ACTA ENERGIAE SOLARIS SINICA

Vol. 40, No. 1 Jan., 2019

文章编号:0254-0096(2019)01-0142-07

高温液态水预处理园林废弃物提高酶解率

卞士祥^{1,2},余 强²,庄新姝²,王 琼²,朱银萍^{1,2},袁振宏^{2,3}

(1. 中国科学技术大学纳米科学技术学院,合肥 230026; 2. 中国科学院广州能源研究所,中国科学院可再生能源重点实验室, 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室,广州 510640; 3. 生物质能源河南省协同创新中心,郑州 450002)

摘 要:为探寻园林废弃物的能源化再利用潜力,以红花羊蹄甲树枝和台湾草废弃物为原料,采用高温液态水预处理方法进行工艺优化研究,以提高其酶解率。结果表明:红花羊蹄甲树枝的最优P因子为1233,台湾草废弃物的最优P因子为153,此时总木糖收率分别为85.48%和68.40%,总糖收率分别达到87.84%和86.31%,72 h酶解率分别由原料的43.99%和55.94%提高到81.25%和87.27%,其中台湾草废弃物比红花羊蹄甲树枝在预处理前后都更易酶解。高温液态水预处理过程脱除了大量半纤维和部分木质素,显著改变了物料表面平整结构,增大了比表面积和纤维素结晶指数,这些变化有助于后续酶解。

关键词:生物质;酶水解;生物乙醇;预处理中图分类号:TK6 文献标识码:A

0 引言

木质纤维素类生物质因其储量丰富、廉价易 得、绿色可再生等优势而成为国内外生物质能研究的 热点,利用其生产燃料乙醇和其他高附加值化学品对 于缓解能源危机,减轻环境污染具有重要意义[1]。 园林废弃物作为一种重要的木质纤维素类生物质, 主要包括人工修剪或自然凋落而产生的树枝、树 叶、草屑等木质纤维,利用其进行生物炼制是解决 园林垃圾堆积和实现资源再利用的有效途径[2,3]。 木质纤维素类生物质是由致密的纤维素-半纤维素-木质素三维结构组成,直接酶解糖化用来发酵产乙 醇,效率低不可取[4],需要通过高效的预处理手段打 破其复杂的结构屏障,构建糖平台,提高产物发酵 效率[5,6]。在众多预处理法中,高温液态水法[7-9]是 指温度在 160~250 ℃之间,压力等于或大于水饱和 蒸气压的压缩液态水预处理生物质的方法,该法具 有自身酸碱催化的作用,无需添加任何化学试剂, 环保高效,可去除大量半纤维素和部分木质素,同 时副产物含量低。

园林废弃物在中国的年产量目前约达 1440 万 t, 每年可提供约 53.57 亿 L 潜在的纤维素乙醇产量^[2],而 高温液态水预处理园林废弃物的报道较少,本研究选取红花羊蹄甲树枝和台湾草废弃物这 2 种南方常见的园林废弃物为原料,引入制浆前处理过程中的 P 因子概念,研究其高温液态水预处理的最优 P 因子并分析预处理前后酶解性能和结构特性的变化,以期为园林废弃物能源化再利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

园林废弃物采集于华南农业大学校园内,分别为红花羊蹄甲树凋落的树枝和台湾草草坪的修剪废弃物。将原料粉碎过筛至 20~60 目,于 80 ℃烘箱中烘 24 h 以上,至恒重备用。原料及水解残渣的成分分析参考美国可再生能源实验室标准测定方法(LAP,NREL)^[10]。纤维素酶购于宁夏和氏壁生物技术有限公司,其滤纸酶活为 113.2 FPU/g。醋酸/醋酸钠缓冲溶液现配,即取 11.484 g 醋酸钠和 3.54 mL 的醋酸溶于 1 L 去离子水中,调节 pH 值为 4.8±0.05。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 预处理方法

将一定量烘干至恒重的原料放入实验室自行

收稿日期: 2016-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(51476179; 21476233); 广东省自然科学基金重点项目(2015A030311022); 广州市珠江科技新星专项 (201610010110); 中国科学院青年创新促进会 (2015289)

通信作者: 庄新姝(1970—), 女, 博士、研究员, 主要从事纤维乙醇生物炼制方面的研究。zhuangxs@ms.giec.ac.cn

设计的间歇搅拌水解反应釜中^[11],加入一定体积的去离子水,混合均匀后密闭反应釜,开启搅拌,转速为 500 r/min,同时开始升温加热,升温阶段从 25 ℃ 开始计时,以 3.1 ℃/min 的恒定速率升至所需反应温度后保温反应一定时间。反应结束后停止搅拌,打开釜下阀门取出水解液,然后向釜内加入适量冰水以保护残渣,待釜体温度降至室温后将残渣取出,清洗反应器。水解液和水解残渣分别置于 4 ℃和-20 ℃冰箱保存待分析。

1.3 酶解方法

将原料及预处理所得残渣按 5%底物浓度置于醋酸/醋酸钠缓冲液中,调节 pH 值至 4.8。按照 40 FPU/g 底物(干重)的量加入纤维素酶,在 50 ℃、150 r/min 摇床中酶解反应 72 h,分别在 12、24、48 和 72 h 取酶解液进行 HPLC 分析糖含量。酶解率计算公式为:

1.4 P因子计算方法

本文采用工业制浆前期预水解过程中的预水解因子(P因子)计算法则,P因子将预水解温度和时间两个因素综合成一个变量,用于指导水预水解工艺条件的制定。Sixta等[12]在前人的基础上给出了P因子的详细计算公式,如式(2):

$$P = \int_{0}^{t} \exp\left(\frac{E}{R \times 373.15} - \frac{E}{RT}\right) dt$$

$$= \int_{0}^{t} \exp\left(40.48 - \frac{15106}{T}\right) dt \qquad \qquad$$
保温阶段
$$\approx \frac{t}{6} \left[\exp\left(40.48 - \frac{15106}{T_{0}}\right) + 4 \exp\left(40.48 - 2 \times \frac{15106}{T_{0} + T}\right) + \exp\left(40.48 - \frac{15106}{T}\right) \right] \qquad$$
升温阶段,且升温速率恒定
(2)

式中, E ——半纤维素脱除的反应活化能,125.6 kJ/mol; R ——气体常数,8.314 J/(mol·K); T ——任意时刻的温度, K; T ——初始温度, K; t ——T 。升至 T 所需的时间或保温反应时间。

因式(2)主要针对木材预水解得到,对台湾草不适用。查阅文献得知甘蔗渣预水解中半纤维素脱除的反应活化能为 88.8 kJ/mol^[13],且甘蔗渣和台湾草同属于禾本科草类原料,主要组分和结构相似,因此将 *E* =88.8 kJ/mol 代入式(2)可得到台湾草

的 P 因子计算公式。

1.5 分析测定方法

通过高效液相色谱仪(HPLC, Waters2498)测定水解液中单糖和副产物含量,色谱条件: Shodex sugar SH-1011色谱柱,柱温50℃,流动相为0.005 mol/L H₂SO₄,流量为0.5 mL/min, UV-RI 和 RI 检测器,检测器温度为50℃。总糖测定是用4% H₂SO₄将水解液于121℃高温反应1h后,低聚糖二次水解完全后换算得到。水解液中总糖主要包括总木糖和总葡萄糖,总木糖收率和原料组分的脱除率可以反映预处理的有效程度,相关计算公式为:

总葡萄糖收率 = 水解液中总葡萄糖质量×0.9 原料中葡聚糖的质量 (4)

脱除率=原料中该组分质量-残渣中该组分质量×100%原料中该组分质量

(5)

总糖收率涉及预处理和酶解 2 大阶段,可用来评价整体效果,其计算公式为:

对固体原料和残渣进行光学镜检和比表面积及孔径分析仪(BET)、扫描电镜(SEM)、X射线衍射仪(XRD)分析测定。选取适量物料,进行切片、染色,于光学显微镜(CX31RTSF)下镜检,图像采集分析。采用全自动比表面积及孔径分析仪(SI-MP-10/PoreMaster33,Quantachrome USA)对物料的比表面积和孔容孔径进行测定,样品先在100℃下脱气24h,然后置于注满液氮的测定筒内进行程序测试。固体表面形态观察采用场发射扫描电镜(S4800,Hitachi),样品需喷金,于2.0kV加速电压下观察拍照。通过X射线衍射仪(PW3040/60,Philips,Holand)对样品进行常规角度XRD测定,测试条件为:反射法,Cu靶,电压40kV,电流40mA,扫描范围5°~80°。结晶指数计算公式为:

$$CrI = \frac{I_{\text{crystalline}(002)} - I_{\text{amorphous}}}{I_{\text{crystalline}(002)}} \times 100\% \tag{7}$$

式中,CrI ——结晶指数; $I_{crystalline(002)}$ ——结晶区强度 $(2\theta=22^\circ)$; $I_{superphys.}$ ——非结晶区强度 $(2\theta=18^\circ)$ 。

2 结果与讨论

2.1 高温液态水预处理工艺优化

根据本实验室对甘蔗渣等木质纤维素原料的高温液态水预处理工艺优化结果[14],选择在固液比为1:20,压力为饱和蒸汽压的条件下进行预处理优化实验,考察不同预处理P因子对水解液中总木糖和总葡糖收率以及副产物含量的影响。相应的预处理P因子如表1所示,不同的P因子下总木糖和总葡萄糖收率及副产物糠醛和5-羟甲基糠醛(5-HMF)的变化情况如图1所示。

由图 1a、图 1b 可知,红花羊蹄甲树枝的总木糖和总葡萄糖收率的变化趋势基本相同,随着 P 因子的增加糖收率先增后减。其中在 160、180 ℃时随 P 因子增大一直增大,直到当 P=1233 时,总木糖收率达到最大值为 85.48%,此时水解液中的总木糖浓度

约为7g/L,总葡萄糖收率也取得最大值4.77%,而 在 200 ℃时,糖收率随着 P 因子的增大先快速增加 后有明显的下降趋势, 当P = 6001 时,总木糖收率降 到约7%,是因为预处理条件越剧烈(高温长时间), 单糖降解成副产物的速率越快,当大于单糖生成速 率时,产物糖收率降低。同时发现相同 P 因子时, 低温长时间要比高温短时间所得的糖收率多,这是 因为低温长时间下单糖的生成速率要大于降解速 率。由图 1c、图 1d 可知,水解液中木糖降解产物糠 醛和葡萄糖降解产物 5-HMF 的浓度随着 P 因子的 增大而增大,160和180℃时的增大幅度极小,而 200 ℃时快速增大,最大糠醛浓度约为 P=1233 时糠 醛浓度的 15 倍,副产物含量显著变大,这对糖收率 和水解液发酵制取下游产品不利。以总木糖收率和 副产物含量作为主要的预处理评判指标,选择 P 因 子为 1233 作为红花羊蹄甲树枝的最优工况。

表 1 不同预处理条件及对应的P因子

Table 1 Different pretreatment conditions and corresponding *P*-factor

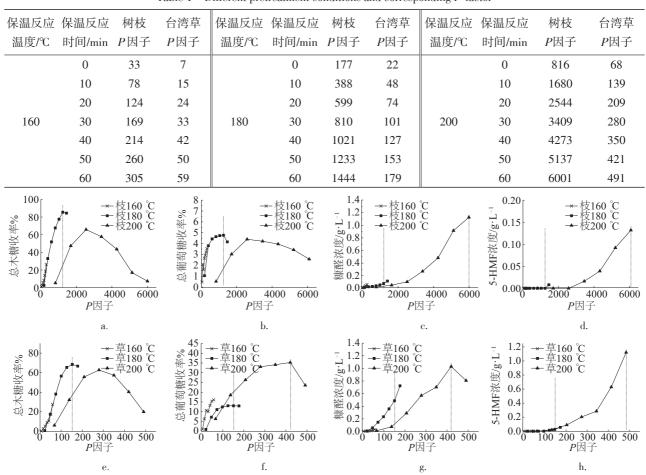


图 1 预处理 P 因子对水解液中总木糖和总葡萄糖收率以及副产物含量的影响

Fig. 1 Effect of P-factor for LHW pretreatment on the yield of total xylose, glucose and by-products in the liquid fractions

根据图 1e、图 1f 可知,台湾草废弃物的水解液中糖收率随 P 因子的增大也呈现先增大后降低的趋势。总木糖收率在低温 160 ℃时普遍较低,而在 P=153 时取得最大值 68.40%,此时水解液中总木糖浓度约为 8 g/L,而总葡萄糖收率在 P=153 时为 13.02%,在 P=421 时达到最大值 35.25%,但此时木糖因降解严重,收率较低,并且葡聚糖损失较多,不利于后续酶解。相比红花羊蹄甲树枝,台湾草废弃物高温液态水预处理能得到更多的葡萄糖,并且在 200 ℃长时间内依然能保持很高的收率,推测其源于纤维素部分水解。由图 1g、图 1h 可知,副产物浓度随着 P 因子的增大而增大,总体趋势与红花羊蹄甲

树枝类似,糠醛浓度在 P=421 时达到最大值约 1 g/L, 然后略微降低,5-HMF 浓度在 P=491 时取得最大值约 1.1 g/L,并且生成速率变快,导致总葡萄糖收率下降了约 10%。综合木糖得率和副产物生成情况,选择 P 因子为 153 作为台湾草废弃物的最优预处理条件。

2.2 预处理效果评价

为进一步考察 2 种园林废弃物的高温液态水预处理效果,分别将原料和最优 P 因子下预处理后的残渣进行成分分析和酶解评价,表 2 给出了 2 种原料的最优预处理效果对比情况。

表2 2种园林废弃物最优P因子预处理对比

Table 2 Comparison of pretreatments for two kinds of garden waste under the optimal P-factor

底物	葡聚糖含量/%	木聚糖 含量/%	木质素 含量/%	木聚糖 脱除率/%	木质素 脱除率/%	总木糖 收率/%	糠醛浓度/g·L ⁻¹	72 h底物 酶解率/%	总糖 收率/%
树枝原料	33.13	14.45	26.09	_	_	_	_	43.99	_
树枝残渣	47.37	7.24	32.73	80.72	14.16	85.48	0.077	81.25	87.84
台湾草原料	27.66	20.63	19.61	_	_	_	_	55.94	_
台湾草残渣	38.46	8.01	29.97	77.47	8.57	68.40	0.487	87.27	86.31

经过预处理后,红花羊蹄甲树枝和台湾草废弃物均脱除约80%的木聚糖,树枝的木质素脱除率为14.16%,而台湾草仅脱除8.57%的木质素,可看出树枝的木聚糖和木质素综合脱除效果好于台湾草,相应的树枝的酶解率提高程度也大于台湾草。由图2可知,台湾草原料要比树枝原料更易酶解,可能是由于其低木质素含量和草类原料本身较为松软的缘故,高温液态水预处理之后物料的酶解性能均有较大提升,树枝和台湾草的酶解率分别提高37.26%

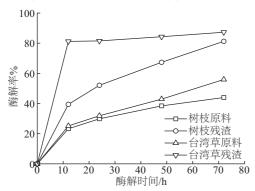


图 2 2种园林废弃物预处理前后的酶解情况

Fig. 2 Enzymatic digestibility variation of untreated and treated garden waste

和 31.33%,同时台湾草水解残渣仅需 12 h 即可达到 约 80%的酶解率,而树枝水解残渣酶解率在 72 h 时才能达到 81.25%,因此台湾草废弃物相比红花羊蹄甲树枝缩短了酶解糖化时间,在生物炼制能源化再利用方面更具竞争力。综合预处理和酶解的糖得率,2 种原料的总糖收率都在 85%以上,效果显著。

2.3 预处理对原料微观结构的影响

2种园林废弃物材料采用番红-固绿染色,番红染液可将植物木质化、木栓化细胞壁以及导管染成红色,固绿染液可将植物纤维素细胞壁、薄壁细胞、细胞质等染成绿色。从图3可看出,原料染色层次清晰明显,经过预处理后,残渣的红绿染色都变浅,细胞排列变得疏松,壁腔分界模糊,说明预处理脱除了部分木质素和纤维素,打破了复杂的细胞壁三维结构。其中树枝红色褪去较多,绿色保留较多(如图3a、图3b),而台湾草绿色褪去较多,红色褪去相对较少(如图3c、图3d),说明台湾草脱除更多的纤维素,印证上文关于台湾草总葡萄糖收率高的分析结果,同时也表明台湾草木质素脱除较少,与上文数据相符合。

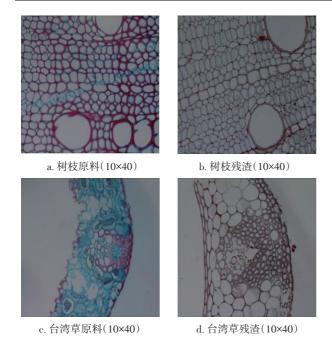
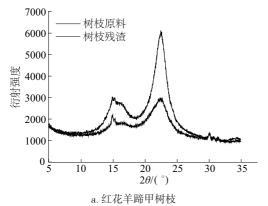


图 3 2种园林废弃物预处理前后的光镜图 Fig. 3 OM micrographs of untreated and treated garden waste

纤维素的结晶度一般被认为是影响纤维素酶解糖化的重要因素。在最优 P 因子下预处理后,红花羊蹄甲树枝的结晶指数(如图 4a)从 40.45%升高至 60.60%,而台湾草废弃物的结晶指数(如图 4b)则从 29.24%升至 40.36%,发现预处理后纤维素结晶区 2θ=22°处的吸收强度相比未处理原料均有明显提高,并且树枝的提高幅度大于台湾草,其原因可能是由于树枝脱除了更多的半纤维素和木质素,使得结晶纤维素能更多地暴露出来,从而增大了结晶指数,提高原料的酶解率。

为进一步理解预处理的微观效应,对 2 种园林 废弃物原料及预处理残渣进行 BET 比表面积及孔 径孔容测定,结果如表 3 所示。2 种未处理原料均 具有较低的比表面积、孔径和孔容,经过在最优 P 因



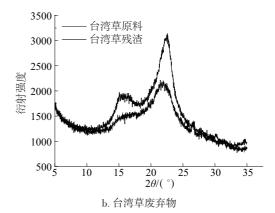


图 4 2种园林废弃物预处理前后的 XRD 谱图 Fig. 4 XRD pattern of untreated and treated garden waste

子条件下的预处理后,残渣的比表面积有所增加, 总孔容均提高一个数量级,其中台湾草残渣总孔容 约为原料的 3.2 倍,平均孔径均有明显增大,这与预 处理脱除大量半纤维素和部分木质素有关,利于生 成更多的孔洞,从而有助于提高酶与纤维素底物之 间的可及度,增强酶解效果。

表3 2种园林废弃物预处理前后的比表面积、 平均孔径及孔容

Table 3 Specific surface area, average pore diameter, total pore volume of untreated and treated garden waste

样品	比表面积/ m²•g ⁻¹	总孔容/ mL·g ⁻¹	平均孔径/ nm
树枝原料	2.980	7.419×10 ⁻³	4.9786
树枝残渣	4.580	18.98×10 ⁻³	8.2929
台湾草原料	3.813	6.469×10 ⁻³	3.3935
台湾草残渣	4.113	20.93×10 ⁻³	10.1786

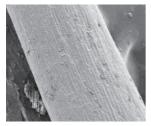
通过 SEM 扫描电镜可更直观看出预处理前后 固体表面的形貌特征。图 5 为 2 种园林废弃物预 处理前后原料和残渣的扫描电镜图,可见树枝和台 湾草原料表面平整致密,纹理清晰,经过高温液态 水预处理后,由于半纤维素及木质素的脱除,导致 平整结构被破坏,表面粗糙多褶皱,并形成裂隙孔, 树枝残渣表面呈现一定的卷曲翻转,台湾草残渣



a. 树枝原料(200倍)



b. 树枝残渣(200倍)





c. 台湾草原料(400倍)

d. 台湾草残渣(400倍)

图5 2种园林废弃物预处理前后的扫描电镜图

Fig. 5 SEM micrographs of untreated and treated garden waste

表面多碎片结构,这些均有助于增大比表面,提高酶与底物的接触机会,增大酶解率。

3 结 论

选择在饱和蒸汽压,1:20 固液比的前提下,P 因子为1233(180℃,50 min, E=125.6 kJ/mol)和153 (180℃,50 min, E=88.8 kJ/mol)分别作为红花羊蹄 甲树枝和台湾草废弃物的高温液态水预处理最优 条件,此时总木糖收率分别为85.48%和68.40%,残 渣酶解率分别为81.25%和87.27%,总糖收率分别 达到87.84%和86.31%。高温液态水预处理园林废 弃物,脱除大量半纤维素和部分木质素,增大比表 面积和孔容孔径,增强酶与纤维素底物的可及性, 从而有利于后续酶解,其中台湾草废弃物比红花羊 蹄甲树枝在预处理前后均更易酶解。

[参考文献]

- [1] Barakat A, Mayer-Laigle C, Solhy A, et al. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production[J]. RSC Advances, 2014, 46(3): 48109—48127.
- [2] Shi Yan, Ge Ying, Chang Jie, et al. Garden waste biomass for renewable and sustainable energy production in China: Potential, challenges and development [J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2013, 22(8): 432—437.
- [3] Wani K A, Mamta, Rao R J. Bioconversion of garden waste, kitchen waste and cow dung into value-added products using earthworm *Eisenia fetida* [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2013, 20(2): 149—154.
- [4] Kumar A, Singh L K, Ghosh S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water- hyacinth (*Eichhornia* crassipes) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by Pichia stipitis [J]. Bioresource Technology, 2009, 100

- (13): 3293—3297.
- [5] 余 强, 庄新姝, 袁振宏, 等. 木质纤维素类生物质制取燃料及化学品的研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(4): 784—791.
- [5] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Research progress on fuel and chemicals production from lignocellulose biomass [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2012, 31(4): 784—791.
- [6] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (13): 4851—4861.
- [7] 余 强,庄新姝,袁振宏,等.高温液态水两步预处理提高桉木酶解率[J].太阳能学报,2011,32(8):1129—1133.
- [7] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, et al. Liquid hot water pretreatment of eucalyptus grandis to enhance enzymatic digestibility of cellulose [J]. Acta Energiae Solaris Sinica, 2011, 32(8): 1129—1133.
- [8] Zhuang Xinshu, Wang Wen, Yu Qiang, et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products[J]. Bioresource Technology, 2016, 199: 68— 75.
- [9] Mosier N, Hendrickson R, Ho N, et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover [J]. Bioresource Technology, 2005, 96 (18): 1986— 1993.
- [10] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. Technical Report NREL/TP-510-42623, 2008.
- [11] Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, Ma Longlong, et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water [J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(5): 578—582.
- [12] Sixta H. Handbook of pulp [M]. Weinheim, Germany: Wiley-vch, 2006.
- [13] 陈嘉翔. 制浆化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990: 230—235.
- [13] Chen Jiaxiang. Pulping chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1990; 230—235.
- [14] Yu Qiang, Zhuang Xinshu, Lyu Shuangliang, et al. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes [J]. Bioresource Technology, 2013, 129(2): 592—598.

LIQUID HOT WATER PRETREATMENT OF GARDEN WASTE TO ENHANCE ITS ENZYMATIC DIGESTIBILITY

Bian Shixiang^{1,2}, Yu Qiang², Zhuang Xinshu², Wang Qiong², Zhu Yinping^{1,2}, Yuan Zhenhong^{2,3}

- (1. Nano Science and Technology Institute, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;
- $2.\ Guangzhou\ Institute\ of\ Energy\ Conversion\ ,\ Key\ Laboratory\ of\ Renewable\ Energy\ ,\ Chinese\ Academy\ of\ Sciences\ ,$

Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Guangzhou 510640, China;

3. Collaborative Innovation Center of Biomass Energy, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to explore the energy reuse potential of garden waste, Bauhinia blakeana Dunn branches and Zoysia tenuifolia waste were selected as raw materials, and they were pretreated with liquid hot water to obtain the process optimization results and improve the enzymatic digestibility. The results indicated that the optimal P-factor of Bauhinia blakeana Dunn branches and Zoysia tenuifolia waste was 1233 and 153 respectively. At this time, the Bauhinia blakeana Dunn branches and Zoysia tenuifolia waste got total xylose yield of 85.48% and 68.40%, total sugar recovery of 87.84% and 86.31%, and 72 h enzymatic digestibility of 81.25% raised from 43.99% and 87.27% raised from 55.94% respectively, in addition, Zoysia tenuifolia waste had better properties of enzymatic hydrolysis than Bauhinia blakeana Dunn branches. Liquid hot water pretreatment removed a large number of hemicelluloses and some lignin, there was a significant change in surface structure after pretreatment, and it also increased the specific surface area and cellulose crystallinity index, all of the changes could help to improve the accessibility of cellulose to enzyme and increase the enzymatic digestibility.

Keywords: biomass; enzymatic hydrolysis; bioethanol; pretreatment