

两步法预处理制备生物质燃料乙醇

王晓娟^{1,2}, 冯浩², 王斌², 李志义^{1*}

(1. 大连理工大学化工与环境生命学部, 大连 116023;

2. 伊利诺伊大学厄巴纳香槟分校 农业工程学院 美国 伊利诺伊州 香槟 61801)

摘要: 为了扩展燃料乙醇制备的预处理工艺的发展方向, 该文针对燃料乙醇制备的 2 种新预处理方法——半纤维素分离两步预处理法和木质素分离两步预处理法进行了试验研究。分别以能源植物柳枝稷和农业废弃物玉米秸秆为原料, 考查了这 2 种方法对酶水解过程中糖产量的影响。结果表明, 半纤维素分离两步预处理法对柳枝稷的较优处理条件为: 第一步预处理用 3% 质量分数的过氧化氢溶液在 50℃ 处理 16 h, 第二步预处理用去离子水在 121℃ 处理 30 min, 最终酶水解可获得 89% 的纤维素转化率; 木质素分离两步预处理法对玉米秸秆的较优处理条件为: 第一步预处理用碱性乙醇溶液 (1% 质量分数氢氧化钠和 70% 质量分数乙醇) 在 80℃ 处理 2 h, 第二步预处理为去离子水在 135℃ 处理 30 min, 最终酶水解可获得 83% 的纤维素转化率; 扫描电镜观察, 柳枝稷和玉米秸秆的纤维束均被破坏, 纤维素酶的作用面积得到提高。同时, 分离提取了部分半纤维素和木质素, 可以回收提纯, 应用于高附加值化学产品的制备。这一结果表明, 这 2 种方法为实现燃料乙醇制备工程工业化提供依据。

关键词: 燃料, 乙醇, 木质纤维素类生物质, 两步法预处理, 糖转化率

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2012.05.033

中图分类号: S216.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2012)-05-0194-07

王晓娟, 冯浩, 王斌, 等. 两步法预处理制备生物质燃料乙醇[J]. 农业工程学报, 2012, 28(5): 194-200.

Wang Xiaojuan, Feng Hao, Wang Bin, et al. Investigation of two-step pretreatment method for production of ethanol from lignocellulosic biomass[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(5): 194-200. (in Chinese with English abstract)

0 引言

利用生物质原料制备燃料乙醇的工艺主要有 3 步: 预处理, 水解, 发酵。预处理过程的目的就是瓦解木质素和半纤维素对纤维素的保护结构, 打破纤维素本身的晶体结构, 使之在后续酶水解过程中可以与酶充分接触, 取得较好的糖化效果。评估预处理方法有效性的标准有: 为水解过程和发酵过程提供易转化的底物; 控制木聚糖的损失; 发酵抑制物产量较低; 过程条件简单和预处理试剂价格低廉或易回收^[1-2]。Wyman 等^[3]的研究表明, 预处理是整个工艺过程中最昂贵的一步, 并对水解和发酵的效果与成本有重要影响。近年来, 科研人员开发了许多预处理工艺, 如机械研磨法、蒸汽爆破法、稀酸法、氨爆法, 碱法、热水法和有机溶剂法等^[4-5]。

现有的方法存在以下不足: 在预处理条件比较苛刻时 (高温、高压和长预处理时间), 才能获得较高的纤维素-葡萄糖转化率; 与此同时, 部分半纤维素会在预处理过程中发生降解, 形成糠醛和 5-羟甲基-2-糠醛 (5-hydroxymethyl furfural, HMF) 等发酵抑制物; 木质素也会发生降解形成小分子芳香化合物, 同样对发酵过程

的微生物有毒性。去除这些降解产物对发酵过程的影响, 需在发酵前对水解液进行去毒, 不仅会浪费生物质原料中的半纤维素和木质素成分, 还增加一道工序, 增加乙醇生产成本。因此, 现有的预处理方法的工业化发展受到了很大的限制, 目前还没有一项预处理技术可以实现大规模工业化生产。从预处理技术发展现状来看, 其未来的发展方向重点在于绿色环保和节能高效, 即控制预处理过程中化学试剂的使用和综合利用纤维素生物质的各个组分, 提高过程的经济可行性^[5]。

有研究者参考现代石油工业精炼过程, 提出了“生物精炼”的概念。其目的在于充分利用生物质原料的各个组分, 在制备燃料乙醇发酵所需的糖分的同时, 制备一些附加值高的化学产品^[6]。

针对“生物精炼”这一概念, 本文提出 2 种新的预处理方法^[7-9]。第一种方法是半纤维素分离两步预处理法。先利用过氧化氢溶液提取部分半纤维素, 剩余的纤维素富集产物用于燃料乙醇的制备。提取的半纤维素可以分离回收, 制备木寡糖 (xylooligosaccharide)。木寡糖是可以应用于医药工业和食品工业的高附加值产品。这一预处理工艺过程已申请专利^[9]。第二种方法是木质素分离两步预处理法。先利用碱性有机溶液提取木质素, 剩余的纤维素和半纤维素富集产物用于燃料乙醇的制备。提取出的木质素可以分离提纯, 应用于地膜、高分子化工材料等功能材料的制备^[5]。

本文利用柳枝稷和玉米秸秆 2 种原料分别考察半纤维素分离两步预处理法和木质素分离两步预处理法的处

收稿日期: 2010-12-30 修订日期: 2011-10-25

作者简介: 王晓娟 (1980—), 女, 大连理工大学和伊利诺伊大学联合培养博士研究生。大连 大连理工大学化工与环境生命学部, 116023。

Email: janefarefox@gmail.com

※通信作者: 李志义 (1959—), 男, 甘肃天水人, 博士, 主要研究方向为能源化工, 超临界流体, 超高压食品处理。大连 大连理工大学, 化工机械学院, 116024。Email: lizy@dlut.edu.cn

理效果，以期扩展预处理工艺研究方向、实现生物精炼工艺提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

柳枝稷和玉米秸秆原料由美国伊利诺伊大学厄巴纳香槟分校 (University of Illinois at Urbana & Champaign) 生物能源研究所提供。原料组分依据美国可再生能源实验室的标准方法测定^[10-12]，结果为：柳枝稷各组分的质量分数为 32%葡聚糖、28%木聚糖和 17%木质素；玉米秸秆各组分的质量分数为 41%葡聚糖、20%木聚糖和 17%木质素。柳枝稷的半纤维素含量较高，以其为原料考察半纤维素分离两步预处理法的处理效果；玉米秸秆的木质素含量与半纤维素含量相近，以其为原料木质素分离两步预处理法。所有原料经 Thomas-Wiley 磨盘 (model 4) 研磨，收集通过 1 mm 网筛的生物质颗粒作为试验原料。

纤维素酶 (Spezyme CP) 和葡聚糖酶 (Novo 188) 购于 Sigma-Aldrich 公司。酶活性的测定依据美国可再生能源实验室的标准方法和相关参考文献完成^[13-15]。

乙醇 (99%质量分数) 和氢氧化钠 (分析纯)，购于美国 Fisher Scientific 公司。

1.2 方法与设备

1.2.1 半纤维素分离两步预处理法

半纤维分离两步预处理法的第一步，利用过氧化氢的碱溶液提取柳枝稷原料中部分半纤维素和木质素；第二步是热水法预处理。通过预试验确定试验条件如表 1 所示。

表 1 半纤维素分离和木质素分离两步预处理法的试验条件
Table 1 Experimental conditions of hemicellulose separation two-step pretreatment and lignin separation two-step pretreatment

步骤	半纤维素分离两步预处理法	木质素分离两步预处理法
第一步预处理	固液比 5% (质量分数)；过氧化氢溶液浓度为 1%，2%和 3% (质量分数)；处理时间 16, 24 和 36 h；pH 值为 11.5；温度为 50℃；摇床转速为 150 r/min	固液比 9% (质量分数)；碱性乙醇溶液浓度为 1% NaOH 和 70%乙醇 (质量分数)；温度 80℃；时间 2 h；摇床转速 150 r/min
第二步预处理	固液比 12.5% (质量分数)；去离子水处理；温度 121℃；处理时间 30 min	固液比 10% (质量分数)；去离子水处理；温度为 120, 135, 150 和 165℃；时间 30 min

第一步预处理和酶水解均在 C276 控温摇床 (型号 C276, 美国 New Brunswick Scientific 公司生产) 中进行。第二步预处理的设备为灭菌锅 (型号 STM-EL ELX, 美国 Market Forge Industries Inc. Everett 公司生产)。

1.2.2 木质素分离两步预处理法

木质素分离两步预处理法的第一步，利用碱性乙醇溶液去除玉米秸秆原料中部分木质素；第二步是利用管式反应器进行热水法预处理。通过预试验确定试验条件如表 1 所示。

第一步预处理和酶水解反应在 C276 控温摇床中进行。第二步预处理设备有：不锈钢管式反应器，长 177.8 mm，直径 25.4 mm；配置 TC-8D 温度控制仪的 SBL-2D 流化床 (型号 L-2D, 美国 Techne Inc. Burlington

公司生产)。

1.2.3 酶水解

柳枝稷和玉米秸秆经预处理后，剩余固体作为底物进行酶水解。为促进酶与底物的充分接触，水解过程也在 C276 控温摇床中进行，通过摇动可以实现酶溶液与底物的均匀混合。

柳枝稷的酶水解条件如下：固液比 10% (质量分数)，温度为 50℃，pH 值为 5，水解时间为 96 h；摇床转速为 200 r/min；纤维素酶和葡聚糖酶的用量分别为 15FPU 纤维素酶/g 葡聚糖和 40 U/g 葡聚糖。

玉米秸秆的酶水解条件如下：固液比 7% (质量分数)，温度为 50℃，pH 值为 5，水解时间为 96 h；摇床转速为 200 r/min；纤维素酶和葡聚糖酶的用量分别为 15 FPU 纤维素酶/g 葡聚糖和 40 U 葡聚糖酶/g 葡聚糖。

FPU (filter paper unit) 表示标准的 Whatman No.1 滤纸单元，指在 1 min 内，从一个标准滤纸单元中释放出 1 μmol 葡萄糖所需的酶用量。葡聚糖酶的活性单位 U 是指在 1 min 内，将 1 μmol 葡聚糖转化为 2 μmol 葡萄糖的酶用量。

纤维素转化率由下式确定

$$\text{纤维素转化率} = \frac{\text{葡萄糖的最终浓度 (g/L)} \times \text{水解液的体积 (L)}}{1.11 \times \text{最初生物质中纤维素的含量 (g)}} \%$$

式中，1.11 为纤维素的转化系数

1.2.4 检测仪器

水解液中的糖浓度和发酵抑制物浓度由高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司生产) 测定。液相色谱系统有 e2695 分离单元和 Waters2414 检测单元组成。分离单元元件有：Aminex HPX-87P 色谱柱 (糖检测) 和 Aminex HPX-87H 色谱柱 (抑制物检测)；Carbo-P 桥型保护柱。检测单元为示差折光检测器。

柳枝稷和玉米秸秆在不同预处理阶段的样品 (未处理的、第一步预处理后的和第二步预处理后的) 经过不同体积分数的乙醇溶液 (25%、50%、70%、95%和 100%) 的梯度脱水处理后，经过超临界二氧化碳临界干燥器 (型号 Samdri-PVT-3D, 美国 Tousimis Research Corporation 公司生产) 干燥。利用涡轮增压镀膜仪 (型号 Denton Vacuum, 美国 Moorestown 生产) 将干燥后的样品镀上金/钼层，以便进行电镜检测。扫描电镜图片 (SEM) 利用环境扫描电镜 (型号 Philips XL30 ESEM-FEG, 荷兰 FEI Company 生产) 获得。

2 结果与分析

2.1 半纤维素分离两步预处理法的结果与分析

图 1 是在不同预处理条件下，柳枝稷水解过程的糖质量浓度变化图。可见，在预处理时间相同的情况下，随着过氧化氢溶液浓度的升高，葡萄糖 (glucose) 在水解液中的最终浓度随之升高。如图 1a 中，第一步预处理时间为 16 h 时，当过氧化氢质量分数为 1% 时，水解液中最终的葡萄糖质量浓度为 24.7 g/L；当过氧化氢质量分数

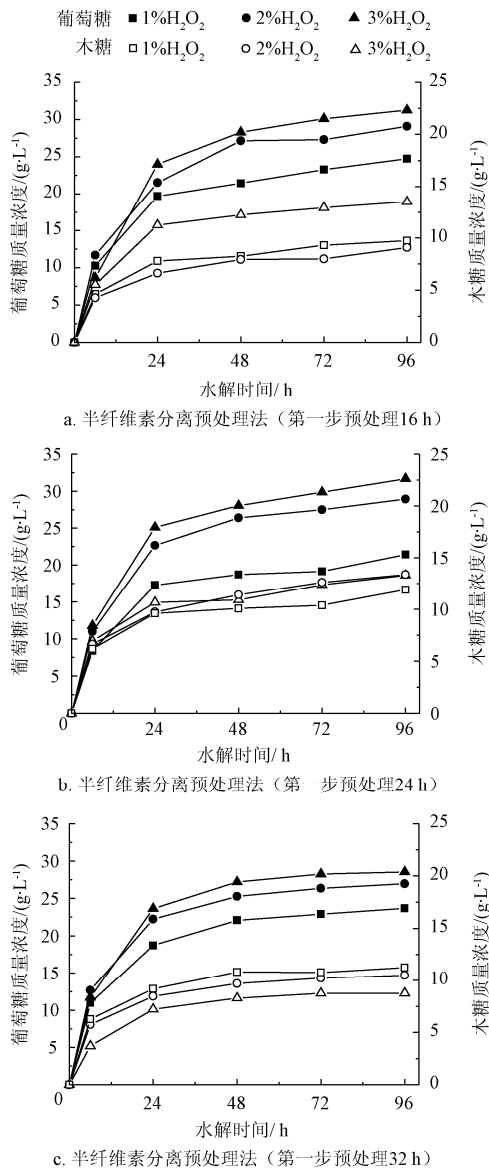


图1 半纤维素分离两步预处理法对柳枝稷水解过程糖质量浓度的影响

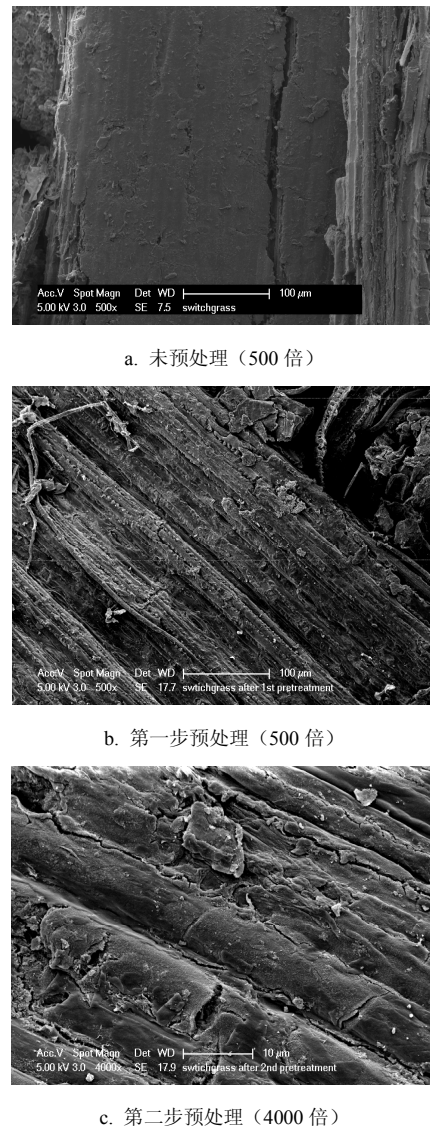
Fig.1 Effects on enzymatic hydrolysis of switchgrass pretreated by hemicellulose separation two-step pretreatment method

为 2% 时, 水解液中的最终葡萄糖质量浓度为 29 g/L; 当过氧化氢质量分数升高到 3% 时, 水解液中葡萄糖的最终浓度为 31.3 g/L。在第一步预处理时间为 24 h 和 32 h 时, 糖浓度变化趋势相同。但在第一步预处理时间相同的情况下, 过氧化氢质量分数从 1% 提高到 2% 时, 水解液中葡萄糖的最终浓度有很大提高; 而当过氧化氢质量分数从 2% 提高到 3% 时, 水解液中葡萄糖的最终浓度提高幅度相对较小。由此可见, 当过氧化氢质量分数达到一定值 (高于 2%) 时, 提高其质量分数对预处理效果没有明显作用。图 1b 中所示, 过氧化氢质量分数为 2%, 当预处理时间为 16 h 时, 可以获得葡萄糖质量浓度为 29 g/L 的水解液; 当预处理时间为 24 h 时, 获得的水解液中的最终葡萄糖质量浓度为 28.9 g/L; 而当预处理时间为 32 h 时, 可以获得葡萄糖质量浓度为 27 g/L 的水解液。由此可见, 当过氧化氢溶液质量分数为 3% 时, 随着第一步预

处理时间的延长, 水解液中葡萄糖的最终浓度降低。在过氧化氢溶液质量分数为 1% 和 2% 时, 也获得同样趋势。这是由于, 当过氧化氢溶液浓度不变的情况下, 延长预处理时间, 随着半纤维素和木质素的部分去除, 有一小部分纤维素也损失了。在 3% 质量分数的过氧化氢溶液处理 16 h 时, 纤维素的转化率达到最高值 89%。

对水解液中木糖 (xylose) 的最终浓度而言 (图 1), 在第一步预处理时间不变的情况下, 预处理时间为 16 h 和 24 h 时, 过氧化氢溶液浓度的提高对其影响不大。而当预处理时间为 32 h 时, 随着过氧化氢溶液的浓度升高, 水解液中木糖的最终质量浓度明显下降, 分别为 14 g/L (1% 过氧化氢溶液)、13 g/L (2% 过氧化氢溶液) 和 9 g/L (3% 过氧化氢溶液)。

图 2 为在预处理过程中, 不同阶段柳枝稷样品的电镜图片, 可以看出半纤维素分离两步预处理法对生物质表面特性的影响。



注: 第一步预处理为 3% 过氧化氢溶液 50℃ 处理 16 h

图2 半纤维素分离两步预处理法不同阶段柳枝稷样品的电镜分析图片

Fig.2 SEM images of switchgrass samples at different steps in hemicellulose separation two-step pretreatment process

如图 2 所示，未经处理的柳枝稷样品微粒表面光洁，纤维呈束状，排列紧密，并且纤维束为粗大型，完全展现了纤维素、半纤维素和木质素紧密联结所形成的致密结构。当第一步预处理结束后，经过了碱性过氧化氢溶液浸泡，柳枝稷样品微粒表面呈杂乱状，粗大的纤维束分散成相对较小的纤维束，并且整体结构松散，表面杂乱，可以推断木质素和半纤维素形成的纤维素保护层被破坏，纤维素暴露面积必然增大。第一步预处理所得固体残余物的组分分析结果表明，柳枝稷原料中 99% 的纤维素和 69% 的半纤维素被保留，也证明了半纤维素的保护结构被破坏这一推断。在第二步预处理之后，可以清晰看到生物质表面出现裂痕，粗糙不平，这十分有利于酶与纤维素的充分接触。对这一固体进行组分分析，结果表明，部分纤维素发生了降解，而在第二步预处理所得的液体部分中，葡萄糖和木糖的质量浓度低于 1 g/L，说明降解了的纤维素以多聚糖的形式存在于溶液中，因此第二步预处理对纤维素的晶体结构产生了一定的破坏作用。

第一步预处理结束后，从所得的半纤维素和木质素提取液中，依据相关参考文献的方法^[17]，分离回收了 80% 以上的半纤维素。

第一步预处理的最佳条件是在固液比为 5% (质量分数) 时，用 3% 质量分数的过氧化氢溶液处理柳枝稷 16 h，温度和 pH 值分别为 50℃ 和 11.5。第一步预处理后，将混合物离心所得的上清液，可以用于分离提纯半纤维素，已有成熟相关的技术应用于工程领域^[16]。第二步预处理为灭菌锅处理，有通用的设备，所得的混合物可以直接进行酶水解。省略了传统预处理工艺后续的离心和去毒工序，在一定程度上降低了过程的复杂性和成本。因此，半纤维素分离预处理法的工业应用具有一定的发展潜力。

2.2 木质素分离两步预处理法的结果与分析

表 2 为木质素分离两步预处理法在不同条件下处理玉米秸秆所获得的葡萄糖和木糖的转化率。

表 2 木质素分离两步预处理法的糖转化率

Table 2 Sugar conversion yield of corn stover pretreated by lignin separation two-step pretreatment method

预处理条件		转化率/%	
第一步预处理	第二步预处理	葡萄糖	木糖
	120℃	79	46
如表 1 所述	135℃	83	47
	150℃	81	49
	165℃	80	48

可见，在第一步去除木质素之后，在相同处理时间情况下，随着第二步预处理温度的升高，葡萄糖和木糖转化率变化不是很大，最高的葡萄糖产率 83% 和最高木糖产率 49% 分别在 135℃ 和 150℃ 时获得。但最高的总糖浓度 (葡萄糖和木糖) 则在 135℃ 时获得，葡萄糖和木糖的质量浓度分别为 32 g/L 和 10 g/L。CAFI 小组以玉米秸秆为原料，考察了多种预处理方法的效果，其糖产率总结于表 3^[17-21]。

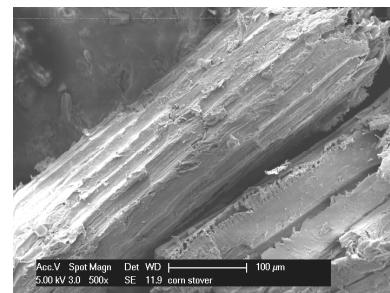
表 3 不同预处理方法处理的玉米秸秆的糖产率^[17-21]

Table 3 Sugar conversion yields of corn stover pretreated by different methods^[17-21]

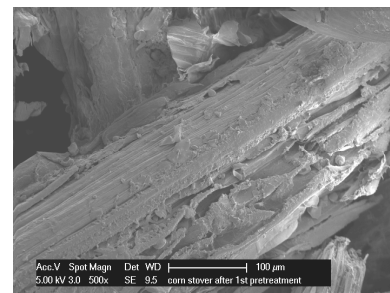
预处理方法	预处理条件	转化率/%	
		葡萄糖	木糖
稀酸法	固液比 5% 质量分数; 4.9% 质量分数稀硫酸; 160℃; 20 min	57.1	35.9
热水法	固液比 16% 质量分数; 190℃; 15 min	88	81
氨循环法	15% 质量分数液氨; 2.5 Mpa; 5.0 mL min ⁻¹ ; 60 min;	87.1	未提
氨爆法	湿度 60% 质量分数; 氨与生物质质量比为 100%; 90℃; 保压 5 min	93	78
石灰法	Ca(OH) ₂ 与生物质质量比为 50%; 55℃; 4 周	91.3	51.8

注：水解过程中酶用量为 15 FPU 纤维素酶 g⁻¹ 纤维素

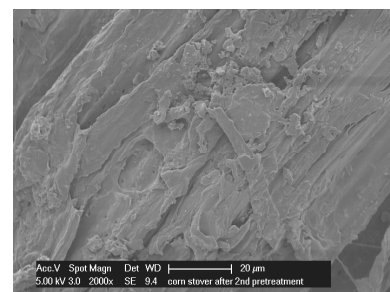
比较可以看出，除了稀酸法，其他方法可以获得较高的纤维素和半纤维素转化率。但其相对预处理条件也有一定的局限性：高温、需要保压、高湿度耗水、采用腐蚀性化学试剂或处理时间很长。这些问题也提高了预处理过程设备的要求。综合来看，本文提出的木质素分离两步法预处理条件相对要求较低，并且提高纤维素和半纤维素转化率的方面还有一定进步空间，值得深入研究。



a. 未预处理 (500 倍)



b. 第一步预处理 (500 倍)



c. 第二步预处理 (2000 倍)

注：第二步预处理温度为 135℃

图 3 木质素分离两步预处理法不同阶段玉米秸秆样品的电镜分析图片

Fig.3 SEM images of corn stover samples at different steps in lignin separation two-step pretreatment process

图 3 为在预处理过程中, 不同阶段玉米秸秆样品的电镜图片, 可以更直观的表明木质素分离两步预处理法对生物质的处理效果。未经处理的玉米秸秆纤维呈束状, 紧密联接在一起, 表面相对较光滑。在第一步预处理后, 部分木质素被碱性乙醇溶液溶解, 从图 3 中可以看出, 生物质表面变得粗糙, 结构看起来松散, 有孔洞的产生。在经过第二步预处理的玉米秸秆样品图片中, 可以看到第二步热水法破坏了生物质纤维束的有序性, 长纤维束断裂成小段, 生物质表面更加粗糙杂乱, 可以推断, 经过两步预处理, 纤维素、半纤维素和木质素联结形成紧密结构被部分破坏, 使得后续酶水解过程可以顺利进行。

木质素分离两步预处理法的第一步预处理条件为利用含有 1% NaOH 和 70% 乙醇 (质量分数) 的碱性溶液提取木质素及其降解物, 最佳条件为温度 80℃ 浸泡 2 h。所得的木质素碱性溶液经过溶剂回收和提纯处理, 可以回收乙醇并制得木质素等高分子材料, 相关方法正在进一步研究中。第二步预处理条件相对传统方法来说预处理条件 (如温度) 降低了很多, 即在 135℃ 时热水法处理 30 min。

3 讨论

糠醛 (furfural)、5-羟甲基-2-糠醛 (5-hydroxymethyl furfural, HMF) 和乙酸 (acetic acid) 是 3 种生物质水解液中最常见的发酵抑制物。其中, 糠醛和 HMF 是分别由戊糖和己糖降解而来, 是水解液中常见的抑制物^[22]。它们在发酵过程中, 可以被酵母细胞利用, 进一步降解为小分子有机酸。酵母细胞可以将糠醛转化成糠基醇, 虽不影响最终的乙醇产量, 但会导致乙醇发酵停滞, 从而降低乙醇发酵速度^[23]。乙酸是由木聚糖降解而来, 它主要影响发酵系统的 pH 值。有研究者考察了这 3 种抑制物在发酵过程中, 对不同发酵微生物产生的影响。在可利用葡萄糖的微生物中, 酵母细胞 (*Saccharomyces cerevisiae* Bakers yeast) 具有其他酵母、真菌等微生物无法超越的优越性, 它可以耐受质量浓度为 150 g/L 的乙醇, 并且可以在完全缺氧的条件下生长^[24]。Lee 等的试验研究表明, 当发酵液中糠醛和 HMF 浓度分别为 65 mmol/L 和 57 mmol/L 时, 利用酵母对质量浓度为 90 g/L 葡萄糖溶液进行发酵, 其乙醇产率是理论产率的 50%^[25]。而当发酵系统中乙酸质量浓度达到 4.3 g/L 时, 酵母生长的抑制程度达 50%^[26]。大肠杆菌 *E.coli* 可以利用六碳糖和五碳糖的混合溶液, 但乙醇产率较低。有研究者进行细菌和酵母基因重组的研究, 以期结合两者的优点^[27]。Zaldivar 等以质量浓度为 100 g/L 木糖溶液为底物, 考察了几种发酵抑制物对 *E.coli* LY01 的作用^[28-29]。结果表明, 当糖溶液中的乙酸浓度为 283 mmol/L 时, 同样发酵时间获得的乙醇浓度为纯糖溶液发酵的 78%; 当糠醛和 HMF 浓度分别为 39 mmol/L 和 36 mmol/L 时, 对细菌生长也有一定抑制作用。

在半纤维素分离两步预处理法试验中, 当第一步预

处理条件为 3% 过氧化氢溶液、处理时间 16 h 时, 可以获得总糖浓度最高的柳枝稷水解液 (31 g/L 葡萄糖和 14 g/L 木糖)。该水解液中的糠醛和 HMF 的浓度很低, 低于检测系统的设定的最低质量浓度 0.2 g/L, 不够定量; 而乙酸质量浓度为 0.14 g/L, 远低于其浓度限制。在木质素分离两步预处理法试验中, 当第二步预处理温度为 135℃ 时, 可获得总糖质量浓度最高的玉米秸秆水解液 (32 g/L 葡萄糖和 10 g/L 木糖)。其中, 糠醛和 HMF 的浓度同样很低, 不够定量; 乙酸质量浓度为 0.23 g/L。由此可见, 这 2 种方法在获得较高纤维素转化率的同时, 可以控制水解液中发酵抑制物的产生。这 2 种方法的第一步主要是对生物质原料进行浸泡处理, 适当调整预处理过程的固液比, 可以降低对生物质原料微粒尺寸的要求, 这对降低过程工艺成本也有很好的效果。综上所述, 半纤维素分离两步预处理法和木质素分离两步预处理法具有很大的发展潜力, 值得进一步研究。

4 结论

半纤维素分离两步预处理法和木质素分离两步预处理法对柳枝稷和玉米秸秆进行处理, 结论如下: 1) 试验研究均获得了超过 80% 的纤维素转化率, 与现有预处理方法相比较, 其纤维素转化率略低, 但其预处理过程的条件 (温度、压力和时间) 要求也相对较低; 2) 这 2 种方法都降低了预处理过程中的温度条件, 从而控制了半纤维素和木质素的降解, 降低了水解液中发酵过程抑制物的浓度; 3) 在获得可发酵的糖原料的同时, 这 2 种方法分别提取了部分半纤维素和木质素。

致谢: 本文试验工作主要是在美国伊利诺伊大学香槟分校冯浩博士的实验室完成的。期间, 中国国家留学基金委员会和冯浩博士分别给予王晓娟同学 2 年和 1 年的资助, 在此表示由衷的感谢。

[参 考 文 献]

- [1] Zhan H H, Huang L L. Recent advances in lignocellulosic ethanol[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2011, 27(Supp.1): 218-221.
- [2] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies[J]. Bioresource Tehnology, 2005, 96(18): 1959-1966.
- [3] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 等. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展[J]. 石油与天然气化工, 2007, 36(6): 452-461.
- [4] Wang Xiaojuan, Wang Bin, Feng Hao et al. Research advancement of bioethanol preparation from lignocellulosic biomass[J]. Chem Eng of Oil and Gas, 2007, 36(6): 452-461. (in Chinese with English abstract)
- [4] 靳胜英, 张福琴, 张礼安. 木质纤维原料制乙醇原料预处理技术[J]. 中国工程科学, 2008, 11(1): 82-88.

- Jin Shengying, Zhang Fuqin, Zhang Li'an. Pretreatment method of lignocellulosic materials for bioethanol production[J]. Eng Science, 2008, 11(1): 82—88. (in Chinese with English abstract)
- [5] Zhang Y P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 2008, 35(5): 367—375.
- [6] Wang B, Wang X J, Feng H. Deconstructing recalcitrant *Miscanthus* with alkaline peroxide and electrolyzed water[J]. Bioresource Tech, 2010, 101(2): 752—760.
- [7] Wang X J, Feng H, Li Z Y. Conversion of switchgrass into fermentable sugars by electrolyzed water pretreatment and a two-stage pretreatment[Z]. American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting of 2010.
- [8] Wang X J, Feng H, Li Z Y. Ethanol and value-added chemicals produced from *corn stover* pretreated by novel methods[Z]. American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting of 2010.
- [9] Wang B, Feng H, Wang X J, et al. Deconstructing lignocellulosic biomass with a two-step method[P]. 2009, Application No. 12642601.
- [10] Hames B, Ruiz R, Scarlata C, et al. Preparation of samples for compositional analysis laboratory analytical procedure (LAP)[Z]. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2008.
- [11] Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, et al. Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure (LAP)[Z]. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2005.
- [12] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass laboratory analytical procedure (LAP)[Z]. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2008.
- [13] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities (LAP)[Z]. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 1996.
- [14] Ghose T. Measurement of Cellulase Activities[J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(5): 457—268.
- [15] Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426—428.
- [16] Blake J D, Murphy R T, Richards G N. Isolation and A/B classification of hemicelluloses[J]. Carbohydrate Research, 1970, 16(1): 49—57.
- [17] Lloyd T A, Wyman C E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids[J]. Bioresour Technol, 2005, 96(15): 1967—1977.
- [18] Moiser 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.
- [19] Kim T H, Lee Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(18): 2007—2013.
- [20] Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(18): 2014—2018.
- [21] Kim S, Holtzapple M T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. Bioresource Technology, 2005, 96(18): 1994—2006.
- [22] Endo A, Nakamura T, Ando A, et al. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Biofuels, 2008, 1(1): 3—10.
- [23] Villa G P, Bartroli R, Lopez R, et al. Microbial of transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta biotechnol, 1992, 12(6): 509—512.
- [24] Claassen P A M, Lier J B V. Utilization of biomass for the supply of energy carriers[J]. App lied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(6): 741—755.
- [25] Lee W G, Lee J S, Shin C S, et al. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1999(1/3): 77—79, 547—559.
- [26] Pampulha M E, Loureiro V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Lett, 1989, 11(4): 269—274.
- [27] 张宇昊, 王颀, 张伟, 等. 半纤维素发酵生产燃料乙醇的研究进展[J]. 酿酒科技, 2004(5): 72—74.
Zhang Yuhao, Wang Jie, Zhang Wei, et al. Research progress of hemicellulose fermentation to produce fuel alcohol[J]. Liquor-making Science & Technology, 2004(5): 72—74. (in Chinese with English abstract)
- [28] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 65(1): 24—33.
- [29] Zaldivar J, Ingram L O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 66(1): 24—33.

Investigation of two-step pretreatment method for production of ethanol from lignocellulosic biomass

Wang Xiaojuan^{1,2}, Feng Hao², Wang Bin², Li Zhiyi^{1*}

(1. Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;
2. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana & Champaign, Urbana, IL 61801, USA)

Abstract: For developing new pretreatment methods of fuel ethanol production, hemicellulose separation two-step pretreatment method and lignin separation two-step pretreatment method were investigated using switchgrass and corn stover. In the hemicellulose separation two-step pretreatment, a cellulose digestibility of 89% was obtained (Step 1 with the condition of 2%wt H₂O₂, 50°C and 16 h; Step 2 with the condition of 121°C and 30 min), while in the lignin separation two-step pretreatment, the highest cellulose digestibility of corn stover was 83% (Step 1 with the condition of 1%wt NaOH, 70%wt ethanol solution, 80°C and 2 h; Step 2 with the condition of 135°C and 30 min). SEM micrographs showed that the surface of biomass had been altered and the accessibility of enzymes had been improved. Hemicellulose and lignin separated from the feedstock could be recovered for the production of value-added products. The results indicate that these two pretreatment methods have a promising future, and are very helpful for the industrialization of fuel ethanol production.

Key words: fuel, ethanol, lignocellulosic biomass, two-step pretreatment, digestibility