

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

木质纤维素糖化模式对酶解得率及过程
放大的影响

刘克

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2015. 4. 14 论文答辩日期: 2014. 5. 22

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 花强 教授

评阅人: 宋安东 教授

史吉平 研究员

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____①_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：刘克

指导教师签名：鲍杰

2015年5月27日

2015年5月27日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：刘克

2015 年 5 月 27 日

木质纤维素糖化模式对酶解得率及过程放大的影响

摘要

提高糖化过程中木质纤维素原料的固含量形成高浓度单糖水解液和高浓度产品发酵液,对后续分离成本的降低是非常重要的。为了提高木质纤维素原料在高固含量下的糖化效率,需要使用能提高混合效率的搅拌桨。但是,在燃料乙醇和生物化学品的工业生产过程中,生物反应器的规模可能在数百乃至数千立方米以上,使用全混式搅拌桨不切实际。本文采用了一种新型的分段糖化(two-stage enzymatic hydrolysis)的方式,有效解决了高效混合与放大生产之间的矛盾。研究表明,随着固含量提高,分段糖化与全程搅拌糖化差别在变小,当固含量达到 30%时,分段糖化的糖化得率与全程搅拌糖化相比已经相差无几。分段同步糖化与发酵(ts-SSF)生产乙醇的实验中,72 h 后,酶用量为 5, 10, 15 FPU/g DM 的实验中,乙醇得率分别为 43.32%, 58.26%, 61.85%,而全程搅拌的同步糖化与发酵(SSF)实验中,相同条件下的乙醇得率分别为 44.10%, 57.67%, 61.04%。分段 SSF 与全程搅拌 SSF 相比,不但乙醇得率没有降低,而且搅拌功耗大幅度下降。而且,分段 SSF 产生的气泡容易破碎,不会像全程搅拌 SSF 一样形成过高的泡沫层,避免了纤维素乙醇发酵过程中气泡冲罐的现象,相比于 SSF 更容易进行放大生产。

本文还研究了粒径对玉米秸秆酶解得率的影响,发现随着粒径的减小,纤维素酶与玉米秸秆的有效接触面积并没有发生改变,导致酶解得率并未发生变化。本研究对木质纤维素生物炼制工艺中,木质纤维素原料的粉碎操作及后续酶解具有指导意义,在不影响酶解得率的同时应降低粉碎强度,减小过程功耗。

关键字: 玉米秸秆; 分段糖化; 扭矩; 粒径; 比表面积

Study on Lignocellulose Saccharification Mode to Hydrolysis Yield and Scale up in Commercial Scale Biorefinery Process

Abstract

Increasing the solids loadings of saccharification is very important to improve a high concentration of monosaccharides hydrolyzed, which can achieve the fermentation broth contained high concentration products, so as to reduce the biorefinery processing costs. In order to improve saccharification efficiency under high solid content, the efficient stirring paddle is necessary. However, in the industrial production process of ethanol and biological chemicals, the scale of the bioreactor may be in the hundreds or thousands of cubic meters, using impeller is impractical. This paper developed a new kind of saccharification called two-stage enzymatic hydrolysis, which make the efficient mixing to get along with industrial production. The results showed that the difference between two-stage enzymatic hydrolysis and normal saccharification are smaller with increased of solid content, when the solid content reach 30%, the difference of yield between two-stage enzymatic hydrolysis and normal saccharification can be ignored. In the two-stage simultaneous saccharification and fermentation(ts-SSF) experiment, enzyme dosage were 5,10 and 15 FPU DM/g, after 72 h, the ethanol yield were 43.32%, 58.26% and 61.85% respectively, while the ethanol yield by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) experiment were 44.10%, 57.67% and 61.04% respectively. Compared with SSF, not only did not reduce the ethanol yield by ts-SSF, but also reduced the stirring power, what`s more, the bubbles broke easily, so two-stage SSF will not form high foam layer what formed in the the entire mixing SSF, the foam flooding was mitigated greatly with the two-stage mixing tactics, these advantage make ts-SSF more appropriated to the industrial scale biorefinery plants.

In this thesis, the effect of particle size reduction on overall surface area and enzymatic hydrolysis yield of corn stover was also investigated. It was found that the effective contact area of cellulase and corn stover did not change with the decrease of particle size, which cause the enzymatic hydrolysis rate did not change. This result provided a reference when a proper size reduction of lignocellulose materials is considered in biorefining.

Keywords: corn stover, two-stage enzymatic hydrolysis, torque, particle size, specific surface area.

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 木质纤维素预处理对糖化的影响.....	2
1.3 木质纤维素水解酶系对糖化的影响.....	4
1.4 生物炼制工艺对糖化的影响.....	6
1.4.1 糖化发酵方式.....	6
1.4.2 底物及纤维素酶添加策略.....	7
1.4.3 反应器设计.....	8
1.5 高固含量糖化的必要性及可行性分析.....	9
1.6 本文研究内容及意义.....	10
1.6.1 研究内容.....	10
1.6.2 研究意义.....	11
第 2 章 两阶段混合模式对玉米秸秆高固含量下糖化及后续发酵的影响.....	12
2.1 背景介绍.....	12
2.2 材料与方法.....	13
2.2.1 原料及试剂.....	13
2.2.2 分段糖化.....	13
2.2.3 分段同步糖化与发酵.....	15
2.2.4 样品分析.....	15
2.3 结果与讨论.....	16
2.3.1 糖化过程中扭矩的测定.....	16
2.3.2 不同固含量及酶用量下全程搅拌糖化研究.....	19
2.3.3 搅拌转速的研究.....	30
2.3.4 5L 反应器分段糖化.....	32
2.3.5 5 L 反应器分段同步糖化与发酵.....	33
2.4 小结.....	35
第 3 章 颗粒粒径对木质纤维素酶解的影响.....	37
3.1 引言.....	37
3.2 材料与方法.....	38
3.2.1 原料.....	38
3.2.2 纤维素酶.....	39
3.2.3 酶解评价.....	39

3.2.4 玉米秸秆粒径、孔径及比表面积分析	39
3.2.5 样品分析方法	40
3.3 结果与讨论	40
3.3.1 不同粒径下玉米秸秆颗粒的酶水解得率测定	40
3.3.2 颗粒直径对酶水解速率影响的原因分析	43
3.4 小结	48
第 4 章 结论与展望	50
4.1 分段糖化模式对玉米秸秆糖化的影响	50
4.1.1 结论	50
4.1.2 展望	50
4.2 玉米秸秆粒径对酶解得率的影响	51
4.2.1 结论	51
4.2.2 展望	51
参考文献	53
攻读硕士期间的研究成果	60
致谢	61

第 1 章 文献综述

1.1 引言

随着社会的发展,以生物质能,风能,太阳能,地热能等清洁能源来替代传统化石燃料越来越受到人们的广泛关注。一方面,传统不可再生化石燃料大量消耗,全球不可再生化石燃料储量在急剧减少,并在不久的将来将被消耗殆尽;另一方面,化石燃料的大量消耗,导致了严重的环境污染,例如,二氧化硫的大量排放导致酸雨,二氧化碳的大量排放导致温室效应等。所以,以新型可再生能源替代传统化石能源已经迫在眉睫^[1, 2, 3]。

与传统的化石燃料和以淀粉类为底物的第一代燃料乙醇相比,通过木质纤维素生物炼制生产第二代燃料乙醇具有下列优点:(1)木质纤维素是一种可再生资源,其含量极其丰富,其每年产量高达 2200 亿吨^[4, 5],这是一个极其庞大的数字,这些生物质所含的能量远远大于现在全世界每年所消耗的能量;(2)以木质纤维素生产的燃料乙醇是一种清洁能源,不会产生富含硫、氮的化合物而污染环境,乙醇燃烧产生的是二氧化碳和水,清洁无污染;(3)与第一代生物乙醇相比,以木质纤维素为原料,生产乙醇节约了粮食,解决了与民争粮的难题。其中,生物炼制是以木质纤维素为原料,经过预处理打开木质纤维素的致密结构,然后经过生物脱毒除去预处理过程中产生的抑制物,然后将预处理及脱毒后的木质纤维素经酶水解产生可发酵单糖,再利用酿酒酵母等乙醇发酵菌种将单糖转化成乙醇的过程。为此,全世界各国家和地区也在加大纤维素乙醇研究的力度,并制定了一系列的计划。例如,美国能源部在 2007 年为了扶持 6 家生物燃料乙醇生产项目而拨款近 4 亿美元,并计划在 2030 年,使得生物燃料年产量达到 600 亿加仑;而欧盟则制定了将生物燃料加入柴油,汽油等运输燃料中的计划,期望在 2030 年左右达到运输燃料的 25%;而我国也认识到生物燃料乙醇的重要性,并为了避免使用粮食进行乙醇生产,从而制定了以木质纤维素为原料生产乙醇的计划^[6, 7, 8]。

目前以木质纤维素为原料生产燃料乙醇需要经过木质纤维素的前处理及预处理,木质纤维素的酶水解,以糖化后的五碳糖和六碳糖为碳源发酵生产乙醇和下游乙醇的分离纯化等操作单元^[9]。其中,木质纤维素的前处理及预处理主要是将木质纤维素进行清洗粉碎之后,使用各种物理化学或生物的方法使得木质纤维素的致密结构得以打开;而预处理后的木质纤维素加入纤维素酶进行酶水解,将纤维素,半纤维素分别水解生成葡萄糖及木糖;然后向水解液中接入酵母菌或基因改造后的细菌进行乙醇发酵生产;而发酵出的乙醇再经过精馏提纯,得到乙醇燃料。与第一代粮食乙醇相比较,通过生物炼制生产乙醇的主要不同在于木质纤维素的预处理及酶水解过程,其中木质纤维素糖化是将木质纤维素这种微生物不可利用的原料通过纤维素酶水解成单糖以供微生物发酵,是整个生物炼制工艺中至关重要的一步,也是关系到木质纤维素生物炼制生产乙醇及其他生物化学品能否实现工业化的关键步骤^[10, 11, 12]。相比于传统的化学法裂解木质纤维素生产还

原糖，酶解法反应条件更加温和，且生成的副产物及抑制物也较少，并且不会产生大量废水废气等对环境产生污染。虽然相比于化学法有这么多优点，但是以木质纤维素酶水解木质纤维素来生产可发酵单糖仍处于研究阶段，距离实现工业化生产还有很长一段路要走，这是因为酶水解法仍有一些关键难题难以解决。影响糖化的因素主要有，木质纤维素的预处理，纤维素酶体系及糖化过程控制和反应器设计等因素^[13, 14, 15]。首先，木质纤维素的天然结构使得纤维素酶很难有效的接触纤维素进行酶解，而使用各种预处理方法使得木质纤维素致密结构打开后，往往产生如糠醛，羟甲基糠醛，酚类等抑制物，会对后续酶解及发酵产生抑制作用；其次，纤维素酶成本较高，这严重影响了木质纤维素酶解的过程经济性，而且不同木质纤维素所含纤维素，半纤维素，木质素及其他组分的比例各不相同，这就需要多种纤维素酶协同作用才能发挥最高酶水解效率，且复合酶各种酶之间的比例也不尽相同；再者，在较低固含量下，糖化生成的单糖浓度较低，从而导致后续发酵的乙醇浓度偏低而增加精馏成本，而提高糖化固含量又会产生自由水缺乏、高的产物浓度抑制、混合搅拌等一系列问题。为了解决酶解过程中出现的问题，各国研究学者从木质纤维素原料到纤维素酶以及生物炼制工艺等方面进行了研究，如通过预处理改变木质纤维素的结构或组分以更利于酶解，或增加纤维素酶的活力，降低酶解过程中可能导致纤维素酶活力下降的抑制因素等方法来提高木质纤维素水解糖化的得率^[16, 17]。

1.2 木质纤维素预处理对糖化的影响

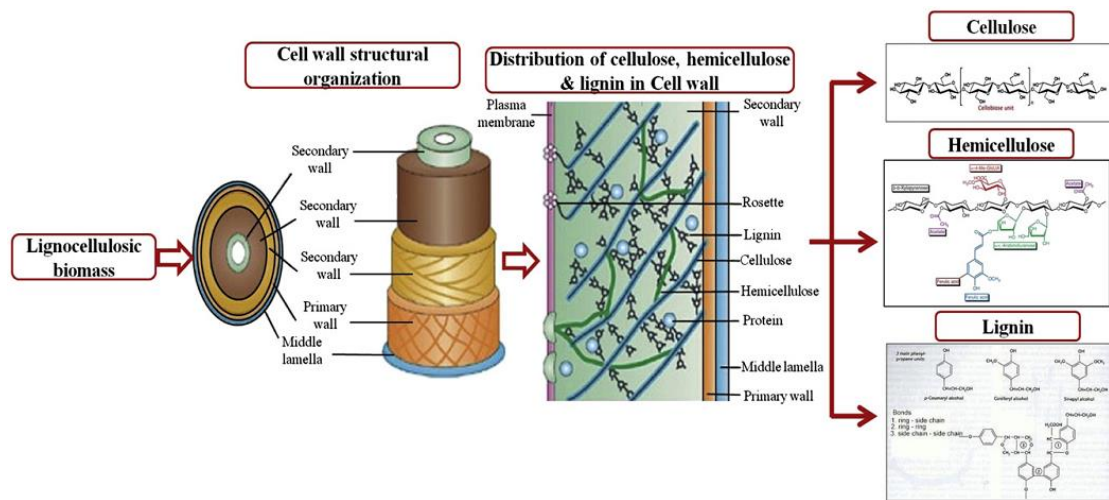


图 1.1 木质纤维素结构示意图^[1]

Fig. 1.1 The structure diagram of lignocellulose^[1]

木质纤维素主要由三种组分组成，如图 1：其中，由纤维二糖聚合形成的直线型高聚物被称为纤维素，它在木质纤维素中的含量大约占到 35-40%；而半纤维素则是由木糖和其他糖衍生物聚合而成的复杂的支链聚合物，它在木质纤维素中的含量大约为 20-35%；最后，木质素是一种较稳定的大分子化合物，它是由苯基丙酸聚合而成的大

分子，并与半纤维素共价交联形成稳定的支架结构，对植物细胞具有保护作用^[1, 18]。在木质纤维素原料中，这三种大分子紧密的排列在一起，这种致密的天然结构严重阻碍了纤维素酶和纤维素的接触，而且大量的木质素存在还会导致纤维素酶的不可逆吸附，降低酶水解效率^[19]。有研究表明，木质纤维素的孔径和结晶度也可以影响木质纤维素的酶解^[17]。要想获得高的糖化得率，必须要对天然的木质纤维素进行预处理，预处理的作用大致可以分为以下几种：(1) 除去部分或全部的木质素，增加木质纤维素的多孔性，减少纤维素酶的无效吸附；(2) 破坏或打乱木质纤维素中三个组分之间的连接，增加纤维素酶可接近性；(3) 除去半纤维素，解除半纤维素对纤维素酶的阻碍作用；(4) 降低木质纤维素的结晶度及粒径等，增加纤维素酶水解的比表面积^[20]。经过大量的研究，世界各国学者针对不同的木质纤维素及后续糖化发酵条件的考虑，发展了各种各样的预处理方法。各种预处理方法都有其优点和不足，有些情况下，单独使用一种预处理方法并不能达到理想的预处理效果，需要两种或以上的方法结合使用。

其中，预处理效果较好且被广泛使用的是稀酸预处理，稀酸预处理的优点是稀酸可用性较广，反应速度快，可以连续生产，且成本较低^[21]。但是由于其反应温度和压力要求较高，反应器要求耐酸腐蚀，且处理之后的木质纤维素中含有大量的抑制物，给后续的糖化发酵带来不利影响。Zhang 等^[22]对稀酸预处理中木质纤维素填充率和固液比进行了深入研究，并考察了这两个参数对蒸汽消耗，沸水产生量和预处理效果的影响。经研究发现，提高装料量和提高固液比至少具有以下几个优点：(1) 蒸汽消耗减少；(2) 预处理过程中无含稀酸的废水产生；(3) 得到了固含量很高的预处理原料，为后续的高固含量同步糖化与发酵奠定了基础。

稀酸预处理及等多数预处理主要除去了木质纤维素中的半纤维素组分，将半纤维素转化为单糖和一些抑制物，但是木质素基本不能除去，这就导致预处理之后木质素含量升高，从而导致后续酶解过程中纤维素酶不可逆的吸附在木质素上，严重影响糖化效率。碱性条件下使用过氧化氢氧化法可以有效地除去木质素，Karagöz 等^[23]在碱性氧化法提高同步糖化共发酵的实验中，通过研究发现，加入 5% (v/v) H_2O_2 ，在 50 °C 反应一个小时的预处理效果最佳，加入硫酸镁也会小幅度提高碱性氧化法的效果，最终的乙醇得率为 14.7 g/100 g 油菜渣。Yamashita 等^[24]使用蒸汽爆破和氢氧化钠联合预处理竹片的实验中，结果显示，在 20 atm 蒸汽爆破预处理 5 分钟之后，使用 10wt% 的氢氧化钠在 121 °C 条件下反应 5 分钟，预处理效果最好，酶解可以产生 456 mg 葡萄糖/g 干物料，460 mg 还原糖/g 干物料；此预处理效果虽然好，但是需要高温高压，而且需要大量氢氧化钠，于是作者通过碱性氧化法，使用 1wt% 氢氧化钠和 1wt% H_2O_2 (v/v) 在 90 °C 预处理物料 60 分钟，结果显示，糖化得率为 399 mg 葡萄糖/g 干物料，虽然糖化得率相比于上述蒸汽爆破-碱预处理稍低，但是条件温和，易于操作。Gupta 等^[25]考察了不同预处理方法对几种不同的木质纤维素的影响，结果显示，亚绿酸盐预处理与稀酸预处理和稀碱预处理相比，可以除去大部分木质素，预处理之后物料含有 90% (w/w) 纤维素，糖化得率在 86.4% 到 92.5% (w/w) 之间。相比于酸碱预处理都大幅提高。

传统预处理方法不是需要高温高压就是需要酸碱等试剂, 预处理条件剧烈, 不仅浪费能量而且导致一部分还原糖降解, 产生抑制物。所以迫切需要找到一种预处理方法能满足以下条件^[26, 27]: (1) 物料在预处理后较易水解; (2) 可发酵糖不会降解; (3) 不产生或少产生抑制物; (4) 木质素可以被有效除去; (5) 耗能较少。离子液体被认为是一种可再生的“绿色液体”, 且稳定不挥发, 且可以改变不同的阳离子及阴离子达到其对水, 无机物, 聚合物和有机物的溶解性变化^[28]。Hou 等^[27]考察了新型生物可再生氨基酸胆碱离子液体对稻秆预处理的效果。结果显示, 氨基酸胆碱对稻秆的预处理效果很好, 可以有效地除去木质素, 提高纤维素和木聚糖的酶解效率; 其中, 组氨酸胆碱显示出很好的可重复利用性, 循环使用五次之后, 葡萄糖得率大于 80%, 木糖得率也从 36.1% 增加到 52.2%。Yuan 等^[18]考察了离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑醋酸 $[C_2mim][OAc]$ 预处理的效果, 结果显示离子液体预处理增大了木质纤维素的表面, 相比于对照组, 糖化得率明显增加。

大量研究表明, 预处理可以极大地促进木质纤维素的糖化效率。因为预处理打开了木质纤维素的天然结构, 降低了其结晶度, 粒度等, 使得纤维素酶更有效的进行水解。但是, 现阶段发展的预处理技术都或多或少的有一些缺点。有的预处理效果较好, 但是成本较高, 操作困难。而条件温和的预处理一般无法达到理想的预处理效果, 还有些预处理效果较好, 成本也不高, 但是会产生一些抑制物影响后续的糖化及发酵过程。综上, 虽然各种预处理技术层出不穷, 但是要找到一种高效, 低成本而又不影响后续发酵的预处理工艺还有很长的路要走。

1.3 木质纤维素水解酶系对糖化的影响

相比于化学裂解催化, 酶水解的反应条件较温和, 温度一般在 50 °C 左右, 且使用酶催化不会产生或极少产生副产物, 这是相比于化学法最明显的优点之一, 再者, 酶水解不需要使用各种无机催化剂及有机溶剂, 所以相比于化学催化更加环保。但是酶水解由于条件温和, 所以反应速率较慢, 且因纤维素酶蛋白对温度, pH 值, 抑制物等较敏感, 所以较容易失活。而且由于纤维素酶不可逆吸附在木质素上, 水解产物抑制酶活力以及木质纤维素成分复杂而水解酶系功能过于单一等问题, 导致目前木质纤维素糖化得率低, 纤维素酶成本高等问题。为了减少生产中的纤维素酶用量并提高酶水解效率, 降低工业生产中纤维素酶的成本, 世界各国研究者们展开了广泛研究, 期望降低酶用量, 提高酶水解效率。

现阶段, 商业纤维素酶一般都含有三个组分, 内切葡聚糖酶, 外切葡聚糖酶及 β -葡萄糖苷酶。其中, 内切葡聚糖酶是作用在纤维素链内部的酶, 它把长链纤维素水解生成较短的纤维素或纤维寡糖; 而外切葡聚糖酶只能从纤维素两端进行水解纤维素长链并生成纤维二糖单体; 而 β -葡萄糖苷酶则可以水解纤维寡糖及纤维二糖生成葡萄糖^[16]。水解纤维素至少需要这三种酶协同作用才能完成, 缺少任何一种水解酶将会大大降低酶解的效率, 甚至不能水解纤维素。

由于木质纤维素的天然组成和结构不同,其降解所需的纤维素酶不同组分之间,以及纤维素酶与其他木质纤维素降解酶之间的最适比例也就各不相同,所以水解不同的木质纤维素,各酶之间的最佳配比也不相同。通过大量的实验验证,研究者们提出了通过对纤维素酶系组分的重构建以优化纤维素降解酶系,提高对纤维素底物的降解效率、降低酶用量的策略^[29]。Surisa 等^[30]考察了商业纤维素酶和来自真菌的 13 种纤维素酶抽提物的混合物对稀碱预处理的稻秆酶解效果。结果显示,来自棘孢曲霉 BCC199 的纤维素酶抽提物和商业酶协同作用最好,作者又考察了三种酶协同作用的影响,最终,商业纤维素酶,来自棘孢曲霉 BCC199 的纤维素酶抽提物以及来自枯草芽孢杆菌的苹果菌素三者的协同作用最好,当商业纤维素酶:孢曲霉 BCC199 酶:苹果菌素=41.4%:37.0%:21.6%时,其中酶活力为 2.82 FPU/g,稻秆的糖化得率为 769 mg 葡萄糖/g 稻秆,此研究较好的展示了不同酶协作对纤维素酶水解木质纤维素的影响。Sarah^[31]提出了多酶复合体的设计理念,用于考察多种酶在水解木质纤维素方面的协同作用;作者挑选了嗜热子囊菌的糖苷水解酶,两种纤维素酶, Cel48A 外切葡聚糖酶和 Cel5A 内切葡聚糖酶,以及内切木聚糖酶 Xyn10B 和外切葡聚糖酶 Xyn11A 两种木聚糖酶进行多酶复合体的构建,使用架蛋白简单地连接这四类酶亚基。从结果可以看出,在小麦秸秆酶解实验中,多酶复合体与单一纤维素酶相比,活性提高了 2.4 倍,多酶复合体提高酶活性可能是由于此酶系中各酶之间靠的更加紧密,有利于协同作用于底物。进一步研究表明,当把纤维素酶和木聚糖酶分开,分别和其他两种酶构成 2 聚体酶系时,活力相比于原先的四聚体酶系活力降低了 2 倍,这也证明了纤维素酶和木聚糖酶毗连是多酶复合体活力提高的关键因素。

木质素是纤维素酶的重要抑制物之一,木质素会造成纤维素酶的不可逆吸附。深入研究和理解在水解过程中纤维素酶的吸附-脱附机理,有助于降低酶的使用量以及酶的回收循环利用,这可能是燃料乙醇实现商业化的关键因素^[24]。Várnai 等^[32]研究了纯化的里氏木霉纤维素酶(TrCel7A, TrCel6A 和 TrCel5A),木糖酶 TrXyn11 以及来自黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶 AnCel3A 三类酶的混合酶对蒸汽爆破和脱木质素的云杉酶解的影响。这三种酶的混合比例参考了商业纤维素酶的组成比例,为模拟真实的同步糖化与发酵的条件,水解温度定为 35 °C。结果显示,绝大部分纤维素酶在水解开始阶段就快速吸附在蒸汽爆破处理的云杉上,并且水解全过程不会脱附;而脱木质素处理的云杉在酶水解过程中,当水解了 80% 云杉时,纤维素酶开始脱附,这说明木质素在纤维素酶的不可逆吸附方面起到关键作用。有研究表明,表面活性剂不仅可以适当提高酶活性,而且对于纤维素酶的吸附脱附也有影响。表面活性剂作用可以总结如下:(1) 去木质素作用;(2) 增加酶活力和酶回收率;(3) 提高糖化得率^[33]。Siposa 等^[34]考察了 PEG4000 对蒸汽爆破预处理的云杉酶解糖化的影响。结果显示,相比于对照组,水解液中的自由酶蛋白增加了 36%,纤维素酶活增加了 51%;糖化 72 h 后,残余的纤维素酶活相比于对照组提高了 48%-68%。

在木质纤维素生物炼制工艺中,纤维素酶的活性及成本是制约其工业化的重要因素。

在提高纤维素酶活的同时,要尽量降低其成本,这样才能使得酶水解过程中纤维素酶所花费的代价不至于影响整个生物炼制过程的经济性。

1.4 生物炼制工艺对糖化的影响

通过改进木质纤维素预处理技术及提高纤维素酶活,降低成本等措施,使得木质纤维素酶水解效率及酶解得率都有了可观的提高。但是酶水解过程中面临的混合不均一导致的传质问题及传热问题仍是制约酶水解效率的另一个至关重要的因素。而在高固含量酶水解中,这些问题变得尤为突出,在高固含量下,由于自由水缺乏,高产物浓度抑制等问题,导致酶解效率直线下降,且高固含量下各种糖化操作及反应器都不能满足其糖化的要求。这些问题则需要对糖化工艺进行改进,以期望解决或减弱以上糖化过程中出现的问题对糖化的影响。例如,改变底物及纤维素酶添加策略,以减弱高的产物浓度抑制;设计新型的糖化反应器,降低高固含量下混合搅拌的难题;采用新的糖化方式,来降低过程成本及利于工业化生产。经过世界各国学者的不懈努力,在生物炼制工艺的改造方面已经取得了重大的进展。

1.4.1 糖化发酵方式

在木质纤维素酶水解过程中,不可避免的会遇到高的产物浓度抑制这种现象。这会严重影响糖化得率从而导致葡萄糖浓度不高,进而提高过程成本,这种现象随着固含量的提高而越发的明显。针对此问题,比较容易想到是不断移走糖化产生的葡萄糖来减少产物浓度抑制。同步糖化与发酵(SSF)被认为是一种有效的糖化及发酵工艺。它相比于分步糖化与发酵(SHF)具有很多优点,例如,SSF使得糖化产生的葡萄糖被发酵菌体及时的消耗,从而降低了葡萄糖对纤维素酶的抑制作用;而且SSF相比于SHF,降低了糖化和发酵的总时间,从而降低了成本投入。Zhu等人研究了SSF和SHF对未预处理木薯渣生产乙醇的影响^[35],结果显示,在20%固含量下,SHF和SSF最终发酵产生的乙醇浓度分别为23.51 g/L和34.67 g/L,相比于SHF,SSF发酵生产的乙醇浓度提高了近47%。但是SSF也有它的劣势,因为糖化与发酵同步进行,为了保证菌体的生长和发酵条件,温度和pH会偏离纤维素酶的最适温度和pH,这使得纤维素酶的酶解效率降低,从而降低了纤维素的转化率。而分步糖化与发酵则能保证糖化与发酵均能在最适条件下进行,NREL 2011报告显示,酶的水解开始于连续的高固含量的反应器,纤维素酶加入后的固体含量是20% (不溶固体含量为10.6wt%),温度是48 °C。这一阶段作为酶水解的第一阶段,停留时间是24 h,然后这些水解液浆物料被分批输送到12个反应器中继续进行60 h的酶水解反应。每个反应器的体积为3600立方米(950,000加仑)。最终的纤维素转化率达到91%^[36]。SSF和SHF各有优势,为了综合利用SSF和SHF的优势,半同步糖化与发酵(S-SSF)工艺被研究以考察其糖化发酵性能。S-SSF是在SSF的基础上加入预水解步骤,这样既可以保证初始糖浓度相对较高,又可以保证后续发酵不受前期糖化的影响。Kerstin等人^[37]研究了预糖化对云杉SSF生产乙醇的影响,固含量

为 25%，采用 SSF 时，乙醇产率只有 5-6%；而在 SSF 之前加入 22 h 预糖化，乙醇产率提高到 72%。

1.4.2 底物及纤维素酶添加策略

为了提高生物炼制工艺的经济性，提高糖化固含量是必要的。固含量提高意味着酶解产生的单糖浓度增加，从而提高后续发酵产生的乙醇浓度。当乙醇浓度高于 4% (w/w) 时，可以大大降低后续乙醇精馏的成本，而生产 4% (w/w) 的乙醇则需要葡萄糖浓度达到 8% (w/w)，从而酶解固含量需要大于等于 20% (w/w)^[38]。提高固含量会带来一系列问题，例如，随着固含量的升高，反应体系自由水含量逐渐下降，从而引起传质和传热受阻，体系粘度增加，增加搅拌功耗且影响混合效果。

表 1.1 分批补料实验中底物及纤维素酶添加策略^[43]

Table 1.1 Substrate and enzyme application times for fed-batch hydrolysis.

底物	预处理方法	总固含量 ^a	水解时间 (h)	底物添加时间 (h)	底物添加策略	酶添加策略 ^b	纤维素转化率
玉米秆	稀酸	25%	288	每 24h 添加一次	保持不溶固含量为 15%	分批	80%
玉米秆	蒸汽	10%	72	0, 3, 6, 9	2.5%+2.5%+2.5%+2.5%	全加	60%
玉米秆	蒸汽爆破	30%	144	0,12,36,60	12%+6%+6%+6%	全加	62%
小麦秆	氢氧化钠	30%	144	0,8,24,48	9%+8%+7%+6%	全加	35%
大麦秆	蒸汽	15%	72	0,6,24	5%+5%+5%	分批	64%
水果渣	热水	15%	120	0,24,48	7.5%+3.75%+3.75%	分批	59%
高粱	热水	20%	120	0,24,48	10%+5%+5%	分批	60%
甘蔗渣	热水	30%	120	0,24,48	15%+7.5%+7.5%	分批	54%
甘蔗渣	稀酸	25%	72	0,6,12	10%+7.5%+7.5%	全加	74%
甘蔗渣	氢氧化钠	30%	144	0,8,24,48	9%+8%+7%+6%	全加	51%
木薯渣	热水	25%	72	0,6,12	10%+7.5%+7.5%	分批	74%

a 总固含量是糖化初始加入的不溶固体基于总体系的比例。

b 纤维素酶添加策略是基于何时添加纤维素酶来分类的，“全加”表示在糖化初始就将所有纤维素酶一次性加入；“分批”表示每次补料的时候按比例加入相应量的纤维素酶，时刻保证糖化液中纤维素酶用量不变。

目前一个有效的解决办法是采取分批补料的策略,降低固含量提高带来的问题^[39, 40, 41, 42]。分批补料具有以下优点:(1) 由于物料分步加入,初始糖化的固含量较批次糖化的固含量较低,由于物料的分批加入,允许糖化液粘度始终维持在一个较低的水平,这样可以减弱混合不利的问题;(2) 分批补料相当于一开始在较低的固含量下进行水解,这变相增加了纤维酶用量,而有更多的时间糖化,且体系自由水含量总是大于批次糖化的自由水含量,从而增加了酶水解效率。

当选择分批补料策略时,不可避免要确定补料方式及补料时间,Alicia 等^[43]总结了近年来各种分批补料策略(表 1.1),随着底物添加策略的不同,纤维素酶的添加策略也有所不同。主要分为两种,一种是糖化初始阶段便把所有纤维素酶加入,第二种是根据底物补料方式按比例加入。结果显示,一次加入的纤维素酶酶活在糖化过程中会不断降低,而根据分批补料的次数合理的添加纤维素酶则可以有效地保持糖化过程中纤维素酶活性,进而提高酶水解得率。另一个研究考察了纤维素酶(C),木聚糖酶(X)以及 β -葡萄糖苷酶(B)三种混合酶对木片酶解的影响^[44],三种酶的添加比例为纤维素酶:木聚糖酶: β -葡萄糖苷酶=10: 3: 3。添加策略如下:(1) 三种酶在糖化初始阶段一同加入(CXB),(2) 先加入纤维素酶,水解一段时间后加入木聚糖酶及 β -葡萄糖苷酶(C+XB),(3) 糖化初始阶段加入一半的纤维素酶,待水解一段时间把剩下的一半纤维素酶及全部木聚糖酶, β -葡萄糖苷酶一起加入(C+CXB)。最终发现,策略(3)纤维素酶转化率最高,为 63%,策略(1)和(2)转化率分别为 38%和 59%。以上研究结果显示,不同的底物和纤维素酶添加策略可能对高固含量酶水解纤维素转化率产生重大影响,在酶水解时,选择合适的补料策略是很有必要的。

1.4.3 反应器设计

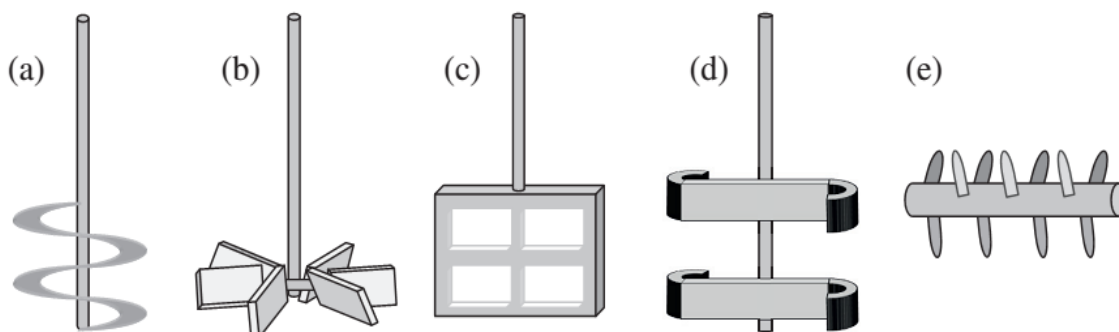


图 1.2 用于高固含量酶水解的不同类型的搅拌桨。(a) 螺带桨, (b) 斜叶桨, (c) 板框搅拌桨, (d) 双曲叶片搅拌桨, (e) 钉型搅拌桨

Fig. 1.2 Different types of impellers studied for use with high-solids enzymatic hydrolysis. (a) Helical impeller, (b) Rushton impeller, (c) plate-and-frame impeller, (d) double-curved-blade impeller, (e) peg mixer.

木质纤维素是一种水不溶性生物物质,所以在酶水解初始阶段,糖化液将在很长一段时间保持明显的固液两相,而在高固含量下初始糖化甚至很难看到自由水。这与淀粉等

水溶性物质的糖化完全不同,普通的搅拌釜式反应器完全不能满足高固含量下木质纤维素酶水解的要求。所以,需要设计一种能提高混合效率的糖化反应器,以提高高固含量下混合效率。再者,高固含量下糖化面临抑制物及产物抑制,传质,传热困难等一系列问题,这都需要设计反应器时予以考虑。针对以上问题,一些研究设计了新型的糖化反应器及搅拌桨(图 1.2),以减弱以上问题对糖化的影响。

为了保持酶解及发酵分别在各自最适条件下进行,降低水解产物对糖化的抑制,E. Viola 等^[45]设计了一种新型两室糖化及发酵反应器,这种反应器可以同时进行糖化和发酵,且分别在各自最适的反应条件下进行。这个反应器含有两个反应池,分别进行糖化和发酵,中间使用膜过滤器隔开,允许葡萄糖等产物从糖化池扩散到发酵池,而不允许木质纤维素穿过,且两个反应池分别使用不同的水浴摇床保证糖化池和发酵池分别维持在 45 °C 和 30 °C。实验结果显示,使用此反应器进行小麦秸秆糖化发酵实验,相比于糖化发酵在同一条件下进行的乙醇得率提高了 20%。

糖化过程中混合效果差,尤其在高固含量条件下,引起的传质,传热问题一直是影响糖化得率的重要因素。Henning 等人^[46]设计了一种卧式滚筒式反应器,这种反应器主要由带有卧式搅拌桨的卧式圆筒组成,圆筒被均分为 5 个小室,每个小室宽 20 cm,直径 60 cm,每个小室中含有一个由三个桨叶组成的搅拌桨,搅拌速度从 2.5-16.5 rpm,并且顺时针和逆时针两种搅拌方式交替进行,每分钟交换两次。实验结果显示,即使小麦秸秆初始固含量达到 40%,使用此反应器也可以有效地进行混合,并在 10 h 内使小麦秸秆完成糖化。当小麦秸秆固含量为 40%,酶用量为 7 FPU/g DM 时,糖化 96 h 后,产生了 86 g/L 的葡萄糖。Zhang 等^[47]设计了一种新型的螺带式搅拌桨,用以增加玉米秸秆糖化及发酵的性能,通过对糖化液流变学性质及搅拌功耗的研究,发现螺带桨可以有效的增加混合并且能量输入相比于斜叶桨要低很多。反应器是糖化反应的场所,合理的反应器设计不仅可以提高糖化得率和速率,而且使得能量输入大大降低,提高过程经济性。有些反应器虽然可以大幅提高纤维素转化率,但是以大量能量输入作为代价,得不偿失。反应器设计除了考虑以上因素,还要做到容易放大,提高其实际应用价值。

1.5 高固含量糖化的必要性及可行性分析

在木质纤维素糖化工艺中,在较低固含量下,酶水解体系粘度较低,酶解产生的产物浓度也不高,而且含有大量的自由水,这使得经过预处理后的木质纤维素,在纤维素酶的作用下,酶解得率较高,而随着固含量的提高,自由水越来越少,产物浓度越来越高,体系粘度也越来越大。有文献表明,酶解得率随着固含量的提高而呈现出线性降低的趋势^[46]。在高固含量下,尤其在 20%固含量以上,由于体系粘度过高,从而使得传统的反应器难以应付如此高粘度的反应体系,导致混合不均匀,导致体系传质传热受到影响,进而使得酶解得率降低,更重要的是如此高粘度的体系所带来的搅拌能耗也是相当巨大的^[48, 49]。其次,高固含量下高的产物浓度抑制也是不可避免的, Kristensen 等人研究结果显示^[50],随着固含量的提高,纤维素酶与纤维素的有效吸附会不断降低,而导

致这种现象的原因是高的葡萄糖浓度对纤维素酶的有效吸附产生了抑制作用,这是导致高固含量下酶水解效率降低的一个重要原因。高固含量下,自由水的缺乏是影响酶解得率的又一个重要因素,因为纤维素酶水解木质纤维素必须在水相中进行,自由水的减少无疑会影响纤维素酶的酶解活性。而且,自由水减少会使得酶解产生的葡萄糖难以及时的扩散,从而产生产物浓度抑制作用^[51]。以上这些问题导致高固含量糖化举步维艰,但是,生物炼制研究工作者们却从没放弃过对高固含量糖化的研究,这是因为,相比于低固含量,高固含量下酶水解具有巨大的优势。首先,固含量的提高,可以有效地提高葡萄糖浓度,虽然葡萄糖得率会相对降低,但是能在较低的酶用量下获得较高的葡萄糖浓度,仍是可取的。因为一方面,低的纤维素酶用量可以降低纤维素酶的成本;另一方面,葡萄糖浓度高可以提高后续发酵的乙醇浓度,进而节约下游乙醇精馏成本,而乙醇精馏成本在整个生物炼制中所占的成本比例非常大,所以提高葡萄糖浓度是十分必要的^[52, 53, 54]。值得一提的是,随着固含量提高,自由水减少可以使得单位体积的反应器装入更多的木质纤维素,这相当于提高了装料量。而且,自由水的减少也使得整个体系比热容降低,降低了加热和冷却的能耗,并且最终的废水也较少。因此,虽然高固含量下酶水解会带来一系列问题,但是其相比于低固含量的巨大的优势,仍让研究者们积极投身其中。为了解决高固含量所带来的问题,各国学者从原料,纤维素酶,糖化工艺,反应器等各个方面加以改进,这在前文中已经有了较详细的描述。例如,新型膜反应器的产生就是为了解决高固含量下高的产物浓度抑制现象,并取得了良好的效果;也有研究表面添加一些表面活性剂可以降低高固含量粘度,提高酶解效率。

不论糖化方式的改进,底物及纤维素酶添加策略优化还是反应器改进,在提高高固含量酶水解得率的同时还应该考虑其可行性及糖化效率。好的糖化工艺不仅需要较高的糖化得率,更重要的是能实现糖化的工业化,这就需要我们花更多的心思思考提高糖化得率与易于放大,减低成本之间的矛盾关系。为此,本研究针对此问题对糖化进行了改进。

1.6 本文研究内容及意义

1.6.1 研究内容

本课题主要针对糖化工艺进行了研究,采用一种新型的分段糖化法:第一步在 5 L 含有螺带式搅拌桨的反应器中迅速进行液化,在较高固含量下,木质纤维素固体和纤维素酶接触开始时,整个糖化体系呈现出固态,自由水基本观察不到,随着木质纤维素酶解的进行,糖化体系由固态渐渐向液态转变,此时,木质纤维素不断被水解产生寡糖,这一过程我们称之为木质纤维素的液化,这一过程体系粘度会大幅度降低;第二步在含有斜叶桨的反应器或摇瓶中进一步糖化。研究内容如下:

(1) 在含有螺带桨式搅拌桨的 5 L 反应器中,研究木质纤维素糖化液扭矩随糖化时间的变化,并确定可进行静置糖化的初始时间点;

(2) 研究不同固含量及酶用量下,分段糖化与全程搅拌糖化的对比,根据糖化得率

确定一个较合适的静置糖化时间点；

(3) 考察例如搅拌转速等糖化条件对分段糖化的影响，并研究影响分段糖化的因素；

(4) 使用分段糖化法进行糖化，待糖化液液化完全，接入发酵菌种继续在无搅拌条件下进行发酵，考察静置发酵性能。

本文还针对粒径对玉米秸秆酶解得率的影响进行了研究，粒径对于木质纤维素的水解影响一直众说纷纭。本文考察了未预处理玉米秸秆粒径对酶解得率的影响及其原因。具体内容如下：

(1) 研究不同粒径下，玉米秸秆酶解得率变化；

(2) 对影响酶解得率的因素，如酶解时间，酶用量等进行了考察，确定不同粒径酶解得率差别是否和这些因素有关；

(3) 对不同粒径玉米秸秆的内外比表面积进行了研究，确定随着粒径的变化，总比表面积的变化规律；

(4) 通过电子扫描显微镜(SEM)直观的观察不同粒径玉米秸秆的差别，并进一步确定粒径是否会对酶解得率产生影响。

1.6.2 研究意义

现阶段，为了降低生物炼制成本，必须提高糖化过程固含量。提高固含量必然需要高效搅拌桨来提高混合效率。而这种含有高效搅拌桨的反应器是很难做到放大生产的，因为搅拌时所需的功耗过大，反应器设计困难。针对以上问题，本文提出了一种新型的糖化方式—分段糖化。这种糖化方式恰当的处理了高效混合与放大生产之间的矛盾，先在小型高效混合反应器中使得糖化液迅速液化，然后将发酵液集中转入大型无搅拌糖化反应器中进一步糖化。首先，分段糖化在糖化初始阶段仍采用现有的高效混合反应器糖化，这与现阶段对于高固含量的研究相同，保证了高固含量下糖化的效率；其次，在糖化液粘度降低可以转移时，将糖化液转入大型无搅拌反应器中进一步糖化，有效解决了在大型反应器中加入搅拌桨的难题；最后，这种糖化方式减少了搅拌的时间，大大节约了搅拌所带来的能耗，节约了过程成本。通过这种糖化方式更有利于实现生物炼制的工业化生产。

而玉米秸秆粒径对酶水解的研究则告诉我们，未预处理的木质纤维素粒径大小对于酶水解的影响微乎其微，因为粒径的减小虽然增加了外比表面积，但是内比表面积并不随着粒径的减小而减小，且内比表面远远大于外比表面积，这导致粒径减小并不能有效的增加其比表面积，而经过预处理后的木质纤维素则是木质纤维素内部结构得到破坏，有效的增加了内比表面积，才使得酶水解效率大大增强的。所以，在木质纤维素前处理过程中，不宜将木质纤维素粉碎的过小，因为这不能有效的增加后续的酶解过程，反而增加了过程能耗。通过此研究，确定了粒径，比表面积和酶解得率之间的关系，对木质纤维素的处理过程具有指导意义。

第 2 章 两阶段混合模式对玉米秸秆高固含量下糖化及后续发酵的影响

2.1 背景介绍

为了降低生物炼制工艺的成本,提高糖化过程中的固含量是必要的。因为高固含量可以增加乙醇浓度,进而降低下游分离成本。有文献指出,当固含量从 20% 升高到 30% 时,成本将会降低 10%^[55]。但是,高固含量糖化会带来一系列问题,首先,相比于低固含量,高固含量下自由水的缺乏较为突出,木质纤维素是一种密度较低,吸水性很强的材料,这导致在高固含量下基本观察不到明显的自由水存在,而纤维素酶水解必须在水相中进行,这就导致酶水解效率大大降低^[56];其次,高固含量就意味着高的葡萄糖及乙醇浓度,而产物浓度过高会对纤维素酶及发酵菌体产生抑制作用,有文献指出,当乙醇浓度高于 15% (v/v) 时,就会对发酵效率产生影响^[57];更重要的是,随着固含量的提高,在糖化初始阶段,糖化液的粘度会非常高,导致糖化液液体状向着膏状转变^[58]。从而使得反应体系混合不均一,传质传热受到影响,影响糖化效率。有研究考察了不同的粘度调节剂对糖化的影响,结果显示,在 10% 固含量下,这些粘度调节剂基本不会对酶水解有促进作用,甚至部分粘度调节剂会降低酶水解速率;但是在 30% 固含量下,加入粘度调节剂可以有效地降低体系粘度达到 4 倍左右,而且糖化得率也提高了 30% 左右。这说明高固含量下,高粘度是影响水解的一个关键因素,因此,我们应尽量使得高固含量下体系的粘度维持在一个较低的水平,或使得体系的粘度快速的降低到较低的水平^[59]。

分批补料是解决固含量过高的一个有效措施^[60],大量研究指出,通过分批补料可以有效地解决高固含量体系粘度过高的问题,提高了糖化过程中葡萄糖的浓度及发酵过程中乙醇的得率^[61,62,63,64]。提高反应器的混合效率是解决高固含量粘度过高的另一个有效方法,因为高固含量下,因为粘度过大导致普通反应器不能达到有效的混合,提高了反应器的混合效率可以大大减弱传质传热带来的影响,防止局部产物浓度过高。滚筒反应器是一种高效的混合反应器,在高达 40% 下,仅仅 4 h 就可以有效地使木质纤维素液化,虽然糖化 96 h 后,糖化液仍呈现出膏状,但是并没有因为体系粘度过高而导致不能有效的糖化,且研究还发现,滚筒搅拌的搅拌转速对于糖化的影响并不大,即使在较低的转速下仍可以进行酶水解,降低了因搅拌而带来的功耗^[46]。

所以,要保持高固含量下糖化的糖化得率,高效的混合搅拌是必须的。而现阶段,各种高效的混合搅拌桨或反应器层出不穷,其中,滚筒反应器、螺带桨反应器在高固含量酶水解中都表现出了明显的优势。但是目前都处于实验室规模,工业生产中,加入这种高效的搅拌设备是不切实际的,因为在成百上千立方的反应器中,搅拌将成为一个极为耗能的过程,而这会大大增加木质纤维素生物炼制过程的成本。而高固含量下,不搅拌是无法进行有效的酶水解的,从而导致高效的混合与工业生产之间出现了不可调和的矛盾。针对此问题,本研究对现有的糖化工艺进行了改进,使得在不影响糖化效率的同

时而有利于放大生产。首先,在实验室规模的高效混合反应器中使得木质纤维素迅速液化,使得糖化液粘度迅速降低,体系均一;然后,将液化完全的糖化液集中输送到工业级大型反应器中进行集中液化,而此过程是不加入搅拌桨的,仅仅使用循环泵进行取热即可。这种分段的糖化方式巧妙地解决了高效混合及放大生产的矛盾,并节约了生产过程中搅拌能耗,为工业化生产奠定基础。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料及试剂

2.2.1.1 清洗及粉碎

本实验使用的原料为玉米秸秆,购自河南郸城。在玉米秸秆中含有灰分,砂砾等杂质,会影响玉米秸秆后续预处理及酶水解过程。所以在使用之前需要对玉米秸秆进行清洗除尘及漂洗除砂砾等过程,具体方法为:将玉米秸秆装入洗衣袋中,然后放入洗衣机中,调节洗衣模式为棉麻模式清洗 40 min,然后取出后放入水槽中使用清水进行漂洗,因为砂砾密度较大,这样可以使得砂砾沉入水底而玉米秸秆漂浮在水面上,待漂洗结束后将玉米秸秆捞出后再放入洗衣机中脱水甩干。将甩干后的玉米秸秆放于通风干燥处晾干,并用鼓风干燥箱进一步除去水分。使用锤式粉碎机将干燥后的玉米秸秆粉碎至 0.5-1 cm 存储备用。

2.2.1.2 预处理

粉碎后的玉米秸秆需要经过本实验室干式稀酸预处理^[65],其中,预处理条件为温度 175 °C,酸用量 2.5%,固液比 2:1,停留时间 5 min。预处理具体步骤:将物料加入预处理反应器中,并加入相应量的 H₂SO₄ 溶液(保证酸用量为 2.5%),在 50 rpm 下搅拌 3min 使玉米秸秆和 H₂SO₄ 溶液充分混合。然后向预处理反应器中通入高压蒸汽,保证 6-7 min 使得预处理反应器内温度升高到 175 °C,并保持此温度 5 min,待反应结束后关闭蒸汽发生器进气,开排气阀排出预处理反应器中的高压蒸汽并放料,将预处理后的玉米秸秆放入塑料袋中冷冻保存。

2.2.1.3 生物脱毒

生物脱毒为本实验室自行研究的脱毒方法^[66],为固态发酵。玉米秸秆在预处理以后,使用 20% Ca(OH)₂ 调节 pH 到 5 左右,然后接入 *Amorphotheca resinae* ZN1 放置在塑料箱中进行生物脱毒 7 天,温度保持在 28 °C。脱毒后的玉米秸秆用于后续糖化及发酵实验。其中,玉米秸秆中纤维素及半纤维素采用两步酸解法^[67]测定,纤维素含量为 41.49%,半纤维素含量为 2.18%。本实验所用纤维素酶为 Youtell #6 固体干粉,购于湖南尤特儿生化有限公司,测定其滤纸酶活为 135 FPU/g 酶粉,β-葡萄糖苷酶活为 344 CBU/g 酶粉,测定方法^[68]来自美国可再生能源实验室(NREL)并经过适当改进。

2.2.2 分段糖化

分段糖化是相对于传统意义上的木质纤维素糖化而言的,它的主要特点是将原有糖化过程分为两阶段:(1)第一阶段搅拌糖化;(2)第二阶段静置糖化。首先,在有搅拌的

情况下,使得木质纤维素和纤维素酶有效混合,充分接触,快速降低糖化液粘度,使得糖化液体系均一;其次,在此基础上把搅拌停止,将糖化液转入静置反应器中使得木质纤维素与纤维素酶进一步反应。

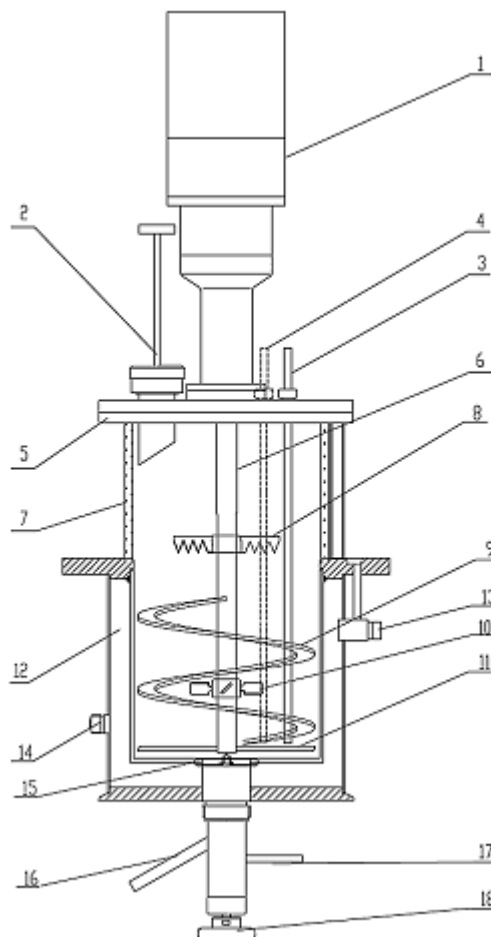


图 2.1 适用于高固含量的螺带式搅拌桨同步糖化与发酵反应器

Fig. 2.1 Bioreactor for SSF operation at high solids loading. The bioreactor includes (1) motor, (2) solid feeding inlet, (3) thermometer port, (4) pH-meter port, (5) tank cap, (6) drive shaft, (7) tank wall, (8) antifoaming impeller, (9) helical impeller, (10) turbine/aerofoil impeller, (11) bottom impeller, (12) water-bath jacket, (13) water-bath jacket outlet, (14) water-bath jacket inlet, (15) gas disperser, (16) discharge head, (17) gas inlet, and (18) stop valve.

搅拌糖化在 5 L 反应器中进行,搅拌桨为本实验室自行研制的螺带式搅拌桨^[47],此搅拌桨在高固含量下仍具有良好的混合效果。糖化条件为:反应体系 3000 g,固含量 20%, 25%, 30%,纤维素酶用量 5, 10, 15 FPU/g 干物料,糖化,温度 50 °C,搅拌转速 50, 100, 150, 200 rpm,糖化时间 48 h。具体糖化步骤为:(1)取少量脱毒后的玉米秸秆放入平皿中,放入 105 °C 鼓风干燥箱烘干至恒重,测定玉米秸秆的含水量;(2)根据糖化条件算出所需湿物料质量,干酶粉质量,及去离子水质量;(3)将玉米秸秆湿物料,去离子水放入高压灭菌锅中进行灭菌,5 L 反应器则使用在位灭菌 20 min,使用 pH

电极标定液对 pH 电极进行标定；(4) 将去离子水及纤维素酶加入反应器中，然后加入玉米秸秆湿物料，并开启搅拌并采用 5M NaOH 控制 pH 在 4.8。(5) 糖化过程中 12 h 取样一次，于 15700 rcf 离心 5 min，取上清于 -4°C 冰箱保存，使用高效液相色谱(HPLC) 进行样品分析。

静置糖化在 100 mL 摇瓶中进行，经过上述搅拌糖化使得糖化液液化后，取 25 g 放入 100 mL 摇瓶中，然后放置在水浴摇床中，设置温度 50 °C，不开搅拌，进行静置糖化，每个实验做 2 组平行。待糖化结束后，开启搅拌 5 min 使得摇瓶中糖化液混合均匀，然后取出 1 mL 离心，取上清于 -4 °C 冰箱保存，用于 HPLC 分析。

2.2.3 分段同步糖化与发酵

2.2.3.1 培养基

活化培养基(MRS): 葡萄糖 20 g/L, 酵母浸粉 1 g/L, 硫酸镁 1 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸铵 1 g/L, 分装 100 mL 摇瓶中，每个摇瓶 20 mL，灭菌备用。

驯化培养基(25%水解液和 50%水解液): 以未脱毒玉米秸秆为原料，在 15%固含量，15 FPU/g 条件下糖化 48 h，离心取上清，定义此上清为 100%水解液。在 100%水解液中加入适量的去离子水，保证 $V_{100\% \text{ 水解液}} : V_{\text{去离子水}} = 1: 3$ 或 $1: 1$ ，就可以配成 25%或 50%的水解液，并补充适量葡萄糖保证水解液糖浓度在 50 g/L 左右，再加入磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸铵 1 g/L, 硫酸镁 1 g/L, 酵母浸粉 1 g/L。

发酵培养基：培养基中不含葡萄糖，其他同 MRS 培养基。

2.2.3.2 种子培养

2mL 酿酒酵母冻存管 $\xrightarrow{2\text{mL}}$ 20mL MRS 培养基(30°C, 180rpm 下培养 18h)
 $\xrightarrow{2\text{mL}}$ 20mL 25%驯化培养基(30°C, 180rpm 下培养 15h) $\xrightarrow{2\text{mL}}$ 20mL 50%
驯化培养基(30°C, 180rpm 下培养 15h) $\xrightarrow{20\text{mL}}$ 200mL 50%驯化培养基(30°C,
180rpm 下培养 15h) $\xrightarrow{200\text{mL}}$ 5L 发酵罐

2.2.3.3 玉米秸秆分段同步糖化与发酵产乙醇

本实验乙醇发酵采用静置发酵的方式，首先在 5 L 螺带桨反应器中有搅拌糖化，糖化条件为固含量 30%，酶用量 5, 10, 15 FPU/g，温度 50 °C，搅拌转速 50 rpm，过程使用 5M NaOH 调节 pH 4.8，糖化时间 5 h，具体步骤如 2.2.2，使得糖化液迅速液化，待到糖化液体系均一，粘度降低后(本实验条件下，一般 5 h 左右可液化完全)，降低糖化液温度至 37 °C，调节 pH 至 5.5，接入酵母菌种子培养基 200 mL，搅拌 5min 左右使得酵母菌与糖化液充分混匀，然后关掉搅拌，进行静置发酵。其中发酵条件为固含量 30%，酶用量 5-15 FPU/g，温度 37 °C，搅拌转速 0 rpm，发酵初始 pH 5.5，发酵过程中不调节 pH，发酵时间 67 h，发酵过程每隔 12 h 取样测定葡萄糖浓度及乙醇浓度。

2.2.4 样品分析

葡萄糖、木糖浓度通过高效液相色谱仪(HPLC) (Bio-Rad HPX-87H 色谱柱，示差折

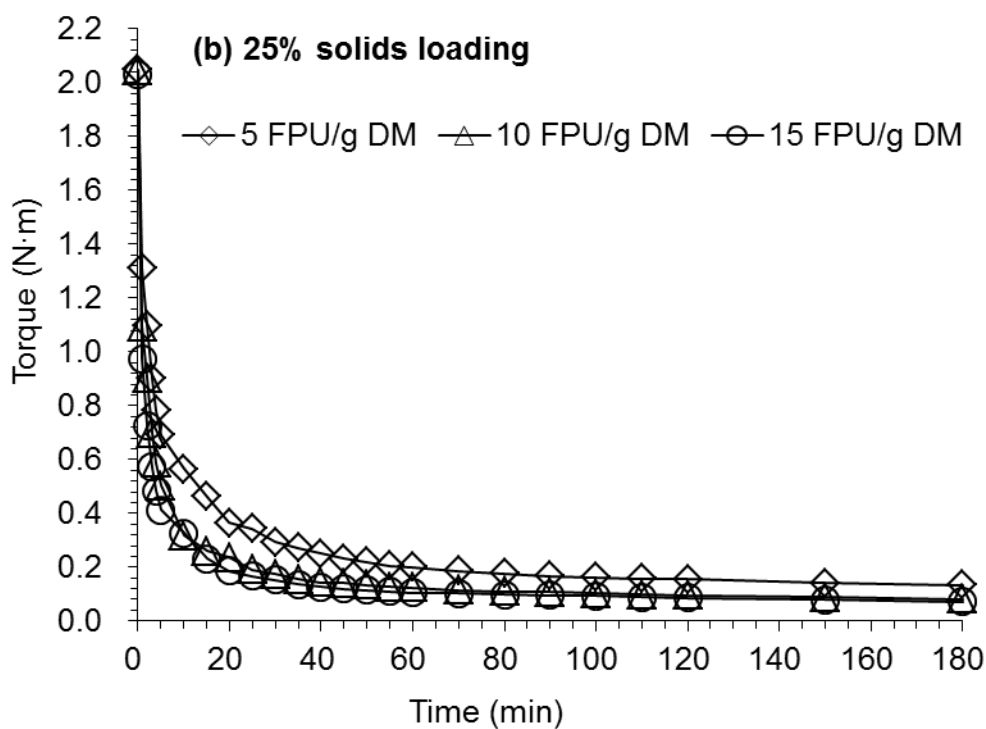
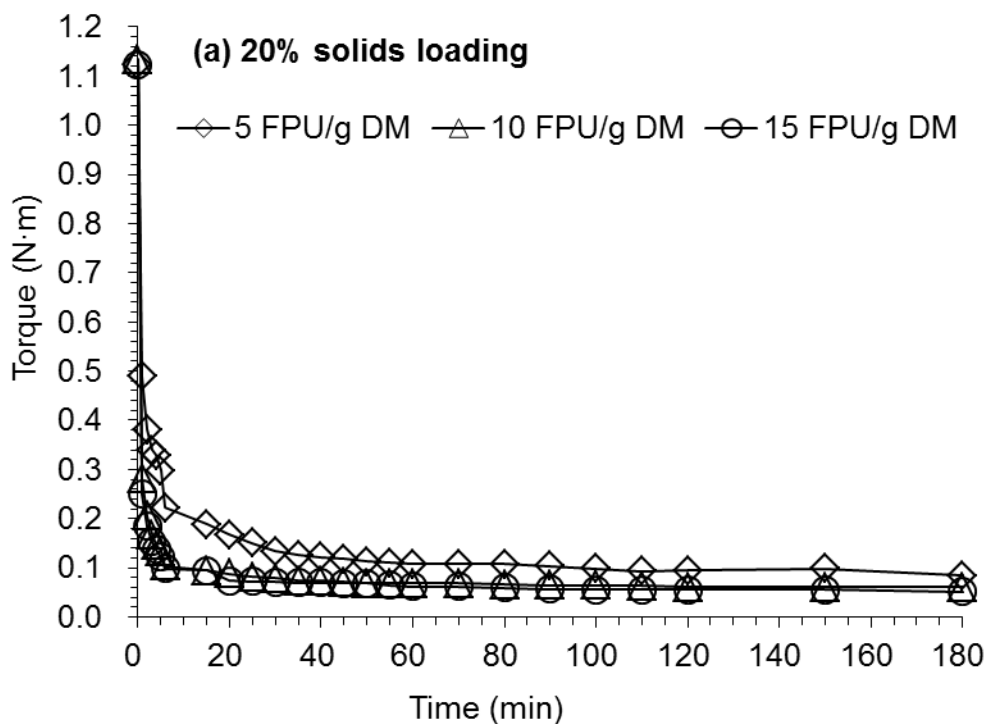
光检测器 RID-10A)测定。流动相采用 5 mmol/L 的稀硫酸, 流动速度为 0.6 mL/min, 高效液相色谱柱温为 65 °C。待测样品先经过适当倍数(5 倍, 10 倍, 20 倍或 50 倍等)的稀释后并用 0.22 μm 的滤膜过滤, 待液相基线平稳之后, 选择合适的测定时间等参数, 将样品打入液相中进行测定, 测量样品所需量为 20 μL 。待样品出峰结束后, 使用 HPLC 自带的处理工具对样品曲线进行积分处理, 然后根据标准曲线算出待测样品中葡萄糖和木糖的浓度。

2.3 结果与讨论

2.3.1 糖化过程中扭矩的测定

糖化过程中液化程度的一个重要指标是糖化体系的粘度变化, 随着液化的不断进行, 糖化液的粘度会迅速降低。但是在实验过程中很难对糖化液的粘度进行实时测定, 而通过本实验室前期的工作我们得知, 糖化液的粘度和糖化液的扭矩之间具有相对应关系, 当知道糖化体系扭矩时, 可以通过公式算出体系粘度, 所以, 本实验通过实时测定糖化液扭矩来反应糖化过程中体系粘度的变化趋势。

分段糖化是将糖化分为两步进行: 第一步, 强搅拌使得木质纤维素在纤维素酶的作用下迅速液化, 第二步, 停止搅拌, 进一步糖化。首先, 为了保证木质纤维素能快速的进行液化, 必须使得木质纤维素和纤维素酶充分接触, 待糖化液粘度降低, 体系均一, 糖化液流动性大大加强后, 转入无搅拌糖化才可以顺利进行, 否则糖化液体系不均一, 液化不彻底, 停止搅拌会会大大降低糖化效率, 且会影响糖化液的转移, 基于此方面考虑, 应当适当延长第一步有搅拌的时间以保证糖化液液化完全; 另一方面, 为了利于木质纤维素糖化的放大生产并节约过程成本, 必须使得第一步有搅拌尽可能短, 因为在工业生产中, 我们要尽量缩短搅拌时间甚至不搅拌, 因为这样不仅可以大大简化实验操作和反应器设计, 而且可以大大节约因搅拌而带来的能耗。为此, 我们需要选择一个合适的分段糖化时间点, 使得糖化液既能在第一步糖化中进行有效的液化而又可以节约大量能耗。为了确定合适的分段糖化时间点, 对不同固含量(20%, 25%, 30%)玉米秸秆糖化液扭矩进行了测定, 这是因为糖化液扭矩和糖化液粘度之间呈现正相关, 所以测定糖化过程中糖化液扭矩变化可以反映出粘度变化。我们设定当糖化液扭矩降到初始值的 10%时, 糖化液粘度大幅度降低, 糖化液混合均匀, 此时才可以进行分段糖化。



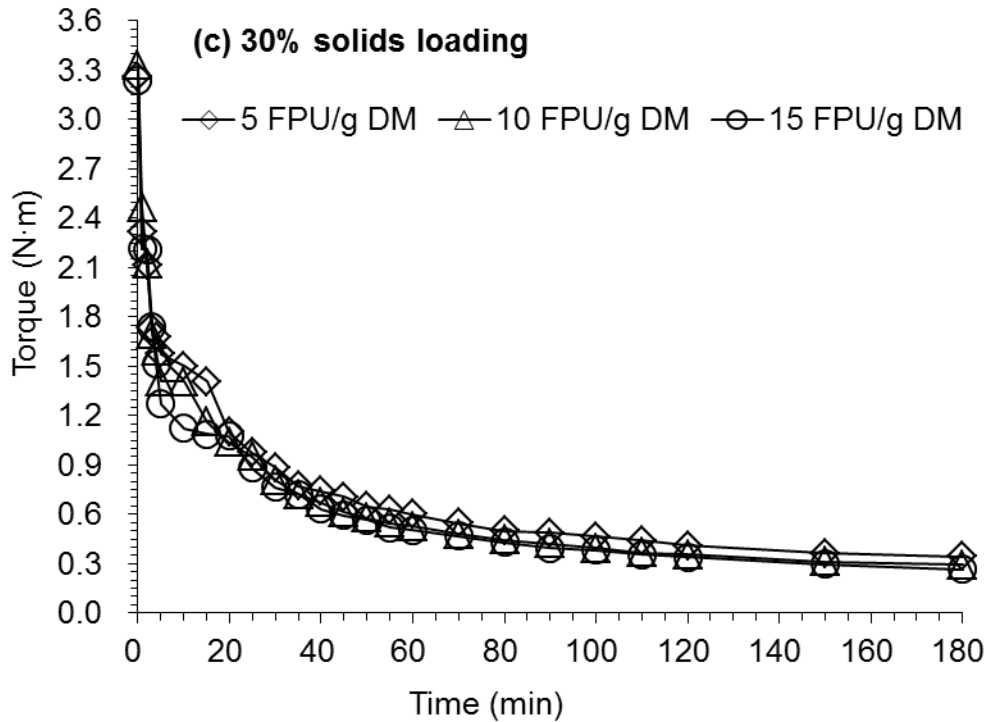


图 2.2 不同固含量及酶用量下糖化液扭矩随糖化时间的变化, (a) 20%固含量; (b) 25%固含量; (c) 30%固含量

Fig. 2.2 Effect of solids loading and cellulase dosage on the torque of corn stover slurry during enzymatic hydrolysis. (a) 20% solids loading; (b) 25% solids loading; (c) 30% solids loading. Conditions in 5L bioreactor: cellulase 5, 10, and 15 FPU/ g DM, respectively; temperature 50 °C, time period 48 hours at 150 rpm.

图 2.2 为糖化前 3 h 的扭矩测定图, 从不同固含量糖化液扭矩测定结果可以看出, 在 20% 固含量下, 没加入纤维素酶之前, 玉米秸秆糖化液扭矩为 1.15 N·m 左右, 当加入纤维素酶后, 5, 10, 15 FPU/g 三种酶用量下扭矩随时间变化都非常快, 其中 10 和 15 FPU/g 酶用量下, 扭矩随时间变化趋势基本相同, 而 5 FPU/g 酶用量下, 变化趋势较 10 和 15 FPU/g 酶用量下稍慢, 但是三个酶用量下, 在液化 15-30 min 后, 糖化液的扭矩都可以降低到初始扭矩的 10%; 在 25% 固含量下, 没加入纤维素酶之前, 玉米秸秆糖化液扭矩为 2.05 N·m 左右, 当加入纤维素酶后, 5, 10, 15 FPU/g 三种酶用量下扭矩随时间变化趋势和 20% 基本相同, 三个酶用量下, 在液化 30-60 min 后, 糖化液的扭矩都可以降低到初始扭矩的 10%; 在 30% 固含量下, 没加入纤维素酶之前, 玉米秸秆糖化液扭矩高达 3.30 N·m 左右, 因为固含量较高, 当加入纤维素酶后, 5, 10, 15 FPU/g 三种酶用量下扭矩随时间变化并没有像 20% 及 25% 那样瞬间降到 0.50 N·m 以下, 但是从扭矩降低的绝对值我们可以看出, 在糖化初始阶段, 随着固含量的提高扭矩降低的越快, 在液化 120-180 min 后, 糖化液的扭矩可以降低到初始扭矩的 10%; 综上所述, 在三个固含量下, 玉米秸秆糖化液在糖化过程中扭矩降低的速度非常快, 20%, 25%, 30% 糖化液扭矩将为初始扭矩的 10% 所花的时间分别为 15-30 min, 30-60 min, 120-180 min。从糖

化初始到糖化结束整个 48h 时间，扭矩降低了 50 倍左右，基本在糖化初始的 3 h 内就可以降低到很低的水平。这说明玉米秸秆糖化液粘度在糖化后期始终处于一个较低的水平，有文献指出，在糖化过程中，糖化液粘度降低幅度越大，表明该糖化液对搅拌的依赖性越弱。

2.3.2 不同固含量及酶用量下全程搅拌糖化研究

由图 2.3 可以看出，在 20% 固含量下，搅拌 150 rpm 下糖化 48 h 后，5, 10, 15 FPU/g DM 三个酶用量的实验中，葡萄糖浓度分别为 69 g/L, 87 g/L 和 96 g/L, 得率分别为 69%, 74%, 83%。在 20% 固含量下，玉米秸秆可以一次性加入，螺带桨的混合效率很高，并没有出现因固含量过高而混合不均一的问题。所以，在 20% 固含量下，并不会出现因混合不均导致的酶解效率偏低的现象。

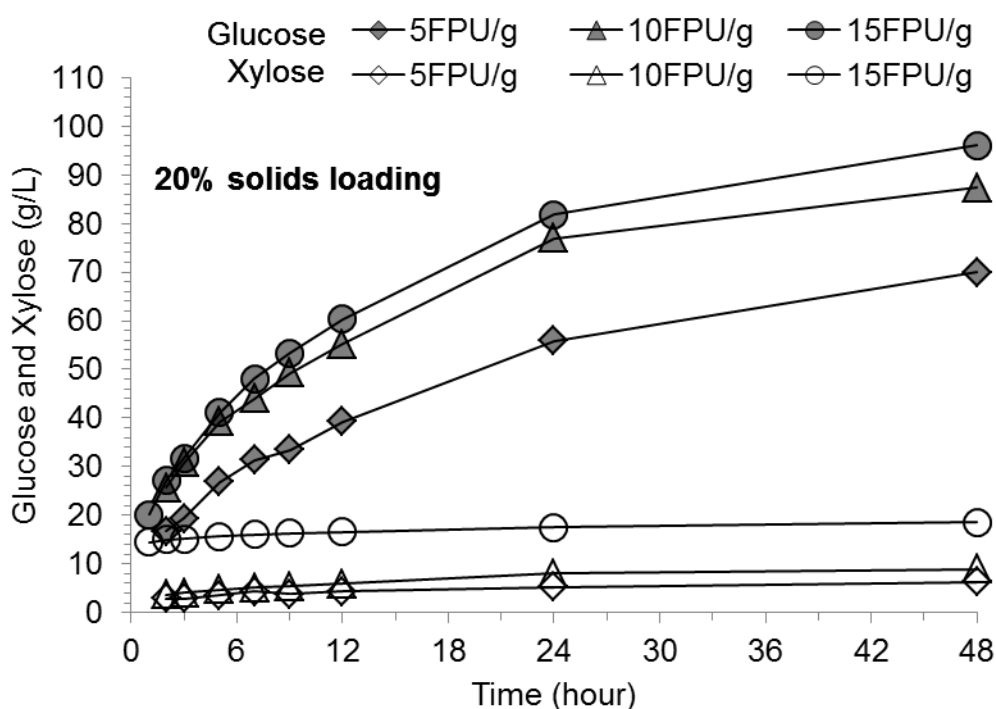


图 2.3 20% 固含量下 5L 螺带桨反应器搅拌糖化

Fig. 2.3 Enzymatic hydrolysis process with agitation at a 5-L bioreactor level at 20% solids loading. Conditions in 5L bioreactor: cellulase 5, 10, and 15 FPU/ g DM, respectively; solids content 20% (% , w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours at 150 rpm.

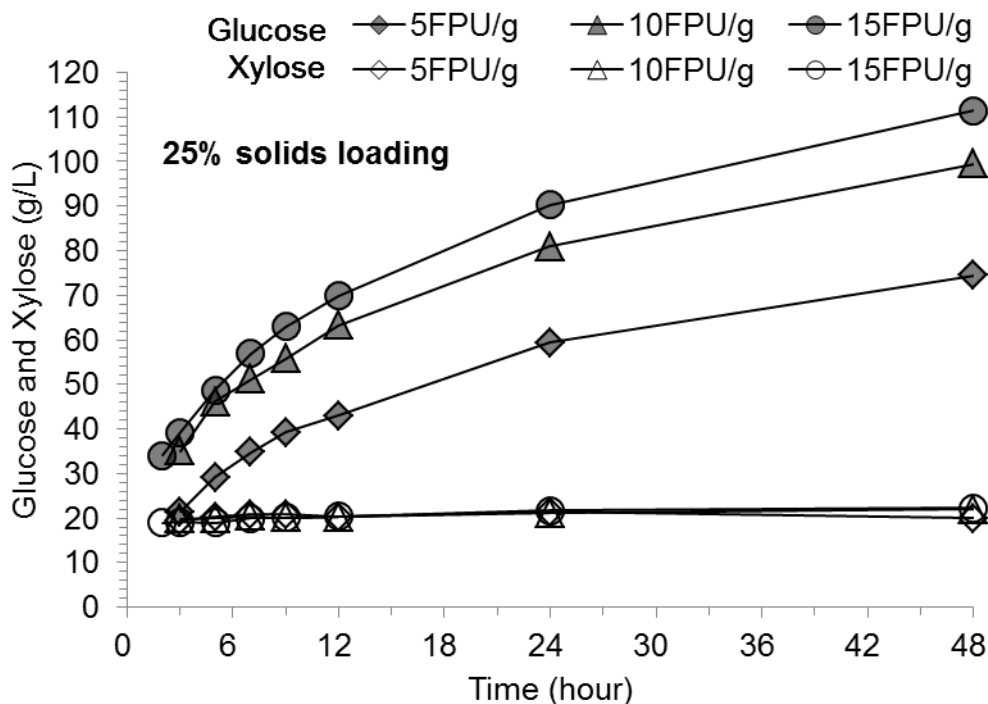


图 2.4 25%固含量下 5L 螺带浆反应器搅拌糖化

Fig. 2.4 Enzymatic hydrolysis process with agitation at a 5-L bioreactor level at 25% solids loading. Conditions in 5L bioreactor: cellulase 5, 10, and 15 FPU/ g DM, respectively; solids content 25% (% w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours at 150 rpm.

在 25%固含量下, 搅拌 48 h 后, 三个酶用量下的葡萄糖浓度分别为 74 g/L, 99 g/L, 111 g/L, 得率分别为 48%, 64%, 73%。相比于 20%固含量来说, 25%下糖化初始阶段, 糖化液明显粘稠了很多, 需要 3 次甚至更多次的分批加料才可以保持糖化液的液浆状态, 从而使得体系混合均一, 不至于出现大量固体块状不溶物。

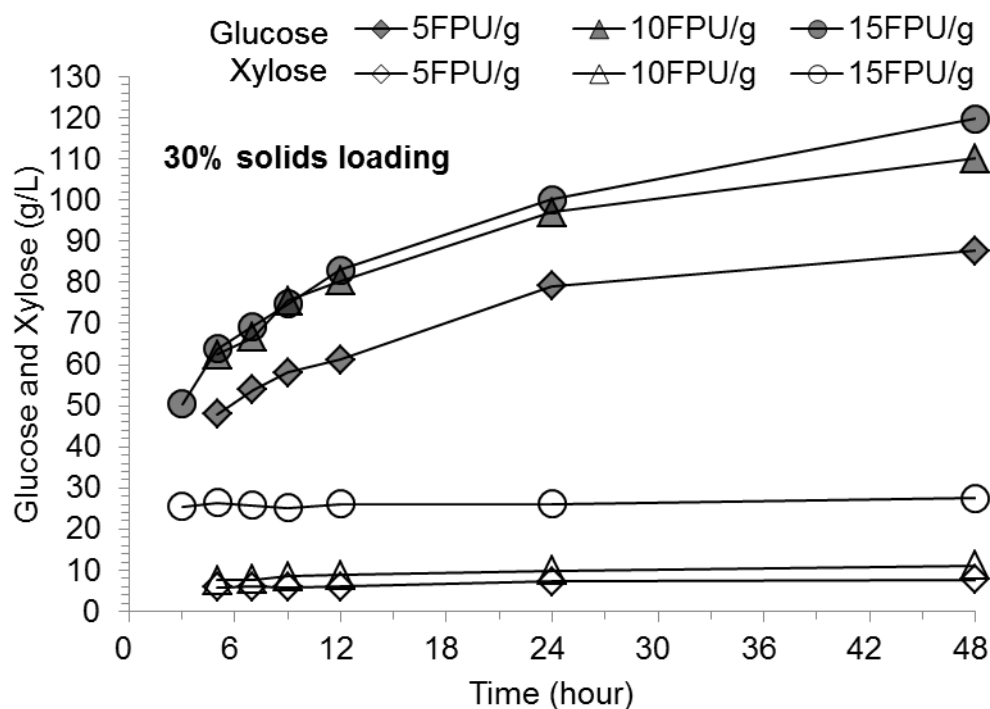


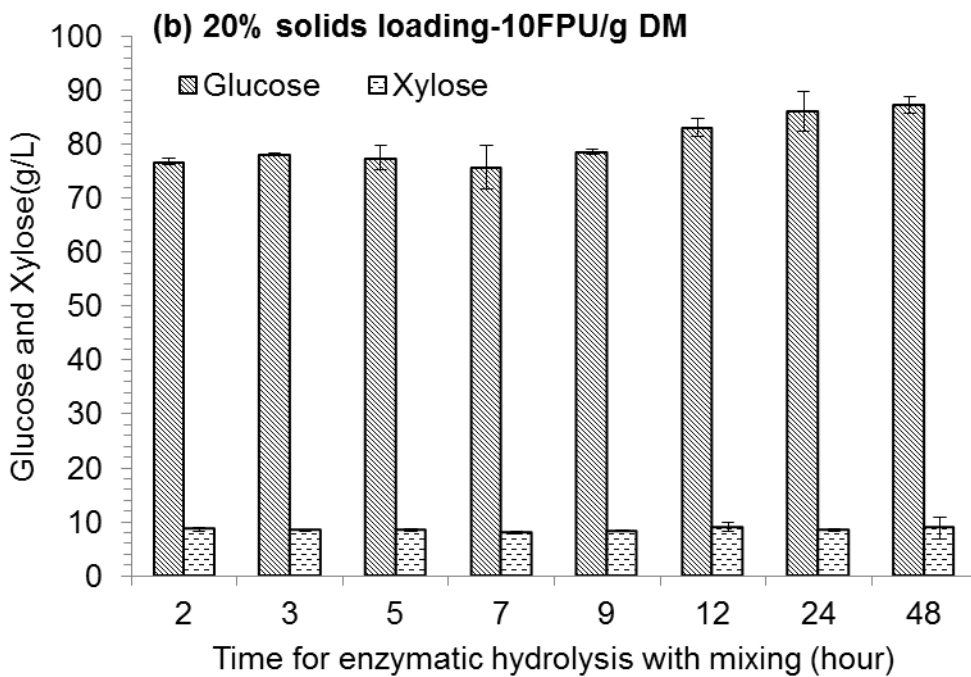
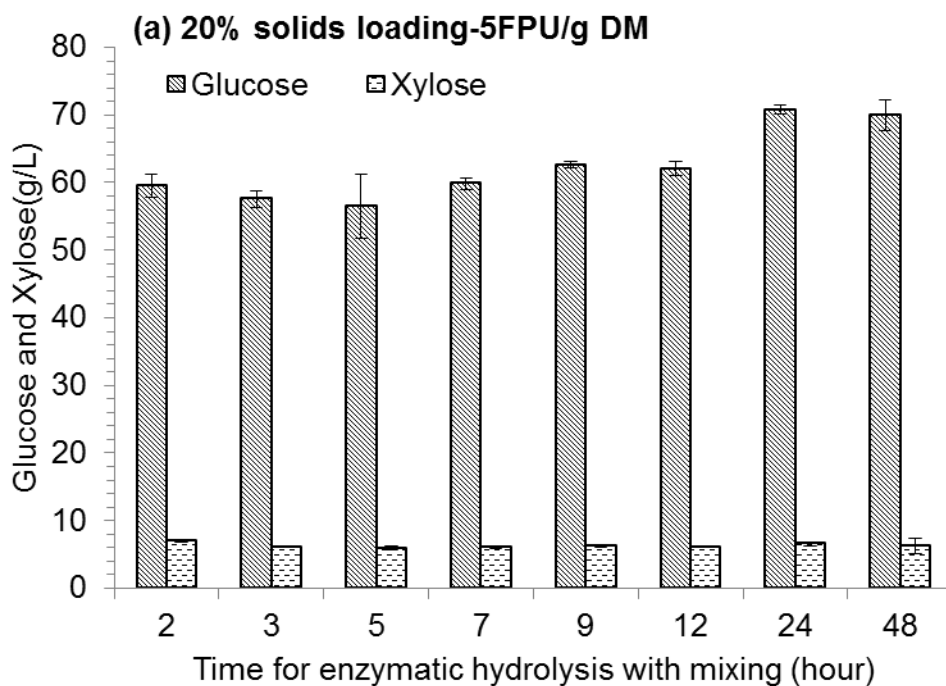
图 2.5 30%固含量下 5L 螺带桨反应器搅拌糖化

Fig. 2.5 Enzymatic hydrolysis process with agitation at a 5-L bioreactor level at 30% solids loading. Conditions in 5 L bioreactor: cellulase 5, 10, and 15 FPU/g DM, respectively; solids content 30% (%, w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours at 150 rpm.

30%固含量下,搅拌糖化 48 h 后,三个酶用量下葡萄糖浓度分别高达 87 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 但是得率分别只有 44%, 55%, 60%。说明固含量提高到 30%时,糖化明显受到了抑制。在糖化初始阶段,观察不到自由水的存在,糖化液呈现出一种粘稠的膏状,此时的传质传热受到严重的影响,即使使用了螺带桨这种高效的混合搅拌桨,但是仍不可避免的出现少量混合不均一的情况,随着酶水解的进行,糖化液会迅速的变稀,在大概 5 h 左右会呈现出较好的流动性。

2.3.3 不同固含量及酶用量下分段糖化研究

上述扭矩测定已经发现,玉米秸秆是一种随着糖化进行扭矩降低非常快的木质纤维素,这样可以保证能在短时间内使得糖化液粘度降低到一个很低的水平,实现快速液化。20%, 25%, 30%固含量下糖化液扭矩降为初始扭矩值的 10%所花的时间分别为 15-30 min, 30-60 min, 120-180 min, 为保证玉米秸秆能液化完全,接下来不同固含量的分段糖化实验将以此时间为最短分步时间点进行研究。接下来以此为分段糖化起始分步时间点,对不同固含量下分段糖化进行了研究。



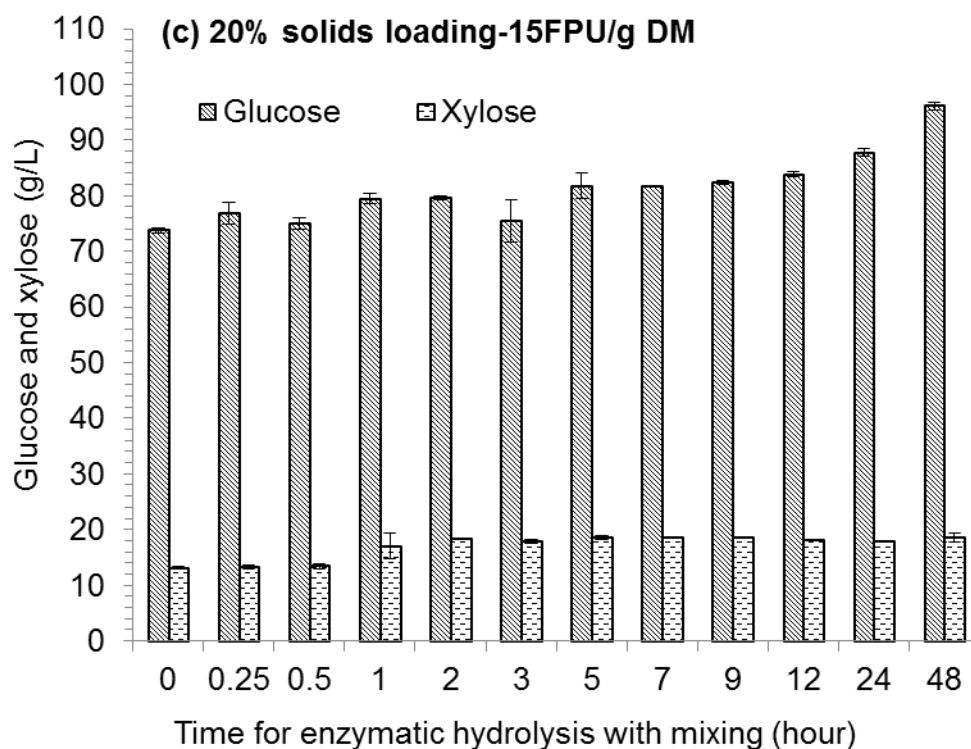
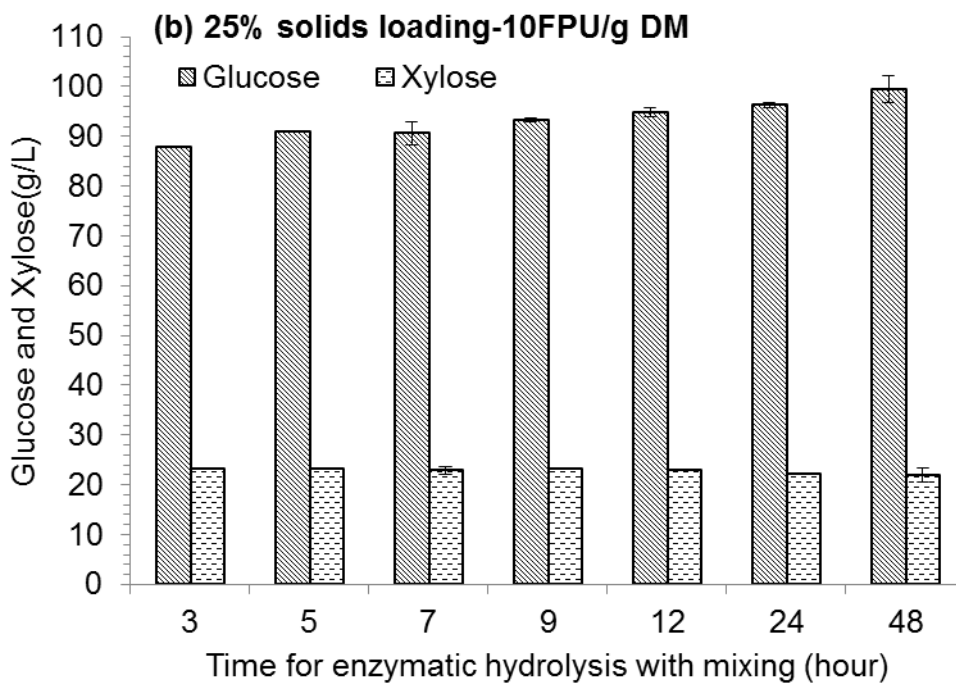
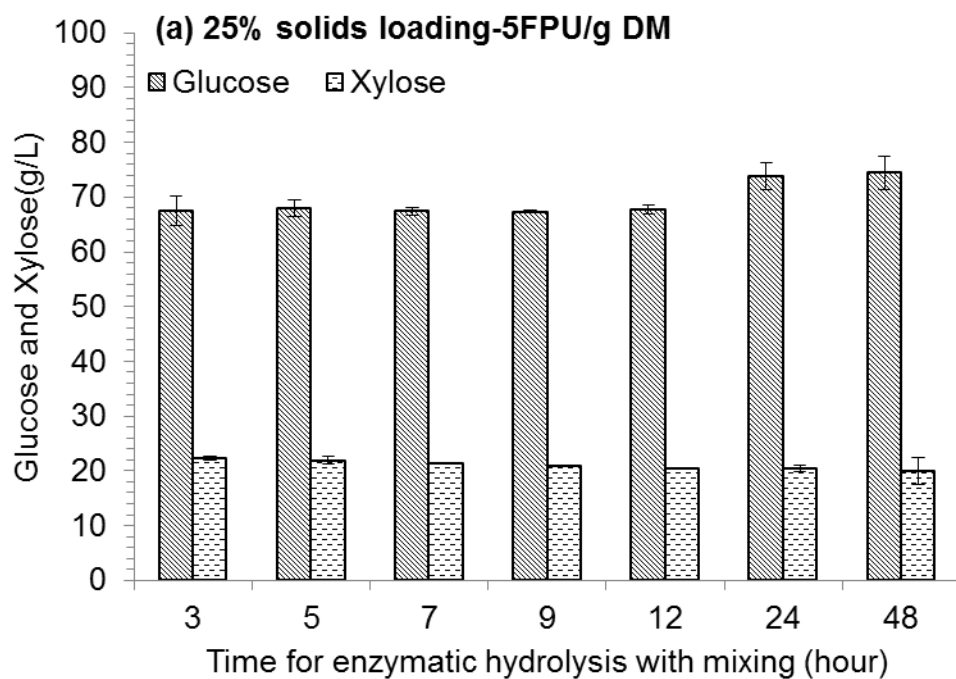


图 2.6 20%固含量下, 搅拌时间对酶解的影响。(a) 5FPU/g DM; (b) 10FPU/g DM; (c) 15FPU/g DM

Fig. 2.6 Effect of agitation combinations on the enzymatic hydrolysis performance at 20% solids loading.

Conditions: solids content 20% (% , w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours, 150 rpm.

由上图可以观察到, 在固含量 20% 实验中, 当纤维素酶用量为 5 FPU/g DM 时, 随着搅拌时间的延长, 最终葡萄糖的浓度是呈现增加趋势的, 但是搅拌时间小于 12 h 时, 分段糖化效果相对于全程搅拌糖化(48 h 组)来说较差, 搅拌时间小于 12 h 的各组葡萄糖浓度在 60 g/L 左右, 葡萄糖得率在 50% 上下, 但是全程搅拌(48 h 组)的葡萄糖浓度达到 69 g/L, 葡萄糖得率为 69%, 从葡萄糖浓度及得率可以看出, 随着搅拌时间的延长, 糖化得率越高; 当纤维素酶用量为 10 FPU/g DM 时, 随着搅拌时间的延长, 最终葡萄糖的浓度仍是呈现增加趋势, 总体变化趋势和 5 FPU/g DM 相似, 搅拌时间小于 12 h 的各组葡萄糖浓度在 77 g/L 左右, 葡萄糖得率在 66% 上下, 但是全程搅拌(48 h 组)的葡萄糖浓度可以达到 87 g/L, 葡萄糖得率为 74%; 当纤维素酶用量为 15 FPU/g DM 时, 搅拌时间从 0 h 开始, 其中 0 h 代表不进行搅拌, 加入纤维素酶直接静置糖化, 由图可以看出, 随着搅拌时间的延长, 糖化 48 h 的葡萄糖浓度呈现明显的增加趋势, 且搅拌时间小于 12 h 的各组葡萄糖浓度在 80 g/L 左右, 葡萄糖得率在 70% 左右, 而全程搅拌糖化(48 h 组)实验中, 葡萄糖浓度达到 96 g/L, 葡萄糖得率为 83%。三个酶用量下, 分段糖化的葡萄糖浓度只能达到全程搅拌糖化的 80%, 且从三个酶用量分段糖化可以看出, 随着搅拌时间越长, 葡萄糖得率越高。



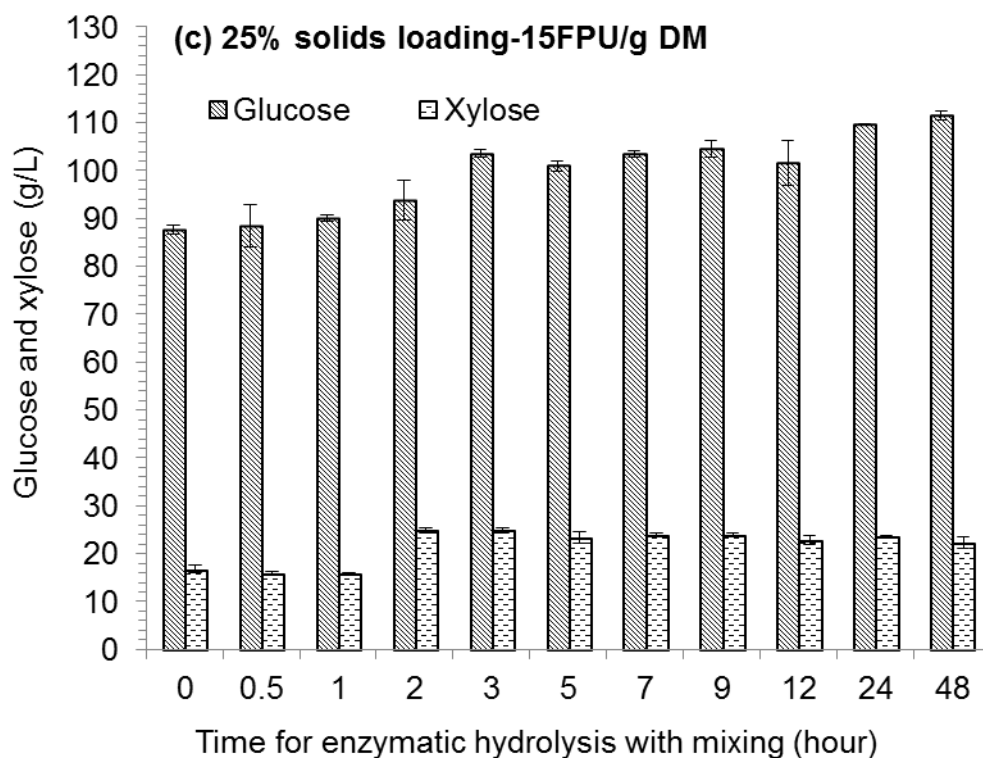
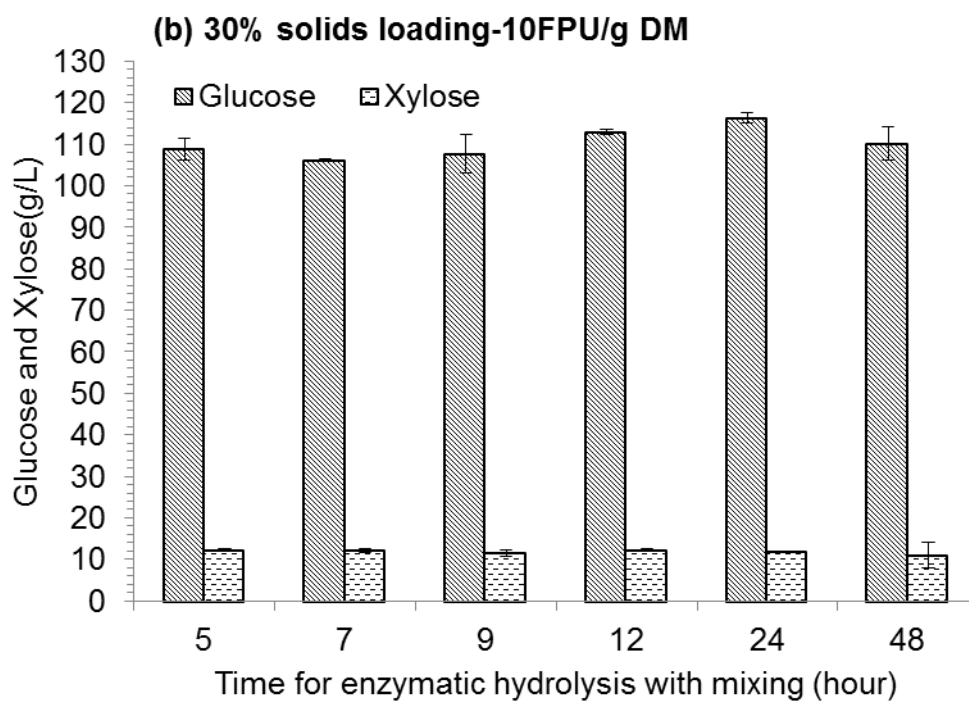
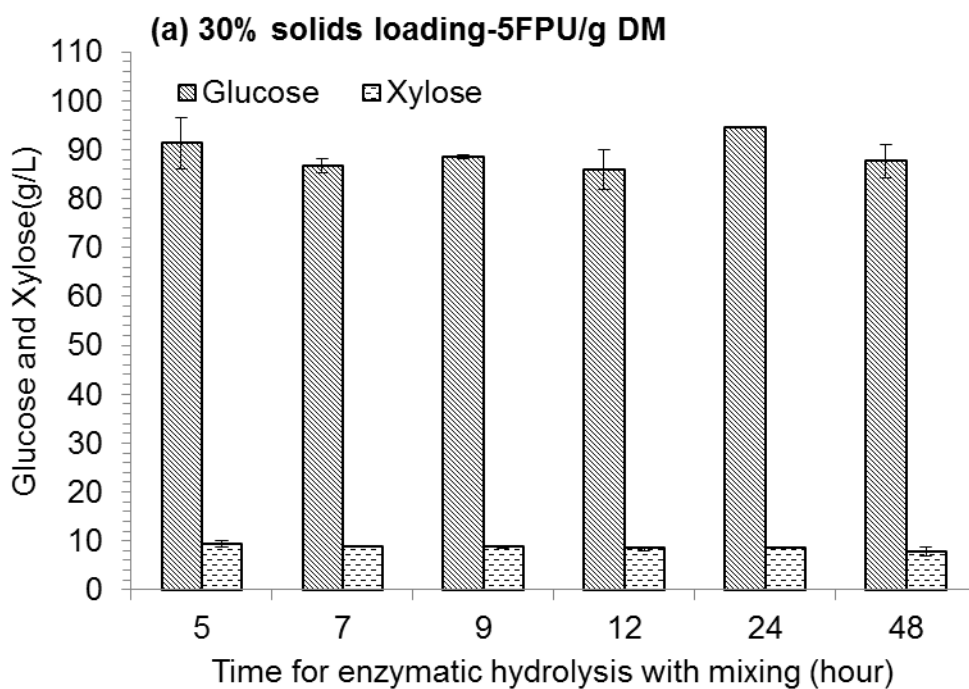


图 2.7 25%固含量下, 搅拌时间对酶解的影响。(a) 5FPU/g DM; (b) 10FPU/g DM; (c) 15FPU/g DM

Fig. 2.7 Effect of agitation combinations on the enzymatic hydrolysis performance at 25% solids loading.

Conditions: solids content 25% (% , w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours, 150 rpm.

在固含量 25% 实验中, 5 FPU/g DM 酶用量下, 搅拌时间为 3, 5, 7, 9, 12 h 的各实验组糖化 48 h 后, 葡萄糖浓度都为 67 g/L, 葡萄糖得率为 44%, 而全程搅拌(48 h 组)的葡萄糖浓度为 74 g/L, 葡萄糖得率为 48%; 10 FPU/g DM 酶用量下, 搅拌时间为 3, 5, 7, 9, 12 h 的各实验组糖化 48 h 后, 葡萄糖浓度都为 94 g/L, 葡萄糖得率为 60%, 而全程搅拌(48 h 组)的葡萄糖浓度为 99 g/L, 葡萄糖得率为 64%; 当酶用量达到 15 FPU/g DM 时, 糖化 48 h 时, 分段糖化的葡萄糖浓度在 104 g/L 左右, 葡萄糖得率在 67% 左右, 而全程搅拌糖化实验中, 葡萄糖浓度达到 111 g/L, 葡萄糖得率为 73%。在分步时间点较短时(0, 0.5, 1, 2 h)和 20% 固含量类似, 分段糖化相比于全程搅拌糖化来说, 葡萄糖浓度仍较低。但随着分步时间的延长, 当分步时间大于 3 h 后, 分段糖化效果明显加强, 说明至少需要 3 h 的强搅拌液化, 才能把糖化液转入静置糖化而使得糖化受到的影响较小, 从整体趋势看, 25% 固含量分段糖化得率相比于全程搅拌糖化降低了不到 10%, 而 20% 固含量下, 分段糖化得率相比于全程搅拌糖化降低了 20% 左右, 说明 25% 固含量分段糖化效果比 20% 更好。



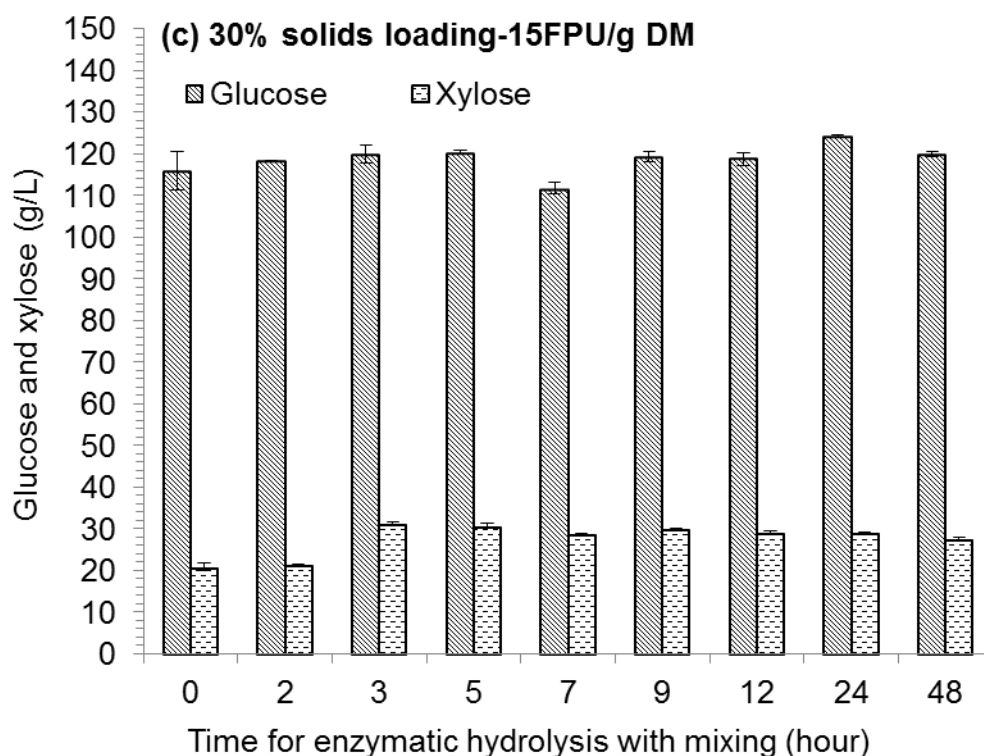


图 2.8 30%固含量下, 搅拌时间对酶解的影响。(a) 5FPU/g DM; (b) 10FPU/g DM; (c) 15FPU/g DM

Fig. 2.8 Effect of agitation combinations on the enzymatic hydrolysis performance at 30% solids loading.

Conditions: solids content 30% (% , w/w), temperature 50 °C, time period 48 hours, 150 rpm.

在固含量 30% 实验中, 5 FPU/g DM 酶用量下, 搅拌时间为 5, 7, 9, 12 h 的各实验组糖化 48 h 后, 葡萄糖浓度都为 86 g/L, 葡萄糖得率为 43%, 而全程搅拌(48h 组)的葡萄糖浓度为 87 g/L, 葡萄糖得率为 44%; 10 FPU/g DM 酶用量下, 搅拌时间为 5, 7, 9, 12 h 的各实验组糖化 48 h 后, 葡萄糖浓度都为 110 g/L, 葡萄糖得率为 55%, 而全程搅拌(48h 组)的葡萄糖浓度为 110 g/L, 葡萄糖得率为 55%; 15 FPU/g DM 酶用量下, 分段糖化和全程搅拌糖化(48 h 组)仍无差别, 葡萄糖浓度都维持在 120 g/L 左右, 葡萄糖得率在 60% 左右。在 30% 固含量下, 分段糖化相比于全程搅拌糖化, 虽然葡萄糖得率没有差别, 但是, 糖化液的流动性仍是随着搅拌时间的增加而增加, 考虑到分段糖化中糖化液的转移, 还需要选择合适的搅拌时间, 在糖化液具有较好的流动性的基础上尽量缩短第一步搅拌糖化的时间, 所以综合考虑决定选择 5 h 作为分段糖化时间点, 使得糖化液尽量液化完全, 不影响后续静置糖化过程。

综合上面 20%, 25% 及 30% 固含量实验, 我们可以看出, 随着固含量提高, 分段糖化与全程搅拌糖化相比葡萄糖得率差别越来越小, 这说明随着固含量的提高, 在糖化后期, 搅拌起到的作用越来越小, 可能是由于固含量过高, 主要抑制因素变成自由水缺乏及高的产物浓度。所以, 接下来对这种猜测进行了研究。

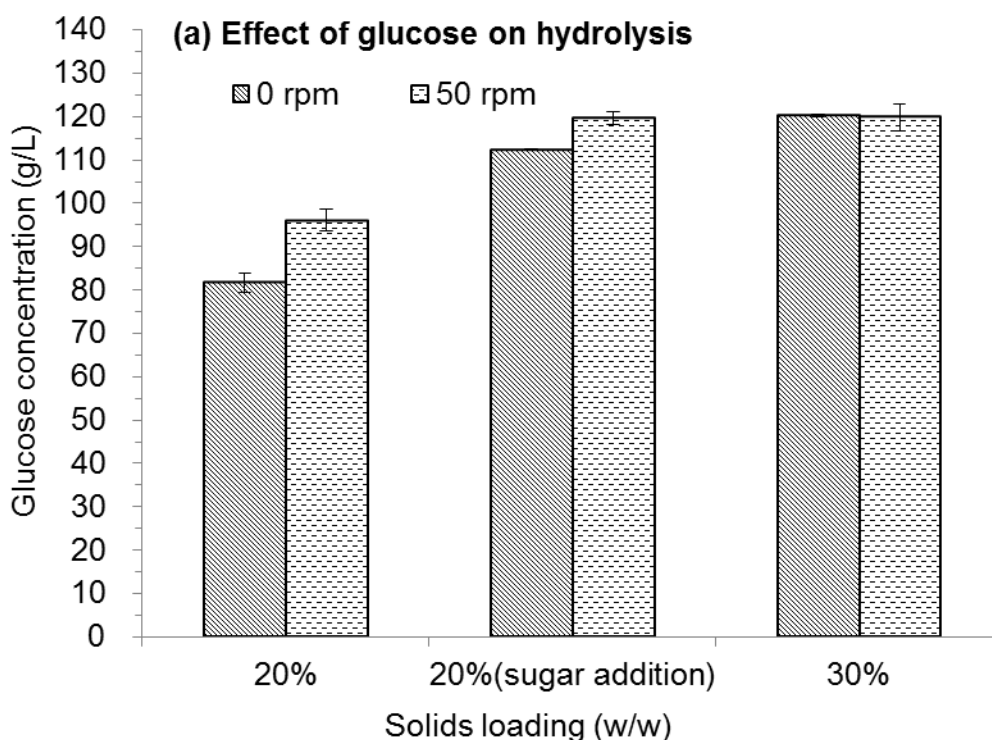


图 2.9 糖浓度对分段糖化的影响

Fig. 2.9 Effect of glucose inhibition on the two-stage enzymatic hydrolysis performance. Conditions in 5L bioreactor: cellulase enzyme 15 FPU/ g DM, temperature 50 °C, time period 48 hours, 150 rpm.

由上图可以看出，在 20%固含量下，糖化 48 h 后，分段糖化与搅拌糖化可以看出比较明显的差距，而 30%固含量下，糖化 48 h 后两者之间差别则基本可以忽略不计。而固含量维持在 20%，在 20%固含量下，搅拌糖化 5 h 后，向糖化液中补 30 g/L 左右糖，使得此时糖化液中的葡萄糖浓度和 30%固含量下葡萄糖浓度相同，这样就使得 20 固含量及 30%固含量在糖化 5 h 时葡萄糖浓度相同。然后停止搅拌进行静置糖化，糖化 48 h 后，可以看出，20%固含量补糖后的最终总糖与 30%一样，虽然分段糖化与搅拌糖化差距略有减小，但是仍比较明显，这说明导致固含量越高，分段糖化越好这种现象的主要因素并不是高糖浓度的抑制。而在分段糖化实验中，由于长时间的静置糖化，使得糖化液会产生固液分离现象。这使得糖化液分布不均匀，局部固含量过高，并影响糖化过程中纤维素酶分布及葡萄糖的传递，从而导致酶解得率降低。通过实验过程中不断观察，我们发现，随着固含量的提高，这种由于静置而导致的糖化液分层现象反而在减弱，为考察此现象是否想观察的那样随着固含量的提高而减弱以及其对分段糖化的影响，接下来对不同固含量下分段糖化实验中糖化液上下部分糖浓度进行了测定。

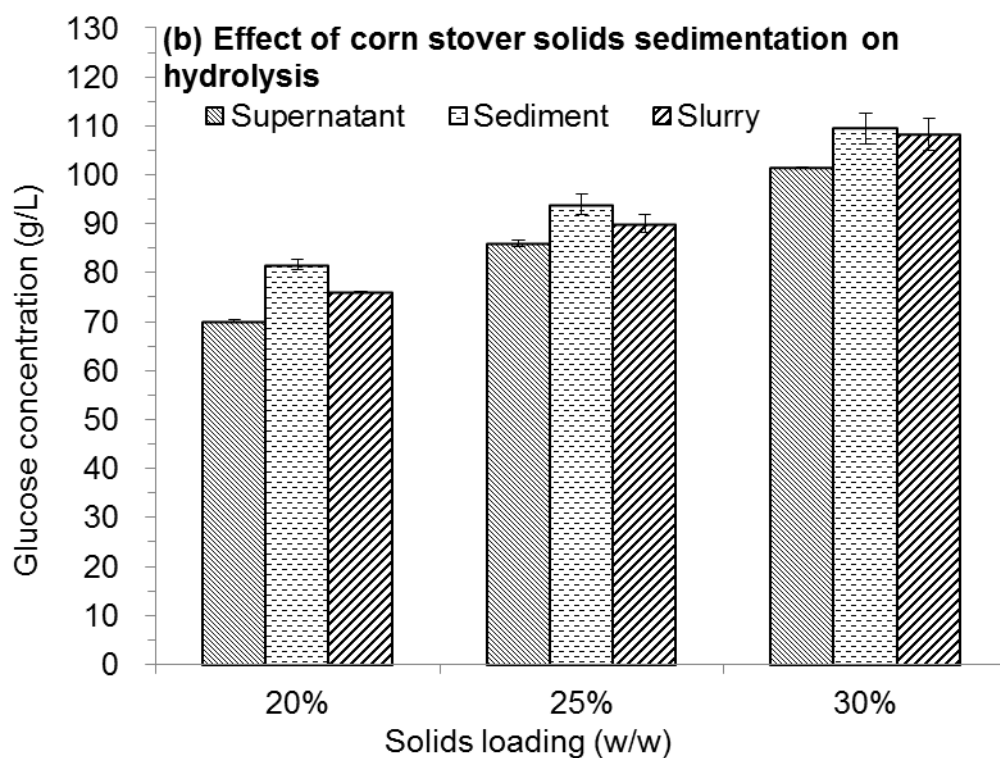
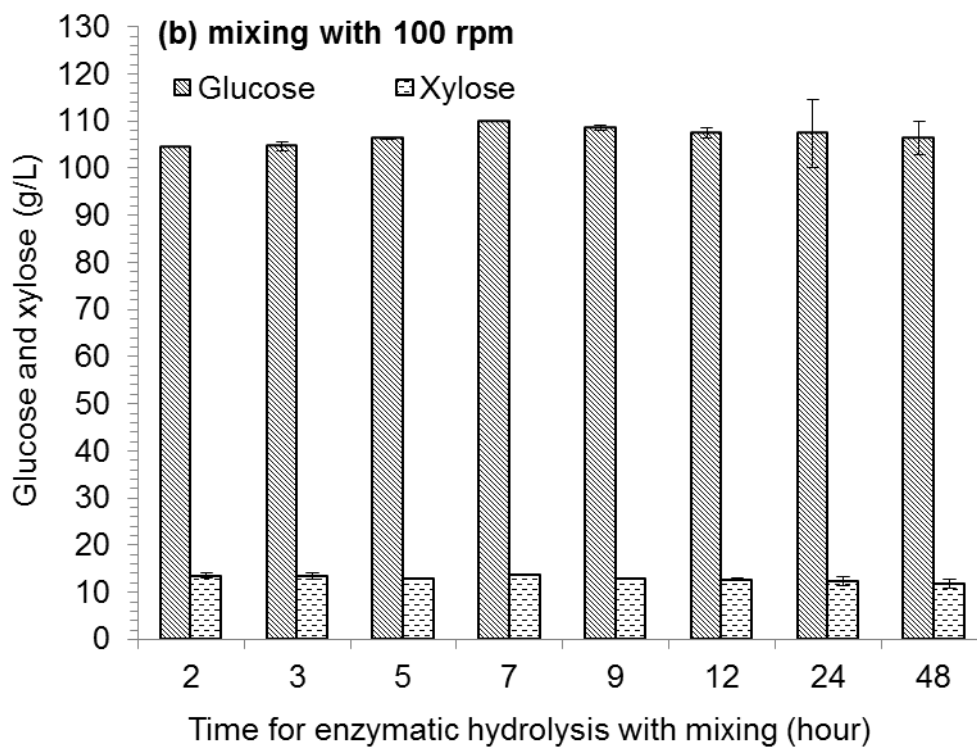
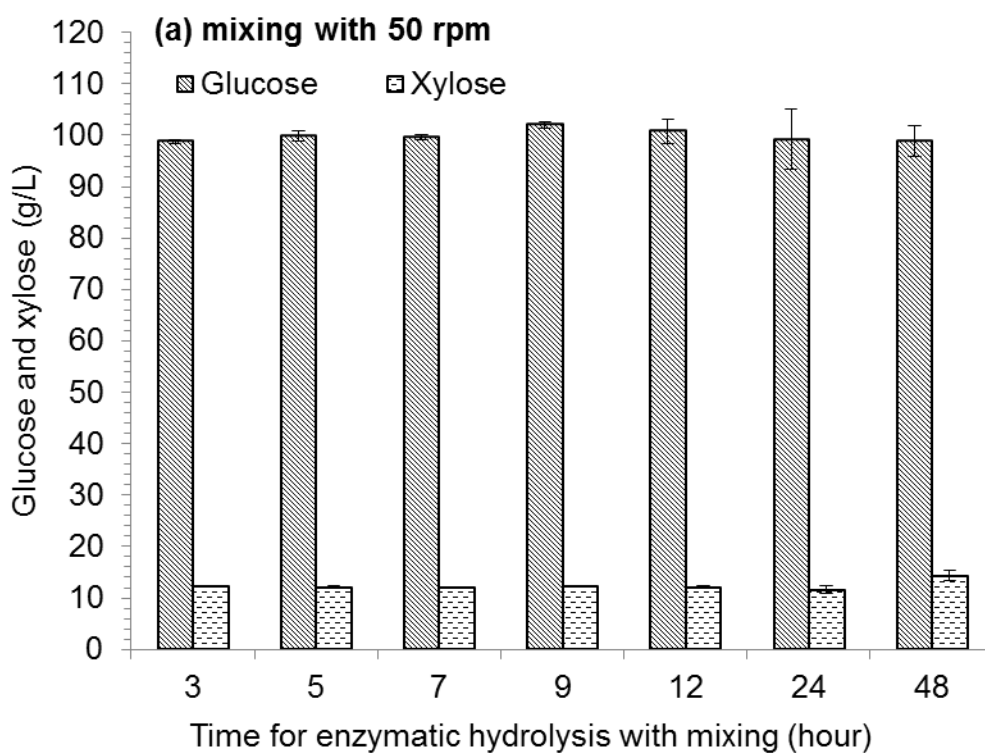


图 2.10 糖化液沉降对分段糖化的影响

Fig. 2.10 Effect of solids sedimentation on the two-stage enzymatic hydrolysis performance. Conditions in 5L bioreactor: cellulase enzyme 15 FPU/ g DM, temperature 50 °C, time period 48 hours, 150 rpm.

而在分段糖化过程中，我们观察到由于糖化液静置而导致了糖化液固液分层现象，并可能影响分段糖化的得率。针对此现象对不同固含量下分段糖化 48 h 后的糖化液上清，沉淀及混匀后葡萄糖浓度进行了测定。上图中，我们可以看出，在三个固含量下，沉淀中的葡萄糖浓度最高，上清中葡萄糖浓度最低，而混匀后葡萄糖浓度介于两者之间。随着固含量的提高，混匀后的葡萄糖浓度越接近沉淀中的糖浓度，这说明随着固含量的提高，上清所占的比重越来越小，也就是说，随着固含量提高，糖化液沉降越来越慢。造成这种现象的原因可能是由于随着固含量的提高，糖化液粘度不断增加，自由水含量不断降低，使得糖化液呈现出粘稠的膏状，从而不容易产生沉降现象。

2.3.3 搅拌转速的研究



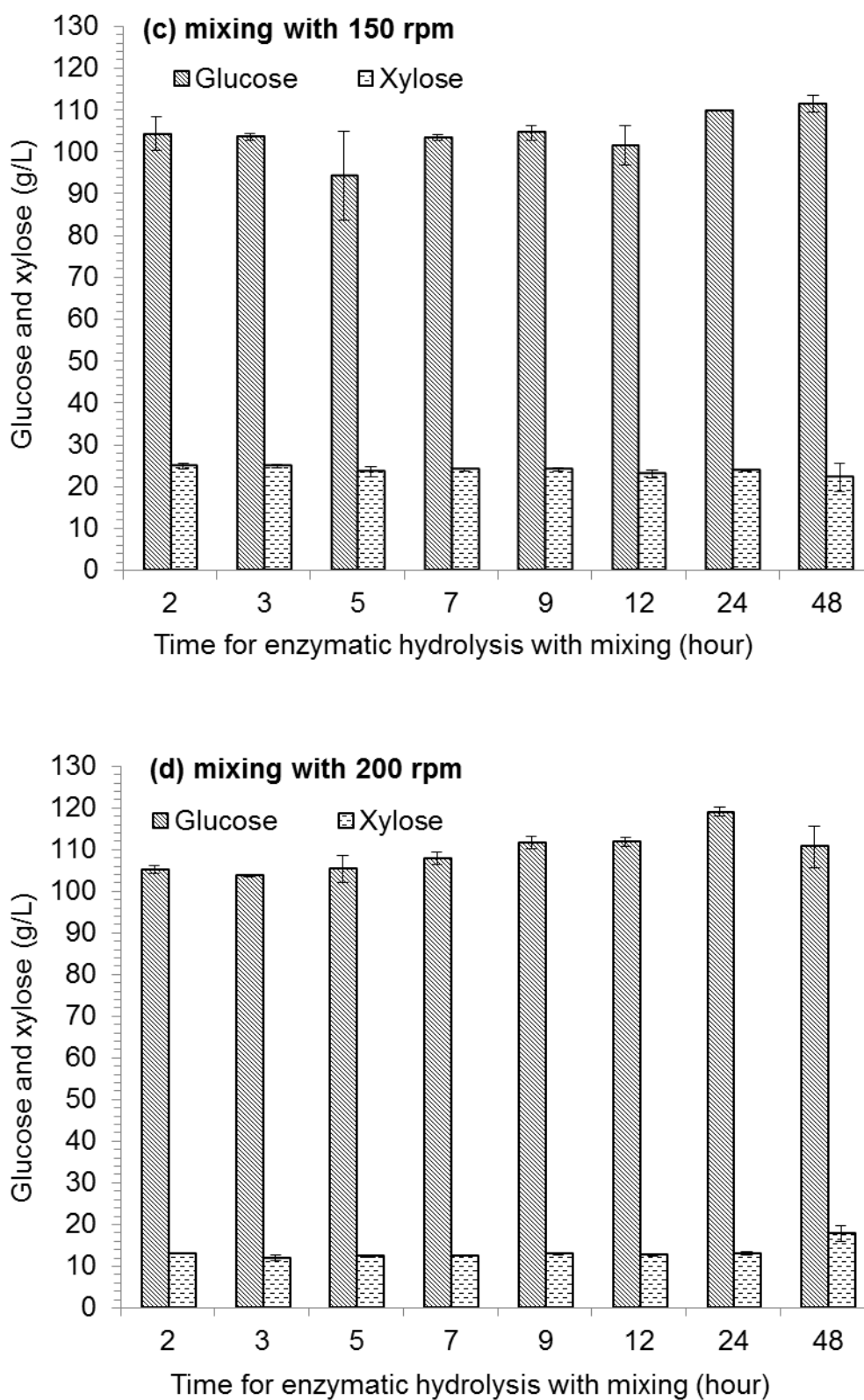


图 2.11 25%固含量下，转速对分段糖化的影响。(a) 50 rpm; (b) 100 rpm; (c) 150 rpm; (d) 200 rpm

Fig. 2.11 Effect of agitation combinations on two-stage enzymatic hydrolysis performance at different agitation speed at 25% solids loading. (a) 50 rpm; (b) 100 rpm; (c) 150 rpm; (d) 200 rpm. Conditions in 5L bioreactor: solids loading 25%, cellulase enzyme 15 FPU/ g DM, temperature 50 °C, time period 48 hours.

分段糖化需要进过第一步搅拌快速液化，第二步静置糖化两步，其中第一步中，搅拌的主要目的是使得木质纤维素快速液化。因为高固含量糖化过程中，由于自由水含量少，使得初始糖化阶段木质纤维素和纤维素酶之间的混合异常困难，必须借助搅拌使其混合均匀。我们希望搅拌能使得糖化顺利进行，在促进液化的同时不增加甚至降低搅拌强度或缩短搅拌时间，这样既保证了后续静置糖化的顺利进行而又节约了搅拌功耗，接下来对搅拌对分段糖化的影响进行了研究。从图中我们可以看出，随着搅拌转速的提高，葡萄糖浓度略有提高，但是提高的并不多。且即使在 50 rpm 下，分段糖化仍可以顺利进行，降低搅拌并没有对糖化液液化速度及粘度产生很大影响，所以不会对后续糖化液的转移产生影响。所以，为了降低搅拌所带来的功耗，选择 50 rpm 作为后续实验的搅拌转速。

2.3.4 5L 反应器分段糖化

上述实验中，搅拌糖化在 5 L 螺带桨反应器中进行，而静置糖化则转入 100 mL 摇瓶中进行，发现在高固含量下，分段糖化糖化得率与全程搅拌相比并没有降低，说明这种分段糖化的方式是切实可行的。但是由于静置糖化反应器的体积过小，由于静置而带来的诸多问题可能并没有体现出来。例如，当停止糖化过程中的搅拌时，葡萄糖的传递等传质问题及糖化液温度的保持等传热问题。如果因不搅拌而使得葡萄糖浓度过高或糖化温度不均匀，则会影响糖化效率。针对以上可能出现的问题，接下来考察在 5 L 反应器中分段糖化的可行性，即静置糖化也在 5 L 反应器中进行。

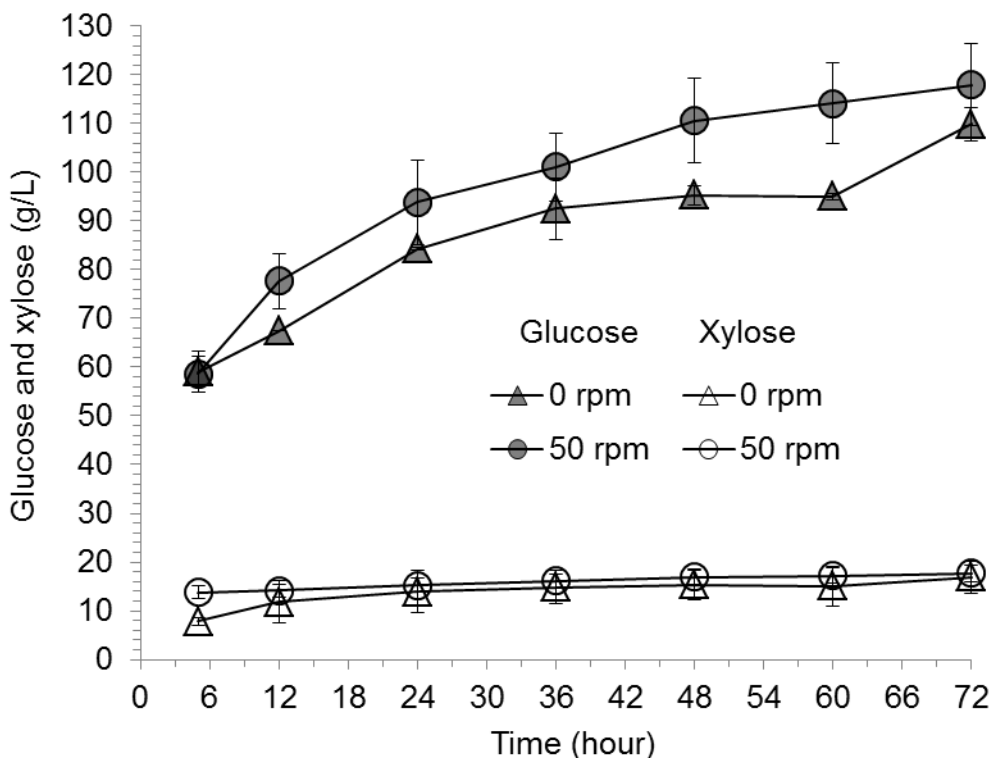


图 2.12 考察分段糖化放在 5 L 反应器的性能

Fig.2.12 Scaling-up of two-stage enzymatic hydrolysis process to a 5-L bioreactor. Conditions: solids loading 30%, cellulase enzyme 15 FPU/ g DM, temperature 50 °C, time period 72 hours, 50 rpm.

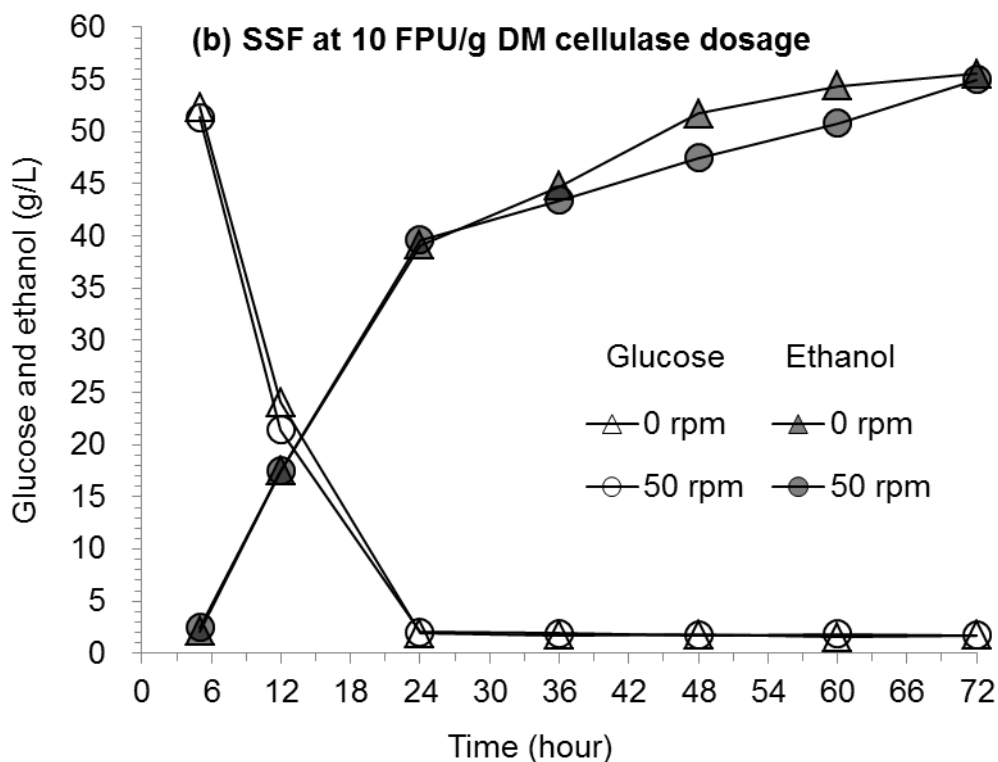
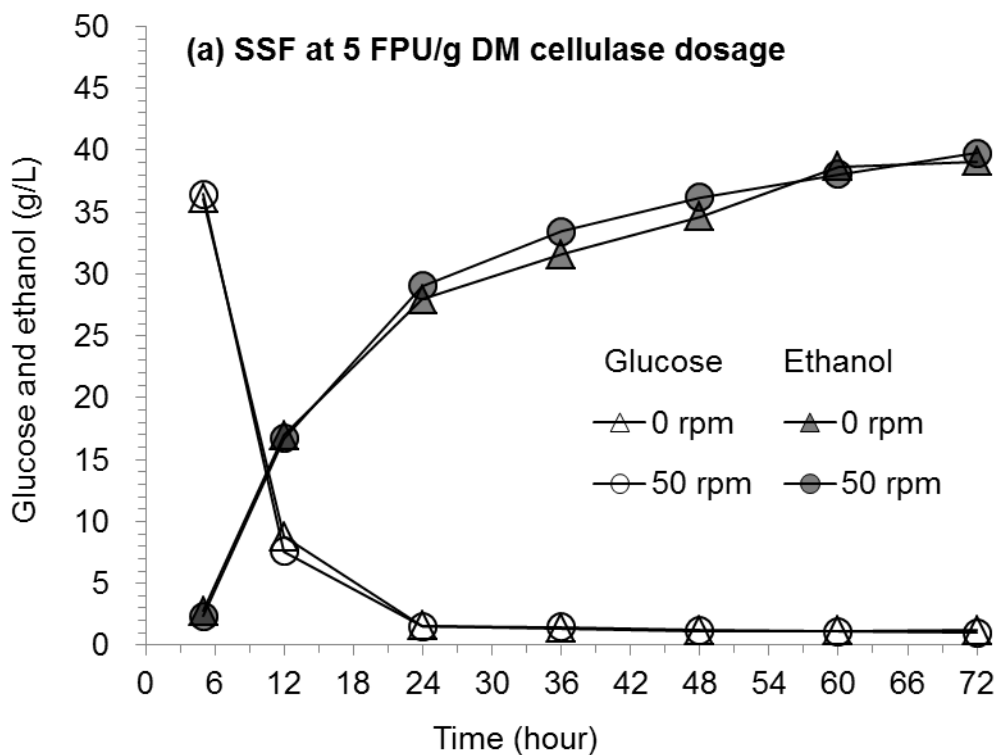
从上图可以看出, 分段糖化时间点选择在 5 h, 分段糖化 72 h 后, 葡萄糖浓度达到 107 g/L, 而全程搅拌糖化 72 h 后, 葡萄糖浓度为 111 g/L。相比于全程搅拌来说, 先进行搅拌快速液化而后静置糖化的方式使得葡萄糖浓度略有降低, 但是降低的并不多, 因为第一步糖化快速液化的同时使得木质纤维素及纤维素酶均匀的分布于糖化液中, 这使得葡萄糖在糖化液中分步也比较均匀, 从而使得传质问题大大减弱; 另一方面, 本实验采用夹套加热的方式, 即使不搅拌仍可以使糖化液受热均匀, 从而降低了传热受阻问题。说明在 5 L 反应器中分段糖化仍具有可行性。

2.3.5 5 L 反应器分段同步糖化与发酵

上述实验表明, 在 5 L 反应器中, 分段糖化在高固含量下与全程搅拌糖化差别较小, 接下来考察分段糖化在同步糖化发酵中的效果, 即先有搅拌进行快速糖化, 待糖化液粘度降低, 体系均一后, 接入酵母菌进行静置发酵。

从下图中可以看出, 酶用量为 5 FPU/g 的发酵实验中, 静置发酵的乙醇得率为 43.32%, 搅拌发酵的乙醇得率为 44.10%; 酶用量为 10 FPU/g 的发酵实验中, 静置发酵的乙醇得率为 58.26%, 搅拌发酵的乙醇得率为 57.67%; 酶用量为 15 FPU/g 的发酵实验中, 静置发酵的乙醇得率为 61.85%, 搅拌发酵的乙醇得率为 61.04%。在 5、10、15 FPU/g 三个酶用量下, 静置发酵与搅拌发酵的最终乙醇浓度都没有差别, 且乙醇生产速率也基本相同, 从乙醇得率我们可以看出, 静置乙醇发酵比静置糖化的效果更好, 这可能是因为发酵过程葡萄糖被大量消耗, 而产生的乙醇可以和水以任意比例互溶, 这就消除了局部葡萄糖过高导致的产物浓度抑制及扩散阻碍, 且发酵过程中不断产生的 CO_2 相当于一个小型气升混合, 防止发酵液因静置时间过程而沉降, 从而使得传质受阻的影响降到最低。

在发酵过程中还观察到了另一个有趣的现象, 全程搅拌的发酵实验中, 在接种后的 5-12 h 之间, 因酵母大量生长, 且此时发酵液中葡萄糖含量仍比较高, 所以乙醇生产速率较高, 而发酵液粘度比较大, 产生的 CO_2 不能及时的排出发酵液, 从而导致发酵液体积膨胀而冲罐。这在以前搅拌发酵实验中屡见不鲜; 而相反, 静置糖化实验中却并没有出现冲罐现象, 从下图可以看出, 搅拌发酵及静置发酵的乙醇生产速率基本相同, 此时发酵液中各个组分也是相似的, 从而我们得出搅拌会导致发酵冲罐的表观现象。导致这种现象的一个可能的原因是, 在静置发酵过程中, 当发酵液中产生 CO_2 时, CO_2 会在发酵液内部形成一个一个小气泡, 因气泡密度小会不断升高, 在升高的过程中因压强的不断减小使得小气泡不断增大, 当气泡到发酵液表面时因压强骤降导致表面张力急剧增大, 所以气泡会突然破裂使得 CO_2 从发酵液上表面排出。而在搅拌的过程中, CO_2 气泡在上升不断变大的过程中, 因发酵液中的剪切力使得气泡不断被打碎, 从一个大气泡变成两个或更多的小气泡, 所以虽然气泡在不断升高, 但是因搅拌而使得气泡体积维持在一个较小的体积, 这样气泡表面张力就不会变大, 所以即使升到发酵液表面气泡也很难破裂, 这样就导致发酵液中 CO_2 无法及时的排出, 当 CO_2 累计到一定量时, 就会带着发酵液产生膨胀, 使得发酵液体积不断增大, 从而导致发酵液冲罐现象。



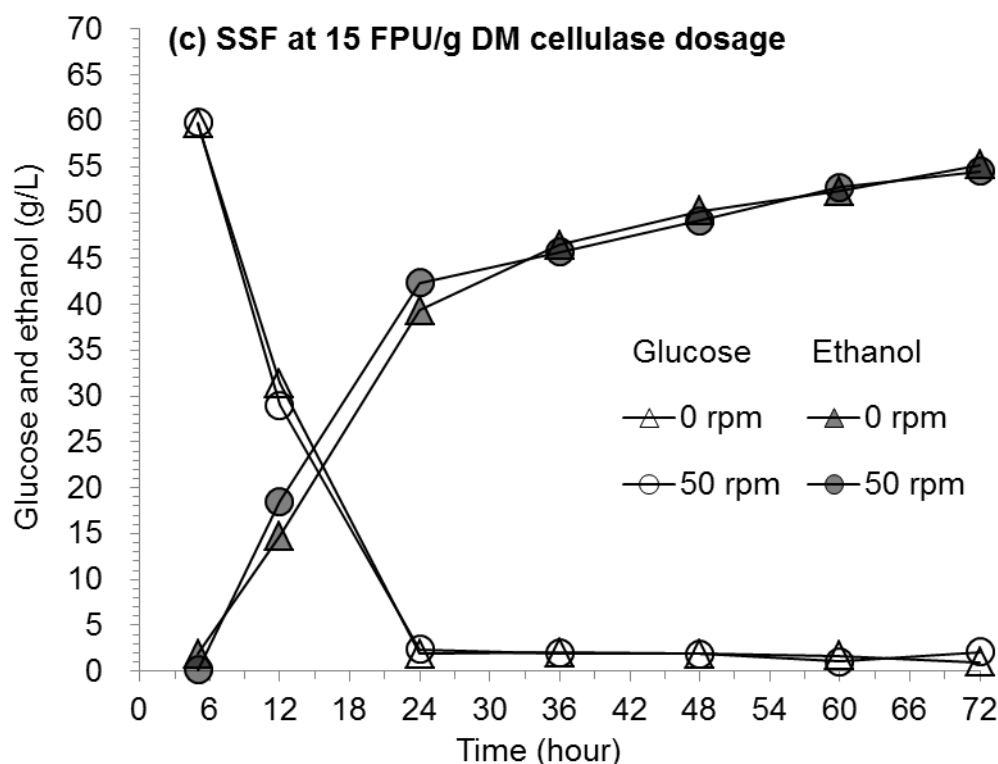


图 2.13 30%固含量下分段 SSF

Fig.2.13 Application of the two-stage mixing to the SSF process at 30% solids loading. Conditions: (1)enzymatic hydrolysis process: cellulase enzyme 5, 10, 15 FPU/ g DM, respectively; temperature 50 °C, time period 5 hours, 50 rpm; (2)fermentation process: cellulase enzyme 5, 10, 15 FPU/ g DM, respectively; temperature 37 °C, time period 5 hours, 0 rpm.

综上所述，静置发酵相比于搅拌发酵，在乙醇得率没有降低的基础上，去除了搅拌而节约了功耗，并简化了发酵罐设计及实验操作，而且因发酵过程中不会冲罐而使得发酵操作更加简便，去除了消泡剂的使用。这使得木质纤维素生物炼制的放大生产更加经济简单。

2.4 小结

现阶段生物炼制主要停留在研究阶段，在放大生产过程中会遇到一系列问题。其中，糖化过程是关系到生物炼制能否放大的关键步骤，而现阶段糖化工艺并不利于放大生产，本文采用了分段糖化这种新型的糖化方式来实现糖化的放大生产。本研究使用的木质纤维素为玉米秸秆，经过扭矩测定发现，玉米秸秆糖化液扭矩随着糖化非常快，在糖化初始几小时扭矩就可以降低到一个很低的值，且整个糖化过程扭矩变化非常大，糖化结束扭矩可以降低 50 左右。这说明玉米秸秆是一种随着糖化进行粘度变化非常大的物料，有文献指出，这种木质纤维素对搅拌不敏感，是一种优良的分段糖化原料。

经研究发现，分段糖化是一种切实可行的糖化方式，随着固含量的提高，分段糖化的效果不断增加，在高固含量下，分段糖化与有搅拌糖化基本无差别。且在糖化过程中

因停止糖化后期的搅拌而节约了搅拌所带来的能耗，因去除了搅拌桨而简化了大型糖化反应器的设计。

在发酵实验中，静置发酵相比于搅拌发酵，乙醇得率及乙醇生产速率并没有降低，而且减少了搅拌，节约能耗；且在发酵过程中不会产生发泡冲罐现象，简化了发酵操作及反应器的设计。综上，分段糖化及静置发酵可以有效的解决放大过程中因搅拌而带来的问题，同时简化了糖化发酵操作，节约设备成本及能耗，为生物炼制产业化奠定了基础

第 3 章 颗粒粒径对木质纤维素酶解的影响

3.1 引言

木质纤维素天然的致密结构使得纤维素酶难以接近纤维素进行水解,其中,影响酶解的因素很多,诸如纤维组分,粒径及比表面积,结晶度等^[69],为了打开木质纤维素的致密结构,在酶解之前,需要对木质纤维素进行前处理及预处理。前处理包括木质纤维素的粉碎及清洗等步骤,前处理后的木质纤维素进入到预处理工段,使得木质纤维素的致密结构得以打开,并进一步减小木质纤维素尺寸。在早先的研究中,有的研究认为在预处理之前,对木质纤维素进行粉碎,降低其尺寸有利于后续的预处理及酶解过程,但是也有一些研究表明,木质纤维素尺寸过小,反而不利于后续的预处理及酶解,因为随着尺寸的减小,预处理之后不仅其纤维素含量会降低,而且在酶解过程中相比于大尺寸物料并没有显示出优势,甚至呈现相反的趋势。木质纤维素的粉碎过程无疑会增加功耗,不利于生物炼制的工业放大。

虽然通过生物炼制工艺生产可再生能源具有巨大的潜力,但是目前,生物炼制仍然面临很多问题,这些问题严重阻碍了生物炼制的工业化进程。为此,世界各国学者针对生物炼制工艺中出现的问题进行了深入研究,其中,木质纤维素的性质是影响酶解的主要因素之一,其中主要包括:木质素和半纤维素对纤维素酶的阻碍作用,纤维素结晶度和聚合度的影响,以及纤维素酶可接触表面积的影响^[70]。因此针对以上几个方面对木质纤维素性质进行了广泛的研究。

粒径作为木质纤维素的主要物理性质之一,是影响木质纤维素酶解的重要因素之一。一些较早的文献^[71, 72]就已经指出,纤维素酶与纤维素表面的可接触性是影响木质纤维素水解最重要的因素之一。而随着木质纤维素尺寸的减小,表面积与体积比不断增加,使得比表面积不断增大,从而增加了木质纤维素与纤维素酶的接触面积,从而增加酶解效率^[69]。Rajesh 等人^[73]研究了初始粒径对木屑酶解的影响,考察了在四种粒径($33\ \mu\text{m} < x \leq 75\ \mu\text{m}$, $150\ \mu\text{m} < x \leq 180\ \mu\text{m}$, $295\ \mu\text{m} < x \leq 425\ \mu\text{m}$ 和 $590\ \mu\text{m} < x \leq 850\ \mu\text{m}$)下,木屑酶解性能的差异,酶解在摇瓶中进行,酶用量为 15 FPU/g 纤维素,酶解温度 $50\ ^\circ\text{C}$,搅拌转速 200 rpm。在糖化了 72 h 后,最小粒径的木屑($33\ \mu\text{m} < x \leq 75\ \mu\text{m}$)产生的葡萄糖量比最大粒径木屑($590\ \mu\text{m} < x \leq 850\ \mu\text{m}$)高了 50%。在 Pedersen 和 Meyer 的研究中^[74],经过湿法氧化处理后的小麦秸秆,粒径为(53-149 μm)的麦秆糖化得率达到了理论得率的 90%,而粒径为(2-4 cm)的麦秆糖化得率仅仅只有理论得率的 65%。在 Yeh^[75]的实验中,得到了和以上实验相似的实验结果,在此实验中,作者主要考查了不同粒径下,纤维素酶解的初始速率。从实验结果看出,随着粒径的减小,纤维素水解产生纤维二糖的速率提高了 5 倍以上,最终的葡萄糖浓度同样提高。

虽然有大量实验表明,木质纤维素的糖化速度随着粒径降低而增加,但是也有部分文献指出,木质纤维素酶解速率和粒径之间没有必然联系。Rivers 和 Emert 在他们 1987

发表的文章中指出, 通过球磨法得到的粒径从 0.25-0.47 mm 的底物酶解得率基本没有变化^[76]。以上研究中, 直接将不同粒径的底物用于酶解中, 以考察粒径对酶解的影响, 而 Ballesteros 等人^[77]在他们的实验中, 首先筛选出 2-5, 5-8 和 8-12 mm 三种粒径的埃塞俄比亚芥, 然后进行蒸气爆破预处理, 将预处理后的物料进行酶解, 结果最大粒径的物料糖化得率反而较高。Mansfield^[70]在其文章中, 就粒径对酶解的影响提出了质疑, 他指出, 虽然很多文献报道木质纤维素酶解效果随着粒径的减小而增大, 但是随着粒径的减小, 木质纤维素的比表面积是否发生变化却并没有给出具体的实验依据。一些文献指出^[71, 72, 78], 纤维素酶解速率与木质纤维素比表面积直接相关, Nahzad 在其纸浆酶解的研究中发现, 随着纸浆液的不循环再生, 其粒径不断减小, 且酶解速率加快, 进一步研究却发现, 酶解速率的加快却并不是由于粒径的减小而引起的, 随着纸浆的不断吸水, 导致其溶胀, 内部结构遭到破坏并出现空隙。从而大大增加了其比表面积, 使得酶解速率得以加快, 而粒径的减小只是表面现象, 却并不是导致酶解速率加快的主要原因。已经有很多文献提出, 只要木质纤维素内部空隙直径大于纤维素酶尺寸, 则纤维素酶可以进入空隙进行酶解, 并且随着空隙的增多, 比表面积逐渐增大, 酶解速率也会增加, 影响酶解的最小孔径为 5.1 nm^[79, 80, 81, 82]。

现有文献普遍表明, 纤维素酶解效率与木质纤维素的比表面积呈正相关。一些文献指出, 随着粒径减小, 比表面积增大, 所以酶解速率会增大。但是一些文献也指出, 随着粒径变化, 酶解速率并没有如预想的那样加快。造成这种分歧的主要原因是由于各个文献研究的关注点不同, 粒径的选择范围, 木质纤维素的结构, 酶解条件的不同, 都会引起实验现象的不同甚至相反。比如, 对于未经过预处理的木质纤维素, 粒径差别至少要在 3-6 倍, 才可以看出其酶解的差别^[83]。粒径减小虽然使得酶解速率得以提高, 但是不幸的是, 为了得到更小粒径的木质纤维素, 需要投入大量的功耗用于木质纤维素的粉碎, 这无疑会增加生产成本, 不利于木质纤维素的生物炼制的工业化与放大^[84, 85]。要弄清楚粒径对酶解的影响的机理以及粒径的减小与功耗的增加之间的平衡, 还需要做大量的工作。本文主要针对粒径对酶解的影响进行了研究。通过对粒径的深入研究, 确定粒径对酶解的影响, 若木质纤维素的粒径对后续的糖化影响不大或没有影响, 则可以省去对木质纤维素的粉碎步骤, 降低生物炼制的生产成本, 若有影响, 则可以寻找一个最优的粒径, 在不引起大量功耗的同时有利于后续的糖化过程。

本研究以玉米秸秆为原料, 考察了不同粒径对玉米秸秆酶解的影响。将玉米秸秆粉碎后, 通过分样筛筛分, 选取 10 目, 20 目, 40 目及 60 目(其尺寸大小分别为 1.42, 0.69, 0.34, 和 0.21 mm)四个粒径范围的玉米秸秆为原料, 通过摇瓶实验, 考察不同粒径玉米秸秆酶解得率的差别, 以确定粒径对未预处理玉米秸秆的影响。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料

本实验使用的玉米秸秆购于河南郸城, 收割于 2012 年秋。玉米秸秆在糖化之前需

进行水洗以除去绝大部分粉尘及砂砾, 因为灰尘、砂砾等会对玉米秸秆预处理及后续糖化发酵过程产生影响。具体方法为将玉米秸秆经过锤式粉碎机粉碎至颗粒大小为 0.5 cm 左右, 然后装入清洗袋中, 放入洗衣机中清洗 40 min, 然后, 将玉米秸秆取出后倒入水槽中漂洗以除去砂砾等杂质, 最后再次用洗衣机脱水甩干, 将甩干后的玉米秸秆平铺于通风干燥处晾干, 最后再使用鼓风干燥箱于 105 °C 下烘干存储备用。为满足本实验需要, 将上述处理过的玉米秸秆放于研钵中研磨, 使用标准分样筛筛选出 10 目, 20 目, 40 目, 60 目四个目数的玉米秸秆备用, 经过范氏洗涤法^[86]测定后发现本实验中使用的玉米秸秆纤维素含量为 43.79%, 半纤维素含量为 33.11%。

3.2.2 纤维素酶

本实验所用纤维素酶为 Youtell #6 固体干粉, 购于湖南尤特尔生化有限公司, 测定其滤纸酶活为 135 FPU/g 酶粉, β -葡萄糖苷酶活为 344 CBU/g 酶粉, 测定方法^[68]来自美国可再生能源实验室(NREL)并经过适当改进。

3.2.3 酶解评价

玉米秸秆酶解实验在 100 mL 摇瓶中进行, 装料体积为 20 mL, 酶解所用物料为 10 目, 20 目, 40 目, 60 目玉米秸秆, 酶解固含量 5% (w/v), 纤维素酶 15 FPU/g 物料, 使用柠檬酸缓冲液调节 pH 4.8, 并加入 80 μ L 10 mg/L 四环素抑制微生物生长, 酶解反应在水浴摇床中进行, 温度 50 °C, 转速 150 rpm, 反应 72 h, 每组实验都含有平行对照, 反应结束后每个摇瓶取 1 mL 样品在 15700 rcf 下离心 5 min, 取上清于 -4 °C 冰箱冷冻储存。

3.2.4 玉米秸秆粒径、孔径及比表面积分析

玉米秸秆经粉碎机粉碎后, 对 10 目、20 目、40 目及 60 目四种粒径玉米秸秆的粒径, 外表面积, 内孔及总表面积进行了分析。

使用压汞法测定玉米秸秆空隙结构参数, 由于压汞仪的测定要求, 20 目, 40 目, 60 目由于尺寸过小而不能有效的测定其孔径及比表面积, 所以本实验仅仅测定 10 目的玉米秸秆。仪器选用来自美国康塔公司生产的全自动压汞仪 Poremaster33, 其方法是将玉米秸秆粉碎至 10 目, 取适量样品放入压汞仪中, 压汞仪对放入其中的样品在一定范围内由小到大逐步施加压力并记录在加压过程中注入样品孔隙中汞的体积得到内孔孔径与注入汞体积之间的关系曲线, 通过分析该曲线, 从而计算出玉米秸秆比表面积等数据。

玉米秸秆总比表面积则采用美国麦克公司生产的全自动比表面积及微孔物理吸附仪 ASAP2020m 进行测定, 其测定原理^[87]是采用等温物理吸附的静态容量法, 即全自动低温氮吸附法。将样品放于液氮温度下, 然后通入含有氮气的混合气体, 调节温度等参数, 使得氮气在被测物质表面形成单分子层, 这样就使得被吸附的氮气与被测物质的表面积成正比, 通过分析被吸附氮气的量, 根据相关公式算出被测物质的表面积。

四种粒径的玉米秸秆的截面观察采用日立公司的 S-3400N 型号扫描电子显微镜 (SEM) 进行观察。玉米秸秆首先在 105 °C 烘干至恒重, 然后将玉米秸秆经过适当固定以

利于观察到秸秆横截面积。将固定了玉米秸秆的铅块进行喷金处理，放于电子显微镜下进行观察，观察使用电压为 15 kV。

3.2.5 样品分析方法

葡萄糖、木糖浓度通过高效液相色谱仪(Bio-Rad HPX-87H 色谱柱，示差折光检测器 RID-10A)测定。流动相采用 5 mmol/L 的稀硫酸，流动速度为 0.6 mL/min，高效液相色谱柱温为 65 °C。待测样品先经过适当倍数(5 倍，10 倍，20 倍或 50 倍等)的稀释后并用 0.22 μm 的滤膜过滤，待液相基线平稳之后，选择合适的测定时间等参数，将样品打入液相中进行测定，进样量为 20 μL 。待样品出峰结束后，使用高效液相色谱自带的处理工具对样品曲线进行积分处理，然后根据标准曲线算出待测样品中葡萄糖和木糖的浓度。

3.3 结果与讨论

3.3.1 不同粒径下玉米秸秆颗粒的酶水解得率测定

本实验分别考察四种粒径 10 目, 20 目, 40 目及 60 目(其尺寸大小分别为 1.42, 0.69, 0.34, 和 0.21 mm)玉米秸秆酶解得率的差异。所用物料为清洗除尘，粉碎后的玉米秸秆，经过测定后发现玉米秸秆纤维素含量为 43.79%，半纤维素含量为 33.11%。糖化实验在 100 mL 摇瓶中进行，总体系为 20 mL，实验条件为固含量 5%，酶用量 15 FPU/g 干物料，酶解温度 50 °C，搅拌转速 150 rpm，酶解时间 72 h。

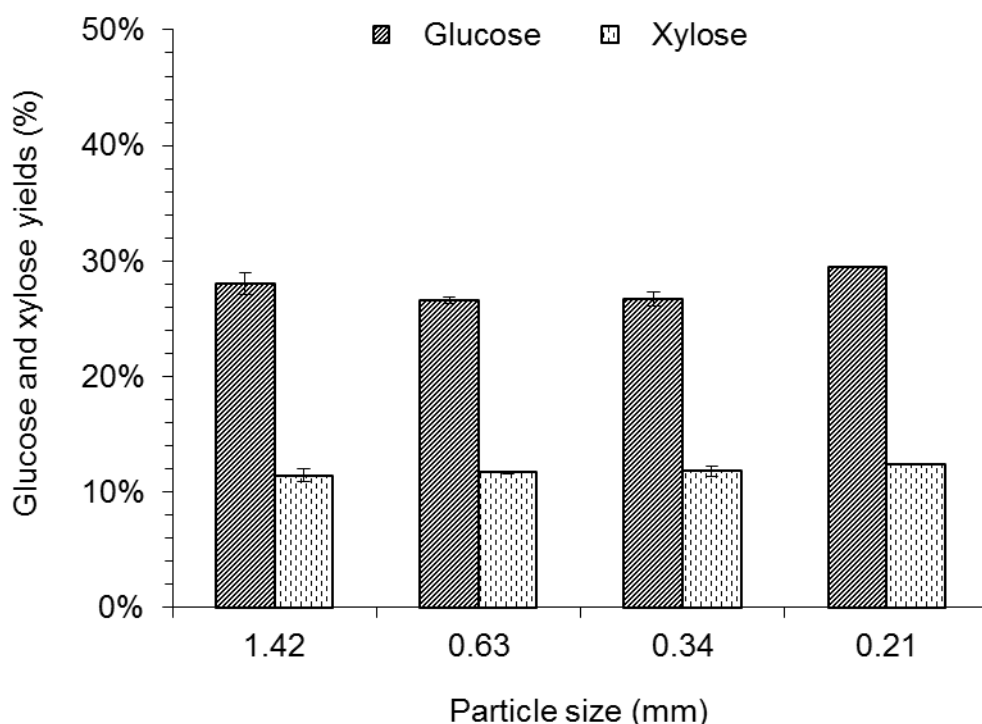


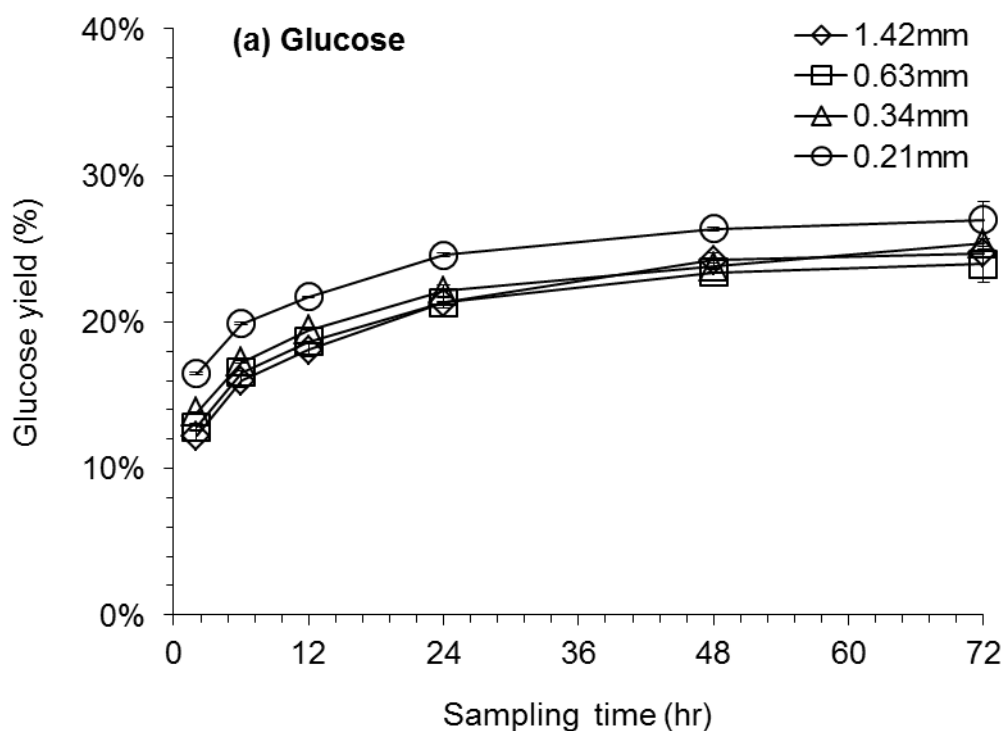
图 3.1 不同粒径玉米秸秆酶水解

Figure. 3.1 Enzymatic hydrolysis of corn stover at different particle sizes. Conditions in flasks: solids content 5% (w/w), cellulase enzyme 15 FPU/ g DM, temperature 50 °C, time period 72 hours at 150 rpm.

四种粒径(1.42, 0.69, 0.34, 和 0.21 mm)玉米秸秆糖化 72 h 后葡萄糖, 木糖得率如上图 3.1 所示。从图中可以看出, 葡萄糖和木糖得率的变化随着颗粒尺寸的变化并不明显, 并没有随着粒径的减小而增大, 考虑存在系统误差及玉米秸秆中可能存在的不可糖化杂质的影响, 可以认为以上四个目数玉米秸秆糖化效果无差别, 葡萄糖及木糖得率并不是随着目数的增大而增加。

从图中葡萄糖, 木糖得率可以看出, 不同粒径玉米秸秆糖化得率并不是随着粒径的减少而增大, 其糖化效果相差不大, 分析原因可能有: (1) 糖化时间过长, 导致糖化初期因粒径因素造成的糖化差异随着时间的延长而逐渐缩小, 如果大大缩短酶解时间, 则由于粒径的不同带来的影响更能直观的显示出来, 所以需要在接下来的实验中, 考察不同的酶解时间对不同粒径玉米秸秆酶解的影响, 以确定不同酶解时间下, 不同粒径玉米秸秆酶解得率是否会产生差别; (2) 糖化过程中影响糖化效果的主要因素并不是粒径大小, 而是其他因素, 如因酶用量过小导致纤维素酶成为酶解的限制因素等, 当酶用量不足, 即使粒径很小, 酶解速度也不会得到加强, 所以应该加大纤维素酶的使用量, 使得纤维素酶相对过量, 这样就可以排除因纤维素酶而带来的影响。

通过以上分析得出, 酶解时间及酶用量可能是导致酶解得率随粒径变化不明显的主要因素, 接下来分别考察了酶解时间(2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h)及酶用量(7、15、30 FPU/g 干物料)对不同粒径玉米秸秆酶解的影响。



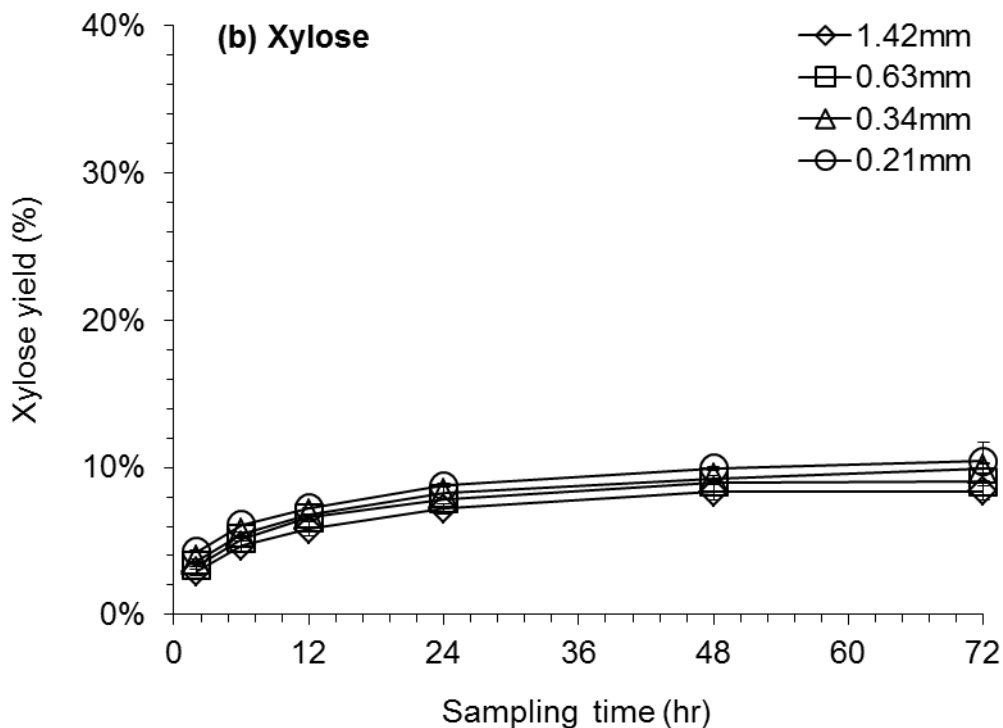


图 3.2 不同粒径玉米秸秆糖化得率随酶解时间的变化。(a) Glucose; (b) Xylose

Figure. 3.2 Time courses of enzymatic hydrolysis of corn stover at different time points, (a) Glucose; (b) Xylose. Conditions in flasks: solids content 5% (w/w), cellulase enzyme 15 FPU/g DM, temperature 50 °C, time period 72 hours at 150 rpm.

从图 3.2 (a)和(b)可以看出,虽然糖化初始阶段葡萄糖,木糖得率随着时间变化比较大,但是四种粒径(1.42, 0.69, 0.34, 和 0.21 mm)的玉米秸秆糖化得率随时间增加的趋势相同,且在相同时间点葡萄糖和木糖得率仍然相差无几,糖化 72 h 后,四种粒径(1.42, 0.69, 0.34, 和 0.21 mm)的玉米秸秆产生的葡萄糖得率分别为 24.69%, 23.96%, 25.34%, 26.97%, 木糖得率分别为 8.40%, 9.05%, 9.92%, 10.42%。可能是由于中间不停取样的缘故,与上述直接糖化 72 h 相比较,葡萄糖和木糖得率稍有降低,但是不同目数的玉米秸秆在不同糖化时间的葡萄糖和木糖得率仍然相差不大,至此我们可以看出,随着酶解时间的变化,不同粒径玉米秸秆的糖化得率并没有发生变化,说明不同粒径玉米秸秆糖化得率无差别并不是由于糖化时间过长引起的。

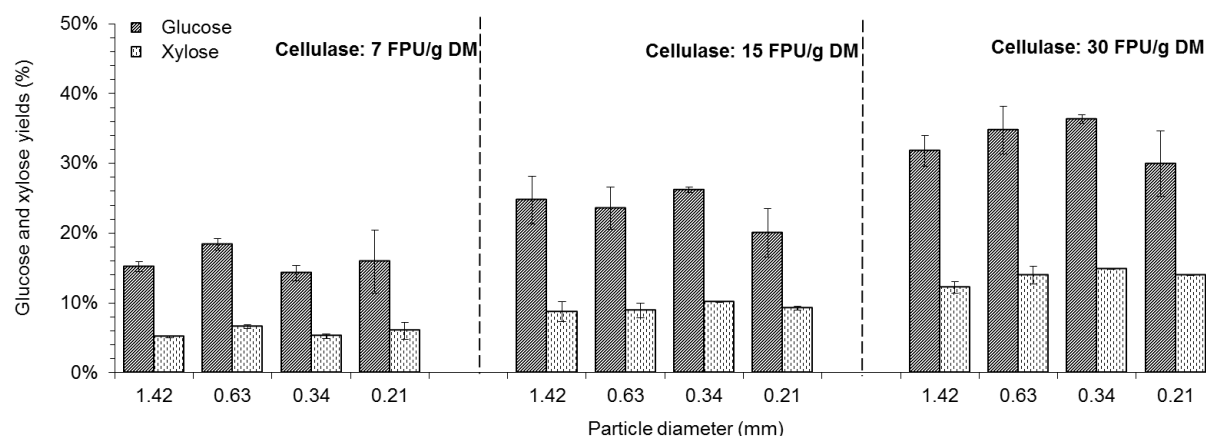


图 3.3 不同酶用量下玉米秸秆糖化

Figure. 3.3 Enzymatic hydrolysis of corn stover at different enzyme dosage. Conditions in flasks: cellulase enzyme 7, 15, and 30 FPU/ g DM, respectively; solids content 5% (w/w), temperature 50 °C, time period 72 hours at 150 rpm.

在酶用量实验中(图 3.3), 在三种酶用量下, 随着粒径的减小, 并没有出现酶解得率增加或降低的现象, 随着纤维素酶用量的提高, 葡萄糖得率虽有所提高, 但即使在高达 30 FPU/gDM 条件下, 四个目数下的玉米秸秆葡萄糖得率分别为 31.80%, 34.79%, 36.37%, 29.99%, 木糖得率分别为 12.22%, 14.02%, 14.88%, 13.96%, 仍然不是随着目数增加而增加, 仍然无法看出四种粒径之间的明显差别。综上, 糖化时间及酶用量并不是导致不同粒径糖化结果无差别的主要原因。

3.3.2 粒径对酶水解速率影响的原因分析

上述实验表明, 即使考虑到酶解时间及酶用量等其他条件的限制, 仍没有发现酶解得率随着粒径的减小而发生明显变化, 说明粒径的减小并不能有效的提高酶解得率。但显而易见的是随着粒径的减小, 外比表面积会不断增加, 一些文献^[80, 81, 88]也指出, 酶解得率随着比表面积的增加而提高。但本文研究中发现, 随着粒径的减小, 外表面积不断增加, 但是酶解得率并没有增加。一个合理的解释是玉米秸秆是一种多空材料, 虽然外表面积随着粒径的减小而不断增加, 但是内孔的比表面积随着粒径的减小却变化不大, 而且内表面积远远大于外表面积, 使得总比表面积随着粒径的减少变化不大。此猜想必须满足三个基本条件: (1) 内表面积随着粒径的减小变化不大; (2) 内表面积远大于外表面积; (3) 内孔足够大, 可以使得纤维素酶进入内孔表面进行酶水解。为了验证这个猜测, 对玉米秸秆颗粒外表面积, 内孔径, 总表面积进行了计算与测定。

首先, 我们对不同粒径玉米秸秆的外表面积进行了近似计算。假设玉米秸秆是一种密度均匀的刚性材料, 总质量为 m 的玉米秸秆, 设其密度为 ρ (本实验室使用的玉米秸秆密度为 0.15 g/mL), 把每个秸秆颗粒想象成球形, 球半径为 r (10 目, 20 目, 40 目, 60 目玉米秸秆颗粒的半径分别为 0.710, 0.315, 0.170, 0.105 m), 则其总外表面积 $S_{\text{总外}}$ 可以表示为:

$$S_{\text{总外}} = N \cdot S_{\text{颗粒}} = \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{颗粒}}} \cdot S_{\text{颗粒}} = \frac{\frac{m}{\rho}}{\frac{4}{3}\pi r^3} \cdot 4\pi r^2 = \frac{3m}{\rho r} \quad (2-1)$$

外比表面积 $S_{\text{外}}$ 可以表示为:

$$S_{\text{外}} = S_{\text{总}}/m = \frac{3}{\rho r} \quad (2-2)$$

其中, N 表示质量为 m 的玉米秸秆总颗粒数, $S_{\text{颗粒}}$ 表示每个颗粒的表面积, $V_{\text{总}}$ 表示质量为 m 的玉米秸秆的总体积, $V_{\text{颗粒}}$ 表示每个颗粒的体积。

从公式可以得出, 一定质量的玉米秸秆, 随着粒径 r 不断减小, 虽然单个颗粒的表面积逐渐减少, 但是秸秆颗粒总数不断增加, 所有秸秆颗粒的表面积总和是不断增加的, 因而理论上随着粒径的减少, 纤维素酶的吸附总量是增加的。由上述比表面积计算公式可得, 10 目, 20 目, 40 目, 60 目玉米秸秆的比表面积分别为: $S_{\text{外}10\text{目}}=0.0282 \text{ m}^2/\text{g}$, $S_{\text{外}20\text{目}}=0.0635 \text{ m}^2/\text{g}$, $S_{\text{外}40\text{目}}=0.1176 \text{ m}^2/\text{g}$, $S_{\text{外}60\text{目}}=0.1905 \text{ m}^2/\text{g}$ 。

由公式计算出的四种粒径的玉米秸秆外比表面积随着粒径的减小而不断增加, 且增加幅度很大, 这和四种粒径玉米秸秆酶解得率没有明显差别的现象不相符。所以接下来对四种粒径玉米秸秆的总比表面积及内孔进行了测定。使用全自动比表面积及微孔物理吸附仪对 10, 20 目秸秆总表面积进行了测定, 由测定报告得出 10, 20 目总表面积分别为 $2.8156 \text{ m}^2/\text{g}$ 和 $3.0729 \text{ m}^2/\text{g}$, 而 10, 20 目玉米秸秆外表面积分别为 0.0200 和 $0.0475 \text{ m}^2/\text{g}$, 所以 10, 20 目玉米秸秆的内表面积分别为 2.7956 和 $3.0254 \text{ m}^2/\text{g}$ 。虽然外表面积随着粒径变小变化很大, 但是内表面积随着粒径的变化却很小, 而且内表面积远远大于外表面积, 下图(图 3.4)给出了随着粒径减小, 外表面积与总表面积的对比图, 从图中可以明显看出, 随着粒径的减小, 外比表面积虽然不断增加, 但是总比表面积变化不大, 所以酶解得率变化并不大。

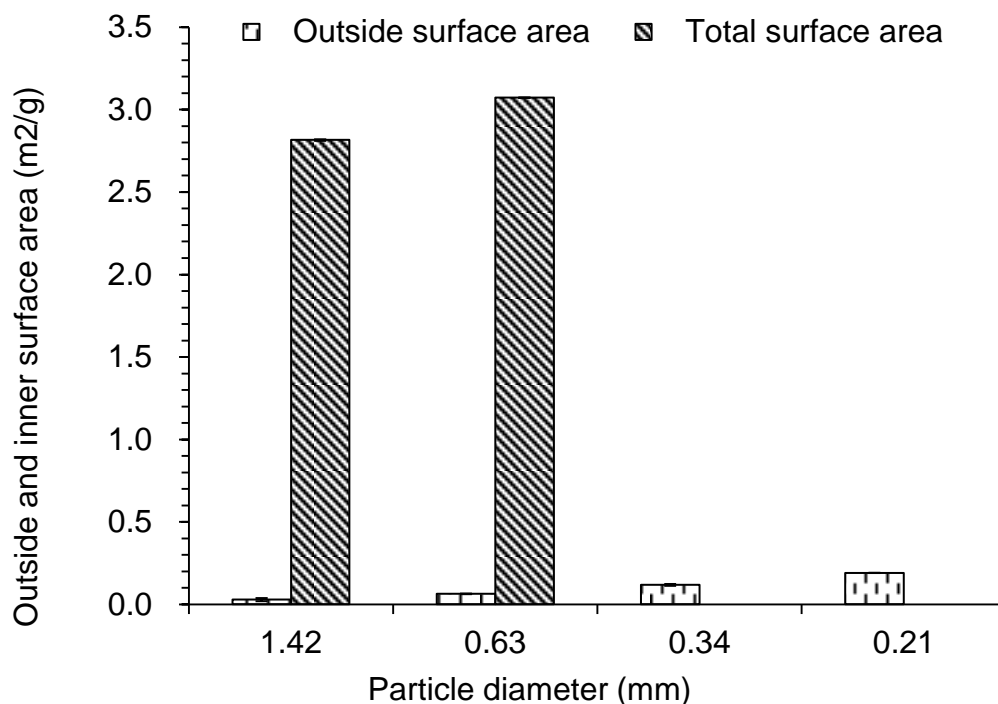


图 3.4 不同粒径玉米秸秆外比表面积与总表面积的同比

Fig. 3.4 comparison of outside surface area and total surface area of corn stover particles with different size.

接下来对内孔径的测定中,从图 3.5 可以明显看出,玉米秸秆内孔主要集中在 50-200 nm 区间,而纤维素酶的直径大约在 4.5 nm 左右^[89],所以纤维素酶可以自由进入秸秆内部进行酶解。这说明对于玉米秸秆这种木质纤维素来说,随着粒径的不断减小,外比表面积会不断增加,但是内比表面积随着粒径的减小并不会产生明显的变化,而且内比表面积远远大于外比表面积,从而使得总比表面积随着粒径减小而变化不明显,这就是不同粒径玉米秸秆糖化效果相差不大的原因。

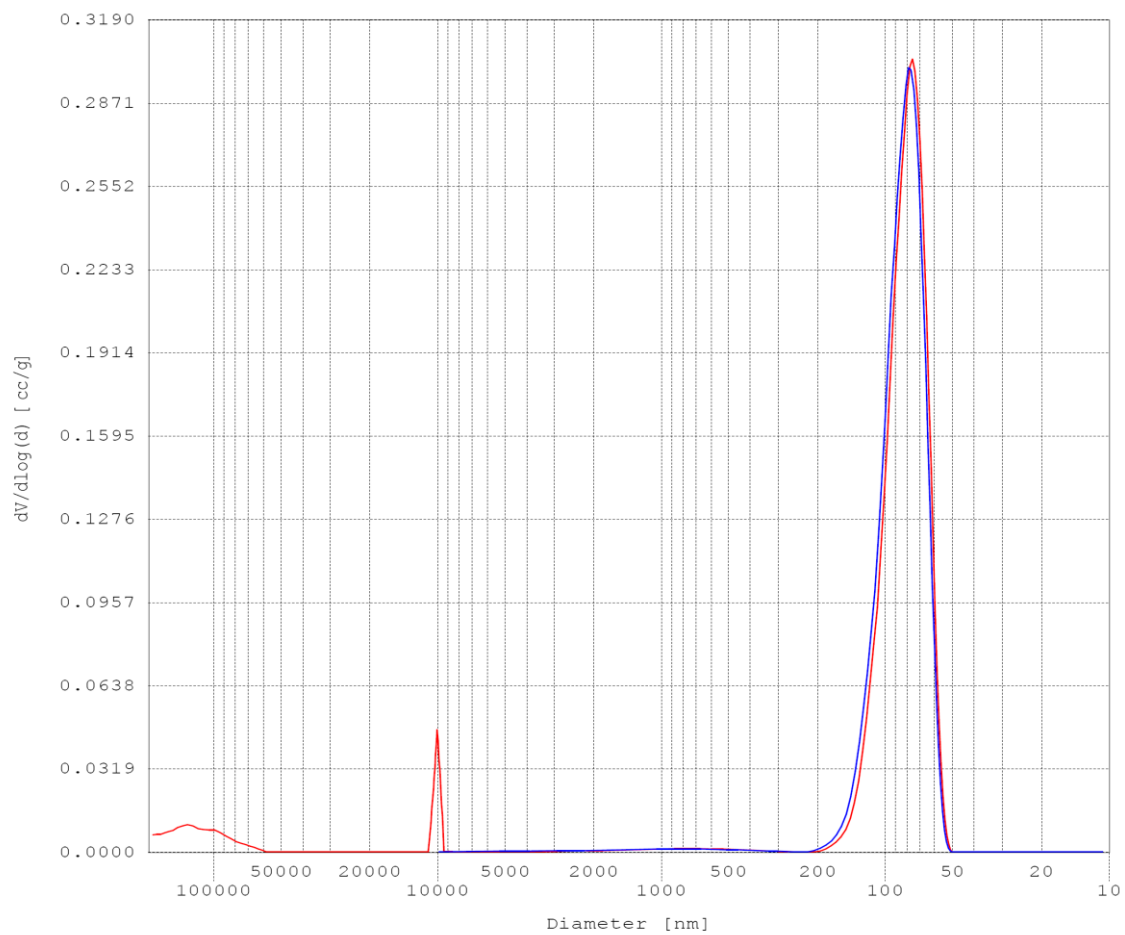


图 3.5 玉米秸秆颗粒内孔尺寸分布图

Figure. 3.5 Size distribution of the inner space of corn stover particles. Horizontal axis: diameter of the inner space, vertical axis: change of space volume with the diameter.

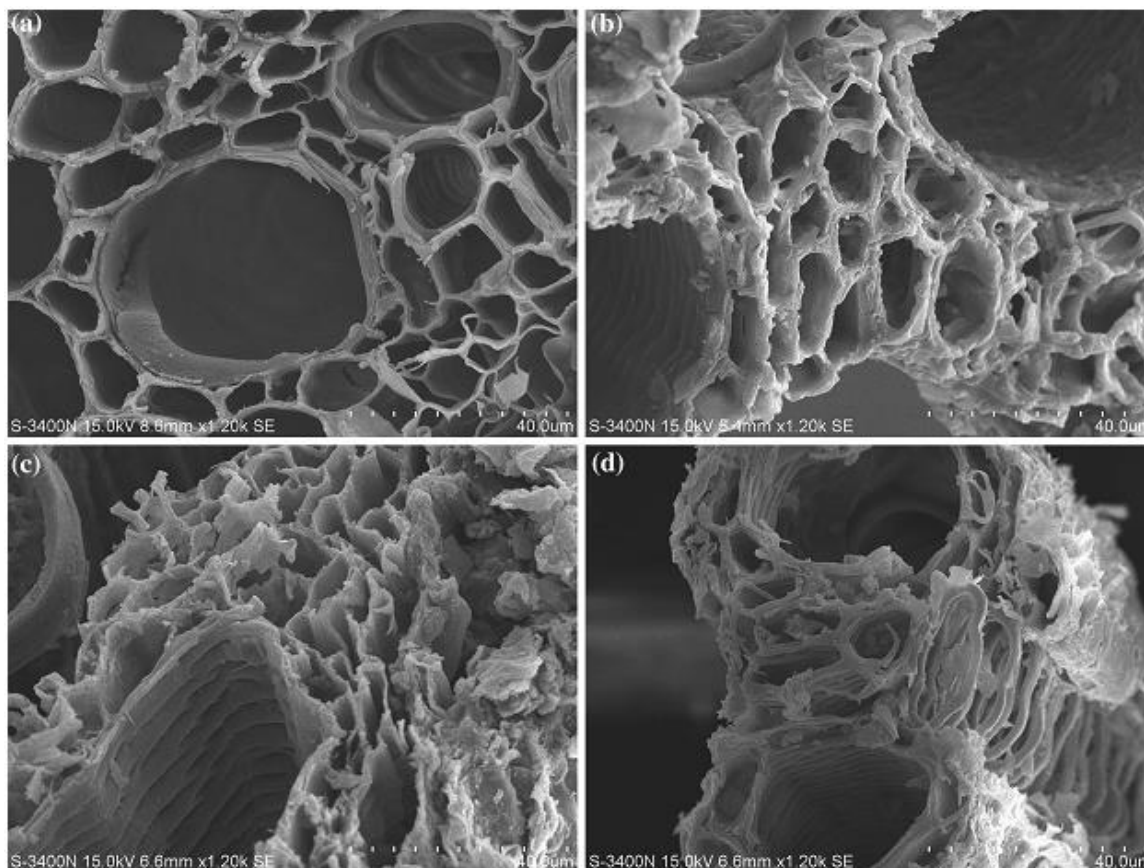


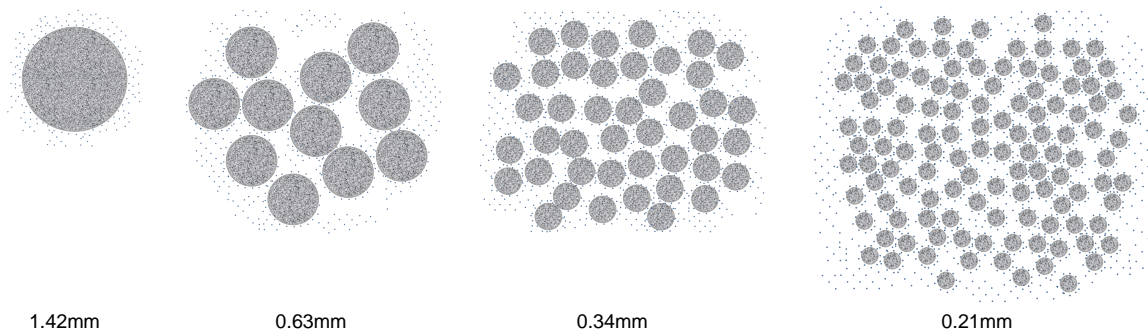
图 3.6 不同粒径玉米秸秆扫描电镜(SEM)观察图。图中, a:1.42mm, b:0.63mm, c:0.34mm, d:0.21mm

Fig. 3.6 Scanning electron microscope (SEM) photographs of corn stover with different particle size.

a:1.42 mm, b:0.63 mm, c:0.34 mm, d:0.21 mm.

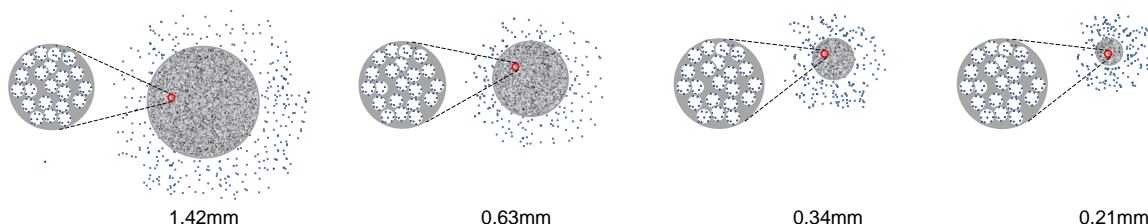
为了更加直观的证明内表面积和外表面积的关系,我们使用扫描电子显微镜对四种粒径玉米秸秆进行了观察,从图 3.6 我们可以明显的看出,四个粒径玉米秸秆的内部都有大量大小不一的空隙,且随着粒径的减小,内孔并没有发生变化,从而使得内表面积没有发生变化,且从图中也可以看出,内表面明显远远大于外表面,这也直观的验证了上述“玉米秸秆酶解得率没有随着粒径的减小而增加是总比表面积并没有随着粒径减小”这种观点。

图 3.7 给出了不同目数玉米秸秆外表面和内表面与纤维素酶的吸附示意图。从图中可以看出,纤维素酶在木质纤维素颗粒内外都有吸附,但是由于内部孔隙非常多,导致其内表面积相比于外表面积要大的多,所以内表面吸附的纤维素酶相比于外表面也多的多。且从全自动比表面积及微孔物理吸附仪测定数据可以看出,内表面积并不随着粒径的减小而变化,表 3.1 给出了外比表面积与总比表面积随着粒径的变化,



(a) 不同粒径玉米秸秆外表面与纤维素酶的吸附

(a) Milling of corn stover into smaller particles



(b) 不同粒径玉米秸秆内表面与纤维素酶的吸附

(b) Inner surface area of the particles with different size

图 3.7 不同粒径玉米秸秆内表面及外表面与纤维素酶的吸附示意图

Figure. 3.7 Schematic drawings of corn stover particles at different size and inner surface area

表 3.1 不同粒径玉米秸秆外比表面积与总表面积

Table. 3.1 Outside and total space surface area of corn stove particles with different size

Particles diameter (mm)	1.42	0.63	0.34	0.21
Outside surface area (m ² /g)	0.0282	0.0635	0.1176	0.1905
Total surface area (m ² /g)	2.8156	3.0729	N/A ^a	N/A ^a

^a 使用物理吸附仪进行比表面积测定发现，当粒径减小到 0.34 mm，氮气吸附曲线和脱附曲线偏差很大，测定结果并不可靠，随着粒径的减小，比表面积甚至出现减小的情况。所以粒径为 0.34 和 0.21 mm 的玉米秸秆比表面积并没有得到准确的数据，还需要寻找更加准确可靠的方法进行测定。

3.4 小结

木质纤维素生物炼制工艺中，木质纤维素的粒径对其后续的预处理及糖化的影响一直众说纷纭，一部分人认为粒径减小可以有效地增加酶解得率，而也有人认为粒径的减小对酶解得率影响不大，且粒径越小，需要的粉碎能耗越高，这会提高生物炼制工艺过程的成本。针对粒径对酶解得率的影响，本文进行了研究。经研究发现，随着玉米秸秆粒径的不断减小，玉米秸秆酶解得率相差不大，通过对比表面积及孔径的测定发现，玉米秸秆是一种含有大量内孔的多空物质，且内孔足够大，纤维素酶可以顺利地进入内孔进行酶水解，且随着粒径的减小，内表面积基本不发生变化，虽然外表面积随着粒径减

小增加的较明显,但是由于内比表面积远远大于外比表面积,从而使得总表面积随着粒径的减小而基本保持不变,这是造成不同粒径玉米秸秆糖化效果无明显差别的主要原因。已经有部分文献表明,酶解效率与木质纤维素与纤维素酶的有效接触面积成正比,本文中粒径的减小并没有减小玉米秸秆的总表面积,从而使得酶解得率变化不大,而在以前的研究中,有些研究发现随着粒径的减小,酶解得率变化很大,而也有一些研究表明,随着粒径的减小,酶解得率变化不大,这是因为不同研究使用的原料不同,粒径研究范围不同及原料处理方式不同。原料预处理方式的不同,会直接导致木质纤维素表面积的变化,从而影响最终的实验结果,大部分机械类粉碎只能单纯减小粒径,而对木质纤维素的内部结构影响不大,所以比表面积随着粒径变化不大;而一些化学预处理方式则会在改变粒径的同时改变木质纤维素的结构,从而增加比表面积。对木质纤维素粒径与酶解特性的深入研究,木质纤维素的机械粉碎对后续的酶解影响不大,所以在工业规模,在不影响后续预处理,酶解过程的同时,应该尽量减小粉碎功耗。

第 4 章 结论与展望

4.1 分段糖化模式对玉米秸秆糖化的影响

4.1.1 结论

本文对玉米秸秆糖化模式进行了研究,采用了一种新型的糖化模式,即分段糖化。本文对比了分段糖化和传统糖化,得出以下结论:

(1) 通过对玉米秸秆糖化过程中扭矩的测定,发现玉米秸秆糖化液随着糖化的进行,扭矩降低非常迅速,在糖化初始 3 h 内,糖化液扭矩就可以降低到一个很低的水平。而扭矩可以直接反应出糖化液粘度的变化,这说明玉米秸秆这种木质纤维素在糖化过程中粘度降低的非常快,这有利于后续的分段糖化过程。因为分段糖化的理念就是通过初始糖化阶段的强搅拌使得糖化液迅速液化,粘度降低后再转入无搅拌反应器中进一步糖化。所以,玉米秸秆等随着糖化进行可以迅速降低粘度的木质纤维素,将是一种优秀的分段糖化原料;

(2) 随着糖化固含量的提高,分段糖化的糖化得率与传统糖化差距越来越小,当固含量提高到 30% 时,两者之间糖化得率基本没有差别。这说明分段糖化适用于高固含量下的糖化,而这与工业生产中需要高固含量糖化来降低生物炼制成本的观点不谋而合;

(3) 同步糖化与发酵实验中,在 30% 固含量下,经过 5 h 的预糖化及后续 67 h 的发酵,分段同步糖化与发酵(ts-SSF)与传统的同步糖化与发酵(SSF)相比,乙醇的得率并没有降低,乙醇的生产速率也没有降低;

(4) 在发酵过程中,传统的 SSF 生产乙醇的过程中,因发酵液粘度较高,菌体发酵乙醇产生的 CO_2 过快等因素,使得在发酵的初始 12 h 内,菌体产生的 CO_2 不能及时的排出发酵液而导致发酵液冲罐现象,这是发酵过程中一直困扰我们的难题,为了解决这个问题,往往需要向发酵液中加入消泡剂来降低冲罐的可能性。但是加入消泡剂不但操作繁琐,而且加入的消泡剂可能会对发酵菌体及纤维素酶产生有害影响。而采用 ts-SSF 方式进行乙醇发酵则不会产生冲罐现象,这是 ts-SSF 相比于 SSF 明显的优势,不仅减少了搅拌节约了搅拌的功耗,而且消除了冲罐现象,使得发酵过程更加容易操作,从而更有利于工业化生产。

4.1.2 展望

本文经过对分段糖化的研究,确定了分段糖化的可行性,在后面的发酵中更加验证了这种糖化方式的优越性。但是要想将这种糖化方式应用于工业化生产中,还需要进行一系列的研究:

(1) 在 5 L 反应器中对分段糖化的研究发现,其相比于传统的搅拌糖化,糖化得率没有降低并减少了搅拌的使用,节约了过程成本。但是还需要在更大的反应器中对这种糖化方式进行评估,以确定其在工业生产中应用。

(2) 分段糖化相比于搅拌糖化节约了搅拌能耗而节约了过程成本,但是具体节约的

能耗并没有进行具体的研究,而且搅拌过程及静置过程中糖化液流变学性质,糖化液组分变化没有进行深入的研究,通过对其糖化液的流变学性质的研究以精确确定糖化液分段糖化时间点及其节约的能耗。

(3) 在 5 L 反应器静置发酵过程中,我们看出静置发酵与搅拌发酵相比乙醇得率完全相同,但是仍需在更大的反应器中进行静置发酵以确定其在工业生产的应用。另一方面,我们观察到静置糖化不会产生冲罐现象,但是具体原因及其机理并没有深入研究,所以接下来还需要对这种现象的具体原因进行探究。

4.2 玉米秸秆粒径对酶解得率的影响

4.2.1 结论

通过研究玉米秸秆粒径对酶解得率的影响,发现随着粒径的减小,酶解得率并没有发生变化,这使得我们在木质纤维素的前处理阶段,关于适当控制木质纤维素的粒径有了更加深入的认识。具体结论如下:

(1) 随着玉米秸秆粒径的减小,酶解得率并没有提高。通过对酶解时间及酶用量的研究也排除了其他因素对酶解的影响,说明随着粒径的减小,酶解得率并不会发生变化;

(2) 通过对不同粒径玉米秸秆粒径及外比表面积的计算发现,随着粒径的减小,外比表面积是不断减小的,且变化幅度非常大,而通过仪器测定的结果也与计算结果基本吻合;

(3) 通过全自动比表面积及微孔物理吸附仪及扫描电子显微镜(SEM)可以看出,随着粒径的减小,玉米秸秆的总比表面积是基本维持不变的,而且玉米秸秆内孔也并没有随着粒径的减小而发生变化。所以,随着粒径的减小,虽然外比表面积变化巨大,但是内比表面积基本不变,且内比表面积远远大于外比表面积,这是导致随着粒径减小,而酶解得率并没有发生变化的根本原因。

本研究打破了粒径越小,酶解得率越高的普遍认识,对木质纤维素处理过程具有指导意义。

4.2.2 展望

通过对未预处理玉米秸秆粒径的研究,我们发现了酶解得率与有效接触面积大小相关,而玉米秸秆粒径减小并没有增加比表面积,所以酶解得率不会增加。但是,我们仅针对未预处理玉米秸秆这一种原料进行了研究,预处理后的玉米秸秆是否仍遵循本研究发现的规律,以及其他木质纤维素是否也像玉米秸秆一样具有大量内孔,并可以使得纤维素酶进入内部进行水解。为了全面研究粒径对木质纤维素酶水解的影响,还需要进行大量的研究工作:

(1) 需要对预处理后的玉米秸秆进行研究,考察预处理过程中玉米秸秆比表面积的变化,及其对酶解得率的影响,考察预处理后的不同粒径玉米秸秆酶解得率是否有差别,并与未预处理玉米秸秆进行对比;

(2) 考察不同种类的木质纤维素,观察其结构与玉米秸秆的区别,并研究其未预处

理及预处理两种状态下，粒径对酶解得率的影响；

(3) 总结以上研究结果，确定粒径对各种木质纤维素的影响，以求在实际生产中，选择合适的粒径，降低粉碎功耗，提高酶解得率

参考文献

- [1] Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 2012, 38: 522-550.
- [2] Speight J. G. Unconventional fuel sources. *The biofuels handbook*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2011, p42-75.
- [3] Karagöz P., Rocha I. V., Özkan M., Angelidaki I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresour. Technol.* 2012, 104: 349-357.
- [4] Sánchez Ó. J., Cardona C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 2008, 99:5270-5295.
- [5] Kumar G., Bakonyi P., Periyasamy S., Kim S. H., et al. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2015, 44: 728-737.
- [6] 陈洪章, 邱卫华. 秸秆发酵燃料乙醇关键问题及其进展. *化学进展*. 2007, 19: 1116-1121.
- [7] 张名佳, 苏荣欣, 齐 崑, 等. 木质纤维素酶解糖化. *化学进展*. 2009, 21: 1070-1074.
- [8] Himmel M. E., Ding S. Y., Johnsons D. K., et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuel production. *Science* 2007;315:804-7.
- [9] Zhang J. Z., Ma X. X., Yu J. L., et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 4585-4589.
- [10] Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 2009, 27: 185-194.
- [11] Gottschalk L. M. F., Oliveira R. A., Da Silva Bon E. P. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.* 2010, 51: 72-78.
- [12] Andrić P., Meyer A. S., Jensen P. A., et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol. Adv.* 2010, 28: 308-324.
- [13] Merino S. T., Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, 108: 95-120.
- [14] Mosier N., Wyman C., Dale B., et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2005, 96: 673-86.

- [15] Zhang Y. P., Himmel M. E., Mielenz J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24: 452-81.
- [16] 张元晶, 魏刚, 张小冬, 等. 木质纤维素生物质预处理技术研究现状. *中国农学通报*. 2012, 28: 272-277.
- [17] Sun Y., Cheng J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 2002, 83: 1-11.
- [18] Yuan T. Q., Wang W., Zhang L. M., et al. Reconstitution of cellulose and lignin after [C2mim][OAc] pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110: 729-736.
- [19] Gupta R., Khasa Y. P., Kuhad R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84: 1103-1109.
- [20] Van Dyk J. S., Pletschke B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30: 1458-1480.
- [21] Kim K. H., Tucker M., Nguyen Q. Conversion of bark-rich biomass mixture into fermentable sugar by two-stage dilute acid-catalyzed hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 2005, 96: 1249-55.
- [22] Zhang J., Wang X. S., Chu D. Q., et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 4480-4488.
- [23] Karagöz P., Rocha I. V., Özkan M., et al. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresour. Technol.* 2012, 104: 349-357.
- [24] Yamashita Y., Shono M., Sasaki C., et al. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydr. Polym.* 2010, 79: 914-920.
- [25] Gupta R., Khasa Y. P., Kuhad R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84: 1103-1109.
- [26] Alvira P., Tomás-Pejeó E., Ballesteros M., et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4851-4861.
- [27] Hou X. D., Smith T. J., Li N., et al. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109: 2484-2493.
- [28] 胡秋龙, 熊兴耀, 谭琳, 等. 木质纤维素生物质预处理技术的研究进展. *中国农学*

- 通报. 2011, 27: 1-7.
- [29] Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L., et al. Lignocellulose biotechnology: issues for bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* 2003, 2: 602-619.
- [30] Suwannarangsee S., Bunternngsook B., Arnthong J., et al. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresour. Technol.* 2012, 119: 252-261.
- [31] Moraš S., Barak Y., Caspi J., et al. Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. *Am. Soc. Microbiol.* 2010, 1: 5-10.
- [32] Várnai A., Viikari L., Marjam K., et al. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 1220-1227.
- [33] Seo D. J., Fujita H., Sakoda A. Structural changes of lignocelluloses by a nonionic surfactant, Tween 20, and their effects on cellulase adsorption and saccharification. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 9605-9612.
- [34] Siposa B., Dienes D., SchleicheraÁ., et al. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). *Enzyme Microb. Technol.* 2010, 47: 84-90.
- [35] Zhu M. J., Li P., Gong X. F., et al. A comparison of the production of ethanol between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using unpretreated cassava pulp and enzyme cocktail. *biosci. biotechnol. biochem.* 2012, 76: 671-678.
- [36] Humbird D., Davis R., Tao L., et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. NREL, 2011, p29-30.
- [37] Hoyer K., Galbe M., Zacchi G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. *Process Biochem.* 2013, 48: 289-293.
- [38] Larsen J., Østergaard Petersen M., Thirup L., et al. The IBUS processe lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chem. Eng. Technol.* 2008, 31: 765-772.
- [39] Hodge D. B., Nazmul Karim M., Schell D. J., et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 152: 88-107.
- [40] Rosgaard L., Andric P., Dam-Johansen K., et al. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 143: 27-40.
- [41] Chandra R. P., Au-Yeung K., Chanis C., et al. The influence of pretreatment and enzyme

- loading on the effectiveness of batch and fed-batch hydrolysis of corn stover. *Biotechnol. Prog.* 2011, 27: 77-85.
- [42] Yang J., Zhang X. P., Yong Q., et al. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 4905-4908.
- [43] Modenbach A. A., Nokes S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. *Biomass Bioenergy*, 2013, 56: 526-544.
- [44] Xue Y., Jameel H., Phillips R., et al. Split addition of enzymes in enzymatic hydrolysis at high solids concentration to increase sugar concentration for bioethanol production. *J Ind. Eng. Chem.* 2012, 18: 707-714.
- [45] Viola E., Zimbardi F., Valerio V., et al. Use of a two-chamber reactor to improve enzymatic hydrolysis and fermentation of lignocellulosic materials. *Appl. Energy.* 2013, 102: 198-203.
- [46] Jørgensen H., Vibe-Pedersen J., Larsen J., et al. Liquefaction of lignocellulose at high-Solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 96: 862-870.
- [47] Zhang J., Chu D. Q., Huang J., et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 105: 718-728.
- [48] Fan Z. L., South C., Lyford K., et al. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2003, 26: 93-101.
- [49] Mohagheghi A., Tucker M., Grohmann K., et al. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992, 33: 67-81.
- [50] Kristensen J. B, Felby C., Jørgensen H.. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels.* 2009, 2: 11.
- [51] Zaccai G. The effect of water on protein dynamics. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2004, 359: 1269-1275.
- [52] Wingren A., Galbe M., Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog.* 2003, 19: 1109-1117.
- [53] Katzen R., Madson P. W., Moon G. D. Alcohol distillation-the fundamentals. In *The Alcohol Textbook* Edited by: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR. Nottingham: Nottingham University Press. 1999: 103-125.
- [54] Zacchi G., Axelsson A. Economic-evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, 34: 223-233.
- [55] Varga E., Klinke H. B., Reczey K., et al. High solid simultaneous saccharification and

- fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol, *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 88: 567-574.
- [56] Kang K. E., Chung D. P., Kim Y., et al. High-titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system. *Fuel.* 2015, 145: 18-24.
- [57] Taylor F., Marquez M. A., Johnston D. B., et al. Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4403-4408.
- [58] Lynd L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 1996, 21: 403-65.
- [59] Ma X. X., Yue G. J., Yu J. L., et al. Enzymatic hydrolysis of cassava bagasse with high solid loading. *J. Biobased Mater Bioenergy.* 2011, 5: 275.
- [60] Zhao X., Dong L., Chen L., et al. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers. *Bioresour. Technol.* 2013, 135: 350-6.
- [61] Rudolf A., Alkasrawi M., Zacchi G., et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme Microb. Technol.* 2005, 37: 195-204.
- [62] Liu K., Lin X., Yue J., et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4952-8.
- [63] Zhang M., Wang F., Su R., et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4959-64.
- [64] Yang M., Li W., Liu B., et al. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4884-8.
- [65] Jian Zhang 1, Xiusheng Wang 1, Deqiang Chu, Yanqing He, Jie Bao. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology* 102 (2011) 4480-4488.
- [66] Zhang J., Zhu Z. N., Wang X. F., et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels.* 2010, 3: 26.
- [67] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, NREL/TP-510-42618. Golden, CO: NREL, 2011.
- [68] Adney B., Baker J.,. Measurement of cellulase activities. NREL. Golden, 1996, CO. LAP-006.
- [69] Chandra R. P., Bura R., Mabee W. E., et al. Substrate pretreatment: the key to effective

- enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 2007, 108: 67-93.
- [70] Mansfield S. D., Mooney C., Saddler J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 1999, 15: 804-816.
- [71] Burns D. S., Ooshima H., Converse A. O. Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989, 20/21: 79-94.
- [72] Wong K. K. Y., Deverell K. F., Mackie K. L., et al. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 31: 447-456.
- [73] Dasari R. K., Berson R. E. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 289: 136-140.
- [74] Pedersen M., Meyer A. S. Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biotechnol. Prog.* 2009, 25: 399-408.
- [75] Yeha A. I., Huang Y. C., Chen S. H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr. Polym.* 2010, 79: 192-199.
- [76] Rivers D. B., Emert G. H. Lignocellulose pretreatment-a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnol. Lett.* 1987, 9: 365-368.
- [77] Ballesteros I., Oliva J. M., Negro M. J., et al. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochem.* 2002, 38: 187-192.
- [78] Grous W. R., Converse A. D., Grethlein H. E. The effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme. Microb. Technol.* 1986, 8: 274-280.
- [79] Tanaka M., Ikesaka M., Matsuno R. Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 32: 698-706.
- [80] Grethlein H. E. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nat. Biotechnol.* 1985, 3: 155-160.
- [81] Stone J. E., Scallan A. M., Donefer E., et al. Digestibility as a simple function of a molecule of a similar size to a cellulase enzyme. *Adv. Chem. Ser.* 1969, 95: 219-241.
- [82] Wong K. Y., Deverell K. F., Mackie K. L., et al. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 31: 447-456.

- [83] Chundawat S. P. S., Venkatesh B., Dale B. E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 96: 219-231.
- [84] Mani S., Tabil L. G., Sokhansanj S. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass Bioenergy.* 2004, 27: 339-352.
- [85] Womac A. R., Igathinathane C., Bitra P., et al. Biomass pre-processing size reduction with instrumented mills. Annual International Meeting of American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2007, Minneapolis, MN, USA.
- [86] Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *1991*, 74: 3583-3597.
- [87] 孙丽, 梁蕾. 浅述全自动比表面积及微孔分析仪的应用. *中国陶瓷工业.* 2011, 18: 3.
- [88] Zhu J. Y., Wang G. S., Pan X. J., et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chem. Eng. Sci.* 2009, 64: 474-485.
- [89] Modenbach A. A., Nokes S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high solids loadings -A review. *biomass bioenergy*, 2013, 56: 526-544.

攻读硕士期间的研究成果

学术论文:

1. Hanjie Li, Chenlin Ye, **Ke Liu**, Hanqi Gu, Weitao Du, Jie Bao. Analysis of particle size reduction on overall surface area and enzymatic hydrolysis yield of corn stover. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, 38:149-154.(以共同第一作者发表, 本学位论文第三章内容)

致谢

本论文是在导师鲍杰教授的悉心指导下完成的，鲍老师在论文选题，实验方案，实验方法及最后论文的撰写等方面给予我关键性的指导，在实验出现问题的时候，能及时给我帮助，给我提出参考性意见，但又不局限我的思路。鲍老师在学术上严谨求实，工作上兢兢业业，鲍老师在研究生三年期间严格要求我的学术思想及实验操作，培养了我严谨的学术作风及积极进取的人生态度。

感谢张建老师，高秋强老师对我实验的指导及生活上的关心，张老师在我实验思路及实验操作上出问题后能第一时间给我提出参考意见，本论文很多实验思路都是与张老师讨论总结出来的。

特别感谢顾韩琦师兄，何燕青师兄，方镇宏师兄及李昆师姐对我实验的帮组。在刚进入实验室期间，他们在实验思路及实验操作上给予我巨大的帮助。还要感谢易霞老师，王霞师姐，张宏森师兄，王娟师姐，刘刚，雷成，孙娇娥及张鹏对我实验的帮助。

感谢室友何彦康，王琪及杨剑冰在生活及学习中给我的帮助，陪我度过了快乐的三年研究生生活，留下了一段美好的回忆。

感谢父母的养育之恩，求学期间姐姐对我的照顾。是他们的关心和支持，让我走到了今天。

最后，向所有关心和帮助我的老师，同学，亲戚和朋友表示感谢。

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共

页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____