

初始 pH 值对产氢产乙酸/耗氢产乙酸两段耦合工艺定向生产乙酸的影响 Acetate Production by Acidification-homoacetogenesis Two-phase Coupling Process : Effect of Initial pH

聂艳秋^{1,3}, 刘 和^{1*}, 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{1,2}

NIE Yan-Qiu^{1,3}, LIU He^{1*}, DU Guo-Cheng^{1,2} and CHEN Jian^{1,2}

1 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室, 无锡 214122

2 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

3 湖南工学院环境工程系, 衡阳 421008

1 Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China

3 Department of Environmental Engineering, Hunan Institute of Technology, Hengyang 421008, China

摘 要 以葡萄糖为底物, 以经加热预处理并活化过的厌氧污泥为种泥, 研究了初始 pH 值对产氢产乙酸/耗氢产乙酸两段耦合工艺厌氧发酵定向生产乙酸的影响。实验考察了 7 个初始 pH 值(5、6、7、8、9、10、11)条件下的底物降解、产物产生和发酵过程 pH 值的变化。结果表明: 产氢产乙酸段初始 pH 值的变化不仅影响本阶段产酸, 而且影响耗氢产乙酸段产酸。初始 pH=5 时主要进行乙醇型发酵; pH=6 和 7 时主要进行丁酸型发酵; pH=8 时混合酸型发酵类型逐渐占优势; pH=8~11 时均以乙酸为主要产物。耦合系统生产乙酸最优初始 pH 值为 10。在初始 pH=8~11 范围内, 产氢产乙酸段初期的乙醇浓度一般较高, 但到后期因乙醇被微生物进一步代谢转化成乙酸而使其含量下降。

关键词 产氢产乙酸, 同型产乙酸, pH, 耦合工艺, 厌氧发酵

中图分类号 X705 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0686-06

Abstract The effect of initial pH values on acetate production was studied in the acidification-homoacetogenesis two-phase coupling system using glucose as the substrate and the heat-treated and activated anaerobic sludge as the inoculum. Substrate degradation, product yield and pH variation during fermentation were examined at various initial pH values (5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11). The results show that initial pH values affect volatile fatty acids and ethanol production not only in the acidification phase itself but also in the homoacetogenesis phase. Ethanol-type fermentation mainly takes place at initial pH 5 while butyrate-type fermentation at initial pH 6 and 7. But acetate is the dominant product at initial pH 8~11. The optimal initial pH value is 10 for acetate production in the two-phase coupling system. At initial pH 8~11, ethanol concentration is highest at the beginning of acidification, but there is a subsequent decline as ethanol is converted to acetate as a result of further metabolism of the microbes.

Key words syntrophic acetogenesis, homoacetogenesis, pH, coupling process, anaerobic fermentation

Received: December 20, 2006; Accepted: February 2, 2007.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (No. 50508014) and the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA062315).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85888301; E-mail: liuhe@sytu.edu.cn

国家自然科学基金(No. E50508014)和 863 项目(No. 2006AA062315)资助。

乙酸是一种重要的化工原料^[1],而利用有机废弃物进行厌氧发酵是生产乙酸的一条新途径^[2,3]。有机物厌氧消化一般可分为水解发酵、产氢产乙酸和产甲烷三个阶段。水解发酵阶段混合菌群利用有机物生成各种短链脂肪酸(VFAs),产氢产乙酸阶段产氢产乙酸细菌利用 VFAs 生成氢气和乙酸,产甲烷阶段则是产甲烷菌利用氢气或乙酸生成甲烷。为了得到更高的乙酸转化率,需要将产甲烷反应加以抑制^[4,5]。但产甲烷菌被抑制后,厌氧反应体系产生的氢气对于水解发酵性细菌和产氢产乙酸细菌形成产物抑制,不利于乙酸的累积。同时,厌氧体系中的同型产乙酸菌又需要较高的底物浓度(H_2 、 CO_2)用于合成乙酸。因此我们提出产氢产乙酸/耗氢产乙酸两段耦合定向生产乙酸工艺,通过将水解发酵和产氢产乙酸阶段产生的 H_2 和 CO_2 导入到另外的同型产乙酸段,一方面降低产氢产乙酸段的产物抑制,另一方面可提高同型产乙酸段的产酸效率。研究结果表明,该工艺具有明显的产乙酸优势^[6],是一条有机废弃物厌氧发酵定向生产乙酸的新途径。

在两段耦合系统中, pH 值是影响厌氧发酵系统乙酸产率的最重要因素之一。pH 值通过(1)调控厌氧发酵种泥中乙酸合成微生物的种群比例^[7,8];(2)改变乙酸合成微生物体内的代谢途径^[9];(3) pH 值导致有机酸产物以不同形态(分子态或离子态)存在^[10-12],从而形成不同程度的产物抑制效应^[13]等多种机制来调控厌氧产酸体系中乙酸的比例和乙酸的转化率。已经有一些研究在普通的中温厌氧发酵酸化体系中发现 pH = 6.0 时液相主要发酵产物为丁酸,而 pH = 8.0 时主要产物为乙酸和丙酸^[14]。

为研究初始 pH 值对两段耦合工艺定向生产乙酸的影响,以葡萄糖为底物,以经加热处理除产甲烷菌并活化过的厌氧污泥作种泥,通过批式厌氧发酵实验比较不同初始 pH 值条件下产氢产乙酸段和耗氢产乙酸段中各种有机酸的分布及随时间的演变规律,揭示初始 pH 值对耦合系统中产酸微生物的生长繁殖和演替以及代谢途径的选择和影响。

1 材料与方法

1.1 种泥和废水

厌氧污泥取自无锡太湖水啤酒有限公司的啤酒废水处理车间厌氧反应器。污泥经风干、磨碎、过 30 目筛后,于 105℃ 烘箱中加热处理 2h,以杀灭其中的产甲烷菌等非芽孢菌^[15-17]。经加热处理过的厌氧污泥在作种泥之前需要进行活化,活化程序如下:

将污泥(8~16g,含水率 79%)加到 1000mL 的反应瓶中,其中葡萄糖为 3g/L,0.1mol/L 的磷酸盐作缓冲剂,营养液成分见文献[12]。采用 2mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 6.5,加橡胶盖。充氮 1min 以去除顶部空间的氧。向反应瓶液体中注入 20mL 的 50g/L 的 L-半胱氨酸。在 35℃ 和 120r/min 摇床中培养 24h,收集混合液体,4800r/min 离心 10min,沉淀物即可用作种泥。配制废水为含 30g/L 的葡萄糖营养液(含磷酸盐 0.25mol/L),其中营养液成分见文献[12]。

1.2 实验装置

实验采用的两段耦合系统系由两个 1000mL 的带有上下嘴的抽滤瓶通过硅胶管连接而成。两瓶分别称为反应瓶 A(产氢产乙酸)和反应瓶 H(耗氢产乙酸)。配制废水加入 A,经厌氧发酵产生的 H_2 和 CO_2 进入 H 后作为同型产乙酸菌的底物进行耗氢产乙酸作用(图 1)。

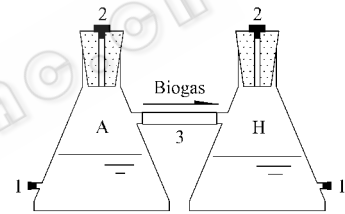


图 1 耦合系统示意图

Fig. 1 Schematics of the coupling system

1: sampling port; 2: injection port; 3: connection pipe;
4: syntrophic acetogenesis phase; H: homoacetogenesis phase.

1.3 运行条件

称取 16g 种泥加入 A,8g 种泥加入 H,活化(见 1.1)后,往 A 中加入配制废水并分别调 pH 至 5、6、7、8、9、10 和 11,往 H 中加入营养液并调 pH = 6.5。每个反应瓶中加入 2g 半胱氨酸以脱去溶解氧。每个反应瓶中液体体积均为 600mL。所有反应瓶密封后,充氮气 2min 以置换顶部空间中的空气。然后将反应装置置于 35℃ 和 120r/min 摇床进行发酵。反应瓶 H 设置一个对照,用于扣除种泥本身产生的挥发酸和醇。除了反应瓶 H 的对照实验外,其余所有实验均做两个平行,结果取二次实验的平均值。

1.4 分析方法

每隔一定时间从反应瓶中取出 5mL 液体样品,4800r/min 离心 10min,取上清液,再经 15000r/min 离心 10min,所得上清液经 0.2μm 膜过滤,储存于 4℃ 冰箱中等待分析。葡萄糖用二硝基水杨酸比色法测定^[18],pH 值用 pH 计测定,挥发酸和醇用气相色谱法测定^[19]。

2 结果与讨论

2.1 初始 pH 值对葡萄糖降解的影响

初始 pH 值对葡萄糖降解的影响如图 2 所示。pH ≥ 8 时,葡萄糖降解速度很快,一般只需 3d 就几乎完全降解。pH = 5 和 6 时,葡萄糖完全降解需要 8d 并有一个先快后慢再快的过程。而 pH = 7 时,前 2d 葡萄糖即降解 90%,余下 10%却用了 3d 降解时间。由于种泥是刚被活化的厌氧污泥,因此有较高的活性,一开始便能迅速降解葡萄糖。至于低初始 pH 值时中间出现的平台期则可能与游离挥发酸有关,为微生物由产酸代谢转为产醇代谢的调整期^[11]。

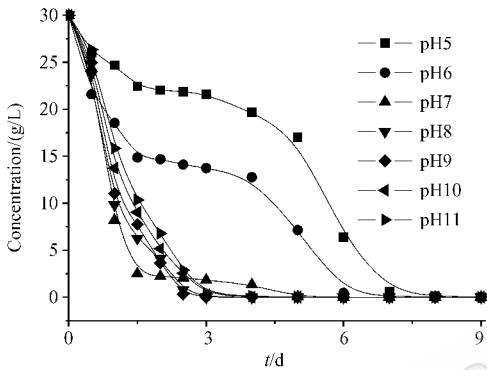


图 2 初始 pH 值对葡萄糖降解的影响

Fig. 2 Effect of initial pH values on glucose degradation

2.2 发酵过程中的 pH 变化

酸化过程中 pH 值的变化如图 3 所示。尽管初始 pH 值不同,但随着葡萄糖酸化过程的进行,pH 值都在下降,下降的幅度因初始 pH 值的不同而异。初始 pH 值越高,则随酸化过程的 pH 下降幅度越大。与葡萄糖降解相对应,pH 下降主要集中在前 3d,之后则只有小幅下降,基本保持稳定。

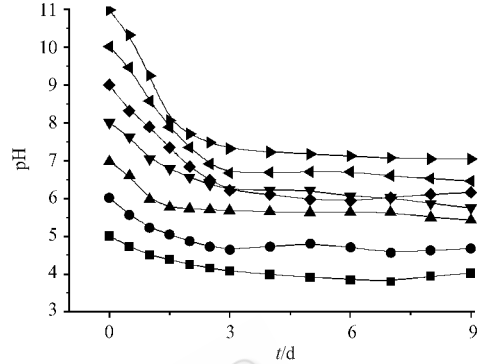


图 3 反应瓶 A 中液相 pH 值的变化

Fig. 3 pH variation of liquid in bottle A

2.3 初始 pH 值对产酸(醇)的影响

葡萄糖在反应瓶 A 中进行水解发酵和产氢产乙酸反应,生成 VFAs 和乙醇等酸化产物。随反应的进行,厌氧种泥中的混合微生物菌群进行着优势菌群的演替以及代谢途径的选择,反映为有机酸和乙醇等酸化产物的变化。图 4 显示了耦合系统主要发酵产品的组成变化,其中 a 与 a'、b 与 b'、c 与 c' 等

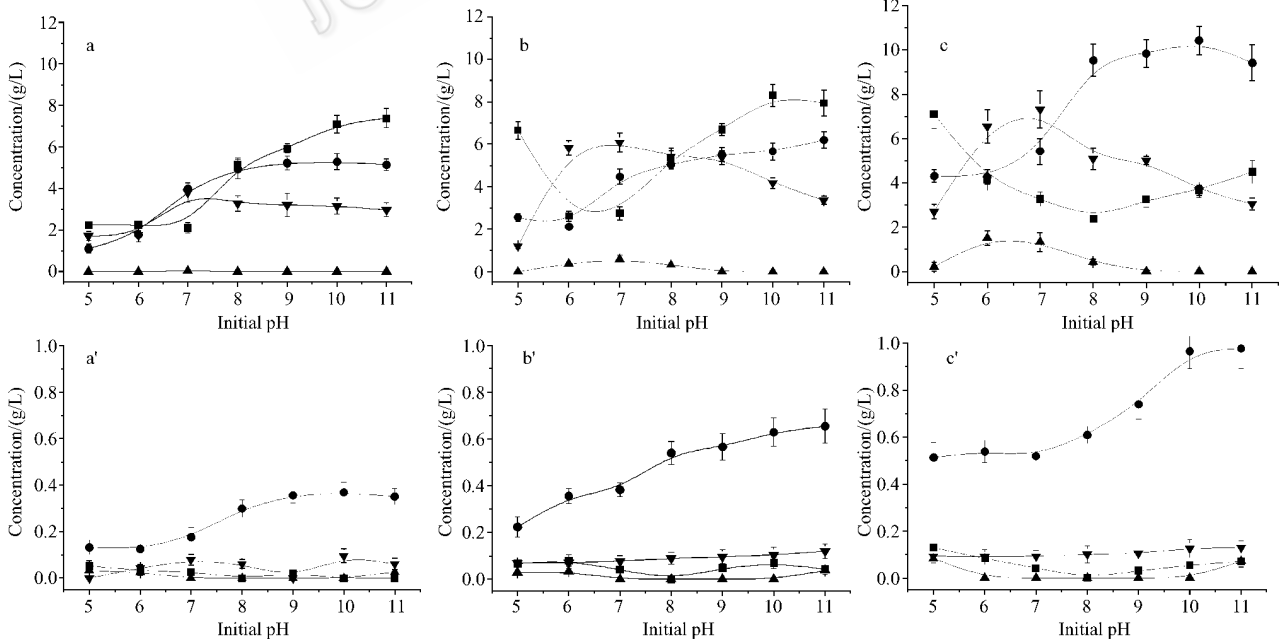


图 4 初始 pH 值对产酸(醇)的影响

Fig. 4 Effect of initial pH values on VFAs and ethanol production

■ Ethanol ● Acetate ▲ Propionate ▼ Butyrate.

分别为 $t = 3, 6, 9\text{d}$ 时反应瓶 A 和 H 液相中主要发酵产物的分布。

当 $t = 3\text{d}$ 时,随着 pH 值的升高,反应瓶 A 中乙醇、乙酸和丁酸的浓度均逐渐增加,当 $\text{pH} = 11.0$ 时则略有下降,这与各种 pH 值条件下葡萄糖降解速度是吻合的。反应瓶 H 中所产乙酸浓度也基本上是随着反应瓶 A 中发酵液初始 pH 值的升高而逐渐增加,这可能与葡萄糖酸化产气量的增加有关。当 $t = 6\text{d}$ 时,两反应瓶中各种产物的浓度都比 $t = 3\text{d}$ 时高,A 中乙醇浓度呈“中低两高”分布,初始 $\text{pH} = 7$ 时最低;丁酸呈“中高两低”分布, $\text{pH} = 7$ 时最高;乙酸则随着初始 pH 值的增加而增加。在 H 中, $\text{pH} = 6$ 时总产物浓度高于 $\text{pH} = 7$;各种发酵产物随 pH 值的变化规律类似于 $t = 3\text{d}$ 时的情况。当 $t = 9\text{d}$ 时,反应瓶 A 中丁酸和总产品浓度随着 pH 的升高呈“中高两低”分布,分别在 $\text{pH} = 7$ 和 $\text{pH} = 10$ 时达最高点,而乙醇浓度则呈“中低两高”分布, $\text{pH} = 8$ 时最低, $\text{pH} = 5$ 时最高;乙酸浓度随着初始 pH 值的升高而增加, $\text{pH} = 10$ 时,达最高点 10.4g/L 。另外, pH 值不同,其主要产物也不一样, $\text{pH} = 5$ 时为乙醇, $\text{pH} = 6, 7$ 时为丁酸,而 $\text{pH} \geq 8$ 时则为乙酸。反应瓶 H 中乙酸(总产品)浓度随初始 pH 值的升高而升高,而乙醇却呈“中低两高”分布, $\text{pH} = 8$ 时未检测到乙醇,这可能与不同 pH 条件下的优势菌群有关。

发酵过程的代谢类型根据末端代谢产物可分为丁酸发酵(产物主要为丁酸和乙酸)、丙酸发酵(产物主要为丙酸)、乙醇发酵(产物主要为乙醇)和混合酸发酵(产物主要为乙酸和乙醇)等。对比图 4a、b 与 c 可发现,反应瓶 A 在 $\text{pH} = 5$ 时,乙醇自始至终都为主要产品,这是典型的乙醇型发酵,任南琪等人以及 Steven 等人也得出低 pH 时乙醇是主要的代谢产物的结论^[7, 10]。而 $\text{pH} = 6, 7$ 时,为典型的丁酸型发酵。在 $\text{pH} \geq 8$ 时,其主要产品为乙酸。因此,进行葡萄糖的混合培养发酵时,上述代谢途径均可能存在。这里还有一个原因,那就是 pH 值不同,优势微生物种群也不一样。乙醇型发酵顶级群落中优势种群是拟杆菌、梭状芽孢杆菌、酵母菌等,而丁酸型发酵却为丁酸梭状芽孢杆菌等。当拟杆菌属(*Bacteroides*)的细菌成为优势种群时,发酵产物以乙醇为主,挥发有机酸的含量较低,而当丁酸梭状芽孢杆菌成为顶极群落中的优势种群时,丁酸和乙酸的含量就很高^[20]。

对比图 4 与图 2 发现,即使葡萄糖完全耗尽,乙酸浓度仍在增加,这是因为其中的乙醇被氧化成乙

酸的缘故^[6]。对比图 4a'、b' 与 c' 可发现,反应瓶 H 中产品随着发酵过程的进行而逐渐增加,增加幅度依 pH 升高而降低。这是因为反应瓶 H 的底物是 A 中产气,由于 A 中 pH 值不同,产气(H_2 与 CO_2)的量也不一样,快慢程度也各不相同,所以尽管 H 中的其他条件完全一样,但也表现出不同的乙酸产量。从 pH 值变化曲线可知,初始 $\text{pH} = 10$ 时,3d 后基本上稳定在 $\text{pH} = 6.5$ 左右,这非常有利于产乙酸。从乙酸生产角度考虑,反应瓶 A 中初始 $\text{pH} = 10$ 为最好。

2.4 初始 pH 值对乙酸构成比与乙酸产率的影响

对于反应瓶 A 进行的产氢产乙酸阶段,初始 pH 值分别为 5、6、7、8、9、10 和 11 时,主要液相产品最高浓度分别为 14、16、17、17、18、18 和 17g/L ,乙酸浓度分别为 4.3、4.2、5.4、9.5、9.8、10.4 和 9.4g/L ,相应占液相产品的构成比分别为 30%、26%、30%、55%、54%、59% 和 56%。类似地也可计算出反应瓶 H 中进行的耗氢产乙酸阶段以及整个耦合系统中乙酸占液相产品的构成比(图 5)。如图 5a 所示,反应

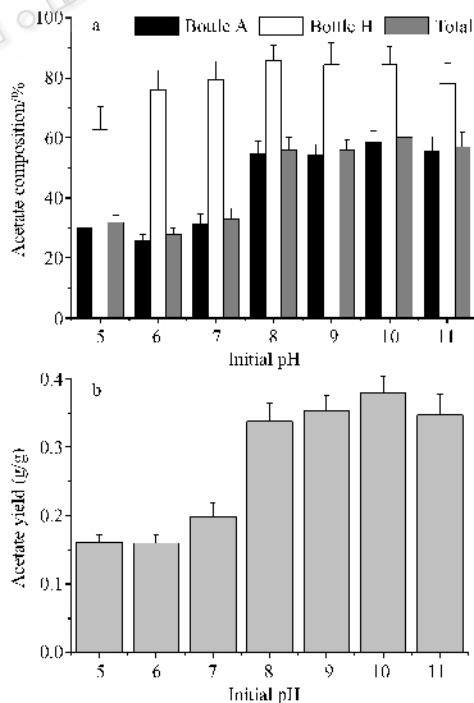


图 5 初始 pH 值对液相产品中乙酸百分含量和乙酸产率的影响

Fig. 5 Effect of initial pH values on acetate compositions in liquid products and acetate yields

瓶 H 中的乙酸构成比远远高于 A,这是因为 H 中主要进行的是同型乙酸化作用;因 A 中初始 pH 值不同,H 中乙酸构成比也各不相同,正如前述分析,这与 A 中 pH 值不同时氢气产量、氢气产生速率以及

发酵气体中氢气所占比率不同有关。经计算得出乙酸产率(乙酸的生成量与降解葡萄糖的质量的比值)如图 5b 所示。随着初始 pH 值的升高,乙酸产率增大,pH = 10 时达到最大,为 0.38g/g 葡萄糖,可能与初始 pH = 10 时,发酵过程中种泥微生物仍有较高酶活等有关^[21,22],这和 Yuan 等人^[23]的结果一致。

2.5 初始 pH 值对乙酸在耦合系统的两个反应瓶中分配的影响

由于加入耦合系统的葡萄糖只进入反应瓶 A,而没有进入反应瓶 H,反应瓶 H 唯一的底物只能来源于 A(已扣除种泥本身所产挥发酸和醇),即 A 中葡萄糖发酵产生的气体扩散进入 H,在同型乙酸菌的作用下产生乙酸等发酵产物。H 中乙酸含量占耦合系统总乙酸含量的比例可以反映耦合系统中耗氢产乙酸作用的强弱以及 A 中发酵气体产量的大小和快慢程度。图 6 表示在反应瓶 H 初始 pH = 6.5,而反应瓶 A 的初始 pH 值分别为 5、6、7、8、9、10 和 11 时,H 中所产乙酸(液相产品)分别占耦合系统总产乙酸(液相产品)的比例,几乎呈“中低两高”分布。原因可能是:当反应瓶 A 初始 pH 值较低时(如 pH

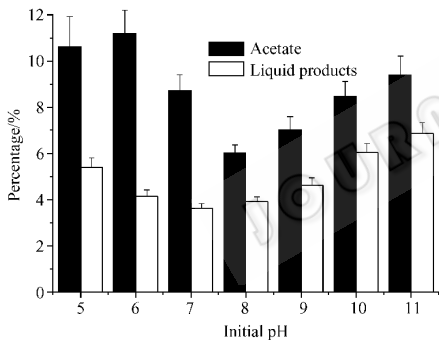


图 6 不同初始 pH 值时反应瓶 H 中乙酸含量(液相产品)占耦合系统总乙酸(液相产品)含量的百分比

Fig. 6 Percentage of the amount of acetate (liquid products) produced in bottle H in the amount of acetate (liquid products) produced in coupling system

= 5 或 6),葡萄糖缓慢降解,因而发酵气体缓慢释放,与 H 中的同型产乙酸菌相对较慢的耗氢产乙酸作用存在相对的一致性[数据未给出],因而 H 中产乙酸相对较高。当反应瓶 A 初始 pH 较高时如 pH = 10 和 11 时,此时产乙酸多,相应地产生 H₂ 和 CO₂ 也多,因而 H 中产乙酸也相对较高。理论上,厌氧条件下 1mol 葡萄糖可产生 2mol 乙酸和 4mol 氢气、2mol 二氧化碳,而后者又可进一步地在同型乙酸菌作用下转化为 1mol 乙酸,因此,同型乙酸化作用所产乙酸占总乙酸的比例为 33%。而本研究中反应瓶 H 中的乙酸所占比例偏低,这可能与气体由 A

向 H 的扩散效应不够充分有关,因此本耦合工艺还有待进一步优化。

2.6 有机废物厌氧发酵技术生产乙酸的比较

当有机废物中有机成分单一时,可以考虑采用纯菌发酵,如脱木素木质纤维(4.5g/L)发酵可得到为 0.3g/g 当量葡萄糖的乙酸产率^[24]。但当有机成分复杂多样时,宜采用混菌发酵生产乙酸。Dae 等人和 Hussy 等人分别以葡萄糖(21.3g/L)^[25]和膨化淀粉(10g/L)^[26]为模式底物进行厌氧混菌发酵,分别得到 2.5g/L 和 2.8g/L 的乙酸;Hiroshi 等人将牛粪(VS 13.4g/L)进行厌氧发酵,得到的乙酸浓度为 1.8g/L^[27]。采用多级逆流技术对有机废物进行混菌发酵,可提高乙酸产量。如采用稻草和鸡粪进行混合发酵,得到的总酸达 30.5 ~ 48g/L,总酸产率为 0.563 ~ 0.669g/gVS^[28];采用市政固体废物与污泥进行混合发酵,产酸浓度达 25g/L,其中乙酸 10.5g/L^[29];采用纸与污泥进行混合发酵,得到的总酸为 19.6g/L 左右,总酸产率 0.12 ~ 0.42g/gVS,其中乙酸含 57% 左右^[30]。国内采用混菌发酵技术将食品废物转化为羧酸,得到的总 VFA 达 28.5g/L,其中含乙酸 45.6%^[31];当食品废物中 VS 为 98g/L,最高乙酸浓度可达 19.5g/L^[32]。本研究利用产氢产乙酸与耗氢产乙酸耦合系统生产乙酸,当葡萄糖浓度为 30g/L 时,得到的最高乙酸浓度为 10.4g/L,占液相产品浓度的 59%,乙酸产率可达 0.38g/g 葡萄糖,高于上述文献中的乙酸产率。

3 结论

主要结论如下:

(1) 产氢产乙酸/同型产乙酸两段耦合工艺的产氢产乙酸段中,葡萄糖降解速度随着初始 pH 值的升高而增加,pH = 11 时略有下降。

(2) 在不同初始 pH 值条件下,产氢产乙酸段的基本发酵类型为:pH = 5 时进行乙醇型发酵;pH = 6 和 7 时主要进行丁酸型发酵;pH ≥ 8 时乙酸是主要发酵产品。对于高初始 pH 值(如 pH ≥ 8)的酸化,发酵初期乙醇浓度较高,后期浓度降低,与此同时,乙酸浓度升高,表明乙醇被氧化成乙酸。

(3) 产氢产乙酸段的初始 pH 值也影响耦合系统的耗氢产乙酸作用,其乙酸产量在耦合系统总乙酸产量中所占的百分含量随着 pH 由 5 到 11 而呈“中低两高”分布,这可能与产氢产乙酸阶段的不同初始 pH 值时产气量、产气速度等有关。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhou Y(周莺), Yin X(尹新). Production status and market analysis of acetic acid. *Journal of Chemical Industry & Engineering* (化学工业与工程技术), 2003, **24**(2): 27-30.
- [2] Iranpour R, Stenstrom M, Tchobanoglous G. Environmental engineering: energy value of replacing waste disposal with resource recovery. *Science*, 1999, **285**(5428): 706-11.
- [3] Largus TA, Khursheed K, Muthanna HA, et al. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(9): 477-85.
- [4] Conrad R, Klose M. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **34**(1): 27-34.
- [5] Chidthaisong A, Conrad R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, **32**(7): 977-988.
- [6] Nie YQ, Liu H, Du GC, et al. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process. *Process Biochemistry* (2006), doi:10.1016/j.procbio.2006.11.007.
- [7] Ren NQ(任南琪), Wang AJ(王爱杰), Ma F(马放). *Physiological Ecology of Acidogens in Anaerobic Biotreatment Process*(产酸发酵微生物生理生态学). Beijing: Science Press(科学出版社), 2005.
- [8] Lü F(吕凡), He P(何品晶), Shao LM(邵立明). Effect of pH value on fermentation pathways of biodegradable organic waste. *Environmental Science*(环境科学), 2006, **27**(5): 991-997.
- [9] Zhu Y, Yang ST. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*, 2004, **110**: 143-157.
- [10] Steven VG, Shihwu S, Jiunn-Jyi L. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol*, 2001, **35**(24): 4726-4730.
- [11] Steven VG, Bruce EL. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**: 9351-9356.
- [12] Sang-Eun O, Steven VG, Bruce EL. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol*, 2003, **37**(22): 5186-5190.
- [13] Zheng P(郑平), Hu BL(胡宝兰). Kinetics of anaerobic ammonia oxidation. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2001, **17**(2): 193-198.
- [14] Horiuchi J, Shimizu T, Tada K, et al. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technol*, 2002, **82**(3): 209-213.
- [15] Bruce EL, Sang EO, In SK, Steven VG. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol*, 2002, **36**: 2530-2535.
- [16] Jiunn JL. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**: 269-278.
- [17] Jiunn JL, Kuo SF, James C, et al. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *Int J Hydrogen Energy*, 2003, **28**: 1361-1367.
- [18] Miller GL. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1960, **31**: 426-428.
- [19] Wooshin P, Seung HH, Sang-eun O, et al. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**: 4416-4420.
- [20] Zhao D(赵丹), Ren NQ(任南琪), Wang AJ(王爱杰). Fermentation type and climax community controlled by pH and ORP. *Chongqing Environmental Sciences*(重庆环境科学), 2003, **25**: 33-35, 38.
- [21] Liu SC(刘树臣), Xie LY(谢澜漪), Li C(李春), et al. Measurement of intracellular pH in long-chain dicarboxylic acid-producing yeast *Candida tropicalis* and its growth activity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, **20**: 279-283.
- [22] Wei GY(卫功元), Li Y(李寅), Du GC(堵国成), et al. Effects of dissolved oxygen and pH on *Candida utilis* batch fermentation of glutathione. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, **19**: 734-739.
- [23] Yuan HY, Chen YG, Zhang HX, et al. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**: 2025-2029.
- [24] David B Levin, Rumana Islam, Nazim Cicek, et al. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int J of Hydrogen Energy*, 2006, **31**: 1496-1503.
- [25] Cheong Dae-Yeo, Hansen L Conly, Stevens K David. Production of bio-hydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor. *Biotechnol and Bioeng*, 2007, **96**: 421-432.
- [26] Hussy I, Hawkes FR, Dinsdale R, et al. Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnol and Bioeng*, 2003, **84**(6): 619-626.
- [27] Hiroshi Yokoyama, Miyoko Waki, Naoko Moriya, et al. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**: 474-483.
- [28] Frank K Agbogbo, Mark T Holtzappple. Fixed-bed fermentation of rice straw and chicken manure using a mixed culture of marine mesophilic microorganisms. *Bioresource Technol*, 2007, **98**: 1586-1595.
- [29] Cateryna Aiello-Mazzarri, Frank K Agbogbo, Mark T Holtzappple. Conversion of municipal solid waste to carboxylic acids using a mixed culture of mesophilic microorganisms. *Bioresource Technol*, 2006, **97**: 47-56.
- [30] Susan B Domke, Cateryna Aiello-Mazzarri, Mark T Holtzappple. Mixed acid fermentation of paper fines and industrial biosludge. *Bioresource Technol*, 2004, **91**: 41-51.
- [31] Zhang H(张波), Shi HZ(史红钻), Zhang LI(张丽丽), et al. The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. *Acta Scientiae Circumstantiae*(环境科学学报), 2005, **25**(5): 665-669.
- [32] Liu ZL(刘振玲), Du GC(堵国成), Liu H(刘和), et al. Production of volatile fatty acids during anaerobic digestion of food wastes. *Environmental Pollution & Control*(环境污染与防治), 2007, **29**(1): 49-52.