

文章编号:0254-0096(2016)07-1650-06

高温液态水处理杂交狼尾草提高总糖收率

刘 静^{1,2}, 余 强¹, 庄新姝¹, 袁振宏¹, 王 闻¹

(1. 中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源重点实验室, 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 广州 510640; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 以杂交狼尾草为原料,采用高温液态水预处理方法研究其对能源草酶解效果的影响。研究表明:180 ℃,40 min,固液比1:20,饱和蒸汽压的水解条件为最优预处理条件,此时总木糖收率为98.09%。高温液态水可降解87.99%的半纤维素和41.28%的木质素;破坏原本平整的表面,使更多的纤维素裸露,使纤维素结晶指数增大,破坏纤维素、木质素中的化学基团(如分子内与分子间氢键等),这些变化均有利于后续酶解。当加酶量为40 FPU/g,杂交狼尾草72 h时的酶解率由62.50%提高到99.36%,高温液态水和酶解后总糖收率达到90.40%。

关键词: 杂交狼尾草; 高温液态水; 酶解率; 能源草

中图分类号: TK6

文献标识码: A

0 引 言

木质纤维素原料转化为燃料乙醇需将多糖类高聚物(纤维素和半纤维素)水解,获得以木糖、葡萄糖为主的糖类产物,构建糖平台。当前酶法为主要糖平台构建方法,但其复杂结构不利于纤维素酶与底物的接触,导致酶解效率较低,需在酶解之前进行一定的预处理。预处理方法有很多种,其中高温液态水^[1-3]是在高于水饱和蒸汽压下,使水在160~240 ℃内保持液体状态时处理生物质的一种方法,该法无需其他化学试剂,过程高效环保,可将半纤维素有效水解为以低聚木糖为主的糖类产物。

能源草(指纤维素类草本能源植物)具有多年生、抗性强、光能利用效率高、种植成本低、生态效益好和适宜在边际土地上种植等优点,被认为是最具开发利用前景的能源植物之一^[4-6]。但目前鲜有文献报道利用高温液态水处理能源草提高其总糖收率、酶解率。杂交狼尾草是以美洲狼尾草(*Pennisetum americanum*)Tift23A不育系为母本,以象草N51为父本配制而成的三倍体杂种。本研究以杂交狼尾草为原料,研究其经高温液态水水解的条件优化并考察最优水解条件下水解前后的酶解

性能和结构变化,以期为杂交狼尾草生产燃料乙醇的工业化应用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材 料

杂交狼尾草采自广东省广州市增城试验地,于2011年5月播种,实验所用原料为2013年9月2日采集的第2年第1茬刈割鲜草。从实验地刈割取回后,将其切成3~4 cm的小段,在粉碎机中粉碎约2 min,于80 ℃烘箱中烘干至恒重备用。

纤维素酶购于宁夏和氏璧生物技术有限公司,其滤纸酶活为151.7 FPU/g。

0.2 mol/L 醋酸/醋酸钠缓冲溶液:取11.484 g醋酸钠和3.54 mL的醋酸溶于1 L去离子水中,调pH值为4.8±0.05备用。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 预处理方法

将一定量烘干至恒重的原料置于间歇搅拌水解装置釜中^[3],加入对应固液比体积的蒸馏水,混合均匀后密闭反应釜,开始加热,程序升温至反应温度后,开启搅拌,开始计时,到达反应时间后停止搅

收稿日期:2014-06-12

基金项目:广东省科技计划(2014A010106023);国家自然科学基金(21476233);广东省自然科学基金重点项目(2015A030311022);广州市珠江科技新星专项;中国科学院青年创新促进会(2015289)

通信作者:庄新姝(1970—),女,博士、研究员,主要从事纤维素乙醇方面的研究。zhuangxs@ms.giec.ac.cn

拌,打开釜下阀门取水解液,向釜内充入一定量冷水保护残渣,使温度降至 100 ℃以下,待釜体冷却至室温后取出残渣,清洗反应器。水解液置于 4 ℃以下保存待分析,水解残渣-10 ℃冷冻保存。

1.2.2 酶解方法

将原料及不溶性预处理残渣按 5%底物浓度置于醋酸/醋酸钠缓冲液中(pH 值为 4.8,依据残渣含水率进行计算),加入 0.1%(100 μL/100 mL 酶解体系)的叠氮化钠防止微生物生长,按照 20、40 FPU/g 底物的量加入纤维素酶,在 50 ℃,150 r/min 摇床中酶解 72 h,每 24 小时取样一次。

1.3 分析方法及计算公式

1.3.1 分析方法

参考美国可再生能源实验室标准测定方法(LAP, NREL)^[7],经本实验室^[8]改进后测定葡聚糖(表示纤维素)、木聚糖(表示半纤维素)等成分;采用场发射扫描电镜(S4800, Hitachi)进行表面形态观察;结晶指数利用 X 射线衍射仪(PW3040/60, Philips, Holand)测量;采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, TENSOR27, Bruker)对样品进行红外光谱分析。

采用高效液相色谱(HPLC, Waters 2498)测定预处理及酶解液中的木糖及葡萄糖含量,测定条件为:Shodex sugar SH-1011 色谱柱,柱温 50 ℃,以 0.005 mol/L H₂SO₄为流动相,流量 0.5 mL/min,RI 检测器,温度为 50 ℃。

1.3.2 计算公式

$$\text{总木糖收率} = \frac{\text{水解液中总木糖质量}}{\text{原料中总木糖质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{酶解率} = \frac{\text{酶解液中葡聚糖质量}}{\text{酶解底物中葡聚糖质量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{脱除率} = \frac{\text{原料该组分质量} - \text{残渣该组分质量}}{\text{原料总质量}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{总糖收率} = \frac{\text{水解液及酶解液中总糖质量}}{\text{原料中总糖质量}} \times 100\% \quad (4)$$

纤维素的结晶指数(Crystallinity Index, *CrI*)指纤维素构成的结晶区占纤维素整体的比率,其计算公式为:

$$CrI = \frac{I_{\text{crystalline}(002)} - I_{\text{amorphous}}}{I_{\text{crystalline}(002)}} \times 100\% \quad (5)$$

式中,*CrI*——结晶指数,%;*I*_{crystalline(002)}——结晶区的强度(2θ=22°);*I*_{amorphous}——非结晶区强度(2θ=18°)。

2 结果与分析

2.1 预处理工艺优化

以水解液中木糖浓度及收率、副产物浓度作为评价指标,考察反应时间(0~60 min)、反应温度(140~200 ℃)以及固液比(1:20、1:15、1:10)对预处理效果的影响,以期获得较优工艺。

2.1.1 反应时间和温度的影响

参照文献报道中针对甘蔗渣^[3]等生物质原料的实验结果,选择在饱和蒸汽压,底物浓度 5%条件下,进行不同反应时间和温度对杂交狼尾草预处理总糖收率和副产物的影响实验,结果如图 1 所示。

由图 1 可看出,在 140 ℃下,虽然总木糖收率随时间的延长而增大,最高仅为 19.57%,水解液中木糖主要是以单糖形式存在,含量约为 1 g/L;160 ℃时,总糖收率随时间的延长不断增大,60 min 时为 65%,在整个过程中,水解液中木糖含量约为 1 g/L,并随水解时间的延长略有下降,30 min 开始有低聚木糖产生,且含量不断增大;180 ℃时,随着水解时间的延长,总木糖收率先增大后减小,40、50 min 时,收率接近 100%,总木糖浓度分别为 8.32、8.46 g/L。一开始木糖以单糖和低聚糖的形式存在,其中单糖从 40 min 的 1.01 g/L 升至 60 min 的 2.62 g/L,而低聚木糖含量迅速增大后减小,笔者认为半纤维素中的一部分较易降解,另一部分需要剧烈条件才能水解成低聚木糖,整个过程中低聚木糖降解成木糖,使单糖含量增大,而木糖又会生成酸类和醛类副产物,这是个动态平衡的过程;200 ℃时总木糖收率从 10 min 的 89.08%急剧下降到 60 min 的 4.07%。总体而言,说明高温液态水水解过程中温度是最重要的因素。低温条件下,水蒸气对物料水解的作用有限,需要较长的时间才能提高半纤维素的降解效果,而当温度为 200 ℃时,因高温致使木糖剧烈降解,副产物含量增大,表明温度的影响最大。考虑木糖收率,副产物生成及能耗等因素,选取 180 ℃的 40 min 为最佳预处理时间和温度,并作为后续试验条件。

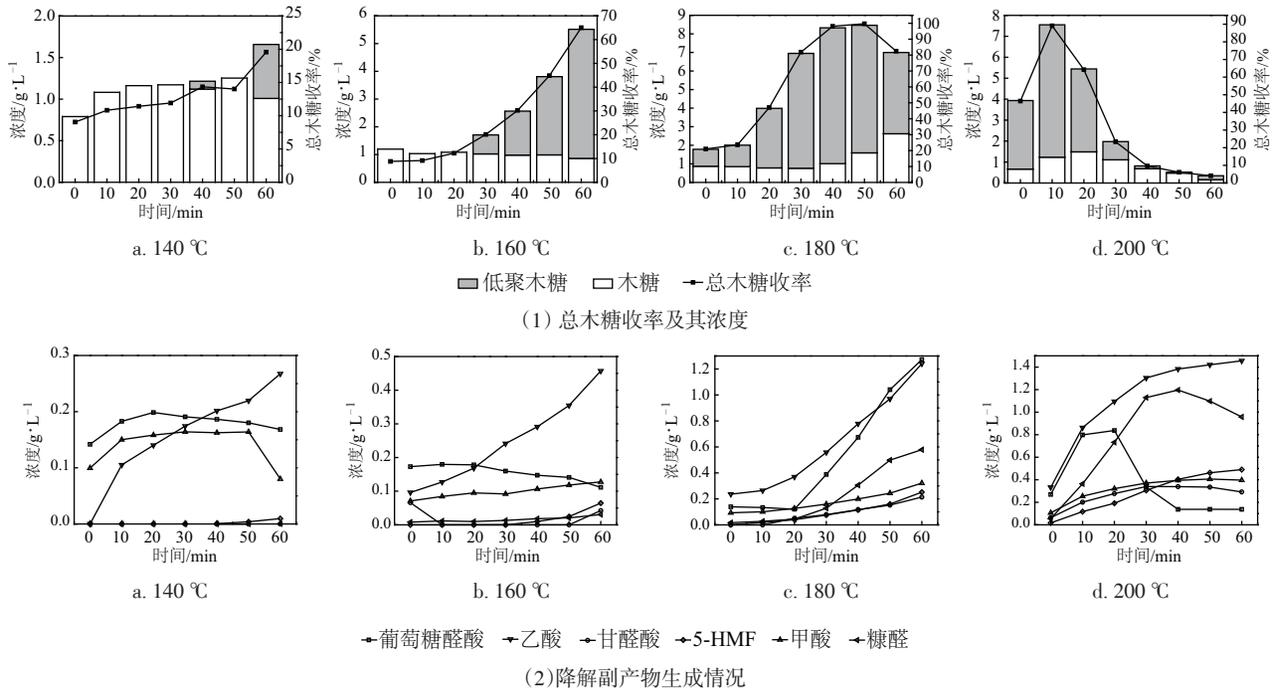


图1 预处理时间和温度对水解液中总木糖收率及其浓度的影响及对降解副产物生成情况的影响
 Fig. 1 Effect of residence time and temperature for LWH pretreatment on the yield of total xylose in the liquid fractions & by-products in the liquid fractions

2.1.2 固液比的影响

由前文实验结果确定 180 °C、40 min 下能获得最为理想的处理效果,针对固液比的实验在该条件下进行,分别考察 1:20、1:15、1:10 固液比条件下的水解实验,考察其影响。图 2 为不同固液比条件下木糖回收率及副产物生成情况的对比图。180 °C、40 min 饱和蒸汽压下,3 种不同固液比的水解液中总糖浓度很高,但 1:20 时能源草的水解效果最好,木糖回收率最高,且副产物浓度最低,究其原因高固液比时副产物的浓度高,反馈抑制了半纤维素的水解,导致其木糖回收率低。

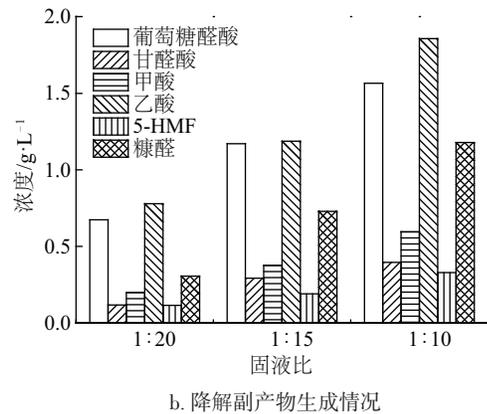
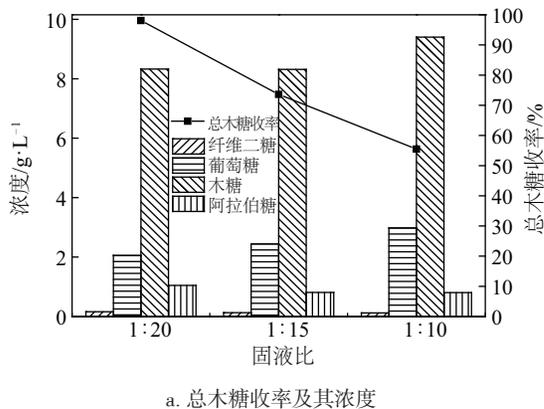


图2 固液比对水解液中总木糖收率及其浓度(a)和降解副产物生成情况(b)的影响

Fig. 2 Effect of solid loading for LWH pretreatment on the yield of total xylose(a) and by-products(b) in the liquid fractions

2.2 预处理对杂交狼尾草成分及结构的影响

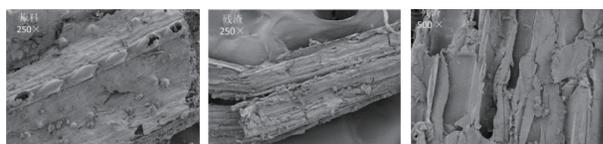
通过对杂交狼尾草的成分分析,剖析其组织结构特点,进行高温液态水预处理工艺的研究,可为能源草的乙醇化提供启示。表 1 给出了其在 180 °C、40 min、固液比 1:20,饱和蒸汽压的预处理条件下的组分变化情况。经高温液态水水解后,半纤维素的脱除率达 87.99%,木质素的脱除率为 41.28%,此外 12.62%的纤维素发生降解。

表1 杂交狼尾草高温液态水预处理物料平衡计算
Table 1 Composition of liquid hydrolysate and solid residues

底物	预处理 ^a							酶解率 ^b /%	总糖收率/%	结晶指数/%
	残渣剩余/%	葡聚糖/%		木聚糖/%		酸不溶木质素/%				
		液体	固体	液态	固体	脱除率	固体			
原料	100.00	—	31.70	—	18.74	—	20.14	62.50	46.90	48.40
残渣	43.41	4.00	22.98	16.49	2.69	41.28	11.83	99.36	90.40	62.01

注:a. 基于未处理原料的干重;b. 酶解条件为固液比 1:20, 72 h, 40 FPU/g 的加酶量。预处理条件: 180 °C, 40 min, 固液比 1:20, 饱和蒸汽压。

通过 SEM 电镜扫描能直接观察到预处理前后表面形态的变化, 如图 3 所示。原料中纤维素分子链长方向彼此平行聚集, 表面平整, 经高温液态水预处理后其平整结构被破坏, 有明显的长束状纤维素结构裸露, 纤维素与纤维素之间的缝隙进一步扩大, 并有明显的褶皱和裂孔结构, 这有利于纤维素酶和纤维素的接触。



a. 原料(250×) b. 残渣(250×) c. 残渣(500×)

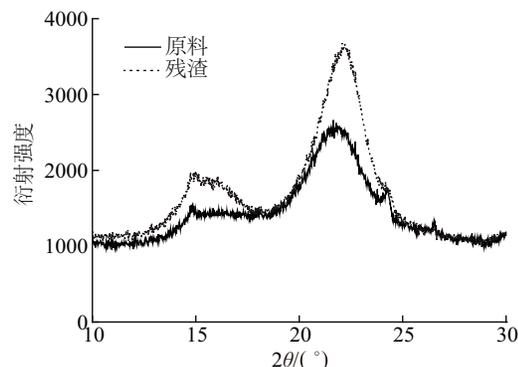
图3 杂交狼尾草原料和高温液态水残渣的电镜观察图片

Fig. 3 SEM micrographs of raw material and its LWH pretreated residues

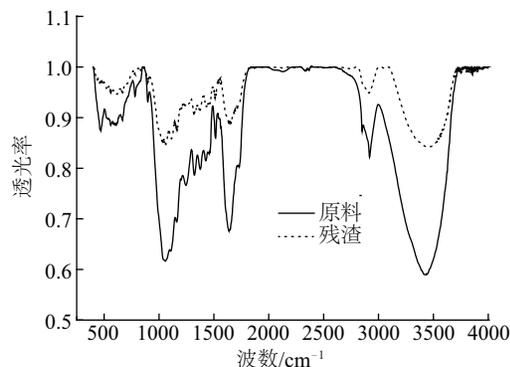
一般说来天然纤维素分为两种类型(I_a 和 I_b), 分别为一个链的三斜单元晶胞和两个链的三斜单元晶胞^[9]。狼尾草的 X 射线衍射图(图 4a)形状显示其纤维素为典型的 I_a 型纤维素, 且预处理未改变其结晶类型。 $2\theta=15.9^\circ$ 处代表非结晶部分, 主要是半纤维素和木质素的峰谱; $2\theta=22^\circ$ 处代表结晶部分, 主要是 I_a 型纤维素的峰谱; $2\theta=18^\circ$ 处代表非结晶纤维素的峰谱。经高温液态水水解后, 狼尾草在 $2\theta=18^\circ$ 处的衍射强度变化不大, 其他两个衍射峰处强度有一定程度的增强, 计算结晶指数(结果列于表 1)后发现其值变大, 说明高温液态水后半纤维素和木质素的降解使更多的纤维素暴露, 印证了前面 SEM 的分析结果。

此外, 预处理后物料的化学基团也会发生变化, 结果见图 4b, 其中特征峰对应的化学基团见表 2。透光率越大说明化学基团对红外的吸收强度越小, 反之则越大。从图 4 中可看出, 杂交狼尾草高温液态水处理前后红外吸收变化很大, 但主要峰谱位置大致相同, 说明预处理后的残渣仍具有纤维素的结构和性质。在 $3000\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 范围内的谱带

是 O—H 键的特征吸收峰, 主要由以下几类振动共同引起^[10,11]: $3450\sim 3570\text{ cm}^{-1}$ 处是由羟基基团氢键的摇摆振动引起的; $3410\sim 3455\text{ cm}^{-1}$ 和 $3340\sim 3375\text{ cm}^{-1}$ 处分别是由 $O(2)H\cdots O(6)$ 和 $O(3)H\cdots O(5)$ 分子内氢键引起的; $3230\sim 3310\text{ cm}^{-1}$ 处则是由 $O(6)H\cdots O(3)$ 分子间氢键引起的。羟基基团主要存在于纤维素中。从图 4 中可看出, 物料在 $3000\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 内的透射带变窄, 说明高温液态水破坏了纤维素中的分子内和分子间氢键, 相对原料透射强度明显增强, 纤维素分子更易断裂水解, 从而酶解效率更高。



a. X 射线衍射图



b. 傅里叶红外光谱图

图4 杂交狼尾草原料和高温液态水残渣的 X 射线衍射图(a)和傅里叶红外光谱图(b)

Fig. 4 XRD (a) and FTIR (b) of raw material and its LWH pretreated residues

此外,在 904 ~ 1635 cm^{-1} 范围内的透射带较多,杂交狼尾草在该范围内透射强度明显增加,这可能是由于蛋白质或来源于半纤维素和木质素的基团被降解所引起的。

表 2 红外特征峰的归属

Table 2 Peak wave numbers of bands and their assignments

波数/ cm^{-1}	归属
3000~3600	O—H 伸展振动
2850	— CH_2 — 不对称的伸展振动
1633	吸附水的 O—H 弯曲振动
1462	甲基或亚甲基 C—H 变形振动
1384	甲基 C—H 变形振动
1257	C—O 伸展振动, C=O 摇摆振动
1159	吡喃糖环的 C—O—C 伸展振动或脂族基团 C=O 伸展振动
1112	芳环不对称的摇摆振动
1060	二级醇或脂肪族醚类中的 C—O 变形振动
987~993	C=O 摇摆振动
904~908	芳环平面外的 C—H 伸展振动
897	异化区 β -键的吸收
400~700	C—C 伸缩振动

2.3 酶 解

将杂交狼尾草在 180 $^{\circ}\text{C}$ 、40 min、固液比 1:20、饱和蒸汽压条件下预处理所得的残渣和原料进行酶解糖化实验以进一步评价预处理的效果,其酶解结果如图 5 所示。原料的酶解率在 24 h 后随时间的变化并不明显,而水解残渣的酶解率始终随着时间的延长而增大;当加酶量为 20 FPU/g,杂交狼尾草残渣 72 h 时的酶解率由原料的 42.18% 提高到 84.27%,40 FPU/g 时残渣酶解率由原料的 62.50% 提

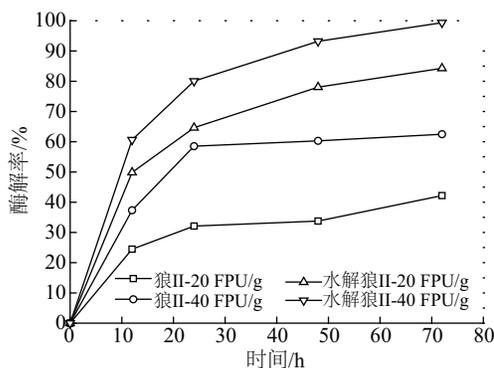


图 5 杂交狼尾草原料及其高温液态水残渣的酶解率

Fig. 5 Enzymatic digestibility of raw material and its LWH pretreated residues

高到 99.36%, 得到充分酶解。能源草中研究最多的是柳枝稷, 文献报道^[12]中, 在 200 $^{\circ}\text{C}$ 、1.45 MPa 条件下水热预处理 10 min, 49 FPU/g 纤维素酶酶解 48 h, 叶子的酶解率为 77.4%, 茎秆为 44.9%。通过本研究发现高温液态水能显著提高杂交狼尾草的酶解效果, 经组分和结构变化分析, 其可能的原因是大部分半纤维素和部分木质素的去除使物料表面的平整结构发生变化, 使更多的纤维素裸露出来, 增大了与纤维素酶的接触面积。

3 结 论

1) 高温液态水能显著提高杂交狼尾草糖类物质的回收率, 其中 180 $^{\circ}\text{C}$ 、40 min、固液比 1:20、饱和蒸汽压的水解条件为最优预处理条件, 此时总木糖收率为 98.09%。当加酶量为 40 FPU/g, 杂交狼尾草 72 h 时的酶解率由 62.50% 提高到 99.36%, 经高温液态水预处理和酶解后, 总糖收率达到 90.40%。

2) 高温液态水可降解 87.99% 的半纤维素和 41.28% 的木质素; 破坏原本平整的表面, 使更多的纤维素裸露出来, 使纤维素结晶指数升高, 破坏纤维素中的分子内和分子间氢键等化学基团, 这些变化均有利于后续酶解。

[参考文献]

- [1] Garrote G, Domínguez H, Parajó J C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials[J]. *Holz als Rohstoffwerkstoff*, 1999, 57(3): 191—202.
- [2] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Stepchange flow rate liquid hot water pretreatment of sweet sorghum bagasse for enhancement of total sugars recovery[J]. *Applied Energy*, 2011, 88(7): 2472—2479.
- [3] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Lyu Shuangliang, et al. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129(2): 592—598.
- [4] Lewandowska I, Scurlockb J M O, Lindvalle E, et al. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 25(4): 335—361.
- [5] 谢光辉, 卓岳, 赵亚丽, 等. 欧美根茎能源植物研究现状及在我国北方的资源潜力[J]. *中国农业大*

- 学学报, 2008, 13(6): 11—18.
- [5] Xie Guanghui, Zhuo Yue, Zhao Yali, et al. Review of rhizomatous energy plants studied in the America and Europe and its potential resource in North China [J]. Journal of China Agricultural University, 2008, 13(6): 11—18.
- [6] 解新明, 周 峰, 赵燕慧, 等. 多年生禾草的产能和生态效益[J]. 生态学报, 2008, 28(5): 2329—2342.
- [6] Xie Xinming, Zhou Feng, Zhao Yanhui, et al. A summary of ecological and energy-producing effects of perennial energy grasses[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(5): 2329—2342.
- [7] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. Technical Report NREL/TP-510-42623, 2008.
- [8] 高月淑, 许敬亮, 张志强, 等. 甘蔗渣高温同步糖化发酵制取燃料乙醇研究[J]. 太阳能学报, 2014, 35(4): 692—697.
- [8] Gao Yueshu, Xu Jingliang, Zhang Zhiqiang, et al. Bio-ethanol production by high temperature simultaneous saccharification and fermentation of bagasse[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2014, 35(4): 692—697.
- [9] Hinterstoesser B, Salmén L. Two-dimensional step-scan FTIR: A tool to unravel the OH-valency-range of the spectrum of cellulose I [J]. Cellulose, 1999, 6(3): 251—263.
- [10] Oh S Y, Yoo D I, Shin Y, et al. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(15): 2376—2391.
- [11] Schwanninger M, Rodrigues J, Pereira H, et al. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FTIR spectra of wood and cellulose [J]. Vibrational Spectroscopy, 2004, 36(1): 23—40.
- [12] Hu Zhoujian, Ragauskas Arthur J. Hydrothermal pretreatment of switchgrass [J]. Industrial and Engineering Chemistry Research, 2011, 50(8): 4225—4230.

LIQUID HOT WATER PRETREATMENT OF *Pennisetum hybrid* TO ENHANCE SUGAR RECOVERY

Liu Jing^{1,2}, Yu Qiang¹, Zhuang Xinshu¹, Yuan Zhenhong¹, Wang Wen¹

(1. Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. University of Chinese Academic of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The effects of liquid hot water on enzymatic digestibility of *Pennisetum hybrid* were investigated in this paper. The results indicated that 180 °C, 40 min, 1:20 ratio of solid to liquid and saturated vapor pressure were the optimal pretreatment conditions, whose total yield of xylose researched 98.09%. After liquid hot water pretreatment, 87.99% of hemicellulose and 41.28% lignin were degraded; The flat surface was damaged, more fibers exposed, the crystallinity index increased, the chemical groups in cellulose and lignin were destroyed like hydrogen bonding, which all helped the subsequent enzymatic hydrolysis. 72 h enzymatic digestibility increased from 62.50% to 99.36% under the enzyme loading of 40 FPU/g, and the total sugar recovery reached 90.40% when combined the pretreatment and enzymatic hydrolysis process.

Keywords: *Pennisetum hybrid*; liquid hot water; enzymatic digestibility; energy crops