

doi:10.3969/j.issn.1673-5854.2016.03.007

· 研究报告——生物质能源 ·

芒草酸/碱预处理副产物的生成及 对乙醇发酵的影响

佘胜利^{1,2,3}, 李鸣^{1,2}, 贾军^{1,4}, 李庆^{1,5}, 郝勃^{1,2}, 王艳婷^{1,4}, 彭良才^{1,2,4}, 涂媛苑^{1,4*}

(1. 华中农业大学 生物质与生物能源研究中心, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 3. 凯里学院 环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556011; 4. 华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 5. 华中农业大学 理学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:研究了不同浓度酸/碱预处理下芒草预处理上清液中副产物的生成和预处理上清液发酵产乙醇的规律,并对预处理副产物与乙醇发酵的关系进行了相关性分析。结果表明:酸/碱预处理上清液中预处理副产物浓度差异较为明显,酸处理产生的糠醛、5-羟甲基糠醛浓度明显高于碱处理,而碱处理上清液中丁香酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸浓度明显大于酸处理;预处理上清液补糖发酵中,1% H₂SO₄ 预处理上清液糖醇转化效率高于 10 g/L NaOH 预处理,半纤维素含量高和木质素含量低的材料具有较高的糖醇转化效率;糖醇转化效率与相应预处理上清液中副产物浓度相关性分析显示,糖醇转化效率与 5-羟甲基糠醛呈极显著正相关,相关系数达 0.795,与香草醛和丁香酸分别表现为极显著和显著负相关,相关系数分别为-0.811 和-0.671。

关键字:芒草;预处理副产物;化学预处理;乙醇发酵;糖醇转化效率

中图分类号:TQ35;TK6

文献标识码:A

文章编号:1673-5854(2016)03-0041-05

Effects of Byproducts Obtained from Alkali or Acid Pretreatment of *Miscanthus* Biomass on Yeast Fermentation

SI Sheng-li^{1,2,3}, LI Ming^{1,2}, JIA Jun^{1,4}, LI Qing^{1,5}, HAO Bo^{1,2}, WANG Yan-ting^{1,4},
PENG Liang-cai^{1,2,4}, TU Yuan-yuan^{1,4}

(1. Biomass and Bioenergy Research Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. College of Environment and Life Science, Kaili University, Kaili 556011, China; 4. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 5. College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract:Total supernatants were obtained from various alkali or acid pretreatments of *Miscanthus* biomass in order to detect the released byproducts and the ethanol production by yeast fermentation. And the correlations of byproducts and ethanol fermentation were analyzed. The results showed that concentrations of byproducts in supernatant obtained by different pretreatments were different. The contents of furfural and 5-hydroxymethylfurfural of acid pretreatment were higher than those of alkali pretreatment. And the contents of vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid of alkali preteratment were higher. In the feeding glucose fermentaion of supernatant, the sugar-alcohol conversion efficiency of 1 % H₂SO₄ pretreatment was higher than that of 10 g/L NaOH. The hemicelluloses and lignin contents in raw *Miscanthus* biomass materials respectively exhibited positive and negative effects on sugar-ethanol conversion rate. Correlative analysis indicated that vanillin and syringic acid exhibited negative effects on ethanol production, while 5-HMF was a positive factor.

Key words:*Miscanthus*; byproduct; chemical pretreatment; yeast fermentation; sugar-ethanol conversion rate

收稿日期:2015-10-13

基金项目:教育部、国家外国专家局高等学校学科创新引智计划项目(B08032);教育部“长江学者”科研启动项目(52204-07022);中央高校基本科研业务费专项基金(2662015PY018)

作者简介:佘胜利(1982—),男,山东郓城人,讲师,博士,研究方向为生物质资源与纤维乙醇转化;E-mail:shengli_si@163.com

* 通讯作者:涂媛苑,女,高级工程师,研究领域为生物质与生物能源;E-mail:yuant@mail.hzau.edu.cn.

木质纤维素是生产燃料乙醇的重要原料之一,然而植物细胞中复杂多样的细胞壁结构形成了抗降解屏障,严重制约了纤维质材料的综合利用和纤维乙醇的生物转化^[1-2]。植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素构成,纤维素是以 β -D-吡喃葡萄糖为基本单元的直链均一聚糖,半纤维素是以单糖分子为主链、单糖和糖酸及非碳水化合物基团为侧链形成的高度分支的杂多糖,木质素是由对羟基苯丙烷、愈创木基丙烷和紫丁香基丙烷3种单体相互连接形成的复杂大分子;纤维素、半纤维素和木质素分子间的相互作用使植物细胞壁形成排列紧密的规则结构,难以被降解与利用^[3-4]。纤维乙醇的生物炼制主要包括预处理、酶水解和发酵3个过程,其中预处理过程通过有效破坏植物细胞壁结构,促进可发酵糖的释放,从而提高纤维乙醇的生物转化效率,是纤维乙醇生产中的关键步骤^[5-6]。与此同时,预处理过程中会产生有机酸类、呋喃醛类和芳香类小分子物质等副产物,对酶解和发酵过程产生影响^[5,7]。芒草是禾本科芒属(*Miscanthus*)植物的总称,是一类多年生草本植物,具有生态适应性广、抗逆性强、光合效率高、生物质产量高等特点,是重要的能源植物^[8-9]。本研究对芒草不同浓度酸/碱预处理上清液中预处理副产物进行了检测,并对预处理上清液进行乙醇发酵实验,最后通过相关性分析研究副产物对乙醇发酵的影响。

1 实验

1.1 材料

200份芒草(*Miscanthus*)材料均收获于湖南农业大学芒属能源植物种质资源基地,收获后立即杀青,将干燥后的茎秆部分粉碎至粒径小于0.25 mm,混合均匀后60℃干燥至质量恒定,备用。根据细胞壁成分差异从200份芒草材料中筛选6个样品,分成3组(I、II和III),使每组芒草材料细胞壁组分纤维素、半纤维素、木质素的差异表现为单一变量。其中I组为:1#五节芒(*M. floridulus*)和2#芒(*M. sinensis*);II组为:3#紫芒(*M. purpurascens*)和4#荻(*M. sacchariflorus*);III组为:5#芒(*M. sinensis*)和6#南荻(*M. lutarioriparius*)。发酵菌种为耐高温高活性酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),购自安琪酵母股份有限公司。

1.2 细胞壁成分测定

细胞壁中纤维素和半纤维素测定按照 Peng 等^[10]的方法进行,总木质素测定按照 Xu 等^[11]的方法进行。

1.3 芒草酸/碱预处理

分别称取0.500 0 g芒草材料茎秆粉末置于15 mL离心管中,加入不同浓度NaOH或H₂SO₄溶液10.00 mL,混匀。酸处理时样品在120℃处理20 min,然后冷却至室温,再加热至50℃,在搅拌速度150 r/min下处理2 h;碱处理直接在50℃下以搅拌速度150 r/min处理2 h。处理结束后冷却至室温,离心收集上清液,测定上清液中五碳糖和六碳糖含量,剩余部分保存备用。每个处理重复3次,结果取平均值。

1.4 芒草酸/碱预处理上清液补糖发酵

分别称取0.500 0 g芒草样品茎秆粉末于15 mL离心管,分别加10.00 mL 10 g/L NaOH或体积分数1% H₂SO₄溶液,预处理过程同1.3节。用5.00 mL蒸馏水冲洗预处理残渣2次,将预处理上清液与2次水洗上清液混匀。分别用H₂SO₄溶液或NaOH溶液将混合液中和后调节pH值至4.8,并定容至20.00 mL。根据预处理产六碳糖数据补加葡萄糖至4.00 g。将上述20.00 mL预处理液完全转移至装有葡萄糖的试管中,发酵起始六碳糖质量浓度为200 g/L。发酵体系灭菌后,加入复水活化的酿酒酵母种子液1.00 mL,酿酒酵母发酵起始质量浓度为2 g/L,37℃静置发酵48 h,发酵结束后逐一蒸馏并测定乙醇含量,每个发酵体系重复3次,结果取平均值。

1.5 分析与检测

五碳糖、六碳糖和乙醇含量分析采用分光光度法,均按文献[5]中的方法进行测定。预处理副产物

测定在文献[12]的方法基础上有所调整,采用高效液相色谱(HPLC)进行,使用双元泵浓度梯度洗脱,流动相的无机相为体积分数0.05%磷酸溶液(pH值2.2~2.3),有机相为体积分数90%乙腈(含体积分数为0.05%的磷酸),有机相在流动相中的体积分数初始为8%,5 min至65 min逐渐增加到25%,73 min时增加到100%,74 min时回落到8%,平衡10 min后准备进下一个样品;流速为0.80 mL/min,柱温30℃,色谱柱为Universal C18反相柱(Kromat,4.6 mm×250 mm,5 μm),检测器为紫外检测器(210 nm)。

1.6 结果计算

1.6.1 糖醇转化效率及其差异 酿酒酵母发酵产乙醇的效率用糖醇转化效率表示,即发酵结束时乙醇的实际产量与发酵体系中所有可发酵糖完全转化为乙醇时的理论产量的比值。同一芒草材料的酸预处理与碱预处理上清液乙醇发酵的糖醇转化效率差异,用两者糖醇转化率数值之差除以较低数值得到的百分比来表示。

1.6.2 相关性分析 预处理副产物浓度与糖醇转化效率的相关性分析以相关系数表示,相关系数的计算通过SPSS软件进行Spearman相关性分析获得。

2 结果与分析

2.1 芒草细胞壁成分测定结果

6份芒草材料根据细胞壁成分不同分为3组,如表1所示。I、II、III组材料分别在纤维素、半纤维素、木质素含量上具有显著差异,达58.86%、33.28%、31.98%,各组材料中其他成分含量基本一致。

表1 芒草细胞壁成分组成

组号 group	编号 No.	纤维素 cellulose	差异 differences	半纤维素 hemicelluloses	差异 differences	木质素 lignin	差异 differences
I	1 [#]	21.93±0.50	58.86	16.81	0.55	23.20±0.36	0.71
	2 [#]	34.84±1.35		16.90		23.03±0.88	
II	3 [#]	31.70±0.33	1.67	15.58	33.28	28.31±0.19	1.14
	4 [#]	31.18±0.97		20.76		27.99±0.54	
III	5 [#]	34.57±0.41	0.09	20.89	1.16	23.57±0.24	31.98
	6 [#]	34.54±1.00		21.14		31.10±0.98	

2.2 芒草酸/碱预处理上清液副产物含量

对6份芒草材料分别进行体积分数为0.25%、1%、4% H₂SO₄和质量浓度为5、10、40 g/L NaOH预处理,并对预处理上清液中的副产物含量进行HPLC测定,各预处理副产物浓度范围见表2。其中10 g/L NaOH和1% H₂SO₄预处理上清液中副产物浓度见表3。

表2 芒草材料在不同浓度NaOH和H₂SO₄预处理上清液中副产物浓度范围

Table 2 Range of byproducts concentration from pretreatment supernatants of *Miscanthus* with alkali and acid in various concentration

副产物 byproducts	不同预处理时的浓度 content of different pretreatment/(μmol·L ⁻¹)	
	酸预处理 H ₂ SO ₄ pretreatment	碱预处理 NaOH pretreatment
甲酸 formic acid(FoA)	778.52~6263.83	1280.30~6143.11
乙酸 acetic acid(AA)	1357.44~7485.49	2469.22~6707.32
5-羟甲基糠醛 5-hydroxymethylfurfural(HMF)	17.63~4679.78	0~90.65
糠醛 furfural(Fur)	0.08~996.55	10.86~176.46
4-羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid(HA)	3.28~38.04	13.65~37.66
香草酸 vanillic acid(VA)	10.48~69.37	21.98~51.21
丁香酸 syringic acid(SA)	7.58~15.81	23.23~64.97
4-羟基苯甲醛 4-hydroxybenzaldehyde(H)	10.49~73.60	18.46~94.70
香草醛 vanillin(G)	12.45~52.05	23.27~96.31
丁香醛 syringaldazine(S)	4.04~28.64	5.97~66.51
对香豆酸 p-coumaric acid(pCA)	42.99~738.15	555.00~2815.56
阿魏酸 ferulic acid(FeA)	25.70~202.87	224.54~906.11
芥子酸 sinapic acid(SiA)	1.76~18.91	1.41~18.97

表 3 10 g/L NaOH 和 1 % H₂SO₄ 预处理上清液中副产物浓度

预处理 pretreatment	组号 group	编号 No.	FoA	AA	HMF	Fur	HA	VA	SA	H	G	S	pCA	FeA	SiA
10g/L NaOH	I	1 [#]	3372.78	6707.32	80.25	27.79	30.09	46.73	36.49	32.54	25.15	7.47	1494.52	780.24	8.77
		2 [#]	1855.39	3919.03	15.51	10.86	37.66	32.50	47.18	32.50	32.20	9.03	1704.99	574.45	16.92
	II	3 [#]	6143.11	3921.32	—	46.93	31.85	36.07	37.90	26.74	59.33	20.08	1669.56	570.84	18.97
		4 [#]	1280.30	2753.02	5.98	38.34	21.34	29.92	32.25	39.01	40.22	18.65	1219.67	484.61	8.04
	III	5 [#]	2054.00	4131.67	33.38	34.94	24.68	29.87	30.62	19.50	34.22	9.41	1556.42	583.37	11.31
		6 [#]	2889.70	2924.73	—	156.62	28.18	51.21	64.97	94.70	84.26	66.51	2130.77	906.11	17.30
1% H ₂ SO ₄	I	1 [#]	3224.80	2674.46	4679.78	143.18	21.76	49.39	9.53	32.11	22.53	12.11	384.96	202.87	3.00
		2 [#]	2268.65	2644.55	1959.31	96.37	15.98	29.01	9.38	24.26	16.96	10.13	345.74	134.93	4.51
	II	3 [#]	1070.88	2367.39	46.10	68.26	16.64	22.00	10.95	18.26	31.33	17.12	377.00	174.12	2.86
		4 [#]	876.46	2164.98	61.24	52.44	9.36	16.18	9.14	17.18	24.93	12.58	283.20	130.74	2.11
	III	5 [#]	1477.19	2179.79	882.51	11.18	10.04	20.65	8.21	19.87	23.83	11.59	337.17	153.23	1.88
		6 [#]	1509.42	2154.45	62.69	115.92	10.66	33.33	11.16	35.76	35.47	20.12	441.45	201.97	4.73

从表 2 和表 3 可以看出:在酸/碱预处理条件下,副产物浓度差异较大;酸处理产生的乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛浓度范围明显大于碱处理,说明酸处理过程中半纤维素的乙酰基脱除作用和五碳糖、六碳糖的降解程度差别较大;碱处理中丁香酸、对香豆酸、阿魏酸的浓度范围明显大于酸处理,说明碱处理过程中木质素衍生物的降解存在个体差异,可能受细胞壁结构与化学键连接方式影响。酸/碱预处理副产物浓度的差异与酸处理断裂醚键、水解多糖分子并使单糖分子发生降解而碱预处理破坏木质素的分子结构及其形成的酯键有关。总体上看,酸处理上清液中 5-羟甲基糠醛、糠醛浓度明显高于碱处理,碱处理上清液中丁香酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸浓度明显高于酸处理。

在碱处理和酸处理上清液中,对香豆酸和阿魏酸浓度明显高于其他芳香类副产物,说明这两种物质的释放量和在原材料中的含量较高,与 Xu 等^[12]研究中禾本科植物中对香豆酸、阿魏酸含量较高相一致。碱处理上清液中,5-羟甲基糠醛、糠醛浓度较低,而甲酸含量较高,可能是由于 5-羟甲基糠醛和糠醛不稳定进一步降解为甲酸所致;而在酸处理上清液中,甲酸、5-羟甲基糠醛、糠醛浓度都比较高,说明 5-羟甲基糠醛和糠醛大量降解为甲酸的同时,酸处理比碱处理有更多的五碳糖、六碳糖发生降解。

2.3 预处理上清液补糖发酵

对 3 组芒草材料酸/碱预处理上清液进行补糖发酵产乙醇,糖醇转化效率见表 4。

表 4 预处理上清液发酵糖醇转化效率

Table 4 Sugar-ethanol conversion rate of fermentation by the supernatant of pretreatment

组号 group	编号 No.	糖醇转化效率 sugar-ethanol conversion rate/%		糖醇转化效率差异/% differences of sugar-ethanol conversion
		10 g/L NaOH 预处理 alkali pretreatment	1 % H ₂ SO ₄ 预处理 acid pretreatment	
I	1 [#]	58.98±1.91	67.10±0.00	13.76
	2 [#]	57.71±0.84	65.42±1.84	13.37
II	3 [#]	50.09±1.49	53.07±1.81	5.95
	4 [#]	53.12±0.48	60.08±0.96	13.11
III	5 [#]	59.61±2.88	71.08±0.65	19.23
	6 [#]	54.38±1.27	54.95±1.27	1.06

3 组材料中,1 % H₂SO₄ 预处理上清液补糖发酵的糖醇转化效率均高于 10 g/L NaOH 预处理,且部分达到显著水平,说明酸处理的产物对发酵抑制作用的累加效应小于碱处理。结合表 1 中芒草细胞壁组分的差异,I 组材料中,纤维素含量低的材料 1[#]糖醇转化效率与高材料 2[#]的基本一致,说明虽然纤维素含量会影响副产物的释放与生成,但在各种副产物的累加作用下,糖醇转化效率所受影响并不明显;II 组芒草材料中,半纤维素含量低的材料 3[#]糖醇转化效率明显低于高材料 4[#],说明富含半纤维素的芒草材料可以通过限制预处理过程中副产物的产生降低对预处理上清液补糖发酵的抑制作用;III 组芒草

材料中,低木质素含量材料 5[#]的糖醇转化效率明显高于高材料 6[#],因此富含木质素的材料也是通过预处理副产物的生成对发酵产生较强抑制作用;在 II 和 III 组芒草材料中,组内高低材料在酸处理上清液补糖发酵的糖醇转化效率差异明显,说明半纤维素和木质素浓度的差异对酸处理时副产物的生成与释放影响较大,而副产物对发酵的影响机理与特点有待于进一步研究。

2.4 预处理副产物与糖醇转化效率相关性分析

6 种芒草材料不同预处理上清液中各副产物的浓度和各上清液补糖发酵的糖醇转化效率都具有明显差异,对糖醇转化效率与相应预处理上清液中副产物浓度共 12 组数据进行相关性分析,研究预处理副产物对乙醇发酵的影响。各副产物与糖醇转化效应的相关系数分别为 $R_{\text{FolA}} - 0.035$ 、 $R_{\text{AA}} - 0.245$ 、 $R_{\text{HMF}} 0.795$ 、 $R_{\text{Fur}} - 0.105$ 、 $R_{\text{HA}} - 0.329$ 、 $R_{\text{VA}} - 0.811$ 、 $R_{\text{SA}} - 0.552$ 、 $R_{\text{H}} - 0.427$ 、 $R_{\text{C}} - 0.280$ 、 $R_{\text{S}} - 0.671$ 、 $R_{\text{pCA}} - 0.545$ 、 $R_{\text{FeA}} - 0.385$ 和 $R_{\text{SiA}} - 0.573$ 。在预处理上清液补糖发酵实验中,糖醇转化效率与 5-羟甲基糠醛表现为极显著正相关,与香草醛、丁香酸呈显著负相关;甲酸、乙酸、糠醛与糖醇转化效率的相关性较低,远未达到显著水平;丁香醛、对香豆酸、芥子酸等芳香类副产物与糖醇转化效率的相关性虽未达到显著水平,但相关系数绝对值均超过了 0.50,说明对发酵的影响较大。

3 结论

3.1 以不同浓度酸/碱对芒草进行预处理,研究了预处理上清液中副产物的变化情况,发现酸/碱预处理上清液中副产物的浓度差异明显,酸处理产生的糠醛、5-羟甲基糠醛浓度明显高于碱处理,而碱处理上清液中丁香酸、对香豆酸、阿魏酸浓度明显大于酸处理,说明酸/碱预处理对细胞壁降解具有不同的作用机理。

3.2 对预处理上清液进行补糖发酵,发现纤维素差异的材料糖醇转化效率差别不大,半纤维素含量高与木质素含量低材料具有较高糖醇转化效率,说明细胞壁组分对乙醇发酵产生影响,而这种影响取决于不同预处理产物对发酵作用的累加效应。

3.3 糖醇转化效率与相应预处理上清中副产物浓度相关性分析显示糖醇转化效率与 5-羟甲基糠醛呈极显著正相关,相关系数达 0.795;糖醇转化效率与香草醛、丁香酸分别表现为极显著和显著负相关,相关系数分别为 -0.811 、 -0.671 。

参考文献:

- [1] CHEN Peng, PENG Liang-cai. The Diversity of Lignocellulosic Biomass Resources and Their Evaluations for Use as Biofuels and Chemicals [M] // SUN Jian-zhong, DING Shi-you, PETERSON J. Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals. London: The Royal Society of Chemistry, 2013: 83-109.
- [2] 王艳婷,徐正丹,彭良才. 植物细胞壁沟槽结构与生物质利用研究展望[J]. 中国科学:生命科学,2014,44(8):766-774.
- [3] LI Feng-cheng, REN Shuang-feng, ZHANG Wei, et al. Arabinose substitution degree in xylan positively affects lignocellulose enzymatic digestibility after various NaOH/H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus* [J]. Bioresour Technol, 2013, 130: 629-637.
- [4] 关倩,蒋剑春,徐俊明,等. 木质纤维生物质热化学转化预处理技术研究进展[J]. 生物质化学工程,2014,48(6):56-61.
- [5] LI Ming, SI Sheng-li, HAO Bo, et al. Mild alkali-pretreatment effectively extracts guaiacyl-rich lignin for high lignocellulose digestibility coupled with largely diminishing yeast fermentation inhibitors in *Miscanthus* [J]. Bioresour Technol, 2014, 169: 447-454.
- [6] 闭帅珠,彭英才,陈克利. 蔗渣纤维素乙醇的预处理技术研究进展[J]. 生物质化学工程,2016,50(2):53-60.
- [7] 朱圆圆,杨金龙,朱均均,等. 稀硫酸-氢氧化钙联合预处理玉米秸秆制乙醇[J]. 林产化学与工业,2015,35(6):89-95.
- [8] 范希峰,左海涛,侯新村,等. 芒和荻作为草本能源植物的潜力分析[J]. 中国农学通报,2010,26(14):381-387.
- [9] 王闯,庄新姝,袁振宏,等. 纤维素燃料乙醇产业发展现状与展望[J]. 林产化学与工业,2014,22(4):144-150.
- [10] PENG Liang-cai, HOCART C, REDMOND J, et al. Fractionation of carbohydrates in *Arabidopsis* root cell walls shows that three radial swelling loci are specifically involved in cellulose production [J]. Planta, 2000, 211(3): 406-414.
- [11] XU Ning, ZHANG Wei, REN Shuang-feng, et al. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5: 58.
- [12] XU Feng, SUN Run-cang, SUN Jin-xia, et al. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 552(1/2): 207-217.