌种和光发酵培养基进行光发酵,将气相产物导出;

(5) 纯化:将步骤(3)和步骤(4)的气相产物合并,并对H<sub>2</sub>进行纯化。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述纤维素类生物质选自于农作物、野生草本植物的秸秆或富含纤维素的工业废弃物;优选地,所述农作物的秸秆为玉米、小麦、水稻或甘蔗的秸秆,所述富含纤维素的工业废弃物为玉米芯、甘蔗渣、水葫芦。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述步骤(1)具有如下条件中的一个或多个:

所述烘干粉碎后,纤维素类生物质的粒径为 $\leq 1\text{mm}$ ;

所述稀酸溶液是:浓度为0.1wt%~5.0wt%的盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、硒酸、高氯酸、氟化氢、溴化氰或碘化氢中的一种或多种;

烘干粉碎后的纤维素类生物质的干重与稀酸溶液的质量比为1:100~10:100;

所述微波加热辅助酸消解在100~150℃的温度、0.2~0.8MPa的压力下进行5~30分钟;

将所述烘干粉碎后的纤维素类生物质与稀酸溶液混合后立即进行所述微波加压加热辅助酸消解。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,在进行步骤(1)的微波酸消解后,将获得的消解液的pH调整至4.0~5.0。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,所述步骤(2)具有如下条件中的一个或多个:

所加入的纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为0.5:100.0~5.0:100.0;

酶水解的温度为35~45℃,酶水解的时间为48~96小时。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,所述步骤(3)具有如下条件中的一个或多个:

所述的暗发酵产氢菌种为选自于由丁酸梭菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、巴氏梭菌、嗜热芽孢杆菌、热纤维梭菌所组成的组中的一种或几种;

所述暗发酵培养基的组成为:4g/L 蛋白胨、0.5g/L L-半胱氨酸、4g/L NaCl、0.1g/L MgCl<sub>2</sub>、0.1g/L FeCl<sub>2</sub>、1.5g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10mL 维生素液、以及10mL 微量元素液;其中,所述维生素液的成分为:0.025g/L 抗坏血酸、0.02g/L 柠檬酸、0.01g/L 叶酸、以及0.01g/L 对氨基苯甲酸;所述微量元素液的成分为:0.01g/L MnCl<sub>2</sub>、0.05g/L ZnCl<sub>2</sub>、0.01g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.01g/L CaCl<sub>2</sub>以及0.01g/L AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>;

所述暗发酵产氢菌种的接种量为:菌种的种子培养液占整个发酵体积的10%(v/v),并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于2.0g/L;

所述暗发酵的发酵溶液温度为 30℃～37℃；

所述暗发酵溶液的 pH 值为 6.0～7.0。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其中,在将步骤 (3) 得到的暗发酵尾液沉淀、离心后,用去离子水稀释 2-6 倍。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,所述步骤 (4) 具有如下条件中的一个或多个:

所述光发酵产氢菌种为选自于红螺菌属、红假单胞菌属或红杆菌属细菌的一种或几种;

所述光发酵产氢菌种为选自于深红红螺菌、沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红杆菌中的一种或几种;

所述光发酵培养基为:0.5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.6g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.2g/L  $\text{NaCl}$ 、0.2g/L  $\text{MgSO}_4$ 、0.05g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.0g/L  $\text{NaHCO}_3$ 、1.87g/L 谷氨酸钠、1.0mL 维生素液、以及 1.0mL 微量元素液;其中,所述微量元素液的成分为:2.0g/L  $\text{EDTA-2Na}$ 、2.0g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L  $\text{ZnCl}_2$ 、0.05g/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、以及 0.02g/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;所述维生素液的成分为:0.1g/L 生物素、0.35g/L 烟酸、0.2g/L 对氨基甲苯、0.1g/L 泛酸钙、以及 0.05g/L 维生素 B12;

按照与任选稀释后的暗发酵尾液相等的体积加入光发酵培养基;

所述光发酵产氢菌种的接种量为:菌种的种子培养液占整个发酵体积的 10% (v/v),并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于 2.0g/L;

所述光发酵的发酵溶液温度为 28℃～35℃;

所述光发酵的 pH 值为 6.0～7.0;

所述光发酵的光照度为 2000lux～10000lux。

## 一种利用纤维素作为原料制取氢气的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物质能源生产技术领域,具体涉及一种利用纤维素作为原料制取氢气的方法。

### 背景技术

[0002] 氢能是理想的清洁能源之一,已经引起人们的广泛重视。生物制氢利用微生物催化脱氢、在代谢过程中产生氢分子的生理机制,通过以有机物作为基质的发酵过程制取氢气。由于整个过程无需以矿物资源为原料,环境污染低且生态效应高,目前对生物制氢的研究已经成为热点。然而,传统方法原料成本高且产氢率低,使得生物制氢发展和应用受到制约。相比之下,纤维素类生物质主要包括农作物秸秆和野生的草本及木本植物,是地球上分布最广且最廉价的可再生资源之一,非常适合作为制备可再生能源的原料。目前,全国秸秆的理论资源量约为 8.4 亿吨,可收集资源量约为 7 亿吨,

[0003] 以纤维素类生物质作为原料,利用微生物发酵制取氢气的方法可概括为:首先对纤维素类生物质进行预处理,使得纤维素水解成还原糖;随后通过微生物发酵将还原糖转化成氢气。

[0004] 由于在纤维素类生物质中,半纤维素和木质素通过共价键形成网状结构,将纤维素包裹其中,在处理中纤维素很难与所加入的纤维素酶接触。如果在预处理时直接用纤维素酶进行水解,还原糖的产率一般低于 20%。因此,为提高底物的转化率,在预处理步骤中,通常先使用物理法和 / 或化学法破坏纤维素类生物质的天然结构,再使用纤维素酶将其水解;或者,采用微生物处理酶解的方法,利用纤维素分解菌直接将纤维素转化为还原糖。预处理中使用的物理法例如通过机械粉碎或蒸汽爆破的方法破坏纤维素的晶体结构,使得在后续水解时与纤维素酶的接触面积增大。预处理中使用的物理—化学法例如将蒸汽爆破或机械粉碎与化学药剂处理相结合。预处理中使用化学法主要为稀酸处理法和碱处理法(非专利文献 1)。例如, CN102101647A 公开了一种从纤维素制取氢气的方法,该过程首先利用外加的水溶 Bronsted 酸、水溶 Lewis 酸、固体酸或水自身可逆电离产生的  $H^+$  对纤维素进行水解,然后水解产物再进行水热重整制氢。非专利文献 2 利用微波炉进行微波辅助碱处理,随后用台式电炉封闭加热,从而将纤维素水解为还原糖。预处理中采用的微生物处理酶解法例如:将白腐真菌接种于木质纤维素液体培养基中培养,经水洗、烘干后得预处理后纤维素,然后将产氢菌营养盐溶液与绿色木霉粗酶液混合,加入预处理后的纤维素,得同步糖化发酵产氢培养基(CN 102321671A);以及利用天然绿色木霉代替商业纤维素酶对纤维素进行处理(CN 102286538A)。上述纤维素预处理工艺均存在工艺时间长、还原糖得率低的缺点。

[0005] 而对于通过微生物发酵将还原糖转化成氢气的过程,传统的暗发酵产氢的主要瓶颈问题是产氢率低和能源转化效率低,且发酵残余液中含有大量有机酸和醇类等副产物,既浪费了能量又污染了环境。例如, CN 102286538A 使用的暗发酵发酵方式理论产氢率最高只有  $4\text{mol/mol}$ 。可见,仅仅使用暗发酵一种发酵方式,产氢效率不可能获得突破性提高。

而非专利文献 2 虽然提出采用微波辅助,然而,该文献利用微波炉作为加热仪器,原料预处理容器处于敞口状态,不宜结合酸溶液进行预处理。普通酸溶液在加热和高温状态下易挥发,不但会造成原料损失,消耗更多酸溶液,增加预处理的成本,而且会降低酸溶液浓度,增加预处理的难度,降低预处理效率。此外,如果该预处理设备长期运行,挥发的酸性气体会对仪器造成损坏,降低仪器使用寿命。由于微波炉不能形成密闭环境产生恒定高温高压的预处理条件,在该文献中,还原糖得率最高不超过 3% (图 1)。此外,由于微波炉的温度和压力均难以控制,不利于技术的推广和应用。特别地,该文献中,在纤维素类生物质产氢底物中添加了 6g 葡萄糖后,与 6g 纯葡萄糖作为产氢底物相比产氢量并无明显增加,这表明该文献微波预处理后的纤维素类生物质,并不能被光合细菌产氢有效利用进行产氢。虽然现有技术中也有采用暗发酵与光发酵结合的两步产氢,然而,大部分均是针对结构简单的小分子糖类(如葡萄糖、蔗糖等)和容易利用的淀粉类生物质进行研究,缺乏对纤维素类生物质的预处理方法和产氢工艺的研究。

[0006] 可见,如何将生物制氢的理念实用化,开发稳健且产氢率、产氢速率、底物利用率和能量转化效率高的方法,仍是亟待解决的技术问题。

[0007] [非专利文献 1] 木质纤维素生物转化氢气技术及前景,《太阳能学报》,第 28 卷第 1 期,2007 年 1 月。

[0008] [非专利文献 2] 微波环境下的玉米秸秆碱处理技术,《浙江农业科学》,2012 年第 6 期。

## 发明内容

[0009] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种利用纤维素类生物质制取氢气的方法,所述方法包含如下步骤:

[0010] (1) 微波酸消解:对纤维素类生物质进行烘干粉碎,随后加入稀酸溶液,在微波加热消解仪中进行微波加热辅助酸消解;

[0011] (2) 酶水解:利用纤维素酶对经步骤(1)消解后的纤维素进行水解,获得含有可发酵的还原糖的水解后纤维素;

[0012] (3) 暗发酵产氢:在暗发酵反应器中加入步骤(2)获得的溶液,接入暗发酵产氢菌种和暗发酵培养基进行暗发酵,将气相产物(主要为  $H_2$ 、 $CO_2$ )导出;

[0013] (4) 光发酵产氢:将步骤(3)得到的暗发酵尾气沉淀、离心后,作为光发酵产氢的底物,接入光发酵产氢菌种和光发酵培养基进行光发酵,将气相产物(主要为  $H_2$ 、 $CO_2$ )导出;

[0014] (5) 纯化:将步骤(3)和步骤(4)的气相产物合并,并对  $H_2$ 进行纯化。

[0015] 具体而言,本发明是通过如下技术方案实现的:

[0016] 1. 一种利用纤维素类生物质制取氢气的方法,所述方法包含如下步骤:

[0017] (1) 微波酸消解:对纤维素类生物质进行烘干粉碎,随后加入稀酸溶液,在微波加热消解仪中进行微波加热辅助酸消解;

[0018] (2) 酶水解:利用纤维素酶对经步骤(1)消解后的纤维素进行水解,获得含有可发酵的还原糖的水解后纤维素;

[0019] (3) 暗发酵产氢:在暗发酵反应器中加入步骤(2)获得的溶液,接入暗发酵产氢菌

种和暗发酵培养基进行暗发酵,将气相产物导出;

[0020] (4) 光发酵产氢:将步骤(3)得到的暗发酵尾液沉淀、离心后,作为光发酵产氢的底物,接入光发酵产氢菌种和光发酵培养基进行光发酵,将气相产物导出;

[0021] (5) 纯化:将步骤(3)和步骤(4)的气相产物合并,并对 $H_2$ 进行纯化。

[0022] 2. 如段落1所述的方法,其中,所述纤维素类生物质选自于农作物、野生草本植物的秸秆或富含纤维素的工业废弃物。

[0023] 3. 如段落2所述的方法,其中,所述农作物的秸秆为玉米、小麦、水稻或甘蔗的秸秆,所述富含纤维素的工业废弃物为玉米芯、甘蔗渣、水葫芦。

[0024] 4. 如段落1-3中任一项所述的方法,其中,步骤(1)中,所述烘干粉碎后,纤维素类生物质的粒径为 $\leq 1\text{mm}$ 。

[0025] 5. 如段落1-4中任一项所述的方法,其中,步骤(1)中,所述稀酸溶液是:浓度为 $0.1\text{wt}\% - 5.0\text{wt}\%$ 的盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、硒酸、高氯酸、氟化氢、溴化氰或碘化氢中的一种或多种。

[0026] 6. 如段落1-5中任一项所述的方法,其中,步骤(1)中,烘干粉碎后的纤维素类生物质的干重与稀酸溶液的质量比为 $1:100 \sim 10:100$ 。

[0027] 7. 如段落1-6中任一项所述的方法,其中,步骤(1)中,所述微波加热辅助酸消解在 $100 \sim 150^\circ\text{C}$ 的温度、 $0.2 \sim 0.8\text{MPa}$ 的压力下进行 $5 \sim 30$ 分钟。

[0028] 8. 如段落1-7中任一项所述的方法,其中,步骤(1)中,将所述烘干粉碎后的纤维素类生物质与稀酸溶液混合后立即进行所述微波加压加热辅助酸消解。

[0029] 9. 如段落1-8中任一项所述的方法,其中,在进行步骤(1)的微波酸消解后,将获得的消解液的pH调整至 $4.0 \sim 5.0$ 。

[0030] 10. 如段落1-9中任一项所述的方法,其中,步骤(2)中,所加入的纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为 $0.5:100.0 \sim 5.0:100.0$ 。

[0031] 11. 如段落1-10中任一项所述的方法,其中,步骤(2)中,酶水解的温度为 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ ,酶水解的时间为 $48 \sim 96$ 小时。

[0032] 12. 如段落1-11中任一项所述的方法,其中,步骤(3)中,所述的暗发酵产氢菌种为选自于由丁酸梭菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、巴氏梭菌、嗜热芽孢杆菌、热纤维梭菌所组成的组中的一种或几种。

[0033] 13. 如段落1-12中任一项所述的方法,其中,步骤(3)中所述的暗发酵培养基的组成为: $4\text{g/L}$ 蛋白胨、 $0.5\text{g/L}$  L-半胱氨酸、 $4\text{g/L}$  NaCl、 $0.1\text{g/L}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1\text{g/L}$   $\text{FeCl}_2$ 、 $1.5\text{g/L}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $10\text{mL}$  维生素液、以及 $10\text{mL}$  微量元素液;其中,所述维生素液的成分为: $0.025\text{g/L}$  抗坏血酸、 $0.02\text{g/L}$  柠檬酸、 $0.01\text{g/L}$  叶酸、以及 $0.01\text{g/L}$  对氨基苯甲酸;所述微量元素液的成分为: $0.01\text{g/L}$   $\text{MnCl}_2$ 、 $0.05\text{g/L}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $0.01\text{g/L}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $0.01\text{g/L}$   $\text{CaCl}_2$ 以及 $0.01\text{g/L}$   $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 。

[0034] 14. 如段落1-13中任一项所述的方法,其中,步骤(3)中,所述暗发酵产氢菌种的接种量为:菌种的种子培养液占整个发酵体积的 $10\%$  (v/v),并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于 $2.0\text{g/L}$ 。

[0035] 15. 如段落1-14中任一项所述的方法,其中,步骤(3)中,所述暗发酵的发酵溶液温度为 $30^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 。

[0036] 16. 如段落 1-15 中任一项所述的方法,其中,步骤(3)中,所述暗发酵溶液的 pH 值为 6.0 ~ 7.0。

[0037] 17. 如段落 1-16 中任一项所述的方法,其中,在将步骤(3)得到的暗发酵尾液沉淀、离心后,用去离子水稀释 2-6 倍。

[0038] 18. 如段落 1-17 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵产氢菌种为选自于红螺菌属、红假单胞菌属或红杆菌属细菌的一种或几种。

[0039] 19. 如段落 1-18 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵产氢菌种为选自于深红红螺菌、沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红杆菌中的一种或几种。

[0040] 20. 如段落 1-19 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵培养基为: 0.5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.6g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.2g/L  $\text{NaCl}$ 、0.2g/L  $\text{MgSO}_4$ 、0.05g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.0g/L  $\text{NaHCO}_3$ 、1.87g/L 谷氨酸钠、1.0mL 维生素液、以及 1.0mL 微量元素液;其中,所述微量元素液的成分为:2.0g/L  $\text{EDTA-2Na}$ 、2.0g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L  $\text{ZnCl}_2$ 、0.05g/L  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、以及 0.02g/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;所述维生素液的成分为:0.1g/L 生物素、0.35g/L 烟酸、0.2g/L 对氨基甲苯、0.1g/L 泛酸钙、以及 0.05g/L 维生素 B12。

[0041] 21. 如段落 1-20 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,按照与任选稀释后的暗发酵尾液相等的体积加入光发酵培养基。

[0042] 22. 如段落 1-21 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵产氢菌种的接种量为:菌种的种子培养液占整个发酵体积的 10% (v/v),并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于 2.0g/L。

[0043] 23. 如段落 1-22 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵的发酵溶液温度为 28°C ~ 35°C。

[0044] 24. 如段落 1-23 中任一项所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵的 pH 值为 6.0 ~ 7.0。

[0045] 25. 如段落 1 所述的方法,其中,步骤(4)中,所述光发酵的光照度为 2000lux ~ 10000lux。

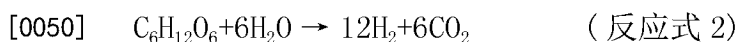
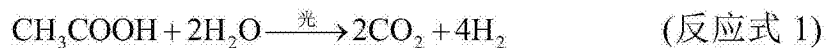
[0046] 有益效果

[0047] 本发明的微波酸消解步骤使用酸溶液协同微波加热来消解纤维素生物质,利用微波离子传导和极性分子转动加热原理,采用物质内外部同时加热方式,具有加热速度快并且均匀的特点,协同稀酸溶液处理消解纤维素类生物质,高效破坏生物质的表面结构及内部的纤维素——半纤维素——木质素复合结构,使半纤维素和木质素充分断裂溶解,降低纤维素的结晶度,将部分半纤维素分解成木糖、甘露糖等单糖,同时使纤维素充分与纤维素酶接触被降解成葡萄糖。这样的处理方法所需时间短,只有 5-30 分钟,避免稀酸溶液将还原糖中的葡萄糖和木糖进一步降解成 5-羟甲基糠醛、糠醛和甲酸等对后续发酵有害的物质,得到的还原糖可以直接用于后续发酵生产,减少脱毒等工序,简化工艺流程。本发明中采用的微波消解步骤可以在有效的密闭消解空间内实现高温高压的预处理条件。特别地,当微波消解的温度恒定在 100 ~ 150°C,压力为 0.2 ~ 0.8MPa(表压)时,还原糖的产率可达到约 600mg/g 纤维素。不同于普通的微波炉的在敞开空间中非恒温加热,本发明利用微波加热消解仪不但易于控制,且能够实现显著提高的纤维素降解效率和还原糖得率。此外,与传统的蒸汽和水浴加热相比,本发明的微波消解步骤在密闭容器中进行,能耗低,条件相

对温和,反应时间短,降低生产成本。

[0048] 另一方面,本发明通过利用暗发酵与光发酵耦合的两步产氢,显著提高了发酵过程的整体产氢率、产氢速率、底物利用率和能量转化效率。光发酵的进行使得暗发酵尾液中的小分子有机酸等副产物几乎被全部利用,极大地降低了生物制氢过程中的污染物排放。具体而言,暗发酵结束后,光发酵产氢步骤所使用的光发酵细菌在光照条件下可以利用暗发酵尾液中残留的乙酸、丁酸等小分子有机酸副产物进行再次发酵,生成  $H_2$  和  $CO_2$  (反应式 1)。暗发酵与光发酵耦合的两步产氢法可以将己糖的理论产氢率从单纯暗发酵的  $4\text{mol } H_2/\text{mol}$  六碳糖提高到  $12\text{mol } H_2/\text{mol}$  六碳糖 (反应式 2),突破性地提高了整体发酵过程的理论和实际产氢率。

[0049]



## 附图说明

[0051] 图 1 是根据本发明方法的工艺流程图。

## 具体实施方式

[0052] 下文将详细阐述本发明。

[0053] 本发明装置中的暗发酵反应器为现有技术的常规反应器,如塞流式反应器 (PFR)、完全混合式反应器 (CSTR)、厌氧接触反应器 (ACR)、升流式厌氧污泥床 (UASB)、升流式固体反应器 (USR)、膨胀颗粒污泥床 (EGSB)、内循环厌氧反应器 (IC)、外循环厌氧反应器 (EC)、厌氧序批间歇式反应器 (ASBR)、折流式反应器 (ABR)、厌氧滤器 (AF)、纤维填料床 (FPB)、复合厌氧反应器 (UBF)、厌氧流化床 (FBR)、厌氧膨胀床 (ESB)、干发酵反应器 (DA),或本领域已知的其它适合进行暗发酵反应的装置。

[0054] 本发明装置中的光发酵反应器为封闭式光生物反应器,可以是柱状式光生物反应器或管状式光生物反应器、板式光生物反应器、光源内置发酵罐式光生物反应器或光纤光生物反应器,优选光源内置发酵罐式光生物反应器,或本领域已知的其它适合进行光发酵反应的装置。

[0055] 对于本发明的微波酸消解步骤 (1),本领域技术人员可根据本说明书的记载,适当地选择纤维素类生物质的种类、稀酸溶液及其加入量、以及相应的消解条件。在本发明的一个实施方式中,纤维素类生物质为富含纤维素的草本植物、其部分或其工业处理废弃物,包括但不限于玉米、小麦、水稻和甘蔗等农作物及野生草本植物的秸秆,以及玉米芯、甘蔗渣、水葫芦等富含纤维素的各种工业废弃物。在本发明的一个实施方式中,所述烘干粉碎后,纤维素类生物质的粒径为  $\leq 1\text{mm}$ 。在本发明的一个实施方式中,所述稀酸溶液为:浓度为  $0.1\text{wt}\% - 5.0\text{wt}\%$  的盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、硒酸、高氯酸、氟化氢、溴化氰或碘化氢中的一种或多种。在本发明的一个实施方式中,烘干粉碎后的纤维素类生物质的干重与稀酸溶液的质量比为  $1:100 \sim 10:100$ 。在一个实施方式中,所述微波加热在  $100 \sim 150^\circ\text{C}$  的温度、 $0.2 \sim 0.8\text{MPa}$  的压力下进行  $5 \sim 30$  分钟。在优选的实施方式中,将所述烘干粉碎后的纤维素类生物质与稀酸溶液混合后立即进行所述微波加压加热辅助酸消解。使得微波加热处理



与酸溶液处理协同进行能够提高生物质的消解效率。

[0056] 对于本发明的酶水解步骤(2),本领域技术人员可根据本说明书的记载,适当地选择纤维素酶加入量以及相应的酶水解条件。在一个实施方式中,在进行步骤(1)的微波酸消解后,将获得的消解液的pH调整至4.0~5.0。所述pH调整可使用本领域惯用的碱,例如但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂、氢氧化钡、氢氧化锰、氢氧化锌、碳酸钠、碳酸钾、碳酸锂溶液或氨水中的一种或多种等。在一个实施方式中,所加入的纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为0.5:100.0~5.0:100.0。在一个实施方式中,酶水解的温度为35~45℃。在一个实施方式中,酶水解的时间为48~96小时。

[0057] 对于本发明的暗发酵产氢步骤(3),本领域技术人员可根据本说明书的记载适当地选择暗发酵培养基的组成、暗发酵培养基加入量、暗发酵产氢菌种的种类、暗发酵产氢菌种的接种量以及相应的暗发酵条件等。在本发明的一个实施方式中,暗发酵培养基的组成为:4g/L 蛋白胨、0.5g/L L-半胱氨酸、4g/L NaCl、0.1g/L MgCl<sub>2</sub>、0.1g/L FeCl<sub>2</sub>、1.5g/LK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10mL 维生素液、以及10mL 微量元素液;其中,所述维生素液的成分为:0.025g/L 抗坏血酸、0.02g/L 柠檬酸、0.01g/L 叶酸、以及0.01g/L 对氨基苯甲酸;所述微量元素液的成分为:0.01g/L MnCl<sub>2</sub>、0.05g/L ZnCl<sub>2</sub>、0.01g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.01g/L CaCl<sub>2</sub>以及0.01g/L AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>。在本发明的一个实施方式中,按照与酶水解步骤(2)后得到的溶液相等的体积加入暗发酵培养基。在本发明的一个实施方式中,暗发酵产氢菌种为选自于由丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*) 巴氏梭菌(*Clostridium barati*)、嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermophilus*)所组成的组中的一种或几种。在本发明的一个实施方式中,暗发酵产氢菌种的接种量为:菌种的种子培养液占整个发酵体积的10%(v/v),并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于2.0g/L。在本发明的一个实施方式中,暗发酵的发酵溶液温度为30℃~37℃。在本发明的一个实施方式中,暗发酵的发酵溶液pH值为6.0~7.0。

[0058] 对于本发明的光发酵产氢步骤(4),本领域技术人员可根据本说明书的记载适当地选择暗发酵尾液的稀释程度、光发酵培养基的组成、光发酵培养基的加入量、光发酵产氢菌种的种类、光发酵产氢菌种的接种量以及相应的光发酵条件等。在本发明的一个实施方式中,在将步骤(3)得到的暗发酵尾液沉淀、离心后,用去离子水稀释2~6倍。在本发明的一个实施方式中,所述光发酵培养基为:0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.6g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2g/L NaCl、0.2g/L MgSO<sub>4</sub>、0.05g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、2.0g/L NaHCO<sub>3</sub>、1.87g/L 谷氨酸钠、1.0mL 维生素液、以及1.0mL 微量元素液;其中,所述微量元素液的成分为:2.0g/L EDTA-2Na、2.0g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1g/L ZnCl<sub>2</sub>、0.05g/L Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.1g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、以及0.02g/L NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O;所述维生素液的成分为:0.1g/L 生物素、0.35g/L 烟酸、0.2g/L 对氨基甲苯、0.1g/L 泛酸钙、以及0.05g/L 维生素B12。在本发明的一个实施方式中,按照与稀释后的暗发酵尾液相等的体积加入光发酵培养基。在本发明的一个实施方式中,光发酵产氢菌种选自于红螺菌属(*Rhodospirillum*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*) 和红杆菌属(*Rhodobacter*),例如但不限于深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)、荚膜红假单胞菌(*Rhodopseudomonas capsulata*)、球形红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)中的一种或几种。在本发明的一个实施方式中,光发酵产氢菌种的接种量为:

菌种的种子培养液占整个发酵体积的 10% (v/v), 并且所述种子培养液中所述菌种种子的浓度不低于 2.0g/L。在本发明的一个实施方式中, 光发酵的发酵溶液温度为 28℃~35℃。在本发明的一个实施方式中, 光发酵 pH 值为 6.0~7.0。在本发明的一个实施方式中, 光发酵的光照度为 2000lux~10000lux。

[0059] 实施例

[0060] 借助于下述实施例可更好地理解本发明, 这些实施例仅用于举例说明本发明, 不应被解释为对本发明的限制。

[0061] 本发明实施例使用的纤维素酶为美国 Sigma-Aldrich 公司 C1794 型号, 小麦秸秆取自北京市郊区农户、玉米秸秆取自北京市郊区农户、水葫芦取自北京市郊区公共水域, 本发明实施例中使用的微波加热消解仪为上海屹尧仪器科技发展有限公司 WX-8000 型号, 光照采用上海博迅实验有限公司 SPX-300I-G 型号微电脑光照培养箱。

[0062] 本发明实施例使用的暗发酵反应器为内循环厌氧反应器; 光发酵反应器为封闭式光生物反应器。

[0063] 本发明实施例所采用的菌株来源为:

[0064] 丁酸梭菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 20036;

[0065] 产气肠杆菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 20051;

[0066] 阴沟肠杆菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 10450;

[0067] 沼泽红假单胞菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 15007;

[0068] 球形红杆菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 18626;

[0069] 荚膜红假单胞菌: 浙江省微生物研究所, 编号为 13366。

[0070] 在以下的实施例和对比例中, 如果没有其它特别说明, 所使用的暗发酵培养基和光发酵培养基的组成如下:

[0071] 暗发酵培养基: 4g/L 蛋白胨、0.5g/L L-半胱氨酸、4g/L NaCl、0.1g/L MgCl<sub>2</sub>、0.1g/L FeCl<sub>2</sub>、1.5g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10mL 维生素液、以及 10mL 微量元素液; 其中, 所述维生素液的成分为: 0.025g/L 抗坏血酸、0.02g/L 柠檬酸、0.01g/L 叶酸、以及 0.01g/L 对氨基苯甲酸; 所述微量元素液的成分为: 0.01g/L MnCl<sub>2</sub>、0.05g/L ZnCl<sub>2</sub>、0.01g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.01g/L CaCl<sub>2</sub> 以及 0.01g/L AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>。

[0072] 光发酵培养基: 0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.6g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2g/L NaCl、0.2g/L MgSO<sub>4</sub>、0.05g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、2.0g/L NaHCO<sub>3</sub>、1.87g/L 谷氨酸钠、1.0mL 维生素液、以及 1.0mL 微量元素液; 其中, 所述微量元素液的成分为: 2.0g/L EDTA-2Na、2.0g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1g/L ZnCl<sub>2</sub>、0.05g/L Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.1g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、以及 0.02g/L NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 所述维生素液的成分为: 0.1g/L 生物素、0.35g/L 烟酸、0.2g/L 对氨基甲苯、0.1g/L 泛酸钙、以及 0.05g/L 维生素 B12。

[0073] 在本发明各实施例中, 根据公式 1 计算产氢率:

[0074] 产氢率 = (步骤 (3) 产生气体的体积 (mL) × 步骤 (3) 气相产物中氢气的体积浓度 (%) + 步骤 (4) 产生气体的体积 (mL) × 步骤 (4) 气相产物中氢气的体积浓度 (%) ) / 底物总可挥发性固体重量 (Total validatessolid, TVS) (g) (公式 1)

[0075] 在本发明各实施例中, 根据如下方法测定发酵尾液中的有机酸:

[0076] 使用带有氢火焰离子检测器 (FID) 的气相色谱仪 (GC, 型号: Thermo Finigan

Trace 2000, 美国) 来测定液相成分及其含量。气相色谱仪中的色谱柱型号为 DB-Waxtre ( $\phi 5\text{mm} \times 2\text{m}$ ), 实验中程序升温方法: 初始温度  $50^\circ\text{C}$ , 保持 2min, 升温速率为  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , 终止温度为  $210^\circ\text{C}$ , 停留 2min。运行时载气为 He, 流量为  $50\text{ml}/\text{min}$ ;  $\text{H}_2$  和空气流量分别为  $35\text{ml}/\text{min}$  和  $350\text{ml}/\text{min}$ , 检测器温度为  $280^\circ\text{C}$ , 柱温为  $240^\circ\text{C}$ 。测试样 pH 调至 2.0 左右, 进样量为  $1.0\ \mu\text{l}$ 。实验中标准溶液中含有浓度为 0.05% (V/V) 的乙醇、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸, 测试样品得到相应色谱图后, 通过出峰时间和峰面积对比得到发酵液各成分及其含量。

[0077] 在本发明各实施例中, 根据如下方法测定微波酸消解获得的消解液中的还原糖浓度:

[0078] 使用带有葡萄糖酶膜的生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所 SBA-40E) 来测定还原糖浓度。首先通过进  $20\ \mu\text{L}$  标样 ( $100\text{mg}/100\text{mL}$  葡萄糖溶液) 对仪器进行标定, 然后再进  $20\ \mu\text{L}$  待检测样品测定还原糖浓度。如果待检测样品中的还原糖浓度高于  $100\text{mg}/100\text{mL}$ , 则通过添加去离子水, 将还原糖浓度稀释至低于  $100\text{mg}/100\text{mL}$  时再进行测定。

[0079] 实施例 1: 利用小麦秸秆制取氢气

[0080] (1) 微波酸消解: 将烘干粉碎后的小麦秸秆 (粒径  $\leq 1\text{mm}$ ) 与浓度为 0.5wt% 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液按照纤维素类生物质的干重与  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液的质量比为 4:100 的比例混合, 在微波加热消解仪中于  $135^\circ\text{C}$ 、压力为  $0.2 \sim 0.7\text{MPa}$  的条件下加压加热消解 10 分钟。

[0081] (2) 酶水解: 使用  $6\text{mol}/\text{L}$  氢氧化钠将步骤 (1) 得到的消解液的 pH 调至 4.3, 按照纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为 2:100 在消解液中加入纤维素酶,  $45^\circ\text{C}$  下酶水解 68 小时。对酶解后溶液中的还原糖浓度进行测定 (表 1)。

[0082] (3) 暗发酵产氢: 在暗发酵反应器中加入步骤 (2) 酶水解后的溶液, 按照暗发酵培养基与酶水解后溶液为 1:1 的体积比加入暗发酵培养基, 随后接入暗发酵产氢菌种, 所述暗发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%; 所述暗发酵产氢菌种为丁酸梭菌, 控制暗发酵的发酵溶液温度为  $35^\circ\text{C}$ , 暗发酵 pH 值为 7.0, 保持黑暗厌氧环境, 进行暗发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物 (主要为  $\text{H}_2$ 、 $\text{CO}_2$ ), 液相产物为暗发酵尾液, 所述暗发酵尾液中含有乙酸、丁酸等小分子有机酸。

[0083] (4) 光发酵产氢: 以转速为  $8000\text{rpm}$  对步骤 (3) 的暗发酵尾液沉淀离心 10 分钟, 并用去离子水稀释 3 倍, 随后按照光发酵培养基与稀释后的暗发酵尾液为 1:1 的体积比加入光发酵培养基, 并接入光发酵产氢菌种。所述光发酵产氢菌种为沼泽红假单胞菌, 所述光发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%; 控制光发酵的发酵溶液温度为  $30^\circ\text{C}$ , 光发酵 pH 值为 7.0, 光照度为  $6000\text{lux}$ , 保持厌氧环境, 进行光发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物 (主要为  $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$ )。

[0084] (5) 纯化: 将步骤 (3) 和步骤 (4) 的气相产物合并, 并对  $\text{H}_2$  进行纯化, 获得  $\text{H}_2$  产品。

[0085] 本实施例步骤 (2) 的暗发酵尾液中的乙酸、丁酸等小分子有机酸几乎被全部利用。本实施例得到产氢率为  $536\text{ml}/\text{g TVS}$ 。

[0086] 实施例 2: 利用玉米秸秆制取氢气

[0087] (1) 微波酸消解: 将烘干粉碎后的玉米秸秆 (粒径  $\leq 1\text{mm}$ ) 与浓度为 1.0wt% 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液按照纤维素类生物质的干重与  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液的质量比为 2:100 的比例混合, 在微波

加热消解仪中于 140℃、压力为 0.2 ~ 0.75MPa 的条件下加压加热消解 15 分钟。

[0088] (2) 酶水解:使用 6mol/L 氢氧化钠将步骤 (1) 得到的消解液的 pH 调至 4.0,按照纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为 5:100 在消解液中加入纤维素酶,40℃下酶水解 72 小时。

[0089] (3) 暗发酵产氢:在暗发酵反应器中加入步骤 (2) 酶水解后的溶液,按照暗发酵培养基与酶水解后溶液为 1:1 的体积比加入暗发酵培养基,随后接入暗发酵产氢菌种,所述暗发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%;所述暗发酵产氢菌种为产气肠杆菌,控制暗发酵的发酵溶液温度为 32℃,暗发酵 pH 值为 6.0,保持黑暗厌氧环境,进行暗发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物(主要为 H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>),液相产物为暗发酵尾液,所述暗发酵尾液中含有乙酸、丁酸等小分子有机酸。

[0090] (4) 光发酵产氢:以转速为 8000rpm 对步骤 (3) 的暗发酵尾液沉淀离心 10 分钟,并用去离子水稀释 3 倍,随后按照光发酵培养基与稀释后的暗发酵尾液为 1:1 的体积比加入光发酵培养基,并接入光发酵产氢菌种。所述光发酵产氢菌种为球形红杆菌,所述光发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%;控制光发酵的发酵溶液温度为 28℃,光发酵 pH 值为 6.0,光照度为 8000lux,保持厌氧环境,进行光发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物(主要为 H<sub>2</sub>和 CO<sub>2</sub>)。

[0091] (5) 纯化:将步骤 (3) 和步骤 (4) 的气相产物合并,并对 H<sub>2</sub>进行纯化,获得 H<sub>2</sub>产品。

[0092] 本实施例步骤 (2) 的暗发酵尾液中的乙酸、丁酸等小分子有机酸几乎被全部利用。本实施例得到产氢率为 596ml/g TVS。

[0093] 实施例 3:利用水葫芦制取氢气

[0094] (1) 微波酸消解:将烘干粉碎后的水葫芦(粒径 ≤ 1mm)与浓度为 3.0wt% 的 HCl 溶液按照纤维素类生物质的干重与 HCl 溶液的质量比为 4:100 的比例混合,在微波加热消解仪中于 130℃、压力为 0.2 ~ 0.6MPa 的条件下加压加热消解 25 分钟。

[0095] (2) 酶水解:使用 6mol/L 氢氧化钾将步骤 (1) 得到的消解液的 pH 调至 4.8,按照纤维素酶与纤维素类生物质的干重的质量比为 2.5:100 在消解液中加入纤维素酶,45℃下酶水解 80 小时。

[0096] (3) 暗发酵产氢:在暗发酵反应器中加入步骤 (2) 酶水解后的溶液,按照暗发酵培养基与酶水解后溶液为 1:1 的体积比加入暗发酵培养基,随后接入暗发酵产氢菌种,所述暗发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%;所述暗发酵产氢菌种为阴沟肠杆菌,控制暗发酵的发酵溶液温度为 36℃,暗发酵 pH 值为 6.5,保持黑暗厌氧环境,进行暗发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物(主要为 H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>),液相产物为暗发酵尾液,所述暗发酵尾液中含有乙酸、丁酸等小分子有机酸。

[0097] (4) 光发酵产氢:以转速为 8000rpm 对步骤 (3) 的暗发酵尾液沉淀离心 10 分钟,并用去离子水稀释 3 倍,随后按照光发酵培养基与稀释后的暗发酵尾液为 1:1 的体积比加入光发酵培养基,并接入光发酵产氢菌种。所述光发酵产氢菌种为荚膜红假单胞菌,所述光发酵产氢菌种的接种量是整个发酵体积的 10%;控制光发酵的发酵溶液温度为 32℃,光发酵 pH 值为 6.5,光照度为 3000lux,保持厌氧环境,进行光发酵产氢。不再产生氢气视为发酵结束。发酵结束后收集气相产物(主要为 H<sub>2</sub>和 CO<sub>2</sub>)。

[0098] (5) 纯化:将步骤 (3) 和步骤 (4) 的气相产物合并,并对 H<sub>2</sub>进行纯化,获得 H<sub>2</sub>产品。

[0099] 本实施例步骤 (2) 的暗发酵尾气中的乙酸、丁酸等小分子有机酸几乎被全部利用。本实施例得到产氢率为 512ml/g TVS。

[0100] 对比例 1

[0101] 采用类似非专利文献 2 中的微波炉处理 (高火 6min) 代替微波加热消解处理, 并采用与实施例 1 相同的酶水解、暗发酵产氢和光发酵产氢、纯化的步骤。对酶水解还原糖的浓度进行测定。结果如表 1 所示。

[0102] 对比例 2

[0103] 不进行微波处理, 仅采用 0.5wt% 的  $H_2SO_4$  溶液对烘干粉碎后的小麦秸秆进行处理 10 分钟。并采用与实施例 1 相同的酶水解、暗发酵产氢和光发酵产氢、纯化的步骤。对酶水解还原糖的浓度进行测定。结果如表 1 所示。

[0104] 对比例 3

[0105] 不进行酸处理, 仅在微波加热消解仪中以 135℃、压力为 0.2 ~ 0.7MPa 的条件加压加热消解 10 分钟, 并采用与实施例 1 相同的酶水解、暗发酵产氢和光发酵产氢、纯化的步骤。对酶水解还原糖的浓度进行测定。结果如表 1 所示。

[0106] 对比例 4-7

[0107] 与实施例 1 采用相同的步骤, 根据表 1 示出的参数分别改变改变加热温度和加热时间, 对酶水解后溶液中的还原糖的浓度进行测定。结果如表 1 所示。

[0108] 表 1 各处理的参数和结果

[0109]

	微波处理 方式	酸处 理	温度(℃)	压力(MPa)	加 热 时 间 (min)	还原糖含量 (mg/g 纤维 素类物质)
实 施 例 1	微波加热 消解仪	有	135	0.2~0.7	10	615
对 比 例 1	微波炉	有	N/A	N/A	6	382
对 比 例 2	无	有	N/A	N/A	10	324
对 比 例 3	微波加热 消解仪	无	135	0.2~0.7	10	172
对 比 例 2	微波加热 消解仪	有	90	0.05~0.4	15	528
对 比 例 3	微波加热 消解仪	有	180	0.4~1.0	15	575
对 比 例 4	微波加热 消解仪	有	120	0.2~0.5	3	526
对 比 例 5	微波加热 消解仪	有	120	0.2~0.5	45	543

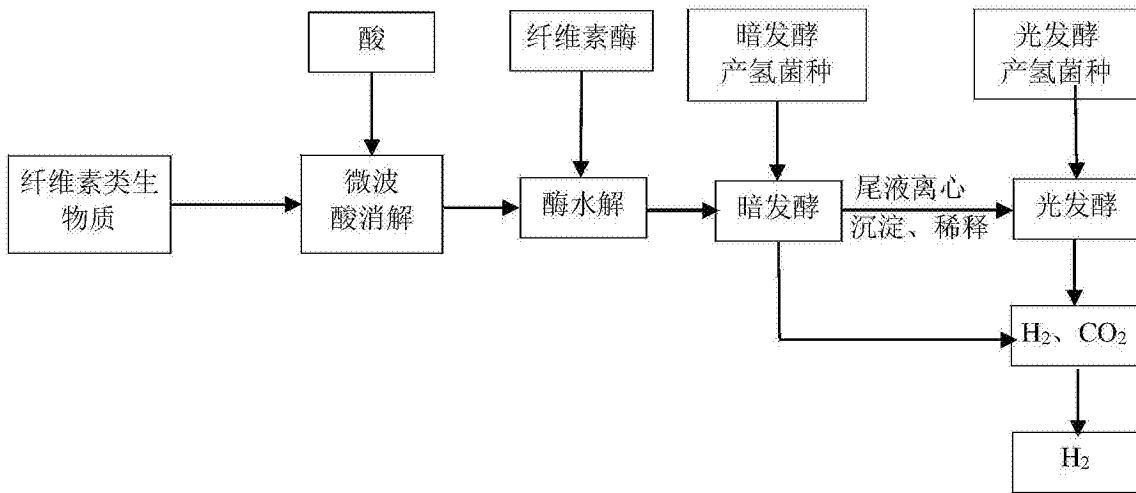


图 1