

混合酶及汽爆法提高秸秆发酵酒精的产量

孙智谋

(吉林省轻工业设计研究院, 联合国援华玉米深加工研究中心, 吉林 长春 130021)

摘要: 采用蒸汽爆破处理后秸秆的酶解液进行酒精发酵的实验。秸秆含有水溶性物质、甲醇可溶性的木质素、克拉松木素、纤维素和其他一些小分子物质。蒸汽处理有利于除去秸秆中的木质素, 从而使秸秆易于被酶水解和进行酒精发酵。在压力为 3.5 MPa 条件下, 采用蒸汽处理秸秆 2 min, 再经绿色木霉纤维素酶水解后, 秸秆中的多糖(纤维素, 半纤维素)几乎完全被水解为单糖(葡萄糖, 木糖)。在带有渗透蒸发系统的膜生物反应器中乙醇的浓度能达到 50 g/L, 这是发酵液中乙醇浓度的 5 倍。能量的效率即燃烧的乙醇与产生的能量(用来产生蒸汽之比)在 3.5 MPa, 2 min 条件下达到最大。

关键词: 燃料乙醇; 秸秆原料; 蒸汽爆破; 酶法糖化; 渗透蒸发

中图分类号: TS262.2; Q814; TS261.2 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)05-0075-04

Mixed Enzyme and Steam Blasting Method to Improve the Output of Stalk Alcohol Fermentation

SUN Zhi-mou

(Jilin Light Industry Design & Research Institute, UN China Aid Corn Deep Processing Research Center, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: Stalk enzymolysis solution treated by steam blasting was used for alcohol fermentation experiment. Stalk contained water-solubility substances, methanol soluble lignose, pine lignose, cellulose and other some micromolecule compounds. Steam blasting treatment could remove lignose from stalk and make stalk more easier for enzymolysis and alcohol fermentation. Under 3.5 MPa pressure, stalk treated by steam for 2 min, then underwent Meicelase enzymolysis, the amylose (cellulose and hemicellulose) in stalk almost hydrolyzed into monose (glucose and xylose). Alcohol concentration in membrane bioreactor equipped with infiltration and evaporation system could reach 50 g/L, 5 times of alcohol concentration in fermenting solution. Energy efficiency (energy produced by alcohol burn) reached the highest value under 3.5 MPa pressure and 2 min steam treatment. (Tran. by YUE Yang)

Key words: fuel alcohol; stalk; steam blasting; saccharification by enzymolysis; infiltration and evaporation

生物质能源曾经是人类历史上的主要能源。我国 8.6 亿的农村人口中仍有 60% 的农村居民靠柴草生活。每年各类农作物秸秆总产量约 7 亿吨,除了少部分被利用外,大部分以堆积、荒烧等形式直接倾入环境,造成极大污染和浪费^[1]。但这种直接燃烧的方法获取的热效率很低,只有 10%。如果将生物质气化成气体或液体燃料(如酒精、氢气、柴油等)热效率可达 30% 以上。

近年来,能源的消耗所带来的问题使得开发可再生的能源物质变得非常重要,农业废料如秸秆、甘蔗、高粱中的多糖(纤维素,半纤维素)可作为产生能源的天然有机资源。然而,由于植物细胞中这些多糖被细胞壁中的木质素网状结构所包围,这些多糖很难通过直接的生物技术转化为燃料物质,如酒精、甲烷等。有几种不同的物理、化学和生物学预处理方法被用来破坏或除去生物原料中的木质素^[2]。近来,蒸汽爆破方法(即利用高温高压蒸汽进行水解,然后通过突然减小压力的方法对水解产物进行机械处理)作为一个有效的降解植物材料中木质素的预处理方法,引起了人们的关注^[3]。

通过对国外先进经验的大量研究^[4-7],我们采用一种混合酶对蒸汽爆破处理后的秸秆产生的单糖进行酶解来发酵生产酒精。利用简单的工艺从秸秆中分离并测定了其中的各种成分,如水溶性

物质、甲醇可溶性的木质素、克拉松木素、纤维素和其他一些小分子物质。

然后,通过毕赤酵母(*Pichia stipitis*)这一酵母能够利用葡萄糖和木糖)利用含有葡萄糖和木糖的酶水解液在不同的空气流速下来生产酒精。在实验规模上利用含高浓度葡萄糖和木糖的酶解液进行酒精发酵能提高酒精的浓度。此外,渗透蒸发系统(它能够优先除去发酵液中的酒精)也可以被用来提高酒精的浓度,因为这一系统能减小酒精细胞生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 样品

本实验中样品是从普通稻田里获得的稻草(用剪刀剪成 10 cm 长的小段)作为农业废料的样品。

1.2 进行蒸汽爆破的设备

蒸汽爆破的设备包括一个蒸汽发生器、一个恒压反应器、一个接收器和一个冷凝器(带有消音措施)^[8]。反应器罐体是绝缘的,以便使温度保持恒定。反应器的容量为 1.2 L,最大压力为 6 MPa,最高温度为 275 °C。把大约 100 g 的秸秆放入反应器中,然后利用蒸汽对秸秆进行加热,加热后把反应器底部的球阀打开,使反应器的

收稿日期: 2003-12-22; 修回日期: 2004-05-10

作者简介: 孙智谋(1965-),男,吉林人,本科,高工,曾在美国普度大学再生资源研究室进修,主要从事秸秆类生物资源的开发与利用,曾参加国家十五攻关玉米及淀粉深加工利用的课题,发表论文数篇。

压力迅速降低到大气压水平。固体及液体产物被收集到收集器底部的旋风分离器,气体产物通过收集器顶部进入冷凝器。

1.3 蒸汽爆破后稻秆的可提取成分

为了测定蒸汽爆破后稻秆中各种成分的含量。我们在 0.3 L 蒸馏水中加入 5 g 干基稻秆,在室温下浸泡 12 h^[9]。液体与固体通过过滤分离,并从液体中回收水溶性物质,然后浓缩,干燥,称重。用 0.1 L 甲醇在 Soxhlet 提取器中对固体残渣抽提 12 h,以便使甲醇可溶性木质素溶解。对甲醇可溶性木质素浓缩干燥后称重。甲醇提取后的残渣包含克拉松木素和纤维素及小分子物质。在 0.015 L 72%(w/w)的硫酸溶液中加入 1 g 以上残渣,并在室温下放置 4 h。

把残渣放入 1 L 锥形烧瓶中,用 0.56 L 的蒸馏水洗涤后煮沸 4 h(冷却回流)。当不溶物沉淀后,过滤除去液体。固体物质用热水冲洗,并在 105℃干燥至恒重后称量。这些物质就是克拉松木素。纤维素和低分子量物质混合物的重量通过计算(1 g 残渣减去其中的克拉松木素重量)获得。

1.4 酶法糖化

汽爆后稻秆的酶法糖化在含有 20 g/L 的干基稻秆,2 g/L 纤维素酶(1 g/L Acucelase 和 1 g/L Meicelase),0.1 L 0.5 M 的醋酸缓冲液(pH5.0)的体积为 0.3 L 的锥形瓶中进行,这两种酶混合作为本实验的纤维素酶。

1.5 酒精发酵

利用毕赤酵母(*Pichia stipitis* CBS5773)对汽爆后稻秆的酶水解液在包含 5 g/L 酵母膏,10 g/L 蛋白胨的培养基中,pH 5.0,温度 30℃,不同的通气速率条件下进行发酵。利用一个膜生物反应器来进行酶液的高效酒精发酵,这一生物反应器包含 3 L 的发酵罐(工作体积 1 L)和一个渗透蒸发系统(用来进行渗透蒸发)。其中一个带有微孔的疏水性的聚四氟乙烯膜被用来进行渗透蒸发,膜的厚度、孔径、面积和开孔率分别为 80 μm,0.2 μm,50 cm²,78%。

1.6 分析测量

培养液的光密度用来指示细胞的生长状况,并利用 UV-120-02 分光光度计在波长 660 nm 处测定。细胞干重由培养液光密度来计算。葡萄糖浓度用变旋酶 GOD 方法测定。木糖浓度用高压液相色谱仪测定。还原糖浓度用 Somogyi-Nelson 方法测定^[10]。乙醇用气相色谱法测定。

2 结果与讨论

2.1 稻秆的汽爆

稻秆中水溶性物质、甲醇可溶性木质素、克拉松木素以及纤维素和低分子量物质混合物的干重得率(相对于稻秆干重)分别为 0.05,0.01,0.23,0.71,并且随蒸汽压力和蒸汽处理的时间发生较大的变化。不同压力条件下稻秆汽爆后的干重得率见表 1。

从表 1 可知,在蒸汽压力为 3.0 MPa 下,纤维素和低分子量的物质含量随着蒸汽处理的时间增加而迅速降低,在 3 min 时达到最小值 0.45,之后不随蒸汽处理时间变化而保持恒定。在压力为 3.5 MPa 时,纤维素和低分子量的物质含量随蒸汽处理时间的变化情况与 3.0 MPa 时相似,甲醇可溶性木质素(一种低分子量的木质素)的含量随着蒸汽处理时间增加而逐渐增加,在 5 min 后稍微降低。

克拉松木素(一种高分子量的木质素)的含量随

着蒸汽处理时间的增加而逐渐减小,在 3 min 时达到最小值,之后又逐渐变大。3 min 后克拉松木素含量增加的原因是由于它与水溶性物质发生了缩合反应。在蒸汽压力为 3.5 MPa 时,甲醇可溶性木质素随着蒸汽处理时间的增加而增加,在 2 min 时达到最大,之后又开始减小。克拉松木素的含量在 0.5~2 min 突然减少,之后又很快增加。在不同蒸汽压力下蒸汽处理时间超过 5 min 后克拉松木素增加以及甲醇可溶性木质素减少的原因,被认为是克拉松木素不仅与水溶性物质而且与甲醇可溶性木质素发生缩合反应。在蒸汽压力为 4 MPa 时,每种成分含量的变化情况与 3.5 MPa 时基本一致。由此可见,蒸汽压力为 3.5 MPa,处理时间为 2 min 是稻秆中多糖(纤维素,半纤维素)酶法糖化的最佳预处理条件,这是因为在此条件下多糖的克拉松木素的含量达到最小。

2.2 汽爆后稻秆的酶法糖化

一般来说,混合酶有不同的水解作用,其水解作用比单一酶的水解作用要好,比如混合酶的协同增效作用。Meicelase 和 Acucelase 是两种纤维素酶,他们和纤维素的反应不同。Meicelase 来源于绿色木霉(*Trichoderma viride*),主要有内切酶组成,它能够从纤维素链的内部随机切下纤维二糖。我们尝试利用混合酶(如 Meicelase 和 Acucelase)对爆破稻秆进行酶法糖化,是因为这样能高效地把稻秆转化为糖类。还原性糖(葡萄糖,木糖)的浓度随着水解时间的增加而增加,水解时间为 70 h 时到达最大(图 1)。

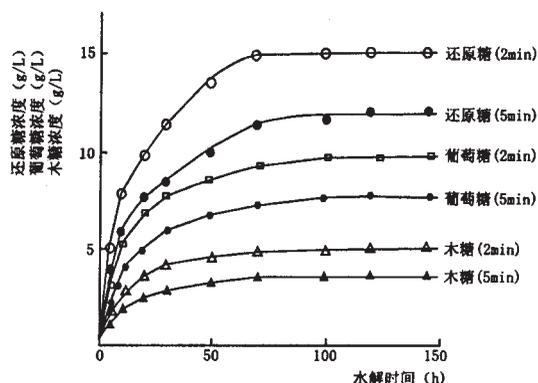


图 1 蒸汽压力 3.5 MPa,汽爆时间分别为 2 min,5 min 时,20 g/L 汽爆水稻秸秆酶解糖化示意图

在蒸汽压力为 3.5 MPa,蒸汽处理时间为 2 min 的预处理条件

表 1 不同压力条件下稻秆汽爆后的干重得率

蒸汽压 (MPa)	蒸煮时间 (min)	水溶性物质	甲醇可溶性木质素	克拉松木素	纤维素和低分子量物质混合物
未处理		0.05	0.01	0.23	0.71
3.0	0.5	0.15	0.07	0.20	0.58
3.0	1	0.21	0.11	0.17	0.51
3.0	2	0.25	0.15	0.13	0.47
3.0	3	0.25	0.18	0.12	0.45
3.0	5	0.19	0.20	0.16	0.45
3.5	0.5	0.21	0.11	0.17	0.51
3.5	1	0.28	0.16	0.09	0.47
3.5	2	0.30	0.20	0.05	0.45
3.5	3	0.24	0.19	0.12	0.45
3.5	5	0.16	0.15	0.25	0.44
4.0	0.5	0.22	0.15	0.17	0.46
4.0	1	0.24	0.16	0.17	0.43
4.0	2	0.20	0.13	0.22	0.45
4.0	3	0.18	0.12	0.25	0.45
4.0	5	0.14	0.12	0.29	0.45

下,汽爆后稻秆糖化液中还原糖(葡萄糖、木糖)的最大浓度要高于3.5 MPa,5 min的预处理条件下的浓度;他们的值分别为15 g/L,10 g/L,5 g/L。在压力为3.5 MPa,处理时间为2 min条件下,葡萄糖和木糖总的干重与汽爆后稻秆干重的比率为75%。这表明几乎所有的多糖被转化为单糖。而且,在稻秆的酶解液中葡萄糖和木糖都有,其比率为2:1,这是因为在稻秆中纤维素(含葡萄糖残基)和半纤维素(含木糖残基)的比率为2:1^[11]。

2.3 汽爆后稻秆酶解液的酒精发酵

从汽爆后稻秆酶解液(包含固体和液体)开始转化为酒精开始,加强对生物反应器中固液两相混合对高效的生产酒精非常重要。因此,我们用含有较低糖浓度的酶解液(10 g/L葡萄糖,5 g/L木糖)进行了酒精发酵实验,因为较低糖浓度的酶解液有利于生物反应器内固液两相的混合而且不会因酒精的产生而抑制细胞生长。

图2显示了利用经3.5 MPa蒸汽压力、蒸汽处理2 min的稻秆置备的酶解液,在通气速率为0 vvm和0.5 vvm条件下通过毕赤酵母(*P. stipitis*)生产酒精的情况。利用毕赤酵母进行酒精发酵时,不仅葡萄糖转化为酒精,而且木糖也转化为酒精。发酵开始时,细胞利用葡萄糖来生长繁殖,而不利用木糖,然后经过一段延迟期后,开始利用木糖生长繁殖。细胞可能在延迟期内合成降解木糖的诱导酶,这是典型的二次生长现象。酒精随着细胞的生长而产生,在此过程中,酒精产生的过程的趋势与细胞生长相似,通气速率为0.5 vvm时酒精的产量比通气速率为0 vvm时高1.5倍。结果表明,毕赤酵母(*P. stipitis*)是利用汽爆后稻秆酶解液发酵生产酒精的高效酵母,酒精的产量随着通气速率的变化而变化。

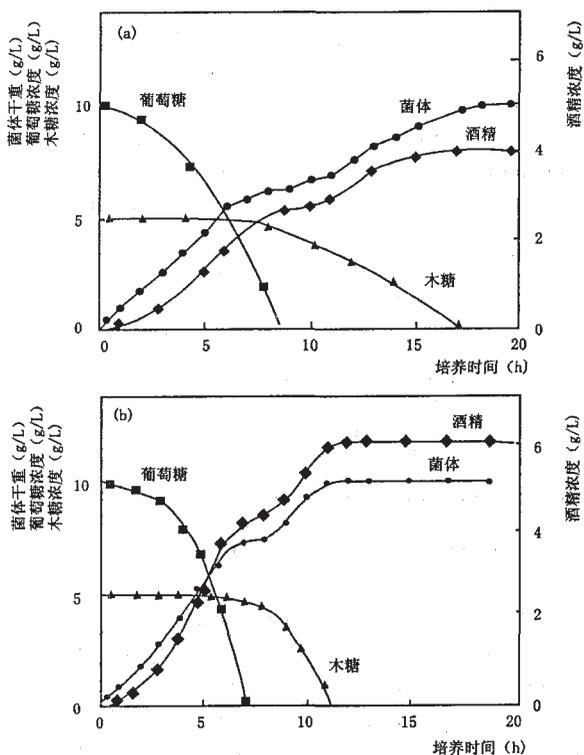


图2 蒸汽压力为3.5 MPa,汽爆时间2 min,空气流量分别为0 vvm和0.5 vvm时,20 g/L水稻秆酶解产物发酵示意图

图3显示了在利用包含10 g/L葡萄糖和5 g/L木糖的样品,在不同通气速率,发酵时间为15 h的条件下,进行酒精发酵时所

获得的酒精的产量。酒精浓度随着通气速率的增加而增加,在通气速率为0.2 vvm时达到最大值6.5 g/L。在通气速率为0.2 vvm时,酒精的理论得率(相对于糖)为86%(w/w)。

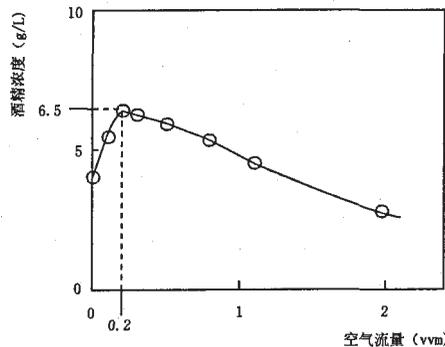


图3 空气流量对汽爆水稻秆水解所产生酒精产量的影响(蒸汽压力3.5 MPa,汽爆时间为2 min)

可见,对于酒精发酵通气速率是一个重要的因素,因为随着氧气的增加,细胞将利用葡萄糖优先进行生长而不是用来产生酒精,同时,木糖转化为酒精需要木糖还原酶和木糖脱氢酶,而这两种酶的活性受氧气量的影响很大^[12]。此外,对于细胞呼吸来说,氧是必需的,在呼吸过程中,糖被氧化生成二氧化碳和水,同时放出能量,而且固醇的生物合成也需要氧气。以上结果表明,为了最有效的把汽爆后稻秆酶解液转化为酒精,必须保持溶氧速率为0.2 mg/kg。

利用含有高浓度糖(100 g/L葡萄糖,50 g/L木糖)的由大量汽爆后稻秆获得的酶解液,用毕赤酵母,在通气速率为0.2 vvm条件下进行了酒精发酵实验。在酶解液的酒精发酵实验中,葡萄糖浓度从100 g/L降到15 g/L;但是酒精的浓度仅仅是22 g/L;仍有剩余的葡萄糖(15 g/L)没有被消耗,这是由于酒精的抑制作用。此外,由于酒精对木糖发酵的抑制,在发酵过程中当酒精浓度超过20 g/L时,木糖就不能被利用。如果通过膜除去酒精的话,葡萄糖和木糖将被细胞利用,而且将会使酒精生产效率更高。图4显示了在含有发酵罐和渗透蒸发系统的生物反应器中,利用含高浓度糖的样品进行酒精发酵的结果,其中渗透蒸发系统利用一个带有微孔的疏水性的聚四氟乙烯膜来进行工作,它能使乙醇优先通过膜^[13]。

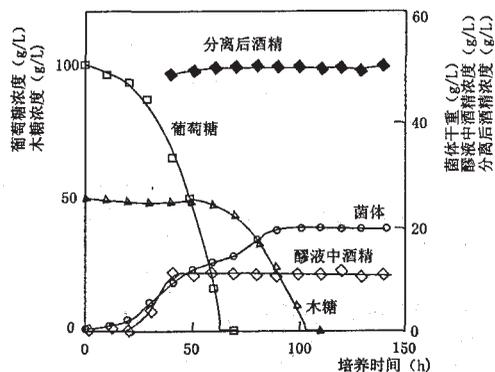


图4 大量汽爆水稻秆(例如200 g/L)水解产物的发酵(采用具有蒸发装置的膜生物反应器,蒸发压力为3.5 MPa,汽爆时间为2 min)

酒精的浓度保持在较低水平(10 g/L),从而酒精的抑制作用可以忽略,因此葡萄糖和木糖都能被细胞利用来转化为酒精。实验表明:在发酵100 h后干细胞重达到最大,这时分离的酒精浓度大约为50 g/L(图4)。由于渗透蒸发作用降低了酒精的抑制作用,

从而使酒精的浓度比没有渗透蒸发系统的要高,可见对于利用大量的汽爆后稻秆大量生产酒精,本实验用的这种生物反应器是一个理想的反应器。

图5显示了利用由100g汽爆后稻秆得到的酶解液进行酒精发酵时,稻秆蒸汽预处理的时间对酒精产量的影响,同时显示了蒸汽爆破所需能量,以及在3.5MPa条件下的能效(产生的蒸汽能量和燃烧掉的酒精的比率)。酒精的产量随着蒸汽处理时间的增加而增加,2min时到达最大33g,之后逐渐减少。利用已报道的方法^[14],对在3.5MPa下,蒸汽爆破的能量进行计算,它随着蒸汽处理时间的增加而增加,当蒸汽处理时间为10min时,它达到250kJ。能效随着蒸汽处理时间增加而增加,最大为11,之后突然迅速降低,实验表明最有效的操作条件(利用较少的能量消耗获得较大产量的乙醇)是蒸汽压为3.5MPa,蒸汽处理时间为2min。

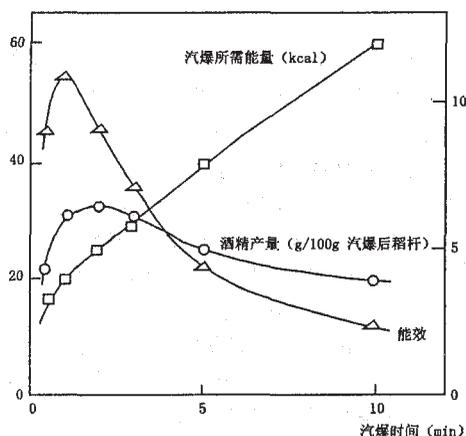


图5 蒸汽压3.5MPa,100g汽爆水稻秸秆水解物发酵后酒精产量,汽爆所需能量以及能效(即酒精燃烧与汽爆所需热能的比值)

3 结论

汽爆后稻秆的酶法糖化和发酵用来使稻草中的多糖转化为单糖和酒精。在3.5MPa,处理时间2min条件下,蒸汽爆破能加强稻秆的去木质作用,从而使稻秆更容易被纤维素酶作用。理论上1t葡萄糖可生产539kg的酒精(根据180份C₆H₁₀O₆在酶的作用下生成88份CO₂和92份C₂H₅OH),而汽爆后稻秆能被混合酶(Meicelase和Acucelase)快速有效的水解为糖,然后通过毕赤酵母(P. stipitis)转化为酒精,其酒精的产率较高,达到86%(w/w)。此外带有渗透蒸发系统的生物反应器能大大提高酒精浓度(50g/L)。而且,最有效的蒸汽爆破条件(使酒精产能最大化,而使热的需要量最小)是3.5MPa,2min。

参考文献:

- [1] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:轻工业出版社,2002.
- [2] Nakamura Y, Sawada T, Sungusia MG. Lignin peroxidase production by phanerochaete chrysosporium immobilized on polyurethane foam[J] J Chem Eng Jpn,1997,30:1-6.
- [3] Sawada T, Nakamura Y, Kobayashi F, Kuwahara M and Watanabe T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass[J] Biotechnol Bioeng, 1995,48:719-724.
- [4] Delgens JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulosic degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitidis and Candida shehatae[J] Enzyme Microb Technol,1996,19:220-225.
- [5] McMillan JD. Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol[M] In:Himmel ME, Baker JO, Overend RP, editors. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. 1994.
- [6] Palmqvist E, Hahn-Hagerdai B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I:Inhibition and detoxification[J] Bioes Technol, 2000,74:17-24.
- [7] Saddlers, JN, Ramos LP, Breiul C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In:Saddler JN editor. Bioconversion of forest and agricultural plant residues[M] Wallingford,UK:CAB International,1993.
- [8] Sawada T, Nakamura Y, Kuwahara M and Suda H. Effect of a process of explosion for the effective utilization of biomass[J] International Chem Eng,1987,27:686-693.
- [9] Chua MGS and Wayman M. Characterization of autohydrolysis aspen lignins part I[J] Can j Chem,1989,57:1141-1149.
- [10] Somogyi M. Notes on Sugar determination[J] J Bio Chem,1982,195:19-23.
- [11] Hayashi H, Arai M. Enzymatic hydrolysis of cellulosic mixture of Aspergillus aculestus and Trichoderma viride, and ethanol production from the hydrolyzate[J] Hakkokogaku,1983,61:413-420.
- [12] Ferrai MD, Neirotti E, Alborno C and Saucedo E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolyzate by Pichia stipiti[J] Biotechnol Bioeng,1992,40:753-759.
- [13] Saito F, Nakao S, Asakura T, Toda K. Continuous ethanol extraction by pervaporation from a membrane bioreactor[J] Nittogihō,1989,27:15-23.
- [14] Sawada T and Nakamura Y. Low energy steam explosion treatment of plant biomass[J] J Chem Technol Biotechnol,2001,76:139-146.

第二届全国核心期刊与期刊国际化、网络化研讨会在合肥召开



研讨会全场

本刊讯 2004年6月21~25日,由中国科技期刊编辑学会和万方数据股份有限公司共同举办的第二届全国核心期刊与期刊国际化、网络化研讨会在合肥召开。来自全国各地300多个单位,400多名代表参加了这次会议。与会代表就如何加强科技期刊深化改革、实现期刊网络化由简单“拷贝”向电子互动化发展、推进科技期刊的国际化发展进程及其核心竞争力的提升等重要问题进行了交流与研讨。

现在,传统期刊已开始走向由传统印刷版形态辐射到网络形态的多媒体形态并行发展的道路。传统期刊一旦与网络期刊有机结合,即可充分发挥与网络的互动优势,真正把读者、广告客户作为服务对象,通过整合内容、跨媒体的一体化服务,成为更具竞争力的媒体。(陶然)