



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110760552 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201911178999.8

(22)申请日 2019.11.27

(71)申请人 湘潭大学

地址 411105 湖南省湘潭市雨湖区羊牯塘
27号

(72)发明人 陈跃辉 田文静 贺倩妮 陈玥如

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所(普
通合伙) 43114

代理人 张伟 魏娟

(51)Int.Cl.

C12P 19/14(2006.01)

C12P 19/02(2006.01)

D21C 3/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法

(57)摘要

本发明公开了一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法。该方法是将乙二酸、氯化胆碱、丙三醇加入水中反应,得到改性低共熔溶剂,采用改性低共熔溶剂对木质纤维素原料进行预处理,该方法能够在更低的温度条件下实现对木质纤维素的预处理,更有利于提高木质纤维素的糖化效率,能大幅提升木质纤维素水解过程中释放碳水化合物总量。

1. 一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:将乙二酸、氯化胆碱及丙三醇加入水中反应,得到改性低共熔溶剂,采用改性低共熔溶剂对木质纤维素原料进行预处理。

2. 根据权利要求1所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:乙二酸、氯化胆碱及丙三醇的摩尔比为 $0.25 \sim 0.5:1 \sim 1.5:1$ 。

3. 根据权利要求2所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:乙二酸、氯化胆碱及丙三醇的摩尔比为 $0.25 \sim 0.5:1:1$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:水占改性低共熔溶剂质量的 $4 \sim 16\%$ 。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:乙二酸、氯化胆碱、丙三醇加入水中在 $75 \sim 105^{\circ}\text{C}$ 反应直至反应体系透明。

6. 根据权利要求1所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:木质纤维素原料占改性低共熔溶剂与木质纤维素原料总质量的 $8 \sim 16\%$ 。

7. 根据权利要求1或6所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:采用改性低共熔溶剂对木质纤维素原料进行预处理的过程为:将木质纤维素加入改性低共熔溶剂中,在 $80 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 条件下预处理 $1.5 \sim 10\text{h}$ 。

8. 根据权利要求7所述的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,其特征在于:所述预处理是在 $110 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 温度下预处理 $6 \sim 8\text{h}$ 。

一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种木质纤维素预处理方法,具体涉及一种利用乙二醇/丙三醇/氯化胆碱新型三元改性低共熔溶剂预处理木质纤维素,提高酶解糖化效率的方法,属于生物燃料制备技术领域。

背景技术

[0002] 农林作物、能源作物等木质纤维素类生物质具有环保、可再生、生产量大、富含碳水化合物等特点,充分利用该新能源生产生物燃料能很大程度减少化石燃料的使用。木质纤维素的结构组成主要为纤维素、半纤维素和木质素,三者通过氢键、共价键、非共价键紧密交织在一起形成牢固的保护伞,增强了木质纤维素在酶解糖化过程中的抗性,而将其转化成可发酵糖是生产生物燃料的瓶颈阶段。预处理技术可以大幅改变木质纤维素生物质物理化学结构特性,提高酶解糖化效率,进而提高生物质生产生物燃料的总产量。

[0003] 木质纤维素预处理方法众多。物理法是通过粉碎、辐射、球磨等机械手段调节生物质的粗细与大小,降低了纤维素的结晶度与聚合度,但附着在结构表面的木质素仍然会阻碍纤维素酶的可及性导致产糖量不高。物理化学法包括湿氧化、CO₂爆破、蒸汽爆破等,使酶与纤维素表面的面积接触更广,而成本高、对设备要求苛刻,后续发酵会产生抑制物是其不足。生物法预处理利用放线菌、白腐菌、褐腐菌分解生物质中的木质素,该法有条件温和、环境友好的优点,但尚且没有可控制、时间周期短的处理系统。化学法利用离子液体、酸、碱、有机溶剂等化学试剂对纤维素、半纤维素和木质素三者之一进行溶解,分离出能基本全部糖化的纤维素部分。离子液体具有高热稳定性、化学稳定性,但价格昂贵,毒性大,工业应用困难。酸、碱法有较理想的预处理效果,尽管本身具有腐蚀性,在预处理过程中也不可避免产生抑制酶活性的副产物。传统的有机溶剂法虽然能够大幅提高木质素去除率和减少纤维素损失率,但成本高、难度大。近年来以低共熔溶剂(DES)为代表的有机溶剂法成为预处理木质纤维素的重要方法之一,该溶剂是由两种以上组分合成,其凝固点显著低于各自组分熔点的,若组成成分均为天然有机物,则称之为天然低共熔溶剂(NADES),具有与离子液体类似的物化特性,能够大幅提高木质纤维素酶解糖化效率,且无毒、环保、易生物降解同时操作方法简便。

[0004] 尽管预处理方法不胜枚举,但处理试剂低成本化、操作过程低能耗化、操作方法简易化、释放污染物无毒无害化仍然是提高木质纤维素酶解糖化效率进而规模化生产生物燃料的最迫切需求。十年前, Lee J W等人研究表明(Lee J W,Rodrigues R C L B,Jeffries T W.Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology[J].Bioresource Technol,2009,100(24):6307-6311.)乙二醇可以直接催化纤维素和半纤维素的水解,是已知的最强的有机酸之一,马来酸和乙二醇等有机酸能够克服产生抑制物和腐蚀设备的缺点,可以作为硫酸等传统酸的替代物;后Lee J W等人(Lee J W,Jeffries T W.Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass

over a range of combined severity factors[J].Bioresource Technology,2011,102(10):5884-5890.)继续研究证实乙二酸对酵母和其他微生物的毒性低于乙酸或亚硫酸,不会抑制糖酵解,也不会产生有害气味,可以有效降解半纤维素,留下较大的纤维素残留量;由此可见,廉价、无毒、环境友好的乙二酸是非常具潜力的预处理有机溶剂之一。

[0005] 因此,近年来,有不少研究学者们用乙二酸或将乙二酸作为天然低共熔溶剂的成分之一,试图发挥它们各自的绿色优势,希望能从生物质中获取更多的能源。2011年,Li X等人(Li X,Cai Z,Horn E,et al.Oxalic acid pretreatment of rice straw particles and loblolly pine chips:release of hemicellulosic carbohydrates[J].Tappi Journal,2011,2011(5):41-45.)研究结果表明使用乙二酸预处理稻草颗粒可以使碳水化合物的提取量显著增高2.3倍,但温度需要达到160摄氏度;2016年,Zhang C W等人(Zhang C W,Xia S Q,Ma P S.Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents[J].Bioresource Technology,2016:S0960852416309907)用一元羧酸/氯化胆碱,二元羧酸/氯化胆碱和多元醇/氯化胆碱这三种深低共熔溶剂(DESs)预处理玉米芯,表征结果表明DESs通过去除半纤维素和木质素来解构玉米芯的结构进而获得较高葡萄糖产量,乙二酸/氯化胆碱对木质素的去除率能达到98.5%,而酶水解后得到的葡萄糖产率仅为45.2%;2017年,Hou X D等人(Hou X D,Feng G J,Ye M,et al.Significantly enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw via a high-performance two-stage deep eutectic solvents synergistic pretreatment[J].Bioresource Technology,2017,238:139-146.)先用乙二酸/氯化胆碱处理稻草,后用氯化胆碱/尿素继续处理,通过两阶段深共熔溶剂的协同作用才显著增强了稻草的酶促水解,尽管葡萄糖收率能达到90.2%,但这样无疑繁琐了实验过程;因此在目前阶段,把乙二酸作为预处理木质纤维素的有机试剂之一,有处理条件苛刻、糖化效率不高,操作过程繁琐等缺点。

[0006] 而不包含乙二酸的DES体系如在Kumar AK等人(Kumar A K,Parikh B S,Pravakar M.Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw:bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue[J].Environmental Science and Pollution Research,2016,23(10):9265-9275.)测试的NADES试剂中,摩尔比为5:1的乳酸/氯化胆碱处理后的生物质稻草的最大还原糖仅为333+11mg g⁻¹,还原糖转化效率并不高;如Liu D等人(Liu D,Yan X,Zhuo S,et al.Pandora sp.B-6assists the deep eutectic solvent pretreatment of rice straw via promoting lignin depolymerization[J].Bioresource Technology,2018,257:62-68)继续优化Kumar A K等人的实验,将生物质稻草用摩尔比为5:1的乳酸/氯化胆碱在140℃预处理8h后,命名为用DES-RS,再将Pandora sp.B-6种子经过活化、接种培养后收集在DES-RS的无菌矿物盐培养基中,才使得最终糖产率达到73.1%。

[0007] 综上所述,目前阶段现有的NADES体系有处理条件苛刻或无法达到理想的糖化效率等不足之处。现有最新专利技术(CN 107904266 A)公开了一种提高木质纤维素糖化效果的预处理方法,具体公开采用氯化胆碱、柠檬酸和丙三醇按1:0.5:1.5混合获得NADES,在130℃预处理水稻秸秆4小时,达到峰值还原糖产量840mg/g,转化效率为91.3%。但是其仍然存在处理温度高,还原糖产量偏低的技术问题,有待进一步改进。

发明内容

[0008] 为了解决现有木质纤维素预处理技术存在的问题,本发明的目的是在于提供了一种乙二酸/丙三醇/氯化胆碱三元组合新型DES体系,相对现有的氯化胆碱/柠檬酸/丙三醇能够在更低的温度条件下实现对木质纤维素的预处理,更有利于提高木质纤维素的糖化效率,能大幅提升木质纤维素水解过程中释放碳水化合物总量。

[0009] 为了实现上述技术目的,本发明提供了一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法,该方法是将乙二酸、氯化胆碱、丙三醇加入水中反应,得到改性低共熔溶剂,采用改性低共熔溶剂对木质纤维素原料进行预处理。

[0010] 优选的方案,乙二酸、氯化胆碱及丙三醇的摩尔比为0.25~0.5:1~1.5:1。最优选的摩尔比为0.25~0.5:1:1。乙二酸、氯化胆碱及丙三醇三者的摩尔比对木质纤维素原料的预处理效果存在明显影响,如乙二酸的引入相对氯化胆碱及丙三醇两者组合使用可以明显提高对木质纤维素原料的预处理效果,且三者较佳的摩尔比例为0.25~0.5:1~1.5:1,而氯化胆碱与丙三醇比例为1:1时可以达到最佳的预处理效果。

[0011] 优选的方案,水占改性低共熔溶剂质量的4~16%。

[0012] 优选的方案,乙二酸、氯化胆碱、丙三醇加入水中在75~105℃反应直至反应体系透明。

[0013] 优选的方案,木质纤维素原料占改性低共熔溶剂与木质纤维素原料总质量的8~16%。

[0014] 优选的方案,采用改性低共熔溶剂对木质纤维素原料进行预处理的过程为:将木质纤维素加入改性低共熔溶剂中,在80~120℃条件下预处理1.5~8.5h。最优选的预处理条件为:在110~120℃条件下预处理6~8h。预处理温度和时间均对木质纤维素原料的预处理效果存在影响,而温度的影响最为明显,随着温度的升高,预处理效果明显提升,但是到120℃接近理想值,这个效果是出乎意料的,相对现有技术中其他低共熔溶剂,预处理温度明显降低,优选的预处理温度为110~120℃,最佳为120℃。而预处理时间对预处理效果不如温度明显,但是在6~8h,达到峰值。

[0015] 优选的方案,木质纤维素原料如水稻秸秆。

[0016] 本发明的一种提高木质纤维素糖化效率的预处理方法:

[0017] 1) 清水清洗粒径为180~400μm的木质纤维素原料,于55℃烘干至恒重。

[0018] 2) 将4~16% (W/W) 的水含量和一定比例配置的乙二酸/丙三醇/氯化胆碱混合形成新型有机溶剂,封口放入恒温干燥箱,完全形成液体后备用。

[0019] 3) 以8~16% (W/W) 水稻秸秆含量与2) 中液体混合,于80~120℃摇床振荡1.5~10h,后清洗滤渣至洗液中性,滤渣烘干得预处理后的木质纤维素样品。

[0020] 4) 在(pH 4.8, 0.1mol/L) 柠檬酸盐缓冲液中加入8~38FPU/g底物纤维素酶和3) 中样品,酶解条件为45~55℃、100~180rpm/min、22~72h,取样计算糖化效率。

[0021] 相对现有技术,本发明技术方案的优势在于:

[0022] 1) 采用乙二酸/丙三醇/氯化胆碱改性低共熔溶剂预处理的木质纤维素,相对现有技术,在更低的预处理温度下,获得更高的酶解糖化效率,如在120℃预处理的水稻秸秆经过酶解后释放的还原糖含量从350.661mg/g提高至961.524mg/g,酶解糖化效率从原来的42.58%提高至98.26%,是未预处理的2.308倍,相对现有技术具有明显技术优势。

[0023] 2) 乙二酸/丙三醇/氯化胆碱改性低共熔溶剂预处理木质纤维素的处理过程简便,设备要求低,且原料廉价易得、绿色友好。

附图说明

[0024] 图1为不同温度下木质纤维素预处理前后的还原糖产量变化;

[0025] 图2为不同摩尔比条件下木质纤维素预处理前后还原糖产量变化;

[0026] 图3为不同时间下木质纤维素预处理前后还原糖产量变化;

[0027] 图4为最佳氯化胆碱/乙二酸(CC/OA)预处理木质纤维素还原糖产量与最佳本发明以及未预处理的还原糖产量的对比;

[0028] 图5为木质纤维素预处理前后表面结构变化;a、b、c为未预处理,d、e、f为实施例2预处理。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图和水稻秸秆研究实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限定。

[0030] 实施例1

[0031] (1) 清水清洗粒径为180~400 μ m的水稻秸秆,于55 $^{\circ}$ C烘干至恒重;

[0032] (2) 以5% (W/W) 的蒸馏水量与0.5:1:1混合乙二酸/丙三醇/氯化胆碱混合封口后,置于100 $^{\circ}$ C干燥箱,待混匀成透明液体后备用;

[0033] (3) 以10% (W/W) 的水稻秸秆量与(2)中新型有机溶剂混合振荡于80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C、120 $^{\circ}$ C摇床4h进行预处理,后清洗滤渣至洗液中性,烘干滤渣,获得三种预处理样品,1;

[0034] (4) 以22FPU/g底物纤维素酶量、25mg/mL预处理样品量与柠檬酸盐缓冲液混合(pH 4.80,0.1mol/L)后,于100rpm/min、50 $^{\circ}$ C酶解22~72h,每隔24小时取样测定产还原糖量。

[0035] 经本实施例处理后,水稻秸秆释放的还原糖含量从350.661mg/g可提高至809.485mg/g (120 $^{\circ}$ C) (见附图1),酶解糖化效率从原来的42.58%提高至87.15%,还原糖转化效率是未预处理的2.047倍;从扫描电镜图(见附图5)可以看出,未预处理的水稻秸秆直挺且粗细均匀,表面光滑结构紧凑,纤维束排列整齐有序,而预处理后的水稻秸秆因断裂变得短小,粗细不均,表面形状扭曲凹凸不平,纤维束发生溶胀整体舒张成片状使其比表面积显著增大,纤维素酶与其充分作用使水稻秸秆释放还原糖量显著增多。

[0036] 实施例2

[0037] (1) 清水清洗粒径为180~400 μ m的水稻秸秆,于55 $^{\circ}$ C烘干至恒重;

[0038] (2) 以5% (W/W) 的蒸馏水量与0.25:1:1、0.5:1:1、0.25:1:1.5、0.5:1:1.5乙二酸/丙三醇/氯化胆碱混合封口后,置于100 $^{\circ}$ C干燥箱,待混匀成透明液体后备用;

[0039] (3) 以10% (W/W) 的水稻秸秆量与(2)中新型有机溶剂混合振荡于120 $^{\circ}$ C摇床4h进行预处理,后清洗滤渣至洗液中性,烘干滤渣,获得4种预处理样品,2;

[0040] (4) 以22FPU/g底物纤维素酶量、25mg/mL预处理样品量与柠檬酸盐缓冲液混合(pH 4.80,0.1mol/L)后,于100rpm/min、50 $^{\circ}$ C酶解22~72h,每隔24小时取样测定产还原糖量。

[0041] 经本实施例处理后,水稻秸秆释放的还原糖含量从350.661mg/g提高至851.415mg/g (OA/CC/GL为0.25:1:1) (见附图2),酶解糖化效率从原来的42.58%提高至

89.26%，是未预处理的2.096倍。

[0042] 实施例3

[0043] (1) 清水清洗粒径为180~400 μ m的水稻秸秆，于55℃烘干至恒重；

[0044] (2) 以5% (W/W) 的蒸馏水量与0.25:1:1混合乙二酸/丙三醇/氯化胆碱混合封口后，置于100℃干燥箱，待混匀成透明液体后备用；

[0045] (3) 以10% (W/W) 的水稻秸秆量与(2)中新型有机溶剂混合振荡于120℃摇床2、4、6、8、10h进行预处理，后清洗滤渣至洗液中性，烘干滤渣，获得5种预处理样品3；

[0046] (4) 以22FPU/g底物纤维素酶量、25mg/mL预处理样品量与柠檬酸盐缓冲液混合(pH 4.80, 0.1mol/L)后，于100rpm/min、50℃酶解22~72h，每隔24小时取样测定产糖量。

[0047] 经本实施例处理后，水稻秸秆释放的还原糖含量从350.661mg/g提高至961.524mg/g(见附图3)，酶解糖化效率从原来的42.58%提高至98.26%，是未预处理的2.308倍。

[0048] 对比实施例1

[0049] (1) 清水清洗粒径为180~400 μ m的水稻秸秆，于55℃烘干至恒重；

[0050] (2) 以5% (W/W) 的蒸馏水量与0.25:1混合乙二酸/氯化胆碱混合封口后，置于100℃干燥箱，待混匀成透明液体后备用；

[0051] (3) 以10% (W/W) 的水稻秸秆量与(2)中有机溶剂混合振荡于120℃摇床2h进行预处理，后清洗滤渣至洗液中性，烘干滤渣，获得预处理样品4；

[0052] (4) 以22FPU/g底物纤维素酶量、25mg/mL预处理样品量与柠檬酸盐缓冲液混合(pH 4.80, 0.1mol/L)后，于100rpm/min、50℃酶解22~72h，每隔24小时取样测定产还原糖量。

[0053] 经本实施例处理后，水稻秸秆释放的还原糖含量从350.661mg/g提高至774.655mg/g(见附图4)，酶解糖化效率从原来的42.58%提高至88.16%，是未预处理2.07倍。

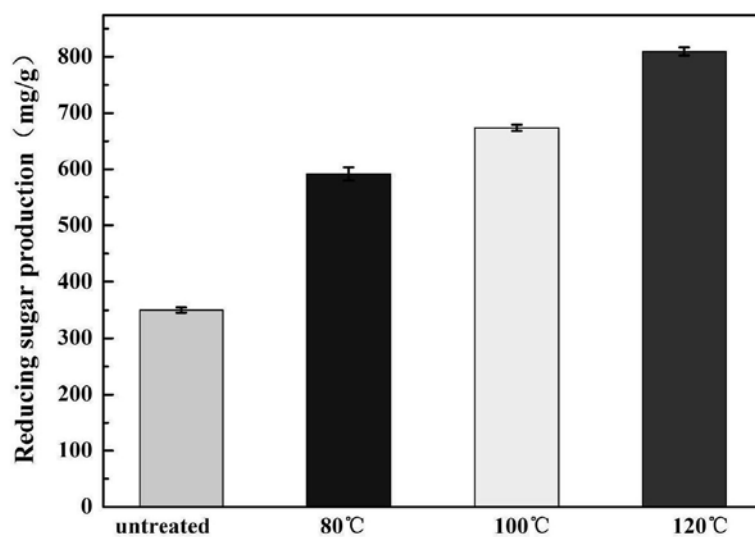


图1

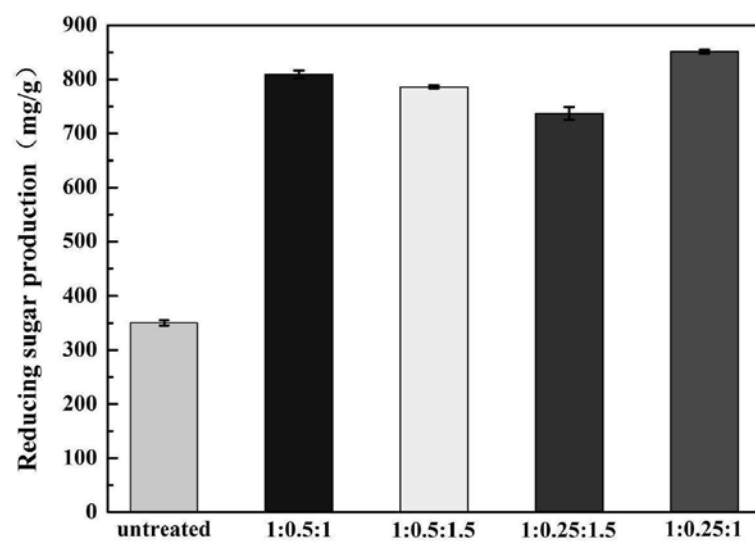


图2

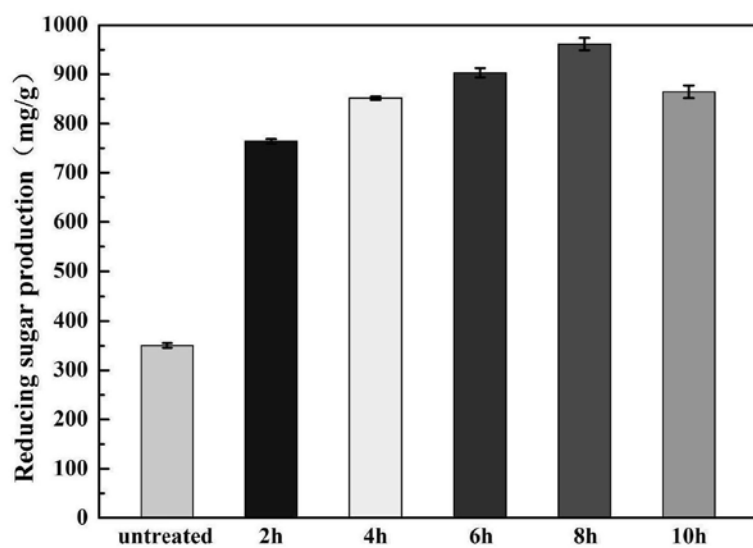


图3

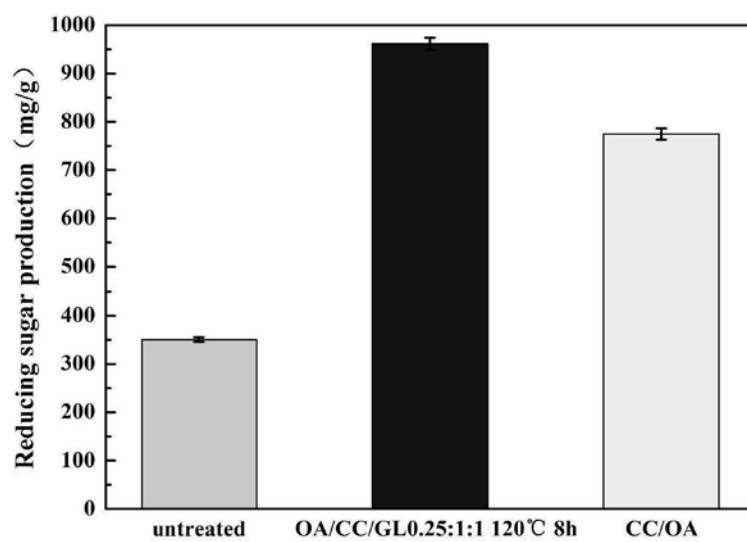


图4

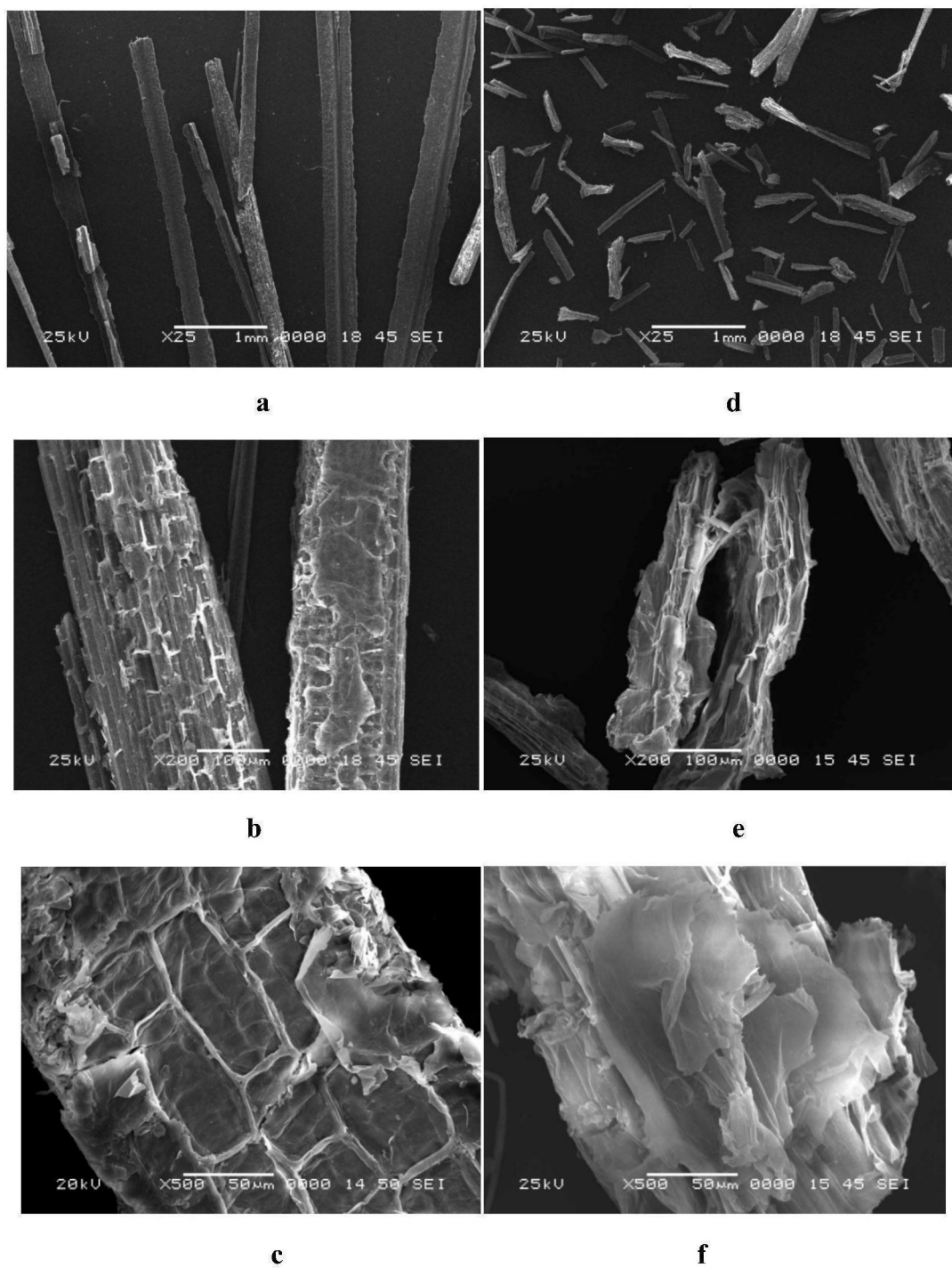


图5