

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.07.020

玉米秸秆水解液脱毒处理发酵生产酒精研究*

张强¹ 庄莉² Anne Belinda Thomsen³

(1. 长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022; 2. 白城市医学高等专科学校外语教研室, 白城 137000;
3. 丹麦瑞素国家实验室生物系, 罗斯基德 450002)

【摘要】 为了找到适宜的玉米秸秆生产酒精工艺, 采用水热处理后的玉米秸秆固体与水解液进行酒精同步糖化发酵, 研究了预水解后不同 pH 值以及饱和生石灰法脱毒相结合对酒精发酵的影响。结果表明: 当 pH 值在 4.8 时, 加入 100% 水解液, 由于抑制作用, 醪液中酒精质量浓度仅为 0.31 g/L (酒精得率 9.48%)。预水解后将 pH 值从 4.8 分别调整到 5.5、6.0 和 6.5 后, 酒精得率都有明显提高, 最高为 pH 值 5.5 时, 酒精质量浓度为 10.67 g/L。将水解液经过饱和生石灰法脱毒处理, 预水解后重新将 pH 值调整为 5.5, 酒精质量浓度达到了 10.96 g/L (酒精得率 57.9%)。与初始 pH 值 4.8 时相比, 酒精得率提高了近 6 倍。

关键词: 玉米秸秆 水解液 酒精 水热预处理 脱毒

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)07-0108-04

Ethanol Production from Detoxified Corn Stover Hydrolysate

Zhang Qiang¹ Zhuang Li² Anne Belinda Thomsen³

(1. Life Science College, Changchun Science and Technology University, Changchun 130022, China

2. Foreign Language Department, Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China

3. Biosystems Department, National Lab for Sustainable Energy, Roskilde 450002, Denmark)

Abstract

After hydrothermal pretreatment of corn stover, solid fraction and hydrolysate were collected separately. To find out the appropriate process for ethanol production from corn stover, ethanol production was evaluated from dried solid fraction and the hydrolysate employed as liquid fraction by baker's yeast. The effects of different pH value and detoxification on ethanol production were investigated. Firstly, prehydrolysis was performed at 50°C for 24 h. When 100% hydrolysate was added, ethanol content of 0.31 g/L (9.48% of theoretical ethanol yield) was obtained based on the cellulose available in the pretreated corn stover due to the existence of acetic acid and furans which are important inhibitors of the fermentation to microorganisms. After prehydrolysis, the initial pH value was adjusted to 5.5, 6.0 and 6.5, respectively. The best value obtained was ethanol content of 10.67 g/L with addition of 100% hydrolysate at pH value of 5.5. The hydrolysate was overlimed, then prehydrolyzed for 24 h at 50°C. After prehydrolysis, the initial pH value was adjusted again to 5.5. Ethanol content of 10.96 g/L (57.9% of theoretical ethanol yield) was obtained. Ethanol yield increased almost 6 times compared to that at pH value of 4.8.

Key words Corn stover, Hydrolysate, Ethanol, Hydrothermal pretreatment, Detoxification

引言

燃料酒精作为一种可再生能源, 可以通过广泛

的糖类物质发酵生产, 其中利用成本低廉、数量巨大的纤维质类物质(例如玉米秸秆)生产燃料酒精尤为引人关注^[1-3]。

收稿日期: 2011-09-24 修回日期: 2011-11-02

* 吉林省教育厅科技项目(200623)

作者简介: 张强, 副教授, 博士, 主要从事生物质能源研究, E-mail: corn11@126.com

玉米秸秆由于结构复杂很难被降解,因此为提高酶解性首先要进行预处理。水热预处理是一种简单的预处理方法,可使原料中的纤维素、半纤维素和木质素有效分离^[4~5]。预处理后的水解液含有丰富的还原糖等营养物质,是酒精发酵很好的原料。目前大部分利用纤维质原料发酵生产酒精的实验,往往在水解液中额外加入葡萄糖或木糖。而采用同步糖化发酵法(SSF)进行酒精发酵,葡萄糖或木糖都来自酶水解液,从而有利于实现资源的合理利用,具有较强的实用价值^[6]。

各种不同的预处理过程会产生多种发酵抑制剂,主要有甲酸、醋酸、糠醛和5-HMF(5-羟甲基糠醛)等。它们以不同方式影响菌体发酵,因此发酵前往往要进行脱毒处理。目前使用的脱毒方法较多,其中饱和生石灰法是常用的有效的脱毒方法^[7~8]。

本文采用水热处理后的玉米秸秆固体与水解液作为发酵原料进行同步糖化发酵,研究预水解后不同pH值以及与饱和生石灰法脱毒相结合对酒精发酵的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

活性干酵母 *S. cerevisiae* (批号 No. 2366) 由丹麦 Danske Spritfabrikker A/S 公司生产。

水热处理后的玉米秸秆固体与水解液来自丹麦 IBUS 公司,水热预处理条件:195℃ 预处理 10 min。

纤维素酶,丹麦 NOVO 公司生产,活力为 96 FPU/mL。

1.2 同步糖化发酵(SSF)

发酵在 250 mL 玻璃瓶中进行。将预处理后的玉米秸秆固体与水解液混合,底物质量分数为 8% (水解液预先用 5 mol/L NaOH 调整到 pH 值 4.8)。首先在 50℃ 进行 24 h 预水解,加酶量为 15 FPU/g (干质量,下同)。然后再加入纤维素酶 20 FPU/g,同时加入 0.2 g 干酵母和 0.2 mL(24%) 的尿素。在 32℃ 进行发酵,酒精生成量可以通过因 CO₂ 释放引起的瓶质量变化来监测。酒精质量浓度及其他成分最终皆通过 HPLC 测得。

1.3 预水解后 pH 值调整

8.0 g 固体与 100 mL 水解液混合(水解液预先用 5 mol/L NaOH 调整到 pH 值 4.8),在 50℃ 进行 24 h 预水解,然后采用 5 mol/L NaOH 将 pH 值从 4.8 分别调整到 5.5、6.0 和 6.5。

1.4 饱和生石灰法

采用饱和石灰石乳液与玉米秸秆水解液快速搅

拌混合,首先将 pH 值调到 10.0,静置 1 h 后过滤,然后用浓 H₂SO₄ 酸化到 pH 值 4.8,静置过滤。

1.5 原料及湿热预处理后的固体及水解液的分析

首先称取约 0.16 g 的原料,用 1.5 mL 72% H₂SO₄ 于 30℃ 水解 1 h,然后加入 42 mL 蒸馏水及标准样品。121℃ 水解 1 h 后过滤。糖的含量可由 HPLC 测得。固体残留物经过干燥及称量可计算出木质素的含量。

湿氧化预处理后所得的水解液用 8% H₂SO₄ 在 121℃ 下水解 10 min,糖的含量及各种抑制剂由 HPLC 测得。

2 结果和讨论

2.1 玉米秸秆水热处理后固体与水解液组成

水热处理后的玉米秸秆分为固体与水解液两部分,对固体及水解液组成进行测定,如表 1 所示。

预处理后固体部分中纤维素和半纤维素质量分数分别为 49.3% 和 6.3%,而木质素质量分数为 29.3%。水解液组成如表 1 所示,预处理过程中极少部分纤维素发生降解产生了葡萄糖,而大部分半纤维素主要降解为木糖。预处理过程中由于半纤维素、木质素等降解还产生了部分发酵抑制剂如糠醛、5-HMF、醋酸等物质,其中醋酸质量浓度为 5.53 g/L。醋酸主要由半纤维素脱乙酰生成,甲酸是 5-HMF 的降解产物,同时甲酸也可由糠醛在酸性环境下降解产生。糠醛和 5-HMF 分别由戊糖和己糖在酸性环境下脱水生成。

表 1 预处理后玉米秸秆水解液化学组成

Tab.1 Chemical composition of hydrolysate of corn stover after pretreatment

水解液	质量浓度/g·L ⁻¹
葡萄糖	0.482
木糖	2.14
糠醛	1.363
醋酸	5.53
5-HMF	0.266
甲酸	3.363

2.2 固体与水解液配比发酵

利用活性干酵母作为发酵菌种,预处理后的固体部分(简称 S)与含 50%、100% 水解液分别混合,最终使底物质量分数达到 8%,然后进行同步糖化发酵,同时加入 100% 水作为空白对照,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,由于水解液中抑制剂的影响,随着加入水解液比例的增加,酒精得率逐步降低。

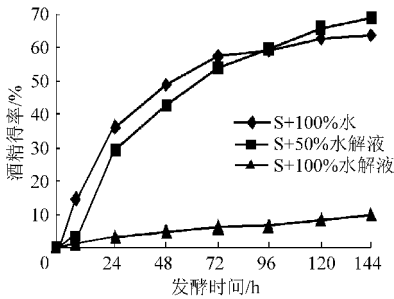


图1 不同配比的水解液对酒精得率影响曲线

Fig. 1 Effect of different ratio of solid fraction and hydrolysate on ethanol production

加入 100% 水,最终酒精质量浓度为 13.03 g/L,酒精得率 63.9%。加入 50% 水解液,最终酒精质量浓度为 14.14 g/L,酒精得率为 68.8%。当加入 100% 水解液,最终酒精浓度仅为 0.31 g/L (酒精得率 9.48%),主要因为发酵液中具有较高的糠醛类及羧酸类抑制剂,影响了菌体生长及酒精形成。另外从图 1 也可以看到,当加入 50% 水解液进行酒精发酵时,发酵 4 h 左右有滞后期存在,主要由于发酵液中存在少量的糠醛等抑制剂。醛类化合物对酿酒酵母的影响主要是抑制其生长,出现滞后期,而酵母具有很强的脱毒能力,能够利用滞后期调整或者进行底物脱毒^[9]。

2.3 预水解后不同 pH 值对酒精发酵的影响

为了克服醋酸的抑制作用,将固体与 100% 水解液混合,底物质量分数为 8%,预水解后将 pH 值从 4.8 分别调整到 5.5、6.0 和 6.5 进行发酵试验,结果如图 2 所示。

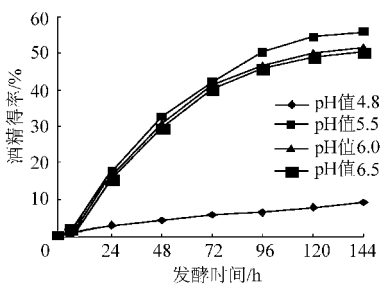


图2 预水解后不同 pH 值对酒精得率的影响曲线

Fig. 2 Effect of different pH value on ethanol production after prehydrolysis

从图 2 中可以看到,当 pH 值从 4.8 分别调整到 5.5、6.0 和 6.5 时,酒精得率都有了明显提高。当 pH 值为 5.5 时,酒精得率最高达到 56.4%,酒精质量浓度为 10.67 g/L。由于 25℃ 醋酸的电离常数为 4.76,未解离的醋酸与 pH 值有很大关系,会透过细胞膜影响细胞生长而产生抑制作用。一般来讲醋酸质量浓度范围在 2.0 ~ 5.0 g/L 就会对菌体生长及酒精发酵产生抑制作用。研究表明维持相对较高的发酵 pH 值将会减轻醋酸的抑制作用,这与本文

的研究结果是一致的^[10-11]。另外从图 2 也可以看到,在 pH 值 5.5、6.0 和 6.5 时,发酵 4 h 左右都有明显的滞后期存在。

2.4 脱毒后玉米秸秆水解液中抑制剂变化

饱和生石灰法是常用的一种脱毒方法,脱毒后玉米秸秆水解液中化合物的含量会发生明显变化,结果如表 3 所示。从表中可见,经过饱和生石灰法脱毒后,有效去除了醛类物质,糠醛减少了 38.8%,5-HMF 减少了 45.9%,两者共减少了 40%。但是经过脱毒处理后,葡萄糖和木糖也有相应的损失,此结果与 Mújgan 的研究结果很相似^[12]。

表 2 饱和生石灰法脱毒对抑制剂的影响

Tab. 2 Influence of overliming on composition of hydrolysate

化合物	最初质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	变化量/%
醋酸	5.535	0
糠醛	1.363	38.8
5-HMF	0.266	45.9
糠醛 + 5-HMF		40.0

2.5 pH 值调整与饱和生石灰法相结合对酒精发酵的影响

根据 2.3 节结果,将水解液采用饱和生石灰法脱毒处理,预水解后将 pH 值重新调到 5.5。发酵结果如表 3 和图 3 所示。经过脱毒处理后酒精质量浓度达到了 10.96 g/L。另外由于糠醛浓度的降低,几乎见不到菌体生长的滞后期,与 pH 值 4.8 时酒精相比,酒精得率几乎增加了 6 倍。

表 3 采用活性干酵母酒精发酵试验结果

Tab. 3 Results of ethanol fermentation by baker's yeast

序号	pH 值	最终酒精质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	酒精得率/%	酒精生产效率/ $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$
1	4.8	0.31	9.48	0.002
2	5.5	10.67	56.4	0.075
3	5.5(脱毒)	10.96	57.9	0.077

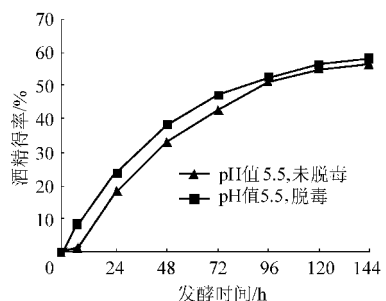


图3 脱毒前后酒精得率曲线

Fig. 3 Effect of ethanol production during fermentation process before and after detoxification

3 结束语

采用水热处理后的固体与水解液进行酒精发酵,当加入100%水解液时,由于抑制作用,酒精质量浓度仅为0.31 g/L,理论酒精得率为9.48%。预水解后将pH值从4.8分别调整到5.5、6.0和6.5后,酒精得率都有了明显提高。当pH值为5.5时,酒精质量浓度为10.67 g/L。经过饱和生石灰法脱毒处理后,重新调整pH值为5.5时,酒精质量浓度达到了10.96 g/L,酒精得率达到57.9%,与pH值

在4.8时相比,酒精得率几乎增加了6倍。

脱毒处理只是去除了部分抑制剂,所以酒精得率仍有较大的提升空间。生物质原料预处理过程产生的抑制作用是非常复杂的,并不是某种产物单独作用的结果,而是多种产物共同作用的结果,除了抑制剂各自的抑制作用外,相互间的协同作用也强化了抑制效果。所以抗抑制剂菌种的筛选、发酵工艺的研究以及对抑制机理的探究等将是未来研究工作的重点。

参 考 文 献

- 1 Frank K, Agbogbo, Kevin S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(11):723~727.
- 2 Ferrari M D, Neirotti E, Albornoz C, et al. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40(7):753~759.
- 3 Parisi F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates [J] // Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 1989, 38:53~87.
- 4 Hedrgaard M, Anders Thygesen, Thomsen A B. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 83(3):447~455.
- 5 Klinke H B, Thomsen A B, Ahring B K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 66(1):10~26.
- 6 Olsson L, Hahn-Hägerdal B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 1993, 28(4):249~257.
- 7 Martinez A, Rodriguez M E, York S W, et al. Effects of Ca(OH)₂ treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(5):526~536.
- 8 Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition [J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1):25~33.
- 9 Roberto I C, Laci S, Barbosa M F S, et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol [J]. Process Biochemistry, 1991, 26(1):15~21.
- 10 Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(3~4):151~159.
- 11 Palmqvist E, Meinander Q, Grage H, et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63(1):46~55.
- 12 Mujgan Telli-Okur, Nurdan Eken-Sarac. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(7):2162~2169.