

接种比例和接种物驯化对榨汁橙渣厌氧发酵的影响

席江^{1,2} 艾平¹ 袁萧² 龙燕² 张衍林¹

(1. 华中农业大学工学院, 武汉 430070; 2. 农业农村部沼气科学研究所, 成都 610041)

摘要: 以榨汁橙渣为原料,研究了不同接种比例(接种物与原料的挥发性固体质量比)对厌氧发酵规律及发酵系统中细菌与古菌群落组成的影响,并探究了接种物驯化对厌氧发酵效率的影响。结果表明:接种比例为8、6和4时厌氧发酵能够正常进行,甲烷累积产率分别达到320.0、304.9、242.6 mL/g,而接种比例为2时仅达到111.4 mL/g,且在第2天厌氧发酵就进入停滞期,直到第8天才恢复产气;测序结果也显示接种比例为2的发酵系统中芽孢杆菌纲相对丰度下降到1.88%,*Methanosaeta*和*Methanospirillum*的相对丰度也下降到24.45%和1.71%,影响了甲烷的产生;按照接种比例为8和6驯化接种物后可以有效缩短厌氧发酵周期,第3轮发酵前4 d的累积甲烷产量占总产甲烷量的95.75%和93.40%;接种比例为4条件下,接种物驯化对厌氧发酵的促进效果存在不确定性,驯化效果会受接种物原微生物群落组成的影响;而接种比例为2条件下通过接种物驯化也不能有效提高厌氧发酵的效率。为保障实验结果的准确性、可重复性和提高发酵效率,进行榨汁橙渣厌氧发酵的相关研究时,推荐选择接种比例为6,并进行至少一轮接种物驯化。

关键词: 榨汁橙渣; 厌氧发酵; 接种比例; 微生物群落组成; 接种物驯化

中图分类号: S216.4; X712 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)03-0309-08

Effect of Inoculum to Substrate Ratio and Acclimation of Inoculum on Anaerobic Digestion of Orange Pressing Waste

XI Jiang^{1,2} AI Ping¹ YUAN Xiao² LONG Yan² ZHANG Yanlin¹

(1. College of Engineering, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
2. Biogas Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China)

Abstract: Different inoculum and substrate ratio (ISR) was taken to conduct the anaerobic digestion of orange pressing waste (OPR), and the daily production of methane was recorded. The relative abundance of bacteria and archaea in the inoculum and sludge were tested to find out the change before and after anaerobic digestion. And the digested materials were used for the test on the improvement of anaerobic digestion after acclimation of inoculum. The results demonstrated that the cumulative methane production of ISR 8, 6 and 4 were 320.0 mL/g, 304.9 mL/g and 242.6 mL/g, respectively, but that of ISR 2 was only 111.4 mL/g after a lag phase of 7 d. And the relative abundance of bacterial and archaea community of ISR 2 was quite different from those in other tests. The relative abundance of Bacilli, *Methanosaeta* and *Methanospirillum* was decreased to 1.88%, 24.45% and 1.71%, respectively, which may cause the insufficient degradation of the substrate. Although there was no increase in the cumulative methane production in the 2nd and 3rd rounds of anaerobic digestion, the time employed to reach the final methane production was shorter than that in the 1st round of ISR 8 and 6, and the cumulative methane production of the first 4 d was 95.75% and 93.40% of the total production in the 3rd rounds. But it was unstable when ISR 4 was taken to conduct the test. In this situation, the improvement of anaerobic digestion would be decided by the source of the inoculum, and no improvement was found in the 2nd and 3rd rounds if the ISR was 2. According to the results, the optimum ISR for the anaerobic digestion of OPR was 6 whether in a test on the biomethane production from different OPR or in a pretreatment unit for the improvement of the methane production, and at least a round of anaerobic

收稿日期: 2018-12-21 修回日期: 2019-01-21

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(1251516100109)

作者简介: 席江(1983—),男,博士生,农业农村部沼气科学研究所助理研究员,主要从事沼气工程技术研究,E-mail: xijiang@caas.cn

通信作者: 张衍林(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事农业生物环境与能源工程研究,E-mail: zhangyl@mail.hzau.edu.cn

digestion was needed for the acclimation of the inoculum.

Key words: orange pressing waste; anaerobic digestion; inoculum to substrate ratio; microbial community structure; acclimation of inoculum

0 引言

2016 年全球橙种植面积超过 $3.96 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 总产量超过 $7 \times 10^7 \text{ t}$, 而中国橙产量位于全球第二, 产量超过 $8 \times 10^6 \text{ t}$, 占全球橙产量的 11.5%^[1]。全球 30% ~ 50% 的柑橘被用于鲜食, 剩余部分被用于加工, 主要生产果汁、果酱、果胶和其他食品^[2], 柑橘加工后残渣的质量达到了鲜果的 50% ~ 60%, 主要包含皮、种子和果肉残渣^[3]。我国每年会产生超过 $5 \times 10^6 \text{ t}$ 柑橘废渣, 除去一小部分被用于果胶的提取和动物饲养, 绝大多数废渣被直接丢弃或填埋^[4]。榨汁橙渣富含果胶等有机质, 适宜采用厌氧生物降解手段进行处理, 既环保, 又能回收能源, 发酵之后的沼渣还可以作为一种土壤改良剂, 替代部分化肥的使用, 促进作物生长, 缓解土壤板结^[5]。

榨汁橙渣易酸化的特性和橙皮中含有对微生物有抑制作用的精油常会导致厌氧发酵不正常或产气率较低。FAGBOHUNGBE 等^[6]采用 3 ~ 3.26 的接种比例(接种物与原料的挥发性固体质量比, Inoculum and substrate ratio, ISR)开展橙皮的厌氧发酵, 尽管加入了生物炭, 但得到最高甲烷累积产率仅 154 mL/g, 发酵过程中均出现了不同程度的停滞。SANJAYA 等^[7]研究了中温条件下, 橙的种子、果皮和果肉的甲烷累积产率, 选择的 ISR 为 4, 橙皮的甲烷累积产率只有 48.23 mL/g, 研究认为是因精油中柠檬烯等一些有芳香味的化合物对厌氧发酵产生了抑制, 可能使用的接种物对橙皮适应性较差而同时添加量又不足, 才造成厌氧发酵异常和产气率较低。WIKANDARI 等^[8]在 30 mL 厌氧发酵体系中添加 20 mL 接种物, 仍只得到 131 mL/g 的甲烷累积产率, 说明以这类废弃物为发酵原料可能需要更高的 ISR。还有一些研究通过水蒸气蒸馏^[3]、溶剂萃取^[8]、汽爆^[9]和生物降解^[4]等预处理手段以促进橙皮的厌氧发酵。FORGÁCS 等^[9]通过汽爆预处理柑橘榨汁渣, 使甲烷累积产率提高了 426%, 但预处理前的甲烷累积产率仅 102 mL/g, 可能是因原料添加量较高(接种物添加较少)而导致预处理前甲烷累积产率较低。一些其他的预处理如生物预处理之后甲烷累积产率也只有 176.05 mL/g^[4], 且没有通过优化厌氧发酵体系来充分挖掘产甲烷潜力。对于榨汁橙渣厌氧发酵的研究, 多集中于不同预处理的优化, 这些预处理均需要额外的能耗或化学试剂添加,

而不同接种比例和接种物驯化对榨汁橙渣厌氧发酵影响的研究相对较少。

因此, 本文以榨汁橙渣为厌氧发酵原料, 通过监测不同 ISR 条件下榨汁橙渣厌氧发酵产甲烷量、pH 值和挥发酸含量, 比较接种物和发酵结束后厌氧发酵体系中细菌和古菌群落组成的变化, 系统分析榨汁橙渣厌氧发酵的规律, 同时, 通过监测驯化后接种物的厌氧发酵甲烷产气量, 分析通过驯化接种物促进榨汁橙渣厌氧发酵的有效性和可行性, 为榨汁橙渣厌氧发酵及其预处理优化研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与接种物

实验用榨汁橙渣(Orange pressing waste, OPR)取自“天使之橙”鲜榨橙汁自助贩卖机, 手动分选出橙皮渣(Orange peel waste, OPW)和橙肉渣(Orange pulp waste, OPU), OPW 与 OPU 鲜质量比为 2.39:1, 经粉碎和过 10 目筛后, 抽真空 -20℃ 分别保存备用。接种物取自四川省德阳市正常运行的集中供气工程, 该工程以猪粪为发酵原料。接种物取回后装入 5 L 厌氧发酵瓶中, 35℃ 水浴放置一段时间直到不再产气为止。OPW、OPU 和接种物的总固体(Total solid, TS)、挥发性固体(Volatile solid, VS)和柠檬烯含量见表 1。

表 1 榨汁橙皮渣、橙肉渣和接种物理化特性

Tab.1 Characteristics of OPW, OPU and inoculum

参数	橙皮渣	橙肉渣	接种物
TS 质量分数/%	24.52 ± 0.31	20.03 ± 0.04	14.95 ± 0.21
VS 质量分数/%	23.52 ± 0.31	19.29 ± 0.04	9.91 ± 0.16
pH 值	3.75 ± 0.08	3.95 ± 0.02	7.81 ± 0.02
柠檬烯质量分数/%	3.27		

验证实验的发酵原料为夏橙榨汁渣, 该夏橙产自湖北省宜昌市秭归县, 手动剥下橙皮, 橙肉渣为橙肉经飞利浦 HR871/00 型榨汁机榨汁后的残渣, 夏橙橙皮渣和橙肉渣 VS 质量分数分别为 19.85% 和 13.94%, OPW 与 OPU 鲜质量比为 1.97:1, 经粉碎和 10 目筛过筛后, 抽真空 -20℃ 分别保存备用。

1.2 厌氧发酵实验

厌氧发酵装置采用全自动甲烷潜力测试系统(Bioprocess AMPTSII), 发酵瓶容积为 400 mL, 沼气通过 3 mol/L NaOH 溶液吸收后进入流量自动记录装置, 装置将甲烷产气量自动换算成标准状态并记

录,厌氧发酵装置示意图见图1。每隔1 d取4 mL发酵液用于pH值和挥发酸(Volatile fatty acids, VFAs)测量。厌氧发酵温度为35℃,ISR设置见表2,每个处理设置2个重复。采用修正的Gompertz模型描述厌氧发酵过程^[10],模型公式为

$$p = p_0 \exp \left(- \exp \left(\frac{R_{\max} e}{p_0} (\lambda - t) + 1 \right) \right)$$

式中 p —— t 时刻的单位挥发性固体累积甲烷产量, mL/g

p_0 ——单位挥发性固体最大产甲烷潜力, mL/g

R_{\max} ——单位挥发性固体最大产甲烷速率, mL/(g·d)

λ ——停滞期, d

t ——实验持续时间, d

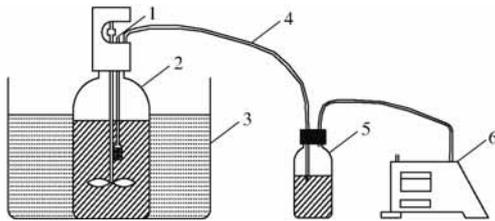


图1 厌氧发酵装置示意图

Fig. 1 Experimental sketch of anaerobic digestion device

1. 液样取样口 2. 厌氧发酵瓶 3. 水浴锅 4. 导气管 5. CO₂吸收瓶 6. 流量自动记录装置

表2 厌氧发酵接种物和原料添加量

Tab. 2 Amount of inoculum and substrate used in anaerobic digestion

ISR	接种物质量	橙皮渣质量	橙肉渣质量	总底物质量	g
8	16	1.41	0.59	2	
6	12	1.41	0.59	2	
4	8	1.41	0.59	2	
2	4	1.41	0.59	2	

验证实验采用相同厌氧发酵装置,ISR分别为8、6、4和2,每个处理设置2个重复,固定发酵原料总VS质量为2 g。

1.3 参数测量方法

TS和VS含量采用差重法测量,取10 g样品,TS测量在(105±5)℃干燥24 h,VS含量测量在550~600℃马弗炉中灼烧4 h;pH值采用梅特勒FE28 pH计进行测量;VFAs含量的测量使用岛津GC-2030型气相色谱仪(日本),检测器为火焰离子化检测器,色谱柱为IntertCap WAX型毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为氦气,进样口温度200℃,柱箱温度95℃保持2 min,以10℃/min升温至160℃,继续以400℃/min升温至240℃,保持5 min。柠檬烯含量测量使用岛津GCMS-

TQ8050型三重四极杆气相色谱质谱联用仪,模式选择Q3Scan,色谱柱使用Rtx-5MS型毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),进样口温度250℃,柱温箱温度50℃保持1 min,以10℃/min的速率上升到280℃,保持5 min,离子源温度200℃。

1.4 细菌和古菌多样性分析

取样品10 mL,于-80℃下保存。使用E. Z. N. A. soil试剂盒(美国Omega Bio-tek公司)进行总DNA抽提,DNA浓度和纯度利用NanoDrop2000型紫外可见分光光度计进行检测,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质,检测合格后用引物Arch344F(5'-ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA-3')和Arch915R(5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'),338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')分别进行PCR扩增,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序,数据进行OUT抽平后进行多样性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同ISR对厌氧发酵产甲烷规律的影响

2.1.1 甲烷日产气率

ISR为8、6、4的处理表现出相似的产甲烷规律,见图2。第1天达到第1个产气高峰之后产气量下降,随后上升达到第2个产气高峰,且第2个产气高峰的日产气率高于第1个产气高峰。但在第1个产气高峰之后的产气下降幅度和时长有所区别,ISR为8、6、4分别在第3、3、4天达到甲烷日产气率相对低点,分别为28.15、21.05、4.58 mL/g,接种比例高的先达到相对低点,同时甲烷日产气率也较高,随后分别在第5、6、9天分别达到第2个产甲烷高峰,分别为52.9、49.8、41.9 mL/g,接种比例高的先达到第2个产气高峰,且甲烷日产气率也较高。ISR为2的处理发生了可逆的酸化,在第1天达到第1个产气高峰之后,产气迅速停滞,直到第8天才恢复产气,并在第10天达到第2个产气高峰,甲烷日产气率达到23.48 mL/g。这种现象反映了产酸和产甲烷速率的失衡,产酸产生的VFAs积累又导致pH值的下降,进一步抑制产甲烷过程^[11],在这个ISR下厌氧发酵不能正常进行。

2.1.2 甲烷累积产率

从图2可以看出,ISR为8和6的甲烷累积产率相近,分别为320.0 mL/g和304.9 mL/g,说明不能通过进一步增加接种物量的方式来提高原料产气率。这个数据与CALABRO等^[12]、RUIZ等^[5]和NEGRO等^[13]分别报道的361、357.3、285 mL/g相近,结果略低于KAPRAJU等^[14]报道的490 mL/g,这种

差异可能是原料理化特性差异造成的。但实验结果高于 FORGÁCS 等^[9] 报道的 102 mL/g 和 FAGBOHUNGBE 等^[6] 报道的 165.9 mL/g, 这可能是由于他们添加的接种物量不足而导致原料没有被充分利用。

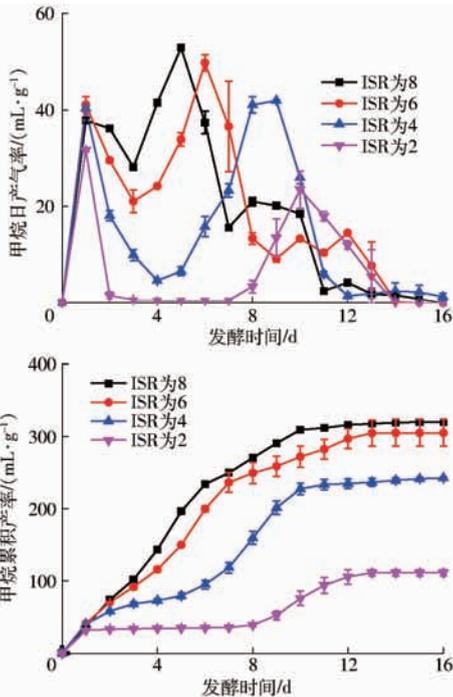


图2 ISR为2~8的甲烷日产气率和累积产率

Fig. 2 Daily and cumulative methane production of ISR 2~8

ISR为4和ISR为2的甲烷累积产率低于ISR为8和ISR为6时的数值。ISR为4的甲烷累积产率为242.6 mL/g, 是ISR为8和6的甲烷累积产率的75.8%和79.6%。而ISR为2的甲烷累积产率仅为111.4 mL/g, 是ISR为8和6的甲烷累积产率的34.8%和36.5%。从累积产甲烷的曲线可以看出, 第1天之后厌氧发酵进入停滞阶段, 尤其是ISR为2时的停滞期长达7 d。

根据表1和表2可以计算出添加到厌氧发酵体系中柠檬烯的质量浓度为490 mg/L, 这个浓度在中温条件下并不会对厌氧发酵体系产生显著抑制^[12], ISR为4和2的处理的累积产甲烷量低, 主要是因为接种物量较少, 不能充分利用底物。

2.1.3 pH值和VFAs含量

厌氧发酵系统pH值的变化与VFAs(乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸含量之和)积累呈负相关(图3)。ISR为8、6、4的处理在第2天挥发酸质量浓度达到峰值, 分别为1 445.89、1 806.05、2 067.37 mg/L, 随接种比例增加, 挥发酸质量浓度峰值降低, 在第10天已经检测不出挥发酸。ISR为2的处理是在第4天挥发酸质量浓度才达到峰值2 201.92 mg/L, 呈先上升再下降的规律, 在第10天挥发酸质量浓度仍达

到279.24 mg/L, 直到第12天才检测不出挥发酸。同时, 随着VFAs含量的减少, pH值在逐渐上升。产甲烷的最适宜pH值是6.8~8.5^[15], ISR为8和6的处理pH值一直高于7。ISR为4的处理在第2天pH值低于6.8, 此后逐步恢复到7以上。而ISR为2的处理在第6天之前pH值也一直维持在6.8以下, 直到第8天pH值才恢复到6.8以上, 同时产甲烷也恢复。由于榨汁橙渣pH值在3~4^[3], 其低pH值和易酸化特性是影响厌氧发酵效果的一个重要因素, 通过增加接种量可以有效提高发酵系统的缓冲能力, 防止发酵过程中pH值大幅下降。

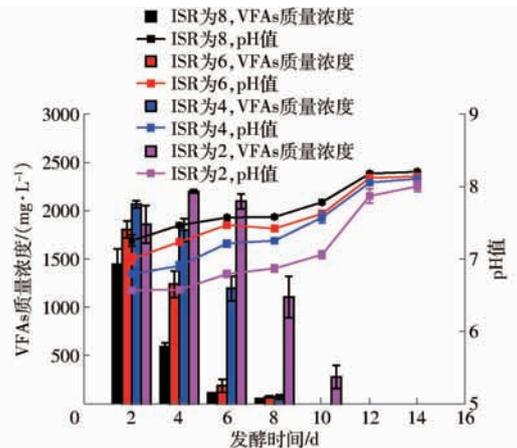


图3 ISR为2~8时pH值和挥发酸含量变化图

Fig. 3 Changes of pH and VFAs of ISR 2~8

2.2 不同ISR对微生物多样性的影响

2.2.1 细菌群落组成

由图4可知, 接种物中主要是硬壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria), 相对丰度分别达到86.96%、4.39%和4.48%, 放线菌门(Actinobacteria)、Atribacteria和绿弯菌门(Chloroflexi)相对丰度较低, 分别为2.26%、0.52%和0.32%。其他的一些研究也发现厌氧发酵系统中硬壁菌门和拟杆菌门细菌为优势菌群^[16], 放线菌门和绿弯菌门也常见于产甲烷的厌氧发酵装置和废水处理工程, 但它们在产甲烷过程中的作用并不清楚^[15]。

在门水平, ISR为4、6和8的沼渣中硬壁菌门和拟杆菌门相对丰度最高, 分别为79.90%~82.86%和3.33%~11.66%, LI等^[17]发现这两个门的细菌在纤维素的降解中发挥重要作用; Atribacteria和绿弯菌门相对丰度均高于接种物, 但相对丰度随ISR下降而降低; 变形菌门和放线菌门相对丰度低于接种物; Cloacimonetes门则只存在于榨汁橙渣发酵后的沼渣中, 这类细菌被认为与氨基酸、丙酸、丁酸以及纤维素的降解有关^[18], 且相对丰度随接种比例降低而下降。ISR为2沼渣的细菌群

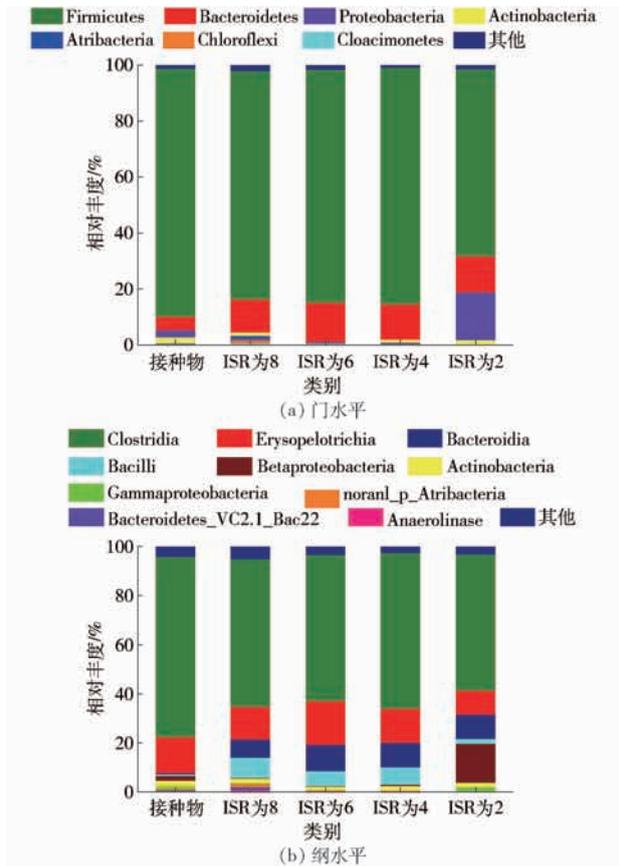


图4 不同ISR发酵前后细菌群落组成

Fig. 4 Composition of bacterial community before and after anaerobic digestion

落组成与其他处理相比,则表现较大差异,硬壁菌门相对丰度下降到 65.10%,变形菌门相对丰度上升到 19.09%,绿弯菌门和 Cloacimonetes 门未检测到。

在纲水平,ISR 为 4、6、8 的沼渣中细菌群落组成相较接种物存在明显差异,表现为梭菌纲 (Clostridia) 相对丰度下降到 57.74% ~ 61.7%,而同属于硬壁菌门的芽孢杆菌纲 (Bacilli) 相对丰度增加到 6.06% ~ 8.20%,拟杆菌纲 (Bacteroidia) 相对丰度则增加到 9.65% ~ 13.00%。梭菌纲和拟杆菌纲的细菌被认为主要参与水解和产酸过程^[19]。同样地,ISR 为 2 沼渣中芽孢杆菌纲相对丰度低于其他处理,仅 1.88%,这可能导致底物水解产酸过程受影响,但 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 丰度高于其他处理,达到 15.91%。

在门水平和纲水平,ISR 为 4、6 和 8 与接种物的细菌群落均有明显差异,可能因为接种物取自以猪粪为发酵原料的沼气工程,猪粪和榨汁橙渣的理化特性差异导致其最适宜的细菌群落组成存在差异,而经过一轮发酵后的群落组成可能更适应榨汁橙渣的厌氧发酵。ISR 为 2 的沼渣在门水平和纲水平与其他处理的差异可能是因为起始接种物数量不足,发酵后期菌群已经失调。

2.2.2 古菌群落组成

由图 5 可知,接种物中主要存在 4 个属的产甲烷菌,分别是 *Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanospirillum* 和 *Methanobacterium*,其相对丰度分别为 72.58%、5.15%、16.06% 和 1.73%。其中,*Methanosaeta* 和 *Methanosarcina* 同属于 Methanosarcinales 目,前者为专性乙酸营养性产甲烷古菌,后者则可以通过 CO₂ 还原、甲基裂解和乙酸发酵途径产甲烷^[20],而 2/3 甲烷的产量是来自乙酸的裂解^[21]; *Methanospirillum* 和 *Methanobacterium* 分属 Methanomicrobiales 和 Methanobacteriales 目,均为氢营养型产甲烷古菌^[20]。发酵后古菌群落组成与接种物相比已经有所变化,在接种物中 *Methanospirillum* 的相对丰度较高,而 *Methanosarcina* 相对丰度较低,可能与发酵原料以及发酵系统中 pH 值有关,因为接种物取自以猪粪为发酵原料的沼气工程,猪粪的 pH 值较橙榨汁渣高,而变化后的古菌群落组成可能更适应榨汁橙渣的厌氧发酵。

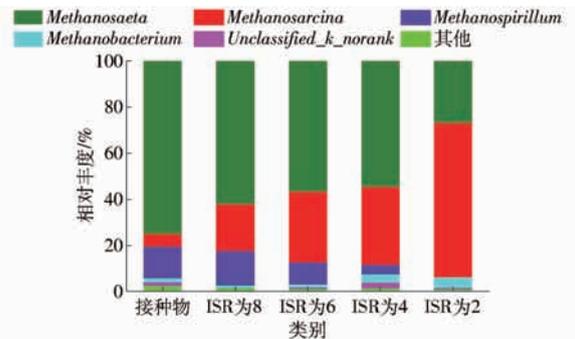


图5 不同接种物量发酵前后古菌群落组成

Fig. 5 Composition of archaea community before and after anaerobic digestion

总体上看,*Methanosaeta* 和 *Methanosarcina* 乙酸营养性产甲烷古菌的累积相对丰度随 ISR 的降低而提高,ISR 为 2 条件下,这两个属的产甲烷古菌相对丰度达到 90.17%。这与厌氧发酵系统中挥发酸的积累随 ISR 降低而提高的趋势一致,而 *Methanospirillum* 和 *Methanobacterium* 氢营养型产甲烷古菌的相对丰度随 ISR 降低而下降,ISR 为 2 条件下,这两个属的产甲烷古菌相对丰度合计仅为 6.92%。这可能与底物被大量转化为挥发酸,而这类古菌可利用底物量下降有关。

单独来看,乙酸营养性产甲烷古菌中 *Methanosaeta* 相对丰度随 ISR 降低而降低,*Methanosarcina* 相对丰度随 ISR 降低而提高,在 ISR 为 2 条件下,相对丰度分别为 24.45% 和 66.72%。这可能是因为前者最适生长的 pH 值范围 (7.0 ~ 7.3) 较后者 (6.5 ~ 7.8) 更窄^[22],而 ISR 为 2 的最低 pH 值达到 6.57,不适宜 *Methanosaeta* 生长,而

Methanosarcina 仍能适应。同样地,氢营养型产甲烷古菌中 *Methanospirillum* 相对丰度随 ISR 降低而降低,*Methanobacterium* 相对丰度随 ISR 降低而提高,在 ISR 为 2 条件下,相对丰度分别为 1.71% 和 5.21%。这可能是因为前者的最适生长的 pH 值范围(7.0~7.8)较后者(5.6~8.6)更窄^[22]。

2.3 接种物驯化对厌氧发酵的影响

厌氧发酵体系中微生物群落组成经过一轮厌氧发酵,已经得到了优化,这种改变的驱动力是发酵原料特性及厌氧发酵的条件^[5]。为了进一步研究接种物驯化后对榨汁橙渣厌氧发酵效率的提升,待第 1 轮厌氧发酵停止后,在发酵装置中加入与第 1 轮相同的原料量进行第 2 轮发酵,在第 2 轮厌氧发酵停止后再加入相同原料量进行第 3 轮发酵,监测厌氧发酵的甲烷产量。

ISR 为 8 和 ISR 为 6 的 3 轮厌氧发酵的甲烷累积产率见图 6a。接种物驯化后甲烷累积产率没有得到进一步提高,说明驯化前的微生物数量是足够的,原料在发酵过程中被充分降解和利用。随着微

生物对底物适应性的提高,产气效率在逐步提高,说明经过驯化,接种物对橙榨汁渣的适应性增强。ISR 为 8 时第 3、2、1 轮甲烷累积产率分别为 326.6、347.0、320.0 mL/g。从累积产甲烷量来看,虽然甲烷累积产率并没有表现出显著差异,但第 3、2、1 轮在前 4 d 产甲烷量占整个发酵周期产气量的 95.75%、83.78% 和 44.89%,通过接种物驯化,有效缩短了产气周期,提高了产气效率。ISR 为 6 的第 3、2、1 轮甲烷累积产率分别为 326.0、311.3、304.9 mL/g。虽然甲烷累积产率并没有表现出显著差异,但同样地,第 3、2、1 轮在前 4 d 产甲烷量占整个发酵周期产气量的 93.40%、86.72% 和 38.03%,有效缩短了产气周期,提高了产气效率。ISR 为 8 和 6 条件下,通过接种物驯化对厌氧发酵促进的效果是一致的,这也说明 ISR 为 6 下微生物数量相对榨汁橙渣量是充裕的,通过接种物驯化可以进一步提高厌氧发酵的效率,而 ISR 为 6 较 ISR 为 8 时添加较少的接种物,更具有应用价值。

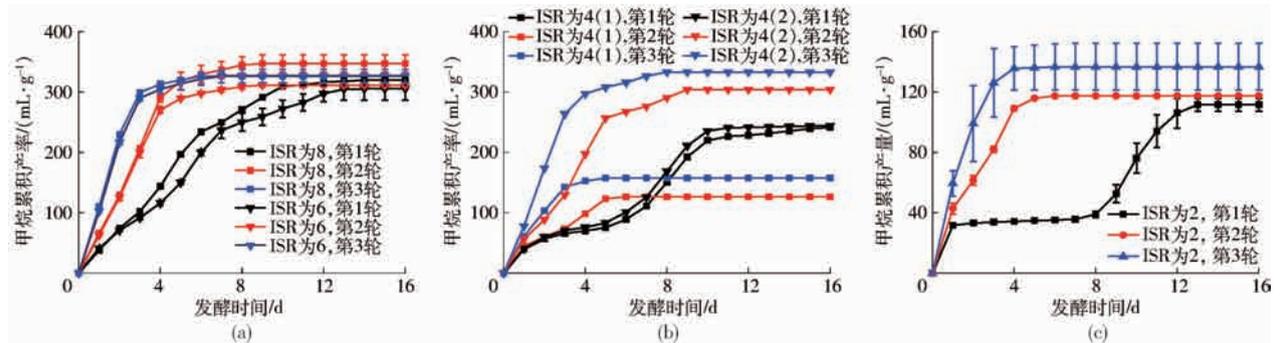


图 6 ISR 为 8、6、4 和 2 时 3 轮厌氧发酵甲烷累积产率

Fig. 6 Cumulative methane production of ISR 8, 6, 4 and 2 from the first to the third round

ISR 为 4 时 3 轮厌氧发酵的甲烷累积产率见图 6b。与 ISR 为 8 和 6 的情况不同,ISR 为 4 的两个重复,在接种物驯化后对厌氧发酵的影响表现出了差异。其中 ISR 为 4 的第 2 个重复,第 3、2、1 轮甲烷累积产率分别为 332.8、304.0、244.1 mL/g,第 3、2、1 轮在前 4 d 产气量占整个发酵周期产气量的 89.21%、64.93% 和 31.07%,通过接种物驯化,有效缩短了产气周期,提高了产气效率。而另一个重复,第 3、2、1 轮甲烷累积产率分别为 157.4、126.4、241.0 mL/g,并没有表现出对厌氧发酵的促进,甚至第 3、2 轮甲烷累积产率还分别下降了 34.7% 和 47.6%。该 ISR 下,厌氧发酵效果的分化说明该比例的微生物数量相对不足,通过接种物驯化来促进发酵存在偶然性和不确定性,接种物自身的微生物群落组成可能会更多地影响驯化的效果。

ISR 为 2 的 3 轮厌氧发酵的甲烷累积产率见

图 6c。ISR 为 2 的处理与 ISR 为 4 的第 2 个重复较为相似的是对厌氧发酵的提升也不显著,第 3、2、1 轮甲烷累积产率分别为 136.6、117.2、111.4 mL/g。这说明在 ISR 为 2 条件下,第 1 轮发酵结束后微生物群落组成可能就失衡了,且为不可逆的,仅通过接种物的驯化不能促进榨汁橙渣的厌氧发酵。

采用修正 Gompertz 模型拟合的模型参数见表 3。通过该模型可以很好地描述 ISR 为 8 和 6 的 3 轮厌氧发酵过程($R^2 > 0.99$)。从第 1 到第 3 轮,最大产甲烷速率 R_{max} 逐步提高,反应停滞期 λ 在逐步缩小,其中第 3 轮 ISR 为 8 和 ISR 为 6 的 R_{max} 分别达到了 145.07 mL/(g·d) 和 139.32 mL/(g·d),而 λ 缩短到 0.27 d 和 0.26 d。模型的参数也体现出 ISR 为 8 和 ISR 为 6 并没有明显差异,而 ISR 为 6 更具有实际应用价值。对于 ISR 为 4 和 ISR 为 2 时,修正 Gompertz 模型只能很好地描述部分厌氧发酵实

验($R^2 > 0.99$),见表3,其中ISR为4的第3轮比第2轮的 R_{max} 进一步提高, λ 进一步缩小,分别达到106.91 mL/(g·d)和0.32 d,表现出与ISR为8和ISR为6时一致的规律。

表3 修正 Gompertz 方程预测的榨汁橙渣厌氧发酵产甲烷动力学参数

Tab.3 Model estimation results of OPR by modified Gompertz models

处理	R^2	$p/$ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	$R_{max}/$ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	λ/d
ISR 为 8, 第 1 轮	0.997	327	44.67	0.60
ISR 为 8, 第 2 轮	0.996	348	90.56	0.49
ISR 为 8, 第 3 轮	0.999	326	145.07	0.27
ISR 为 6, 第 1 轮	0.992	317	36.21	0.47
ISR 为 6, 第 2 轮	0.996	312	85.69	0.45
ISR 为 6, 第 3 轮	0.998	342	139.32	0.26
ISR 为 4(1), 第 3 轮	0.994	157	62.62	0.13
ISR 为 4(2), 第 2 轮	0.991	307	59.51	0.50
ISR 为 4(2), 第 3 轮	0.997	330	106.91	0.32
ISR 为 2, 第 3 轮	0.995	136	60.73	0.11

验证实验以夏橙榨汁渣为发酵原料,接种物经过一轮驯化,厌氧发酵结果见表4。ISR为8和6的甲烷累积产率分别为291.0 mL/g和298.5 mL/g,高于ISR为4和2的269.7 mL/g和208.1 mL/g,且

表4 夏橙榨汁渣厌氧发酵结果

Tab.4 Results of anaerobic digestion of XC

ISR	接种物 质量/g	总底物 质量/g	甲烷累积产率/ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	产气周期/ d
8	18	2	291.0 ± 4.5	7
6	12	2	298.5 ± 9.2	7
4	8	2	269.7 ± 8.0	8
2	4	2	208.1 ± 3.6	30

ISR为8和6的产气周期也较ISR为4和ISR为2时短。这进一步验证了以橙榨汁废渣为原料开展厌氧发酵实验,宜采用ISR为6并将接种物驯化一轮。

3 结论

(1)ISR为8和6条件下,榨汁橙渣厌氧发酵可以正常进行,甲烷累积产率分别达到320.0 mL/g和304.9 mL/g,产气结束后发酵系统中细菌和古菌的群落组成也相似。同时,通过驯化优化微生物群落组成虽然不能提高甲烷累积产率,但可以有效缩短发酵周期,其中,ISR为6条件下第3、2、1轮发酵前4 d产甲烷量占总产量的93.40%、86.72%和38.03%,有效提高了发酵效率。开展榨汁橙渣中抑制成分在厌氧发酵中的代谢规律以及厌氧发酵的预处理优化等相关实验时,推荐选择ISR为6,并进行至少一轮接种物的驯化以避免因接种物数量和来源的差异对实验结果带来干扰。

(2)ISR为4条件下,接种物中微生物数量相对不足,不能充分利用底物,厌氧发酵效率低于ISR为8和6,累积甲烷产率也只有ISR为8和6的75.8%和79.6%。在该ISR下通过驯化接种物来促进厌氧发酵存在偶然性和不确定性,接种物中本身的微生物菌落组成可能会更多地影响驯化的效果和质量。

(3)ISR为2条件下,接种物中微生物数量严重不足,厌氧发酵出现停滞,累积甲烷产率只有ISR为8和ISR为6的34.8%和36.5%,芽孢杆菌纲相对丰度下降到1.88%,*Methanosaeta*和*Methanospirillum*的相对丰度也分别下降到24.45%和1.71%,影响了甲烷的产生,且通过驯化接种物也无法改变微生物群落组成失调的状况。

参 考 文 献

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus fruit-fresh and processed statistical bulletin 2016[R]. Market and Policy Analysis of Raw Materials, Horticulture and Tropical (RAMHOT) Products Team, 2016.
- [2] WILKINS M R, SURYAWATI L, MANESS N O, et al. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(8): 1161 - 1168.
- [3] MARTIN M A, SILES J A, CHICA A F, et al. Biomethanization of orange peel waste[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(23): 8993 - 8999.
- [4] SU H, TAN F, XU Y. Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation[J]. Fuel, 2016, 181: 843 - 851.
- [5] RUIZ B, FLOTATS X. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 109: 9 - 18.
- [6] FAGBOHUNGBE M O, HERBERT B M, HURST L, et al. Impact of biochar on the anaerobic digestion of citrus peel waste [J]. Bioresour Technology, 2016, 216: 142 - 149.
- [7] SANJAYA A P, CAHYANTO M N, MILLATI R. Mesophilic batch anaerobic digestion from fruit fragments[J]. Renewable Energy, 2016, 98: 135 - 141.
- [8] WIKANDARI R, NGUYEN H, MILLATI R, et al. Improvement of biogas production from orange peel waste by leaching of

- limonene[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 494182.
- [9] FORGÁCS G, POURBAFRANI M, NIKLASSON C, et al. Methane production from citrus wastes: process development and cost estimation[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2012, 87(2): 250–255.
- [10] 崔宪, 郭建斌, 徐艳, 等. 秸秆湿贮存过程中添加剂协同调控对甲烷产量的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(9): 302–310.
CUI Xian, GUO Jianbin, XU Yan, et al. Effect of wei-storage additives on fermentation performance and biomethane potential of corn stover[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(9): 302–310. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180935&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2018.09.035. (in Chinese)
- [11] PERLLERA F, GIDARAKOS E. Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methan potential of solid agroindustrial waste[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2016, 4(3): 3217–3229.
- [12] CALABRO P S, PONTONI L, PORQUEDDU I, et al. Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: preliminary batch results[J]. *Waste Management*, 2016, 48: 440–447.
- [13] NEGRO V, RUGGERI B, FINO D. Recovery of energy from orange peels through anaerobic digestion and pyrolysis processes after d-limonene extraction[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2018, 9(8): 1331–1337.
- [14] KAPARAJU P L N, RINTALA J A. Thermophilic anaerobic digestion of industrial orange waste [J]. *Environmental Technology*, 2006, 27(6): 623–633.
- [15] CHOJNACKA A, SZCZESNY P, BLASZCZYK M K, et al. Noteworthy facts about a methane-producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128008.
- [16] LIU T, SUN L, MULLER B, et al. Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates[J]. *Bioresour Technology*, 2017, 245: 768–777.
- [17] LI T, MAZEAS L, SGHIR A, et al. Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 889–904.
- [18] SIEBER J R, MCINERNEY M J, GUNSALUS R P. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation[J]. *Annual Review Microbiology*, 2012, 66: 429–452.
- [19] WIRTH R, KOVÁCS E, MARÓTI G, et al. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 41.
- [20] 方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(1): 1–9.
FANG Xiaoyu, LI Jiabao, RUI Junpeng, et al. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(1): 1–9. (in Chinese)
- [21] DEMIREL B, SCHERER P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2008, 7(2): 173–190.
- [22] 承磊, 郑珍珍, 王聪, 等. 产甲烷古菌研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1143–1164.
CHENG Lei, ZHENG Zhenzhen, WANG Cong, et al. Recent advances in methanogens[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1143–1164. (in Chinese)