

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士专业学位论文

木质纤维素生物质预处理与水解过程的关键技术研究

王修胜

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

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:

评 阅 人:

木质纤维素生物质预处理与水解过程的关键技术研究

摘要

稀酸预处理是一种有效的木质纤维素生物质预处理方法，主要作用是降解半纤维素和降低纤维素的结晶度。本文以玉米秸秆为主要原料进行稀酸预处理，提出了在极低用水量条件下的新型稀酸预处理技术。通过实验考查了预浸固液比、预处理温度、预处理时间、酸量、蒸汽压力、预处理原料装量等因素对预处理效率的影响。评价预处理效率的指标包括蒸汽用量、水用量、预处理后物料的固体含量、单糖和寡糖含量、抑制物含量、预处理物料的酶水解效果等。在装填预处理反应器容积50%和100%的装量条件下，通过中心组合实验设计法及响应面分析确定了最佳的预处理条件：酸量2.5%、温度190°C、时间3min。比较了两个原料装量下的预处理效果的差异，考查了在最佳预处理条件下的发酵性能，同时比较了不同产地、不同种类的各种木质纤维素在此预处理条件下处理后的差异。

本文还研究了影响办公废纸酶水解的主要因素，提供了一种办公废纸利用的有效的预处理方法。实验发现废纸中CaCO₃含量是影响办公废纸酶水解最主要的因素，同时提出并对比了不同无机酸或水洗和预浸两种处理方法对去除CaCO₃而促进酶水解的可行性和有效性，确立了硫酸预浸为最佳方案，并仔细研究确定了最佳的预浸条件：固液比1:1.5、硫酸浓度7%(v/v)、温度20°C、时间3h，在最终的验证实验中酶水解后的葡萄糖和木糖浓度分别为36.2 g/L和7.2 g/L，相当于73.3%的纤维素转化率。

本文还研究了在不同固体含量、温度、转速、反应器类型、酶量等因素下的纤维素酶催化纤维素水解的行为，比较了三种常用纤维素酶在游离、木质素和滤纸水解过程中的失活情况和产物抑制情况，对纤维素水解条件的确定和纤维素酶的选择具有一定的参考价值。

关键字：木质纤维素生物质；稀酸预处理；办公废纸；酶水解；纤维素酶

Studies on pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass

Abstract

Dilute acid pretreatment is one of the most effective pretreatment methods for lignocellulosic biomass, by degrading hemicellulose and reducing cellulose crystallinity. In this thesis, corn stover was used as feedstock for dilute acid pretreatment and a new dilute acid pretreatment method consuming very minimum water usage was proposed. The effect of solid to liquid ratio (S/L), temperature, retention time, sulphuric acid usage, steam pressure and feedstock loading on the pretreatment efficiency were investigated. The steam and water usage, the solid and WIS content of the pretreated corn stover, the monomer and oligomer sugars and the inhibitor concentrations in the prehydrolysate and the enzymatic hydrolysis yield of pretreated slurry were measured and calculated. The optimal pretreatment condition was experimentally determined using the Central Composite Design method and response surface analysis at feedstock loading of 50% and 100%, i.e. H₂SO₄ usage 2.5% at 190°C for 3min. The fermentation performance of the pretreated slurry at the optimal condition were also investigated. The comparison of the differences between the two feedstock loadings was also done, as well as different kinds of lignocellulosic biomass from different places at the optimal condition.

The effects on enzymatic hydrolysis of waste office paper (WOP) were investigated in the thesis and the WOP utilization with a practical enzymatic hydrolysis method with industrial application potential was provided. It was found that CaCO₃ content in WOP was the main reason that reduced the enzymatic hydrolysis efficiency of WOP. Two pretreatment methods, acid washing and acid presoaking, were tested for the removal of CaCO₃ from WOP and the efficiency on enhancement of WOP enzymatic hydrolysis. It was found that the presoaking with sulfuric acid (H₂SO₄) was the most effective way. The presoaking condition parameters were studied carefully and the optimal condition was found, i.e. solid to liquid (S/L) 1:1.5, H₂SO₄ 7% (v/v), room temperature, 3 hours. The concentration of glucose and cellobiose reached 36.2 g/L and 7.2 g/L respectively, equals to 73.3% cellulose conversion yield in the prolonged enzymatic hydrolysis at the optimal presoaking conditions.

The cellulose enzymatic hydrolysis at different solid contents, temperatures, rotation speeds, kinds of bioreactor and cellulase loadings, and comparison of the deactivation of three industrial cellulases at different states - free, absorbed by lignin and during filter paper hydrolysis was carried out. The results provided suggestions for the option of cellulases and cellulose hydrolysis conditions.

Key words: Lignocellulosic biomass; Dilute acid pretreatment; Waste office paper (WOP); Hydrolysis; Cellulase

删除的内容: on

删除的内容: , it mainly targets

删除的内容: on the

删除的内容: degrades it to monomers with

删除的内容: e

删除的内容: paper

删除的内容: kind of

删除的内容: little

删除的内容: provided

删除的内容: We investigated t

删除的内容: .

删除的内容: The evaluation included: s

删除的内容:

删除的内容: Meanwhile,

删除的内容: found through the

删除的内容: s

删除的内容: according to

删除的内容: We also investigated t

删除的内容: C

删除的内容: tow

删除的内容: Factors mainly e

删除的内容: ing

删除的内容: also

删除的内容: paper

删除的内容: we provided

删除的内容: Studies were also done on

目录

第1章 绪论	1
1.1 木质纤维素类生物质	1
1.1.1 木质纤维素类生物质的定义	1
1.1.2 木质纤维素类生物质的组成与结构	1
1.2 生物质能源利用现状	3
1.3 木质纤维素乙醇生产基本工艺	4
1.3.1 生物质原料的前处理与粉碎	4
1.3.2 生物质的预处理	4
1.3.3 生物质的水解	5
1.3.4 生物乙醇的发酵	5
1.3.5 乙醇的分离纯化	6
1.4 木质纤维素生物质预处理研究进展	6
1.4.1 物理法	7
1.4.2 化学方法	7
1.4.3 物理化学方法	10
1.4.4 生物法	10
1.5 办公废纸的预处理研究进展	10
1.6 生物质酶水解研究进展	12
1.6.1 纤维素酶及其水解机理	12
1.6.2 影响木质纤维素酶水解的因素	12
1.7 本文的研究意义和内容	13
1.7.1 本文的研究意义	13
1.7.2 本课题的研究目的	14
1.7.3 本课题的研究内容	14
第2章 木质纤维素生物质原料的稀酸预处理	16
2.1 材料和方法	16
2.1.1 实验材料	16
2.1.2 实验试剂及配制	16
2.1.3 实验设备和仪器	17
2.1.4 实验方法	17
2.2 结果与讨论	23
2.2.1 预浸固液比对稀酸预处理的影响	23
2.2.2 预处理温度对稀酸预处理的影响	26

2.2.3 预处理时间对稀酸预处理的影响·····	29
2.2.4 硫酸用量对稀酸预处理的影响·····	33
2.2.5 蒸汽压力对稀酸预处理的影响·····	37
2.2.6 最佳预处理条件的确定·····	39
2.2.7 不同预处理装量下的预处理比较·····	54
2.2.8 预处理物料发酵测试·····	57
2.2.9 不同木质纤维素生物质稀酸预处理之间的差别·····	59
2.3 结论·····	63
第3章 影响办公废纸酶水解因素探究与促进·····	66
3.1 材料和方法·····	66
3.1.1 实验材料·····	66
3.1.2 主要试剂·····	66
3.1.3 实验仪器·····	67
3.1.4 实验方法·····	68
3.2 实验结果与讨论·····	69
3.2.1 办公废纸中纤维素和金属离子的含量·····	68
3.2.2 废纸中的金属盐类化合物对纤维素酶水解的影响·····	69
3.2.3 去除办公废纸的 CaCO_3 预处理方法·····	71
3.2.4 办公废纸酸预浸处理条件优化·····	72
3.2.5 办公废纸酸在最佳预浸处理条件下处理效果的验证·····	74
3.3 结论·····	75
第4章 纤维素酶催化水解纤维素影响因素及其失活情况研究·····	77
4.1 材料和方法·····	77
4.1.1 实验材料·····	77
4.1.2 实验仪器·····	77
4.1.3 主要试剂·····	77
4.1.4 实验方法·····	78
4.2 实验结果与分析·····	81
4.2.1 固含量对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响·····	81
4.2.2 不同反应器中转速对 Accellerase 1000 催化纤维素水解的影响·····	82
4.2.3 不同酶量和固含量下转速对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响·····	82
4.2.4 温度对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响·····	83
4.2.5 不同纤维素酶在缓冲液中失活情况·····	84
4.2.6 不同纤维素酶在木质素存在的缓冲液中失活情况·····	86
4.2.7 不同纤维素酶在在滤纸水解过程中失活情况·····	87
4.2.8 纤维素酶在水解过程中的葡萄糖抑制情况·····	89

4.3 结论.....	90
参考文献.....	92
致谢.....	99

第1章 绪论

能源以其对人类社会进步和经济发展的作用，一直以来都是世界各国人们关注的焦点，特别是工业革命之后，社会和经济的迅猛发展致使对能源的需求量大大增加。长期以来，人类所利用的能源主要是煤、石油和天然气等化石类燃料，从而导致地球上的化石燃料被大量的开采并消耗，并使人类面临可怕的能源危机。据统计^[1]，全球石油的已探明可开采寿命为16-18年，潜在开采寿命也仅为30-40年；天然气已探明可开采寿命为15-19年，潜在开采寿命也仅为35-40年。在化石燃料大量使用过程中，所产生的二氧化硫、氮氧化物及大量的温室类气体如CO₂等，已经引起了严重的环境问题，如酸雨泛滥、全球气温升高等，由于化石燃料燃烧产生的CO₂占全球总二氧化碳产生量的73%^[2]。

目前已工业化的燃料乙醇主要以粮食或甘蔗为原料虽然工艺成熟，但是产量受原料的限制，也难以长期满足能源需求，同时全球面临的粮食危机，各国也都限制粮食乙醇的发展。而木质纤维素生物质能源以其资源丰富、廉价、可再生等优势成为替代传统能源的焦点。全球每年产生的生物质有10000亿吨；仅美国的农业和林业废弃物每年就有10亿多吨^[3,4]。我国的木质纤维素原料也非常丰富，仅农作物秸秆达7亿吨/年，其中玉米秸、麦秆和稻草分别占35%、21%和19%；林业副产品、城市垃圾和工业废物数量也很可观，如林业生产每年还可以提供1000多万吨工废弃物^[4,5]。此外，城市固体废弃物中的木质纤维素生物质数量也非常巨大，据2000年《中国环境状况公报》报告中国工业固体废物年产总量为8.2亿吨^[6,7]。而且从生物通过光合作用固定CO₂，然后将生物质转化成生物燃料燃烧的过程中形成了“碳循环”，可有效缓解温室效应。生物质资源如此丰富，但以能源形式被利用的部分还不到其总量的1%^[8,9]。因此，有效利用纤维素类生物质发展生物能源，不仅可以解决人类面临的能源危机，还可以充分利用自然资源实现废物利用，缓解粮食危机，同时还能减少CO₂排放，改善环境问题。

1.1 木质纤维素类生物质

1.1.1 木质纤维素类生物质的定义

木质纤维素类生物质指的是植物通过光合作用生成的主要由纤维素、半纤维素和木质素等三种大分子物质及少量的矿物质、植物油等其它成分构成的植物有机体，主要包括木材、农作物秸秆和草类等^[10-16]。

1.1.2 木质纤维素类生物质的组成与结构

木质纤维素类生物质主要有纤维素、半纤维素和木质素等三种成分构成，是构成植物细胞壁主要物质，其在植物细胞中的组成情况如图1所示^[10]。其中，纤维素以微束的形式构成细胞壁的骨架，而木质素与半纤维素则以基质的形式分散包裹在纤维素微束其周围及表面，以保护纤维素不被微生物和酶类破坏。除了纤维素、木质素以及半纤维素以外，还含有植物油、果胶质及灰分等成分。

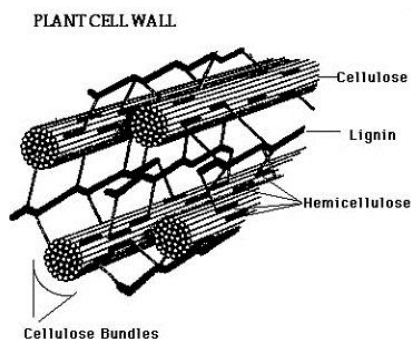


图1.1 木质纤维素的结构与组成

Fig. 1.1 Components and structure of lignocellulosic biomass

不同种类、不同产地的以生物质及同一植物的不同器官和细胞发育的不同时期，其化学组成的差异是很大的。一般纤维素、半纤维和木质素分别约占 30-40%、25-35%和 25-30%^[11,12]。

纤维素是由 β -D-葡萄糖通过 β -1,4糖苷键相结合而形成的链状高分子聚合物，链两端一个是还原端，另一个为非还原端。多条纤维素分子的长链能通过氢键和范德华力等相互作用而结合成微晶纤维素束，多个微晶纤维素束又可以平行的结合在一起形成微纤维结构。微纤维包埋在由半纤维素、木质素和果胶等构成的基质中，这样可以增强其机械强度，在植物体内起着支撑作用^[13,14]。由于纤维素分子间形成致密的纤维束晶体结构，使得纤维素的性质很稳定，不溶于一般的有机溶剂、水、稀酸、稀碱等，且常温下不发生水解，在高温下水解也很慢，只有在催化剂存在的情况下才能显著的进行^[13]。

半纤维素是一类由不同的糖基，如木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等组成的非均一多糖的总称，常带有侧链并连有小分子基团，如乙酰基等，其主要成分是由木糖通过 β -1,4糖苷键连接而成的木聚糖^[10,12,13,15]。半纤维素由于其无定形结构，因此其中的糖苷键较易被断裂，从而使半纤维素降解，尤其是在酸性环境下。如在100°C左右就能在稀酸里水解，也可以在酶催化下水解。但生物质中的半纤维素一般和纤维素交织在一起，因此要完全水解很难。

木质素是构成生物质的主要组成部分之一，目前对许多植物的木质素结构仍不完全清楚，但可概括为一种植物中由愈创木基丙烷、紫丁香基丙烷、对羟基丙烷等几种苯丙烷单元，通过醚键或碳碳键连接而成网状高聚物。在植物体内，木质素与半纤维素结合，将纤维素分子包埋其中，增加了细胞壁的力度，保护了其中的纤维素成分，使之不易被降解^[10,12,14-16]。木质素也不易被降解，也不易溶于水，但在高温下在酸溶液中可以少量溶解，在碱性环境中高温下溶解较多^[16]。

除此之外，生物质中还含有果胶、植物油、无机盐等成分，所有这些相互交织包裹形成了复杂而又致密的结构，使其具有很高的抗张强度和机械强度，同时具有很强的抗降解性能。因此要破坏这种结构使其中的纤维素、半纤维素或木质素降解或分离需要克服很大的阻力，通常要借助各种物理、化学及生物的方法共同作用才能使纤维素、半纤

纤维素、木质素等分离开，破坏纤维素的晶体结构。

1.2 生物质能源利用现状

生物质转化为能量的最简单最直接的方法是燃烧，但效率很低且会产生环境污染，同时生物质能是品位很低的能源存在形式，因此一般要通过各种技术将生物质转化为高品位的生物燃料如燃料乙醇、生物柴油、沼气等。特别是乙醇由于具有清洁、环保、安全等特点被认可为替代化石燃料的最有潜力的生物燃料。

巴西是将乙醇用作车用燃料最早的国家，2001年巴西燃料乙醇的年产量已达2000万吨，占整个车用燃料的50%以上。其次是美国，目前已有70%汽车采用加有乙醇的汽油作为燃料，如E10、E80等其中乙醇含量分别占10%和80%，预计美国乙醇需求2015年达到150亿，2030年达到600亿加仑^[17]。

我国在2001年开始推广使用燃料乙醇，2005年成为世界第三大燃料乙醇生产国，2008年产量已达180万吨^[18,19]。现我国批准的燃料乙醇试点企业有吉林燃料乙醇有限责任公司、河南天冠燃料乙醇公司、安徽丰原生物化学股份有限公司和黑龙江华润酒精有限公司。

目前燃料乙醇的生产原料在美国和中国主要是粮食，在巴西为甘蔗，而作为第二代生物乙醇的纤维乙醇是用木质纤维素生物质作为原料来生产燃料乙醇。世界各国已加快了对纤维乙醇的研究步伐。我国在非粮食乙醇特别是纤维乙醇方面也很重视，《可再生能源中长期发展规划》规定不再增加以粮食为原料的燃料乙醇生产能力，而要积极发展以纤维素生物质为原料的生物液体燃料技术。国家科技部于2008年将纤维乙醇项目列入“十一五”国家科技支撑计划。2006年河南天冠集团3000吨纤维乙醇关键技术研究及产业化示范项目在河南省南阳市开建，并于2009年6月底通过专家验收，这是国内首条秸秆纤维乙醇工业化生产示范线，现已投入运行^[20]。2006年由山东泽生生物科技有限公司与中科院过程工程研究所共同开发秸秆汽爆技术，并在山东省建立“秸秆酶解发酵乙醇新技术其产业化示范工程”。2008年中国石油吉林燃料乙醇有限公司又批准建立3000吨纤维乙醇产业化示范项目，并于2009年底开建。

1.3 木质纤维素乙醇生产基本工艺

由木质纤维素制备生物乙醇的基本工艺可以分为原料前处理与粉碎，预处理、水解与发酵和分离纯化等几部分(如图1.2)^[22]，此外还包括纤维素酶的生产及生产过程中废水的处理和发酵后剩余固体木质素的处理等环节。

删除的内容: 美国能源部投入2.5亿美元成立了两个生物能源研究中心，负责纤维乙醇研究，并在路易斯安那州建成美国第一个示范性纤维乙醇厂，以甘蔗渣作为原料年产530万升，并于2007年资助建设6套纤维素乙醇装置。欧盟在其第七个研究与发展框架计划中为纤维素乙醇研究预留出1亿欧元的经费^[20]。日本、印度等也都分别制定各自的纤维乙醇计划。

删除的内容: 2007年，中国石油吉林燃料乙醇有限公司，在江苏省盐城地区东台市启动3000吨甜高粱秸秆制乙醇示范项目。中国科学院2007年12月中旬启动“纤维素乙醇的高温发酵和生物炼制”重大项目^[21]。

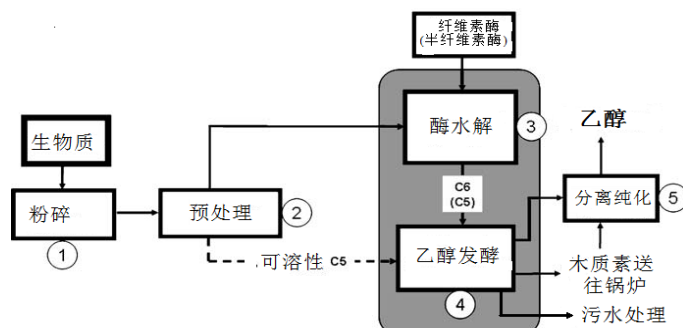


图1.2 木质纤维素乙醇生产基本流程

Fig. 1.2 Main steps for the conversion of biomass to ethanol

1.3.1 生物质原料的前处理与粉碎

木质纤维素原料在风干打包收获后一般要先经过清洗，除去其中的大量泥沙，然后要进行粉碎以降低尺寸，一方面便于输送和操作，同时增大其比表面积以增大后续工段中预处理的效果。通常木质纤维素经切碎、粉碎处理后的原料大小通常为10-30mm，然后进行其它方式的预处理，但也有人研究只经过粉碎而不经其他方式预处理后的糖化性能，因此人们也常常把粉碎作为一种预处理方法加以讨论。生物质经粉碎以后的粒度对预处理乃至糖化和发酵的结果的影响较大^[23,24]

1.3.2 生物质的预处理

生物质的预处理是指通过各种物理、化学和生物等方法打破生物质内原有组成与结构，以利于下面的糖化和发酵的过程。预处理方法可以分为物理法，化学法，物理化学法和生物法等。

预处理的目的是去除生物质内阻碍糖化和发酵的结构和组分，消除木质素对纤维素的保护，打破纤维素致密的微晶体结构，以提高水解阶段中木质纤维素与纤维素酶的接近度和对酶的有效吸附，取得良好的水解效果，得到较高的糖收率，并为发酵提供足够的碳源^[25-28]。同时要在预处理过程中注意控制不利于微生物生长的抑制物的生成量，使发酵阶段高效进行，提高产物收率。预处理阶段还对上游的粉碎和下游的分离纯化及废水控制等有较大影响，因此是整个纤维乙醇工艺中最关键的步骤^[29-33]。

1.3.3 生物质的水解

水解过程是指在一定的温度条件下利用酸或纤维素酶使生物质中的纤维素或半纤维素等高分子化合物与水反应，使之成为可溶性的戊糖和己糖，即糖化过程。为发酵提高碳源。因此，可以将水解分为酸水解法和酶水解法。

酸水解法是研究最早的水解方法，分为浓酸法和稀酸法，但由于其条件非常苛刻且水解后糖得率不高，且产生了较多的抑制物，而逐渐被酶法所取代。其实预处理过程中，又通常伴随着纤维素和半纤维素的水解，因此现在一般将酸水解归为预处理的过程。

酶水解法实际上是指在预处理后的生物质物料在纤维素酶的作用下催化水解生物

质中的纤维素和半纤维素的过程,因此是预处理与酶联合的方法。由于酶水解条件温和,一般在常压下45-50°C, pH 4.8左右的条件下进行,且具有较高的转化率,因此被认为是最具商业前景的水解方法^[31-33]。但由于水解产物如葡萄糖,纤维二糖等及预处理过程中降解产生的糠醛等抑制物对纤维素酶的活性有抑制作用,以及在水解过程中温度,搅拌剪切等引起的酶的失活等原因,使得纤维素到糖的转化率并不高,同时在水解过程中,存在木质素对纤维素酶的不可逆的无效吸附也会影响水解效率^[34-39]。

1.3.4 生物乙醇的发酵

发酵过程是利用微生物,如酵母等对水解产物(五碳糖和六碳糖)进行利用并发酵获得乙醇的阶段。影响发酵过程的因素除了糖浓度外,水解液中的抑制物对发酵结果影响也非常大。按照水解和发酵是否同时进行还可分将发酵分为分批糖化发酵和同步糖化发酵。

(1) 分步水解发酵(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)

这一工艺过程是传统乙醇的生产工艺,即生物质先经纤维素酶的糖化水解得到糖化液,然后利用此糖化液进行微生物发酵。其特点是酶水解和发酵在不同的反应器中进行,反应条件互不影响,均可在各自的最佳条件下进行^[40]。但是由于纤维素酶的底物抑制、产物及预处理糖和木质素降解产物抑制和搅拌剪切失活、热失活等原因,水解过程中所加的生物质固体含量不能太高,从而使得的水解后糖的浓度低,经发酵后得到的乙醇的浓度也会很低,从而也增加了分离纯化的成本,因此其应用受到较大限制^[30,35]。

(2) 同步糖化发酵(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

同步糖化发酵是指纤维素酶催化木质纤维素水解的过程中,同时在同一反应器内接入微生物进行发酵的过程,是现在研究的热点^[40]。同步糖化发酵的特点是酶水解和乙醇发酵在同一反应器内进行,酶水解过程中生成的糖类可以迅速被微生物利用转化成乙醇,使反应器内糖浓度维持在较低的水平,从而减小了纤维素酶的产物抑制,同时因为乙醇对水解反应的抑制作用小于糖类,相对分步糖化发酵而言,同步糖化发酵过程速率较快,乙醇产率以及浓度较高。此外,此过程设备简单,易操作;发酵液中乙醇和纤维素酶的存在及厌氧条件,降低了染菌的几率^[40-43]。

对同步糖化发酵的应用限制最大的是纤维素酶的最佳水解条件和微生物的最佳发酵条件不协调,此外还有预处理中产生各种抑制物对纤维素酶和发酵的抑制及反应器内传质的限制等,尤其是高固体含量条件下的同步糖化发酵,抑制物对微生物和酶的毒害作用会更强,过程中发酵醪的黏度会更高,传质限制更加突出^[40-43]。本实验室的张建等人用自行设计的带有螺带式搅拌桨的发酵罐中在固体含量为30%的条件下,以本实验室专利的耐37°C的酵母进行高固体含量的同步糖化发酵,系统研究了酶量,搅拌转速等条件对高固体同步糖化发酵的影响,同时观测了过程中的流场分布和能耗等结果^[44]。

选择耐高温酵母菌是解决同步糖化发酵过程中酶和微生物最适温度不协调的重要途径。37°C酵母能同步糖化发酵过程中得到比30°C下更好的发酵结果^[44]。许多研究者都在筛选耐高温酵母,或在同步糖化发酵过程中使用其它耐热微生物,其温度可达42°C,

但是高温下许多微生物的产乙醇能力很低^[45-48]。

此外,在发酵过程中通过外加磁场、超声波、添加表面活性剂等促进方法提高乙醇产率和产量也是许多研究者正在进行的项目^[49,50]。

1.3.5 乙醇的分离纯化

分离纯化是通过各种分离手段获得纯度较高的乙醇的过程。传统的乙醇精馏技术已经发展非常成熟,但要真正应用于纤维乙醇的生产要求发酵后乙醇的浓度达到10%以上,否则将消耗大量的能量。但一般纤维乙醇的浓度只有8%,因此一方面要求中上游的不断突破提高发酵醪中的乙醇浓度,另一方面要不断改进乙醇分离纯化技术^[51]。

现具有较大发展潜力的乙醇分离方法是乙醇发酵原位分离耦合技术,即乙醇发酵和分离同时进行的技术,通过此法可以降低乙醇对微生物的毒害作用。如渗透汽化分离与乙醇发酵耦合技术,它是以发酵液中乙醇的渗透压差为推动力,依靠各组分在膜中的溶解与扩散速率差异来实现乙醇分离的新型膜分离技术^[51]。

在以上木质纤维素乙醇生产工艺的几部分中,预处理过程是生物质制备乙醇商业化的限制步骤,在整个过程中耗能最大所占成本最高,约占整个过程成本的18%,且对其之前的原料粉碎和其之后的酶水解、发酵、纯化及污水处理等过程都有很大的影响^[30,31]。纤维素酶的使用量也是乙醇成本中占有比重很大的部分,所以降低纤维素酶的成本,降低发酵过程的使用量也是减少成本的重要方面;水解过程产生的一些酸、醛等也会影响发酵过程中微生物的活性。因此,选择适当的发酵工艺也是生物质制备乙醇商业化要解决的重要问题。此外,还有废水的处理也要花费大量成本,其中一种重要的途径就是减少水的使用量,采用高固体含量发酵是个很好方法,它可以同时解决产物浓度低、水解产物抑制、污水控制等问题,但前提是预处理后的物料固含量高。

1.4 木质纤维素生物质预处理研究进展

在以木质纤维素为原料通过酶将其水解糖并进一步生产乙醇等生物能源的过程中,预处理的目的是去除生物质内阻碍糖化和发酵的结构和组分如木质素和半纤维素等,消除木质素对纤维素的保护作用,打破纤维素致密的微晶体结构降低其结晶度,增加生物质的孔隙率及纤维素与酶的接触和有效吸附以取得良好的水解效果,得到较高的糖收率,同时产生较少的抑制物。因此一种有效的预处理方法应该具有以下特点^[30,31]:

- (1)生物质中总糖得率要高;
- (2)能提高酶水解糖化时纤维素酶与生物质的接触并具有较高的酶解效率;
- (3)要尽量避免预处理过程糖类的降解,防止产生对后续的水解发酵过程有抑制作用的抑制物的生成,预处理液能不经脱毒就能进行发酵;
- (4)预处理得到的物料具有较高的固含量;
- (5)处理过程耗能低,或者多余的能量能被其他工段利用;
- (6)操作成本低,简单易行。

生物质预处理的方法很多,有时很难将一种方法归为某一类,但是大致划分为物理

法、化学法、物理化学法和生物法等，以及他们相结合的方法。

1.4.1 物理法

物理法是指利用机械力对生物质进行切碎，粉碎，研磨等处理或高温分解处理或者利用物理射线如微波，高能电子及超声波等对生物质进行处理，从而破坏纤维素原料的物理结构，降低结晶度的方法。

(1) 机械破碎法

通常木质纤维素原料在进行预处理之前都要经粉碎处理，主要有切碎，干法粉碎，湿法粉碎等，目的是减小生物质的颗粒尺寸，增大其比表面积，以便于进行其他操作。机械破碎法还包括对纤维素原料通过切碎、粉碎、碾磨处理后直接用于酶水解而不进行其它预处理的方法，包括震动磨，高温球磨以及压缩碾磨等，经此法粉碎后的原料颗粒大小可以非常细。粉碎后的生物质不但颗粒变小，如随着对原料粉碎程度的加大，其表面积增大，结晶度降低，物料水溶性组成成分增加，易于纤维素酶的水解，且原料体积没有变化，可以在较高的固含量下进行酶水解，提高水解后的糖浓度。但是粉碎法耗能大，成本高，粉碎过程甚至能占到总能耗的50-60%，尤其是对于硬度较高的生物质并不适合[27,28,52]。

(2) 高温热分解

高温热分解是直接將生物质加热到300°C以上，使生物质中的纤维素快速分解并气化，生成的气称为合成气，而剩余物可用于酶水解，此法类似于煤的干馏。此法要求温度相当高，当温度较低时，分解的速度很慢[52,53]。

其它的物理预处理方法还有，微波预处理法及利用高能辐射如电子辐射、X射线等对木质纤维素原料预处理的方法，虽然具有反应速度快、操作简单等优点，但设备费用高，主要处于理论研究阶段[54,55]。

1.4.2 化学方法

化学方法主要指利用酸、碱、有机溶剂等化学试剂的催化作用或溶解作用，破坏纤维素的晶体结构，同时使半纤维素降解，溶解并使木质素膨胀从而消除其对纤维素的保护作用，并增加木质纤维素生物质的空隙率和比表面积，提高纤维素与酶的接触几率，获得较高的酶水解效率。化学预处理法根据其所用的化学试剂不同可以分为酸处理法，碱处理法和有机溶剂法等。

1.4.2.1 酸处理法(Acid Pretreatment)

酸预处理所用的酸主要有硫酸、硝酸、磷酸、盐酸等无机酸及乙酸等有机酸。酸预处理法是研究最早的生物质预处理技术，且多年来一直都是许多科学家研究的重点方法，主要包括浓酸法，稀酸法和超低酸法等。稀酸预处理法是发展较为完善和成熟的预处理方法之一，最常用的无机酸是硫酸。虽然盐酸效率比硫酸高，但价格较高，且腐蚀性大，对设备要求高，磷酸和硝酸也被用于水解研究[52,53]。

稀硫酸法是研究最多最为成熟的预处理方法，在多种生物质中都有广泛的研究和应用，且此法被美国可再生能源实验室 (NREL) 看好，是最有商业化应用前景的预处理技

删除的内容: 其中浓酸法指的是用高浓度的硫酸，盐酸或磷酸等在较低温度下水解木质纤维素使其水解成单糖的方法，反应一般在常压条件、100°C以下，2-10h，酸浓度在30%以上。浓酸预处理优点是糖转化率高，纤维素和半纤维素的转化率都高达80%以上，其缺点是酸和糖难以分离，用酸量大且回收成本高，设备腐蚀严重且造价高。

(1) 稀酸法。

删除的内容:

术^[30,31]。用稀硫酸对生物质进行预处理的典型过程是：将木质纤维素原料浸泡在稀硫酸溶液中并混合均匀，然后加热到一定温度并维持一定的时间，此过程所需要的硫酸的浓度一般为0.5%-6%，温度一般在140-220°C，维持时间从几分钟到数小时不等，固液比的确定按照加热方式不同而不同，当采用容器壁间接加热时一般为1:5-1:20，若通过直接通入热蒸汽加热可适当降低固液比^[25,26]。稀硫酸预处理的特点是可以有效作用于生物质中半纤维素组分，约有80-90%转化为单糖^[30]。虽然木质素溶解的很少，对纤维素的也作用较小，但不少研究表明，木质素结构被打破，使酶的可及性提高，使后面纤维素酶水解生成葡萄糖的产率大大提高^[30,56-58]。

删除的内容：。

虽然稀硫酸预处理法商业应用前途光明，但同样存在许多不足之处^[30,43]，主要有：对反应器腐蚀性强，对反应器材料要求较高，因此反应器造价高；完成预处理后，要用碱中和，以便水解和发酵过程的进行；预处理过程中伴随着木质纤维素的水解，会产生大量乙酸，及糖和木质素的降解产物如木糖有可能进一步降解，生成糖醛等副产物，六碳糖降解形成5-羟甲基糠醛，糠醛和5-羟甲基糠醛降解时又形成甲酸和乙酰丙酸等，这些物质对酶水解和发酵过程有很强的抑制作用，通常需要采用离子交换、过量石灰处理、活性炭处理等措施脱毒^[30,31]；此外传统的稀酸预处理要求的固液比很低(1:5-1:20)使得处理后的物料固体含量相当低，不能满足纤维乙醇生产的高固体含量的要求，且不利于节水节能。

超低酸水解是用远远低于稀硫酸处理的硫酸浓度一般低于0.1%，然后在较高温度下(200°C以上)对生物质进行处理的方法。超低酸法具有所需酸少，发酵前中和时碱的用量少，对设备腐蚀性小，糖产率高等优点，但此法能耗大^[31,40]。

删除的内容：(2) 超低酸水解。

1.4.2.2 碱处理法(Alkali Pretreatment)

碱处理法是利用木质素可溶于碱性溶液的特点，使木质素结构破坏，以便于酶水解的进行，主要有NaOH处理法、处理法和氨处理法。目前对碱—过氧化物预处理方法的关注也较多^[28,30,32]。碱处理法的局限性在于一些碱的价格较高，反应结束后不易回收；反应废液和残余物易污染环境。

(1) NaOH法

NaOH有较强的脱木质素，纤维素可以膨胀结晶度也有所降低，同时半纤维素也有部分降解。但此法在后续处理之前要用大量的酸中和，此外NaOH本身的成本很高^[59,60]。

(2) 石灰法

Ca(OH)₂与NaOH相比也较有效而且便宜，但多数石灰法预处理均采用高温(100-200°C)、纯氧条件下进行反应，这就需要不锈钢、耐高压、耐腐蚀的设备^[61,62]。

(3) 碱氧化法

碱处理法的改进是在处理过程中，通入空气或氧气，可以大大提高木质素的去除率，从而提高纤维素的酶可及性，提高水解产率^[62]。

如果用过氧化物代替氧气或空气作氧化剂，于是产生了碱—过氧化物预处理法(Alkaline Peroxide)，如氨—过氧化氢法等。此外还有湿氧化法，通常是在高温高压下，

水、氧气和碱共同作用使木质素和半纤维素与纤维素分离并溶解于碱液中^[63]。

(4) 氨水处理法

主要包括氨水浸泡法(SAA)、氨循环浸没法(ARP)

氨水浸泡法是在常压下, 温度为25-60°C, 将木质纤维素与氨溶液(5-15%)混合并浸泡24-48h, 以脱除原料中大部分木质素^[64]。

氨循环浸没法(ARP)是指将液态的浓度为5-15%的氨水通过装有生物质的反应器, 并加热到80-180°C, 然后分离回收氨并不断循环的方法。氨循环浸没法脱除木质素能力强, 这是由于木质素可以发生氨化作用而溶解于氨水而对糖类的作用不大, 因此可以使木质素含量降低70-85%^[65]。

1.4.2.3 有机溶剂法

有机溶剂溶解法是利用有机溶剂作用下破坏半纤维素和木质素的结合而实现纤维素和木质素、半纤维素的分离。常用的有机溶剂有甲醇、乙醇、乙二醇、丙二醇等。反应结束后要对有机溶剂进行回收, 以防止对下一步酶水解和发酵的抑制, 并降低成本^[26,30,31]。

1.4.2.4 离子液体预处理(Ionic Liquids Pretreatment, ILs)

近来离子液体由于具有难挥发、不易燃烧、物性可调等优点, 引起了约来越多研究者的关注。因此也有人用离子液体对生物质原料进行预处理^[28,30,31,66]。

1.4.3 物理化学方法

物理化学方法有蒸汽爆破法, 氨纤维爆破法及高压热水处理法等。

1.4.3.1 蒸汽爆破法(Steam Explosion, SE)

蒸汽爆破法是用高压蒸汽加热生物质到160-220°C并维持一定时间然后突然泻压的预处理过程^[31,40,52,67,68], 其机理是生物质在高温高压蒸汽的作用下产生一些酸类物质, 这些物质又可作为催化剂使半纤维素降解, 同时高温蒸汽会可以减弱木质素和纤维素的结合, 并在蒸汽爆破瞬间使纤维素晶体被破坏, 并增大木质纤维素的空隙率和比表面积。

蒸汽爆破法不需另外添加试剂; 处理后固体含量高能满足高固体发酵的要求, 但汽爆过程中会产生较多抑制物, 因而在进行发酵前一般要对物料进行水洗, 从而引起五碳糖的损失, 且蒸汽爆破所要求的压力和温度较高, 能耗较大^[31,40,52,67,68]。

1.4.3.2 氨纤维爆破法(Ammonia Fiber Explosion, AFEX)

氨纤维爆破法实际上是蒸汽爆破法与氨处理法的结合方法, 其机理是在反应过程中, 液氨和木质素发生氨化反应, 使木质素和其它组分分离, 同时通过爆破降低纤维素的晶体结构并增加生物质的比表面积, 增大酶水解时纤维素酶与纤维素的结合^[69,70]。

氨纤维爆破法可以有效去除木质素, 半纤维素损失少, 同时破坏纤维素的结晶结构以提高纤维素酶的接触几率, 氨几乎可以全部回收, 残余的少量氨可为发酵微生物提供氮源, 但其保压过程需要能耗较大。

与氨纤维爆破法相似蒸汽爆破法与稀酸处理法结合又产生了稀酸蒸汽爆破法, CO₂蒸汽爆破法, SO₂蒸汽爆破法等, 其机理与蒸汽爆破和稀酸法类似, 但效果不同, 可以

结合两者的优点,但也存在部分缺陷^[40]。

1.4.3.2 液态热水法

液态热水法又称控制pH高压热水法,是指在不加任何其它化学试剂的条件下利用高压状态的热水使生物质中的半纤维素降解,并使纤维素水解。液态热水法的反应温度一般为200-230°C时间为2-15min。液态热水法具有不需要其它试剂对设备要求小,处理过程中产生的抑制物少等优点,但所需温度高,能耗较大^[71]。

1.4.4 生物法

生物预处理法是某些微生物在培养过程中产生的能降解木质素的酶类对生物质进行处理的方法。

生物预处理常用的微生物是白腐菌、棕腐菌等^[72,73]。白腐真菌在碳源和氮源限制时会降解木质素的漆酶和锰过氧化物酶等,从而使木质素降解。生物处理法的优点是能耗小、对环境友好,但是由于作用周期长,且效果不如物理和化学法明显,因此发展较慢。

1.5 办公废纸的预处理研究进展

随着现代社会的发展,城镇居民的数量日益增加,同时由此产生的城镇固体垃圾越来越多。据统计,仅美国每年产生的固体垃圾就有 15 亿吨^[74],我国城镇固体垃圾年产总量为 8.2 亿吨^[8],这些固体垃圾一般被送到垃圾场被焚烧或填埋,这样不但产生严重的环境问题如焚烧带来的大气污染,填埋会占用大量耕地,而世界耕在减少,许多国家也在控制垃圾填埋场的数量和面积,因此垃圾填埋的成本也越来越高^[75,76]。在这大量的固体垃圾中,废纸占了约 37.8%,其中废报纸就占了 14%^[76]。因此作为木质纤维素原料的重要组成部分非常有必要对固体城镇垃圾加以利用,然而这些原料的回收率很低,在垃圾回收率最高的日本,废纸的回收率只有 66.1%^[77]。回收的这些废纸一般用于在造纸,但利用率也并不高,在日本回收废纸中只有 65%用于纸的生产^[77]。而且在回收经过脱墨漂白等工艺过后重新造纸后生产的纸大都是低品质的纸,如书刊纸,纸板等。这是由于经回收重新利用的纸中,纤维的长度变短,从而影响了纸张的质量,而且回收纸中不能利用的细小纤维的处理是令生产商头痛的事^[78]。

因此需要一种更好的方法来解决此问题,并提高利用率。一种重要的解决办法就是将其降解成还原糖,再把糖转化成生物能源,如乙醇、油脂等,或其它生物化学品,如乳酸等^[78-81]。

理论上,废纸作为一种重要的木质纤维素原料可以用现有木质纤维素的处理方法对其预处理和水解等,但由于在纸张的生产过程中,已经过其进行了一系列的处理,包括粉碎,木质素的脱除和高温处理等^[82],所以就此而言利用废纸比农作物废弃物转化成糖和其它产品更有优势。

利用纤维素酶进行酶水解是一个条件温和而且有效的方法,特别是过程中不会产生醛类和有机酸等抑制物。但纤维素酶水解废纸时固含量很低,一般不高于5%,这样会使糖化后还原糖的浓度太低,而影响最终产物的分离和成本,且产生的废水过多。所以

提高其水解时固体含量而不影响其转化率是一个重大的挑战^[83]。

现在虽然纸的成本在降低,但原纸浆的成本在升高,特别是对于中国这样的森林覆盖率低且纸浆工艺落后的国家纸浆的成本更高,所以在成品纸生产中使用了大量的化学药品,包括填料、干湿强度添加剂、施胶剂等,如碳酸钙、硫酸铝、胶粘剂、增白剂等,此外在印刷使用中又会引入许多有机染料等物质^[82,84-86],其中碳酸钙就约占15-25%^[82,84],这些化学品的存在会极大影响其酶解效率。

目前对于办公废纸处理并促进其酶水研究主要包括以下几个方向:

(1) 纤维素酶直接水解:

这是指在不加入任何化学试剂或对其进行物理化学预处理,而仅仅通过粉碎后匀浆然后由纤维素酶水解的过程。如Van Wyk研究了来源不同的纤维素酶及其混合物对不同的废纸在经过或不经不同方法预处理后的水解情况,发现不同的纸材,对不同的酶的水解情况不同,其中办公废纸最难^[87]。Park等比较了三种商业纤维素酶对办公室废纸的水解情况,并提出了各自的经验模型^[88]。Park和Michinaka以动力学黏度为操作参数在糖化过程中补入酶和匀浆或没匀浆过的办公废纸,使24h后的还原糖浓度分别达到87g/L和120g/L,相应得率分别为42.2%和40%,提高了还原糖的浓度^[83]。

(2) 超声波处理:即在废纸酶水解的过程中施加超声波以促进酶水解的方法。

Li等发现连续的超声波能促进各种废纸的水解,且随着超声波强度的增加这种促进作用更明显^[89]。Wood等用超声波处理混合办公废纸(MWOP)并进行同步糖化发酵发现间歇的超声处理能促进MWP的水解和发酵,但连续的超声波处理对发酵有抑制作用^[90]。

(3) 添加表面活性剂促进废纸中纤维素的酶水解

Wu 和 Ju 用添加非离子表面活性剂的方法促进废纸纤维素的水解使转化率达52%^[91]。侯金淑等用废报纸进行同步糖化发酵生产乙醇的过程中加入吐温-20 同样发现吐温对发酵又促进作用^[92]。

(4) 用其它针对植物木质生物质的方法对废纸处理

Kojima等用臭氧法对各种废纸和纸浆进行预处理后,发现废纸比表面积和总孔隙容量增大,并增加了纤维素酶的可接近度提高了酶水解^[86]。

Zheng等用超临界CO₂爆破法处理纤维素原料提高了纤维素的酶解速率和水解程度,使葡萄糖得率提高了50%^[93]。

1.6 生物质酶水解研究进展

生物质的酶水解实际上生物质物料在纤维素酶的作用下催化水解生物质中的纤维素和半纤维素生成单糖的过程。

1.6.1 纤维素酶及水解机理

纤维素酶是指能降解纤维素及其衍生物并生成葡萄糖的一类酶的总称,纤维素酶来源非常广泛,主要有真菌、细菌和放线菌等微生物产生。研究最多并应用于生产的是真菌,主要有绿色木霉、里氏木霉、黑曲霉、根霉等^[94]。

纤维素酶是由多种组分组成的复合酶系,目前普遍认为其主要包括:内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、葡萄糖苷酶等三个组分,在水解时三者相互结合协调作用^[95-97]。

内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4)作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 β -1,4-糖苷键,切断纤维素分子并生成大量短链纤维素和纤维寡糖等。外切葡聚糖酶(EC3.2.1.91)又称纤维二糖水解酶,它主要作用于纤维素分子的非还原末端,水解 β -1,4-糖苷键产生纤维二糖。 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21),通常又称为纤维二糖酶(Cellobiase),它主要催化水解含有 β -葡萄糖苷键的寡糖,如纤维二糖、纤维素三糖等水解生成葡萄糖。

天然或工业生产的纤维素酶中的这各种组分的比例并不是协调的,不同的微生物产生的纤维素酶中的各组分的差别也是很大的。

1.6.2 影响木质纤维素酶水解的因素

预处理后的木质纤维素原料经过纤维酶水解时会受到许多因素的影响而影响水解效率,这些因素可概括为:预处理后物料的性质,纤维素酶本身的性质和水解条件。

(1) 预处理物料对酶水解的影响

预处理物料对酶水解的影响底物实际上也是预处理方法的选择对酶水解的影响,它可以影响酶水解速率和糖得率。

预处理后的木质纤维素原料的孔隙率与比表面积的大小,其中纤维素的结晶度,木质素的含量与存在形式,半纤维素的含量及预处理过程产生的糖类及其降解产物的种类和浓度等都对酶水解效率有很大影响。这也充分说明选择合适的预处理方法对植物木质纤维素原料酶水解至关重要。

物料比表面积的大小决定了纤维素酶在物料吸附量的大小同时也决定了酶有纤维素接触几率的大小^[98-100]。木质素和半纤维素的含量和存在形式,一方面影响纤维素酶与纤维素的接触几率,同时还会引起纤维素酶由于吸附在木质素或半纤维素上而产生的无效吸附^[36,98-100]。纤维素的结晶度及无定形纤维素的含量则直接决定了纤维素酶的酶解速率^[34,35,98-101]。预处理过程中产生的糖的降解产物往往是纤维素酶的抑制剂,而产生的寡糖也可以对纤维素酶产生底物抑制^[34-39]。

(2) 纤维素酶的性质对酶水解的影响

由于不同的微生物产生纤维素酶不同,其本身对木质纤维素原料水解能力也不同的,同时纤维素酶本身在水解过程耐抑制物的能力、耐底物和产物抑制的能力、热稳定性、抗剪切失活的能力也大不相同,因此纤维素酶的选择和性能的改进也非常重要^[34-39]。

(3) 水解过程中条件因素的影响

影响纤维素水解的条件因素包括水解固体含量即底物浓度、酶用量、底物的混合传质情况、水解搅拌剪切情况及酶水解温度、pH、水解时间等^[34,35,37]。

水解固体含量的高低直接决定了水解过程中是否产生底物抑制和降解产物对酶的抑制,同时会通过影响混合和传质情况影响水解效果,而且底物浓度较高时产生的糖浓度较高又会产生产物抑制,但太低又会影响糖的发酵利用。

酶用量是决定水解速率和糖得率最直接的因素,一般提高酶用量可以提高酶解效

率，但由于酶的价格比较昂贵，尽量降低酶用量才能降低生产成本。

底物的混合传质也是影响酶解效率的重要因素，因为好的传质可减小由于局部糖浓度过高引起的产物和底物抑制，但要注意剪切强度的控制尽量减少由于搅拌剪切带来的酶失活问题

此外水解温度、pH、水解时间也都是影响酶水解的重要因素，一般的纤维素酶最佳温度为50℃、pH4.8水解时尽量在其最佳条件内是最好的，但实际中为了整个过程的协调性会有所改变，如在同步糖化发酵过程中会降低到微生物的生长温度范围内，pH也可能有所改变。

纤维素的酶解周期一般在72h左右，由于酶的失活和抑制作用太长的酶解时间并不一定有好的酶解效果。

1.7 本文的研究意义和内容

1.7.1 本文的研究意义

利用木质纤维素原料如农作物秸秆、木材、城镇固体垃圾中的木质纤维素类垃圾等生产燃料乙醇、生物油脂、沼气等生物能源以替代化石燃料能够同时解决能源危机，环境问题如大气污染、温室效应、固体垃圾污染和处理等，而且能够实现资源的循环利用，对整个人类社会进步和经济发展具有深远的意义。然而由于木质纤维素生物质中的纤维素半纤维和木质素结合紧密，具有很强的抵抗破坏的能力，必须通过预处理，酶水解等共同作用才能使其转化成可以利用的单糖，才能进一步转化成乙醇，生物柴油等生物燃料或乳酸，丁醇等生物基化学品。

目前限制纤维乙醇甚至是整个生物炼制商业化应用的主要障碍在于其成本高，而其成本主要集中在预处理、纤维素酶、酵母、化学品用量、产品纯化，废水处理等几个方面。其中预处理所占成本最高约占整个生物乙醇的18%^[30]，其次为纤维素酶的用量，这是由于目前纤维素酶的生产成本较高，此外废水处理也是成本中不可忽视的部分。预处理的高成本主要体现在高能耗，高用水量及设备成本上。

预处理的重要性除了其所占成本高外，还体现在其对整个生物乙醇生产工艺的上游粉碎和下游的酶水解、发酵、纯化及废水处理具有很大的影响作用，如预处理效果对酶解效率的影响，预处理产生的抑制物对酶解和发酵的影响，预处理后固体的含水量对产品浓度及分离纯化的影响，以及由于预处理对上游的影响的传递效应等。因此，减少预处理能耗和用水量，提高处理后物料的固含量，不但可以直接减少成本，同时高固体含量的物料才能满足高固体同步糖化发酵的要求，从而对于提高产物浓度和减少废水产生量有重要的意义。

要实现降低纤维素酶在生物乙醇工艺中所占成本，除了降低其生产成本外，就目前而言很有必要对其中的主要商业纤维酶的特性进行对比研究，为生产提供参考与指导。

1.7.2 本课题的研究目的

(1) 对玉米秸秆进行稀酸预处理，考查预处理过程中的蒸汽量(能耗的体现)，用水

量, 预处理后物料固体含量, 预处理液成分和酶水解效果等特点及各条件因素对预处理的影响, 并在保证一定预处理效果和低蒸汽用量及水量的基础上找出最佳的处理条件。同时比较不同产地不同种类的各种木质纤维素在此预处理条件下处理后的差异, 考查此预处理方法和预处理条件的普遍适用性。

(2) 测试固体垃圾中的废纸作为生物炼制产业的原料的潜力, 研究影响办公废纸酶水解的主要因素, 提出并验证解决方法, 提高其酶解率, 为其进一步利用提供参考。

(3) 研究影响纤维素酶催化水解的纤维素主要因素及其在不同状态下的失活情况和产物抑制情况

1.7.3 本课题的研究内容

1.7.3.1 木质纤维素生物质原料的稀酸预处理

主要包括:

- (1) 预浸固液比对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (2) 预处理温度对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (3) 预处理时间对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (4) 硫酸用量对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (5) 通入蒸汽压力对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (6) 预处理装量对木质纤维素原料预处理效果的影响;
- (7) 最佳稀酸预处理条件的优化与确定;
- (8) 稀酸预处理后的玉米秸秆的发酵性能测试;
- (9) 不同种类不同产地的木质纤维素生物质的预处理比较;

1.7.3.2 影响办公废纸酶水解因素探究与促进

- (1) 办公废纸中纤维素和金属离子的含量
- (2) 废纸中的金属盐类化合物对纤维素酶水解的影响
- (3) 除办公废纸的 CaCO_3 预处理方法
- (4) 公废纸酸预浸处理条件优化办公废纸酸
- (5) 最佳预浸处理条件下处理效果的验证

1.7.3.3 纤维素酶催化水解纤维素影响的因素及其失活情况研究

- (1) 固体含量对纤维素酶催化滤纸水解的影响
- (2) 转速和反应器类型对纤维素酶催化滤纸水解的影响
- (3) 温度对纤维素酶催化滤纸水解的影响
- (4) 不同纤维素酶在缓冲液中失活情况
- (5) 不同纤维素酶在木质素存在的缓冲液中失活情况
- (6) 不同纤维素酶在在滤纸水解过程中失活情况
- (7) 纤维素酶在水解过程中的葡萄糖抑制情况

第2章 木质纤维素生物质原料的稀酸预处理

2.1 材料和方法

2.1.1 实验材料

预处理所用木质纤维素生物质原料为各种不同产地不同种类的农作物废弃物包括：玉米秸秆(吉林、山东、河南)，小麦秆(山东、河南)，稻草(江西)，芝麻秆(河南、湖北)，棉花秆(湖北)，油菜秆(河南)，经锤式粉碎机粉碎并过直径为 0.5cm 的筛网,颗粒大小为 20-60 目,其中来自吉林的玉米秸秆中由于含有大量泥沙,故用自来水清洗后经压榨机压滤除去大量水,然后 105°C 烘干 8-12h 后储存于真空袋中备用。各种生物质原料中纤维素和半纤维素的含量见表 2.1

纤维素酶：Accellerase 1000，由 Genencor International (Rochester, NY, USA)提供

菌种：酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* DQ-1)，本实验室保存菌种

表 2.1 各种生物质原料中纤维素和半纤维素的含量

生物质原料 Biomass	产地 Place	纤维素含量 Cellulose (%)	半纤维素含量 Hemicellulose (%)
玉米秸秆 CS-JL	吉林	34.1	24.6
玉米秸秆 CS-SD	山东	35.4	23.5
玉米秸秆 CS-HN	河南	36.3	21.5
小麦秆 WS-SD	山东	33.4	26.5
小麦秆 WS-HN	河南	31.7	23.2
稻草 RS-JX	江西	35.4	22.8
棉花秆 Ct-HB	湖北	38.2	18.8
芝麻秆 SS-HN	河南	29.2	18.3
芝麻秆 SS-HB	湖北	31.4	19.8
油菜秆 Rp-HN	河南	33.9	19.9

2.1.2 实验试剂及配制

(1) 主要试剂

硫酸、柠檬酸、柠檬酸钠：分析纯，海凌锋化学试剂有限公司

四环素：Sigma 公司

放线菌酮：Amresco 公司

(2) 试剂配制

预处理所用稀硫酸的浓度为 1%-8%，其配制方法如下：

1%稀硫酸的配制：在 500mL 蒸馏水中小心加入 98%浓硫酸 5.54mL，一边加入一边用玻璃棒搅拌，降温后定容至 1000mL。

其它浓度的稀硫酸配制方法类似。

72%浓硫酸：取 88.8mL98%浓硫酸后加水定容至 100mL。

0.1mol/L 柠檬酸缓冲液(pH4.8)：分别配好 0.1 mol/L 的柠檬酸和柠檬酸钠溶液，然后将两者混合，并用 pH 计测定使其 pH4.8。

删除的内容: T3383,

删除的内容: 94271,

10mg/mL 的四环素溶液: 准确称取四环素 100mg 于 10mL 容量瓶中, 然后用 75% 乙醇定容, 无菌过滤后并储存在-20°C。

10mg/mL 的放线菌酮溶液: 准确称取四环素 100mg 于 10mL 容量瓶中, 然后用超纯水定容, 无菌过滤后并储存在 4°C。

2.1.3 实验设备和仪器

实验所用预处理反应器为自制不锈钢反应器(15L), 主要由电热高压蒸汽发生器(DZSF4.5C, 上海蒸源机电), 预处理反应釜和接收容器 3 部分组成, 反应釜为圆筒状, 外壁以加热套及石棉隔热层保温, 加热套变压器(TDGC2-2KVA, 鸿宝)输出电压为 80V, 反应器内部温度由沿中轴线插入的热电偶测得, 外壁温度由固定于外壁和加热套之间的热电偶测得。

其它仪器有:

高效液相色谱(HPLC): LC-20AD, 日本岛津公司

示差检测器: RID-10A, 日本岛津公司

色谱柱: HPX-87H, Bio-rad Aminex

恒温水浴振荡器: HZ-9212S, 江苏华利达实验设备厂

自动高温灭菌锅: YXQ-LS-75SII, 上海博迅实业有限公司

电热鼓风干燥箱: BDHG-9140A, 上海一恒科学仪器厂

粉碎机: SF-300, 上海科太粉碎设备厂

电子计重器: E5-YD3, 上海三积分电子有限公司

电子天平: BS224, 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司

2.1.4 实验方法

2.1.4.1 稀酸预处理

本实验中所用稀硫酸量指的是硫酸质量占固体干木质纤维素原料质量的百分比, 即

$$H_2SO_4\% = C \times m / M \times 100\% \quad (2-1)$$

C 为稀硫酸的质量浓度, %

m 为稀硫酸的质量, g;

M 为干木质纤维素原料的质量, g。

稀酸预处理的步骤为:

(1) 预浸

称取一定质量粉碎干燥的木质纤维素生物质原料(800g 或 400g), 置于大塑料箱(25L)内, 然后按照一定固液比(S/L=1/2-2/1)缓缓倒入浓度一定的稀硫酸(1%-8%), 并不断反复搅拌直到混合均匀, 然后将物料装入塑料袋内密封, 于室温下预浸约 15-18h, 待用。

(2) 预处理

将预浸过的木质纤维素生物质原料加入到预处理反应器中, 拧紧上下法兰后缓缓打开进气阀通入高压水蒸汽(1.5-3.0MPa), 并在温度升高到 100°C 前打开排气阀排出不凝性气体, 并打开排水阀排出冷凝水, 然后关闭排气阀使反应器内部温度在 30s 内升至所

需温度(180-200°C),并根据压力表和热电偶的读数通入蒸汽使温度维持在目标温度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 内并保持一定时间,同时控制外壁加热套变压器输出电压为 80V,保证反应器外壁温度维持在低于反应器内部温度越为 5-10°C。待预处理达到预定时间后打开排气阀排气泻压,保证在 30s 内使预处理反应器内的压力降低到常压,然后打开反应器卸料至不锈钢桶中,并将不锈钢桶置于冷水中,使其快速降到室温。

2.1.4.2 预处理所用蒸汽用量和水用量测定

实验中测定的蒸汽用量为处理过程中被生物质原料吸收的蒸汽折合成的水的量,水用量为预浸用水和蒸汽水量之和,测定方法为:

预处理前记录所加干秸秆的质量 M_1 和预浸时所加稀酸的质量 M_2 ,处理后将冷却的总物料称重,记为 M_3 ,则预处理所用有效蒸汽用量:

$$M_s = M_3 - M_1 - M_2 \quad (2-2)$$

预处理所用总水量:

$$M_w = M_3 - M_1 \quad (2-3)$$

2.1.4.3 物料固含量或含水量测定

取若干个平皿洗净后,于 105°C 烘箱中烘干 1-2h 至恒重,并记录平皿质量 M_1 ,然后称取一定量的物料 M_2 ,并置于 105°C 烘箱中烘干 8-12h 至恒重,记录其质量 M_3 ,则物料的固体含量为:

$$S_c = (M_3 - M_1) / M_2 \times 100\% \quad (2-4)$$

而物料的含水量为:

$$W_c = [1 - (M_3 - M_1) / M_2] \times 100\% \quad (2-5)$$

2.1.4.4 预处理液成分测定

由于采用此预处理方法所得到的物料固体含量较高,难以得到液态的预处理液,故采用以下方法处理:

准确称取 5g 预处理物料于 100mL 三角摇瓶中,并加入 45mL 去离子水用硅胶塞塞紧后置于 37°C、150r/m 恒温摇床中浸泡 2-3h,然后用烘干称重后的滤纸进行真空抽滤。滤液用于测定预处理物料液相中的单糖,寡糖和抑制物等成分测定。滤渣经多次水洗后 105°C 下烘干至恒重测定水不溶性固体含量及纤维素和半纤维素等结构成分含量组成。

(1) 预处理液中单糖和抑制物的测定

取经上述处理得到的滤液适当稀释并经 0.22 μm 滤膜过滤后通过高效液相色谱(LC-20AD,示差监测器 RID-10A)测定其中的纤维二糖、葡萄糖、木糖、乙酸、乙酰丙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛等成分的浓度。所用色谱柱 Bio-rad Aminex HPX-87H,流动相为 0.05M H_2SO_4 ,柱温 65°C,流速 0.6mL/min,进样量 30/50 μL 。

然后根据预处理物料的固体含量计算出预处理物料液相中单糖和抑制物的含量。

计算公式为:

$$C = n \times C' \times [5 \times (1 - S_c) + 45] / [5 \times (1 - S_c)] \quad (2-6)$$

C 为预处理物料液相中单糖或抑制物的浓度, g/L;

C' 为经高效液相色谱测得的糖或抑制物浓度, g/L;

S_c 为预处理物料的固体含量, %;

n 为稀释倍数。

或

$$W = \{n \times C' \times [5 \times (1 - S_c) + 45] / (5 \times S_c)\} / 1000 \times 100 \quad (2-7)$$

W 为预处理物料液相中单糖或抑制物的含量, g/100g DM

C' 为经高效液相色谱测得的糖或抑制物浓度, g/L;

S_c 为预处理物料的固体含量, %;

n 为稀释倍数。

(2) 预处理液中的寡糖含量测定

预处理液中寡糖含量测定根据 NREL 中寡糖测定方法^[102]并稍作修改, 主要步骤为: 取 5mL 经上述处理得到的滤液于 30mL 具塞压力管中, 并加入 72% H_2SO_4 将硫酸浓度调制 4%, 然后将塞子塞紧并用纱布扎紧, 置于高温自动灭菌锅中于 121°C 下反应 1h, 待反应完成并冷却至室温时加入 $CaCO_3$ 调节 pH 至 5-6 后, 离心取上清液通过 HPLC 测定其中的葡萄糖和木糖浓度, 并与(1)中所测得葡萄糖和木糖的含量对应作差, 得出纤维寡糖和木寡糖的含量。

此实验需同时用已知浓度的葡萄糖和木糖溶液进行相同处理, 并计算其糖得率绘制标准曲线加以校正。所用葡萄糖和木糖标准液浓度见表 2.2, 本实验中测定的标准曲线见图 2.1。

计算方法同预处理液中单糖和抑制物的测定。

表 2.2 寡糖和纤维素含量测定葡萄糖和木糖校正标准曲线表

Table 2.2 Glucose and xylose concentrations for calibration in oligomer sugars and cellulose content analysis

序号	1	2	3	4
葡萄糖(g/L)	0.4	0.8	1.6	3.2
木糖(g/L)	1.5	3.0	6.0	12.0

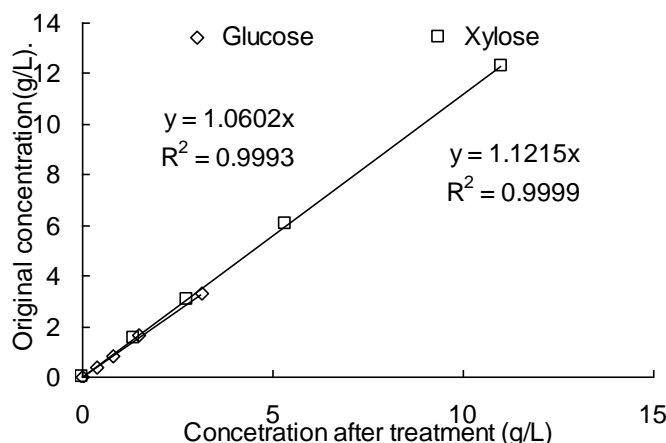


图 2.1 寡糖测定中葡萄糖与木糖测定校正标准曲线

Fig. 2.1 Glucose and xylose standard curves for calibration in oligomer sugars analysis

2.1.4.5 预处理后物料中水不溶性固体(WIS)含量测定^[103]

取经 2.1.4.4 中所述的经浸泡的预处理物料悬浊液,用事先于 105°C 下烘干 2-3h 至恒重(质量为 m_1)的滤纸进行真空抽滤,然后约 400mL 的去离子水冲洗直到洗出液中检测不到糖,同时用玻璃棒不断缓缓搅动,待液体抽干后将滤纸和滤渣小心取出并全部转移到已经于 105°C 下烘干 2-3h 至恒重的平皿(质量为 m_2)中,然后置于 105°C 烘箱中烘干 8-12h 至恒重,并称得其重量 m_3 ,从而计算得预处理物料中水不溶性固体(WIS)的含量为:

$$\text{WIS} = (m_3 - m_2 - m_1) / 5 \times 100\% \quad (2-8)$$

2.1.4.6 原始物料或预处理物料中纤维素和半纤维素含量的测定

物料中纤维素和半纤维素(木聚糖)含量的测定根据 NREL 生物质结构组成成分测定方法^[104]并稍作修改,主要步骤为:

准确称取 100mg、105°C 下烘干至恒重的未处理纤维素生物质原料或处理后并经如 2.1.4.5 中所述的预处理浸泡并洗涤烘干后的滤渣于 30mL 具塞压力管中,然后加入 1mL 72% H_2SO_4 置于 30°C 恒温水浴锅中反应 60min,并用玻璃棒每隔 5-10min 搅拌一次,待达到反应时间后向压力管中加入去离子水 28mL 将 H_2SO_4 浓度调至 4%,然后将塞子塞紧并用纱布扎紧,置于高温自动灭菌锅中于 121°C 下反应 1h,待反应完成并冷却至室温后加入 CaCO_3 调节 pH 至 5-6 后通过 HPLC 测定。

此实验需同时用标准葡萄糖和木糖溶液进行相同处理,计算糖得率并绘制标准曲线加以校正。所用葡萄糖和木糖标准液浓度见表 2.2,本实验标准曲线见图 2.2。

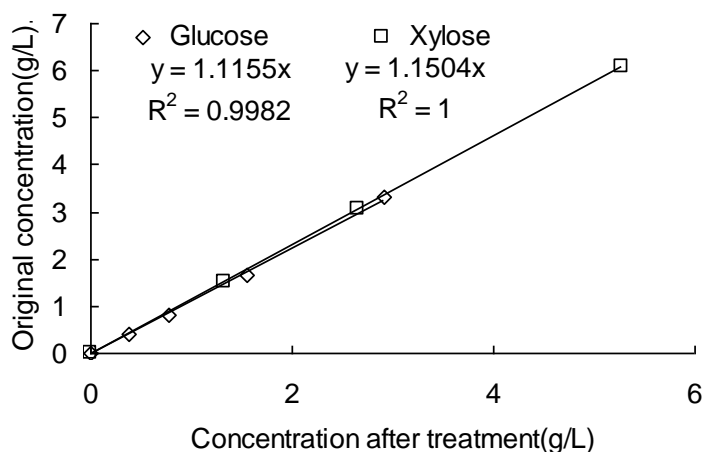


图 2.2 纤维素和半纤维素含量测定中葡萄糖和木糖校正标准曲线

Fig. 2.2 Glucose and xylose standard curves for calibration in cellulose content analysis

2.1.4.7 纤维素酶水解

木质纤维素生物质原料预处理后纤维素酶水解糖化方法参见 NREL 木质纤维素酶水解方法^[105]并稍作修改,主要步骤为:

称取质量为相当于 1gDM 的预处理后物料于 100ml 三角瓶中,加入 10mL 浓度为

0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH4.8), 用 4mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 4.8, 加入 0.06mL 四环素溶液(10mg/mL 75% 乙醇)和 0.08mL 放线菌酮(10mg/mL 水), 然后加入去离子水并调整固含量为 5%(w/w), 同时以加酶量为 15FPU/g DM 加入纤维素酶, 然后用硅胶塞塞紧并置于 50°C 恒温水浴摇床在转速为 180r/m 下水解 48 或 72h, 每点两个平行。

水解后样品于 13000r/m 离心 3min 取上清液, -20°C 下保存并经适当稀释后用高效液相色谱(HPLC)测定其中纤维二糖、葡萄糖、木糖和抑制物浓度。

2.1.4.8 发酵测试

实验所得的预处理后秸秆进行了分步糖化发酵和同步糖化发酵测试。

2.1.4.8.1 分步糖化发酵(SHF)

分步糖化发酵在糖化时固体含量为 25% 或 30% 的水解液中进行

(1) 25% 或 30% 水解液的制得: 向带有螺带式搅拌桨的 5L 生物反应器中加入一定量去离子水于 115°C 下灭菌 20min, 待冷却到 50°C 左右时开启发酵罐温度控制使发酵温度稳定在 50°C, 并将转速调至 200r/m, 然后按照 15FPU/gDM 的加酶量一次加入纤维素酶, 并控制 pH 为 5.0, 然后定时加入固含量已知的预处理物料, 每隔 30min 补料一次在 6h 内将所有物料全部加完, 使所加物料在发酵罐中的固体含量为 25% 或 30%(w/w), 并在 50°C, 200r/m 的条件下糖化 48h 整个过程以 20%NaOH 的控制 pH 为 5.0 左右。待糖化结束后, 将糖化醪于 8000r/m 下离心 15min, 取上清液即为所需 25% 或 30% 的水解液。

(2) 酵母菌驯化: 取保存于 -80°C、50% 甘油管中的酵母菌 2mL 加入装有 20mL 活化培养基的 100mL 三角瓶中, 于 30°C、150r/m 下活化培养 16-18h, 然后以 10% 接种量依次接入到 20mL、30% 水解含量为 25%、50%、50% 剩余部分为活化培养基的 100mL 三角瓶中, 并在 30°C、150r/m 下活化培养 12-14h。

活化培养基的组成: 葡萄糖 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, 酵母浸膏 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%。

(3) 发酵: 将驯化好的酵母菌以 10% 接种量接入到装有 100mL、30% 水解液的 250mL 三角瓶中, 与 30°C、150r/m 下培养 48-60h。培养时定时取样测定, 取样体积为 1mL, 样品于 13000r/m 下离心 3min 取上清液, -20°C 下保存并经适当稀释后用高效液相色谱(HPLC)测定其中葡萄糖、木糖、乙醇及抑制物浓度。

2.1.4.8.2 同步糖化发酵(SSF)

实验中以预处理后的物料进行了同步糖化发酵测试。

(1) 酵母菌驯化同上;

(2) 预糖化: 步骤同 30% 水解制备, 但预水解时间为 12h, 工作体积为 2L。

(3) 同步糖化发酵: 当物料预水解 12h 后, 将发酵罐温度降到 37°C, 同时将 pH 提高到 5.5, 然后以 10%(v/v) 接种量接入驯化好的酵母菌, 于 37°C 进行同步糖化发酵 60h, 并定时取样, 取样体积为 2mL, 样品于 13000r/m 下离心 3min 取上清液, -20°C 下保存并经适当稀释后用高效液相色谱(HPLC)测定其中葡萄糖、木糖、乙醇及抑制物浓度。

2.1.4.9 实验设计

本实验通过单因素试验考查了预浸固液比、预处理温度、预处理时间、硫酸用量、蒸汽压力、预处理装量等因素对木质纤维素原料预处理效果的影响，并在预处理装量为 400g(占反应器容积的 50%)的条件下用中心组合实验设计法(CCD)设计了 15 个条件实验对预处理温度，时间和硫酸用量三个因素进行预处理条件的优化，其中包括 1 个重复 6 次的中心点条件实验，其他每个条件两个平行。实验结果用 Design Expert version 7.1.6 进行响应面分析。试验因素和水平及实验设计结果见表 2.3 和表 2.4。在装量为 800g(占反应器容积的 100%)时的条件优化时，本文采用了在 400g (50%)装量时的结论上逐渐探寻的方法。

表 2.3 预处理条件优化试验因素和水平表

Table 2.3 Factors and levels in optimization experiment

硫酸用量 (%, g/g DM)	温度 (°C)	时间 Time(min)
1	180	5
2.5	190	10
4	200	15

表 2.4 中心组合实验设计预处理条件优化条件表

Table 2.4 Pretreatment conditions according to CCD in optimization experiment

序号	硫酸(%)	温度 (°C)	时间 (min)	$\log R_0^1$	$\log CS^2$
1	1	180	3	2.83	1.06
2	4	180	3	2.83	1.69
3	1	200	3	3.42	1.61
4	4	200	3	3.42	2.26
5	1	180	9	3.31	1.49
6	4	180	9	3.31	2.14
7	1	200	9	3.9	2.03
8	4	200	9	3.9	2.70
9	1	190	6	3.43	1.62
10	4	190	6	3.43	2.27
11	2.5	180	6	3.13	1.75
12	2.5	200	6	3.72	2.31
13	2.5	190	3	3.13	1.72
14	2.5	190	9	3.6	2.17
15	2.5	190	6	3.43	2.08
16	2.5	190	6	3.43	1.99
17	2.5	190	6	3.43	2.01
18	2.5	190	6	3.43	2.03
19	2.5	190	6	3.43	2.06
20	2.5	190	6	3.43	2.10

注：1. R_0 为预处理强度因子，计算公式为： $R_0 = t \cdot \exp[(T - T_i)/14.75]$, $T_i = 100^\circ\text{C}$;

2. $\log CS$ 为考虑酸量影响时的强度因子，计算公式为 $\log CS = \log R_0 - \text{pH}$, pH 为预处理液的 pH ，本实验中难以测得故通过初始加酸量与处理后水量相比换算代替。

2.2 结果与讨论

2.2.1 预浸固液比对稀酸预处理的影响

(1) 预浸固液比对预处理蒸汽、水用量及固含量等的影响

实验中考查了在 400g (50%)和 800g (100%)预处理装量下预浸固液比对玉米秸秆(吉林)稀酸预处理的影响。表 2.5 和表 2.6 分别为 50%和 100%装量下不同预浸固液比及不同预处理条件下蒸汽用量、水用量及固含量和水不溶性固体含量结果。

结果表明,在 50%装量下,降低固液比时用水量会大大增加,预处理后物料的固体含量和水不溶性固体含量也相应大大降低,说明增大预浸时固液比可以大大节约水用量。随固液比降低蒸汽用量有所减少,可能是因为高固液比的物料吸水性较强所致。在 100%装量条件下,用水量和蒸汽用量随固液比增大而大大减少,固含量和水不溶性固体含量也相应升高。在固液比 2:1 时的用水量仅是 1:2 条件下的 1/3,预处理后固体含量可达到 50%左右,约为 1:2 条件下的 2 倍,可充分满足高固体同步糖化发酵要求。

表 2.5 50%预处理装量下预浸固液比对预处理蒸汽、水用量及固含量的影响

Table 2.5 Effect of solid to liquid ratio (S/L) on steam and water usage and solid and WIS content at 50% feedstock loading

预处理条件	固液比	蒸汽用量 (g/100gDM)	水用量 (g/100gDM)	固含量 (%)	水不溶性固体 WIS(%)	
					WIS/slurry	WIS/DM
180°C; 10min;2%	2/1	79.9	138.0	39.1	28.7	73.5
180°C; 10min;2%	1/1	74.8	189.1	33.5	23.6	70.5
190°C; 10min;2.5%	2/1	140.2	202.3	30.6	24.1	72.6
190°C; 10min;2.5%	1/1	106.8	231.3	28.1	22.0	69.6

表 2.6 100%预处理装量下预浸固液比对预处理蒸汽、水用量及固含量的影响

Table 2.5 Effect of solid to liquid ratio (S/L) on steam and water usage and solid and WIS content at 100% feedstock loading

预处理条件	固液比	蒸汽用量 (g/100gDM)	水用量 (g/100gDM)	固含量 (%)	水不溶性固体 WIS(%)	
					WIS/slurry	WIS/DM
200°C; 3min;1%	2/1	47.9	101.5	47.9	34.8	72.6
200°C; 3min;1%	1/1	55.0	160.5	37.6	26.2	69.6
190°C; 3min;2.5%	2/1	41.9	97.8	50.1	35.1	70.0
190°C; 3min;2.5%	1/1	53.0	162.5	37.2	25.4	68.3
190°C; 3min;2.5%	1/2	59.1	282.8	26.5	18.05	68.1

从表 2.5 和表 2.6 中还可以看出,预处理后物料中的水不溶性固体含量占处理后干物料的百分比随预浸固液比的降低而降低,说明在低固液比条件下有较多的成分变成了可溶的成分从固体成分中溶解出来。相同固液比条件下提高预处理温度会增加蒸汽用量和水用量。比较两个装量条件可以看出平均蒸汽用量和用水量会随着装量的提高而大大降低,说明加热反应器本身所消耗的蒸汽用量是很大的,所以提高预处理规模对于降低平均预处理成本是很有利的。

因此,提高预浸固液比同时增大预处理装量,即可以大大减少水用量和蒸汽用量实现节水节能,又可大大提高处理后物料的固体含量满足高固体同步糖化发酵的要求。

(2) 预浸固液比对预处理液成分的影响

不同预浸固液比对预处理后物料液相成分的影响见表 2.7(a, b)、2.8(a, b), 其中表 2.7a 和表 2.8a 为以其在液体里浓度表示的结果(单位: g/L), 表 2.7b 和表 2.8b 为以其占处理后干固体的质量表示的结果(单位: g/100g DM)。预处理液中的可溶性物质主要为糖类及其降解产物, 其中浓度最高或所占比重最大的为木糖和木寡糖, 其次为葡萄糖和纤维寡糖、乙酸, 含量最少的为糠醛和羟甲基糠醛等抑制物。

表 2.7 a 50%预处理装量下预浸固液比对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 2.7a Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the components in prehydrolysate at 50% feedstock loading (Unit: g/L)

预处理条件	固液比	纤维二糖	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛
180°C; 10min;2%	2/1	4.75	10.8	50.4	10.4	0.99	2.62	2.48
180°C; 10min;2%	1/1	4.53	6.80	43.9	7.42	1.09	1.47	1.06
190°C; 10min;2.5%	2/1	4.38	10.0	34.9	10.7	1.50	3.41	3.78
190°C; 10min;2.5%	1/1	3.16	9.70	30.5	8.75	0.89	3.00	3.92

表 2.7b 50%预处理装量下预浸固液比对预处理液成分的影响 (单位: g/100g DM)

Table 2.7b Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the components in prehydrolysate at 50% feedstock loading (Unit: g/100gDM)

预处理条件	固液比	纤维二糖	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛
180°C; 10min;2%	2/1	0.74	1.68	7.84	1.61	0.15	0.41	0.38
180°C; 10min;2%	1/1	0.90	1.35	8.72	1.48	0.22	0.29	0.21
190°C; 10min;2.5%	2/1	0.99	2.27	7.91	2.42	0.34	0.77	0.86
190°C; 10min;2.5%	1/1	0.81	2.48	7.80	2.24	0.23	0.77	1.00

表 2.8a 100%预处理装量下预浸固液比对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 2.8 a Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the components in prehydrolysate at 50% feedstock loading (Unit: g/L)

预处理条件	固液比	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
200°C; 3min;1%	2/1	4.01	19.7	6.15	4.37	0.54	1.68	20.7	107.2
200°C; 3min;1%	1/1	2.19	13.1	2.65	2.71	0.32	0.40	14.5	77.0
190°C; 3min;2.5%	2/1	14.6	75.5	11.21	3.33	3.46	7.65	14.2	41.2
190°C; 3min;2.5%	1/1	7.62	53.3	5.10	0.96	1.42	3.10	11.7	32.0
190°C; 3min;2.5%	1/2	7.94	69.6	6.90	1.20	1.15	2.01	15.3	49.0

表 2.8b 100%预处理装量下预浸固液比对预处理液成分的影响 (单位: g/100g DM)

Table 2.8 b Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the components in prehydrolysate at 100% feed stock loading (Unit: g/100gDM)

预处理条件	固液比	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
200°C; 3min;1%	2/1	0.44	2.14	0.67	0.47	0.06	0.18	2.2	11.7
200°C; 3min;1%	1/1	0.36	2.17	0.44	0.45	0.05	0.07	2.4	12.8
190°C; 3min;2.5%	2/1	1.57	8.13	1.20	0.35	0.37	0.82	1.5	4.4
190°C; 3min;2.5%	1/1	1.29	8.99	0.86	0.16	0.24	0.52	2.0	5.4
190°C; 3min;2.5%	1/2	2.20	19.3	1.84	0.32	0.31	0.54	4.2	13.6

从表 2.7a 和表 2.8a 中可以看出, 随着预浸固液比的降低, 预处理液中的可溶性物

质,如糖和抑制物的浓度会降低,主要是由于低固液比时得到的物料液体含量较高,而从表 2.7b 和表 2.8b 中可以看出,预处理液中的木糖和寡糖(包括纤维寡糖和木寡糖)的含量随着固液比的降低而升高,而葡萄糖和乙酸,糠醛及羟甲基糠醛的含量随预浸固液比的降低而降低,说明在低固液比条件下更易于木糖的释放同时能减少抑制物的产生,但不利于葡萄糖的释放。对于表 2.8b 中 190°C、3min、2.5%条件下固液比为 1/2 时产生的较多葡萄糖和乙酸可能是由于物料中液体较多,热和传质更加均匀,同时此条件下的酸量较多更利于半纤维素的降解(表现为木糖及其寡糖含量很高),而乙酸主要来自半纤维素中的乙酰基水解,所以产生了较多的乙酸,而乙酸在预处理中又可强化对预处理的效果因而导致葡萄糖的含量较高。

100%预处理装量条件下各物质的浓度比 50%装量下高是由于 100%装量下得到的预处理后物料的固体含量较高。

(3) 预浸固液比对预处理物料酶水解效果的影响

表 2.9 和表 2.10 为不同预浸固液比条件下得到的预处理物料经纤维素酶水解后的结果,结果显示预浸固液比对酶水解后葡萄糖得率和浓度影响差别并不明显,而木糖的得率随着固液比的降低而升高,说明降低固液比即增大液体的量有利于提高总的木糖得率。

表 2.9 50%预处理装量下预浸固液比对预处理物料酶解(12h)效果的影响

Table 2.9 Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the enzymatic hydrolysis (12h) of pretreated slurry at feedstock loading of 50%

预处理条件	固液比 S/L	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率(%)	
						Glucose	Xylose
180°C; 10min;2%	2/1	12.5	4.19	0.95	1.11	62.9	29.1
180°C; 10min;2%	1/1	11.8	6.36	1.10	0.85	59.2	44.2
190°C; 10min;2.5%	2/1	13.6	4.08	1.33	0.90	68.2	28.4
190°C; 10min;2.5%	1/1	13.8	4.95	1.29	0.88	69.2	34.4

表 2.10 100%预处理装量下预浸固液比对预处理物料酶解(72h)效果的影响

Table 2.10 Effect of solid to liquid ratio (S/L) on the enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry at feedstock loading of 100%

预处理条件	固液比 S/L	纤维二糖 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率(%)	
							Glucose	Xylose
200°C; 3min;1%	2/1	1.34	14.4	8.41	1.15	0.69	72.3	58.4
200°C; 3min;1%	1/1	1.79	15.0	9.46	1.23	0.91	75.5	65.8
190°C; 3min;2.5%	2/1	1.17	16.8	7.16	1.28	0.80	84.5	49.7
190°C; 3min;2.5%	1/1	1.17	16.6	8.55	1.27	0.36	83.1	59.4
190°C; 3min;2.5%	1/2	1.20	16.5	9.83	1.21	0.35	82.7	68.3

综上所述,预浸固液比对预处理蒸汽用量和用水量的影响很大,提高固液比可以大大降低蒸汽用量和用水量从而实现节能节水的目的,同时可以提高处理后物料的固体含量,但提高固液比会降低木糖得率,同时产生较多的乙酸,糠醛和羟甲基糠醛等抑制物,不利于总糖得率的提高和抑制物含量的控制,但可以通过略降低预处理条件来解决。在

带格式的: 字体颜色: 自动设置

实验中的几个固液比中，相同预处理条件下酶水解后总的葡萄糖相差不大。

2.2.2 预处理温度对稀酸预处理的影响

实验以玉米秸秆(吉林)为原料，在装量为 400g(50%)、固液比 1: 1.5、酸用量为 1.5%、预处理时间为 10min 的条件下考查了不同预处理温度(160-210°C)对稀酸预处理的影响。

(1) 预处理温度比对预处理蒸汽、水用量及固含量的影响

不同温度下预处理蒸汽用量、水用量和固含量及水不溶性固体含量的结果见图 2.3。结果表明，随着温度的升高蒸汽用量和水用量会逐渐增加，且温度越高增加相同的温度，蒸汽用量和水用量的增加量会变大(图 2.3(a))。同时，预处理后物料中的总固体含量和水不溶性固体的含量会随着温度的升高而降低(图 2.3(b))，说明提高预处理温度会增加预处理过程中的能耗和水耗。(所有分图号需用括号标出!!)

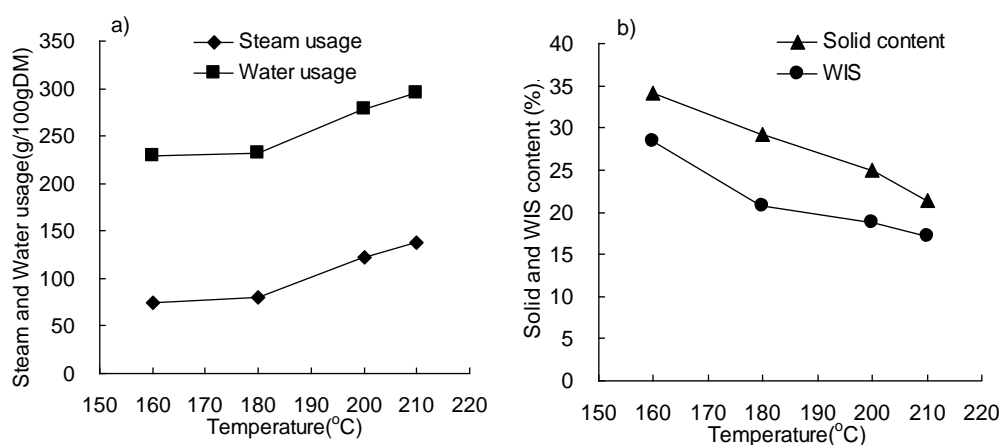


图 2.3 温度对预处理蒸汽和水用量(a)、预处理后固体及水不溶性固体含量(b)的影响

Fig. 2.3 Effect of temperature on the steam and water usage and solid and WIS content

(2) 预处理温度对预处理液成分的影响

预处理温度对预处理物料液相(预处理液)成分的影响结果见表 2.11 及图 2.4，从结果中可以看出，在预处理温度低于 160°C 时预处理液中的木糖和寡糖的浓度和含量很低，而随着温度由 160°C 提高到 180°C 其含量迅速增加，然后随着温度的继续提高而降低(表 2.11 和图 2.4 a, c)，这是由于随着温度的提高，玉米秸秆中的半纤维素的水解加快，木寡糖和木糖的量增加，同时伴随着乙酸的释放量的增加(表 2.11 和图 2.4b)，但当温度继续升高时木糖的降解也加快，表现为糠醛的量逐渐增加(表 2.11 和图 2.4 b)。而葡萄糖的浓度则随着温度从 160°C 提高到 200°C 时逐渐增加，当温度继续提高时才有降低(表 2.11)，而葡萄糖占干物料的百分含量随着温度的提高而不断增加(图 2.4 a)，说明温度越高越利于葡萄糖的释放，但温度提高时葡萄糖的降解也加快，所以羟甲基糠醛的含量也逐渐增加(图 2.4 b)。

比较木糖和葡萄糖随温度的变化规律可以看出，生物质中纤维素的水解比半纤维素的水解需要更高的预处理强度，但高的预处理强度下，单糖尤其是半纤维素水解得到的

木糖会发生降解，从而增加了糠醛和羟甲基糠醛等抑制物的量。

表 2.11 预处理温度对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 2.11 Effect of temperature on the components of prehydrolysate (Unit: g/L)

温度(°C)	纤维二糖	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
160	0.34	0.39	1.24	0.76	1.72	0.14	0.10	5.00	20.0
180	3.91	2.10	13.5	2.97	1.36	0.27	0.44	6.31	35.3
200	1.72	2.13	9.81	6.51	1.73	0.72	0.51	3.96	12.5
210	0.64	1.74	4.09	6.39	1.16	1.26	0.66	1.16	0.21

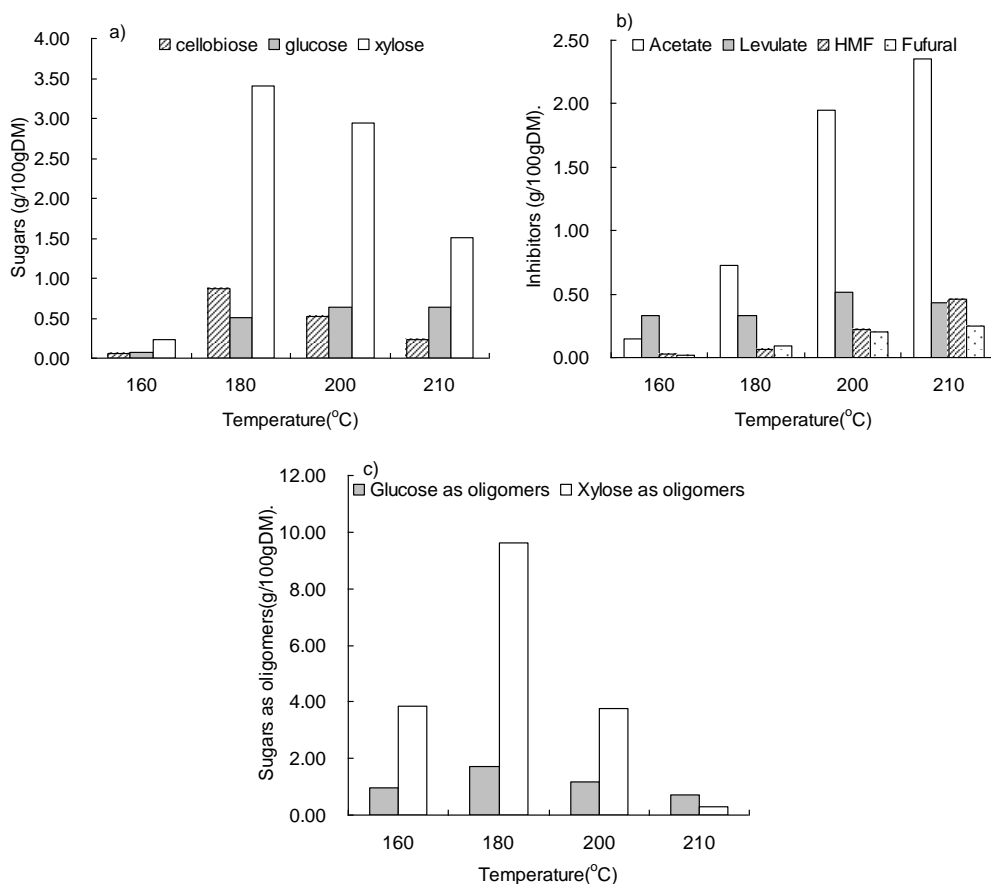


图 2.4 预处理温度对预处理液成分的影响 (单位: g/100gDM)

Fig. 2.4 Effect of temperature on the components of prehydrolysate (Unit: g/100gDM)

(3) 预处理温度对预处理物料酶水解情况的影响

图 2.5 为不同预处理温度下的预处理物料在纤维素酶的作用下水解 48h 葡萄糖，木糖和乙酸随时间的变化情况。

结果表明，随着温度的提高水解 48h 后葡萄糖的浓度逐渐提高(图 2.5 a)，而且在相同时间段内随着温度的提高葡萄糖的增加量也是增大的，这说明提高温度利于纤维素的酶水解。从图 2.5a 中还可以看出，葡萄糖的浓度随着水解时间的延长逐渐增加，但增加量逐渐降低，在水解前 12h 水解速率最大，说明纤维素的酶水解主要发生在水解初期，

主要原因可能是水解刚开始时物料中含有较多的预处理过程中产生的寡糖，更易于纤维素酶的水解，而且水解初期纤维素酶的活力较高，但随着时间的延长，纤维素酶逐渐失活，同时随着糖浓度的增加产物的抑制程度也逐渐增强，再加上纤维素酶被木质素的无效吸附等原因表现为葡萄糖的增加逐渐减少。

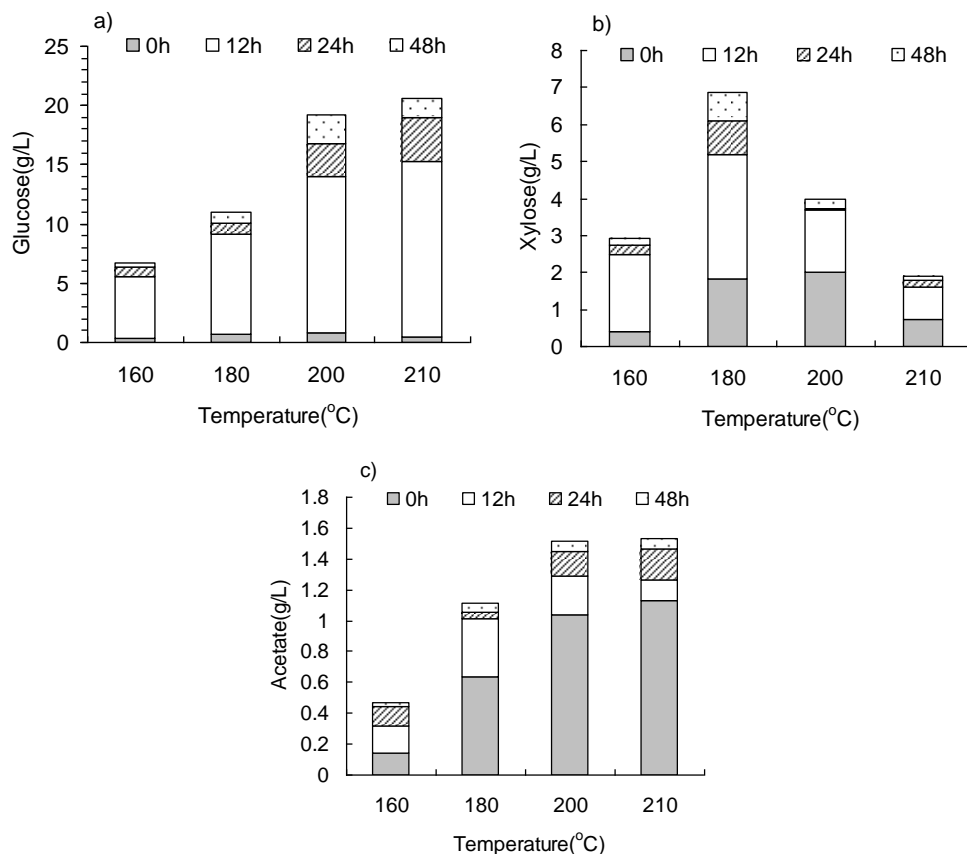


图 2.5 预处理温度对预处理物料酶水解(48h)情况的影响

Fig.2.5 Effect of temperature on the enzymatic hydrolysis (48h) of pretreated slurry

图 2.5b 为在纤维素酶的作用下木糖的浓度随预处理温度和时间的变化情况，从图中可以看出，随着温度的升高，水解 48h 后的木糖浓度逐渐升高到 180°C 时达到最大，但当温度继续升高时木糖的浓度会降低，这主要是由于随着温度的升高半纤维素中的木聚糖水解释程度增大更加利于酶水解，但温度过高时木糖降解速率会大大增加，表现为高温下预处理得到的物料中木糖的得率降低。而且在预处理温度低于 180°C 时水解产生的木糖占很大比例，且也主要集中在水解初期水解后期的产生逐渐减少，而在较高预处理温度下水解产生的木糖比例减少而主要为预处理过程中产生的木糖。

图 2.5c 为预处理物料酶水解过程中乙酸的变化情况，从图中可以看出，乙酸的变化情况与木糖的变化情况相似，即随着预处理温度的提高乙酸的浓度也逐渐升高，在预处理温度低于 180°C 时水解产生的乙酸占较大比例且在初期增加量较大随时间延长而减

少,而在较高预处理温度下预处理过程中产生的乙酸占绝大部分。这说明乙酸在酶水解过程中是逐渐增加的,同时证明了乙酸是伴随着半纤维素的水解产生的。

总之,预处理温度是影响生物质稀酸预处理的重要因素,它对蒸汽用量和水量影响较大,提高预处理温度会增加预处理过程中的能耗和水耗。较高的预处理温度利于葡萄糖的释放但木糖降解速率会大大增加从而不利于木糖得率的提高。乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等抑制物的量会随着温度的提高而增加。因此选择适当的预处理温度是非常重要的。

带格式的: 字体颜色: 自动设置

2.2.3 预处理时间对稀酸预处理的影响

实验以玉米秸秆(吉林)为原料,在装量为 400g (50%)、固液比 1:1.5、酸量 1.5%、预处理温度 180°C 的条件下考查了不同预处理时间(5-30min)对稀酸预处理的影响。

(1) 预处理时间对蒸汽、用水量及处理后固体和水不溶性固体含量的影响

不同预处理时间下的蒸汽用量、水用量和固含量及水不溶性固体含量的结果见图 2.6,从图中可以看出,随着预处理时间的增加蒸汽用量和水用量会逐渐增加,同时预处理后物料中的总固体含量和水不溶性固体的含量会随着预处理时间的增加而降低,说明增加预处理时间会增加预处理过程中的能耗和水耗。

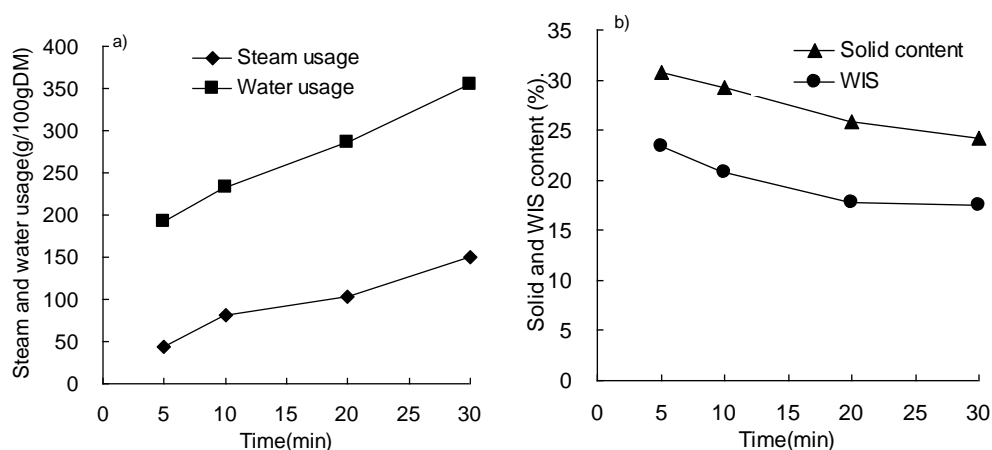


图 2.6 预处理时间对预处理蒸汽和水用量(a)、处理后固体和水不溶性固体含量(b)的影响

Fig. 2.6 Effect of pretreated time on the steam and water usage (a), solid and WIS content (b)

(2) 预处理时间对预处理液成分的影响

预处理时间对预处理液成分的影响结果见表 2.12 及图 2.7,从结果中可以看出,在预处理时间低于 5min 时预处理液中的葡萄糖、木糖、乙酸、羟甲基糠醛及糠醛等各种抑制物的浓度和含量都很低,但纤维寡糖和木寡糖的浓度已经较高,且木糖和木寡糖所占比例最大,说明在较低的预处理强度下半纤维素再稀酸的作用下首先水解成寡糖然后再水解成单糖。

而随着预处理时间增加到 10min 时预处理液中的各种物质的浓度和总量都迅速增加,然后随着时间的继续增加葡萄糖和乙酸、羟甲基糠醛及糠醛等各种抑制物的浓度和

总量一直增加，且抑制物总量的增加速度要大于葡萄糖和木糖的增加速度(图 2.7 b)，木寡糖和纤维寡糖在预处理时间超过 10min 时开始随着预处理时间的增加而逐渐降低(表 2.12 和图 2.7c)，而木糖的浓度在预处理时间超过 10min 时也随着预处理时间的增加而逐渐降低，这是因为提高温度增加的水量超过了木糖的增加量，但木糖的总量随时间延长逐渐增加且增加量较 5min 到 10min 时变慢 (表 2.12 和图 2.7a)，这说明延长预处理时间有利于葡萄糖的释放，但葡萄糖和木糖的降解也会大大增加，所以太长预处理时间并不利于控制抑制物的含量。

表 2.12 预处理时间对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 2.12 Effect of pretreated time on the components of prehydrolysate (Unit: g/L)

时间(min)	纤维二糖	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
5	0.96	0.30	2.54	0.85	0.60	0.09	0.11	4.49	22.3
10	3.91	2.10	13.5	2.97	1.36	0.27	0.44	6.31	35.3
20	10.2	2.01	11.2	4.42	1.23	0.50	0.50	5.17	29.7
30	6.43	2.14	9.81	6.79	1.91	0.73	0.57	3.19	15.4

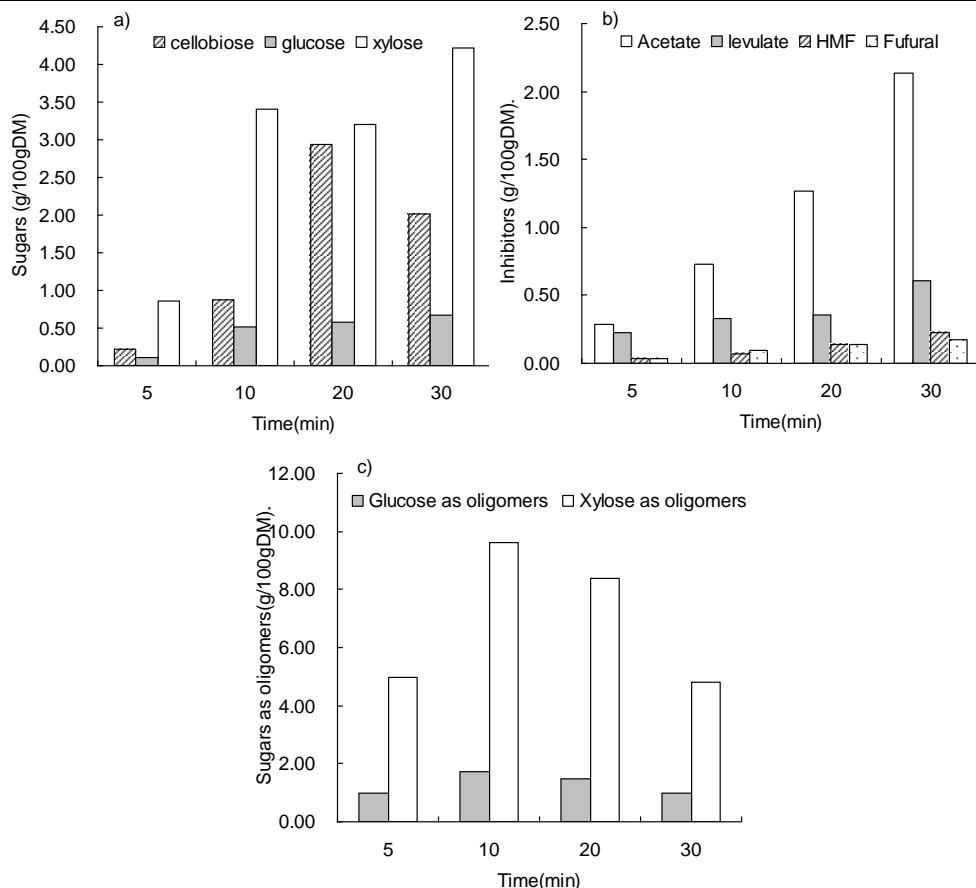


图 2.7 预处理时间对预处理液成分的影响 (单位: g/100gDM)

Fig. 2.7 Effect of pretreated time on the components of prehydrolysate (Unit: g/100gDM)

(3) 预处理时间对预处理物料酶水解情况的影响

图 2.8 为不同预处理时间下的预处理物料在纤维素酶的作用下水解 48h 的过程中葡萄糖、木糖和乙酸随时间的变化情况。

结果显示,随着预处理时间的增加水解 48h 后葡萄糖的浓度逐渐提高(图 2.8a),而且在相同时间段内随着时间的增加葡萄糖的增加量也是增加的,说明增加预处理时间利于纤维素的酶水解。而且葡萄糖的浓度随着水解时间的延长逐渐增加,但增加量逐渐降低,纤维素的酶水解主要发生在水解初期,主要原因也可能是纤维寡糖量较多,纤维素酶逐渐失活,产物抑制及无效吸附等原因引起。

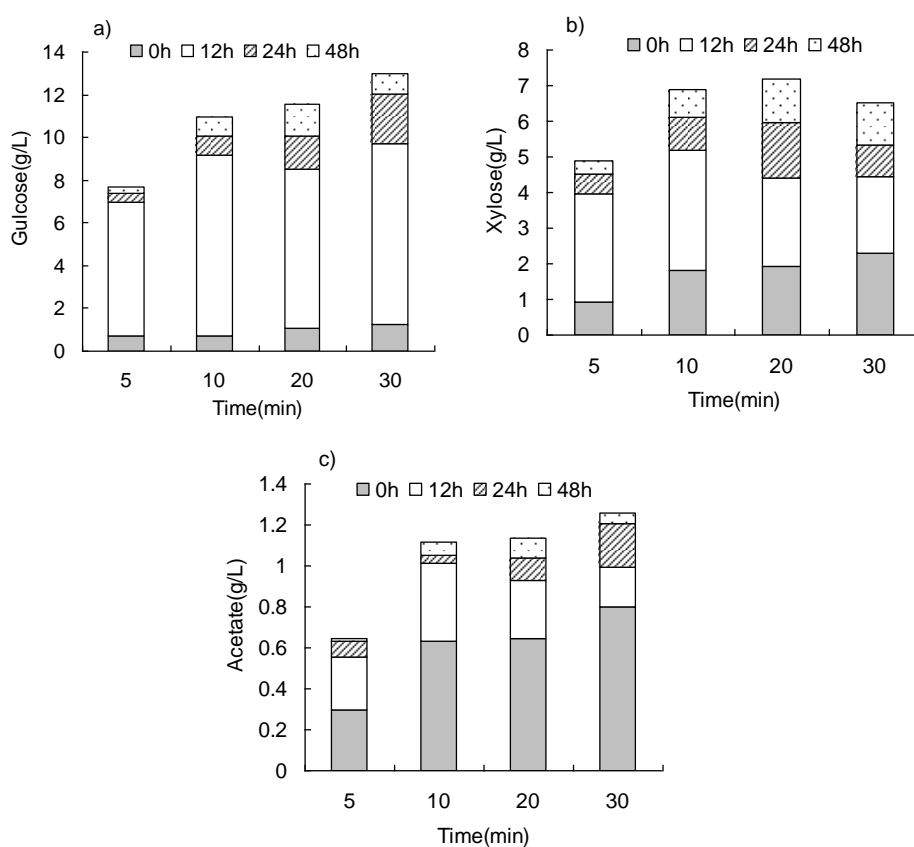


图 2.8 预处理时间对预处理物料酶水解(48h)情况的影响

Fig. 2.8 Effect of pretreated time on the enzymatic hydrolysis (48h) of pretreated slurry

图 2.8b 为在纤维素酶的作用下木糖的浓度随预处理时间和时间的变化情况,从图中可以看出,随着预处理时间的增加,水解 48h 后的木糖浓度逐渐升高,20min 条件下达到最大,但当预处理时间继续增加时木糖的浓度会降低,这主要是由于随着温度的升高半纤维素中的木聚糖水解程度增大更加利于酶水解,但时间过长时木糖降解速率会大大增加使得木糖的得率降低。与温度对酶水解的影响相似,而且在预处理时间较短时酶水解产生的木糖占较大比例,而在较长预处理时间下酶水解产生的木糖比例减少而预处理

过程中产生的木糖比例增大。

图 2.8c 为预处理物料酶水解过程中乙酸的变化情况，从图中可以看出，同样随着预处理时间的增加乙酸的浓度也逐渐升高，在预处理时间较短时酶水解产生的乙酸占较大比例，而在较长预处理时间下预处理过程中产生的乙酸比例增大。

总之，预处理时间也是影响生物质稀酸预处理的重要因素，预处理时间越长蒸汽用量和水量也越大，所得到的预处理原料在后续的酶水解阶段葡萄糖得率也越高，但太长的预处理时间会使单糖尤其是木糖的降解量增多从而提高了预处理液中的抑制物的浓度，也降低了木糖总得率。因此，在预处理过程中尽量缩短时间对节能节水、提高木糖得率和抑制物控制是很有必要的。

2.2.4 硫酸用量对稀酸预处理的影响

实验以玉米秸秆(吉林)为原料，在装量 400g(50%)、固液比 1:1.5、预处理时间 10min、预处理温度 180°C 的条件下考查了不同酸用量 (0.375-3%)对稀酸预处理的影响。

(1) 酸用量对预处理蒸汽和水用量及处理后固体和水不溶性固体含量的影响

不同酸用量下预处理蒸汽用量、水用量和固含量及水不溶性固体含量的结果见图 2.9。

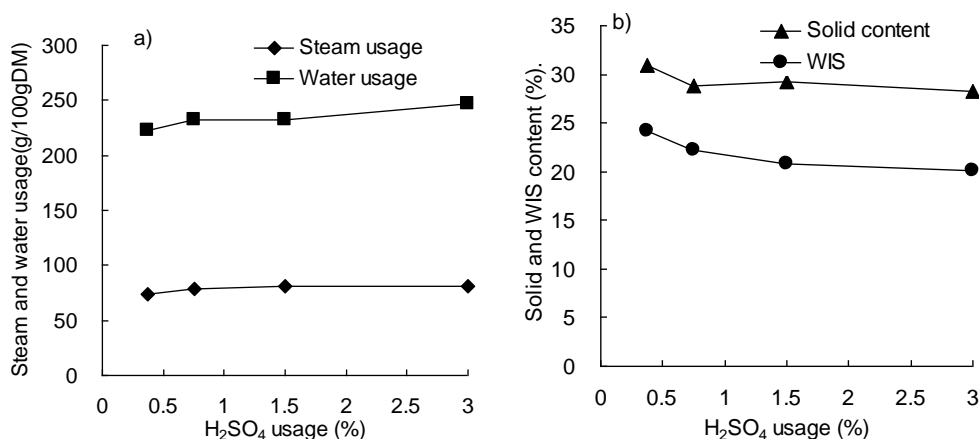


图 2.9 酸用量对预处理蒸汽和水用量(a), 处理后固体和水不溶性固体含量(b)的影响

Fig. 2.9 Effect of H₂SO₄ usage on the steam and water usage (a), solid and WIS content (b)

从图中可以看出，酸用量对预处理过程中消耗的蒸汽用量和水用量的影响很小(图 2.9a)，几乎没什么差别，同时预处理后物料中的总固体含量也并不大(图 2.9b)，但水不溶性固体的含量差别随着酸量的增加而降低，这是由于在较高的酸用量条件下产生的可溶性的组分增加的缘故(表 2.13)。因此在相同预处理时间和温度下对预处理过程中的能耗和水耗的影响不大。

(2) 酸用量对预处理液成分的影响

酸用量对预处理液成分的影响结果见表 2.13 及图 2.10。结果表明，在酸用量很低时(0.375%)预处理液中的葡萄糖、木糖、乙酸、羟甲基糠醛及糠醛等各种抑制物的浓度

和含量都很低,纤维寡糖和木寡糖的浓度也不高,且随着酸用量的增加到 0.75%时预处理液中的各种物质的浓度和总量增加也并不明显,只有木寡糖的量增加较多,直到酸用量增加到 1.5%时,纤维二糖、葡萄糖、木糖和寡糖的浓度才有较大的增加,酸量继续增加后(3%)葡萄糖和木糖量突然有很大增加,但寡糖的量降低(表 2.13, 图 2.10a c),预处理液中的糠醛和羟甲基糠醛含量随着酸量的增加也大大增加(表 2.13, 图 2.10b)。

表 2.13 酸用量对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 2.13 Effect of H₂SO₄ usage on the components of prehydrolysate (Unit: g/L)

H ₂ SO ₄ (%)	纤维二糖	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
0.375	0.04	0.10	0.30	0.36	0.27	0.02	0.02	1.14	4.63
0.75	0.10	0.10	0.51	0.53	0.24	0.04	0.05	1.49	6.66
1.50	0.87	0.51	3.41	0.73	0.33	0.07	0.09	1.72	9.63
3.00	0.88	1.41	11.69	1.06	0.36	0.17	0.28	1.25	2.26

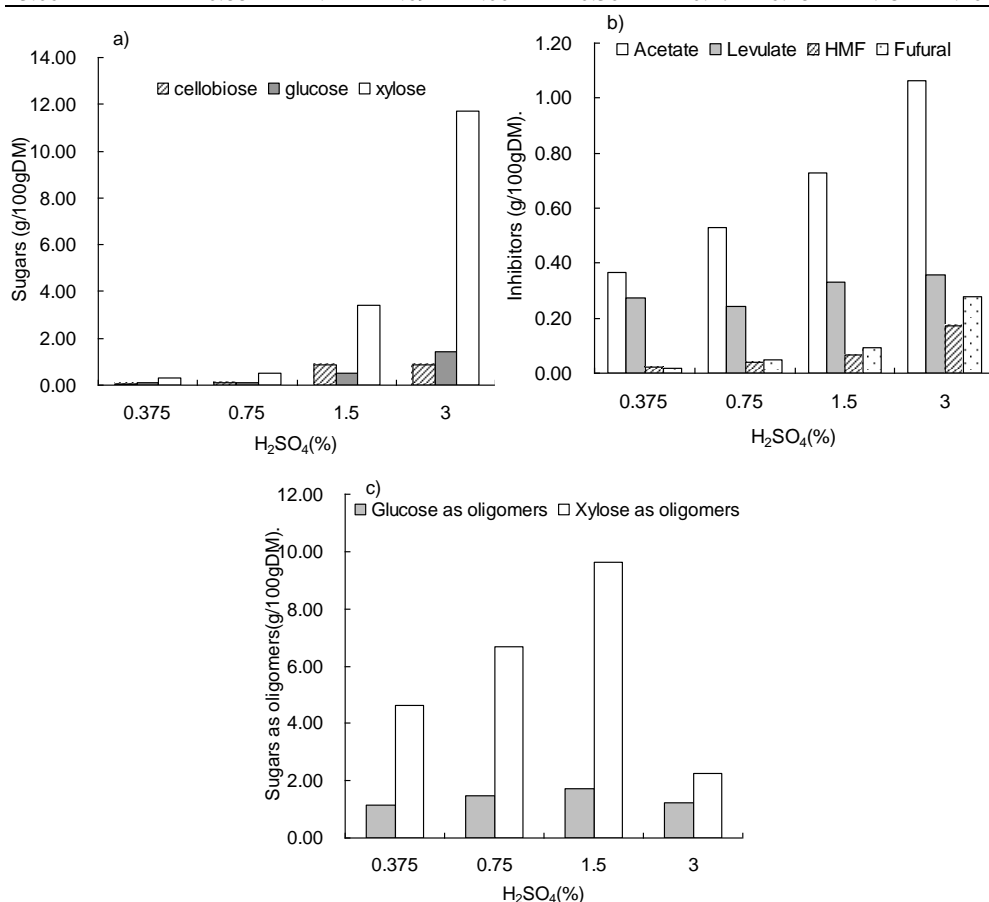


图 2.10 预处理时间对预处理液成分的影响 (单位: g/100gDM)

Fig. 2.10 Effect of H₂SO₄ usage on the components of prehydrolysate (Unit: g/100gDM)

葡萄糖和木糖及其降解产物随着酸量的增加呈现出“突跃”现象的原因是由于生物质秸秆具有一定的缓冲能力,即能够吸收一定量酸,只有当所加的酸量大于其缓冲量时

才对其具有较好的处理效果。因此，酸用量对预处理效果的影响很大。

(3) 酸用量对预处理物料酶水解情况的影响

图 2.11 为不同酸用量的预处理物料在纤维素酶的作用下水解 48h 的过程中葡萄糖，木糖和乙酸随时间的变化情况。从图中可以看出，同样随着酸用量的增加水解 48h 后葡萄糖的浓度逐渐提高(图 2.11a)，而且在相同时间段内随着酸用量的增加葡萄糖的增加量也是增加的，葡萄糖的浓度随着水解时间的延长增加量逐渐降低。木糖也呈现出与葡萄糖相似的变化规律(图 2.11b)，且在酸量较少时酶水解产生的木糖占较大比例，而在较高酸量下预处理过程中产生的木糖比例增大。

从图 2.11a 和 b 中还可以看出，水解 48h 后的葡萄糖和木糖的浓度随着酸量的增加在酸量超过 1.5% 时表现出突然增加的现象，这与预处理液中的成分变化规律相吻合，主要是由于生物质本身具有一定的缓冲能力。

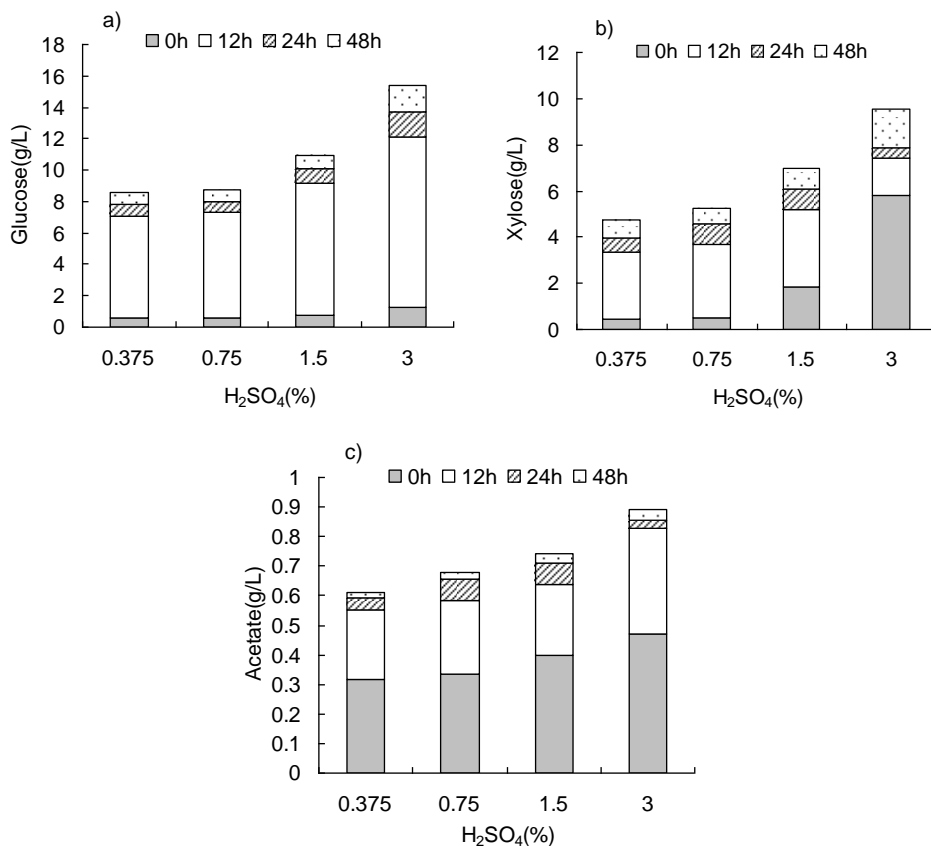


图 2.11 酸用量对预处理物料酶水解(48h)情况的影响

Fig. 2.11 Effect of H₂SO₄ usage on the enzymatic hydrolysis (48h) of pretreated slurry

图 2.11c 为预处理物料酶水解过程中乙酸的变化情况，从图中可以看出，同样随着酸量的增加乙酸的浓度也逐渐升高，在预处理时间较短时酶水解产生的乙酸占较大比例，而在较长预处理时间下预处理过程中产生的乙酸比例增大。

总之，酸量对蒸汽用量和水量的直接影响不大，但对于预处理效果影响十分显著。低酸量对物料的作用不大，只有酸量超过一定值时才表现出明显的预处理效果。葡萄糖和抑制物的量会随着酸量的增加而增加，酶解后的总糖得率也会升高，但酸量太高时木糖降解速率会大大增加，不但降低了木糖得率同时增加了抑制物的含量。因此，预处理时必须选择合适的酸量。

删除的内容: 巨大

删除的内容: ,

删除的内容: 生物质缓冲量

2.2.5 蒸汽压力对稀酸预处理的影响

实验以玉米秸秆(吉林)为原料，在装量为 800g(100%)、固液比 2:1、预处理时间为 3min、预处理温度为 190°C、酸用量为 2.5% 的条件下考查了所通入蒸汽压力对稀酸预处理的影响。

(1) 蒸汽压力对预处理蒸汽、水用量及处理后固体和水不溶性固体含量的影响

不同蒸汽压力下预处理的蒸汽用量、水用量和固含量及水不溶性固体含量的结果见图 2.12。

从图中可以看出，所通蒸汽压力对预处理用水量和蒸汽用量影响并不明显，不同蒸汽压力下预处理水量和蒸汽用量相差不大(图 2.12a)，同时预处理后物料的固体含量差别也不明显，但水不溶性固体的含量随蒸汽压力的提高略有降低(图 2.12b)，这是由于在消耗同样多的蒸汽用量的条件下，高压蒸汽所蕴涵的热量更高，对生物质的作用会更强，使可溶性物质的含量增加，表现为物料中水不溶性固体(WIS)随蒸汽压力的升高而略有降低。但获得高压蒸汽的能耗更大，对设备要求也更高，因此降低蒸汽压力对降低预处理阶段的成本是非常有利的。

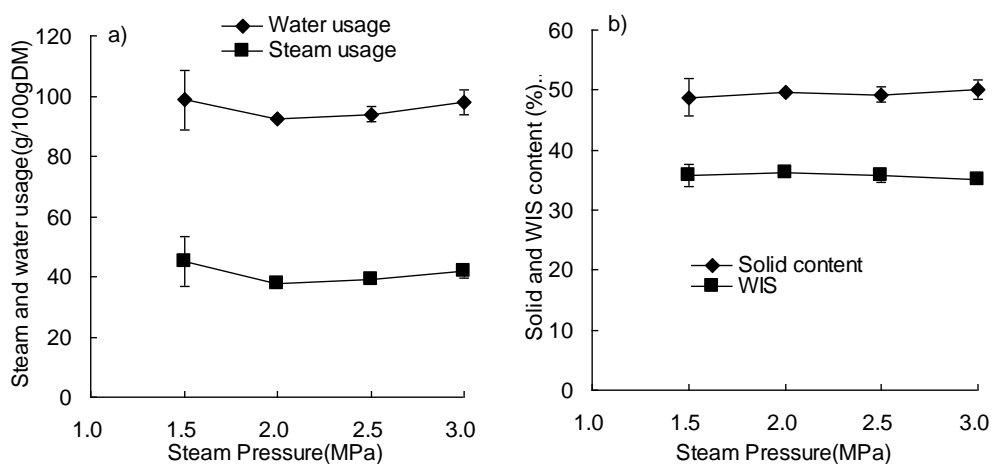


图 2.12 蒸汽压力对预处理蒸汽和水用量(a)、处理后固体和水不溶性固体含量(b)的影响

Fig. 2.12 Effect of steam pressure on the steam and water usage (a), solid and WIS content (b)

(2) 蒸汽压力对预处理液成分的影响

蒸汽压力对预处理物料中液相成分的影响结果见表 13(a, b)，其中表 13a 为以其在液体里浓度表示的结果(单位: g/L)，表 13b 为以其占处理后干固体质量表示的结果(单位: g/100gDM)。从表中可以看出，随着蒸汽压力的增加预处理液中的葡萄糖，木糖及

其降解产物和乙酸等抑制物浓度和含量压逐渐增加，同时预处理液中的纤维寡糖和木寡糖随压力升高而减少。

表 13a 蒸汽压力对预处理液成分的影响 (单位: g/L)

Table 13a Effect of steam pressure on the components of prhydrolysate (Unit: g/L)

蒸汽压力 (MPa)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	羟甲基糠醛 (g/L)	糠醛 (g/L)	纤维寡糖 (g/L)	木寡糖 (g/L)
1.5	8.89	48.2	7.22	2.18	2.96	5.59	20.28	61.6
2.0	11.5	57.6	7.74	2.87	3.01	6.68	18.16	60.9
2.5	10.8	58.0	8.68	1.21	3.68	7.19	19.02	56.1
3.0	14.6	75.5	11.21	3.33	3.46	7.65	14.18	41.2

表 13b 蒸汽压力对预处理液成分的影响 (单位: g/100gDM)

Table 13b Effect of steam pressure on the components of prhydrolysate (Unit: g/100gDM)

蒸汽压力 (MPa)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	羟甲基糠醛 (g/L)	糠醛 (g/L)	纤维寡糖 (g/L)	木寡糖 (g/L)
1.5	0.94	5.08	0.76	0.22	0.31	0.61	2.13	6.49
2.0	1.16	5.86	0.79	0.29	0.31	0.68	1.85	6.20
2.5	1.11	5.97	0.89	0.13	0.38	0.74	2.01	5.88
3.0	1.57	8.13	1.20	0.35	0.37	0.82	1.52	4.43

(3) 蒸汽压力对预处理物料酶水解情况的影响

不同蒸汽压力下预处理物料经纤维素酶水解情况如图 2.13，从图中可以看出经纤维素酶水解以后，葡萄糖和木糖浓度随着蒸汽压力的升高虽略有增加，但相差不明显，说明在实验预处理条件下，较高的蒸汽压力虽对生物质的破坏程度会更大但差别不显著，这可能主要预处理条件(温度、时间和酸量)有关。

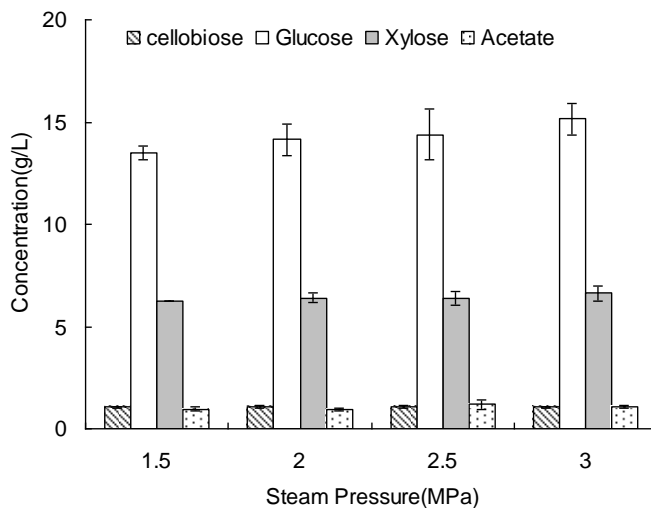


图 2.13 蒸汽压力对预处理物料酶水解(72h)情况的影响

Fig. 2.13 Effect of steam pressure on the enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry

总之，蒸汽压力对蒸汽量和水量略有影响，降低蒸汽压力物料固体含量会略降低，但低压蒸汽更利于节能。随着蒸汽压力的降低，预处理液中的糖和抑制物也略有降低，

酶水解效果也略有降低,但都在可接受范围内,因此从节能降耗角度考虑,适当降低所用蒸汽压力对降低预处理成本是很有利的。

2.2.6 最佳预处理条件的确定

2.2.6.1 50%装量下最佳预处理条件的确定

实验中以玉米秸秆(吉林)为原料、在蒸汽压力为 3.0MPa、固液比为 2:1 的条件下,中心组合实验设计法(CCD)设计了 15 个条件实验(表 2.3、2.4)对预处理温度、间和硫酸用量三个因素进行预处理条件的优化。

(1) 50%装量各预处理条件下蒸汽和水用量及固含量结果

各处理条件下蒸汽用量、水用量和预处理后物料的固体含量及水不溶性固体含量结果见表 2.14 和图 2.14。

表 2.14 50%装量各预处理条件下蒸汽和水用量及固含量结果

Table 2.14 Results of steam and water usage, solid and WIS content at feedstock loading of 50% under different conditions

序号 Run	预处理条件	蒸汽用量 (g/100gDM)	水用量 (g/100gDM)	固含量(%)	水不溶性固体(WIS)	
					WIS (%)	WIS/DM (%)
1	180°C;3min;1%	70.7	124.0	43.0	33.1	77.0
2	180°C;3min;4%	73.2	124.4	40.6	28.4	69.9
3	200°C;3min;1%	88.0	147.1	40.1	28.8	71.9
4	200°C;3min;4%	86.1	143.1	36.3	26.4	72.7
5	180°C;9min;1%	92.2	149.6	38.9	29.8	76.7
6	180°C;9min;4%	87.3	140.7	37.2	27.0	72.7
7	200°C;9min;1%	122.2	188.7	32.9	26.0	79.1
8	200°C;9min;4%	111.4	180.5	31.3	22.1	70.7
9	190°C;6min;1%	92.4	153.7	38.3	27.7	72.3
10	190°C;6min;4%	85.6	146.4	36.7	26.2	71.5
11	180°C;6min;2.5%	81.3	130.7	40.9	29.1	71.2
12	200°C;6min;2.5%	107.2	177.9	33.2	27.2	81.9
13	190°C;3min;2.5%	91.9	146.1	37.7	28.8	71.2
14	190°C;6min;2.5%	87.6	147.8	37.5	27.6	73.3
15	190°C;9min;2.5%	107.6	176.5	34.6	27.4	80.5

从结果中可以看出,在相同的预处理温度和时间下,温度较低时间较短时不同的酸量下蒸汽用量和水用量差别并不大(如实验 1 和 2),说明酸量对用水量 and 蒸汽用量影响不大(见本章 2.2.3),但在温度较高或时间较长时酸量较高时的蒸汽用量和水量比酸量较低时偏低(如 3 和 4, 5 和 6, 7 和 8, 9 和 10),同时对应处理后物料的固体含量也随酸量提高而降低,这是由于在较高酸浓度下尤其是在温度较高时间较长的条件下,产生的挥发性组分含量较高从使得质量损失较多,而用水量和蒸汽用量的测定是通过预处理后的总质量与处理前的质量作差求得的(见用水量和蒸汽用量测定方法),固含量的测定是通过烘干测得的从而损失了挥发性组分。但水不溶性固体含量在酸量越高的条件下其含量越低,且时间越长温度越高其含量越低,对应水不溶性固体占总干固体的含量(WIS/DM)也越低,这是由于预处理强度越高产生的可溶性物质越多的缘故。

在相同的预处理温度和酸用量时，延长预处理时间蒸汽用量和水量会增加(表 2.14 和图 2.14 a)，如实验 1 和 5，2 和 6，3 和 7，4 和 8，13-15 等，相应的固含量及水不溶性固体含量也会降低(表 2.14 和图 2.14b)，结果同本章 2.2.2。

在相同的预处理时间和酸量条件下，提高预处理温度蒸汽用量和水量也会增加(表 2.14 和图 2.14a)，固含量及水不溶性固体含量也会降低，如实验，1 和 3，2 和 4，5 和 7，6 和 8，11、12 和 14 等(表 2.14 和图 2.14b)，结果同本章 2.2.4。因此，温度和时间对蒸汽用量和水量的影响较大。

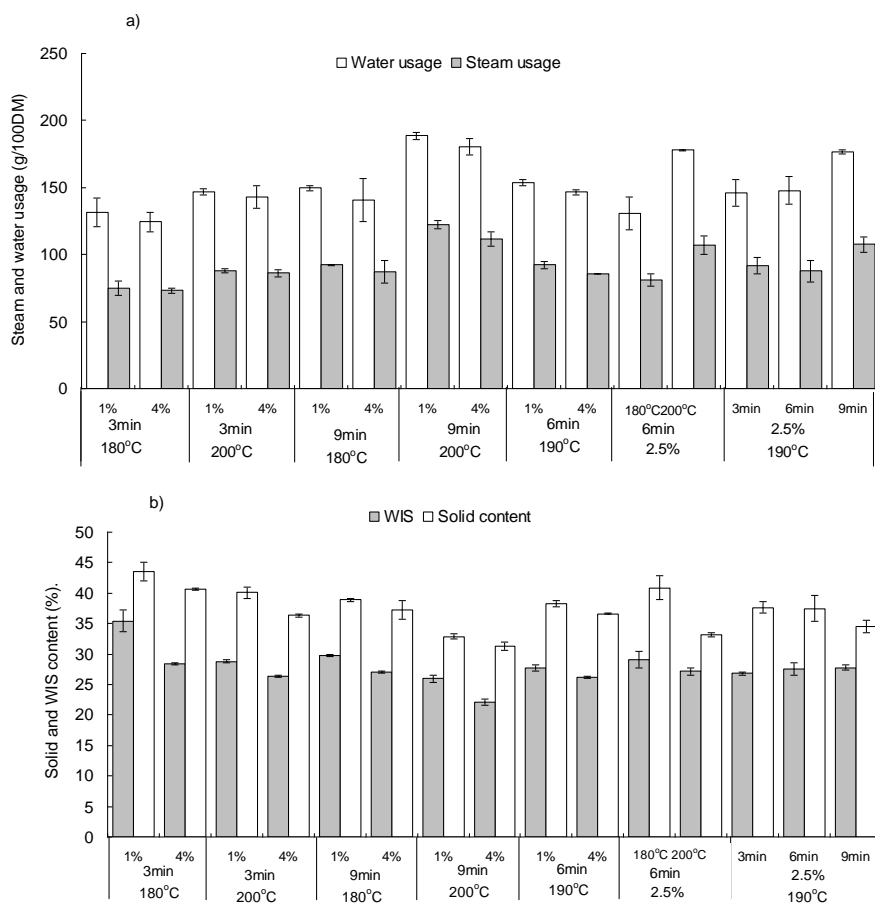


图 2.14 50%装量各预处理条件下蒸汽和水用量及固含量结果

Fig. 2.14 Results of steam and water usage, solid and WIS content at feedstock loading of 50% under different conditions

(2) 50%装量各预处理条件下预处理液中成分

各预处理条件下预处理物料中液相成分含量见表 2.15 和图 2.15，其中表 20 为以各物质在液体中的浓度表示结果(单位：g/L)，图 2.15 为以各物质占处理后干固体质量百分比表示结果(单位：g/100gDM)。

从结果中可以看出，在相同预处理温度和时间下，温度较低时间较短时，酸量增加预处理液中的葡萄糖和木糖浓度和含量会大大提高(表 2.15，图 2.15a)，乙酸和糠醛等抑

制物也越高(表 2.15,图 2.15 b), 但寡糖含量和浓度则随酸量升高迅速而降低(表 2.15,图 2.15c), 如实验 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6, 9、10 和 14; 而在较高温度较长时间时, 酸量越高葡萄糖的浓度和含量越高, 而木糖则随酸量增加而减少, 同时乙酸和糠醛等抑制物也随酸量增加而大大增加(表 2.15, 图 2.15b), 但寡糖含量和浓度则随酸量升高而降低(表 2.15, 图 2.15c), 如实验 7 和 8, 说明预处理强度越大越利于葡萄糖释放, 但单糖尤其是木糖降解加快, 不利于提高木糖得率和控制抑制物含量。

表 2.15 50%装量各预处理条件下预处理液中成分 (单位:g/L)

Table 2.15 Components of prehydrolysate at feedstock loading of 50% at different conditions (Unit: g/L)

序号	预处理条件	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
1	180°C; 3min;1%	0.47	4.32	1.88	2.75	0.22	0.49	14.5	67.8
2	180°C; 3min;4%	21.0	81.1	11.3	3.68	1.90	4.85	5.40	14.1
3	200°C; 3min;1%	3.30	23.7	5.88	3.36	0.73	2.36	15.6	72.4
4	200°C; 3min;4%	37.8	37.4	15.4	4.22	5.66	6.60	7.04	3.35
5	180°C; 9min;1%	0.45	7.9	3.08	5.31	0.41	0.61	15.1	72.6
6	180°C; 9min;4%	24.8	49.5	14.7	4.56	3.06	5.74	3.70	6.12
7	200°C; 9min;1%	4.14	20.6	9.12	2.16	1.68	3.06	7.97	26.7
8	200°C; 9min;4%	30.2	12.7	14.2	5.41	6.71	2.69	5.63	2.90
9	190°C; 6min;1%	2.83	17.0	4.42	2.69	0.46	1.12	12.9	72.3
10	190°C; 6min;4%	29.2	43.2	15.1	4.15	3.75	3.86	6.34	3.86
11	180°C; 6min;2.5%	10.9	57.7	7.69	2.04	2.24	4.22	3.06	4.04
12	200°C; 6min;2.5%	10.3	20.6	13.3	4.46	5.26	4.31	9.72	28.5
13	190°C; 3min;2.5%	10.0	49.3	8.27	6.44	1.98	3.97	5.06	18.6
14	190°C; 6min;2.5%	10.5	46.0	10.3	2.10	3.00	4.27	4.17	5.52
15	190°C; 9min;2.5%	13.0	33.4	13.8	4.35	5.20	4.59	2.71	3.49

在相同的预处理温度和酸用量下, 温度和酸量都很低时(180°C、1%), 增加处理时间预处理液中的葡萄糖和木糖浓度和含量会提高(表 2.15, 图 2.15), 乙酸和糠醛等抑制物也越高(表 2.15, 图 2.15b), 寡糖含量和浓度则随时间增加也有所增加(表 2.15, 图 2.15c), 见实验 1 和 5; 在较低温度较高酸量(180°C、4%)或较高温度较低酸量(200°C、1%)及中等温度和酸量(190°C、2.5%)时, 延长时间葡萄糖的浓度和含量增加, 而木糖则随时间增加而减少, 同时乙酸和糠醛等抑制物也随时间增加而增加(表 2.15, 图 2.15 b), 但寡糖含量和浓度则随酸量升高而降低(表 2.15, 图 2.15 c), 见实验 2 和 6, 3 和 7, 13-15; 在温度和酸量都很高(200°C, 4%)时, 葡萄糖量虽然较高且木糖量较低且都随时间增加而降低, 寡糖的含量也很少同时随时间增加而降低(表 2.15, 图 2.15 c), 抑制物含量则很高且随时间增加而大大增加(表 2.15, 图 2.15 b), 见实验 4 和 8。

在相同的预处理时间和酸量下, 当酸量较低(1%)时提高预处理温度预处理液中的葡萄糖和木糖浓度和含量会提高(表 2.15, 图 2.15a), 乙酸和糠醛等抑制物会有较大增加(表 2.15, 图 2.15b), 寡糖含量和浓度则随之也有所增加(表 2.15, 图 2.15 c), 见实验 1 和 3, 5 和 7; 而将酸量提高到 2.5% 和 4% 时, 预处理液中的葡萄糖浓度较高, 且随着温度的提高而增加, 木糖的含量也很高但随温度的提高而大大降低(表 2.15, 图 2.15 a), 寡糖的量

较低且随温度提高而减少(表 2.15, 图 2.15 c), 抑制物的量也很高且随温度提高有较多增加(表 2.15, 图 2.15b), 见实验 2 和 4, 6 和 8, 11、12 和 14。

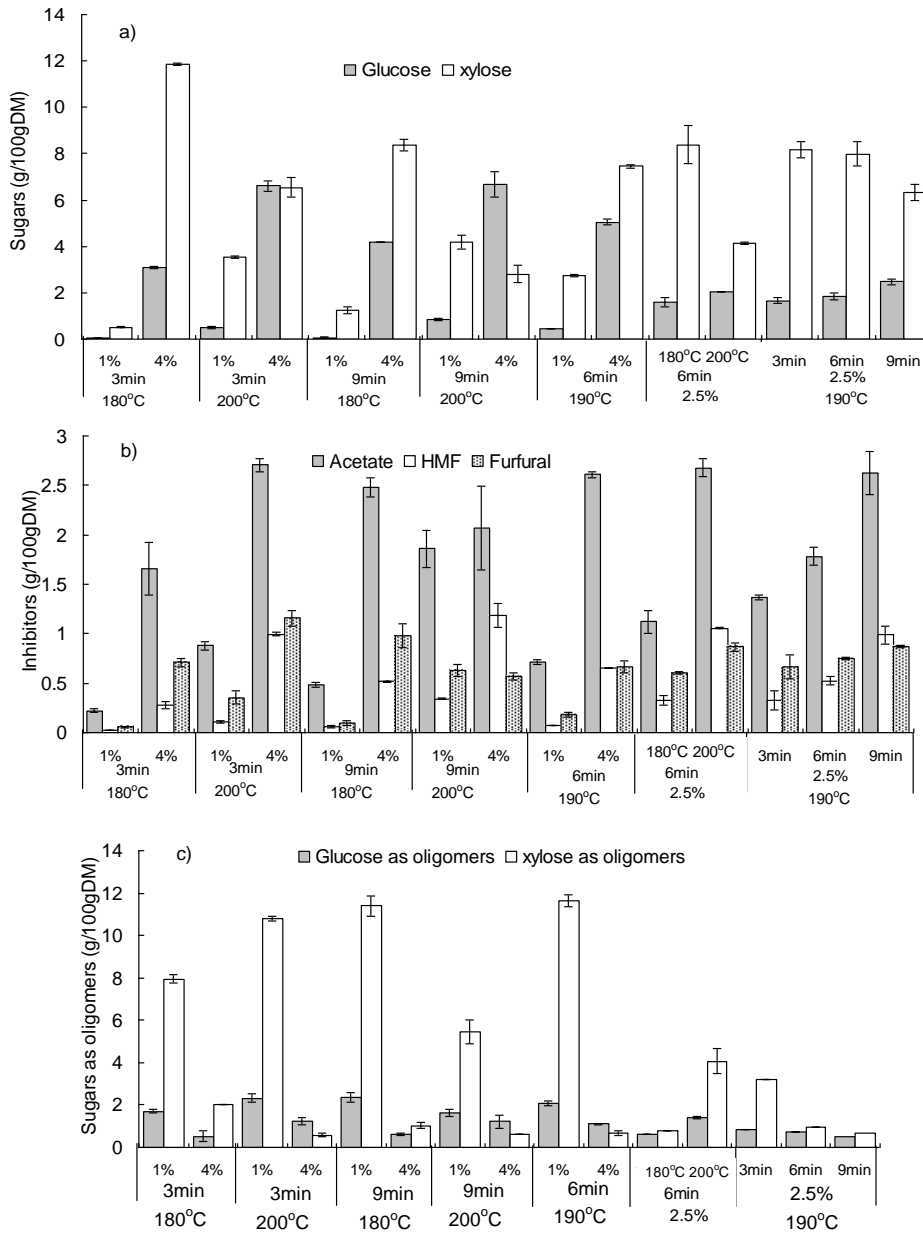


图 2.15 50%装量各预处理条件下预处理液中成分 (单位:g/100gDM)

Fig. 2.15 Components of prehydrolysate at feedstock loading of 50% under different conditions (Unit: g/100gDM)

综合预处理温度、时间和酸量可以看出, 提高酸量对预处理液中的成分含量改变影响最大, 在温度较低时间较短的条件下更明显, 其次为温度的影响, 预处理时间对预处理液成分的影响相对较小。表 2.16 为用 Design Expert version 7.1.6 中的方差分析(ANOVA)

所得到的温度、时间和酸量对预处理液中成分影响显著性结果，从表中可以看出，三个因素的显著性大小依次为酸量，温度和时间。

表 2.16 50%装量下各因素对预处理液中成分影响显著性分析(p 值)

Table 2.16 Effect significance of acid usage, temperature and time on prehydrolyaste (p-value)

	葡萄糖	木糖	乙酸	羟甲基糠醛	糠醛
酸量(%)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
温度(°C)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0263
时间(min)	0.0618	0.0061	0.0029	0.0006	0.6228

(3) 50%装量各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量

各预处理条件下所得物料中纤维素和半纤维素占其干重和水不溶性固体的百分含量如表 2.17 和图 2.16。

表 2.17 50%装量各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量

Table 2.17 Cellulose and Hemicellulose content of pretreated corn stover (dry material) and WIS at pretreating feedstock loading of 50%

序号	预处理条件	纤维素含量(%)		半纤维素含量(%)	
		g/100gWIS	g/100g DM	g/100g WIS	g/100g DM
1	180°C;3min;1%	43.6	34.8	18.2	15.58
2	180°C;3min;4%	55.9	39.1	0.57	0.40
3	200°C;3min;1%	49.2	35.4	7.63	5.48
4	200°C;3min;4%	45.2	32.8	1.23	0.90
5	180°C;9min;1%	46.0	35.3	15.3	11.7
6	180°C;9min;4%	50.3	36.6	0.20	0.15
7	200°C;9min;1%	50.3	39.8	3.97	3.14
8	200°C;9min;4%	41.2	29.6	0.88	0.62
9	190°C;6min;1%	46.1	33.3	9.34	6.75
10	190°C;6min;4%	47.8	34.2	1.64	1.17
11	180°C;6min;2.5%	50.0	35.6	5.96	4.24
12	200°C;6min;2.5%	47.4	38.8	1.95	1.60
13	190°C;3min;2.5%	51.4	36.6	4.48	3.19
14	190°C;6min;2.5%	50.3	37.0	3.85	2.84
15	190°C;9min;2.5%	47.5	38.3	2.65	2.13

从结果中可以看出，除了在高温高酸量(200°C、4%)条件下所得的物料中的纤维素含量低于原始秸秆中的含量(34.1%)外，其它条件下所得的物料纤维素含量都高于原秸秆，但半纤维素的含量都大大低于原秸秆(24.6%)，且在较强的预处理条件下几乎接近零(表 2.17, 图 2.16 a)，同时处理后的水不溶性固体(WIS)中的纤维素都远远高于原始秸秆，半纤维素含量也大大低于原秸秆(表 2.17, 图 2.16b)。这是由于稀酸预处理主要作用于半纤维素使其水解，因此作为半纤维素主要成分的半纤维素含量在处理会大大降低。

在相同预处理温度和时间下(表 2.17, 图 2.16)，温度较低(180°C)时低酸量(1%)条件下的预处理物料中的纤维素含量比原秸秆只有很少增加，同时半纤维素的含量也只有少量减少(实验 1、5)，当酸量升高到 4%时纤维素含量会大大提高，同时半纤维素的含量几乎接近零(实验 2、6)，这是由于半纤维素大量水解而纤维素只有很少量水解的缘故；在

温度较高(200°C)时,低酸量(1%)条件下的预处理物料中的纤维素含量比原秸秆高,半纤维素的含量比原秸秆有较大降低(实验 3、7),但当酸量升高到 4%时纤维素含量反而比原秸秆降低,同时半纤维素的含量也几乎接近零(实验 4、8),这是由于纤维素也有较大量水解的缘故;在中等温度和时间(190°C、6min)下,纤维素含量随着酸量的增加先升后降,而半纤维素含量逐渐降低(实验 9、10、14)。

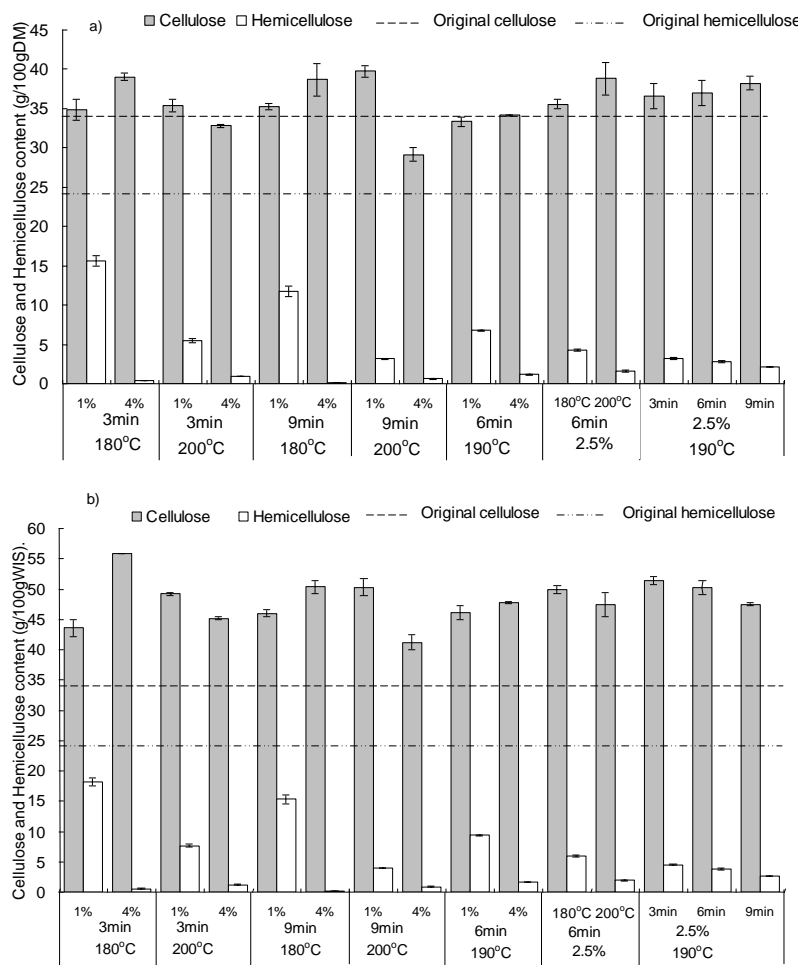


图 2.16 50%装量各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量

Fig. 2.16 Cellulose and Hemicellulose content of pretreated corn stover (dry material, a) and WIS (b) at pretreating feedstock loading of 50%

在相同的预处理温度和酸用量下(表 2.17, 图 2.16),酸量较低 (1%)时,纤维素含量随处理时间的增加而提高,且温度越高提高幅度越大,半纤维素含量随时间延长而降低,见实验 1 和 5、3 和 7,中等温度和酸量下与之相似,但增加幅度较小,见实验 13-15,这是由于半纤维素在较长预处理条件下水解量大于纤维素所致;在酸量较高 (4%)时,延长预处理时间纤维素含量降低,且温度越高纤维素含量降低的越多,见实验 2 和 6、4 和 8,说明酸量较高时纤维素也有大量的水解。

在相同的预处理时间和酸量下(表 2.17, 图 2.16), 在酸量较低(1%)下, 预处理时间较短(3min)时提高预处理温度纤维素含量略有增加, 半纤维素含量也略有减少(实验 1 和 3), 而预处理时间较长(1%、9min)时提高温度纤维素含量则有较大提高, 半纤维素含量也有较大降低(实验 5 和 7), 这和中等酸量和时间(2.5%、6min)下相似(实验 11、12、14); 在较高酸量(4%)下, 纤维素含量随温度的提高而减少, 半纤维素含量几乎为零(实验 2 和 4, 6 和 8)。

综合预处理温度、时间和酸量可以看出, 提高酸量对预处理后物料中的纤维素和半纤维素含量影响最大, 其次为温度和预处理时间。

(4) 50%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

各预处理条件下预处理物料经纤维素酶水解 72h 后葡萄糖, 木糖及乙酸等浓度和得率结果如表 2.18 和图 2.17 所示, 其中图 2.17 给出了预处理和纤维素酶水解所产生的葡萄糖和木糖分别占干秸秆的比例。从中可以看出, 预处理后的物料经过纤维素酶催化水解后, 葡萄糖的产生主要在酶水解阶段(图 2.17a), 而木糖主要在预处理阶段产生(图 2.17b), 说明稀酸预处理主要使生物质中的半纤维素水解, 同时破坏纤维素的晶体结构, 增加纤维素对纤维素酶的接近度, 从而在酶水解过程中产生较多的葡萄糖。

表 2.18 50%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

Table 2.18 Results of enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry at feedstock loading of 50% under different pretreatment conditions

序号	预处理条件	纤维二糖 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率 Sugar yields (%)	
							葡萄糖	木糖
1	180°C;3min;1%	0.89	8.03	5.40	0.71	0.90	40.3	38.5
2	180°C;3min;4%	0.00	17.4	7.81	1.22	0.41	87.1	55.6
3	200°C;3min;1%	1.37	14.7	8.75	1.36	0.51	73.9	62.4
4	200°C;3min;4%	0.60	18.5	4.08	1.33	0.33	92.7	29.1
5	180°C;9min;1%	1.29	10.0	7.18	0.95	1.09	50.1	51.2
6	180°C;9min;4%	0.00	19.9	6.24	1.39	0.79	100.0	44.5
7	200°C;9min;1%	1.30	19.8	5.33	1.75	0.62	99.4	38.0
8	200°C;9min;4%	0.55	18.8	2.54	1.44	1.39	94.6	18.1
9	190°C;6min;1%	1.36	12.0	8.20	1.24	0.85	60.4	58.4
10	190°C;6min;4%	0.65	18.9	5.25	1.32	0.76	95.2	37.4
11	180°C;6min;2.5%	1.33	15.6	7.84	1.15	1.08	78.4	55.9
12	200°C;6min;2.5%	0.77	21.2	3.54	1.44	1.08	106.5	25.2
13	190°C;3min;2.5%	1.31	17.8	7.81	1.27	0.99	89.3	55.7
14	190°C;6min;2.5%	1.12	19.0	6.78	1.33	1.20	98.4	48.3
15	190°C;9min;2.5%	0.91	19.6	4.62	1.36	0.72	95.3	32.9

从结果中还可以看出, 在相同的温度和时间下(表 2.18 和图 2.17), 葡萄糖的浓度和得率且温度越低时间越短其增加幅度越大(实验 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6, 图 2.17a), 但在温度较高时间较长时提高酸量葡萄糖的浓度和得率反而降低(实验 7 和 8, 9、10 和 14), 这可能是由于预处理强度太高, 预处理过程中产生的葡萄糖有较多的降解生成了较多的抑制物, 降低了纤维素的含量(表 2.17), 同时较多的抑制物对纤维素酶的抑制程度也更

大。而在相同的温度和时间下,木糖的浓度和得率则除在温度较低时间较短(180°C、3min)时随着酸量的增加而增加外,在其它条件下随酸量的增加而大大降低(表 2.18, 图 17b),说明酸量对木糖的得率影响非常大。

在相同的温度和酸量下(表 2.18 和图 2.17),当温度较低或酸量较低时延长处理时间葡萄糖的浓度和得率会随之提高(实验 1 和 5, 2 和 6, 3 和 7),但当温度或酸量较高时,葡萄糖得率虽有增加但增加量很小(实验 4 和 8, 13-15),而木糖的浓度和得率则除在温度和酸量都低时 (180°C、1%)随着时间的延长而增加外,在其它条件下都随时间延长而降低(表 2.18, 图 2.17b)。

在相同的预处理时间和酸量下(表 2.18, 图 2.17),在酸量和时间不是太高的条件下,提高预处理温度葡萄糖的浓度和得率会随之提高(实验 1 和 3, 2 和 4, 5 和 7, 11、12、14),而预处理时间较长温度较高时,提高温度葡萄糖的得率则会降低(实验 6 和 8),而木糖的浓度和得率则除在时间和酸量都低时(3min、1%)随着温度的提高而增加外,在其它条件下都随温度的提高而降低(表 2.18, 图 2.17b)。

在酶水解后溶液中的乙酸的量比预处理液中都有所增加(见 2.2.2, 2.2.3 和 2.2.4),其含量也随预处理强度的增加而增加。

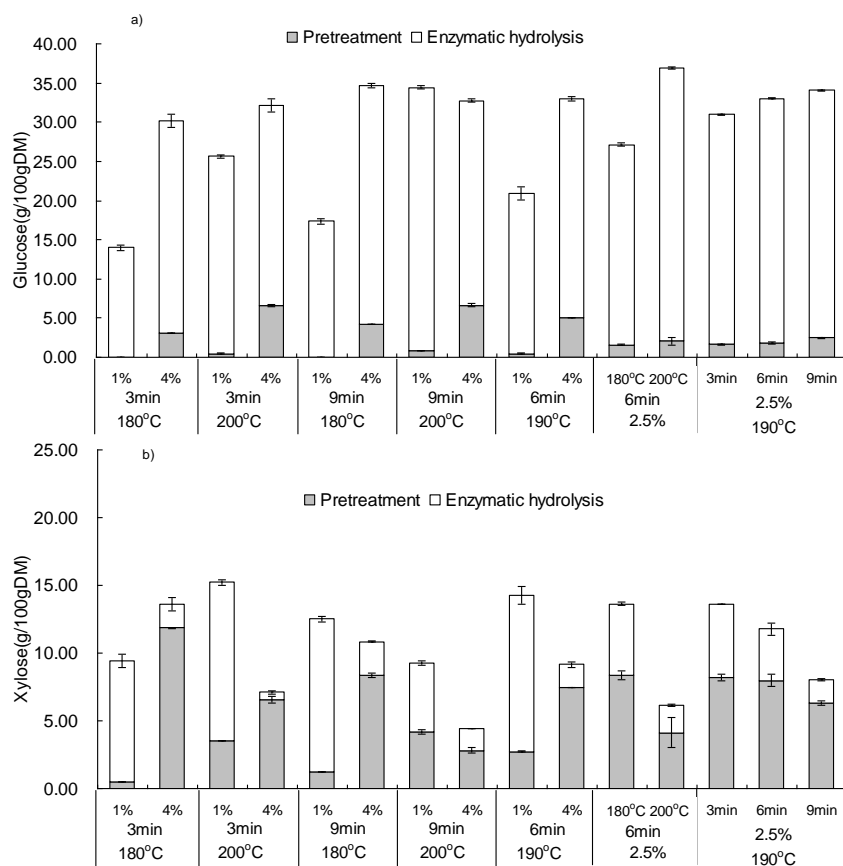


图 2.17 50%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

Fig. 2.17 Results of enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry at feedstock loading of 50% under different pretreatment conditions

(5) 50%装量各预处理条件下预处理物料酶水解后葡萄糖得率响应面分析

利用 Design Expert 7.1.6 软件以酶水解后葡萄糖得率为响应值对中心组合设计(CCD)的条件实验进行响应面分析(图 2.18), 并回归得到的二次三参数模型方程为如下:

以编码值表示为:

$$\text{Glucose\%} = 93.94 + 14.54A + 11.11B + 5.91C - 10.35AB - 2.56AC - 14.58A^2 \quad (2-9)$$

其中A为酸量, B为温度, C为时间

实验值 R^2 和预测值 R^2 分别为: 0.9713 和 0.8408

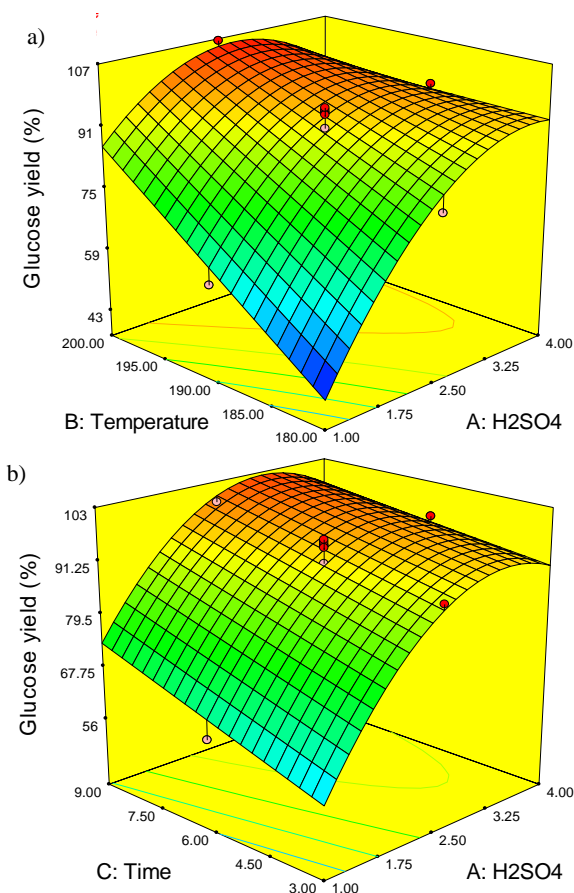


图 2.18 各预处理因素对葡萄糖总得率响应面分析结果

Fig. 2.18 Response surface analysis of pretreatment factors on glucose total yield

从上面的方程和图 2.18 中可以看出, 酸量、温度及时间对葡萄糖的得率影响都非常显著, 其中酸量影响最大, 其次为温度和时间, 酸量和温度的交互作用及酸量和时间的交互作用对葡萄糖得率的影响也很显著。从图 2.18 中还可以看出, 葡萄糖得率的最高温度, 最长时间和中等酸量的条件下, 说明要得到较高的葡萄糖得率需要非常高的预处理强度, 然而此时的抑制物会大大增加。

响应面分析中，以木糖得率为响应值进行分析，结果显示预测值和实验值相差非常大，难以得到较好的预测模型，故本文中并没有给出，这可能是由有实验中所设计的实验水平与木糖得率最优偏离较大的缘故，但这也再次说明半纤维素水解的最佳条件和纤维素水解的最佳条件的差别，而且实验中我们最关心的也是葡萄糖的得率。

综上所述，预处理温度和时间是影响预处理蒸汽用量、水用量和固体含量的主要因素，而酸量对水量和蒸汽用量影响不大，降低能耗和水耗就要尽量降低预处理温度缩短预处理时间。酸量对预处理效率（表现为在后续酶水解的单糖收率）影响最大，适当提高酸量可以在达到相同预处理效率的前提下降低预处理温度和时间，从而对节能是**有利**，预处理温度和时间对预处理效率的影响则次之。综合考虑，**太高的酸量会加快葡萄糖和木糖的降解同时产生较高的抑制物，对总糖得率和抑制物控制不利，太低的温度会影响酶水解，所以综合考虑我们选定 190°C、3min、2.5%为装量 50%时的最佳预处理条件。**

2.2.6.2 100%装量最佳预处理条件的确定

在 100%装量条件下，实验中以 50%装量为参考通过适当调整预处理温度时间和酸量的方法考查了预处理的规律并确定了最佳的预处理条件，其中实验 1-4 为适当延长预处理时间同时降低酸量时的预处理结果，实验 5 和 6 为提高温度并降低酸量的结果，实验 7-10 为适当调整酸量的结果。

(1) 100%装量各预处理条件下蒸汽和水用量及处理后物料固体含量

表 2.19 为各预处理条件下蒸汽用量和水用量及预处理后固体含量结果，从中可以看出，延长预处理时间或提高预处理温度蒸汽用量和水用量会增加，同时固含量也会降低，酸量对蒸汽和水用量的影响不大，但水不溶性固体含量会随酸量的增加而降低。从结果中还可以看出，100%装量下的平均蒸汽和水用量比 50%装量下要低，同时固体含量要高的多，说明反应器本身消耗的蒸汽远远大于生物质(见 2.2.7)。

表 2.19 100%装量各预处理条件下蒸汽和水用量及固含量结果

Table 2.19 Results of steam and water usage, solid and WIS content at feedstock loading of 100% under different conditions

序号	预处理条件	蒸汽用量 (g/100gDM)	水用量 (g/100gDM)	固体含量 (%)	水不溶性固体(WIS)	
					WIS (%)	WIS/DM (%)
1	190°C,6min,0.75%	54.1	107.3	46.8	35.5	75.9
2	190°C,6min,1%	49.9	101.0	49.2	36.2	73.5
3	190°C,6min,1.25%	47.7	100.6	48.4	35.5	73.3
4	190°C,6min,1.5%	49.8	103.2	47.6	34.2	71.8
5	200°C,3min,0.75%	55.9	109.4	46.2	33.6	72.8
6	200°C,3min,1%	47.9	101.5	47.9	34.8	72.6
7	190°C,3min,1.75%	44.7	98.9	48.3	33.9	70.2
8	190°C,3min,2%	44.0	95.4	50.5	35.8	70.9
9	190°C,3min,2.5%	41.9	97.8	50.1	35.1	70.0
10	190°C,3min,3%	44.0	97.3	49.0	34.3	70.0

(2) 100%装量各预处理条件下预处理液中的成分

- 删除的内容: 预处理
- 删除的内容: 过程中
- 删除的内容: 和
- 删除的内容: 及
- 删除的内容: 但可以大大减少水不溶性固体的含量, 要
- 删除的内容: 量
- 删除的内容: 对于预处理液和预处理物料成分及酶水解情况的影响,
- 删除的内容: 的
- 删除的内容: 其次是温度和时间, 因此
- 删除的内容: ,
- 删除的内容: 非常
- 删除的内容: 的, 但

各预处理条件下预处理物料液相中的成分见表 2.20 和图 2.19, 其中表 25 为以各物质在液体中的浓度表示结果(单位: g/L), 图 2.19 为以各物质占处理后干固体质量百分比表示结果(单位: g/100gDM)。

表 2.20 100%装量各预处理条件下预处理液中成分 (单位: g/L)

Table 2.20 Components of prehydrolysate at feedstock loading of 100% at different conditions (Unit: g/L)

序号	预处理条件	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
1	190°C, 6min, 0.75%	2.51	11.4	4.73	2.07	0.59	1.09	19.4	91.4
2	190°C, 6min, 1%	3.97	17.1	5.61	3.46	1.11	1.63	21.4	96.1
3	190°C, 6min, 1.25%	4.58	28.4	6.56	2.82	1.02	2.33	19.9	85.2
4	190°C, 6min, 1.5%	7.18	44.9	9.06	2.44	2.10	5.08	17.3	57.6
5	200°C, 3min, 0.75%	2.58	13.2	5.73	2.52	0.44	1.28	14.9	61.6
6	200°C, 3min, 1%	4.01	20.9	6.15	4.37	0.54	1.68	16.0	68.4
7	190°C, 3min, 1.75%	5.18	30.0	5.02	1.78	1.19	2.19	22.5	101.3
8	190°C, 3min, 2%	8.18	55.0	7.25	1.63	2.35	4.67	21.3	70.6
9	190°C, 3min, 2.5%	14.6	75.5	11.2	3.33	3.46	7.65	14.2	41.2
10	190°C, 3min, 3%	38.0	102.9	22.7	4.44	3.98	10.8	9.33	18.1

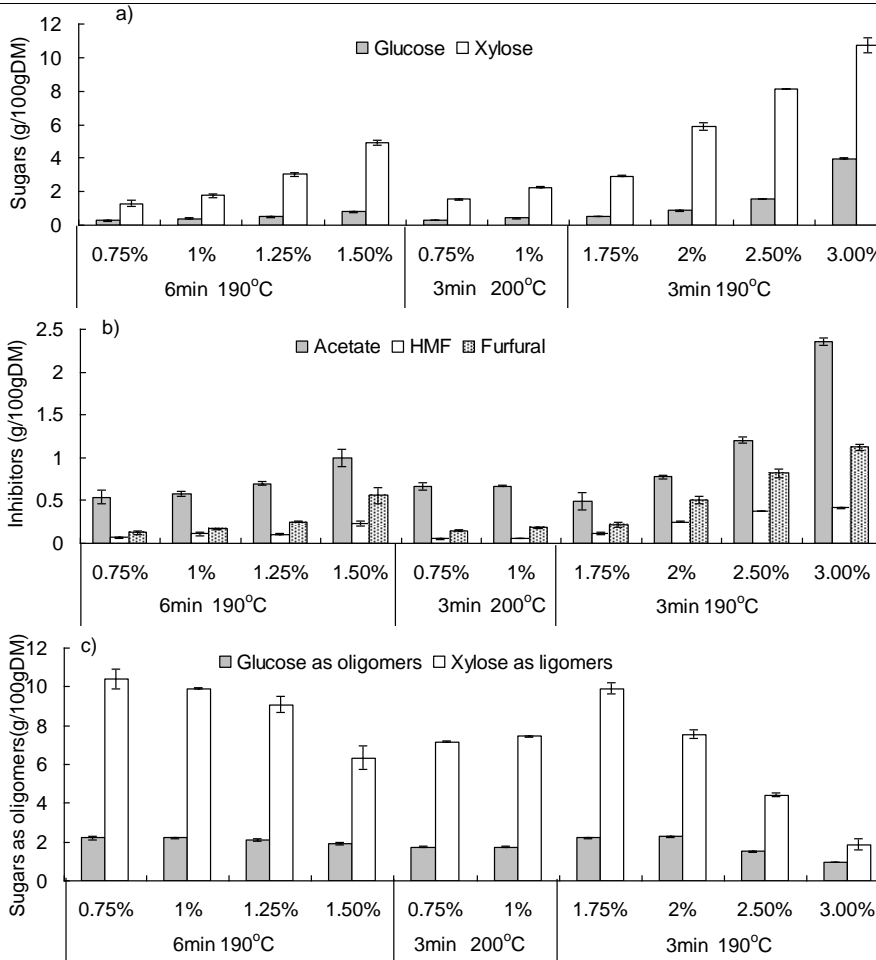


图 2.19 100%装量各预处理条件下预处理液中成分 (单位: g/100gDM)

Fig. 2.19 Components of prehydrolysate at feedstock loading of 100% under different conditions (Unit: g/100gDM)

从结果中可以看出, 在实验条件范围内, 随着温度的提高, 时间的延长和酸量的增加, 葡萄糖和木糖及乙酸, 糠醛等各种抑制物的浓度和含量都会增加, 且随着酸量的增加变化幅度最大, 而纤维寡糖和木寡糖的浓度和含量则随着酸量的提高先增加后减少, 说明酸量对预处理液的影响最大。

(3) 100%装量各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量

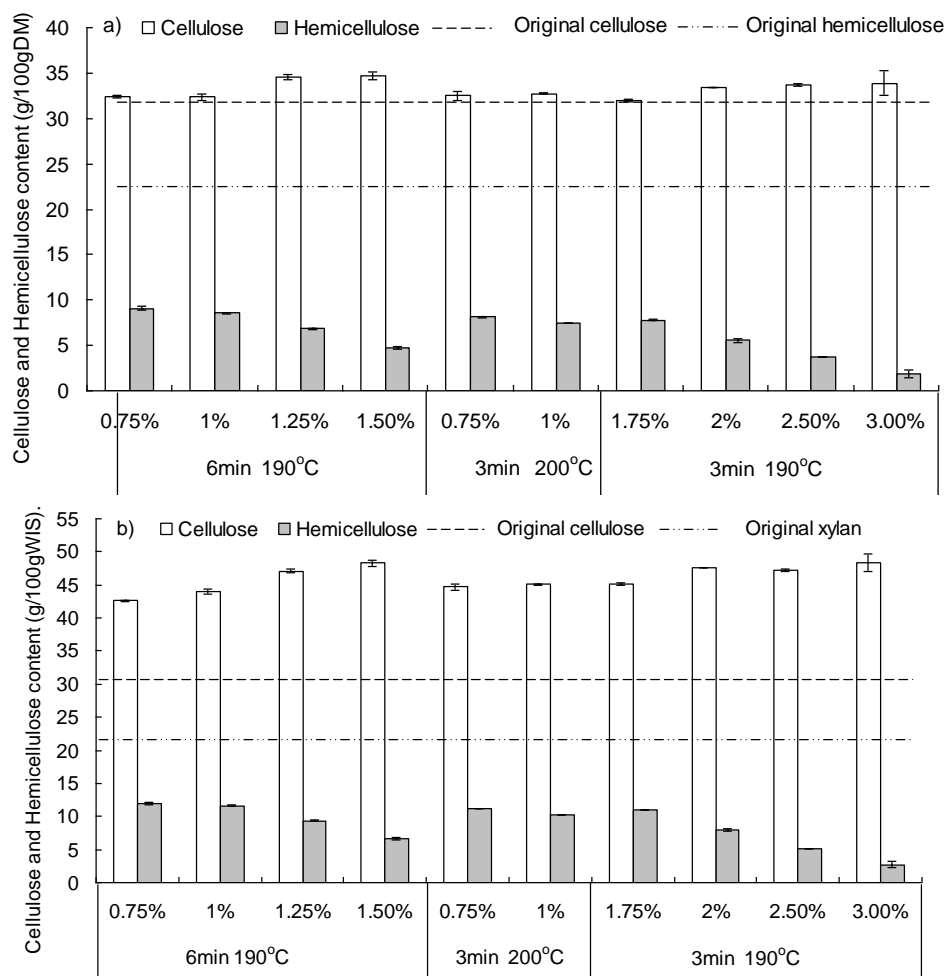


图 2.20 100%装量各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量

Fig. 2.20 Cellulose and Hemicellulose content of pretreated corn stover (dry material) and WIS at pretreating feedstock loading of 100%

各预处理条件下预处理物料中纤维素和半纤维素含量如图 2.20 所示, 其中图 2.20a 为纤维素和半纤维素占预处理后总干固体的百分比(g/100gDM), 图 2.20b 为纤维素和半纤维素占预处理后水不溶性固体的百分比(g/100gWIS)。从中可以看出, 预处理后总干固

体纤维素含量与原秸秆相差不大，但半纤维素的含量远远低于原秸秆，这是由于稀酸预处理主要作用于生物质中的半纤维素使其水解，而对纤维素作用较小。但处理后水不溶性固体中的纤维素含量比原秸秆大大提高，且半纤维素含量也大大降低，说明木聚糖等半纤维素成分水解成了可溶性物质。

从图中还可以看出，处理之后物料中的纤维素含量随着温度提高，时间延长和酸量的增加而增加，而半纤维素的含量则随之减少，说明预处理强度越高，对生物质的作用就越强，半纤维素的水解程度就越大。

(4) 100%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

各预处理条件下预处理物料经纤维素酶水解 72h 后葡萄糖，木糖及乙酸等浓度和得率结果如表 2.21 和图 2.21 所示，其中给出了预处理和纤维素酶水解所产生的葡萄糖和木糖分别占干秸秆的比例。从图 2.21 中可以看出，预处理后的物料经过纤维素酶催化水解后，葡萄糖的产生主要在酶水解阶段，而木糖主要在预处理阶段产生，尤其是预处理强度较高时，而在强度较低时则主要来自预处理阶段产生的木寡糖(见 2.2.6.1)。

从表 2.21 和图 2.21 中还可以看出，葡萄糖的浓度随着温度提高，时间的延长和酸量的增加而提高，而木糖则随着酸量的提高先提高后降低，说明太高的酸量并不利于木糖的总得率而可以提高葡萄糖得率。同时，乙酸等抑制物的含量也随预处理强的增加而增加。

表 2.21 100%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

Table 2.21 Results of enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry at feedstock loading of 100% under different pretreatment conditions

序号	预处理条件	纤维二糖 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率(%)	
							葡萄糖	木糖
1	190°C,6min,0.75%	1.21	11.2	7.77	1.00	0.86	56.2	54.0
2	190°C,6min,1%	1.39	12.4	8.37	1.08	0.73	62.0	58.2
3	190°C,6min,1.25%	1.38	14.4	8.69	1.20	1.21	72.5	60.4
4	190°C,6min,1.5%	1.24	15.0	7.97	1.20	0.75	75.2	55.4
5	200°C,3min,0.75%	1.35	12.7	8.37	1.15	0.76	63.9	58.2
6	200°C,3min,1%	1.34	13.3	8.41	1.15	0.69	66.8	58.4
7	190°C,3min,1.75%	1.05	12.2	7.08	0.91	1.01	61.2	49.2
8	190°C,3min,2%	0.00	14.4	7.39	1.15	1.06	72.1	51.4
9	190°C,3min,2.5%	1.22	16.9	7.40	1.19	0.78	85.1	51.5
10	190°C,3min,3%	0.85	19.0	7.32	1.35	0.97	95.3	50.9

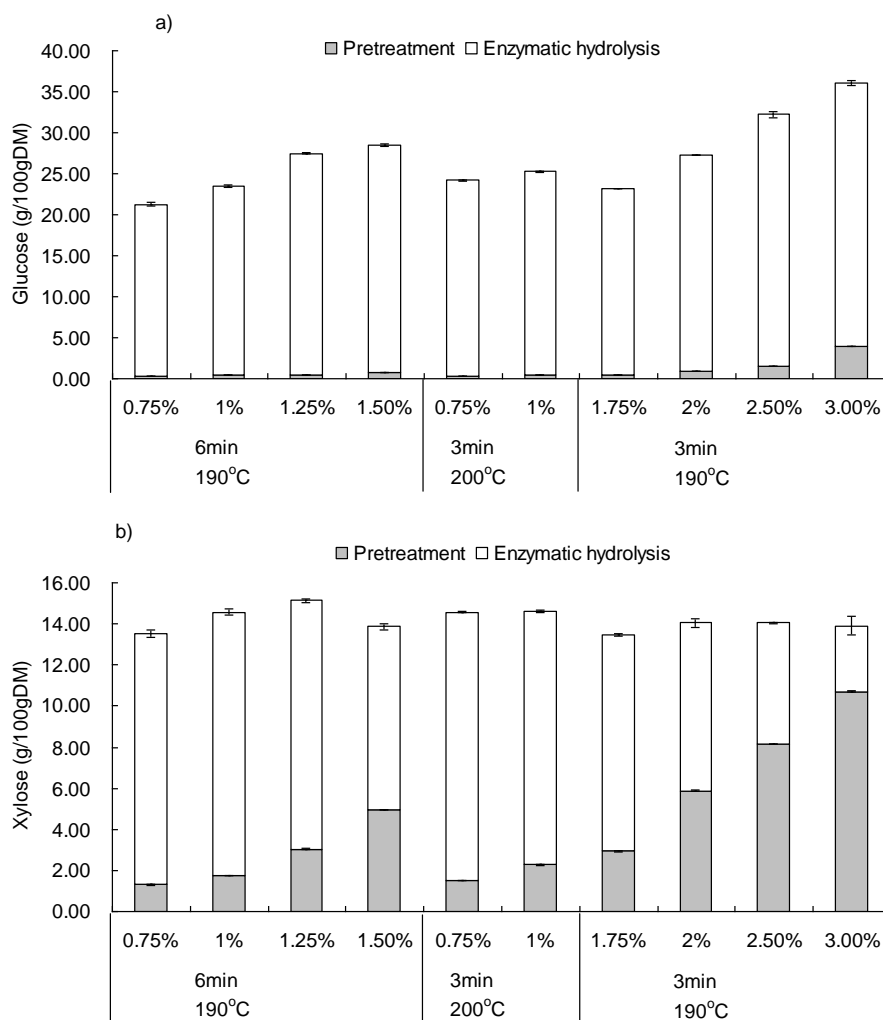


图 2.21 100%装量各预处理条件下预处理物料酶水解结果

Fig. 2.21 Results of enzymatic hydrolysis (72h) of pretreated slurry at feedstock loading of 100% under different pretreatment conditions

2.2.7 不同预处理装量下的预处理比较 综上所述，蒸汽和水用量主要受温度和时间的影响，处理后物料中的成分和酶水解受酸量的影响最大，其次为温度和预处理时间，综合考虑糖得率和抑制物的含量，我们也选择 190°C、3min、2.5%为最佳预处理条件。

删除的内容: 综上所述，蒸汽和水用量主要受温度和时间的影响，处理后物料中的成分和酶水解受酸量的影响最大，其次为温度和预处理时间，综合考虑糖得率和抑制物的含量，我们也选择 190°C、3min、2.5%为最佳预处理条件。

带格式的: 字体颜色: 自动设置

在 2.6 中分别讨论了 50%(400g)和 100%(800g)装量下的预处理条件对预处理结果的影响和变化规律，但两个条件下结果差别较大，本节则选择其中相同条件下(温度、时间和酸量)的预处理结果进行对比说明。

(1) 不同预处理装量下蒸汽用量和水用量及固体含量比较

从图 2.22a 中可以看出，在相同预处理条件下，100%装量下平均每 100gDM 所消耗

的蒸汽量和水量远远小于装量 50%，仅稍大于 50% 装量下所消耗蒸汽的 1/2，即 100% 装量下所用的总蒸汽量仅略大于 50% 装量，与蒸汽用量和水量相对应，100% 装量下的预处理物料中的含水量(约为 50%，图 2.22b)要高于 50% 装量(约为 38%，图 2.22b)，这说明预处理过程中加热反应器本身所消耗蒸汽是预处理能耗的主要部分，因此提高预处理反应器的利用率或增大反应器装量，可以降低预处理过程的能耗。

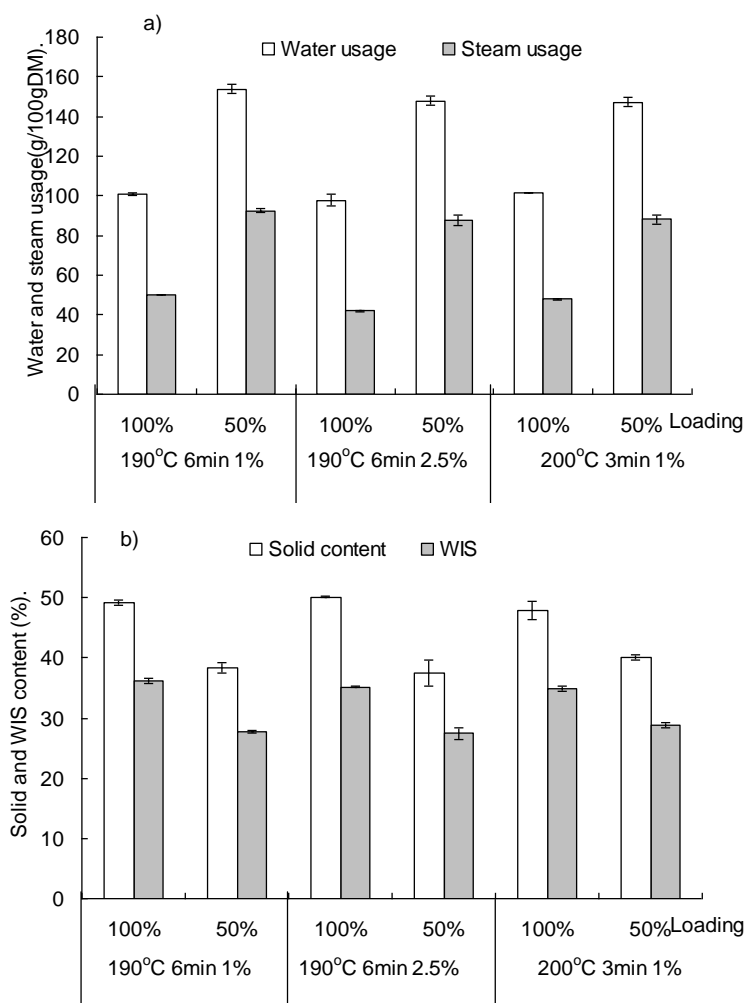


图 2.22 不同装量下预处理蒸汽和水用量及预处理后物料固含量比较

Fig. 2.22 Comparison of steam and water usage, solid and WIS content between different feedstock loading

(2) 不同预处理装量下预处理液中成分比较

从表 2.22 中可以看出，在相同的预处理条件下，50% 装量条件下产生的葡萄糖糖，木糖及寡糖和乙酸，糠醛等抑制物的量都要略高于 100% 装量，且在酸量较低时葡萄糖和糠醛类抑制物相差较小且含量较低，而木糖和半纤维素的差别较大且含量较高，但在酸量较高条件下葡萄糖的量差别增大同时含量有所增加，但木糖和半纤维素的量差别减

小且含量减少。这说明在装量为 50%的预处理程度要稍强于 100%装量，尤其是在较低预处理强度下，而在预处理强度较高时，这种差别有所减小。这可能是由于在 50%时的装量下，平均所消耗的蒸汽较多，同时处理时的含水量相对较高，和 100%装量相比而言质量和能量传递更加均匀，半纤维素较大程度水解的缘故。

表 2.22 不同预处理装量下预处理液中成分比较 单位: g/100gDM

Table 2.22 Comparison of components in prehydrolysate between different feedstock loading
Unit: g/100gDM

预处理条件	装量	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
190°C; 6min;1%	100%	0.41	1.76	0.58	0.36	0.11	0.17	2.21	9.91
	50%	0.46	2.74	0.71	0.44	0.07	0.18	2.08	11.6
190°C; 3min;2.5%	100%	1.58	8.02	1.20	0.42	0.21	0.90	1.57	4.29
	50%	1.67	8.17	1.37	1.04	0.33	0.66	0.87	3.21
200°C; 3min;1%	100%	0.44	2.27	0.67	0.47	0.06	0.18	1.74	7.44
	50%	0.49	3.54	0.88	0.51	0.11	0.36	2.33	10.8

(3) 不同预处理装量下预处理物料酶水解结果比较

从表 2.23 中可以看出，在酸量和温度较低(1%)即预处理强度较低时，经酶水解后木糖的浓度和得率稍高，葡萄糖的浓度和得率则较低，且两个装量下的糖浓度和得率相差不大，100%装量下略高。在温度提高后两个装量下的葡萄糖和木糖的得率和浓度都有所提高，且 50%装量下的葡萄糖和木糖得率要稍高于 100%装量。而将酸量提高到 2.5%两个装量下的葡萄糖得率继续提高，而木糖得率则降低，但 50%装量下的葡萄糖和木糖得率比 100%装量下高的更多。而在各个预处理条件下，50%装量下的乙酸的浓度比 100%装量下要高。这说明，相同条件下 50%装量比 100%装量更利于获得较高的糖得率，这可能主要由于 50%装量下平均蒸汽量较多同时物料的含水量较高传热较均匀的原因。

表 2.23 不同预处理装量下预处理物料酶水解结果比较

Table 2.23 Comparison of enzymatic hydrolysis (72h) between different feedstock loading

预处理条件	装量	纤维二糖 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	木糖 (g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率(%)	
							葡萄糖	木糖
190°C;6min;1%	100%	1.39	12.4	8.37	1.08	0.73	62.0	58.2
	50%	1.36	12.0	8.20	1.24	0.85	60.4	57.0
190°C;3min;2.5%	100%	1.22	16.9	7.40	1.19	0.78	85.1	51.5
	50%	1.31	17.8	7.81	1.27	0.99	89.3	54.3
200°C;3min;1%	100%	1.34	14.4	8.41	1.15	0.69	72.3	58.4
	50%	1.37	14.7	8.75	1.36	0.51	73.9	60.8

(4) 不同预处理装量下预处理物料中纤维素和半纤维素含量比较

从图 2.23 中可以看出，在实验中几个预处理条件下 100%装量下的纤维素含量与原秸秆差别不大且略有降低，但是随着温度的提高或酸量的增加其含量升高，而 50%装量下的物料中的纤维素含量只有在较低温度和酸量条件下略低于原秸秆，随着温度或酸量的增加其含量不断增加且高于原秸秆，因此整体而言 50%装量条件下预处理物料中的纤维素含量要高于 100%装量。而半纤维素含量与纤维素相反，所有条件下的预处理物料

中的半纤维素含量都低于原秸秆，且温度或酸量越高半纤维素的含量越低，且 50% 装量下的半纤维素含量都低于相同条件下 100% 装量的结果(图 2.23a)。同时从图 2.23b 中还可以看出，处理后水不溶性固体中的纤维素含量都大大高于原秸秆，而半纤维素含量则大大低于原秸秆，且各自在不同装量和预处理条件下的规律与干物料中的相同。

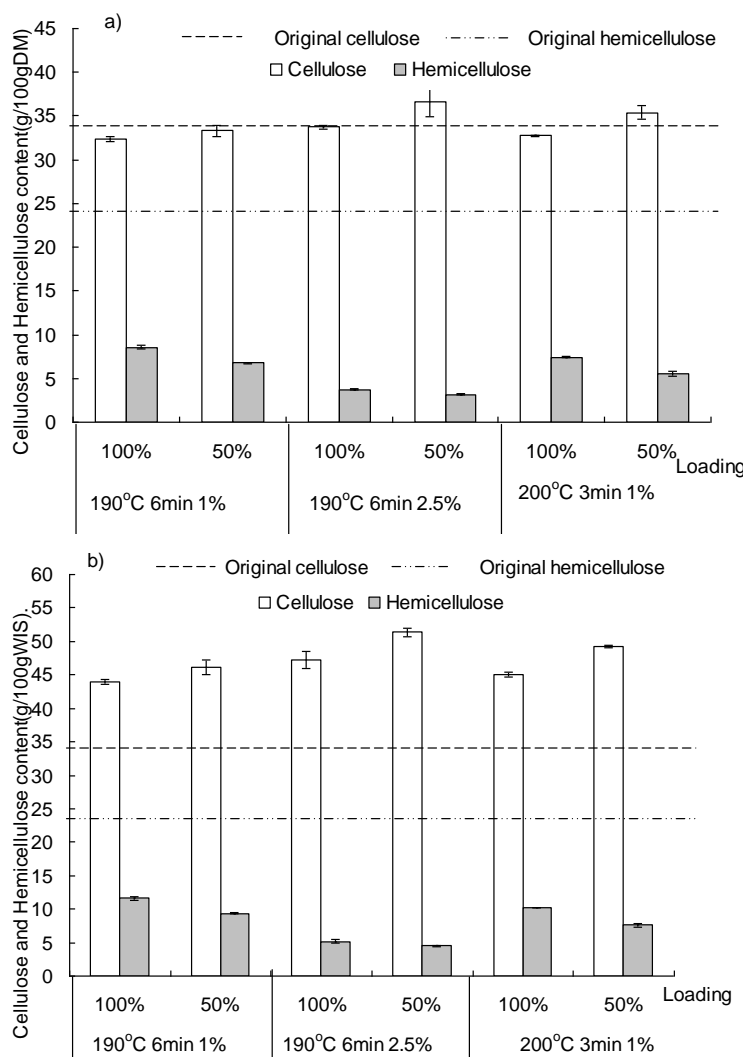


图 2.23 不同预处理装量下预处理物料中纤维素和半纤维素含量比较

Fig. 2.23 Comparison of cellulose and hemicellulose content in pretreated slurry (dry mater) and WIS between different feedstock loading

因此，从预处理物料中的纤维素和半纤维素含量结果也可以看出，在 50% 装量条件下，生物质中的半纤维素更好的被水解尤其是在较高的预处理强度下，而在酸量和温度较低即预处理强度较低时，两者相差不大。

从上面的结果比较中可以得出，预处理装量对预处理效率和蒸汽用量影响很大，反应器在 50% 和 100% 装量条件下的蒸汽用量相同，提高预处理装量和可以大大降低平均

删除的内容: 的

蒸汽用量和水用量，并可以提高物料的固体含量。

删除的内容: 从而

2.2.8 预处理物料发酵测试

为了验证通过以上稀酸预处理方法生产的预处理物料在纤维乙醇中的应用价值，实验中以预处理物料直接进行了同步糖化发酵(SSF)和分步糖化发酵(SHF)测试。

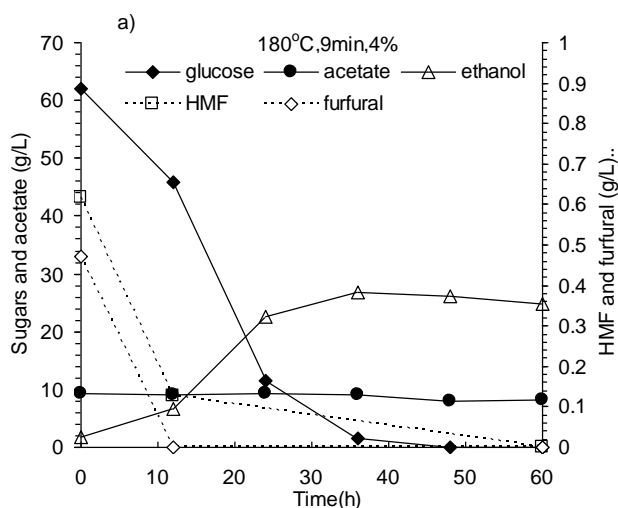
删除的内容: 预处理反应器本身所消耗的能量远大于加热生物质所消耗能量，因此预处理过程中提高反应器利用率是实现节能节水的重要方面。低预处理装量下，

实验中首先以 50%装量 180°C、9min、4% 预处理条件下生产的物料不经过任何脱毒处理而在 37°C、pH5.5 的条件下直接进行固体含量为 25% 的同步糖化发酵 72h，结果发酵并未进行，发酵失败。而在此实验中重新将温度提高到 50°C 使其在纤维素酶的作用下继续进行糖化 24h 后获得其水解液后，用此水解液在 37 °C 初始 pH6.0 条件下发酵，结果同样失败，而其它条件不变用此水解液在 30°C 下进行发酵时，结果发酵能正常进行，最终溶液中葡萄糖到乙醇得率为理论得率的 87%(如图 2.24a)。

实验选择预处理强度较低的 190°C、6min、2.5% 条件下的预处理物料在 37°C 下进行同步糖化发酵，结果实验同样失败，而用此实验的水解液在 30°C 下进行发酵，发酵也能进行，最终溶液中葡萄糖到乙醇的得率为理论得率的 92%，结果如图 2.24b)。

同样以 190°C、3min、2.5% 条件下的预处理物料进行同步糖化发酵实验，结果也是失败。

在上述预处理条件下不能进行同步糖化发酵的原因可能是由于在预处理过程产生的抑制物含量太高，严重抑制酵母的生长和繁殖。而 37°C 和 30°C 之间的区别说明发酵温度对酵母耐受抑制物的能力影响很大，降低温度可以提高酵母耐受抑制物的能力。而两个条件下的水解在 30 °C 发酵乙醇得率的差异可能也是由于抑制物对酵母影响的结果。从图 2.24 的结果可以看出，在此水解液中酵母利用糖的速率较慢，经过 32h 才消耗完，而且在快速利用葡萄糖之前糠醛和羟甲基糠醛的量快速降低，说明在酵母生长过程中首先将影响其生长的糠醛和羟甲基糠醛等抑制物降解至相当低的水平后才能发酵。



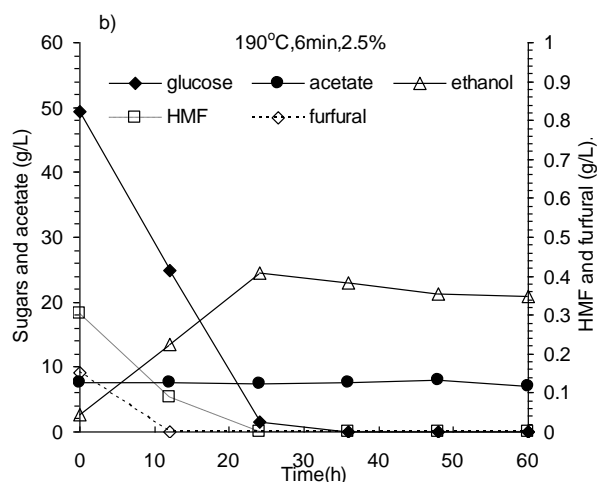


图 2.24 失败同步糖化发酵水解液 30°C 下发酵结果

Fig. 2.24 Fermentation at 30°C with the hydrolysate of failed SSF

而以 190°C、6min、1% 条件下的预处理物料在固体含量为 25%、37°C、pH5.5 条件下的同步糖化发酵可以进行，结果如图 2.25。从图 2.25 中可以看出，在此预处理条件下的物料经过 12h 的预糖化后葡萄糖的浓度只有 43.6g/L(得率仅为 34.6%)，而糠醛和羟甲基糠醛的浓度也很低，分别只有 0.30g/L 和 0.12g/L，乙酸的浓度也只有 6.88g/L。在接入酵母菌后葡萄糖并没有被快速利用，而是在糠醛的浓度在降到零同时羟甲基糠醛也被降解到很低水平后才出现葡萄糖的快速利用，同时产生较多的乙醇。在随后的过程中乙醇浓度逐渐提高，葡萄糖也逐渐被利用，但此发酵最终的乙醇浓度只有 27.15g/L 仅为理论得率的 44.5%，主要原因可能除了抑制物的影响外，预处理强度较低葡萄糖的得率较低的原因。此过程说明此预处理条件下的物料之所以能正常进行同步糖化发酵主要由于物料中的抑制物浓度较低，且在发酵过程中可以降解到足够低的水平，只有当抑制物在降解到足够低的水平后酵母菌才开始大量利用葡萄糖进行生产和发酵。

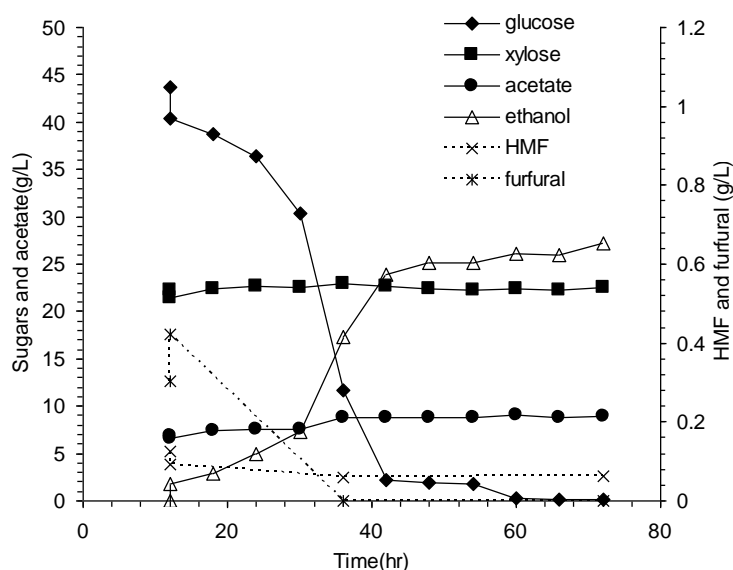


图 2.25 190°C,6min,1%预处理物料 37°C 下的同步糖化发酵结果

Fig.2.25 Results of SSF at 37°C with the pretreated slurry at 190°C, 6min, 1%

从上述实验探索过程和结果可以看出，预处理对纤维乙醇工业生产下游的发酵影响非常大，预处理过程中产生的抑制物浓度的高低和直接决定了发酵能否正常进行，而预处理效果的好坏能决定酶解过程中葡萄糖的释放从而影响最终乙醇的得率。因此，通过稀酸预处理所得到的物料在用于发酵前需要对其进行脱毒处理或提高微生物的耐受抑制物能力。

2.2.9 不同木质纤维素生物质稀酸预处理之间的差别

实验中比较了不同种类和不同产地的各种木质纤维素生物质秸秆经过稀酸预处理后之间的差别。

(1) 不同生物质预处理后蒸汽用量，水用量及固体含量之间的差别

从图 2.26 中可以看出,在相同的条件(190°C、3min、2.5%、S/L2:1、装量 800g)下进行预处理后所消耗蒸汽和水量,及处理后的固体含量不同的生物质原料之间相差不大,同时处理后的固体含量也没有多大差别,介于 45%-50%之间,说明影响蒸汽用量和水量的主要因素是预处理条件,如温度、时间、固液比等。而芝麻和油菜等作物秸秆消耗的蒸汽用量和水量稍高,可能是由于粉碎后其堆积密度较大,相同质量的芝麻和油菜秸秆的堆积体积较小,试验中仅占反应器体积的一半,从而在预处理过程中产生了较多的冷凝水的缘故。

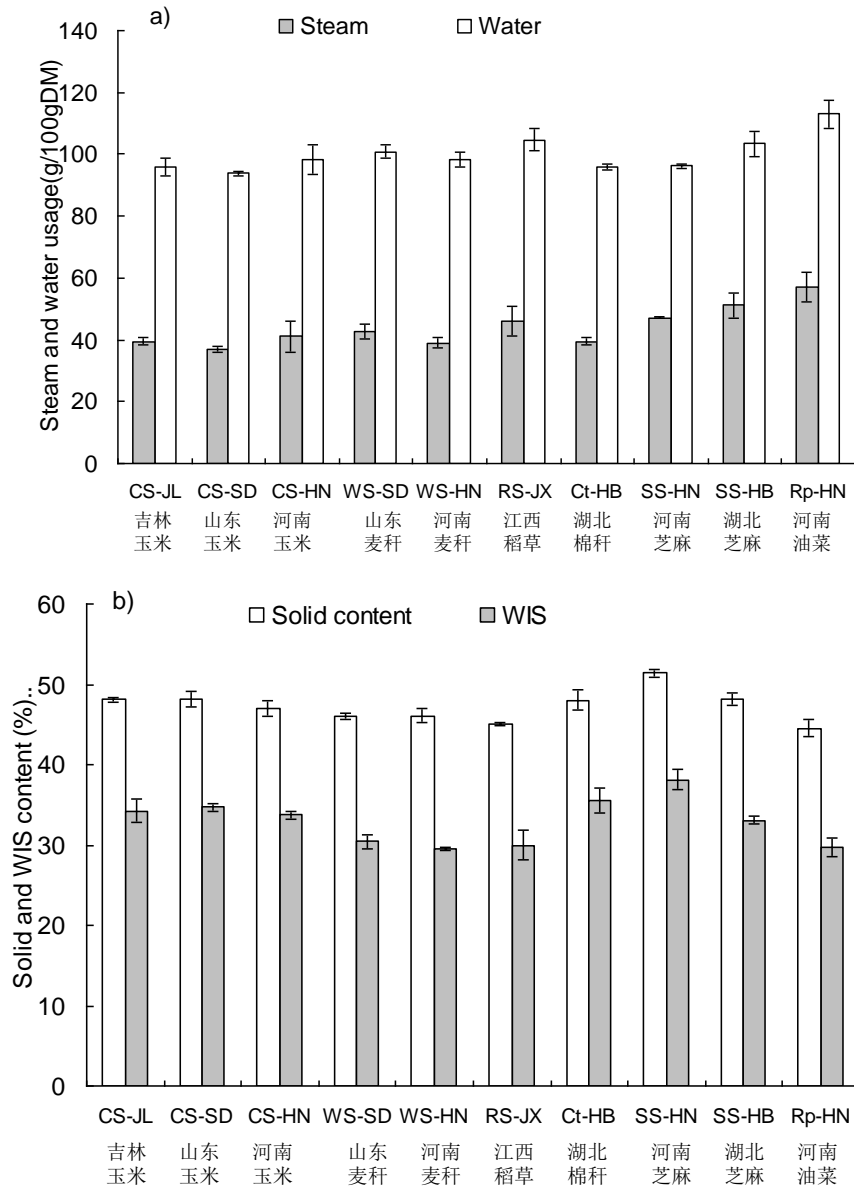


图 2.26 各生物质预处理后蒸汽用量，水用量及固体含量之间的差别

Fig.2.26 Difference of steam and water usage, solid and WIS content of various biomass from different places at the same pretreatment condition

(2) 不同木质纤维素生物质预处理后预处理液中的成分差别

不同木质纤维素生物质预处理后预处理液中的成分见表 2.24(a, b)，其中表 2.24a 为以其在液体里浓度表示的结果(单位: g/L)，表 2.24b 为以其占处理后干固体质量表示的结果(单位: g/100g DM)。

从结果中可以看出，同一种类不同产地的生物质预处理液中成分之间的差别并不

大, 而不同种类的生物质之间的差别还是很明显的, 如不同产地的玉米秸秆预处理液中的葡萄糖和木糖的浓度分别为 14.5-16.1g 和 74-80.4g/L, 而不同产地的芝麻秆中的葡萄糖和木糖的浓度分别为 5.01-5.22g/L 和 12.4-19.9g/L。不同产地同一种类的生物质预处理液中的乙酸和糠醛, 及寡糖之间的差别也不大, 而不同种类生物质之间则相差较大, 如不同产地的麦秆预处理液中的乙酸、糠醛和木寡糖的含量分别介于 1.3-2.0g/100gDM、0.33-0.4g/100gDM 和 4.2-5.6g/100gDM, 而不同产地的芝麻秆则介于 0.45-0.51g/100gDM, 0.07-0.07g/100gDM, 5.6-7.5 g/100gDM。

表 2.24 a 各生物质预处理后预处理液中的成分差别 (单位: g/L)

Table 2.24a Difference of components in the prehydrolysate of various biomass from different places at the same pretreatment condition (Unit: g/L)

原料	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
吉林玉米秆 CS-JL	15.8	80.4	12.1	4.19	1.97	9.07	15.8	43.4
山东玉米秆 CS-SD	14.5	79.0	13.6	1.18	3.03	3.57	7.14	48.8
河南玉米秆 CS-HN	16.1	74.0	13.1	1.64	3.05	3.25	5.19	33.1
山东麦秆 WS-SD	9.30	106.5	10.7	0.91	1.95	2.81	8.66	47.5
河南麦秆 WS-HN	15.9	113.5	17.2	1.70	4.01	3.40	7.50	35.9
江西稻草 RS-JX	7.61	66.2	5.34	2.71	0.98	1.52	10.7	43.8
湖北棉秆 Ct-HB	4.75	37.9	9.47	1.65	0.63	0.89	4.48	56.6
河南芝麻秆 SS-HN	5.01	12.4	4.73	1.82	0.67	0.69	7.73	59.7
湖北芝麻秆 SS-HB	5.15	19.9	4.76	2.38	1.09	0.65	6.71	70.2
河南油菜秆 Rp-HN	5.22	36.9	6.68	4.23	0.63	1.23	5.57	71.2

从表 2.24(a, b)中还可看出, 粮食类作物预处理后预处理液中的葡萄糖, 木糖及乙酸和糠醛类抑制物的含量较高, 如玉米秸秆、麦秆、稻草等, 而非粮食作物的则含量较少, 如棉秆、芝麻秆和油菜秆等, 但木寡糖比粮食作物高。

这说明不同作物秸秆在相同预处理条件下纤维素及半纤维素的水解程度并不相同, 这可能主要由于不同种类生物质秸秆中的纤维素, 半纤维素含量不同(表 2.1), 同时其中的组成结构不同所致。粮食作物秸秆中的纤维素和半纤维素含量较高且较易水解而油料作物秸秆中的纤维素和半纤维素含量较低且不易水解。

表 2.24 b 各生物质预处理后预处理液中的成分差别 (单位: g/100gDM)

Table 2.24b Difference of components in the prehydrolysate of various biomass from different places at the same pretreatment condition (Unit: g/100gDM)

原料	葡萄糖	木糖	乙酸	乙酰丙酸	羟甲基糠醛	糠醛	纤维寡糖	木寡糖
吉林玉米秆 CS-JL	1.58	8.02	1.20	0.42	0.21	0.90	1.57	4.29
山东玉米秆 CS-SD	1.55	8.50	1.46	0.13	0.32	0.38	0.76	5.23
河南玉米秆 CS-HN	1.82	8.35	1.48	0.19	0.35	0.37	0.65	4.13
山东麦秆 WS-SD	1.09	12.5	1.26	0.11	0.23	0.33	1.01	5.56
河南麦秆 WS-HN	1.86	13.3	2.01	0.20	0.47	0.40	0.88	4.19
江西稻草 RS-JX	0.93	8.08	0.65	0.33	0.12	0.19	1.31	5.34
湖北棉秆 Ct-HB	0.52	4.15	1.04	0.19	0.07	0.10	0.48	6.08
河南芝麻秆 SS-HN	0.47	1.17	0.45	0.17	0.06	0.07	0.73	5.64
湖北芝麻秆 SS-HB	0.56	2.15	0.51	0.25	0.12	0.07	0.72	7.54
河南油菜秆 Rp-HN	0.65	4.58	0.83	0.54	0.08	0.15	0.69	8.89

(3) 不同木质纤维素生物质预处理物料酶水解的差别

不同木质纤维素生物质预处理物料经纤维素酶水解 72h 的结果如表 2.25 所示,从表中可以看出同一种类不同产地的生物质秸秆预处理物料经纤维素酶水解后的差别不大,而不同种类的秸秆之间的差别是很大的,如经预处理并酶水解后的玉米秸秆的纤维二糖、葡萄糖、木糖及乙酸的浓度分别介于 1.0-1.22g/L、15.5-16.9g/L、7.4-8.3g/L 和 1.2-1.48g/L,而芝麻秆则测不到纤维二糖,其它物质分别介于 7.0-7.4g/L、4.7-6.6g/L 和 1.1-1.2g/L。不同种类秸秆的葡萄糖和木糖的得率也相差很大,而同一种类不同产地间则相差很小。

从表 2.25 中还可以看出,粮食作物的葡萄糖得率和木糖得率要远远高于非粮食作物,最高的为稻草和麦秆,其次为玉米秸秆,最低的为油菜秆、芝麻秆和棉秆等。这说明,在相同预处理条件下粮食作物秸秆中的木质纤维素的破坏程度很大,对纤维素酶的接近度较高,而油料作物和棉秆中的木质纤维素结构艰难破坏,这可能与其中的纤维素,半纤维素及木质素含量及组成结构有关。

表 2.25 不同木质纤维素生物质预处理物料酶水解(72h)的差别

Table 2.25 Difference of enzymatic hydrolysis (72h) of various biomass from different places at the same pretreatment condition

原料	纤维二糖 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	木糖(g/L)	乙酸 (g/L)	乙酰丙酸 (g/L)	糖得率(%)	
						葡萄糖	木糖
吉林玉米秆 CS-JL	1.22	16.9	7.40	1.19	0.78	85.1	51.5
山东玉米秆 CS-SD	1.08	15.5	8.34	1.45	0.55	74.7	60.8
河南玉米秆 CS-HN	1.00	15.5	8.13	1.48	0.34	72.9	64.5
山东麦秆 WS-SD	1.11	18.5	10.1	1.20	0.34	94.6	65.3
河南麦秆 WS-HN	1.23	17.7	9.94	1.38	0.44	95.7	73.2
江西稻草 RS-JX	1.13	20.6	8.99	0.86	0.33	99.5	67.3
湖北棉秆 Ct-HB	0.79	9.27	6.33	1.59	0.39	41.5	57.5
河南芝麻秆 SS-HN	/	6.96	4.71	1.09	0.33	40.7	44.1
湖北芝麻秆 SS-HB	/	7.43	6.59	1.51	0.38	40.5	56.9
河南油菜秆 Rp-HN	/	8.59	7.30	1.91	0.27	43.3	62.8

(4) 不同木质纤维素生物质预处理物料中纤维素和半纤维素含量的差别

不同木质纤维素原料处理前后中的纤维素和半纤维素的含量如表 2.26,从表中可以看出,除了棉秆和油菜秆其它处理后总干物料(DM)纤维素的含量都有所提高,而所有秸秆中半纤维素的量则大大降低,处理后的水不溶性固体中的纤维素含量也是大大提高,半纤维素则大大降低,说明稀酸预处理对所有生物质秸秆都是有作用的,但作用程度不同。

从表 2.26 中还可看出,同一种类不同产地的生物质原秸秆中的纤维素和半纤维素的含量差别不大,而不同种类的生物质则相差较大,如玉米秸秆中的纤维素和半纤维素含量分别为 34.1-36.3%和 21.5-24.6%,而芝麻秆中的为 29.2-31.4%和 18.3-19.8%,且粮食作物和中的纤维素和半纤维素含量要比油料作物中的高,如稻草中纤维素和半纤维素含量分别为 35.4%和 22.8%,而油菜秆中分别只有 33.9%和 19.9%,而棉秆重纤维素的含

量最高达 38.2%但半纤维素含量较低只有 18.8%。这就说明,在粮食作物秸秆中纤维素和半纤维素含量较高,而在油料作物秸秆中其它组分如木质素含量较高。

对比预处理后的秸秆中的纤维素和半纤维素的含量可以看出,粮食作物中的半纤维素含量要比其它作物低,如处理后的麦秆总干物料中的半纤维素含量为 3.5-4.7%,而芝麻秆中的达 9.8-10.1%。这说明经过预处理后,粮食作物秸秆中的半纤维素水解程度更高对木质纤维素结构的破坏更大,因此经纤维素酶水解后粮食作物的葡萄糖和木糖得率较高。

表 2.26 不同木质纤维素生物质预处理物料中纤维素和半纤维素含量的差别

Table 2.26 Difference of cellulose and hemicellulose centent of various biomass from different places at the same pretreatment condition

原料	纤维素含量 (%)			半纤维素含量(%)		
	原秸秆	处理后 WIS	处理后 DM	原秸秆	处理后 WIS	处理后 DM
吉林玉米秆 CS-JL	34.1	47.3	33.7	24.6	5.2	3.7
山东玉米秆 CS-SD	35.4	51.9	37.4	23.5	7.2	5.2
河南玉米秆 CS-HN	36.3	54.6	36.3	21.5	7.1	4.7
山东麦秆 WS-SD	33.4	50.0	33.0	26.5	6.6	4.3
河南麦秆 WS-HN	31.7	50.9	32.7	23.2	5.4	3.5
江西稻草 RS-JX	35.4	46.2	36.5	22.8	6.0	4.7
湖北棉秆 Ct-HB	38.2	49.7	31.0	18.8	7.2	4.5
河南芝麻秆 SS-HN	29.2	42.4	31.4	18.3	13.6	10.1
湖北芝麻秆 SS-HB	31.4	50.4	34.7	19.8	14.2	9.8
河南油菜秆 Rp-HN	33.9	49.4	33.0	19.9	10.6	7.1

总之,不同种类的生物质在相同预处理条件下的结果并不相同,这主要与其组成和结构不同有关。对于半纤维素含量较高的粮食类作物,稀酸预处理对其作用效果较为明显而对纤维素和半纤维素含量较少的油料作物在相同条件下较差,因此,对不同的木质纤维素原料要选择不同的预处理条件,甚至是不同的预处理方法。对于同一种类不同产地的生物质,差别并不明显,说明地域的因素对预处理影响不大。

2.3 结论

预浸固液比对预处理蒸汽用量和用水量的影响非常大,提高固液比可以大大降低蒸汽用量和用水量从而实现节能节水的目的,而且可以获得高固体含量的物料,满足高固体含量同步糖化发酵的要求。但提高固液比会降低木糖得率,同时产生较多的乙酸,糠醛和羟甲基糠醛等抑制物,不利于总糖得率的提高和抑制物含量的控制,但可以通过略降低预处理条件来解决。

预处理温度稀酸预处理的蒸汽用量和水量影响较大,提高预处理温度会增加预处理过程中的能耗和水耗。温度越高越利于葡萄糖的释放但并不利于提高木糖的收率,而且高温下单糖降解速率增加,从而增加了糠醛和羟甲基糠醛等抑制物的含量同时乙酸的量也会大大增加。经过酶水解后,葡萄糖的得率会随着温度的升高而升高,但木糖会大大

减少。因此选择适当的预处理温度是非常重要的。

延长预处理时间也会增加蒸汽用量和水量，同时预处理液中的抑制物的浓度会随着时间的延长而增加，葡萄糖总得率也会提高，但太长的预处理时间下木糖得率会降低。因此在保证效果的前提下，尽量缩短时间对节能节水和抑制物控制上是很有必要的。

酸量对蒸汽用量和水量的直接影响不大，但对于预处理效果影响巨大，低酸量对物料的作用不大，只有酸量超过生物质缓冲量时才表现出明显的处理效果。葡萄糖和抑制物的量会随着酸量的增加而增加，酶解后的总糖得率也会升高，但太高的酸量会导致单糖的大量降解从而提高了抑制物的含量。

蒸汽压力对蒸汽量和水量略有影响，降低蒸汽压力物料固体含量会略降低，但低压蒸汽更利于节能。随着蒸汽压力的降低，预处理液中的糖和抑制物也略有降低，酶水解效果也略有降低，但从节能降耗角度考虑，适当降低所用蒸汽压力对降低预处理成本是很有利的。

在对预处理条件优化实验中，我们系统比较了预处理温度、时间和酸用量三者对预处理效率的影响，其中预处理温度和时间是影响预处理过程中蒸汽用量和水量及固体含量的主要因素，而酸量对水量和蒸汽用量影响不大，但可以减少水不溶性固体的含量提高可溶物含量，要降低能耗和水量就要在保证预处理效果的前提下尽量降低温度缩短时间。对于预处理液和预处理物料成分及酶水解情况的影响，酸量的影响最大，其次是温度和时间，因此适当提高酸量，降低温度和时间对节能是非常有利的，但太高的酸量会加快葡萄糖和木糖的降解同时产生较高的抑制物。所以综合考虑我们选定 190℃、3min、2.5%为装量 50%时的最佳预处理条件。

两个不同的预处理装量相比，相同预处理条件下 50%装量所消耗的蒸汽用量和水量远远高于 100%装量，处理后物料的固体含量也远低于 100%装量，但预处理液中的木糖含量较高，同时乙酸等抑制物的含量也略高，同时预处理物料中纤维素含量较 100%装量下要高，且经纤维素酶水解后葡萄糖和木糖的得率 50%装量条件下要稍高，说明 50%条件下稍利于半纤维素的水解和葡萄糖木糖的得率，这可能是由于 50%装量条件下平均消耗蒸汽较多，有更多的蒸汽作用于其中的秸秆，同时预处理过程中物料的含水量较高传热较为均匀的更利于半纤维水解的缘故。

预处理对纤维乙醇工业生产下游的发酵影响非常大，预处理过程中产生的抑制物浓度的高低和直接决定了发酵能否正常进行，而预处理效果的好坏能决定酶解过程中葡萄糖的释放从而影响最终乙醇的得率。

不同种类的生物质在相同预处理条件下的结果并不相同，这主要与其组成和结构不同有关，对于半纤维素含量较高的粮食类作物，稀酸预处理对其作用效果较为明显而对纤维素和半纤维素含量较少的油料作物在相同条件下较差，因此，对不同的木质纤维素原料要选择不同的预处理条件，甚至是不同的预处理方法。对于同一种类不同产地的生物质，差别并不明显，说明地域的因素对预处理影响不大

总之，通过以上实验我们系统考查了预浸固液比、预处理温度、预处理时间、酸量、

蒸汽压力、预处理原料装量等因素对稀酸预处理中蒸汽用量、水用量、预处理物料固体含量、单糖和寡糖含量、抑制物含量、预处理物料的酶水解效果等的影响，并确定了最佳的预处理条件为：酸量 2.5%、温度 190°C、时间 3min。比较了两个原料装量下(50% 和 100%)的预处理效果的差异，考查了在最佳预处理条件下的发酵性能，同时比较了不同产地、不同种类的各种木质纤维素在此预处理条件下处理后的差异，提出了在极低水量条件下的新型稀酸预处理技术。

基本结论合理。根据以上各部分的修改再做一点调整。

第 3 章 影响办公废纸酶水解因素探究与促进

3.1 材料和方法

3.1.1 实验材料

办公室废纸(WOP)为经惠普打印机(HP LaserJet 1002)用过的 A4 安信牌打印纸购自上海惠东安信纸业有限公司, 并经碎纸机粉碎成大小为 $0.2\times 0.6\text{cm}$ 的纸片。

实验中所用墨粉从惠普打印机中收集。

酶水解时所用滤纸为新华滤纸(Xinhua NO.1), 购自杭州新华纸业有限公司, 用碎纸机粉碎成 $0.2\times 0.6\text{cm}$ 的滤纸片。

用于酶水解的纤维素酶为 Accellerase 1000。

3.1.2 主要试剂

(1) 实验试剂

硫酸铵, 甘氨酸: 化学纯, 上海国药集团

葡萄糖, 木糖, 纤维二糖, 氯化高铁, 甘氨酸: 分析纯, 上海国药集团

碳酸钙, 氯化钙, 盐酸, 硫酸, 硝酸: 分析纯, 上海凌锋化学试剂有限公司

硫酸镁: 分析纯, 上海同亚化学技术发展公司

磷酸: 分析纯, 上海菲达工贸有限公司

氢氧化钠: 分析纯, 上海振兴化工厂

无水硫酸铝, 无水硫酸钙: 分析纯, 上海美星化学试剂公司

(2) 所用试剂的配制

0.05mol/L pH4.0-pH5.5 醋酸缓冲液: 分别配好 0.05 mol/L 的醋酸和醋酸钠溶液, 然后将两者混合, 并用 pH 计测定使其 pH 为所需 pH。

0.05mol/L pH6.0-8.0 磷酸盐缓冲液: 分别配好 0.05 mol/L 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶液然后将两者混合, 并用 pH 计测定使其 pH 为所需 pH。

0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液: 分别配好 0.05 mol/L 的甘氨酸和 NaOH 溶液然后将两者混合, 并用 pH 计测定使其 pH 为所需 pH。

1 % (v/v) 硫酸: 吸取 98% 的浓硫酸 10mL 于盛有去离子水的 100mL 烧杯中, 并用 100mL 容量瓶定容。

其他浓度的硫酸配置方法类似。

2mol/L 盐酸: 取 42.6mL 37% 的浓盐酸稀释并定容到 250mL 容量瓶中

2mol/L 硝酸: 取 34.3mL 68% 的浓硝酸稀释并定容到 250mL 容量瓶中

2/3mol/L 磷酸: 取 11.4mL 85% 的浓磷酸稀释并定容到 250mL 容量瓶中

1mol/L 硫酸: 取 13.6mL 98% 的浓硫酸稀释并定容到 250mL 容量瓶中

3.1.3 实验仪器

恒温水浴振荡器, HZ-9212S, 江苏华利达实验设备厂

电热鼓风干燥箱, BDHG-9140A, 上海一恒科学仪器厂

高效液相色谱, LC-20AD, 日本岛津公司

碎纸机, SD9331, 上海三木实业有限公司

2L 升反应器, 2 L, 上海保兴生物设备工程有限公司

pH 计, PHS-3C, 上海雷磁仪器厂

3.1.4 实验方法

3.1.4.1 办公废纸的预处理

(1)酸预浸: 取 10g 粉碎过的办公废纸置于 250ml 三角瓶中, 以一定料液比加入一定浓度的稀酸溶液或去离子水, 用玻璃棒搅拌均匀, 用硅胶塞塞紧, 置于 50°C 水浴 200r/m 下保持 12h。

(2)水洗: 取纸约 50g, 加入去离子 500mL 水浸泡并搅拌约 30min, 然后用四层纱布过滤拧干, 然后重新加入去离子水 500mL, 如此反复洗涤 10 次以上。

经洗涤后的废纸于 105°C 的烘箱中, 烘干至恒重, 以用于酶水解和金属元素含量分析。

(3)酸洗: 取粉碎过的办公废纸 50g, 加入 20mL 氢离子浓度为 2mol/L 的稀酸溶液 (H_2SO_4 1mol/L, HCl 2mol/L, H_3PO_4 2/3 mol/L, HNO_3 1mol/L) 拌匀, 10min 后加入 500ml 水浸泡并搅拌 30min, 用四层纱布过滤并拧干去除水, 再加入 20ml 酸溶液, 拌匀后加 500ml 水, 如此反复洗涤 3 次, 最后用去离子水反复洗至为 pH5.0 左右;

经洗涤后的废纸于 105°C 的烘箱中, 烘干至恒重, 以用于酶水解和金属元素含量分析。

3.1.4.2 处理后办公废纸的酶水解

将经过处理的废纸于 250ml 三角瓶中用 0.05mol/L pH5.0 醋酸缓冲液固含量为 10%, 若酸过量需用 2mol/L NaOH 将其 pH 调至 5.0, 然后于 115°C 下灭菌 20min. 待冷却到室温后接入纤维素酶, 酶加入量为 12FPU/g DM, 然后置于 50°C 恒温水浴摇床, 200r/m, 水解 24h。

水解结束后用 pH 计测其 pH 并取样于 13000r/m 离心 5min 取上清液, -20°C 下保存并测其糖浓度, 每点两个平行。

3.1.4.3 金属盐或墨粉对纤维素酶水解的影响

取 10g DM 粉碎后的滤纸于 250ml 三角瓶中, 加入 0.05M pH5.0 醋酸缓冲液 90mL 调整固含量为 10%(w/v), 然后分别加入一定量相应的金属盐类 (CaCO_3 , CaSO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3) 或打印墨粉, 于 115°C 下灭菌 20min 后加入相同的纤维素酶 (12FPU/g DM) 于 50°C 恒温水浴摇床, 200r/m, 水解 24h。

水解结束后取样于 13000r/m 离心 5min 取上清液, -20°C 下保存并测其糖浓度, 每点两个平行。

3.1.4.4 pH 对纤维素酶水解的影响

取 10g DM 粉碎后的滤纸于 250ml 三角瓶中, 加入 0.05M 不同 pH 的缓冲液 90mL

调整固含量为 10%(w/v),然后于 115°C 下灭菌 20min 后加入相同的纤维素酶(12FPU/g DM), 于 50°C 恒温水浴摇床,200r/m,水解 24h。

水解结束后取样于 13000r/m 离心 5min 取上清液, -20°C 下保存并经适当稀释后测其糖浓度, 每点两个平行。带有螺带式搅拌桨

3.1.4.5 办公废纸酸在最佳预浸处理条件下处理效果的验证

取 100g 经碎纸机粉碎过的办公废纸于带有螺带式搅拌桨的 2-L 生物反应器中, 以液固比为 1.5:1(v/w)加入体积浓度为 7%(v/v)稀硫酸溶液, 混匀, 于室温下保持 3h, 每 10-20min 用玻璃棒搅拌一次。然后加入 0.05mol/L, pH5.0 的醋酸缓冲液, 并用 NaOH 调节 pH 至 5.0, 用 pH 计测定。然后以 12FPU/gDM 的加酶量加入纤维素酶 Accellerase 1000, 于 50°C、200r/m 条件下酶解 96h, 酶解过程中定时取样, 取样量为 2mL, 样品于 13000r/m 离心 5min 取上清液, -20°C 下保存并经适当稀释后测其糖浓度

3.1.4.5 办公废纸中组分的测定

(1) 办公废纸中纤维素含量测定:

纤维素含量的测定根据 NREL 中生物质结构组成测定方法^[104]并稍作修改, 主要步骤为:

准确称取 100mg、105°C 下烘干至恒重的办公废纸(WOP)于 30mL 具塞压力管中, 然后加入 1mL 72% H_2SO_4 置于 30°C 恒温水浴槽中反应 60min, 并用玻璃棒每各 5-10min 搅拌一次, 待达到反应时间后向压力管中加入去离子水 28mL 将 H_2SO_4 浓度调至 4%, 然后塞紧并用纱布扎紧, 置于高温自动灭菌锅中于 121°C 下反应 1h, 待反应完成并冷却至室温后加入 $CaCO_3$ 调节 pH 至 5-6 后通过 HPLC 测定。

(2) 办公废纸中金属元素的测定:

废纸中金属元素分析用原子发射光谱(ICP-AES, Varian 710ES)测定, 具体由华东理工大学分析测试中测定。

测定时的主要条件为: 射频电源功率 1.1 kW, 等离子流速 15 L/min, 辅助流速 1.5 L/min, 雾化压力 0.2 MPa, 泵速 13 r/m。

3.1.4.6 水解液成分分析

水解过程生成的单糖和纤维二糖通过高效液相色谱(HPLC)测定(LC-20AD, 岛津), 示差监测器(RID-10A, 岛津), 色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H, 柱温为 65°C, 流动相为 50 mM H_2SO_4 流速为 0.6 mL/min。

所有样品 13000r/m 下离心 3min, 取上清液适当稀释后过 0.22 μ m 醋酸纤维滤膜过滤。

3.2 实验结果与讨论

3.2.1 办公废纸中纤维素和金属离子的含量

办公废纸(WOP)中纤维素和主要金属离子的含量见表 1, 从表中可以看出, 纤维素含量约占办公废纸(WOP)总重的一半(48.8%), 其中含量最多的添加物质是含钙化合物,

相当于 21.2% 的 CaCO_3 或 28.9% 的 CaSO_4 其他的化合物还有：含镁化合物相当于 0.9% 的 MgSO_4 ，含铁化合物相当于 1.3% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 含铝化合物相当于 0.2% 的 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ，锰和铜的含量很少可以忽略。

表3.1 办公废纸(WOP)中纤维素和主要金属离子的含量

Table 3.1 Major ingredients in WOP and the residue content (% , w/w) after washing

	纤维素	半纤维素	Ca	Fe	Mg	Al	Mn	Cu
未处理 WOP	48.8	7.44	8.5	0.37	0.18	0.036	0.0026	0.00014
水洗后 WOP	/	/	4.6	0.48	0.081	0.022	0.0023	0.00015
H_2SO_4 洗后 WOP	/	/	0.16	0.37	0.059	0.020	0.0022	0.00010

3.2.2 废纸中的金属盐类化合物对纤维素酶水解的影响

3.2.2.1 含钙盐类对纤维素酶水解的影响

实验中根据表 3.1 测定的废纸中各金属盐的量，通过水滤纸酶水解过程中添加相应的金属盐类然后测定水解 24h 后葡萄糖的得率来考查个金属盐类对纤维素酶水解的抑制作用。实验中各添加物的添加量根据表 3.1 中所示的废纸(WOP)中的含量加以调整。

表 3.2 含钙化合物的添加对滤纸酶水解的影响

Table 2. Effect of calcium compound addition on hydrolysis of filter paper

CaCO_3 (g/g DM)	0	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
葡萄糖 (g/L)	21.7±0.5	16.4±0.4	14.0±0.1	12.9±0.5	13.3±0.4	12.6±0.3
纤维二糖 (g/L)	1.5±0.1	4.1±0.1	4.6±0.5	5.2±0.6	4.9±0.4	5.3±0.1
初始 pH	5.0	6.8	6.9	7.1	6.9	6.9
水解后 pH	5.0	6.6	6.1	6.9	7.0	7.0
CaSO_4 (g/g DM)	0	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
葡萄糖 (g/L)	22.2±0.5	20.9±0.4	21.6±0.4	21.6±0.7	21.3±0.3	22.1±0.6
纤维二糖 (g/L)	1.3±0.0	1.0±0.0	0.9±0.1	1.0±0.2	1.1±0.1	1.1±0.0
CaCl_2 (g/g DM)	0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20
葡萄糖 (g/L)	19.6±2.1	19.2±1.3	17.7±0.8	16.4±1.0	16.7±0.1	17.2±0.8
纤维二糖(g/L)	1.0±0.2	1.0±0.1	0.8±0.1	0.5±0.0	0.6±0.0	0.9±0.2

表 3.2 是含钙化合物(包括 CaCO_3 、 CaSO_4 和 CaCl_2)对纤维素酶 Accellerase 1000 催化水解滤纸水解的影响结果，从表中可以看出，当 CaCO_3 的量从 0 增到 0.05g/gDM 时，从滤纸中水解得到的葡萄糖的浓度急剧降低，但从 0.05 g/g DM 继续增加到 0.2 g/g DM (接近办公废纸中碳酸钙的含量，21.2%)时葡萄糖浓度降低程度有所减缓。同时还可以看出，随着 CaCO_3 增加，水解体系中的 pH 迅速升高，继续增加碳酸钙的量 pH 不变。而相比而言，水解过程中添加 CaSO_4 并没有改变滤纸的酶解效率，同时 pH 也没有大的变化。而添加 CaCl_2 后滤纸水解后的葡萄糖得率也略有降低，但没有 CaCO_3 那样明显。

图 3.1 为用纤维素酶 Accellerase 1000 水解滤纸时 pH 对糖得率的影响，在 pH4.5 是葡萄糖的浓度达到最大，此时的 pH 接近 Accellerase 1000 的最佳 pH(4.8)，pH 在 4.0 到 5.0 之间水解得率稍有降低，但当 pH 高于 6.0 以后葡萄糖得率会迅速降低。由于 Accellerase 1000 中缺少足够的纤维二糖酶，因此在水解过程中同时有纤维二糖的存在，且 pH 从 4.5 增加到 6 时纤维二糖的量有所升高之后迅速降低。而从纤维素到葡萄糖和纤维二糖的转化率在 pH4.5-5.5 之间几乎没有变化。此结果中 pH 对滤纸酶水解的影响和

表 3.2 中由于 CaCO_3 的加入而引起的 pH 变化相对应。

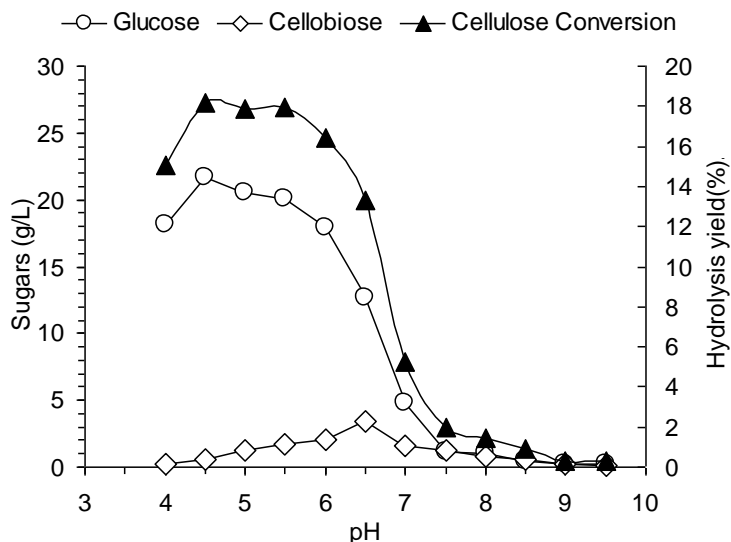


图 3.1 pH 对滤纸酶水解的影响

Fig. 3.1 Effect of pH on hydrolysis of filter paper.

表 3.2 和图 2.1 中的结果表明，含钙化合物对滤纸酶水解的影响是很复杂的，对于可溶性的钙盐它可能通过抑制纤维素酶的活性而影响水解(CaCl_2)，但对于难溶性的钙盐并不会因为其在纤维素上的吸附从而占据纤维中的空隙而影响纤维素的酶水解如加入 CaSO_4 后，而是通过改变水解时系统中的 pH 使其偏离纤维素酶的最佳 pH 而影响水解。

3.2.2.2 金属盐类和墨粉对纤维素酶水解的影响

各金属盐类化合物 (包括镁, 铝和铁)在其浓度范围为办公废纸(WOP)中含量时对滤纸酶水解的影响结果见表 3.3, 从表中可以看出, 随着镁离子浓度的增加, 滤纸的水解效率缓慢增加说明在此范围内镁离子对滤纸的水解具有微弱的促进作用。然而, 随着铝离子浓度的增加, 滤纸的水解得率慢慢降低, 同样增加铁离子的浓度滤纸水解率也有所降低, 但降低都不明显, 此结果符合文献中报道的金属离子对纤维素酶的抑制作用^[106-108]。此结果表明, 在实验的浓度范围之内金属离子对滤纸酶水解的影响是很小的。

打印墨粉对滤纸酶水解的影响结果同样见表 3.3, 结果表明墨粉对滤纸酶水解结果并没有消极的作用, 相反结果显示, 其对滤纸的酶水解有促进的趋势, 这可能是由于墨粉的分散性质有关。

表 3.3 金属离子和墨粉对滤纸酶水解的影响

Fe ³⁺ (g/g DM)	0	0.0014	0.0028	0.0042	0.0056	0.0071
葡萄糖 (g/L)	19.6±0.3	19.9±0.1	17.8±0.6	17.3±0.2	15.6±1.1	15.6±0.1
纤维二糖 (g/L)	1.0±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0
Mg ²⁺ (g/g DM)	0	0.0022	0.0054	0.0108	0.0162	0.0216
葡萄糖 (g/L)	20.1±1.5	22.7±0.8	23.7±0.9	22.1±1.1	21.4±0.4	21.4±0.3
纤维二糖 (g/L)	1.2±0.0	1.3±0.0	1.0±0.1	0.9±0.2	0.9±0.0	1.0±0.1
Al ³⁺ (g/g DM)	0	0.00024	0.00047	0.00071	0.00095	
葡萄糖 (g/L)	21.1±0.9	21.2±0.4	19.4±0.7	18.0±1.0	18.3±0.3	
纤维二糖 (g/L)	1.1±0.0	1.0±0.1	0.8±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	
墨粉 (g/g DM)	0	0.0005	0.0010	0.0015	0.0020	0.0025
葡萄糖 (g/L)	16.5±0.1	17.0±0.8	17.0±0.3	17.4±0.2	18.5±0.6	18.9±0.2
纤维二糖 (g/L)	1.2±0.0	1.3±0.0	1.3±0.0	1.3±0.0	1.4±0.0	1.5±0.0

3.2.3 去除办公废料的 CaCO₃ 预处理方法

从上面结果看出,影响办公废纸(WOP)的主要因素为其中大量 CaCO₃ 的存在,因此要促进办公废纸的酶水解效率,主要应去除其中的 CaCO₃。实验中比较了去除办公废纸中 CaCO₃ 的两种方法:预浸和洗涤。

图 3.2 为用各种无机酸或水洗涤和预浸后又经过纤维素酶水解后的结果,经硫酸和水洗涤后办公废纸中的金属离子见表 3.1。

图 3.2(a) 结果表明,经过酸洗后的办公废纸(WOP)的酶水解效率比没有洗涤过的和用水洗涤过的办公废纸要高的多,且实验表明经硫酸和硝酸洗涤后的水解结果最好。图 3.2(b) 为经各种无机酸和水浸泡过的办公废纸经纤维素酶水解后的结果,从图中可以看出,同样是硫酸和硝酸的作用效果最好,酶解得率差不多是水浸泡的 4 倍。

比较洗涤和浸泡两种处理方法可以看出,洗涤后办公废纸的酶水解率要高于浸泡后的酶水解率,但是洗涤所用的酸量几乎是浸泡的 10 倍,而且洗涤产生搅拌等带来的动力消耗。因此,我们优先选择浸泡作为办公废纸预处理的方法。在各种不同的无机酸中,我们选硫酸作为所预浸酸液,因为其腐蚀性较小且预处理过程中不易挥发。

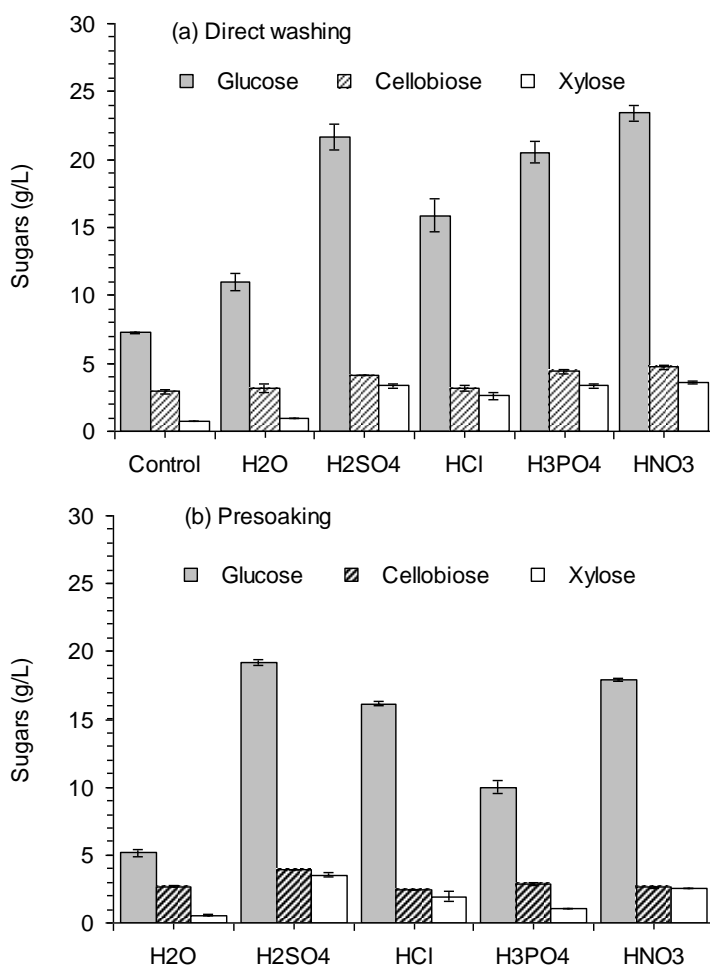


图 3.2 用不同无机酸洗涤和浸泡后的酶水解结果

Fig. 3.2 Hydrolysis of WOP pretreated with different inorganic acids.

3.2.4 办公废纸酸预浸处理条件优化

实验中考查了办公废纸酸预浸处理过程中的条件因素如硫酸的量、预浸时间、预浸温度和液固比对其酶水解的影响，并确定了最佳的预浸条件。

图 3.3 为在液固比为 1.5: 1 下硫酸用量对预浸后办公废纸酶水解得率的影响，结果表明随着酸用量的增加，酶水解后的糖得率逐渐增加，并在硫酸体积浓度为 7% 时达到最大，此量基本相当于完全反应掉废纸中约占 20% 的 CaCO_3 所用的酸量。

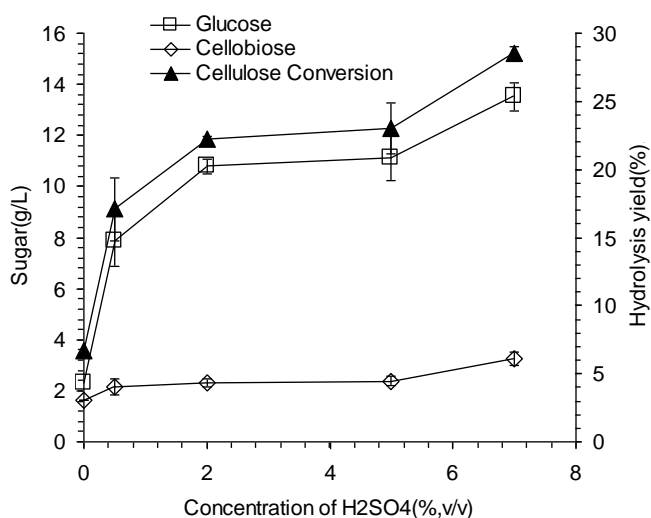


图 3.3 硫酸用量对办公废纸预浸后酶水解结果的影响

Fig.3.3 Effect of H₂SO₄ usage in the presoaking on WOP hydrolysis.

在相同的硫酸加量下，液固比即水或硫酸溶液体积与固体办公废纸(WOP)的质量比对预浸后办公废纸(WOP)的酶水解得率的影响结果见图 3.4。结果表明，液固比对酶解效果没有大影响，只有在液固比超过 5 以后才有较大提高，这可能由于在液体较多时混合较均匀，硫酸与 CaCO₃ 反应更加完全的缘故。但实际中液固比不能太高，否则酶解产生的糖浓度太低不能用于发酵。

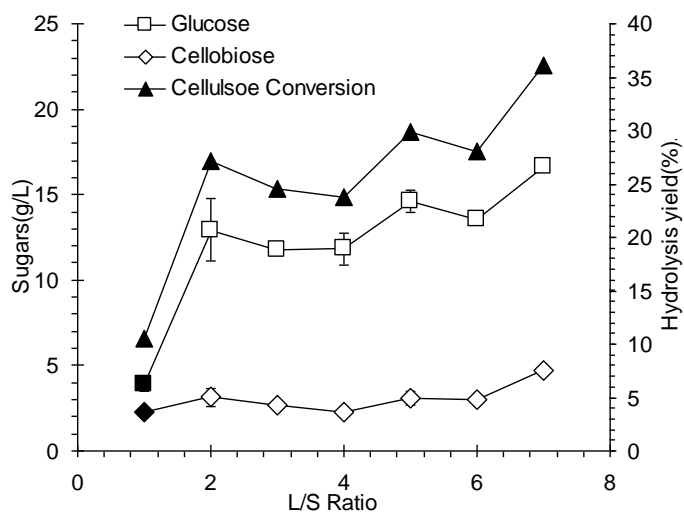


图 3.4 预浸液固比对办公废纸酶水解结果的影响

Fig. 3.4 Effect of L/S ratio on WOP hydrolysis.

图 3.5 给出了预浸时间对办公废纸(WOP)酶解后的影响结果，从图中可以看出，随着时间的延长酶解效率逐渐提高，这可能是由于时间太短时 CaCO₃ 还没有完全反应的结

果，但随着预浸时间的延长酶解效果并没有提高。

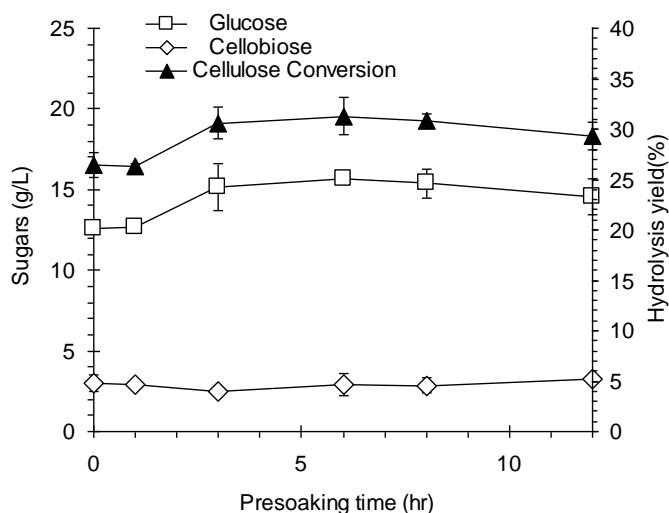


图 3.5 预浸时间对办公废纸酶水解的影响

Fig. 3.5 Effect of presoaking time on WOP hydrolysis.

图 3.6 为预浸温度对办公废纸(WOP)酶水解后糖得率的影响，结果显示，在实验温度范围内预浸温度对酶解的影响并不大，因此在实际应用过程中可在室温下进行。

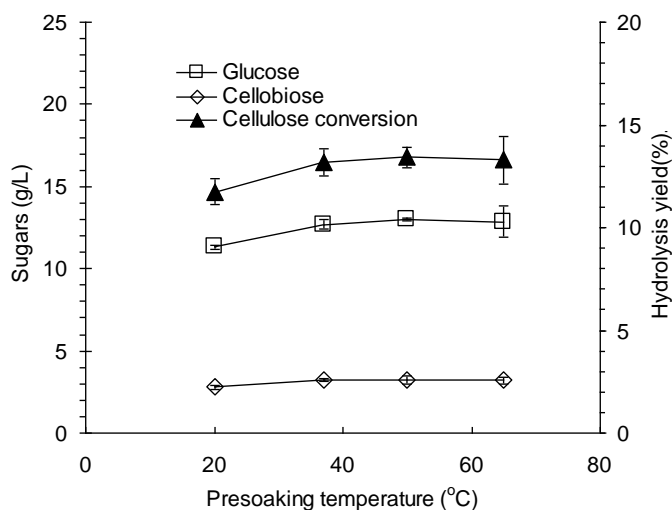


图 3.6 预浸时间对办公废纸酶水解的影响

Fig.3.6 Effect of presoaking temperature on WOP hydrolysis.

3.2.5 办公废纸酸在最佳预浸处理条件下处理效果的验证

以上条件的探究试验都在三角摇瓶中进行，但由于在酶水解时 10%的固含量的条件下三角瓶中的混合效果很差，特别是在水解初期，因此为了验证此预浸方法的有效性和应用潜力，实验中在带有螺带式搅拌桨的 2-L 生物反应器中进行了放大验证试验，试验条件为硫酸浓度 7%，液固比 1.5: 1，预浸温度 50°C，预浸时间 3h，其酶水解效率岁时

间的变化曲线如图 3.7 所示。

结果表明经预浸后的办公废纸，在纤维素酶的作用下不断水解并有葡萄糖的产生，葡萄糖的浓度不断提高，特别是在酶水解反应的初期糖得增加速率最快，但随着时间的延长增加速率逐渐减少，而纤维二糖则一直维持在较为恒定的水平。这主要是由于反应初期纤维素酶的活性较高，且所受的产物抑制较弱，而随着水解的进行，一方面酶逐渐变性失活，另一方面葡萄糖等抑制物逐渐增加从而使纤维素的转化率降低。从图中可以看出，经过 96h 的酶水解后葡萄糖和纤维二糖的量分别达到了 36.2 g/L 和 7.2 g/L，相当于办公废纸中 73.3% 的纤维素转化率。此结果远远高于其他文献中报道的结果，如 Kojima 和 Yoon^[86]用臭氧过氧化法处理办公废纸，最终其水解率从 37% 提高到 52%。而 Wu 等^[91]人通过添加表面活性剂的方法也只能使废报纸在经过 123.5h 后达到 56.5% 的糖化率。同时 Park 等^[83]在不加任何试剂的条件下对废纸进行酶水解最终纤维素的转化率也只有 42.2%。

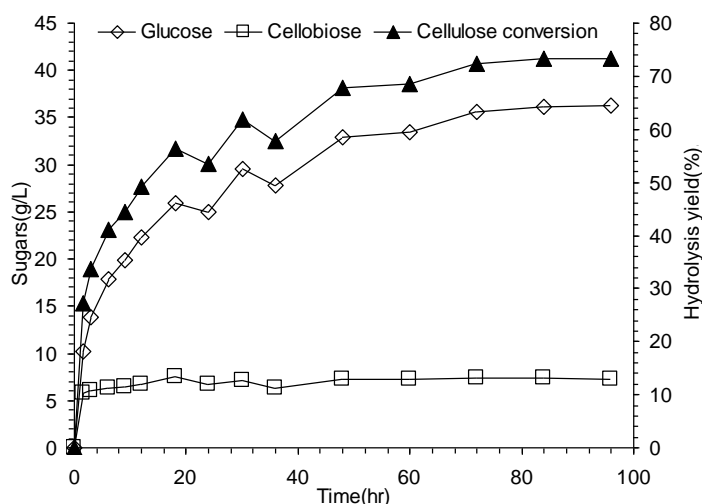


图 3.7 最佳预浸条件下处理过的办公废纸的酶水解结果

Fig. 3.7 Hydrolysis of WOP pretreated at optimal condition.

3.3 结论

在实验中，通过向粉碎后的滤纸中添加化学试剂的方法考查了办公废纸(WOP)中主要的金属盐类对其经过商用纤维素酶 Accellerase 1000 酶水解后糖得率的影响，结果发现其中 CaCO_3 的含量对办公废纸(WOP)的酶水解效果影响非常大。然后测试了几种不同的预处理方法对克服这些废纸(WOP)中存在的添加剂对其酶水解影响的有效性和实用性，发现硫酸预浸的方法是最可行有效的方法。实验中还仔细探讨了影响预浸的后酶解效果的几个条件因素并确立最佳条件，结果水解效率具有很大改善。

为了获得较高的糖浓度以提高其后续应用的潜力，实验中对办公废纸(WOP)的酶水解时在较高的固含量下进行(10%, w/w)，并且在最终的验证实验中，得到得葡萄糖和木

糖的浓度分别为 36.2 g/L 和 7.2 g/L, 其中的纤维二糖可能是由于葡萄糖对纤维素酶的抑制引起的, 葡萄糖是纤维二糖酶较强的抑制剂尤其是当其浓度较高时, 但是如果利用自办公废纸(WOP)的酶水解液作为营养物进行发酵时, 葡萄糖可以快速的转化成乙醇或其他产物, 当然这取决于所用的发酵方式和菌种。当葡萄糖被利用后, 纤维素和纤维二糖会很快转化成葡萄糖并参加到发酵代谢中去^[80]。在 2-L 生物反应器中进行的延长糖化时间的验证试验中, 如果算上产生的葡萄糖和木糖办公废纸(WOP)中的纤维素转化率达 73.3%(图 3.7)。

将办公废纸(WOP)作为一种原料通过水解加以利用还需要进一步的研究和探讨, 许多问题还需要通过进一步的实验来验证, 包括不同的废纸(WOP)材料的影响; 除了本文中所提到的造纸过程中添加的其他添加物对酶水解的影响, 如胶类物质, 有机染料等; 以办公废纸(WOP)作为内原料采用同步糖化发酵工艺生产乙醇或其他产品的葡萄糖和纤维二糖的利用情况和产物得率等。

总之, 本文提供了一种利用办公废纸(WOP)的可行有效的预处理方法, 能够使经过酶水解后糖的浓度达到用于发酵生产的水平, 具有很好的工业应用前景。

第 4 章 纤维素酶催化水解纤维素影响因素及其失活情况研究

4.1 材料和方法

4.1.1 实验材料

酶水解时所用滤纸为新华滤纸(Xinhua NO.1), 购自杭州新华纸业有限公司, 用碎纸机粉碎成 $0.2 \times 0.6\text{cm}$ 的滤纸片。纤维素酶活测定所用滤纸为 Whatman 定性滤纸(Whatman NO.1)购自 Whatman International Ltd (Maidstone, UK), 葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术有限公司, 蛋白酶 K 购自 Sigma 化学试剂公司。

本文中商用纤维素酶 Accellerase 1000 和 Spezyme CP 由 Genencor International (RoChester, NY, USA) 提供, 纤维二糖酶 Novozyme 188 购自 Novo Industrial A/S (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 其酶活情况见表 4.1。

气爆后玉米秸秆由吉林燃料乙醇有限公司提供。

表 4.1 实验中所用纤维素酶的酶活

纤维素酶	滤纸酶活(FPU/mL)	纤维二糖酶活(CBU/mL)
Accellerase 1000	67	140
Spezyme CP	70	31
Novozyme 188	/	681

4.1.2 实验仪器

恒温水浴振荡器, HZ-9212S, 江苏华利达实验设备厂

碎纸机, SD9331, 上海三木实业有限公司

5L 发酵罐(FMG-5L(II)), 国强生化装备有限公司

2L 发酵罐, 2L, 上海保兴生物设备工程有限公司

高效液相色谱, LC-20AD, 日本岛津公司

示差检测器, RID-10A, 日本岛津公司

色谱柱, HPX-87H, Bio-rad Aminex

722 可见光分光光度计, 722N, 上海精密科学仪器有限公司

恒温水浴槽, ZC-18Q, 宁波天恒仪器厂

4.1.3 主要试剂及配制

0.05mol/L pH5.0 醋酸缓冲液: 分别配好 0.05 mol/L 的醋酸和醋酸钠溶液, 然后将两者混合, 并用 pH 计测定使其 pH 为 5.0。

0.05mol/L pH4.8 柠檬酸缓冲液: 分别配好 0.05 mol/L 的柠檬酸和柠檬酸钠溶液, 然后将两者混合, 并用 pH 计测定使其 pH 为 4.8

80mM 纤维二糖溶液: 准确称取 1.368g 纤维二糖于 50mL 容量瓶中, 加入 0.05mol/L pH4.8 柠檬酸缓冲液定容。

DNS 试剂: 准确称取 3, 5-二硝基水杨酸 6.3g, 用少量蒸馏水溶解, 加入 2mol/L 的

氢氧化钠溶液 262mL，再加入到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中，再加入 5g 苯酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加蒸馏水，在容量瓶中定容至 1000mL。储于棕色试剂瓶中，放置一周后备用。

Bradford 试剂：称取 350mg 考马斯亮蓝 G-250(B1131, Sigma)，加入 100mL95%乙醇和 200mL88%磷酸，待考马斯亮蓝 G-250 溶解后定容到 1000mL，并储存于棕色瓶中作存储液。测定时取上述存储液 30mL，15mL95%乙醇和 30mL88%磷酸，并用去离子水定容到 500mL，摇匀后过滤，可作为工作液。

4.1.4 实验方法

4.1.4.1 纤维素酶催化水解纤维素影响因素探究

(1) 固体含量对 Accellerase1000 水解纤维素的影响

称取 50g 滤纸片加入带有螺带式搅拌桨的 2L 发酵罐中，然后加入一定量的 0.05M pH5.0 醋酸缓冲液，并一次性加入所需纤维素酶(Accellerase1000, 15FPU/gDM)于 50°C、200r/m 下开始水解 24h。当固含量高于 5%时需定时补料，即将所需滤纸于 2-6h 内分批补加到发酵罐中，使最终水解的固体含量为实验固体含量(5%-30%)，工作体积为 1L。水解过程中每两 2h 取一次样，取样量为 2mL。于 13000r/m 离心 3min，取上清液经适当稀释并过滤后进行 HPLC 分析测定，并计算糖得率：

$$\text{Sugar yield \%} = C \times V / (M \times 1.11) \times 100\% \quad (4-1)$$

C 为糖浓度，g/L；

V 为发酵罐中液体体积，L；

M 为滤纸质量，g。

纤维素到葡萄糖和木糖转化率为

$$\text{Conversion \%} = (C_1 + C_2 \times 1.05) \times V / (M \times 1.11) \times 100\% \quad (4-2)$$

C₁ 为葡萄糖浓度，g/L；

C₂ 为纤维二糖浓度，g/L；

V 为发酵罐中液体体积，L；

M 为滤纸质量，g。

(2) 温度对 Accellerase 1000 水解纤维素的影响

于 250mL 三角瓶中以固含量 5%加入 5g 滤纸片并加入 0.05mol/L, pH5.0 醋酸缓冲液 95mL，然后加入纤维素酶(Accellerase 1000, 15FPU/gDM)，于 50°C 200r/m 水浴中糖化 24h，每两小时取一次样，取样量为 0.4ml。样品处理同上。

(3) 转速和不同反应器对 Accellerase 1000 水解纤维素的影响

于 250ml 三角瓶(普通和改造型)或带有螺带式搅拌桨的 2L 发酵罐中以固含量 5%加入滤纸片和加入 0.05mol/L, pH5.0 醋酸缓冲液，并加入纤维素酶(15FPU/gDM)，工作体积为 100mL 或 1L 于 50°C 不同转速下糖化 24h，每两小时取一次样，取样量为 0.4mL。样品处理同上。

此处所用改造型的三角瓶为底部带有两个向内突出的锥形玻璃，高约 1cm。

4.1.4.2 纤维素酶在水解过程中葡萄糖的抑制

在 250mL 三角瓶中加入葡萄糖浓度为 0-220g/L 的用 0.05mol/L, pH5.0 醋酸缓冲液配制的葡萄糖溶液 88mL 并加入 12g 滤纸, 然后以 7FPU/gDM 的加酶量加入纤维素酶 (Spezyme CP 和 Accellerase 1000), 于 50°C, 200r/m 水浴中进行水解 24h 后测其葡萄糖浓度, 比较增加的葡萄糖的量。

4.1.4.3 纤维素水解过程中纤维素酶失活情况研究

(1) 不同纤维素酶在缓冲液中失活的情况比较

于 250mL 三角瓶中加入 95mL 0.05 mol/L, pH5.0 醋酸缓冲液, 以纤维素酶活为 15FPU/gDM, 纤维二糖酶活为 31CBU/gDM 的加入量加入纤维素酶或纤维二糖酶或其混合物 (Accellerase 1000, Spzyme CP, Novozyme 188, 见表), 并假设加入的底物质量为 5g, 然后将其置于 50 °C, 200r/m 的水浴摇床中抚育 24h, 并分别在 0, 3, 7, 12, 24h 取样, 取样量为 2mL, 经适当稀释后测定酶活 (FPU, CBU) 和蛋白含量 (Bradford 法) 变化, 每个实验两个平行。

(2) 不同纤维素酶在木质素或底物存在下的失活情况比较

于 250mL 三角瓶中加入 95mL 0.05M pH5.0 醋酸缓冲液, 然后加入 5g 木质素或滤纸, 以纤维素酶活为 15FPU/gDM, 纤维二糖酶活为 31CBU/gDM 的加入量加入纤维素酶或纤维二糖酶或其混合物 (Accellerase 1000, Spzyme CP, Novozyme 188, 见表), 然后将其置于 50 °C 转速为 200r/m 的水浴摇床中抚育 24h, 并分别在 0, 3, 7, 12, 24h 取样, 取样量为 2mL, 经适当稀释后测定酶活 (FPU, CBU) 和蛋白含量 (Bradford 法) 变化, 每个实验两个平行。

表 4.2 纤维素酶失活实验中不同纤维素酶的加量

Table 4.2 Enzyme loading of different cellulases during the deactivation experiments

纤维素酶	加酶体积(mL)	加酶量	
		滤纸酶活 (FPU/g DM)	纤维二糖酶活 (CBU/gDM)
Accellerase 1000 (A1000)	1.12	15	31
Spezyme CP (CP)	1.07	15	6.6
Novozyme 188 (188)	0.23	/	31
Spezyme CP 与 Novozyme 188 混合物 (CP+188)	1.07+0.18	15	31

4.1.4.4 木质素的制备^[106]

取干基质量为 100g 蒸汽膨爆后玉米秸秆于 5L 发酵罐中, 加入去离子水 1900mL, 以 15FPU/gDM 的加酶量加入纤维素酶 Accellerase 1000, 与 50 °C、200r/m 下水解 48h, 然后 8000r/m 离心 10min 去掉上清液, 并加入去离子水混匀, 8000r/m 离心 10min 去掉上清液, 如此反复三次。然后用磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 调至固含量为 5%, 加入蛋白酶 K 于 37 °C 处理过夜, 然后 80 °C 加热 15min 后再次离心并用 1mol/L NaCl 洗涤后反复用去离子水洗涤三次, 与 105 °C 下烘干, 并存于 4 °C 备用。

4.1.4.5 纤维素酶活测定方法

(1) 纤维素酶滤纸酶活测定

纤维素酶测定根据国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)推荐纤维素酶活测定方法^[107],一个纤维素酶滤纸酶活单位(FPU)定义为 50°C 时 1h 内从 50mg Whatman 滤纸中释放 2mg 还原糖所需酶量。主要步骤为:准确称取 50mg 滤纸于试管中,加入 1mL pH4.8 0.05M 柠檬酸缓冲液然后加入 0.5mL 适当稀释的酶液,于 50°C 水浴中反应 60min,后加入 3mL DNS 试剂并在沸水浴中煮沸 5min,然后取 0.2mL 显色液于 2.5mL 去离子水中混匀,于 540nm 下比色。实验中同时以缓冲液作背景,以滤纸和酶液分别作对照,并作出吸光度与葡萄糖浓度的标准曲线。

(2) 纤维二糖酶活测定

纤维二糖酶活测定亦根据国际应用化学联合会(IUPAC)推荐纤维素酶活测定方法^[107]并做了如下修改:酶活测定的反应体系包括 1mL 的浓度 80mM 的纤维二糖溶液(0.05M 柠檬酸缓冲液, pH 4.8)和 1mL 适当稀释的酶液,50°C 下反应 10min,用葡萄糖试剂盒测定产生的葡萄糖量。一个纤维二糖酶活单位(CBU)定义为每分钟从纤维二糖水解出 2 μ mol 葡萄糖所需的酶量。

4.1.4.6 蛋白含量测定(Bradford 法)

主要步骤为:取 Bradford 工作液 2mL 于试管中,然后加入待经适当稀释的待测样品 100 μ L,摇匀,反应 2min 后于 595nm 下测定其吸光度。

此法同时要以牛血清蛋白作标准曲线(图 1)。

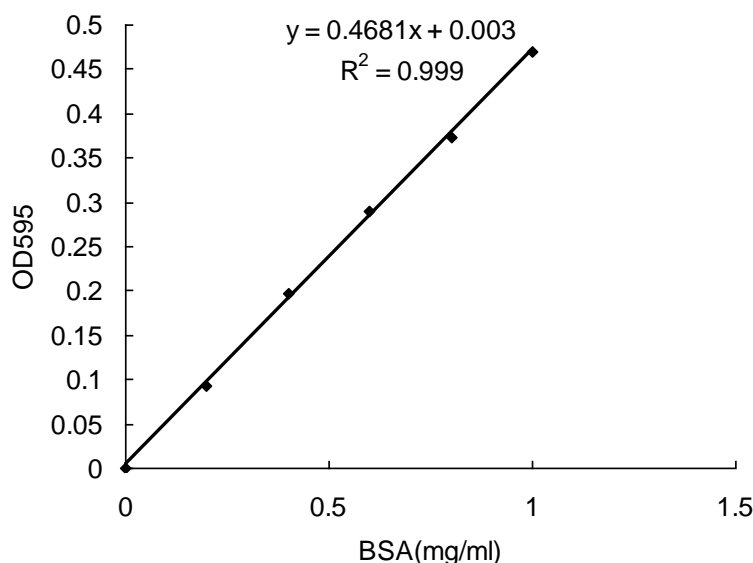


图 4.1 Bradford 法测蛋白含量标准曲线

Fig.4.1 Standard curve of protein in Bradford method

4.1.4.7 糖分析测定

水解过程产生的总还原糖通过 DNS (3, 5-二硝基水杨酸) 比色法测定。

水解过程生成的单糖和纤维二糖通过高效液相色谱(HPLC)测定(LC-20AD, 示差检测器 RID-10A, 岛津),色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H,柱温为 65°C,流动相为 5 mM

H₂SO₄ 流速为 0.6 mL/min。所有样品 3000r/m 下离心 3min，取上清液适当稀释后过 0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤。

4.2 实验结果与分析

4.2.1 固含量对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响

不同固体含量下 Accellerase1000 催化水解纤维素的情况如图 4.2 和表 4.3。随着时间的延长糖得率都逐渐升高，但增加的速度逐渐减缓。虽然在固含量较高时水解所得到的糖浓度比低固体含量时要高(表 4.3)，但在低固体含量时水解 24h 后葡萄糖得率较高，随着固体含量的增加葡萄糖得率逐渐降低。如在固体含量为 5% 时，24h 后葡萄糖得率为 24.3%，而在固体含量为 30% 时，其得率只有 17.3%。而纤维二糖与之相反，固体含量越高得率也越高。在固体含量分别为 5% 和 30% 时纤维二糖的得率分别为 2.41% 和 7.68%。但在糖化初期(0-2h)葡萄糖得率在各固体含量下，相差并不大。

表 4.3 不同固体含量下的滤纸经 Accellerase 1000 水解 6h 和 24h 后的糖浓度

Table 4.3 Sugars concentration at 6h and 24h of filter paper enzymatic hydrolysis by Accellerase 1000 at different solid content

时间(h)	6h				24h			
固含量(%)	5	15	25	30	5	15	25	30
葡萄糖(g/L)	8.28	25.9	47.9	52.3	14.1	37.2	65.9	81.7
纤维二糖(g/L)	1.28	6.38	20.7	24.7	1.34	4.36	21.1	34.6

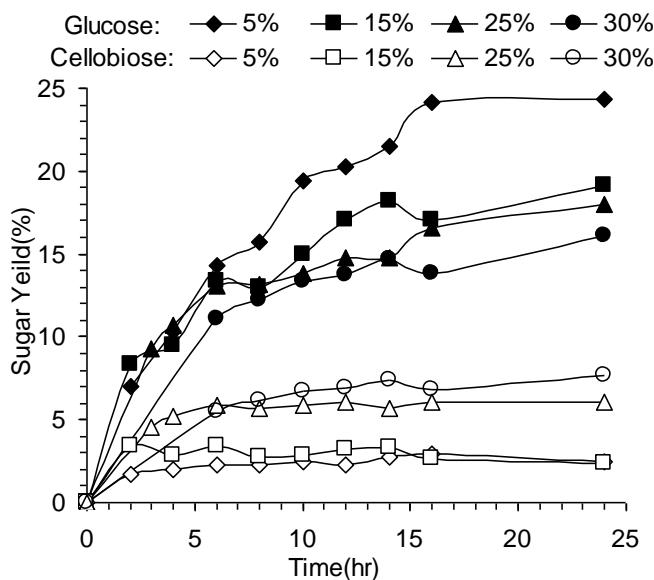


图 4.2 不同固含量下 Accellerase 1000 催化滤纸水解结果

Fig.4.2 Results of filter paper hydrolysis by Accellerase 1000 at different solid content

这主要可能是由于固体含量较高时，纤维素经酶水解后产生的糖浓度较高抑制了纤维二糖酶的活性，使得纤维二糖到葡萄糖的转化速率降低纤维二糖积累导致。同时随着时间的延长，纤维素酶由于剪切失活和热失活等原因，进一步降低了葡萄糖的得率。而

在水解初期,虽然糖浓度相差较大,但由于纤维素酶活性较高,同时高固含量时滤纸在反应初期还没全部补加到发酵罐中而纤维素酶则在反应开始时已全部加入,纤维素酶此时相对过量,因此糖得率也没有大的差别。

4.2.2 不同反应器中转速对 Accellerase 1000 催化纤维素水解的影响

在不同反应器和不同转速下 Accellerase 100 催化水解纤维素的情况如图 4.3,其中图 4.3 a)在带有螺带式搅拌桨的 2-L 生物反应器中进行,图 4.3b)为普通三角瓶,图 4.3 c)为改造三角瓶.相同转速下不同反应器中的滤纸水解情况差别不大,在水解 12h 后基本上都能得到相同的糖浓度.如转速为 50r/m 时,12h 后发酵罐,普通三角瓶和改造三角瓶葡萄糖得率分别为 14.24g/L, 14.44 g/L, 14.52 g/L。

而在不同的转速下,转速越高水解 12h 后葡萄糖与纤维二糖浓度越低,如在普通三角瓶中 50r/m 时葡萄糖浓度为 14.44g/L 而 200r/m 时为 10.84g/L,发酵罐中 50r/m 和 200r/m 时,水解 12h 后的纤维二糖分别为 1.30g/L 和 0.49g/L,但在反应初期,高转速和低转速下的糖浓度相差不大。

以上结果说明,在较低固含量(5%)较高酶量(15FPU/gDM)的条件下,传质问题可能已经不是影响纤维素酶水解的主要原因,相反由高转速引起的剪切强度增大从而加快了酶的失活成为限制酶水解的主要因素。

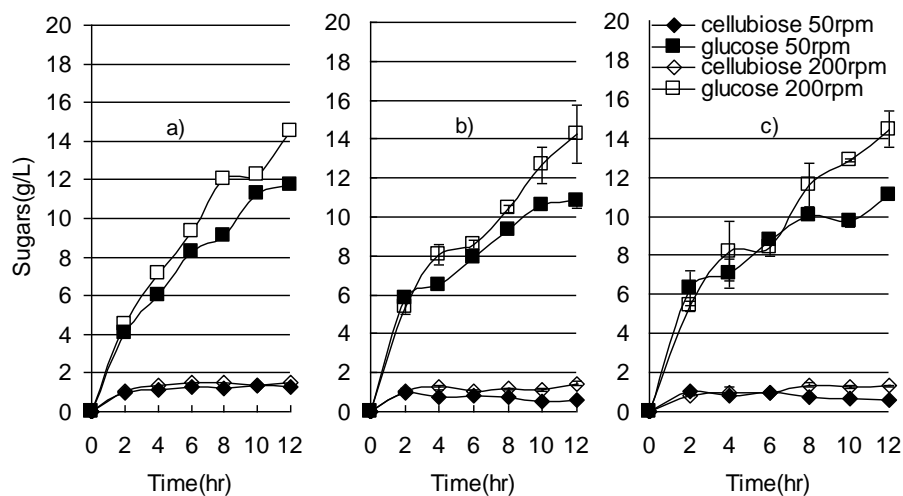


图 4.3 不同反应器不同转速下 Accellerase 1000 催化纤维素水解情况

Fig. 4.3 Filter paper hydrolysis at different rotation rates in different reactors by Accellerase 1000

4.2.3 不同酶量和固含量下转速对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响

在不同固体含量和不同加酶量的条件下转速对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响情况如图 4.4 其中图 4.4 a)为 5%固含量, 15FPU/gDM; 图 4.4b)为 10%固含量, 15FPU/gDM; 图 4.4 c)为 5%固含量, 3FPU/gDM。

在较低固含量下(5%),在较低酶量(3FPU/gDM)的条件下,随着转速的提高酶解 24h 后得到葡萄糖浓度逐渐降低,而纤维二糖却随之升高(图 4.4c),而在较低固含量(5%)高

加酶量(15FPU/gDM)的条件下, 酶解后的葡萄糖和纤维二糖浓度都随着转速的提高而降低(图 4.4a). 但在较高固含量(10%)的条件下, 随着转速的提高酶解后的葡萄糖浓度逐渐提高, 而纤维二糖的浓度随之降低(图 4.4b). 这可能是由于在较低固含量下, 相同转速下搅拌剪切比高固体含量下更强, 从而引起了纤维素酶失活加速。而在酶量较低的情况下, 高转速下纤维二糖的积累和葡萄糖的降低可能是由于 Accellerase 1000 中纤维二糖酶的失活速率高于纤维素酶中其它组分引起的。在固含量较高时, 低转速下混合较差会引起局部浓度过高而增大产物对纤维素酶的抑制作用, 但提高转速后可缓解此影响。

这说明, 在较低固含量(5%)的条件下传质已不是限制纤维素水解的主要因素, 纤维素酶的失活成为主导因素, 而在较高固含量(10%)的条件下, 提高转速可以使质量混合更加均匀, 从而降低了由于局部糖浓度过高引起的产物抑制情况, 因此在较高固含量条件下传质问题是影响纤维素水解的主要原因。

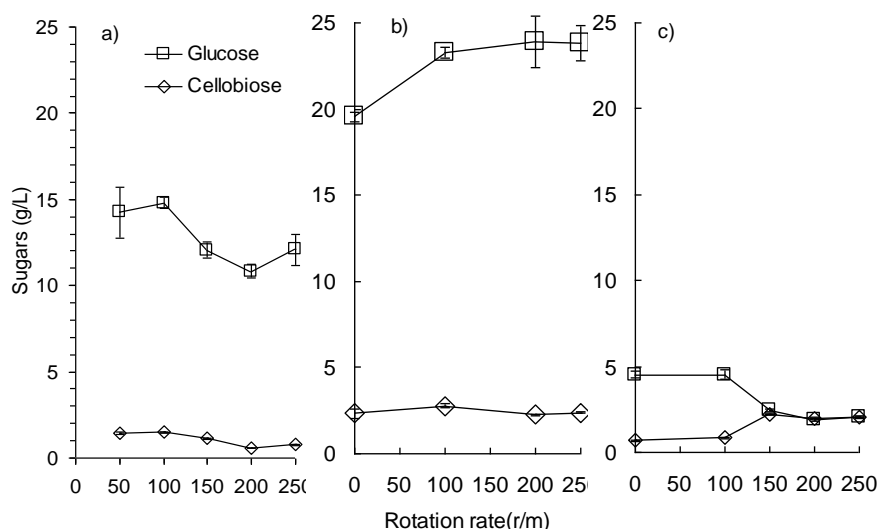


图 4.4 不同酶量和固含量下 Accellerase 1000 催化水解纤维素的情况

Fig. 4.4 Filter paper enzymatic hydrolysis at different cellulase loadings and solid contents by Accellerase 1000

4.2.4 温度对 Accellerase 1000 催化水解纤维素的影响

不同温度下 Accellerase 1000 催化水解纤维素的结果如图 4.5, 从图中可以看出, 在温度一定时, 随着时间的延长葡萄糖的浓度都逐渐增加, 且增加速率逐渐降低。随着温度的提高, 相同时间内温度较高时产生的葡萄糖较多, 在低于纤维素酶的最佳温度(50°C)时, 提高温度有利于增加纤维素的最终的转化率和初期的葡萄糖产生速率。在高于最佳温度时, 提高温度有利于增加初期葡萄糖产生速率, 使达到最大糖浓度的时间缩短, 但之后葡萄糖几乎没有增加, 可能是由于失活加快的原因。

从此结果中可以看出, 较高的温度是有利于提高纤维素酶的催化速率的, 但失活也会加快, 因此获得耐高温纤维素酶对提高水解速率, 缩短水解时间是有利的。

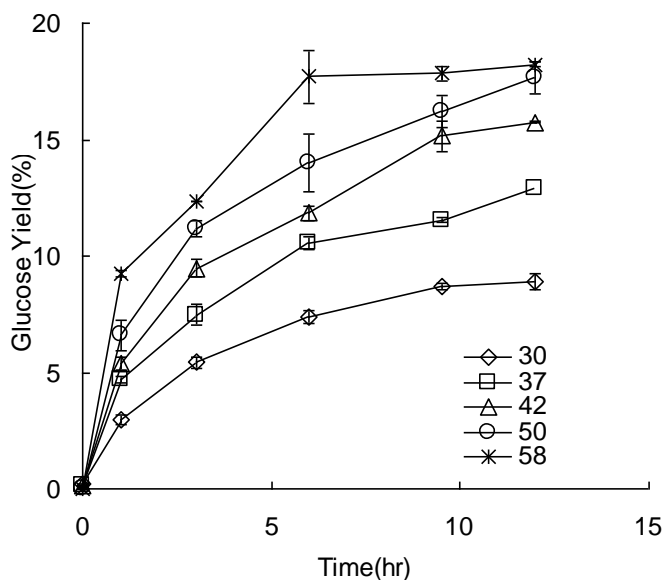


图 4.5 不同温度下 Accellerase 1000 催化水解纤维素的情况

Fig.4.5 Filter paper enzymatic hydrolysis by Accellerase 1000 at different temperatures by Accellerase 1000

4.2.5 不同纤维素酶在缓冲液中失活情况

三种商业用纤维素酶(Accellerase 1000, Spezyme CP) 和纤维二糖酶(Novozyme 188) 在缓冲液中的失活情况如图 4.6, 从图中可以看出, 三种纤维素酶的滤纸酶活随时间逐渐降低, Accellerase 1000 (A1000) 的失活速率较 Spezyme CP (CP)快(图 4.6, a)。Spezyme CP 与 Novozyme 188 混合(CP+188)后的酶活较单纯的 Accellerase 1000 和 Spezyme CP 高, 可能是由于酶活测定时产生的葡萄糖相对较多增大了酶活测定时的吸光度, 或由于 Novozyme 188 中具有少量的纤维素酶滤纸酶活引起。从图 4.6 a)中还可以看出, 在初期个纤维素酶的失活速率较快, 而随着时间延长, 失活速率逐渐变慢,

三种纤维素酶的纤维二糖酶活随时间变化见图 4.6, b), 由于 Spezyme CP 中的纤维二糖酶活很低, 故实验中没有测定单纯的 Spezyme CP 的纤维二糖酶失活曲线。从图中可以看出, Novozyme 188 (188) 和 Spezyme CP 与 Novozyme188 的混合物(CP+188) 在缓冲液中的失活并不明显, 说明其在最佳 pH 缓冲液中具有较强的稳定性。而 Accellerase 1000 中的纤维二糖酶的稳定性相对较低, 随着时间的延长, 酶活降低较大。

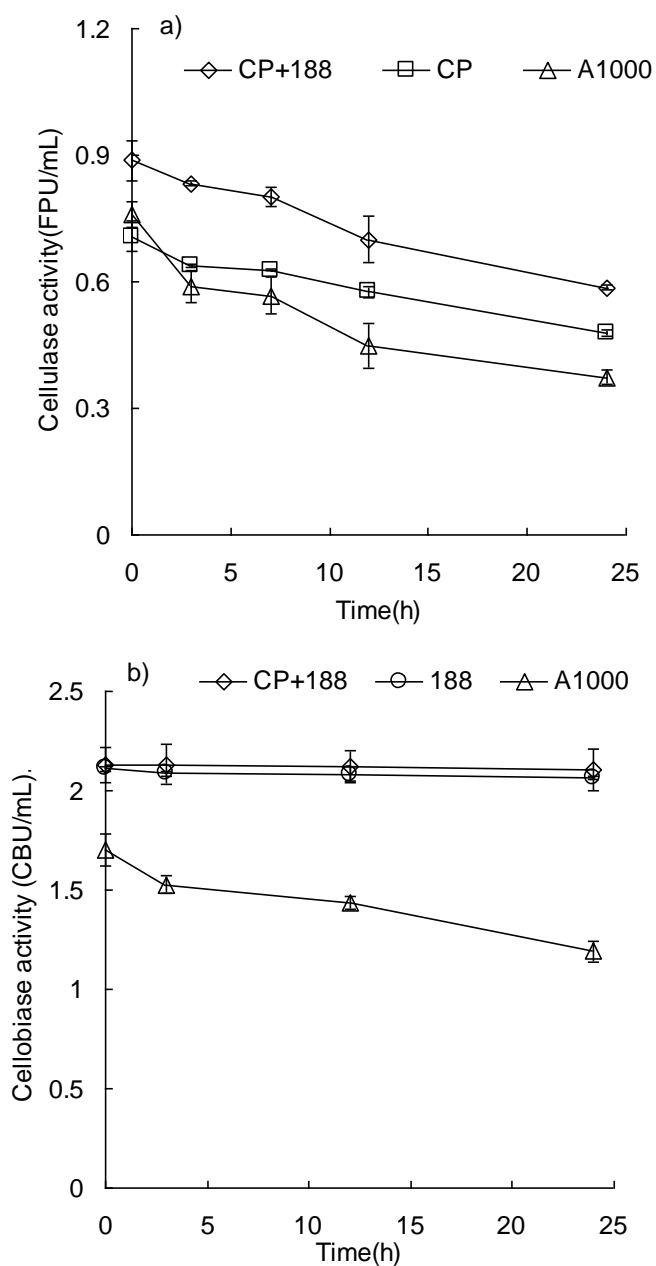


图 5 纤维素酶在 pH5.0 醋酸缓冲液中的失活情况

Fig. 4.6 Deactivation of cellulases in the acetate buffer (pH 5.0)

图 4.7 为各缓冲液中可溶性蛋白的含量变化，从图中可以看出，不同的酶液中蛋白的浓度并不相同，Spezyme CP 中的蛋白含量要远高于 Accellerase 1000 和 188，而 Novozyme188 中的蛋白含量最低。从图中还可看出，随着时间的延长，各缓冲液中的可溶性蛋白逐渐减少，且在初期蛋白含量降低较快，而随着时间延长，逐渐变慢，这是说明随着时间的延长，缓冲液中的蛋白质发生了变性失活。

此结果说明,不同的纤维素酶的在缓冲液中的稳定性是不同的,酶活都随着时间的延长而降低,但幅度不同,因此在酶水解过程中选择稳定性较高的纤维素酶是很有必要的。

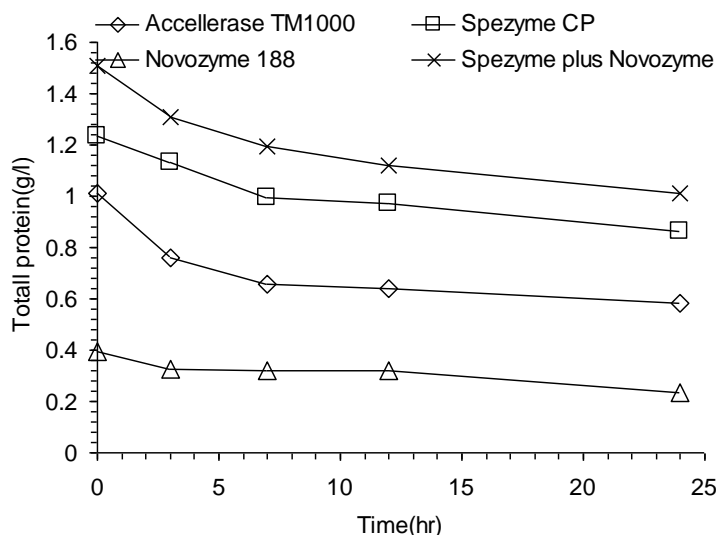


图 4.7 各纤维素酶在 pH5.0 醋酸缓冲液中的可溶性蛋白变化情况

Fig. 4.7 Time course of soluble protein during the deactivation of cellulases in acetate buffer (pH5.0)

4.2.6 不同纤维素酶在木质素存在的缓冲液中失活情况

在木质素存在下,纤维素酶的失活趋势和在单纯的缓冲液中类似,总滤纸酶活随时间逐渐降低,同样 Accellerase 1000 的失活速率比 Spezyme CP 快(图 7a)且酶的失活主要发生在前 6h 内,随着时间的延长失活速率逐渐降低。纤维二糖酶活也同样随着时间的延长而降低,且 Accellerase 1000 的纤维二糖酶失活速率比 Novozyme 188 快(图 7b)。

与在单纯的缓冲液中相比,在木质素存在下纤维素酶滤纸酶活在 24h 内的平均失活速率较慢,如在 24h 时 Spezyme CP 和 Accellerase 1000 的残存酶活分别为 70.56FPU/mL 和 0.47FPU/mL(图 7b),而在单纯的缓冲液中分别为 0.48FPU/mL 和 0.36FPU/mL,而纤维二糖酶活失活速率比在缓冲液中快(图 5b)。这可能主要由于木质素对纤维素酶的吸附对纤维素酶有一定的保护作用,从而减小了失活速率,而对于纤维二糖酶,由于木质素固体颗粒的存在增大了剪切强度,其失活速率加快。

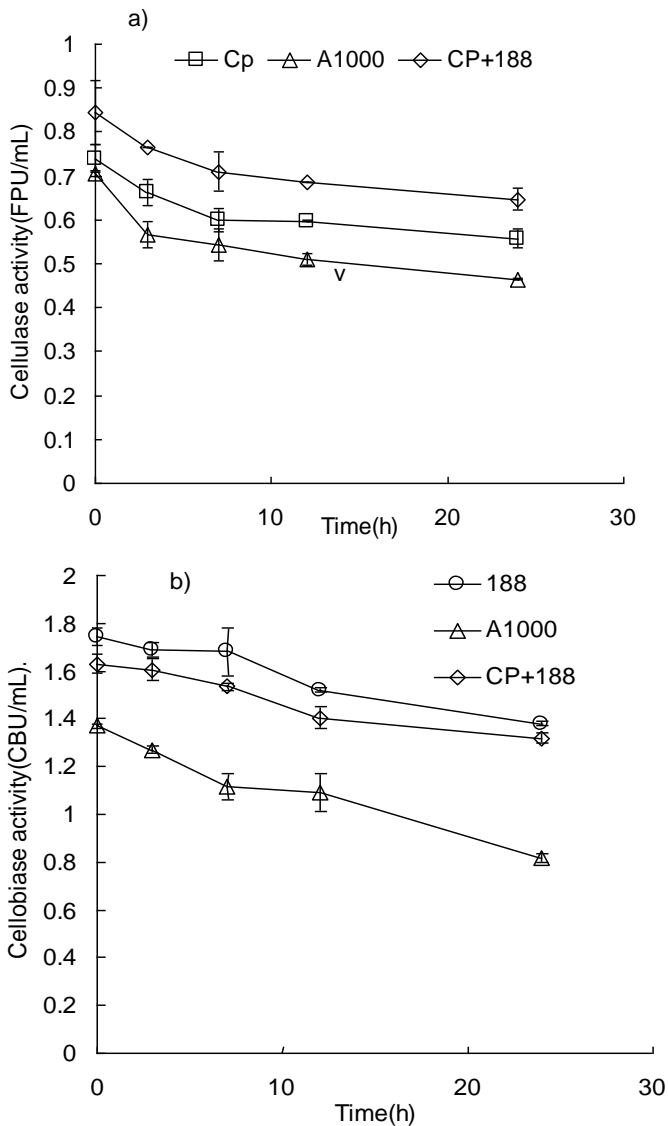


图 4.8 不同纤维素酶在木质素(5%)存在的 pH5.0 醋酸缓冲液中失活情况

Fig. 4.8 Deactivation of cellulases in acetate buffer (pH5.0) with lignin of 5%

4.2.7 不同纤维素酶在在滤纸水解过程中失活情况

在以滤纸为底物水解过程中的纤维素酶失活情况如图 4.9a), 3h 时的酶活为稀释 2 倍后的测定结果, 其它点为稀释 6 倍后的测定结果。从图中可以看出随着时间的延长, 滤纸水解过程中纤维素酶活逐渐降低, 且失活速率在前 6h 内最快, 在超过 6h 基本不变。在 3h 所测酶活极低, 主要是因为测定时稀释倍数太小, 水解过程中产生的还原糖抑制了纤维素酶的活性, 这也表明产物抑制是纤维素酶水解过程中的重要影响因素, 甚至在反应初期就可以将酶活抑制在较低的水平。

三种酶相比, Spezyme CP 与 Novozyme 188 的混合物在酶活上要比单纯的 Spezyme CP 和 Accellerase 1000 高, 失活速率也较慢, 而 Accellerase 1000 的失活速率最快。

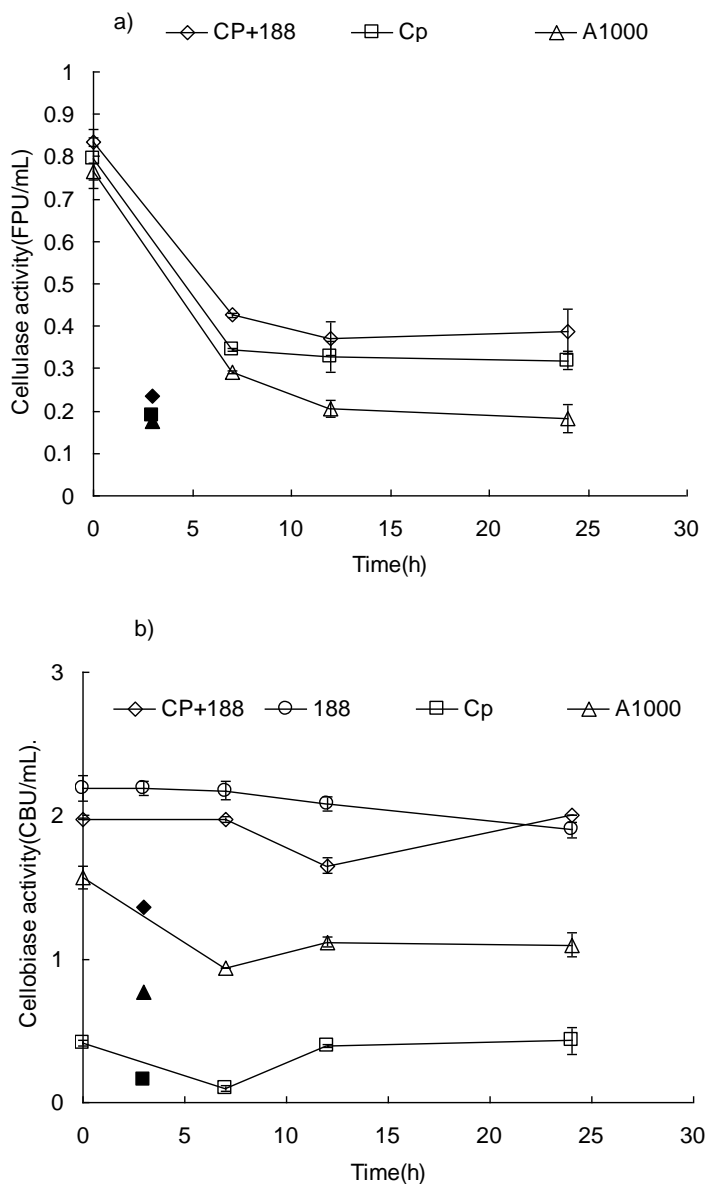


图 4.9 不同纤维素酶在滤纸(5%)水解过程中失活情况

Fig. 4.9 Deactivation of cellulases during filter paper hydrolysis at solid content of 5%

滤纸水解过程中的纤维二糖酶失活情况如图 4.9b), 其酶活降低同样随时间延长而降低, 但并没有纤维素酶那样迅速。三种酶相比, Novozyme 188 和 Spezyme CP 相对失活较慢, 而 Accellerase 1000 失活则较快。

三种酶水解过程中产生的还原糖和葡萄糖情况如图 4.10, 从图中可以看出, Spezyme

CP 与 Novozyme 188 的混合物产生的总还原糖和葡萄糖的总量和产生速率都高于单纯的 Spezyme CP 和 Accellerse1000, 而 Accellerse 1000 中虽然初始纤维二糖酶活的比 Spezyme CP 高的多, 但产生的葡萄糖量却仅略高于 Spezyme CP, 说明 Accellerse 1000 中的纤维二糖更容易失活或收到产物的抑制。

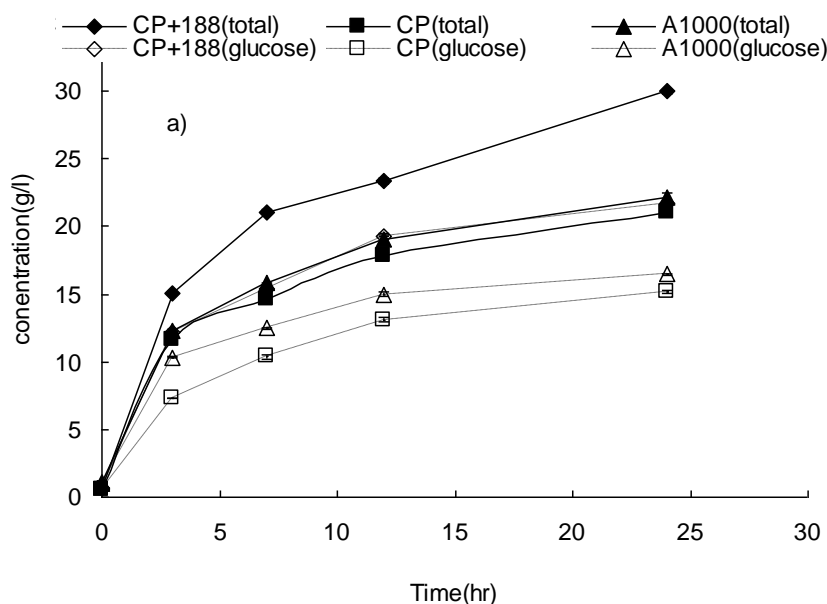


图 4.10 不同纤维素酶在滤纸水解过程中糖的产生情况

Fig. 4.10 Sugars production during the filter paper hydrolysis by different cellulases.

4.2.8 纤维素酶在水解过程中的葡萄糖抑制情况

初始葡萄糖对纤维素酶水解过程中的抑制情况如图 4.11, 从图中可以看出, 随着初始葡萄糖浓度的增加, 在水解相同时间后产生的葡萄糖的量大大减少, 在初始葡萄糖浓度为 50g/L 时, Accellerse1000 和 Spezyme CP 产生的葡萄糖量分别仅相当于初始不加葡萄糖的 57.8% 和 69.2%, 当初始葡萄糖浓度增加到 200g/L 时产生的葡萄糖量就更少了(图 4.11a), 从图 10b 中可以看出, 随着初始葡萄糖浓度的增加, 其对纤维素酶的抑制程度也增加, 当初始葡萄糖浓度达到 100g/L 时期对 A1000 和 CP 的抑制程度就已分别达到 50% 和 56%。

这说明初始加入的葡萄糖对纤维素酶产生很大抑制作用, 且葡萄糖浓度越高, 抑制效果跟明显。

从图中还可以看出, Spezyme CP 与 Accellerase 相比在初始葡萄糖浓度较低时其受到的抑制程度较低, 而 Accellerase 1000 受到的葡萄糖的抑制在初始葡萄糖浓度较低时所受到的抑制就较强。

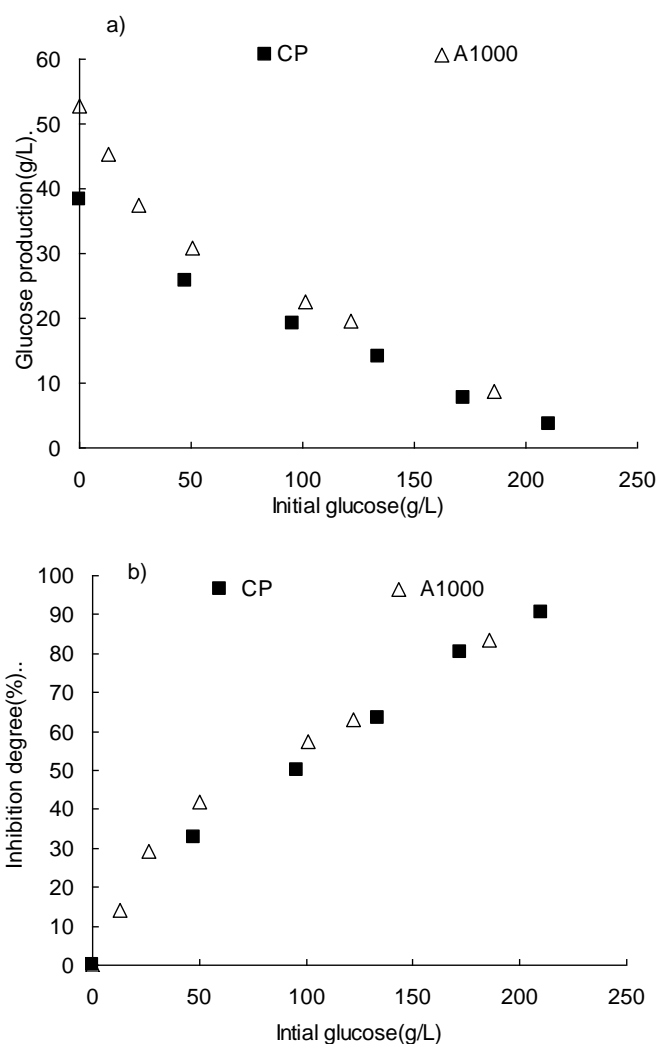


图 4.11 葡萄糖对不同纤维素酶催化滤纸酶水解的抑制情况

Fig. 4.11 Glucose inhibition on filter paper enzymatic hydrolysis with different cellulases.

4.3 结论

通过本部分实验我们考查了固体含量、温度、转速、酶量、反应器类型等对纤维素酶水解的影响，同时对比了纤维素乙醇中三种最常用的工业纤维素酶在游离状态下，木质素吸附状态下及水解过程中的失活的情况，而且考查了葡萄糖对两种纤维素酶的抑制情况。

酶水解固体含量对最终糖浓度较高和纤维素的转化率都有很大影响，这主要涉及到体系的混合状况和酶的抑制情况，因此在实际水解过程中选择合适的固含量是很重要的。

在固体含量较低的情况下，不同反应器中的水解情况是基本相同的，但转速却能影

带格式的：字体颜色：自动设置

响纤维素的酶解效率，低固体含量下提高转速是不利于最终的酶解得率的，而在高固体含量下，提高转速却是很有必要的，酶量对纤维素的酶解效果影响最为直接，且低酶量时纤维素酶受剪切作用而失活的现象更加明显。

在低于纤维素酶的最适温度或稍高于最适温度时，纤维素酶都具有活性，但水解速率不同，适当提高温度是有助于加快纤维素水解速率缩短水解时间的。

不同纤维素酶在不同存在状态下的失活情况是不同的，在游离状态下纤维素酶似乎更容易失活，在纤维素水解过程中纤维素酶的失活也是很明显的，在初期失活速率是最明显的，随着时间的延长失活速率会降低。

纤维素酶受葡萄糖的抑制作用是非常明显的，葡萄糖浓度越高抑制越明显，且不同的纤维素酶受到的抑制情况不同。

因此，在通过酶水解的方法水解纤维素的时候，必须要选择合适的固体含量，温度，转速，酶量及反应器，在选纤维素酶时既要考虑其活力大小同时还要考虑其稳定性和耐抑制性等情况，本文对以上条件进行了探讨对木质纤维素酶水解具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 李建政, 汪群慧. 废物资源化与生物能源. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [2] Lokhorst, A. and Wildenborg T. Introduction on CO₂ Geological Storage-Classification of storage options. *Oil Gas Sci Technol-Rev IFP*. 2005, 60(3): 513-515
- [3] 骆光林, 赵匀. 农业工程技术创新与可持续农业. *农业工程学报*. 1999, 15(1): 22-26
- [4] 于泊藁, 吕树芳, 马建薇, 何钟健, 张海领. 能源工业固体废物粉煤灰基净水剂的研制. *河北大学学报(自然科学版)*. 2009, 29(5): 518-522
- [5] 孙君社, 苏东海, 刘莉. 秸秆生产乙醇预处理关键技术. *化学进展*. 2007, 19(7): 1122-1128
- [6] 于永庆. 固体废弃物资源化利用现状和措施. *黑龙江科技信息*. 2009, (17): 192-192
- [7] 晏晓红. 农业固体废物回收及利用. *江西化工*. 2009, 3: 32-35
- [8] 王丰华, 陈庆辉. 生物质能利用技术研究进展. *化学工业与工程技术*. 2009, 30(3): 32-35
- [9] 孙振钧. 中国生物质产业及发展取向. *农业工程学报*, 2004, 20(5): 1-5
- [10] Holtzapple, M.T. Chapters cellulose, hemicellulose, and lignin. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.). *Encyclopedia of Food Science, Food technology, and Nutrition*. Academic Press, London. 1993
- [11] 刘爱兵, 刘星剑. 生物质能的利用现状及展望. *江西林业科技*. 2006, (4): 37-40
- [12] 王长贵. 新能源和可再生能源的分类. *太阳能*. 2003, (1): 14-15
- [13] 高洁, 汤烈贵. 纤维素科学. 北京: 科学出版社. 1996, 183-189
- [14] 蒋剑春. 生物质能源应用研究现状与发展前景. *林产化学与工业*. 2002, 22(2): 75-80
- [15] 张益, 胡惠仁, 石淑兰. 半纤维素的应用. *天津造纸*. 2006, 28(2): 16-18
- [16] 江苏省轻化工业厅纤维水解研究所. 植物纤维水解和生产. 北京: 燃料化学工业出版社, 1974
- [17] 罗承先. 世界生物乙醇产业发展现状. *中国石化*. 2007, (12): 43-45
- [18] 张扬健, 向威达, 周涛, 雷家辅. 我国燃料乙醇发展现状和趋势分析. *中国能源*. 2009, (1): 31-33
- [19] 孙智谋, 周旭, 刘丽萍. 生物质能源的研究与发展. *粮食与饲料工业*. 2009, (2): 1-3
- [20] 龚德词. 生物乙醇的生产与发展. *当代化工*. 2009, (2): 178-181
- [21] 钱伯章, 朱建芳. 纤维素乙醇发展前景和我国的进展. *化学工业*. 2009, 10: 13-16
- [22] Merino, S.T. and Cherry, J. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, (108): 95-120
- [23] 李稳宏, 吴大雄, 高新, 刘蓬军, 王梅兰, 李宝璋. 麦秸纤维素酶解法产糖预处理过程工艺条件. *西北大学学报(自然科学版)*. 1997, 27(3): 227-230

- [24] Lynd, L.R., Elander, R.L., Wyman, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Appl. Biochem Biotechnol.* 1996, (57/58): 741-761.
- [25] Lin, K.W., Ladisch, M.R., Schaefer, D.M., Noller, C.H., Lechtenberg V. and Tsao G.T. Review of effect of pretreatment on digestibility of cellulosic materials. *AIChE. Symp. Series.* 1981, 207:102-106
- [26] Grohmann K., Torget R., and Himmel M. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 1985, 15:59-80
- [27] Chum, H.L., Johnson, D.K., Black, S., Baker, J., Grohmann, K., Sarkanen, K.V., Wallace, K., and Schroeder, H.A. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 31:643-649.
- [28] Koullas, D.P., Christakopoulos, P.F., Kekos, D., Koukios, E.G. and Macris, B.J. Effect of alkali delignification on wheat straw saccharification by *Fusarium-oxysporum* cellulases. *Biomass Bioenergy.* 1993, 4:9-13
- [29] McMillan, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. In: Himmel, M.E., Baker, J.O. and Overend, R.P. (eds). American Chemical Society, Washington, DC, 1994, pp. 292-324.
- [30] Yang, B., Wyman, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* 2008, (2):26-40
- [31] Galbe, M., Zacchi, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv BioChem Engin Biotechnol.* 2007, (108): 41-65
- [32] Sheehan, J. The road to bioethanol. A strategic perspective of the US Department of Energy's National Ethanol Program. In: Himmel, M. E., Baker, J.O, Saffler, J.N. (eds). *Glycosyl hydrolases for biomass conversion.* American Chemical Society, Washington DC, 2001, pp 2-25
- [33] Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. and Lee, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 2005, 96(18):1959-1966
- [34] Ladisch, M.R., Ladisch, C.M., and Tsao, G.T. Cellulose to sugars-new path gives quantitative yield. *Science.* 1978, 201:743-745
- [35] Yang, B., Willies, D.M., and Wyman, C.E. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of avicel cellulose with conversion. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 94(6):1122-1129.
- [36] Yang, B., and Wyman, C.E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 94(4):611-617.
- [37] Reese, E.T., Siu, R.G.H., and Levinson, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 1950, 59(4):485-497
- [38] Ladisch, M.R., Gong, C.S., and Tsao, G.T. Cellobiase hydrolysis by endoglucanase (glucan-glucanohydrolase) from *Trichoderma reesei*: kinetics and mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 1980, 22(6):1017-1126
- [39] Dekker, R.F.H. Kinetic, inhibition, and stability of a commercial β -glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of

- lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, 28(9):1438-1442.
- [40] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 李志义. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展. *石油与天然气化工.* 2007, (6):452-461
- [41] Cardona, C.A., and Sanchez, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 2007, 98(12):2415-2457
- [42] Wyman, C.E., Spindler, D.D., and Grohmann, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass. Bioenergy.* 1992, 3(5):301-307
- [43] Hinman, N.D., Schell, D.J., Riley, C.J., Bergeron, P.W., and Walter, P.J. Preliminary estimate of the costs of ethanol production for SSF technology. *Appl. BioChem. Biotechnol.* 1992, 1(34/35): 639-649
- [44] Zhang, J., Chu, D.Q., Huang, J., Yu, Z.C., Dai, G.C., and Bao, J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at high corn stover solids loading in a Helical stirring Bioreactor. *Biotchnol. Bioeng.* 2010, 105(4):718-728
- [45] Huang, S.Y., and Chen, C.Y. Ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with temperature profiling. *J. Ferment. Technol.* 1988, 66(5): 509-516
- [46] Eklund R., Galbe M., and Zacchi G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme. Microb. Technol.* 1990, 12(3): 225-228
- [47] Spindler, D.D., Wyman, C.E., Mohagheghi, A., and Grohmann, K. Thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. BioChem. Biotechnol.* 1988, 17(1-3): 279-293
- [48] Chandrakant, P., and Bisaria, V.S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1998, 18(4):295-331
- [49] Alkasrawi, M., Eriksson, T., Borjesson, J., Wingren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., and Zacchi, G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme. Microb. Technol.* 2003, 33(1):71-78
- [50] Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., and Wu, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol. Progr.* 2005, 21(3): 816-822.
- [51] 孙亚东, 蒋建新, 孙冉, 齐祥. 纤维乙醇及渗透汽化原位分离技术研究进展. *研究与探讨.* 2008, 30(9):17-21
- [52] 杨长军, 汪勤, 张光岳. 木质纤维素原料预处理技术研究进展. *酿酒科技.* 2008, (3):85-90
- [53] 王许涛, 周恒涛, 张百良. 秸秆生产乙醇的预处理方法分析. *安徽农业科学.* 2007, 35(22): 6883-6884, 6886
- [54] 李静, 杨红霞, 杨勇. 微波强化酸预处理玉米秸秆的乙醇化工艺的研究. *农业工程学报.* 2007, 23(6): 199-202.

- [55] 谷洪春, 顾永宝. 电子束辐射加工研究进展. 原子核物理评论. 1997, (3): 195-188
- [56] Grohmann, K., Mitchell, D., Himmel, M., and Dale, B. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989, 20/21(1):45-61.
- [57] Knappert, D., Grethlein, H., and Converse, A. Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1980, 22(7):1449-1463.
- [58] Yang, B. and Wyman, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 86(1):88-98
- [59] Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., and Osborne, J.A. comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of corn stalks. *Bioresour. Technol.* 2007, 98(16): 3000-3011.
- [60] Varga, E., Szengyel, Z., and Réczey, K. Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 98/100(1-9):73-87
- [61] Kaar, W.E., and Holtzapple, M.T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass. Bioenergy.* 2000, 18(3):189-199.
- [62] Kim, S., and Holtzapple M.T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 2005, 96(18): 1994-2006
- [63] Varga, E., Schmidt, A.S., Réczey K., and Thomsen, A.B. Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. *Appl. BioChem. Biotechnol.* 2003, 104(1):37-50
- [64] 徐忠, 汪群慧, 姜兆华. 氨预处理大豆秸秆纤维素酶解产糖影响的研究. *高校化学工程学报.* 2004, 18(6): 773-776.
- [65] Kim, T.H, and Lee, Y.Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresour. Technol.* 2005, 96(9): 2007-2013
- [66] Dadi, A.P., Varanasi, S., and Schall, C.A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 95(5): 904-910
- [67] 陈洪章, 李佐虎. 无污染秸秆汽爆新技术及其应用. *纤维素科学与技术.* 2002, 10(3): 47-51.
- [68] 罗鹏, 刘忠. 蒸汽爆破法预处理木质纤维原料的研究. *林业科技.* 2005, 30(3): 53-56
- [69] Dale, B.E., and Moreira, M.J. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 1982, 12:31-44
- [70] Dale B E, Henk L L, Shiang M. Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. *Dev. Ind. Microbiol.* 1985, 26:223-233
- [71] Laser, M., Schulman, D., Allen, S., Michael, J., and Lynd L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 2002, 81(1):33-44
- [72] Tengerdy, R.P., and Szakacs, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2003, 13(2-3):169-179.

- [73] Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., and Kim, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2004, 91(2):153–156.
- [74] Thayer, A.M. Solid state concerns spur plastic recycling efforts (in the US) *Chem. Eng. News.* 1989, 67:7-15
- [75] Rathje, W.S. Once and future landfills. *Natl. Geogr. Mag.* 1991, 179:116-134
- [76] Van Wyk J.P.H. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends. Biotechnol.* 2001, 19(5):172-177.
- [77] Terasawa, M. Paper recycling promotion center. *Paper Recycling Handbook.* <http://www.prpc.or.jp/index.html>. 2005
- [78] Ikeda, Y., Park, E.Y., and Okuda, N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 2006, 97(8):1030-1035.
- [79] Wayman, M., Chen, S., and Doan, K. Technical Note-Production of fuel ethanol from the waste paper in garbage. *Process. Saf. Environ. Prot.* 1993, 71:141-143.
- [80] Scott, C.D., Davison, B.H., Scott, T.C., Woodward, J., Dees, C., and Rothrock, D.S. An advanced bioprocessing concept for the conversion of waste paper to ethanol. *Appl. Biotechnol. Bioeng.* 1994, 45(1):641-653.
- [81] Marques, S., Santos, J.A.L., Francisco, M.G., and Roseiro, J.C. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2008, 41(3):210-216.
- [82] Smook, G.A. (translated by Cao BW). *Handbook for Pulp and Paper Technologists*, second ed. Beijing: China Light Industry Press. 2001.
- [83] Park, E.Y., Michinaka, A., and Okuda N. Enzymatic Hydrolysis of Waste Office Paper Using Viscosity as Operating Parameter. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17(2):379-382
- [84] Nikolov, T., Bakalova, N., Petrova, S., Benadova, R., Spasov, S., and Kolev, D. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresour. Technol.* 2000, 71(1):1-4.
- [85] Viesturs, U., Leite, M., Eisimonte, M., Eremeeva, T., and Treimanis, A. Biological deinking, technology for the recycling of office waste papers. *Bioresour. Technol.* 1999, 67(3):255-265
- [86] Kojima, Y., and Yoon, S.L. Improved enzymatic hydrolysis of waste paper by ozone pretreatment. *J. Mater. Cycles. Waste. Manage.* 2008, 10(2):134-139.
- [87] Van Wyk J.P.H. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass Bioenergy.* 1999, 16(3): 239-242
- [88] Park, E., Ikeda, Y., and Okuda, N. Empirical evaluation of cellulase on enzymatic hydrolysis of waste office paper. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2002, 7(5): 268-274
- [89] Li, C.Z., Yoshimoto, M., Ogata, H., Tsukuda, N., Fukunaga, K., and Nakao, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. *Ultrason. Sonochem.* 2005, 12(5):373-384

- [90] Wood, B.E., Aldrich, H.C., and Ingram, L.O. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnol. Progr.* 1997, 13(3):232-237
- [91] Wu, J., and Ju, L.K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnol. Progr.* 1998, 14:649-652.
- [92] 侯金淑, 袁兴中, 曾光明, 阿依汗, 刘佳, 佟婧怡. 利用废报纸同步糖化发酵生产乙醇的研究. *食品与发酵工业.* 2006, 32 (10): 66-69
- [93] Zheng, Y., Lin, H.M., and Tsao, G.T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Progr.* 1998,14(4):890-896.
- [94] Pierre, B., and Jean, P.A. The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* 1994, 13 (1):25-58.
- [95] 吴显荣, 穆小民. 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向. *生物工程进展*, 14(4): 25-27
- [96] Zhang ,H.Y., and Lynd, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2004b, 88(7):797-824.
- [97] Zhang, Y.H., Himmel, M.E., and Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24(5):452-481
- [98] Hoshino, E., Kanda, T., Sasaki, Y. and Nisizawa, K. Adsorption mode of exo-cellulases and endo-cellulases from *irpex-lacteus* (*Polyporus, Tulipiferae*) on cellulose with different crystallinities. *J. Biochem.* 1992, 111(5):600-605.
- [99] Sewalt, V.J.H., Glasser, W.G., and Beauchemin, K.A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. *J. Agric. Food. Chem.* 1997, 45(5):1823-1828.
- [100] Kong, F., Engler, C.R., and Soltes, E.J. Effects of cell wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Appl. Biochem Biotechnol.* 1992, 34/35(1):23-35.
- [101] Hoshino, E., Shiroishi, M., Amano, Y., Nomura, M., and Kanda, T. Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, 84(4):300-306.
- [102] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Golden, CO, USA, 2006
- [103] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Golden, CO, USA, 2008
- [104] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden, CO, USA, 2004.
- [105] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Golden, CO, USA, 2008
- [106] Okada, G. Purification and Properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 1985, 49(5):1257-1265.
- [107] Sharma, S., Sandhu, D.K., and Bagga, P.S. Physical characterization of isozymes of

endo-beta-1,4-glucanase and beta-1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991, 63(1):99-104.

[108] Yoshigi, N., Taniguchi, H., and Sasaki, T. Purification and properties of a new endo-cellulase from *Robillarda* sp. Y-20. *Agric Biol. Chem.* 1988, 52(6):1389-1396.

[109] Kumar, R., and Wyman, C.E. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102(6):1544-57.

[110] Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure. Appl. Chem.* 1987, 59(2):257-268.

致谢

本论文是在恩师鲍杰教授的悉心指导下完成的，鲍老师在学术上严谨求实，一丝不苟，在工作中兢兢业业，拼搏进取。为我的实验和论文付出了巨大的心血，在研究思路及试验方案和研究方法的制定上给予了关键性的指导，在论文的撰写中，进行了仔细地审阅和修改。同时在生活中也给予了我莫大的帮助和鼓舞。鲍老师严谨治学的态度和忘我的工作精神深深地感染我，激励着我。非常感谢三年来鲍老师老师在学习、工作和生活中对我的关怀、照顾和栽培，祝愿鲍老师在学术上取得更高的成就！

感谢辛秀娟副教授、胡凤仙老师的指导和帮助，以及他们对我的关心和教育。感谢董宏伟师兄、张建师兄、楚德强师兄在实验中对我的建议和帮助，感谢张怀庆，黄潇，刘建明，李传航，邢恒维，刘威，赵凯，国力浩，罗紫臣等在实验中给予的帮助，本文中的预处理实验都是在他们的参与下共同完成的。感谢本实验室其它同学的关心和帮助，感谢华东理工大学生物工程学院和化工学院，以及生物反应国家重点实验室其它的老师，师兄师姐，师弟，师妹和同学对我的帮助。

还要特别感谢女友李欣，感谢她对我的支持，鼓励和在生活中无微不至的关怀。

同时特别感谢我的父母对我的养育之恩，以及一直以来对我的鼓励和帮助，使我顺利完成学业。

最后还要向所有关心我的老师、同学、亲戚、朋友表示衷心的感谢！