

白酒丢糟的酸酶联合水解糖化工艺

任海伟^{1,2}, 李金平^{2*}, 张 轶¹, 李志忠¹,
尹建波³, 王晓梅³, 申永前³, 石进才⁴

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050; 2. 兰州理工大学能源与动力工程学院, 兰州 730050;
3. 兰州理工大学材料科学与工程学院, 兰州 730050; 4. 甘肃金徽酒股份有限公司, 陇南 742308)

摘要: 为充分利用白酒丢糟资源, 探讨了酸酶联合水解法对其进行糖化以获得可发酵糖的可行性。以木糖和还原糖浓度为指标, 研究温度、固液比、混合酸浓度和时间等因素对酸解效果的影响; 在此基础上分析纤维素酶对酸解残渣(AHR)的酶解历程, 并利用扫描电镜(SEM)、红外光谱(FTIR)和 X-衍射(XRD)技术考察不同水解阶段丢糟的结构特性变化。结果表明, 丢糟在温度为 100℃、固液比为 1:12 g/mL 和酸浓度为 2.0%的条件下经混合酸水解 120 min 可获得 59.32 g/L 还原糖和 6.49 g/L 木糖, 该酸解阶段的半纤维素和纤维素转化率分别为 77.38%和 62.50%, 木质素溶出率为 43.50%。AHR 在纤维素酶用量为 4000 U/g 原料、温度为 45℃和 pH 值为 4.8 的条件下继续作用 2.5 h 可获得 13.27 g/L 还原糖, 该酶解阶段的纤维素转化率为 66.67%, 酶解率高达 90.73%。结构特性研究表明, 水解作用前后的丢糟形貌结构变化明显, 孔隙率和比表面积增加, 有利于纤维素酶对 AHR 中纤维结晶区的作用。FTIR 和 XRD 结果显示, 水解前后的特征组分所对应的吸收峰强度发生了变化, 相对结晶度逐渐提高。白酒丢糟经酸酶联合水解作用转化为可发酵糖具有可行性。该研究可为丢糟生物质发酵制备乙醇提供理论基础。

关键词: 糖化, 水解, 酸, 酶, 木糖, 还原糖, 白酒丢糟

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.05.032

中图分类号: TS261.9;TQ353.6;TQ920.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-05-0243-08

任海伟, 李金平, 张 轶, 等. 白酒丢糟的酸酶联合水解糖化工艺[J]. 农业工程学报, 2013, 29(5): 243—250.
Ren Haiwei, Li Jinping, Zhang Yi, et al. Saccharification for distiller's grains based on combined hydrolysis with acid and enzyme[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(5): 243—250. (in Chinese with English abstract)

0 引言

随着石油资源的日益枯竭, 纤维素乙醇的开发不仅有助于减少对石油、天然气等不可再生资源的依赖, 还可减轻地球温室效应。中国是白酒生产和消费大国, 2011 年全国白酒产量约 1 000 万 t, 酿酒产生的副产物丢糟量约 2.5~3 万 t。目前, 白酒丢糟除了直接用作家畜饲料外, 还可用于生产有机肥、蛋白饲料、食用菌、燃料棒、活性炭、食醋等, 但仍无法全部转化庞大的丢糟资源。因此, 研究新的转化工艺是有效利用丢糟资源的重要途径。丢糟

含有丰富的纤维素和半纤维成分, 是极具开发潜力的木质纤维素类生物质, 通过降解可以转化为以木糖、葡萄糖为主的戊糖和己糖混合糖液。若能将其作为碳源, 替代粮食或糖基原料用于微生物发酵制备乙醇, 既不会影响粮食供给安全, 又可降低乙醇生产成本, 还可实现白酒丢糟资源的综合利用^[1]。

木质纤维素生产乙醇的工艺一般分为原料预处理、水解糖化、微生物发酵和乙醇精馏 4 个步骤^[2]。水解糖化主要有酶水解、酸水解、超/亚临界水液化等方法^[3-4]。超/亚临界水液化技术具有反应速率快、无溶剂污染、转化率高等优点, 但目前在技术上还不成熟^[5]。酶水解反应条件温和、影响发酵抑制物的副反应少, 但也存在对原料处理要求高、酶制剂成本高等缺点。酸水解被认为是最容易实现商业化的生产工艺。稀酸对生物质进行处理可以将半纤维素有效降解为以木糖为主的可发酵糖, 并能大大提高纤维素酶的可及性和葡萄糖产率^[6]。在水解糖化过程中, 既要考虑获得较高浓度的可发酵糖, 又要尽可能减少糠醛等发酵抑制物的生成^[7]。

因此, 本文结合了酸水解和酶水解的优点, 针对丢糟生物质提出一种酸酶联合水解的糖化工艺,

收稿日期: 2012-09-18 修订日期: 2013-02-25

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD15B03); 国家科技部星火计划重点项目(2010GA860004); 陇原青年创新人才扶持计划项目(09-0165); 兰州理工大学红柳青年教师培养计划(Q201207); 甘肃省自然科学基金项目(2011GS04322)

作者简介: 任海伟(1983—), 男, 山西孝义人, 讲师, 研究方向为生物质资源转化利用。兰州 兰州理工大学生命科学与工程学院, 730050。
Email: rhw52571119@163.com

*通信作者: 李金平(1977—), 男, 宁夏中宁人, 教授, 博士生导师, 研究方向可再生资源与环境。兰州 兰州理工大学能源与动力工程学院, 730050。Email: lijinpj77@163.com

期望能通过纤维素和半纤维素组分的降解获得高浓度可发酵糖；并利用扫描电镜(SEM)、红外光谱(FTIR)和 X-衍射(XRD)技术考察丢糟在不同水解阶段的结构特性，旨在为丢糟生物质发酵制备乙醇提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

白酒丢糟，甘肃金徽酒股份有限公司提供，自然晾干后粉碎过 50 目筛，备用。化学成分的质量分数为：纤维素 33.58%，木质素 22.23%，半纤维素 8.4%，淀粉 11.59%，脂肪 3.56%，蛋白质 14.45%，灰分及其他杂质 6.23%。

纤维素酶（滤纸酶活力为 5×10^4 U/g，厂家提供的最适作用温度为 45°C ，最适 pH 值为 4.8），南宁庞博生物工程有限公司；地衣酚，上海蓝季科技发展有限公司；D-木糖，天津市光复精细化工研究所；3,5-二硝基水杨酸（NDS），上海中泰化学试剂有限公司；其余试剂为分析纯。

UV-9200 紫外可见分光光度计，北京瑞利分析仪器公司；Nexus670FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪，美国尼高力公司；JSM5600LV 扫描电子显微镜，日本 JEOL 公司；D/MAX-2004 粉末 X 射线衍射仪，日本理学公司。

1.2 试验方法

1.2.1 分析方法

淀粉分析参照 GB5009.9-2008 酶解法；蛋白质分析参照 GB5009.5-2010 凯氏定氮法，纤维素、木质素和半纤维素分析参考文献[8-9]；还原糖测定采用 DNS 法^[10]；木糖测定参考文献[11]。

1.2.2 混合酸水解试验

称取 10 g 丢糟置于三角瓶中，加入配制好的混合酸溶液搅拌均匀后室温浸泡 12 h，转移至灭菌锅中于 121°C 高压蒸汽预处理 15 min，然后进行酸水解。酸解结束后 3 000 r/min 离心 10 min，测定水解液中的木糖和还原糖浓度，回收酸解残渣（acid hydrolysis residue, AHR），烘干至恒质量。混合酸由 HCL 与 H_3PO_4 以相同质量浓度配制^[12]。

分别研究温度（60、70、80、90、100、110、 120°C ）、固液比（1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 g/mL）、混合酸质量浓度（1.0%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%）和时间（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h）4 个因素在不同水平条件下对酸水解效果的影响。

1.2.3 酶水解试验

准确称取 1.2.2 方法酸水解后的 AHR 5.0 g，加入 40 mL 蒸馏水，搅拌均匀。根据预试验结果，以

4000 U/g 原料的加酶量添加纤维素酶，在厂家提供温度 45°C 和 pH 值 4.8 的最适条件下连续酶解 3 h，间隔 0.5 h 取样分析酶解液中的还原糖和木糖浓度。酶解结束后沸水浴终止反应，3 000 r/min 离心 10 min 进行固液分离，收集酶解残渣（enzymatic hydrolysis residue, HER），烘干至恒质量，备用。

按照 1.2.1 中方法，测定 AHR 和 EHR 中半纤维素、纤维素和木质素 3 种组分的质量分数，参考文献[13]分析组分分布变化情况。

1.2.4 结构特性分析

采用 SEM、FTIR 和 XRD 技术考察丢糟和不同水解阶段的固体残渣 AHR 和 EHR 的结构特性^[14]。

2 结果与分析

2.1 混合酸水解工艺条件的考察

2.1.1 酸解温度对丢糟酸水解效果的影响

在固液比 1:10、混合液浓度 2.0% 和酸解时间 2 h 的条件下进行温度的单因素试验，结果如图 1。随着酸解温度的升高，木糖浓度和还原糖浓度均呈现先升高后降低的趋势，而且 $90 \sim 100^\circ\text{C}$ 温度范围的木糖浓度提高明显。说明该范围内的半纤维素水解强度较高。因为，温度太低反应速率较慢，不利于木糖浓度的积累，温度过高则木糖分解较快，导致其浓度反而下降。同时，随着半纤维素的水解，木质纤维结构变得疏松，促进木糖释放的同时也提高了纤维素的水解强度^[15]。由于丢糟中的半纤维素和纤维素在高温酸性环境中，主要降解为以木糖和葡萄糖为主的还原糖，表现为还原糖浓度在该范围也急剧上升。

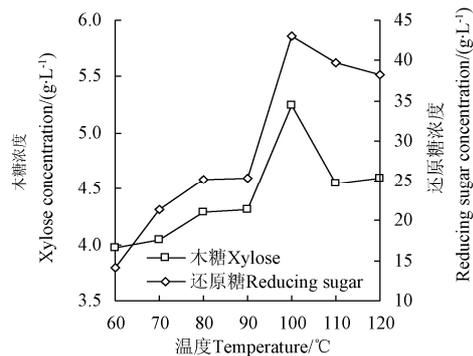


图 1 温度对丢糟酸水解效果的影响

Fig.1 Effect of temperature on acid hydrolysis of distiller's grains

当酸解温度高于 100°C 时，还原糖浓度反而下降，说明高温酸性条件不利于还原糖的积累。因为，生物质水解是一个动态过程，生物质转化为还原糖的同时，还原糖也在向糠醛和 5-羟甲基糠醛(5-HMF)等副产物转化。一方面，温度的升高能加速丢糟的

水解,有利于还原糖迅速积累;另一方面,温度过高反而导致部分还原糖分解速率加快,当还原糖的分解速率大于生成速率,则会使其浓度降低^[15-17],表现为 100~120℃ 范围内,还原糖浓度下降了 11.02%。这与常春等^[15]的报道一致,提高温度不仅能加速生物质降解,也加速了还原糖的分解。因此,确定酸解温度为 100℃。

2.1.2 固液比对丢糟酸水解效果的影响

在酸解温度 100℃、混合液浓度 2.0%和酸解时间 2 h 的条件下进行固液比的单因素试验,结果如图 2。在试验范围内,随着固液比的减小,底物基质相对含量降低,木糖浓度呈现先升高后降低的趋势;而还原糖浓度持续增加,直至固液比为 1:12 时增速放缓渐趋恒定。因为,较高的固液比意味着底物浓度较高,体系流动性较差,阻止了 H⁺向木质纤维结构内部渗透,致使 H⁺与纤维素和半纤维素接触面积有限,不利于酸解反应,导致木糖和还原糖浓度偏低。随着固液比的减小,混合酸体积增加,体系流动性加强,而且相同浓度酸液中的 H⁺数量增加,提高了 H⁺与底物的接触面积和反应几率,酸解作用加强,促进了糖化效果。当固液比为 1:6~1:10 时,木糖浓度迅速上升,由 1.81 g/L 增加到 5.54 g/L,增加了 2 倍。另一方面,酸液扩散进入底物内部属于非均相扩散过程。高温高压蒸汽预处理导致丢糟的木质纤维结构塌陷,内部产生大量“空隙”,使 H⁺更容易渗透扩散,促进酸解作用^[18-19]。另外,较低的固液比意味着反应体系中的木糖和还原糖被稀释,弱化了二者的分解反应。因此,从反应体系流动性和酸液扩散等角度综合考虑,选择适宜的固液比为 1:12。

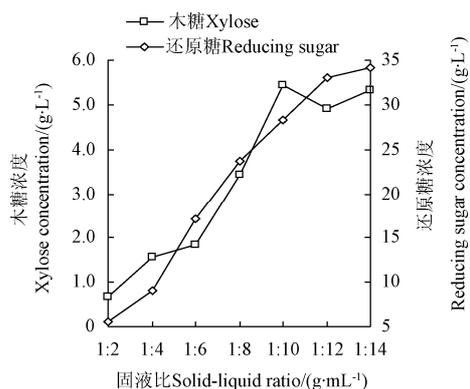


图 2 固液比对丢糟酸水解效果的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on acid hydrolysis of distiller's grains

2.1.3 混合酸浓度对丢糟酸水解效果的影响

在固液比 1:12、酸解温度 100℃和酸解时间 2 h 的条件下进行混合液浓度的单因素试验,结果如图 3。

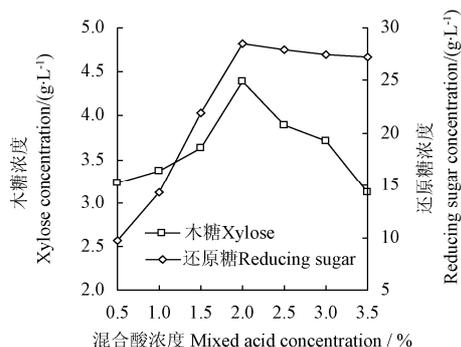


图 3 混合酸浓度对丢糟酸水解效果的影响

Fig.3 Effect of mixed acid concentrations on acid hydrolysis of distiller's grains

随着混合酸浓度的升高,木糖和还原糖浓度迅速提高,当混合酸质量浓度达到 2.0%时,木糖和还原糖浓度达最高值,分别为 4.39 和 28.46 g/L。若酸浓度继续增加,还原糖浓度趋于稳定,而木糖浓度显著下降。因为,酸水解主要是靠 H⁺水解和催化的双重作用来实现,较低的酸浓度使 H⁺浓度过低,造成 H⁺与底物的接触几率和面积降低,水解效率差;随着混合酸浓度的增加,体系中 H⁺浓度提高, H⁺与底物接触充分,使木糖从木聚糖长结构链上释放出来,有利于酸解反应。然而,当混合酸浓度大于 2.0%时,一方面,丢糟木质纤维结构的孔隙数量恒定,混合酸渗透速率受限,导致体系中 H⁺浓度相对饱和,对酸解作用影响不大;另一方面,高浓度的混合酸和高温条件会加速还原糖的分解,尤其是木糖,促进糠醛抑制物的生成^[20]。因为在酸解过程中,不仅存在纤维素和半纤维素的降解正反应,还存在木糖和葡萄糖等还原糖的脱水负反应。因此,混合酸浓度为 2.0%更有利于丢糟的酸解作用。

2.1.4 时间对丢糟酸水解效果的影响

在固液比 1:12、混合液浓度 2.0%和酸解温度 100℃的条件下进行酸解时间的单因素试验,结果如图 4。随着反应时间的推移,木糖浓度逐渐增加,而且 20~70 min 范围内增速较快,增幅为 18.42%,70~145 min 范围内增速放缓,曲线斜率降低,增幅为 7.06%,145 min 后的木糖浓度反而降低。因为,丢糟的木质纤维包被结构导致反应初始阶段 H⁺很难渗透到其内部,反应速率较低;当 H⁺作用一段时间后,木质纤维结构被逐步破坏,木质素对纤维素和半纤维素的束缚减少,更多 H⁺进入丢糟内部,半纤维素中易水解的部分被快速降解,对应于 20~70 min 范围内的木糖浓度增速较快。随着时间的延长(70~145 min),半纤维素的易水解部分反应殆尽,难水解部分开始被降解,导致木糖浓度增速放缓。若反应时间过长(>145 min),高温酸性环境

会促使木糖分解, 转化为糠醛等发酵抑制物, 导致木糖浓度显著下降。

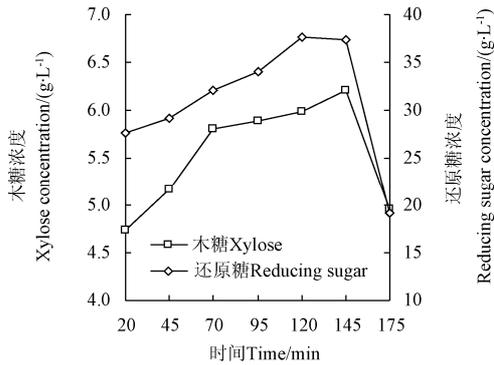


图4 时间对丢糟酸水解效果的影响

Fig.4 Effect of time on acid hydrolysis of distiller's grains

由图4还可看出, 随着反应时间的延长还原糖浓度呈现先增后减的趋势, 且还原糖浓度的增速高于木糖浓度。因为木质素的溶解和半纤维素的降解有利于纤维素的暴露和 H^+ 的酸解作用。反应120 min 时的还原糖浓度最高为 37.59 g/L。但时间过长, 反而会导致以葡萄糖和木糖为主的还原糖发生降解, 致使还原糖浓度降低^[6]。综合考虑, 选择酸解时间为 120 min。

2.2 纤维素酶水解反应历程

图5为纤维素酶对AHR酶解效果的动态分析。由图可知, 在酶解反应的初始阶段(0.5~2.5 h), 木糖和还原糖浓度升高速率较快, 这得益于在酸解过程中, 丢糟中半纤维素的降解和部分木质素的溶出, 使得AHR空间结构疏松多孔, 孔隙率和可接触表面积增加, 甚至使包裹在木质纤维结构中的微细纤维裸露出来, 酶切位点的充分暴露提高了纤维素酶的可及度。同时, 商业纤维素酶包含有外切 β -1,4-葡聚糖酶、内切 β -1,4-葡聚糖酶和 β -1,4-葡萄糖苷酶, 酶解过程中通过互相提供新可及部位、除去障碍、消除产物抑制等多种方式协同作用于纤维素底物, 进而提高酶解效率获得较多的葡萄糖, 促使还原糖浓度逐渐升高^[21]。另一方面, 反应初始阶段, 酶主要作用于纤维素无定形区, 酶易与无定形区的纤维素分子结合产生催化酶解作用, 酶解速度快。随着酶解反应的进行, 纤维素酶难渗入结晶区的致密结构, 造成酶解速度减缓^[6], 而且纤维素的降解产物葡萄糖也会对纤维素酶产生抑制作用^[22]。同时, 残留木质素的溶出也会阻碍底物对酶的吸附, 引起无效吸附, 导致还原糖浓度在酶解2.5 h后基本稳定。另外, 酶解过程中木糖浓度的增加可能是由于AHR自身结构所产生的传质阻力使酸解产生的木糖束缚在丢糟内部。酶水解作用又进一步

促使残留木糖逐渐扩散至液相中。因此, 确定适宜的酶解时间为2.5 h。

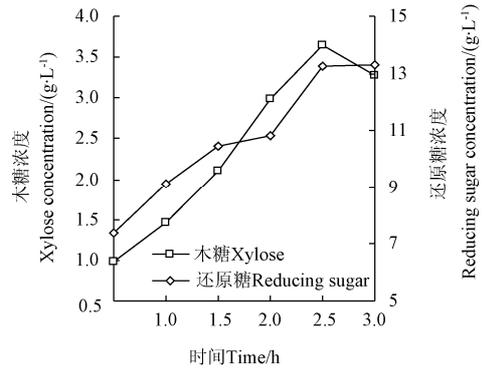
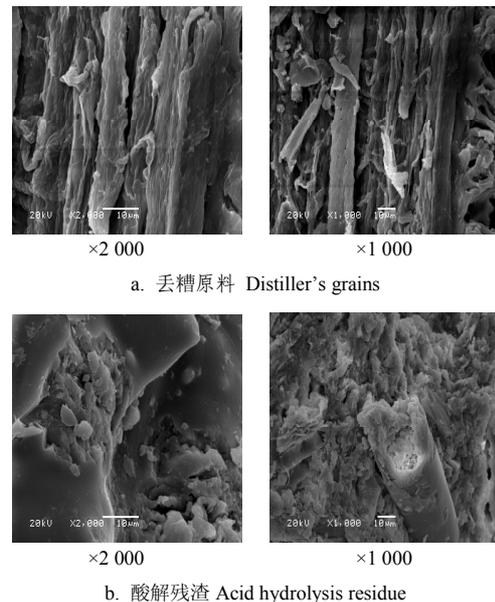


图5 纤维素酶对AHR的酶解历程

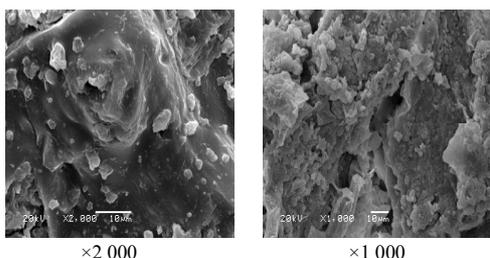
Fig.5 Enzymatic hydrolysis of AHR by cellulase

2.3 扫描电镜分析

由图6分析可知, 丢糟原料的木质纤维结构紧密, 纤维素聚集态结构清晰, 纤维素沿链长方向聚集成微细纤维状态。纤维素结晶区和无定形区交错结合(图6a)。经混合酸作用后, 丢糟形貌结构变化明显, 原先规则的长条状晶束变成絮状无规则绒毛形, 光滑表面出现明显裂痕或不规则孔洞, 孔隙度增加, 比表面积增大, 结晶区和非结晶区界限模糊(图6b)^[23-24]。原因是先前的木质纤维结构受到 H^+ 作用而变得疏松, 半纤维素逐渐被溶出降解, 纤维素暴露及其链被打碎, 聚合度下降, 同时木质素软化部分溶解, 形成液滴态木质素衍生物, 附着于AHR表面, 上述形貌结构的改变有利于纤维素酶的作用。从图6c可以看出, 经纤维素酶作用后, EHR的纤维素分子无定形区消失, 结晶区表面被破坏。由此可见, 丢糟经过酸酶联合水解作用后, 原先的木质纤维结构被修饰。



b. 酸解残渣 Acid hydrolysis residue



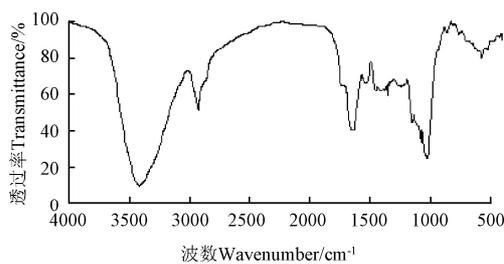
c. 酶解残渣 Enzymatic hydrolysis residue

图 6 丢糟及其水解残渣的扫描电镜对比图

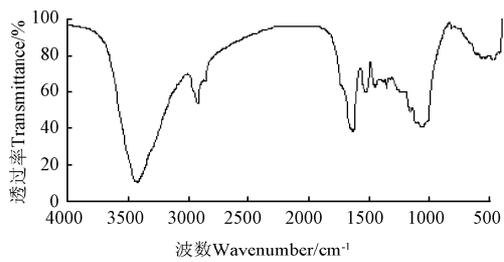
Fig.6 SEM comparison of distiller's grains and hydrolysis residues

2.4 红外光谱分析

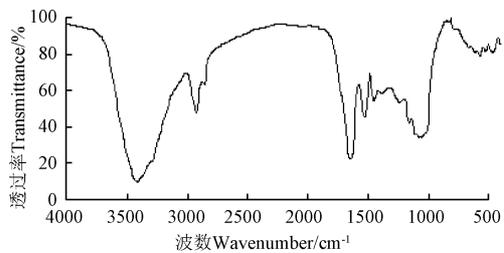
由图 7 中 FTIR 图谱分析可知, 3 415.37 cm^{-1} 处的强峰代表纤维素 O-H 伸缩振动, 2 927.46 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的 C-H 对称伸缩振动峰, 1 646.94 和 1 537.01 cm^{-1} 处为苯环骨架伸缩振动峰, 1 456.02 cm^{-1} 代表 C-H 弯曲振动, 表明有木质素存在。1 378.88 cm^{-1} 为 C-H 对称伸缩振动吸收峰, 1 240.03 cm^{-1} 为 C=O 伸缩振动吸收峰, 1 151.32 cm^{-1} 和 1 078.03 cm^{-1} 分别对应于纤维素分子内醚的 C-O



a. 丢糟原料
a. Distiller's grains, DG



b. 酸解残渣
b. Acid hydrolysis residue, AHR



c. 酶解残渣
c. Enzymatic hydrolysis residue, EHR

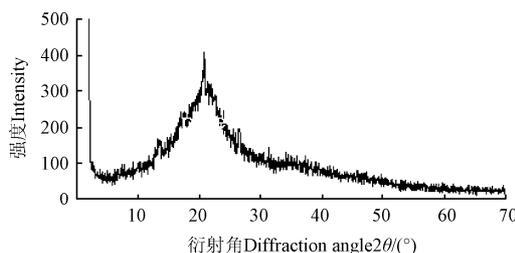
图 7 丢糟及其水解残渣的红外光谱图

Fig.7 FTIR spectra of distiller's grains and hydrolysis residues

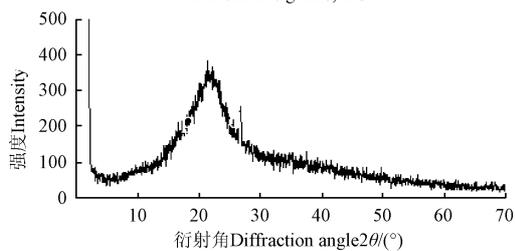
伸缩振动和 C-C 骨架的伸缩振动, 1 029.82 和 759.83 cm^{-1} 处是木聚糖的特征吸收峰, 其中 1 029.82 cm^{-1} 对应于 C-O 伸缩振动吸收, 且在其附近有很多较弱的肩峰, 759.83 cm^{-1} 为 C-H 平面弯曲振动吸收峰^[23]。由此判断, 丢糟含有木质素、纤维素和半纤维素等成分, 符合木质纤维类生物质的特征。经酸酶联合作用后, AHR 在 1 635.37 和 1 523.51 cm^{-1} 处、EHR 在 1 641.15 和 1 525.44 cm^{-1} 处的吸收峰强度增强, 说明木质素相对含量有所增加。AHR 和 EHR 在 1 050 cm^{-1} 处的吸收峰减弱, 说明半纤维素被降解。AHR 在 1 106.96 cm^{-1} 的吸收峰强度增强, EHR 在 1 157.44 cm^{-1} 处的吸收峰强度减弱, 表明纤维素在酶解作用下被部分降解。由此可见, 尽管丢糟及其残渣 AHR 和 EHR 的红外谱峰位置基本一致, 但特征峰强度发生了变化, 推测酸酶联合水解作用使得丢糟固体组分含量发生变化。

2.5 X-衍射分析

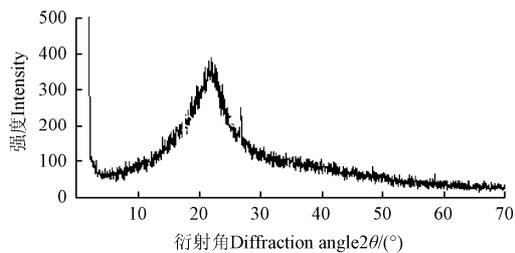
如图 8 所示, 丢糟位于 $2\theta=13.22^\circ$ 、 20.74° 和 26.6° 处有 3 个衍射峰, 其中 $2\theta=13.22^\circ$ 左右的弱峰代表纤维素无定形区, $2\theta=20.74^\circ$ 代表结晶区强度的 002 面衍射峰。经酸酶水解作用后, 纤维素无定形



a. 丢糟原料
a. Distiller's grains, DG



b. 酸解残渣
b. Acid hydrolysis residue, AHR



c. 酶解残渣
c. Enzymatic hydrolysis residue, EHR

图 8 丢糟及其水解残渣的 X 射线衍射(XRD)图谱

Fig.8 X-ray diffraction patterns of distiller's grains and hydrolysis residues

区消失, $2\theta=22^\circ$ 左右处出现较宽的衍射峰, 但峰尖不再尖锐。利用 Segal 经验公式^[25-26]求得丢糟、AHR 和 EHR 的相对结晶度依次为 11.42%、19.37%和 26.82%。一方面, 酸解作用使得半纤维素首先被降解, 纤维素无定形区及结晶区表面随之暴露, 尤其是结晶区的暴露导致 AHR 的 002 面衍射峰强度增强, 结晶度提高。另一方面, H^+ 作用先使容易水解的纤维素无定形区消失, 随着反应进行 H^+ 缓慢渗入难水解的结晶区, 使纤维素的晶体结构发生变化。纤维素酶又进一步作用于结晶区提高了 HER 的相对结晶度。

3 讨论

结构特性分析表明, 经混合酸水解作用后, 丢糟的木质纤维结构变得疏松, 孔隙率和比表面积增加, 有效促进纤维素酶对纤维素无定形区和结晶区的作用, 提高了糖化效果。

糖化过程中溶解于反应体系中的木质素可能会与生成的单糖发生聚合反应。同时, 木质素也是纤维素酶的抑制剂, 既可以作为物理屏障, 限制纤维素酶接近底物, 又能吸附纤维素酶, 导致非反应性结合。因此, 木质素的存在是导致本试验获得糖浓度偏低的原因之一。若能在水解过程中及时去除木质素, 将会大大提高可发酵糖浓度和酶解效果。

白酒丢糟中的主要成分纤维素、半纤维素和木质素的质量分数约 64%以上, 可利用潜力巨大。由于具有复杂稳定的结构, 丢糟很难被微生物直接发酵利用。只有通过糖化作用转化为可发酵糖才能被微生物利用^[27-28]。通过对糖化过程中工艺参数、固体结构特性和组分含量综合分析, 发现丢糟中的纤维素和半纤维素成分被有效降解为可发酵糖, 酸酶联合工艺基本实现了白酒丢糟高效转化为可发酵糖的目的。

4 结论

本文针对丢糟原料提出了酸酶联合水解糖化工艺, 通过试验研究了不同温度、固液比、混合酸浓度和水解时间等条件对还原糖转化和木糖转化效果的影响。结果表明:

1) 白酒丢糟经高温高压蒸汽处理后, 在温度为 100°C 、固液比为 1:12 和混合酸浓度为 2.0%的条件下水解 120 min 效果最好, 可获得 59.32 g/L 还原糖和 6.49 g/L 木糖。结合固体组分含量分析, 在酸解阶段, 纤维素质量分数由原料的 33.58%降至 12.6%, 半纤维素质量分数由 8.40%降至 1.87%, 木质素质量分数由 22.23%降至 12.60%, 半纤维素和纤维素的转化率分别为 77.38%和 62.50%, 木质素溶出率

为 43.50%。说明酸解阶段的纤维素和半纤维素转化效率较高。

2) 酸解后残渣经纤维素酶在加酶量 4 000 U/g 原料、温度 45°C 和 pH 值 4.8 的条件下连续酶解 2.5 h 后可获得 13.27 g/L 还原糖, 残渣 EHR 中纤维素、半纤维素和木质素的质量分数分别为 10.53%、1.61%和 12.23%, 酶解阶段的纤维素转化率为 44.45%, 酶解率达 90.73%。

[参 考 文 献]

- [1] 吕欣, 坂志朗. 流通加压热水液化木质生物质[J]. 农业工程学报, 2010, 26(3): 289-293.
Lü Xin, Saka Shiro. Liquefaction of woody biomass by flow through hot-compressed water[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2010, 26(3): 289-293. (in Chinese with English abstract)
- [2] 黄秋婷, 张鹏, 张淑荣, 等. 螺杆挤压连续汽爆玉米秸秆的稀酸水解效果[J]. 农业工程学报, 2009, 25(7): 190-194.
Huang Qiuting, Zhang Peng, Zhang Shurong, et al. Hydrolysis effect of dilute acid on corn stalks by continuous screw extrusion steam explosion[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(7): 190-194. (in Chinese with English abstract)
- [3] Laser M, Schulmand, Allen S G. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugar cane bagasse for bio-conversion to ethanol[J]. Bioresource Technology, 2002, 81(1): 33-44.
- [4] Mitsuru S, Bernard K, Roberto M. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water[J]. Journal of Supercritical Fluids, 1998, 13(1/2/3): 261-268.
- [5] Toshiki N, Hisashi M, Shiro S. Bioethanol from cellulose with supercritical water treatment followed by enzymatic hydrolysis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 130(1/2/3): 476-485.
- [6] 章冬霞, 张素平, 许庆利, 等. 酶酸联合水解玉米秸秆的实验研究[J]. 太阳能学报, 2010, 31(4): 478-481.
Zhang Dongxia, Zhang Suping, Xu Qingli, et al. Study on the hydrolysis of corn stalks using dilute sulfuric acid and cellulase[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2010, 31(4): 478-481. (in Chinese with English abstract)
- [7] Herrera A, Simon J, Tellez-Luis S J, et al. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 63(1): 103-109.
- [8] 李春光, 周伟铎, 田魏, 等. 甘蔗渣纤维素提取及木质素与半纤维素脱除工艺探讨[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 316-320.
Li Chunguang, Zhou Weiduo, Tian Wei, et al. Study on extraction of cellulose and removal of hemicelluloses and lignin from bagasse[J]. Chinese Agricultural Science

- Bulletin, 2011, 27(4): 316—320. (in Chinese with English abstract)
- [9] 侯曼玲. 食品分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [10] Saqib A AN, Whitney P J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid(DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(11): 4748—4750.
- [11] 秦伟军, 陈叶福, 赵换英, 等. 玉米芯碱液预处理条件优化[J]. 农业工程学报, 2010, 26(4): 248—253.
Qin Weijun, Chen Yefu, Zhao Huanying, et al. Optimization of pretreatment conditions for corn cob with alkali liquor[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2010, 26(4): 248—253. (in Chinese with English abstract)
- [12] 任海伟, 张飞, 张轶, 等. 白酒糟水解液摇瓶发酵生产木糖醇的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(10): 287—292.
Ren Haiwei, Zhang Fei, Zhang Yi, et al. Process optimization for producing xylitol by shaking-flask fermentation from distiller's grains hydrolysates[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(10): 287—292. (in Chinese with English abstract)
- [13] 王琼, 元伟, 余强, 等. 超低浓度马来酸水解玉米芯纤维素[J]. 农业工程学报, 2012, 28(7): 221—227.
Wang Qiong, Qi Wei, Yu Qiang, et al. Hydrolysis of corn cob by extremely low concentration maleic acid[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(7): 221—227. (in Chinese with English abstract)
- [14] Roberta Cristina Novaes Reis Corrales, Fabiana Magalhães T Mendes, Clarissa C Perrone, et al. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 2—8.
- [15] 常春, 马晓建, 李洪亮, 等. 高温稀酸条件下木屑降解动力学研究[J]. 太阳能学报, 2009, 30(8): 1713—1717.
Chang Chun, Ma Xiaojian, Li Hongliang, et al. Kinetic study on sawdust decomposition under high temperature and dilute acid conditions[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2009, 30(8): 1713—1717. (in Chinese with English abstract)
- [16] 张素平, 元伟, 具文华, 等. 木质纤维素生物质稀酸水解研究(I)——连续水解反应器的研究与开发[J]. 太阳能学报, 2008, 29(5): 532—535.
Zhang Suping, Qi Wei, Ju Wenhua, et al. Study on dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass(I): development of continuous hydrolysis reactor[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2008, 29(5): 532—535. (in Chinese with English abstract)
- [17] 颜涌捷, 任铮伟. 纤维素连续催化水解研究[J]. 太阳能学报, 1999, 20(1): 55—58.
Yan Yongjie, Ren Zhengwei. Continuous catalytic hydrolysis of cellulose[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 1999, 20(1): 55—58. (in Chinese with English abstract)
- [18] 张素平, 元伟, 任铮伟, 等. 生物质稀酸水解过程中硫酸在粒子中的扩散模型的建立[J]. 太阳能学报, 2010, 31(8): 942—946.
Zhang Suping, Qi Wei, Ren Zhengwei, et al. Distribution model of sulfuric acid concentrations in the biomass particle during hydrolysis in dilute acidic solution[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2010, 31(8): 942—946. (in Chinese with English abstract)
- [19] 元伟, 张素平, 任铮伟, 等. 酸浓度对水解液中葡萄糖分解反应的影响研究[J]. 太阳能学报, 2008, 29(11): 1395—1398.
Qi Wei, Zhang Suping, Ren Zhengwei, et al. Investigation of the effect of acid concentration on the decomposing reaction of glucose in the hydrolyzate[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2008, 29(11): 1395—1398. (in Chinese with English abstract)
- [20] 赵银中, 万金泉. 二次纤维稀酸水解糖化的研究[J]. 环境工程学报, 2012, 6(1): 302—306.
Zhao Yinzong, Wan Jinquan. Study on secondary fiber saccharification based on dilute acid hydrolysis[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2012, 6(1): 302—306. (in Chinese with English abstract)
- [21] Xu Zhong, Wang Qunhui, Jiang Zhaoxia, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw[J]. Biomass and Bioenergy, 2007, 31(2/3): 162—167.
- [22] 欧阳嘉, 李建明, 李鑫, 等. 酶法水解低聚木糖生产废渣工艺的研究[J]. 太阳能学报, 2010, 31(2): 263—268.
Ouyang Jia, Li Jianming, Li Xin, et al. An experimental research on enzymatic hydrolysis of waste residue of xylooligosaccharide[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2010, 31(2): 263—268. (in Chinese with English abstract)
- [23] 邸明伟, 高振华. 生物质材料现代分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [24] 何明雄, 张艳, 胡启春, 等. 竹子生物质废弃物前处理技术比较研究[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 232—236.
He Mingxiong, Zhang Yan, Hu Qichun, et al. Comparison of different pretreatment methods for bamboo residues[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2011, 17(2): 232—236. (in Chinese with English abstract)
- [25] 王凤芹, 尹双耀, 谢慧, 等. 前处理对玉米秸秆蒸汽爆破效果的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(12): 273—280.
Wang Fengqin, Yin Shuangyao, Xie Hui, et al. Effects of pretreatments on steam exposition efficiency of corn stalk[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(12): 273—280. (in Chinese with English abstract)
- [26] Hiroyuki Inoue, Shinichi Yano, Takashi Endo, et al. Combining

- hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2008, 1(1): 1—9.
- [27] 李科, 靳艳玲, 甘明哲, 等. 木质纤维素生产燃料乙醇的关键技术研究现状[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(6): 877—884.
Li Ke, Jin Yanling, Gan Mingzhe, et al. Progress in research of key techniques for ethanol production from lignocellulose[J]. *China J Appl Environ Biol*, 2008, 14(6): 877—884. (in Chinese with English abstract)
- [28] 吕欣, 坂志朗, 董明盛, 等. 用加压热水预处理山毛榉树粉生产燃料乙醇的初步研究[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(3): 219—222.
Lü Xin, Shiro Saka, Dong Mingsheng, et al. Preliminary investigation on hot-compressed water pretreatment of Japanese beech powder for fuel-ethanol production[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2008, 24(3): 219—222. (in Chinese with English abstract)

Saccharification for distiller's grains based on combined hydrolysis with acid and enzyme

Ren Haiwei^{1,2}, Li Jinping^{2*}, Zhang Yi¹, Li Zhizhong¹,
Yin Jianbo³, Wang Xiaomei³, Shen Yongqian³, Shi Jincai⁴

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. School of Energy and Power Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

3. School of Materials Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

4. Gansu Jinhui Liquor Company Limited, Longnan 742308, China)

Abstract: China is a big country of white spirit production and consumption. When brewing white spirit, large amounts of distiller's grains (DG) are left over, which are as the byproduct in white spirit production. In virtue of high content of cellulose and hemicellulose, DG is a kind of lignocellulosic biomass. In order to make full use of a distiller's grains (DG), the feasibility of using DG in making fermentable sugars by the two-step hydrolysis method of mixed acid and cellulase was explored. The key parameters of temperature, mixed acid concentrations, solid-liquid ratio and hydrolysis time were studied with the index of the concentrations of reducing sugar and xylose. In addition, the structural characteristics of DG in different hydrolysis stages were examined by means of scanning electronic microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The results indicated that there was 59.32 g/L reducing sugar and 6.49 g/L xylose in the conditions of temperature 100 °C, solid-liquid ratio 1:12 g·mL⁻¹, acid concentrations 2.0% and time 120 min, with the conversions of 77.38% and 62.50% for hemicellulose and cellulose, respectively. There were 13.27 g/L reducing sugars in the enzymatic hydrolysis conditions of cellulase dosage 4000 U/g, temperature 45 °C, pH value 4.8 and time 2.5 h. The conversion rate and enzymatic hydrolyzation of the cellulose were 66.67% and 90.73%, respectively. The studies of structural characteristics showed that the changes in morphology caused by acid and enzymatic hydrolysis successively were significant in comparison to those of feedstock, resulting in increasing surface exposure and porosity. The disorganized morphological structure of AHR allows for greater accessibility to cellulase, which facilitates enzymatic hydrolysis. The spectrograms of FTIR and XRD suggested that the characteristic strength peaks for the corresponding typical functional groups of each component were changed and the crystallinity index of the solid residues were increased, compared with DG. In short, the saccharification process based on the combined hydrolysis of acid and enzyme to produce fermentable sugars was feasible and efficient.

Key words: saccharification, hydrolysis, acids, enzymes, xylose, reducing sugar, distiller's grains