

# 玉米秸秆稀酸预处理条件对糠醛类抑制物产生的影响

张莎莎<sup>1</sup>, 张 坤<sup>1</sup>, 陈晓晓<sup>1</sup>, 王晓俊<sup>1</sup>, 左小明<sup>2</sup>, 薛冬桦<sup>1</sup>

(1. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012;

2. 悉尼大学 医学院 传染病研究中心, 澳大利亚 悉尼 2145)

**摘要:**以玉米秸秆为原料,探讨稀硫酸预处理玉米秸秆过程中影响糠醛类抑制物产生的因素,运用偏相关性分析法分析不同预处理条件与还原糖、糠醛的相关性。分析得知,影响预处理液中糠醛类抑制物产生的主要因素是硫酸浓度,二者呈正相关。预处理温度和时间与糠醛浓度显著相关,而固液比对糠醛类抑制物的产生没有显著影响。实验结果表明,当硫酸浓度为1%、预处理温度120℃、时间90min,固液比1:10时预处理液中糠醛浓度为0.99mg/mL,还原糖浓度为27.6mg/mL。

**关键词:**玉米秸秆;酸预处理;糠醛类抑制物

**中图分类号:**TQ 353.4<sup>+</sup>2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)04-0088-05

## Research on the factors brought by furfural inhibitor during acid - pretreatment of corn stover

ZHANG Sha - sha<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, CHEN Xiao - xiao<sup>1</sup>, WANG Xiao - jun<sup>1</sup>, ZUO Xiao - ming<sup>2</sup>, XUE Dong - hua<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun Jilin 130012;

2. Infectious Disease Research Center of Medical College, Sydney University, Sydney Australia 2145)

**Abstract:**To explore the factors that affect the generation of furfural inhibitor during the process, corn stover was pretreated using diluted sulfuric acid. The correlation between pretreatment conditions and reducing sugar and furfural was analysed by partial correlation. The analysis showed that the main factor affecting furfural generation was the concentration of the sulfuric acid. There was a positive correlation between the concentration of furfural and sulfuric acid. Pretreatment temperature and time were associated with the furfural concentration significantly; however the solid - liquid ratio was not associated with the generation of furfural. The results showed that the optimal results were achieved by using 1% sulfuric acid to pretreat the corn stover at 120℃ for 90 minutes and ratio of solid to liquid 1:10, as results, the furfural concentration was measured as 0.99 mg/mL with reducing sugar at 27.6 mg/mL.

**Key words:**corn stover; acid - pretreatment; furfural inhibitor

随着经济的发展,世界能源需求快速增长,世界化学工业原料正逐步由石油资源向生物质资源转变<sup>[1]</sup>。国际能源署(IEA)调查显示,生物质能源每

年提供的能源大约占全球总量的10%,通过生物催化实现从木质纤维素原料到液体生物燃料和高附加值化学品的生物转化潜力巨大<sup>[2-4]</sup>,必然愈来愈受到人们的重视。因此,科学地利用生物质能,对生物质资源进行综合利用,生产一系列高附加值的产品,具有重要的经济和环保意义<sup>[5-6]</sup>。

收稿日期:2014-10-11

基金项目:吉林省科技发展计划(20126035);长春市科技支撑计划(2012213)

作者简介:张莎莎,1987年出生,女,河南开封人,硕士研究生。

通讯作者:薛冬桦,1956年出生,女,吉林长春人,教授,博士。

自然状态下的木质纤维素需要进行预处理才能转化为单糖<sup>[7]</sup>。但在玉米秸秆预处理过程中,高温和酸性条件下产生的糖类部分脱水,转化为甲酸、乙酰基丙酸和糠醛等发酵抑制物<sup>[8-10]</sup>,且在微生物工业发酵过程中,玉米秸秆水解液需要浓缩提高可发酵性糖浓度,同时抑制物浓度也随之增加,这些抑制物对发酵所需酶的活性具有抑制作用,在一定程度上破坏菌体原生质膜的完整性,抑制糖代谢过程,降低水解液的发酵性能,影响发酵产物产量,制约生物炼制及相关产业的发展<sup>[11-14]</sup>。

本文以东北三省丰富的玉米秸秆为原料,采用偏相关性分析法研究硫酸浓度、预处理时间、预处理温度对玉米秸秆稀酸处理过程中糠醛类抑制物产生的影响。探讨糠醛类抑制物和还原糖之间的相关性,为秸秆水解液抑制物去除(即脱毒)、后续发酵和利用生物质开发其它生物化工产品提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

玉米秸秆由长春大成集团提供,经测定,秸秆含水率为5.06%,纤维素含量40.68%,半纤维素含量25.12%,木质素含量12.75%。粉碎后过40~60目筛,烘干至恒重。

### 1.2 仪器与设备

DF-101S 集热式搅拌器:金坛市科技仪器有限公司; Cary Series UV-Vis-NIR spectrophotometer 紫外可见光谱仪:美国 VARIAN; UV-5100 紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司; Waters 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司; ACQUITY UPLC Agilent7890A 型气相色谱仪(配有 Agilent7890A-Agilent5975C 色谱工作站):美国安捷伦科技有限公司。

### 1.3 还原糖和糠醛浓度分析

稀硫酸预处理玉米秸秆,经过滤分离,获得含有还原糖和糠醛玉米秸秆预处理液。通过 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定还原糖浓度<sup>[15-16]</sup>,在波长540 nm 处测定还原糖吸光值,得到还原糖标准曲线  $y = -0.028 + 1.375x$ ,根据还原糖标准曲线方程得公式1,计算还原糖浓度。在波长272 nm 处测定糠醛吸光值,得到糠醛标准曲线  $y = 0.096 + 0.144x$ ,

根据糠醛标准曲线方程得公式2,分析预处理液中糠醛浓度。

$$C_{\text{还原糖浓度}} = \frac{(A + 0.028) \times N}{1.3754} \times 100\% \quad \text{公式 1}$$

$$C_{\text{糠醛浓度}} = \frac{(A - 0.0956) \times N}{0.144} \times 100\% \quad \text{公式 2}$$

式中:A-吸光度;N-稀释倍数。

### 1.4 高效液相色谱法分析还原糖

色谱柱:HPAM 华普氨基柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速:0.5 mL/min;流动相:90%乙腈+10%水等度洗脱;检测器:蒸发光检测器。准确称取葡萄糖、木糖、果糖标准品各100 mg于100 mL容量瓶中,配成1 mg/mL的混合标准溶液。

### 1.5 气相色谱-质谱联用分析糠醛

色谱柱:HP-INNOWAX(60 m × 0.25 mm × 0.25 mm);色谱条件程序升温:70 °C保留2 min,以25 °C/min升温速率升至180 °C,再以5 °C/min的升温速率升至230 °C,保持20 min;载气(He)流速:1 mL/min;进样温度:250 °C;进样量:1 μL;分流比:50:1;溶剂延长时间:3 min。

质谱条件:电子轰击(EI)离子源;电子能量为70 eV;传输线温度280 °C;EI离子源温度280 °C;四级杆温度150 °C;质量扫描范围m/z 35~350。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫酸浓度对预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度的影响

在预处理温度为120 °C、固液比1:10、反应时间90 min的条件下,探讨预处理玉米秸秆过程中,不同浓度硫酸与还原糖、糠醛浓度的关系,结果见图1。当硫酸浓度为1%时,预处理液中还原糖浓度为16.3 mg/mL,糠醛浓度为0.69 mg/mL。硫酸浓度<0.75%时,纤维素和半纤维素的束缚没有完全被破坏,还原糖浓度增加缓慢,同时在酸的作用下糠醛生成较快。硫酸浓度>1.0%时,糠醛生成量缓慢增加,但还原糖浓度降低。以还原糖浓度为控制变量,进行糠醛浓度和硫酸浓度偏相关分析,相关系数  $r = 0.984$ ,  $p = 0.002$ ,相关性非常显著;以硫酸浓度为控制变量,进行糠醛浓度和还原糖浓度的偏相关分析,二者具有相关性(见表1)。实验结果表明,水解液中硫酸浓度的增加导致糠醛类物质浓度增加,

因此玉米秸秆稀酸预处理时硫酸浓度不宜过高,硫酸浓度过高导致半纤维素水解过程中产生糠醛类抑制物质。无论以哪个因素作为控制变量时,糠醛浓度都随着反应进行而增加,考虑玉米秸秆预处理液中还原糖浓度,确定硫酸浓度为 1%。

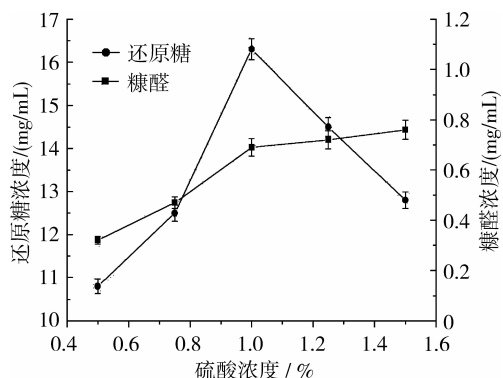


图 1 硫酸浓度对还原糖浓度和糠醛浓度的影响

表 1 还原糖浓度、糠醛浓度与硫酸浓度的偏相关分析

因素	参数	还原糖浓度	硫酸浓度	还原糖浓度	硫酸浓度
		A	B	控制变量 B	控制变量 A
	<i>r</i>	0.598	0.984	0.950	0.998
糠醛浓度	<i>p</i>	0.287	0.002	0.050	0.002
	<i>df</i>	3	3	2	2

注:*r*为相关性系数,*p*为显著性,*df*为自由度,下同。

## 2.2 预处理时间对预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度的影响

在预处理温度为 120 °C、固液比 1:10、硫酸浓度 1% 的条件下,探讨预处理玉米秸秆过程中,不同预处理时间与还原糖、糠醛浓度的关系,结果见图 2。当预处理时间为 90 min 时,预处理液中还原糖浓度为 26.4 mg/mL,糠醛浓度为 0.85 mg/mL。在预处理时间 90 min 内,还原糖浓度呈现升高趋势;超过 90 min 后,玉米秸秆预处理液中还原糖得率有所下降,糠醛量随着预处理时间的延长而降低。继续延长预处理时间,预处理液中还原糖浓度降低,糠醛类物质进一步转化为甲酸和乙酰丙酸等抑制物<sup>[17-18]</sup>,导致糠醛浓度降低。对实验结果进行偏相关性分析,以还原糖浓度作为控制变量,做时间和糠醛浓度的偏相关性分析,糠醛浓度随着时间的延长而降低,二者呈负相关,*p* 值小于 0.05,相关性显著(见表 2)。以时间作为控制变量时,糠醛浓度和还原糖浓度之间的相关性为显著相关。不同预处理时间,

预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度差异较大,减少预处理时间能够有效减少预处理液中抑制物的含量,当反应进行到 90 min 时,预处理液中还原糖浓度达到峰值,因此选择反应时间 90 min 作为玉米秸秆预处理时间。

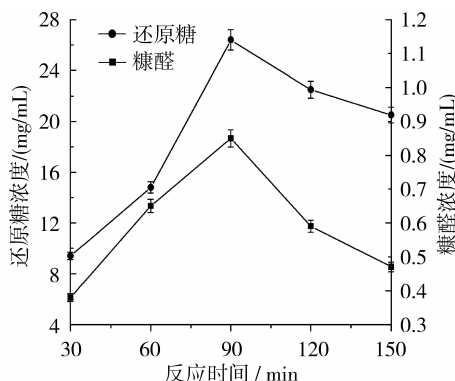


图 2 预处理时间对还原糖浓度和糠醛浓度的影响

表 2 还原糖浓度、糠醛浓度与时间的偏相关分析

因素	参数	还原糖浓度	水解时间	还原糖浓度	水解时间
		A	B	控制变量 B	控制变量 A
	<i>r</i>	0.362	-0.399	0.995	-0.995
糠醛浓度	<i>p</i>	0.549	0.505	0.005	0.005
	<i>df</i>	3	3	2	2

## 2.3 预处理温度对预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度的影响

在预处理时间为 90 min、固液比 1:10、硫酸浓度 1% 的条件下,探讨预处理玉米秸秆过程中,不同预处理温度对还原糖、糠醛浓度的影响,结果见图 3。预处理温度为 120 °C 时,预处理液中还原糖浓度为 17.0 mg/mL,糠醛浓度为 0.68 mg/mL,预处理温度低于 120 °C 时,玉米秸秆预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度均随温度的上升而增加,当温度超过 120 °C,玉米秸秆预处理液中的还原糖在酸性高温条件下浓度降低,糠醛浓度增加。在实验设计的预处理温度区间内,预处理液中糠醛的浓度随着温度的提高而增加。对实验结果作偏相关性分析可知,以还原糖浓度作为控制变量时,糠醛浓度与温度显著相关,*p* 值小于 0.05(见表 3)。以温度作为控制变量时,糠醛浓度和还原糖浓度的相关性不显著,糠醛浓度随还原糖浓度的增加而降低。升高温度,预处理液中的糠醛浓度会继续升高,影响后续发酵研究,选择 120 °C 作为预处理温度。

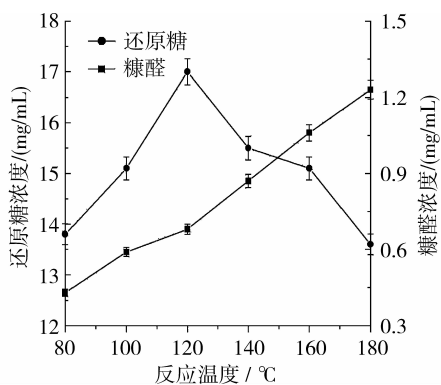


图3 预处理温度对还原糖浓度和糠醛浓度的影响

表3 还原糖浓度、糠醛浓度与温度的偏相关分析

因素	参数	还原糖浓度		水解温度	
		A	B	控制变量 B	控制变量 A
还原糖浓度	<i>r</i>	0.316	0.993	-0.884	0.998
	<i>p</i>	0.605	0.001	0.116	0.002
	<i>df</i>	3	3	2	2

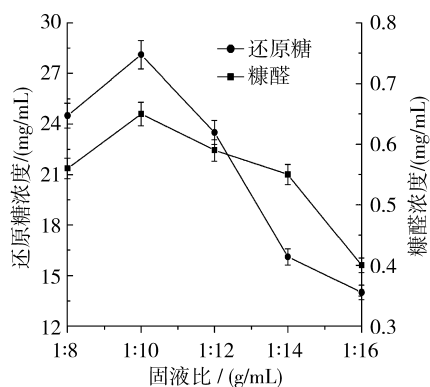


图4 固液比对还原糖浓度和糠醛浓度的影响

表4 还原糖浓度、糠醛浓度与固液比的偏相关分析

因素	参数	还原糖浓度		固液比	
		A	B	控制变量 B	控制变量 A
还原糖浓度	<i>r</i>	0.861	0.568	0.813	-0.337
	<i>p</i>	0.061	0.318	0.187	0.663
	<i>df</i>	3	3	2	2

### 2.4 固液比对预处理液中还原糖浓度和糠醛浓度的影响

在预处理时间为 90 min、预处理温度 120 °C、硫酸浓度 1% 的条件下,探讨预处理玉米秸秆过程中,不同固液比与还原糖、糠醛浓度的关系,结果见图 4。当反应体系中固液比为 1:10 时,预处理液中还原糖浓度为 28.2 mg/mL,糠醛浓度为 0.65 mg/mL。当反应体系中玉米秸秆固体比例较低时,玉米秸秆与溶剂之间能更好地接触,界面阻力减小,有利于反应的进行,预处理液中还原糖浓度增长迅速,糠醛的浓度有所增加,但变化不大。当反应体系中玉米秸秆比例较高时,溶液的黏度增加,容易发生团聚作用, H<sup>+</sup> 活性降低,玉米秸秆与溶剂不能充分接触,影响稀酸对玉米秸秆的处理效率。以固液比为控制变量,对糠醛浓度和还原糖浓度做偏相关分析(见表 4),结果显示,糠醛浓度和还原糖浓度的相关性不显著, *p* 值大于 0.05。以还原糖浓度为控制变量,做糠醛浓度和固液比的偏相关分析,固液比同糠醛浓度之间的相关性不显著, *p* 值大于 0.05, *r* 值小于 0,固液比同糠醛浓度之间的关系为负相关,即随着固液比的增加预处理中糠醛类物质浓度降低。由于 *p* 值均大于 0.05,所以固液比对预处理液中糠醛浓度影响不显著。

### 2.5 预处理液中还原糖和糠醛浓度液相/气质联机分析

在硫酸浓度 1%、预处理温度 120 °C、反应时间 90 min、固液比 1:10 的条件下,对获得的玉米秸秆预处理液进行液质联机分析还原糖和糠醛,图 5 为标准溶液和玉米秸秆预处理液高效液相色谱图,图 6 为玉米秸秆预处理液糠醛总离子流图,图 7 为玉

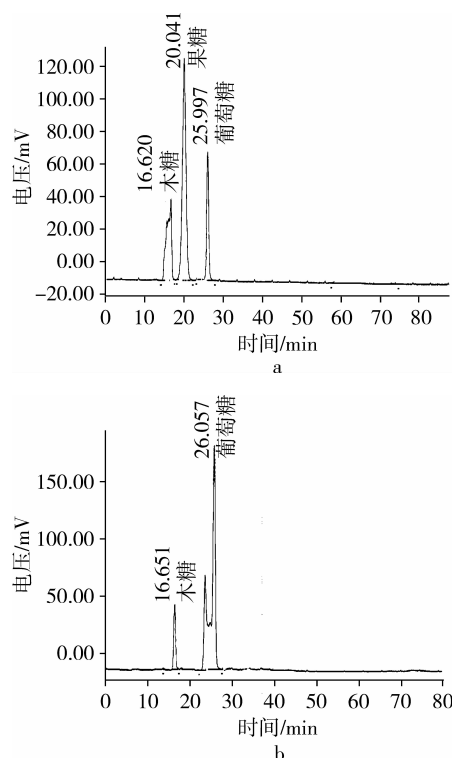


图5 标准溶液(a)和玉米秸秆预处理液(b)色谱图比较

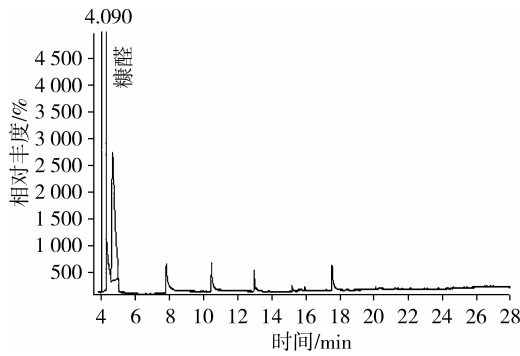


图 6 预处理液中糠醛的总离子流图

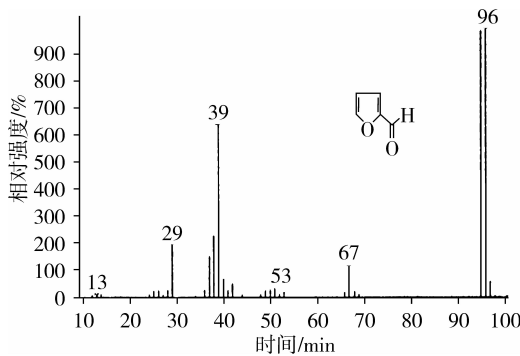


图 7 糠醛质谱图

米秸秆预处理液糠醛质谱图。根据图 5 葡萄糖标准溶液出峰时间,及峰面积对浓度进行线性回归,得到玉米秸秆处理液中还原糖浓度为 27.6 mg/mL,糠醛浓度为 0.99 mg/mL。

### 3 结论

探索玉米秸秆预处理条件时,获得较高还原糖得率,减少发酵抑制物的产生,是高效利用生物质资源的关键。在玉米秸秆稀酸预处理过程中,硫酸浓度、预处理时间和温度显著影响水解液中糠醛浓度,而固液比对预处理液中糠醛产生量没有显著影响。实验结果表明,当硫酸浓度为 1%、水解温度 120℃、固液比 1:10 时水解玉米秸秆 90 min,此时预处理液中糖得率较高,还原糖浓度为 27.6 mg/mL,预处理液中糠醛浓度为 0.99 mg/mL。

### 参考文献:

[1] Wyman C E. Introduction overview: World energy resources and the need for biomass for energy and lower fossil carbon dioxide emissions. In *Plant Biotechnology for Sustainable Production of Energy and Co-products* [M]. Berlin, Germany, 2012:3-23.  
 [2] Erika Teixidó, Encarnación Moyano, Javier Santos F, et al. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxy methyl furfural in food[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1185(2): 102-108.

[3] 楼宏铭, 刘红艳, 吴舜, 等. 酶解木质素吸附脱除糠醛和 5-羟甲基糠醛等发酵抑制物的研究[J]. *精细化工*, 2014, 31(6): 711-716.  
 [4] 张东旭. 生物法脱除木质纤维素水解液中抑制因子的最新研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(5): 120-124.  
 [5] Ohgre K, Vehmaanpera J, Siika-Aho M, et al. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated com stover for ethanol production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4): 607-613.  
 [6] Li H Q, Chen H Z. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(12): 1447-1451.  
 [7] Clayton V McNeff, Daniel T Nowlan, Larry C McNeff, et al. Continuous production of 5-hydroxymethylfurfural from simple and complex carbohydrates[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2010, 384(1-2): 65-69.  
 [8] Zhu S D, Wu Y X, Yu Z N, et al. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw[J]. *Biosystems Engineering*, 2006, 93(3): 279-283.  
 [9] Hisashi M, Herbert D, Markus N, et al. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 32(3-4): 396-400.  
 [10] 仇磊, 李涛, 王磊, 等. 糠醛渣的纤维素酶水解及其最优纤维素转化条件[J]. *农业工程学报*, 2009, 25(10): 226-230.  
 [11] Hu S Q, Zhang Z F, Zhou Y X, et al. Conversion of fructose to 5-hydroxy methyl furfural using ionic liquids prepared from renewable materials[J]. *Green Chemistry*, 2008, 10(12): 1280-1283.  
 [12] 杨柳, 刘玉环, 阮榕生, 等. 紫外光谱测定葡萄糖两相水解液中 5-羟甲基糠醛的新方法[J]. *现代化工*, 2011, 31(10): 92-95.  
 [13] Heer D, Sauer U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain[J]. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1(6): 497-506.  
 [14] Martin C, Marcet M, Almazan O, et al. Adaptation of a recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(16): 1767-1773.  
 [15] 齐香君. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(3): 17-21.  
 [16] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 534-536.  
 [17] 孙绍晖, 宋勇, 孙培勤. 分光光度法测定生物质水解液中糠醛、酸溶木质素、还原糖的含量[J]. *太阳能学报*, 2013, 34(2): 331-336.  
 [18] Chang C, Ma X J, Cen P L. Spectrophotometric Determination of 5-Hydroxyfurfural and Furfural in the Hydrolyzed Liquor of Cellulose[J]. *Physical testing and chemical analysis part B: chemical analysis*, 2008, 44(3): 84-87.