

Study on Fuel Ethanol Production on Pilot Scale from Corn cob Using the Process of Dilute Acid Pretreatment and Separated Saccharification and Fermentation

Yuxiao Wang¹, Fengjuan Ge¹, Jie Zhu¹, Yiting Sun¹, Linlin Zhou¹, Chao Yuan¹, Jing Wang²

¹Xuzhou Engineering Research Center of Bio fuel, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu, China, 221008

²Faculty of Chemical Science & Engineering, China University of Petroleum, Beijing, China, 102249

Email: wangyuxiao@xzit.edu.cn

Abstract: The aim of this study was to achieve the optimum process parameters for fuel ethanol production on pilot scale from corncob. After the optimization of orthogonal experiment, the process configuration including dilute acid pretreatment and separated saccharification and fermentation (SHF) was obtained: the optimum pretreatment were at 120°C for 3 hours with 1.1% sulphuric acid as well as solid-to-liquid ratio=1:8, and the optimum enzymatic hydrolysis were at initial pH5.0 and 48°C for 48 hours with FPA(IU·mL⁻¹):CBA(IU·mL⁻¹)=20:7 and 180g·L⁻¹ substrate produced by pretreatment. The maximum ethanol concentration in the enzymatic hydrolyzates fermentation by *Zymomonas mobilis* at 35°C for 48 hours reached 67.8g·L⁻¹.

Keywords: fuel ethanol production; pilot scale; corncob; dilute acid pretreatment; separated saccharification and fermentation (SHF)

玉米芯稀酸预处理和分步糖化与发酵工艺生产燃料乙醇的中试研究

王欲晓¹, 葛奉娟¹, 朱捷¹, 孙怡婷¹, 周琳琳¹, 袁超¹, 王靖^{2*}

¹徐州工程学院徐州市生物质燃料工程技术研究中心, 江苏徐州, 中国, 221006

²中国石油大学(北京)化学科学与工程学院, 北京昌平, 中国, 102249

Email: wangyuxiao@xzit.edu.cn

摘要: 利用正交试验在中试水平考察了玉米芯的稀硫酸预处理和分步糖化与水解生产乙醇的工艺, 结果: 最佳预处理工艺为稀硫酸浓度 1.1%, 温度 120°C, 固液比 1:8, 时间 3h; 酶解糖化最佳工艺为: 起始底物浓度 180 g·L⁻¹, 滤纸酶活: 纤维二糖酶活=20.0IU·g⁻¹底物: 7.0IU·g⁻¹底物, pH=5.0, 48h; 利用运动发酵单胞菌发酵酶解液, 35°C, 48h, 发酵液中乙醇浓度最高 67.8g·L⁻¹。

关键词: 燃料乙醇生产; 中试; 玉米芯; 稀酸预处理; 分步水解与发酵;

1 引言

目前, 地球上石油和煤炭等化石能源的可探明储量有限加, 而产量已接近了极限, 人类正面临着能源危机的严峻挑战^[1,2]。2003 年 6 月召开的“国际可再生能源会议”提出了全球应该加速实现从矿物能源时代向可再生能源过渡的发展战略。许多国家开始制定或调整能源政策, 把生物能源的研究和开发摆在了重要的位置。生物

燃料乙醇作为安全、洁净的燃料及汽油添加剂目前已经备受关注^[3-5], 大力发展乙醇与汽油的混合燃料势在必行。

传统的乙醇发酵工业主要以玉米、小麦等粮食淀粉或甘蔗汁为原料, 但其原料成本高达总成本的 40%^[6]。而中国地少人多的国情现状, 也决定了基于粮食为原料的乙醇大规模生产必将导致“与人畜争粮, 与粮食争地”的不利局面。在我国利用甘蔗等糖料作物生产乙醇也将受到土地资源和原料成本的限制而无法大规模推广。木质纤维原料是地球上最丰富、最廉价的可再生

基金项目: 江苏省重大科技支撑和自主创新项目(项目编号 BE2008121)

资源^[7]。全世界每年通过光合作用产生的木质纤维生物质高达 1000 亿吨，其中 89%目前尚未被人类利用^[8]。我国的木质纤维原料也非常丰富，每年仅农作物秸秆就有 7 亿多吨，加上数量巨大的林业纤维废料和工业纤维废渣，每年可利用的木质纤维原料总量可达 20 亿吨以上。木质纤维原料中纤维素约占干重的 35-45%，半纤维素约占 20-40%，采用适宜技术将它们水解成可发酵性糖，进一步发酵生产乙醇^[9-12]，有可能改变传统的生产方式，对我国经济和社会的可持续发展具有十分重大的意义^[13,14]。

本文以玉米芯为原料生产燃料乙醇进行了中试研究，分别考察了稀酸预处理和分步水解与发酵工艺工艺，确定了各自最佳条件。

2 材料和方法

2.1 实验原料

原料：玉米芯，取自江苏省铜山县张集镇，自然风干备用。

2.2 纤维酶、菌种和培养基

纤维酶原液 1：滤纸酶活(filter paper activity, FPA) 为 60FPIU·mL⁻¹，由里氏木霉 (*T.reesei*) 生产；纤维酶原液 2：纤维二糖酶活 (cellobiase activity, CBA) 为 30CBIU·mL⁻¹，由黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 生产。运动发酵单胞细菌 (*Zymomonas mobilis*)：本实验室保存；*Z.mobilis* 种子培养基 (W/V)：葡萄糖 10%，酵母膏 0.50%，硫酸铵 0.10%，磷酸二氢钾 0.10%，硫酸镁 0.05%，28℃培养；*Z.mobilis* 发酵培养基 (W/V)：酶解液还原糖，酵母膏 0.90%，磷酸二氢钾 0.10%，pH5.0。

Table 1 Design of factors and levels of orthogonal experiment design for dilute sulfuric acid hydrolysis of corncob
表 1 玉米芯稀硫酸预处理 4 因素 3 水平正交试验设计

水平	因素 A 稀硫酸浓度/%	因素 B 温度 /℃	因素 C 时间 /h	因素 D 固液比
1	0.7	100	1	1:6
2	0.9	110	2	1:8
3	1.1	120	3	1:10

2.5 分析方法

2.3 主要仪器设备

电动直联秸秆粉碎机 9FZ-35，山东省泰安泰峰农牧机械厂；耐强酸搪瓷反应釜 100L，山东省淄博太极集团；袋式过滤器 SHL-2P2S，浙江省海宁过滤设备有限公司；酶解-发酵罐 RTY-MS-100L，江苏省镇江日泰生物工程设备有限公司；板框压滤机 SHF150，浙江海宁过滤设备有限公司；高压蒸汽灭菌锅 YXQ-LS-18SI，上海博迅实业有限公司；紫外/可见分光光度计 UV751GD，上海分析仪器总厂。

2.4 实验方法

2.3.1 取玉米芯样品经烘干恒重，定量分析纤维素、木聚糖和木质素的含量。

2.3.2 原料经粉碎机 9FZ-35 粉碎后过 9 目 (1981μm) 筛，取适量样品按正交设计要求 (见表 1)，以纤维素含量、木聚糖去除率和酸不溶木质素去除率为指标，在 100L 反应釜进行稀硫酸预处理试验。

2.3.3 按最佳条件预处理后，样品经袋式过滤器过滤，再用 2%的氢氧化钠溶液 65℃下处理 2h，再经板框压滤，固体渣洗至中性，风干备用。取样品烘干恒重，定量分析纤维素、木聚糖和酸不溶木质素的含量。

2.3.4 固体渣样品按正交设计要求 (见表 2)，以还原总糖为指标，在 100L 酶解罐内自动流加酸液调节 pH 值为 5，48℃恒温进行酶解糖化试验。

2.3.5 运动发酵单胞菌 *Z.mobilis* 在种子液培养基中培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 时制成种子液，以 5%的接种量接种到 100L 发酵罐内的酶解糖化液，以酶解糖化液中的还原糖为碳源，按发酵培养基配方添加营养成分，分别在 35℃、40℃、45℃发酵 60h，考察发酵液中乙醇浓度。

Table 2 Design of factors and levels of orthogonal experiment for enzymatic saccharification of cellulose
表 2 纤维素酶解糖化 3 因素 3 水平正交试验设计

水平	因素 A 时间 /h	因素 B 底物浓度/g·L-1	因素 C FPA:CBA/IU·mL-1
1	24	120	15:8
2	48	150	20:7
3	72	180	20:10

2.5.1 样品主要成分定量分析方法

样品含水率测定按照中华人民共和国国家标准造

纸原料水分的测定[M]. GB/T2677.2-93; 纤维素含量按照文献^[16]; 戊聚糖含量测定按照中华人名共和国国家标准造纸原料多戊糖含量的测定[M].GB/T2677.9-94; 酸不溶木质素含量测定按照中华人名共和国国家标准造纸原料酸不溶木质素含量的测定[M].GB/T2677.8-94; 酸溶木质素含量测定按照文献^[16]。

2.5.2 纤维素酶活定量分析方法

酶活力定义: 在标准反应条件下, 1 min 内将底物转化生成 1 μ mol 产物所需要的酶量即为 1 个酶活单位, 单位为 IU \cdot mL⁻¹。

滤纸酶力 (FPA) 测定按照工业酶制剂通用试验方法[M]. QB / T 1803~1993; 纤维二糖酶活力 (β -葡萄糖苷酶活) 测定参照文献^[17]。

2.5.3 还原糖、乙醇和菌体浓度定量分析方法

还原糖总糖含量测定参照文献^[18]DNS 法; 乙醇含量测定参照文献^[19]重铬酸钾氧化分光光度计法; 菌体浓度定量分析方法: 以不接种的培养基为对照, 用分光光度计测发酵培养基 OD₆₀₀ 值。

3 结果和讨论

3.1 稀酸预处理正交试验结果

Table 3. Results and analysis of orthogonal experiment of corncob pretreatment using sulfuric acid
表 3. 稀硫酸预处理玉米芯正交试验结果和分析

因素	稀硫酸浓度/%	温度 / $^{\circ}$ C	时间 /h	固液比	纤维素含量 /%	戊聚糖去除率 /%	木质素去除率 /%
	A	B	C	D	指标1	指标2	指标3
实验1	1	1	1	1	46.5	23.9	13.8
实验2	1	2	2	2	66.1	87.9	39.9
实验3	1	3	3	3	67.9	92.9	28.5
实验4	2	1	2	3	52.6	48.6	20.1
实验5	2	2	3	1	64.6	86.1	27.5
实验6	2	3	1	2	47.4	76.1	36.1
实验7	3	1	3	2	58.6	66.3	11.7
实验8	3	2	1	3	60.6	79.4	34.5
实验9	3	3	2	1	65.1	89.6	36.9
K1	60.18	52.58	51.48	58.74			
K2	54.84	63.76	61.27	57.37			
K3	61.42	60.12	63.70	60.34			
R	6.58	11.18	12.22	2.98			

指标 1 影响因素最优条件 C>B>A>D
C3 B2 A3 D3

件	68.23	46.37	59.80	66.53
K1	68.23	46.37	59.80	66.53
K2	70.26	84.47	75.37	76.77
K3	78.43	86.20	81.77	73.63
R	10.20	39.93	21.97	10.23

指标 2 影响因素最优条件 B>C>D>A
B3 C3 D2 A3

件	27.40	15.20	28.13	26.06
K1	27.40	15.20	28.13	26.06
K2	27.90	33.96	32.30	29.23
K3	27.70	33.83	22.56	27.70
R	0.50	18.76	9.73	3.16

指标 3 影响因素最优条件 B>C>D>A
B2 C2 A2 D2

由表 3 结果看出, 稀硫酸预处理玉米芯, 纤维素含量在实验 3 最高为 67.90%, 其影响因素由高到低依次是: 时间>温度>酸浓度>固液比。戊聚糖去除率在实验 3 最高为 92.9%, 其影响因素由高到低依次是: 温度>时间>固液比>酸浓度。木质素去除率在实验 2 最高为 67.90%, 其影响因素由高到低依次是: 温度>时间>固液比>酸浓度。

综合比较, 稀硫酸预处理主要是去除样品中戊聚糖和提高纤维素含量, 所以预处理最佳条件为温度 120 $^{\circ}$ C, 稀硫酸浓度 1.1%, 固液比 1:8, 时间 3h。此条件下平行试验 3 次, 平均值为: 戊聚糖去除率 78.7%, 纤维素含量由 32.3%上升到 62.3%。

3.2 玉米芯 3 种主要成分在酸、碱处理前后的定量分析

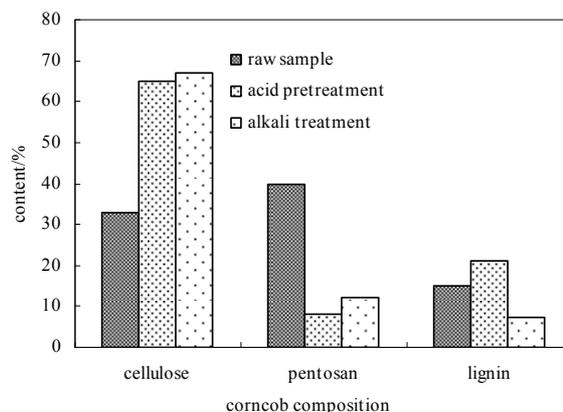


Figure 1. Corncob compositions analysis of untreated, acid

pretreated and alkali treatment
图 1. 酸碱处理前后玉米芯 3 种主要成分含量

由图 1 可以看出, 玉米芯经酸碱处理, 纤维素含量最终上升到 66.7%, 戊聚糖去除了 72.6%, 木质素去除了 62.9%。为下面的酶解糖化创造了良好条件。

3.3 酶解糖化正交试验结果

Table 4. Results and analysis of enzymatic saccharification orthogonal experiment of pretreated corncob
表 4. 酶解糖化正交试验结果和分析表

因素	A	B	C	实验结果
	时间 /h	底物浓度 /g·L ⁻¹	FPA: CBA /IU·mL ⁻¹	还原糖浓度 /g·L ⁻¹
实验1	1	1	1	75.8
实验2	1	2	2	99.6
实验3	1	3	3	116.5
实验4	2	1	2	91.7
实验5	2	2	3	106.7
实验6	2	3	1	115.3
实验7	3	1	3	101.6
实验8	3	2	1	91.7
实验9	3	3	2	120.6
K1	97.32	89.68	94.26	
K2	104.54	99.31	103.96	
K3	104.60	117.47	108.25	
R	7.29	27.79	13.98	
影响因素	B>C>A			
最优条件	B3 C2 A3			

由表 4 结果看出, 酶解糖化实验 9 还原糖浓度最高为 120.6 g·L⁻¹, 其影响因素由高到低依次是: 底物浓度>FPA: CBA>时间。综合考虑, 酶解糖化在以下工艺条件运行: 罐中初始底物浓度为 180 g·L⁻¹, 添加滤纸酶活为 20FPIU: 1g 底物, 12h 流加纤维二糖酶活为 7CBIU: 1g 底物, 酶水解过程中补充底物至 180 g·L⁻¹, pH 值保持 5, 恒温 48℃, 48h。试验 3 次, 还原糖浓度平均 168 g·L⁻¹。

3.4 运动发酵单胞菌发酵酶解糖化液生产乙醇实验结果

由于酶解糖化过程在 48℃ 恒温中进行, 故重点考察运动发酵单胞菌 *Z.mobilis*, 在 35℃、40℃、45℃ 发酵糖化液生产乙醇的情况, 实验结果见下图。

由图 2 可以看出, 运动发酵单胞菌 *Z.mobilis* 发酵酶解糖化液生产乙醇最佳条件是 35℃, 48h, 发酵液中乙醇浓度最高达 67.8 g·L⁻¹。

4 结论

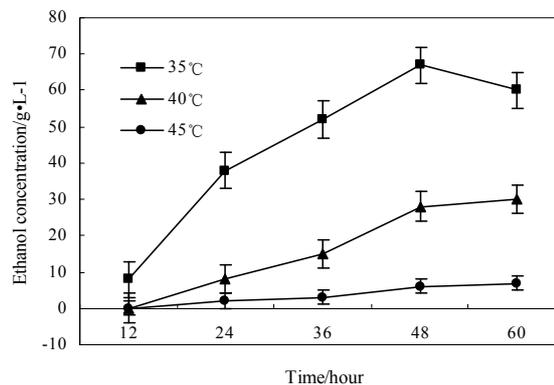


Figure 2. Ethanol concentration curve in different temperature medium to ferment enzymatic hydrolysates using *Z. mobilis*
图 2. 运动发酵单胞菌在不同温度下发酵酶解糖化液生产乙醇的浓度曲线图

本研究在中试水平考察了以玉米芯为原料生产燃料乙醇的稀酸水解和分步糖化和发酵工艺, 结果表明原料经 1.1% 的稀硫酸处理 3h, 碱液洗涤后, 再经李氏木霉和黑曲霉产的纤维酶协同糖化 48h, 酶解糖化液接种 5% 运动发酵单胞菌 *Z.mobilis* 发酵 48h, 发酵液中乙醇浓度达 67.8 g·L⁻¹。本研究为工业化生产纤维燃料提供了参考。

致谢

衷心感谢江苏省重大科技支撑和自主创新项目 (项目编号 BE2008121) 对本研究的资助。衷心感谢徐州工程学院化学化工学院实验室主任岳玮高级实验师对本研究提供的帮助。

References (参考文献)

- [1] Sun Y, Cheng JY. Hydrolysis of lignin cellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 2002, 83, P1-11.
- [2] Campbell C J, Sharp P M. The end of cheap oil. *Sci AM*, 1998, 3, P78-83
- [3] Pan X, Aerator C, Gilkes N, Gregg D. Bio-refining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of Process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-Products. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: P473-481.
- [4] Martin C, Galbe M, Whlbom C F, Hahn-Hagerdal B, Jonsson L F. Ethanol Production from Enzymatic hydrolysates of sugarcane bagass using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbe Technol*, 2002, 31: P274-282.
- [5] Govindaswamy S, Vane L M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresour Technol*, 2006, 98: P677-685.
- [6] Liu Na, Shi shu-lan. Research progress of converting lignocellulose to produce fuel ethanol. *Modern Chemical Industry*, 2005, 25 (3): P19-22.
刘娜, 石淑兰, 木质纤维素转化为燃料乙醇的研究进展, 现代化工[J], 2005, 25(3): P19-22.
- [7] Xia liming. Advance on enzymatic hydrolysis of renewable cellulosic resources. *Journal Of Chemical Industry Of Forest*

- Products(bimonthly), 1999, 33(1):P23-28.
夏黎明, 可再生纤维素资源酶法降解的研究进展, 林产化工通讯[J], 1999, 33(1): P23-28.
- [8] Chen hongzhsng. Cellulose Biotechnology. Chemical Industry Press, 2005:P1-2.
陈洪章, 纤维素生物技术, 化学工业出版社[M], 2005: P1-2.
- [9] Wyman C E. Biomass ethanol: Teehnieal Progress, opportunities and commercial challenges. Biomass Annu Rev Energy Environ, 1999, 24:P189-226.
- [10] Yang B, Wyman C E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through Pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. Biotechnol Bioeng, 2004, 86: P88-95.
- [11] Hamelinek C N, Hooijdonk G, Faaij A P C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-middle-and long-term. Biomass Bioenerg, 2005, 28: P384-410.
- [12] Kim S, Dale B E. Global Potential Bioethanol Production from wasted crops and crop residues. Biomass Bioenerg, 2004, 26: P361-375.
- [13] Jia shubiao, Li shengxian, Wu guofeng. New alcohol technology. Chemical Industry Press. 2004: P1-3.
贾树彪, 李盛贤, 吴国峰, 新编酒精工艺学, 化学工业出版社[J], 2004:P1-3.
- [14] Ma zanhua. The new process of the ethanol highly effective produce. Chemical Industry Press .2003:P11-12.
马赞华, 酒精高效清洁生产新工艺, 化学工业出版社[J], 2003: P11-12.
- [15] HU Yue zhao, LU Ding qiang, WAN Hong gui, JIA Hong hua .Progresses on treatment of lignocellulosic material. Chinese Journal of Bioprocess Engineering. 2004, 2(4):11-16
朱跃钊, 卢定强, 万红贵, 贾红华, 木质纤维素预处理技术研究进展, 生物加工过程[J], 2004, 2(4):P11-16.
- [16] LIU shucai, ZHANG meiyun. Analysis and determination for pulp and paper [M], Beijing: industry press of chemical engineering, 2004, P17-30.
刘书钗, 张美云等, 制浆造纸分析与检测[M], 北京:化工工业出版社, 2004, P17-30.
- [17] JIANG Hua, YU Zhao-hai. Purification and Characterization of Cellulase from Trichoderma reesei[J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition), 2007, (06) P48-52.
江华, 于兆海, 里氏木霉纤维素酶系的分离及其酶学性质[J], 南京林业大学学报, 2007, (06), P48-52.
- [18] Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for Determination of Reduce Sugar [J]. Anal Chem, 1959 (3), P426-428.
- [19] LIN Renquan, HU Wenlan, CHEN Guoliang. Study on the Measurement of ethanol Content in wine by Chemical Oxidation with Potassium Dichromate. Zhejiang Prev. Med., March 2006, 18 (3), P78-79.
林仁权, 胡文兰, 陈国亮, 重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量, 浙江预防医学[J], 2006, 18(3), P78-79.