

CrCl₃ 预处理和表面活性剂对杨木酶解效率的影响

麦桑怡，赵宸彪，张红丹^{*}，谢君^{*}

(华南农业大学生物质工程研究院，广州 510642)

摘要：为了探究预处理和表面活性剂对纤维素酶水解效率的影响，该研究以杨木为研究对象，探究了温度对 CrCl₃ 预处理的影响，同时从表面活性剂种类、用量和酶添加量 3 个方面分析表面活性剂对 CrCl₃ 预处理后样品酶解的促进作用。结果表明：CrCl₃ 预处理对杨木组分分离有良好的促进效果，经 160 ℃ 预处理后葡萄糖得率达到 65.9%。通过结构表征发现预处理后杨木结构完整度降低，提高了纤维素的可接触面，进而提高了酶解效率。在酶解段加入木质素磺酸钙可显著缩短酶解时间，提高酶解效率，同时有效降低纤维素酶用量，最终酶解 72h 后葡萄糖得率达 85.5%，当酶用量为该研究为提升木质纤维原料预处理效率和降低酶解成本提供了一定的理论支持。

关键词：酶解；预处理；木质素；表面活性剂

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202210222

中图分类号：TK6；S21

文献标志码：A

文章编号：1002-6819(2023)10-0210-08

麦桑怡，赵宸彪，张红丹，等. CrCl₃ 预处理和表面活性剂对杨木酶解效率的影响[J]. 农业工程学报，2023，39(10)：210-217. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202210222 <http://www.tcsae.org>

MAI Shenyi, ZHAO Chenbiao, ZHANG Hongdan, et al. Effects of CrCl₃ pretreatment and surfactant on improving enzymatic hydrolysis of poplar[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2023, 39(10): 210-217. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202210222 <http://www.tcsae.org>

0 引言

长期以来能源生产主要以煤炭、石油、天然气等化石能源为主，然而，过度消耗化石燃料严重破坏了环境，导致全球变暖、环境污染和生态平衡破坏^[1]，因此越来越多的人不断寻求可持续性和环境友好型的可再生能源^[2-3]。生物质能源具有可循环利用和环境友好的优势，其中木质纤维素因其来源广泛且储量丰富，被认为是优质的生物质资源^[3]。而林木资源作为中国重要可持续发展资源，可以通过生物炼制方法转化为乙醇等生物燃料，对缓解中国能源供应压力，维护国家能源战略安全、减轻污染、实现双碳战略等起着重要作用^[4-5]。

杨木作为一种速生丰产的树种，在中国南方和北方均有广泛种植，由于它们生长迅速、且纤维素含量相对较高，是优良的生产生物质能源的原料。然而杨木原料的纤维素、半纤维素和木素相互交织，形成致密结构，使得木质纤维素很难被直接酶解或微生物降解，因此需要进行预处理以解构生物质原料^[6-7]。目前常用的预处理方法有酸碱预处理、高温液态水预处理、金属氯化物预处理、蒸汽爆破和有机溶剂预处理、微波预处理等^[8-10]。金属氯化物如 CrCl₃、AlCl₃、FeCl₃ 等络合金属盐具有良好的催化性能，可用于生物质的预处理，这是由于金属

氯化物溶于水后生成的水合氢离子能有效破坏木质纤维素的紧密结构，实现木质纤维素组分的有效分离^[11]。相比于 AlCl₃、FeCl₂、ZnCl₂，CrCl₃ 作为催化剂进行预处理能很好地去掉半纤维素，同时，相比于 FeCl₃，预处理后产生的糠醛较少^[12]。金属氯化物预处理能够实现半纤维素的大量去除，但对木素的溶解有限，而残留的木素会造成对纤维素酶的无效吸附，进一步阻碍了纤维素酶对纤维素的结合。通过在酶解段添加表面活性剂能够减弱木素存在对酶解的影响，原因是表面活性剂可以通过疏水作用与木质素结合，进而促进酶解效率。此外添加剂的加入可以缩短酶解时间，节省纤维素酶的用量，从而降低酶解成本，提高生产可行性。

本研究以杨木为原料，对不同温度下 CrCl₃ 预处理的效果进行比较，确定最佳预处理温度以获得更好的预处理效果及酶解效率。在此基础上，考察了表面活性剂的种类、用量及酶添加量对酶解效率的促进作用。通过 XRD (X-ray Diffraction)、FT-IR (Fourier Transform Infrared) 和 SEM (Scanning Electron Microscope) 分析方法对杨树和预处理后的固体进行表征，分析了 CrCl₃ 预处理后表面形态和内部结构的变化，进一步探索了预处理条件和酶解条件对提高酶解效率的作用机理，为提高杨木的预处理效率和降低酶解成本提供一种有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用杨木原料由华南农业大学木工厂所提供，经自然风干至含水率约 10% 左右，室温条件下保存。所用纤维素酶购买于丹麦诺维信生物工程技术有限公司，

收稿日期：2022-10-27 修订日期：2023-04-23

基金项目：国家重点研发计划 (2021YFC2101603, 2021YFC2101602)

作者简介：麦桑怡，研究方向为生物质高效转化与利用。Email: 912536455@qq.com。

通信作者：张红丹，博士，副研究员，研究方向为生物质的高效转化与利用。Email: hdzhang@scau.edu.cn；谢君，博士，教授，研究方向为生物乙醇多联产系统技术创新及应用。Email: xiejun@scau.edu.cn。

通过 DNS 法测定出其滤纸酶活力为 138 FPU/mL。试验过程中所用 CrCl_3 、乙酸、乙酸钠等化学试剂均为分析纯。

1.2 CrCl_3 预处理

称取 15 g 绝干杨木原料, 以固液比 1: 10 将 0.05 mol/L CrCl_3 均匀倒入 150 mL 去离子水溶液中, 搅拌均匀后倒入反应釜中, 密封后进行反应。将搅拌速度设定为 300 r/min, 分别在 150、160、170、180 和 190 °C 下反应 20 min。反应结束后, 将预处理后样品采用布氏漏斗进行固液分离, 固体部分用去离子水洗涤至 pH 值为中性, 并保存在 4 °C 冰箱中, 用于后续的酶解和分析试验。

1.3 预处理样品的酶解试验

准确称取 2 g 绝干底物置于 150 mL 锥形瓶中, 加入一定量的纤维素酶 (20FPU/g 预处理后样品) 和 100 mL 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 值为 4.8)。将酶解样品置于摇床上进行反应, 摇床温度为 50 °C, 摇床转速为 150 r/min, 定时取 1 mL 酶解上清液, 用于酶解液中糖浓度测定。

1.4 表面活性剂添加试验

选取 5 种表面活性剂 (乳清蛋白、木质素磺酸钙、吐温 80、聚乙二醇 8 000 和曲拉通 X-100) 为研究对象, 按照 150 mg/g 底物进行添加, 探究表面活性剂种类对于酶解效率的影响。

在表面活性剂用量优化试验中, 添加浓度梯度为 5、10、25、50、75、100 和 150 mg/g (绝干底物) 的表面活性剂进行酶解试验, 并探究表面活性剂用量对于酶解得率的影响。

在酶用量优化试验中, 按照 5、7.5、10、15、20 FPU/g 的纤维素酶进行添加, 探究表面活性剂用量对于纤维素酶用量的影响。

1.5 分析方法

1.5.1 组分分析

杨木原料中纤维素、半纤维素和木质素的化学组成按照美国可再生能源实验室 (NREL) 分析方法进行测定^[13]。

1.5.2 葡萄糖浓度的测定

通过高效液相色谱, 使用 KS-801 阳离子交换柱和示差检测器, 以 0.4 mL/min 的超纯水为流动相, 在 60 °C 下对葡萄糖浓度进行分析。葡萄糖得率及添加表面活性剂后葡萄糖增长率分别按下式 (1)、式 (2) 进行计算:

$$\text{葡萄糖得率} = \frac{m_1}{m_2 \times 1.11} \times 100\% \quad (1)$$

式中 m_1 为酶解液中葡萄糖的质量, g; m_2 为原料中葡聚糖的质量, g。

$$\text{葡萄糖增长率} = \frac{Y_1 - Y_2}{Y_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中 Y_1 为添加表面活性剂时葡萄糖得率, %; Y_2 为未添加表面活性剂时葡萄糖得率, %。

1.5.3 回收率的测定

预处理后固体残渣中纤维素、半纤维素和木质素含

量同样采用 NREL 的组分分析方法测定。固体回收率、纤维素回收率、半纤维素和木质素去除率按下式 (3) ~ (6) 进行计算:

$$\text{固体回收率} = \frac{m_3}{m_4} \times 100\% \quad (3)$$

式中 m_3 为预处理后杨木的质量, g; m_4 为预处理前杨木的质量, g。

$$\text{纤维素回收率} = \frac{m_5}{m_6} \times 100\% \quad (4)$$

式中 m_5 为固体残渣中纤维素的质量, g; m_6 为杨木原料中纤维素的质量, g。

$$\text{半纤维素去除率} = 1 - \frac{m_7}{m_8} \times 100\% \quad (5)$$

式中 m_7 为固体残渣中半纤维素的质量, g; m_8 为杨木原料中半纤维素的质量, g。

$$\text{木质素去除率} = 1 - \frac{m_9}{m_{10}} \times 100\% \quad (6)$$

式中 m_9 为固体残渣中木质素的质量, g; m_{10} 为杨木原料中木质素的质量, g。

1.5.4 SEM (scanning electron microscope) 分析

采用扫描电镜 (EVO18, ZEISS, Germany) 分析杨木原料和 CrCl_3 预处理后样品的表面形貌特征。为增加纤维样品的导电性, 在进行电镜观察之前, 要对样品进行喷金处理, 并对样品放大 5 000 倍后进行观察和拍照。

1.5.5 X-射线衍射分析

使用 X 射线衍射仪 (Bruker D8-ADVANCE, Karlsruhe, Germany) 对杨木原料和 CrCl_3 预处理样进行结晶度测定。采用 $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) 辐射源, 扫描范围在 $2\theta=5^\circ \sim 60^\circ$ 。结晶度指数 (X_{CrI}) 根据 Segal 公式 (7) 进行计算^[14]:

$$X_{\text{CrI}} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\% \quad (7)$$

式中 I_{002} 和 I_{am} 分别表示 002 衍射面 ($2\theta=22.5^\circ$) 和基线的衍射强度 ($2\theta=18.5^\circ$)。

1.5.6 红外分析

采用傅立叶红外光谱仪 (Vertex70, Bruker, Germany) 测定了杨木原料和 CrCl_3 预处理后杨木的官能团变化。将样品与光谱纯溴化钾 (KBr) 混合, 研磨成粉末后用压片机将混合物压成薄片, 在范围为 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数为 32 次。

2 结果与讨论

2.1 CrCl_3 预处理温度的优化

2.1.1 CrCl_3 预处理温度对预处理后杨木化学组成的影响

预处理温度是影响预处理效果的关键因素, 本研究在固液比为 1:10, 预处理时间为 20 min, 搅拌速度为 300 r/min 条件下, 分别考察在预处理温度为 150、160、170、180、190 °C 时, CrCl_3 预处理对杨木化学组成的影响, 预处理前后杨木各组分含量的变化如表 1 所示, 试验结果表明, CrCl_3 预处理对杨木组分分离有良好的促进效果。预处理前杨木原料纤维素、半纤维素、木质素质

量分数分别为 45.6%、15.0%、22.9%，当 CrCl_3 预处理温度从 150 °C 逐渐升高至 170 °C 时，半纤维素的去除率由 84.7% 逐渐增加至 95.7%，木质素的去除率在 10.4%~14.2% 之间，90.4% 以上的葡聚糖被保留在预处理后样品中，此时固体回收率由 75.1% 逐渐降低至 66.1%，这说明预处理后大部分半纤维素、小部分木质素和纤维素发生降解，同时引起了固体回收率的降低。继续提升预处理温度至 190 °C 时，可以基本实现半纤维素的完全去

除。木质素的含量虽然呈现逐渐升高的趋势，但由于溶出的木质素部分重新吸附在纤维表面，阻碍了酸溶木质素的溶出，导致去除率没有明显提升^[15]。纤维素的降解比较明显，纤维素含量呈现逐渐降低趋势，其回收率迅速降低至 35.5%，从预处理后样品颜色形态来看，经 190 °C 的 CrCl_3 预处理后样品炭化明显，导致其回收率和葡聚糖回收率迅速降低，造成原料损失，故认为不适宜选用过高温进行反应。

表 1 原料和预处理后固体组分分析

Table 1 Component analysis of raw and solids after pretreatment %

处理 Treatment	回收率 Recovery Rate/%	葡聚糖 Glucan		木聚糖 Xylan		酸不溶木素 Acid-insoluble lignin	
		质量分数 Mass fraction	回收率 Recovery rate	质量分数 Mass fraction	去除率 Removal rate	质量分数 Mass fraction	去除率 Removal rate
原料 Raw	—	45.6	—	15.0	—	22.9	—
160 °C H_2O	90.5±0.01	50.0	99.4±0.02	15.7	5.3±0.03	20.7	17.9±0.02
150 °C CrCl_3	75.1±0.21	59.5	98.0±0.65	3.1	84.7±0.98	26.1	14.2±0.33
160 °C CrCl_3	69.0±0.04	61.8	93.6±0.24	2.2	90.0±0.09	29.7	10.4±0.17
170 °C CrCl_3	66.1±0.77	62.3	90.4±0.36	1.0	95.7±0.28	30.0	13.2±0.06
180 °C CrCl_3	57.5±0.93	52.7	66.5±0.56	—	100.0±0.00	35.6	10.3±0.62
190 °C CrCl_3	44.1±1.32	36.6	35.5±0.78	—	100.0±0.00	47.0	9.3±2.10

注：数值未处理温度， H_2O 、 CrCl_3 为处理溶剂，下同。
Note: The values are treatment temperature, H_2O and CrCl_3 are treatment solvents, the same below.

2.1.2 CrCl_3 预处理温度对杨木酶解葡萄糖得率的影响

为进一步评价预处理效果，探讨不同预处理温度（150、160、170、180、190 °C）对 CrCl_3 预处理杨木酶解葡萄糖得率的影响，结果见图 1 所示。图 1 对比了杨木原料、在不同温度下经 CrCl_3 预处理杨木及 160 °C 下不添加 CrCl_3 预处理杨木的酶解葡萄糖得率，杨木原料在酶解 24 h 后的葡萄糖得率为 11.3%，当酶解时间延长到 72 h 时，原料的葡萄糖得率降至 9.9%。经 CrCl_3 预处理后，杨木酶解葡萄糖得率高于原料酶解后的葡萄糖得率，这说明 CrCl_3 预处理能有效提高杨木的酶解效率。随着 CrCl_3 预处理温度从 150 °C 升高到 170 °C，葡萄糖得率逐渐升高，从 43.3% 提升至 66.7%，其原因是适当升高温度有利于半纤维素去除，解构杨木组成，暴露更多的纤维素酶可接触位点，增加其与纤维素酶的接触，进而提高葡萄糖得率^[16]。当 CrCl_3 预处理温度逐渐由 170 °C 增加至 190 °C 时，酶解葡萄糖得率发生明显下降，从 66.7% 下降到 31.1%。从 CrCl_3 预处理后样品的组分分析可以看出，从 170 °C 到 190 °C，虽然半纤维素得到完全的去除，但纤维素回收率也从 90.4% 降至 35.5%，纤维素的大量损失，导致酶解得率的降低^[17]。然而，在 170 °C 条件下预处理后杨木的葡萄糖得率，较在 160 °C 条件下仅提高 0.8%，因此从能量损耗和成本方面考虑，选择 160 °C 作为 CrCl_3 预处理的温度条件进行后续试验研究。在固液比为 1:10，预处理时间为 20 min，反应温度为 160 °C 的条件下经 CrCl_3 预处理后，杨木的纤维素回收率、半纤维素和木质素去除率分别为 93.6%、90.0% 和 10.4%，预处理后杨木中纤维素、半纤维素和木质素质量分数分别为 61.8%、2.2%、29.7%。相比杨木原料，纤维素质量分数提高 35.6%，半纤维素和木质素

质量分数分别降低 85.5% 和 29.9%，酶解 72 h 后葡萄糖的得率比未处理原料提高了 568.1%，比不添加 CrCl_3 提高了 508.3%。

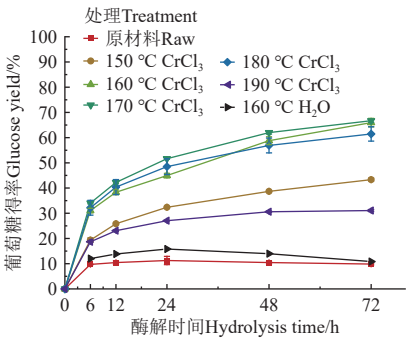


图 1 预处理温度对葡萄糖得率的影响
Fig.1 Effect of pretreatment temperature on glucose yield

2.2 表面活性剂的添加对酶解的促进作用

2.2.1 表面活性剂类型对 CrCl_3 预处理杨木酶解的影响

研究发现，表面活性剂和部分添加剂可以通过减少酶对木质素的无效吸附，实现纤维素酶解效率的提高^[18]。而表面活性剂主要被分为 4 种类型：非催化蛋白、非离子表面活性剂、离子表面活性剂和生物表面活性剂。本研究主要从 3 种不同类型的添加剂中选择了五个具有代表性的表面活性剂（非催化蛋白：乳清蛋白；非离子表面活性剂：聚乙二醇 8 000、吐温 80、曲拉通 X-100；离子表面活性剂：木质素磺酸钙）探究表面活性剂的添加对酶解的影响^[19-20]。本研究在 pH 值为 4.8，酶解温度为 50 °C，摇床转速为 150 r/min，酶添加量为 20FPU/g 底物，表面活性剂用量为 150 mg/g 底物的条件下，考察了五种不同表面活性剂的添加对 CrCl_3 预处理后杨木酶解效率的影响，结果见图 2 所示。

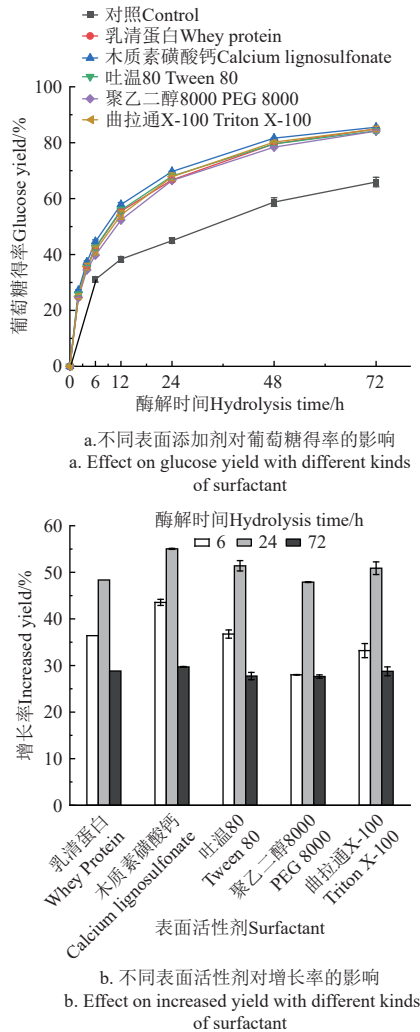


图 2 不同表面添加剂对葡萄糖得率及其增长率的影响
Fig.2 Effect on glucose yield and increased yield with different kinds of surfactant

从图 2a 可以看出, 添加表面活性剂对 CrCl_3 预处理后样品酶解效率有明显的提升作用, 虽然 5 种表面活性剂间的提升效果差别不大, 但添加木质素磺酸钙后, 酶解过程中的葡萄糖得率均高于添加其他表面活性剂。在样品中添加木质素磺酸钙并酶解 24 h 后, 葡萄糖得率达到 69.7%, 高于未加添加剂的样品酶解 72 h 的葡萄糖得率 (65.9%), 这说明木质素磺酸钙的加入能显著缩短酶解时间。继续延长酶解时间至 72 h, 葡萄糖得率增加至 85.5%。由此可见, 木素磺酸钙对 CrCl_3 预处理杨木的酶解具有良好的促进作用。从图 2b 中可以看出, 随着酶解时间的延长, 不同表面活性剂对葡萄糖的提升效率不同, 但均呈现先增加后降低趋势, 在酶解 24 h 时提升效率最明显, 增长率处于 47.9%~55.0% 范围内。当酶解时间延长至 72 h 后, 其葡萄糖增长率仍然保持在 27.6% 以上, 这是因为表面活性剂可以与木素进行吸附, 有效地促进酶解过程中纤维素和酶的结合, 提高酶解效率^[21]。其中, 添加木质素磺酸钙后, 在酶解 6、24 和 72 h 的葡萄糖增长率均高于添加其他表面活性剂 (乳清蛋白、吐温 80、聚乙二醇 8 000 和曲拉通 X-100)。通过对图 2 的综合分析可知, 添加木质素磺酸钙不仅能缩短酶解时

间且能大幅提高酶解效率, 是行之有效的促进酶解过程的方法, 因此我们将选择木质素磺酸钙为表面活性剂进行后续试验。

2.2.2 表面活性剂用量对 CrCl_3 预处理杨木酶解的影响

以木素磺酸钙作为表面活性剂, 探讨不同添加量对 CrCl_3 预处理杨木酶解效率的影响, 结果如图 3 所示。从图 3a 中可以看出, 随着表面活性剂用量从 0 增加至 75 mg/g 底物, 葡萄糖得率也逐渐从 65.9% 增加到 85.0%, 说明表面活性剂用量对于酶解效率有着显著影响, 足够的表面活性剂可以与木素充分接触, 为酶提供更多的可接触纤维素, 进而提高酶解效率^[22]。继续提升木素磺酸钙的用量, 当用量达到 150 mg/g 底物时, 酶解 72 h 后的葡萄糖得率达到 85.5%。

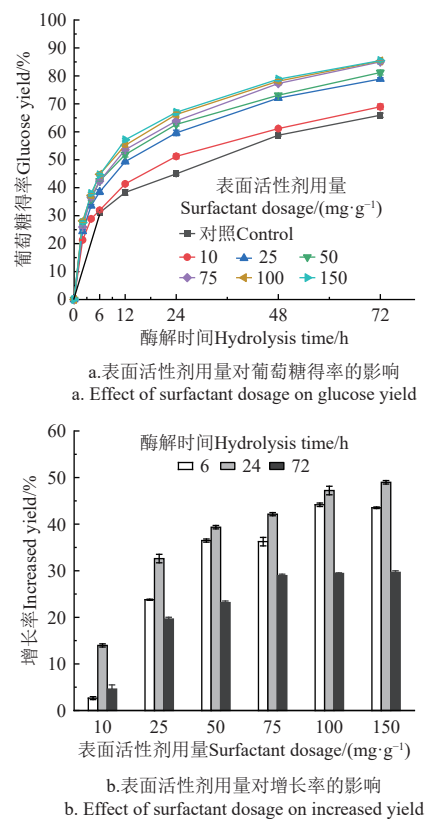


图 3 表面活性剂用量对葡萄糖得率和增长率的影响
Fig.3 Effect of surfactant dosage on glucose yield and increased yield

通过图 3b 中葡萄糖增长率的分析可以看出, 随着酶解时间的延长, 其葡萄糖增长率呈现先增加后降低的趋势, 在酶解 24 h 时达到最大, 在 14.0%~49.0% 范围内。随着木素磺酸钙用量的增加, 在酶解前期 (<24 h), 其葡萄糖增长率逐渐增加, 这说明在酶解前期表面活性剂用量对酶解有着显著影响, 表面活性剂用量越多, 葡萄糖得率和提升效率增加越明显^[23]。当酶解达到 72 h 后, 其葡萄糖增长率随着木素磺酸钙用量的增加呈现先增加后逐渐趋于平缓的趋势。结合图 3a 分析, 木素磺酸钙添加量为 75 和 150 mg/g 底物时, 葡萄糖得率相近 (85.0% 和 85.5%) 且葡萄糖增长率提升较少 (从 29.0% 到 29.6%), 进一步表明 75 mg/g 底物是木素磺酸钙的

最优添加量, 因此, 为节省酶解生产成本, 我们将木质素磺酸钙的用量减少至 75 mg/g 底物用于后续研究。

2.2.3 纤维素酶添加量对 CrCl_3 预处理杨木酶解的影响

纤维素酶成本是影响以木质纤维素为原料制备燃料乙醇生产成本的关键因素, 通过以上的分析可以发现, 随着酶解时间的延长, 酶解效率依然不断提高, 故选择酶解 72 h 葡萄糖收率进行对比, 同时为了节省酶解成本, 选择木质素磺酸钙用量为 75 mg/g 底物进行酶添加量的优化试验, 结果见图 4 所示。由图 4a 可以看出, 无论是否添加表面活性剂, 随着纤维素酶添加量的增加, 葡萄糖得率均呈现逐渐增加的趋势, 说明酶添加量对酶解效率具有决定性的促进作用, 当酶添加量较大时, 可与纤维素结合的酶越多, 酶解效率越好, 则葡萄糖得率越高^[24]。此外, 通过对添加表面活性剂前后酶解效果进行对比, 发现在不同酶添加量下, 添加木质素磺酸钙对预处理样品的酶解效率都有明显的提升作用。在木质素磺酸钙作用下, 当纤维素酶添加量为 5 FPU/g 底物时, 葡萄糖得率为 68.0%, 与在酶添加量为 20 FPU/g 底物但不添加表面活性剂时所得葡萄糖得率 (65.9%) 相当, 由此可见, 木质素磺酸钙的添加可有效降低酶添加量, 并获得更高葡萄糖得率。在木质素磺酸钙的添加量一定时, 当酶添加量从 5 FPU/g 底物逐渐增加到 15 FPU/g 底物, 葡萄糖得率也逐渐增加至 82.2%, 而当酶添加量继续增加到 20 FPU/g 底物时, 葡萄糖得率增加不大, 仅增至 85.0%, 这可能是由于参与反应的纤维素酶已经达到饱和状态。图 4b 展示了酶添加量对葡萄糖增长率的影响, 由结果可知, 在木质素磺酸钙的添加量一定时, 随着纤维素酶添加量的增加 (由 5 FPU/g 增至 20 FPU/g), 其葡萄糖增长率由 69.6% 逐渐降至 28.9%, 可见在较低酶添加量下, 表面活性剂对酶解的促进作用更为明显。葡萄糖增长率与酶添加量呈负相关关系可能是在酶添加量较多的情况下, 可

以与纤维素结合的酶越多, 表面活性剂发挥作用越有限^[25]。综上所述, 加入木质素磺酸钙可以有效缩减纤维素酶用量, 同时提升酶解效率, 进而节省酶解成本, 因此后续试验可在较低酶添加量条件下进行。

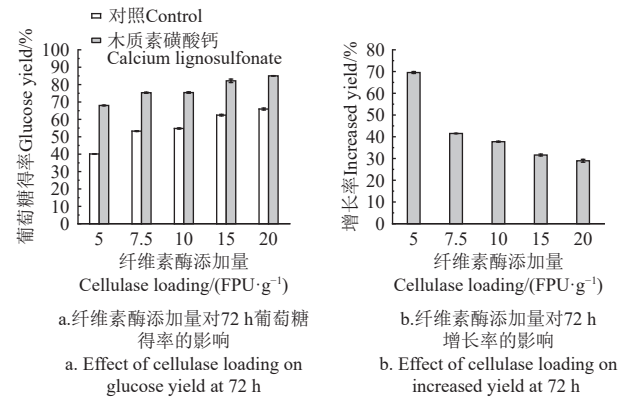


图 4 纤维素酶添加量对 72 h 葡萄糖得率和增长率的影响

Fig.4 Effect of cellulase loading on glucose yield and increased yield at 72 h

2.3 预处理前后样品的表征

2.3.1 扫描电镜 (SEM) 分析

对较优条件下杨木 CrCl_3 预处理前后样品表面形貌变化进行了分析, 结果如图 5 所示。与预处理后样品相比, 杨木原料的表面结构光滑、完整, 呈现致密的结构形态, 纤维素、半纤维素和木质素的有序排列使得纤维素酶很难接触到内部的纤维素束, 因此直接进行酶解其葡萄糖得率极低^[26]。经过 CrCl_3 预处理后, 杨木表面变得粗糙, 且出现一些裂痕和孔隙, 部分结构松散, 大部分纤维素已经暴露出来, 预处理过程中的纤维素的溶胀率增大, 降低了杨木原料完整结构对酶解的阻碍, 提高了纤维素的可接触面, 进而提高了酶解效率^[27]。

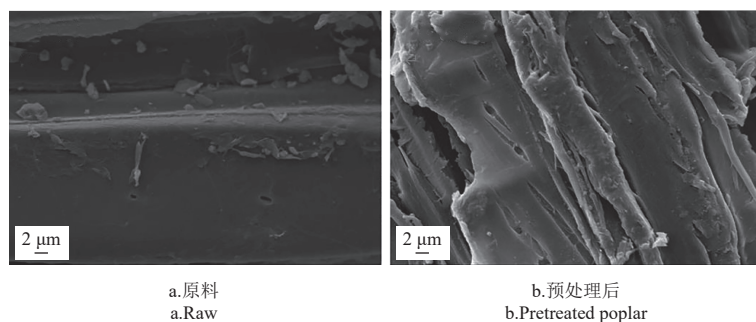


图 5 原料和 CrCl_3 预处理后杨木的 SEM 图

Fig.5 SEM scanning electron microscope of raw and chromium (III) chloride pretreated poplar

2.3.2 X 射线衍射分析

木质纤维素生物质的结晶度是影响酶解效率的重要因素之一, 因此, 我们对杨木原料和 CrCl_3 预处理后的样品进行 XRD 图谱和相应的纤维素结晶度指数 CrI 的分析, 结果如图 6 所示。从图 6 可以看出, 原料和预处理后样品在 $2\theta = 15.8^\circ$ 、 22.5° 和 34.5° 处都出现了衍射峰, 分别对应于结晶纤维素 I 的 101、002 和 034 晶面^[28]。木原料 CrI 值为 63.84%, 经 CrCl_3 预处理后样品的结晶度

指数 CrI 升高到 71.07%, 这是因为预处理过程中无定型态半纤维素的去除, 使得预处理后样品中结晶态纤维素的相对含量增加, 从而使得其结晶度 CrI 值增加^[29]。

2.3.3 红外光谱分析

杨木原料经 CrCl_3 预处理前后样品的红外光谱图如图 7 所示。1740 cm^{-1} 附近存在半纤维素中乙酰基的 $\text{C}=\text{O}$ 特征吸收峰, 经过 CrCl_3 预处理后此特征吸收峰强度与原料相比明显减弱, 表明 CrCl_3 预处理导致半纤维

素的大量降解^[30]。而在 $1\,510\text{ cm}^{-1}$ 处仍保留了较强的苯环特征吸收峰, 说明 CrCl_3 预处理对木素影响较小。在 898 cm^{-1} 附近出现的 β 糖苷键的特征峰, 经 CrCl_3 预处理后该峰强度基本没有变化, 说明 CrCl_3 对杨木的预处理不会导致纤维素的大量降解, 保留了大部分纤维素, 这也与之前的组分分析结果相一致^[31-32]。综上所述, 通过红外光谱结果进一步证明, CrCl_3 预处理能够对半纤维素实现大量去除, 但对木质素降解不显著, 并保留大量纤维素, 促进后续的酶解过程, 这与本研究的结果高度吻合。

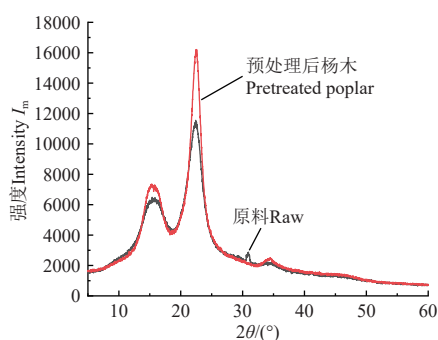


图 6 原料和预处理后杨木的 XRD 谱图

Fig.6 XRD (X-ray diffraction) patterns of raw and pretreated poplar

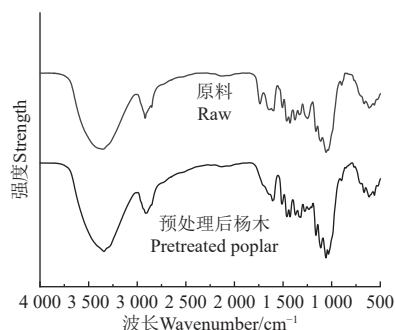


图 7 原料和预处理后杨木的红外光谱图

Fig.7 FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) spectra of raw and pretreated poplar

3 结 论

CrCl_3 预处理具有优良的去半纤维素的能力, 能解构木质纤维素原料并有效保留纤维素。本文考察了 CrCl_3 预处理温度对杨木组分和酶解效果的影响, 并对不同表面活性剂的添加、表面活性剂添加量以及纤维素酶添加量对葡萄糖得率和增长率的影响进行了探讨, 主要结论如下:

1) 预处理温度为 160°C 时可得较优的酶解效果, 在 0.05 mol/L CrCl_3 、固液比 1: 10、 160°C 、20 min 的预处理条件下, 杨木的纤维素回收率、半纤维素和木质素去除率分别为 93.6%、90.0% 和 10.4%, 相较于杨木原料, 纤维素含量提高 35.6%, 半纤维素和木质素含量分别降低 85.5% 和 29.9%, 72 h 后葡萄糖的得率提高了

568.1%。

2) 在 pH 值为 4.8、酶解温度为 50°C 、摇床转速为 150 r/min 的酶解条件下, 加入 75 mg/g 底物用量的木质素磺酸钙可以有效缩减纤维素酶用量, 同时提升酶解效率。

3) 通过 SEM、XRD、FT-IR 分析手段对较优条件下预处理前后样品进行了表征分析, 进一步证明, CrCl_3 预处理能够对半纤维素实现大量去除, 并保留大量纤维素, 但对木质素降解不显著, 为金属盐的广泛应用奠定了基础。

4) 未来在提高预处理效率和降低酶解成本方面, 可采用组合预处理以及组合添加剂来开展研究。

[参 考 文 献]

- [1] TANG Y, DOU E, JIANG J X, et al. Yield-determining components in high-solid integrated first and second generation bioethanol production from cassava residues, furfural residues and corn[J]. RSC Advances, 2016, 6: 50373-50383.
- [2] SRIVASTAVA N, RAWAT R, OBEROI H S, et al. A review on fuel ethanol production from lignocellulosic biomass[J]. International Journal of Green Energy, 2015, 12(7-12): 949-960.
- [3] MAHMOOD H, MONIRUZZAMAN M, IQBAL T, et al. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products-ScienceDirect[J]. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2019, 20: 18-24.
- [4] MA Y, SHEN Y, LIU Y. State of the art of straw treatment technology: Challenges and solutions forward[J]. Bioresource Technology, 2020, 313: 123656.
- [5] 王芳, 刘晓风, 陈伦刚等. 生物质资源能源化与高值利用研究现状及发展前景 [J]. 农业工程学报, 2021, 37 (18): 219-231.
- [6] WANG Fang, LIU Xiaofeng, CHEN Lungang, et al. Research status and development prospect of energy and high value utilization of biomass resources (Transactions of the CSAE), 2021, 37(18): 219-231. (in Chinese with English abstract)
- [7] SUN S N, SUN S L, CAO X F, et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials[J]. Bioresource Technology, 2016, 199: 49-58.
- [8] KUMAR P, BARRETT D M, DELWICHE M J, et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009, 48(8): 3713-3729.
- [9] FAN S Y, ZHANG P Y, LI F, et al. A review of lignocellulose change during hydrothermal pretreatment for bioenergy production[J]. Current Organic Chemistry, 2016, 20(26): 2799-2809.
- [10] HU F, RAGAUSKAS A, et al. Pretreatment and lignocellulosic chemistry[J]. Bioenergy Research, 2012, 5(4): 1043-106.
- [11] PULIGUNDLA P, OH S E, MOK C, et al. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review[J]. Carbon Letters, 2016, 17(1): 1-10.
- [12] WU, MIAO, ZHAO, et al. Separation and characterization of

- lignin obtained by catalytic hydrothermal pretreatment of cotton stalk[J]. *Industrial Crops & Products*, 2015, 66: 123-130.
- [12] CHEN L, RONG C, FU S. Preliminary exploration on pretreatment with metal chlorides and enzymatic hydrolysis of bagasse[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 71: 311-317.
- [13] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: NREL/TP-510-42618[R]. Washington: U. S. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2011.
- [14] SEGAL L, CREELY J J, MARTIN A E, et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer[J]. *Textile Research Journal*, 1959, 29(10):786-794.
- [15] 任利彤, 黎博文, 赵思, 等. 杨木预水解过程中化学组分的降解行为及 P 因子调控作用[J]. *林业工程学报*, 2020, 5(2): 103-108.
- REN Litong, LI Bowen, ZHAO Si, et al. Effect of P factor on degradation of poplar chemistry composition during prehydrolysis process[J]. *Transactions of the Journal of Forestry Engineering*, 2020, 5(2): 103-108. (in Chinese with English abstract)
- [16] WWA B, ZC A, HW A, et al. Co-production of fermentable glucose, xylose equivalents, and HBS-lignin from sugarcane bagasse through a FeCl₃-catalyzed EG/H₂O pretreatment[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 165: 113440.
- [17] KAMIREDDY S R, LI J B, TUCKER M, et al. Effects and mechanism of metal chloride salts on pretreatment and enzymatic digestibility of corn stover[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(5): 1775-1782.
- [18] LIN X, LOU H, QIU X, et al. Effect of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide catanionic surfactant on the enzymatic hydrolysis of Avicel and corn stover[J]. *Cellulose*, 2017, 24(2): 669-676.
- [19] 席琳乔, 吴书奇, 马春晖. 非离子表面活性剂 PEG 对棉秆木质纤维素酶解的影响[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(23): 176-183.
- XI Linqiao, WU Shuqi, MA Chunhui. Effect of nonionic surfactant PEG on lignocellulose enzymatic hydrolysis of cotton stalk[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2012, 28(23): 176-183. (in Chinese with English abstract)
- [20] FANG Z F, LIU K L, CHEN F S, et al. Cationic surfactant-assisted microwave-NaOH pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis and fermentable sugar yield from peanut shells[J]. *Bioresources*, 2014, 9(1): 1290-1302.
- [21] ZHANG Y, XU X, ZHANG Y, et al. Effect of adding surfactant for transforming lignocellulose into fermentable sugars during biocatalysing[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 16(5): 930-936.
- [22] GONG Z, YANG G, SONG J, et al. Understanding the promoting effect of non-catalytic protein on enzymatic hydrolysis efficiency of lignocelluloses[J]. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8: 9.
- [23] ZHANG J, XIE J, ZHANG H. Sodium hydroxide catalytic ethanol pretreatment and surfactant on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 319: 124171.
- [24] TANG W, WU X, HUANG C, et al. Natural surfactant-aided dilute sulfuric acid pretreatment of waste wheat straw to enhance enzymatic hydrolysis efficiency[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 324: 124651.
- [25] ZHANG H, HUANG S, WEI W, et al. Investigation of alkaline hydrogen peroxide pretreatment and Tween 80 to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 107.
- [26] DONG M, WANG S, XU F, et al. Pretreatment of sweet sorghum straw and its enzymatic digestion: insight into the structural changes and visualization of hydrolysis process[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019: 12:276.
- [27] TAO X, ZHANG P, ZHANG G, et al. Thermo-carbide slag pretreatment of turfgrass pruning: Physical-chemical structure changes, reducing sugar production, and enzymatic hydrolysis kinetics[J]. *Energy Conversion and Management*, 2018, 155: 169-174.
- [28] ZHAO C, SHAO Q, MA Z, et al. Physical and chemical characterizations of corn stalk resulting from hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment[J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 83: 86-93.
- [29] 董倩, 唐松, 徐禄江, 等. 乙二醇-氯化铁预处理对棉秆酶水解效率的影响[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(14): 213-220.
- DONG Qian, TANG Song, XU Lujiang, et al. Effects of ethylene glycol - ferric chloride pretreatment on the enzymatic hydrolysis of cotton stalks[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2021, 37(14): 213-220. (in Chinese with English abstract)
- [30] ZHANG J, MA X, YU J, et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(6): 4585-4589.
- [31] WANG S, LV M, YANG J, et al. Effects and mechanism of metal ions on enzymatic hydrolysis of wheat straw after pretreatment[J]. *Bioresources*, 2018, 13(2): 2617-2631.
- [32] 李祥, 陆子琦, 浦译文, 等. 温度-压力解耦条件下汽爆玉米秸秆物化作用及酶解效果[J]. *农业工程学报*, 2022, 38(3): 239-246.
- LI Xiang, LU Ziqi, PU Yiwen, et al. Physicochemical properties and enzymatic digestibility of steam-exploded maize stalk under temperature-pressure decoupling[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2022, 38(3): 239-246. (in Chinese with English abstract)

Effects of CrCl_3 pretreatment and surfactant on improving enzymatic hydrolysis of poplar

MAI Shenji, ZHAO Chenbiao, ZHANG Hongdan[✉], XIE Jun[✉]

(*Institute of Biomass Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract: Biomass energy has the advantages of recyclability and environmental friendliness. Poplar grows rapidly and has a relatively high cellulose content, making it an excellent raw material for the production of biomass energy. However, the cellulose, hemicellulose and lignin of poplar are intertwined to form a dense structure, making it difficult to be hydrolyzed in normal cases. In this work, poplar was pretreated by CrCl_3 as catalyst, the effect of different temperatures was compared, and the optimal pretreatment temperature was determined. Results showed that under the conditions of 0.05 mol/L CrCl_3 , solid-liquid ratio of 1/10, pretreatment time of 20min, stirring speed of 300 r/min and pretreatment temperature of 160°C, the components of poplar were effectively separated after pretreatment with CrCl_3 , while 10.4% lignin and 90.0% hemicellulose removal, and cellulose content increased by 35.6%, hemicellulose and lignin content decreased by 85.5% and 29.9%, respectively. The yield of glucose increased by 568.1% after 72h. In addition, the structure and physical properties of the raw and pretreated poplar were characterized by scanning electron microscope (SEM)、diffraction of X-rays (XRD) and Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR). Experimental results indicated that the structure of poplar became loose after CrCl_3 pretreatment, improving the contact surface of cellulose. The crystallinity (CrI) of poplar raw material was 63.84%, then increased to 71.07% after CrCl_3 pretreatment, which was due to the removal of amorphous hemicellulose during pretreatment. In the FT-IR test, the characteristic absorption peak of acetyl groups in hemicellulose was significantly weakened after CrCl_3 pretreatment compared with the raw material, a strong benzene ring characteristic absorption peak was retained at 1510 cm^{-1} , and the characteristic peak of β -glycosidic bonds still appeared around 898 cm^{-1} . It is further demonstrated that CrCl_3 pretreatment removed most of hemicellulose and retained the majority of cellulose, which promoted the subsequent enzymatic hydrolysis process, but had less effect on lignin. The enzymatic hydrolysis of pretreated poplar was conducted under the conditions of pH value is 4.8, enzymatic hydrolysis temperature of 50 °C, shaker speed of 150 r/min, enzyme addition of 20 FPU/g substrate, surfactant dosage of 150mg/g substrate, exploring the promotion effect of surfactant type, dosage and enzyme addition on enzymatic hydrolysis. It was found that the glucose yield of 69.7% was obtained after 24 h with calcium lignosulfonate, which was higher than that after 72 h without additive. Further extending the hydrolysis time to 72 h, the glucose yield reached 85.5%. When the cellulase loading was 5 FPU/g substrate, the glucose yield with calcium lignosulfonate (68.0%) was constant with that when the enzyme dosage was 20 FPU/g substrate without additive. that the addition of calcium lignosulfonate could reduce the hydrolysis time, decrease the dosage of cellulase, and enhance the efficiency of enzymatic hydrolysis. Consequently, the CrCl_3 pretreatment effectively removed the lignin and hemicellulose, while remained cellulose to promote hydrolysis efficiency. Furthermore, the addition of calcium lignosulfonate as a surfactant in the enzymatic hydrolysis also improve hydrolysis efficiency. This study provides some theoretical support for the improvement of pretreatment and the reduction of enzymatic hydrolysis cost.

Keywords: enzymatic hydrolysis; pretreatment; lignocellulose; Surfactant