

糠醛渣纤维乙醇同步糖化发酵过程研究

孙亚东, 孙冉, 蒋建新, 朱莉伟

(北京林业大学化学工程系, 北京 100083)

摘要:以过碱化处理的糠醛渣为原料,采用正交试验法进行同步糖化发酵(SSF)转化乙醇工艺条件及过程研究。通过考察反应温度、pH、纤维素酶用量和表面活性剂浓度来优化同步糖化发酵转化工艺条件。在正交优化条件基础上,进行了 5 L 发酵罐试验,并同步分析表征了发酵过程中还原糖浓度、乙醇浓度、酵母细胞数、纤维素含量及其结构变化。同步糖化发酵转化糠醛渣生成乙醇的优化条件为:反应温度 38℃, pH 4.2, 纤维素酶用量 20 FPU/(g 纤维素), 吐温-20 质量分数 0.15%, 酵母接种量 10%。发酵罐中同步糖化发酵糠醛渣生成乙醇的转化率达到 72.33%, 过程分析表明反应时间为 27 h 时, 糠醛渣糖化发酵产乙醇的转化率达到最高, 比其他纤维原料的反应转化时间大大缩短。同步糖化发酵过程中, 糠醛渣纤维素含量逐步降低, 纤维素表观结晶度呈下降趋势, 纤维素微晶尺寸减小。

关键词:糠醛渣; 纤维乙醇; 同步糖化发酵; 纤维素结构

中图分类号:TQ92

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)12-0048-05

Study on conversion process for furfural residue manufacture to ethanol by simultaneous saccharification and fermentation

SUN Ya-dong, SUN Ran, JIANG Jian-xin, ZHU Li-wei

(Department of Chemical Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Furfural residue pretreated by overliming is fermented to ethanol by batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) in this paper. The optimal combination of factors (reaction temperature, solution pH value, loading of both cellulase and tween-20) affecting the conversion of pretreated furfural residue to ethanol is found by orthogonal design experiments. The SSF of furfural residue is experimented in a 5 L fermentor, and the data of different phases are analyzed simultaneously. The optimal conditions are as follows: 38℃ of reaction temperature, 4.2 of pH value, cellulase 20 FPU/(g cellulose), 0.15% of tween-20 and 10% inoculum solution. The ethanol recovery up to 72.33% (vs theory data) can be obtained in 5 L fermentor. The simultaneous analysis result indicates that the highest ethanol conversion rate appear at 27 h, which is much less than that of other cellulose material. The cellulose content and crystallinity index of fermented furfural residue decrease as the SSF proceed, and the average dimension of cellulose crystallite decreases during enzymatic hydrolysis.

Key words: furfural residue; cellulosic ethanol; simultaneous saccharification and fermentation (SSF); cellulosic structure

糠醛是一种重要的化工原料,是以农林产品下脚料为生产原料,我国已成为糠醛的主要生产国和出口国之一。糠醛生产企业遍布华北、东北、华东等 15 个省市,现有 100 多家生产厂,其中山西、河北两省的糠醛厂最为集中。糠醛生产主要利用原料中的戊聚糖,戊聚糖含量高的植物原料都是生产糠醛的理想原料。我国糠醛生产的主要原料为玉米芯,玉米芯产量 2 000 万~3 000 万 t/a。在糠醛生产(蒸煮水解)过程中,伴有大量糠醛废渣产生,每吨糠醛产品排出 10 t 以上残渣,因此我国每年排放糠醛废渣超过千万吨。

目前有部分生产厂将糠醛渣作为供汽锅炉的燃料,但大部分企业受技术条件的限制,都没有实现糠醛渣的规模工业化再利用。糠醛废渣含有丰富的纤维素,是生产纤维素及其转化产品的潜在原料。

随着国际石油价格的不断攀升,各国对燃料乙醇的需求越来越大,而目前我国又逐步限制粮食乙醇的发展,因此发展纤维素乙醇成为关注的重点。糠醛的生产大多采用弱酸水解法,在分离大部分半纤维素的同时,原料中纤维素与半纤维素和木素之间的复杂网状结构遭到一定程度的破坏,为纤维素发酵转化乙醇提供了有利条件。本文通过正交实验

收稿日期:2008-09-08

基金项目:国家林业局“948”引进项目(2004-4-40);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-07-0082)项目

作者简介:孙亚东(1982-),男,硕士生;蒋建新(1969-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事林产化工及生物质能源方面的研究,通讯联系人,010-62338152,jiangjx@bjfu.edu.cn。

方法对过碱化处理糠醛渣进行同步糖化发酵工艺优化,并进行5 L发酵罐试验和过程同步检测,分析表征同步糖化发酵过程中还原糖浓度、乙醇浓度、酵母细胞数、纤维素含量及其结构变化,以期为糠醛渣转化乙醇工业化生产提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 原料与仪器

原料:糠醛渣(河北春蕾集团),经气流烘干和水分平衡后,磨碎过40目筛,密闭封存。

仪器:恒温水浴摇床(HZ-9212S)、多功能全自动发酵罐(GBCS-5)、气相色谱仪(GC7890F)、X射线衍射仪(Shimadzu XRD-6000)、生物显微镜(LEICA DME)、电子天平(FA1004N)、烘箱(DF-240)、离心机(L-550)、紫外分光光度计(UV-2102C)。

试剂:纤维素酶(夏实纤维素酶,滤纸酶活力98 FPU),安琪酿酒活性干酵母(耐高温型),其他试剂为分析纯。

1.2 糠醛渣组成分析与过碱化处理

糠醛渣组成分析:纤维素含量采用硝酸乙醇重量法测定,试样灰分、苯醇抽提物、木素、戊聚糖测定按文献[1]规定的方法进行。

(上接第47页)

酰氯,然后选择合适的溶剂溶解而后直接与简单胺类反应沉淀出酰胺的方法,可以有效的阻止保护基Fmoc的脱落,是一种合成氨基酸酰胺类化合物的有效方法。

表1 Fmoc保护缬氨酸、亮氨酸、蛋氨酸与不同胺的反应

Fmoc-氨基酸	胺	溶剂	收率/%	熔点/℃
Fmoc-缬氨酸	氨水	乙醚	93.6	206~209
	异丙胺	乙醚	93.8	205~208
Fmoc-亮氨酸	氨水	乙醚	93.2	167~170
	甲胺	THF	0	—
	甲胺	CCl ₄	92.3	165~168
Fmoc-蛋氨酸	甲胺	乙醚	92.3	180~182
	异丙胺	CH ₂ Cl ₂	0	—
	异丙胺	乙醚	91.8	191~194

参考文献

[1] Muehlman A, Lindberg J, Classon B, *et al.* Synthesis of novel, potent, dio L-based HIV-1 protease inhibitors via intermolecular pinacol homo-coupling of (2S)-2-benzyloxymethyl L-4-phenylbutanal [J]. J Med Chem, 2001, 44(21): 3407 - 3416.

过碱化处理:糠醛渣本身为酸性,10%水溶液pH为2~3,含有许多酸性发酵抑制物。向10%糠醛渣水溶液中投加NaOH,使溶液pH达到9~10,搅拌碱化1 h,水洗至中性,再经过60℃烘干,经碱化处理后的糠醛渣可消除部分抑制物^[2]。

1.3 SSF摇床正交实验

采用正交实验进行SSF法乙醇工艺优化,通过考察反应温度、pH、酶用量和表面活性剂用量等4因素,选用L₉(3⁴)正交表进行实验优化。将SSF培养基150 mL移入250 mL锥形瓶,用醋酸缓冲液调节pH,高压蒸汽灭菌(121℃,30 min);冷却后加入规定量的纤维素酶和表面活性剂吐温-20,酵母按发酵液体积的10%接种;用塑料薄膜封口,放置摇床上,调节反应温度进行同步糖化发酵,振荡频率为100 r/min。

酵母活化培养基:取2 g干酵母放入2%的麦芽糖水溶液200 mL中,水浴摇床上36℃活化15 min,再降温至33℃活化90 min。

SSF培养基配料比:原料(糠醛渣)6 g、酵母膏1 g、蛋白胨1 g、磷酸二氢钾0.2 g、硫酸铵0.1 g、硫酸镁0.1 g和少量氯化钙,加水或缓冲液定溶至150 mL^[3]。

- [2] Akira D, Kaori K, Makoto S, *et al.* Control of the solubility transition in novel temperature-responsive linear polymers comprising α -amino acid diamide derivatives[J]. Anal Sci, 2000, 16: 829 - 835.
- [3] Veronique P, Carl J C, *et al.* The nucleophilic reactivity of valine methylamide: A model of the N-terminal valine residues of hemoglobin [J]. Acta Chemica Scandinavica B, 1983, 37: 817 - 822.
- [4] Holzapfel C M, Pettit G R, *et al.* Synthesis of the dolastatin thiazole amino acid component (gln) Thz [J]. J Org Chem, 1985, 50: 2323 - 2327.
- [5] Roger R H, David B, Graham E J, *et al.* Enantioselection in peptide bond formation[J]. Org Biomol Chem, 2003, 1: 965 - 972.
- [6] Victor W R, James L P, John J V, *et al.* Rapid optimization of the hydrolysis of N-trifluoroacetyl L-S-tert-leucine-N-methylamide using high-throughput chemical development techniques[J]. Org Process Res Dev, 2001, 5: 294 - 298.
- [7] 韩香, 龚喜, 杨潇骁. 经济实用的Boc保护氨基酸键合氯甲基树脂的方法研究[J]. 有机化学, 2007, 27: 536 - 540.
- [8] Frank S G, Stephen C B, Henry R, *et al.* (+ -)-Aspidofractinine derivatives[J]. J Org Chem, 1994, 59: 3216 - 3218.
- [9] Nikos Z, Leonidios L, Nikolas F, *et al.* Na-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution[J]. J Comb Chem, 2005, 7: 4 - 6.
- [10] Louis A C, Beri J C, Kenton E S, *et al.* Regioselective removal of allylic nitro groups via hydride transfer[J]. J Org Chem, 1986, 51: 3734 - 3736. ■

1.4 发酵罐试验与过程同步检测

发酵罐试验取培养基 3 L, 糠醛渣 120 g, 在正交实验优化工艺条件下进行糠醛渣的发酵罐同步糖化发酵。过程同步检测取样点依次为每隔 3 h、取样 4 次, 5 h、取样 4 次, 8 h、取样 2 次, 12 h、取样 2 次, 共反应 72 h、取样 12 次。取样后测定酵母细胞数^[4]; 将反应液离心分离, 分别测定清液中还原糖和乙醇浓度, 还原糖浓度采用 DNS 法测定^[5]; 进行离心残渣中纤维素含量和纤维素 X 射线衍射分析。

1.5 分析方法

1.5.1 乙醇浓度

取 50 mL 发酵液离心分离 (2 000 r/min, 5 min), 取上清液, 准确量取 30 mL 并加 30 mL 蒸馏水进行常压蒸馏, 蒸出馏分 30 mL。馏分采用气相色谱外标法进行测定, 色谱条件: 白酒分析柱, 2 m × 3 mm (OD) stainless steel 柱温 90℃, 检测器温度 120℃, 进样器温度 120℃, 进样量 1 μL。乙醇理论得率是以 1 g 纤维素理论上产生 0.5679 g 乙醇为计算基准。

1.5.2 纤维素 X 射线衍射

将发酵液离心得到的固体残渣烘干、研磨过 100 目筛, 并压入样品架内, 在 Shimadzu XRD-6000 仪器上测定。实验条件: CuKα 靶 (射线波长 λ = 0.154 nm), 电压 40 kV, 电流 30 mA, 衍射方向 θ-2θ 联动扫描方式, 旋转半圆锥角 2θ 从 5° ~ 60°。

2 结果与讨论

2.1 糠醛渣组成

与其他生物质原料相比, 玉米芯中半纤维素含量较高 (质量分数 35% ~ 40%), 且主要为戊聚糖, 而木质素含量相对较低。由表 1 可以看出, 由于糠醛生产中大部分半纤维素的降解分离, 使得糠醛渣中纤维素和木质素含量相对提高。大部分半纤维素在糠醛生产过程中被降解分离, 有助于纤维素从复杂的网状结构中解离出来, 也更有利于纤维素糖化发酵反应的进行。

表 1 糠醛渣和玉米芯化学组成 质量分数/%

	纤维素	半纤维素	木素	苯醇 抽提物	1% NaOH 抽提物	水分
糠醛渣	42.23	1.85	38.69	14.83	37.03	9.66
玉米芯 ^[6]	32 ~ 36	35 ~ 40	20 ~ 23	—	—	—

2.2 SSF 摇床正交实验结果

正交实验数据分析见表 2, 糠醛渣 SSF 转化的最佳工艺条件为反应温度 38℃, pH 4.2, 酶用量为每克纤维素 20 FPU, 吐温-20 质量分数 0.15%, 稳定性

实验结果乙醇转化率可达 62.03%。各因素的影响顺序为: pH > 吐温-20 用量 > 反应温度 > 酶用量。

表 2 同步糖化发酵正交实验结果

实验号	反应 温度/℃	pH	酶用量/ FPU·g ⁻¹	吐温-20 质量分数/%	乙醇转 化率/%
1	30	4.0	10	0.10	20.95
2	30	4.2	15	0.15	54.45
3	30	4.6	20	0.20	49.19
4	34	4.0	15	0.20	25.21
5	34	4.2	20	0.10	53.77
6	34	4.6	10	0.15	52.84
7	38	4.0	20	0.15	41.06
8	38	4.2	10	0.20	59.71
9	38	4.6	15	0.10	48.03
均值 1	41.530	29.073	44.500	40.917	
均值 2	43.940	55.977	42.563	49.450	
均值 3	49.600	50.020	48.007	44.703	
极差	8.070	26.904	5.444	8.533	

同步糖化发酵实验结果表明: 适宜的 pH 为 4.6, 反应温度为 38℃, 而纤维素酶的最适温度为 50℃^[7], 两者存在着一定的差异。当反应体系温度过高 (大于 45℃), 则酵母细胞活性降低。因此, 在同步糖化发酵过程中, 只有寻求一个折中的反应温度才能同时满足酵母和纤维素酶反应需要, 这也是目前同步糖化发酵反应效率偏低的主要因素之一。开发耐高温型酵母, 可以提高发酵温度, 从而进一步提高同步糖化发酵反应效率。

纤维素酶活性普遍不高, 理论上纤维素酶量越大, 乙醇转化率越高。但考虑到纤维素酶的使用成本以及产糖速度对发酵的影响等客观因素, 纤维素酶用量应选择一个合适的量; 吐温-20 作为一种表面活性剂, 在一定浓度下可以扩大酶和原料的接触面积, 可以较好的促进糖化和发酵, 但使用量过大也会带来负面影响, 如产生泡沫等, 实验表明吐温-20 的质量分数为 0.15% 时效果最好。

2.3 发酵罐试验与过程同步检测

发酵罐同步糖化发酵实验中 (见图 1), 反应进行 3 h 时还原糖质量浓度可达到 6.4379 g/L, 此后随着发酵的进行, 糖浓度下降较快, 反应 27 h 后逐步达到平衡。在同步糖化发酵开始阶段, 糖化反应速度较快, 说明由于原料结构的特殊性使糠醛渣糖化反应比其他纤维素类原料速率更快。随着还原糖的

产生,反应液中开始生成乙醇,从开始反应至反应12 h,乙醇浓度快速升高,表明糖化和发酵速度均很快。反应12 h后乙醇浓度增速变缓,表明最易水解的那部分纤维素已经水解;反应27 h,乙醇浓度达到了最高值,此后略有下降,可能是因为实验设备等因素引起的少量乙醇损失。反应进行到60 h至72 h,乙醇浓度略有升高并稳定,分析原因可能是部分难降解的结晶纤维素被酶解转化。由于采用了发酵条件控制更为精确的多功能全自动发酵罐,乙醇转化率与摇床实验相比有较大幅度提高,达到72.33%。上述结果与其他纤维素原料相比,糖化发酵时间大大缩短^[8-9],张德强等^[3]利用毛白杨爆破原料SSF转化乙醇研究认为当发酵5 d时,发酵液里乙醇浓度达到了最大;侯金淑等^[10]利用废报纸SSF转化乙醇研究认为乙醇的产率到72 h达到最大值。

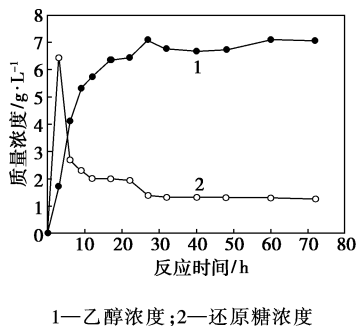


图1 反应时间对糖化发酵液中乙醇和还原糖浓度的影响

酵母细胞同步检测表明,在同步糖化发酵过程的开始阶段,酵母活细胞数稳定增长,说明酵母细胞适应所处的生长环境,开始自身生长繁殖。由图2可以看出,在同步糖化发酵的中后期,活细胞数量出现上下振荡,说明此时部分细胞死亡,同时也有新的细胞繁殖。酵母细胞在现有的同步糖化发酵过程中能够进行较好地自我更新,基本能满足适合纤维素原料同步糖化发酵的需要。在同步糖化发酵反应

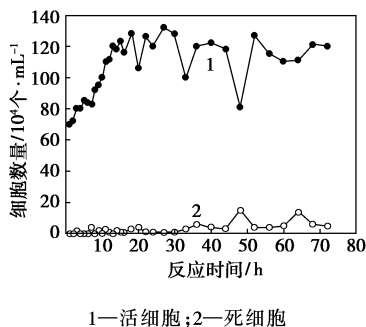


图2 反应时间对发酵过程酵母细胞数量的影响

前期,死细胞数量很少,而在反应后期死细胞数量明显增多。活细胞曲线变化趋势也基本上与死细胞曲线(死细胞曲线只体现了取样点当时存在的死细胞数量,死细胞在一定时间内也会分解)的变化趋势相一致。随着反应时间延长,整个细胞群体会进入衰减期,活细胞数量总体减少,死细胞数量增加^[11]。

同步糖化发酵过程中,反应体系中纤维素含量随着反应时间的延长而降低,并且在反应初期纤维素含量快速下降,反应6 h时纤维素含量下降至23.66%(如图3);反应20 h后,反应体系中纤维素含量下降趋势变缓。上述纤维素降解规律可以解释为:同步糖化发酵反应初期,酶等水解剂能很快渗透进纤维素的无定形区,在无定形区各处,几乎同时进行水解,故水解速度很快;由于酶等水解剂很难甚至根本不能渗透到纤维素的结晶区,因此当无定形区水解完毕以后,起水解作用的只有结晶表面的少数链分子,故水解速度显得缓慢而趋于稳定。纤维素含量的变化与图1中乙醇和还原糖浓度变化结果是吻合的,经计算同步糖化发酵过程中纤维素消耗达到75%,与乙醇转化率计算得出的结论基本相符。从图3中的纤维素表观结晶度曲线可以看出,原料糠醛渣纤维素的表观结晶度约为49%,而木材纤维素的表观结晶度为60%~70%,说明糠醛渣纤维素结构比较松散。这可以归因于糠醛生产大都采用稀酸水解法,较大程度地破除了纤维素结晶结构,从而极易进行纤维素酶糖化反应,因此糠醛渣是生产纤维乙醇的理想原料^[12]。

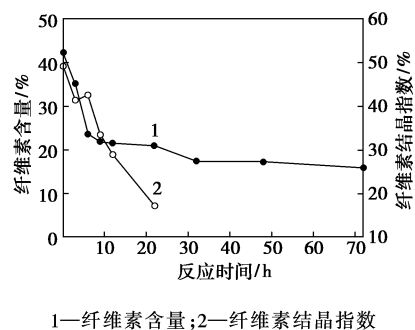


图3 反应时间对纤维素含量和纤维素表观结晶度的影响

随着同步糖化发酵反应的进行和纤维素含量不断降低,纤维素表观结晶度总体也呈下降趋势。在反应过程中纤维素表观结晶度有一定的振荡起伏,可能是由于在反应过程中无定型区纤维素和结晶区纤维素的反应速率不同造成表观结晶度的变化^[13],反应进行到32 h以后,纤维素无定型区衍射峰已不

明显,表明剩余残渣中以结晶纤维素为主。图 4 比较了原料和糖化发酵反应各个阶段剩余残渣的 X 射线衍射曲线,反应 12 h 以内,纤维素在 18° 和 22° 处有明显的衍射峰,为纤维素-I 的典型结构,说明其糠醛渣纤维素为天然纤维素的晶型。随着反应的

进行,18° 处的无定型区衍射峰消失,说明无定型区纤维素全部被纤维素酶所糖化降解;22° 处的结晶区衍射峰的半峰宽随着反应延长而增大,纤维素微晶体尺寸减小,表明纤维酶解反应主要发生在纤维素的无定形区和结晶区表面。

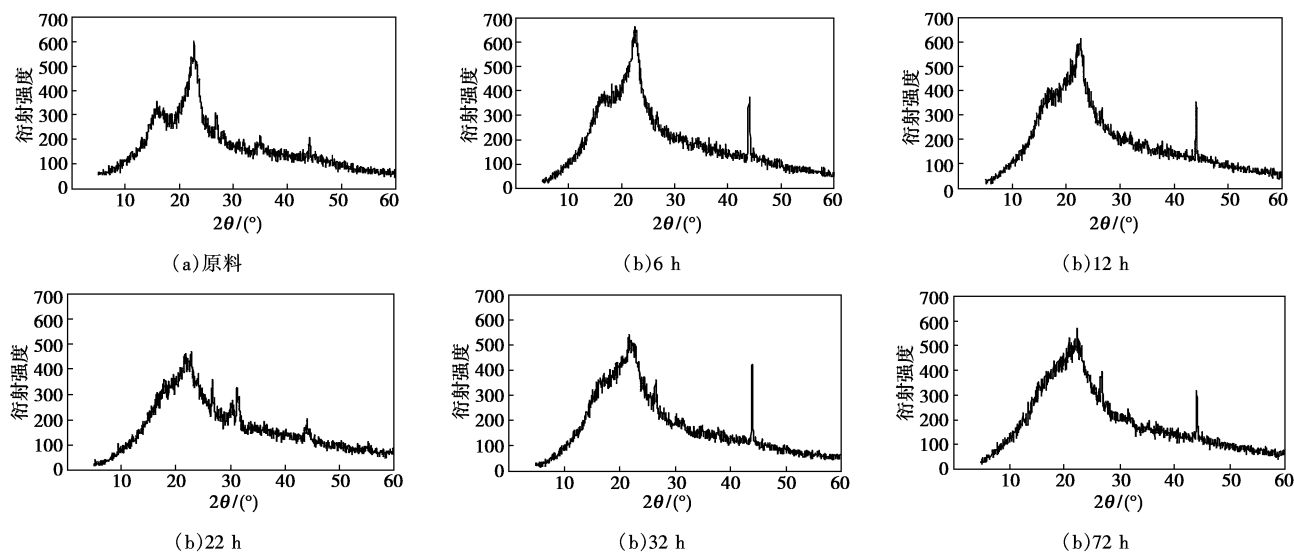


图 4 同步糖化发酵中不同反应时间物料的纤维素 X 射线衍射图

3 结论

(1) 通过摇床正交实验得到糠醛渣 SSF 转化乙醇的优化工艺条件为:反应温度 38℃, pH 4.2, 酶用量每克纤维素 20 FPU, 吐温-20 质量分数 0.15%, 乙醇转化率为 62.03%。

(2) 发酵罐试验及过程同步检测分析表明,反应 3 h 内进入酶解糖化反应高峰期,反应 27 h 发酵液中乙醇浓度最高,乙醇转化率达到 72.33%。与其他纤维类原料相比,糠醛渣同步糖化发酵反应时间较短。糠醛渣中纤维素与半纤维素和木素之间的复杂网状结构已被破坏,纤维素表观结晶度低,使得纤维素易于进行糖化发酵反应,因此糠醛渣是生产纤维乙醇的理想原料。

(3) 同步糖化发酵过程中,反应体系中纤维素含量随着反应时间的延长而降低,并且在反应初期纤维素含量下降幅度较大。反应过程中纤维素表观结晶度也呈下降趋势,随着反应的进行,18° 处的无定型区衍射峰逐渐减弱并最终消失,22° 处的结晶区衍射峰的半峰宽增大,纤维素微晶体尺寸减小,纤维酶解主要发生在纤维素的无定形区和结晶区表面。

参考文献

- [1] 石淑兰. 制浆造纸分析与检测[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2003:10-34.
- [2] Eva P, Barbel H H. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: Inhibition and detoxification[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 17-24.
- [3] 张德强, 张志毅, 黄镇亚. 木质纤维素生物量一步法(SSF)转化成乙醇的研究(Ⅲ)[J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22(6): 50-54.
- [4] 李华, 刘延琳, 王华. 葡萄汁和葡萄酒微生物分析[J]. *酿酒*, 1999(4): 61-70.
- [5] 粟学刚. 纤维素酶水解纤维素还原糖的测定[J]. *湖北化工*, 1999(1): 43-44.
- [6] 韩晓东, 丁涓, 赵华. 玉米芯生物炼制研究进展[J]. *酿酒*, 2006, 33(5): 47-49.
- [7] 杨传强, 龙德树. 纤维素酶的活性测定及其影响因素进展[J]. *天津纺织工学院学报*, 1999, 18(4): 31-36.
- [8] Zhou S D, Ingram L O. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulase[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1455-1462.
- [9] Mohammed M Z. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw[J]. *Bioresource Technology*, 1996, 55: 111-117.
- [10] 侯金淑, 袁兴中, 曾光明, 等. 利用废报纸同步糖化发酵生产乙醇的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(10): 66-69.
- [11] 晏辉, 马鸿志, 汪群慧, 等. 同步糖化发酵从厨余垃圾生产燃料乙醇的研究[J]. *环境与可持续发展*, 2007(3): 37-39.
- [12] Hagerdal B H, Gorwa-Grauslund M F, Liden G, et al. Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today[J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(12): 549-556.
- [13] 鲁杰, 石淑兰, 杨汝男, 等. 纤维素酶解苇浆纤维微观结构和结晶结构的变化[J]. *中国造纸学报*, 2005, 20(2): 85-90. ■