

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2020.15.002

外源酶强化秸秆污泥混合厌氧消化条件优化

李慧莉¹, 何芙蓉¹, 刘鹏程², 陈志强^{1,3}, 杨子显¹

(1. 兰州理工大学 土木工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 大连市市政设计研究院有限责任公司, 辽宁 大连 116021; 3. 哈尔滨工业大学环境学院 城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 为研究不同外源酶对中温(35 ℃)混合厌氧消化过程的影响,以秸秆污泥混合物(质量比为1:2)作为底物,在最优投加量下将蛋白酶与纤维素酶按1:1、1:2、2:1、1:3、3:1等5组投加比设置实验,分析各组产气量、甲烷含量、发酵过程氨氮含量以及多糖、蛋白质、挥发性脂肪酸(VFAs)的含量和酶活的变化情况。结果表明,中性蛋白酶:纤维素酶为1:2的酶配比甲烷产量最大,为373.05 mL,TS和VS去除率分别达到10%和43.5%,且无VFAs积累,可以作为秸秆污泥混合厌氧消化最佳外源酶投加量。通过HPLC对多酶联合反应消化液进行测定,发现厌氧消化产物中高分子物质主要是生物聚合物和高分子质量腐殖酸。

关键词: 玉米秸秆; 市政污泥; 厌氧消化; 纤维素酶; 蛋白酶

中图分类号: TU992.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)15-0006-07

Optimization of Anaerobic Co-digestion Conditions of Straw and Sludge Enhanced by Exogenous Enzymes

LI Hui-li¹, HE Fu-rong¹, LIU Peng-cheng², CHEN Zhi-qiang^{1,3}, YANG Zi-xian¹

(1. School of Civil Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. Dalian Municipal Design & Research Institute Co. Ltd., Dalian 116021, China; 3. State Key Laboratory of Urban Water Resources and Environment, School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Effects of exogenous enzymes on anaerobic co-digestion at medium temperature (35 ℃) were explored. In batch experiments, the mixture of straw and sludge (mass ratio = 1 : 2) was used as the substrate. Under the optimal dosage, five groups of protease and cellulase with the ratio of 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1, 1 : 3 and 3 : 1 were set. The gas production, methane content, ammonia nitrogen, polysaccharide, protein, volatile fatty acids (VFAs) and enzyme activity were analyzed. The maximum methane production (373.05 mL) with the TS removal efficiency of 10% and the VS removal efficiency of 43.5% was obtained when the ratio of neutral protease and cellulase was 1 : 2, and there was no VFAs accumulation. Therefore, the enzyme ratio of 1 : 2 could be used as the optimal dosage of exogenous enzymes for anaerobic co-digestion of straw and sludge. The slurry of multi-enzyme combined reaction was determined by HPLC. It was found that the main macromolecule substances of anaerobic digestion

products were biopolymer and high molecular weight humic acid.

Key words: corn straw; municipal sludge; anaerobic digestion; cellulase; protease

污泥具有 C/N 值低的特性,秸秆混合污泥的共消化工艺则可以控制合理的进料 C/N,有利于厌氧消化过程的实施^[1]。研究表明,外加水解酶可提升厌氧消化效果^[2]。Roman 等^[3]证实污泥厌氧降解受蛋白酶活性影响较大,外加中性蛋白酶可提高消化液中的蛋白酶活性,从而促进蛋白质的水解及厌氧消化效能的提升。吴丹^[4]在玉米秸秆厌氧消化时添加了纤维素酶,发现产气效果明显提高。罗琨等^[5]在污泥厌氧消化时,投加了淀粉酶和蛋白酶,发现复合酶的促进效果优于单一酶。Recktenwald 等^[6]以浓缩污泥为原料,按照 1:1:1:1 的酶配比直接添加混合酶(纤维素酶、脂肪酶、 α -淀粉酶、蛋白酶),沼气产量提高了 16%,污泥体积减少 13%。以上研究仅局限于单种酶对单种底物和多种酶对单种底物的作用机理研究,而复合酶对混合底物的影响研究较少。笔者采用单因素批次实验的方法,研究了不同外源酶用量和不同复合酶配比对秸秆污泥中温厌氧消化的强化效果,并为构造高效固体废弃物混合厌氧消化工艺提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验使用的污泥取自哈尔滨文昌污水厂二沉池,取后静置 3 d,去除上清液后,封装于塑料桶,放在 -4 ℃ 的冰箱里冷藏保存待用。实验使用的秸秆取自哈尔滨郊外某农田。取料后将其风干并用研磨机粉碎,研磨后过 100 目筛子,装袋在室温下保存。秸秆与污泥的理化性质见表 1。

表 1 玉米秸秆和市政污泥的理化性质

Tab. 1 Physicochemical properties of corn straw and municipal sludge

项目	TS/%	VS/%	C/%	N/%	C/N	pH 值
秸秆	93.2	71.2	48.29	0.62	77.89	—
污泥	5.9	2.8	24.66	5.05	4.88	6.80

厌氧消化接种污泥取自实验室同底物 CSTR 反应器,其 TS 为 3.5%,VS 为 1.3%。实验所用外源酶购自索莱宝公司,中性蛋白酶酶活为 60 000 U/g,纤维素酶酶活为 50 000 U/g。

1.2 实验装置

将底部放置转子的厌氧发酵玻璃瓶放置在自带

水浴筒的磁力搅拌器上,反应温度控制在 35 ℃,反应器有效体积为 0.5 L。发酵瓶用带穿孔管的橡胶塞密封,穿孔管连接采样气袋。

1.3 实验方法

秸秆预处理:将过筛称量后的秸秆浸泡于 15 倍质量、质量分数为 2% 的 NaOH 溶液中,超声处理 60 min 并置于 55 ℃ 恒温水浴箱中浸泡 1 d。

实验设计底物为 6 g TS,秸秆污泥质量比为 1:2(即秸秆 2 g,污泥 4 g)。

实验首先采用批次发酵方式确定最优酶投加量,运行 7 组实验,每组设置 3 个锥形瓶为平行样。每个锥形瓶的接种泥量为 350 mL,酶投加量见表 2。将完成预处理的秸秆溶液、市政污泥按比例混合溶液倒入相应的厌氧发酵瓶中,为排除空气对厌氧系统的影响并营造厌氧环境,向各厌氧瓶氮吹 5 min^[7-8]。随后在最优投加比下,分别将两种酶按 1:1、1:2、2:1、1:3、3:1 等 5 组投加比设置实验,复酶批次混合发酵实验设计见表 3,分析各组产气量、甲烷含量、发酵过程氨氮含量以及多糖、蛋白质、挥发性脂肪酸(VFAs)的变化情况。

表 2 单酶批次混合发酵实验设计

Tab. 2 Experiment design of batch mixed fermentation with single enzyme

组号	市政污泥/ mL	秸秆/ g	酶投加量/ (mg · g ⁻¹ TS)	酶种类	接种泥/ mL
1#	68.00	2.15	0	—	350
2#	68.00	2.15	60	蛋白酶	350
3#	68.00	2.15	80	蛋白酶	350
4#	68.00	2.15	100	蛋白酶	350
5#	68.00	2.15	60	纤维素酶	350
6#	68.00	2.15	80	纤维素酶	350
7#	68.00	2.15	100	纤维素酶	350

表 3 复酶批次混合发酵实验设计

Tab. 3 Experiment design of batch mixed fermentation with multiple enzyme

组号	市政污泥/ mL	秸秆/ g	酶总投加量/ (mg · g ⁻¹ TS)	蛋白酶: 纤维素酶	接种泥/ mL
A#	68.00	2.15	80	1:1	350
B#	68.00	2.15	80	1:2	350
C#	68.00	2.15	80	2:1	350
D#	68.00	2.15	80	1:3	350
E#	68.00	2.15	80	3:1	350

1.4 分析方法

样品以 8 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液过 0.45 μm 滤膜后测定氨氮、VFAs。分子质量采用 HPLC 测定,多糖采用苯酚-硫酸法测定,蛋白质采用 Lowry 法测定,VFAs 和气体成分含量采用气相色谱法(Agilent)测定,气体体积采用抽气法测定,纤维素酶酶活采用 3,5-二硝基水杨酸法测定,氨氮、蛋白酶酶活采用分光光度法测定,pH 值采用 pH 计测定(HANNA)。

2 结果与讨论

2.1 投加单一酶对厌氧消化的强化效果

pH 值和累积产甲烷量随时间的变化见图 1。

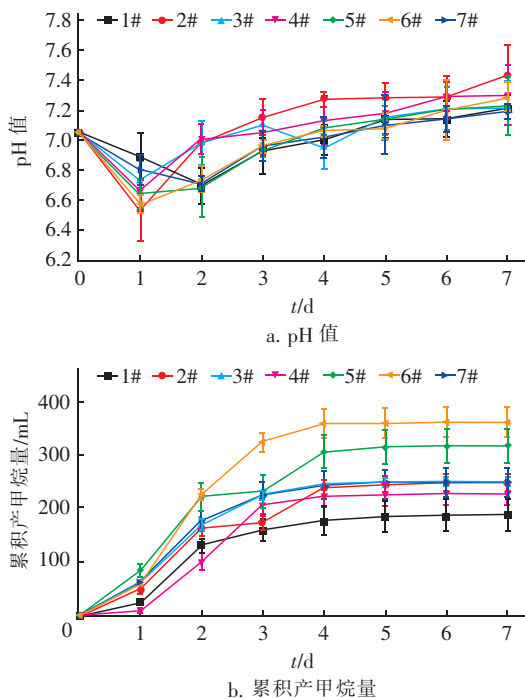


图1 pH值和累积产甲烷量随时间的变化

Fig.1 Change of pH and cumulative methane production with time

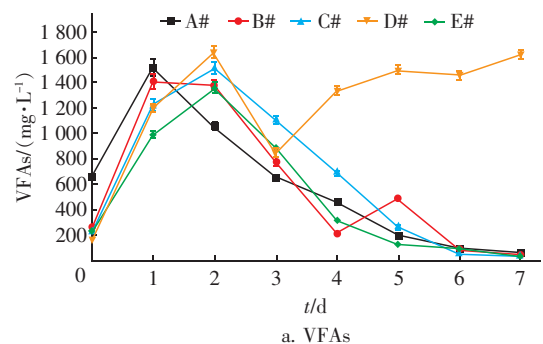
可以看出,各组的 pH 值在第 1 天下降,从第 2 天开始,各组的 pH 值不断升高,逐渐上升到 7.0 左右。图 1(b)表明外加 80 mg/gTS 的纤维素酶相比其他 2 组外源酶添加量,呈现较高的甲烷产量,而外加 80 mg/gTS 的蛋白酶相比其他 2 组外源酶添加量,没有明显的甲烷产量优势。秸秆、污泥中的高分子有机物必须经过传质进入细菌细胞体内才能参与代谢反应,但是只有单体物质或者低聚物才能穿过细胞膜被大多数原核和真核微生物利用,因此用于厌氧消化微生物群落新陈代谢过程的基质必须先经

过水解酶的催化作用降解为小分子物质才能被进一步分解利用。外源酶的添加能加速微生物在水解过程中对秸秆、污泥基质的利用效率,并降低相关生化反应的活化能,从而为产甲烷微生物群落提供一定的物质基础,进而增大甲烷产量。因此实验首先确定外源酶的最佳用量为 80 mg/gTS。

2.2 不同复合酶配比条件下的厌氧消化效果

2.2.1 不同复合酶配比对 pH 值和 VFAs 的影响

不同复合酶配比对厌氧消化 pH 值和 VFAs 的影响见图 2。图 2(a)表明,A#、B#发酵瓶中 VFAs 在第 1 天即达到最大值,依次是 $(1\ 521.59 \pm 66.52)$ 、 $(1\ 412.18 \pm 59.99)$ mg/L。C#、D#和 E#发酵瓶 VFAs 在第 2 天达到最大值,依次是 $(1\ 514.98 \pm 49.65)$ 、 $(1\ 651.97 \pm 49.52)$ 和 $(1\ 359.52 \pm 39.52)$ mg/L。A#、B#、C#和 E#中 VFAs 含量在发酵末期均远低于初始值,而 D#发酵瓶在反应后期出现 VFAs 累积现象,之前的研究也证实了中性蛋白酶投加能抑制秸秆污泥厌氧消化^[9],这表明在该混合酶配比下蛋白酶能高效将蛋白质加速分解产生大量氨氮,对厌氧消化产生一定抑制。图 2(b)表明,在第 1 天,A#、B#、C#厌氧发酵瓶的乙酸含量很高,而 D#和 E#第 1 天乙酸含量低于其他 3 组,表明过量的中性蛋白酶或纤维素酶在厌氧消化反应初期不利于乙酸的产生。图 2(c)、(d)表明,在水解菌的作用下,有机物经水解酸化产生大量 VFAs,VFAs 短时间大量积累,使得 pH 值下降,在第 2 天,5 组的 pH 值均降至最低值,随后,产甲烷菌对 VFAs 充分利用,使得 pH 值逐步升高至 7.0 附近。丙酸呈现的变化趋势与 pH 值呈负相关关系。A#、B#、C#和 E#在反应结束后丙酸含量远低于初始值,未发生酸化。而 D#在反应后期出现丙酸累积现象,因为在该酶配比下厌氧水解主要由外源酶完成,导致水解酸化可利用的营养物质较低,从而抑制产甲烷菌,导致丙酸累积。



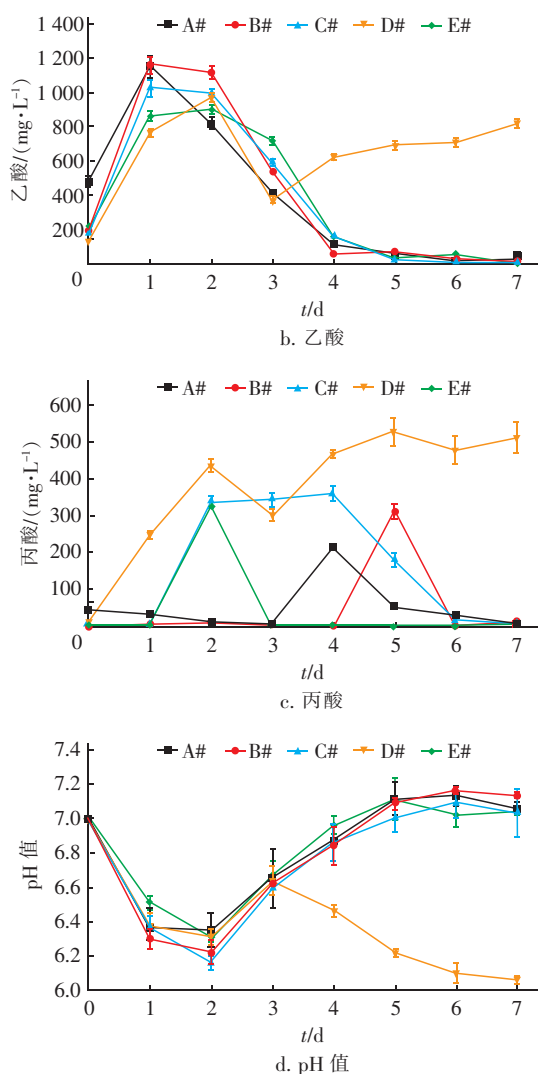


图2 VFAs、乙酸、丙酸和 pH 值随时间的变化

Fig. 2 Change of VFAs, acetic acid, propionic acid and pH with time

2.2.2 酶联合对单日总产气量、产甲烷量的影响

不同外源酶比对厌氧消化单日总产气量、产甲烷量的影响见图3。可见,酶配比为3:1的发酵瓶日产气量较低,酶配比为2:1和3:1的发酵瓶分别在第2天和第3天达到日产气量峰值。第1天A#、B#、C#、D#和E#发酵瓶产气量分别是(260 ± 10.00)、(230 ± 8.09)、(200 ± 11.10)、(228 ± 18.06)和(63 ± 2.90) mL,表明纤维素酶能明显提高厌氧消化速率。第2天酶配比为1:1的发酵瓶产气量没有明显变化,酶配比为1:2、1:3的发酵瓶产气量开始下降,A#、B#、C#、D#和E#发酵瓶产气量分别是(262 ± 12.02)、(200 ± 13.31)、(302 ± 13.29)、(220 ± 16.09)和(83 ± 3.60) mL。E#发酵

瓶在第3天产气量达到峰值,为(174 ± 11.06) mL。由于后期有机物不足,在反应的后4天,每组厌氧消化发酵瓶的生物气日产量呈下降状态。反应共持续7 d,从图3(b)可以看出,A#、B#、C#、D#和E#发酵瓶中的甲烷累积产量分别是(244.36 ± 19.61)、(373.05 ± 29.79)、(224.88 ± 26.05)、(121.71 ± 16.25)和(117.76 ± 11.76) mL。B#发酵瓶中的累积产甲烷量最多,即蛋白酶:纤维素酶为1:2的酶配比是最佳酶配比。在一定范围内,纤维素酶投加量越多,产气量越大。

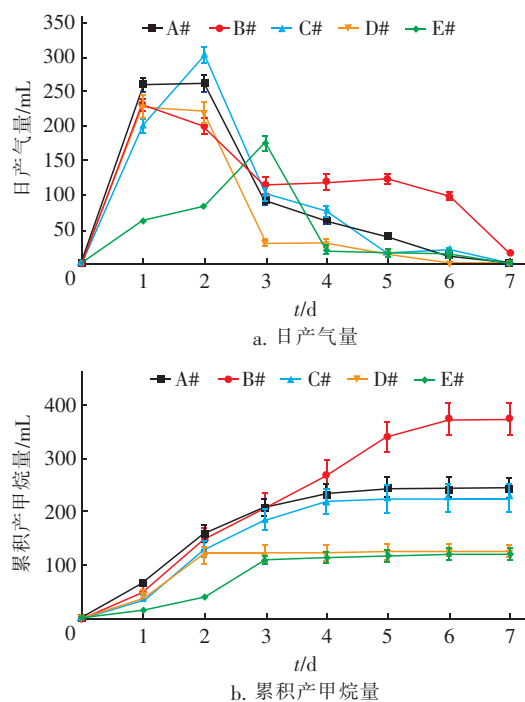


图3 日产气量和累积产甲烷量随时间的变化

Fig. 3 Volume change of daily biogas and cumulative methane production with time

2.2.3 酶联合对氨氮、多糖、蛋白质的影响

不同外源酶比对厌氧消化氨氮、多糖、蛋白质的影响见图4。由图4(b)可以看出,酶配比为1:2的B#发酵瓶纤维素酶酶活在第1天高于其他4组发酵瓶,为66.09 U/mL。随着消化过程进行,纤维素酶酶活不断下降至20 U/mL左右。所有发酵瓶多糖含量在第1天均下降至200 mg/L以下,分别是(121.01 ± 10.31)、(115.21 ± 7.23)、(100.13 ± 3.56)、(119.85 ± 5.32)、(100.13 ± 2.63) mg/L。从反应的第2天起,由于水解菌自身分泌的纤维素酶酶活处于一个比较稳定的水平,5组厌氧发酵瓶中的多糖含量一直处于较低的水平。实验结果表

明,外源酶的添加可以分解系统中无法被细菌分解的有机物。

厌氧消化反应系统中的氨氮是由蛋白质分解得来的。氨氮过高对微生物产生一定抑制,从而抑制厌氧产气。氨氮含量过低会影响水解菌和产甲烷菌酶的分泌合成。

图4(c)表明,在第1天,5组反应器中的蛋白质含量明显下降,并且从第1天起持续稳定在较低水平。图4(d)表明,蛋白酶酶活也在第1天明显下降,并且从第1天起持续稳定在较低水平。由图4(e)可见,5组反应器中氨氮含量在运行期间不断上升,并且氨氮的变化趋势一致。表明通过添加中性蛋白酶,蛋白质水解效果并未明显提升,这主要是因为微生物自身产生的蛋白酶活性较高造成的。在厌氧消化反应结束后,D#厌氧发酵瓶中氨氮浓度最大,为 $(214.826 \pm 4.28) \text{ mg/L}$ 。

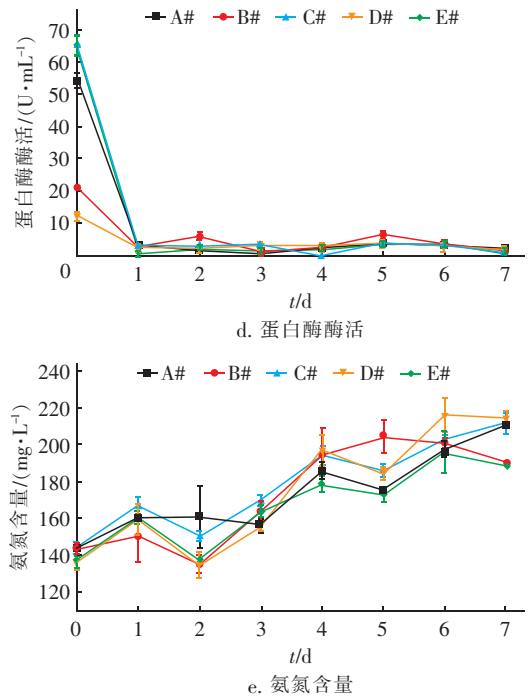
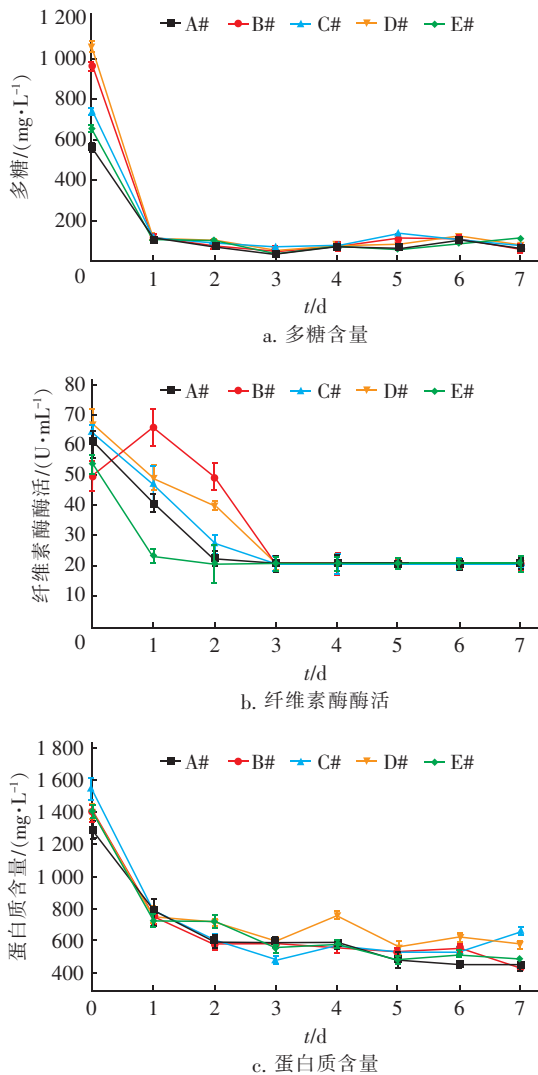


图4 多糖含量、纤维素酶酶活、蛋白质含量、蛋白酶酶活和氨氮含量随时间的变化

Fig. 4 Change of polysaccharide content, cellulase activity, protein content, protease activity and $\text{NH}_3 - \text{N}$ content

2.2.4 酶联合对厌氧消化 TS、VS 的影响

不同外源酶比对 TS、VS 的影响见图 5。

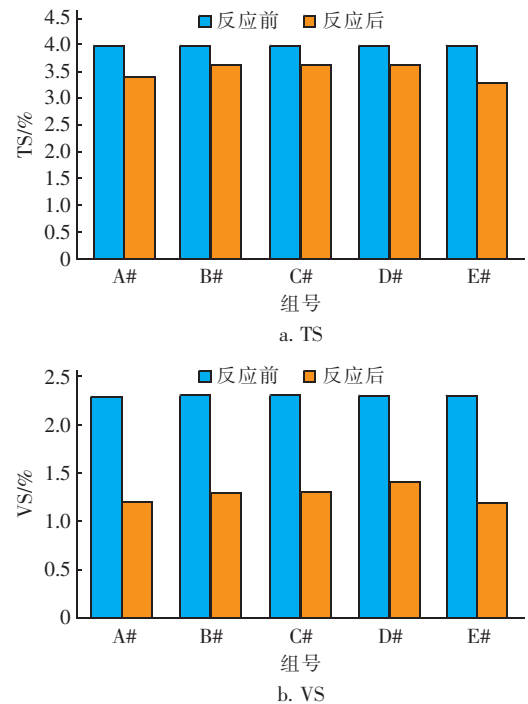


图5 反应过程的 TS 和 VS 变化

Fig. 5 Change of TS and VS during the reaction

可见,虽然酶投加量不同,但是初始的TS和VS均一致,由于加入外源酶只是加快了反应速率,并未改变底物的浓度,故在厌氧消化结束后各组实验TS和VS相差无几。各组发酵瓶中的TS去除率分别为15%、10%、10%、10%和17.5%。各组发酵瓶中VS的去除率分别为47.8%、43.5%、43.5%、39.1%和47.8%。

A#、E#的TS、VS去除率均高于其他组,对复合酶配比优选有参考价值。

2.2.5 厌氧消化中酶组合对分子质量的影响

Laspidou等^[10]提出了统一理论,溶解性微生物代谢产物(SMP)与溶解性EPS是同一物质。本实验测定酶配比为1:1、1:2、2:1、1:3、3:1的样品的色谱图如图6所示。

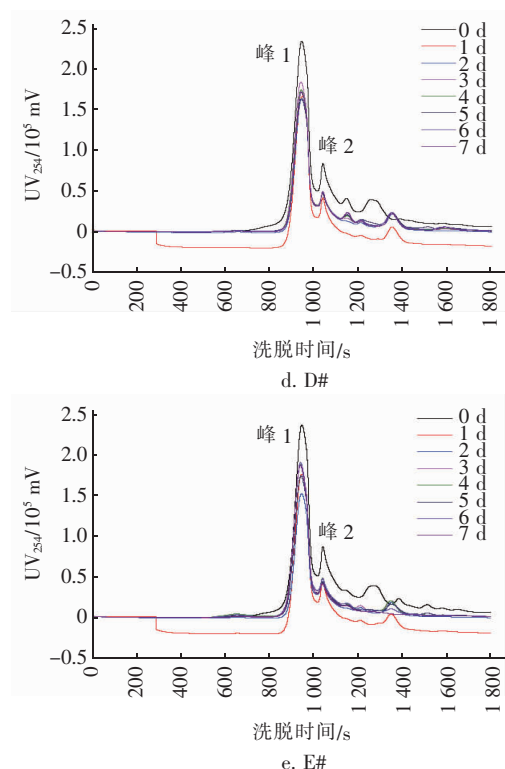
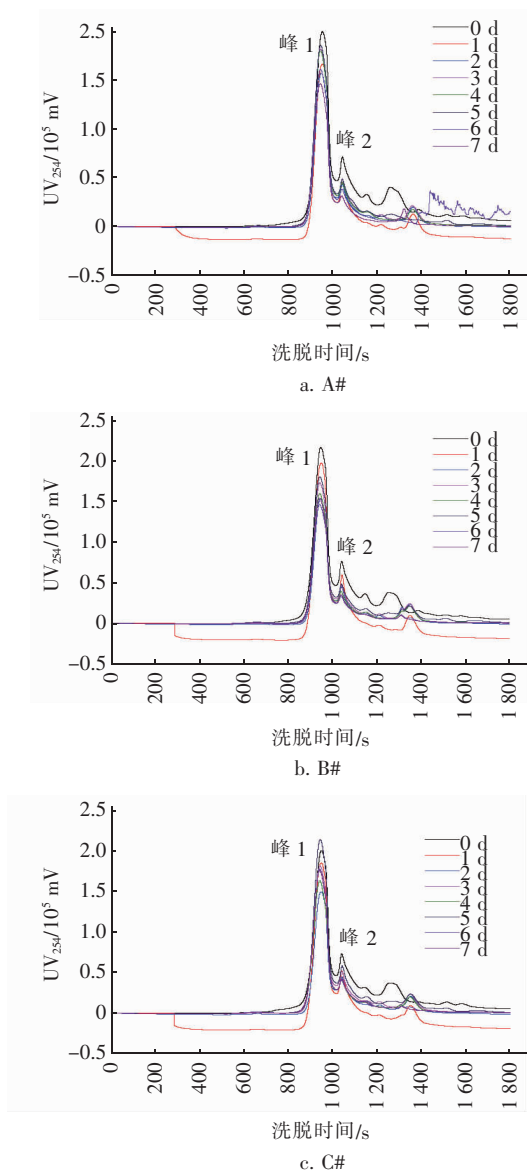


图6 A#、B#、C#、D#和E#组色谱图

Fig.6 Chromatograms of A#, B#, C#, D# and E#

在色谱图中,可溶性微生物代谢产物(SMP)的表观分子质量随洗脱时间而降低^[11]。SMP色谱图的主要峰分布在949 s和1040 s的洗脱时间,平均表观分子质量分别为1572264 u(峰1)和13202 u(峰2),这分别与生物聚合物和高分子质量腐殖类物质有关^[12-13]。根据色谱图,生物聚合物(峰1)是SMP的主要组成部分,其次是高分子质量的腐殖类物质(峰2)。

3 结论

① 单一酶批次实验得出中性蛋白酶及纤维素酶最优投加量为80 mg/gTS。

② 复合酶最佳酶配比为蛋白酶:纤维素酶=1:2,累积产甲烷量最大达373.05 mL,其TS和VS去除率分别为10%和43.5%。酶配比1:2有明显的提高产气量和甲烷含量的强化作用。

③ 复合酶酶配比为蛋白酶:纤维素酶=1:3易导致丙酸累积。可能是因为在该酶配比下厌氧水解主要由外源酶完成,导致水解酸化可利用的营养物质较低,从而抑制产甲烷菌,导致丙酸累积。

④ 厌氧消化过程中,产物分子质量随时间不断减小,厌氧消化产物中高分子物质主要是生物聚

合物和分子量腐殖酸。

参考文献:

- [1] 李慧莉,刘鹏程,陈志强,等. 沼液回流对秸秆与污泥混合中温厌氧消化的影响[J]. 环境工程学报,2018,12(10):2959-2965.
Li Huili, Liu Pengcheng, Chen Zhiqiang, *et al.* Effect of slurry recirculation on mesophilic anaerobic digestion of straw and sludge[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(10): 2959-2965 (in Chinese).
- [2] Guo H, Wu Y, Hong C, *et al.* Enhancing digestibility of miscanthus using lignocellulolytic enzyme produced by bacillus[J]. Bioresour Technol, 2017, 245(1): 1008-1015.
- [3] Roman H J, Burgess J E, Pletschke B I. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge[J]. Afr J Biotechnol, 2006, 5(10): 963-967.
- [4] 吴丹. 纤维素酶添加对玉米秸秆厌氧消化产甲烷的影响[D]. 北京:北京林业大学,2015.
Wu Dan. Effects of Cellulase Addition on Methanogenesis from Anaerobic Digestion of Corn Straw[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [5] 罗琨,杨麒,李小明,等. 外加酶强化剩余污泥水解的研究[J]. 环境科学,2010,31(3):763-767.
Luo Kun, Yang Qi, Li Xiaoming, *et al.* Enhanced hydrolysis of excess sludge by external enzymes[J]. Environmental Science, 2010, 31(3): 763-767 (in Chinese).
- [6] Recktenwald M, Dey E S, Norrlöw O. Improvement of industrial-scale anaerobic digestion by enzymes combined with chemical treatment[J]. J Residuals Sci Technol, 2015, 12(4): 205-214.
- [7] 王佳君,陆洪宇,陈志强,等. 接种量对餐厨垃圾中温厌氧产甲烷潜能的影响[J]. 环境工程学报,2017,11(1):541-545.
Wang Jiajun, Lu Hongyu, Chen Zhiqiang, *et al.* Effect of inoculation ratio for methane potential of food waste on mesotherm anaerobic digestion[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(1): 541-545 (in Chinese).
- [8] Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, *et al.* Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays[J]. Water Sci Technol, 2009, 59(5): 927-934.
- [9] 党宁. 污泥秸秆厌氧共消化研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2017.
Dang Ning. Study on Anaerobic Co-digestion of Sludge Straw[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [10] Laspidou C S, Rittmann B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass[J]. Water Res, 2002, 36(11): 2711-2720.
- [11] Li W, Cao M, Young T, *et al.* Application of UV absorbance and fluorescence indicators to assess the formation of biodegradable dissolved organic carbon and bromate during ozonation[J]. Water Res, 2017, 111: 154-162.
- [12] Umar M, Roddick F, Fan L. Impact of coagulation as a pre-treatment for UVC/H₂O₂-biological activated carbon treatment of a municipal wastewater reverse osmosis concentrate[J]. Water Res, 2016, 88: 12-19.
- [13] Yu W, Campos L C, Graham N. Application of pulsed UV-irradiation and pre-coagulation to control ultrafiltration membrane fouling in the treatment of micro-polluted surface water[J]. Water Res, 2016, 107: 83-92.



作者简介:李慧莉(1970-),女,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,研究方向为水污染控制技术和固废资源化。

E-mail: huilihit@163.com

收稿日期:2019-05-15