

文章编号:0254-0096(2016)04-0991-06

高温液态水耦合氨法预处理提高甘蔗渣酶解率

余强, 庄新姝, 亓伟, 袁振宏, 王闻, 王琼

(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, 广州 510640)

摘要: 为了提高甘蔗渣的酶解率和总糖收率, 设计高温液态水耦合氨法预处理方法。与单一高温液态水预处理相比, 耦合预处理木质素脱除率从 23.12% 提高至 75.36%, 残渣酶解率从 77.96% 提高至 97.99%, 总糖收率从 81.30% 提高至 87.85%。耦合处理后甘蔗渣原料紧密有序的纤维结构被破坏得更厉害, 细胞壁各层界线难以区分, 其中耦合处理第一步反应对残渣表面形态和细胞超微结构影响较大, 随后第二步脱木质素或者脱半纤维素效果减弱。梯度酶解试验表明, 原料中木质素的脱除对于减少加酶量和提高酶解率至关重要。

关键词: 预处理; 高温液态水; 氨水; 甘蔗渣; 酶解

中图分类号: TK6

文献标识码: A

0 引言

木质纤维素原料细胞壁中天然纤维素与半纤维素、木质素等组分形成了极其复杂的三维结构, 这种通过化学键、氢键、疏水作用等形成的致密结构严重阻碍了微生物的转化。通过预处理技术打破紧密的纤维素-半纤维素-木质素结构, 增大物料表面孔径和表面积, 有利于提高生物质纤维素酶解率及后续微生物的多糖利用率^[1]。易工业化的预处理方法主要有化学法(酸法^[2]、碱法^[3]和有机溶剂法^[4]等)和热处理法(高温液态水法^[5-7]和蒸汽爆破法^[8]等)。本实验室前期研究结果发现, 原料中半纤维素和木质素组分的去除均能提高残渣纤维素酶解率^[9]。而单一预处理方法大多仅对一种组分具有特异性, 如酸法等低 pH 值预处理条件下, 半纤维素会发生溶解, 生成低聚糖或单糖, 而木质素会以盐分的形式溶于高 pH 值环境中^[10]。在众多的预处理方法中, 高温液态水法无需添加任何化学试剂, 而且对半纤维素具有很好的水解效果, 而氨法处理不仅可脱除大部分的木质素, 而且可回收挥发氨。

本文以甘蔗渣为原料, 结合高温液态水和氨水处理的优点, 设计耦合预处理工艺, 通过对比耦合方式以及耦合前后物料固体表面形貌、超微结构、

细胞壁化学组分分布、酶解率和糖收率等, 揭示耦合预处理机理及其对纤维素酶解的影响机制, 为该方法的推广及工业化应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

甘蔗渣由广西凭祥丰浩酒精有限公司提供, 为甘蔗压榨制糖后的残余物, 粉碎至 20~80 目, 于 80 °C 烘焙 24 h 以上至恒重备用。原料组分采用美国可再生能源实验室标准方法(LAP, NREL)进行测定, 含有葡聚糖 38.95%、木聚糖 19.69%、酸不溶木质素 24.70%、水-乙醇提取物 6.55%、其他组分 10.11%。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 234 FPU/g。

1.2 预处理方法

预处理实验装置主要由反应系统、收集系统和控制系统组成^[11]。具体操作步骤为: 将甘蔗渣和去离子水以固液比 1:20 加入到搅拌反应器中并加热, 180 °C, 4 MPa 时开启搅拌(500 r/min), 计时反应 20 min, 完成高温液态水预处理, 收集固体和液体样品进行分析; 对于耦合预处理过程, 取高温液态水处理残渣, 按照固液比 1:10 加入 25% 氨水, 混合均匀后密闭反应釜, 在 160 °C, 2 MPa 条件下反应 1 h,

收稿日期: 2014-04-04

基金项目: 国家自然科学基金(21476233; 21206163); 广东省科技计划(2014A010106023); 中国科学院青年创新促进会(2015289)

通信作者: 袁振宏(1953—), 男, 研究员、博士生导师, 主要从事生物质能利用方面的研究。yuanzh@ms.giec.ac.cn

得到高温液态水-氨法预处理样品。氨法-高温液态水预处理过程为将上述两步反应顺序调换,反应结束后收集残渣备用,进行含水率及成分分析。

1.3 残渣酶解方法

将甘蔗渣原料及不溶性预处理残渣按照 5% 底物浓度置于柠檬酸钠缓冲液(pH 值为 4.8)中,加入 0.2% 叠氮化钠抑制微生物生长,添加纤维素酶后,在 50 ℃ 摇床(转速 150 r/min)中酶解 72 h。酶解率计算公式为:

$$Y_d = \frac{m_g \times 0.9}{m_{lg}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, Y_d ——酶解率, %; m_g ——酶解液中葡萄糖质量; m_{lg} ——预处理后残渣中葡聚糖的质量。

1.4 分析方法

1.4.1 糖浓度分析

预处理液及酶解液中单糖浓度用 HPLC waters2695 检测,采用 Shodex sugar SH-1011 柱,以 0.005 mol/L H_2SO_4 为流动相,流量 0.5 mL/min, RI 检测器。预处理液中总糖浓度以用 4% H_2SO_4 在 121 ℃ 下二次水解其中低聚糖 1 h 后的 HPLC 分析结果计算。

1.4.2 电镜分析方法

扫描电镜分析方法:样品经干燥后在真空条件下喷金,通过场发射扫描电镜(Hitachi, S-4800)在 2.0 kV 加速电压下获得影像。

透射电镜测定方法:选取代表性试样经梯度乙醇脱水浸透后包埋于 Spurr's 的低粘度树脂中,在 Leica Ultramicrotome(EM-UC6)型超薄切片机上切片(100 nm),将切片用 1% $KMnO_4$ 溶液室温下染色 10 min,烘干后在 JEM-100CX 型透射电镜上观察细胞壁各层特征,加速电压 100 kV。

1.4.3 拉曼光谱分析方法

将固体物料样品切片至 1 μm 厚度,置于 1.0% 硼氢酸钠溶液浸泡 5 min 去除荧光,采用法国 HORIBA JOBIN YVON 公司的 LabRam ARAMIS 型激光共聚焦拉曼光谱仪对样品进行分析,激发波长为 532 nm,由 CCD-7949 检测器探测。将包埋块横切片切成厚度为 2 μm 的切片,固定于载玻片上,置于拉曼显微镜下进行观察分析,采用 50 倍物

镜,拉曼光谱测试范围为 300~3500 cm^{-1} ,用单晶硅拉曼图谱进行谱线校准,单点采集时间 20 s,采集两次,滤波器 D0.6,空隙为 400 μm ,狭缝宽度为 200 μm 。

1.4.4 结晶指数分析方法

采用荷兰帕纳科公司 X' Pert Pro MPD (PW3040/60)型 X 射线衍射仪进行分析测定,测试条件为:反射法,Cu 靶,电压 40 kV,电流 40 mA,扫描范围 5°~80°。结晶指数(Crystallinity Index, CrI)计算公式为:

$$CrI = \frac{I_{crystalline(002)} - I_{amorphous}}{I_{crystalline(002)}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, CrI ——结晶指数, %; $I_{crystalline(002)}$ ——结晶区的强度($2\theta=22^\circ$); $I_{amorphous}$ ——非结晶区强度($2\theta=18^\circ$)。

2 结果与讨论

2.1 高温液态水耦合氨法预处理

通过表 1 分析可知,高温液态水和氨水预处理分别主要溶解甘蔗渣中的半纤维素和木质素组分,通过两种方法优势互补,可实现纤维素酶解率和总糖收率的提高。高温液态水预处理后甘蔗渣木质素脱除率为 23.12%,经第二步氨法预处理木质素脱除率升高至 75.36%,残渣 72 h 酶解率由 77.96% 提高至 97.99%,同时总糖收率由 81.30% 提高至 87.85%;而氨法预处理残渣经过第二步高温液态水预处理进一步脱除半纤维素后,酶解率增幅不大,从 98.49% 增至 99.70%,第二步高温液态水能回收一定的木聚糖故总糖收率有所增大。对不同预处理残渣的结晶指数进行测定,高温液态水-氨法残渣结晶指数为 63.92%,高于单一高温液态水预处理残渣(54.08%),而氨法-高温液态水处理所得残渣结晶指数为 66.45%,也高于单一氨法预处理所得残渣结晶指数(64.97%),可见结晶指数与半纤维素及木质素脱除成正相关。

综合而言,甘蔗渣第一步采用高温液态水可回收其中的木聚糖,并通过脱除半纤维素破坏纤维素-半纤维素-木质素复杂结构,经第二步氨法脱除对纤维素酶有吸附作用的木质素,进一步提高了残渣的酶解率,其中氨可回收利用,过程绿色环保。

表1 不同预处理条件下甘蔗渣化学组分及结晶指数变化

Table 1 Chemical comparison and crystallinity index of different pretreated sugarcane bagasse

| 条件 | 残渣/% | 预处理过程 ^a | | | 纤维素 酶解率/ % | 木糖 收率 ^b / % | 葡萄糖 收率 ^b / % | 总糖 得率 ^c / % | 结晶 指数/ % |
|----------|--------|--------------------|--------------|--------------|------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| | | 葡聚糖 保留率/% | 木聚糖 脱除率/% | 木质素 脱除率/% | | | | | |
| 未处理蔗渣 | 100.00 | — | — | — | 15.72 | 5.36 | 15.72 | 11.90 | 48.46 |
| 高温液态水 | 61.39 | 97.25 | 86.54 | 23.12 | 77.96 | 81.65 | 81.12 | 81.30 | 54.08 |
| 氨法 | 55.38 | 87.48 | 47.68 | 83.96 | 98.49 | 46.33 | 86.15 | 71.47 | 64.97 |
| 高温液态水-氨法 | 48.68 | 93.38 | 86.91 | 75.36 | 97.99 | 78.22 | 92.06 | 87.85 | 63.92 |
| 氨法-高温液态水 | 49.40 | 84.68 | 60.87 | 86.36 | 99.70 | 63.78 | 84.43 | 76.82 | 66.45 |

注: 高温液态水预处理条件: 180 ℃, 4 MPa, 固液比 1:20, 20 min; 氨法处理条件: 氨水浓度 25%, 固液比 1:10, 160 ℃, 1 h;

a. 基于未处理甘蔗渣中的葡聚糖、木聚糖及木质素含量; b. 包含预处理水解液及酶解液中的葡萄糖和木糖; c. 基于未处理原料中的初始葡萄糖和木糖的总和。

2.2 残渣表面结构分析

图 1 为不同预处理残渣的表面形貌情况, 未处理甘蔗渣纤维结构紧密而严实(图 1a), 预处理后甘蔗渣纤维素-半纤维素-木质素组成的紧密结构明显改变, 同时比较单一高温液态水(图 1b)和高温液态水-氨法处理残渣(图 1d)发现, 二者形貌相似, 表面形成裂隙孔, 结构无序化; 而氨法-高温液态水预处理残渣(图 1e)也表现出氨法处理残渣的性状(图 1c), 其表面无明显孔状结构, 纤维表面呈膨胀态。

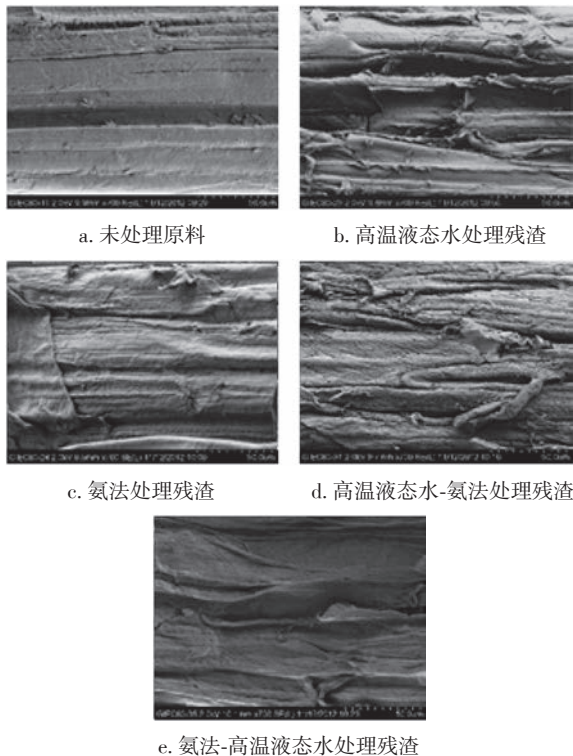


图1 甘蔗渣预处理前后的扫描电镜图(700倍)

Fig. 1 SEM of treated and untreated sugarcane bagasse (700×)

可见两步耦合过程中不同预处理方法的顺序对最终结果影响显著, 第一步预处理对残渣影响大于第二步。比较表 1 中两步耦合与一步处理过程中半纤维素和木质素的脱除效果可发现, 经第一步处理后, 第二步脱木质素或脱半纤维素效果减弱。

2.3 残渣超微结构分析

甘蔗渣样品切片后经 KMnO_4 特异性染色^[12-14]来追踪细胞壁中木质素的分布及预处理前后甘蔗渣细胞壁超微结构变化。图 2a 所示, 甘蔗渣原料细胞壁有明显的分层结构, 由外向内分为胞间层(CML)、初生壁层(P)、次生壁外层(S1)、次生壁中层(S2)及次生壁内层(S3)。初生壁层(P)很薄且与细胞其他层紧密相连很难分开, 它与相邻细胞的胞间层(ML)及初生壁层(P)一起构成的层称为复合胞间层(CML), 3 或 4 个细胞之间存在一个共有的区域, 称之为细胞角隅区(CC)。与 P 层相比, S 层较厚, 在图 2 上能很清楚地与其他层分辨出来, 其中 S3 层最厚。

经高温液态水法处理后, 甘蔗渣 CC 区及 CML 区染色加重, 而 S 区各层颜色变浅(图 2b), 说明预处理使 CC 区及 CML 区木质素相对含量升高, 而 S 区木质素含量减少。氨法预处理后, 细胞发生润涨, 由于木质素的大量脱除, 细胞壁各层颜色均变浅, 与未处理原料相比, 各层之间颜色差异性减小(图 2c)。与单一高温液态水处理残渣相比, 高温液态水-氨法处理残渣细胞壁(图 2d)经进一步脱除木质素后 CML 层及 S 层之间的差异性进一步减小, 次生壁各层分层也更不明显, 但细胞未明显润涨进一步证明两步耦合处理中第一步的作用大于第二

步。氨法预处理残渣进一步脱除半纤维素之后其细胞壁形态(图 2e)无明显变化。

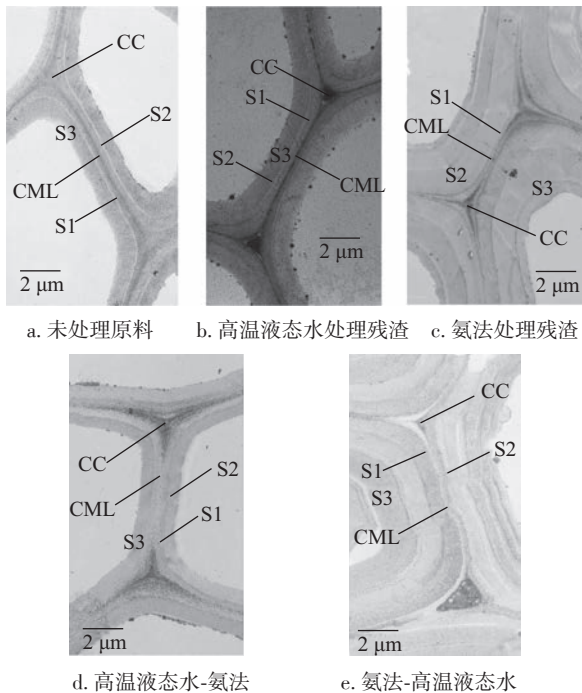


图2 甘蔗渣不同预处理方法所得残渣的透射电镜图

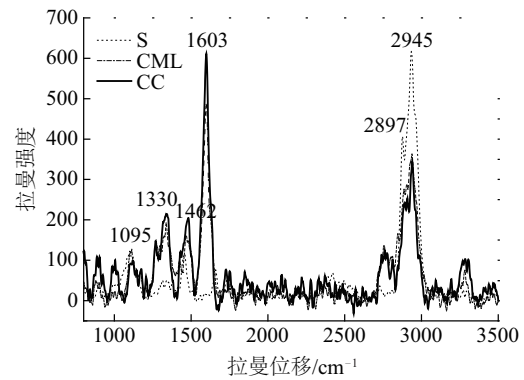
Fig. 2 TEM images of untreated and treated sugarcane bagasse

2.4 残渣化学组分分布分析

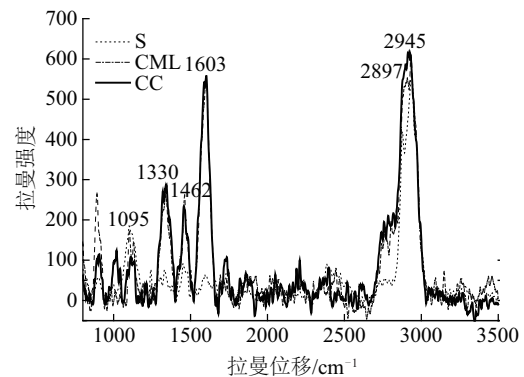
甘蔗渣预处理前后细胞壁各层化学组分分布规律采用拉曼光谱点扫的方法进行分析,谱图中纤维素的主要特征峰为 2897 cm^{-1} (C—H 和 H—C—H 伸缩振动) 和 1095 cm^{-1} (C—C 和 C—O 的伸缩振动), 而木质素特征峰主要在 1603 cm^{-1} (苯环对称伸缩振动) 和 1330 cm^{-1} (苯环 O—H 或 O—CH₃ 振动) 处, 1462 cm^{-1} 及 2945 cm^{-1} 处特征峰与纤维素及木质素均有关^[14]。

未处理甘蔗渣细胞壁各层拉曼光谱如图 3a 所示,纤维素特征峰强度顺序依次为:次生壁>复合胞间层>细胞角隅,表明在未处理甘蔗渣细胞壁中次生壁纤维素含量最高,细胞角隅纤维素含量最低。而与木质素特征峰强度顺序却与其相反,细胞角隅最高,表明该区域木质素浓度最高,复合胞间层信号强度略低于细胞角隅,次生壁信号强度最弱,表明木质素含量最低,可见木质素在甘蔗渣细胞壁中分布具有不均一性。分析图 3b 发现,经高温液态水-氨法预处理后,甘蔗渣样品细胞角隅和复合胞间层木质素特征峰强度接近,而纤维素特征峰在细胞

角隅、复合胞间层及次生壁强度差别不大。推测预处理后细胞壁各层之间化学组分分布的均质化可能是导致其残渣纤维素酶解率增加的直接因素。



a. 未处理原料



b. 高温液态水-氨法处理残渣

图3 预处理前后细胞壁各层的拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectrum of cell wall

2.5 残渣纤维素酶解

物料的酶解率不仅与底物特性相关,而且受酶的特性影响,酶添加量直接关系到酶解速率及最终酶解效率。为进一步考察加酶量与木质素(或半纤维素)的脱除关系,纤维素酶添加范围为 5~40 FPU/g 葡聚糖,如图 4 所示,高温液态水预处理残渣经氨法进一步脱除木质素后,随着加酶量的逐渐增大,残渣酶解率增大 4.8 倍,高于单一高温液态水增幅(3.4 倍)。相比而言,虽然氨法-高温液态水预处理较单一氨法预处理,木聚糖脱除率从 47.6%增至 60.8%,但在加酶量 5~40 FPU/g 葡聚糖的范围内,酶解率变化均不明显。除此之外,在加酶量较低(5~10 FPU/g 葡聚糖)的情况下,预处理残渣酶解率均低于 30%,这是由于木质素对酶分子不可逆吸附造成的^[15]。可见,木质纤维素生物质中木质素的脱除

或低木质素含量能源作物的培育,对于生物质生化炼制至关重要。

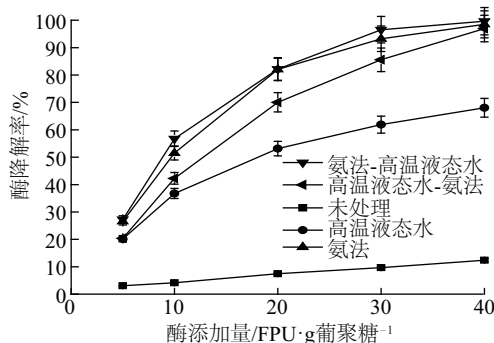


图4 不同加酶量情况下残渣酶解情况

Fig. 4 Enzymatic digestibility of residues for different pretreatment methods at different enzyme loadings

3 结 论

结合高温液态水和氨水优势,设计高温液态水耦合氨法预处理工艺,提到甘蔗渣酶解率至97.99%,总糖收率为87.85%。借助扫描电镜、透射电镜和拉曼光谱分析了预处理前后原料表面形貌及超微结构,推测预处理后细胞壁各层之间化学组分分布的均质化可能是导致其残渣纤维素酶解率增加的直接因素。而原料中木质素的脱除情况决定了纤维素酶的添加量和糖化效率,间接控制着纤维素乙醇、丁醇等生化炼制的成本。

[参考文献]

- [1] Hendriks A T W M, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10—18.
- [2] Cara C, Ruiz E, Oliva J M, et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1869—1876.
- [3] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18): 2026—2032.
- [4] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(6): 673—686.
- [5] 余 强, 庄新姝, 袁振宏, 等. 高温液态水两步预处理提高桉木酶解率[J]. *太阳能学报*, 2011, 32(8): 1129—1133.
- [5] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. of lignocellulosic biomass with liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance enzymatic digestibility of cellulose [J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2011, 32(8): 1129—1133.
- [6] 余 强, 庄新姝, 袁振宏, 等. 木质纤维素类生物质高温液态水预处理技术 [J]. *化工进展*, 2010, 29(11): 2177—2182.
- [6] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass with liquid hot water [J]. *Chemical Industry & Engineering Progress*, 2010, 29(11): 2177—2182.
- [7] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Step-change flow rate liquid hot water pretreatment of sweet sorghum bagasse for enhancement of total sugars recovery [J]. *Applied Energy*, 2011, 88(7): 2472—2479.
- [8] 陈洪章. 蒸汽爆碎技术原理及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [8] Chen Hongzhang. Principle and application of steam explosion technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- [9] Lye Shuangliang, Yu Qiang, Zhuang Xinshu, et al. The influence of hemicellulose and lignin removal on the enzymatic digestibility from sugarcane bagasse [J]. *Bioenergy Research*, 2013, 6(4): 1128—1134.
- [10] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Lye 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.
- [11] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4895—4899.
- [12] Saka S. Evaluation of the quantitative assay of lignin distribution by SEM-EDXA technique [J]. *Wood Science and Technology*, 1982, 16(1): 1—18.
- [13] Donohoe B S, Decker S R, Tucker M P, et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 1129—1133.

- 913—925.
- [14] Ma Jianfeng, Zhang Zhiheng, Yang Guihua, et al. Ultrastructural topochemistry of cell wall polymers in populus nigra by transmission electron microscopy and raman imaging[J]. *Bio Resources*, 2011, 6(4): 3944—3959.
- [15] Seiji N, Richard P C, Jack N S. The influence of lignin on the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass substrates. sustainable production of fuels, chemicals, and fibers from forest biomass [M]. USA: American Chemical Society, 2011.

COMBINED PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE WITH LIQUID HOT WATER AND AQUEOUS AMMONIA TO ENHANCE ENZYMATIC DIGESTIBILITY OF CELLULOSE

Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Qi Wei, Yuan Zhenhong, Wang Wen, Wang Qiong
(Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences,
Guangzhou 510640, China)

Abstract: A pretreatment combined liquid hot water and aqueous ammonia was investigated to improve the enzymatic digestibility and total sugar recovery of sugarcane bagasse. Compared with single liquid hot water pretreatment, the lignin removal was increased from 23.12% to 77.96%, the enzymatic digestibility of the residual solids was increased from 75.36% to 97.99% and the total sugar recovery was increased from 81.30% to 87.85% for combined pretreatment. The fibers of treated samples were separated from the initial connected structure and fully exposed, and the boundaries among the three layers in the secondary wall could not be exactly distinguished. Moreover, the first step in the combined pretreatment had a greater influence on the change of surface morphology and ultrastructural characteristics of the residual solids, and the removal of lignin and hemicellulose was weakened in the second step of the pretreatment. The results of enzymatic hydrolysis under different cellulose loading indicate that the delignification is very important for reducing the use of enzyme and improving the digestibility.

Keywords: pretreatment; liquid hot water; aqueous ammonia; sugarcane bagasse; enzymatic hydrolysis