常享琳,李治波,谢 娟,等.外源复合酶对纤维素类生物质共消化系统的效能强化研究 [J]. 中国环境科学, 2025,45(8):4423-4433.
Chang X L, Li Z B, Xie J, et al. Research on the efficiency enhancement of an exogenous compound enzyme for the co-digestion system with lignocellulosic biomass [J]. China Environmental Science, 2025,45(8):4423-4433.

外源复合酶对纤维素类生物质共消化系统的效能强化研究

常享琳[1],李治波[1],谢 娟[1],曹思凡[1],李令虎[1],李玉友[2],王晓昌[1],陈 荣[1],邢保山[1,2*] (1.西安建筑科技大学环境与市政工程学院,陕西 西安 710055；2.日本东北大学土木与环境工程系,日本 仙台 980-8579)

摘要：为探究外源复合酶对厌氧共消化系统产甲烷效能的强化策略,采用玉米秸秆和餐厨垃圾为混合基质,通过批次试验和响应面法优化了外源复合酶的组合及浓度;木质素单因子试验筛选了复合酶组分和浓度范围;通过响应曲面法设计了 20 组以漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶浓度为变量的试验,并以产甲烷促进率作为优化目标,根据试验数据成功建立了模型并进行了方差分析,结果表明响应面分析确定漆酶(1.5~4.0U/mL)、木聚糖酶(12~20U/mL)和内切-β-1,4-葡聚糖酶(50~85U/mL)的范围内可到达高产甲烷促进率的酶组合作为合适的复合酶组分.连续流试验验证复合酶的效能表明:投加复合酶促进了水解酶和乙酸型产甲烷菌的增殖,释放更高活性的木质素、纤维素酶和厌氧消化酶,进而促使厌氧共消化系统的甲烷产率提高19.5%.

关键词：玉米秸秆；餐厨垃圾；复合酶；产甲烷；厌氧共消化
中图分类号：X705 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)08-4423-11

Research on the efficiency enhancement of an exogenous compound enzyme for the co-digestion system with lignocellulosic biomass.

CHANG Xiang-lin[1], LI Zhi-bo[1], XIE Juan[1], CAO Si-fan[1], LI Ling-hu[1], LI Yu-you[2], WANG Xiao-chang[1], CHEN Rong[1], XING Bao-shan[1,2*] (1.School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China；2.Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University, Sendai 980-8579, Japan). *China Environmental Science*, 2025,45(8)：4423~4433

Abstract：To explore the enhancement strategies for the methane production efficiency of anaerobic co-digestion systems by exogenous compound enzymes, corn stover and food waste were adopted as the mixed substrates. Subsequently, the combination and concentration of exogenous compound enzymes were optimized through batch experiments and the response surface methodology. In the single-factor experiment on lignin, the component and concentration range of the compound enzymes were screened. Moreover, 20groups of experiments with the concentrations of laccase, endo-β-1,4-glucanase and xylanase as variables were designed by means of the response surface methodology, and with the methane production promotion rate as the optimization objective. Based on the experimental data, a model was successfully established and variance analysis was carried out. The results showed that response surface analysis identified enzyme combinations within the ranges of laccase (1.5~4.0U/mL), xylanase (12~20U/mL) and endo-β-1,4-glucanase (50~85U/mL), which could achieve a high methane production promotion rate, was finally determined as the appropriate component of the compound enzyme. The continuous flow test validated the efficacy of the composite enzyme, indicating that the addition of the compound enzyme promoted the proliferation of hydrolases and aceticlastic methanogens, released lignin, cellulase and anaerobic digestion enzymes with higher activities, and thus increased the methane production rate of the anaerobic co-digestion system by 19.5%.

Key words：corn straw；food waste；compound enzyme；methane production；anaerobic co-digestion

在有机废物管理领域,木质纤维素类生物质是最丰富的可再生资源,但由于其结构复杂,水解成为其资源化过程中主要的限速步骤[1-2].木质纤维素类生物质通过厌氧共消化产甲烷的过程一般与反刍动物对饲料的降解利用过程相似[3].由于餐厨垃圾的易酸化特性,将玉米秸秆和餐厨垃圾混合共消化效能优于单独消化,二者混合共消化产甲烷亦受到国内外学者的关注[4-5].

通常,市场上可用的酶制剂常被用作促进动物饲料消化和提高木质纤维素生物质水解潜力的添加剂[6].酶强化降解纤维素生物质的研究主要集中在物理、化学或复合预处理后的酶解过程,且多关注

收稿日期：2024-12-20
基金项目：国家自然科学基金资助项目(52100162);日本学术振兴会海外特别研究员项目(P24088)
* 责任作者, 副教授, baoshanxing@xauat.edu.cn

于发酵生产生物燃料.将纤维素酶应用于以秸秆为原料的厌氧消化系统中可以提升甲烷产率[7].在厌氧共消化系统中直接添加酶可减少后续的成本投入,使其成为经济可行的设计.然而,有研究结果却发现漆酶(2U/g 底物)和过氧化物酶(1.5U/g 底物)预处理小麦秸秆 6h 后,厌氧共消化过程仍受阻,甚至出现产甲烷潜力降低 10%的负作用[8].为了探究最适合玉米秸秆和餐厨垃圾厌氧共消化的复合酶组合,在使用酶制剂时需要针对不同的种类组合及用量,并进行系统的组合优化以得到最合适的外源复合酶.然而,目前有关外源复合酶对厌氧共消化系统产甲烷效能强化的最适组合优化及其强化效能验证仍鲜见报道.

因此,本文首先拟通过批次试验探究不同商用酶制剂单一投加不同剂量时对厌氧共消化系统甲烷产率的促进效果,筛选具有显著促进效果的酶试剂种类;然后,通过响应面法优化分析得到最适促进消化系统甲烷产率的外源复合酶组合,建立参数模型的同时进行模型验证.在此基础上,选择最优外源复合酶投至玉米秸秆和餐厨垃圾连续流中温厌氧动态膜共消化系统中,进一步验证响应面优化所得外源复合酶组合对共消化系统的强化效能,为其工程化应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 基质和接种污泥

基质由玉米秸秆和餐厨垃圾以 3g VS/g VS 的比例混合而成(预试验优化值),基质总固体浓度(TS)控制在 9%左右.餐厨垃圾在试验室现配现用,采用已有研究的配方模拟实际餐厨垃圾的组分[9].玉米秸秆来自河南农村,自然风干后经高速粉碎机研磨待用.厌氧消化系统的接种污泥取自西安市某污水处理厂中温厌氧反应器[10].本研究中使用的基质和接种污泥的理化特性见表 1.其中,玉米秸秆的 TS 和 VS 分别为(92.70±0.17)和(86.20±0.11g/L).

1.2 试验设计

1.2.1 单因子批次试验 利用收集的玉米秸秆和餐厨垃圾共消化污泥进行木质纤维素酶单因子批次试验,试验设置如表 2 所示.根据仿瘤胃厌氧发酵过程中瘤胃高效降解纤维素类生物质过程中起关键作用的酶种类[11],本研究主要选用以下 4 种酶试剂:纤维素酶(纤维素酶菌株深层发酵酶制剂),相应的纤维素酶活为 20000U/g;漆酶(白腐菌),白色粉末,漆酶酶活为 2000U/g;内切-β-1,4-葡聚糖酶(绿色木霉),白色粉末,相应的酶活为 50000U/g;木聚糖酶(木霉),白色粉末,酶活为 50000U/g.根据酶制剂的酶活性,将漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶配置为不同剂量的浓缩液,相应的酶剂量依次为 80,800,800,2000U/mL.

表 1 接种污泥、餐厨垃圾、玉米秸秆及其混合基质的理化特性

Table 1 Physicochemical properties of inoculum, food waste and mixed substrate

参数	接种污泥	餐厨垃圾	混合基质
TS (g/L)	35.40±0.65	83.20±0.05	83.30±6.00
VS (g/L)	28.60±0.59	81.20±0.68	77.70±5.60
总化学需氧量(TCOD,g/L)	45.20±3.90	204.60±4.50	113.20±1.20
溶解性化学需氧量 (SCOD, g/L)	1.97±0.23	84.70±1.30	14.70±3.40
pH 值	7.75±0.02	4.36±0.01	4.06±0.25
蛋白质(g/L)	1.95±0.44	2.98±0.02	2.72±0.88
多糖(g/L)	0.27±0.02	81.50±1.20	12.20±0.41
氨氮(mg/L)	63.20±0.05	305.60±1.41	537.00±3.00
碱度(g $CaCO_3$/L)	3.50±0.78	n.d.	n.d.
乙酸(mg/L)	6.40±2.90	1875.60±74.18	884.70
丙酸(mg/L)	135.10±7.64	n.d.	13.00
丁酸(mg/L)	n.d.	n.d.	83.30±6.00
戊酸(mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.
C (%)		47.80±0.53	44.70
H (%)		4.72±0.13	5.10
O (%)		27.30±1.18	35.60
N (%)		5.71±0.05	1.97
S (%)		0.87±0.04	0.62

注:n.d.表示低于检出限;"/"表示未测定.

为了探究在混合基质中投加酶对共消化污泥甲烷产率的促进作用,每种酶设置 5 种浓度梯度(表 2).其中,漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶浓度范围依次设置为 0.5~5、5~50、5~50 和 10~125U/mL.同时,为去除外源酶在厌氧消化过程自身降解转换产甲烷的背景值,采用仅有接种污泥存在时加入上述相同酶浓度,探究不同酶剂量对甲烷产率的影响.此外,平行设置两组空白,一组为仅有接种污泥,另一组添加接种污泥和基质,分别作为两种探究条件下的背景值.批次试验在血清瓶中进行,置于 39℃摇床内晃动 2~3min 后,用针管插入橡胶塞放气以排除受热膨胀的气体,然后定时测定生

物气组分和生物气产量.

表 2　批次试验的运行设置

Table 2　Operating characteristics of the batch experiments

试验设置		酶浓度 (U/mL)	接种物 (mL)	基质 (mL)	酶浓缩液 (mL)	水(mL)
空白组		/	30.0	/	/	9.70
		/		7.20	/	2.50
漆酶	酶+基质	0.50		7.20	0.25	2.30
		1.00			0.50	2.00
		1.50			0.75	1.75
		2.00			1.00	1.50
		5.00			2.50	/
	酶	0.50		/	0.25	9.45
		1.00			0.50	9.20
		1.50			0.75	8.95
		2.00			1.00	8.70
		5.00			2.50	7.20
内切-β-1,4-葡聚糖酶或木聚糖酶	酶+基质	5.00		7.20	0.25	2.25
		10.0			0.50	2.00
		20.0			0.75	1.75
		25.0			1.00	1.50
		50.0			2.50	/
	酶	5.00		/	0.25	9.45
		10.0			0.50	9.20
		20.0			0.75	8.95
		25.0			1.00	8.70
		50.0			2.50	7.20
纤维素酶	酶+基质	10.0		7.20	0.20	2.30
		20.0			0.40	2.10
		25.0			0.50	2.00
		75.0			1.50	1.00
		125			2.50	/
	酶	10.0		/	0.25	9.45
		20.0			0.50	9.20
		25.0			0.75	8.95
		75.0			1.00	8.70
		125			2.50	7.20

1.2.2　响应面批次优化试验　在单因子批次试验基础上,选择显著影响目标响应值的 3 个影响因素设计响应面试验,即以漆酶活性(A)、内切-β-1,4-葡聚糖酶活性(B)和木聚糖酶活性(C)为影响因素,以产甲烷促进率为优化目标值,建立二次多项式回归模型.采用中心复合设计(CCD)对三因素和五水平进行响应面批次优化试验,利用 Design Export 依次进行响应面批次优化外源复合酶组成(表 3).

1.3　外源复合酶强化连续流厌氧共消化系统产甲烷的效能验证

表 3　响应面优化试验条件及其响应值

Table 3　Experimental conditions and response values for response surface optimization

序号	漆酶 (A,U/mL)	内切-β-1,4-葡聚糖酶(B,U/mL)	木聚糖酶 (C,U/mL)	产甲烷促进率(%)
1	4.13	41.3	41.3	16.3
2	4.13	80.0	41.3	13.3
3	4.13	41.3	41.3	26.3
4	1.82	64.3	18.2	17.6
5	4.13	2.50	41.3	21.7
6	4.13	41.3	2.50	20.4
7	0.250	41.3	41.3	12.7
8	6.43	64.3	64.3	−135
9	6.43	18.2	18.2	20.5
10	1.82	64.3	64.3	20.9
11	4.13	41.3	80.0	2.69
12	4.13	41.3	41.3	7.09
13	4.13	41.3	41.3	14.4
14	4.13	41.3	41.3	10.7
15	6.43	18.2	64.3	11.0
16	4.13	41.3	41.3	5.41
17	6.43	64.3	18.2	10.8
18	1.82	18.2	18.2	14.9
19	8.00	41.3	41.3	−125
20	1.82	18.2	64.3	6.56

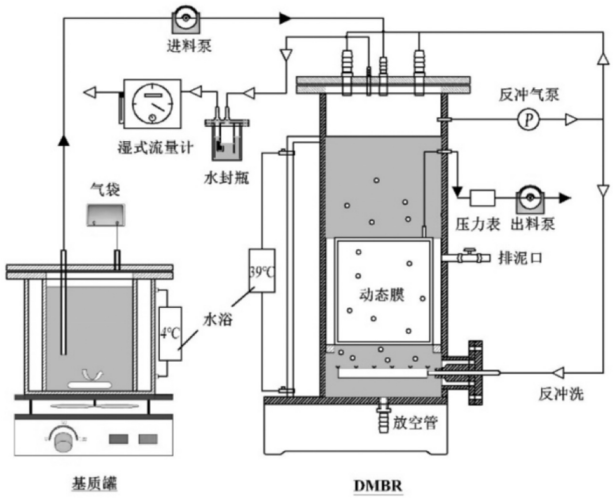


图 1　共消化系统的试验装置

Fig.1　Configuration co-digestion system used in this study

以相同混合基质连续运行的厌氧动态膜生物反应器(DMBR)装置如图 1 所示,操作过程分为无外源复合酶添加和外源复合酶添加阶段.为了使用稳定的厌氧消化作为背景对照,从第 1~100d,DMBR 的水力停留时间为 8.33d,系统有机负荷(OLR)为

10.86±0.49g VS/L/d.为了研究外源复合酶对共消化系统的促进效能,第 101d 投加最佳组合的外源复合酶运行 53d,同时保持其余条件不变.从连接到反应器顶部的沼气袋中收集气体样本,而滤液和污泥分别从 DM 出口和污泥出口收集.然后,在添加和不添加外源复合酶阶段连续监测系统沼气产量、pH 值、挥发性脂肪酸(VFA)、碱度、总化学需氧量(TCOD)和氨氮以比较 DMBR 共消化系统外源复合酶投加前后产甲烷的效能变化.为了比较外源复合酶对纤维素类生物质的降解效果及其对共消化污泥特性的影响,在外源复合酶添加前后准确定量木质纤维素、木质纤维素酶活性、厌氧消化酶活性和比产甲烷活性(SMA).同时,对外源复合酶投加前后系统中厌氧消化酶活性和微生物群落进行对比解析,进一步解析系统效能变化的微生物学原因.

1.4 测试方法

TS、VS、碱度、COD 和氨氮采用标准方法进行测定[12].pH 值采用便携式 pH 计(Horiba)进行测定.产气量、生物气组分(甲烷和二氧化碳)和 VFA 参照文献[13]进行测定.其中,乙酸、丙酸、丁酸和戊酸对应等量 COD 的转化系数分别为 1.07、1.51、1.82 和 2.04[14].批次试验过程中,采用一级动力学模型对试验数据进行模拟[15],去除背景值的试验数据采用修正的 Gompertz 模型对甲烷产量进行拟合[16],确定最大产甲烷速率和迟滞期.DMBR 中厌氧消化酶和木质纤维素酶活性数据均采用对应种类的上海酶联酶活试剂盒及分光光度法测定.

2 结果与讨论

2.1 木质纤维素酶单因子批次试验

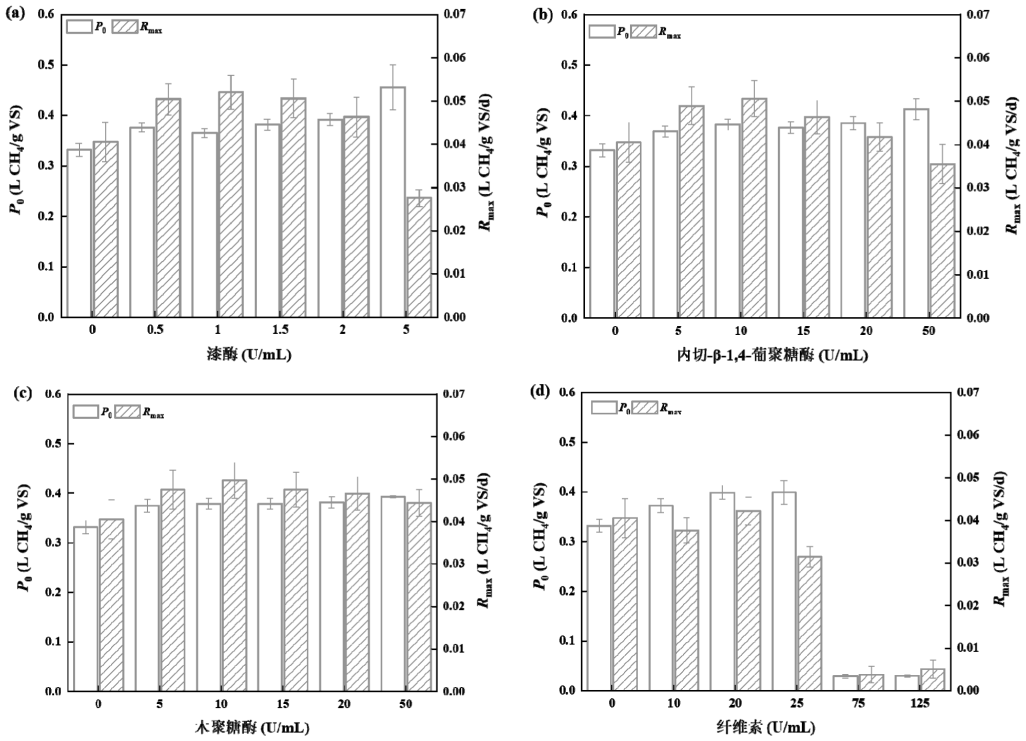


图 2 玉米秸秆和餐厨垃圾厌氧共消化系统投加不同剂量木质纤维素分解酶和基质(S/I=0.30g VS/g VS)相应的产甲烷潜力(P_0)和最大产甲烷速率(R_{max})变化

Fig.2 Changes of methane production potential (P_0) and maximum methane production rate (R_{max}) with added of different lignocellulose degrading enzyme doses and mixed substrate with S/I of 0.30g VS/g VS in the anaerobic co-digestion system of corn straw and food waste

通过 Gompertz 模型拟合累积甲烷产量得到不同浓度的漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶对产甲烷潜力(P_0)和最大产甲烷速率(R_{max})的影响,结果如图 2 所示.其中,漆酶是一种木质素降解酶,可以分解木质素聚合物结构[17].如图 2(a)所示,随着漆酶浓度从 0.5U/mL 增至 5U/mL,P_0 逐渐升高.

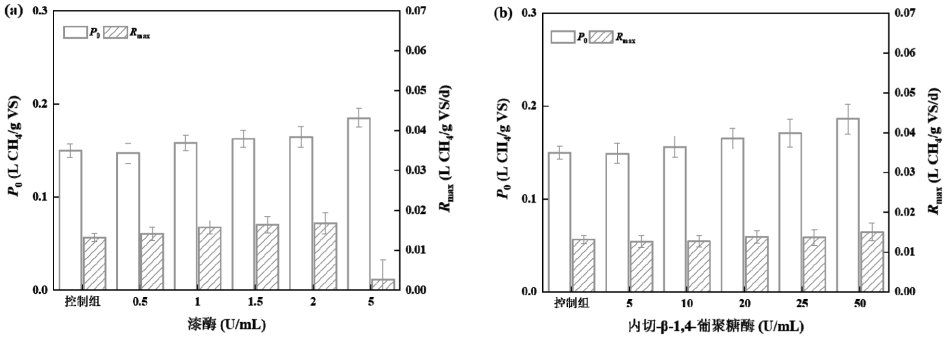
然而,漆酶浓度为0.5~1.5U/mL时R_{max}高于漆酶浓度为 5U/mL 的相应值,表明漆酶浓度高于 5U/mL 时,底物利用过程可能受阻.内切-β-1,4-葡聚糖酶是一种能分解葡萄糖聚合物的 β-糖苷键生成葡萄糖和麦芽糖的生物发酵酶[18].木聚糖酶主要针对玉米秸秆中半纤维素成分进行分解转化[19].与漆酶对共消化污泥产甲烷产效能的影响类似,当内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶浓度均为 5~50U/mL 时,内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶的P_0和R_{max}变化趋势相同,均呈现先升高后降低的趋势(图 2b-c).其中,当内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶浓度均为 10U/mL 时,内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶的P_0和R_{max}均取得最高值.如图 2(d)所示,与以上 3 种木质纤维酶不同的是,能够直接水解纤维素转化成葡萄糖的纤维素酶并未发挥明显的促进作用[20].当纤维素酶浓度为10U/mL时,纤维素酶在玉米秸秆和餐厨垃圾共消化系统中并未促进甲烷产量.相反,随着纤维素酶浓度逐渐增至 75~125U/mL,P_0和 R_{max}均大幅下降,其原因可能是由于酶抑制或纤维素酶降解纤维素的速率缓慢所致[21].

为消除酶作为厌氧消化底物的影响,不添加混合基质,使用相同的接种物和木质纤维素酶剂量进行同步批次试验.结果表明,4 种酶的浓度均与P_0和R_{max}值呈线性正相关(图 3).未添加底物的纤维素酶组的P_0和R_{max}值甚至高于添加底物的纤维素酶组.由图 2(d)和图 3 对比可知:纤维素酶对P_0和R_{max}的影响差异较大,可能是由于接种物中纤维素残留物仅含有少量木质素和半纤维素,使得纤维素酶能够直接降解暴露的纤维素.分析可知:木质素和半纤维素阻碍了纤维素酶与木质纤维素类生物质中纤维素的直接接触,进而降低了纤维素酶对共消化系统中甲烷产量的促进效率.此外,批次试验中 pH 和操作温度(39±1°C)并不在纤维素酶的适宜范围(45~65℃)[22],在一定程度上也限制了纤维素酶的降解效能.因此,纤维素酶不适合直接添加以玉米秸秆和餐厨垃圾为基质的中温厌氧共消化系统中进行酶强化,但可增强该系统沼渣厌氧后消化的产甲烷效能.因此,最终选择确定漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶三种木质纤维素水解酶作为外源复合酶的主要组成来源,以促进玉米秸秆和餐厨垃圾中温厌氧共消化系统中纤维素类生物质的降解转化.

2.2　响应面法优化外源复合酶组成

根据木质纤维素酶单因素试验结果,选取漆酶(1.82~6.43U/mL)、内切-β-1,4-葡聚糖酶(18.21~64.92U/mL)和木聚糖酶(18.21~64.92U/mL)作为外源复合酶的组成优化因素和范围.建模过程中试验条件设置及其响应值见表 3.采用方差分析(ANOVA)对产甲烷促进率的简化二次模型进行统计检验,结果如表 4 所示.在 95%置信水平下,P<0.05 时,模型具有显著性,较高的回归系数(0.9891)表明回归模型对试验数据的准确模拟[23].F 和 P 的检验结果表明[24],A 因素是显著的模型项(P<0.05),三因素对产甲烷促进率的影响大小顺序依次为:A(漆酶)>C(木聚糖酶)>B(内切-β-1,4-葡聚糖酶).同时,三因素的交互作用对产甲烷促进率的影响均显著(P<0.01).如图 4 所示,产甲烷促进率的试验值与模拟值收敛性良好.此外,95%置信度下的回归系数为 0.9891,表明回归模型能够准确反映试验数据;同时,失拟项 P 为 0.2002(表 4),表明失拟项不显著,所建模型拟合度好[24].将模型中编码值的模型方程与产甲烷促进率的试验结果拟合,结果如方程式 1 所示.

$$Y = 13.16-28.05A-11.17B-13.89C-21.56AB-18.76AC-15.55BC-23.19A^2+2.79B^2+0.6710C^2 \quad (1)$$



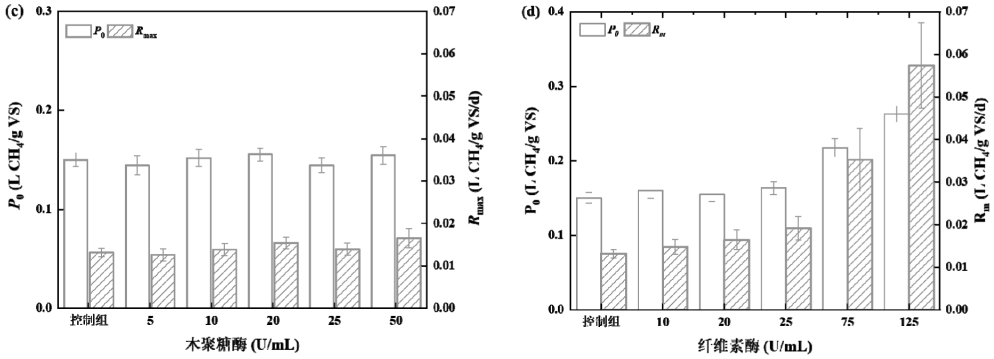


图 3 投加不同剂量木质纤维素分解酶至厌氧共消化污泥中无基质时对应的 P_0 和 R_{max} 变化

Fig.3 Changes of P_0 and R_{max} of added different lignocellulose degrading enzyme doses to anaerobic co-digestion without feeding substrate

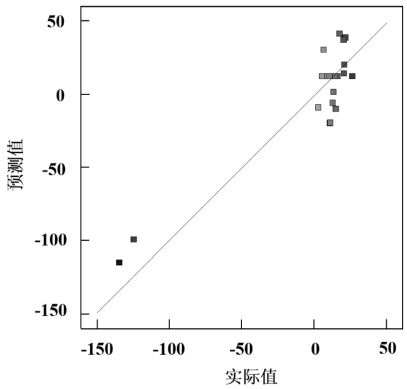


图 4 产甲烷促进率的实际值与预测值

Fig.4 Actual vs. predicted values of the methane yield

如图 5 所示,AB 与 AC 响应曲面最陡,表明漆酶与内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶的交互作用对产甲烷促进率的影响最大[25].等高线的形状则反映因素间交互作用的显著程度,漆酶和内切-β-1,4-葡聚糖酶的等高线二维图近似椭圆,说明二者交互作用显著[26].如图 5(b),当内切-β-1,4-葡聚糖酶浓度设定在中间值 41.25U/mL 时,产甲烷促进率随漆酶浓度的降低而增加,与漆酶单因素试验中 R_{max} 变化一致(图 2(a)).同样,当木聚糖酶浓度设定为中间值时,甲烷产量仍随漆酶浓度降低而增加(图 5(c), (d)).分析结果可知:0.5~4.0U/mL 的漆酶是提高玉米秸秆和餐厨垃圾中温共消化甲烷产率的最适剂量范围.如图 5(e, f)所示,当漆酶浓度为 41.25U/mL,木聚糖酶低于 25U/mL、内切-β-1,4-葡聚糖酶大于 53U/mL 时,相应的产甲烷促进率超过 20%.为进一步缩小优化范围,通过叠加各种响应曲面的等值线而生成的叠加图如图 6 所示.其中,叠加图的黄色阴影部分定义了图形优化,提供了因变量的允许值;根据以下关键响应确定相应的最佳区域,即产甲烷促进率超过 25%,一次为目标筛选得到漆酶(1.5-4.0U/mL)、木聚糖酶(12-20U/mL)和内切-β-1,4-葡聚糖酶(50-85U/mL)的酶组合范围可达到高产甲烷促进率.相应的,选取漆酶(1.84U/mL)、木聚糖酶(18.67U/mL)和内切-β-1,4-葡聚糖酶(64U/mL)投至玉米秸秆和餐厨垃圾的中温厌氧共消化系统(详见 2.3 部分),可取得最大产甲烷理论促进率(26.13%).

表 4 响应面回归模型方差分析结果

Table 4 ANOVA for response surface quadratic polynomial models

来源	平方和	自由度	均方	F	P	
回归模型	4.131×10^5	13	31773.98	41.95	< 0.0001	显著
A-A	1.038×10^5	1	1.038E+05	137.06	< 0.0001	
B-B	388.37	1	388.37	0.5127	0.5009	
C-C	1716.98	1	1716.98	2.27	0.1829	
AB	40939.48	1	40939.48	54.05	0.0003	
AC	30984.32	1	30984.32	40.91	0.0007	
BC	21289.13	1	21289.13	28.11	0.0018	
A^2	85304.71	1	85304.71	112.62	< 0.0001	
B^2	1236.50	1	1236.50	1.63	0.2486	
C^2	71.37	1	71.37	0.0942	0.7692	
ABC	29957.40	1	29957.40	39.55	0.0008	
A^2B	7999.45	1	7999.45	10.56	0.0175	
A^2C	7938.16	1	7938.16	10.48	0.0177	
AB^2	17345.80	1	17345.80	22.90	0.0030	
残差	4544.76	6	757.46			
失拟	1377.94	1	1377.94	2.18	0.2002	不显著
纯误差	3166.82	5	633.36			
总离差	4.176E+05	19				

注: P<0.05,差异显著; P>0.05,差异不显著. (R^2 = 0.9891, R_{adj}^2 = 0.9655, 信噪比= 23.4095, 标准差=27.52, C.V.% = 8.32).

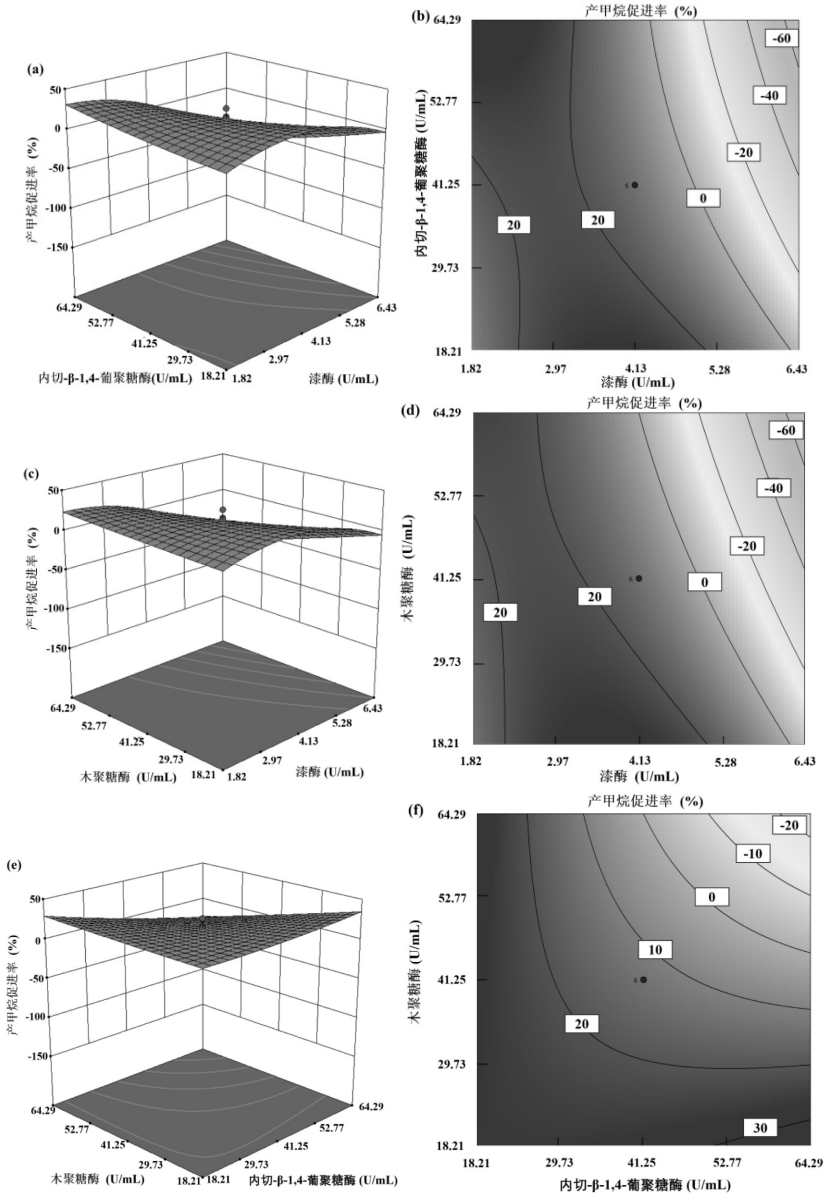


图 5　三维响应面图(a、c 和 e)和二维等值线图(b、d 和 f)相对于不同试验因子的响应变量(甲烷产量)

Fig.5　Three−dimensional (a, c, and e) and contour plots (b, d, and f) for the response variable (methane yield) with respect to different experimental factors

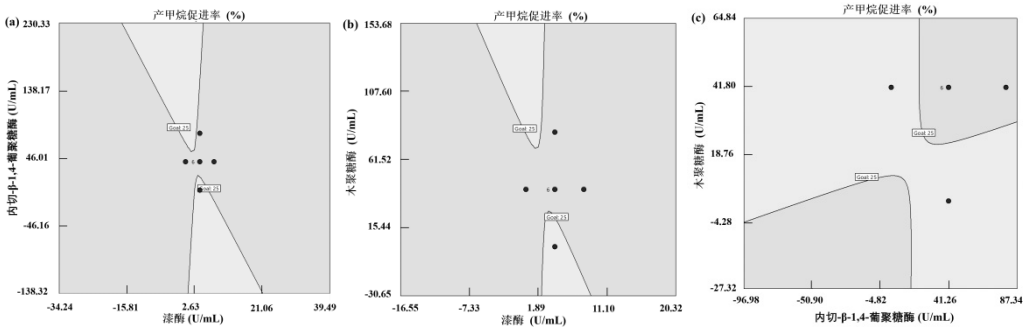


图 6　最佳区域的叠加图

Fig.6　Overlay plot for the optimal region

a.内切−β−1,4−葡聚糖酶和漆酶的变化,木聚糖酶为 41.25U/mL; b.木聚糖酶和漆酶的变化,内切−β−1,4−葡聚糖酶为 41.25U/mL; c.内切−β−1,4−葡聚糖酶和木聚糖酶的变化,漆酶为 4.13U/mL

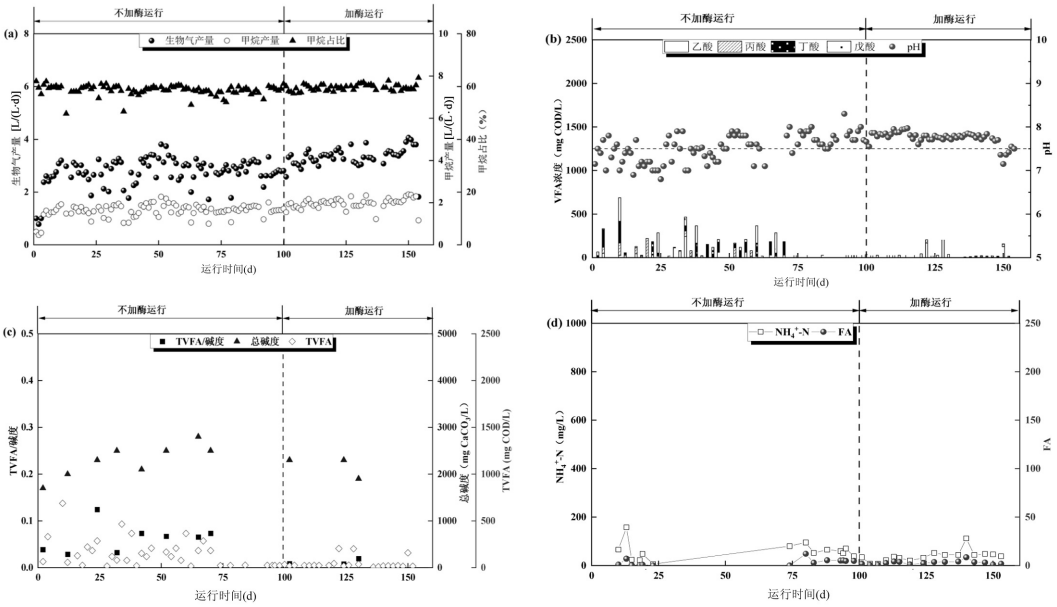


图 7 外源复合酶添加前后连续流 DMBR 共消化系统产甲烷的效能

Fig.7 The efficiency of continuous flow DMBR co digestion system for methane production before and after the addition of exogenous complex enzymes

2.3 外源复合酶强化连续流厌氧共消化系统产甲烷的效能

2.3.1 生物气产量、VFA 和氨氮 如图 7a 所示,在没有添加外源复合酶的初始阶段(第 1~100d),系统的甲烷产量和甲烷产率分别为(1.69±0.12L/L/d)和(166.49±11.79mL/g VS).第 101d 投加外源复合酶后,系统的甲烷产量和甲烷产率逐渐增加,分别达到(2.02±0.17L/L/d)和(186.80±19.87mL/g VS),相比没有投加酶的初始阶段(第 1~100d)分别提高 16.8%和 19.5%.由于实际连续流工况波动,使得外源复合酶的促进效能略低于响应面优化的理论最佳结果(26.13%),表明外源复合酶的添加可以显著强化提升玉米秸秆和餐厨垃圾连续中温 DMBR 共消化系统的产甲烷效能.同时,外源复合酶的添加使得 DMBR 拥有更稳定的 pH 值(7.5~8.0),TVFA 也基本稳定在 5.86−37.2mg COD/L,氨氮和游离氨浓度分别低于 1000mg/L 和 250mg NH_3/L(图 7b−d).这些结果表明:外源复合酶的添加不仅强化了共消化系统的产甲烷效能,同时使产甲烷系统的运行更稳定.

2.3.2 厌氧消化酶和木质纤维素酶活性、木质素去除率和产甲烷活性 连续流 DMBR 共消化系统中外源复合酶投加前后,如表 5 所示,在玉米秸秆和餐厨垃圾连续进料的 DMBR 中添加复合酶后,包括漆酶和木质素过氧化物酶的典型木质素酶活性分别提高 42%和 50%,羟甲基纤维素酶活性由 2.13×10^5U/L 增至 5.46×10^5U/L.然而,内切葡聚糖酶和木聚糖酶活性略有降低.整体而言,外源复合酶添加强化后 DMBR 系统中木质素降解酶活性和纤维素降解酶活性均增强,使得木质素的解聚和纤维素的水解效率增加(表 6),取得了更高的木质素降解率(28.16%)和纤维素的降解率(69.66%).其中,本研究运行的 DMBR 所得木质素去除率(28.16%)高于已有研究中使用单一外源酶强化后取得的木质素去除率(4.9%~8.7%)[27].

外源复合酶的投加强化了纤维素类生物质水解效率的提高,进而促进了厌氧消化酶活性总体呈上升趋势,与 DMBR 的产甲烷效能提升一致(图 7 和表 5).水解酶活性的增加可将大分子化合物水解成易降解物质,从而提高难降解纤维素类生物质的水解速率.辅酶 F_{420} 是产甲烷过程的关键酶,其活性增加 2.19 倍(表 5),与酶添加操作期间较高的甲烷产量和 SMA 显著相关(表 6).其中,添加酶后共消化污泥的辅酶 F_{420} 为 1673.5U/L(0.35 μmol/g VS),在厌氧消化系统中辅酶 F_{420} 研究范围内(0.006~0.49 μmol/g VS)处于较高水平[28].此外,乙酸、丙酸、戊酸和 H_2/CO_2 的 SMA 分别是投加复合酶前的 1.24 倍、1.82 倍、1.61 倍和 1.05 倍(表 6).外源复合酶的投加并未促进丁酸降解产甲烷活性,但共消化污泥对其他

VFA 的利用率显著提高,尤其是乙酸和丙酸,与乙酸、丙酸在复合酶投加阶段较少积累一致(图 7a).因此,添加外源复合酶提高共消化污泥对木质纤维素水解效能的同时促进共消化污泥的产甲烷活性.

表 5　外源复合酶投加前后 DMBR 中厌氧消化酶和木质纤维素酶活性

Table 5　Anaerobic digestive enzyme and lignocellulolytic enzymes' activities in the DMBR system before and after the exogenous compound enzyme addition

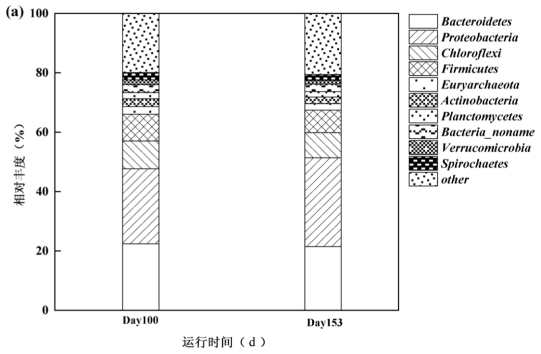
污泥样品			加酶前(Day 35)	加酶后(Day 123)
厌氧消化酶 (U/L)	水解	α-葡萄糖苷酶	39.7±3.0	36.4±3.1
		蛋白酶	741.4±26.0	905.4±33.0
	产酸	乙酸激酶	64.7±10.1	187.8±5.6
		丁酸激酶	156.1±4.6	260.0±3.5
		乙酰辅酶 A	91.5±2.4	127.0±2.1
	产甲烷	辅酶 F_{420}	791.5±75.1	1673.5±97.1
木质纤维素酶 (U/L)	木质素	木质素过氧化物酶	42.7±1.3	86.4±1.0
		漆酶	174.0±13.7	291.8±11.1
	纤维素	内切葡聚糖酶	$(1.91\pm0.16)\times10^5$	$(1.69\pm0.17)\times10^5$
		羧甲基纤维素酶	$(2.13\pm0.03)\times10^5$	$(5.46\pm0.03)\times10^5$
	半纤维素	木聚糖酶	109.4±3.7	100.2±3.8

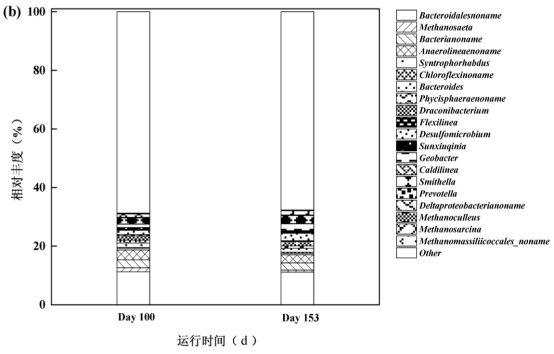
2.3.3　微生物菌群结构变化　如图 8(a),添加外源复合酶前后连续流 DMBR 共消化系统中微生物群落的变化主要体现在 *Proteobacteria* 门相对丰度提高,与木质素去除率提高一致,表明复合酶的投加增强了共消化系统对纤维素类生物质的降解能力.在细菌属水平上,*Bacteroidalesnoname* 属作为主要优势属的相对丰度明显上升(图 8(b)),表明投加复合酶可以增强微生物的水解能力.此外,*Smithella* 菌属的相对丰度增加,有助于 DMBR 系统避免丙酸累积实现稳定运行.此外,添加外源复合酶后,氢营养型 *Methanomassiliicoccales_noname* 和 *Methanoculleus* 的相对丰度趋于增加,但可利用乙酸的 *Methanosarcina* 仍然是最主要的产甲烷菌,与 SMA 试验中较高的乙酸产甲烷活性一致.如图 8(c),通过进一步分析功能基因可以发现与 TCA 代谢、丙酮酸代谢相关的 *M00009*、*M00307* 等基因的丰度在酶强化阶段得到提高.另一方面,通过 KEGG 数据库分析酶强化前后代谢途径中的 ko 基因丰度变化,发现以丙酮酸为中心的糖水解、酸化代谢及氢营养型代谢均得到强化(图 8(d)),与 *Bacteroidalesnoname*、*Smithella*、*Methanoculleus* 等菌属的变化趋势一致.*Proteobacteria* 是加酶后主要富集的微生物门类,而属水平上富集的菌属主要有 *Smithella*、*Deltaproteobacterianoname*、*Desulfomicrobium* 和 *Geobacter*,分别与葡萄糖、丙酸和丁酸的利用转化有关[29],这些功能菌属的富集强化了共消化系统的水解酸化能力.综上可知,添加外源复合酶可使具有 VFA 利用转化的功能微生物菌群更具优势,并促进乙酸产甲烷菌更具优势,进而获得更高的共消化系统产甲烷效能和系统稳定性.

表 6　连续流运行模式下基质和污泥纤维素、半纤维素、木质素去除率、TS 浓度和比产甲烷活性(SMA)

Table 6　Removal rate of cellulose, hemicellulose, lignin, and TS of substrate and sludge in the continuous operation mode.

污泥样品		加酶前(Day 35)	加酶后(Day 123)
基质浓度(g/L)	纤维素	19.46	20.20
	半纤维素	12.39	13.30
	木质素	16.27	18.20
TS(g/L)	基质	84.61	94.36
	污泥	70.97	67.24
去除率(%)	纤维素	53.32	69.66
	半纤维素	41.87	57.09
	木质素	15.82	28.16
SMA (g CH_4−COD/g VS/d)	乙酸	0.188±0.016	0.233±0.022
	丙酸	0.033±0.001	0.060±0.002
	丁酸	0.109±0.005	0.081±0.005
	戊酸	0.035±0.001	0.056±0.011
	H_2/CO_2	0.050±0.004	0.053±0.004





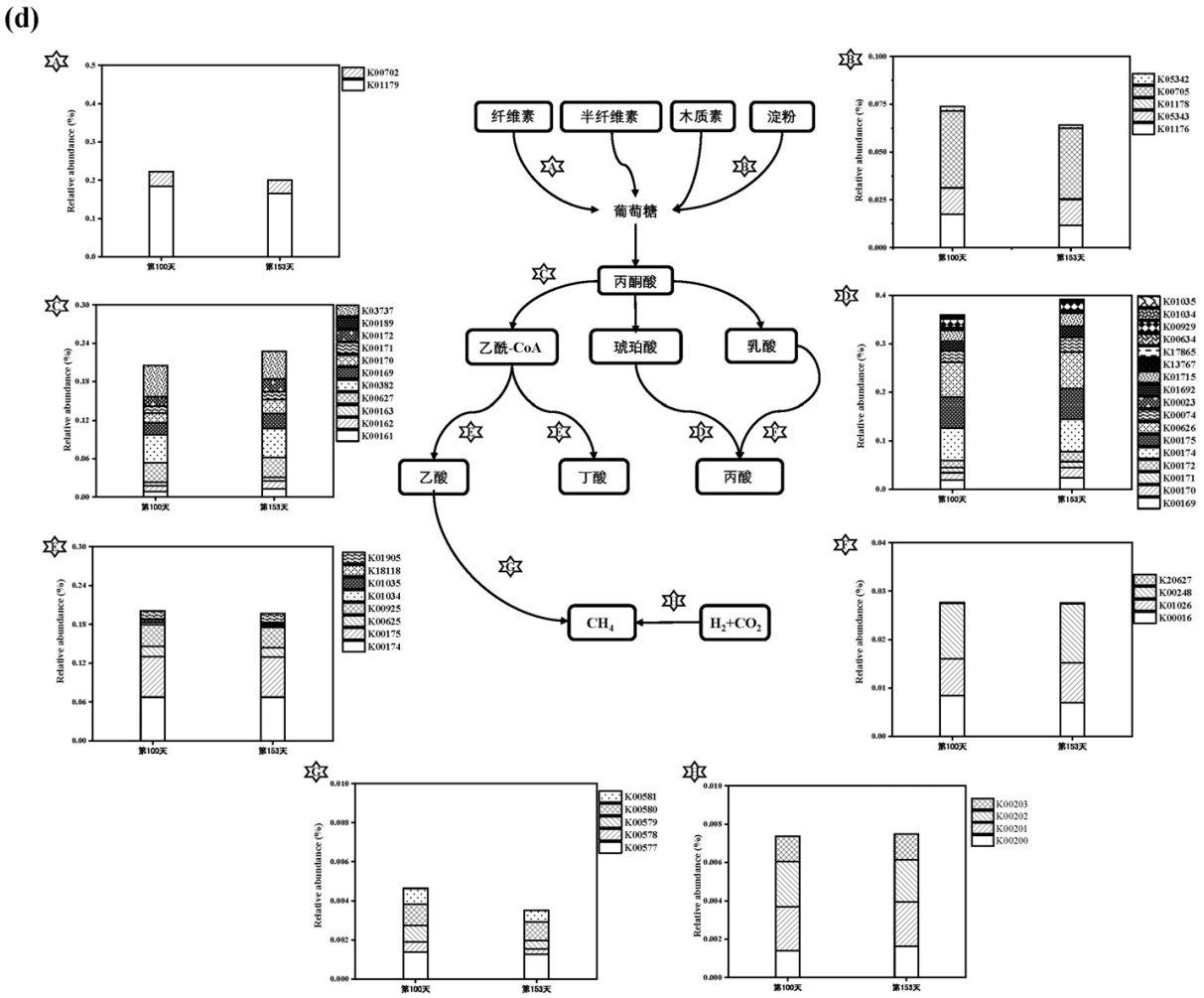


图 8 微生物群落和代谢基因在投加复合酶前后(Day 100,Day 153)的变化

Fig.8 Changes in microbial community and metabolic genes before and after the addition of complex enzymes (Day 100, Day 153)

3 结论

3.1 通过单因子试验筛选单一酶种类并筛选优化范围,采用 Gompertz 模型拟合累积甲烷产量得到不同浓度的漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶对 P_0 和 R_{max} 的影响,最终选择确定漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶能够显著促进木质纤维素水解产甲烷效能,并将其作为外源复合酶的主要组成.

3.2 通过响应曲面法,以漆酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶和木聚糖酶为优化关键因素,以产甲烷促进率作为优化目标,根据试验数据成功建立了模型并进行了方差分析,根据曲面图分析最终确定了漆酶(1.5~4.0U/mL)、木聚糖酶(12-20U/mL)和内切-β-1,4-葡聚糖酶(50-85U/mL)作为合适的复合酶组合范围.

3.3 通过连续流 DMBR 共消化系统验证外源复合酶的强化效能,得到以玉米秸秆和餐厨垃圾共消化系统的甲烷产率提升 19.5%;外源复合酶的投加促进了水解酶活性,同时通过 *Smithella* 等功能菌的富集强化了水解及酸化代谢,进而提升木质纤维素类生物质的降解效能,以乙酸型为主的产甲烷菌(*Methanosarcina*)进一步提高了共消化系统的产甲烷性能及其稳定性.

参考文献:

[1] Deng Y, Liu M, Fang T, et al. Enhancement of anaerobic digestion of rice straw by amino acid-derived ionic liquid [J]. Bioresource Technology, 2023,380:129076.

[2] 孟 艳,李 屹,杜中平,等.蔬菜秸秆与牲畜粪便共消化特性及关键微生物分析 [J]. 中国环境科学, 2023,43(S1):136-148.
Meng Y, Li Y, Du Z P, et al. Analysis on the co-digestion characteristics and key microorganisms of vegetable straw and livestock manure [J]. China Environmental Science, 2023,43(S1): 136-148.

[3] Ren H, Sun W, Yan Z, et al. Bioaugmentation of sweet sorghum ensiling with rumen fluid: Fermentation characteristics, chemical composition, microbial community, and enzymatic digestibility of silages [J]. Journal of Cleaner Production, 2021,294:126308.

[4] Xing B, Han Y, Cao S, et al. Cosubstrate strategy for enhancing lignocellulose degradation during rumen fermentation in vitro: Characteristics and microorganism composition [J]. Chemosphere, 2020,250:126104.

[5] 程东兴,胡以松,屈　艺,等.AnMBR 处理剩余污泥与厨余共消化的效能研究 [J]. 中国环境科学, 2023,43(9):4676−4687.
Cheng D X, Hu Y S, Qu Y, et al. Study on the efficiency of anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) in the co−digestion of excess sludge and food waste [J]. China Environmental Science, 2023,43(9):4676−4687.

[6] Singh S K. Biological treatment of plant biomass and factors affecting bioactivity [J]. Journal of Cleaner Production. 2021,279:123546.

[7] Wang S, Li F, Wu D, et al. Enzyme pretreatment enhancing biogas yield from corn stover: feasibility, optimization, and mechanism analysis [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018,66(38): 10026−10032.

[8] Schroyen M, Vervaeren H, Vandepitte H, et al. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential [J]. Bioresource technology, 2015,192:696−702.

[9] Li Q, Li H, Wang G, et al. Effects of loading rate and temperature on anaerobic co−digestion of food waste and waste activated sludge in a high frequency feeding system, looking in particular at stability and efficiency [J]. Bioresource Technology, 2017,237:231−239.

[10] Xing B, Chang X, Cao S, et al. Long−term in−situ starvation and reactivation of co−digestion with food waste and corn straw in a continuous AnDMBR: Performance, sludge characteristics, and microorganism community [J]. Science of the total Environment, 2023, 882:163673.

[11] Xing B, Han Y, Wang X C, et al. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation [J]. Science of the total Environment, 2020,715:136529.

[12] Yong Z, Dong Y, Zhang X, et al. Anaerobic co−digestion of food waste and straw for biogas production [J]. Renewable Energy, 2015,78:527−530.

[13] Xing B, Chang X, Zhang Y, et al. A compound enzyme as an additive to a continuous anaerobic dynamic membrane bioreactor for enhanced lignocellulose removal from codigestion: Performance, membrane characteristics and microorganisms [J]. Bioresource technology, 2024, 402:130772.

[14] Yang W, Young S, Munoz A, et al. Dynamic modeling of a full−scale anaerobic mesophilic digester start−up process for the treatment of primary sludge [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019,7(3):103091.

[15] Liang J, Fang W, Chang J, et al. Long−term rumen microorganism fermentation of corn stover in vitro for volatile fatty acid production [J]. Bioresource Technology, 2022,358:127447.

[16] Li Y, Park S Y, Zhu J. Solid−state anaerobic digestion for methane production from organic waste [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2011,15(1):821−826.

[17] Bhardwaj P, Kaur N, Selvaraj M, et al. Laccase−assisted degradation of emerging recalcitrant compounds – A review [J]. Bioresource Technology, 2022,364:128031.

[18] Barbosa F C, Martins M, Brenelli L B, et al. Screening of potential endoglucanases, hydrolysis conditions and different sugarcane straws pretreatments for cello−oligosaccharides production [J]. Bioresource Technology, 2020,316:123918.

[19] Liao H, Feng B, Ying W, et al. Efficient production of xylobiose and xylotriose from corncob by mixed acids and xylanase hydrolysis [J]. Bioresource Technology, 2023,387:129686.

[20] Zhu Z, Wu S, Qi B, et al. Highly efficient glucose production from raw non−pretreated Chinese medicinal herbal residues via the synergism of cellulase and amylolytic enzymes [J]. Bioresource Technology, 2022,364:128102.

[21] Wang X, Lei Z, Zhang Z, et al. Use of nanobubble water bioaugmented anaerobically digested sludge for high−efficacy energy production from high−solids anaerobic digestion of corn straw [J]. Science of the Total Environment, 2023,863:160825.

[22] Zhao X, Huang C, Lin W, et al. A structure–activity understanding of the interaction between lignin and various cellulase domains [J]. Bioresource Technology, 2022,351:127042.

[23] Subramaniam S, Karunanandham K, Asm R, et al. Delignification of the cotton stalk and ginning mill waste via EnZolv pretreatment and optimization of process parameters using response surface methodology (RSM) [J]. Bioresource Technology, 2023,387:129655.

[24] Jin R, Xing B, Ni W. Optimization of partial nitritation in a continuous flow internal loop airlift reactor [J]. Bioresource Technology, 2013, 147:516−524.

[25] Iamsaard K, Weng C, Tzeng J, et al. Systematic optimization of biochars derived from corn wastes, pineapple leaf, and sugarcane bagasse for Cu(II) adsorption through response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2023,382:129131.

[26] Masoumi H, Ghaemi A, Gannadzadeh Gilani H. Synthesis of polystyrene−based hyper−cross−linked polymers for Cd(II) ions removal from aqueous solutions: Experimental and RSM modeling [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021,416:125923.

[27] Yang H, Deng R, Jin J, et al. Hydrolytic performances of different organic compounds in different lignocellulosic biomass during anaerobic digestion [J]. Environmental Engineering Research, 2022,27 (4):210013.

[28] Fan Y, Zhang Z, Yang X, et al. Alleviation of volatile fatty acids inhibition in anaerobic digestion of swine manure with nano−bubble water supplementation [J]. Bioresource Technology, 2024,411: 131304.

[29] Liu H, Wang L, Zhang X, et al. A viable approach for commercial VFAs production from sludge: Liquid fermentation in anaerobic dynamic membrane reactor [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 365:912−920.

作者简介：常享琳(2000−),男,安徽淮北人,西安建筑科技大学硕士研究生,主要从事废物资源化技术研究.共发表 8 篇论文.cxl0121@xauat.edu.cn.