

The New Technology of Highly Effective Pretreatment and Saccharification for the Cellulosic-Ethanol

Zhengguang ZHANG, Hui TIAN, Jingting TANG, Zhou ZHENG, Dachun GONG*

Alan G.Macdiarmid Research Institute of Renewable Energy, China Three Gorges University, Yichang, Hubei, 443002; China

*Corresponding author email: dchong_2004@163.com

Abstract: The L₁₆ (4⁵) orthogonal experiment were carried out with the five factors of the temperature. The pressure, the ratio of feedstock and water, the amount of alkali and the time for the pretreatment of the wheat stalk using the wet-oxidized explosion technology. The optimal wet-oxidized explosion process was obtained with the ratio of feedstock and water 1: 0.5, alkali 53g, 0.37×10⁶MPa, 160°C, 20min through the comparison of the sugar yield. The highly saccharification process was obtained through the study on the effect of the different metal ions and PEG on the enzymatic hydrolysis of cellulase. The technology can be up to the saccharification yield 96%. The sugar concentration 150g/L with the good foundation for the bioprocess of cellulose to produce fuel ethanol.

Keywords: cellulosic-ethanol; wet-oxidized explosion; high concentration substrate; highly effective saccharification

纤维素乙醇的高效预处理及糖化新技术

张争光, 田辉, 汤金婷, 郑州, 龚大春*

三峡大学 Alan G. Macdiarmid 再生能源研究所, 宜昌, 中国, 443002

*通讯作者邮箱: dchong_2004@163.com

摘要: 本文采用湿氧化爆破的新技术利用五个因素、四个水平 L₁₆ (4⁵) 正交实验对富含纤维素的麦秆进行了温度、压力、料水比、碱量、反应时间 16 种不同工艺的处理。通过糖化效果的比较, 得出最佳的湿氧化爆破工艺: 料水比 1: 0.5, 添加 53g 碱, 进氧压力 0.37×10⁶MPa, 在 160°C 反应温度下, 反应 20 分钟。以该优化工艺得到的爆破料为原料, 通过研究不同金属离子、PEG 对纤维素酶解过程的影响, 得到高底物浓度下的高效糖化工艺。该技术可以实现纤维素的糖化率达到 96%, 在底物达到 30% 的高浓度条件下, 糖浓度 150g/L, 为纤维素的生物加工和生产燃料乙醇奠定了良好的基础。

关键词: 纤维素乙醇; 湿氧化爆破; 高浓度底物; 高效糖化

1. 引言

汽车动力的部分替代品第二代燃料乙醇---纤维素乙醇, 于 2004 年起在美国进入工业化示范阶段。美国政府先后投入 3.85 亿美元支持建设了六个纤维素乙醇企业: Range 燃料公司、logen 生物炼制公司、Broin 公司、BlueFire 乙醇公司、Alico 公司和 Abengoa 生物能源公司。我国在“十一五”期间也开始在一些燃料乙醇企业进行 3000 吨规模的纤维素乙醇中试研究。

纤维素乙醇作为未来液态燃料的重要的石油替代

品, 由于其原料木质纤维素的蕴藏量巨大、可再生特点, 备受能源消耗大国的关注。但是在木质纤维素转化为乙醇的过程中面临着两大技术难题。一是木质纤维素的液化难度大; 二是纤维素的糖化效率不高。因此, 如何对木质纤维素进行适当的的有效处理, 如何进行高效糖化, 成为制约纤维素乙醇大规模生产的关键。

本课题经过近五年的努力, 通过对木质纤维素的蒸汽爆破和湿氧化处理技术的研究, 发现两种工艺可以集成在一个反应器中, 同步进行半纤维素和木质素的去除, 实现木质纤维素晶体结构的有效疏松、纤维素的高回收率以及高效糖化, 找到一种具有工业化前景的湿氧化爆破预处理技术^[1]和高效糖化新工艺^[2], 并申报相关

基金资助: 湖北省教育厅高校产学研项目 (CXY2009B2008); 研究生创新基金

专利。

2. 实验方法

2.1 原料的处理

2.1.1 原料的预处理
先将麦草杆进行粗粉碎，得到 1-2 厘米的 16kg 原料。

2.1.2 湿氧化爆破

将 16kg 原料分成 16 份按表 1 和 2 进行实验。先秤取 1kg 的原料按下表的比例加入碱，混合好后放入爆破反应器，然后按下表加入水盖好盖，通入氧气将

反应器内的空气排空，置换好后按下表通入氧，再缓慢通入蒸汽，当达到指定温度后维持反应所需的时间，最后泄渣，收集产物。

Table 1. Five factors and Four levels.

温度 (A)	进氧压力(B)	料水比(C)	碱量(D)	时间(E)
140	3	1:0.5	4	5
147	3.7	1:1	5.3	10
154	4.3	1:1.5	6.7	15
160	5	1:1.25	8	20

Table 2. The design of L₁₆ (4⁵) orthogonal experiment for the wet-oxidized explosion.

序号	温度	进氧压力 ×0.1MPa	料水比(W/W)%	碱量 g	反应时间 Min
1	A1	B1	C1	D1	E1
2	A1	B2	C2	D2	E2
3	A1	B3	C3	D3	E3
4	A1	B4	C4	D4	E4
5	A2	B1	C2	D3	E4
6	A2	B2	C1	D4	E3
7	A2	B3	C4	D1	E2
8	A2	B4	C3	D2	E1
9	A3	B1	C3	D4	E2
10	A3	B2	C4	D3	E1
11	A3	B3	C1	D2	E4
12	A3	B4	C2	D1	E3
13	A4	B1	C4	D2	E3
14	A4	B2	C3	D1	E4
15	A4	B3	C2	D4	E1
16	A4	B4	C1	D3	E2

2.2 酶解过程

以湿氧化爆破后的麦秸秆为底物，加入一定量的酶液、缓冲溶液及表面活性剂进行水解，本水解实验设计总体积为 1000mL。

2.2.1 底物的制备

取 1-16 号爆破料，分别水洗干净，按料液比 30% 取干物料 300g 于 1000mL 容器中，并编号 1-16。取 300g 未经爆破的小麦秸秆，编号 17。待用。

按 2g/L 添加表面活性剂 PEG 于 1-17 号锥形瓶中。然后将 1-17 号底物置于高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 分钟。自然冷却，待用。

2.2.2 水解反应及取样

待 1-17 号底物冷却后，分别按需要 45IU/g 纤维

素添加纤维素酶，按 64IU/g 纤维素添加 β-葡萄糖苷酶，按 800IU/g 纤维素添加木聚糖酶，于 1-17 号锥形瓶内。搅拌条件控制在 100rpm，混合反应 72 小时，每隔 24 小时取样一次，共取样 3 次。取样时，取 0.5mL 反应液并加入 0.5mL 甲醇，离心 15 分钟，编号，低温保存待测。

2.2.3 样品的测试

木质纤维素中的主要成分由意大利进口设备 VELP 测定。样品中葡萄糖及木糖的含量采用高效液相色谱检测。色谱柱：Shodex Asahibak NH₂P-50 (4.6*250mm, 5μm)；柱温：25℃、乙腈：水 65:35 流速：1mL/min；氮气流速：1.93KPa/min；飘移管温度：90℃。取稀释后的样品 20μL 进样并记录结果。

3 实验结果与讨论

3.1 不同工艺湿氧化爆破料的糖化效果比较

16组不同预处理条件下得到的纤维素经过在同等条件下糖化后测定的结果如下。木糖测定时稀释10倍，葡萄糖测定时稀释15倍。测得木糖及葡萄糖含量

如表3。

由表3、4的正交结果可知：温度对预处理影响较大。 $A_4B_2C_1D_2E_4$ 为纤维素及半纤维降解成糖的最佳条件，即料水比1: 0.5，添加53g碱，进氧压力0.37MPa，在160°C反应温度下，反应20分钟为最佳爆破条件。

Table 3. The contain of glucose and xylose in the pretreated solution

组数	木糖/24h (mg/mL)	木糖/48h (mg/mL)	木糖/72h (mg/mL)	葡萄糖/24h (mg/mL)	葡萄糖/48h (mg/mL)	葡萄糖/72h (mg/mL)
1	1.22	1.31	1.70	0.088	0.19	0.25
2	1.78	1.80	1.91	0.11	0.12	0.12
3	0.89	1.06	1.42	0.20	2.48	0.83
4	0.77	1.23	0.61	1.76	0.31	2.94
5	2.08	2.43	0.90	0.75	1.90	2.23
6	1.27	2.89	1.06	1.58	3.53	4.01
7	0.03	0.87	1.17	1.67	2.30	2.63
8	1.60	1.04	0.56	0.56	0.86	1.37
9	1.67	4.37	0.84	2.14	3.63	4.41
10	3.31	2.85	1.91	4.01	3.92	5.67
11	1.26	1.94	1.68	8.62	11.36	10.45
12	0.88	1.27	0.59	1.07	1.22	2.02
13	0.98	2.20	0.88	0.49	0.27	8.69
14	2.66	1.05	0.68	6.67	8.88	9.52
15	1.48	1.68	1.11	3.16	3.78	4.42
16	1.61	2.36	0.81	3.73	3.41	5.93
原样	0.40	0.50	0.77	0.092	0.24	0.44

Table 4. the error analysis of experiment results

因素	温 度(A)	进氧压力(B)	料水比(C)	碱量(D)	反应时间(E)
均值1	2.445	4.975	6.473	4.640	4.248
均值2	3.482	6.220	3.325	6.415	4.455
均值3	6.893	5.928	4.907	4.925	4.875
均值4	8.010	3.708	6.125	4.850	7.253
极差	5.565	2.513	3.148	1.775	3.005

3.2 高效糖化工艺

3.2.1 金属离子对纤维素糖化过程的影响

考察了三个浓度（0.01 mmol/L, 0.1mmol/L, 1mmol/L）的金属离子对糖化的影响，确定了该浓度范围内对纤维素酶糖化有促进作用的几种金属离子后，再进一步优化得出最佳的金属离子添加量。以不添加任何金属离子为空白对照，经过糖化后糖的浓度（mg/mL）结果见下图 1。

从图 1 可以看出， Mg^{2+} 和 Co^{2+} 对纤维素的糖化过程明显。 Cu^{2+} 对纤维素酶的抑制较强烈。通过不同浓度的实验发现，当 $Co^{2+} 0.01\text{mmol/L}$ 时作用效果最明

显，还原糖浓度可提高 25mg/mL，纤维素水解率可提高 22%。

3.2.2 PEG2000 对纤维素糖化的影响

多羟基化合物对纤维素酶的疏水性结构产生一定的影响。实验采用 PEG 系列化合物进行实验，PEG 对酶的激活作用明显。图 2 结果表明，PEG2000 对纤维素酶水解有明显的促进作用，在浓度为 1mg/mL 时，还原糖浓度达到最大，比空白增加了 21%，纤维素水解率也增加了 23%。

3.2.3 β -葡萄糖苷酶对木质纤维素糖化过程影响

从图 3 可以看出，葡萄糖水解率随 β -葡萄糖苷酶

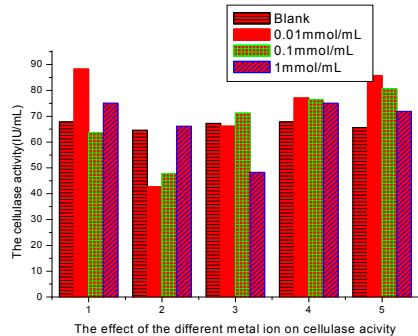


Figure 1.The effect of the metal ions on the saccharification of the cellulose (1-Mg²⁺,2-Cu²⁺,3-Fe²⁺,4-Zn²⁺,5-Co²⁺)

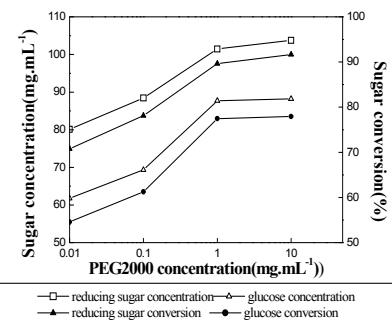


Figure 2. The effect of the PEG2000 on the saccharification of cellulose

图 2. PEG2000 添加量对纤维素糖化过程的影响

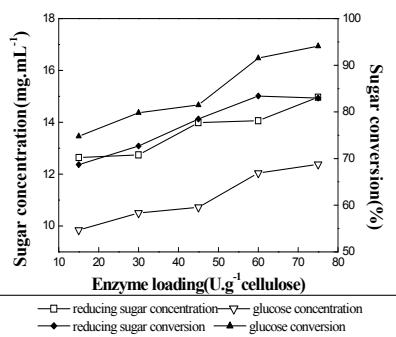


Figure 3.The effect of the β -glucosidase on the saccharification of cellulose.

图 3. β -葡萄糖苷酶对纤维素糖化过程的影响。

的增加而增加，说明 β -葡萄糖苷酶对纤维二糖的水解作用明显，并且结果显示，还原糖水解率也有所增加，原因可能是 β -葡萄糖苷酶在一定程度上缓解了纤维二糖对纤维素酶的抑制问题。

4 结论

湿氧化爆破法是一种具有工业化前景的绿色无污染的预处理技术。通过优化湿氧化爆破条件，可以有效降低纤维素的结晶度，增加纤维素无定型化程度和空隙率，提高纤维素的水解率。通过对纤维素酶系组成、化学激活剂（金属离子、多羟基化合物）等因素对纤维素糖化过程的影响的研究，得出最佳的糖化条件，实现纤维素的糖化率达到 96%，在底物达到 30% 的高浓度条件下，实现糖浓度 150g/L，为纤维素的生物加工奠定了良好的基础。

References(参考文献)

- [1] Zhijun Li, Xuefeng Yu, Dachun Gong, et al. A pretreatment method for the biorefinery of the ligninocellulose. Chinese Invention Patent, Application No. 200810177096.3(Ch)
李志军, 俞学锋, 龚大春等.一种木质纤维素生物炼制的预处理方法国家发明专利[P],申请号 200810177096.3
- [2] Dachun Gong, Jinting Tang, Zhijun Li, et al. A production method of glucose and cellobiose using cellulase[J]. Chinese Invention Patent, Application No. 200910062286.5(Ch)
龚大春,汤金婷,李志军,等.一种利用纤维素酶复合酶系生产葡萄糖和纤维二糖的方法.国家发明专利 ,申请号 200910062286.5
- [3] Tao Niu, Jinting Tang, Zhijun Li, et al. The determination of sugars in the pretreatment of the ligninocellulose[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2009(8), P125-127(Ch)
牛涛, 汤金婷, 李志军等, 木质纤维素原料预处理前后主要糖成分的测定[J].酿酒科技, 2009 (8) ,P125-127.
- [4] Deying Li, Dachun Gong, Yihong Tian, et al.The effect of the metal ions on the cellulase activity [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2009(6), P40-46
李德莹, 龚大春, 田毅红等.金属离子对纤维素酶活力影响的研究[J].酿酒科技, 2009(6),P40-46.
- [5] Sridhar Viamajala, James D. McMillan, Daniel J. Schell, et al.Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations-effects of saccharification and particle size[J]. Bioresource Technology, 2009(100), P925-934.