

薯芋厌氧发酵产氢的研究*

马最瑶 徐成基

(中国科学院成都生物研究所)

薯芋是野生植物,根茎中含有皂素,是制取甾体激素类药物的重要药源^[1-2]。我所在沼气发酵研究中发现^[3],在污泥的富集培养物中,添加4—6%的薯芋粉,能大量地产氢,并分离到几株产氢菌株。本文主要报道薯芋产氢及皂素综合利用的结果。

材料与方 法

1. 样品: 四川绵阳栽培的盾叶薯芋 (*Dioscorea Zingiberensis* Wright), 试验用其鲜根,绝干重为27%。

2. 菌株: 我所分离的产氢菌株,共6株,

属于肠杆菌科 (Enterbacteriaceae) 和芽孢杆菌科 (Bacillaceae)。

3. 培养基: (1) 斜面培养基 (%): 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 1.5—2。种子培养基 (%): $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.11, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0214, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.052, NH_4Cl 0.075, 95% 乙醇 2.1, 添加3% 去氧剂 (%): $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1, Na_2CO_3 (无水) 5。(2) 发酵培养基: 为2.7%的薯芋根粉悬浮液。

4. 发酵: 容器为500, 3000ml 瓶改装(图

* 气体组分由陈忠余同志测定, 红外、熔点由中心实验室测定, 产氢菌株由本所沼气组提供。

1)盛 3000ml 培养基,接种量 10% (V/V),每 菌种子液,其种龄 24 小时,35℃ 厌氧发酵 30 日选出料各 1000ml, pH6.8—7.0。小时结果见图 2。

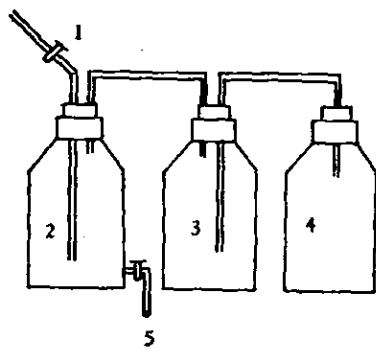


图 1 厌氧发酵装置

1.加液管;2.发酵瓶;3.贮气瓶;4.贮水瓶;5.放液管

5.测定: 用排水吸气法收集气体,SP-2305 型气相色谱仪测气体组分及发酵液中挥发性成分。雷磁 25 型酸度计测 pH 及氧化还原电势 (ORP)。岛津 IR-27 型红外光谱仪测红外光谱。Gallenkamp 仪测熔点,用丘林法和凯氏定氮法测薯芋 C:N=32:1,用 W. J. Rothrock 的直接酸水解法原理,测发酵渣皂素含量^[4],二硝基水杨酸法测还原糖。

结果与讨论

一、薯芋厌氧发酵产氢菌株的筛选

在薯芋基质上,不同的菌株,产气量及氢含量都有较大差异,混合菌株优于单一菌株,看来混合菌株在提高氢气含量上,有相辅作用,有趣的是,所有菌株都不产生甲烷气(表 1)。

二、批量厌氧发酵产氢效果

在 3000ml 薯芋发酵液中,接种 300ml 混合

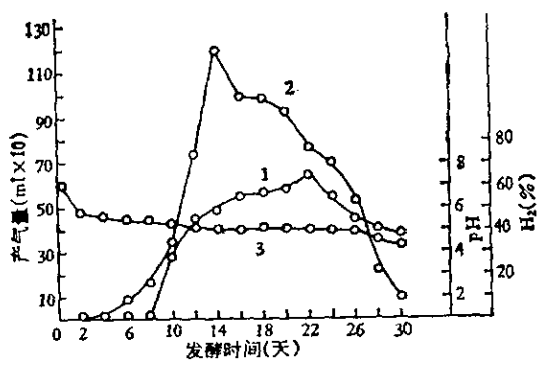


图 2 发酵产氢曲线

1.产氢曲线;2.产气曲线;3.pH 曲线,总产气量 7800ml,含氢 50.5%

图 2 说明,接种 4 小时后开始产气,10 小时后有氢气产生,14 小时为产气高峰,此时氢气含量也迅速增加,22 小时氢气含量最高,平均产氢含量 50.5%。接种后 2 小时, pH 值降至 6,产气高峰时 pH 为 5—5.5,当 pH 降至 4.5 以后,发酵停止。这与沼气发酵 pH7—8 的条件完全不同。

三、厌氧发酵过程中挥发酸、还原糖的消涨变化

发酵后 10 小时,开始产氢。此时培养液中醋酸:丙酸:丁酸 = 11:1:1.2,到产气高峰其比值变为 8.5:1:11.5,丁酸量大增。在产氢微生物中能在植物基质上很好生长,活性较强的是某些梭菌,杆菌。能大量产生分子氢并大量累积丁酸和醋酸。本试验发酵终了时,丁酸达 1884.34 mg/ml,比发酵前 (185.47mg/ml) 约

表 1 不同产氢菌株在薯芋基质中的产氢效果

结果 菌株	项目	发酵液体积 (ml)	总产气量 (ml)	气 体 组 分 (%)				
				H ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CH ₄
1—21		500	200	29.79	39.20	24.00	4.80	0
6—120		500	220	37.24	43.40	14.40	3.84	0
6—229		500	1010	30.86	68.40	6.40	1.60	0
6—232		500	465	24.05	78.40	2.56	1.60	0
6—248		500	125	24.09	53.20	9.61	2.56	0
T ₃ —2100		500	185	42.56	50.20	9.60	3.32	0
混合菌		500	1748	54.12	36.12	5.82	1.51	0

高 9 倍，醋酸约高 4 倍 (684.55mg/ml)。还原糖消耗很快，由 3.15mg/ml 下降到 0.07mg/ml 以下。看来以薯芋为基质的产氢发酵，主要是丁酸类型发酵 (表 2)。

四、去氧剂对薯芋厌氧产氢的影响

由于薯芋含有大量皂甙，在制备悬液时，会产生泡沫，添加去氧剂，保持较好的嫌气条件，对薯芋产氢有利。表 3 表明：无水碳酸钠与焦性没食子酸的氧化还原电势 (ORP) 较低，产气量和氢含量均高，对照最差 (见表 3)。

五、薯芋厌氧发酵连续产氢

在 3000ml 批量发酵中，第一天产气之后，逐日放出发酵液和加入 1000ml 培养基，调 pH 至 6—6.5。图 3 表明连续 25 天产气是波动的，

其曲线呈锯齿状，这与实验条件变化有关，25 天平均产气量为 3338 ml/日/L，氢含量为 40.10—50.31%。在产气过程中 pH 和还原糖的变化亦很显著 (表 4)。

六、薯芋厌氧发酵产氢对皂素收率的影响

在制备悬液时，捣碎的薯芋中大量皂甙酶被释放出来。将皂甙水解成次级甙或皂甙元并释放出葡萄糖^[5]，增加皂素的收率并有利于产氢。表 5 说明平均 7 次的皂素收率为 3.08%，对照为 2.20%，提高 40%。取发酵后的上清液，经酸水解提取皂素，每 1000ml 液体中仅有 0.001—0.005 克皂素，说明酶解得比较好。皂素质量经红外光谱、硅胶 G 薄层析、熔点 (196—201℃) 测定，符合商品要求。

表 2 薯芋厌氧发酵产氢过程中挥发酸、还原糖消涨变化

结果 项目 发酵时间	总挥发酸 (mg/ml)	乙 酸 (mg/ml)	丙 酸 (mg/ml)	丁 酸 (mg/ml)	还原糖 (mg/ml)
发酵原液	350.40	124.94	40.00	185.47	3.15
2 (小时)	415.60	259.59	40.00	70.00	2.64
4	445.85	334.40	61.45	50.00	1.89
6	448.50	348.50	52.41	50.00	—
8	532.33	429.92	50.00	50.00	—
10	530.65	440.65	40.00	50.00	—
12	532.47	340.73	40.00	151.75	1.10
14	819.88	390.42	40.00	389.46	0.66
16	811.89	340.69	40.00	461.21	0.20
18	1088.74	346.78	40.00	701.96	0.13
20	1229.35	317.48	40.00	871.76	0.12
22	1544.62	368.50	40.00	1136.12	0.11
24	1835.87	412.55	40.00	1383.32	0.08
26	2096.91	456.21	40.00	1600.70	0.07
28	3432.50	539.98	40.00	1852.52	>0.07
30	2608.89	684.55	40.00	1884.34	>0.07

表 3 不同去氧剂对薯芋厌氧发酵产氢的影响

结果 项目 处理	23/1		24/1		25/1		26/1		总产气量 (ml)	终了 pH	终了 ORP
	产气量 (ml)	氢含量 (%)	产气量 (ml)	氢含量 (%)	产气量 (ml)	氢含量 (%)	产气量 (ml)	氢含量 (%)			
D ₂ -半胱氨酸 (0.1%)	470	42.05	300	39.89	200	40.10	80	40.00	1050	4.6	-220
Na ₂ CO ₃ (无水) 0.12% Na ₂ S 0.03%	770	44.89	1000	49.60	240	40.56	10	40.21	2020	4.8	-250
Na ₂ CO ₃ (无水) 0.12%	750	44.89	1350	52.54	330	50.87	110	50.10	2540	5.7	-430
焦性没食子酸 0.12%	500	37.55	400	45.60	120	40.25	100	36.10	1120	4.5	—
对 照											

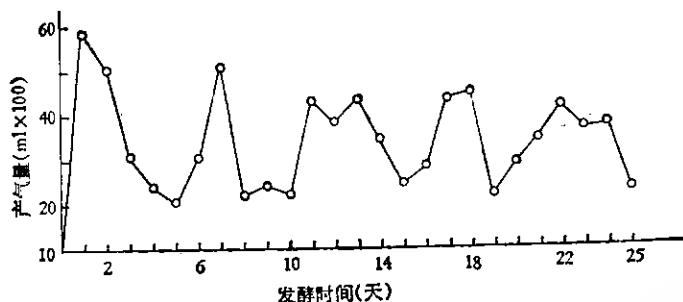


图3 厌氧发酵产气情况

表4 连续厌氧发酵产氢中还原糖、pH变化

连续次数	pH 变化		还原糖变化 (mg/ml)		
	进料	出料	进料	出料	消耗
23	6.8—7.1	5.0—5.5	2.87	0.095	96%

试验证明,产氢细菌亦能酶解皂甙,增加皂素的收率,并有利于产氢。

我国薯芋资源丰富,加之农业栽培成功。薯芋发酵产氢及皂素综合利用,无疑对薯芋资源的开发、利用有一定意义。

参 考 文 献

- [1] Erich Heftmann: *Steroidal hormones in Plant*, Lioydia, 38(3): 195—209, 1975.
- [2] 徐成基,马最瑶: 植物生理学通讯, 6: 6—11, 1980.
- [3] 刘克鑫等: 微生物学报, 20(4): 385—389, 1980.
- [4] J. W. Rothrock: *J. Arch. Biochem. Biophys.*, 57:

表5 批量发酵和连续发酵产氢对皂素收率的影响*

结果 处理	项目	皂素重 (g)	折生药皂 素含量 (%)	与对照比 较净增提 高(%)	总产气量 (ml)	氢含量 (%)
批量 发酵	7次平均	0.4188	3.08	140	1885	46.82
	对照	0.3030	2.20	100	—	—
连续 发酵	Y-X-1	0.4205	**8.75%	—	5800	47.00
	Y-X-2	0.5412	11.27%	—	3000	47.00
	Y-X-3	0.4688	9.75%	—	2300	51.47
	Y-X-4	0.4735	9.86%	—	2000	33.75
	对照	0.3200	6.40%	—	—	—

* 样品为鲜薯芋 100 克,加水至 1000ml, ** 连续发酵每日放出之薯芋渣,经 2N HCl 水解之后称取 5 克干渣提取的皂素,此数据为干渣皂素含量百分率。

51, 1955.

- [5] G. Blunden and R. Hardman: *J. Pharmacol and Pharmacology*, XY(4), 1963.