

## 乙酸和乳酸对玉米秸秆青贮料有氧稳定性和甲烷产率的影响

马旭光<sup>1,2</sup> 刘晶晶<sup>1</sup> 郑泽慧<sup>1</sup> 袁旭峰<sup>1</sup> 任济伟<sup>1</sup> 王小芬<sup>1</sup> 崔宗均<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心,北京 100193;

2. 乐山师范学院 化学学院,四川 乐山 614000)

**摘要** 根据热电偶原理采用无纸记录仪测定温度,研究不同质量浓度乙酸和乳酸对玉米秸秆青贮料有氧稳定性及干物质的影响,并通过批次厌氧发酵工艺,分析不同质量比的乙酸和乳酸对提高青贮料甲烷产率的作用。结果表明:乙酸能有效提高青贮料的有氧稳定性,且随乙酸浓度的增加,青贮料有氧稳定性提高。相应地,乙酸添加量为10%和8%的处理干物质损失分别为1%和3%,而乙酸量添加为2%和没有添加乙酸的处理干物质损失分别为20%和25%,且干物质损失率( $x$ )与甲烷产量减少率( $y$ )呈线性正相关: $y=0.705x+1.224(R^2=0.9862)$ 。在仅以乙酸和乳酸为原料的厌氧发酵体系中,高浓度乙酸的甲烷产率显著高于高浓度乳酸( $P<0.05$ );而在烘干青贮料发酵体系中,乙酸添加量为17%和13%的处理甲烷产率与相同添加量乳酸的处理相比,差异性不显著( $P>0.05$ )。综合评价,乙酸对青贮料的主要贡献在于增加其出料期的有氧稳定性,减少干物质损失,进而提高物料甲烷产率。

**关键词** 乙酸;乳酸;青贮料;有氧稳定性;厌氧发酵;甲烷产率

中图分类号 S 216.2

文章编号 1007-4333(2015)01-0044-09

文献标志码 A

## Effects of acetic and lactic acid in corn stover silage on aerobic stability and methane yield rate

MA Xu-guang<sup>1,2</sup>, LIU Jing-jing<sup>1</sup>, ZHENG Ze-hui<sup>1</sup>, YUAN Xu-feng<sup>1</sup>, REN Ji-wei<sup>1</sup>,  
WANG Xiao-fen<sup>1</sup>, CUI Zong-jun<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology/Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. School of Chemistry, Leshan Normal University, Leshan 614000, China)

**Abstract** Effects of acetic (A) and lactic acid (L) on the aerobic stability of silage were determined by adding mixture of A and L with various mass ratios of A/L to prepared corn stover silage. In addition, the roles of acetic and lactic acid improving methane yield rate (MYR) of silage in the presence of exposure to ambient air were analyzed using three feedstocks including the silage before and after the aerobic stability test, mixtures of A/L and stove-dried silage with different ratios of A/L. For this purpose, the aerobic stability tests and anaerobic digestion tests were respectively performed using paperless recorder with thermocouple theory and several bath reactors. The results showed that addition of acetic acid significantly extended the aerobic stability of silage and the stability increased along with the increased acetic acid concentration. Accordingly, dry matter (DM) loss of the treatments adding 10% and 8% acetic acid was 1% and 3% respectively, whereas adding 2% and without acetic acid loss 20% and 25% DM respectively. The linear relationship between DM loss of silage( $x$ ) and its methane yield decrease( $y$ ) was expressed as:  $y=0.705x+1.224(R^2=0.9862)$ . MYR of higher acetic acid concentration was significantly higher( $P<0.05$ ) than that of higher lactic acid concentration in anaerobic digestion system with acetic and lactic acid as only feedstock. However, adding 17% and 13% acetic acid had less effect on MYR compared to those treatment by adding the same ratios of lactic acid in the stovedried silage. A comprehensive assessment showed increasing acetic acid concentration in silage was beneficial for its aerobic stability, DM loss and MYR. These results suggested that heterofermentative ensiling with higher

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD14B06); 北京市重点学科经费

第一作者: 马旭光, 讲师, 主要从事农业固体废弃物再利用研究, E-mail: maxg196@163.com

通讯作者: 崔宗均, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源转化与利用研究, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

acetic acid concentration was an effective method of storing fresh feedstock during the feed-out period in the presence of exposure to ambient air for biogas production.

**Key words** acetic acid; lactic acid; silage; aerobic stability; anaerobic digestion; methane yield rate (MYR)

青贮作为一种贮存动物饲料的传统方法,近年来已成为一种厌氧发酵物料保存的有效手段而备受关注<sup>[1]</sup>。目前该技术在德国、奥地利和捷克等欧洲国家的沼气工程中已得到广泛应用<sup>[2]</sup>,但由于采用的是适宜于饲喂反刍动物的同型乳酸发酵技术,青贮料在长期的贮存过程中及出料期接触空气后有氧稳定性差、物料易腐败、干物质(Dry matter, DM)损失较大,严重影响原料的甲烷产率(Methane yield rate, MYR)<sup>[3]</sup>。如何提高产甲烷青贮料的有氧稳定性,对于降低原料的贮存成本、提高生产效率具有重要的意义。

目前青贮料的有氧稳定性对其甲烷产率影响的研究才刚刚起步。有研究<sup>[4-6]</sup>表明,异型乳酸发酵与同型乳酸发酵相比能提高青贮料的有氧稳定性,其机理在于异性乳酸发酵过程中产生的乙酸能有效抑制腐败微生物。另外,异型乳酸发酵更有利于厌氧发酵产甲烷,因为发酵产物乙酸可直接被嗜乙酸产甲烷菌所利用,而且乙醇具有较高的理论产甲烷值 729 L/kg<sup>[7]</sup>,但同时会释放二氧化碳,因此该发酵类型较同型乳酸发酵在青贮过程中有更多的干物质损失。

不同乳酸发酵类型对物料甲烷产率的影响还存在争议。Vervaeren 等<sup>[8]</sup>的研究表明,简单组合的同型发酵乳酸菌和异型发酵乳酸菌并不能提高物料的甲烷产量,但若分别和复合酶、酵母菌或乳酸发酵菌系配合,均能有效提高甲烷产量。Herrmann 等<sup>[9]</sup>的研究表明,异型发酵乳酸菌能延长青贮料的贮存时间并提高甲烷产量,但若考虑发酵过程中干物质的损失,异型发酵乳酸菌对物料甲烷产量的影响较小。上述研究都只探讨了青贮料在发酵前期的干物质变化及其对甲烷产量的影响,并没有考虑出料期的干物质损失对甲烷产量的影响。有人<sup>[10]</sup>认为提高青贮物长期贮存和接触空气后的稳定性与异型乳酸发酵引起的少量干物质损失相比要划算和重要得多,但有关系统研究还未见报道。

为此,本研究通过在玉米秸秆青贮料中添加不同质量比的乙酸和乳酸,探讨二者对青贮料有氧稳定性和干物质损失的影响;并通过批次厌氧发酵工艺,进一步分析不同质量比的乙酸和乳酸对青贮料

甲烷产率的影响,旨在明确乙酸对青贮料在接触空气条件下对提高甲烷产量的贡献,为发展产甲烷青贮料的异型乳酸发酵技术提供理论支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1) 玉米秸秆青贮料:取自中国农业大学上庄实验站,青贮时加入一定量的乳酸菌复合系 SFC-2<sup>[11]</sup>。青贮料的长度为 2 cm 左右,贮存期为 6 个月。

2) 烘干青贮料:将上述的玉米秸秆青贮料在恒温干燥箱(DGG-9053A,上海森信实验仪器有限公司)中于 141 °C 烘干至恒重,其目的是去除青贮料中的各类挥发性脂肪酸(VFAs)和醇类物质,然后在高速植物粉碎机(FW80-1,天津泰斯特仪器有限公司)中粉碎至 0.5 mm 左右,为后续研究添加外源乙酸和乳酸对甲烷产量的影响试验备用。

3) 厌氧消化种泥:取自于北京郊区某家中温发酵沼气厂,在以干黄玉米秸秆为主要原料的厌氧发酵罐中驯化 1 个月后备用。

上述试验材料的理化性质见表 1。根据青贮料干物质含量和 pH 关系<sup>[1]</sup>可判断出本试验所用青贮料质量良好,适宜于作进一步试验的材料。另外,经过 141 °C 烘干的青贮料,基本有效去除了其中的乙酸、乳酸和乙醇,满足试验需求。

### 1.2 试验设计及方法

#### 1.2.1 有氧稳定性试验设计

不同质量比的乙酸和乳酸对青贮料的有氧稳定性试验采用无纸记录仪测定法<sup>[12-13]</sup>。按总浓度 100 g/kg、质量比分别为 10 : 0、8 : 2、2 : 8 和 0 : 10 往青贮料添加乙酸和乳酸,喷洒后迅速搅拌均匀,以不添加酸的青贮料作为对照。每个处理所用的青贮料为 800 g,添加酸后装入 1 L 带盖(尽可能减少水分蒸发)的聚乙烯盒子(25 cm×20 cm×20 cm)中,不压实,不密封,(28±0.5) °C 恒温放置 7 d。每个处理另备 300 g 物料保存于一 20 °C,以备后续 pH、挥发性脂肪酸(Volatile fatty acids, VFAs)含量的测定及厌氧产甲烷试验。本试验将有氧稳定性定义为青贮料接触空气后物料核心温度比外界温度高出 2 °C 所需的小时数<sup>[13]</sup>。

有氧稳定性试验前、后,准确称取每个重复的盒子与物料的总重量以计算各处理的干物质损失,干物质损失=(有氧稳定性试验前总重量-有氧稳定性试验后总重量)/有氧稳定性试验前总重量 $\times 100$ 。

在有氧稳定性试验后,均匀搅拌物料,每个处理取300 g左右的样品,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,待测pH、VFAs含量以及后续的厌氧产甲烷试验备用。每个处理均设3次重复。

表1 玉米秸秆青贮料、烘干青贮料及接种污泥的理化性质

Table 1 Physicochemical characteristics of feedstocks and inoculums

测定指标 Parameters	青贮料 Silage	141 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干的青贮料 Stoving silage at 141 $^{\circ}\text{C}$	接种污泥 Inoculum
干物质/% Dry matter (DM)	27.53 $\pm$ 0.69	99.77 $\pm$ 0.17	5.87 $\pm$ 0.00
有机干物质/% <sup>①</sup> Organic dry matter(ODM)	92.26 $\pm$ 0.43	91.29 $\pm$ 0.17	68.56 $\pm$ 0.25
乙醇/(g/kg) Ethanol	2.56 $\pm$ 0.93	ND <sup>②</sup>	ND
乳酸/(g/kg) Lactic acid	24.58 $\pm$ 1.80	2.25 $\pm$ 0.22	ND
乙酸/(g/kg) Acetic acid	9.01 $\pm$ 1.12	ND	ND
丙酸/(g/kg) Propionic acid	16.97 $\pm$ 0.56	2.96 $\pm$ 0.13	18.07 $\pm$ 0.16
丁酸/(g/kg) Butyric acid	6.33 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.04	ND
pH	4.40 $\pm$ 0.00	6.10 $\pm$ 0.00	7.90 $\pm$ 0.00

注:表中的数字代表3次重复试验的平均值和方差。①基于干物质中的有机干物质质量分数。②ND表示未检测到。下同。乙醇、乳酸、乙酸、丙酸、丁酸的含量为每kg干物质中的含量。

Note: Values represent means and standard deviations of three replicates. ① ODM contents base on DM. ② ND means non-detection. The same as follows. Contents of ethanol, lactic, acetic, propionic and butyric acid are the contents per kilogram DM.

### 1.2.2 批次厌氧发酵试验设计

1) 以有氧稳定性试验前、后的青贮料为发酵原料。将保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的原料于食品粉碎机(Deer BL-747, 广东德尔电器有限公司)中快速粉碎至1 mm左右,按10 g干物质的量,迅速加入已装有1.0 L活性物泥的自制玻璃厌氧发酵瓶(容积为1.5 L),充分混匀后置于 $35\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温室厌氧发酵,发酵周期为20 d。以不加物料的活性污泥为空白对照,每个处理3个重复。每天测定沼气产量和甲烷含量。沼气体积采用带有刻度的倒置塑料量筒进行排水法测定,并按标准条件(温度为 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,压强为1 013 hPa)对测定体积矫正<sup>[14]</sup>,记为 $\text{mL}_N$ 。

2) 仅以不同质量比的乙酸和乳酸为发酵原料。该试验目的是探索单一物料乙酸和乳酸在以不同比例混合时对产甲烷的影响,进一步明确二者在影响青贮料有氧稳定性及其甲烷产量中的作用。乙酸和乳酸的质量比与1.2.1试验相同,总量为5 g,用5 mol/L的NaOH溶液调pH至 $7.0\pm 0.2$ 后,再用0.1 L注射器快速注入装有1.0 L活性污泥的厌氧发酵瓶(容积为0.5 L),以不加酸的活性污泥为空白对照,发酵周期为100 h,其他发酵方式和条件同试验1)。每隔10 h测定1次沼气产量及甲烷含量,

测定和计算方法同试验1)。同时,每次从出料口取约10 mL的出料保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待后续分析发酵过程中乙酸和乳酸的变化。

3) 以烘干青贮料与不同质量比的乙酸和乳酸为发酵原料。该试验目的是明确乙酸和乳酸在更接近青贮物料主要成分(除青贮料发酵过程中产生的挥发性脂肪酸和醇类物质外)的发酵体系中对甲烷产率的影响。烘干青贮料的添加量为30 g,以不添加酸的烘干料为对照,其他操作条件和测定、分析方法均同试验1)。发酵周期为200 h。

沼气产量的定量和定性评价按如下方法:1)按德国工程师协会(Verein Deutscher Ingenieure, VDI)<sup>[15]</sup>的标准方法矫正甲烷和二氧化碳的含量之和至100%;2)各处理测得的沼气体系需减去对照样品的体积;3)物料甲烷产率表示为发酵期间的甲烷总产量除以加入物料的经验矫正的干物质( $\text{DM}_{\text{corrected}}$ )或有机干物质( $\text{ODM}_{\text{corrected}}$ ),用青贮料和酸混合为原料发酵时用 $\text{DM}_{\text{corrected}}$ 表示,用纯酸为原料发酵时用 $\text{ODM}_{\text{corrected}}$ 表示。

### 1.2.3 测定及分析方法

上述保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的所有样品在做后续分析时采用冷水法解冻和浸提<sup>[9]</sup>。干物质和有机干物质

(Organic dry matter, ODM)均按美国 APHA《水和废水检验标准方法》测定。含有 VFAs 和乙醇物料的 DM 值均按以下经验公式矫正<sup>[16]</sup>:  $DM_{corrected} = DM_{uncorrected} \times [100 + 0.375 \times \text{乳酸含量} + \text{乙醇含量} + 0.892 \times (\text{乙酸含量} + \text{丁酸含量})]$ 。液体样品的 pH 值采用便携式 pH 计 (B-211, Horiba, Inc., Japan) 测定, 固体样品先按质量用去离子水稀释 5 倍, 充分震荡后再浸泡 15 min 进行测定。VFAs 用 HPLC 仪 (LC-20A, Shimadzu, Japan) 测定。先将待测样品按一定倍数稀释, 再将离心的上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  有机系滤膜后进样。分析柱为 Aminex HPX-87H (300 mm  $\times$  7.8 mm, Bio-Rad Company, American), 流动相为 0.005 mol  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速为 0.6 mL/min, 柱温箱和进样温度分别为 40 和 90  $^\circ\text{C}$ , 柱压为 1.3 MPa, 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。乙醇的测定采用气质色谱法<sup>[12]</sup>。沼气成分 ( $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$ ) 用气象色谱仪 (GC-2014, Shimadzu, Japan) 测定。分析柱为 GDX-101 型不锈钢柱 (2 m  $\times$  4 mm, Bio-Rad Company, American), 热导检测器, 载气为氢气, 载气流速为 25 mL/min, 柱温箱温度和检测器温度分别为 40 和 100  $^\circ\text{C}$ , 检测时间为 2 min, 进样量为 100  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3 数据分析

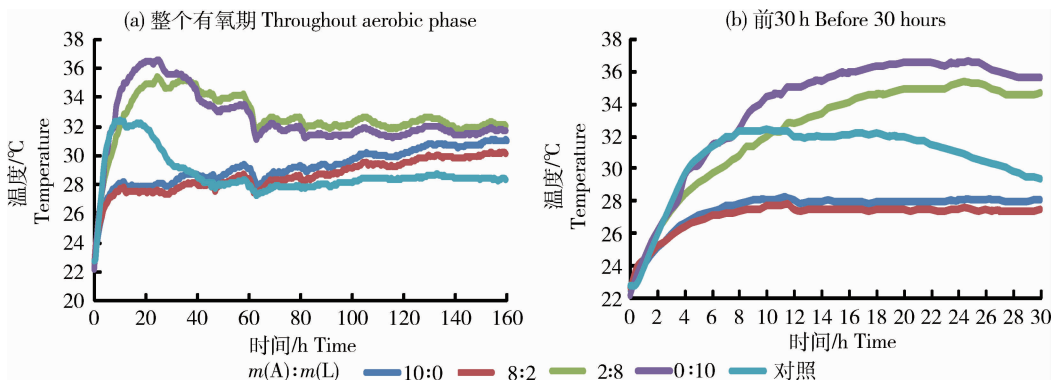
所有测定指标的原始数据用 Excel 2007 计算平均值和标准误。除有氧稳定性试验中青贮料温度以外的其他测定指标均采用 SPSS 17.0 统计软件

进行方差分析和 Tukey's HSD 法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理青贮料的有氧稳定性及干物质损失

不同的乙酸添加量对青贮料的有氧稳定性有明显影响 (图 1(a))。由于本试验的环境温度是  $28 \pm 0.5$   $^\circ\text{C}$ , 根据有氧稳定性的定义, 各处理的有氧稳定性是指在有氧条件下, 物料核心温度达到 30  $^\circ\text{C}$  时所需的小时数。乙酸添加量少的试验组有氧稳定性为 6 h (图 1(b)), 而乙酸添加多的 2 个试验组有氧稳定性直到 7 d 后还未达到 30  $^\circ\text{C}$  (图 1(a)); 没有添加乙酸的试验组和对照组的有氧稳定性差别不大, 均为 4 h 左右。这说明在有氧条件下, 乙酸可有效提高青贮料的有氧稳定性, 且乙酸浓度与有氧稳定性成正比, 这是由于乙酸能抑制腐败微生物的生长和繁殖的原因所致<sup>[12]</sup>。Danner 等<sup>[4]</sup>研究了葡萄糖、果糖、甘露糖、乳酸、乙酸和 1,2-丙二醇对青贮料有氧稳定性的影响, 结果表明, 乙酸是唯一能提高有氧稳定性的物质, 且有氧稳定性随乙酸浓度呈指数级延长的趋势, 这与本试验的研究结果一致。相反地, 较高浓度乳酸会缩短青贮料的有氧稳定性, 其原因是在有氧的条件下, 好氧的细菌、酵母菌和真菌会以乳酸为主要营养物质进行生长繁殖, 同时散发出大量的热量以致青贮料温度上升<sup>[3,17]</sup>。值得一提的是, 对照组虽然没有添加乳酸, 但干物质损失也较高, 这可能与青贮料中乳酸含量较高有关。



A 表示乙酸, L 表示乳酸。下图同。

Letter A means acetic acid and L means lactic acid. The same as follows.

图 1 添加不同质量比的乙酸和乳酸的青贮料在有氧期的温度变化

Fig. 1 Temperature changes in response to different A/L mass ratios addition to silage in the aerobic stability test

有氧稳定性差的青贮料直接会导致干物质的大量损失。由表 2 可知, 有氧稳定性对青贮料在发酵

过程中的有机酸和干物质含量有显著影响。在有氧稳定性试验期间, 乙酸添加量多的处理干物质损失

仅为1%~3%，而没有添加乙酸试验组的干物质损失高达25%左右。青贮料的有氧稳定性越长，干物质损失越少，相应地其中乙酸、乳酸和丙酸等挥发性脂肪酸损失也越少，反之亦然。Pahlow等<sup>[18]</sup>认为好氧微生物在以乳酸为主要营养物质进行好氧呼吸时会产生大量的二氧化碳，这是导致青贮料在有氧稳定性差时会发生干物质损失的根本原因。

另外，在有氧稳定性试验后有氧稳定性差的处理的pH较有氧稳定性好的处理高(表2)。乙酸添加量高的处理的pH试验前后变化不大，仍保持在4.0左右；而乙酸添加量少和不添加的处理的pH试验后高达8.6，这可能是大量好氧和耐酸性微生物分解和氧化青贮料中的蛋白质和发酵产物(如乳酸等)的结果<sup>[4]</sup>。这也可间接反映出有氧稳定性差的青贮料干物质损失也高。

表2 各处理在有氧稳定性试验前、后的干物质、挥发性脂肪酸及pH的变化

Table 2 Changes of DM, volatile fatty acids and pH of silage with different ratios of lactic acid and acetic acid for before and after aerobic stability tests

处理 (m(A) : m(L)) Treatments	干物质损失量/% DM loss	乳酸损失量/% Lactic acid loss	乙酸损失量/% Acetic acid loss	丙酸损失量/% Propionic acid loss	pH	
					试验前 Before	试验后 After
10 : 0	1.44±0.19 a	30.39±2.53 a	69.53±0.79 a	24.69±0.16 a	4.2±0.1	4.2±0.0
8 : 2	3.27±0.22 b	37.24±7.90 b	72.03±2.04 a	39.13±0.52 b	4.0±0.0	4.1±0.0
2 : 8	20.87±1.58 c	99.00±1.80 c	76.16±0.22 b	45.90±0.47 c	3.8±0.1	8.6±0.0
0 : 10	25.42±1.53 d	99.41±0.38 c	92.97±1.31 d	50.02±0.36 d	3.8±0.0	8.6±0.1
对照 Control	25.20±1.41 c	99.35±1.80 c	91.90±2.52 c	49.52±0.27 d	4.6±0.0	8.6±0.0

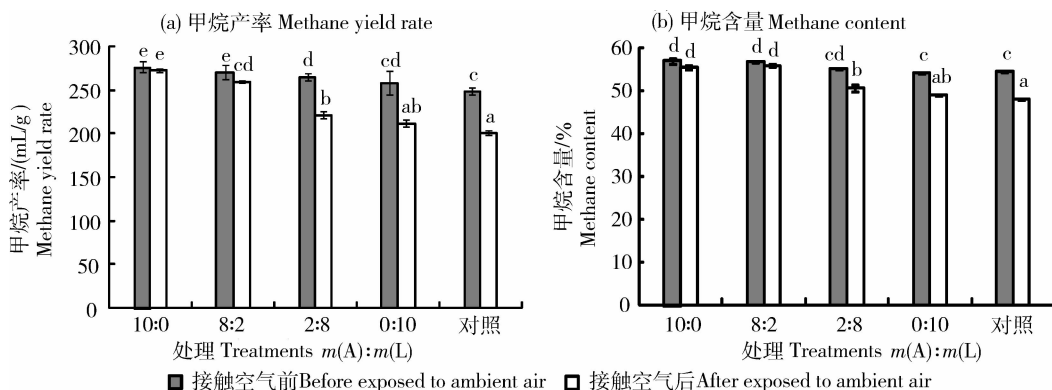
注：每列数字后的不同字母表示在0.05水平上差异性显著。下同。

Note: Values followed by the different letters in each column are significantly different at 0.05 level. The same as follows.

## 2.2 不同处理青贮料在有氧稳定性试验前、后的甲烷产率

各处理在有氧稳定性试验前、后的甲烷产率和甲烷含量受乙酸添加量的影响较大(图2)。乙酸添

加量多的处理的甲烷产率在有氧稳定性试验后较有氧稳定性试验前分别减少了1.09%和4.64%，甲烷含量没有显著性差异( $P>0.05$ )；相反，乙酸添加量少的处理和对照组的甲烷产率在有氧稳定性试验后



不同字母表示各处理之间在0.05水平上差异性显著。下同。

Different letters are significantly different at 0.05 level among the treatments. The same as follows.

图2 各处理在有氧稳定性试验前、后的甲烷产率和甲烷含量

Fig. 2 Comparisons of methane yield rate and methane content of adding different mass ratios of A/L to silage before and after aerobic stability tests

较有氧稳定性试验前分别减少了 20.87%、25.42% 和 25.20%，甲烷含量也有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，其原因可能是乙酸添加量少的处理有氧稳定性试验后的干物质损失较乙酸添加量多的处理多，同时也伴随着较多的理论产甲烷率和甲烷含量高的有机物质如乙醇、丙酸和丁酸等<sup>[19]</sup>。另外，有氧稳定性试验前，添加乙酸量多的处理的甲烷产率显著高于添加乙酸量少的处理。在理论上，乙酸和乳酸在厌氧条件下的甲烷产量是相等的<sup>[20]</sup>。但在实际发酵中，乳酸需要经乙酸细菌转化为乙酸、二氧化碳和氢气，再经嗜乙酸甲烷菌和嗜氢甲烷菌转化为甲烷，而乙酸可直接利用产生甲烷，如果在活性污泥中的嗜氢甲烷菌种类和数量较少且乳酸浓度较高的情况下，均会降低乳酸的甲烷产率<sup>[21-22]</sup>。

由图 2(a)的数据可知，青贮料在有氧条件下的干物质损失量与甲烷产率紧密相关。结合表 2 和图 2(a)的数据，分析可得到干物质损失率 ( $x$ ) 和甲烷减少量 ( $y$ ) 的关系 (图 3)： $y = 0.705x + 1.224$  ( $R^2 = 0.9862$ )。Kung 等<sup>[23]</sup>的研究发现干物质损失量 3% 会导致沼气产量减少 5%，这与本研究结果是一致的。

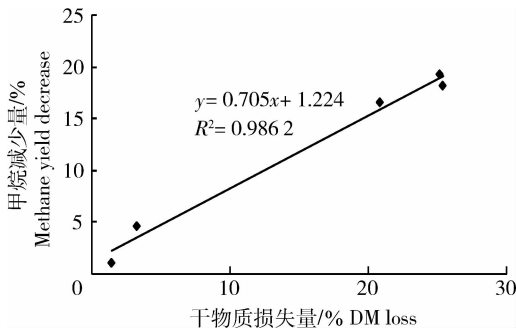


图 3 干物质损失量和甲烷减少量之间的关系

Fig. 3 Correlation between DM loss and methane yield decrease

### 2.3 不同质量比的乙酸和乳酸的产甲烷过程分析及甲烷产率比较

不同质量比的乙酸和乳酸对产甲烷的影响见图 4。各处理在 100 h 内产气结束，乙酸添加量多的处理产气高峰期较乙酸添加少的处理滞后 20 h 左右 (图 4(a))，但在产气前期 (前 50 h) 前者较后者的甲烷含量高 (图 4(b))；相反地，尽管乳酸添加量多的处理产气高峰较早，但二氧化碳含量也高。如前所述，乙酸作为产甲烷古菌的重要前体物质，可直接被嗜乙酸古菌利用，而乳酸还需要先转化为乙酸、二氧化碳和氢气，然后才能在嗜乙酸甲烷菌和嗜氢甲烷菌作用下产生甲烷。在这一过程中，乳酸的乙酸化在短时间内可自发完成，在众多挥发性脂肪酸和醇类物质乙酸化时，唯有乳酸所需自由能是负值 ( $\Delta G^{\circ} = -4.2 \text{ kJ/mol}$ )<sup>[24]</sup>。因此，当厌氧消化的底物中乳酸含量即使较多时，随着发酵时间的延长也不会大量积累，而会在短时间内乙酸化，该现象从表 3 乳酸在发酵过程中的浓度变化可以得到证实。由表 3 可知，乙酸在厌氧发酵过程中浓度逐渐降低，而乳酸会迅速乙酸化，因此在添加乳酸量多的处理中，乙酸的浓度会增加，然后在嗜乙酸产甲烷古菌的作用下逐渐降低。

另外，在乳酸短时间乙酸化的过程中，同时会释放出较高浓度的二氧化碳和氢气，而这会阻碍嗜氢产甲烷古菌的代谢效率，降低乳酸的甲烷产率，因为嗜氢产甲烷古菌只有氢分压较低的情况下才能正常产甲烷<sup>[25]</sup>。由图 5 可知，乙酸多的处理的甲烷产率显著高于乳酸多的处理，而二氧化碳产率与此相反。乙酸多的 2 个处理甲烷产率分别为 367 和 360 mL/g，接近于乙酸 (乳酸) 的理论产甲烷值 373 mL/g，而乳酸多的 2 个处理甲烷产率仅为 329 和 334 mL/g，这也说明原料中高浓度的乳酸会降低甲烷产率。

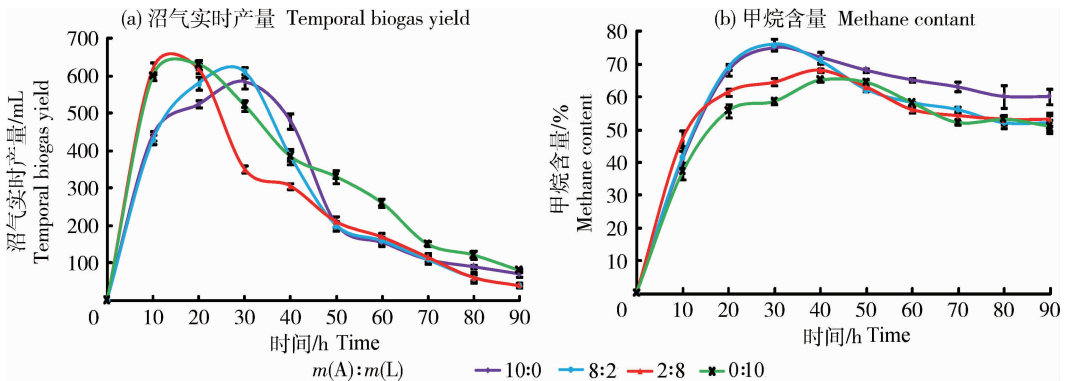


图 4 不同质量比的乙酸和乳酸实时产气量及甲烷含量的变化

Fig. 4 Changes of temporal biogas yield and methane content of different A/L mass ratios during anaerobic digestion

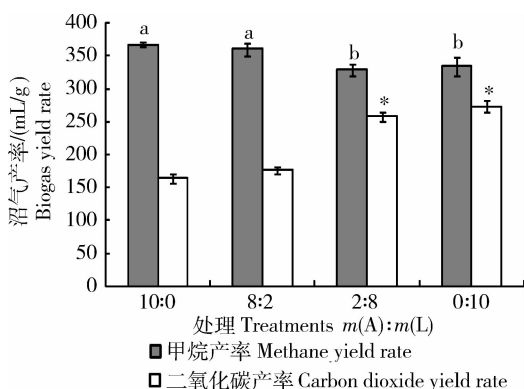
表3 各处理在厌氧发酵过程中乙酸和乳酸的浓度变化

Table 3 Concentration changes of acetic acid and lactic acid of the treatments during anaerobic digestion g/L

处理(m(A) : m(L)) Treatments	成分 Composition	发酵时间/h Digestion time					
		0	10	20	30	40	90
10 : 0	乙酸 Acetic acid	4.02±0.17	2.90±0.05	2.07±0.12	1.03±0.09	0.15±0.04	ND
8 : 2	乙酸 Acetic acid	3.28±0.10	2.22±0.25	1.38±0.16	0.47±0.07	ND	ND
	乳酸 Lactic acid	0.73±0.08	ND	ND	ND	ND	ND
2 : 8	乙酸 Acetic acid	0.80±0.09	1.97±0.23	0.94±0.11	0.48±0.06	ND	ND
	乳酸 Lactic acid	3.28±0.12	ND	ND	ND	ND	ND
0 : 10	乙酸 Acetic acid	ND	2.30±0.32	1.80±0.25	0.57±0.10	ND	ND
	乳酸 Lactic acid	4.08±0.08	0.15±0.03	ND	ND	ND	ND

## 2.4 不同质量比的乙酸和乳酸在烘干青贮料中的产甲烷过程分析及甲烷产率比较

不同质量比的乙酸和乳酸在烘干青贮料的产甲烷动态见图6。各处理在200 h内产气结束,且出现产气高峰的时间均在30 h左右(图6(a)),各处理组的实时沼气产量明显高于对照组,但其他各处理的实时产气量及产气动态基本保持一致,在前30 h乙酸添加量多的处理的甲烷含量略高于乳酸添加量多的处理(图6(b))。对照组物料产气量低的原因在于其主要成分是纤维素、半纤维素和少量可溶性糖,而各处理组添加了被发酵细菌和产甲烷古菌容易利用的乙酸和乳酸。有趣的是,在该发酵体系中,只有添加乙酸最多的处理的甲烷产率显著高于添加乳酸最多的处理,其他各处理的甲烷产率和二氧化碳产率没有显著差异(图7),这与仅以乙酸和乳酸为原料的发酵体系情况有较大不同,其原因可能是小粒径的烘干青贮料起到一定缓冲和稀释作用<sup>[22]</sup>。一方面,一部分乳酸会吸附在小颗粒的青贮料表面,减缓乳酸转化为乙酸的速率,进而降低发酵体系中的



不同字母表示各处理在0.05水平上甲烷产率差异性显著,\*表示各处理在0.05水平上二氧化碳产率差异性显著。下同。  
Different letters are significantly different in methane yield rate at 0.05 level among the treatments, \* means significantly different in carbon dioxide yield rate at 0.05 level among the treatments. The same as follows.

图5 不同质量比的乙酸和乳酸的甲烷产率和二氧化碳产率比较

Fig. 5 Comparisons of methane yield rate and carbon dioxide yield rate of different A/L ratios

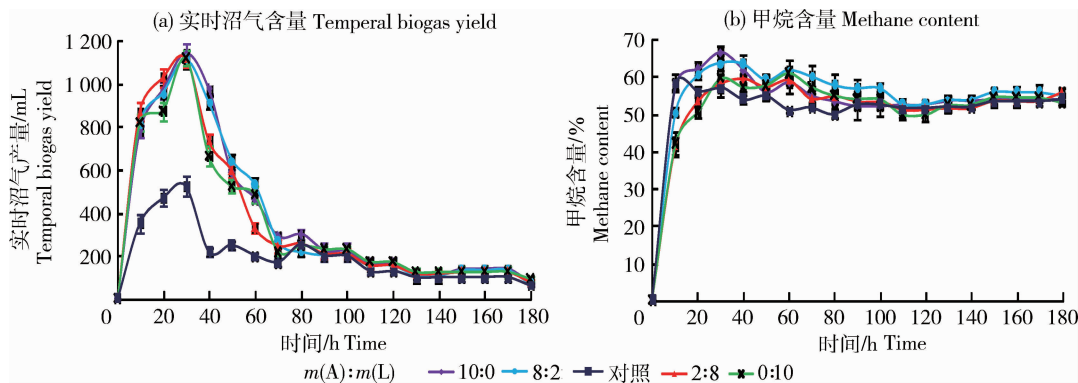


图6 不同质量比的乙酸和乳酸在烘干青贮料中的实时产气量及甲烷含量的变化

Fig. 6 Changes of temporal biogas yield and methane content of adding different A/L mass ratios in stoving silage during anaerobic digestion

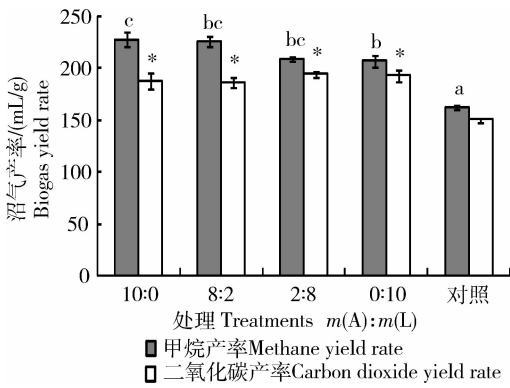


图 7 不同质量比的乙酸和乳酸在烘干青贮料中的甲烷产率和二氧化碳产率比较

Fig. 7 Comparisons of methane yield rate and carbon dioxide yield rate of different A/L mass ratios in stoving silage

氢分压而提高乳酸的甲烷产率；另一方面，添加的烘干青贮料降低乳酸在发酵体系中的浓度，这也有利于乳酸的高效代谢。由表 4 可知，前 40 h 乳酸的乙酸化速率较试验 2.3 明显变慢，在乳酸添加量多的 2 个处理中，在 20 h 时还能检测到乳酸，而后者几乎在 10 h 内完成了乳酸的乙酸化。上述结果说明，在乙酸和乳酸占总干物质质量较小的情况下，青贮料中不同质量比的乙酸和乳酸浓度对其甲烷产率没有明显影响。

### 3 结 论

1) 乙酸能有效提高青贮料的有氧稳定性，且乙酸浓度与有氧稳定性的高低呈正相关。当添加的乙酸浓度为干物质的 10% 和 8% 时，青贮料的有氧稳定性可达 160 h 以上，而当添加的乙酸浓度为干物

表 4 各处理在厌氧发酵过程中乙酸和乳酸质量浓度的变化

Table 4 Concentration changes of acetic acid and lactic acid of the treatments during anaerobic digestion g/L

处理 (m(A) : m(L)) Treatments	成分 Composition	发酵时间/h Digestion time				
		0	10	20	30	40
10 : 0	乙酸 Acetic acid	4.08±0.12	2.01±0.06	1.34±0.06	0.46±0.06	ND
	乳酸 Lactic acid	0.07±0.02	ND	ND	ND	ND
8 : 2	乙酸 Acetic acid	3.90±0.15	2.74±0.08	1.92±0.07	0.04±0.01	ND
	乳酸 Lactic acid	0.73±0.08	ND	ND	ND	ND
2 : 8	乙酸 Acetic acid	0.92±0.07	1.24±0.08	0.48±0.06	ND	ND
	乳酸 Lactic acid	3.96±0.14	0.94±0.09	0.36±0.09	ND	ND
0 : 10	乙酸 Acetic acid	ND	2.36±0.14	1.14±0.08	0.48±0.03	ND
	乳酸 Lactic acid	4.75±0.19	1.98±0.12	0.54±0.06	ND	ND

质的 2% 和没有添加乙酸时，青贮料的有氧稳定性仅为 4 h 左右。

2) 相应地，添加乙酸量多的处理干物质损失为 1%~3%，而添加乙酸量少的和没有添加乙酸的处理干物质损失高达 20%~25%。干物质损失率 (x) 和甲烷减少量 (y) 存在如下线性关系： $y = 0.705x + 1.224 (R^2 = 0.9862)$ 。

3) 在仅以乙酸和乳酸为原料的厌氧发酵体系中，高浓度乙酸的甲烷产率较高浓度乳酸的甲烷产率高，各处理之间差异性显著 ( $P < 0.05$ )；而在烘干青贮料发酵体系中，添加乙酸量较多的处理甲烷产率与添加乳酸量较多的处理比较，差异性不显著 ( $P > 0.05$ )。

4) 综合评价，乙酸对青贮料的主要贡献在于能增加其出料期的有氧稳定性，减少干物质损失，进而提高物料甲烷产率，但乙酸和乳酸本身的添加量对甲烷产率影响不大。因此，建议在利用玉米秸秆青贮料生产甲烷的应用中，宜采用乙酸含量较多的异型乳酸青贮技术。

### 参 考 文 献

[1] Kalac P. The required characteristics of ensiled crops used as a feedstock for biogas production: A review [J]. J Agrobiolog, 2011, 28(2): 85-96

[2] Weiland P. Biogas production: Current state and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnolog, 2010, 85(4): 849-860



- [3] Peymanfar S, Kermanshahi R K. The effect of bacteria, enzymes and inulin on fermentation and aerobic stability of corn silage[J]. Iran J Microbial, 2012, 4(4): 180-186
- [4] Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 69(1): 562-567
- [5] Wilkinson J M, Davies D R. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments[J]. Grass and Forage Sci, 2013, 68(1): 1-19
- [6] Filya I, Sucu E. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage[J]. Grass and Forage Sci, 2010, 65(4): 446-455
- [7] McDonald P, Henderson A R, Heron S J E. The Biochemistry of Silage[M]. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991: 341
- [8] Vervaeren H, Hostyn K, Ghekiere G, et al. Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production[J]. Renew Energy, 2010, 35(9): 2089-2093
- [9] Herrmann C, Heiermann M, Idler C. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(8): 5153-5161
- [10] 张涛, 崔宗均, 李建平, 等. 不同发酵类型青贮菌制剂对青贮发酵的影响[J]. 草业学报, 2005, 14(3): 67-71
- [11] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 等. 乳酸菌复合系 SFC-2 处理水稻秸秆的效果[J]. 环境科学, 2007, 28(6): 1392-1396
- [12] 刘晶晶. 高温发酵与乳酸发酵相衔接的秸秆饲料化技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2012: 20
- [13] Hu W, Schmidt R J, McDonell E E, et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(8): 3907-3914
- [14] Walker M, Zhang Y, Heaven S, et al. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(24): 6339-6346
- [15] Beuth Verlag. VDI standard procedures 4630: Fermentation of organic materials. Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests[S]. Berlin: Verein Deutscher Ingenieure, 2006: 92
- [16] Porter M G, Murray R S. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by different analytical methods[J]. Grass and Forage Sci, 2001, 56(4): 405-411
- [17] Pahlow G, Muck R E, Driehuis F, et al. Microbiology of ensiling[C]//Buxton D R, Muck R E, Harrison J H. Silage Science and Technology. American Society of Agronomy, Inc, Crop Science Society of America, Inc, Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wisconsin, USA, 2003: 31-35
- [18] Pahlow G, Muck R E. Managing for improved aerobic stability[C]// Broderick G A. Proceedings of the 15th International Silage Conference. Madison: American Society of Agronomy, Inc, 2009: 77-90
- [19] Elferink S J, Krooneman J, Gottschal J C, et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 125-132
- [20] Buswell A M, Mueller H F. Mechanism of methane fermentation[J]. Ind & Eng Chem, 1952, 44: 550-552
- [21] Lee C, Kim J, Hwang K, et al. Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters[J]. Water Research, 2009, 43(1): 157-165
- [22] Pieper B, Korn U. Influence of lactic acid and acetic acid in corn silage on biogas production and conclusions for the application of silage additives[C]//Jambor V, Jamborová S, Vosynková B, et al. 14th International Symposium on Forage Conservation. Brno: Czech Republic, 2010: 117-118
- [23] Kung L, Stokes M R, Lin C J. Silage Science and Technology[M]. Madison: Soil Science Society of America, Inc, 2003: 305-360
- [24] McInerney M J, Gieg L M. An overview of anaerobic metabolism[C]//Nakano M M, Zuber P. Strict and facultative anaerobes: Medical and environmental aspects. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004: 27
- [25] Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, et al. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: A novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(13): 4326-4331

责任编辑: 袁文业