

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.09.018

基于响应面法的秸秆与粪便联合制氢预混工艺优化*

张志萍 周雪花 冯宜鹏 王艳锦 张全国

(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)

摘要: 借助 Design-Expert (version 8.0) 软件, 采用 Box-Behnken 试验设计法及响应面分析法, 对食草性牲畜粪便与秸秆利用光合微生物进行联合制氢的预混工艺进行优化研究。设定三因素三水平的响应面试验, 三因素为 pH 值、预混温度、预混时间, 响应值为 OD 值, 零点试验进行 3 次。使用 Design-Expert 软件对响应面试验数据进行回归分析, 结果表明, 响应面模型中二次方模型表达最准确, 三因素间存在显著相关性, 通过回归方程的修正得到优化后的预混工艺为: 时间 6.3 d, pH 值 4.9, 温度 48℃, 预估计最大 OD 值为 2.6968, 预测值与验证试验平均值接近。

关键词: 秸秆 纤维素分解菌 联合制氢 预混工艺 响应面分析

中图分类号: S216 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2013)09-0097-05

Optimization of Premixing Process of Joint Hydrogen Production by Straw and Manure Based on Response Surface Method

Zhang Zhiping Zhou Xuehua Feng Yipeng Wang Yanjin Zhang Quanguo

(Key Laboratory of New Materials and Facilities for Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to optimize the premixing process of the herbivorous livestock manure and straw for joint photosynthetic microorganisms hydrogen production, the method of Box-Behnken experimental design and response surface analysis were used with Design-Expert software. The response surface experiments contained three factors, such as pH value, premixed temperature and premixed time. Response value was OD value and zero point experiments proceed three times. The response surface experiment data were analyzed by Design-Expert software, and the results showed that the quadratic model was the most accurate expression. The three factors existed significant correlation. The premixing process was optimized by the amendment of the regression equation: time of 6.3 d, the pH value of 4.9, temperature of 48℃, the estimated maximum OD value of 2.6968. The predicted value was closed to the average value of the validation test. The results provided a theoretical basis for the experimental study of photosynthetic microorganism hydrogen production.

Key words: Straw Cellulose decomposition bacteria Joint hydrogen production Premixing process Response surface analysis

引言

中国是一个农业大国, 秸秆资源非常丰富, 每年三大主要农作物的秸秆总产量达 5 亿吨左右, 其中玉米秸秆占 32.43%^[1~2], 秸秆的资源化利用在当

前能源紧缺和环境恶化的背景下备受关注。秸秆类生物质的转化主要采用热化学和生物学技术, 为了解决能效低的问题, 具有产氢效率高等优点的细菌光合制氢等技术正在积极尝试中^[3~4]。氢具有燃烧热值高、清洁无污染等优点, 是最具发展前景的理想

收稿日期: 2013-03-22 修回日期: 2013-04-03

* 国家自然科学基金资助项目(50976029)和国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA05Z119、2012AA051502)

作者简介: 张志萍, 博士生, 主要从事可再生能源研究, E-mail: zhangzhiping715@163.com

通讯作者: 张全国, 教授, 博士生导师, 主要从事农业生物环境与能源工程研究, E-mail: zquanguo@163.com

能源^[5-7]。大多数生物制氢研究仍局限在碳水化合物(如:葡萄糖、淀粉及含糖和淀粉的废水)的研究方面,制氢成本一直居高不下^[8]。利用厌氧发酵预处理技术将秸秆类生物质转化为可再生糖类资源^[9],用于酒精、单细胞蛋白、发酵工业原料等的生产,且能被光合产氢微生物利用进行代谢放氢,在实现废弃物资源化利用的同时,为生物制氢技术提供了一个新的研究方向^[10-11]。

木质素、半纤维素对纤维素的包裹保护作用以及纤维素本身复杂的结晶结构,使得天然纤维素原料直接进行水解时水解程度很低^[12],因此,必须对其进行预处理。目前,对秸秆类生物质的预处理方法的研究主要集中在酸、碱、超声波及微生物预处理等,其中,微生物降解技术是最经济有效的手段^[13-14]。利用粪便中的纤维素分解菌对秸秆进行预混处理,然后与光合微生物联合进行产氢的研究目前还没有报道,因此,对秸秆与粪便的预混工艺进行研究和优化,促进秸秆类生物质中纤维素和半纤维素分解转化后联合制氢的技术成为研究热点。

牛羊等草食性动物肠胃内富含纤维素分解菌等混合菌群,其产生的酶可用来降解纤维素^[15]。本文以牛粪作为秸秆厌氧发酵过程中纤维素分解菌来源,以玉米秸秆为底物,通过两者预混厌氧发酵进行联合产氢。玉米秸秆被分解后生成的糖类物质可被光合微生物有效利用,且成正比关系^[16],因此选择用 DNS 比色法,利用分光光度计测定水解液 OD 值的方法,以 OD 值为考察指标,对秸秆与粪便的预混联合产氢过程中的工艺条件进行响应面优化,分析 pH 值、预混处理时间、预混处理温度这 3 个因素对产氢过程产氢底物还原糖得率的影响,寻求最佳预处理工艺条件。

1 试验

1.1 材料

1.1.1 原料来源与前处理

牛粪采用河南农业大学养牛场的新鲜牛粪,按照粪水体积比 1:10 的比例稀释溶解 48 h,用 0.2 mm 筛子过滤后稀释至 COD 为 5 000 mg/L 的试样。玉米秸秆取自河南农业大学教学试验田,将其粉碎后过筛,选用粒径 0.097 mm 的玉米秸秆粉体,干燥备用。

1.1.2 试剂

酸碱调节剂为 Na_2CO_3 与 6% HCl 溶液。DNS 溶液按照农业部标准 DNS 溶液的配制方法配制;0.05 mol/L 且 pH 值 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,按照文献^[17]中方法进行配制。

1.1.3 仪器设备

分光光度计(安捷伦 HP8453 型,美国安捷伦科技公司);离心机(Anke 牌 TGL-16C 型,上海安亭科学仪器厂);电子天平(FA2004 型,上海民桥精密科学仪器有限公司);生化培养箱(SPX-150B 型,天津泰斯特仪器有限公司);粉碎机(LG-02 型,江苏瑞安市百信药机机械厂);分样筛(40 目、80 目、120 目、160 目分样筛,浙江省上虞市五四仪器筛具厂);高压蒸汽灭菌器(DC-B50L 型,上海医用核子仪器厂);pH 测量仪(Delta320 型,广州德润仪器科技有限公司);无尘工作台(SW-CJ-2A 双人水平流工作台,苏州金信净化设备工程有限公司);加热炉(DL-I-15 型台式封闭电炉,天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.1.4 产氢试验装置

光合菌群产氢试验装置如图 1 所示。产氢时选用容积为 500 mL 的反应瓶,待接入适量的处于对数生长期的光合细菌后,密封固定。将反应瓶置于恒温箱中,为产氢反应提供恒温环境。导气管上有阀门,方便利用氢分析器对不同时段所产氢气进行分析。气体用排水法收集。恒温箱内光源采用均匀分散布置的 40 W 白炽灯,为反应提供合适的光照强度,保证反应瓶内光合细菌受光均匀。

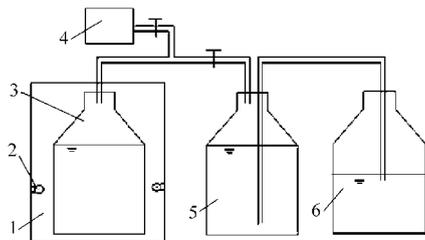


图 1 产氢试验装置图

Fig. 1 Diagram of hydrogen production experimental setup

1. 恒温箱 2. 光源 3. 反应瓶 4. 氢分析器 5. 集气瓶 6. 测量瓶

1.2 方法

1.2.1 DNS 比色法测 OD 值

秸秆与粪便在各因素条件下预混处理后取上清液进行离心,转速设定为 4 000 r/min,离心 15 min。取离心后上清液 0.5 mL 加入 0.5 mL DNS 溶液,煮沸 5 min,冷却加入 4 mL 蒸馏水,以空白管做对照(0.5 mL 蒸馏水 + 0.5 mL DNS),使用分光光度计,在波长 540 nm 条件下测定 OD 值。

1.2.2 菌液 pH 值测定

用酸度计测定反应液的 pH 值,测量前用蒸馏水冲洗酸度计两电极,然后用滤纸吸干电极上残余的溶液(也可以用待测液冲洗电极),将电极浸入放有待测溶液的烧杯中,轻轻摇动烧杯,待溶液混合均

匀后,按下读数开关,指针所指的位置即为待测溶液的 pH 值。重复几次,直到数值稳定为止。

1.2.3 预混工艺响应面优化试验设计

根据粒径大小对 OD 值影响的单因素试验分析可知,随着粒径减小,OD 值逐渐增大,但当粒径减小至 0.097 mm 后,粒径继续减小并不能实现 OD 值显著增长,且从 0.097 mm 粉碎至超微时,消耗大量电能,造成成本激增,因此选用粒径 0.097 mm 的玉米秸秆作为后期试验的产氢底物。将 10 g 粒径 0.097 mm 的玉米秸秆加入 250 mL 稀释后的牛粪底物,预混并振荡溶解 2 h,所用器皿均用高压蒸汽灭菌器进行高温灭菌,不同因素水平试验均在恒温生化培养箱中进行,试验开始后用橡胶瓶塞与玻璃胶进行密封,保证严格厌氧环境。

根据 Box-Behnken 法设定三因素三水平响应面试验,零点试验 3 次,其中 A、B、C 分别表示 pH 值、温度、时间 3 个影响因素编码值,1、0、-1 代表变量编码水平,OD 值 Y 为响应值。使用 Design-Expert (version 8.0) 软件对试验数据进行分析,计算出相关的回归方程,并且预测得出最佳的工艺条件。响应面优化试验编码设置如表 1 所示。

表 1 混合底物试验响应面优化试验编码设置

Tab.1 Codes of response surface analysis

编码水平	pH 值	温度/℃	时间/d
-1	3	35	4
0	5	50	6
1	7	65	8

2 结果与讨论

2.1 响应面试验结果

各因素水平试验结果如表 2 所示。

表 2 响应面试验结果

Tab.2 Results of response surface analysis

试验序号	A	B	C	OD 值
1	1	0	-1	1.257
2	-1	-1	0	1.550
3	1	-1	0	1.369
4	0	1	-1	1.268
5	0	1	1	1.486
6	0	0	0	2.684
7	-1	1	0	1.333
8	0	0	0	2.685
9	1	1	0	1.269
10	0	-1	-1	1.477
11	-1	0	1	1.795
12	0	0	0	2.654
13	0	-1	1	1.889
14	-1	0	-1	1.096
15	1	0	1	1.386

2.2 响应面模型符合度分析

响应面模型中各模型的符合度分析如表 3 所示,表中汇总了响应面模型中各模型的符合度分析计算结果。

模型符合度由失拟项和模型 P 值可以判断。由表 3 可知,线性模型、含有二因素交互作用的线性模型 $P > 0.05$, 表示其不显著,二者失拟项 $P < 0.001$, 表示失拟度较大,模型不准确,与此同时三次方模型与更高次方模型 $P > 0.05$, 表示其不显著,故这几种模型均不合适。二次方模型型 $P < 0.001$, 且失拟项 $P > 0.05$, 说明二次方模型拟合度较好。决定系数 R^2 越大,拟合效果越好,综上,选用二次方模型进行回归分析。

表 3 各模型符合度分析

Tab.3 Analysis of models' conformity

来源	模型 P 值	失拟项 P 值	决定系数 R^2	修正系数 R^2
线性模型	0.768 4	0.000 7	-0.152 8	-0.251 0
二因素交互作用的线性模型	0.976 3	0.000 5	-0.546 7	-0.810 8
二次方模型	<0.000 1	0.057 6	0.989 4	0.941 2
三次方与更高次方模型	0.057 6	0.999 0		

2.3 响应面试验方差分析

由表 4 可知模型 $P < 0.000 1$, 表示模型极显著,模拟效果极好, A、B、C 的 P 均小于 0.05, 表示 A、B、C 3 个因素对还原糖产量的影响均为显著影响,且影响显著程度顺序为: C、B、A, 即时间、温度、pH 值,模型的失拟项 $P > 0.05$, 表示模型失拟度较小,即偏离程度较小,符合选用原则。

表 4 响应面方差分析

Tab.4 Variance analysis of response surface

来源	平方和	自由度	标准方差	F 值	P 值
模型	4.250	7	0.610	146.03	<0.000 1
A	0.030	1	0.030	7.29	0.030 6
B	0.110	1	0.110	25.84	0.001 4
C	0.270	1	0.270	63.85	<0.000 1
AC	0.081	1	0.081	19.52	0.003 1
A ²	1.910	1	1.910	460.59	<0.000 1
B ²	1.210	1	1.210	292.13	<0.000 1
C ²	1.200	1	1.200	289.11	<0.000 1
失拟项	0.028	5	5.694×10^{-3}	18.06	0.053 3
误差	6.305×10^{-4}	2	3.152×10^{-4}		
总和	4.28	14			

2.4 响应面试验回归分析与回归曲线

对试验结果进行多元回归拟合,得到牛粪污水 OD 值 Y 对 pH 值 A、温度 B、预处理时间 C 的二次多项回归模型为: $Y = 2.67 - 0.062A - 0.12B + 0.18C - 0.14AC - 0.72A^2 - 0.57B^2 - 0.57C^2$ 。

对该模型进行检验,模型极显著 ($P < 0.000 1$),

且决定系数 R^2 为 0.996 5, 修正后决定系数 R^2 为 0.989 4, 均接近于 1, 表明其拟合度很好, 符合实际的变化。

2.5 响应面交互作用分析

根据回归模型绘制交互作用等高线图和曲面图如图 2~7 所示。

由图 2 可知, 温度与 pH 值交互作用等高线形状均为椭圆形, 表示此二因素交互作用显著。

图 3 显示了当时间为 6 d 时, 预处理温度与 pH 值的交互作用对底物 OD 值的影响。预处理温度较低时, 随着 pH 值的增大 OD 值缓慢增长, 达到最高点后逐渐减小; 预处理温度适中时, 随着 pH 值的增大 OD 值迅速上升, 达到最高之后又迅速下降; 预处理温度较高时, 随着 pH 值的增大 OD 值缓慢提高, 达到最高点后又缓慢下降。说明在预处理时间确定的情况下, 较低的 pH 值有利于预混处理过程中还原糖得率的提高, 但 pH 值不能低于一定水平。

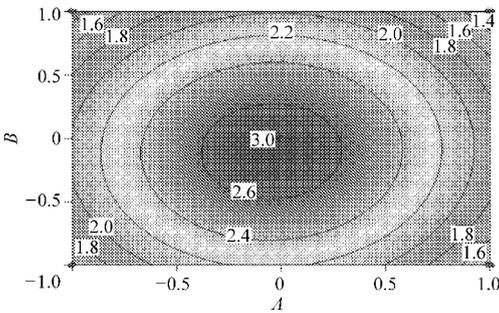


图 2 温度与 pH 值交互作用 2-D 等高线图

Fig. 2 Interaction of temperature and pH value in 2-D contour map

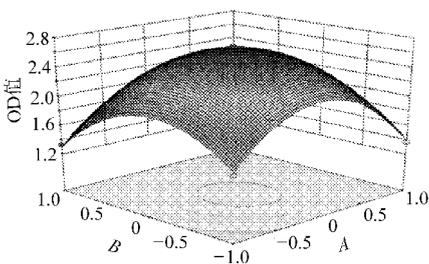


图 3 温度与 pH 值交互作用 3-D 曲面图

Fig. 3 Interaction of temperature and pH value in 3-D model

由图 4 可知, 时间与 pH 值交互作用等高线形状均为椭圆形, 表示此二因素交互作用显著。

图 5 显示了当温度为 50℃ 时, 预处理时间与 pH 值的交互作用对底物 OD 值的影响。在预处理时间较短的条件下, 随着 pH 值的增大 OD 值缓慢上升, 到达最高点后开始下降; 在预处理时间较长的情况下, 随着 pH 值的增大 OD 值迅速上升, 达到最高之后又迅速下降。这说明在较短预处理时间的情况下, 一定范围内, 较低的 pH 值有利于增加预混处理

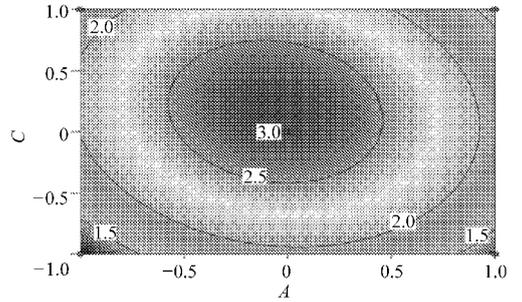


图 4 时间与 pH 值交互作用 2-D 等高线图

Fig. 4 Interaction of time and pH value in 2-D contour map

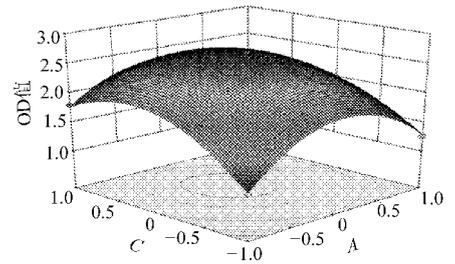


图 5 时间与 pH 值交互作用 3-D 曲面图

Fig. 5 Interaction of time and pH value in 3-D model

过程中的还原糖得率, 但 pH 值过低又会出现抑制作用; 在较长的预处理时间条件下, 一定范围内较低的 pH 值对提高还原糖得率的作用更显著。

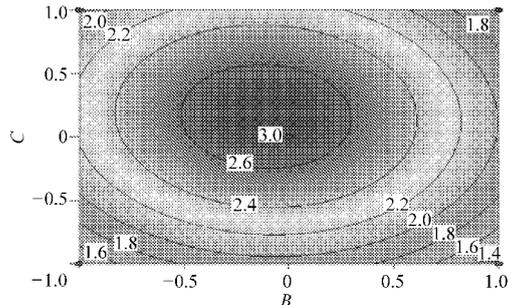


图 6 时间与温度交互作用 2-D 等高线图

Fig. 6 Interaction of temperature and time in 2-D contour map

由图 6 可知, 时间与温度交互作用等高线形状为椭圆形, 表示此二因素交互作用显著。

图 7 显示了当 pH 值为 5 时, 预处理时间与 pH 值的交互作用对底物 OD 值的影响。在预处理时间较短的条件下, 随着温度的升高 OD 值缓慢上升, 达到最高点后又逐渐下降; 在预处理时间较长的情况下, 随着温度的增长 OD 值迅速上升, 到达最高点后又迅速下降。这说明在预处理时间较短的情况下, 一定范围内较低的温度有利于还原糖得率的提高, 但是过低又会起到抑制作用。在预处理时间较长的情况下, 较低温度下对还原糖得率增长的促进作用更显著。

2.6 响应面试验条件优化与验证

综合上述结果, 通过软件分析, 得到混合底物预处理最佳工艺条件为: 时间 6.34 d、pH 值 4.88、温度

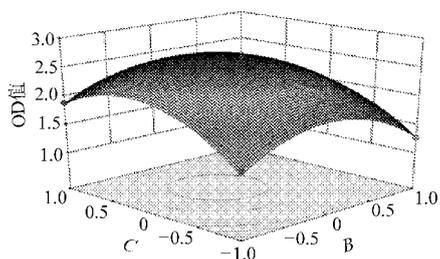


图7 时间与温度交互作用 3-D 曲面图

Fig. 7 Interaction of temperature and time in 3-D model

48. 35℃,考虑到实际操作的简便性,将参数修正为:时间 6.3 d、pH 值 4.9、温度 48℃,预测最高 OD 值为 2.696 8。在此优化后工艺条件下,重新进行秸秆粪便预混处理试验,实际得到的 OD 值为 2.626 3。与预测值仅相差 0.070 5,两者基本一致,因此,基于响

应面法优化所得的混合底物预处理基本参数准确,具有实用性。

3 结论

(1)对牛粪与玉米秸秆联合产氢预混工艺过程进行响应面分析,以粒径 0.097 mm 玉米秸秆为底物,对响应面实验中 pH 值、温度、时间等因素进行三因素三水平编码,按照设定水平进行试验,对试验结果进行分析并修正,得出修正最佳工艺为:时间 6.3 d、pH 值 4.9、温度 48℃。

(2)建立了二次多项回归方程,在回归方程基础上,预估计最大 OD 值为 2.696 8,与实际验证值仅相差 0.070 5,相差极小,证明此回归方程拟合度非常好,为相关试验研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 张志萍,岳建芝,王毅,等.产氢用生物质球磨预处理工艺的优化试验[J].生物质化学工程,2012,46(1):19~22.
Zhang Zhiping, Yue Jianzhi, Wang Yi, et al. The optimization of the ball milling pretreatment process for hydrogen production from straw biomass[J]. Biomass Chemical Engineering, 2012,46(1):19~22. (in Chinese)
- 2 何曼妮,李秀金,田立斌,等.不同粒径玉米秸秆的中温厌氧消化性能[C]//2012年中国沼气学会学术年会论文集,2012:63~68.
- 3 尤希凤,郭新勇.生物制氢技术的研究现状及发展趋势[J].河南化工,2003(10):4~6.
You Xifeng, Guo Xinyong. Development trend and present situation of hydrogen production by biotechnology[J]. Henan Chemical Industry, 2003(10):4~6. (in Chinese)
- 4 张全国,尤希凤.生物制氢技术研究现状及其进展[J].生物质化学工程,2006,40(1):27~31.
Zhang Quanguo, You Xifeng. The present situation and research progress in bio-hydrogen production technology[J]. Biomass Chemical Engineering, 2006,40(1):27~31. (in Chinese)
- 5 杨游.秸秆资源的开发现状与趋势[J].畜禽业,2006(8):27~29.
Yang You. The exploitative status and the trend of straw[J]. Livestock and Poultry Industry, 2006(8):27~29. (in Chinese)
- 6 胡代泽.我国农作物秸秆资源的利用现状与前景[J].资源开发与市场,2000,16(1):19~20.
- 7 Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological process: a survey of literature[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2001,26(1):13~28.
- 8 三宅淳.利用光合作用细菌制氢[J].王伟廉,译.新能源,1991,13(3):48~52.
- 9 周善元.21世纪的新能源——生物质能[J].江西能源,2001(4):34~37.
Zhou Shanyuan. The biological energy—the new energy of the 21th century[J]. Jiangxi Energy, 2001(4):34~37. (in Chinese)
- 10 Momirlan M, Veziroglu T N. Recent directions of world hydrogen production[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 1999,3(3):219~231.
- 11 Mizumo O, Dinsdale R, Hawkes F R, et al. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas spring[J]. Bioresource Technology, 2000,73(1):59~65.
- 12 蔡彦,马玉龙,谢丽,等.不同预处理方法对麦草纤维素酶解效果的影响[J].可再生能源,2010,28(3):72~75.
Cai Yan, Ma Yulong, Xie Li, et al. Comparative study on pretreatment of wheat straw cellulose with compound method[J]. Renewable Energy Resources, 2010,28(3):72~75. (in Chinese)
- 13 王素兰,于鲁冀.光合产氢菌群生长特性的研究[J].安徽农业科学,2008,36(31):13 508~13 510.
Wang Sulan, Yu Lujie. Study on growth characteristics of PSB group[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(31): 13 508~13 510. (in Chinese)
- 14 王平,王朋朋,左瑞雨,等.牛瘤胃中米曲霉的分离鉴定及对玉米秸秆降解效果的研究[J].河南农业大学学报,44(3):295~299.
Wang Ping, Wang Pengpeng, Zuo Ruiyu, et al. Study on isolation and identification of Aspergillus oryzae from bovine rumen and analysis of its effect on corn straw degradation[J]. Journal of Henan Agricultural University, 44(3):295~299. (in Chinese)
- 15 江平.秸秆饲料的营养特点及利用[J].四川畜牧兽医,2004,31(11):24~25.
Jiang Ping. The Nutrient Trait of Straw Feed and Its Utilization[J]. Sichuan Animal & Veterinary Sciences, 2004, 31(11):24~25. (in Chinese)
- 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 the feasibility study of hydrogen production [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- 17 蒋琼凤,张金金,周斌,等.一株产纤维素酶真菌的筛选和诱变[J].湖南农业科学,2010(11):24~27.
Jiang Qiongfeng, Zhang Jinjin, Zhou Bin, et al. Screening and mutation of a strain of cellulase-producing fungus[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(11):24~27. (in Chinese)