



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106929547 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201611240710.7

(22)申请日 2016.12.29

(71)申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区麓山南路1号湖南大学环境科学与工程学院

(72)发明人 张盼月 张海波 曾光明 刘建波
叶捷 吴彦 房玮 许东 王贝
晏丽 晏铭

(51)Int.Cl.

C12P 7/40(2006.01)

C12P 5/02(2006.01)

C12P 7/10(2006.01)

C12P 19/14(2006.01)

C12R 1/865(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法,属于生物技术可再生能源领域。将稻草生物质与瘤胃液及缓冲液混合后进行厌氧产酸发酵,获得挥发性脂肪酸;将厌氧发酵后的混合物固液分离;液体部分进行产甲烷发酵,固体部分烘干至恒重,即为发酵纤维;将发酵纤维再进行预处理,得到预处理后的发酵纤维;将预处理后的发酵纤维进行酶解,再添加酿酒酵母菌发酵产乙醇。本发明不仅能够同时获得甲烷和乙醇两种清洁生物能源,实现了清洁能源的联合生产,提高了纤维素能量转化率,增加了生物能源的产量,而且降低当前由屠宰场废弃物排放及由化石燃料所产生的环境污染,并在一定程度上缓解了能源危机,为清洁能源的合理化生产提供了理论依据。

1. 一种利用稻草高效生产甲烷和乙醇的方法,其特征在于:将稻草生物质与接种瘤胃液和缓冲液混合后进行厌氧产酸发酵,获得挥发性脂肪酸;将厌氧发酵后的混合物进行固液分离,液体部分进行甲烷发酵;固体部分烘干至恒重,即为发酵纤维;将发酵纤维再进行预处理,得到预处理后的发酵纤维;将预处理后的发酵纤维进行酶解,再添加酿酒酵母菌进行发酵产乙醇。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述瘤胃微生物发酵条件为 39°C ,产酸发酵固体浓度为 $2.5\text{--}10\%$ (m/v),接种量为 $40\text{--}60\%$ (v/v),运行时间为 $2\text{--}5\text{d}$ 。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述产酸发酵缓冲液成分为: NaHCO_3 , 5.0g/L ; KH_2PO_4 , 1.2g/L ; K_2HPO_4 , 2.4g/L ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g/L ; MgCl_2 , 0.03g/L 。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述产甲烷发酵条件为 35°C ,接种量为 $50\text{--}70\%$ (v/v),运行时间为 $1\text{--}3\text{d}$ 。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述固液分离为在 4000rpm 条件下离心 20min ,去除上清液后将消化产物在 $40\text{--}100^{\circ}\text{C}$ 的条件下烘干至恒重。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述发酵纤维预处理采用化学处理或机械处理。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述发酵纤维的预处理为化学处理,将发酵纤维和 NaOH 溶液混合,发酵纤维与 NaOH 溶液的固液比为 $15\text{--}25\%$, NaOH 溶液浓度为 $0.5\text{--}1.5\%$,于 $400\text{--}700\text{W}$ 的微波炉下处理 $10\text{--}40\text{min}$ 。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述发酵纤维的预处理为物理处理,将 $4\text{--}8\text{g}$ 消化纤维加入球磨机,于 $600\text{--}800\text{rpm}$ 处理 $60\text{--}180\text{min}$ 。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述酶解反应,将预处理后的消化纤维加入纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶中得至少一种。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述发酵纤维加入纤维素酶与 pH 为 4.8 醋酸缓冲液混匀后,在 $40\text{--}60^{\circ}\text{C}$, 150rpm 条件下酶解 $24\text{--}72\text{h}$,消化纤维与缓冲液的固液比为 $1\text{--}5\%$ 。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述乙醇发酵,所选菌株为酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),具体步骤如下:

A、配制培养基,成分为:葡萄糖, 50g/L ;酵母膏, 5g/L ;蛋白胨, 5g/L ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L ; K_2HPO_4 , 1g/L 。

B、在 121°C 的高温灭菌锅灭菌 30min ,冷却后,将酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)在 30°C 的条件下,活化 $12\text{--}48\text{h}$ 。

C、活化后,在 1000rpm 转速下对其进行浓缩 $10\text{--}30\text{min}$ 。

D、将浓缩后的活化酵母培养物与水解液以 $1:5\text{--}1:15$ 的体积比例混合,在 30°C 的条件下发酵 $12\text{--}72\text{h}$ 。

一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法,属于生物技术可再生能源领域。

背景技术

[0002] 由于人口的快速增长及工业化进程的加快,能源问题已成为全世界关注的焦点。化石能源的有限储量和化石燃料使用对环境的危害(温室效应、酸雨、雾霾等)使可再生的生物能源成为当今的研究热点。生物能源的生产通常以甘蔗、玉米、小麦等粮食作物为原料,然而会导致潜在的粮食危机。因此探寻以废弃木质纤维素生物质为原料成为国际社会的共识。

[0003] 反刍动物内瘤胃微生物能够有效消化木质纤维素生物质材料,每毫升瘤胃液中大约包含 10^{10} 个细菌、 10^6 个纤毛原生动物以及 10^5 个可降解纤维素的真菌,这些微生物相互作用,可实现木质纤维素的高效降解。Nair等研究表明,木质纤维素生物质分解的瘤胃容积产率约为 $18\text{g COD/L}_{\text{瘤胃容积}} \cdot \text{d}$ (以测量的挥发性脂肪酸生产速度表示),而传统的厌氧沼气池只有 $6\text{g COD/L}_{\text{瘤胃容积}} \cdot \text{d}$,动物瘤胃消化的固体降解速率几乎是厌氧反应器的三倍。Yue等人通过比较接种瘤胃液和厌氧消化污泥时水生植物芦苇的厌氧消化,产物生成速率分别为 $207.2\text{mg COD/L} \cdot \text{d}$ 和 $120.4\text{mg COD/L} \cdot \text{d}$ (以测量的挥发性脂肪酸和甲烷总和的生产速度表示),瘤胃微生物时产物生成速率更高。上述研究表明瘤胃微生物能够高效降解木质纤维素。同时,瘤胃微生物降解木质纤维素的代谢产物主要为挥发性脂肪酸,容易被转变为甲烷。同时,屠宰场每天产生大量废物,其中很大一部分来自于牛羊的瘤胃内容物,这些废物排放到污水处理厂,不仅增加环境负担,还需要大量的人力物力去处理。

[0004] 瘤胃微生物发酵后所产生残渣纤维有较高的纤维素含量、较低的半纤维素含量,是生产乙醇的理想原料。以瘤胃微生物发酵残渣纤维为原料生产乙醇,从而构建瘤胃微生物主导厌氧发酵和乙醇生产过程鲜见报道。更重要的是,合理处理剩余发酵残渣能够大大减少环境负担。本专利提出一种利用稻草高效联合生产甲烷和乙醇的方法,提高了以木质纤维素生物质稻草为原料的生物能源转化率,增加了生物能源的产量,节省了反应时间,具有成本低,无污染,效率高的优点。

发明内容

[0005] 本发明目的在于填补现有相关技术的空白,提供一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法。本发明首先进行稻草生物质的瘤胃液厌氧产酸发酵,产生的挥发性脂肪酸进行产甲烷发酵,然后瘤胃液发酵残渣纤维继续进行产乙醇发酵。本发明不仅提高了木质纤维素生物质稻草的能源转化率、增加了生物能源的产量、节省了反应时间、同时具有成本低、无污染、效率高的优点。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种利用稻草高效联产甲烷和乙醇的方法,其特征在于:将稻草生物质与接种瘤

胃液和缓冲液混合后进行厌氧产酸发酵,获得挥发性脂肪酸;将厌氧发酵后的混合物进行固液分离;液体部分直接进行产甲烷发酵,固体部分烘干至恒重,即为发酵纤维;将发酵纤维再进行预处理,得到预处理后的发酵纤维;将预处理后的发酵纤维进行酶解,再添加酿酒酵母菌进行发酵产乙醇。

[0008] 所述瘤胃微生物发酵条件为39℃,产酸发酵系统含固率为2.5-10% (m/v),接种量为40-60% (v/v),运行时间为2-5d。

[0009] 所述产酸发酵缓冲液成分为:NaHCO₃,5.0g/L;KH₂PO₄,1.2g/L;K₂HPO₄,2.4g/L;CaCl₂·2H₂O,0.1g/L;MgCl₂,0.03g/L。

[0010] 所述产甲烷发酵条件为35℃,接种量为50-70% (v/v),运行时间为1-3d。

[0011] 所述固液分离为在4000rpm条件下离心20min,去除上清液后将消化产物在80℃的条件下烘干至恒重。

[0012] 所述发酵纤维预处理采用化学处理或机械处理。

[0013] 所述发酵纤维的预处理为化学处理,将发酵纤维和NaOH溶液混合,发酵纤维与NaOH溶液的固液比为15-25%,NaOH溶液浓度为0.5-1.5%,于400-700W的微波炉下处理10-40min。

[0014] 所述发酵纤维的预处理为物理处理,将4-8g消化纤维加入球磨机,于600-800rpm处理60-180min。

[0015] 所述酶解反应,将预处理后的发酵纤维加入纤维素酶、β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶中的至少一种。

[0016] 所述发酵纤维加入纤维素酶与pH为4.8醋酸钠缓冲液混匀后,在40-60℃,150rpm条件下酶解24-72h,消化纤维与缓冲液的固液比为1-5%。

[0017] 所述乙醇发酵,所选菌株为酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*),具体步骤如下:

[0018] A、配制培养基,成分为:葡萄糖,50g/L;酵母膏,5g/L;蛋白胨,5g/L;MgSO₄·7H₂O,1g/L;K₂HPO₄,1g/L。

[0019] B、在121℃的高温灭菌锅灭菌30min,冷却后,将酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在30℃的条件下,活化12-48h。

[0020] C、活化后,在1000rpm转速下对其进行浓缩20min。

[0021] D、将浓缩后的活化酵母培养物与水解液以1:5-1:15的体积比例混合,在30℃的条件下发酵12-72h。

[0022] 本发明的优点在于:

[0023] 本发明将稻草生物质先进行瘤胃微生物主导的厌氧发酵,产生的挥发性脂肪酸进行甲烷发酵,剩余的发酵纤维经预处理后进行酶解糖化及酵母菌发酵产乙醇,提供了一种高效、低成本、可再生、环境友好的联产甲烷和乙醇的方法。在实际应用中,该发明不仅能够同时获得甲烷和乙醇两种清洁生物能源,实现了清洁能源的联合生产,提高了纤维素能量转化率,增加了生物能源的产量,而且降低当前由屠宰场废弃物排放及由化石燃料所产生的环境污染,并在一定程度上缓解了能源危机,为清洁能源的合理化生产提供了理论依据。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体事例对本发明进一步阐述,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于以下的实例。

[0025] 本实例中所用的水稻秸秆,风干后粉碎,过30目筛,所用的瘤胃液取自屠宰场新鲜的牛瘤胃,过滤后密闭保存备用。瘤胃液的pH为6.5,TS为10.7g/L,VS为6.8g/L。本实例中所用的接种污泥为富含甲烷菌的厌氧消化污泥pH为7.8,TS为27.9g/L,VS为17.2g/L。本实例中得纤维素酶和酵母菌均来自购买。下述实例中得其它所用的材料,试剂等如无特殊说明,均从商业途径获得。

[0026] 实施例1

[0027] 本实施例的具体步骤如下:

[0028] (1) 瘤胃微生物主导的厌氧发酵:称取过30目筛的干稻草(RS) 10g于1L的厌氧发酵瓶中,分别加入瘤胃液和缓冲溶液,接种量为50% (v/v,瘤胃液和缓冲液体积比),反应的有效体积为400mL,固体浓度为2.5%,发酵温度为39℃,发酵时间为3d。发酵结束后,在4000rpm条件下离心20min得到上清液和固体消化纤维,将固体部分在60℃的条件下烘干至恒重。

[0029] (2) 甲烷发酵:将步骤(1)得到的上清液加入到富含甲烷菌厌氧消化污泥中,接种量为60% (v/v,厌氧消化污泥和去离子水体积比),反应温度为35℃,运行时间为2d。用排水法测定产气量,气象色谱测定甲烷的含量。

[0030] (3) 预处理(MAP):在500mL的反应器中分别加入5g由步骤(1)制备的样品和100mL 1%的NaOH溶液,将加入回流装置的三角瓶置于微波炉中,在700W的条件下处理25min。反应完全后,取出反应器,冷却后,将预处理的样品于4000rpm条件下离心20min,去除上清液,所得到的固体部分于70℃的条件下烘干至恒重。

[0031] (4) 酶解糖化:在100mL的反应器中分别加入1g步骤(3)制备的样品和46mL醋酸钠缓冲液(0.2M,pH 4.8)。将样品混匀后,加入纤维素酶(30FPU/g 样品)。然后将其置于150rpm,50℃的恒温震荡培养箱中培养48h,得到酶解液。

[0032] (5) 乙醇发酵:配制培养基:葡萄糖,50g/L;酵母膏,5g/L;蛋白胨,5g/L;MgSO₄·7H₂O,1g/L;K₂HPO₄,1g/L。在121℃的高温灭菌锅灭菌30min,冷却后,将酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)在30℃的条件下,活化24h。活化后,在1000rpm转速下对其进行浓缩20min。将浓缩后的活化酵母培养物与步骤(4)制备的水解液以1:10的体积比例混合,在30℃,发酵48h。

[0033] (6) 实验结果:经过2d的甲烷发酵后,最终累积甲烷产量达到1285.7mL,相应的甲烷产率为128.6L/kg干稻草,经过48h乙醇发酵,乙醇的产量达到64g/kg干稻草。如表1所示,根据质量平衡分析得知,每kg稻草经过瘤胃微生物主导的厌氧消化和乙醇发酵共产生甲烷4950g,乙醇1792g,生物能源共计6742KJ。

[0034] 实施例2

[0035] 本实例与实例1相同之处不再重复,不同之处在于所选消化纤维的预处理为球磨(BMP),称取4g消化纤维于750rpm条件下球磨120min。预处理后的消化纤维再进行酶解,乙醇发酵。该实例证明了较实例一球磨预处理可以提高每kg稻草的乙醇产量,乙醇的产量达到70g·kg⁻¹干稻草(表1)。

[0036] 实施例3

[0037] 本实例与实例1和实例2的相同之处不再重复,不同之处在于瘤胃液主导的厌氧发酵所选的固体浓度为10%,发酵后分离的液体进行甲烷发酵,固体经过实例1和实例2所述预处理后,再进行酶解和乙醇发酵。实验结果表明甲烷产率较实例1和实例2降低,为58.4L/kg干稻草,而乙醇产量较实例1和实例2有明显提高,分别为105mg/kg干稻草(MAP)和113mg/kg干稻草(BMP)。

[0038] 实施例4

[0039] 本实例为对比实例,本对比实例中所选的稻草未经瘤胃微生物主导的厌氧发酵过程,而是直接进行与实例1、2和3相同的预处理,酶解和乙醇发酵过程。所得实验结果如表1所示。该对比实例的结果表明将稻草直接应用于乙醇发酵所得每kg干稻草总能量输出远低于实例1、2和3(表1),证明了瘤胃微生物主导的厌氧发酵过程能有利于提高其能源转化率。

表1每千克稻草总产能效果

原料	产能 (g/kg)		能量输出 (KJ/kg)		总能量输出 (KJ/kg)
	甲烷	乙醇	甲烷	乙醇	
2.5%-BMP-RS	99	70	4950	1960	6910
2.5%-MAP-RS	99	64	4950	1792	6742
10%-BMP-RS	45	113	2250	3164	5414
10%-MAP-RS	45	105	2250	2940	5190
BMP-RS	-	117	-	2828	3276
MAP-RS	-	102	-	2464	2856