

# 温和碱法预处理甘蔗渣分步糖化乙醇发酵的研究

谢文化<sup>1,2</sup>, 祝智胜<sup>1</sup>, 朱明军<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广州甘蔗糖业研究所, 广东广州 510316)

**摘要:** 甘蔗渣是制糖工业的主要废弃物, 因其来源广泛, 纤维素含量高而成为一种重要的可再生生物资源。本文在对甘蔗渣成分分析的基础上, 研究了温和碱法预处理甘蔗渣分步糖化乙醇发酵工艺。甘蔗渣经温和碱法预处理后采用分步糖化发酵来生产乙醇, 正交设计试验表明影响甘蔗渣酶解的显著因素为酶添加量, 并得到最优酶解条件: 酶添加量为 25 FPU/g 甘蔗渣, 温度为 50 °C, 初始 pH 为 4.9。在优化条件下, 预处理甘蔗渣的酶解效率可达到 74.26%。在甘蔗渣水解液中补加一定营养物后, 适合酵母的生长和乙醇的发酵, 发酵 96 h 时, 乙醇产量达到 39.79 g/L, 发酵效率为 82.70%, 乙醇得率为 0.48 g/g。本研究证实了温和碱法预处理甘蔗渣水解液发酵生产乙醇的可行性, 为甘蔗渣预处理及用作乙醇发酵原料奠定了坚实的基础。

**关键词:** 甘蔗工业; 纤维素; 酶解; 生物乙醇; 发酵

文章编号: 1673-9078(2014)8-169-174

## Bioethanol Production by Stepwise Saccharification and Fermentation of Sugarcane Bagasse by Using Mild Alkali Pretreatment

XIE Wen-hua<sup>1,2</sup>, ZHU Zhi-sheng<sup>1</sup>, ZHU Ming-jun<sup>1</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou, 510316, China)

**Abstract:** Sugarcane bagasse, the main waste product of the sugar industry, is an important renewable biological resource owing to its wide variety of sources and high cellulose content. Based on the cellulose content analysis, sugarcane bagasse was prepared with mild alkali, followed by stepwise saccharification and fermentation, to produce bioethanol. The results of orthogonal experiments showed that enzyme dosage significantly affected enzymatic hydrolysis, where optimal conditions for hydrolysis were as follows: enzyme dosage of 25 FPU/g sugarcane bagasse, temperature of 50 °C, and an initial pH of 4.9. Under these optimal conditions, the enzymatic efficiency could reach up to 74.26%. Supplementation of the bagasse hydrolysate with certain nutrients facilitated yeast growth and fermentation to produce ethanol. After 96 h fermentation, the final ethanol concentration was 39.79 g/L, with a fermentation efficiency of 82.70% and an ethanol yield of 0.48 g/g. This study confirmed the feasibility of using mild alkali to pretreat bagasse hydrolysate for ethanol production by fermentation and demonstrated the benefit of pretreating sugarcane bagasse before use as raw material for ethanol production.

**Key words:** sugarcane industry; cellulose; enzymatic hydrolysis; bioethanol; fermentation

燃料乙醇是最有发展前景的新型可再生能源之一, 以木质纤维原料替代淀粉类和糖类原料生产乙醇成为全世界研究的热点, 纤维素发酵制燃料乙醇符合“不与人争粮、不与粮争地”原则, 是燃料乙醇的发展方向, 具有诱人的开发前景<sup>[1-2]</sup>。

甘蔗渣是制糖工业的主要副产品, 是甘蔗在糖厂

收稿日期: 2014-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(51278200); 广东省自然科学基金(S2012010010380); 广东省科技计划项目(2012B91100163)

作者简介: 谢文化(1968-), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事发酵工程方面的研究

通讯作者: 朱明军(1969-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物发酵工程和纤维素废弃物综合利用研究

经过压榨机或用渗透法把蔗汁提取后剩下的甘蔗茎的纤维性残渣。我国的糖厂每生产 1 t 的蔗糖就会产生 2~3 t 的甘蔗渣。我国南方蔗区甘蔗总产量为 7000 多万 t, 蔗渣的产量达到 700 万 t。甘蔗渣一般含有: 干物质 90%~92%, 粗蛋白质 2.0%, 粗纤维 44%~46%, 粗脂肪 0.7%, 无氮浸出物 42%, 粗灰分 2%~3%<sup>[3]</sup>。由此可知, 甘蔗渣来源集中、量广面大, 纤维素含量高, 灰分含量低, 是一种重要的、较好的可再生生物资源。基于纤维质原料结构的复杂性和致密性, 对其进行适当的预处理, 可以提高转化利用率和转化效率。预处理目的就是破坏纤维质原料的致密结构, 破坏木质素对纤维素的包裹作用, 降低纤维素的结晶度<sup>[4]</sup>。甘蔗渣经过适当的预处理, 用其作为乙醇发酵的

原料, 不仅解决了处理甘蔗渣的问题, 也解决了燃料乙醇发酵的原料问题, 变废为宝, 这对于缓解目前国际社会能源紧缺、环境恶化等状况具有重大意义<sup>[5-7]</sup>。

本文研究的目的是通过温和碱法预处理甘蔗渣, 使纤维素结构发生肿胀和膨化, 使酶更容易接触到纤维素和半纤维素, 从而提高酶解效率。在研究影响酶解效率的单因素试验基础上, 采用正交设计试验探讨了甘蔗渣酶解反应的最优条件; 同时对水解液乙醇发酵性能进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 甘蔗渣

甘蔗渣, 由广州甘蔗糖业研究所提供; 高速万能粉碎机 (FW 100 型), 天津泰斯特; 磨碎后 60 目过筛, 并用  $\text{NH}_4\text{OH}-\text{H}_2\text{O}_2$  混合液 (体积比为 2:1), 在浓度 53%, 固液比 28:1, 温度 63 °C 下浸泡甘蔗渣 20 h, 之后经离心机 (日立 CF7D2 型, 日本) 3000 r/min 离心 8 min, 水洗至 pH 为中性, 60 °C 烘干。

### 1.2 菌种及酶

融合酵母 SHY 07-1 (*Saccharomyces cerevisiae* 与 *Pichiastipitis* 的融合子), 由华南理工大学生物科学与工程学院发酵工程研究室保藏<sup>[8]</sup>; 纤维素酶 Celluclast 1.5 L (诺维信, 丹麦) 中纤维素酶活为 12.54 FPU/mL,  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活为 26.43 CBU/mL。

### 1.3 甘蔗渣成分的测定

纤维素和半纤维素的测定按美国可再生能源实验室的方法进行<sup>[9]</sup>。分别用国标法测定酸溶性木质素 (GB/T 10337-1989)<sup>[10]</sup>, 酸不溶性木质素 (GB/T

747-2003)<sup>[11]</sup>和灰分 (GB/T 2677.3-1993)<sup>[12]</sup>。

### 1.4 酶活的定义及测定

纤维素酶酶活以 FPU/mL 表示, 定义为: 1 mL 纤维素酶在 50 °C、pH 4.8 及 1 h 条件下分解滤纸产生 1 mg 葡萄糖为 1 个活力单位。 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活以 CBU/mL 表示, 定义为: 1 mL 纤维素酶在 50 °C、pH 4.8 及 1 h 条件下分解滤纸产生 2 mg 葡萄糖为 1 个活力单位。酶活的测定按美国可再生能源实验室的方法进行<sup>[13]</sup>。

### 1.5 残糖及发酵产物的检测

样品用 10% (wt) 的硫酸酸化, 12000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。使用 Waters 2695 高效液相色谱仪检测, 色谱柱为 Bio-rad 公司的 HPX-87H 柱, 柱温为 60 °C; 流动相为超纯水配制的 2.5 mmol/L 的硫酸溶液, 流速为 0.6 mL/min; 检测器为 Waters 2414 示差折光检测器, 温度 40 °C

### 1.6 扫描电镜的分析

未处理和处理过的甘蔗渣样品首先经真空冷冻干燥 24 h, 镀上一层 20 nm 的金层后在扫描电镜仪 (ZEISS, EVO-18, 德国) 上进行分析。

### 1.7 甘蔗渣的酶水解及水解液的发酵

通过改变不同的实验参数 (表 1) 来研究不同单因素对酶解效率的影响。正交设计试验 (表 2) 是为了寻求酶解的最优条件。水解完成后在无菌条件下于 8000 rpm 离心 10 min 得到水解液, 补加一定营养物后接入酵母进行发酵实验。

表 1 温度、酶量、底物浓度及初始 pH 值对酶水解作用的影响参数设计

Table 1 The effects of temperature, enzyme loadings, substrate loadings and initial pH on enzymatic hydrolysis of bagasse

实验参数	温度的影响	酶添加量的影响	底物浓度的影响	初始pH的影响
温度/°C	30, 40, 50, 55	40	40	40
酶添加量/(FPU/g)	15	10, 15, 20, 25	15	15
底物浓度/(g/L)	20	20	20, 40, 60, 80	2
初始pH	4.9	4.9	4.9	3.9, 4.9, 5.9, 6.9

### 1.8 计算公式

$$\text{酶解效率} = \frac{\text{水解液中还原糖浓度}^*}{\text{固形物浓度} \times \text{葡聚糖含量} \times 1.11 + \text{固形物浓度} \times \text{木聚糖} \times 1.14} \times 100\%$$

注: \*水解液中的还原糖浓度均已扣除酶液引入的还原糖浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甘蔗渣的成分分析

预处理过的和未处理的甘蔗渣的成分分析见表2。由表2可知,温和碱法处理甘蔗渣能够去除约49%的酸不溶性木质素,并且能最大限度的保留纤维素和半纤维素。由图1显示的扫描电镜图可知,通过此法预处理后的甘蔗渣表面卷起,纤维素-半纤维素-木质素交联结构部分分开。这与部分文献报道的用碱法可以去除或溶解部分木质素,且能改变其表面结构从而更有利于纤维素酶的接触的结论是一致的<sup>[14-15]</sup>。

表2 甘蔗渣的成分分析

Table 2 Chemical characterization of the sugarcane

bagasse		
含量/%	未处理甘蔗渣	预处理甘蔗渣
纤维素	39.50±0.66	50.41±3.38
半纤维素	19.77±0.03	18.57±0.13
Klason 木质素	21.04±0.01	10.69±0.02
酸溶木质素	4.89±0.21	3.14±0.07
灰分	5.69±0.01	5.93±0.01

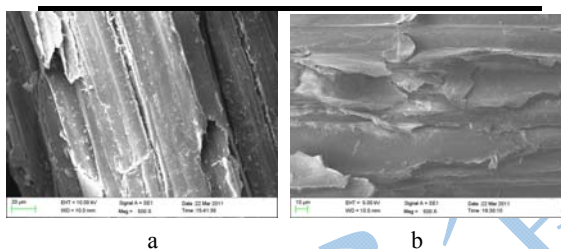


图1 甘蔗渣样品的扫描电镜图

Fig.1 Morphology of fiber bundles in sugarcane bagasse samples

注: a: 未处理甘蔗渣, b: 温和碱法处理甘蔗渣。

### 3.2 不同单因素对甘蔗渣酶解效率的影响

通过改变温度、酶添加量、底物浓度及初始pH值来考察单因素对酶解效率的影响。实验结果见图2。

温度主要影响酶的稳定程度,即酶的热变性。一般来说,酶促反应在一定温度范围内,反应速度随着反应温度的升高而加快;温度降低,则反应速度下降,反应时间延长。但温度超过某一界限,蛋白质会变性,即酶的活性降低甚至失活。由图2a可知,在一定温度范围内,甘蔗渣水解的酶解效率随着温度的升高而提高,并在24h后逐渐趋于稳定。当温度从30℃增加到50℃时,24h的酶解效率提高了约29%。

由图2b可知,在一定的条件下,酶促反应的速度和酶添加量成正比,酶水解效率一直保持上升趋势,当酶添加量为25 FPU/g甘蔗渣时,酶水解效率可以达

到96.81%。但当底物和酶分子结合的结合点数饱和,再增加酶的用量,就起不到增加酶解效率的作用了<sup>[16]</sup>。

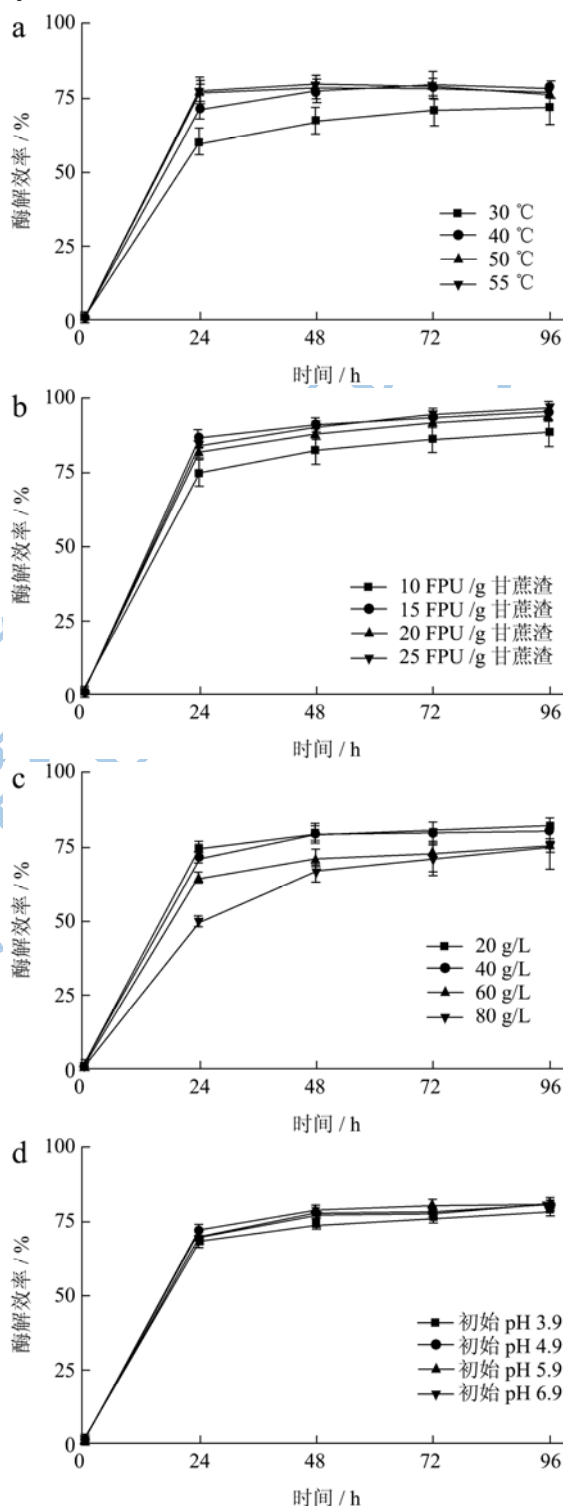


图2 不同单因素对酶解效率的影响

Fig.2 Effect of different single factor on enzymatic efficiency

注: a: 温度, b: 酶量, c: 底物浓度, d: 初始pH值。

在酶解反应时,高浓度的底物能提高水解液中的糖浓度,但高浓度底物会导致更大的固液间传质阻力以及更多的酶与固形物底物之间的非生产性吸附,从

而影响酶解效率。图 2c 表明, 随底物浓度升高, 酶解效率下降, 24 h 时, 80 g/L 的底物浓度的酶解效率比 20 g/L 的底物浓度的酶解效率降低 34%。随着底物浓度的增大, 酶解液中还原糖浓度提高而酶解效率降低, 说明在较高底物浓度下甘蔗渣难以完全水解。

由图 2d 可知, 当初始 pH 值在 3.9~6.9 范围内, 其变化对甘蔗渣酶解的酶解效率没有明显的影响。

### 2.3 正交试验

在研究单因素对酶解效率影响的基础上, 为了考察各单因素间的交互作用, 得出最优酶水解的条件, 进行了  $L_{16}(4^3)$  正交实验 (底物浓度为 40 g/L, 转速为 200

r/min)。实验结果见表 4 及表 5。

表 3 正交试验因素水平设计表

**Table 3 Design of orthogonal experiments**

因素	No.		
	1 酶添加量 (FPU/g 甘蔗渣)	2 温度 /°C	3 初始 pH
水平 1	10	40	3.9
水平 2	15	45	4.9
水平 3	20	50	5.9
水平 4	25	55	6.9

表 4 正交试验设计及结果

**Table 4 Orthogonal design and results of experiment**

因素	A [酶添加量 (FPU/g 甘蔗渣)]	B (温度 /°C)	C (初始 pH)	24 h 酶解效率/%	
1	10	40	3.9	1	65.70
2	10	45	4.9	2	68.90
3	10	50	5.9	3	66.03
4	10	55	6.9	4	51.24
5	15	40	4.9	3	70.51
6	15	45	3.9	4	67.50
7	15	50	6.9	1	69.08
8	15	55	5.9	2	65.34
9	20	40	5.9	4	67.21
10	20	45	6.9	3	69.09
11	20	50	3.9	2	68.95
12	20	55	4.9	1	67.92
13	25	40	6.9	2	68.49
14	25	45	5.9	1	72.61
15	25	50	4.9	4	74.26
16	25	55	3.9	3	70.77
Mean 1	62.968	67.978	68.230	68.828	68.598
Mean 2	68.107	69.525	70.398	67.920	68.990
Mean 3	68.293	69.580	67.797	69.100	67.485
Mean 4	71.532	63.817	64.475	65.052	65.828
Range	8.64	5.763	5.923	4.048	3.162

表 5 正交试验结果方差分析

注: \*显著。

**Table 5 Variance analysis of orthogonal experiment**

因素	SS	Df	F	Critical value of F	Significance
酶添加量	150.397	3	6.246	5.390	*
温度	88.053	3	3.657	5.390	
初始pH	71.860	3	2.984	5.390	
Error	24.08	3			

由表 4 可知, 在实验参数范围内, 酶添加量对酶水解实验结果的影响最为显著, 其次为初始 pH 值, 温度影响最小。综合极差和方差考虑, 正交试验优化的结果为:  $A_4B_3C_2$ , 即酶添加量为 25 FPU/g 甘蔗渣, 温度为 50 °C, 初始 pH 为 4.9, 在此条件下试验, 24 h 酶解效率可达 74.26%。Rocha 等<sup>[14]</sup>的研究表明, 去除木质纤维素物质中 20%~65% 的木质素可以有效地增



加纤维素酶与底物的有效解除, 从而增加酶解过程中的酶解效率。相比未处理的样品, 氨水-双氧水混合处理过的样品的酶解效率显著提高, 这与 Rocha 等的报道一致。

### 2.4 甘蔗渣水解液的发酵

初步实验结果表明, 甘蔗渣水解液不添加任务营养物质无法进行乙醇发酵。所以对甘蔗渣水解液添加部分营养物质后进行乙醇发酵试验。以底物浓度为 160 g/L, 酶添加量为 15 FPU/g 甘蔗渣, 在 50 °C 下酶解 72 h 得到水解液 (含 7.54 g/L 纤维二糖, 61.80 g/L 葡萄糖及 43.70 g/L 木糖), 补加一定营养物后按 6% 接种量接入酵母菌悬液, 于 200 r/min, 30 °C 进行发酵。结果如图 5 所示。

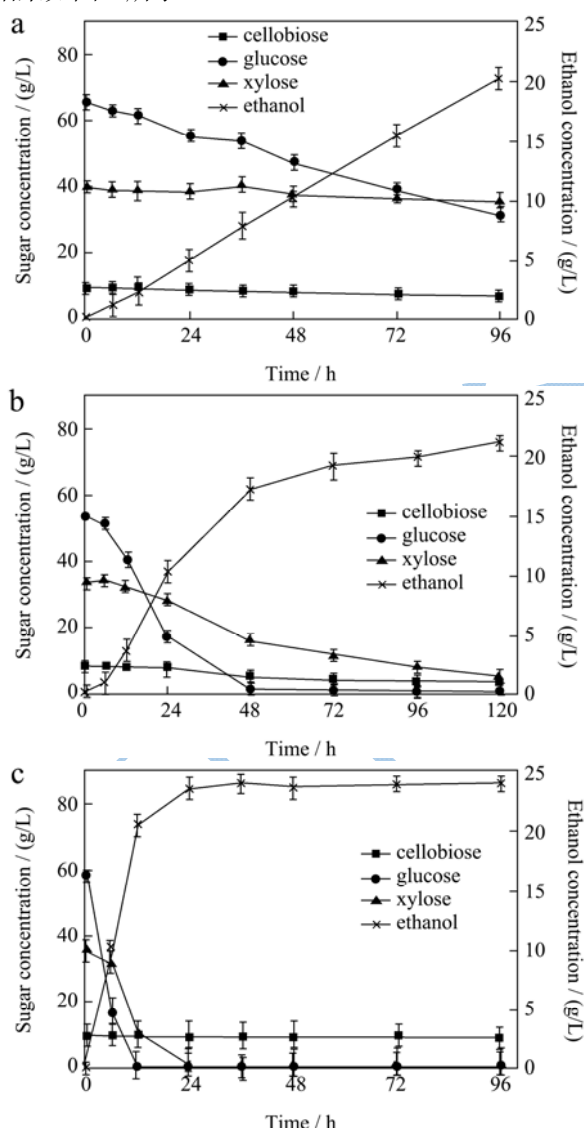


图 3 甘蔗渣水解液的发酵曲线

Fig.3 The fermentation curves of hydrolysate from sugarcane bagasse

注: a: 水解液添加0.3%玉米浆; b: 水解液添加20 g/L酵母

母粉, 10 g/L蛋白胨和0.3%玉米浆; c: 纯糖培养基添加20g/L酵母粉, 10 g/L蛋白胨和0.3%玉米浆。

酵母在同时含有葡萄糖和木糖的培养基中发酵时, 木糖的利用会受到葡萄糖利用的竞争性抑制作用而滞后于葡萄糖<sup>[17]</sup>。由图 5b 及 c 可以明显看出, 酵母对葡萄糖的利用优于对木糖的利用, 并且只有当葡萄糖的含量降低到某一值时, 木糖才开始快速的被利用。图 5b 中, 纤维二糖的含量有所降低, 可能原因是残留的纤维素酶液中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶将纤维二糖分解为葡萄糖而被酵母利用。

根据未添加营养物质水解液的发酵实验结果 (未显示) 以及对比图 5a 和 b 可知, 甘蔗渣水解液中需要补充一定的额外营养物质才能满足酵母乙醇发酵对营养的要求。图 5b 中底物的消耗 (主要葡萄糖和木糖) 和产物的生成 (主要为乙醇) 与纯糖模拟 (图 5c) 中的底物和产物随时间变化具有相似的曲线。96 h 时, 图 5b 的发酵效率为 82.70%, 乙醇得率为 0.48 g/g, 说明甘蔗渣水解液添加一定营养物后适合酵母的发酵。但是甘蔗渣水解液葡萄糖利用速率明显低于模拟糖液中葡萄糖的利用速率 (表 6), 表明通过温和和碱法预处理甘蔗渣的酶解液中可能含有一些对酵母发酵产生抑制作用的物质, 但是 HPLC 检测时未检测出常见的抑制剂糠醛和羟甲基糠醛。尽管如此, 97.96%的葡萄糖利用率和 74.63%的木糖利用率充分说明温和和碱法预处理甘蔗渣水解液具有良好的发酵性能。

表 6 不同培养基发酵参数比较 (96 h)

Table 6 Summary of fermentation results at 96 h from different media

培养基	(a)	(b)	(c)
乙醇浓度/(g/L)	19.13	39.79	45.03
乙醇得率/(g/g)	0.46	0.48	0.48
乙醇产率/[g/(L·h)]	0.20	0.41	0.47
发酵效率/%	33.51	82.70	87.41
葡萄糖利用率/%	52.17	97.96	99.44
木糖利用率/%	11.31	74.63	98.98
葡萄糖消耗速率/[g/(L·h)]	0.36	1.54*	4.82**
木糖消耗速率/[g/(L·h)]	0.05	0.24***	1.48****

注: \*发酵24 h; \*\*发酵12 h; \*\*\*发酵120 h; \*\*\*\*发酵24

h.

### 3 结论

通过温和和碱法对甘蔗渣进行预处理, 尽可能多的去除木质素并使其表面结构和成分发生变化, 从而更利于纤维素酶的酶解。以酶解效率为指标, 在一定条件下, 随着温度、酶用量和底物浓度的增加, 酶解效

率提高;而转速和初始 pH 值在实验范围内对于酶水解效率没有明显的影响。三因素四水平正交试验表明,影响酶解因素的主次为酶量>初始 pH 值>温度,酶解的最优条件为:酶添加量为 25 FPU/g 甘蔗渣,温度为 50℃,初始 pH 为 4.9。在甘蔗渣水解液中添加 20 g/L 酵母粉,10 g/L 蛋白胨及 0.3%玉米浆后,适合酵母的生长和乙醇的发酵,96 h 时,发酵效率为 82.70%,乙醇得率为 0.48 g/g。

### 参考文献

- [1] Cardona C A, Quintero J A, Paz I C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives [J]. *Bioresource and Technology*, 2010, 101(13): 4754-4766
- [2] Jorgensen H, Kristensen J B, Felby C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities [J]. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2007, 1(2): 119-134
- [3] 王允圃,李积华,刘玉环,等.甘蔗渣综合利用技术的最新进展 [J].*中国农学通报*,2010,26(16):370-375  
WANG You-pu, LI Ji-hua, LIU Yu-huan, et al. Comprehensive utilization of bagasse: state of the art [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(16): 370-375
- [4] Sánchez Q J, Cardona C A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5270-5295
- [5] Katahira S, Ito M, Takema H, et al. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S.cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(2): 115-119
- [6] Kumar A, Singh K A, Ghosh S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhorniacrassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichiastipitis* [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13): 3293-3297
- [7] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001, 56(1-2): 17-34
- [8] Zhu Z S, Li X H, Zheng Q M, et al. Bioconversion of a mixture of paper sludge and extraction liquor from water prehydrolysis of *Eucalyptus* chips to ethanol using separate hydrolysis and fermentation [J]. *Bioresources*, 2011, 6(4): 5012-5026
- [9] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [EB/OL]. (2008-4-25) [2011-6-24]. <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>
- [10] GB/T 10337-1989, Raw material and pulp-Determination of acid-soluble lignin [S]
- [11] GB/T 747-2003, Pulps- Determination of acid-insoluble lignin [S]
- [12] GB/T 2677.3-1993, Fibrous raw material-Determination of ash [S]
- [13] Adney B, Baker J. Measurement of Cellulase Activities [J]. *Pure and Applied chemistry*, 1987, 59(2): 257-268
- [14] Rocha G J M, Martin C, Soares I B, et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(1): 663-670
- [15] Chang V S, Holtzapple M T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84-86(1-9): 5-37
- [16] Duff S J B, Murray W D. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: a review [J]. *Bioresource Technology*. 1996, 55(1): 1-33
- [17] Agbogbo F A, Kelly G C, Smith M T, et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichistipitis* [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(11): 2333-2336