

# 玉米秸秆分批补料获得高还原糖浓度酶解液的条件优化

宋安东<sup>1</sup>, 任天宝<sup>2</sup>, 张玲玲<sup>1</sup>, 王风芹<sup>1</sup>, 谢慧<sup>1</sup>

1 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

2 河南科技学院, 新乡 453003

**摘要:** 木质纤维素高浓度还原糖水解液的获得是纤维乙醇产业化发展的方向。在发酵工业领域, 分批补料法是实现这一目标的重要研究途径。本研究采用分批补料法对获得高浓度玉米秸秆酶解还原糖的条件进行了优化。以稀硫酸预处理的玉米秸秆为原料, 考察了液固比、补加量与补加时间对分批补料糖化的影响。结果表明, 秸秆高浓度酶解液条件的初始物料为 20% (重量/体积), 木聚糖酶 220 U/g (底物), 纤维素酶 6 FPU/g (底物), 果胶酶 50 U/g (底物), 在 24 h、48 h 后分批补加 8% 预处理后的物料, 同时添加与补料量相应的木聚糖酶 20 U/g (底物), 纤维素酶 2 FPU/g (底物), 72 h 后, 最终糖化结果与非补料法相比, 还原糖浓度从 48.5 g/L 提高到 138.5 g/L, 原料的酶解率最终达到理论值的 62.5%。试验结果表明补料法可以显著提高秸秆水解液还原糖浓度。

**关键词:** 玉米秸秆, 预处理, 补料, 糖化

## Optimization of corn stover hydrolysis by fed-batch process

Andong Song<sup>1</sup>, Tianbao Ren<sup>2</sup>, Lingling Zhang<sup>1</sup>, Fengqin Wang<sup>1</sup>, and Hui Xie<sup>1</sup>

1 College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** High-concentration sugars production from stover is an important perspective technology for the cellulosic ethanol industrialization. Fed-batch process is an effective way to achieve this goal in the fermentation industry. In this study, based on fed-batch process, high-concentration sugars were produced from pretreated corn stover by enzymatic hydrolysis. After being pretreated by the dilute sulphuric acid, the impacts of the ratio of solid raw material to liquid culture, the content of supplementary materials and the refilling time on the saccharification rate were investigated. Results showed that the initial ratio of solid raw material to liquid culture was 20% (W/V) and the initial concentrations of enzymes for xylanase, cellulase and pectinase were 220 U, 6 FPU, and 50 U per gram of substrates, respectively. After 24 hours and 48 hours, 8% pretreated corn stovers were added respectively together with the additions of xylanase (20 U) and cellulase (2 FPU) per gram of substrates. After 72 hours, the final concentration of reducing sugar was increased to 138.5 g/L from 48.5 g/L of the non fed-batch process. The rate of enzyme hydrolysis of the raw material was 62.5% of the theoretical value in the fed-batch process. This study demonstrated that the fed-batch

**Received:** November 25, 2010; **Accepted:** February 21, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 70741032), Transformation Fund for Agricultural Science and Technology Achievements (No. 2006G B2D000173).

**Corresponding author:** Andong Song. Tel/Fax: +86-371-63555810; E-mail: song1666@126.com

国家自然科学基金 (No. 70741032), 国家农业科技成果转化项目 (No. 2006G B2D000173) 资助。

process could significantly improve the concentration of reducing sugar.

**Keywords:** corn stover, pretreatment, fed-batch process, enzymatic hydrolysis

现代生物质能借助热化学、生物化学等手段,通过一系列先进的转换技术,生产出固、液、气等高品质能源来代替化石燃料,为人类生产、生活提供电力、交通燃料、热能、燃气等终端能源<sup>[1-2]</sup>。木质纤维素的高效水解是实现其转化为生物燃料和生物制品关键技术之一,如生物乙醇、生物丁醇、生物制氢等都是建立在木质纤维素高浓度水解糖平台基础之上<sup>[3]</sup>。因此,开展高效的木质纤维素糖化技术研究是实现高值化利用的重要途径<sup>[4]</sup>。

在纤维乙醇研究领域,纤维素原料高浓度还原糖水解液的获得有利于提高后期乙醇高浓度发酵并降低乙醇蒸馏的能耗和经济成本。由于木质纤维素原料质地疏松、能量密度小、浸水性差等特点,致使一次性加料固形物浓度较低,水解还原糖浓度处于较低水平。Rudolf 等认为分批补料法可以提高水解液糖浓度,是一种解决乙醇发酵浓度较低有效的途径之一<sup>[5]</sup>。目前,基于木质纤维素酶水解机理模型,围绕木质纤维素高浓度水解液的技术体系优化,降低或消除水解过程中产物反馈抑制效应已经成为研究的重点之一<sup>[6]</sup>。Pristavka 等研究了在非连续搅拌反应器中,21%的秸秆固形物,纤维素添加量 42 FPU/g 秸秆,还原总糖浓度达到 160 g/L<sup>[7]</sup>。赵晶等采用分批补料酶解工艺,使底物最终质量浓度达到 200 g/L,纤维素酶 20 FPU/g (底物) 和纤维二糖酶 6.5 CBU/g (底物) 酶解 60 h 后还原糖浓度达到 116.3 g/L,酶解得率达到 80.1%<sup>[8]</sup>。虽然纤维素高浓度水解技术并取得了一定进展,但仍然存在两个较为突出的问题:一是纤维素酶用量大,酶的添加量通常为 20~45 FPU/g 原料;二是还原糖浓度较低,通常在 100 g/L 以下,且糖化时间较长,这些不利因素制约纤维乙醇产业化发展进程。

本研究针对纤维素高浓度水解过程中酶加载量较高和糖化周期较长等问题,以稀硫酸预处理的玉

米秸秆为原料,采用分批补料糖化的方法,对影响纤维素高浓度水解液的条件进行优化,有利于构建木质纤维素的高浓度水解技术体系。该补料糖化方法的建立,为以后纤维液体燃料工业化生产中补料控制提供了有益的启示和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

玉米秸秆:取自河南农业大学北郊科教试验园区,粉碎 100~200 目,水分含量 12%,经测定原料及其预处理后的主要成分含量如表 1 所示。

表 1 试验用玉米秸秆的主要成分 (% , 干基)

Table1 Main components of corn stover (% , dry basis)

Components	Content	
	Corn stover	Pretreated corn stover
Cellulose	36.3	41.6
Hemicellulose	25.3	18.5
Lignin	18.5	20.7

#### 1.1.2 所用酶类

纤维素酶:购自无锡杰能科生物工程有限公司,滤纸酶活 180 FPU/mL。

木聚糖酶:购自无锡杰能科生物工程有限公司,CMC 酶活  $4.5 \times 10^4$  U/mL。

果胶酶:购自宁夏和氏璧生物技术有限公司,酶活  $5.0 \times 10^5$  U/g。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 稀酸预处理及糖化

每次准确称取玉米秸秆原料 10 g 放于 300 mL 三角瓶中,平行 3 次,用 1% 稀硫酸溶液浸润,初始固形物含量为 20% (W/V),121 °C 处理 60 min 后,冷却至室温,在 pH 4.8 醋酸-醋酸钠缓冲液进行酶解。原料酶添加量为:木聚糖酶 220 U/g,纤维

素酶 6 FPU/g, 果胶酶 50 U/g, 温度 45 °C, 转速为 120 r/min, 每隔 24 h 测定还原糖浓度。

### 1.2.2 补料糖化

补料原料: 玉米秸秆原料经 1% 稀硫酸, 固形物含量为 20%, 121 °C 处理 60 min 后, 冷却至室温, 抽滤, 105 °C 烘干备用。

补料糖化: 从一次性加料糖化实验中得到的最佳条件作为补料糖化过程的最初含量, 每隔 24 h 对原料进行补料, 补料前测定还原糖浓度。

补酶量: 每克补加原料酶添加量为木聚糖酶 20 U/g, 纤维素酶 2 FPU/g。

### 1.3 分析方法

纤维素酶酶活测定: 采用 QB 2583-2003 测定。

木聚糖酶酶活测定: 采用 GB 23874-2009 测定。

果胶酶酶活测定: 采用 QB1502-92 测定。

纤维素、半纤维素、木素的测定: 采用范氏 (Van Soest) 纤维测定法。

总还原糖浓度测定: 采用 DNS 法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 液固比对分批补料糖化的影响

纤维素酶降解发生在固、液相界面较为复杂的过程, 影响这个动态过程的因素有很多, 一方面与纤维素自身的结晶区类型、聚合度、分子质量有关; 另一方面与水解液的理化性质及酶作用表面结构的吸附与解析等密切相关。首先考察了液固比对补料糖化的影响, 从图 1 可以看出, 当液固比为 5, 即固形物含量为 20% (W/V) 时, 间隔 24 h 进行分批补料, 48 h 和 72 h 时还原糖浓度分别为 108.7 g/L 和 117.6 g/L, 比对照相应增加了 20.8 g/L 和 23.0 g/L, 表明随着分批补料的添入, 还原总糖的浓度显著增加, 但还原总糖增幅减少。

从图 2 可以看出, 当液固比为 6, 48 h 和 72 h 时还原糖浓度分别为 89.8 g/L 和 106.2 g/L, 比对照相应增加了 3.6 g/L 和 13.2 g/L。图 1 和图 2 结果表明通过分批补料的方法可以获得较高浓度的还原总

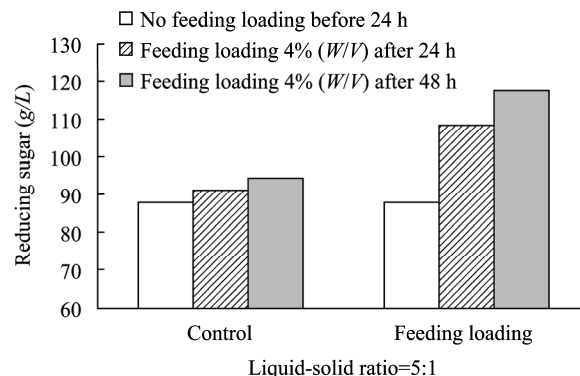


图 1 液固比为 5 对补料糖化的影响

Fig. 1 Effects of liquid to solid ratio of 5 on the release of reducing sugar.

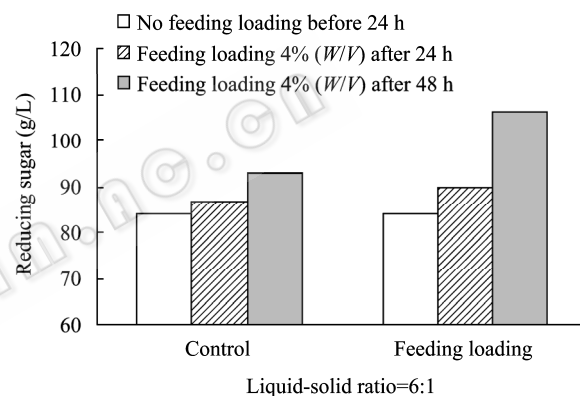


图 2 液固比为 6 补料糖化的结果

Fig. 2 Effects of liquid to solid ratio of 6 on the release of reducing sugar.

糖, 表明分批补料可以提高促进水解液中游离态的酶吸附与底物的降解, 从而提高糖化体系中酶的利用效率, 降低酶的相对使用量。

### 2.2 不同补料量对糖化的影响

在进行液固比对分批补料糖化影响的基础上, 研究了分批补料料量对糖化体系的影响。如图 3 所示, 一次补料糖化结束后, 补料 4% (W/V)、6% (W/V) 和 8% (W/V) 还原糖与对照相比分别增加了 15.5 g/L、26.1 g/L 和 44.7 g/L; 表明随着一次分批补料量的增加, 还原总糖的增幅相对增加; 二次补料糖化结束时, 补料 4% (W/V)、6% (W/V) 和 8% (W/V) 还原糖与对照相比分别增加了 34.6 g/L、46.7 g/L 和 58.0 g/L, 但在这一补料糖化阶段, 补料 6% (W/V) 与 8% (W/V) 相比, 增量分别为 21.5 g/L

和 13.6 g/L, 表明随着二次分批补料量的增加, 还原总糖的增幅相对减少, 这与水解液体系中增加木质素含量浓度相对增加有关, 以致影响固、液相界面游离态酶的可及性, 这与 Zhao 等和 Mosier 等对纤维质高浓度糖化水解的研究结果相一致, 随着酶解糖化的持续进行, 不易降解的底物如木质素, 部分结晶度较高的 (半) 纤维素可能阻碍酶的吸附和解吸效率<sup>[8-9]</sup>。

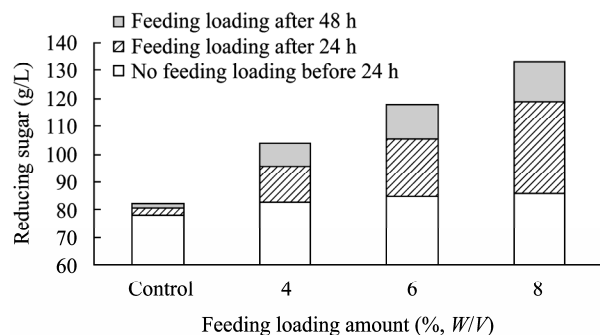


图 3 不同补料量对糖化的影响

Fig. 3 Effects of feeding loading (W/V) on the release of reducing sugar.

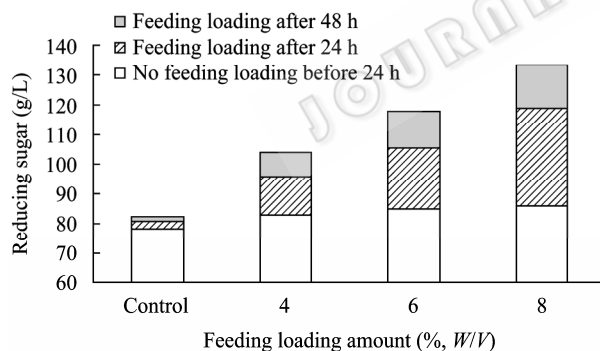


图 4 不同补料量与补酶对糖化的影响

Fig. 4 Effects of feeding loading (W/V) and enzymes on the release of reducing sugar.

### 2.3 分批补料与补酶对糖化的影响

基于分批补料量不同对糖化的影响, 研究同时分别补料与酶的研究, 通过少量的酶, 以增强底物对酶的吸附与解吸附问题, 从而有利于提高底物的转化率, 获得高浓度的纤维素水解液。从图 4 中可以看出, 一次补料同时补酶时, 产生的还原糖浓度比只补料产生的还原糖浓度分别提高 13.5 g/L、

15.8 g/L 和 16.6 g/L。经过二次补料补酶后, 补料 4% (W/V)、6% (W/V) 和 8% (W/V) 时还原糖浓度分别为 116.2 g/L、122.5 g/L 和 138.5 g/L。结果分析表明随着补料量的增加, 产生的还原糖浓度也在增加, 在经过一次补料补酶后, 不同的补料量产生的还原糖浓度基本相同, 还原糖浓度都增加了约 25~27 g/L。从二次补料补酶的结果中可以看出, 在 48~72 h 水解过程中, 补料 8% (W/V) 还原糖浓度达到 138.5 g/L。试验结果表明, 糖化过程中分批补料补酶工艺可以有效提高还原糖的浓度。

## 3 结论

本研究以稀硫酸预处理后的玉米秸秆为原料, 采用分批补料工艺方法, 对影响纤维素高浓度水解液的条件进行优化。结果表明: 固形物含量为 20% (W/V) 玉米秸秆经 1% 稀硫酸溶液浸润, 121 °C 处理 60 min 后, 冷却至室温, 在醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.8) 中进行, 原料酶添加量为木聚糖酶 220 U/g, 纤维素酶 6 FPU/g, 果胶酶 50 U/g, 温度 45 °C, 转速为 120 r/min 开始进行糖化, 糖化 24 h 和 48 h 后分别向水解液中加入 8% 的物料和补料量相应的木聚糖酶 20 U/g (底物), 纤维素酶 2 FPU/g (底物), 糖化 72 h 后水解液最终还原总糖达到 138.5 g/L, 原料的酶解率最终达到理论值的 62.5%。

纤维素原料高浓度水解液的获得是实现其高浓度发酵并降低纤维乙醇生产成本的必要条件。本实验室以前对一次添加秸秆原料的酶解条件进行了研究<sup>[11-13]</sup>, 结果表明原料可以达到较高的酶解效率, 但水解液中还原糖浓度仅为 48.5 g/L<sup>[12]</sup>, 水解糖的浓度始终处于较低的水平。采用与本研究相同的预处理条件和酶解条件, 对稻草秸秆酶解 72 h 后, 水解液中还原糖浓度为 84.22 g/L<sup>[14]</sup>。本文基于补料糖化策略, 通过分批添加底物的方式获得了较高还原糖浓度的纤维素水解液。与以前的非补料糖化 72 h 实验结果相比, 表明补料法可以显著提高还原总糖浓度。该结果与赵晶等研究结果相比<sup>[8]</sup>, 减少

了纤维酶用量, 还原糖浓度提高了 19.1%, 但原料的酶解率降低了 17.6%。

在木质纤维素原料的酶法糖化工艺中, 提高底物浓度有利于获得较高的还原糖浓度, 但如果初始底物浓度太高, 则底物料液过于黏稠, 不利于搅拌和传热, 从而影响酶解反应进行, 分批补料法可以解决这一关键技术难题。综上所述, 分批补料法可以有效提高还原总糖浓度, 但仍需进一步优化和提高原料酶解率, 最终实现纤维质原料的高效糖化, 获得适合工业发酵水平高浓度还原总糖, 从而有利于木质纤维素液体燃料的产业化发展。

## REFERENCES

- [1] Zhang BL, Wang JQ, Xu GZ, et al. Thinking about bio-energy utilization in China. *Transac Chin Soc Agri Eng*, 2009, 25(9): 226–234.  
张百良, 王吉庆, 徐桂转, 等. 中国生物能源利用的思考. *农业工程学报*, 2009, 25(9): 226–234.
- [2] Wu CZ, Zhou ZQ, Yin XL, et al. Current status of biomass energy development in China. *Transac Chin Soc Agri Machin*, 2009, 40(1): 91–97.  
吴创之, 周肇秋, 阴秀丽, 等. 我国生物质能源发展现状与思考. *农业机械学报*, 2009, 40(1): 91–97.
- [3] Sims REH, Mabee W, Saddler JN, et al. An overview of second generation biofuel technologies. *Biores Technol*, 2010, 101(6): 1570–1580.
- [4] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Biores Technol*, 2009, 100(1): 10–18.
- [5] Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 37(2): 195–204.
- [6] Demirbas MF. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Applied Energy*, 2009, 86(Suppl1): S151–S161.
- [7] Pristavka A, Kodituvakky PA, Kozlov YP, et al. High-solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded willow without prior water washing. *Appl Biochem Microb*, 2000, 36(2): 101–108.
- [8] Zhao J, Chen M, Zhang JF, et al. Study on Enzymatic hydrolysis of corncob for ethanol production. *Chem Ind Forest Prod*, 2007, 27(4): 7–10.  
赵晶, 陈明, 张靖芳, 等. 酶法糖化玉米芯发酵生产乙醇的研究. *林产科学与工业*, 2007, 27(4): 7–10.
- [9] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2005, 96(6): 673–686.
- [10] Roche CM, Dibble CJ, Knutsen JS, et al. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(2): 290–300.
- [11] Song AD, Wang MD, Ren TB, et al. Study on the straw saccharification conditions with cellulase and xylanase simultaneously. *J Xinyang Normal Univ: Natural Sci*, 2006, 19(2): 181–184.  
宋安东, 王明道, 任天宝, 等. 秸秆双酶糖化条件研究. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 2006, 19(2): 181–184.
- [12] Song AD, Ren TB, Xie H, et al. Effect of chemical pretreatment on enzymatic saccharification of maize straw. *Chemistry & Bioengineering*, 2006, 23(8): 31–33.  
宋安东, 任天宝, 谢慧, 等. 化学预处理对玉米秸秆酶解糖化效果的影响. *化学与生物工程*, 2006, 23(8): 31–33.
- [13] Zhang LL. The study on hydrolysis conditions of straw [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010.  
张玲玲. 农作物秸秆水解条件的研究. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [14] Ren TB, Zhang LL, Song AD, et al. Research on multi-enzyme hydrolysis of rice straw. *Renewable Energy*, 2010, 28(2): 67–72.  
任天宝, 张玲玲, 宋安东, 等. 稻草秸秆多酶水解条件研究. *可再生能源*, 2010, 28(2): 67–72.