

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12P 5/02 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510010991.2

[45] 授权公告日 2009年6月17日

[11] 授权公告号 CN 100500858C

[22] 申请日 2005.8.31

[21] 申请号 200510010991.2

[73] 专利权人 云南师范大学

地址 650032 云南省昆明市一二一大街  
298号

[72] 发明人 刘士清 张无敌

[56] 参考文献

CN1351170A 2002.5.29

沼气料液对木聚糖酶活性的影响. 刘士清, 李文鹏, 廖昌珑, 张无敌. 中国沼气, 第22卷第3期. 2004

审查员 李晶晶

[74] 专利代理机构 昆明科阳知识产权代理事务所  
代理人 孙山明

权利要求书1页 说明书3页

[54] 发明名称

应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法

[57] 摘要

本发明涉及使用微生物或酶的沼气发酵方法,特别是涉及以木聚糖酶为主的半纤维素酶混合粗酶外源加入沼气发酵系统以提高产气率的方法。以外源加入0.55~0.581U/mL料液的木聚糖酶类半纤维素酶启动新池;在进出料时间间隔为5~9d的正常发酵的半连续发酵池中或已正常发酵的批量或连续发酵中投入5.01U/mL料液的木聚糖酶量。可明显提高沼气发酵产气量、TS和VS产气潜力以及沼气中甲烷(CH<sub>4</sub>)含量。

1、应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法，其特征在于：

在新池发酵起动中，以 0.55IU/mL ~ 0.58IU/mL 用量投入木聚糖酶；

在半连续发酵池中，间隔进出料时间 5 d ~ 9d，以 2.5IU/mL ~ 5.0IU/mL 用量投入木聚糖酶；

在连续发酵池或批量发酵池中，以 5.0IU/mL 用量投入木聚糖酶。

2、根据权利要求 1 所述的应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法，其特征在于木聚糖酶用水、粪水或沼液吸湿后，再用 20 ~ 50Kg 发酵原料搅匀，从进料口倒入池中。

3、根据权利要求 1 所述的应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法，其特征在于在新池起动的沼气发酵原料中，当料投至 1/2 ~ 2/3 时，将所需投入的木聚糖酶用水、粪水或沼液吸湿溶解后倒入池中，再将余料投完封池，且起动最大用量为 5.5IU/mL。

4、根据权利要求 1 所述的应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法，其特征在于木聚糖酶与沼气发酵生物活性添加剂二者时间间隔 5d ~ 10d 加入，即投入木聚糖酶间隔 5d ~ 10d 后，再按每立方料液投入糖化酶 40 ~ 60g、淀粉酶 20 ~ 45g、纤维素酶 5 ~ 15g、蛋白酶 3 ~ 10g。

## 应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法

### 所属技术领域

本发明涉及使用微生物或酶的沼气发酵方法，特别是涉及以木聚糖酶为主的纤维素酶外源加入沼气发酵系统以提高产气率的方法。

### 背景技术

农村半连续、连续沼气发酵始终存在的问题之一是产气率较低，实际原料产气率仅只是理论值的 50%左右，其中一个重要原因是，沼气发酵原料中的重要成分半纤维素几乎未被利用。

半纤维素占木质纤维素含量的 30%，它一般是不足 200 个糖基高度分枝的非结晶状杂多聚糖，而木聚糖是半纤维素的主要成分。例如，在被子植物(开花植物)的木材中木聚糖占其半纤维素的一大部分，占整个干重的 15%~30%；在裸子植物(蕨类及针叶类植物)中，木聚糖占整个干重的 7%~12%。木聚糖的结构很复杂，完全生物降解为构成单元需要多种酶共同完成。

未曾有人注意用木聚糖酶提高沼气发酵原料的能源转化率，残留于体系中的半纤维素成为未被利用的生物量，而天然纤维质原料的物理或化学结构结晶性和木质化，又使半纤维素影响了木质纤维素的其它有机物降解，造成原料能源转化效率总体偏低。我们在发酵成熟的料液中未检测到酶活力，故认为木聚糖酶是一种底物诱导才产生的酶。以木聚糖酶在沼气发酵体系外酶活力检测发现：来源于体系外的微生物和体系内的微生物产生的 8 种不同性质特点的木聚糖酶受到沼气料液的强烈抑制，但来源于绿色木霉 (*Trichoderma viride*) YNUCC0183 和兼性厌氧细菌 B5-3 菌株的木聚糖酶不受抑制或抑制较小，这两种酶虽然分别来源于真核生物和原核生物，共同有最适温度 50℃，最适 pH6.0 的特点。（“沼气料液对木聚糖酶活性的影响”刘士清 李文鹏 廖昌琬 张无敌 中国沼气 2004, 22(3)）。但是，论文中是在脱离了产沼气的厌氧环境的体系外研究沼气发酵液对酶的抑制的实验结果；同时，木聚糖酶是国际命名的一类酶 EC3.2.1.8 的总标识，论文研究阐述的 8 株菌产生的木聚糖酶仅是木聚糖酶大类中 F10 和 F11 两大家族中的点滴，由此，论文推论存在客观局限。

在此之前，我们加入一定糖化酶、淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶到沼气发酵体系中水解淀粉、纤维素、蛋白质，提高了产气速率、获得了较好的沼气产量及原料利用率，并以“沼气发酵生物活性添加剂”（ZL 01129073.0）取得发明专利。

以下内容的术语中，

IU 为国际单位，以 50℃，在桦木木聚糖 (Birchwood xylan) 为底物，每分钟从木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个活力单位 (IU)，还原糖与木糖等量。

BU 为专用于沼气发酵中的自定义单位，以 50℃ 酶解底物释放木糖 μg/min 计。

$$1IU (\mu\text{mol}/\text{min}) = 150BU (\mu\text{g}/\text{min})$$

总固形物 TS (Total Solids) 指一定量的发酵物料在 105℃ 下烘干至恒重所得净重。

挥发性物质 VS (Volatility Substrate) 指 TS 在马弗炉中 550℃ 灼烧掉的挥发性部分。

新池起动是指新建造的沼气发酵池，投入生物质原料(作物秸秆、动物粪便等)和一定的种量(正常发酵沼气池的活性底泥，或牛粪等较长时间在高湿度下沤制)，总 TS 约 5~7%，投好后封池至正常产生出沼气的时间，此称之为新池起动，或清池大换料后起动。

半连续发酵池指正常发酵着的沼气池定期或不定期的间断进料和出料的操作方式。

连续发酵指正常发酵着的沼气池，原料从进料口不断进入，同时出料口不断的流出的发酵操作方式。

批量发酵主要指一次性投入原料，中间不作任何添加原料，从起动、发酵至结束一次的完成。

在农村用户沼气池的正常运行中常见的是半连续发酵、连续发酵两种混合进行，批量发酵常见在研究中。

#### 发明内容

本发明目的是采用外加木聚糖酶对成为残留物滞于沼气发酵体系中的半纤维素进行生物降解，提高发酵原料沼气生产效率。

本发明另一目的是外源加入的木聚糖酶结合沼气发酵生物活性添加剂共同作用，提高发酵原料沼气生产效率。

为实现上述目的，本发明提供了应用木聚糖酶提高沼气发酵产气率的方法，该方法在新池发酵起动中，以 0.55IU/mL ~ 0.58IU/mL 用量投入木聚糖酶；在半连续发酵池中，间隔进出料时间 5 d ~ 9d，以 2.5IU/mL ~ 5.0IU/mL 用量投入木聚糖酶；在连续发酵池或批量发酵池中，以 5.0IU/mL 用量投入木聚糖酶。

所述木聚糖酶用水、粪水或沼液吸湿后，再用约 20 ~ 50Kg 发酵原料搅匀，从进料口倒入池中。对于新池起动，最好当沼气发酵原料投至 1/2 ~ 2/3 时，将所需投入的木聚糖酶用水、粪水或沼液吸湿溶解后倒入池中，再将余料投完封池，且起动最大用量为 5.5IU/mL。

所述木聚糖酶与沼气发酵生物活性添加剂二者时间间隔 5d ~ 10d 加入，再按每立方料液投入糖化酶 40 ~ 60g、淀粉酶 20 ~ 45g、纤维素酶 5 ~ 15g、蛋白酶 3 ~ 10g。或正常沼气发酵过程进入后期时二者同时使用。

木聚糖酶能够从不同环境中分离的细菌和真菌得到。本发明不管产生木聚糖酶的微生物种类，只需产生的木聚糖酶符合上述发酵过程要求，能水解沼气发酵中木聚糖即可。

我们前期发现，一定的水解酶活可以缩短沼气发酵的启动过程，利用猪粪发酵添加水解酶的实验结果表明，添加糖化酶等水解酶可以提高沼气发酵的产气率。并且，在猪粪的批量发酵过程中，多数水解酶活变化与产气变化规律极为相似，水解酶活峰值均出现在产气峰值附近，在沼气发酵过程中维持适宜的纤维素酶活、脂肪酶活和淀粉酶活可以提高沼气发酵的效率，而较高蛋白酶活的存在会降低沼气产气率。而本发明在研究沼气发酵料液对木聚糖酶的影响基础上，提出了外源加入木聚糖酶于沼气发酵体系提高其产气率的技术工艺参数，使半纤维素及其它有机物得到更多降解，提高了原料能源转化效率，明显增加了原料产气量和气体成分甲烷含量。

本发明作用机制：

在新池起动时，木聚糖酶的投入最大用量为 5.5IU/mL (820BU/mL)。这是由于超过此量，水解速度太快，而改变发酵体系的内环境，产甲烷菌生长倍增跟不上，非产甲烷菌过度活跃，出现前期 CO<sub>2</sub> 量大幅度上升消耗可资利用的原料，中后期发酵不正常，总产气和甲烷含量反而大幅减少。

木聚糖酶在正常发酵池中以 5.0IU/mL (750BU/mL) 或减半为 2.5IU/mL (375 BU/mL) 的用量投入后，提高沼气发酵产气率的结果见下表：

时间段(d)	2.5IU/mL						5.0IU/mL					
	0-5	5-9	9-14	14-19	19-23	23d 总量	0-5d	5-9	9-14	14-19	19-23	23d 总量
总气量增加(%)	22.45	12.31	4.92	12.26	-5.41	8.99	55.10	15.38	14.75	16.60	-0.90	19.15
CH <sub>4</sub> 增加(%)	41.49	15.97	-7.63	-4.92	-37.68	-3.23	160.38	49.95	-24.27	-14.36	-75.57	7.53
TS 产气潜力增加 (%)						9.02						19.16
TS 产 CH <sub>4</sub> 潜力增加 (%)						8.98						19.16
VS 产气潜力增加 (%)						-3.22						7.55
VS 产 CH <sub>4</sub> 潜力增加 (%)						-3.18						7.59

对表中结果，通过时间段的分析，在半连续发酵中进料时间间隔不宜超过 9d。9d 内以 2.5IU/mL 木聚糖酶量投入总产气提高是 16.67%，甲烷提高是 22.56%；以 5.0IU/mL 的木聚糖酶量投入总产气提高 32.46%，甲烷 78.50%。

一定量的木聚糖酶与一定量的其它水解酶配合更能进一步改善发酵状况，对连续或半连续的沼气发酵过程提高产气率比用新池起动易操作和效果好，能获得达到或接近二者产气率相加的效果，还能防止池表结壳。由于水解作用对象和产物不同，在发酵体系中引起混合菌群产生优势微生物有异，二者投入时间需要一定间隔期。

与现有技术比较, 本发明具有以下效果:

在新池发酵启动中, 加入木聚糖酶未缩短启动时间, 但沼气总产气量提高 12.17%; 甲烷气体量提高 13.84%, TS 产气潜力提高 23.01%, TS 产甲烷潜力提高 24.84%; VS 产气潜力提高 22.88%, VS 产甲烷潜力提高 24.71%。

在半连续发酵池中, 加入木聚糖酶, 进出料时间间隔为 5~9d, 可提高总产气 16.67%~32.46%, 产甲烷提高 22.56%~78.50%。

在连续发酵池中加入木聚糖, 总产气提高 42.63%, 产 CH<sub>4</sub> 提高 34.14%。

在批量发酵池中加入木聚糖, 提高总产气率 19.12%, 甲烷 13.55%; 提高 TS 产气潜力 19.12%, 提高 TS 产甲烷潜力 13.55%; 提高 VS 产气潜力 19.12%, 提高 VS 产甲烷潜力 3.55%。

### 具体实施方式

实施例:

#### (1) 木聚糖酶用于新池启动的方法

按常规沼气发酵配料启动沼气发酵, 同时以发酵实际体积计算木聚糖酶加入量, 加入为 0.58IU/mL (87BU/mL)。投料操作中, 当料投至 1/2~2/3 时, 将所需投入的木聚糖酶用水吸湿溶解后倒入池中, 再将余料投完封池。

实验结果表明, 在冬季 12 月至次年 1 月期间获得总产气量提高 12.17%; 甲烷气体量提高 13.84%, TS 产气提高 23.01%, TS 产甲烷潜力提高 24.84%; VS 产气提高 22.88%; VS 产甲烷潜力提高 24.71%。

实验结果还表明, 木聚糖酶不缩短启动时间, 启动后速率快, 产气量, 甲烷含量高, 单位质量的 TS 和 VS 产气量增加, 提高了原料的利用率及转化效率。

#### (2) 木聚糖酶用于正常发酵池的方法

在进出料时间间隔为 7d 的正常发酵的半连续发酵池中或已正常发酵的批量或连续发酵中, 以 5.0IU/mL (750BU/mL) 木聚糖酶用量投入料液。

#### (3) 木聚糖酶类与沼气发酵生物活性添加剂联合使用方法

正常启动后的发酵池或正常发酵过程中的发酵池, 以 5.0IU/mL (750BU/mL) 将所需投入的木聚糖酶用水、粪水或沼液吸湿后, 再用约 20kg 发酵原料搅匀, 从进料口倒入池中, 并在时间间隔 8d 后加入沼气发酵生物活性添加剂, 即每立方料液投入糖化酶 50g、淀粉酶 35g、纤维素酶 10g、蛋白酶 5g。

连续发酵自加入木聚糖酶起 10d 中最高总产气提高 42.63%, 最高产 CH<sub>4</sub> 提高 34.14%, 平均分别为总产气 19.12%, 甲烷 13.55%。