

分类号: _____ 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

农作物来源木质纤维素生物转化

制备多元醇和乙醇的工程研究

方镇宏

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

张小希 高级工程师 吉林燃料乙醇有限公司

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

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: (姓名、职称)

评阅人: (姓名、职称)

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

农作物来源木质纤维素生物转化制备多元醇和乙醇的工程研究

摘要

本文针对两种不同类型的木质纤维素生物质从工业应用的角度进行了生物转化研究,并提出了工业应用的初步方案。首先,以玉米秸秆为原料,通过干式预处理和基于成本计算的酶水解过程获得低成本秸秆糖,进而通过秸秆糖的加氢裂解转化为丙二醇、乙二醇等多元醇产品。其次,以木薯块茎中的纤维素组分为对象,从纤维素酶成本角度评估了三种利用木薯纤维素组分发酵生产乙醇的方法,提出了木薯纤维素工业应用的最优方案。

在秸秆糖转化多元醇研究上,本文对秸秆除尘环节、稀酸预处理及纤维素酶水解环节、氢解环节进行了深入的研究。结果表明:在秸秆前处理除尘环节,不同清洗程度秸秆原料对糖化得率和乙醇得率有重要影响,说明尽可能彻底地脱除秸秆中的灰分有助于增大稀酸预处理的强度;在预浸固液比 1:1、硫酸用量 5%、反应温度 190 °C、反应 3 分钟的预处理条件下,玉米秸秆的糖化得率最为理想;在反应温度 50 °C 和较大范围的 pH (4.2-5.8) 条件下都有较高的糖得率;提高反应器搅拌强度明显提高糖化反应速率,但最终的糖得率相差不大。通过酶成本、浓缩成本、物料成本的分析,得到了最低成本的秸秆糖制备工艺;将秸秆糖用于加氢裂解制取多元醇,逐步进行脱色、除离子等精致步骤,丙二醇收率提高至 48%,最终裂解效果与纯葡萄糖无明显差异。目前,秸秆糖制备多元醇技术已经初步应用于工业生产。

在木薯纤维素利用研究上,从纤维素酶成本角度评估了三种利用木薯纤维素组分发酵生产乙醇的方法,包括木薯纤维素酒渣的直接糖化和乙醇发酵、木薯纤维素酒渣预处理后的糖化与乙醇发酵、木薯淀粉与纤维素同步糖化与乙醇发酵。结果表明,前两种方法的纤维素利用效率不高,酶成本分别达到 13602、11659 元/吨乙醇。第三种方法发酵结束时的乙醇浓度从 101.5 g/L 提高到 107.0 g/L,生产每吨纤维乙醇增加的成本仅为 3589 元/吨乙醇,远低于燃料乙醇售价,因此第三种方法为木薯纤维用于乙醇发酵的最适方法,本结论将为木薯乙醇产业深度利用木薯纤维提供依据。

关键词: 玉米秸秆; 稀酸预处理; 纤维素酶水解; 多元醇; 木薯酒渣

Industrial Research on Bioconversion of Agricultural Lignocellulose Biomass into Polyols and Ethanol

Abstract

In this study, two agricultural lignocellulosic biomass resources were converted into polyols and ethanol and applied into the design and demonstration of industrial applications. Firstly, corn stover was processed and optimized by dry-pretreatment and enzymatic hydrolysis into stover sugar based on the cost analysis, then the stover sugar was catalytically hydrogenlyzed into polyols products containing propylene glycol, ethylene glycol, etc. Secondly, several bioconversion methods of cellulose fraction in virgin cassava tubes into ethanol were tested and evaluated based on the cellulase cost, and an optimized method was proposed for cassava ethanol industry.

In the study of converting corn stover sugar to polyols, the researches were focused on the ash removal process, dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis process and hydrogenolysis process. The results showed that: in the ash removal process, sugar yield and the ethanol yield of corn stover were significantly positive correlated with the washing degree which indicated that the removal of ash by washing contributed to increase the strength of pretreatment; The optimum pretreatment condition was that presoaking solid/liquid ratio was 1:1, sulfuric and usage was 5%(w/w), reaction temperature was 190 °C and reacted for 3min; The result of enzymatic hydrolysis showed that 50 °C ,pH range at 4.2-5.8 were the optimum conditions for hydrolysis. Increasing agitation rate can improve enzymatic reaction rate, but had no effect for increasing the ultimate sugar yield. According to the analysis of concentrated cost, enzyme cost and material cost, the optimum condition of solids loading and enzyme loading was obtained, at which the total cost above was minimum; The result of hydrogenolysis showed that corn stover sugar after gradually treating by decoloring and ion exchange, propylene glycol yield increased to 48%, and the final result of hydrogenolysis of stover sugar had no significant difference with the pure glucose. Currently, the technology of the polyols production from corn stover has been applied to industrial production preliminarily.

In the study of the utilization of the cassava cellulose, the cellulase cost of different ethanol fermentation process options form cassava cellulose was evaluated. The processes include the direct saccharification and fermentation of original cassava cellulose residues, the direct saccharification and fermentation of pretreated cassava cellulose residues, and the

simultaneous co-saccharification and fermentation of cassava starch and cassava cellulose. The results show that the utilization of the cassava cellulose in the first two processes were low with the enzyme cost of 13,602 and 11,659 RMB Yuan per tone of ethanol, respectively. Comparing to the first two processes, the third one demonstrated the lowest enzyme cost at 3,589 RMB Yuan per ton of ethanol, which was less than the ethanol price. The result indicated that the third one was the optimized method and provided a practical way of cassava cellulose utilization in cassava ethanol industry.

Keywords: Lignocellulosic biomass; Bioconversion; Hydrogenlysis; Polyols; Simultaneous saccharification and ethanol fermentation

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 生物炼制综述.....	1
1.2 糖平台技术.....	3
1.2.1 木质纤维素预处理.....	3
1.2.2 酶水解.....	6
1.2.3 影响糖化反应的因素.....	7
1.3 单糖炼制多元醇.....	9
1.3.1 多元醇简介.....	9
1.3.2 氢解糖类物质制备多元醇研究现状.....	10
1.4 木薯纤维素发酵生产乙醇的研究现状.....	12
1.5 本文研究主要内容及意义.....	13
第 2 章 玉米秸秆单糖制备及氢解生产多元醇.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 材料与方法.....	15
2.2.1 实验材料.....	15
2.2.2 实验方法.....	17
2.2.3 分析方法.....	19
2.3 结果与讨论.....	22
2.3.1 秸秆灰分及秸秆清洗对预处理的影响.....	22
2.3.2 不同产地玉米秸秆稀酸预处理.....	28
2.3.4 稀酸预处理玉米秸秆糖化条件的探索.....	31
2.3.5 用于多元醇炼制的糖浓缩液其浓缩成本、酶成本及原料成本分析.....	38
2.3.6 秸秆糖液加氢裂解生产多元醇.....	42
2.4 本章小结.....	44

第 3 章 木薯纤维素乙醇发酵的纤维素酶成本评价.....	45
3.1 材料与方法.....	45
3.1.1 原料与试剂.....	45
3.1.2 实验方法.....	45
3.1.3 分析方法.....	46
3.2 结果与讨论.....	46
3.2.1 木薯酒渣的直接同步糖化与发酵生产乙醇.....	46
3.2.2 木薯酒渣稀酸预处理后的同步糖化与乙醇发酵.....	47
3.2.3 木薯块茎的同步淀粉与纤维素糖化生产乙醇.....	50
3.2.4 木薯酒渣生产乙醇方法的工艺对比.....	51
3.3 本章小结.....	52
第 4 章 结论与展望.....	53
4.1 结论.....	53
4.2 展望.....	54
参考文献.....	55
致谢.....	63

第 1 章 文献综述

1.1 生物炼制综述

人类社会的发展离不开稳定的、可持续的能源及资源的供给,近几十年来,石油、天然气等化石能源的过度开采及消耗,使得人类面临着能源危机、环境污染等重大问题。对此寻找新的能源替代是当今的研究热点,随着全人类对珍惜能源、保护环境等问题达成的强烈共识,未来社会的能源需求绝大部分必将依赖于风能、水能、太阳能、核能,当然也包括生物质能等可再生能源。生物质能来源于植物的光合作用,据估计,纤维素、半纤维素、木质素等作为植物生物质的主要成份大约以每年 1500-2000 亿吨的速度再生,换算成能量相当于石油产量的 20 倍^[1-2]。若这部份生物质资源得到合理及有效地利用,人类相当于拥有一个取之不尽、用之不竭的资源宝库。另一方面,生物质在同化光能的同时,同步固定大气中的 CO₂,经燃烧后再生成 CO₂ 排出,在碳循环中不会使得空气中的 CO₂ 的含量增加,因此生物质能与矿物质能源相比更具有环境友好、燃烧清洁等特点^[2]。

以生物质为原料进行的生物炼制 (Bio-refinery) 被认为是一种能够替代传统以石油为原料的化工炼制的新型大宗化学品生产工业^[3]。美国可再生能源实验室 (U.S. National Renewable Energy Laboratory, NREL) 将生物炼制定义为“利用生物质原料,结合生物质转化技术及反应设备,用来集成生产燃料、热电能和化学产品的装置”^[4]。目前,生物炼制产业已经蓬勃发展,世界上各大化工产业巨头都敏锐地看到此新型产业的前景,纷纷进行业务转移及战略投资,表 1.1 列举了全球主要的生物基化学品及其主要的生产公司^[5]。以生物质为原料得到的产品覆盖范围十分广阔,部分产品例如乙二醇、丙二醇都是重要的石油炼制产品,若使用可再生生物质原料替代石油生产,将产生巨大的经济效益及环境效益。

自 1982 年生物炼制的概念首次于 science 期刊被提出到今天的蓬勃发展^[6],其发展的趋势可概括为:原料由第一代的淀粉、蔗糖、油料等常规粮食作物拓宽到木质纤维素、农林工业残渣、能源作物等第二代非粮原料,产品由第一代的生物燃料乙醇、生物柴油扩充到第二代生物基化学品、生物基材料、高附加值产品等。目前美国、巴西、中国已经实现玉米燃料乙醇、蔗糖燃料乙醇等第一代生物炼制产业的工业化^[7,8],第二代生物炼制原料木质纤维素具有储量大、种类多、价格低廉等优点,全世界的学者们对第二代生物炼制的原料、转化技术、产品进行了广泛而深入的研究^[9],部分产品及技术已经具有一定程度的工业化规模。在我国,自 2001 年中石油燃料乙醇项目产业化及市场化以来,以小麦、玉米等陈粮为原料的燃料乙醇的产量逐年上升,“十二五”期间,燃料乙醇的年产值约为 160-170 万吨^[7]。基于粮食储备安全、粮价稳定等因素,国家对生物炼制的

政策已逐步向非粮原料偏移, 提出“因地制宜, 非粮为主”的政策方针, 不再审批以粮食为原料的燃料乙醇项目, 在 2012 年燃料乙醇总产量也首次出现下降。2012 年, 国务院在《生物产业发展规划》中指出: “要促进推动生物基产品的规模化发展, 重点推进非粮生物醇、有机酸、生物烯烃等行业的产业化, 进一步加大第二代生物炼制原料的开发力度, 突破纤维素乙醇原料预处理、低成本酶水解等关键技术瓶颈, 大力支持建设具备条件的木薯乙醇、甜高粱茎秆乙醇、纤维素乙醇等项目的商品化示范工程等”^[10]。由此可见, 在我国, 以木质纤维素为原料的第二代生物炼制产业前景比较乐观, 相关的政策配套也已经到位, 现在亟需解决的是相关关键技术的突破与创新。

表 1.1 主要的生物基化学品及其主要生产公司^[5]

Table 1.1 Main biomass base chemicals and it's producers

	产品	生产公司
C1	Methanol	BioMCN, Chemrec
	Ethanol	Many
C2	Ethylene glycol	India Glycols Ltd, Greencol Taiwan
	Acetic acid	Wacker
C3	Lactic acid	Purac, NatureWorks, Galactic, Henan Jindan, BBKA
	Propenoic acid	Cargill, Perstorp, OPXBio, DOW, Arkema
	Glycerol	Many
	3- hydracrylic acid	Cargill
	1,3-prolylene glycol	DuPont/Tate&Lyl
	1,2-prolylene glycol	ADM
C4	N-butyl alcohol	Cathay Industrial Biotech , Butamax, Butalco, Cobalt/Rhodia
	1,4- butanediol	Genomatica/M&G, Genomatica/Mitsubishi, Genomatica/Tate&Lyle
	Isobutyl alcohol	Butamax, Gevo
	Succinic acid	BioAmber, Myriant, BASF, DSM/Roquette, PTT Chem/Mitsubishi CC
C5	Xylitol	Danisco/Lenzing, Xylitol Canada
	Glutamic acid	Global Biotech, Meihua, Fufeng, Juhua
	Levulinic acid	Maine BioProducts, Avantium, Segetis, Circa Group
	Furfural	Many
C6	Sorbitol	Roquette, ADM
	Citric acid	Cargill, DSM, BBKA, Ensign, TTCA, RZBC
	Lysine	Global Biotech, Evonik/RusBiotech, BBKA, Draths, Ajinomoto
Cn	Polyhydroxyalkanoate (PHA)	Metex, Meridian plastics, Tianjin Green Bioscience Co.

生物炼制与石油炼制相似, 其原料都具有复杂的组成, 并且都是将复杂成分逐级分离得到主要化合物后, 再加工成具有广泛用途的产品的过程。而不同于石油原料, 生物质原料一般具有高聚合度和含有丰富的功能团, 生物炼制环节中的酶反应及微生物发酵

具有反应条件温和、低能耗等特点。但是生物反应的一项不足是，仅仅依靠酶反应、微生物发酵等传统生物技术得到的平台化合物总类较为贫乏，有些大宗化学品依靠生物法仍无法实现工业化生产。Clark 发表的一篇文章提出，生物炼制在未来将是结合生物转化技术与化学转化技术的交叉产业，这些技术将包含木质纤维素拆分、分级和改进的预处理方法等糖平台技术，酶工程开发及酶催化工艺的改进，针对可再生原料转化的反应器设计与优化、多级反应器的连续合成，碳水化合物到大宗化学品或化学中间体、产品分离等工艺及设备设计等^[11]。

1.2 糖平台技术

1.2.1 木质纤维素预处理

木质纤维素是构成植物细胞壁的主要物质，主要包含有纤维素（cellulose）、半纤维素（hemicellulose）以及木质素（lignin）三种成分。其中纤维素是由 β -D-葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键聚合而成的长链聚糖，聚糖的一端具有还原性而另一端不具有还原性，多条纤维素长链聚糖通过氢键作用及彼此间范德华力的作用形成纤维素结晶束，在纤维素结晶束的周围，紧密包裹着由木质素形成的网络结构，由木糖、阿拉伯糖组成的半纤维素通过其侧链的小分子基团例如乙酰基等与木质素及纤维素连接形成无定形的结构^[12]，这样使得纤维素、木质素、半纤维素通过彼此间的作用相互交织在一起，一方面使得木质纤维素作为植物细胞壁骨架具有较强的结构韧性，而另一方面也使得其性质十分稳定，在常温常压下不容易被水，有机溶剂，低浓度酸、碱所溶解，被微生物作为碳源利用也比较困难且需要较长的时间。图 1.1 为木质纤维素在预处理前后的结构简图。

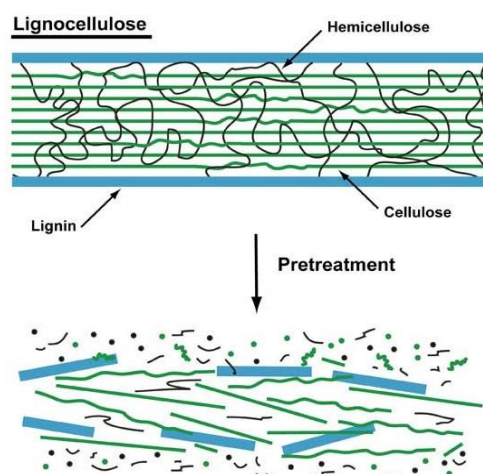


图 1.1 木质纤维素预处理示意图

Fig. 1.1 Schematic of the pretreatment of lignocellulose

由于木质纤维素结构的特殊性，对木质纤维素进行预处理的目的是为了使得它能够被纤维素酶直接作用。预处理后的木质纤维素晶体结构受到破坏，表面呈现多孔状，比

表面积增大, 暴露出更多的酶接触位点从而使得生物质中糖的利用率大大提高。一个理想的预处理技术是使得木质纤维素的主要成分(纤维素、半纤维素、木质素)可以从不可直接利用的状态转化为可直接利用的状态, 并且提高它们在后续转化为能源或者高附加值产品时的浓度与得率^[13]。使用不同的预处理方法会导致木质纤维素组份发生不同的变化, 产生的预处理效果也不尽相同, 不同的预处理方法有其各自的优缺点, 随着技术与设备的不断发展, 世界各地的学者都在不断完善与发展预处理方法的理论与技术, 目的是寻找或建立一种成本低廉、效果优越、操作简单、易于放大、环境友好的木质纤维素的预处理方法^[14-16]。通常, 将预处理方法分为物理、化学、生物及它们之间相结合的方法。

1.2.1.1 酸预处理

稀酸预处理是一种比较传统的木质纤维素预处理方法, 在上个世纪 50 年代就有稀硫酸水解木质纤维素原料从而生产糠醛的研究, 现在此方法也广泛运用于糠醛的工业化生产^[17]。稀酸的作用使得聚糖链发生水解生成单糖或者寡聚糖, 并且半纤维素的水解优先于纤维素, 因此稀酸预处理能够去除绝大部分的半纤维素从而破坏原先木质纤维素的紧密结构, 使得残余物料中纤维素的水解能力增强。硫酸是使用最广泛的酸, 其他的酸例如硝酸、盐酸、磷酸也有报导^[14], 也可用其他酸性化合物作为催化剂, 例如 Zhu 等用亚硫酸钠与硫酸作为酸性催化剂开发了 SPORL 稀酸预处理技术^[18]。稀酸预处理的方法首先是将酸、原料、水进行固液混合并使得整个体系均匀, 这一步骤通常被称为预浸^[19] (presoaking), 混合的方法有直接混合法, 酸液喷洒的方法和通过带有搅拌装置的反应器^[20]进行混合的方法。接着通过外壁加热或者直接蒸汽加热的方法将混合均匀的体系升温至 140 °C-200 °C 并保留几分钟到一小时不等的反应时间, 最后降至常温常压从而完成预处理反应。

稀酸预处理被广泛运用于各种木质纤维素原料, 包括软木、硬木、草本植物及秸秆等林业或农业残余物, 并且都具有较好的预处理效果。由于酸在此方法中起到主导作用, 因此提高酸用量及降低 pH 值对预处理效果的提高十分显著^[21], 但是酸用量的提高也会导致设备腐蚀、排出液污染环境、后续工序原料中和成本上涨等问题, 通常稀酸的使用量在 0.5% 到 5% 之间。另一方面, 反应温度及保留时间也是重要的操作参数, 稀酸预处理可以维持在较低的温度 (120 °C) 保持较长的时间 (1 h) 也可以在较高的温度下 (190 °C) 反应较短的时间 (3 min), 预处理过程本身就是消耗能量的过程, 因此相关的研究报导多数集中于根据原料、设备的差异性进行反应参数的优化, 以期得到最佳的反应工艺及较低的能量消耗^[18,19,22]。

稀酸预处理重要的局限性包括酸对设备的腐蚀造成设备的投入成本较大, 预处理后物料必须使用碱进行中和并且中和产物例如硫酸钙、硫酸钠等会对后续工艺造成一定的影响; 另一方面, 高温反应生成的副产物例如糠醛, 羟甲基糠醛、甲酸、乙酸、乙酰丙

酸、木质素等均会对酶水解、微生物发酵等工艺造成强烈的抑制作用^[23]，因此在微生物发酵之前，通常都必须增加脱毒步骤而造成额外的设备及能量的投入。

1.2.1.2 碱预处理

碱预处理方法通常是指使用氢氧化钠、氢氧化钙、氨水等碱性的溶剂与木质纤维素原料进行反应的技术。它的反应的机理是碱通过与木质素之间或者木质素与半纤维素之间的酯键发生皂化反应，使得木质素溶解成木质素单体从而破坏了木质纤维素的网络结构，碱处理使得物料结构更疏松，具有较多的内孔从而增加了纤维素酶的活性位点，碱处理造成很少的糖损失。与稀酸预处理方法相比，碱预处理反应通常在较低的温度与压力下进行，Playne 用石灰处理甘蔗渣时，在常温常压下反应 192 h 后纤维素的水解能力由 20% 提高至 72%，提高温度有助于缩短反应时间^[24]，Chang 等在 120 °C 反应 1h 后获得了相应的结果^[25]。石灰是最常用的碱，使用石灰时对设备要求较低，并且可通过石灰窑进行碱回收，但是碱法常见的缺点是反应后污水排放量大且污染严重，这个问题也是现在造纸行业面临的最大问题。

碱处理时，通过在反应体系中通入空气、氧气的方法称为湿氧化法，此方法在高木质素含量的原料中广泛运用，氧气的氧化作用有助于提高木质素的去除效果从而增强了预处理的强度^[26]。

1.2.1.3 蒸汽爆破

蒸汽膨爆技术是一项比较优秀且成本较为低廉的预处理技术之一，该技术在实验室规模及中试放大实验中都有比较成功的运用。蒸汽膨爆的过程是将高压饱和蒸汽通入装好粉碎原料的带有膨爆装置的反应设备中，高温水蒸气（180 °C-220 °C，对应的压力约为 1-2.3 MPa）本身就能提供氢离子使得半纤维素侧链的乙酰基团发生水解，生成乙酸，乙酸的生成进一步加强木质纤维素的水解从而使得木质纤维素结构缝隙率与比表面积变大，当反应完成后，瞬间泄掉反应器内部的压力，能够进一步打开木质纤维素的构造从而增强纤维素酶的结合能力。蒸汽膨爆技术是一种物理预处理技术，通过结合化学催化剂，可以产生更理想的预处理效果，结合酸预处理技术，使用硫酸或者二氧化硫作为酸催化剂，可以显著加强半纤维素的水解，并降低反应温度及缩短反应时间，最终提高纤维素的酶解得率^[27]。

氨纤维膨爆（Ammonia fiber explosion, AFEX）是一种以氨水作为反应溶剂，在高压反应器中与木质纤维素反应一定时间，然后瞬间泄压造成膨爆效果的预处理技术^[28]。该技术液氨的使用量通常为物料的 5% 与 15% 之间，因此可处理高固体含量的物料，并且预处理后的物料水解得率在低酶用量下仍十分接近理论值（<5 FPU/g 干物质 or 20 FPU/g 纤维素），因此被认为是最理想的预处理技术。Chang 等在 AFEX 中结合 TiO₂ 和 ZnO 作为催化剂在较低的固含量下反应，对比不加催化剂的实验组，最终糖化得率提高 13%^[29]。氨纤维膨爆技术适用于草本植物及农业残余等木质素含量较高的原料，对硬木

原料适用性一般，而不适合于软木原料。氨纤维膨爆技术面临的最大问题是液氨的价格过高及回收成本过大，然而，若结合该技术对下游工艺的正面促进作用，如水解环节的高糖收率及发酵环节时的低抑制物含量，氨纤维膨爆技术能显著降低整个生物炼制产业链的成本，因此，此技术被认为具有广阔的前景。

1.2.1.4 其他预处理方法

热水预处理是采用高压下的过热水（200 °C-230 °C）对木质原料进行预处理的方法，热水能够溶解大约 40%-60% 的生物质，其中包含 4%-22% 左右的纤维素、50% 左右的木质素及大于 90% 的半纤维素^[30]。该方法优点是无需化学试剂的使用及去除了后续的中和环节，缺点是废水排放量大、产生的微生物抑制物多。

用甲醇、乙醇、丙酮、甘油或者苯酚等有机溶剂对木质纤维素进行木质素萃取的预处理方法称为有机溶剂法，该方法基于的原理是通过有机溶剂萃取出原料中的木质素从而破坏木质纤维素的复杂结构，通常添加少量的无机酸例如盐酸、硫酸能够提高预处理效果^[31]。该方法的缺点是有机溶剂成本过高，并且具有环境污染性及毒性。

生物预处理技术是基于木材降解微生物对木质纤维素进行降解的预处理技术，棕腐、白腐、软腐真菌等微生物对木质纤维素的降解有助于提高糖化得率。微生物预处理的优点是反应过程能耗低、几乎无需化学试剂、对环境温和等，而它最大的缺点是反应时间过长且纤维素结构破坏不充分。Yu 等利用超声波和过氧化氢等物理或者化学技术与生物预处理相结合，结果发现采用结合的预处理方法可将反应时间由 60 天缩短至 16 天^[32]。

1.2.2 酶水解

酶水解过程的目的是降低木质纤维素底物中聚糖的聚合度，为生物炼制提供可直接利用的单糖原料，由于木质纤维素成分及结构的复杂性，要将底物完全降解就需要多种酶的共同作用，这使得酶水解过程的机制变复杂、酶使用成本加剧^[33]。按照作用的底物不同，水解木质纤维素的酶类主要可以分为纤维素酶、半纤维素酶、木质酶等。

纤维素酶是参与水解葡聚糖生成葡萄糖的多种酶的总称，能够分泌纤维素酶的微生物主要有霉菌、细菌、放线菌等，里氏木霉（*Trichoderma reesei*）能分泌大量的胞外纤维素酶，是研究最广泛的纤维素酶生产菌种，并且是现在工业化生产纤维素酶的主要菌种。最近，科学家们已经完成了对里氏木霉基因组的全部测序，这将为对其进行基因及代谢工程的改造提供宝贵的信息，也将促进对纤维素酶及生物炼制行业的发展^[34]。将纤维素降解为葡萄糖，至少有三种类别的酶参与了该反应：内切葡聚糖酶从内部水解葡聚糖链的 β -1,4-糖苷键，外切纤维素酶从链的一端水解得到纤维二糖，接着纤维二糖被 β -葡糖苷酶水解成葡萄糖。前一个酶的反应产物是后一个酶的反应底物，复合纤维素酶通过这种协调作用创造更多水解位点，从而降低产物抑制。然而，纤维素酶的作用机理并非完全明确，有报导指出纤维素酶与反应时间、酶用量不符合线性的动力学关系，并且上述三种酶的反应也不是按照顺序依次进行^[35]。也有人提出假设：酶水解反应的限速

步骤不是纤维素酶对 β -1,4-糖苷键的催化断裂, 而是底物纤维素晶体散解为葡聚糖链的过程, 因为这一步骤为纤维素酶提供的可接受位点最为充分^[36]。Igarashi 等用实时可视化的技术也报导了这一机理, 对纤维素酶反应机理进行更为深入的了解将有助于提高整个酶水解过程的效率^[37]。

半纤维素酶是参与水解半纤维素的一类酶的总称, 它一般作为木质纤维素水解过程的辅酶被进行了广泛的研究。在进行稀酸预处理、蒸汽膨爆等预处理时, 半纤维素受到严重破坏, 为了降低预处理成本及预处理过程产生的有害抑制物含量, 有些预处理过程选择在较低的强度下进行, 为了保持预处理强度降低后物料的糖化得率仍处在较高的水平, 在糖化过程中添加半纤维素酶起到的作用越来越突出。半纤维素通过降低半纤维素网络结构增强了纤维素与纤维素酶的结合能力, 提高了酶水解得率及降低了纤维素酶的使用量^[38,39]。另一方面, 半纤维素酶水解能产生的大量五碳糖产物, 能够被越来越多的五碳糖利用菌种所转化成化学品, 也可以作为资源用于五碳糖的深加工及化学转化^[40]。

木质素是储量第二丰富的植物生物质资源 (第一为纤维素), 尽管木质素不含有可用于发酵的糖, 但由于木质素对纤维素与纤维素酶的结合造成物理性的空间位阻障碍以及对纤维素酶产生无效吸附等因素使得对木质素的去除成为生物质炼制的关键步骤, 一些霉菌通过胞外及非特异性酶系统能够对天然地氧化木质素并使其降解。参与这个过程的酶类主要有漆酶、木质素分解过氧化物酶、能够产生胞外过氧化氢的氧化酶、还原酶, 还有衔接上述酶反应的低分子量的化合物等。在生物燃料的生产过程中, 木质素酶被用于降低预处理过程产生的有害抑制物含量。高温下的预处理, 由于糖类及木质素的降解, 产生了弱酸、呋喃类、酚类等抑制物, 漆酶能够选择性地作用于酚类化合物, 从而提高糖化得率及酵母发酵性能^[41]。

1.2.3 影响糖化反应的因素

纤维素酶是影响木质纤维素高效转化为可利用单糖的重要因素, 近几年来, 尽管诺维信 (Novozymes)、杰能科 (Genencor)、帝斯曼 (DSM) 等酶制剂公司在纤维素酶的研发及生产过程中都具有较大的突破, 但是现在酶水解过程仍然需要较高的酶使用量, 酶成本过高仍然是生物炼制产业的经济瓶颈。影响木质纤维素糖化反应的因素主要可分为酶相关与底物相关两项因素, 酶相关因素主要包括产物抑制、热失活、酶协同作用与木质素对纤维素酶的不可逆吸附等; 底物相关因素包括底物聚合度、纤维素结晶度、可接触表面积、木质素与半纤维素的含量等。现在很多研究工作的核心都是为了提高酶使用效率、降低酶成本。这些研究工作一方面从预处理环节入手, 通过预处理改变底物的性质从而提高底物转化率; 另一方面, 从纤维素酶性质及酶糖化过程入手, 对其酶的性质及糖化机理进行研究。

(1) 优化复合酶的组成, 前文已经提到为了更有效的水解木质纤维素底物, 需要多种酶进行协同作用。由于原料种类及预处理方法繁多, 为了适应不同原料在经过不同

预处理后的物料性质, 复合纤维素组成就需要做出相应调整, 有研究显示通过添加底物特异性的辅酶如木聚糖酶、甘露聚糖酶、酯酶等能够降低酶用量及预处理强度。通过多种商品纤维素酶的复配, 可以有针对性地改变复合酶的性质, 比较常见的是诺维信公司生产的 β -糖苷酶 Novezyme 188 经常被用于与其他纤维素酶复配从而提高混合酶的 β -糖苷酶酶活^[42-44]。另外, 对纤维素酶中一些具有特殊功能的蛋白也有一定的研究, 据 Cannella 等报导, 商品纤维素酶 (Cellic CTec2) 中含有氧化断裂糖苷键的活性蛋白使得糖水解得率提高 25%^[45]。Banerjee 等则指出在商品复合纤维素酶中存在大量无水解能力的蛋白, 若去除这部分蛋白能显著提高纤维素酶活及降低酶成本, 但是他并没有给出使用纯酶及粗酶的成本比较^[46]。有研究则指出纤维素粗酶中存在功能暂不明确的蛋白, 这些蛋白对纤维素水解存在积极的作用^[47]。

(2) 反应条件的影响 (pH 值, 反应温度, 混合)。酶在特定的 pH 及温度范围才具有较高的活性, 当酶反应不处在最佳条件时, 为了维持水解得率则需要加大酶用量从而导致整个过程成本加剧, 因此为了得到最佳的反应效果就必须对反应条件进行优化, 进行同步糖化发酵 (SSF) 与整合细胞工艺 (CBP) 时, 反应条件的优化就显的更为复杂。一般来说, 里氏木霉属产生的纤维素酶的酶活最适 pH 值为 3-6, 当 pH 大于 7.5 时纤维素酶基本失活。腐质霉属产生的纤维素酶最适 pH 为 6-8, 并且在 pH 3-11 内都具有活性。当处理木质纤维素等不溶性的固体底物时, 底物的混合及反应器的类型对水解过程影响显著, 特别是大规模反应时, 物质传递成为主要限制因素。Chundawat 等指出增强搅拌有助于微晶纤维素的转化^[48], Samaniuk 等指出高强度的搅拌对酶水解起到协同作用, 高强度的搅拌增大酶在反应体系的外扩散系数, 使得酶与底物接触几率变大^[49]。Chundawat 等建议当酶活较低时可将转速提高至 400 rpm 以上^[48]。混合问题成为高固体含量下的水解反应的首要问题, 很多研究都指出高固体含量的水解反应体系中高强度搅拌的重要性。

(3) 酶与底物用量。酶成本占据了生物转化过程总成本的三分之一, 因此对酶使用量的控制决定了糖化工艺是否具有工业应用前景^[39]。一般地, 都以酶的投入 (FPU/g Substrate) 所水解得到的单糖收率 (g/g) 来比较糖化反应中酶的使用效率。另一方面, 高底物固含量下的水解反应, 能够水解得到更高浓度产物从而降低了生物转化的成本。因此, 纤维素酶用量及底物固体含量是决定糖化过程经济性的两个重要条件。

不同的底物及不同的预处理方式都会对酶使用产生影响。例如在水解高木质素含量的原料时由于木质素对纤维素酶的无效吸附, 使得纤维素酶用量变大。Wyman 等发现, 在达到相同水解效果时, 水解碱处理原料所需的酶用量比稀酸、二氧化硫、热水等预处理原料所需的酶用量大, 可能的原因在于不同预处理方式造成木质纤维素成分及结构的差异性影响底物对酶的结合能力^[50]。加大酶用量会提高水解得率, 但是当酶用量加大到一定的值时, 由于多方面的因素酶水解得率并不随着提高。这些因素包括产物抑制、底

物水解位点有限、吸附与解吸附达到平衡等。因此通过找到糖化反应中的极限酶用量可以为衡量糖化反应的投入与产出提供经济上的依据。提高固体含量会降低糖化过程酶的性能,这是因为提高固含量的同时,酶的抑制物例如产物、木质素、有毒物质也随之提升,另一方面,高固含量影响酶与底物的混合与接触。通常初始固体含量为大于 10%-15% (w/w) 的水平就被认为是高固体含量,在此条件下底物的粘度非常高从而增加了混合难度及传质效果,通过多步批次补料的方法可以克服上述缺点,当体系被水解至较低粘度时再添加新鲜物料从而达到总固体含量处在较高水平。在同步糖化发酵 (SSF) 过程中,增加预糖化工艺也能达到上述相同的效果。另外通过对生物反应器的改造及创新也能有效的解决混合问题, J. Zhang 等开发的带有螺带搅拌桨的反应器能够适应高固体含量体系,并具有加强混合能力和降低能量消耗等特点^[51]。X. Zhang 等结合造纸工作常用的钉状搅拌器开发的反应器也能处理 30% 固含量以上的水解反应,并能得到较高的糖得率^[52]。

(4) 酶回收及表面活性剂的使用。糖化反应结束后,通过对上清液及残余固体(主要是木质素)中的纤维素酶进行回收也是降低整个过程成本的有效途径。使用新料对酶进行再吸附以及上清液的超滤是酶回收的主要方法^[53]。另外一种提高水解性能的方法是使用表面活性剂,表面活性剂与木质素结合从而避免木质素对纤维素酶产生无效吸附,因此能够提高纤维素转化及降低酶用量^[54]。吐温 20、吐温 80、聚乙二醇 (PEG) 等非离子型的表面活性剂都有很好的促进作用。

1.3 单糖炼制多元醇

通过对自然界丰富的纤维素生物质资源(如农作物秸秆、草、树木、废纸等)进行各种先进的预处理及酶水解技术,从而建立生物炼制的糖平台,从糖平台出发,结合生物转化、化学转化等工艺,可以用来生产各种高附加值的化学品,糖平台技术与化学转化相结合,通过氢气断裂碳水化合物的 C-C 键和 C-O 键的氢解反应 (Hydrogenolysis) 生成化学多元醇的概念为生物炼制提供十分具有可行性的前景,目前,利用甘油、糖、糖醇等原料进行氢解反应生成乙二醇及丙二醇的研究被进行了广泛的报导,而用糖或糖醇进行生物基多元醇的炼制被认为具有更大的潜能^[55]。

1.3.1 多元醇简介

单糖的氢化 (Hydrogenation) 产物是糖醇或多羟基醇,例如葡萄糖加氢反应后生成山梨醇、木糖加氢生成木糖醇等,二糖也能生成对应的糖醇,例如麦芽糖醇、乳糖醇等。这些糖醇对酸、热有较高的稳定性,不容易发生美拉德反应,一般作为低热值食品甜味剂,广泛应用于低热值食品配方。国外已把糖醇作为食糖替代品,广泛应用于食品工业中。其他的多元醇,例如乙二醇 (ethylene glycol, 简称 EG) ——最简单的糖醇——一般用作防冻剂及聚合物对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 的前体,丙三醇 (甘油) 作为润滑

剂及润湿剂广泛用于医药及护肤保健用品领域。美国能源部 (DoE) 定义的 12 种最具有潜能的生物基平台化学品中就包含山梨醇、木糖醇、甘油等多元醇^[56]。这些糖醇的氢解作用及加氢脱氧作用能够生成乙二醇、丙二醇 (1,3-和 1,2-丙二醇) 以及少量丁二醇、乙醇、甲醇等重要平台化合物, 这些醇类化合物广泛运用于材料、食品、药品、化妆品等行业, 例如 1,2-丙二醇可用于树脂、表面活性剂、增塑剂、破乳剂和乳化剂的原料, 1,3-丙二醇与对苯二酸聚合生成聚酯材料 (PTT), 大量用于表面涂料及增强塑料。目前, 1,3-丙二醇传统的化工炼制是通过石油衍生物例如环氧乙烷 (壳牌途经) 和丙烯醛 (德国赛-杜邦途经) 的化学催化合成, 1,2-丙二醇则通过环氧丙烷衍生得到。这些二元醇产品对建筑、汽车、材料、制药等行业的稳定发展至关重要, 工业上为了获得二元醇需要消耗大量的石油, 对于中国这样一个石油进口及消费大国来说, 不仅会对石油燃料炼油工业和石油化工行业造成冲击, 也制约了石油乙烯下游工业的发展。而以生物质为原料得到的糖醇, 通过氢解生产多元醇的途径可以取代上述石油炼制途经, 已可再生资源的形式补给乃至替代原油来满足化工行业的需求。糖醇、多元醇等作为中间物衔接了从生物质原料到各种大宗化学品的转化, 不仅为淀粉、蔗糖、木质纤维素等生物质深加工提供广阔的市场, 还能缓解石油需求, 在国民经济上具有重要的意义。

1.3.2 氢解糖类物质制备多元醇研究现状

表 1.2 糖或糖醇生产多元醇的部分文献信息

Table 1.2 Information of the references with using sugar or sugar alcohol to produce polyols

催化剂	条件		原料	产品	参考文献
	T °C	p bar			
Pt black, KOH	100–135	84	glucose	mannitol sorbitol	[57]
NiCrO ₄	275	200	glucose, sorbitol	1,2-PG	[58]
Ir-ReO _x /SiO ₂	120	80	glycerol	1,3-PG	[59]
Ru/C	220	80	sorbitol	glycols	[60]
Ru, sulfur-modified Ru	210	60	sorbitol, xylitol	1,2-PG glycerol	[61]
Ru/C	150	250	starch inulin	polyols	[62]

糖或糖醇与氢气反应的研究可追溯至上世纪 20 年代, Cake 首次报导了在氢氧化钾溶液中, 用 Pt 作为催化剂, 成功利用葡萄糖加氢制备了山梨醇及甘露醇^[57]。糖的加氢反应生成相应的糖醇的过程通常在比较温和的条件下进行, 反应温度及压力较低, 反应 pH 值呈中性; 涉及 C-O 键及 C-C 键断裂的氢解反应对条件要求则要高出, 通常温度 200 °C 以上并且需要较高的氢气压力。氢解过程需要碱性的环境, 较常见的是通过添加 CaO

或者 NaOH 调节。加氢反应与氢解反应可以在同一个反应器中进行，也可以分别在不同的反应器中进行。近几年来，在山梨醇及其他糖醇需求量持续增长的刺激下，出现了大量的研究报导和相关专利。在以前，糖的氢解反应的主要目标及优先产物都是甘油（丙三醇），现在由于生物柴油行业产生的大量甘油副产物，使得糖氢解反应的目标产品逐渐转向丙二醇、乙二醇等多元醇，甘油反而可以作为廉价的原料生产这些多元醇。现在发表的文章及专利中，单糖、双糖、糖醇、甘油、淀粉等均可作为催化加氢裂解制多元醇的原料，表 1.2 中列举了部分相关研究的主要信息。在这些报导中所用的催化体系既涉及均相也有多相系统，并且催化剂的类型非常繁多，最常见的是含有第 VIII 族金属元素如镍 Ni、钌 Ru、铑 Rh、钯 Pd 和铂 Pt 等元素的催化剂。铜 Cu、锌 Zn、钨 W 等元素也比较常见。在选择催化剂时，一是考虑催化剂对底物及反应产物的选择性，另一则是考虑催化剂的价格、回收利用、使用寿命等因素。Agnieszka M. 等对不同原料种类在不同催化剂类型的作用下发生的氢解反应的机理做了十分详尽的综述^[55]。总的来说，碳水化合物的氢化、氢解反应生产多元醇的工艺在催化剂应用、反应机理、反应技术及设备等层面上的研究已经十分完善。而对木质纤维素原料特别是木头、秸秆等原料的氢解作用的研究则比较集中于煤液化或热裂解技术的应用，即在高温（400 °C 以上）高压（10 MPa 以上）下由木质纤维素裂解为烷烃、甲醇、一氧化碳等燃料气体的应用，另一方面对纤维素糖链的化学催化水解生成六元醇也有综述报导^[63]，而对木质纤维素特别是成分较为复杂的秸秆原料的二元醇生产几乎没有系统的研究，并且未见产业化的报导。

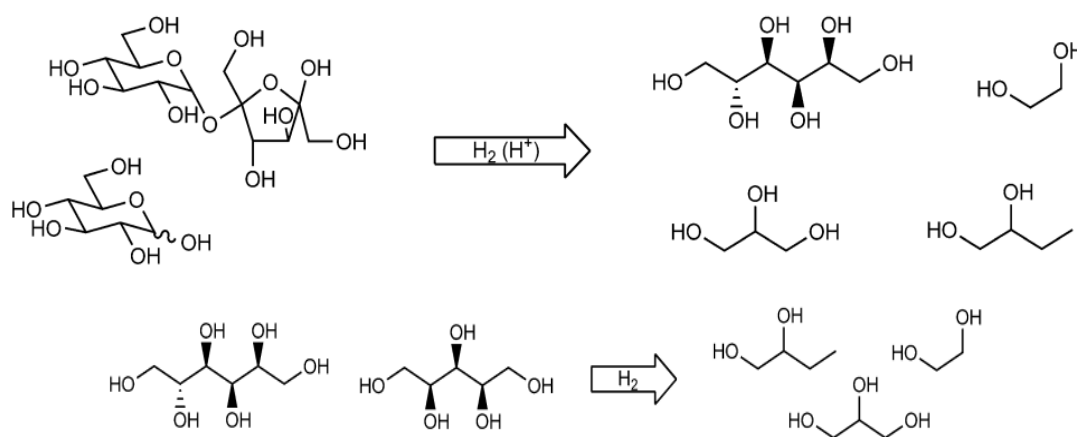


图 1.2 糖、糖醇氢解生成多元醇示意图

Fig. 1.2 Diagram of the polyols production of sugar and sugar alcohol

自 1999 年杜邦公司成功开发了以玉米淀粉为原料制备丙二醇的新工艺并使其成本略低于以石油为原料的传统工艺，标志着生物基多元醇正式实现工业化以来，淀粉基原料一直是生物基多元醇生产的主要原料。淀粉多元醇的生产工艺一般是先将淀粉液化糖化成葡萄糖，再经加氢反应生成山梨醇，山梨醇本身可作为产品出售，也可以作为原料

继续加氢裂解从而生成多元醇。秸秆糖的水解产物主要为葡萄糖及木糖，木糖的加氢产物是木糖醇，氢解产物是丙二醇及乙二醇（图 2.2），由此可见秸秆糖的水解产物用于多元醇生产，在反应过程及产品性质上基本和淀粉糖不存在差异，套用淀粉糖多元醇炼制的技术及设备进行秸秆糖的多元醇生产理论上也不存在重大技术难题。秸秆原料由于具有价格低廉、来源广泛并且若用于工业应用受到国家政策的支持的特点，相对于淀粉原料，具有很大的优势。

1.4 木薯纤维素发酵生产乙醇的研究现状

木薯拥有“淀粉之王”的美誉，是生产生物燃料乙醇理想的非粮原料之一，大规模种植于我国的广西壮族自治区等热带与亚热带地区^[64, 65]。2008 年广西北海年产 20 万吨木薯燃料乙醇工厂已经投产运行，2009 年，广西的木薯产量已达 600 万吨^[66, 67]。在木薯燃料乙醇生产过程中，每生产 1 吨乙醇同时产生 500 公斤左右的干基木薯发酵残渣（木薯酒渣）^[68]，其主要组分为木质纤维素（纤维素、半纤维素和木质素）。与从玉米生产乙醇的工艺比较，木薯酒渣比玉米酒糟（distillers dried grains with soluble, DDGS）的可溶性糖、蛋白及脂肪含量低，饲用价值非常低，成为木薯燃料乙醇生产中难以合理处置的废弃物^[69]。因此，提高木薯酒渣的附加值，对于降低木薯乙醇产业的废弃物排放和过程经济性具有重要意义。

将木薯或木薯酒渣中的纤维素和半纤维素转化为乙醇是最简便、最直接的方法。以往利用木薯淀粉厂提取淀粉后剩余残渣的研究中，由于残渣中淀粉含量达 55-60%（干重），直接利用淀粉酶或经稀酸水解即可得到大部分还原糖^[70]，对含量仅 15-18%的纤维素的利用可使用复合淀粉糖化酶、纤维素酶、木糖酶对其进行降解^[70-73]。木薯乙醇发酵后的残渣则不同，其淀粉含量在 3% 以下，主要可以利用的有效成分即是含量 20-30% 的纤维素。纤维素转化为乙醇主要有三种可以利用的方式：

(1) 木薯纤维素酒渣的直接糖化和乙醇发酵。直接添加纤维素酶进行木薯纤维素酒渣的同步糖化与发酵生产乙醇。已有专利文献数据表明，此法木薯酒渣的乙醇产率在 11%-21% 之间^[74]，得率较低。

(2) 木薯纤维素酒渣预处理后的糖化与乙醇发酵。对木薯酒渣进行预处理后，再添加纤维素酶进行木薯酒渣的同步糖化与发酵生产乙醇。木薯乙醇生产过程的短暂高温液化和中温糖化仍不足以破坏木薯纤维成分的结构，因此，对木薯酒渣进行较高强度的预处理可以有效提高纤维素的转化率和后续乙醇发酵的得率。王永伟等利用高压蒸汽锅对木薯酒渣进行低强度的预处理，还原糖浓度达到 3.25%^[75]。Zhang 等用稀酸预处理后的木薯酒渣进行甲烷发酵，预处理后的物料的甲烷产率提高 56.96%^[76]。这些预处理方法存在问题是加工温度低、固体浓度较低，造成后续发酵工段糖浓度和乙醇浓度偏低，不具备工业应用价值。预处理过程产生的大量抑制物^[77]，包括呋喃类物质如糠醛、羟甲基

糠醛等也严重抑制微生物生长和发酵的化合物^[78]，因此预处理后原料须经过脱毒处理后才能进行发酵^[23]。对木薯的乙醇发酵残渣进行预处理的研究还未见报道。

(3) 木薯乙醇发酵中同步淀粉与纤维素糖化以及乙醇发酵。在液化后的木薯浆液中，同时添加糖化酶和纤维素酶，进行淀粉与纤维素的同步糖化，进而发酵生产乙醇。相关研究表明，在木薯发酵过程中添加纤维素酶，最终乙醇浓度有所提高（14.1% (v/v) 提高至 14.9% (v/v)），说明纤维素酶有助于提高乙醇产量，但是增幅度不大^[79, 80]。

1.5 本文研究主要内容及意义

以秸秆为原料制备多元醇的研究思路主要为：从秸秆出发，采用干法稀酸高温预处理之后，利用特殊的高固体含量糖化反应器和生产工艺对秸秆进行纤维素酶水解，得到葡萄糖及木糖的混合糖化醪，再经过固液分离、活性炭脱色、离子交换、高效旋蒸浓缩制得秸秆糖，秸秆糖在专用的镍合金催化剂作用下，经高压氢化裂解得到生物化工醇的过程。整个过程如图 1.3 所示。

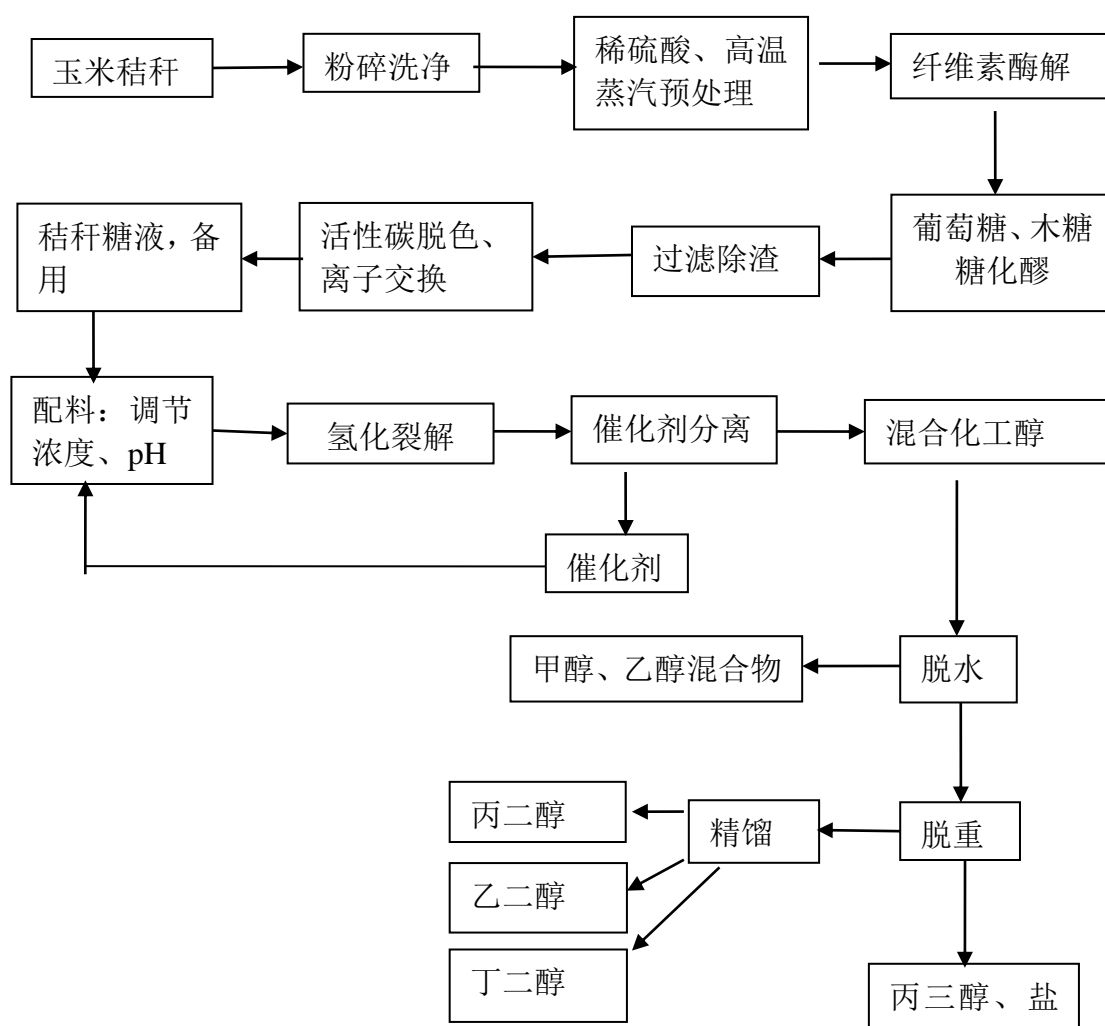


图 1.3 以秸秆为原料制备化工多元醇的主要工艺途径

Fig. 1.3 Main process of chemical polyols production using corn stover as a feedstock

在上述流程中，本文的主要研究内容有：

(1) 针对秸秆清除粉尘、沙石、泥土等秸秆前处理环节，探讨秸秆中灰分去除对秸秆稀酸预处理、纤维素酶糖化、同步糖化乙醇发酵的影响，考察秸秆除尘环节在整个生物炼制过程是否存在必要性。

(2) 针对预处理环节，探索预处理条件：硫酸用量、预浸固液比、反应温度等对预处理效果的影响，通过提高预处理强度，优化出适合本研究路线的稀酸预处理工艺。

(3) 针对糖化环节，探索影响糖化效果的糖化反应条件的变化规律，结合糖液浓缩成本、纤维素酶使用成本、原料使用成本等分析，找到适合本研究路线、且成本较为低廉的秸秆糖化工艺。

(4) 针对加氢裂解环节，将不同精制程度的秸秆糖浓缩液用于催化裂解制取多元醇，以葡萄糖溶液作为对照，从产品差异性、催化剂循环使用次数上考察秸秆糖是否能运用于多元醇的生产，并考察精制程度对裂解结果的影响。

本项研究工作的意义在于，第一，采用玉米秸秆制备生物化工醇，在农作物废弃物相关技术领域实现技术创新，为以秸秆等木质纤维素为原料的第二代生物炼制、全世界可再生资源的充分利用提供具有前景性的思路，秸秆生物多元醇相对于当今的研究热点秸秆乙醇还具有“原子经济性”高、产品附加值高、反应流程简单等优势；第二，通过该工艺实现产业化其一可替代原先产业化的淀粉原料，彻底规避了粮食风险，对国家粮食储备、粮价稳定具有积极作用，其二将节约大量石油资源，实现了资源综合循环利用，大大减少了石油化工行业带来的环境污染，缓解石油、煤炭等不可再生资源紧缺局面；第三，对提高农业废弃物利用率，避免田间秸秆焚烧导致环境污染和消防安全，改善农村环境，增加农民收入，发展循环经济具有重要意义。

本文的另一项工作是研究利用木薯纤维素同步糖化发酵生产乙醇，正如 1.4 小节中所述，三种木薯酒渣纤维素生产乙醇的研究都局限于各自方法的条件探索和优化，并无彼此之间横向的比较。本文以木薯发酵乙醇后的酒渣为原料，对三种方法在高木薯酒渣含量条件下进行乙醇发酵的技术进行了比较，包括木薯酒渣直接同步糖化与发酵生产乙醇、木薯酒渣预处理后同步糖化与发酵生产乙醇、液化木薯浆液同步淀粉与纤维素糖化生产乙醇，并对三种方法进行了工艺优化。最后，对比了三种木薯酒渣纤维素乙醇的纤维素酶用酶成本，从酶成本角度对木薯纤维素的深加工及综合利用提供依据。

第 2 章 玉米秸秆单糖制备及氢解生产多元醇

2.1 引言

本章节的主要研究内容是建立以玉米秸秆为基础原料，经干法稀酸高温预处理、高固体含量糖化、秸秆糖精制浓缩、最后经高压氢化裂解得到生物化工醇的过程。本章着重研究了上述流程中的秸秆除尘前处理、预处理、酶水解糖化、氢化裂解等工段的主要影响。秸秆中通常含有一定量的泥土、沙石、灰分等杂质，这部分物质一般为钙盐、镁盐等偏碱性的成分，文献报导使用的秸秆原料都经过较为彻底的除尘处理，通常都是采用大量水洗的方法，也有文献提到这部分物质会影响秸秆预处理的效果^[81]，但是并没有进行系统的研究及分析，因此本章其中一节着重研究了经常被忽视的秸秆除尘的影响及重要性。另一方面，正如第一章中所述，在运用预处理及糖化等糖平台技术时，需综合考虑底物适用性、产品用途、下游工艺以及预处理及糖化时各主要的反应条件的影响，本文在本实验室开发的干法预处理技术及高固体糖化反应器的基础上，探索了影响预处理效果及酶水解效果的各个因素，并结合成本分析以期得到高糖收率、低成本的适用于化学多元醇生产的糖平台技术。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 秸秆原料

秸秆分别来自于吉林省吉林市、河南省新乡市、河南省郸城县。实验中将含有大量尘土的河南郸城的秸秆用于清洗实验。对于用于预处理的秸秆，需彻底洗净后才可用于实验，具体方法为首先用清水洗去沙土后，然后经压榨机压榨出残余水分，最后平铺于鼓风式干燥箱中 105 °C 下烘干。将烘干后的秸秆经锤式粉碎机粉碎至颗粒大小为 0.5 cm 以下，收集置于密封袋中室温存储。秸秆经上游前处理后纤维组成见表 2.1。

表 2.1 不同产地玉米秸秆纤维素与半纤维素含量

Table 2.1 cellulose and hemicellulose content in the corn stover

	纤维素 (%)	半纤维素 (%)
吉林	37.04±0.12	26.84±0.12
河南新乡	40.53±0.24	28.72±0.80
河南郸城	41.42±0.08	31.74±0.18

2.2.1.2 纤维素酶

纤维素酶来自上海尤特尔生化有限公司商品酶 Youtell #6，酶为固体粉末状，滤纸酶活为 145 FPU/g 酶粉。

2.2.1.3 菌种

实验中用到的微生物：酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1（中国普通微生物保藏中心 CGMCC 编号为 2528），本实验室自行诱变筛选得到，具有耐高温、耐抑制物的特点，适合于稀酸预处理生物质的乙醇发酵。树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1，本实验室自行筛选得到，具有高效脱除呋喃衍生物、弱酸类等抑制物的能力。

2.2.1.4 药品及试剂

实验中所用到的无机盐、硫酸、柠檬酸、柠檬酸钠、活性炭均购于上海凌风化学试剂有限公司，AR 级。葡萄糖、木糖、乙醇购于国药集团化学试剂有限公司，AR 级。其他药品例如四环素购于 sigma 公司、酵母粉购于安琪酵母有限公司、离子交换所用树脂购于华昌聚合物有限公司。

2.2.1.5 设备

(1) 预处理反应器由本实验室自主设计，主要由蒸汽发生器(输出压力为 3.0 Mpa)、预处理反应釜和物料收集装置三部分组成。反应釜由耐酸不锈钢组成，呈圆柱状，直径约为 20 厘米、高 40 厘米。反应釜底部封闭，通过顶部法兰的开启及关闭实现物料进出，顶部法兰配有泄压阀及压力表。反应釜外壁由石棉隔热层及加热套保温，在反应釜内部及保温层配有热电偶，分别实时测定内部及夹套的温度。

(2) 糖化及发酵反应器由本实验室自行设计，由上海保兴生物设备有限公司生产，该反应器配置有温度、转速、pH 控制等系统，其特点是安装一组正螺旋螺带搅拌桨，以及配套的涡轮/翼型桨与底桨，在此混合系统下能够处理高达 40% 固体含量的木质纤维素原料的糖化及发酵过程，反应器更多的结构及信息见参考文献^[51]。

其他设备有：

1L 高压氢解反应釜，威海化工机械有限公司

LC-20AD 高效液相色谱(HPLC)，日本岛津公司

GC2014C 气相色谱，日本岛津公司

HPX-87H 色谱柱，Bio-rad Aminex

RID-10A 示差检测器，日本岛津公司

YXQ-LS-75SII 立式蒸汽灭菌锅，上海博迅实业有限公司

SF-300 粉碎机，上海科太粉碎设备厂

BDHG-9140A 电热鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司

SX2-2.5-10 箱式电阻炉配套 KSW-4D-11 温度控制器，上海博讯实业有限公司

HZ-9212S 恒温水浴振荡摇床，江苏华利达实验设备厂

BS224 电子天平，梅特勒托利多仪器(上海)有限公司

Milli-Q 超纯水系统，Millipore 公司

RE-201D 旋转蒸发器，上海科兴仪器有限公司。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 秸秆清洗除尘

秸秆中通常含有一定量的泥土、沙石、灰分等杂质，实验中对来自河南郸城的秸秆进行清水清洗处理，按照单位质量秸秆所需的清洗用水量的不同，考察不同清洗的程度对秸秆的组成变化（纤维及灰分）及对后续稀酸预处理效果的影响。秸秆清洗时，称取 500 g 干秸秆于 50 L 的塑料箱中，分别加入秸秆质量的 100 倍、50 倍、30 倍、10 倍的自来水，不断搅拌，清洗 10 分钟左右之后用滤瓢将秸秆捞出，装入压榨袋中用压榨机挤压出残余的水分，最后平铺于 105 °C 烘箱中烘干备用。考察秸秆经不同清洗程度后的性质时，以不经清洗的秸秆（表示为 0 倍水洗）作为对照。预处理条件为：2.5% (w/w) 稀硫酸使用量、2:1 预浸固液比，反应温度 190 °C，反应 3 分钟。

2.2.2.2 秸秆预处理

(1) 稀酸预浸。预处理的预浸环节涉及两个参数：硫酸使用量及预浸固液比。硫酸使用量指的是单位质量干秸秆所需的硫酸质量，表示为 g 硫酸/ g 干秸秆 ×100%；预浸固液比指的预浸时所用固体对液体的质量比，表示为 g 固体/g 液体。预浸过程先将原料按一定的固液比 (2:1-1:3) 及硫酸用量 (2.5% -15%) 加入质量浓度为 5% 的稀硫酸溶液，在大塑料箱中（体积为 25 L）充分搅拌混匀后，装于密封塑料袋中，室温下预浸 12-16 小时后待用。

(2) 预处理反应：将上述预浸后的物料装入不锈钢圆柱型网套中（网套内径略小于预处理反应釜内径），接着将装满物料的网套装入预处理反应器，拧紧顶部法兰，确定反应器完全密闭后，缓慢通入高温水蒸汽 (2-3 MPa)，在温度升至 100 °C 之前，打开排气阀排出不凝性气体，并打开底部排液阀排出冷凝水。温度高于 100 °C 以后，关闭排气阀与排水阀，通过调节进气阀，控制反应器内部温度与压力的上升速度，从 100 °C 到 150 °C 控制在 3 min 左右，从 150 °C 到 190 °C 约 5-6 min。当到达反应温度 (190-200 °C ±2 °C) 后，根据压力表及热电偶的读数控制进气阀，使得反应体系在目标温度下维持一定的时间 (3-5 min)。反应结束后，打开排气阀泄压，30 s 内将反应器内压力降至大气压。预处理完后物料冷却后装入塑料袋，4 °C 储存备用。

2.2.2.3 预处理秸秆的酶水解反应

预处理后秸秆在一定固含量下进行纤维素酶水解反应，当固含量在 20% 以下时，水解反应于 250 mL 摇瓶中进行。使用摇瓶作为反应器时，采用 0.1 M、pH 4.8 的柠檬酸钠缓冲液作为缓冲体系，反应场所为恒温水浴摇床。当固含量为 20% 时，水解反应于 5 L 螺带浆反应器中进行，采用反应器自带的 pH 及温度电极实时监测反应过程中的 pH 值及温度，利用 5 M NaOH 溶液调控反应体系 pH 值在设定的范围内。水解反应主要考察不同反应温度（分别为 45、50、55、60 °C），不同固含量（5%、10%、15%、20%），不同酶用量（7、10、15、20 FPU/g DM），不同搅拌转速（100、150、200、250 rpm），

不同 pH 值 (4.5、4.8、5.2、5.5) 对秸秆水解效果的影响。

2.2.2.4 玉米秸秆生物脱毒

用 20 mL 去无菌离子水清洗长满树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 的 PDA 培养基斜面, 将洗出的孢子液接入 200 g 左右经稀酸预处理后且经 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 至 6.0 的秸秆中, 将秸秆置于 5 L 的塑料整理箱中, 盖上盖子 25 °C 下静置扩大培养 7 天。将上述扩培结束的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 连同它的秸秆培养基一起接种至 2 kg 稀酸预处理后且经氢氧化钙调节 pH 至 6.0 的秸秆中, 并轻微搅拌混合使其均匀。此时的脱毒反应在 25 L 的塑料整理箱中进行, 盖上整理箱的盖子, 于 25 °C、湿度 50-60% 下静置培养 7 天。

2.2.2.5 玉米秸秆同步糖化乙醇发酵

合成培养基: 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L, YE 1 g/L。pH 值自然。合成培养基用于菌种活化。

水解液培养基: 将预处理后未经脱毒的秸秆在 15% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量下糖化 72 小时, 糖化结束后于离心机中 8000 rpm 离心 20 分钟, 收集水解液上清。往水解液上清中添加营养盐成分及浓度与合成培养基一致。

25% 水解液培养基: 将水解液培养基与合成培养基按体积比 1:3 混匀, 将 pH 值用 5M NaOH 调节至 5.5, 用于菌种驯化。

50% 水解液培养基: 将水解液培养基与合成培养基按体积比 1:1 混匀, 将 pH 值用 5M NaOH 调节至 5.5, 用于菌种驯化。

同步糖化发酵过程中所用营养盐成分及浓度为: KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L, YE 1 g/L。上述培养基与营养盐在使用前在 115 °C 蒸汽灭菌锅中灭菌 20 min。

菌种培养及驯化过程: 取 2 mL 甘油冷冻保藏 (-70 °C) 菌种, 接入 20 mL (100 mL 锥形瓶) 合成培养基中, 30 °C、150 rpm 培养箱中活化 18 h。接着以 10% (v/v) 的接种量接入 25% 水解液培养基中, 在相同环境下驯化培养 15 h (一级种子)。之后再以相同的接种量接入 50% 水解液培养基中, 在相同环境下继续驯化培养 15 h (二级种子)。最后再以 10% (v/v) 的接种量接入 50% 水解液培养中 (500 mL 锥形瓶装液 250 mL) 用于第三级种子的扩大培养, 30 °C、150 rpm 培养箱中培养 12 h 后用于发酵罐接种实验。

同步糖化发酵过程可分为两个阶段, 即预酶解阶段和同步糖化与发酵阶段。在预酶解阶段, 根据固含量及酶用量算得实验所需的去离子水及纤维素酶用量, 并将其全部加入发酵罐中, 然后以补料的方式加入 2.2.2.4 步骤中脱毒完全的玉米秸秆 (始终保持反应体系呈液浆状) 至固体含量为 25% (w/w)。预酶解阶段在 50 °C、pH 4.8、150 rpm 的条件下维持 12 h。预酶解结束后, 将温度降低为 37 °C、pH 升高至 5.5, 然后以 10% (w/w) 的接种量接入上述驯化培养后的第三级酵母菌种, 此时同步糖化与发酵阶段正式开始。在整个同步糖化乙醇发酵过程中, 用 5 M 的 NaOH 控制体系 pH 为 5.5, 并定时取样,

经 13000 rpm 离心 5 min 后, 将上清液于 HPLC 进行分析。发酵过程持续 72 小时。

2.2.2.6 玉米秸秆水解液除杂及氢解制取多元醇

玉米秸秆糖化结束后, 利用高速离心机 (8000rpm、15min) 进行除渣过滤, 然后加入 3% (w/w) 的活性炭加热至 80-90 °C, 脱色 30 分钟后进行真空过滤, 将滤液用蠕动泵泵入 732 型强酸性阳离子交换树脂中去除滤液中的 Na^+ , 紧接着用 D315 型弱碱性阴离子交换树脂去除 SO_4^{2-} , 最后利用旋转蒸发器将离子交换后的溶液浓缩至总糖浓度为 200 g/L-400 g/L 备用。在进行氢解反应时, 于高压反应釜中加入上述浓缩后的糖液中并加入 3-4% 的 NaOH, 补充一定量的催化剂, 开启搅拌, 通入氢气 (先置换釜中残余空气) 开启夹套导热油缓慢升温至 220-230 °C, 之后保持氢气压为 11-12 Mpa, 反应 120 分钟结束后出料。出料后将反应液经高速离心分离出催化剂, 取上清经气相色谱分析多元醇的组成。在计算多元醇收率时, 假设加氢裂解前后反应体系体积变化可忽略不计。

$$\text{多元醇收率} = \frac{[\text{多元醇浓度}]}{[\text{总糖浓度}]} \times 100\%。$$

2.2.3 分析方法

2.2.3.1 物料含水量或含固量分析

将物料置于洗净且烘干至恒重的玻璃平板中, 记录平板质量 M_1 , 物料质量 M_2 。接着将物料及平板置于 105 °C 烘箱中烘干 4 小时以上至恒重, 记录此时总质量 M_3 。则物料的含固量 = $(M_3 - M_1) / M_2 \times 100\%$; 含水量 = $100\% - \text{含固量}$ 。

2.2.3.2 预处理效果评价

对稀酸预处理效果的评价采用 NREL 的 LAP-009 并稍作修改, 考察预处理后物料完全糖化的能力用于评价预处理强度^[82]。全糖化体系为: 于 100 mL 摇瓶中称取质量为 1 g 干重的秸秆, 添加 10 mL 0.1 M、pH 4.8 柠檬酸钠缓冲液作为缓冲体系, 用 5M 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 4.8, 接着加入 15.0 FPU/g DM 的纤维素酶, 及 0.06 mL 四环素溶液 (10mg/mL 75% 乙醇) 用于抑制微生物生长, 之后用去离子水调节体系至 20 g (5% w/w), 最后将摇瓶置于 50 °C、150 rpm 的水浴摇床, 酶解 72 h。糖化结束后取 1mL 样品经 13000 rpm 离心 5 分钟后, 取上清用于水解产物浓度测定。每个预处理条件设置两次平行实验, 单次预处理的评价取两个平行。水解得率计算方法为:

$$\text{葡聚糖转化率} \% = \frac{[\text{葡萄糖浓度 g/L}] \times 0.019 \text{ L} - 1\text{g} \times [\text{样品中葡萄糖含量 g/g}]}{1\text{g} \times [\text{样品中葡聚糖含量 g/g}] \times 1.111} \times 100\%$$

$$\text{木聚糖转化率} \% = \frac{[\text{木糖浓度 g/L}] \times 0.019 \text{ L} - 1\text{g} \times [\text{样品中木糖含量 g/g}]}{1\text{g} \times [\text{样品中木聚糖含量 g/g}] \times 1.136} \times 100\%$$

其中, 0.019 为反应体系液体体积, 1.111 及 1.136 分别为葡聚糖及木聚糖转化为单糖时的反应系数。

2.2.3.3 预处理物料的可溶性组份及抑制物、不溶性组份含量分析

称取质量为 1 g 干重的秸秆于 100 mL 锥形瓶中, 加入去离子水使得体系总质量至 20 g (5% w/w), 用橡胶塞密封后置于 30 °C、150 rpm 恒温气浴摇床中洗脱 2 小时左右,

将洗脱后的物料用烘干并记录重量 (m_1) 的滤纸进行抽滤。抽滤得到的滤液用于预处理物料可溶性组份中的游离的单糖, 寡糖和抑制物等成分的测定。将滤渣用去离子水反复、多次冲洗后于 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重 (滤纸与不溶性固体总重 m_2), 将烘干后固体用于测定物料中水不溶性固体含量及纤维素、半纤维素含量。上述过程可计算得到物料中水不溶性固体含量 (WIS) 含量为:

$$\text{WIS} = (m_2 - m_1) / 1 \times 100\%$$

(1) 可溶性游离组份的测定, 将上述抽滤得到的滤液经 HPLC 分析后, 得到滤液中葡萄糖、木糖、乙酸、乙酰丙酸、糠醛、羟甲基糠醛的浓度, 进而算出物料液相组成中可溶性成分的含量, 采用如下公式计算各物质的含量:

$$\text{物料中游离组份含量 mg/g} = \frac{[\text{滤液中样品浓度 g/L}] \times 0.019\text{L}}{1\text{g}} \times 1000 \text{ mg/g}$$

(2) 纤维素、半纤维素及寡聚糖含量测定: 对原料及预处理物料不溶性组份中的纤维素及半纤维素、滤液中寡聚糖含量的分析根据 NREL 中的测定方法^[83]并稍作修改, 纤维素及半纤维素分析的主要步骤为:

准确称取 0.100 g 、 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重的秸秆原料或上述经多次清洗、抽滤、烘干后的不溶性秸秆滤渣于 30 mL 具塞压力试管中, 然后加入 1 mL $72\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中反应 1 h , 在此过程中每隔 $5\text{--}10\text{ min}$ 使用玻璃棒搅拌一次, 待反应结束后向压力试管中加入去离子水 28 mL 使得 H_2SO_4 浓度下调至 4% , 然后将塞子塞紧, 并上下颠倒数次使其充分混匀。最后用纱布扎紧试管塞, 置于自动灭菌锅中 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 1 h , 待反应结束后冷却至室温, 加入碳酸钙粉末调节 pH 至中性 (不再产生气泡) 后通过离心取上清用于 HPLC 测定。

寡聚糖含量测定的主要步骤为: 取 5 mL 经上述抽滤得到的洗脱液于 30 mL 具塞压力试管中, 并加入 1 mL $72\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 及 23 mL 去离子水, 此时硫酸浓度为 4% 。接下来的步骤与上述纤维素及半纤维素分析的方法一致。最后经 HPLC 测得葡萄糖和木糖的浓度后, 与(1)中所测得相应的葡萄糖和木糖含量作差, 即得出物料游离组份中葡寡糖和木寡糖的含量。

由于上述反应均需要在 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高温下进行, 在此条件下会使得单糖发生降解从而影响测定结果, 因此在实验进行时, 需配置标准葡萄糖及木糖溶液并同时对其进行相同处理, 并测定反应前后的糖浓度变化从而绘制标准曲线加以校正。图 2.1 为测定时标准校正曲线。

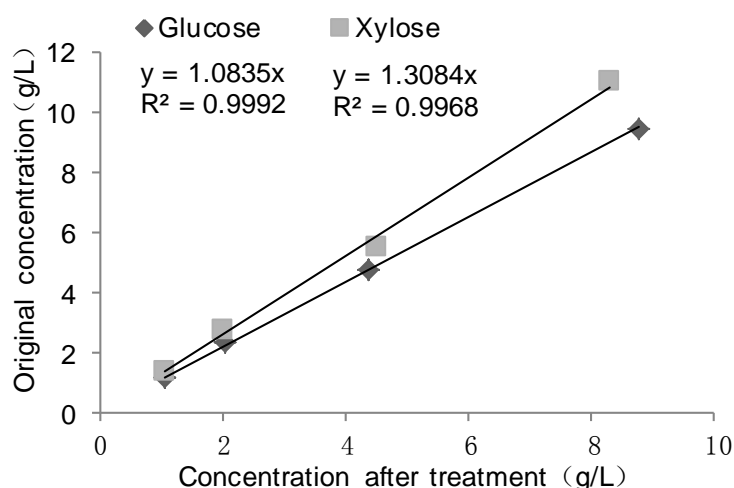


图 2.1 纤维及寡糖分析校正曲线

Fig. 2.1 Standard curves for calibration in fiber or oligosaccharide content analysis

相应组分的计算公式如下：

$$\text{葡聚糖含量}\% = \frac{[\text{葡萄糖浓度 g/L}] \times 0.029 \text{ L} \times 1.083}{0.1\text{g} \times 1.111} \times 100\%$$

$$\text{木聚糖含量}\% = \frac{[\text{木糖浓度 g/L}] \times 0.029 \text{ L} \times 1.308}{0.1\text{g} \times 1.136} \times 100\%$$

其中，0.029 为反应体系体积，1.083 及 1.308 为图 2.1 中得到的反应校正系数，1.111 及 1.136 分别葡聚糖及木聚糖的转化系数。

2.2.3.4 秸秆中灰分含量测定

对秸秆中灰分的测定采用高温电阻炉煅烧后测差重的方法，具体方法为：将待测样品及坩埚在 105 °C 烘箱中烘至恒重，然后称取 1 g 左右（记录质量为 M1）秸秆原料于坩埚（记录质量为 M2）中，置于电阻炉中，首先设定温度为 250 °C，由室温升至 250 °C 的时间约为 10 分钟，并在 250 °C 下反应 30 分钟。第二步设置温度为 575 °C，由 250 °C 升温至 575 °C 的时间约为 20 分钟并在 575 °C 下反应 3 小时。反应结束后，关闭炉子的加热系统，自然降温至 105 °C 后取出样品置于干燥器中继续降温至室温后称重，记录此时样品及坩埚总重量（M3）。样品中灰分的含量 = (M3-M2) / M1 × 100%。

2.2.3.5 高效液相色谱使用条件

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、乙酰丙酸、糠醛及羟甲基糠醛等化合物的浓度通过高效液相色谱仪测定。测定条件为：5 mmol/L 的稀 H₂SO₄ 为流动相，流速为 0.6 mL/min，柱温为 65 °C。分析样品时先经过适当倍数的稀释并使用 0.22 μm 的滤膜过滤，液相分析时样品的进样体积为 20 μL。

2.2.3.6 糖化及同步糖化发酵过程中得率的计算

糖化及同步糖化发酵过程中葡萄糖、木糖、乙醇得率均为相应理论得率的百分比，

计算公式如下:

$$\text{葡萄糖得率} = \frac{[\text{Glu}] \times V}{f \times [\text{Biomass}] \times m \times 1.111} \times 100\%$$

$$\text{木糖得率} = \frac{[\text{Xyl}] \times V}{f_h \times [\text{Biomass}] \times m \times 1.136} \times 100\%$$

$$\text{乙醇得率} = \frac{[\text{Eth}] \times W}{976.9 \times 0.804 \times [\text{Eth}] \times 0.511 \times f \times [\text{Biomass}] \times m \times 1.111} \times 100\%$$

其中: [Glu], 糖化结束时葡萄糖浓度 g/L;

[Xyl], 糖化结束时木糖浓度, g/L;

[Eth], 发酵结束时乙醇浓度, g/L;

V, 糖化或发酵结束时体系的总液体体积, L;

W, 同步糖化与发酵过程体系的总用水量, g;

f, 物料中的纤维素含量, g/g;

f_h , 物料中的半纤维素含量, g/g;

[Biomass], 糖化或发酵体系的物料固体含量, % (w/w);

m, 糖化或发酵体系的总质量, g。

上述公式中, 1.111 与 1.136 分别为葡聚糖和木聚糖转化为单糖的反应系数, 0.511 为酵母发酵时葡萄糖到乙醇的转化系数。乙醇得率计算采用 Zhang^[84]优化后的计算方法, 此方法将高浓度乙醇发酵时生成的乙醇体积、糖化消耗的水以及乙醇-水体系混合产生的体积缩减等三个因素考虑入内所形成的新的乙醇得率计算式。

2.3 结果与讨论

2.3.1 秸秆灰分及秸秆清洗对预处理的影响

清洗秸秆是一种有效的去除秸秆粉尘的办法, 随着清洗过程中用水量的增加, 粉尘的去除效果更加显著, 如图 2.2 所示, 对比于原物料, 当用水量增加时, 清洗后物料灰分逐步降低, 由 9.6% 降低至 5% 左右, 随着灰分含量的降低, 相应的葡聚糖与木聚糖含量有一定的增加。秸秆中的粉尘一般为无机矿物性粉尘, 多为硅盐、钙盐、镁盐等, 这部分物质在水溶液中呈碱性, 图 2.3 为不同清洗液固比清洗后物料在不同阶段的 pH 值, 如图所示, 当用水量增加时, 由于粉尘的去除使得秸秆浸于水后液体的 pH 值逐渐降低, 变化规律与灰分含量相一致。在稀硫酸预浸后, 游离酸的存在使得秸秆浸于水后呈酸性, 随着清洗程度增大, 稀酸预浸后物料的 pH 降低, 说明粉尘去除使得秸秆酸中能力变弱, 在预浸过程中粉尘会中和掉一部分的酸。

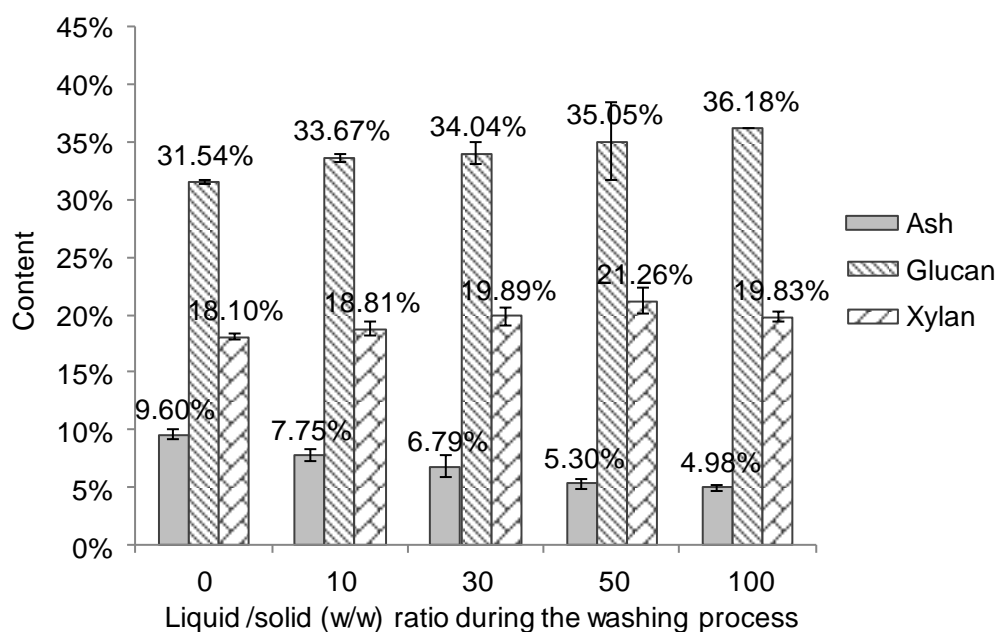


图 2.2 不同清洗液固比清洗后物料的组份含量

Fig. 2.2 Fiber and ash content in the corn stovers which after different water usage washing

将上述不同清洗液固比清洗后的秸秆用于稀酸预处理，预处理后物料的各组分含量见表 2.2、表 2.3 及图 2.2。分析上述结果可知，随着原料清洗程度增强，预处理物料の木糖含量上升，木聚糖含量降低，半纤维素含量也降低，这些变化趋势都说明清洗会导致预处理强度增大，其原因可能来自于粉尘的去除削弱了原料对酸的中和能力，从而使

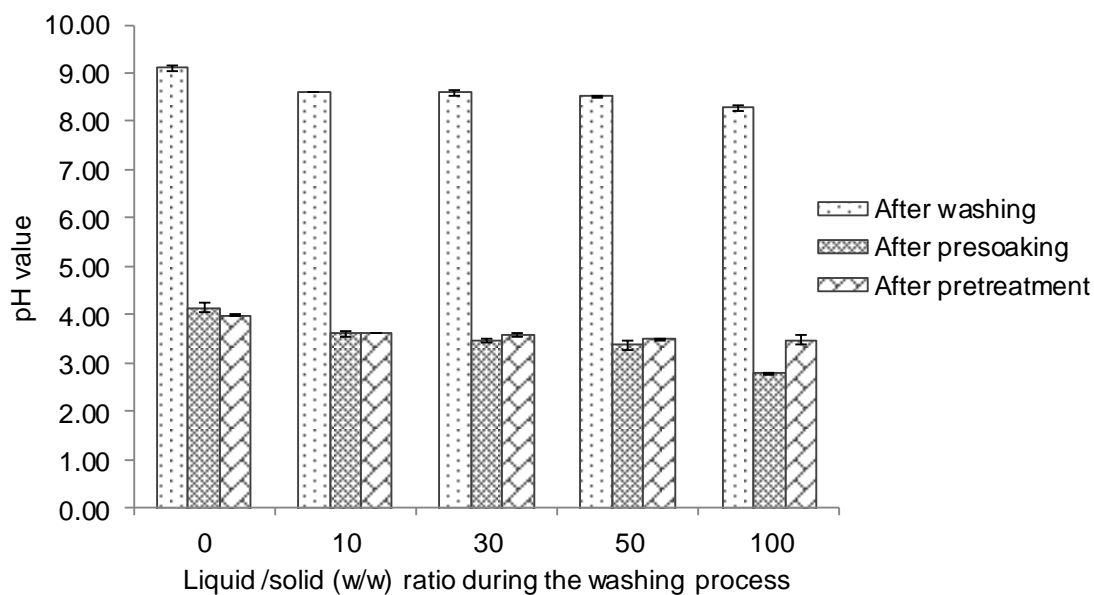


图 2.3 不同清洗液固比清洗后物料在不同阶段的 pH 值

Fig. 2.3 PH value of corn stovers which after different water usage washing

得剩余更多硫酸与半纤维素发生水解反应，因此加大了预处理强度，伴随着还有物料中抑制物含量的增加（表 2.3）。

表 2.2 不同清洗液固比清洗后物料经预处理后游离组份的含量

Table 2.2 Content of the free sugar in the pretreated corn stover

Liquid/solid ratio	Glucose (mg/g DM)	Xylose (mg/g DM)	Glucan oligosaccharide (mg/g DM)	Xylan oligosaccharide (mg/g DM)
0	3.235±0.205	15.381±0.442	17.383±0.783	87.899±3.440
10	4.561±0.123	28.448±0.370	15.896±0.761	76.996±0.717
30	3.600±0.259	28.884±0.110	14.357±2.565	81.952±3.401
50	3.995±0.374	31.750±2.086	12.050±0.765	74.572±1.328
100	4.524±0.218	38.891±0.209	10.361±0.043	70.188±1.301

表 2.3 不同清洗液固比清洗后物料经预处理后抑制物的含量

Table 2.3 Content of the inhibitors in the pretreated corn stover

Liquid/solid ratio	Acetate (mg/g DM)	5-HMF (mg/g DM)	Furfural (mg/g DM)
0	6.914±0.064	0.911±0.007	0.527±0.123
10	6.941±0.051	1.516±0.195	1.267±0.039
30	6.275±0.062	1.366±0.022	1.451±0.387
50	7.102±1.560	1.417±0.123	1.670±0.048
100	6.148±0.447	1.656±0.316	1.538±0.153

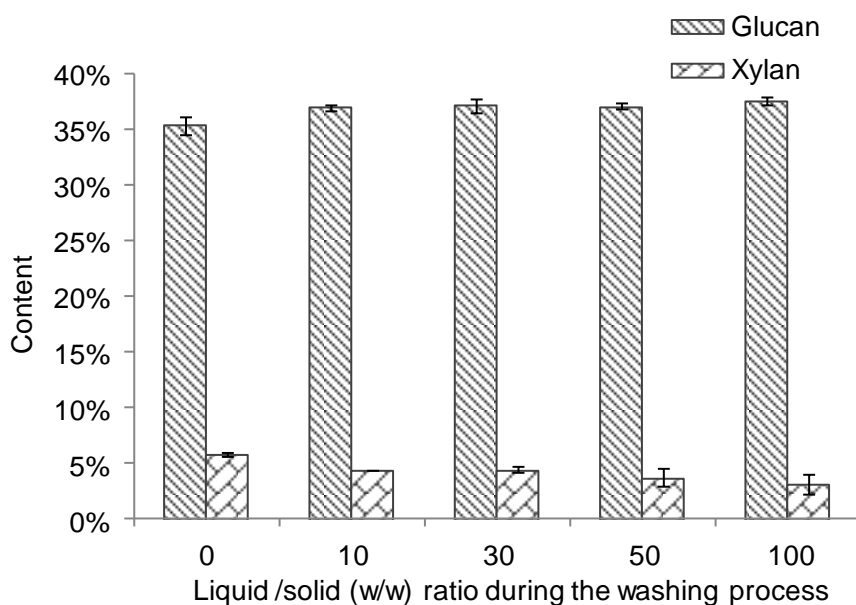


图 2.4 不同清洗液固比清洗后物料经预处理后纤维含量

Fig. 2.4 Fiber content in the pretreated corn stover

图 2.4 为预处理后物料的葡聚糖与木聚糖的含量，对比图 2.2 中预处理前物料的组份含量，可知在预处理后，木聚糖由 20%左右降低至 3%-5%之间，木聚糖的去除率在 73%-85%之间，由于木聚糖的去除，葡聚糖含量有小幅度的增长。图 2.5 考察预处理过程物料衡算，糖回收率如图 2.5 所示，葡聚糖的回收率都在 1 左右，木聚糖的回收率随着清洗程度加大而降低，这说明葡聚糖在预处理过程中损失极少，而木聚糖在预处理过程由于被硫酸水解并受到高温破坏从而有一定量的损失，预处理强度越大，损失量越多。

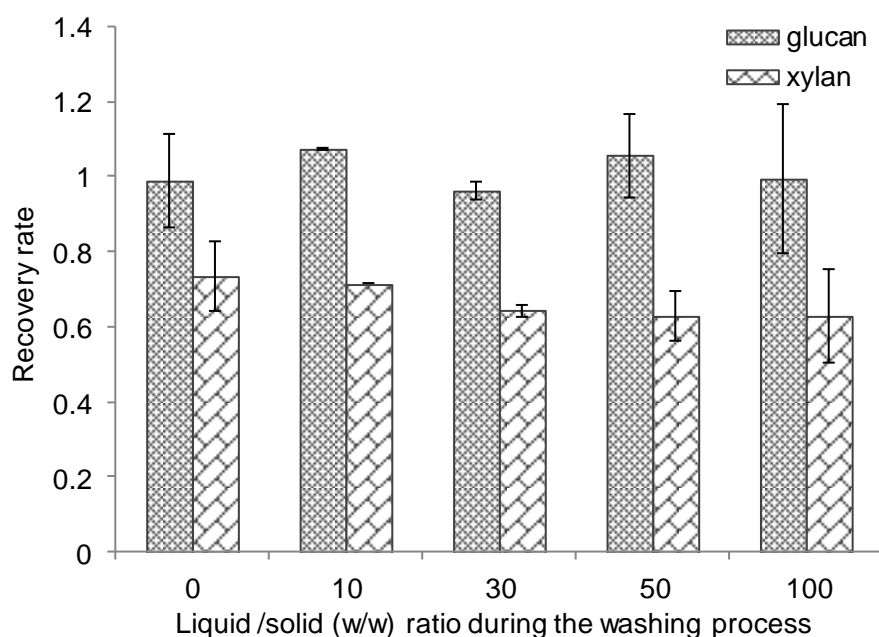


图 2.5 不同清洗液固比清洗后物料在预处理过程中的糖回收率

Fig. 2.5 Recovery rate of the pretreatment of the corn stovers which after different water usage washing

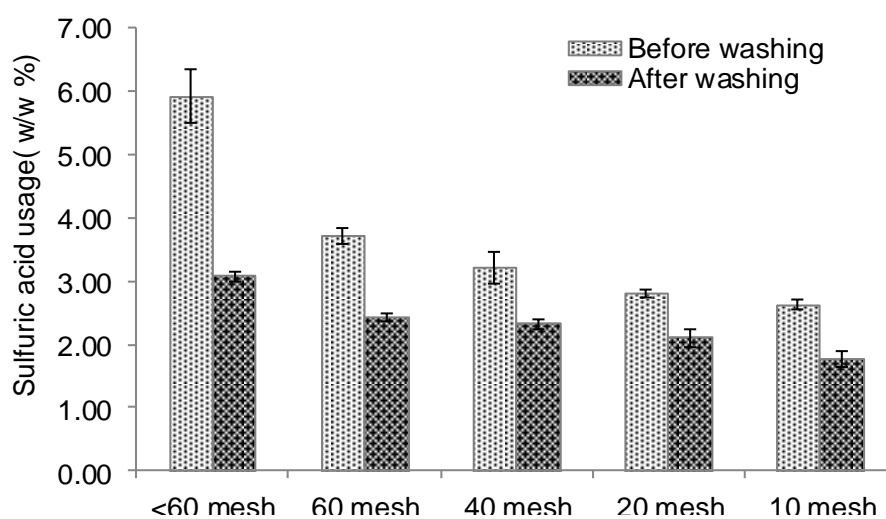


图 2.6 秸秆不同粒度组份的酸反应能力

Fig. 2.6 Acid reaction capacity of the different particle size of corn stover

用振动筛将 100 倍水解秸秆及不清洗的秸秆分别筛分成不同粒度的组份，再将各组份与 5% 硫酸溶液反应，将反应终点的 pH 控制在 2.5 左右（预浸结束时的 pH 值），考察不同粒度秸秆酸反应能力。图 2.5 表明，秸秆在清洗前后酸中和能力变化最显著的组份为小于 60 目的组份，这部分物质主要为粉尘小颗粒。秸秆不同粒度与 5% 硫酸溶液反应时，未清洗秸秆 60 目以下组份的酸反应能力最强，硫酸用量约为 6.0% (w/w)。秸秆在清洗后，60 目以下组份的酸反应能力急剧下降，硫酸用量降低为 3.0% (w/w)。说明清洗主要除去粉尘等小颗粒，这也是清洗使得秸秆 pH 值降低的主要因素，而这部分物质的脱除将对预处理效果产生正面影响。

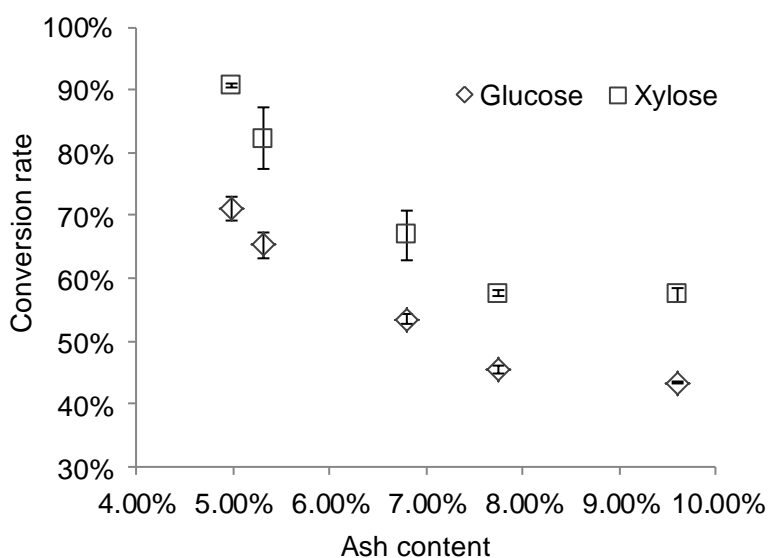


图 2.7 物料中灰分含量对糖转化率的影响

Fig. 2.7 Sugar conversion rate of pretreated corn stovers which has different ash content

将上述预处理物料用于酶水解反应，结果如图 2.7 所示，考察清洗后物料中灰分的含量对糖转化率的影响，在全糖化评价时，糖化得率的高低最主要取决于预处理环节的强度，对原料纤维结构破坏的程度越大，残余的葡聚糖与木聚糖就更容易被纤维素酶水解，由图可知，当物料中灰分含量为 5% 左右时，葡聚糖的水解得率大于 70%，木聚糖的水解得率大于 90%，随着灰分含量增大，葡聚糖与木聚糖的转化率都显著降低，对比不经过清洗的物料（即灰分含量为 9.7% 的原料）葡聚糖的水解得率只有 45% 左右，由此可得出即原料中灰分含量越大，稀酸预处理的效果越低，从而造成酶水解时聚糖的转化率降低。

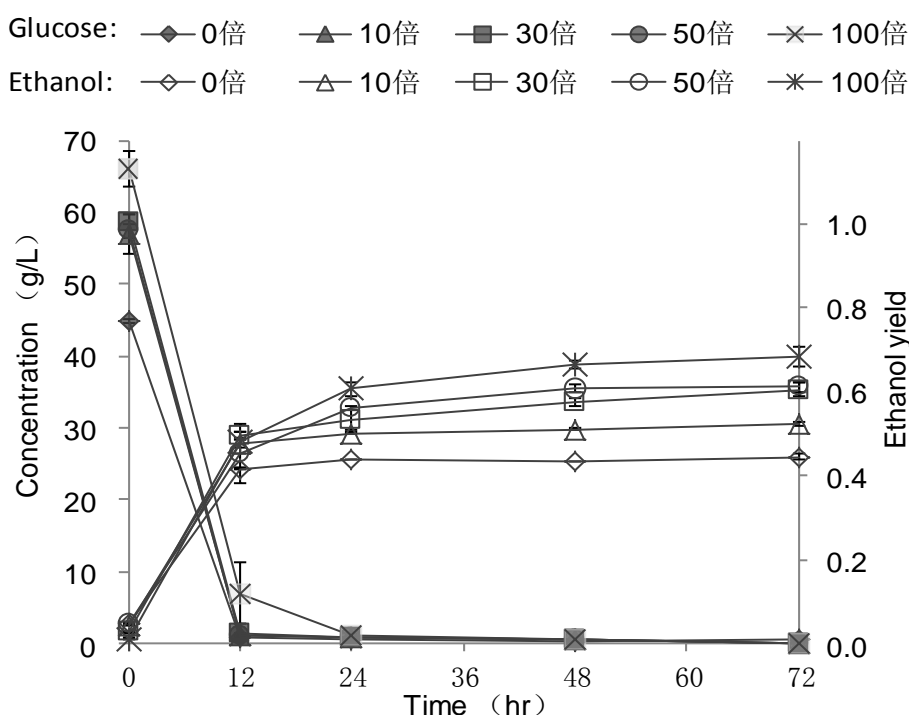


图 2.8 不同清洗程度的预处理秸秆用于乙醇同步糖化发酵的影响

Fig. 2.8 Effect of corn stover washing degree on simultaneous saccharification and ethanol fermentation
 反应条件：底物固含量 25%、预糖化时间 12 h、酶用量 15FPU/gDM、37°C、pH5.5、接种量 10% (v/v)，转速 150 rpm、反应 72 h

将上述不同清洗程度的原料用于预处理后，经生物脱毒除去其中的抑制物，接着用于同步糖化发酵生产乙醇，实验中所用底物固体含量均为 25%，酶用量均为 15 FPU/g DM。发酵过程中的葡萄糖消耗曲线及乙醇生成曲线如图 2.8 所示。由图可以看出，不同清洗程度的秸秆对同步糖化发酵过程中的影响主要体现在两个方面，一个是预糖化结束时的初糖浓度，随着清洗程度的加大，初糖浓度由 45 g/L 提高至 67 g/L，这说明清洗的越干净，物料的预处理效果更佳从而在预糖化阶段释放出更多的糖。另一方面，从乙醇的生成上看，随着发酵的进行，清洗程度越高的原料其乙醇浓度始终要高于清洗程度较低的秸秆，100 水洗的秸秆最终乙醇浓度为 40 g/L，而不经清洗的对照实验其乙醇浓度只有 26 g/L。在发酵终点时乙醇得率呈现梯度分布，乙醇得率与清洗程度的变化规律与图 2.7 中全糖化评价是的变化规律一致。由此可得出，秸秆经水洗后，稀酸预处理的效果随着清洗程度加大而增强，一方面造成酶水解时糖的转化率提高，另一方面也对同步糖化乙醇发酵过程有正面促进作用，使得最终乙醇得率增大。

综上所述，郸城秸秆在收获后带有 9.7% 左右的灰分，用水清洗的方法能够有效地去除这部分物质，秸秆中的灰分使得秸秆浸于水后呈碱性，随着清洗程度加深，秸秆越趋近于中性。这部分碱性物质的去除对秸秆稀酸预处理起到积极的促进作用，体现为预浸过后秸秆 pH 值降低，预处理过程产生的游离糖分增多、抑制物含量增多。将不同清

洗程度的预处理秸秆用于全糖化评价及同步糖化乙醇发酵, 糖化得率及乙醇得率都是随着清洗程度加强而增大, 这也从秸秆纤维结构受预处理破坏的水平上说明秸秆中灰分的去除有助于增大稀酸预处理的强度。因此, 在进行玉米生物炼制时, 对原料中灰分的控制十分必要, 在实验室水平, 可以通过简单的水洗清除, 而在运用于产业化时, 用水清洗的方法显然不适用, 此时可考虑采用机械震荡及鼓风装置对原料进行除尘处理。

2.3.2 不同产地玉米秸秆稀酸预处理

表 2.4 秸秆预处理条件

Table 2.4 Pretreatment condition of corn stover

编号	固液比	硫酸用量	反应温度
1	2:1	2.5%	190 °C
2	2:1	2.5%	200 °C
3	1:1	2.5%	190 °C
4	1:1	5%	190 °C

对清洗干净的秸秆的稀酸预处理, 实验室先前的研究表明, 从反应后物料含水量(必须控制在 65% 以下)、糖化效果、抑制物水平, 以及同步糖化发酵的效率考察, 固液比 2:1、硫酸用量 2.5%、反应 190 °C、反应 3 min 的条件(表 2.4 中编号条件 1)为最佳的预处理条件^[19]。但是仅仅作为糖化使用的秸秆物料, 对含水量、及抑制物含量没有较严格的要求, 并且糖化过程中产生的产物抑制会降低糖收率, 因此, 考虑到提高糖收率, 提高了反应温度、以及预浸时所用的稀酸液体及酸浓度, 从而提高预处理反应条件, 考察在这些条件下的来自不同产地的玉米秸秆预处理后糖化效果。

表 2.5 a 吉林秸秆预处理后物料性质及糖化结果

Table 2.5 a Saccharification result and character of pretreated of Jilin corn stover

编号	预处理物料游离组份含量				预处理物料糖化评价结果		
	固含量	glu(mg/g)	xyl(mg/g)	fur(mg/g)	glu(g/L)	xyl(g/L)	Yield of glucose
1	0.42	11.65	59.79	9.29	6.34	3.48	0.84
2	0.44	15.42	55.66	13.59	6.82	2.34	0.90
3	0.37	13.91	77.74	9.07	6.85	4.15	0.91
4	0.35	38.39	110.84	15.46	7.30	2.94	0.97

表 2.5 b 河南新乡秸秆预处理后物料性质及糖化结果

Table 2.5 b Saccharification result and character of pretreated of Xinxiang corn stover

编号	预处理物料游离组份含量				预处理物料糖化评价结果		
	固含量	glu(mg/g)	xyl(mg/g)	fur(mg/g)	glu(g/L)	xyl(g/L)	Yield of glucose
1	0.480	6.21	66.13	5.70	4.86	3.11	0.54
2	0.453	7.14	60.39	8.82	6.59	2.57	0.73
3	0.397	3.67	59.61	3.83	5.43	3.53	0.60
4	0.373	30.85	117.82	9.77	7.63	2.83	0.85

表 2.5 c 河南郸城秸秆预处理后物料性质及糖化结果

Table 2.5 c Saccharification result and character of pretreated of Dancheng corn stover

编号	预处理物料游离组份含量				预处理物料糖化评价结果		
	固含量	glu(mg/g)	xyl(mg/g)	fur(mg/g)	glu(g/L)	xyl(g/L)	Yield of glucose
1	0.499	4.92	40.74	8.11	5.41	3.47	0.55
2	0.443	11.33	63.45	17.07	7.52	2.64	0.76
3	0.390	7.45	91.14	7.96	6.40	4.55	0.65
4	0.361	39.42	118.86	15.74	8.03	3.02	0.81

来自不同产地（吉林、河南新乡、河南郸城）的玉米秸秆的预处理效果及糖化效果如表 2.5 a-c 所示。实验室先前的研究表明，稀酸预处理条件对秸秆纤维素含量的变化影响不大。预处理后吉林秸秆纤维素含量为 34.0%、新乡秸秆纤维素含量 40.5%、郸城秸秆纤维素含量为 44.2%。用全糖化时葡萄糖得率表征预处理效果，表 2.5 a-c 结果表明，不同产地的秸秆的耐预处理程度差异很大，来至吉林的秸秆最容易被稀酸、高温破坏，从而表现出预处理后物料的抑制物含量比另外两种秸秆高，稀酸的作用是破坏木质纤维素中的半纤维素，使得木聚糖降解得到木寡糖或木糖，高温的作用使得木聚糖进一步降解，并使得部分木糖转化为糠醛等抑制物。因此，从反应后物料中木糖及糠醛的量可以直接作为预处理强度评价的一个指标。由表中数据得出，比较不同的反应条件，温度由 190 °C 提高至 200 °C，糠醛含量及糖化收率都有很明显的提高，这表明了温度的提高加剧了木质纤维素结构的破坏。

预浸时液体用量的提高及酸用量的提高也相应地加强预处理强度，第 4 号条件下，吉林秸秆糖化收率都将近理论糖收率，说明在预浸固液比 1:1、硫酸使用 5.0% 的条件已经足够可以破坏木质纤维素的结构，此条件为最优糖化秸秆预处理条件。对于河南新乡与河南郸城的原料，1 号预处理条件下，预处理效果都不佳（葡萄糖得率 0.55），随着预处理反应强度的提高，糖得率都有明显提高，当使用第 4 号预处理条件时，糖得率达到 0.8 以上。综上所述，不同产地的玉米秸秆对高温稀酸预处理的耐受程度存在差异，对于来自吉林的秸秆，较适合的预处理条件为 1 号：预浸固液比 2:1、硫酸用量 2.5%、反应 190 °C、持续 3 min；对于河南新乡与郸城的秸秆，需加大预处理条件：预浸固液比 1:1、硫酸用量 5.0%、反应 190 °C、持续 3 min。

2.3.2.1 不同预浸固液比对郸城秸秆预处理效果的影响

由 2.3.2 节结果可知，提高稀酸预浸时硫酸用量对预处理效果影响最为显著，因此，考察继续加大硫酸使用量对预处理效果的影响。如表 2.6，增加酸用量使得固液比达到 1:2 与 1:3。使用的原料为来自河南郸城的玉米秸秆。

表 2.6 不同预浸固液比预处理条件

Table 2.6 Pretreatment condition of solid/liquid ratio

编号	固液比	硫酸用量 (%)	反应温度
1	2:1	2.5	190 °C
2	1:1	5	190 °C
3	1:2	10	190 °C
4	1:3	15	190 °C

结果如表 2.7 所示, 随着酸用量的增加, 反应后物料含水量随之增加, 当固液比 1:2 时, 物料预处理后含水量已达 0.75, 并有游离水渗出。游离糖含量随着固液比变化先增加后减少, 呋喃衍生物的含量随着固液比增大而增大, 当固液比为 1:3 时, 糠醛与羟甲基糠醛的含量显著提高。由此可知, 稀硫酸对木质纤维素结构的破坏随着酸用量的提高而逐渐加强, 使得酸水解出的单糖含量增多, 但是由于物料含水量增大, 溶解于水中的单糖在高温作用下, 更容易被转化为呋喃类化合物, 反而降低糖收率。预处理物料在低固含量 (2%) 下的糖化评价效果如表 2.8 所示。最终葡萄糖浓度在固液比为 1:1 时呈现最大值。随着酸用量提高, 由于木糖大部分被转化为糠醛, 因此最终木糖浓度较低。

表 2.7 不同预浸固液比预处理物料分析结果

Table 2.7 Character of the pretreated corn stover which under different S/L ratio

编号	固含量	glu(mg/g)	xyl(mg/g)	fur(mg/g)	HMF(mg/g)
1	0.499	4.92	40.74	8.11	2.32
2	0.364	39.42	118.86	15.74	5.11
3	0.250	140.29	48.31	22.68	11.78
4	0.225	10.66	1.49	159.96	132.50

表 2.8 不同预浸固液比预处理物料糖化结果*

Table 2.8 Saccharification result of the pretreated corn stover which under different S/L ratio

编号	2% 固含量			20% 固含量		
	glu(g/L)	xyl(g/L)	Yield	glu(g/L)	xyl(g/L)	Yield
1	5.41	3.47	0.552	59.75	33.44	0.479
2	8.03	3.02	0.813	73.01	31.82	0.585
3	6.78	1.29	0.694	68.11	14.55	0.546
4	5.15	0.70	0.522	55.36	8.22	0.444

*固含量 2% 的实验在 100mL 摇瓶中进行; 固含量 20% 的反应于 5L 螺带桨反应器进行。温度控制在 50°C, pH4.8, 转速 150rpm。表中数据为 72h 分析结果, 酶用量均为 15FPU/g DM。得率指的是葡萄糖得率。

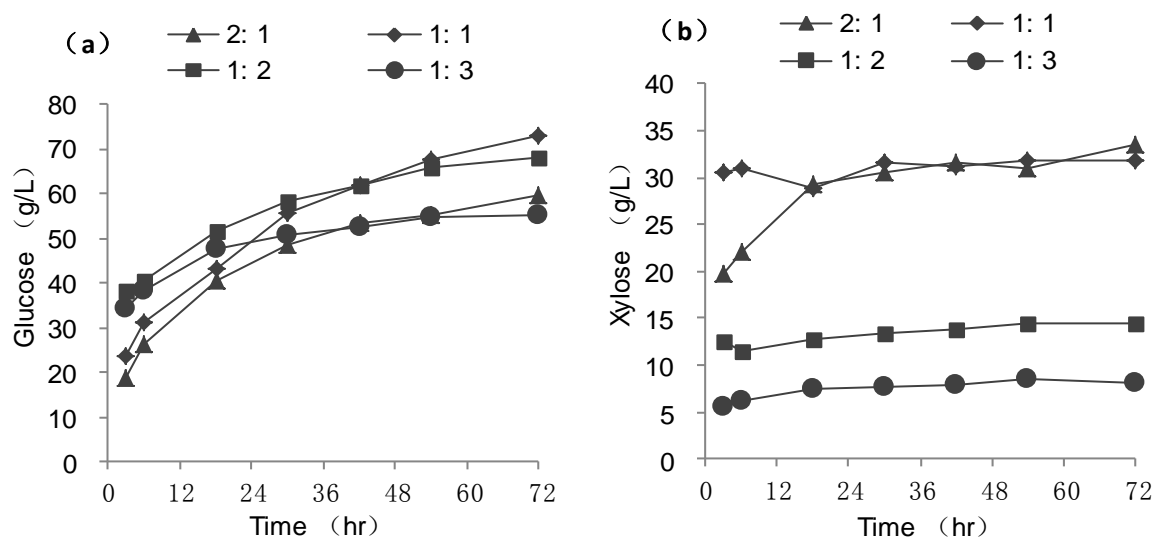


图 2.9 不同预浸固液比预处理物料糖化 (a) 葡萄糖曲线 (b) 木糖曲线

Fig. 2.9 Saccharification curve (a) glucose (b) xylose of the pretreated corn stover which under different S/L ratio

反应条件：反应于 5L 螺带桨反应器进行，温度控制在 50 °C，pH4.8，转速 150 rpm，反应 72h，酶用量为 15FPU/g DM。

不同预浸固液比预处理物料在高固含量下（20%）的糖化结果如表 2.8 与图 2.9 所示。由图可知，随着糖化反应的进行，葡萄糖浓度逐步增加，而木糖的浓度增加缓慢。最终葡萄糖得率与 2% 固含量时相比，都有所下降，这是因为固含量增高，一方面由于固体增多导致的酶反应的传质传热效果降低，一方面由于糖浓度高产生的产物抑制使得葡萄糖得率降低。对比不同固液比预处理物料的糖化反应，由图 2.9 (a) 中可看出，初糖水平随着固液比提高而提高，这是因为提高预浸酸液的用量能显著提高预处理强度，使得游离的葡萄糖糖组份变多从而体现出初糖浓度变大，而另一方面，木糖的浓度却随着固液比增大而降低，这是因为木聚糖比较容易被酸水解成单糖，它的含量降低不是由于水解得到的单糖变少，相反地则是因为水解出的木糖在高温下发生了急剧的降解从而向糠醛转化（由表 2.7 可看出）造成木糖含量降低。糖化过程随着时间的进行，固液比 1:1 时，最终葡萄糖得率最高，并且总的糖浓度最高，当固液比继续升高至 2:1 或者 3:1 时，糖损失较大造成糖浓度偏低并且此时物料已经有游离水析出，不符合本预处理方法无污水排放的理念。因此固液比 1:1 为最适合的预处理反应固液比。综上可得，预浸固液比 1:1、硫酸用量 5%、反应温度 190 °C、反应 3 分钟为郸城玉米秸秆较优的预处理条件，在此条件中用于秸秆的大规模生产，为下面即将探讨的糖化环节提供原料。

2.3.4 稀酸预处理玉米秸秆糖化条件的探索

将上述预处理后秸秆原料用于纤维素酶水解，目的是得到葡萄糖与木糖的混合糖液，再利用此糖液用于化学催化加氢裂解制取多元醇。经过上述预处理测得原料中的成分含

量如下：纤维素含量 41.4%，半纤维素含量 5.51%，游离葡萄糖含量 3.9%，木糖 11.8%。酶水解反应时，考察温度、底物固含量、酶用量、pH、搅拌转速、反应器尺度等因素对糖化过程的影响。

2.3.4.1 糖化温度

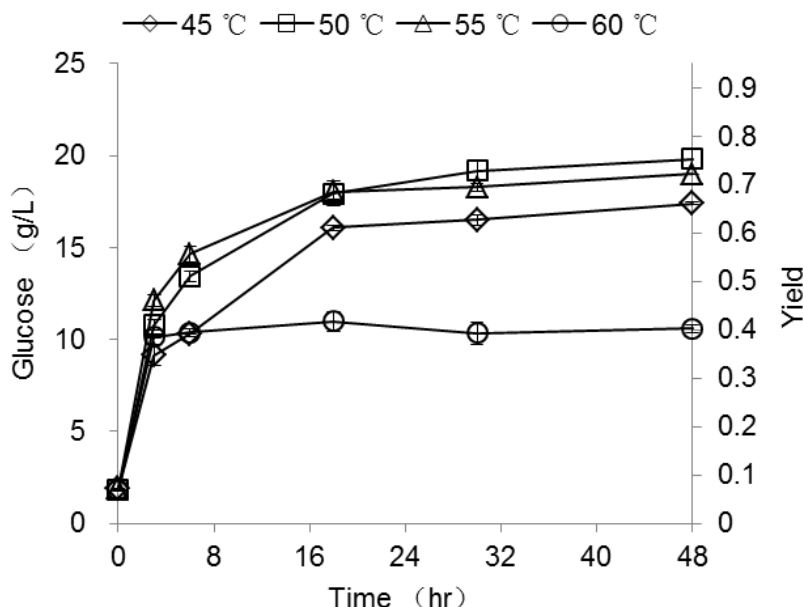


图 2.10 不同温度下酶水解对葡萄糖生成的影响

Fig. 2.10 Effect of hydrolysis temperature on the saccharification of corn stover

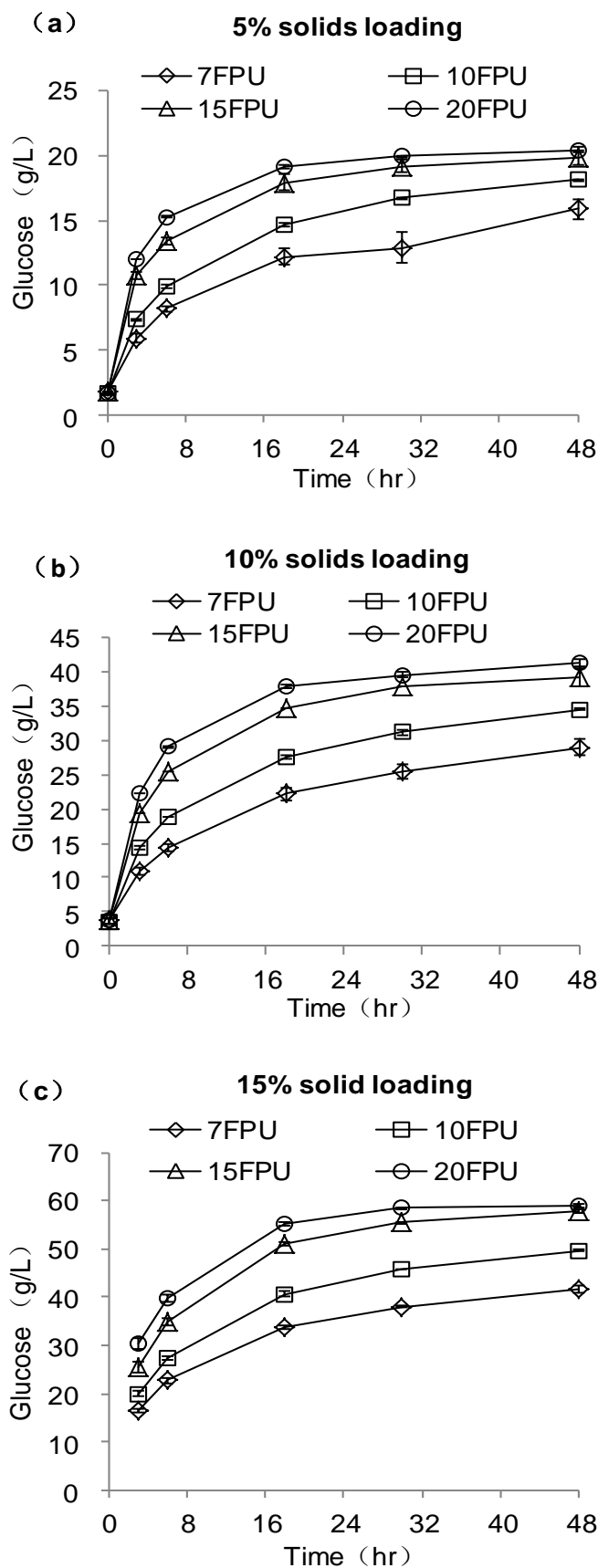
反应条件：底物固体含量 (w/w) 5%，纤维素用量 15FPU/gDM，反应 45-60 °C 水浴摇床，pH 4.8，转速为 150 rpm

酶水解温度对糖化效果的影响结果如图 2.10 所示。文献报导中，纤维素酶最适的酶活温度一般均处在 50 °C 与 55 °C 之间，实验结论也说明在 50 °C 与 55 °C 时，葡萄糖的生成量与生产速率都高于其他温度。反应温度过高则导致酶失活，如图 2.10 中，当温度达到 60 °C 时，反应 3 小时过后基本上无葡萄糖生成。考虑酶活的稳定性，选择 50 °C 作为最优的酶反应温度。

2.3.4.2 糖化固含量及酶用量

固含量 5%-15% 的糖化反应于 250ml 烧瓶中进行，反应 48h。20% 的于 5L 反应器中进行，反应 72h (图 2.11)。温度均为 50 °C，pH 为 4.8。糖化结果如图 2.11 与表 2.9 所示。从图中可以看出，在相同的固含量下，随着酶用量的提高，葡萄糖浓度随之提高，当酶用量从 15 FPU 提高至 20 FPU 时，葡萄糖浓度增幅不大。这可能是由于底物可作用的酶接触位点有限，在酶用量充足时，反应的限速步骤可能取决于底物的性质。在固含量较低时，反应时间较短，当固含量 20% 时，于螺带桨反应器中的糖化反应持续时间较长，随着固含量的上升，糖得率发生显著下降，这是因为高固体含量导致酶反应传质效果降低。由表 2.9 中看出木糖的浓度变化与酶用量关系不大，并且随着糖化反应进行，浓度变化也不大，这是因为木糖主要来源于预处理过程中半纤维素的降解，纤维素酶对

半纤维素的降解作用不大。



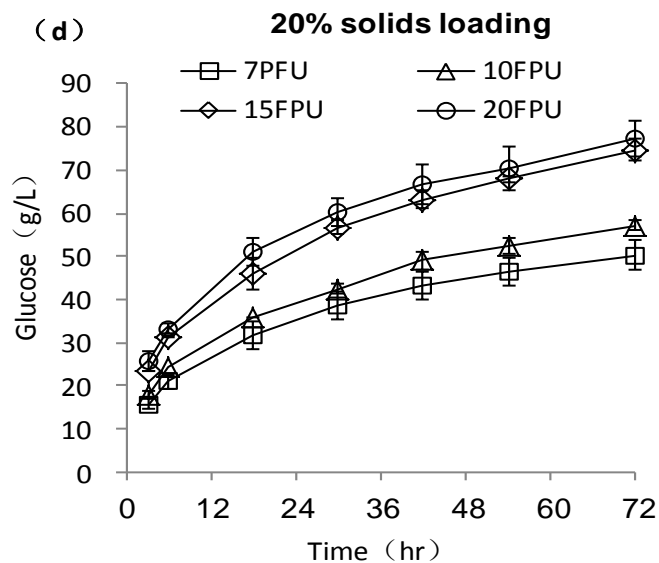


图 2.11 固含量 (a) 5%、(b) 10%、(c) 15%、(d) 20% 及酶用量对秸秆糖化的影响

Fig. 2.11 Effect of solids loading(a)5%, (b)10%, (c)15%, (d)20% and enzyme loading

其他反应条件：反应温度 50 °C，pH 4.8，5%-15% 固含量下于摇瓶中进行，20% 固含量与螺带桨反应器中进行，转速为 150 rpm

2.3.4.3 转速对糖化效果的影响

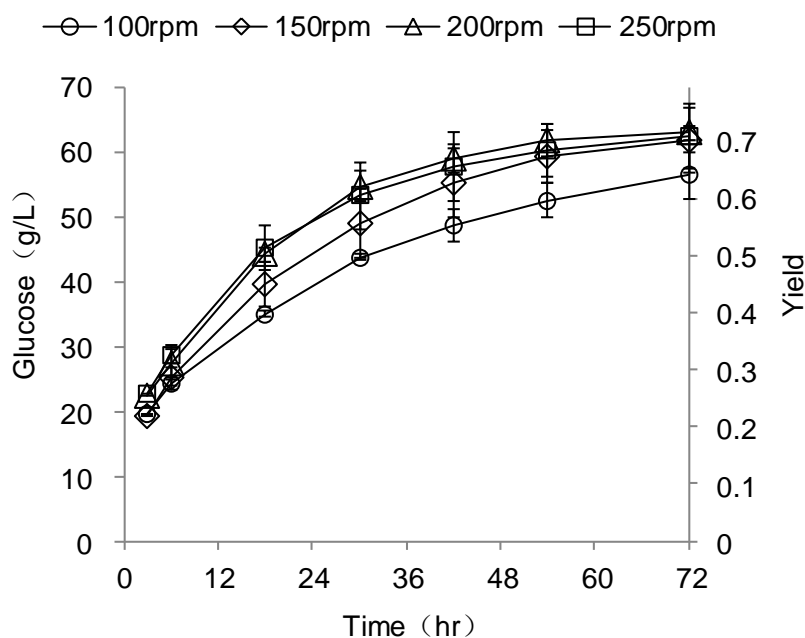


图 2.12 搅拌转速对糖化速率的影响

Fig. 2.12 Effect of agitation rate of the saccharification of corn stover

反应条件：底物固体含量 15%，纤维素用量 7 FPU/gDM，反应温度 50 °C，pH 4.8，糖化罐搅拌转速为 100-250 rpm

搅拌转速对糖化反应的影响实验于 5L 反应器中进行，图 2.12 为不同搅拌转速下葡

葡萄糖生成曲线。由图可知，随着转速由 100 rpm 提高至 150 rpm，反应速度随之提高，反应时间可缩短 12 小时，并且最终糖浓度也随之提高。当转速达到 200 rpm 时，反应速度继续提高，但最终糖浓度与 150 rpm 差异不大。转速到达 250 rpm 时，糖化反应前期仍可提高速率，但是后期速率与糖浓度基本上以 200 rpm 时一致。葡萄糖浓度很大程度上取决于底物中纤维素结晶区的破坏程度，因此在相同底物用量与酶用量下，产生的糖浓度值会存在极限值，搅拌转速的提高能有效解决酶与底物的混合与传递，从而加快反应速度，但是在酶反应后期，由于非结晶区纤维素接近完全降解，并存在产物抑制以及木质素对纤维素的无效吸附，提高转速并不能使得糖浓度继续增大。

2.3.4.4 反应 pH 值对秸秆糖化效果的影响

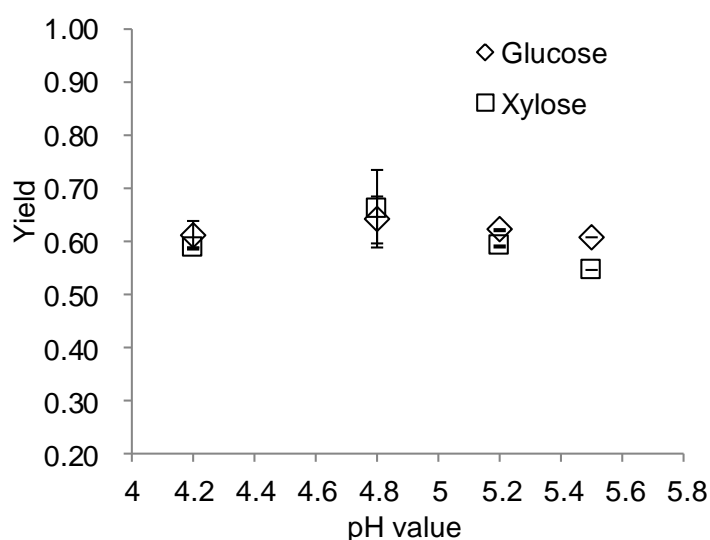


图 2.13 反应 pH 值对糖化得率的影响

Fig. 2.13 Effect of pH value of saccharification of corn stover

反应条件：底物固体含量 15%，纤维素用量 7 FPU/gDM，反应温度 50 °C，pH 4.2-5.5，糖化罐搅拌转速为 150 rpm

实验中使用的纤维素酶为酸性纤维素酶，它在以滤纸为底物时的最适 pH 为 4.8，在 pH 4.0 至 5.0 范围内亦能保持较高的活性。不同于滤纸体系，秸秆中因为含有大量的木质素及预处理产生的抑制物，会对纤维素酶产生无效结合，从而使得纤维素酶活性降低。秸秆体系的 pH 值会影响体系中木质素或者游离的抑制物如有机酸的电离平衡，改变其表面的电荷，可能使得此类抑制物对酶的无效吸附减弱并最终提高糖化得率^[85]。糖化反应 pH 值对秸秆糖化效果的影响结果如图 2.13 所示，由图可知，在考察的 pH 范围内，随着 pH 值的升高，糖化得率先增高后降低，在 pH 值为 4.8 时呈现最大值，此结果与滤纸作为底物时相似，说明秸秆体系中，最佳的 pH 值与纤维素酶的最适 pH 值一致。通过图 2.13 还可看出，在 pH 值下，各组实验的葡萄糖得率都处于 0.6 与 0.7 之间，说明

pH 值对糖化得率的影响较小,这也说明了实验中所用纤维素酶对秸秆体系的 pH 值具有较大范围的适应性。

2.3.4.5 不同反应器对糖化效果的影响

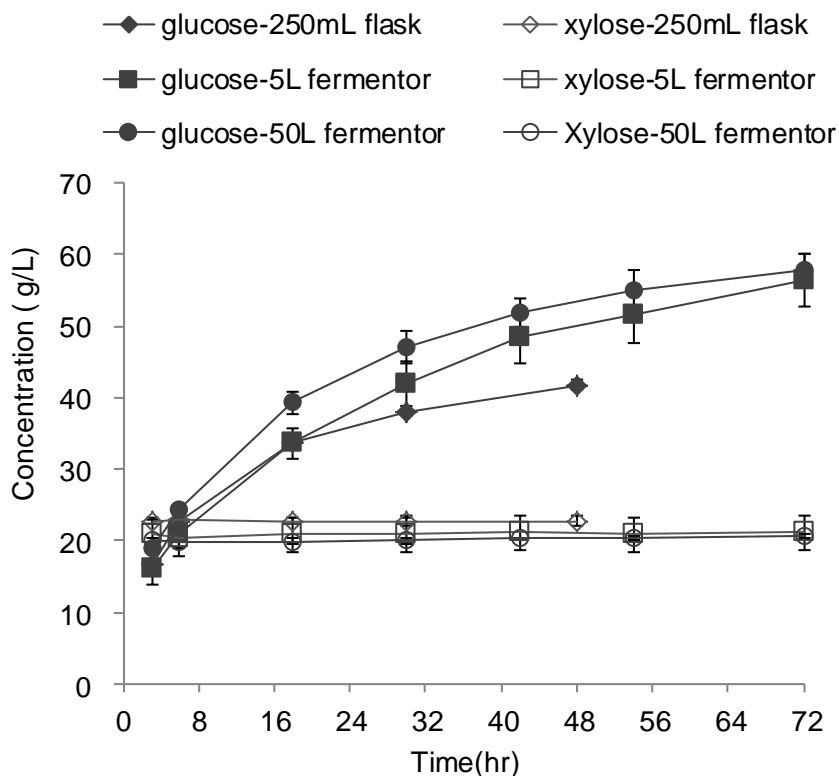


图 2.14 不同反应器对糖化过程的影响

Fig. 2.14 Effect of different reactor on the saccharification of corn stover

反应条件: 底物固体含量 15%, 纤维素用量 7 FPU/g DM, 反应温度 50 °C, pH 4.8, 转速均为 150 rpm

不同反应器下的糖化结果如图 2.14 所示, 在不同反应器中, 250 mL 摇瓶中的水解反应表现为葡萄糖浓度在 30 小时后增长缓慢, 可以理解为此时糖化反应已经结束。在摇瓶中, 15% 的固体含量已达处理极限, 物料与纤维素酶混合效果受到影响。而在带有螺带桨的反应器中, 葡萄糖浓度保持持续增加, 这说明, 螺带桨反应器能有效解决物料混合问题, 增大纤维素酶与固体底物的结合能力, 从而在相同底物含量与酶用量下, 能有效提高糖收率。对比 5 L 与 50 L 反应器, 大的反应器的糖化速率要明显好与小的反应器, 而最终葡萄糖浓度差别不大。这是因为, 在相同转速下, 搅拌桨半径越大, 搅拌桨末端线速度越大, 所以在相同转速条件下, 体积较大的反应器混合情况要优于小的反应器。从实验中也可以看出, 对于纤维素酶与秸秆的反应, 搅拌与混合是影响糖化速率较为主要的因素。

表 2.9 将上述糖化条件下的糖化结果进行汇总。

表 2.9 不同糖化条件下的糖化结果

Table 2.9 Saccharification result at different hydrolysis condition

NO.	固含量	酶用量 (FPU/g DM)	温度 (°C)	pH 值	反应器	反应时间 (h)	Yield of Glucose	Yield of Xylose	Yield of Total sugar
1	5%	15	45	4.8	250 mL	48	66.2 ± 0.3	68.4 ± 6.8	66.8 ± 2.0
2	5%	15	50	4.8	250 mL	48	75.5 ± 1.9	75.4 ± 2.8	75.5 ± 2.1
3	5%	15	55	4.8	250 mL	48	72.3 ± 0.1	76.3 ± 5.5	73.3 ± 1.5
4	5%	15	60	4.8	250 mL	48	40.4 ± 0.8	62.6 ± 4.5	46.3 ± 1.8
5	5%	7	50	4.8	250 mL	48	60.5 ± 2.9	76.3 ± 6.0	66.3 ± 3.7
6	5%	10	50	4.8	250 mL	48	68.8 ± 0.4	75.4 ± 6.7	70.6 ± 2.1
7	5%	20	50	4.8	250 mL	48	77.8 ± 0.8	85.2 ± 7.8	79.7 ± 2.7
8	10%	7	50	4.8	250 mL	48	52.3 ± 2.1	74.4 ± 1.4	58.2 ± 1.9
9	10%	10	50	4.8	250 mL	48	62.3 ± 0.3	73.3 ± 8.0	66.5 ± 2.4
10	10%	15	50	4.8	250 mL	48	70.6 ± 2.3	78.0 ± 0.1	72.6 ± 4.4
11	10%	20	50	4.8	250 mL	48	74.5 ± 1.0	83.2 ± 2.1	76.7 ± 3.2
12	15%	7	50	4.8	250 mL	48	47.4 ± 0.8	71.2 ± 2.2	53.8 ± 11.2
13	15%	10	50	4.8	250 mL	48	56.4 ± 1.1	69.0 ± 5.6	59.7 ± 1.6
14	15%	15	50	4.8	250 mL	48	65.6 ± 0.4	74.6 ± 6.6	68.0 ± 2.0
15	15%	20	50	4.8	250 mL	48	66.9 ± 0.9	76.7 ± 6.1	69.5 ± 2.3
16	15%	7	50	4.5	5 L	72	61.2 ± 2.5	58.6 ± 0.2	61.0 ± 1.9
17	15%	7	50	4.8	5 L	72	64.0 ± 4.3	66.1 ± 7.4	65.1 ± 5.2
18	15%	7	50	4.8	50 L	72	65.8 ± 2.4	64.8 ± 1.1	65.5 ± 1.8
19	15%	7	50	5.2	5 L	72	62.0 ± 0.3	59.0 ± 0.2	61.7 ± 0.2
20	15%	7	50	5.5	5 L	72	60.7 ± 0.1	55.3 ± 0.1	59.5 ± 0.1
21	20%	7	50	4.8	5 L	72	44.6 ± 3.0	67.0 ± 2.1	47.1 ± 2.6
22	20%	10	50	4.8	5 L	72	50.7 ± 1.0	66.0 ± 2.2	51.2 ± 1.3
23	20%	15	50	4.8	5 L	72	66.3 ± 2.2	71.2 ± 1.0	62.9 ± 1.7
24	20%	20	50	4.8	5 L	72	68.4 ± 3.8	73.6 ± 2.6	65.0 ± 3.2

2.3.5 用于多元醇炼制的糖浓缩液其浓缩成本、酶成本及原料成本分析

上述各糖化条件下得到的水解液糖浓度一般为 50-70 g/L 左右,此浓度的糖液不足以直接用于多元醇的生产。一般地,必须对水解液进行提浓步骤使得糖浓度满足化学催化的要求。在浓缩过程中,初糖浓度的提高有助于降低浓缩过程的成本,通过在糖化反应过程中提高底物固含量及酶用量的方法可有效提高水解液的初糖浓度,但是这样做会导致底物利用率差从而造成用料成本及酶成本加剧。因此,综合考虑浓缩成本降低及用料、用酶成本变大的相互抵消效应,在糖化过程中,控制底物固含量及酶用量等糖化条件,必然可找出浓缩成本、用酶、用料成本之和最低的糖化条件。此条件对秸秆酶水解及糖液浓缩过程的成本控制具有较高的指导意义。

在固含量 S 下,物料中所有的聚糖全部转化为单糖时产生的理论总糖浓度 C_0

$$C_0 = \frac{S \times 41.1\% \times 1.11 + S \times 5.51\% \times 1.136 + S \times 0.039 + S \times 0.118}{(1-S) \times 10^3} = 679.1 \times \frac{S}{1-S}$$

上述公式中,41.4%为纤维素含量,5.51%为半纤维素含量,0.039 与 0.118 分别为游离葡萄糖与木糖含量。

实验中得到的糖水解液实际浓度为 C , $C = C_0 \times Y$ (Y 为实验糖对理论糖的得率)。为了满足多元醇炼制时的糖液糖浓度,将糖浓度 C 的秸秆水解液(体积为 V_1)浓缩至 400 g/L 的糖浓缩液(体积为 V_2),由糖质量守恒得: $C \times V_1 = 400 \times V_2$ 。忽略糖浓度不同导致的密度变化,按现在已产业化的工艺,蒸发一吨水所需的能耗成本约为 70 元,得到 $V_2 = 10^3$ L 糖液的浓缩成本为: $Cost1 = (V_1 - V_2) \times 70$ 代入 V_1, V_2, C, C_0 的值,得到:

$$\begin{aligned} Cost1 &= (V_1 - V_2) \times 70 = \left(\frac{400}{C} - 1 \right) \times 70 = \left(\frac{400}{C_0 \times Y} - 1 \right) \times 70 = \left(\frac{400}{Y} \times \frac{1-S}{679.1 \times S} - 1 \right) \times 70 \\ &= (0.589 \times \frac{1-S}{S \times Y} - 1) \times 70. \end{aligned}$$

$$\text{得到 } 10^3 \text{ L } 400 \text{ g/L 糖液的酶成本: } Cost2 = \frac{400 \times 10^3}{0.6791 \times Y} \times \frac{U}{145} \times P$$

0.6791 为干物料中单糖含量、145 为单位质量酶酶活 FPU/g、 U 为酶使用量 FPU/g DM、 P 为酶单价 元/g),化简常数项得:

$$Cost2 = 4062.17 \times \frac{U}{Y} \times P$$

$$\text{得到 } 10^3 \text{ L } 400 \text{ g/L 糖液所需的预处理原料成本: } Cost3 = \frac{0.4}{0.6791 \times Y} \times (P1 + P2 + P3)$$

$P1$ 为玉米秸秆单价(取 250 元/吨), $P2$ 为预处理蒸汽成本,查得当前 4.3 Mpa 饱和蒸汽价格为 216 元/吨,按照现在的预处理工艺,假设蒸汽的损耗全部转为预处理后物料增重,则处理 1 吨秸秆约消耗蒸汽 0.87 吨,因此蒸汽价格 $P2 = 216 \times 0.87 = 188$ 元/吨秸秆。 $P3$ 为浓硫酸单价,约为 33 元/吨秸秆。代入化简得:

$$\text{Cost3} = \frac{277.4}{Y}$$

总成本 $\text{Cost} = \text{Cost1} + \text{Cost2} + \text{Cost3}$

$$= (0.589 \times \frac{1-S}{S \times Y} - 1) \times 70 + 4062.17 \times \frac{U}{Y} \times P + \frac{277.4}{Y}$$

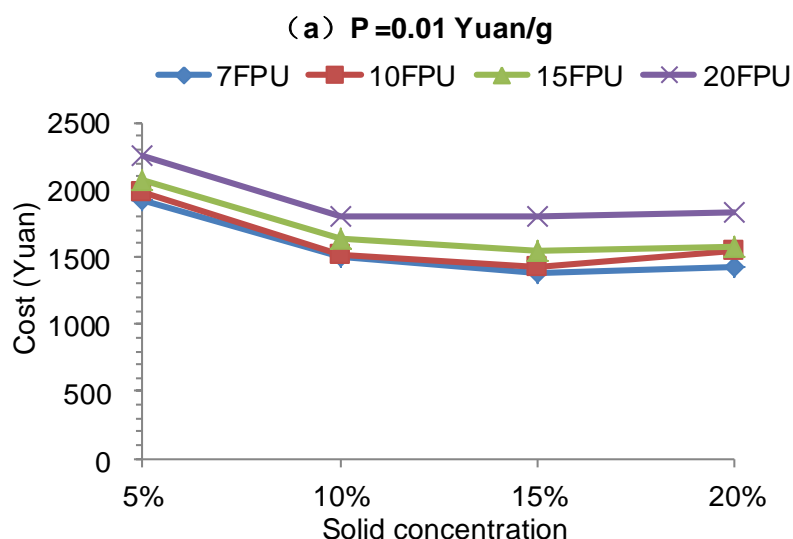
因此, 总成本 Cost 为浓缩成本 Cost1、用酶成本 Cost2、用料成本 Cost3 三者之和, 它表示用秸秆得到 1m^3 、 400g/L (400 kg 糖) 的糖浓缩液所需投入的浓缩、酶、物料成本之和。它是关于底物固含量 S、酶用量 U、酶单价 P、糖化得率 Y 的函数, $\text{Cost} = f(S, U, P, Y)$ 。

表 2.10 成本分析时各变量的定义及单位

Table 2.10 Definition and unit of the variable during the cost analysis

符号	定义	单位
Cost	Cost1、Cost2、Cost3 之和	Yuan
Cost1	10^3 L 400 g/L 糖液浓缩成本	Yuan
Cost2	10^3 L 400 g/L 糖液酶成本	Yuan
Cost3	10^3 L 400 g/L 糖液秸秆原料成本	Yuan
C_0	理论糖浓度	g/L
C	实际糖浓度	g/L
S	糖化反应固体含量	
Y	糖化过程总糖得率	
V_1	糖液浓缩前体积	L
V_2	糖液浓缩后体积 (取值为 10^3)	L
P	纤维素酶单价	Yuan/g
U	纤维素酶用量	FPU/g DM

根据实验数据, 在实际约束下 ($P: 0.01\text{-}0.05\text{ Yuan/g}$, $U: 7\text{-}20\text{ FPU/g DM}$, $S: 5\text{-}20\%$) 内测算最低 Cost:



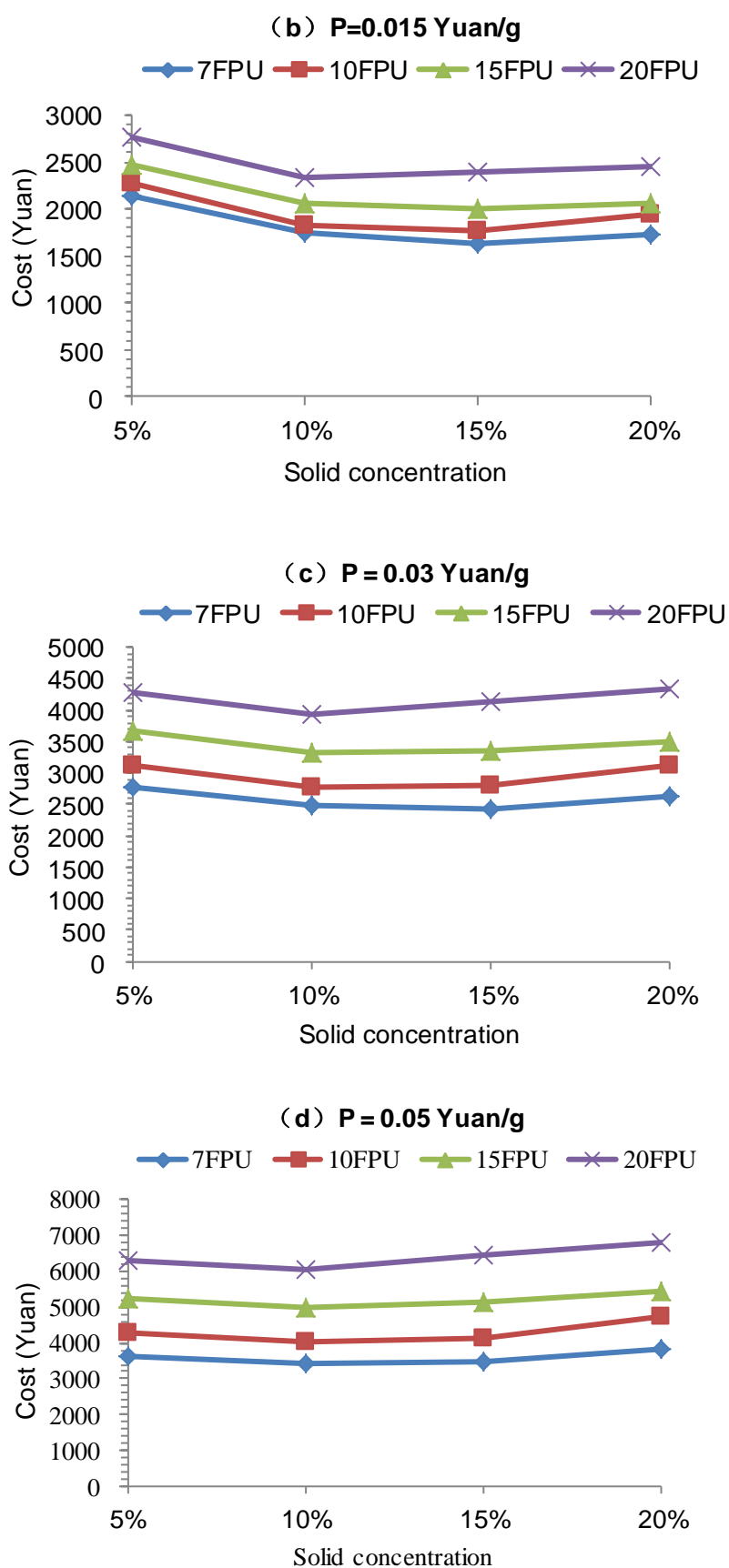


图 2.15 不同底物固含量与酶用量水解糖液在不同酶单价下的成本曲线

Fig. 2.15 Cost of the hydrolysate under different hydrolysis condition and enzyme price

将表 2.9 糖化结果中的总糖得率 Y 及相应糖化的酶用量 U、底物固含量 S 代入成本计算，在酶单价 P 为 0.01-0.050 的约束下计算各个糖化条件下得到的浓缩液的成本 Cost，其成本计算结果如图 2.15 所示。由图可看出，当酶单价一定时，在一定固含量下，随着酶用量的提高，总成本均随之提高，说明加大酶用量带来的糖浓度提高导致的浓缩成本降低不足以弥补增加的酶成本，这也可说明酶成本占总本比重比浓缩成本所占比重大。在一定酶用量下，成本随着固含量的增大先降低后升高，这是因为固含量低导致浓缩成本大，固含量高导致酶使用效率低从而增大了酶成本，因此当 P=0.01 时，在 7 FPU 酶用量下，固含量为 15% 时，总成本呈现最低值，为 1410 元。

当底物固含量为 15%，酶用量为 7 FPU/g DM 时，成本呈现最低值，将 S=15%、U=7 代入成本计算公式得：

$$\text{Cost} = 28435 \times \frac{P}{Y} + \frac{511}{Y} - 70。$$

此时，成本 Cost 只与酶单价 P 及糖化得率 Y 相关，根据表 2.9 中数据，在此糖化固含量及酶用量下，采用螺带搅拌桨反应器得到的糖得率将提高至 65%，从而使得成本由 1410 元降低至 1152 元。用 Excel 软件作出该方程 Cost 关于 P 与 Y 的曲面图，如图 2.16 所示，由图可得成本随着酶单价的提高及糖得率的下降而急剧增大。由图还可以看出，当糖得率较低时，成本值对酶的价格波动较为敏感，糖得率提高时，曲面变得较为平缓，说明糖得率提高有助于降低酶单价提高带动的成本上涨。由图还可得，若成本要控制在千元以下，糖得率必须在 0.7 以上，酶价格在 0.02 以下。

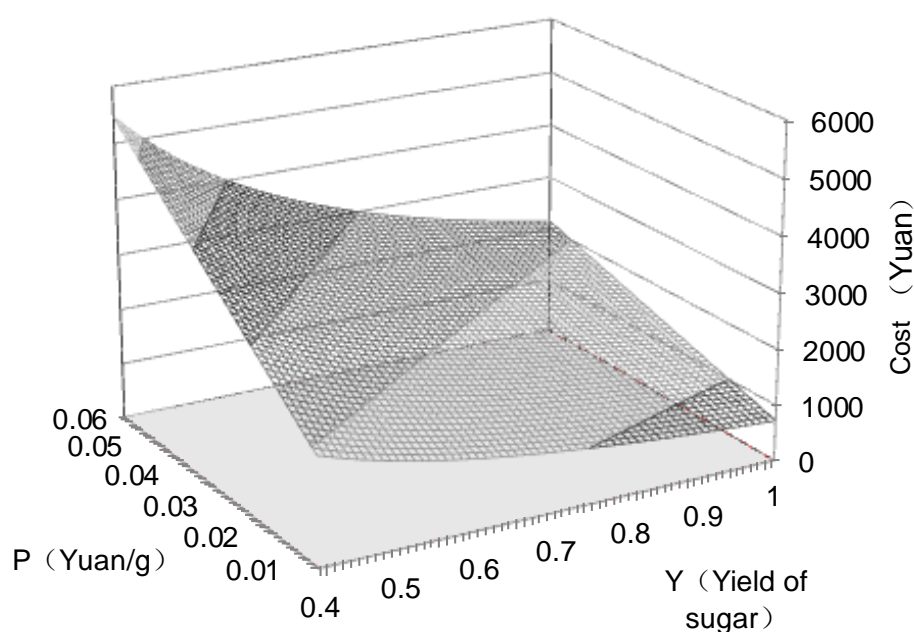


图 2.16 成本 Cost 与酶单价 P 及糖得率 Y 的关系曲面

Fig. 2.16 Surface of the Cost against P and Y

2.3.6 秸秆糖液加氢裂解生产多元醇

秸秆糖液的加氢裂解同河南财鑫糖业有限公司合作完成，财鑫公司开发了专用秸秆糖氢化裂解的镍合金催化剂，该催化剂适用于葡萄糖（60-70%）、木糖（20-30%）、阿拉伯糖、乳糖等混合底物的反应体系，适用性强，稳定性好，生物化工醇得率高达 88% 以上。在实验过程中，将不同精制程度的秸秆糖浓缩液用于催化裂解制取多元醇，以葡萄糖溶液作为对照，考察精制程度对裂解结果的影响，糖液的精制与浓缩、氢解反应设备的操作见 2.2.2.6 章节，加氢裂解的条件为：温度：230 ℃、压力：11 Mpa、转速：10000 rpm、时间：120 min、配料总糖浓度：350 g/L、反应物料体积：500 mL、加碱量：7 g/批、催化剂加入量 200 g。实验结果如表 2.11 与表 2.12。

表 2.11 不同精制程度秸秆糖裂解平均收率

Table 2.11 Average hydrogenolysis yield of corn stover sugar which were purified at different degree

原料类型	丙二醇收率	总收率	丙二醇百分比
离子交换后秸秆糖	47.88%	79.59%	60.22%
活性炭脱色后秸秆糖	39.75%	78.02%	50.88%
未脱色秸秆糖	28.06%	62.65%	44.73%
葡萄糖（对照）	49.54%	81.20%	61.02%

秸秆糖的精制过程为：先将经活性炭脱色再经树脂进行离子交换，最后浓缩至 350 g/L，表 2.11 中的原料分别取不同精制阶段的秸秆糖用于浓缩后进行氢解实验。由表 2.11 可得，离子交换后的秸秆糖，裂解效果最高，丙二醇收率及二元醇总收率都与葡萄糖对照组的效果接近，没有脱色的秸秆糖反应效果最差。离子交换后的秸秆糖的丙二醇的选择性较高，达到 60%，与对照相近。

由表 2.12 可知，经离子交换后的秸秆糖反应指标，各个批次的丙二醇收率都相近，说明催化剂的活性没有大的变化。脱色后的秸秆糖反应效果有所下降，生成的各种盐例如甲酸盐、乳酸盐，甘油及其他杂醇等组分逐渐上升，并且在使用至第三批时，丙二醇的收率指标已降低至 36%，这说明脱色的秸秆糖可使催化剂的活性下降，需对催化剂进行活化，方能继续使用。未脱色的秸秆糖反应效果更差，丙二醇、乙二醇的含量大幅度下降，产品主要为各种丁二醇等中间产物，此时催化剂的活性和选择性已经降低。

综合表 2.11 及表 2.12，秸秆糖化液不经过任何除杂处理时，裂解反应时的丙二醇的收率偏低（仅为 28%），将秸秆糖液逐步进行脱色、除离子等精致步骤，丙二醇收率与总收率随之逐步提升，从丙二醇占总二元醇的百分比及总收率两个指标上看，最终裂解效果与纯葡萄糖并无明显差异。而另一方面，秸秆糖的精制程度加深，必将带来成本的加剧，因此，在判断哪种秸秆糖适合催化剂的裂解时，应综合考虑精制秸秆糖的成本，精制的可行性，再加上反应、分离的成本和难易程度，以及对催化剂等因素的影响。

表 2.12 不同精制程度秸秆糖批次裂解结果

Table 2.11 Batch hydrogenolysis result of corn stover sugar which were purified at different degree

批次	原料类型	1,2-丙二醇 (g/L)	1,3-丙二醇 (g/L)	乙二醇 (g/L)	甲酸 (g/L)	丙三醇 (g/L)	各种丁二醇 (g/L)	山梨醇 (g/L)	乙酸 (g/L)	乳酸 (g/L)	丙二醇 收率	总收率	丙二醇百 分比
1	离子交 换后秸 秆糖	93.2	76.1	46.3	22.2	24.3	22.9	0.8	8.8	5.4	48.37%	75.53%	64.04%
2		94.4	66.0	45.8	22.9	25.4	49.4	0.8	8.7	5.8	45.82%	80.51%	56.91%
3		93.9	61.7	42.0	28.1	27.0	52.8	1.9	12.1	6.6	44.46%	79.79%	55.72%
4		91.3	76.7	46.0	22.6	34.0	38.1	2.7	10.6	6.3	47.99%	82.51%	58.16%
1	活性炭	91.3	64.8	42.5	16.7	36.6	39.9	5.6	13.6	9.7	44.61%	80.20%	55.62%
2	脱色后	89.2	46.5	42.7	15.5	34.6	55.2	2.5	16.0	11.2	38.76%	77.33%	50.12%
3	秸秆糖	83.0	42.6	39.9	17.0	34.6	59.3	8.4	15.2	11.1	35.89%	76.53%	46.90%
1	未脱色	57.4	48.2	22.3	11.7	15.8	75.8	4.3	18.4	8.8	30.16%	63.94%	47.17%
2	秸秆糖	40.2	50.6	14.2	3.9	12.9	91.9	4.9	23.0	9.6	25.95%	61.36%	42.29%

2.4 本章小结

(1) 用水清洗的方法能够有效地去除秸秆中的灰分，秸秆中的灰分使得秸秆浸于水后呈碱性，随着清洗程度加深，秸秆越趋近于中性。这部分碱性物质的去除对秸秆稀酸预处理起到积极的促进作用，体现为预浸过后秸秆 pH 值降低，预处理过程产生的游离糖分增多、抑制物含量增多。将不同清洗程度的预处理秸秆用于全糖化评价及同步糖化乙醇发酵，糖化得率及乙醇得率都是随着清洗程度加强而增大，这也从秸秆纤维结构受预处理破坏的水平上说明秸秆中灰分的去除有助于增大稀酸预处理的强度。

(2) 通过考察预处理温度、预浸固液比及硫酸用量对郸城秸秆预处理效果的影响，得到预浸固液比 1:1、硫酸用量 5%、反应温度 190 °C、反应 3 分钟为郸城玉米秸秆较优的预处理条件。当固液比继续升高至 2:1 或者 3:1 时，糖损失较大造成糖浓度偏低并且物料有游离水析出不适合后续的工艺。

(3) 将预处理后秸秆用于酶水解时，考察反应条件对酶解效果的影响，结果表明，本实验体系中较适合的反应温度为 50 °C；反应 pH 对糖化反应影响不大，在 4.2-5.8 范围内都有较高的糖得率；反应搅拌转速能提高酶反应速率，从 150 rpm 提高至 200 rpm 时，反应时间可缩短 12 小时，但最终的糖收率相差不大；采用螺带桨反应能有效解决物料与酶的混合问题，在 15% 固含量下，于螺带桨反应器中的水解糖得率为 65% 而于摇瓶中的仅为 53%。通过浓缩成本、酶成本、物料成本的分析，得到成本关于糖化条件 (S, U, P, Y) 的计算公式，通过该公式得到成本较低时的底物固含量为 15%、酶使用量为 7 FPU/g DM，在酶单价为 0.01 元/g 时，该三项成本之和约为 1152 元。

(4) 分别将不同精制程度的秸秆用于加氢裂解制取多元醇，结果表明，秸秆糖化液不经过任何除杂处理时，裂解反应时的丙二醇的收率偏低（仅为 28%），将秸秆糖液逐步进行脱色、除离子等精致步骤，丙二醇收率与总收率随之逐步提升，丙二醇收率提高至 48%、占二元醇总量的 60%，从丙二醇占总二元醇的百分比及总收率两个指标上看，最终裂解效果与纯葡萄糖并无明显差异。

第 3 章 木薯纤维素乙醇发酵的纤维素酶成本评价

3.1 材料与方法

3.1.1 原料与试剂

木薯块茎来源于广西北海市中粮生物质能源有限公司,经锤式粉碎机粉碎并经 0.5 cm 的筛网过筛后, 105 °C 烘干并密封保存。木薯酒渣购于江苏省海门市的联海生物科技有限公司,为木薯乙醇发酵醪蒸馏出乙醇后的固体残渣, 105 °C 下烘干后密封储存。木薯干粉与干木薯酒渣的主要组分见表 3.1。

表 3.1 木薯酒渣与木薯粉组分测定

Table 3.1 Composition analysis of cassava residues and cassava powder

Compositions	Cassava residues after ethanol production (% , w/w)	Cassava powder (% , w/w)
Neutral detergent composition*	36.84±0.25	88.16±0.38
Cellulose	22.34±1.04	4.67±0.25
Hemicellulose	16.73±0.30	4.09±0.20
Lignin and ash	24.07±0.94	3.07±0.49
Starch	1.89±0.67	75.44±0.11

注: * Neutral detergent composition =1- (Neutral Detergent Fiber, NDF), including starch.

实验中所用的所有酶制剂均购买于杰能科国际有限公司(中国苏州)。高温淀粉液化酶 HTAA (Lot number 7201455498), 酶活为 22,000 U/mL; 糖化酶为 GA-L NEW(Lot number 7201417190), 酶活为 100,000 U/mL; 纤维素酶为 Accellerase 1000, 纤维素酶滤纸酶活和纤维二糖酶酶活分别为 55.0 FPU/mL 和 152.0 IU/mL。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 发酵菌种及其使用

方法同第 2 章, 配置水解液培养基时将原料替换为木薯酒渣。

3.1.2.2 木薯酒糟稀酸预处理及同步糖化乙醇发酵

方法同第 2 章, 将原料替换为木薯酒渣。

3.1.2.3 木薯块茎的同步淀粉与纤维素糖化与乙醇发酵

木薯粉的乙醇发酵分为三个阶段, 即液化、预酶解和同步糖化与发酵。首先将木薯粉调浆至固体含量为 26.7% (w/w), 置于 5 L 螺带搅拌桨反应器中, 以 22 U/gDM 的酶量加入高温淀粉液化酶, 90 °C、150 rpm 的条件下液化 3 h。液化结束后降温至 55 °C, 以 100 U/gDM 的酶量加入糖化酶(或同时以 15 FPU/g 纤维素的酶量加入纤维素酶), 150 rpm 预酶解 0.5 h。预酶解结束后降温至 37 °C, 并以 10% (w/w) 的接种

量接入经 YPD 培养基活化 16 h 的酵母菌种，开始同步糖化发酵。整个木薯乙醇的生产过程，用 5M 的 NaOH 控制体系 pH 为 5.0。并定时取样，13000 rpm 离心 5 min 后，将上清液于 HPLC 进行分析。

3.1.3 分析方法

3.1.3.1 单位质量乙醇所需纤维素酶计算

对比生产木薯纤维素乙醇的三种方法，其共通点是投入纤维素酶使得原料中纤维素最终转化为产品乙醇。在整个工艺过程中，纤维素酶成本所占比例较大，因此可以通过对比纤维素酶的投入带来的乙醇收益的大小来比较这三种方法的优劣性。我们用单位质量乙醇所需纤维素酶活 C 来评价方法的经济性，C 值越大，说明得到相同质量乙醇所需酶活越高，其经济性相对就越弱。单位质量乙醇所需纤维素酶活计算如下：

$$C = \frac{U_c}{Y \times 0.511}$$

其中：C，单位质量乙醇所需纤维素酶量，FPU/g 乙醇；

Y，乙醇得率；

U_c ，纤维素酶用量，FPU/g 纤维素。

3.1.3.2 木薯及木薯酒渣组分分析

淀粉含量分析方法参考美国可再生能源实验室方法 LAP-016^[86]。纤维素与半纤维素的分析利用 ANKON 公司纤维素分析仪及包装滤袋采用范氏洗涤法得到^[87]，即用中性洗涤剂、酸性洗涤剂、72% 浓硫酸依次处理样品，利用差重法得出中性洗涤纤维（Neutral Detergent Fiber, NDF）、酸性洗涤纤维（Acid Detergent Fiber, ADF）和中酸性洗涤木质素（Acid Detergent Lignin, ADL）组份的含量。再根据公式：半纤维 = NDF - ADF * NDF、纤维素 = ADF * NDF - ADF * NDF * ADL 得到纤维素与半纤维素的含量。

中性洗涤剂溶液：乙二胺四乙酸二钠（ Na_2EDTA ）18.61 g/L，十水四硼酸钠（ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ）6.81 g/L，十二烷基硫酸钠 30 g/L，乙二醇乙醚 10 mL/L，无水磷酸氢二钠 4.65 g/L，无水亚硫酸钠 10g/L， α -淀粉酶 34800 U/L。

酸性洗涤剂溶液：将十六烷三甲基溴化铵（CTAB）溶解于 0.5 mol/L 硫酸溶液中，CTAB 的浓度为 20 g/L。

3.1.3.3 得率计算

同第 2 章。在木薯粉浆同步糖化发酵计算乙醇对纤维素得率时，[Eth]为添加纤维素酶的实验组与不添加纤维素酶的对照组最终乙醇浓度的差值。

3.2 结果与讨论

3.2.1 木薯酒渣的直接同步糖化与发酵生产乙醇

在木薯燃料乙醇的生产过程中，木薯要经过高温蒸煮、高温淀粉液化酶的糊化、淀粉糖化酶的糖化和微生物发酵等诸多处理，最终得到的木薯酒渣中纤维素的结构可

能已经部分或完全破坏，其被纤维素酶降解的能力已得到加强。而且，直接利用木薯酒渣进行乙醇生产的工艺也是最简便、操作性最强的。目前，同步糖化与发酵（SSF）工艺是生物转化木质纤维素生产乙醇过程最常用的工艺。但在同步糖化与发酵乙醇的过程中，由于纤维素的酶解和酵母发酵的最适温度和 pH 值（分别为 45-55°C、pH 4.5-5.0 和 30-37°C、pH 5.0-6.0）都有冲突，而且纤维素的酶解在 SSF 过程中为限速步骤。基于此，我们在利用木薯酒渣直接进行 SSF 时，首先考察了温度和 pH 值对木薯酒渣发酵性能的影响（见表 3.2）。为了得到高的乙醇浓度，降低乙醇分离工序的成本，我们在实验中采用了高固体含量底物的发酵工艺。

分析表 3.2 可知，当温度为 30 °C 和 37 °C 时，乙醇得率分别为 43.8% 和 46.6%，而当同步糖化与发酵阶段的温度继续提高时，酵母菌基本上不能正常发酵。在 37 °C 条件下，考察了不同的 pH 对木薯酒渣同步糖化与发酵的影响。如表 3.2 所示，在考察的 pH 范围内，葡萄糖消耗和乙醇的生产速率差异性很小，最终生成的乙醇浓度基本接近。对比各组实验结果，在同步糖化与发酵过程中，不同实验条件下水解得到的葡萄糖基本都能被酵母利用，这说明乙醇得率低的限制因素是纤维素水解效率低，木薯酒渣中的纤维素结构并没有被充分破坏，其酶解性能较差。实验中纤维素酶的使用量为 10 FPU/g DM，相当于 45 FPU/g cellulose，在如此高的纤维素酶使用量下水解效率仍然低，继续增大酶用量已无太大意义，因此，有必要对木薯酒渣进行高强度的预处理，从而提高木薯酒渣中纤维素的转化率和乙醇得率。

表 3.2 不同发酵参数对未经预处理木薯酒渣 30% (w/w) 固体含量同步糖化与发酵的影响 (a) 温度; (b) pH 值

Table. 3.2 Effect of different fermentation parameters on ethanol fermentation from cassava residues at 30% (w/w) solids loading (a) temperature (b) pH value

SSF conditions		Final ethanol concentration (g/L)	Ethanol yield (%)	Ethanol productivity(g/L/h)
pH	Temperature(°C)			
5.0	30	22.7 ± 1.11	43.8 ± 2.10	0.315
4.5	37	24.1 ± 1.34	46.6 ± 2.54	0.335
5.0	37	24.1 ± 0.89	46.6 ± 1.69	0.335
5.5	37	22.9 ± 1.10	44.2 ± 2.08	0.318

Experimental condition: 30% solids loading, presaccharification was at 50 °C, for 8 h, with cellulase dosage of 10 FPU/g DM; SSF was at 30 °C and 37 °C, with pH value of 4.0, 4.5, 5.0 respectively, and with agitation rate of 150 r/min for 72 h.

3.2.2 木薯酒渣稀酸预处理后的同步糖化与乙醇发酵

干法高温稀酸预处理是一种对农作物秸秆非常有效的预处理方法，同时以其低能耗和无废水排放而获得较为广泛的应用。本实验主要考察预浸固液比（木薯酒渣干固

体与稀硫酸用量之比)、稀硫酸用量及反应温度三个预处理条件对木薯酒渣中纤维素转化率的影响。当固液比降低至 1:1 以下时, 预处理后物料含水量已达 69.1%, 不再适合后续的高固含量同步糖化与发酵操作, 因此在固液比为 2:1 的条件下, 不同稀硫酸用量和温度对预处理效果的影响, 见表 3.3。分析表 3.3 可知, 相比未经预处理的木薯酒渣(酶解后其纤维素和半纤维素转化率分别为 42.9%和 5.6%), 预处理后纤维素和半纤维素的转化最高可以达到 63.5%(190 °C, 1.5%稀酸浓度条件下)和 26.9%(190 °C, 2.5%稀酸浓度条件下)。同时, 在稀硫酸用量相同的条件下, 随着预处理温度的增加, 纤维素的转化率有所增加, 而半纤维素转化率的提高更为显著, 但是预处理物料中抑制物—糠醛的浓度也成倍增加, 在预处理温度相同的情况下, 随着稀酸浓度的增加, 纤维素和半纤维素的转化率都变化不大, 而糠醛的浓度则急剧增加。综合考虑木薯酒渣中纤维素、半纤维素的转化率、抑制物的浓度以及酵母菌对抑制物的耐受性, 抑制物浓度在 0.5 mg/g DM (干物料) 以下时无需对物料进行脱毒, 而从糖转化率角度比较, 越高的纤维素转化率与半纤维素转化率说明预处理效果越好, 因此选定 160 °C, 0.5% 稀酸浓度预处理后的木薯酒渣, 不经脱毒进行高固体含量的同步糖化与乙醇发酵。

表 3.3 不同预处理条件下木薯酒渣的糖化结果

Table 3.3 Effect of pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis of cassava residues

Experiment Number	Pretreatment conditions		Conversion yield (%)		Inhibitions(mg/g DM)
	Sulfuric acid (% , w/w)	Temperature (°C)	Glucose	Xylose	Furfural
control	0	-	42.9±1.4	5.6±0.4	Not detected
1	0.5	140	59.7±0.5	10.7±0.2	0.182±0.058
2	0.5	160	61.3±1.5	13.8±0.7	0.381±0.196
3	0.5	190	61.9±1.7	19.3±0.7	0.808±0.002
4	1.5	140	57.5±3.7	9.6±0.1	0.165±0.019
5	1.5	160	58.4±0.1	14.0±1.0	0.462±0.827
6	1.5	190	63.5±1.2	23.5±0.9	1.66±0.377
7	2.5	140	56.2±1.2	12.9±0.2	0.230±0.098
8	2.5	160	58.2±0.4	17.7±0.1	0.640±0.050
9	2.5	190	63.2±2.4	26.9±2.0	2.077±0.168

Pretreatment condition: presoaking ratio of Solid to liquid was 2:1, Sulfuric acid (w/w) was 0.5%-2.5%, Temperature was 140 °C-190 °C, and reacted for 3 min ; Hydrolytic condition: 5% solids loading, with cellulase dosage of 10 FPU/g DM , pH 4.8 citrate buffer, in 50 °C shaking bath with agitation rate of 150 r/min , non-pretreated cassava residue was used as control.

将 160 °C，0.5%稀酸浓度、预浸固液比为 2:1 条件下预处理后的木薯酒渣，不经脱毒直接进行 30%固体含量的同步糖化与乙醇发酵，其结果如表 3.4 所示。预酶解 8 h 后接入驯化后的酵母菌，开始进行同步糖化与发酵。接入酵母菌后的 40 h 内，葡萄糖基本上没有被利用，分析体系糠醛的变化可知，在这长达 40 h 的时间内，糠醛和 5-羟甲基糠醛逐渐被酵母菌代谢至较低的浓度（图 3.1）。从第 48 h 开始，体系的葡萄糖浓度急剧降低，伴随着乙醇浓度的快速生成。发酵至第 96 h，体系葡萄糖浓度残余 2.93 g/L，生成的乙醇浓度达到 26.8 g/L，木薯酒渣中乙醇得率为 52.1%（表 3.4）。综上所述，在木薯酒渣的预处理过程中生成的大量抑制物对乙醇的发酵过程产生了较为强烈的抑制作用，从而大大增加了酵母发酵过程的延滞期。

表 3.4 预处理后木薯酒渣 30%(w/w)固体含量条件下的同步糖化与发酵

Table 3.4 Simultaneous saccharification and ethanol fermentation performance of cassava residues after pretreatment at 30% (w/w) solids loading

	Final ethanol concentration (g/L)	Ethanol yield of cellulose(%)	Ethanol productivity(g/L/h)
CEFR	24.1±0.89	46.6±1.69	0.318
Pretreated CEFR	26.8±0.63	52.1±1.19	0.280

Experimental condition: 30% solids loading, presaccharification was at 50 °C, for 8 h, with cellulase dosage of 10 FPU/g DM ; SSF was at 30 °C, with pH value of 5.0, agitation rate of 150 r/min, fermentation time of pretreated and non-pretreated feedstock was 72 h and 96 h respectively.

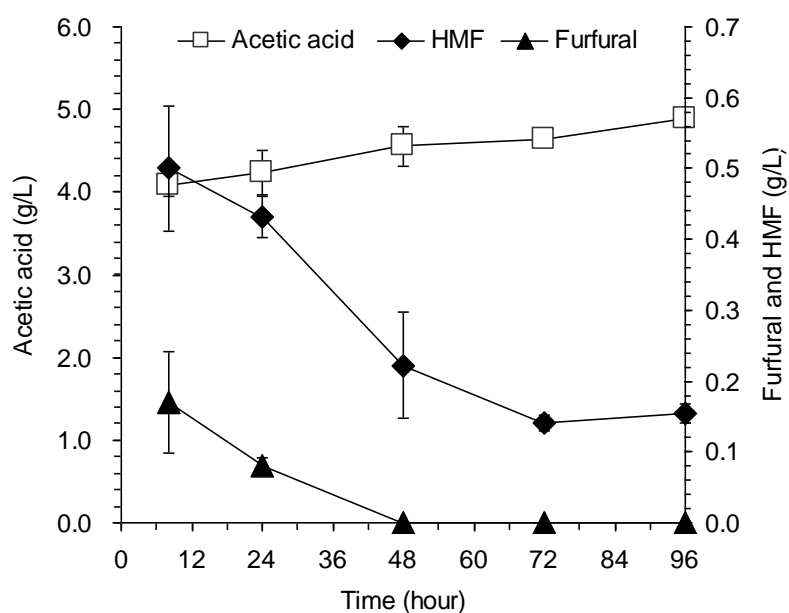


图 3.1 预处理后木薯酒渣 30% (w/w) 固体含量条件下的同步糖化与发酵过程中抑制物变化曲线

Fig. 3.1 Inhibitors variation of the simultaneous saccharification and ethanol fermentation performance of cassava residues after pretreatment at 30% (w/w) solids loading

3.2.3 木薯块茎的同步淀粉与纤维素糖化生产乙醇

木薯中含有相当比例的纤维素，发酵木薯淀粉时，可以同时加入淀粉糖化酶和纤维素酶，在利用淀粉糖生产乙醇的同时，发酵纤维素酶解得到的葡萄糖生产乙醇，从而提高发酵体系最终的乙醇产量和木薯的综合利用率。

对比木薯发酵生产乙醇的过程中，添加纤维素酶与否对乙醇发酵性能的影响，结果见图 3.2 及表 3.5。分析图 3.2 及表 3.5 可知，与未添加纤维素酶的发酵过程相比，以 15 FPU/g 纤维素的酶量加入纤维素酶后，葡萄糖的消耗速率有所降低，这可能是由于 SSF 过程既有葡萄糖的释放，又有转化葡萄糖生成乙醇两个过程。而加入纤维素酶后，由于木薯中纤维素酶解生成葡萄糖，所以葡萄糖浓度相比未加入纤维素酶的实验要略高，并且最终乙醇浓度为 106.95g/L，未添加纤维素酶的实验组为 101.51g/L。在木薯粉发酵结束后，烘干发酵醪得到的木薯酒渣固形物占总重的比例为 8.04%，固体中淀粉含量仅为 1.89%，这部分残余淀粉一般属于较难利用的淀粉成分，很难被完全降解。假设这部分残余淀粉完全转化为乙醇，最终的乙醇浓度只能增加 1.07 g/L 左右。在添加了纤维素酶的实验组中，最终乙醇浓度比对照组多出 5.5g/L，至少 80% 以上的乙醇增量来自于纤维素降解。而且，由于纤维素酶的水解位点是 β -1,4 糖苷键，区别于淀粉 α -1,4 糖苷键，残余淀粉在非特异性酶（纤维素酶）的作用下降解的程度有限，添加了纤维素酶的实验组的乙醇增量的绝大部分应来自于木薯纤维素降解的葡萄糖发酵。

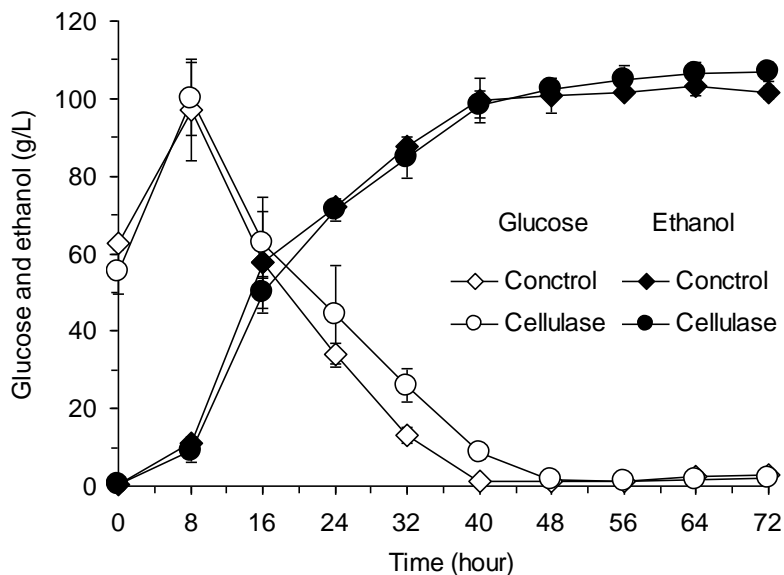


图 3.2 添加纤维素酶对木薯原料高固体含量条件同步糖化与发酵的影响

Fig. 3.2 Simultaneous saccharification and ethanol fermentation performance of cassava powder with and without cellulase supplementation at 30% (w/w) solids loading

Experimental condition: 26.7% solids loading, liquefaction was at 90 °C, for 3 h, with amylase dosage of

22 U/g DM, saccharification was at 55 °C, for 0.5 h with glucoamylase dosage of 100 U/g DM (or with cellulase dosage of 15 FPU/g cellulose simultaneously) ,SSF was at 37 °C, pH 5.0, agitation rate 150 r/min.

表 3.5 添加纤维素酶对木薯原料高固体含量条件同步糖化与发酵的影响

Table 3.5 Simultaneous saccharification and ethanol fermentation performance of cassava powder with and without cellulase supplementation at 30% (w/w) solids loading

	Final ethanol concentration(g/L)	Ethanol Yield of cellulose(%)	Ethanol productivity(g/L/h)
Without cellulase	101.52±1.60	0	1.41
With cellulase	106.95±2.32	56.30±2.58	1.49

3.2.4 木薯酒渣生产乙醇方法的工艺对比

对比三种木薯纤维素转化乙醇的方法，生产单位质量乙醇所需的纤维素酶活如表 3.6。对比表中数据可知，由木薯酒渣作为原料进行的高固体含量 SSF，所需的纤维素酶活远大于以木薯淀粉为原料进行的 SSF 工艺，并且乙醇得率也处在较低水平。这是因为以木薯酒渣为原料，纤维素酶使用效率极低，木薯酒渣成分复杂、木质素含量较高、溶解性差、存在固体杂质、在高固体含量（30%）下混合效果不佳，这都会造成纤维素酶的失活或者浪费，这就需要投入大量的纤维素酶，从而造成生产单位质量乙醇所需的酶活偏高。前两种方法，即木薯纤维素酒渣的直接糖化和乙醇发酵，以及木薯纤维素酒渣预处理后的糖化与乙醇发酵，纤维素酶成本为 13602、11659 元/吨乙醇，按当前燃料乙醇价格 6500 元/吨计算，纤维素酶的成本已经超过产品乙醇的收益，因此不具备实用上的可行性。

第三种方法即木薯乙醇发酵中同步淀粉与纤维素糖化以及乙醇发酵，与不加纤维素酶的木薯淀粉发酵的唯一区别在于添加了少量纤维素酶液体。纤维素酶的添加方式是在添加前与糖化酶复配，然后与糖化酶同时添加到液化后的木薯淀粉液浆中，由此增加的操作成本基本可以忽略不计；添加纤维素酶后的乙醇发酵操作与不添加纤维素酶的常规操作没有区别，发酵结束后发酵液的板框压滤固液分离由于固体残渣减少导致操作强度有微弱降低，而发酵液乙醇浓度的提高（约为常规操作的 2%）导致精馏能耗有微弱增加，但由此微弱变化导致的成本减低和提高基本可以忽略不计。在木薯粉发酵过程中加入纤维素酶，同时利用淀粉糖与纤维素糖，由于液化后的木薯浆液成分较为单一（大多数为直链聚糖）且为液体状，不易使得纤维素酶失活，所以可以在较低的酶用量下最终提高乙醇浓度。按当前纤维素酶价格（上海尤特尔公司纤维素酶酶活： 145×10^3 FPU/kg 酶，价格 10 元/kg）可得生产单位木薯纤维素乙醇（吨）需要的纤维素酶成本为 3589 元，按燃料乙醇 6500 元/吨的价格计算，此方法利用木薯纤维

素生产乙醇具有可行性与经济性。

表 3.6 不同木薯纤维乙醇工艺对比

Table 3.6 Comparison of the different process of cassava cellulose ethanol

Process of cassava cellulose ethanol production	Ethanol yield of cellulose(%)	Cellulase usage (FPU/gcellose)	Cellulase demand per unit cellulose ethanol (FPU/gEthanol)
SSF of cassava residue	44.6	45	197.3
SSF of pretreated cassava residue	52.1	45	169.1
SSF with cellulase of cassava powder	56.3	15	52.1

3.3 本章小结

本章研究了木薯中纤维素组分发酵生产乙醇的三种不同方法，并从纤维素酶的用酶成本对其进行评估。结果表明，这三种方法都能利用木薯纤维素转化为乙醇，其中以木薯发酵残渣为原料直接(或经预处理后)用于高固含量同步糖化与发酵生产乙醇，纤维素酶投入量大，并且乙醇得率偏低，最终造成用酶成本大于产品收益，使得此方法不具有可行性。另一方面，以木薯粉为原料，在木薯乙醇生产中同步糖化与发酵淀粉糖与纤维素糖的方法，木薯纤维乙醇得率最高，发酵结束时的乙醇浓度从 101.5 g/L 提高到 107.0 g/L，纤维素酶成本为 3589 元/吨乙醇。综合考虑木薯纤维素乙醇生产工艺的复杂性和纤维素酶的成本，在木薯乙醇生产过程中，同时发酵淀粉糖和纤维素糖生产乙醇的方式是最为简便、最为经济可行的木薯纤维素乙醇转化方式。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

本文针对两种不同类型的木质纤维素生物质从工业应用的角度进行了生物转化研究,并提出了工业应用的初步方案。首先,以玉米秸秆为原料,建立了玉米秸秆经干法稀酸高温预处理、特殊的高固体含量糖化反应器对秸秆进行纤维素酶水解、再经过固液分离、活性炭脱色、离子交换、高效旋蒸浓缩制得秸秆糖,秸秆糖在专用的镍合金催化剂作用下,经高压氢化裂解从而制备生物化工醇的过程。其次,以木薯块茎中的纤维素组分为对象,从纤维素酶成本角度评估了三种利用木薯纤维素组分发酵生产乙醇的方法,提出了木薯纤维素工业应用的最优方案。在此过程中展开了相关研究工作,取得了如下结论:

(1) 在秸秆前处理除尘环节,用水清洗的方法能够有效地去除秸秆中的灰分,秸秆中的灰分使得秸秆浸于水后呈碱性,随着清洗程度加深,秸秆越趋近于中性。这部分碱性物质的去除对秸秆稀酸预处理起到积极的促进作用,体现为预浸过后秸秆 pH 值降低,预处理过程产生的游离糖分增多、抑制物含量增多。将不同清洗程度的预处理秸秆用于全糖化评价及同步糖化乙醇发酵,糖化得率及乙醇得率都是随着清洗程度加强而增大,这也从秸秆纤维结构受预处理破坏的水平上说明秸秆中灰分的去除有助于增大稀酸预处理的强度。

(2) 通过考察预处理温度、预浸固液比及硫酸用量对郸城秸秆预处理效果的影响,得到预浸固液比 1:1、硫酸用量 5%、反应温度 190 °C、反应 3 分钟为郸城玉米秸秆较优的预处理条件。当固液比继续升高至 2:1 或者 3:1 时,糖损失较大造成糖浓度偏低并且物料有游离水析出不适合后续的工艺。

(3) 将预处理后秸秆用于酶水解时,考察反应条件对酶解效果的影响,结果表明,本实验体系中较适合的反应温度为 50 °C; 反应 pH 对糖化反应影响不大,在 4.2-5.8 范围内都有较高的糖得率; 反应搅拌转速能提高酶反应速率,从 150 rpm 提高至 200 rpm 时,反应时间可缩短 12 小时,但最终的糖收率相差不大; 采用螺带桨反应能有效解决物料与酶的混合问题,在 15% 固含量下,于螺带桨反应器中的水解糖得率为 65% 而于摇瓶中的仅为 53%。通过浓缩成本、酶成本、物料成本的分析,得到成本关于糖化条件 (S, U, P, Y) 的计算公式,通过该公式得到成本较低时的底物固含量为 15%、酶使用量为 7 FPU/g DM,在酶单价为 0.01 元/g 时,该三项成本之和约为 1152 元。

(4) 分别将不同精制程度的秸秆用于加氢裂解制取多元醇,结果表明,秸秆糖化液不经过任何除杂处理时,裂解反应时的丙二醇的收率偏低(仅为 28%),将秸秆糖液逐步进行脱色、除离子等精致步骤,丙二醇收率与总收率随之逐步提升,丙二醇收

率提高至 48%、占二元醇总量的 60%，从丙二醇占总二元醇的百分比及总收率两个指标上看，最终裂解效果与纯葡萄糖并无明显差异。

(5) 在木薯中纤维素组分发酵生产乙醇的三种不同方法，并从纤维素酶的用酶成本对其进行评估的研究中。得到的结果表明，这三种方法都能利用木薯纤维素转化为乙醇，其中以木薯发酵残渣为原料直接（或经预处理后）用于高固含量同步糖化与发酵生产乙醇，纤维素酶投入量大，并且乙醇得率偏低，最终造成用酶成本大于产品收益，使得此方法不具有可行性。另一方面，以木薯粉为原料，在木薯乙醇生产中同步糖化与发酵淀粉糖与纤维素糖的方法，木薯纤维乙醇得率最高，发酵结束时的乙醇浓度从 101.5 g/L 提高到 107.0 g/L，纤维素酶成本为 3589 元/吨乙醇。综合考虑木薯纤维素乙醇生产工艺的复杂性和纤维素酶的成本，在木薯乙醇生产过程中，同时发酵淀粉糖和纤维素糖生产乙醇的方式是最为简便、最为经济可行的木薯纤维素乙醇转化方式。

上述结论为秸秆多元醇产业化、木薯酒糟纤维深度利用提供了重要的基础。

4.2 展望

(1) 本文对秸秆除尘处理的研究得到结论为秸秆中粉尘对后续的稀酸预处理影响显著，同时也说明除尘对整个工艺的必要性。在实验室规模可以通过用水清洗出去这部分粉尘，然而用于大规模工业化生产时，清洗的方法显然不适用。以后的工作中，若采用机械装置例如振荡、鼓风等对秸秆进行除尘并考察其效果，对秸秆原料的工业化应用将更具有指导意义。

(2) 本文建立的秸秆化学多元醇的炼制过程仅是实验室规模的研究，目前此项目已经运用于中试放大，然而对于实现产业化还需大量的工作来完善，其中预处理、糖化、加氢裂解等环节仍需过程放大的研究，另一方面，可结合 Aspen plus 软件对整个过程的连续化生产、物料及能量衡算得到具体的流程设计及过程分析，结合模拟结果还可得到成本预算、经济效益评估等重要内容。这些工作对产业化的深入具有关键作用。

参考文献

- [1] Anuj K. Chandel, Om V. Singh. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of Biofuel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89,(5):1289-1303
- [2] Joseph J. Bozell. Feedstocks for the Future - Biorefinery Production of Chemicals from Renewable Carbon. *CLEAN- Soil, Air, Water*. 2008,36(8):641-647
- [3] Sandun Fernando, Sushil Adhikari, Chauda Chandrapal, Naveen Murali. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy Fuels*. 2006, 20(4):1727-1737
- [4] NREL Biomass Research. <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>
- [5] 于建荣, 毛开云, 陈大明. 全球生物基化学品商业化发展现状及趋势. *生物产业技术*. 2012, 3:45-51
- [6] Henry R. Bungay. Biomass Refining. *Science*. 1982, 218:643-646
- [7] Jos éGoldemberg. Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 2007, 315:808-810
- [8] 孙海洋, 苏海佳, 谭天伟, 等. 关于大型石油公司发展生物能源产业的思考. *生物工程学报*. 2013, 29(3):299-311
- [9] Hongzhang Chen, Weihua Qiu. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. 2010, 28:556-562
- [10] 国务院关于印发生物产业发展规划的通知.
http://www.gov.cn/zwggk/2013-01/06/content_2305639.htm
- [11] James H. Clark, Fabien E. I. Deswarte, Thomas J. Farmer. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2009, 3(1):72-90
- [12] Svein Jarle Horn, Gustav Vaaje-Kolstad, Bjørge Westereng, Vincent GH Eijsink. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5:45
- [13] Jack Saddler and Linoj Kumar. Special Issue from the NSERC Bioconversion network workshop: pretreatment and fractionation of biomass for biorefinery/biofuels. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6:17
- [14] Nathan Mosier, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y.Y. Lee, Mark Holtzaple, Michael Ladisch. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96:673-686
- [15] Mats Galbe, Guido Zacchi. Pretreatment: The key to efficient utilization of

- lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*. 2012, 46:70-78
- [16] David Chiaramonti, Matteo Prussi, Simone Ferrero, Luis Oriani, Piero Ottonello, Paolo Torre, Francesco Cherchi. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and bioenergy* 2012, 46:25-35
- [17] Joseph B. Binder and Ronald T. Raines. Simple Chemical Transformation of Lignocellulosic Biomass into Furans for Fuels and Chemicals. *J. Am. Chem. Soc.*. 2009, 131(5):1979-1985
- [18] J.Y. Zhu, X.J. Pan, G.S. Wang, R. Gleisner. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 2411-2418
- [19] Jian Zhang, Xiusheng Wang, Deqiang Chu, Yanqing He, Jie Bao. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102:4480-4488
- [20] Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen, Anne Belinda Thomsen. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009, 83:447-455
- [21] Malester I.A., Green M., Shelef G.. Kinetics of dilute acid-hydrolysis of cellulose originating from municipal solid-wastes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 1992, 31:1998-2003
- [22] Badal C. Saha, Loren B. Iten, Michael A. Cotta, Y. Victor Wu. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005, 40:3693-3700
- [23] Jian Zhang, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, Nan Wang, Wei Wang, Jie Bao. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:26
- [24] Playne M.J.. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984, 26(5):426-433
- [25] Chang V.S., Nagwani M., Holtzapple M.T.. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998, 74:135-159
- [26] Prasad Kaparaju, Claus Felby. Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pretreatment processes of wheat straw and corn stover. *Bioresource Technology*. 2010, 101:3175-3181

- [27] Ohgren K. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover. *Bioresource Technology*. 2007, 98(13):2503-2510
- [28] Chundawat SP, Venkatesh B, Dale BE. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 96:219-231
- [29] Chang Geun Yoo, Chao Wang, Chenxu Yu, Tae Hyun Kim. Enhancement of Enzymatic Hydrolysis and Klason Lignin Removal of Corn Stover Using Photocatalyst-Assisted Ammonia Pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013, 169:1648-1658
- [30] W.S.L. Mok, M.J. Antal Jr.. Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 1992, 31:1157-1161
- [31] Pan XJ, Arato C, Gilkes N, Gregg D, Mabee W, Pye K. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005, 90(4):473-482
- [32] Jun Yu, Jibin Zhang, Jin He, Ziduo Liu, Ziniu Yu. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*. 2009, 100:903-908
- [33] Banerjee G, Scott Craig JS, Walton JD. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioengineering Research*. 2010, 3:82-92
- [34] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*. 2008, 26:553-560
- [35] Kurasin M, V äljam ä P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *J Biol Chem*. 2011, 286:169-177
- [36] Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*. 2004, 58:521-554
- [37] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, Wada M, Kimura S, Okamoto T, Penttil äM, Ando T, Samejima M. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science*. 2011, 333:1279-1282
- [38] Alvira P, Tom ás-Pej óE, Negro MJ, Ballesteros M. Strategies of xylanase supplementation for an efficient saccharification and cofermentation process from pretreated wheat straw. *Biotechnology Progress*. 2011, 27:944-950

- [39] Kumar R, Wyman CE. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*. 2009a, 25:302-314
- [40] Tomás-Pejó ME, Ballesteros M, Oliva JM, Olsson L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010, 37:1211-1220
- [41] Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresource Technology*. 2012, 106:101-109
- [42] Samayan IP, Schall CA. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. *Bioresource Technology*. 2010, 101:3561-3566
- [43] Pryor SW, Nahar N. Deficiency of cellulase activity measurements for enzyme evaluation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010, 162:1737-1750
- [44] Prior BA, Day DF. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, β -glucosidase, and hemicellulase preparations. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008, 146:151-164
- [45] David Cannella, Chiawen C Hsieh, Claus Felby and Henning Jørgensen. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5:26
- [46] Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Bongers M, Walton JD. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2010a, 101:9097-9105
- [47] Harris PV, Welner D, McFarland KC, et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*. 2010, 49:3305-3316
- [48] Chundawat SP, Balan V, Dale BE. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 99(6):1281-1294
- [49] Samaniuk JR, Scott CT, Root TW, Klingenberg DJ. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresource Technology*. 2011, 102:4489-4494
- [50] Wyman CE, Balan V, Dale BE, et al. Comparative data of effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different

- switchgrass sources. *Bioresource Technology*. 2011, 102(4):11052–11062
- [51] Jian Zhang, Deqiang Chu, Juan Huang, Zhanchun Yu, Gance Dai, Jie Bao. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105:718-728
- [52] Xiao Zhang, Wenjuan Qin, Michael G. Paice, John N. Saddler. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresource Technology*. 2009, 100:5890-5897
- [53] Qi B, Luo J, Chen G, Chen X, Wan Y. Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulase and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw. *Bioresource Technology*. 2012, 104:466-472
- [54] Tu M, Saddler JN. Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010, 161:274-287
- [55] Agnieszka M. Ruppert, Kamil Weinberg, and Regina Palkovits. Hydrogenolysis Goes Bio: From Carbohydrates and Sugar Alcohols to Platform Chemicals. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012, 51:2564-2601
- [56] 美国国家可再生能源实验室编著，鲍杰译。现代生物能源技术。北京：科学出版社，2009
- [57] W. E. Cake. The catalytic hydrogenation of dextro glucose. *J. Am. Chem. Soc*. 1922, 44:859-861
- [58] AW Larchar. Hydrogenation of aliphatic. US Patent 1963997,1934
- [59] Y. Amada, Y. Shinmi, S. Koso, T. Kubota, Y. Nakagawa, K. Tomishige. Reaction mechanism of the glycerol hydrogenolysis to 1,3-propanediol over Ir-ReO_x/SiO₂ catalyst. *Appl. Catal. B*. 2011, 105:117-127
- [60] L. Zhao, J. H. Zhou, Z. J. Sui, X. G. Zhou. Hydrogenolysis of sorbitol to glycols over carbon nanofiber supported ruthenium catalyst. *Chemical Engineering Science*. 2010, 65:30-35
- [61] C. Montassier, J.C. M^én^ézo, L.C. Hoang, C. Renaud, J. Barbier. Aqueous polyol conversions on ruthenium and on sulfur-modified ruthenium. *Journal of Molecular Catalysis*. 1991, 70:99-110
- [62] Annemieke W. Heinen, Joop A. Peters, Herman van Bakkum. The combined hydrolysis and hydrogenation of inulin catalyzed by bifunctional Ru/C. *Carbohydrate Research*. 2001, 330:381-390

- [63] Stijn Van de Vyver, Jan Geboers, Pierre A. Jacobs, Bert F. Sels. Recent Advances in the Catalytic Conversion of Cellulose. *Chem Cat Chem*. 2011, 3:82-94
- [64] Yu S, Tao J. Energy efficiency assessment by life cycle simulation of cassava-based fuel ethanol for automotive use in Chinese Guangxi context. *Energy*. 2009, 34(1): 22-31
- [65] Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, et al. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Appl Energ*. 2009, 86(1): S95-S99
- [66] Fang X, Shen Y, Zhao J, et al. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4814-4819
- [67] 黄日波, 陈东, 王青艳, 等. 木薯原料生产燃料乙醇. *生物工程学报*. 2010, 26(7): 888-891.
- [68] Zhang C, Han W, Jing X, et al. Life cycle economic analysis of fuel ethanol derived from cassava in southwest China. *Renew Sust Energ Rev*. 2003, 7(4): 353-366
- [69] 郝静, 刘钢, 左福元. 木薯渣的饲用价值及应用. *饲料研究*. 2007, 11: 64-66
- [70] Divya Nair MP, Padmaja G, Moorthy SN. Biodegradation of cassava starch factory residue using a combination of cellulases, xylanases and hemicellulases. *Biomass and bioenergy*. 2011, 35: 1211-1218
- [71] Ancharida A, Jutarat K, Natchanun L, et al. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*. 2011, 61: 431- 436
- [72] Ashok P, Carlos R S, Poonam N, et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1):81-87
- [73] Klanarong S , Rungsima C, Sunee C, et al. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology*. 2000, 71:63-69
- [74] 刘甲申, 刘文信, 李春玲, 等. 采用含木薯渣的原料制备乙醇的方法: CN101423849A. 2009-01-06
- [75] 王永伟, 王异静, 张五九, 等. 木薯酒糟稀酸预处理条件的研究. *中国酿造*. 2010, 2:146-149
- [76] Zhang QH, Tang L, Zhang JH, et al. Optimization of thermal-dilute sulfuric acid pretreatment for enhancement of methane production from cassava residues. *Bioresource Technology*. 2011, 102(4): 3958-3965
- [77] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96(6): 673-686
- [78] Hsu TC, Guo GL, Chen WH, et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13):

4907-4913

- [79] 申乃坤, 王青艳, 陆雁, 等. 木薯淀粉高温高浓度生产酒精的工艺研究. 酿酒. 2009, 36(5): 47-51
- [80] 谢玉锋, 伍时华, 易弋, 等. 应用纤维素酶提高木薯酒精发酵出酒率的试验研究. 酿酒科技. 2009, 1: 30-32
- [81] Ye Chen, Mark A. Stevens, Yongming Zhu, Jason Holmes, Geoffrey Moxley, Hui Xu. Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012, 39:691-700
- [82] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. CO: National Renewable Energy Laboratory. 2001, LAP-009
- [83] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. 2008. National Renewable Energy Laboratory
- [84] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solid content and high ethanol titer. Bioresource Technology. 2012, 116: 74-79
- [85] T.Q. Lan, Hongming Lou, J.Y. Zhu. Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2-6.2. BioEnergy Research. 2012
- [86] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC. CO: National Renewable Energy Laboratory. 2005, LAP-016.
- [87] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J Dairy Sci. 1991, 74(10): 3583-3597

攻读硕士期间主要研究成果

- [1] 方镇宏, 邓红波, 张小希, 张建, 鲍杰. 木薯纤维素乙醇发酵的纤维素酶成本评价. 生物工程学报, 2013, 29(3): 212-224.
Fang ZH, Deng HB, Zhang XX, Zhang J, Bao J. Evaluation of the cellulase cost during the cassava cellulose ethanol fermentation process. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 212-224.
- [2] Jian Zhang, **Zhenhong Fang**, Hongbo Deng, Xiaoxi Zhang, Jie Bao. Cost analysis of cassava cellulose utilization scenarios for ethanol production on flowsheet simulation platform. Bioresource Technology (IF 4.9). 2013, 134:298-306.
- [3] 鲍杰, 方镇宏. 一种木质纤维素原料除尘前处理方法. 专利申请号: 201210510127.9
- [4] **Zhenhong Fang**, Jian Zhang, Jie Bao. Dry Dilute Acid Pretreatment of Corn Stover and the Saccharification at a High Solids Loading. International Conference on Biomass-Energy Technologies 2012, Nanjing, China.

致谢

本文是在导师鲍杰教授悉心指导下完成的。在此期间，鲍老师帮助我克服了众多困难，并对本工作做出卓有成就的指导才使本文得以完成。经过三年来的相处，鲍老师实事求是的科学态度，严谨的治学精神，努力拼搏的工作作风，给我留下了十分深刻的印象，并深深地感染和激励着我。在此谨向鲍老师致以诚挚的谢意及崇高的敬意。

其次，要特别感谢我的企业导师张小希女士以及本实验室的胡凤仙老师、张建老师、高秋强老师。他们对我的工作提出了宝贵的指导意见及无私的帮助，使我收获甚丰，谢谢各位老师。

感谢楚德强博士、国立浩师兄、赵凯师兄、何燕青、崔振阳、李昆、陶泰河、刘克、吴倩等同学在实验过程给予我的帮助。谢谢实验室的全体成员，你们让我感受到了集体的力量及温暖。

谢谢我的家人及我的女友方巧珠，谢谢你们对我的爱与付出。