

青贮对柳枝稷制取燃料乙醇转化过程的影响

吴文韬^{1,2}, 鞠美庭¹, 刘金鹏¹, 刘博群¹

1 南开大学 环境科学与工程学院, 天津 300071

2 宾夕法尼亚州立大学 农业与生物工程系 宾夕法尼亚州学院, 16802

吴文韬, 鞠美庭, 刘金鹏, 等. 青贮对柳枝稷制取燃料乙醇转化过程的影响. 生物工程学报, 2016, 32(4): 457–467.

Wu WT, Ju MT, Liu JP, et al. Effect of ensilage on bioconversion of switchgrass to ethanol based on liquid hot water pretreatment. Chin J Biotech, 2016, 32(4): 457–467.

摘要: 青贮是一种传统的生物质原料保存方法, 广泛应用于纤维素乙醇炼制领域尚需要考察其对原料品质和下游乙醇转化过程的影响。文中以秋季(初、中和末)收割的柳枝稷为原料, 通过青贮、高温水热(LHW)预处理、纤维素酶水解和同步糖化与发酵(SSF)实验对上述问题予以回答。结果显示, 秋季初收割的柳枝稷以不同湿度青贮后 pH 均小于 4.0, 干重损失小于 2%, 各主要成分与青贮前相比无明显变化; LHW 预处理中青贮样品半纤维素水解率普遍高于未贮存样品, 但青贮同样使原料获得了更高的发酵抑制物产生水平; 青贮柳枝稷葡萄糖、木糖和半乳糖产量(预处理+酶水解)高于未贮存柳枝稷; 经过 168 h 的 SSF, 青贮样品乙醇浓度为 12.1 g/L, 未贮存的秋季初、秋季中和秋季末柳枝稷为底物的浓度分别为 10.3 g/L、9.7 g/L 和 10.6 g/L。综上, 青贮有助于提高柳枝稷 LHW 预处理效率、酶水解率和乙醇产量。

关键词: 柳枝稷, 青贮, 高温水热预处理, 纤维素乙醇, 同步糖化与发酵

Effect of ensilage on bioconversion of switchgrass to ethanol based on liquid hot water pretreatment

Wentao Wu^{1,2}, Meiting Ju¹, Jinpeng Liu¹, and Boqun Liu¹

1 College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 Department of Agricultural and Biological Engineering, Pennsylvania State University, University Park 16802, United States

Abstract: Ensilage is a traditional way of preserving fresh biomass. However, in order to apply ensilage to the ethanol

Received: July 21, 2015; **Accepted:** September 6, 2015

Supported by: International Cooperation Projects in the Science & Technology Pillar Program of Tianjin, China (No. 13RCGFSF14300).

Corresponding author: Meiting Ju. Tel: +86-22-23506446; E-mail: jumeit@nankai.edu.cn

天津市科技支撑国际科技合作项目 (No. 13RCGFSF14300) 资助。

biorefinery, two parameters need to be evaluated: quantity and quality changes of the biomass; and its effects on bioconversion process. To study these two aspects, switchgrass harvested on three different time points (Early, mid and late fall) were used as feedstock. The early fall harvested biomass was ensiled at 5 moisture levels ranging from 30% to 70%. Silage of 40% moisture and 3 other raw switchgrass were pretreated with liquid hot water, followed by enzymatic hydrolysis as well as simultaneous saccharification and fermentation. After 21 days storage pH values of all silages decreased below 4.0 and the dry matter losses were less than 2.0%, and structural sugars contents did not change dramatically. Liquid hot water caused more hemicellulose dissolution in the silage than in unensiled switchgrass. However, ensilage also increased the risk of releasing more sugar degradation products; After enzymatic hydrolysis, silage obtained higher total glucose, xylose and galactose yields than raw materials; After simultaneous saccharification and fermentation, ethanol concentration in silage was 12.1 g/L, higher than the unensiled switchgrass (10.3 g/L, 9.7 g/L and 10.6 g/L for early, mid and late fall respectively). Our results suggest that ensilage helps increase pretreatment efficiency and sugar yield, which increases final ethanol production.

Keywords: switchgrass, ensilage, liquid hot water pretreatment, cellulosic ethanol, simultaneous saccharification and fermentation

燃料乙醇是一种清洁的可再生能源，可直接作为液体燃料或与汽油混合后利用。近年来，美国、巴西和中国等汽车大国愈发重视生物乙醇技术的研发。国际能源署数据显示，全球能源总消耗约 9% 为生物质能源，生物柴油和乙醇等燃料又占其中约 6%，并呈快速增长趋势^[1]。2009 年《美国清洁能源安全法案》提出，到 2030 年，纤维素乙醇等高级生物燃料供应至少达到 600 亿加仑；我国《可再生能源中长期发展规划》指出，到 2020 年，生物燃料乙醇年目标利用量超过 1 000 万 t。

农业固体废弃物和能源作物是制取第二代燃料乙醇的主要原料。其中基于秸秆和蔗渣等农业废弃物的研究已有很多^[2-3]；近年，能源作物在欧美等国成为研究热点，而我国对该类作物种植、收割、运输、贮存和转化过程的研究尚不充分。柳枝稷 *Panicum virgatum* L. 是最具前景的能源作物之一，是一种原生于北美地区的多年生 C₄ 草本植物^[4]。我国对柳枝稷引进和试种开展了大量研究^[5]，为其在国内大规模种植和商业化奠定了一定基础。

柳枝稷用于工业生产将涉及贮存问题。良好的贮存不仅应保证原料品质，而且可作为预处理前的生化处理，提高生物质转化效率。传统生物质原料保存方法由农业和畜牧业生产发展而来，包括干贮存法和湿贮存法。对于柳枝稷，干贮存需在收割后晾晒至含水率低于 15%，然后打捆置于室外或室内保存^[6]。室外贮存易受气候条件影响，保存不当会造成原料大量损失，贮存过程亦存在火灾隐患；湿贮存含水率一般大于 30%，畜牧业生产中含水率通常保持在 50%–60%。然而，如此高含水率使大规模贮存成本提高，不利于工业生产。以往报道显示，对玉米秸秆以约 30% 含水率青贮时，厌氧微生物亦能够产生足够乳酸和乙酸使原料 pH 降低，实现保存质量^[7]。该结果为柳枝稷湿贮存提供了参考。以典型的北方地区为例，柳枝稷产量在 9 月下旬时较高，此时含水率往往大于 30%，收割后进行青贮处理可能达到理想的贮存效果。

本文以柳枝稷为原料，青贮后使用 LHW 预处理、纤维素酶水解和 SSF 方法，比较青贮和未青贮原料在生物质转化过程中的特征，考察

青贮对该过程影响的机理,为柳枝稷资源的利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 原料收集与青贮

柳枝稷收割于宾夕法尼亚州立大学植物试验田 (PSU Arboretum),时间为2014年9月16日(秋季初)、10月24日(秋季中)和11月18日(秋季末),下文简称为EFS、MFS和LFS (Early, mid and late fall harvested switchgrass)。青贮实验以EFS为原料,MFS和LFS室温存放至使用。青贮前,原料于通风处使含水率降至约30%,使用Munson切割机(SCC-10-MS, Monson, Utica, NY)切割至1–2 cm。添加超纯水调整原料湿度为30%–70%,共5组,每组3个平行。混匀后使用聚乙烯袋双层真空包装(Food Saver Model V3040 Bag Sealer),置于37 °C恒温箱中保存21 d。

1.2 高温水热预处理

所有预处理原料均干燥后使用Wiley粉碎机(Model 4, Thomas Scientific)粉碎,过2 mm筛网,其中青贮样品于40 °C下烘干。LHW预处理采用Dionex ASE 350溶剂萃取系统(ASE 350, Thermo Fisher Inc., Sunnyvale, CA)。反应器为66 mL两端带有旋盖的铝材质管状容器,主体长10.0 cm,外径3.0 cm,内径2.9 cm。旋盖内装有过滤筛板和垫圈,使用时下端旋盖内放置2层直径3.0 cm玻璃纤维滤纸以达到更好的固液分离效果。原料使用量为(15.0±1.0)% (W/W,原料干重/总重)。预处理温度190 °C,保留时间10 min,加热至目标温度的时间为9 min。结束后共约200 mL去离子水冲洗固体

残余物,使温度迅速降低至100 °C以下,最后氮气吹扫180 s分离固液相。预处理液收集至仪器底部转盘的玻璃瓶中用于糖和副产物分析。固体残余物用于成分分析、纤维素酶水解及SSF。

1.3 纤维素酶水解

纤维素酶水解主要参照美国国家可再生能源实验室(NREL)标准分析方法LAP 9并稍作如下修改^[8]。为防止微生物生长,加入40 μL四环素和100 μL放线菌酮。使用两种酶Cellic Ctec 2 (Novozymes, Franklinton, NC, USA)和Novozyme 188 (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)对固体残余物进行水解处理,添加量分别为30 FPU/g纤维素和64 CBU/g纤维素。酶水解反应在50 °C下进行168 h,水解液4 000 r/min下离心15 min,上清液用于糖成分分析。

1.4 同步糖化与发酵

SSF主要参照NREL LAP 10并稍作修改^[9]。使用–20 °C保存的预处理固体残余物作底物,底物纤维素投加量为30 g/L。添加15 FPU/g纤维素的Cellic Ctec 2和64 CBU/g纤维素的Novozyme 188。菌种为酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24859。所有样品于30 °C、130 r/min发酵168 h。第0、6、12、24、72、120和168 h取样,其中第72、120和168 h于厌氧箱中取样。发酵液4 000 r/min离心15 min,上清液过0.22 μm Nylon滤膜用于乙醇测定。测定仪器为YSI 2700 SELECT™生化分析仪(Xylem Inc., Yellow Springs, OH, USA),校准液为1.0 g/L乙醇标准溶液(YSI 2792 Ethanol Standard Kit)。

1.5 成分分析

柳枝稷原料、青贮样品和预处理固体残余物的成分分析参照 NREL LAP 1-6^[10-11]。其中青贮样品和预处理固体残余物分析前在通风烘箱中 40 °C 下烘干。

将部分青贮样品置于干燥箱中 60 °C 下烘干 24 h 用于干重 (DM) 测定。DM 损失率按照每袋柳枝稷青贮前后 DM 的差除以青贮前 DM 计算。青贮样品按照重量比 1 : 10 (原料/水) 混合, 取滤液测定 pH 和有机酸, 有机酸的测定包括羟基二丁酸、丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸、异丁酸、丙酸、丁酸、酒石酸和戊酸。为了测定柳枝稷原样和干燥后青贮样品的有机酸成分, 使用 ASE 350 于 40 °C 下对原料进行萃取, 取萃取液进行测定。

糖、糠醛、羟甲基糠醛 (HMF)、有机酸的分析参照 NREL LAP 7^[12]。为测定预处理水解液中低聚糖, 将 10 mL 水解液移至 15 mL 血清瓶中, 加入 348 μ L 72% H₂SO₄, 121 °C 处理 1 h, 测定酸水解液中某一种糖的总含量 (如葡萄糖), 该种糖的低聚糖含量按照总含量减去预处理水解液中单糖含量计算。所有糖、醛和酸由 Dionex ICS-3000 离子交换色谱仪 (ICE, Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, CA) 测定。

1.6 离子色谱条件

所有样品测定前过 0.22 μ m PTFE 或 Nylon 滤膜并稀释。糖的测定中, 保护柱和分析柱为 3 mm \times 30 mm 和 3 mm \times 150 mm CarboPacTM PA20 (Dionex, Sunnyvale), 工作温度 30 °C, 流动相为 2 mmol/L NaOH, 流速 0.5 mL/min, 检测器为金电极检测器 (Dionex, Sunnyvale, CA)。醛和酸的测定中, 保护柱和分析柱为

4 mm \times 50 mm 和 4 mm \times 250 mm IonPacTM ICE-AS1 离子交换柱, 工作温度 30 °C, 流动相为 100 mmol/L 甲基磺酸, 流速 0.16 mL/min, 检测器为二极管阵列检测器 (Dionex UVD 340U), 检测波长 210 nm。

1.7 计算

酶水解纤维素转化率和 SSF 乙醇产量的计算参照 NREL LAP 9 和 LAP 10^[8-9]。LHW 预处理 (S1) 和酶水解 (S2) 中糖的产量按照下列公式计算^[13] :

$$S1,2 \text{ Glucose yield (\%)} = \frac{\text{Glucose (S1,2)} + \text{GO (S1,2)}}{\text{Glucan}_f / 0.9 + \text{Glucose}_f + \text{Sucrose}_f / 1.9} \times 100 \quad (1)$$

$$S1,2 \text{ Xylose yield (\%)} = \frac{\text{Xylose (S1,2)} + \text{XO (S1,2)}}{\text{Xylan}_f / 0.88 + \text{Xylose}_f} \times 100 \quad (2)$$

其中 GO 和 XO 为低聚葡萄糖和低聚木糖; 0.9 为葡萄糖至葡聚糖转换系数; 1.9 为蔗糖与葡萄糖分子质量比; 0.88 为木糖至木聚糖转换系数^[14]; f 为处理前原料。半乳糖产量计算参照葡萄糖, 但不包含蔗糖; 阿拉伯糖产量计算参照木糖。

2 结果与讨论

2.1 青贮对柳枝稷品质的影响

表 1 列出了秋季初、秋季中和秋季末柳枝稷 (EFS、MFS 和 LFS) 及以秋季初柳枝稷为原料青贮 21 d 样品的主要成分。通常, 本研究涉及的高地生态型柳枝稷自秋季初开始枯萎衰老, 水分含量逐渐减少, 纤维化程度提高, 因此随着收割时间的延后纤维素、木聚糖、木质素和乙酰基含量增加, 而水提取物和蔗糖含量降低。其中, EFS 可溶性糖成分由大于 5% 降低

至 MFS 和 LFS 的 1% 左右。因此 10 月中旬后柳枝稷可能更适于干贮存,这也正是本文只对 EFS 进行青贮的原因。加入 MFS 和 LFS 主要是比较 EFS 青贮原料与较晚收割柳枝稷之间、不同收割时间柳枝稷之间乙醇转化能力,并有助于探讨产生差异的机理。由表 1,青贮对结构性碳水化合物含量影响较小,其中纤维素含量在青贮前后几乎一致;木聚糖、半乳聚糖和乙酰基有所下降,但不明显;阿拉伯聚糖和木质素含量普遍略有升高。青贮过程中微生物活动消耗了原料中部分可溶性糖,通过发酵产生乳酸和乙酸。此类有机酸使亲水性相对较强的半纤维素和其中乙酰基少量水解,因此木聚糖和乙酰基含量下降。阿拉伯聚糖和木质素含量的升高则可能是水提取物等其他成分降低的结果。

图 1 显示了不同含水率青贮柳枝稷有机酸含量、DM 损失率和 pH 值。青贮前 EFS pH 为 6.7,青贮后各含水率组 pH 均低于 4.0。其中,30% 含水率组最高,约为 3.9;60% 和 70% 组以及 40% 和 50% 组 pH 分别为 3.7 和 3.8 左右。有机酸含量是决定青贮样品 pH 值的重要因素,尤其是乳酸含量。乳酸是否为主要发酵产物是能否保证贮存质量的关键因素。经测定,青贮后柳枝稷有机酸主要由乳酸、乙酸、异丁酸和丁酸组成,其中乳酸在各含水率组中含量均最高,其次为乙酸(未列出丁酸和异丁酸)。由图 1,所有未干燥和低温通风干燥的青贮样品(F 和 D)有机酸含量随含水率升高先增加再减少,60% 组含量最高为 6.2% (F) 和 5.4% (D)。低温通风干燥后,青贮样品有机酸有一定损失(图 1)。

表 1 青贮及不同收割时间柳枝稷成分

Table 1 Composition of silage and switchgrass harvested on different dates

Component (%)	Sample name				
	Silage (40% moisture)	Silage (others)	EFS	MFS	LFS
Glucan	33.4±0.6	33.0–33.9	33.3±0.0	34.5±0.3	35.5±0.3
Xylan	22.2±0.5	21.5–22.8	20.2±0.4	25.0±0.1	26.2±0.1
Galactan	0.9±0.0	0.8–0.9	1.1±0.2	0.9±0.0	0.8±0.0
Arabinan	3.4±0.1	3.5–3.6	2.9±0.0	3.0±0.0	3.0±0.1
Lignin	16.6±0.1	15.9–16.5	16.2±0.1	19.2±0.0	19.0±0.1
Acetyl	3.8±0.0	3.7–4.1	4.3±0.0	4.7±0.1	4.8±0.1
Water extractives	15.3±0.1	15.5–16.4	16.7±0.1	8.2±0.1	6.7±0.0
Sucrose	0.7±0.0	0.1–1.4	5.3±0.0	1.2±0.0	1.1±0.0
Lactic acid	3.9±0.0	3.4–5.0	0.9±0.2	0.3±0.1	0.1±0.1
	(3.6±0.1)	(3.3–4.7)	(0.7±0.1)	(0.2±0.1)	(0.1±0.0)
Acetic acid	0.8±0.1	0.5–1.1	0.7±0.1	0.4±0.1	0.4±0.0
	(0.3±0.1)	(0.3–0.4)	(0.3±0.0)	(0.2±0.1)	(0.2±0.1)
Mass closure	101.3±1.0	100.0–100.2	99.8±0.7	100.3±0.0	100.3±0.5

Note: Value in parentheses is the organic acid content of oven-dried biomass. EFS, MFS and LFS stand for early, mid and late fall harvested switchgrass, respectively. "Silage (others)" represents 30%–70% moisture silage except for 40%.

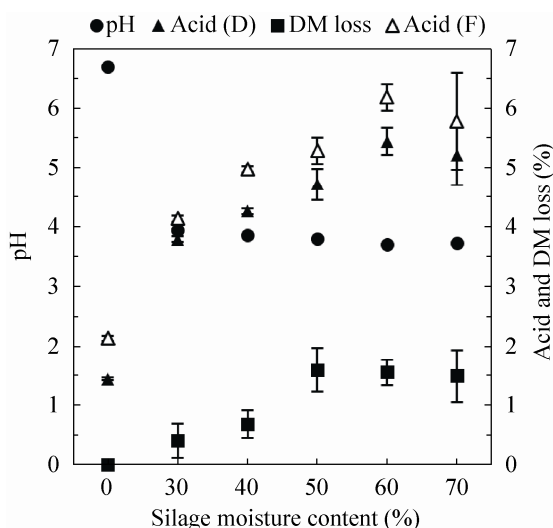


图1 青贮柳枝稷 pH 值、有机酸含量及干物质损失率
Fig. 1 The pH values, organic acids and DM loss of switchgrass silage.

其中乳酸损失较小,40%组乳酸含量由 3.9% (F) 下降至 3.6% (D); 乙酸含量受干燥影响较大, 由 0.8% (F) 下降至 0.3% (D) (表 1)。并且, 乙酸挥发量随青贮样品含水率升高而增加。乙酸作为乙醇发酵的抑制物之一^[15], 干燥过程大量挥发有利于后续乙醇发酵。各含水率组柳枝稷贮存 21 d 后 DM 损失略有不同 (图 1)。其中 50%–70%组 DM 损失率较大, 为 1.5%左右, 30%和 40%组均小于 1%。含水率较高时, 青贮样品中丁酸和异丁酸含量随之增加 (数据未列出), 表明梭状芽孢杆菌活跃, 导致原料异型发酵, 因此 DM 损失增加^[16], 总有机酸含量也因此产生变化; 含水率过低时, 原料中微生物活动总体受到限制, 发酵水平较低, 因此总产酸水平较低, DM 损失率低 (不足 1%)。综合 pH 值、有机酸含量和 DM 损失情况, 本文采用 40%含水率青贮柳枝稷进行后续 LHW 预处理和 SSF, 考察青贮对柳枝稷生物质转化过程的影响。

2.2 青贮对高温水热预处理效率的影响

青贮和不同时间收割的柳枝稷经过 190 °C 10 min LHW 处理后, 结构性碳水化合物和木质素发生了不同程度的水解 (表 2)。100 g 样品预处理后青贮样品和 EFS 固体残余物不足 65 g; MFS 和 LFS 大于 70 g。由于 10 月和 11 月收割的柳枝稷具有更致密的纤维结构、更高木质素和更低的水溶物含量, 因此在该处理条件下溶解率相对较低。青贮样品处理前含纤维素 33.4 g (表 1), 预处理后固体残余物中剩余 30.9 g, 水解率为 7.5%; EFS、MFS 和 LFS 纤维素水解率分别为 10.5%、2.0%和 3.6%。较晚收割的柳枝稷纤维素水解率明显低于青贮样品和 EFS, 主要原因可能是随着柳枝稷衰老枯萎, 细胞壁纤维素聚合度和结晶度增加, 无定型区纤维含量减少, 使该处理条件下可被水解的部分减少。青贮对 LHW 预处理中纤维素水解的影响不明显, 而对半纤维素各组分水解有明显提升作用。

去除半纤维素是 LHW 预处理的主要目的之一。半纤维素主要由木糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, 其中木聚糖含量最高。在 190 °C 下,

表 2 预处理固体残余物成分 (g/100 g 预处理前样品)
Table 2 Composition of pretreated solids (g/100 g un-pretreated biomass)

Comp	Pretreated solid			
	Silage	EFS	MFS	LFS
Solid	63.2±0.6	64.2±0.8	72.7±0.7	70.4±1.0
Glucan	30.9±0.2	29.8±0.3	33.8±0.2	34.2±0.4
Xylan	10.3±0.1	11.3±0.2	12.2±0.2	12.2±0.2
Galactan	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0
Arabinan	1.0±0.0	1.1±0.1	1.1±0.0	0.9±0.0
Lignin	15.4±0.1	15.6±0.1	17.1±0.2	16.3±0.2

Note: Comp stands for component; EFS, MFS and LFS stand for early, mid and late fall harvested switchgrass, respectively.

100 g 青贮样品中 12.2 g 木聚糖水解, 水解率为 55.2% (表 1 和 2); MFS 和 LFS 水解率分别为 49.2% 和 53.3%; EFS 最低为 45.8%。对于半乳聚糖和阿拉伯聚糖, 青贮样品水解率亦大于 EFS: 二者半乳聚糖水解率分别为 71.3% 和 64.2%, 阿拉伯聚糖分别为 71.4% 和 52.7%。一方面, 青贮样品有机酸含量较高, 使预处理体系 pH 降低, 有助于聚糖水解; 另一方面, 青贮使半纤维素结构变得疏松, 并且由于微生物的活动, 纤维表面更加粗糙^[17], 因此水解率增加。

预处理对各样品中木质素成分去除效果均不明显。青贮样品木质素由处理前的 16.6 g 减少至 15.4 g, 去除率为 7.2%; EFS 由 16.2 g 减少至 15.6 g, 去除率为 3.7%, 略小于青贮样品; MFS 和 LFS 分别为 10.7% 和 14.2%。以往研究显示, 200 °C 时, 约 20% 木质素溶解于水中^[14], 说明即使在相对激烈的条件下, LHW 对木质素的去除率依旧不高。在预处理过程中, 木质素降解为酚类和其他芳香族化合物, 在一定程度上破坏了木质纤维结构, 使纤维素更容易酶解^[18]。木质素为生物质抗降解屏障的重要组成部分, 通过两方面影响木质纤维素类生物质的水解进程: 一是含量; 二是分子量大小以及聚合形式^[19]。以往研究显示, 青贮玉米秸秆预处理后木质素中愈创木基丙烷结构单体有明显断裂迹象; 未青贮或干贮存的秸秆这种断裂现象不明显, 且固体残余物中的木质素与纤维素和半纤维素的结合程度高于青贮秸秆^[17]。本文中, 各样品木质素去除率虽然普遍不高, 且青贮样品仅大于 EFS, 但可以肯定, LHW 预处理对青贮样品木质素的破坏不仅表现在量的大小, 而且更多表现为对整体纤维结构的影响。

LHW 预处理过程中, 部分结构性碳水化合物水解为低聚糖和单糖, 其中一部分继而降解为醛和酸。本文中糖的主要副产物为 HMF、糠醛和乙酸 (图 2), 主要是戊糖、己糖和半纤维素中乙酰基的降解产物^[18]。由图 2, 青贮样品、MFS 和 LFS 的 HMF 产量均远低于 0.1 g/100 g, 而 EFS 约 0.2 g/100 g。主要原因是 EFS 的非结构性葡萄糖含量明显高于其他样品 (表 1), 这些非结构性糖在一定的处理时间和温度下能够直接水解为 HMF。青贮柳枝稷糠醛产量明显高于 EFS (分别为 0.4 g/100 g 和 0.2 g/100 g)。预处理过程中, 青贮样品半纤维素水解率高于其他样品, 因此水解液中含有更多的木糖和阿拉伯糖, 使糠醛产生水平升高。本文主要为了比较青贮和未青贮柳枝稷生物质转化过程的不同, 因此选择了较为温和的预处理条件, 尽可能保留纤维素成分用于 SSF, 若进一步升高处理温度

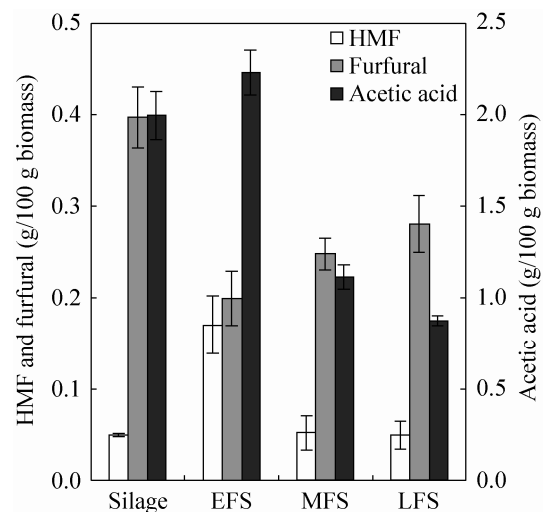


图 2 预处理过程中 HMF、糠醛和乙酸的产量

Fig. 2 HMF, furfural and acetic acids released during pretreatment.

并延长时间,青贮样品糠醛产量则可能显著提高,并且糠醛将继续降解为乙酰丙酸和甲酸。而在实际生产中,甲酸对酵母菌的抑制作用远高于乙酸和丙酸^[20]。本研究中所有样品甲酸产量均低于 0.1 g/100 g,并且未青贮样品低于青贮样品(未在图表中显示)。值得注意的是,水解液中青贮样品甲酸可能更多来自于青贮过程而非糠醛降解。

由图 2,青贮样品和 EFS 乙酸产量明显高于 MFS 和 LFS,并且 EFS 略高于青贮样品。Darku 在比较青贮前后玉米秸秆预处理水解液乙酸含量时有类似的结果^[7]。主要原因可能是作为预处理底物,青贮柳枝稷和 EFS 乙酸成分高于 MFS 和 LFS;而 EFS 乙酸产量相对较高可能是青贮过程原料乙酰基含量减少的结果。

2.3 青贮对糖产量的影响

图 3 为各样品在 LHW 预处理和纤维素酶水解过程中糖的产量。S1 (LHW 预处理) 阶段,青贮和未青贮柳枝稷水解液中葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖主要以低聚糖形式存在。除葡萄糖,青贮样品各糖产量在 S1 阶段均高于 EFS。由图 3A S1 阶段 EFS 葡萄糖产量为 20.7%,高于青贮样品 (10.8%)、MFS 和 LFS (5.7%和 4.9%)。这是由于 EFS 非结构性葡萄糖含量最高(表 1)。并且,由图 3A 和成分分析可知,这些非结构性葡萄糖主要以蔗糖和低聚糖形式存在。对于所有样品,葡萄糖主要在 S2 阶段通过酶水解纤维素获得。其中,青贮柳枝稷和 LFS 在 S2 阶段的葡萄糖产量约 68%,高于 EFS 和 MFS (分别为 55.7%和 64.6%)。由章节 2.2, EFS 在 S1 阶段纤维素去除率仅高于青贮样品约 3%,而在 S2 阶段葡萄糖产量明显低于青贮样品。S2

阶段,青贮样品具有比 EFS 更高的纤维素转化率(分别是 74.3%和 66.6%,未在图表中显示),说明青贮处理提高了底物纤维素的酶水解效率,这也正是造成上述产量差异的直接原因。对于葡萄糖总产量,青贮样品为 78.9%,同样高于 EFS (76.4%) 和 LFS (71.9%); MFS 最低为 70.3%。

S1 和 S2 阶段青贮柳枝稷木糖和半乳糖总产量高于未青贮柳枝稷,阿拉伯糖总产量略低于 LFS (图 3B、C 和 D)。S1 阶段青贮样品的木糖产量最高,为 53.6%,EFS 最低为 45.5%,MFS 和 LFS 分别为 46.8%和 51.8%。在 190 °C 预处理 10 min 的条件下,各样品水解液中的木糖均主要以低聚糖形式存在,这在一定程度上减小了木糖单糖降解为糠醛的风险,保证了青贮样品木糖产量。若增加预处理温度或延长处理时间,青贮样品 S1 阶段木糖损失可能更高。由于 Cellic Ctec 2 包含少量半纤维素酶,因此 S2 阶段底物中部分木聚糖、半乳聚糖和阿拉伯聚糖亦得到水解,但青贮与未青贮之间无明显差异,各样品木糖、半乳糖和阿拉伯糖 S2 阶段产量分别低于 35%、14%和 10%。再由图 3B,青贮样品木糖总产量最高,为 86.6%;EFS、MFS 和 LFS 分别为 80.3%、79.7%和 84.9%。半乳糖在酸性条件下最易自半纤维素中解聚。在弱酸条件下,青贮样品超过 90%的半乳糖回收于预处理阶段(图 3C);MFS 和 LFS 分别为 83.8%和 89.7%;EFS 最低为 71.6%。青贮样品半乳糖总产量明显高于 EFS,但由于各样品中半乳聚糖含量仅约 1%,因此其产量的差异可能不会对 SSF 乙醇产量造成影响。对于阿拉伯糖,青贮与未青贮样品在 S1 阶段产量均低于 80%,

EFS 最低为 62.2% ;青贮样品 S1 和 S2 阶段总产量为 79.2% ,高于 EFS (69.8%) ,但低于 LFS (83.5%)。但是,由于 ATCC 24859 主要利用葡萄糖,木糖和阿拉伯糖利用能力有限,因此木糖和阿拉伯糖产量更主要作为指示自身水解效率的指标。

2.4 青贮对乙醇产量的影响

经过 168 h SSF, 青贮样品、EFS、MFS 和 LFS 乙醇浓度分别为 12.1、10.3、9.7 和 10.6 g/L (图 4)。24 h 时,所有样品乙醇浓度均未达到 10.0 g/L, MFS 最小为 8.5 g/L。青贮柳枝稷乙醇浓度于 24–72 h 快速增加,72 h 时达到 11.0 g/L,

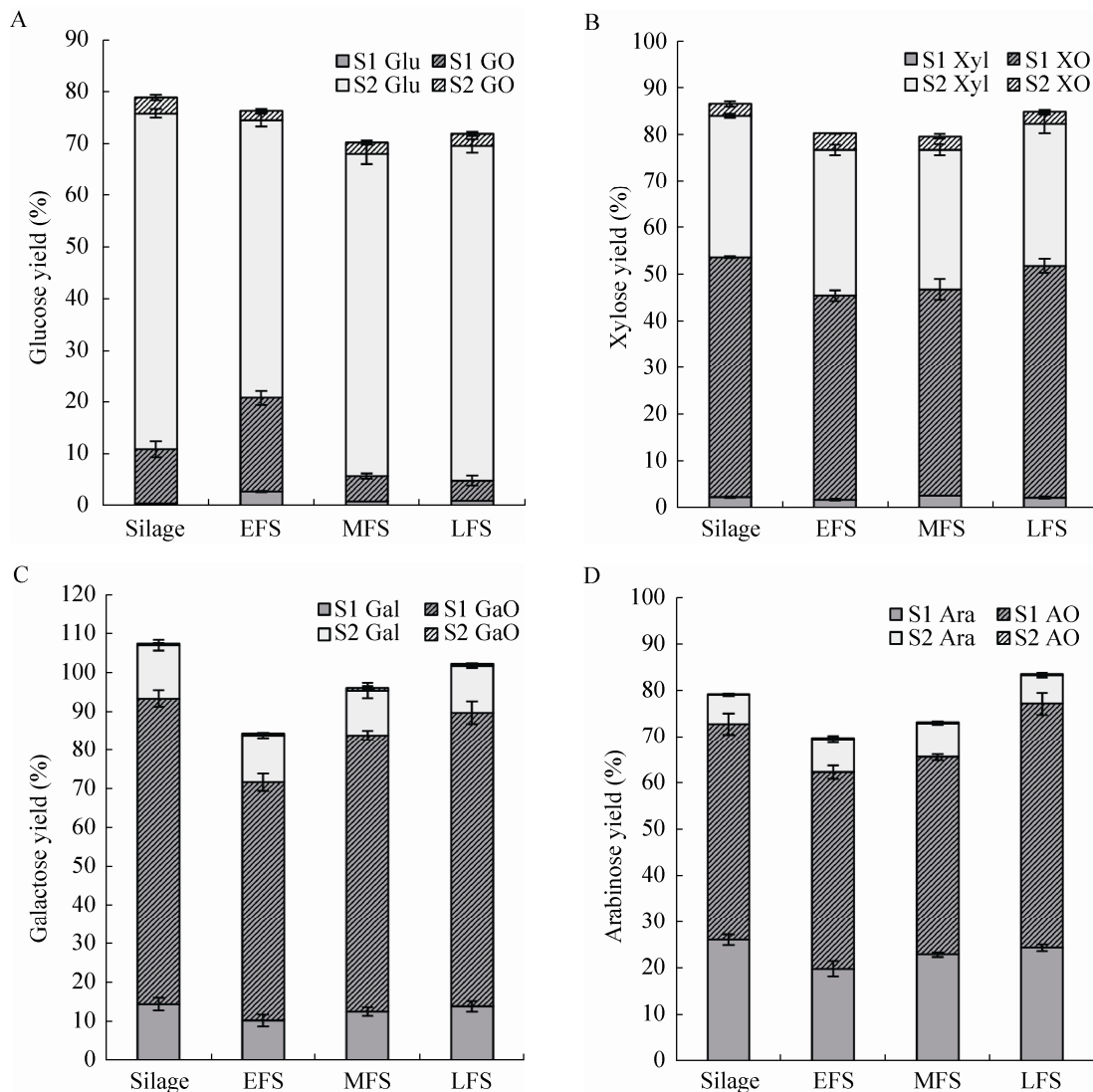


图 3 预处理和纤维素酶水解过程糖的产量

Fig. 3 Sugar yield during LHW pretreatment and enzymatic hydrolysis. S1 and S2 represent LHW pretreatment and enzymatic hydrolysis; Glu: glucose; GO: gluco-oligomers; Xyl: xylose; XO: xylo-oligomers; Gal: galactose; GaO: galacto-oligomers; Ara: arabinose; AO: arabino-oligomers.

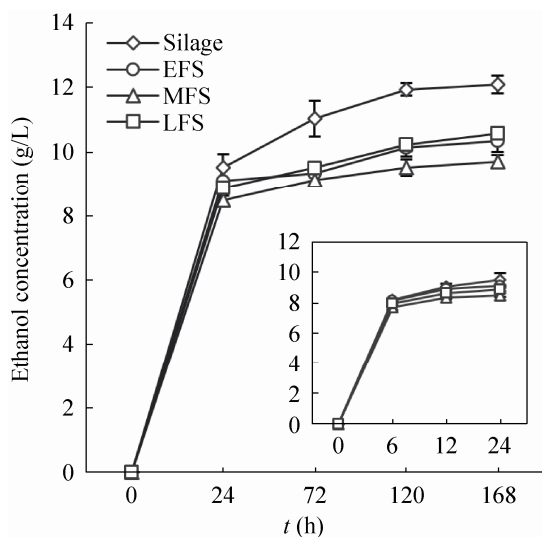


图 4 同步糖化与发酵液中乙醇的浓度

Fig. 4 Ethanol concentration in SSF liquids.

其他样品均小于 10.0 g/L。120 h 后青贮样品中乙醇增加趋势不明显，未青贮柳枝稷略微增加。按照 NREL LAP 10 乙醇产量计算，24 h 时，各样品底物乙醇理论产量均低于 60%；72 h 时青贮样品和 LFS 产量达到 60%；120 h 时青贮样品达到 70%以上，EFS 和 MFS 则低于 60%；SSF 结束时，青贮样品产量为 73.0%，其次为 LFS (66.9%)，EFS 为 63.1%。由章节 2.3，各样品乙醇理论产量均低于 S2 阶段纤维素转化率（分别为 74.3%、66.6%、67.0%和 71.7%），这是由于一方面 SSF 初始阶段酵母菌好氧呼吸迅速增殖消耗了部分葡萄糖；另一方面，为考察各样品的最大糖产量，章节 1.3 中酶水解步骤每 g 纤维素投加 Cellic Ctec 2 的量为 30 FPU，而 SSF 中投加量为 15 FPU，因此 SSF 纤维素酶水解效率相比较低。SSF 仅使用预处理后固体残余物作为底物，没有将 LHW 水解液与之混合发酵，这可能会造成乙醇总产量的降低，尤其是对于青

贮前 EFS 原样，因为 EFS S1 阶段水解液中包含约 20%非结构性葡萄糖。但是，上述情况同样需要考虑预处理水解液中发酵抑制物对乙醇产量的影响，因此不能仅按照 S1 阶段葡萄糖产量直接转换为理论乙醇产量。此部分还需进一步实验加以印证。

3 结论

青贮秋季初收割的柳枝稷能够使其获得良好的贮存效果。青贮后柳枝稷非结构性碳水化合物含量降低，结构性碳水化合物和木质素含量无明显变化。在 190 °C 预处理 LHW 10 min 条件下，青贮处理使柳枝稷获得了更高的半纤维素去除率，但乙醇发酵抑制产物的产量也普遍高于未青贮样品。并且，较晚收割的柳枝稷半纤维素去除率高于较早收割的柳枝稷。未青贮柳枝稷在预处理和纤维素酶水解中糖的产量普遍低于青贮处理后的柳枝稷。在最终的 SSF 中，青贮柳枝稷获得了更高的乙醇产量。

REFERENCES

- [1] International Energy Agency. IEA technology roadmaps: biofuels for transport. Source OECD Energy, 2011: 1-56.
- [2] Wang H, Xu HX, Zhou DY, et al. Study of ultrasonic-assisted alkali pretreatment on cotton stalk. J Agro-Environ Sci, 2013, 32(2): 400-406 (in Chinese).
王华, 许红霞, 周大云, 等. 棉花秸秆超声波碱预处理研究. 农业环境科学学报, 2013, 32(2): 400-406.
- [3] Wang XT, Xie H, Geng T, et al. Study on fuel ethanol by synchronous saccharification and fermentation from straws. Renew Energy Resour, 2013, 31(6): 85-89 (in Chinese).

- 王许涛, 谢慧, 耿涛, 等. 农作物秸秆同步糖化发酵制燃料乙醇条件研究. 可再生能源, 2013, 31(6): 85–89.
- [4] Lu F, Lipka AE, Glaubitz J, et al. Switchgrass genomic diversity, ploidy, and evolution: novel insights from a network-based SNP discovery protocol. *PLoS Genet*, 2013, 9(1): e1003215.
- [5] Guo CY, Li JC, Yue JY, et al. Diurnal changes in the photosynthetic characteristics of two high yield and high quality grasses during different stages of growth and their response to changes in light intensity. *Acta Ecolog Sin*, 2013, 33(6): 1751–1761 (in Chinese).
郭春燕, 李晋川, 岳建英, 等. 两种高质牧草不同生育期光合生理日变化及光响应特征. *生态学报*, 2013, 33(6): 1751–1761.
- [6] Mitchell RB, Schmer MR. *Switchgrass Harvest and Storage*. London: Springer-Verlag London Press, 2012: 113–127.
- [7] Darku ID. Characterization of wet storage impacts on bioprocessing of corn stover to biofuels [D]. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 2013.
- [8] Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass [EB/OL]. [2015-02-04]. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [9] SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation [EB/OL]. [2001-10-30]. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [10] Extractives in biomass [EB/OL]. [2005-07-17]. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [11] Structural carbohydrates and lignin in biomass [EB/OL]. [2012-08-03]. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [12] Sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples [EB/OL]. [2006-12-08]. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [13] Garlock RJ, Balan V, Dale BE, et al. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. *Bioresour Technol*, 2011, 102(24): 11063–11071.
- [14] Yemiş O, Mazza G. Acid-catalyzed conversion of xylose, xylan and straw into furfural by microwave-assisted reaction. *Bioresour Technol*, 2011, 102(15): 7371–7378.
- [15] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24(3/4): 151–159.
- [16] McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Welton, Lincoln, UK: Chalcombe Publications Press, 1981: 160–191.
- [17] Liu ZH, Qin L, Jin MJ, et al. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 5–15.
- [18] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 16.
- [19] Leschinsky M, Zuckerstätter G, Weber HK, et al. Effect of autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* wood on lignin structure. Part 2: influence of autohydrolysis intensity. *Holzforschung*, 2008, 62(6): 653–658.
- [20] Pampulha ME, Loureiro-Dias MC. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31(5/6): 547–550.
- [21] Obembe OO, Jacobsen E, Visser RGF, et al. Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 2006, 1(3): 76–86.

(本文责编 陈宏宇)