

文章编号: 0254-0096(2020)03-0345-06

狼尾草高底物同步糖化乙醇发酵全残留物 产甲烷特性研究

陈 乐, 左然然, 李建安, 杜济良, 杨秀山, 田 沈

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘 要: 以汽爆狼尾草的高底物浓度乙醇发酵全残留物为底物, 进行甲烷潜力测试(BMP)以及单相全混式连续搅拌反应器(CSTR)厌氧消化实验, 以验证乙醇发酵全残留物的产甲烷特性及残留物中各组分在生产清洁能源甲烷时的底物贡献率。经过 50 d 的 BMP 实验, 甲烷产量最终达到 884 mL, 相应的甲烷产率为 390.6 mL/g VS, 其中纤维素和半纤维素在第 10 天达到产气高峰, 累计产气量占全残留物累计产气量的 48.2%, 小分子酸和酶与酵母在第 2 天达到产气高峰, 其产气量分别占全残留物累计产气量的 22.4% 和 26.4%。随后使用 CSTR 反应器进行单相厌氧消化, 有机负荷从 1.5 g VS/(L·d) 逐渐提升至 3.5 g VS/(L·d), 最终获得 457.1 L/kg VS 的甲烷产率和 47.3% 的挥发性固体(VS)去除率。结果表明: 狼尾草作为一种木质纤维素原料, 在获得满足工业蒸馏需求的乙醇浓度后, 其发酵全残留物仍可作为良好的底物通过厌氧消化制取甲烷, 不仅减少工艺的环境排放负荷, 而且可提高原料的利用率。

关键词: 生物质燃料; 厌氧消化; 甲烷; 乙醇发酵; CSTR

中图分类号: TK6

文献标志码: A

0 引 言

狼尾草是一种具有高生物质产量的多年生草本植物, 它生长速度快、适应性强, 因此作为生物燃料生产的原料具有较大潜力^[1]。在进行同步糖化发酵(SSF)时, 高底物浓度虽然可提高乙醇浓度, 但会导致全纤维素转化率低于 70%, 在其残留物中存在纤维素、半纤维素、糖类、蛋白等物质, 因此乙醇发酵全残留物的处理是纤维素乙醇生产时的主要问题之一^[2]。

厌氧消化微生物群落能将糖类、脂质和蛋白质转化成沼气(由 60%~70% CH₄ 和 30%~40% CO₂ 组成)^[3-4], 因此乙醇发酵残留物作为厌氧消化的底物是一个非常具有吸引力的选择^[5-6]。然而, 木质纤维素因其结构复杂, 导致高底物浓度木质纤维素乙醇发酵残留物与已广泛研究的其他原料完全不同, 同时也影响甲烷产量和甲烷产率。相比于乙醇发酵残留物上清液, 全残留物具备更高的糖含量, 但其主要以多糖纤维素和半纤维素的形式存在, 不易立即被降解和发酵^[7]。

众所周知, 提升全残留物厌氧消化性能的核心要求在于缩短消化时间、提高工艺效率、达到最大可挥发性

固体去除率和能持续维持高有机负荷稳定运转^[8]。单相厌氧消化系统因其水解酸化和甲烷化同时在一个反应器中进行的特点, 仍是处理大多数废物的首选^[9]。研究表明, 全混合厌氧反应器(CSTR)是一种适用于处理高总固体(TS)和高挥发性固体(VS)的高强度底物的反应器, 具有操作简单并且可使底物与微生物充分接触的优良^[10]。因此, 为了提高底物的降解速率和沼气产量, 本文选用 CSTR 反应器针对高底物浓度乙醇发酵全残留物进行单相厌氧消化。本文使用汽爆狼尾草高底物浓度乙醇发酵全残留物进行甲烷生产的可行性研究。在 CSTR 反应器中单相厌氧消化期间评估其甲烷产量、纤维素转化率、TS 去除率和 VS 去除率来衡量其生物降解性能。

1 材料与方 法

1.1 汽爆原料

本研究所用狼尾草(*Pennisetum purpureum*)由中国农业大学提供, 蒸汽爆破压力 1.6 MPa, 保留时间为 5 min。汽爆原料常温下风干, 风干后的固体为酶解和发酵的底物。经测定狼尾草汽爆前后成分变化如表 1。

收稿日期: 2017-09-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31971202)

通信作者: 田 沈(1972—), 女, 博士、教授, 主要从事微生物酶和发酵工程方面的研究。cnu_tianshen@sina.com

表 1 狼尾草成分分析表(%wt,千重)
Table 1 Composition and characteristics of *Pennisetum purpureum*(%wt,DM)

原料	纤维素	半纤维素	木质素	灰分	提取物
狼尾草	35.24±0.38	25.12±3.74	21.51±1.33	6.55±0.20	11.74±0.21
汽爆狼尾草	43.85±0.41	8.47±0.19	25.82±0.38	7.52±0.01	14.64±0.30

1.2 发酵残留物厌氧消化产甲烷

1.2.1 发酵残留物

发酵液经蒸馏后为发酵残留物,取 10 mL 发酵残留物,采用烘干法测其总固体(TS)以及挥发性固体(VS)含量,并取发酵残留物固体测定残余纤维素及半纤维素,取上清液测可溶性 COD(SCOD 化学需氧量)、总挥发酸(TVFA)。发酵残留物及接种物成分测定如表 2 所示。

表 2 发酵残留物及接种物成分测定
Table 2 Characteristics of whole stillage and inoculums

参数	发酵残留物	厌氧污泥
pH 值	5.8	7.6
TS 含量/g·L ⁻¹	280.2	158.7
VS 含量/g·L ⁻¹	226.3	109.7
COD/mg·L ⁻¹	119200	5000
纤维素含量/%	26.1	12
半纤维素含量/%	6.9	2.6
甲酸含量/g·L ⁻¹	2.63	0
乙酸含量/g·L ⁻¹	1.05	0
丙酸含量/g·L ⁻¹	0.37	0.275
丁酸含量/g·L ⁻¹	0	0
TVFA 含量/g·L ⁻¹	4.05	0.275

1.2.2 发酵残留物产甲烷潜力实验

甲烷潜力测试在 250 mL 厌氧瓶内进行,有效体积 200 mL,接种物取自本实验室长期处理纤维素乙醇发酵残留物的厌氧反应器,接种物 100 mL。设置 4 个实验组,第 1 组为发酵全残留物组,加入 10 mL 全残留物。第 2 组加入 0.17 mg 酶和 7.4 mg 酵母;第 3 组加入 6.6 mg 甲酸/2.625 mg 乙酸和 0.925 mg 丙酸的混合液;第 4 组加入 0.35 g 纤维素和 0.2 g 半纤维素。设置空白对照组,加入 100 mL 污泥接种物并补水至工作体积 200 mL 以排除污泥本身对产甲烷产量的影响。进料后封瓶并通 N₂ 吹扫 2 min 排空。每天用 NaOH 排水法定时测定产气量,整个厌氧消化实验直到与对照组产气基本相同为止。所有实验组的产气量减去接种物

的产气量即为实际产气量。

1.3 发酵残留物单相厌氧消化产甲烷

单相厌氧消化在一个 8 L(有效工作体积 7 L),内径为 200 mm,高度为 250 mm 的全混式连续搅拌反应器中进行。通过循环水浴将温度控制在(35±2)℃,每 30 分钟打开开关搅拌一次。在单相连续厌氧消化过程中,水力停留时间(HRT)为 25 d,有机负荷(OLR)从 1.5 g VS/(L·d)逐渐提升到 3.5 g VS/(L·d)。每天需用蠕动泵向反应器中加入发酵全残留物,并排出等量的流出物以保持体积恒定。整个过程持续 25 d,每天测量沼气和甲烷含量,并计算其甲烷产率。

1.4 分析方法

小分子酸浓度使用高效液相色谱仪测定(HPLC, mode 1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA),色谱柱为 Hi-Plex H(300 mm×7.7 mm),柱温 60℃,示差检测器(RI)温度 40℃,流动相为 5 mmol/L 稀硫酸,流速 0.6 mL/min,进样量 5 μL。甲烷含量使用气相热导检测器(TCD)、HP-PLOT/Q 色谱柱测定,检测器及进样器温度均为 200℃,柱温为 60℃。以 N₂ 作为载气,流速 4 mL/min。标准样品为纯甲烷(99.99%)气体,采用外标法校正。总固体(TS)、挥发性固体(VS)、化学耗氧量(COD)、总挥发性酸(TVFA)、干重(DM)等参数根据标准方法(APHA,1998)测定^[11]。

2 结果与讨论

2.1 甲烷潜力测试实验(BMP)

汽爆狼尾草经高底物同步糖化发酵获得全残留物 3181.6 g。取 10 mL 发酵全残留物与 100 mL 接种物在厌氧条件下加入 250 mL 厌氧瓶中进行第 1 组甲烷潜力测试实验。经 50 d 厌氧消化后,得到甲烷日产量与甲烷累积产量变化结果如图 1 所示。实验起始阶段并无延滞期,在第 2 天就出现了第 1 个产气高峰,经 6~8 d 后出现第 2 个产气高峰。底物随厌氧消化的进行逐渐减少,最终被完全消耗。整个过程中累积甲烷产量为 884 mL,甲烷产率为 390.6 mL/g VS。

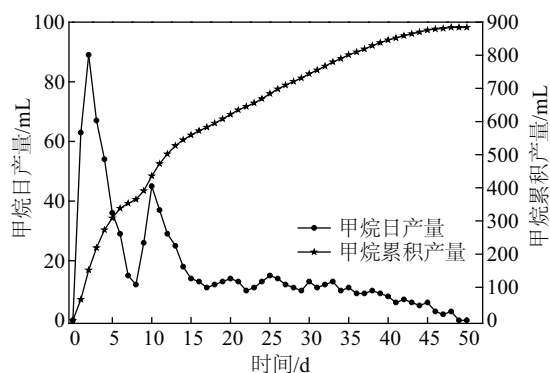


图1 全残留物甲烷潜力测试实验结果

Fig. 1 Methanogenesis potential tests of ethanol fermentation stillage

反应体系中的纤维素和半纤维素含量变化如图2所示。实验初始阶段反应体系中的纤维素含量为0.35 g, 半纤维素含量为0.21 g。经5 d第1个产气峰结束后, 反应体系中的纤维素含量为0.34 g, 半纤维素含量为0.19 g。在第15天第2个产气峰结束后, 纤维素含量为0.18 g, 半纤维素含量0.09 g。实验结束时, 纤维素最终剩余0.09 g, 半纤维素0.05 g。结果表明, 纤维素和半纤维素在第10天后开始被利用, 且需经过超过40 d的水解消化后才能被完全利用。

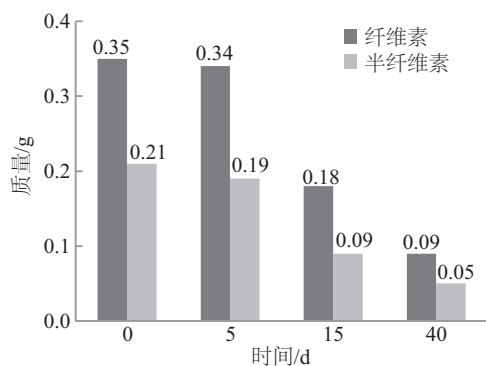
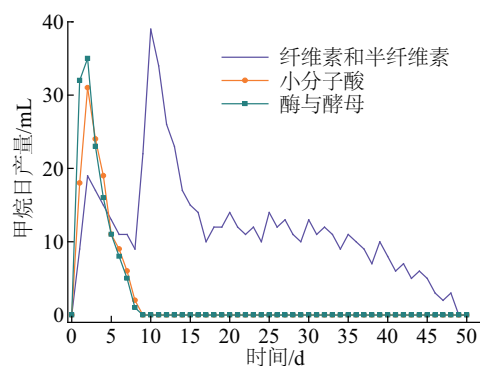


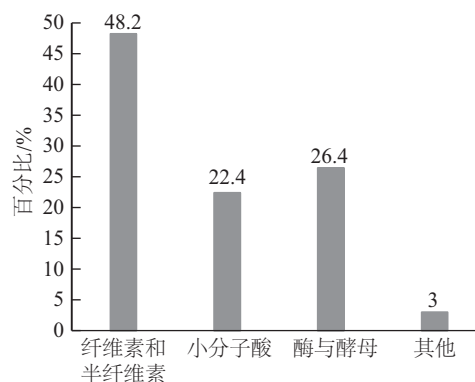
图2 纤维素和半纤维素含量随时间变化实验结果

Fig. 2 Changes in cellulose and hemicellulose content with time

第2组BMP实验, 其甲烷日产量结果如图3a所示。在起始阶段未出现延迟期, 第2天出现1个产气高峰, 最高甲烷日产量达到35 mL, 经8 d可降解底物消尽, 产气量与对照组相同时结束实验。实验结果说明在第2天, 全残留物中的酶与酵母蛋白能快速被产甲烷菌群利用而产气。第3组BMP实验, 其甲烷日产量结果如图3a所示。同样在第2天出现1个产气高峰, 最高甲烷日产量达到33 mL, 经8 d可完全降解底物。



a. 甲烷日产量



b. 各组分产甲烷

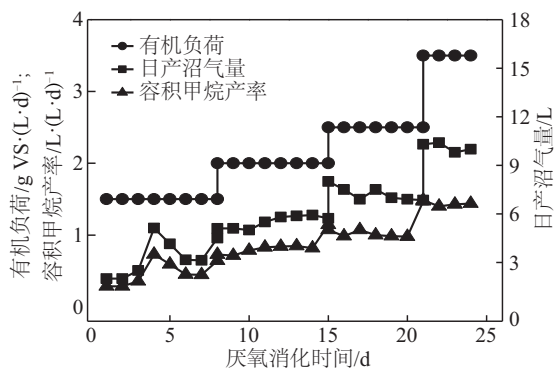
图3 甲烷日产量和各组分累计产气量占全残留物的百分比结果

Fig. 3 Daily methane production and cumulative production of each component in whole stillage

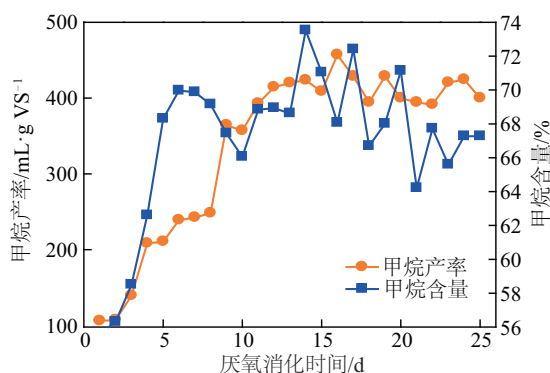
第4组实验将0.35 g纤维素和0.20 g半纤维与100 mL接种物在厌氧条件下加入250 mL厌氧瓶中进行, 起始阶段未出现延迟期, 第2天出现第1个产气高峰, 之后在第10天出现第2个产气高峰, 经50 d厌氧消化后, 产气量与对照组相同, 结束实验。纤维素和半纤维素实验组以未水洗的汽爆狼尾草为底物, 虽然蒸汽爆破预处理能将木质纤维素的结晶结构破坏降低聚合度, 但产甲烷菌对纤维素和半纤维素的利用仍较为缓慢, 在第10天时, 纤维素和半纤维素组出现和全残留物第2个产气峰峰值近似的峰, 说明发酵全残留物中剩余纤维素在第10天时开始被利用。在蒸汽爆破预处理的过程中, 木质素很少一部分转化为晶结构破坏降低聚合度, 但产甲烷菌对纤维素和半纤维素的利用仍较为缓慢, 在第10天时, 纤维素和半纤维素组出现和全残留物第2个产气峰峰值近似的峰。由图3b可知, 纤维素和半纤维素的累计产气量占全残留物累计产气量的48.2%, 小分子酸和酶与酵母分别占22.4%和26.4%, 这些组分的产气量占全残留物的97%。

2.2 单相 CSTR 厌氧消化实验结果

乙醇发酵残留物在 8 L 全混式持续搅拌反应器中单相消化产甲烷的试验结果如图 4 所示。起始阶段的有机负荷为 $1.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 厌氧消化迅速启动没有延迟期, 第 1 天产气量为 2 L, 甲烷产率为 105.9 L/kg VS , 容积产气率 $0.28 \text{ L}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 起始负荷运转第 4 天时, 日产气量达到高峰 5.12 L, 之后 4 d 的气体产量基本稳定, 平均日产气体量和容积甲烷产量达到 $3.2 \text{ L}\cdot\text{d}$ 和 $0.55 \text{ L}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 甲烷含量和甲烷产率持续上升, 分别达到 69.8% 和 248 L/kg VS 。随后将反应器有机负荷提升至 $2.0 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 此阶段的日产甲烷量维持在 $5.00\sim 5.93 \text{ L}$, 容积产气率在 $0.71\sim 0.84 \text{ L}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 甲烷产率在 $364.2\sim 423.5 \text{ L/kg VS}$, 甲烷平均含量为 68.7%。待反应器运转稳定后进一步提升有机负荷至 $2.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 此阶段共运转 8 d, 平均甲烷产率为 428 L/kg VS , 最高达 457.14 L/kg VS , 容积甲烷产率为 $1.14 \text{ L}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 甲烷含量为 71.3%。当继续有机负荷提升至 $3.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 时, 甲烷产率仍稳定在 400 L/kg VS 以上。在反应器稳定运转的 25 d 中, OLR 从起始阶段的 $1.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$



a. 有机负荷



b. 甲烷

图4 乙醇发酵残留物单相 CSTR 厌氧消化运转中的有机负荷及产甲烷变化

Fig. 4 CSTR anaerobic digestion on organic load and methane production of whole stillage

提升到 $3.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 共产生气体 146.6 L , 其中甲烷 89.1 L , 最大甲烷含量达到 73.52%, 最高甲烷产率达到 457.1 L/kg VS , VS 去除率达 67.3%, 纤维素转化率达到 85.3%。

为了实时监控反应器的运转状态, 对发酵残留物厌氧消化过程中的碱度、pH 值等关键参数进行分析。如图 5 所示, 反应起始阶段的碱度为 3350 mg/L CaCO_3 , 当有机物负荷不断提升, 反应器内的碱度与 pH 值在较小范围波动, 分别维持在 $3350\sim 3875 \text{ mg/L CaCO}_3$ 和 $7.3\sim 7.9$ 之间。在整个厌氧消化运转过程中, 均无乙酸检出, 挥发酸与碱度的比值始终小于 0.3。一般认为, 挥发酸与碱度的比值小于 0.4 时, 表明反应器运转稳定, 对所承载的有机负荷具有较强的缓冲能力。可见, 在最高 $3.5 \text{ g VS}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 有机负荷下运转时仍未达到 CSTR 反应器的处理极限。

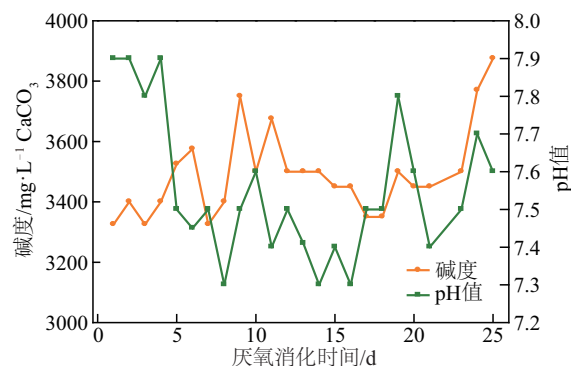


图5 CSTR 厌氧消化运转过程中碱度、pH 值变化

Fig. 5 Alkalinity and pH change during anaerobic digestion of CSTR

以上结果表明, 以高底物同步糖化乙醇发酵残留物进行 CSTR 厌氧消化是一种可行性较好的生产清洁能源的策略, 其甲烷产率、底物利用率及纤维素转化率均较高, 并且在提升负荷的过程中系统稳定性较好。

3 结 论

本文以汽爆狼尾草高底物同步糖化乙醇发酵全残留物为底物, 对其产甲烷潜力以及其在 CSTR 反应器中连续厌氧消化生产清洁能源的特性进行研究。经过 BMP 实验后, 一方面证明狼尾草乙醇发酵全残留物可作为良好的厌氧消化底物, 另一方面证实发酵残留物甲烷潜力测试中第 1 个产气高峰主要是产甲烷菌群快速利用小分子酸、纤维素酶和酵母而产生的。在第 10 天, 产甲烷菌群开始利用纤维素和半纤维素, 出现第 2 个产气高峰。酶与酵母、小分子酸及纤维素和半纤维素这些组分的产气量占总产气量的 97%。在后续利

用 CSTR 反应器进行单相厌氧消化时,当有机负荷从 1.5 g VS/(L·d)逐渐提升至 3.5 g VS/(L·d)时,反应器运转稳定,无乙酸积累,最终获得 457.1 L/kg VS 的甲烷产率和 67.3%的 VS 去除率,说明乙醇发酵全残留物在利用 CSTR 进行连续厌氧消化过程中可稳定运转并获得较高的甲烷产率,为后续利用全残留物进行长期规模化清洁能源甲烷的生产提供可靠的依据。

[参考文献]

- [1] NIELSEN S F, HJORTH M, BABY S, et al. The effect of harvest time, dry matter content and mechanical pretreatments on anaerobic digestion and enzymatic hydrolysis of miscanthus[J]. *Bioresource technology*, 2016, 218: 1008-1015.
- [2] KANG K E, CHUNG D-P, KIM Y, et al. High-titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system[J]. *Fuel*, 2015, 145: 18-24.
- [3] DANG Y, SUN D Z, WOODARD T L, et al. Stimulation of the anaerobic digestion of the dry organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with carbon-based conductive materials [J]. *Bioresource technology*, 2017, 238: 30-38.
- [4] LI Y Q, ZHANG R H, LIU G Q, et al. Anaerobic co-digestion of chicken manure and corn stover in batch and continuously stirred tank reactor(CSTR)[J]. *Bioresource technology*, 2014, 156: 342-347.
- [5] FENG L, WAHID R, WARD A J, et al. Anaerobic co-digestion of cattle manure and meadow grass: effect of serial configurations of continuous stirred tank reactors (CSTRs)[J]. *Biosystems engineering*, 2017, 160: 1-11.
- [6] ZHAO C, CUI X Y, LIU G Q, et al. Maximization of the methane production from durian shell during anaerobic digestion [J]. *Bioresource technology*, 2017, 238: 433-438.
- [7] SCHMIDT T, NELLES M, SCHOLWIN F, et al. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage-optimization of metal dosing [J]. *Bioresource technology*, 2014, 168: 80-85.
- [8] CHENG Q P, CHEN Z H, DENG F, et al. Kinetic evaluation on the degradation process of anaerobic digestion fed with piggery wastewater at different OLRs [J]. *Biochemical engineering journal*, 2016, 113: 123-132.
- [9] LI Y Q, LIU C M, WACHEMO A C, et al. Serial completely stirred tank reactors for improving biogas production and substance degradation during anaerobic digestion of corn stover [J]. *Bioresource technology*, 2017, 235: 380-388.
- [10] 曹长海, 张全, 关浩, 等. 提高木质纤维素酶解糖化效率的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(8): 126-136.
- CAO C H, ZHANG Q, GUAN H, et al. Research progress of enhancing enzymatic saccharification efficiency of lignocellulose [J]. *China biotechnology*, 2015, 35(8): 126-136.
- [11] WANG Z, LYU Z, DU J L, et al. Combined process for ethanol fermentation at high-solids loading and biogas digestion from unwashed steam-exploded corn stover[J]. *Bioresource technology*, 2014, 166: 282-287.

METHANE PRODUCTION CHARACTERISTICS OF STILLAGE FROM ETHANOL FERMENTATION OF *Pennisetum purpureum*

Chen Le, Zuo Ranran, Li Jian'an, Du Jiliang, Yang Xiushan, Tian Shen

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: In this study, the whole stillage of ethanol fermentation of *Pennisetum purpureum* is used as substrate to do the methane potential test (BMP) and the single-phase continuous stirring reactor (CSTR) anaerobic digestion experiment. The aim is to verify the methane production characteristics of the ethanol residue and the contribution of the components in the residue to the production of clean energy methane. After 50 d of BMP experiments, the final methane production reaches 884 mL and the corresponding methane yield is 390.6 mL/g VS, while cellulose and hemicellulose reach a peak of production on tenth day with a percent of 48.2% on the total gas production. The small molecular acid and enzyme reach the peak of gas production on the second day, and the gas production accounts for 22.4% and 26.4% of the total gas production. The organic loading rate was gradually increased from 1.5 g VS/(L·d) to 3.5 g VS/(L·d) using a CSTR reactor followed by a single-phase anaerobic digestion. The final results obtain 457.1 L/kg VS yield of methane and 47.3% VS removal rate. The results show that the ethanol fermentation whole stillage of *Pennisetum purpureum* can be used as a good anaerobic digestion substrate to produce biogas.

Keywords: biofuel; anaerobic digestion; methane; ethanol fermentation; CSTR