

## 醋酸预处理对牛粪与水稻秸秆混合厌氧发酵特性的影响

杨雪<sup>1</sup>, 邹书珍<sup>1,2</sup>, 唐贇<sup>1</sup>, 余小丽<sup>1</sup>

(1. 西华师范大学生命科学学院, 南充 637000; 2. 西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 为了探究醋酸预处理提高厌氧发酵产气量的原因, 研究用醋酸预处理水稻秸秆, 之后将预处理后的水稻与牛粪混合进行厌氧发酵, 测定发酵初始环境和发酵过程中纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量、pH 及日产气量, 并且对其发酵过程中的稳定性系数进行分析。结果表明, 水稻秸秆在 4% 的醋酸浓度下预处理 4 d 处理组的总沼气产量最高为 11 605 mL, 且显著高于未经预处理总沼气的 6 450 mL ( $P < 0.01$ ), 且该处理的日产气量的峰值提高和出现的时间提前; 厌氧发酵的初始环境、过程环境、环境稳定性以及他们之间的相互作用关系受醋酸预处理影响; 醋酸预处理提高总沼气产量的主要原因是, 醋酸预处理使厌氧发酵初始环境和过程环境更加协调, 使发酵系统更加稳定。研究表明, 醋酸预处理能够显著提高沼气产量, 为醋酸预处理技术提供一定的参考。

**关键词:** 醋酸预处理; 厌氧发酵; 稳定性分析; 产气量

中图分类号: S216.4; X71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)04-0697-09

### Effect of acetic acid pretreatment on anaerobic fermentation characteristics of mixed cow dung and rice straw

YANG Xue<sup>1</sup>, ZOU Shuzhen<sup>1,2</sup>, TANG Yun<sup>1</sup>, YU Xiaoli<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, West China Normal University, Nanchong 637000;

2. College of Agriculture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)

**Abstract:** In order to explore the reasons for the pretreatment of acetic acid to increase the gas production of anaerobic fermentation, the study of pretreatment of rice straw with acetic acid and then mixed with cow dung for anaerobic fermentation. Besides, the mixtures were used to determine the influence factors of the initial fermentation environment and fermentation process by anaerobic fermentation. The enzyme activity, reducing sugar content, VFA content, pH and daily gas production, and the stability coefficient during the fermentation process were analyzed. The results showed that the total biogas production of rice straw treated at 4% acetic acid concentration for 4 days was 11 605 mL, which was significantly higher than the total pre-treated total biogas volume of 6450 mL ( $P < 0.01$ ), and the peak of the daily gas production of the treatment increased and time was advanced. The initial environment, process environment, environmental stability and interaction between anaerobic fermentation are affected by acetic acid pretreatment. The main reason for the increase of total biogas production by acetic acid pretreatment is that the pretreatment of acetic acid makes the initial environment and process environment of anaerobic fermentation more coordinated and promotes the stability of the fermentation system. Studies have shown that acetic acid pretreatment can significantly increase biogas production and provide a reference for acetic acid pretreatment technology.

**Key words:** acetic acid pretreatment; anaerobic fermentation; stability analysis; gas production

沼气工程化技术是农业废弃物资源化的重要技术之一<sup>[1]</sup>。根据欧盟政策评估了沼气的利用现状, 发现大约有 25% 的生物质能源来自于沼气<sup>[2]</sup>。因此

生物能源的开发与研究已经成为当今社会关注的焦点<sup>[3]</sup>, 而农作物秸秆作为一种生产沼气的重要生物质能源, 其开发潜力巨大, 但如今大多数农作物秸

收稿日期: 2018-10-08

基金项目: 四川省科技厅项目 (2018JY0475) 和国家自然科学基金 (31800458) 共同资助。

作者简介: 杨雪, 硕士研究生。E-mail: 944718691@qq.com

\* 通信作者: 唐贇, 副教授。E-mail: tangyun\_502@cwnu.edu.cn; 邹书珍, 博士、讲师。E-mail: zousz@foxmail.com

秆被堆放或者露天焚烧处理,这样不仅造成资源的浪费,还对环境造成污染。利用人畜粪便进行厌氧发酵并综合利用,既能回收能源,又能净化环境,因而得到了广泛的应用<sup>[4]</sup>。沼气的利用率在国内外都有明显的提高,在国外,沼气工程建设的数目在不断增长<sup>[5]</sup>;在中国,沼气用户高达2亿,解决了人们的用能需求。其次厌氧发酵技术是一种合理有效利用有机废弃物来产生沼气的方式之一,可有效地降低环境污染,减轻人们对不可再生资源的消耗和依赖,提供更多的清洁能源,并应用于实际生产中<sup>[6]</sup>。通过沼气发酵不仅可以解决秸秆焚烧带来的环境问题,同时可以利用其减少水稻秸秆与牛粪混合物中细菌病毒的繁殖传播,避免水稻直接还田引发病虫害,对生态环境造成一定影响<sup>[7]</sup>。这样一来一方面可有效解决因农作物秸秆的不合理利用带来的一系列生态环境问题,另一方面,也可以为农民带来一定的经济效益,提高农民收入,这种方式集经济、社会和生态效益于一体,应用前景可观<sup>[8]</sup>。

但秸秆种类的多样性对沼气工艺的技术和设备要求更高<sup>[9]</sup>。由于水稻秸秆的组成与结构较复杂,若不进行任何处理就会导致其厌氧消化时间长,降解效率低,产气量少<sup>[10]</sup>。虽然化学预处理存在一定的缺点,强酸会腐蚀设备,对环境造成二次污染<sup>[3]</sup>,但在本研究中,将醋酸作为一种预处理的有机酸,其酸性较弱规避了其他强酸对设备产生二次污染的问题,降低成本,易于将农业废弃物转化成高品质的清洁能源,同时采用醋酸预处理发酵原料能在一定程度上有效促进农作物秸秆的生物降解率,在厌氧发酵过程中易于被微生物利用,产生甲烷<sup>[11]</sup>,是提高发酵效率的关键技术之一。郑明霞等<sup>[12]</sup>、李辉勇<sup>[13]</sup>研究发现,醋酸能够使水稻秸秆中的纤维素、半纤维素和木质素的自身晶体结构因吸胀作用而被破坏,将其中大分子物质溶解,从而达到提高降解率的目的;黎雪等<sup>[14]</sup>研究发现麦秆经过醋酸预处理后与猪粪混合发酵可显著提高甲烷单位产量;郭燕<sup>[15]</sup>研究发现醋酸预处理玉米秸秆能有效调节厌

氧发酵料液的碳氮比例,明显提高其产气量,是秸秆预处理的最佳方法之一。

现今,许多国内外学者已经通过预处理对厌氧发酵特性的影响以及对预处理条件优化进行较多研究。Song等<sup>[16]</sup>研究了Ca(OH)<sub>2</sub>预处理对水稻秸秆沼气产量的影响,主要是因为预处理能够降解秸秆中的半纤维素的含量;Khatri等<sup>[17]</sup>通过碱预处理和Fe投加对玉米秸秆厌氧消化有显著的改善,其能进一步提高甲烷产量;Mancini等<sup>[18]</sup>研究发现通过NaOH预处理水稻秸秆比添加微量元素更能提高沼气产量。但对预处理后,发酵过程中各因素之间相关性及其对产气量的重要程度的研究较少,尤其是纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA(挥发性脂肪酸)含量、pH及其稳定性与日产气量之间的关系研究较少。

为了弥补上述研究中存在的不足,本研究采用醋酸预处理的方法对水稻秸秆进行处理后与牛粪混合进行厌氧发酵,测定发酵初始环境和发酵过程中环境中的纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA含量和pH值,并对发酵过程中各因子的稳定性系数进行分析,之后利用相关性分析法和冗余分析法(RAD)研究发酵环境中各因素与日产气量和总产气量之间的相互关系。通过多种分析方法探讨发酵初始环境和发酵过程中多因素对提高厌氧发酵产气量的原理。以期水稻秸秆与牛粪混合厌氧消化预处理提供参考依据,同时为实际生产中沼气工程发酵技术提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

将自然风干的水稻秸秆,用9Z-2.5秸秆粉碎机粉碎成1~2cm的小段备用。新鲜的牛粪取自奶牛养殖场。沼液取自陕西省杨陵区西北农林科技大学沼气示范村沼气池,取时将其摇匀。原料和沼液的基本性质如表1所示。

表1 水稻秸秆、牛粪及沼液的性质

Table 1 Characteristics of raw materials and inoculum

项目 Item	水稻秸秆 Rice straw	牛粪 Cow dung	接种物 Inoculum
全碳 TOC <sup>a</sup> Total Organic Carbon (g/kgVS)	48.43±0.15	65.12±0.50	35.50±0.30
全氮 TN <sup>a</sup> Total nitrogen (g/kg VS)	0.85±0.02	4.59±0.03	1.69±0.20
碳氮比 <sup>a</sup> C/N Carbon to nitrogen ratio	56.98±0.12	14.20±0.20	21.01±0.20
干物质含量 TS Total Solid (%)	91.00±0.15	22.20±0.20	8.50±0.09
挥发性干物质含量 VS Volatile Solid (%)	85.00±0.17	83.97±0.70	70.20±0.60

注:<sup>a</sup>烘干样品。Note:<sup>a</sup>Drying samples

## 1.2 二因素全面试验设计

二因素全面试验设计中有两个自变量, 利用二因素来分析这两个自变量对因变量的影响。在本实验中, 二因素分别为醋酸预处理时间和浓度, 其中预处理时间为 2、4、6 d; 预处理浓度为 4 个浓度梯度为: 3% (V:V)、4%、5% 和 6%, 每个处理设置 3 个重复, 共 12 个处理。其组合方式如表 2 所示。

表 2 水稻秸秆与牛粪醋酸预处理试验设计

Table 2 Experimental design of CH<sub>3</sub>COOH pretreatment

浓度/% Concentration	时间/d Time	水稻秸秆 Rice straw
3	2	C <sub>3</sub> d <sub>2</sub>
3	4	C <sub>3</sub> d <sub>4</sub>
3	6	C <sub>3</sub> d <sub>6</sub>
4	2	C <sub>4</sub> d <sub>2</sub>
4	4	C <sub>4</sub> d <sub>4</sub>
4	6	C <sub>4</sub> d <sub>6</sub>
5	2	C <sub>5</sub> d <sub>2</sub>
5	4	C <sub>5</sub> d <sub>4</sub>
5	6	C <sub>5</sub> d <sub>6</sub>
6	2	C <sub>6</sub> d <sub>2</sub>
6	4	C <sub>6</sub> d <sub>4</sub>
6	6	C <sub>6</sub> d <sub>6</sub>

## 1.3 醋酸预处理方法

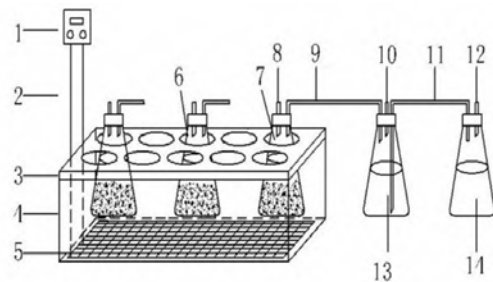
按照二因素全面试验设计的结果进行。具体操作方法: 称取 12 份 500 g 水稻秸秆与容器中, 放置备用。向 4 份含有 2 250 mL 的纯净水的烧杯中分别加入 67.5、90、112.5、135 mL 的醋酸分析纯, 配置成醋酸与纯净水的体积比为 3%、4%、5% 和 6% 的醋酸稀释液。之后将稀释液按照表 2 的设计方法, 分别加入水稻秸秆中, 使水稻机别干的含量水量为 80%, 搅拌均匀。加盖后室温下预处理。

## 1.4 厌氧发酵方法

将醋酸预处理后水稻秸秆与牛粪按照不同比例混合, 当按干物质质量 1:1 进行混合时, 发现该配比产气量最佳, 并且在经过醋酸预处理后, 混合物能够充分与总产气量明显提高, 此方法参考了多人的研究方法<sup>[8]</sup>, 并且在此基础上经过醋酸预处理后, 秸秆中的纤维素能够被充分降解, 总产气量进一步提高。取适量混合物质, 使其干物质重量 56 g, 放入 1L 的三角瓶中, 然后往该三角瓶中加入 200 g 的沼液, 最后加入一定量的纯净水使三角瓶中物质的总重量为 700 g, 保持发酵瓶中的干物质为 8%, 之后将其放入温度为 (35±2) °C 的水浴槽中厌氧发酵 35 d。期间每 5 d 取样测定纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量及 pH。取样前先测定产气量, 之

后将发酵罐轻轻摇匀。具体取样过程为: 打开厌氧发酵罐的盖子, 迅速用抽拉式液体取样器取 10 mL 沼液放入离心管中, 立刻盖上离心管的盖子放入冰箱待测, 避免氧气进入发生反应。之后将氮气充入厌氧发酵罐, 赶走空气, 立刻盖上厌氧发酵罐。设置空白试验 (700 g 沼液厌氧发酵组)。每组试验设置 3 个平行试验。发酵装置如图 1 所示。

该装置是一个厌氧发酵装置, 由温控箱、控温传感器、发酵瓶、储气瓶等组成, 各装置间通过导管连接。其中通过温控箱和控温传感器控制发酵温度, 储气瓶收集气体, 恒温箱中 3 个 1 L 的三角瓶, 表示每个处理进行 3 次重复。



1、温控箱; 2、控温传感器; 3、保温盖; 4、保温层; 5、加热线; 6、发酵瓶; 7、取样口; 8、取气口; 9、导气管; 10、导气口; 11、导水管; 12、排气口; 13、储气瓶; 14、储水瓶

1.temperature control box; 2.temperature sensor; 3.insulation cover; 4.insulation layer; 5.heating wire; 6.fermentation bottle; 7. sampling port; 8. gas inlet; 9. airway; 10. air guide; 11. water pipe; 12. exhaust port; 13. gas cylinder; 14. water bottle

图 1 厌氧发酵装置

Figure 1 Anaerobic digestion device

## 1.5 测定项目及方法

(1) 总固体 (TS) 质量测定: 采用烘干法测定 TS 在 (105±5) °C 的烘箱中烘至恒重<sup>[19]</sup>;

(2) 挥发性固体 (VS) 测定: 烘至恒重的发酵原料再放入坩埚内, 置于 550 °C 的马弗炉中灼烧 2 h, 冷却后称量<sup>[11]</sup>;

(3) 总氮 (N) 含量: 利用凯氏定氮仪测量;

(4) 总碳 (C) 含量: 重铬酸钾—外热源法测定<sup>[20]</sup>;

(5) DNS 比色法测定还原糖含量: 利用 DNS 法对纤维素酶活力进行测定。具体方法为: 将 1 mL 沼液加入到 3 mL 0.5% 的羧甲基纤维素钠中, 50 °C 水浴中水浴 30 min, 到时间后沸水浴 10 min, 最后测定其还原性糖含量。沼液每 min 从浓度为 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液中释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个活力单位 (IU·mL<sup>-1</sup>)<sup>[21]</sup>。

(6) 挥发性脂肪酸 (VFA) 含量: 利用紫外分光光度仪比色法测定<sup>[22]</sup>;

(7) pH: 用智能 pH 计 (pHs-3CT 型) 测定发酵产物中的 pH;

(8) 日产气量: 采用排水集气法将厌氧发酵过程中产生的沼气收集至 1 L 的三角瓶中<sup>[13]</sup>;

### 1.6 数据分析与整理

利用 Office 2010 对数据进行初步整理, 利用 IBM SPSS 软件 (Version 21, IBM Inc, 2012) 对数据进行方差分析、稳定性分析、相关性分析, 利用 canon 软件对数据进行 RDA 分析, 利用 Oringin 软件制作柱形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 醋酸预处理对沼气产量的影响

2.1.1 醋酸预处理对总产气量的影响 从图 2 可以看出, 醋酸预处理的厌氧发酵处理组总沼气产量均显著高于 CK 厌氧发酵总沼气的量 ( $P < 0.05$ )。其中 C<sub>4d6</sub> 厌氧发酵处理组的总沼气的量最高为 11 605 mL, 且显著高于 CK 厌氧发酵总沼气的量 6 450 mL ( $P < 0.01$ ), 说明醋酸预处理显著提高水稻秸秆和牛粪混合厌氧发酵的沼气产气量。因为在酸性条件下, 水稻秸秆的结构已被酸性试剂破坏, 在供给微生物大量能量时也为其提供更多的附着场所, 使微生物更利降解水稻秸秆并转化为其他能被产气菌利用的小分子物质, 从而加快产气进程, 产气量增加。此结果与周莎等研究醋酸预处理麦秆增加产气量结果一致<sup>[11,25]</sup>。

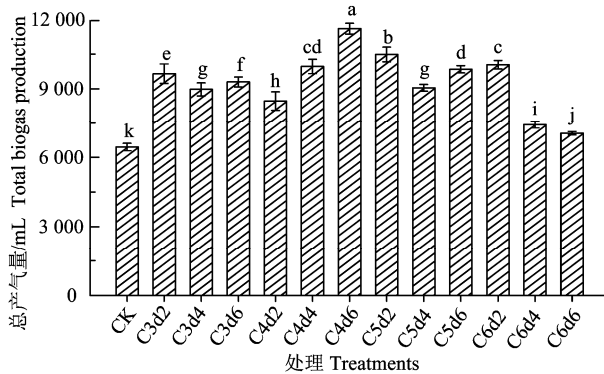


图 2 醋酸预处理对厌氧发酵总产气量的影响 (小写字母相同表示差异性不显著, 小写字母均不同表示差异显著) Figure 2 Effect of acetic acid pretreatment on total gas production(The lowercase letters are the same, the difference is not significant, and the lowercase letters are different, indicating significant difference)

2.1.2 醋酸预处理对日产气量影响 从图 3 可以看出, 日产气量最大值、最小值呈现出先上升后下降

的趋势, 并且在高峰期维持一段时间后日产气量才开始下降且稳定在一定水平。这是由于经过醋酸预处理后, 水稻秸秆的组分被降解, 利用率提高, 从而使得发酵液中的微生物很容易利用底物来繁殖发酵, 进而产生大量气体<sup>[22]</sup>。但在反应过程中, 底物被急剧消耗减少, 产气菌生长速度减慢, 产气量下降。直到最后可利用底物越来越少时, 产气菌的作用也趋于稳定, 产气量从趋于稳定到产气停止<sup>[23]</sup>。

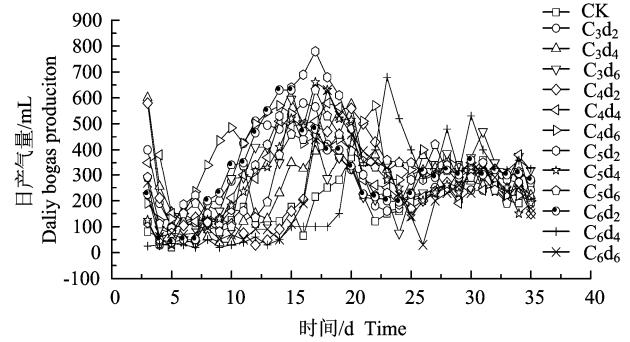


图 3 醋酸预处理对日产气量的影响 Figure 3 Effect of acetic acid pretreatment on daliy gas production

### 2.2 醋酸预处理对发酵初始环境的影响

醋酸预处理对水稻秸秆和牛粪混料物质厌氧发酵初始环境中的纤维素活力、还原性糖含量、VFA 含量和 pH 值具有一定的影响 (图 4)。未经醋酸预处理的水稻秸秆与牛粪混料 (CK) 厌氧发酵初始环境中纤维素活力、还原性糖含量、VFA 含量和 pH 值分别是 1.69 IU·mL<sup>-1</sup>、9.20 mg·mL<sup>-1</sup>、713 mg·L<sup>-1</sup>、7.2。预处理后的各处理组的纤维素活力、还原性糖含量和 VFA 含量均升高, 而 pH 值下降。可能原因是醋酸预处理能够纤维素的分解使水稻秸秆的秸秆变得疏松, 使发酵初始环境中的纤维素酶活力提高, 从而加速了对底物中纤维素的分解<sup>[24]</sup>。醋酸分解木质纤维素的机理是醋酸能够释放底物中的水合氢离子, 进一步反应中, 水合氢离子作为催化剂降解大分子多糖物质<sup>[19]</sup>, 秸秆中的纤维素和半纤维素被水解成还原性糖。因此, 醋酸预处理后, 还原性糖含量也升高。处理组中 VFA 含量其最大值和最小值也都大于 CK, 因为底物被纤维素酶降解为还原性糖的过程中, 还原性糖作为合成 VFA 的中间物质, 在微生物作用下转化为 VFA, 所以处理组中的 VFA 含量较 CK 高<sup>[24]</sup>; 而在醋酸加速溶解水稻秸秆中木质纤维素的过程中, 醋酸显酸性, 且醋酸溶解秸秆产生的酸性物质 (VFA) 也促使预处理后的各处理的 pH 小于 CK。

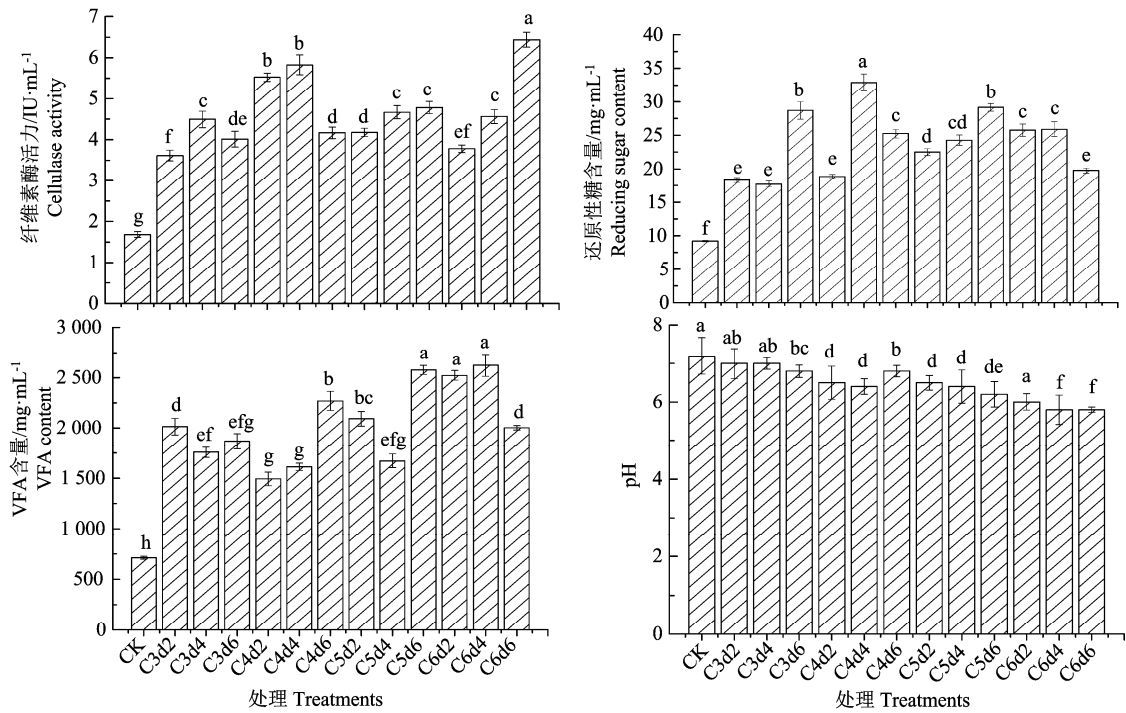


图 4 醋酸预处理对发酵初始环境的影响 (小写字母相同表示差异性不显著, 小写字母均不同表示差异显著)

Figure 4 Effect of acetic acid pretreatment on fermentation initial environment (The same big letters represent no significances and different big letters represent significant difference at 0.05 levels)

表 3 厌氧发酵过程中纤维素酶活力变化的特征

Table 3 Changes of cellulase activity on anaerobic fermentation

IU·mL<sup>-1</sup>

处理 Treatment	最大值 Maximum	最大值出现时间/d Maximum time	最小值 Minimum	最小值出现时间/d Minimum time
CK	6.19±0.18	10	1.69±0.10	35
C <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	5.17±0.17	5	1.96±0.08	35
C <sub>3</sub> d <sub>4</sub>	5.29±0.17	5	2.03±0.08	35
C <sub>3</sub> d <sub>6</sub>	5.15±0.18	5	1.88±0.09	35
C <sub>4</sub> d <sub>2</sub>	5.53±0.19	0	2.23±0.10	35
C <sub>4</sub> d <sub>4</sub>	5.83±0.18	0	2.38±0.09	35
C <sub>4</sub> d <sub>6</sub>	5.09±0.21	5	2.00±0.09	35
C <sub>5</sub> d <sub>2</sub>	6.38±0.18	5	1.99±0.09	35
C <sub>5</sub> d <sub>4</sub>	4.67±0.17	0	1.86±0.09	35
C <sub>5</sub> d <sub>6</sub>	5.27±0.18	5	1.83±0.10	35
C <sub>6</sub> d <sub>2</sub>	5.41±0.16	5	1.88±0.08	35
C <sub>6</sub> d <sub>4</sub>	4.78±0.17	5	2.16±0.08	35
C <sub>6</sub> d <sub>6</sub>	6.44±0.19	0	1.79±0.09	35

### 2.3 醋酸预处理对厌氧发酵过程环境的影响

**2.3.1 醋酸预处理对厌氧发酵过程中纤维素酶活力的影响** 在发酵初期纤维素酶活力相对较高。CK 厌氧发酵过程中纤维素酶活力最大值分别是 6.19 IU·mL<sup>-1</sup> (如表 3), 且最大值出现在厌氧发酵第 10 天 (如表 3), 在处理组中 C<sub>5</sub>d<sub>2</sub> 的最大值为 6.38 IU·mL<sup>-1</sup>, 均大于其余处理组。并且在各处理组中发现醋酸能使发酵过程中的纤维素酶活力的最大值

升高或降低且使最大值出现的时间提前, 均出现在厌氧发酵的初始环境。但醋酸预处理使纤维素酶活力最小值升高, 出现时间无变化, 均出现在厌氧发酵结束时。因为醋酸预处理能够破坏底物中纤维素的组分, 从而增强了纤维素酶活力, 所以其最大值出现的时间提前<sup>[25]</sup>。但随着反应的进行, 底物中纤维素含量降低, 能被纤维素酶分解的底物越来越少, 纤维素酶活力也随之下降。

表 4 厌氧发酵过程中还原性糖含量变化的特征

Table 4 Changes of reducing sugar activity on anaerobic fermentation

mg·mL<sup>-1</sup>

处理 Treatment	最大值 Maximum	最大值出现时间/d Maximum time	最小值 Minimum	最小值出现时间/d Minimum time
CK	19.24±0.55	5	9.20±0.32	0
C <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	18.31±0.53	0	10.50±0.35	25
C <sub>3</sub> d <sub>4</sub>	17.71±0.50	0	9.95±0.34	25
C <sub>3</sub> d <sub>6</sub>	28.68±0.61	0	10.50±0.34	35
C <sub>4</sub> d <sub>2</sub>	18.87±0.54	0	11.20±0.35	20
C <sub>4</sub> d <sub>4</sub>	32.91±0.72	0	10.97±0.35	25
C <sub>4</sub> d <sub>6</sub>	25.24±0.68	0	10.55±0.34	35
C <sub>5</sub> d <sub>2</sub>	22.50±0.64	0	8.78±0.30	25
C <sub>5</sub> d <sub>4</sub>	24.27±0.65	0	10.83±0.35	20
C <sub>5</sub> d <sub>6</sub>	29.15±0.70	0	10.50±0.34	5
C <sub>6</sub> d <sub>2</sub>	25.75±0.71	0	10.83±0.36	35
C <sub>6</sub> d <sub>4</sub>	25.89±0.71	0	12.13±0.38	5
C <sub>6</sub> d <sub>6</sub>	19.76±0.58	0	11.43±0.36	20

表 5 厌氧发酵过程中 VFA 含量变化的特征

Table 5 Changes of VFA on anaerobic fermentation

处理 Treatment	最大值 Maximum	最大值出现时间/d Maximum time	最小值 Minimum	最小值出现时间/d Minimum time
CK	2 490±55	10	713±18	0
C <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	2 240±56	5	563±17	35
C <sub>3</sub> d <sub>4</sub>	1 998±52	5	656±20	35
C <sub>3</sub> d <sub>6</sub>	2 296±60	15	570±18	35
C <sub>4</sub> d <sub>2</sub>	2 235±58	5	663±18	35
C <sub>4</sub> d <sub>4</sub>	3 163±72	5	825±24	35
C <sub>4</sub> d <sub>6</sub>	2 982±75	10	892±26	35
C <sub>5</sub> d <sub>2</sub>	3 021±76	10	958±28	35
C <sub>5</sub> d <sub>4</sub>	2 642±84	5	697±20	35
C <sub>5</sub> d <sub>6</sub>	2 665±66	10	624±18	35
C <sub>6</sub> d <sub>2</sub>	3 256±76	15	790±22	35
C <sub>6</sub> d <sub>4</sub>	2 896±70	5	940±28	35
C <sub>6</sub> d <sub>6</sub>	2 859±72	5	765±22	35

**2.3.2 醋酸预处理对厌氧发酵过程中还原性糖含量的影响** CK 厌氧发酵过程中还原性糖含量的最大值为 19.24 mg·mL<sup>-1</sup> (如表 4), 最小值为 9.20 mg·mL<sup>-1</sup>, 其中最大值则出现在第 5 天 (如表 4)。在各处理组中还原糖含量呈现先升高后降低最后趋于稳定的趋势。因为在发酵初期, 纤维素酶活力提高加速了对底物的分解, 在酶解速率加快的同时, 生成了较多的还原糖, 还原糖含量升高<sup>[20]</sup>。并在各处理组中发现, 醋酸预处理也能够使发酵过程中的还原糖含量的最大值升高或降低且使最大值出现的

时间提前, 均出现在厌氧发酵的初始环境。而还原糖含量的最小值也能够被预处理升高或降低, 但出现时间推迟。因为在纤维素酶活力降低的同时, 底物无法被纤维素酶分解成还原性糖, 所以其含量也下降。

**2.3.3 醋酸预处理对厌氧发酵过程中 VFA 含量影响** CK 中 VFA 含量最大值为 2 490 mg·mL<sup>-1</sup>, 但受醋酸预处理的影响, 处理组中最大值出现的时间提前或延迟, 而最小值无变化, 均为厌氧发酵第 35 天 (如表 5)。其处理组中 C<sub>6</sub>d<sub>2</sub> 最大值最高为 3 256

mg·mL<sup>-1</sup>, 而 C<sub>3</sub>d<sub>2</sub> 的最小值最小为 563 mg·mL<sup>-1</sup>, 因为产酸菌可以通过其他代谢途径将大分子物质转化为 VFA<sup>[21]</sup>, 使 VFA 含量升高, 但随着发酵反应的进行, VFA 被急剧消耗, 发酵反应也处于稳定状态。由此得出在醋酸预处理使发酵过程中 VFA 含量先升高后降低。

### 2.3.4 醋酸预处理对厌氧发酵过程中 pH 的影响

CK 中 pH 最小值出现的时间不受醋酸处理的影响, 同 12 个经醋酸预处理的组最小值出现的时间相同, 均为厌氧发酵的第 5 天 (如表 6)。其中 CK

组的最大值为 7.5, 而其最小值为 6.0。而 CK 中 pH 在厌氧发酵的第 35 天达到最大值, 且保持稳定, 其他处理组最大值出现的时间提前 (如表 6), 且 pH 出现不同程度的升高<sup>[23]</sup>。每一个处理组的 pH 值呈现出先降低后升高的, VFA 含量与 pH 值成反比的关系。因为发酵初期大分子物质在产酸菌的作用下降解为小分子酸性物质, 使发酵液处于酸性环境下, pH 下降; 当产酸菌处于适宜条件下, 并且底物被消耗, 生成还原性糖和转化为 VFA 的速率减慢时, pH 逐渐升高, 之后又减低<sup>[26]</sup>。

表 6 厌氧发酵过程中 pH 值变化的特征  
Table 6 Changes of pH value on anaerobic fermentation

处理 Treatment	最大值 Maximum	最大值出现时间/d Maximum time	最小值 Minimum	最小值出现时间/d Minimum time
CK	7.5±0.21	35	6.0±0.20	5
C <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	7.4±0.23	20	5.8±0.21	5
C <sub>3</sub> d <sub>4</sub>	7.6±0.24	30	6.4±0.23	5
C <sub>3</sub> d <sub>6</sub>	7.5±0.23	35	5.7±0.19	5
C <sub>4</sub> d <sub>2</sub>	7.8±0.24	30	6.1±0.20	5
C <sub>4</sub> d <sub>4</sub>	7.4±0.23	30	6.0±0.21	5
C <sub>4</sub> d <sub>6</sub>	7.5±0.23	30	5.8±0.21	5
C <sub>5</sub> d <sub>2</sub>	7.3±0.24	35	5.8±0.20	5
C <sub>5</sub> d <sub>4</sub>	7.2±0.22	5	5.6±0.20	5
C <sub>5</sub> d <sub>6</sub>	7.2±0.22	25	5.5±0.19	5
C <sub>6</sub> d <sub>2</sub>	7.1±0.21	25	5.3±0.19	5
C <sub>6</sub> d <sub>4</sub>	7.2±0.22	35	5.5±0.20	5
C <sub>6</sub> d <sub>6</sub>	6.2±0.20	35	5.3±0.19	5

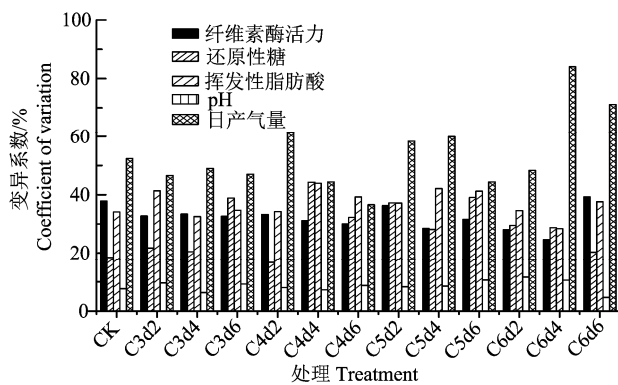


图 5 厌氧发酵过程中各因素及日产气量的稳定性

Figure 5 The stability of various factors and daily gas production on anaerobic fermentation

## 2.4 醋酸预处理对厌氧发酵过程环境稳定性影响

如图 5 所示, CK 组与处理组中 4 个因素的稳定性各不相同, CK 组纤维素酶活力变异系数较处理组纤维素酶活力变异系数大, 稳定性被降低; 而

其余处理组纤维素酶活力的变异系数均小于 CK, 稳定性提高, 因为纤维素酶属于一种蛋白酶, 其酶活性受 pH 值、底物降解的难易程度以及其他因素的影响, 在应对复杂发酵环境的同时酶活性也发生了相应的变化<sup>[27]</sup>, 稳定性也因此不同。此外, 处理组还原性糖含量的变异系数均比 CK 组大 (18.42%), 稳定性明显下降。还原性糖未能转化成更多的 VFA, VFA 含量较少<sup>[26]</sup>, 因此处理组的变异系数也随之降低, 其稳定性升高。随着反应进行, 醋酸预处理能够使初始环境中的一些可溶性物质增加, 缩短了厌氧发酵的水解阶段, 促进 VFA 的产生, 其稳定性降低。由于醋酸是有机酸, 溶于水显酸性, 因此发酵过程中的 pH 值受醋酸影响较大, 其变异系数 (11.63%), 明显高于 CK 组的变异系数 (7.67%), 所以稳定性降低。

日产气量受纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量、pH 值的影响, 其稳定性也发生改变<sup>[3]</sup>。其中

CK 组经醋酸预处理过后, 日产气量的变异系数出现先减小后增大的趋势, 稳定性先升高后降低。在初期, 醋酸预处理提高了纤维素酶活力的稳定性, 使底物的利用率提高, 且 pH 值在逐渐升高, 产气菌处于适宜 pH 条件下, 启动发酵过程, 提高了日

产气量<sup>[28]</sup>。但在后期, pH 逐渐降低, 导致了产气菌被酸性物质抑制了活性, 不能正常发酵, 从而使日产气量降低<sup>[29]</sup>, 使得日产气量的变异系数随之增大, 稳定性降低。

表 7 过程环境与产气量之间的关系

Table 7 Relationship between process environment and biogas production

因素 Factor	日产气量变异系数 Daily gas production c oefficient of variation	总产气量 Total gas production
纤维素酶活力变异系数 Cellulase activity coefficient of variation	- 0.077	- 0.312
还原性糖含量变异系数 Reducing sugar content coefficient of variation	- 0.344	0.599
VFA 含量变异系数 VFA content coefficient of variation	- 0.526	0.484
pH 变异系数 pH coefficient of variation	- 0.136	0.358

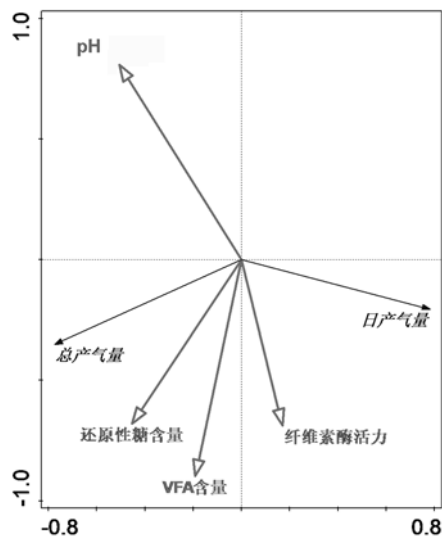


图 6 初始环境与产气量之间的关系

Figure 6 Relationship between initial environment and biogas production

## 2.5 发酵环境与产气量的关系分析

用 Canoco 软件对变量: 发酵初始环境中的纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量、pH、纤维素酶活力变异系数、还原性糖含量变异系数、VFA 含量变异系数和 pH 变异系数、日产气量的变异系数和总产气量相互之间的关系进行 RDA 分析, 发现 P 值为 0.19, 模型不显著, 之后对因素进行剔除 (分析过程略)。发酵初始环境中的纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量、pH、日产气量的变异系数和总产气量相互之间的关系进行 RDA 分析的模型显著 (图 6)。分析结果如下图所示: 发酵初始环境中纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量和 pH 均与总产气量正相关, 其中还原性糖含量与总产气量的相关性最强, pH 对总产气量的相关性最小。纤

维素酶活力和 VFA 含量与日产气量的变异系数呈正相关, 还原性糖含量和 pH 值与日产气量的变异系数呈负相关, 其中 pH 值与日产气量变异的相关性最大, VFA 含量与日产气量变异的相关性最小。为了进一步分析 RDA 剔除因子 (发酵过程环境因子稳定性) 对产气量的影响, 纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量和 pH 的变异系数与日产气量的变异系数和总产气量之间的关系分析如表 7 所示, 发酵过程中 VFA 含量的稳定性对日产气量的稳定性影响最大, 还原性糖含量的稳定性对总产气量多的影响最大。

## 2.6 醋酸预处理提高水稻秸秆和牛粪混合发酵产气量的原因

研究结构表明, 醋酸预处理能够提高水稻秸秆和牛粪混合厌氧发酵的产气量, 结合本研究分析具体原因如下: 第一, 预处理提高发酵初始环境中纤维素酶活力、还原性糖含量、VFA 含量 (如图 2 所示) 以及总产气量的峰值, 提高发酵初期细菌的营养物质含量, 从而加速发酵的启动, 提高产气量; 第二, 醋酸预处理使发酵过程中纤维素酶活力的最大值和还原性糖含量的最大值出现的时间提前, 加入底物中纤维素的降解而提高产气量; 第三, 醋酸预处理改变发酵系统中环境因子的稳定性, 并且这些因子之间相互影响, 提高发酵系统整体稳定性而提高产气量。

## 3 结论

醋酸预处理显著提高水稻秸秆和牛粪混合厌氧发酵的产气量, 水稻秸秆在 4% 的浓度下预处理 4 天处理组的总沼气产量最高为 11 605 mL, 且显著高于未经预处理总沼气的 6 450 mL ( $P < 0.01$ )。



发酵过程中环境因子的峰值和峰值出现的时间受醋酸预处理的影响, 环境因子的稳定性受预处理条件的影响, 但没有明显变化规律。

发酵初始环境中 VFA 含量及发酵过程中 VFA 含量的稳定对与日产气量的稳定性影响最大, 发酵初始环境中还原性含量及发酵过程中还原性糖含量的稳定性对总产气量多的影响最大。

醋酸预处理改变发酵初始环境性质及改变发酵系统中环境因子的稳定性, 并且这些因子之间相互影响, 提高发酵系统整体稳定性而提高产气量。

## 参考文献:

- [1] YUAN H P, ZHU N W. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion[J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2016, 58: 429-438.
- [2] 毛春兰. 小麦秸秆与猪粪混合物料厌氧发酵特征及微生物调控机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [3] 邹书珍. 不同预处理工艺厌氧发酵产气效率及其综合效益评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [4] YANG T X, LI Y J, GAO J X, et al. Performance of dry anaerobic technology in the co-digestion of rural organic solid wastes in China[J]. *Energy*, 2015, 93: 2497-2502.
- [5] RODRIGUEZ-VERDE I, REGUEIRO L, CARBALLA M, et al. Assessing anaerobic co-digestion of pig manure with agroindustrial wastes: The link between environmental impacts and operational parameters[J]. *Sci Total Environ*, 2014, 497/498: 475-483.
- [6] HJORTH M, GRÄNITZ K, ADAMSEN A P S, et al. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(8): 4989-4994.
- [7] YIN D X, LIU W, ZHAI N N, et al. Regional differentiation of rural household biogas development and related driving factors in China[J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2017, 67: 1008-1018.
- [8] LI J, WEI L Y, DUAN Q W, et al. Semi-continuous anaerobic co-digestion of dairy manure with three crop residues for biogas production[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 156: 307-313.
- [9] ZHANG Z K, ZHANG G Y, LI W L, et al. Enhanced biogas production from *Sorghum* stem by co-digestion with cow manure[J]. *Int J Hydrog Energy*, 2016, 41(21): 9153-9158.
- [10] 李文哲, 丁清华, 魏东辉, 等. 稻秸好氧厌氧两相发酵工艺与产气特性研究[J]. *农业机械学报*, 2016, 47(3): 150-157.
- [11] 周莎. 麦秆醋酸预处理后与粪便混合厌氧发酵协同效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [12] 郑明霞, 李来庆, 郑明月, 等. 碱处理对玉米秸秆纤维素结构的影响[J]. *环境科学与技术*, 2012, 35(6): 27-31.
- [13] 李辉勇. 稻草秸秆的碱法氧化预处理方法研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [14] 黎雪, 张彤, 邹书珍, 等. 不同温度下 NaOH-绿氧联合预处理对麦秆厌氧发酵的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(9): 1812-1821.
- [15] 郭燕. 不同化学预处理条件下秸秆厌氧发酵特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [16] SONG Z L, YANG G H, HAN X H, et al. Optimization of the alkaline pretreatment of rice straw for enhanced methane yield[J]. *Biomed Res Int*, 2013, ID 968692: 1-9.
- [17] KHATRI S, WU S B, KIZITO S, et al. Synergistic effect of alkaline pretreatment and Fe dosing on batch anaerobic digestion of maize straw[J]. *Appl Energy*, 2015, 158: 55-64.
- [18] MANCINI G, PAPIRIO S, RICCARDELLI G, et al. Trace elements dosing and alkaline pretreatment in the anaerobic digestion of rice straw[J]. *Bioresour Technol*, 2018, 247: 897-903.
- [19] CARLSSON M, LAGERKVIST A, MORGAN-SAGASTUME F. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review[J]. *Waste Manag*, 2012, 32(9): 1634-1650.
- [20] ZOU S Z, WANG X J, CHEN Y L, et al. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion by ultrasonic pretreatment[J]. *Energy Convers Manag*, 2016, 112: 226-235.
- [21] 楚莉莉, 李铁冰, 冯永忠, 等. 猪粪麦秆不同比例混合厌氧发酵特性试验[J]. *农业机械学报*, 2011, 42(4): 100-104.
- [22] ZOU S Z, KANG D. Relationship between anaerobic digestion characteristics and biogas production under composting pretreatment[J]. *Renew Energy*, 2018, 125: 485-494.
- [23] STEFFEN F, REQUEJO A, JANZON R, et al. Anaerobic digestion of rejects from deinked pulp manufacturing- influence of recovered paper grade on biogas potential[C]// International conference on engineering for waste and biomass valorisation. Albi: 2016.
- [24] CARRASCO J E, SÁIZ M C, NAVARRO A, et al. Effects of dilute acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 45/46(1): 23-34.
- [25] 周莎, 黎雪, 翟宁宁, 等. 麦秆酸预处理后与猪粪混合发酵提高产气量的效应研究[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(8): 2526-2533.
- [26] VANWONTERGHEM I, JENSEN P D, RABAEY K, et al. Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8496.
- [27] JIN W Y, XU X C, GAO Y, et al. Anaerobic fermentation of biogas liquid pretreated maize straw by rumen microorganisms in vitro[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 153: 8-14.
- [28] 邹书珍, 康迪. 超声波预处理对牛粪与玉米秸秆混合厌氧发酵特性的影响[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(7): 2696-2704.
- [29] KWIETNIEWSKA E, TYS J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation[J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2014, 34: 491-500.