

偏低温沼气发酵促进剂的初步研究

杨鹏可¹,周静¹,胡梦¹,邓斌²,张宿义³,胡承¹

(1.四川大学生命科学学院,生物资源与生态环境教育部重点实验室,四川成都 610064;2.重庆市江津计量质量检测中心,重庆 401420;3.四川泸州老窖股份有限公司,四川泸州 646000)

摘要: 沼气池通常采用常温发酵,在低温时节产气不足,严重影响沼气的推广和使用。偏低温沼气促进剂由微生物混合菌剂辅以酒糟浸出液和微量的无机盐成分而成。实验室模拟发酵实验表明,该促进剂可加速发酵启动,6~25 d增产效果显著,实验组比对照组总产气量提高了38.9%,总固体(TS)降解率相对提高了46.3%,挥发性固体(VS)降解率相对提高了39.8%,产沼气的甲烷量也有所提高。气池投放实验表明,在冬季低温条件下,促进剂投入6 d后开始产生效果;实验组产气量比对照组高;作用最显著的时期为9~24 d;实验组产气总量比对照组提高37.4%。

关键词: 沼气发酵; 促进剂; 酒糟浸出液

中图分类号: X797; Q93-3

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2008)04-0101-04

Research on Biogas-fermentation Accelerant at Relatively Low Temperature

YANG Peng-ke¹, ZHOU Jing¹, HU Meng¹, DENG Bin², ZHANG Su-yi³ and HU Cheng¹

(1.College of Life Sciences, Key Lab of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610064; 2. Jiangjin Center of Measurement and Quality Testing, Qijiang 401420; 3. Luzhou Liaoji Co. Ltd, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Normal temperature fermentation is usually adopted for biogas pool. However, the insufficient output of biogas in low temperature seasons would seriously inhibit the use of biogas. In this experiment, an accelerant which could remarkably increase biogas output at low temperature was developed. Such accelerant was a mixed-microbial-agent supplemented by distiller's grains lixivium and small quantity of inorganic salt. The simulation fermentation experiments in Lab suggested that such accelerant could speed up the start-up of the fermentation, and biogas output increase was remarkable from the 6th day to the 25th day. The total output, relative degradation rate of total solids and of volatile solids were increased by 38.9%, 46.3% and 39.8% respectively in experimental group compared with control group. Besides, methane content in biogas was also enhanced. The subsequent biogas pool use experiments indicated that the accelerant started to take effect on the 6th day at low temperatures in winter (the effects were remarkable from the 9th day to the 24th day) and biogas output increased (37.4% higher than control biogas pool).

Key words: biogas-fermentation; accelerant; distiller's grains lixivium

在农村推广普及户用沼气池是解决农村能源问题、帮助农民脱贫致富的有效措施。同时能消除粪便污染,减少薪柴的燃烧,从而极大地改善农村生态环境。在政府的重视下,经过长年的推动,截至2006年底,中国使用户用沼气池的农户达到2200万户,到2010年,将达到4000万户^[1]。

然而我国的户用沼气池面临一些问题。其中之一就是户用沼气池为常温发酵,低温时节产气不足。这影响了南方地区冬季时节沼气的使用,限制了低温时间长的北方地区的沼气普及和应用^[2]。关于这个问题,国外没有经验可以借鉴,因为国外多为大型沼气工程,采用中高

温发酵^[3]。国内多采用物理保温等办法^[2],均有着种种局限,因此,我们希望开发一种沼气发酵促进剂,促进低温状态下的沼气生产,从而利于沼气的推广和使用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

乳酸菌培养基^[4]: 乳酪蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 葡萄糖 5.0 g, 吐温 80 1.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, 醋酸钠 5.0 g, 柠檬酸二铵 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.5~6.8。

收稿日期: 2007-12-25

作者简介: 杨鹏可(1983-), 湖南长沙人, 在读硕士研究生, 研究方向: 工业微生物。

通讯作者: 胡承, 电子信箱 5123688@schu.com。

豆芽汁葡萄糖培养基^[4]: 黄豆芽 200.0 g, 葡萄糖 30.0 g, 水 1000 mL, pH 7.2。将黄豆芽洗净, 放入水中煮沸 30 min, 用纱布过滤得豆芽汁, 加入葡萄糖, 补足水分。

1.1.2 沼气发酵促进剂

该促进剂是多种微生物混合制剂。从 10 左右仍能维持较高产气量的优质沼气池中采样, 用人工制备的培养基反复富集驯化而成。菌剂培养过程中并不要求有严格的厌氧环境, 不产甲烷。接种后培养 3~4 d, pH 达 5.5 左右, 即成为原始菌剂。在原始菌剂中按一定比例加入酒糟浸出液以及微量的多种无机盐成分, 即成为最终产品, 可投池使用。其中, 酒糟浸出液制备方法为: 将酒糟按照 1:3 比例加入水后混合煮沸, 用纱布过滤, 滤液用 NH_4HCO_3 溶液将 pH 值调整到 5.5, 煮沸灭菌待用。

1.1.3 接种物

取自本实验室以猪粪为原料富集的接种物, 经测定总固体(TS)为 10.6%, 挥发性固体(VS)为 72.7%。

1.1.4 发酵原料

发酵原料为新鲜猪粪, 来源于成都市郊的一家养殖场。经测定, TS 为 18.3%, VS 为 83.1%。

1.1.5 实验装置

自制 2300 mL 实验型水压式厌氧消化装置^[5], 见图 1。发酵瓶外使用水浴, 模拟沼气池的地温缓冲, 避免温度剧烈变化。

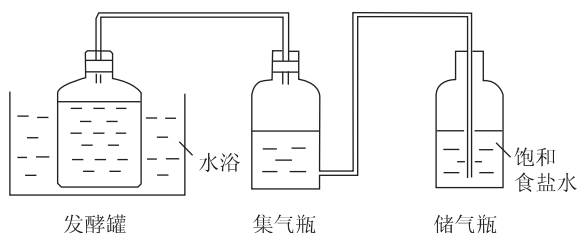


图 1 发酵装置图

1.1.6 实验仪器

气相色谱仪: HP 公司 1102G 型, FID 检测器; 电子天平: 日本 Shinko GS223 型, 精确到 0.001 g; pH 酸度计: 上海雷磁 pH-3C 型, 仪器级别为 0.01 级; PCR 仪: ABI 2700 型。

其他: 烘箱、马弗炉等。

1.2 方法

1.2.1 实验室模拟试验中发酵料液的配制

本实验设 1 个实验组和 1 个对照组, 各重复设 3 个平行。配料如下:

实验组: 500 mL 接种物, 500 g 新鲜猪粪, 加入促进剂 20 mL, 然后补加沼液至料容为 2000 mL。

对照组: 500 mL 接种物, 500 g 新鲜猪粪, 加入用于培养促进剂的培养基 20 mL, 然后补加沼液至料容为 2000 mL。

2005 年 11 月下旬至 12 月下旬, 避光发酵 30 d。

1.2.2 实验室模拟试验中测定项目及方法

TS、VS: 采用常规分析法^[6], 测定原料、接种物以及发酵前后料液的 TS、VS。

发酵温度: 每天中午 12 点和晚上 10 点各观测 1 次温度, 以其平均值作为发酵温度。

pH 值: 采用精密 pH 试纸和 pH 酸度计测定发酵前后料液的 pH 值。

产气量: 每天晚上 10 点记录。点火燃烧沼气, 观察记录火焰的颜色、燃烧状态。根据火焰颜色确定气体的甲烷含量^[7]。

1.2.3 沼气池试验

在四川省邛崃市选取 18 个户用沼气池参与实验, 其中 13 个为实验组, 5 个为对照组。池容为 6 m³, 投料为猪粪, 时间从 11 月下旬延续至次年 1 月, 共计 40 d, 气温为 2~12℃, 实验组按 2.5 kg/池加入促进剂, 对照组加入等量的促进剂培养基。

1.2.4 挥发酸的检测

参照文献[8], 略作改动。

2 m×3 mm 不锈钢螺旋柱, 内填 15% 的邻苯二甲酸二壬酯与 6% 的吐温-80 混合固定液 /6201 红色担体 80~100 孔。温度: 柱温 110℃, 汽化室温度 150℃, FID 150℃。气体流速: 氮气 40 mL/min, 氢气 40 mL/min, 空气 500 mL/min。

样品处理: 取发酵样 2 mL, 加入 2 mg 溶解于乙醇的内标, 然后加无水乙醇 5 mL 加以稀释, 离心, 取上清液置于蒸发皿中, 用 0.1 mol/L 的四甲基氢氧化铵准确中和至 pH 9.0, 蒸发皿置于水浴上蒸干。冷却至室温后, 以 2 mL 的 DMAA 分次溶解剩余有机酸盐, 溶液置于干燥、洁净的具塞试管中, 加入摩尔数为四甲基氢氧化铵用量的 1.5 倍的碘乙烷, 盖紧塞子, 摇匀, 50℃ 水浴 10 min。用微量进样器取 1 μL 上清液进样分析。

1.2.5 乳酸菌的分离鉴定

使用乳酸菌培养基对促进剂进行稀释涂布, 挑选单菌落接入豆芽汁葡萄糖液体培养基培养, 使用气相色谱检测乳酸。产乳酸的菌株经多次划线纯化后参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版进行生理生化鉴定。另外, 根据《分子克隆》提取其 DNA, 使用引物 EU27F (5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1490R (5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3')^[9] PCR 扩增 16S rDNA, 产物经电泳检测后, 与载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆

菌, 验证之后测序。测序结果提交 NCBI 数据库进行比对。

2 结果与分析

2.1 实验室模拟发酵测定项目

2.1.1 发酵温度

发酵过程温度变化结果表明, 整个发酵过程中温度为 7~12℃, 平均温度 10.7℃。

2.1.2 模拟发酵 30 d 的产气量

用各组 3 个平行样的产气量算术平均值分别作累积产气量曲线, 结果见图 2。同时, 对发酵的总产气量、料容产气率、甲烷含量进行了分析, 结果见表 1。

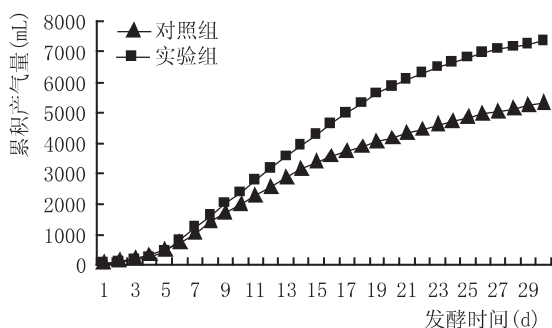


图 2 实验室模拟发酵实验累积产气量曲线

实验证明, 该促进剂能加速发酵的启动, 在 6~25 d 这段时期效果比较显著。

表 1 总产气量、料容产气率、甲烷含量的分析

项目	总产气量 (mL)	料容产气率 ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{d}$)	甲烷含量 (%)
对照组	5306	0.088	50~60
实验组	7371	0.123	55~65

由表 1 可知, 加入发酵促进剂之后, 总产气量提高了 38.9%。

实验结果还表明, 在发酵的 30 d 中, 实验组 6~23 d 所产沼气燃烧状况良好, 甲烷含量较高 (55%~65%), 而对照组产生高质量沼气的的时间稍短, 为 7~21 d, 且甲烷含量相对较低 (50%~60%)。说明该促进剂不但提高了产量而且在一定程度上提高了沼气的质量。

2.1.3 料液发酵前后相关指标的比较

本次实验中, 对料液发酵前后相关指标进行比较, 结果详见表 2。

由表 2 可知, 2 个组均处于沼气发酵的正常 pH 范围。实验组虽然加入了偏酸性的促进剂, pH 值并未因此具有酸化倾向。就 TS 和 VS 的降解率而言, 加入了促进剂的实验组 TS 降解率比对照组相对提高了 46.3%, VS 降解率相对提高了 39.8%, 表明加入此生物活性剂能够

表 2 料液发酵前后的 pH、TS、VS 变化

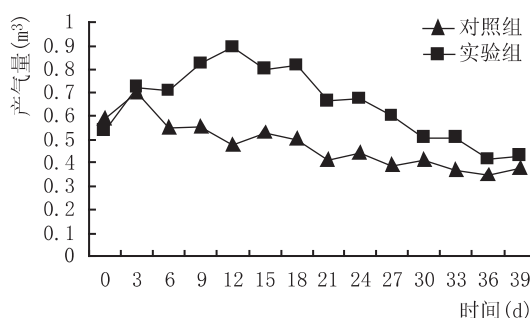
项目	对照组		实验组	
	发酵前	发酵后	发酵前	发酵后
pH 值	7.06	7.21	7.06	7.29
TS (%)	7.4	5.9	7.4	5.2
VS (%)	79.5	73.9	79.5	72.2
TS 降解率 (%)		20.3		29.7
VS 降解率 (%)		25.9		36.2

促进发酵原料的转化。

2.2 气池实验结果

2.2.1 产气量

以各组的日产气量的算术平均值分别作产气曲线, 结果见图 3。



注: 每 3 d 取样 1 次。

图 3 气池投放实验产气曲线

实验中发现, 促进剂加入的 1~3 d 中产气量有成倍的增长, 而对照组也有相应的增长, 直到第 3 天仍未恢复正常。推测其原因在于投入的促进剂的培养基中含有较多的营养物质。从图 3 可知, 促进剂是在投入 6 d 后才开始真正产生效果。在此后的整个发酵过程中, 实验组的产气量均比对照组要高, 个别天数日产量提高了将近 100%。作用最显著的时段为 9~24 d, 此后效果逐渐下降。整个发酵过程中, 实验组产气量总和比对照组有明显提高, 达到 37.4%, 结果见表 3。

表 3 沼气池产气量总和对比

项目	对照组	实验组
产气量总和 (m^3)	6.52	8.96
产气量相对增加值 (%)		37.4

2.2.2 现象观察

促进剂投入沼气池使用的过程中观察到以下一些现象: 沼气池使用沼气发酵促进剂后, 沼渣明显减少, 表明有更多的有机物得到了分解利用转变成沼气; 一个 5 口之家每顿饭需用气 0.3~0.4 m^3 , 在冬季低温季节, 沼气池日产气量较少, 往往只能供一餐的用气。加入促进剂后, 就能满足两餐的用气。由此可见, 在低温产气少的情况下, 沼气发酵促进剂能促进产气量的增长。

2.3 气相色谱检测促进剂中的挥发酸

通过促进剂的峰谱与标准酸峰谱的比较可知,促进剂中主要含有乳酸。根据面积内标法得出促进剂中乳酸含量。当 pH 值为 5.5 时,乳酸含量为 0.15 mg/mL。

2.4 乳酸菌鉴定

根据其生理生化特征和 16S 序列分析,确定该乳酸菌为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。

3 结论

该沼气发酵促进剂能够使沼气池在偏低温条件下的沼气产量明显增加,对厌氧消化的促进作用明显,具有推广应用的潜力。当然,促进剂要产生效果必须满足一些基本的前提条件。例如,使用本产品前沼气池中沼气发酵菌的生理状态必须正常,促进剂对“酸中毒”的沼气池无法产生作用。另外,使用过程中用户必须保证对气池进行有效的管理,包括原料的正常添加等等。

该促进剂的缺点是作用时间不够长,只有 1 个月左右。另外,该菌剂的作用机理尚不明确,有待进一步研究。

致谢:本研究项目得到泸州老窖股份公司和四川省农村能源办公室支持。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部.全国农村沼气工程建设规划(2006-2010年)[EB/OL].(2007-03)[2007-05-20].<http://www.agri.gov.cn/xztz/P020070418570346665578.doc>
- [2] 刘树民,韩靖玉,岳海军.中国北方寒冷地区沼气的综合开发利用[J].内蒙古农业大学学报,2002,23(4):84-56.
- [3] 刘英,胡启春,吴力斌.世界沼气技术研究与应用进展简述[J].中国沼气,2003,21:86-90.
- [4] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.258-259.
- [5] 张无敌,宋洪川.实验型水压式厌氧消化装置[P].中国专利:ZL00244796.7,2001-11-21.
- [6] 张无敌.沼气发酵残留物利用基础[M].昆明:云南科技出版社,2002.86-92.
- [7] 江蕴华,余晓华.利用火焰颜色判断沼气中甲烷含量[J].中国沼气,1983,(3):28.
- [8] 胡家元.气相色谱法测定饮料酒中的低沸点有机酸[J].分析测试通报,1992,11(5):88-89.
- [9] Wen-xue Zhang, Zong-wei Qiao, Toru Shigematsu etc. Analysis of the bacterial community in zaopei during production of Chinese luzhou-flavor liquor [J].Journal of the Institute of Brewing.,2005,111(2):217.

~~~~~

(上接第100页)

力(内插和外插)、参数识别的稳定性、参数值的可解释性。在实验次数较少的情况下(操作条件变化下做10次实验),包括过程知识的模型和神经网络模型精度一样,但其远比神经网络模型可靠。CO<sub>2</sub>释放量的预测精度为5%,乙醇为10%,残糖为20%。笔者最后得出,数据少时用一般模型,数据多时用神经网络模型。

## 参考文献:

- [1] Douglas A Gee, W. Fred Ramirz. A flavour model for beer fermentation[J]. J. Inst. Brew., 1994, 100: 321-329.
- [2] B. de Andrés-Toro, J. M. Girón-Sierra, J. A. López-Orozco, C. Fernández-Conde, J. M. Peinado, F. García-Ochoa. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions[J]. Mathematics and Computers in Simulation, 1998,48: 65-74.
- [3] G. E. Carrillo-Ureta, P. D. Roberts, V. M. Becerra, Genetic algorithms for optimal control of beer fermentation[A]. Proceedings of the 2001 IEEE International Symposium on Intelligent Control[C]. Mexico City, Mexico, 2001. 391-396.
- [4] R. Alex Speers, Peter Rogers, Bruce Smith. Non-linear modeling of industrial brewing fermentations[J]. J. Inst. Brew., 2003, 109: 229-235.
- [5] Ioan Cristian Trelea, Mariana Titica, Georges Corrieu. Dynamic optimization of the aroma production in brewing fermentation [J]. Journal of Process Control, 2004,(14):1-16.
- [6] Tony D'Amore, Guy Celotto, Glen D. Austin, Graham G. Stewart. Neural network modeling: applications to brewing fermentations[J]. EBC Congress, 1993.221-231.
- [7] I. C. Trelea, B. Perret. On-line estimation and prediction of density and ethanol evolution in the brewery[J]. MBAA TQ, 2000,37(2):173-181.
- [8] L. F. M. Zorzetto, R. Maciel Filha, M. R. Wolf-Maciel. Process modeling development through artificial neural networks and hybrid models[J]. Computers and Chemical Engineering, 2000,24:1355-1360.
- [9] Ioan Cristian Trelea, Mariana Titica, Sophie Landaud, Eric Latrielle, Georges Corrieu, Arlette Cheruy. Predictive modeling of brewing fermentation: from knowledge-based to black-box models[J]. Mathematics and Computers in Simulation, 2001,56: 405-424.
- [10] Jermu Pöllänen, Jukka Kroni?f. Automation'2001 seminar days[J]. SAS Julkaisusarja. 2001,(24):246-251.
- [11] 张彦青,张五九.基于神经网络的大生产规模啤酒发酵过程建模[J].食品与发酵工业,2007,(9):43-48.