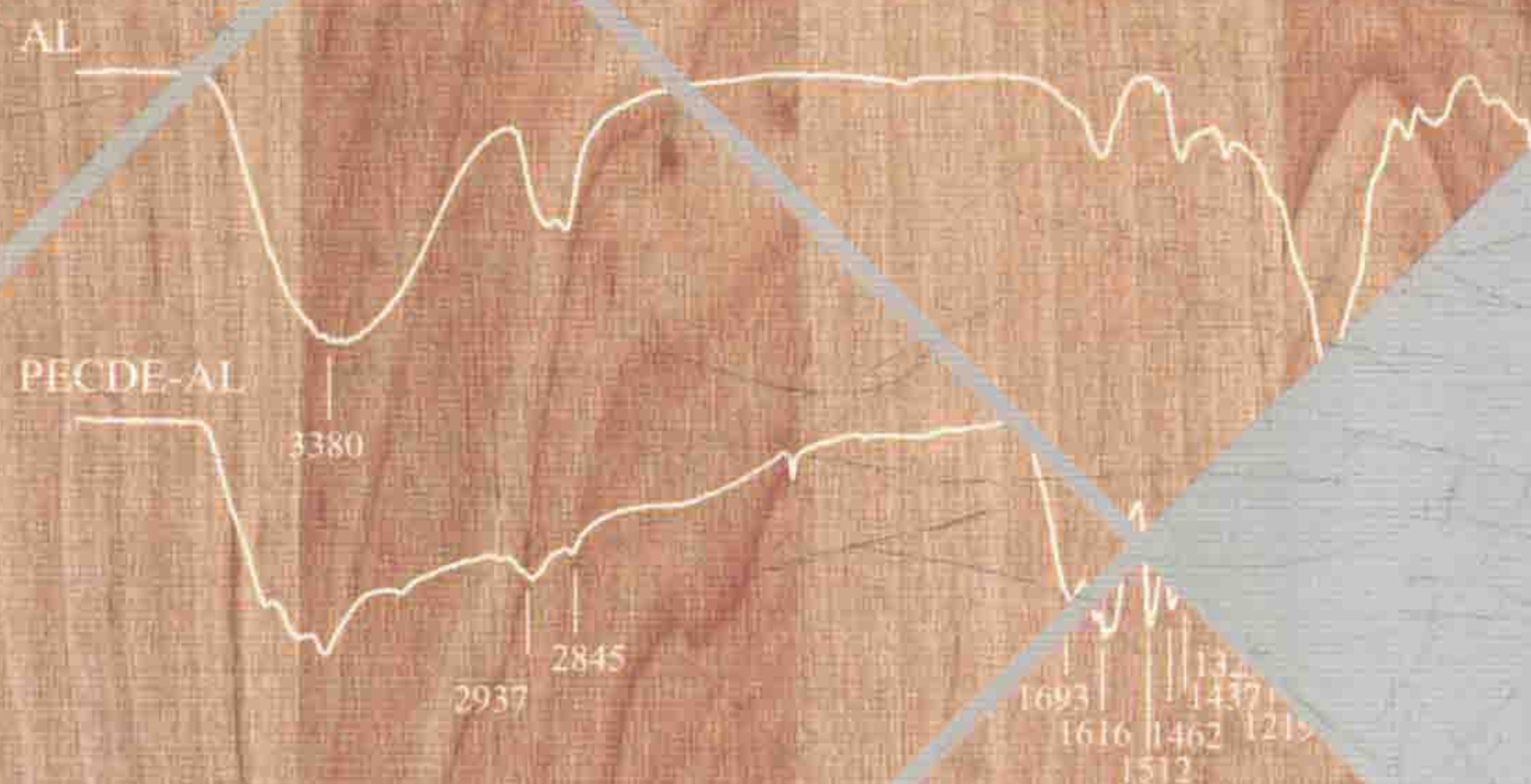


# 木质纤维生物物质的酶糖化技术

MUZHI XIANWEI SHENGWUZHI DE  
MEI TANGHUA JISHU

杨静 邓佳 史正军 等著



化学工业出版社



# 木质纤维生物质的 酶糖化技术

MUZHI XIANWEI SHENGWUZHI DE  
MEI TANGHUA JISHU

杨静 邓佳 史正军 等著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书系统地介绍了纤维素酶结构特性及其对木质纤维的典型糖化技术。主要内容包括纤维素酶的制备、木质纤维生物质酶糖化技术、木质素对木质纤维生物质酶糖化过程的影响，高底物浓度木质纤维生物质酶糖化技术。

本书可供生物质能及生物材料的研发人员和生产技术人员使用。

#### 图书在版编目 (CIP) 数据

木质纤维生物质的酶糖化技术/杨静等著. —北京:  
化学工业出版社, 2018. 6  
ISBN 978-7-122-32076-6

I. ①木… II. ①杨… III. ①木纤维-纤维素酶-  
生物降解-研究②木纤维-原料-糖化-研究 IV. ①TQ353.4  
②Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 086741 号

---

责任编辑: 赵卫娟  
责任校对: 宋 夏

装帧设计: 刘丽华

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京京华铭诚工贸有限公司

装 订: 三河市瞰发装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 9 $\frac{1}{4}$  字数 152 千字 2018 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 68.00 元

版权所有 违者必究

# 前言

随着现代工业的发展及世界人口激增，能源危机、粮食危机、环境危机日益加剧，寻找可再生的绿色能源替代日益枯竭的化石能源成为各国科学研究的焦点。木质纤维生物质中的纤维素和半纤维素高效转化为糖，继而发酵成乙醇和糖基化学品，对开发新能源和新材料、保护环境具有非常重要的现实意义，同时具有经济、生态、环保和社会多重效益；对实现工农业可持续、健康发展具有积极的推动作用，是实现国家经济安全与可持续发展的一项重要技术。

本书主要以云南省高校生物质能源创新团队和西南林业大学生物质化学与材料课题组多年来在纤维素降解酶和木质生物质的酶糖化方面的研究成果为素材，全面而系统地介绍了酶糖化降解生物质制备糖基化合物和纤维素乙醇的研究进展。本书具体内容和编写分工如下：第1章介绍纤维素降解酶和纤维素酶的糖化技术的概况，由杨海艳、解思达和朱国磊编写；第2章介绍纤维素酶的制备，由邓佳和张加研编写；第3章介绍木质纤维生物质酶糖化技术，由史正军和徐高峰编写；第4章介绍木质素对木质纤维生物质酶糖化过程的影响，由史正军和杨海艳编写；第5章介绍高底物浓度木质纤维生物质酶糖化技术，由杨静和邓佳编写。

本书在撰写的过程中，得到了南京林业大学余世袁教授和勇强教授，以及西南林业大学的杜官本教授和郑志锋教授等专家的指导，在此表示衷心感谢！

鉴于编者水平有限，书中难免存在不足之处，恳请读者批评指正。

著者

2018年3月于昆明

# 目 录

## 第 1 章 绪论

1

1.1	木质纤维生物物质 .....	1
1.2	木质素-碳水化合物复合体 .....	3
1.3	木质纤维原料的预处理技术 .....	4
1.3.1	物理法 .....	4
1.3.2	化学法 .....	5
1.3.3	生物法 .....	7
1.3.4	联合法 .....	7
1.4	纤维素酶 .....	8
1.4.1	纤维素酶的来源 .....	8
1.4.2	纤维素酶的组成和结构 .....	9
1.4.3	里氏木霉纤维素酶 .....	10
1.4.4	纤维素酶的合成 .....	11
1.4.5	纤维素酶的应用 .....	17
1.5	纤维素酶的糖化 .....	18
1.5.1	纤维素酶的吸附 .....	18
1.5.2	纤维素酶的作用方式 .....	19
1.5.3	酶糖化过程的影响因素 .....	20
1.6	降低酶糖化过程成本的策略 .....	24
1.6.1	提高纤维素酶的产量 .....	24
1.6.2	改进纤维素酶的特异活性 .....	25
1.6.3	酶糖化促进剂 .....	26
1.6.4	有效的预处理方法 .....	26
1.6.5	同步糖化发酵 .....	27
1.6.6	纤维素酶的回收利用 .....	27
	参考文献 .....	28

2.1 引言 .....	36
2.2 原材料 .....	36
2.3 碳源浓度对里氏木霉产纤维素酶的影响 .....	37
2.4 里氏木霉分批补料产纤维素酶 .....	39
2.5 商品纤维素酶和自产纤维素酶酶活的比较 .....	41
2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 .....	42
2.7 双向电泳分析 .....	43
2.8 不同来源纤维素酶对微晶纤维素的吸附性能 .....	47
参考文献 .....	48

3.1 引言 .....	50
3.2 实验材料 .....	51
3.3 不同预处理方式对木质纤维生物质一段式酶糖化效率的影响 .....	51
3.3.1 蒸汽爆破及稀酸预处理对纤维素酶一段式糖化玉米秸秆效率的影响 .....	51
3.3.2 NaOH 预处理和 NaOH-Fenton 试剂预处理对生物质一段式酶糖化效率的影响 .....	55
3.4 纤维素酶一段式糖化木质纤维素过程中酶蛋白的吸附规律 .....	61
3.4.1 木质纤维素一段式水解过程中纤维素酶蛋白在固液相中的分布 .....	61
3.4.2 木质纤维素水解过程中纤维素酶蛋白在纤维素上的分布 .....	63
3.4.3 木质纤维素水解过程中纤维素酶蛋白在木质素上的分布 .....	65
3.5 木质纤维生物质的分段酶糖化技术 .....	67

3.5.1	纤维素酶一段式糖化不同预处理底物的酶 反应速率 .....	68
3.5.2	纤维素酶分段水解蒸汽爆破玉米秸秆 .....	69
3.5.3	纤维素酶三段水解蒸汽爆破玉米秸秆 .....	71
3.5.4	添加酶三段水解过程中纤维素酶的分布 .....	73
3.5.5	纤维素酶分段水解 NaOH-Fenton 试剂预 处理的桑木 .....	75
3.5.6	自产纤维素酶三段水解蒸汽爆破玉米秸秆 .....	78
参考文献 .....		80

## 第4章 木质素对木质纤维生物质酶糖化过程的影响

83

4.1	引言 .....	83
4.2	木质素制备 .....	83
4.3	分离木质素对纤维素酶糖化效率的影响 .....	84
4.4	分离木质素对纤维素酶的吸附动力学 .....	88
4.5	分离木质素结构分析 .....	90
4.5.1	傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析 .....	90
4.5.2	核磁共振 (NMR) 和 2D 核磁共振谱分析 .....	92
4.6	碱木质素-聚乙氧基接枝共聚物对纤维素酶糖化 效率的影响 .....	96
4.6.1	碱木质素-聚乙氧基接枝共聚物 (PEGDE-AL) 红外光谱分析 .....	96
4.6.2	碱木质素-聚乙氧基接枝共聚物 (PEGDE-AL) 表面特征分析 .....	97
4.6.3	聚乙氧基接枝共聚对木质素与纤维素酶蛋白 结合力的影响 .....	98
4.6.4	碱木质素-聚乙氧基接枝共聚物 (PEGDE-AL) 对纤维素酶糖化及酶分布的影响 .....	100
参考文献 .....		102

5.1	引言 .....	105
5.2	原料预处理 .....	106
5.3	高底物浓度的分段酶糖化蒸汽爆破玉米秸秆 .....	106
5.3.1	不同底物浓度下纤维素酶一段式水解蒸汽爆破玉米秸秆 .....	106
5.3.2	不同底物浓度下纤维素酶分段式水解蒸汽爆破玉米秸秆 .....	108
5.3.3	高底物浓度下三段酶糖化的反应速率 .....	111
5.3.4	不同酶用量的分段酶糖化蒸汽爆破玉米秸秆 .....	112
5.3.5	稀酸预处理玉米秸秆的分段酶糖化技术 .....	114
5.3.6	NaOH-Fenton 试剂预处理桑木的分段酶糖化技术 .....	114
5.3.7	自产纤维素酶分段酶糖化蒸汽爆破玉米秸秆 .....	117
5.4	分段酶糖化木质纤维素过程中的纤维素酶的分布规律 .....	119
5.4.1	分段酶糖化蒸汽爆破玉米秸秆过程中纤维素酶的分布 .....	119
5.4.2	分段酶糖化过程中纤维素对纤维素酶的吸附现象 .....	121
5.4.3	分段酶糖化过程中木质素对纤维素酶的吸附现象 .....	122
5.5	分段酶糖化蒸汽爆破玉米秸秆过程中底物结晶结构的变化 .....	124
5.6	酶回收 .....	126
5.6.1	$\beta$ -葡萄糖苷酶均相水解 .....	127
5.6.2	响应面法优化 $\beta$ -葡萄糖苷酶均相水解的条件 .....	128
5.6.3	超滤技术回收均相水解液中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 .....	132
5.7	酶水解工艺成本分析 .....	133
5.7.1	工艺技术指标和基础数据 .....	134
5.7.2	工艺流程 .....	134



5.7.3	纤维素酶一段式水解蒸汽爆破玉米秸秆的成本 分析 .....	135
5.7.4	纤维素酶三段水解蒸汽爆破玉米秸秆的成本 分析 .....	137
<b>参考文献</b> .....		<b>138</b>

## 绪论

### 1.1 木质纤维生物质

---

木质纤维生物质是分布广泛，数量众多的可再生资源，包括阔叶材、针叶材、禾本科植物、农林废弃物以及城市纤维垃圾等。木质纤维生物质主要由纤维素（cellulose）、木质素（lignin）和半纤维素（hemicellulose）组成，此外，还含有少量的果胶、淀粉、色素、无机物等成分，通过化学键或者其他特殊形式连接形成复杂的网状结构。一般在木质纤维生物质中，纤维素含量约占45%~50%，半纤维素含量约为10%~30%，木质素含量约为20%~30%。

纤维素为地球上储量最丰富的有机化合物，是植物细胞壁的主要组成成分，为植物提供承载和支持作用。纤维素是由D-葡萄糖基经 $\beta$ -1,4糖苷键连接而成的线型高分子化合物，糖基数目（即聚合度）为几百至几万个以上。纤维素的性能与葡萄糖单元的个数（聚合度）密切相关，天然纤维素的聚合度在1000~10000之间。纤维素分子链上的葡萄糖单元中存在游离羟基，能与相邻葡萄糖基的羟基形成分子内或分子间氢键；单个的纤维素链通过氢键和范德华力以平行取向彼此黏结形成微纤丝，微纤丝相互聚集形成纤丝，纤丝再进一步螺旋缠绕形成更高级的结构，高能的氢键使纤维素水解变得困难；其次，在纤维素的微纤丝之间充满了半纤维素、果胶和木质素等物质，因此，强大的氢键网络使其纤维素大分子具有不同的形态结构、刚性和溶解性等<sup>[1,2]</sup>。天然纤维素由分子结构紧密、排列规则的结晶区和结构不规则的、无序的无定形区组成，故植物纤维原料中纤维素呈半结晶状态。纤维素这种高度规则的结构使其难以被酶或化学试剂水解，因此纤维素的利用需要经过有效的预处理。

半纤维素也是植物细胞壁的主要组分之一，与纤维素和木质素结合在一起，增加了细胞壁强度<sup>[3,4]</sup>。与纤维素不同，半纤维素是由多种单糖和糖醛酸组成的一群复合聚糖的总称，是由2~4种糖基构成的不均一聚糖，大多带有短的侧链，其聚合度远低于纤维素。组成半纤维素的糖基主要有：D-木糖基、D-甘露糖基、D-半乳糖基、D-葡萄糖基、L-阿拉伯糖基、4-O-甲基-葡萄糖醛酸基、D-半乳糖醛基等。植物纤维原料的种类、地理位置、取材部位、处理方法不同，它们的复合聚糖的组成也是不相同的。针叶木中半纤维素主要为半乳糖-葡萄糖甘露聚糖和阿拉伯糖-半乳聚糖；阔叶木中半纤维素主要为葡萄糖醛酸-木聚糖和葡萄糖甘露聚糖；禾本科植物中半纤维素主要为阿拉伯糖-木聚糖和葡萄糖醛酸-木聚糖。半纤维素主要应用在制浆造纸工业中，对纸浆和纸张性质有一定影响，半纤维素也可用于生产一些高附加值产品，如糠酸、乙醇、木糖醇和低聚木糖等。

木质素存在于植物细胞壁中，赋予纤维原料刚性、防渗、抗微生物攻击及氧化应激等性能。木质素是由愈创木基丙烷（syringyl, S）、紫丁香基丙烷（guaiacyl, G）和对羟基丙烷（p-hydroxyphenyl, H）三种基本结构单元组成的天然高分子聚合物。通常，不同植物的同一部位或者同一植物的不同组织或者细胞层中，这些结构单元的含量各不相同。针叶材木质素为G型结构单元，阔叶材木质素为S和G型结构单元，禾本科植物木质素为S、G和H型结构单元。木质素结构单元间的连接方式主要为碳-碳键和醚键，醚键是最主要的连接方式，大约占60%~70%，主要为二芳基醚键、二烷基醚键及烷基芳基醚键。碳-碳键的连接方式有 $\beta$ - $\beta$ 、 $\beta$ -5和5-5等。此外，木质素大分子具有多种功能基，如甲氧基、羟基和羧基等，其中，甲氧基是木质素最有特征的功能基，针叶材木质素甲氧基含量为14%~16%，阔叶材木质素甲氧基含量为19%~22%，禾本科木质素甲氧基含量为14%~15%。羟基是木质素重要功能基之一，对木质素的化学性质影响较大。羟基存在两种类型：一种是苯环上的醇羟基，另一种是侧链上的脂肪族羟基。除了结构单元之间的连接外，木质素通过共价键与糖类物质连接生成木质素-碳水化合物复合物，形成致密的结构，进一步增加了木质纤维生物质的异质性和结构复杂性<sup>[3,4]</sup>。

木质素以类似于填充剂的黏结物质的形式分布在细胞壁的各个层次中，增加木材的机械强度和抵抗微生物侵蚀的能力，使木材直立挺拔且不易腐朽。不同类型植物木质素含量稍有不同，其中针叶材木质素含量25%~35%，阔叶木木质素含量20%~25%，禾本科植物木质素含量15%~

25%<sup>[5]</sup>。在植物细胞壁中，木质素浓度最高的部位是复合胞间层，次生壁的木质素浓度较低，但由于次生壁比复合胞间层厚得多，植物细胞至少70%以上的木质素分布在次生壁中<sup>[6]</sup>。木质素作为自然界中最丰富的芳香族聚合物，其年产量超过5000万吨。目前，对木质素利用的研究主要集中在胶黏剂、聚烯烃、合成聚氨酯及酚醛树脂等方面<sup>[7]</sup>，此外，木质素也可通过裂解转化成低分子物质，如香兰素、二甲基亚砷、二甲基硫醚、苯和苯酚及其同系物等<sup>[8]</sup>。

因此，在木质纤维生物物质中，纤维素作为骨架材料，以分子链排列有序的微纤丝状态存在于细胞壁中，而半纤维素通过氢键和纤维素相连，渗透在骨架物质中，木质素是以填充物质形式存在于木质纤维中使纤维素纤维之间黏结和加固，三种组分紧密交织生长，共同构成了坚固的细胞壁结构。植物细胞壁由胞间层、初生壁和次生壁组成。胞间层中不含微细纤维而充满木质素、半纤维素及少量果胶质等成分；初生壁中微细纤维较松散，木质素、半纤维素的密度甚高；次生壁，特别是中层中微细纤维呈有规则排列，木质素、半纤维素的密度则较低。另外在木质纤维原料中还含有少量的果胶、树脂和灰分等化学成分。木质纤维素如此复杂的结构大大阻碍了生物或化学试剂对其的接触，因此，木质纤维生物物质被认为是自然界中对化学作用和生物作用抗性最强的材料之一。

## 1.2 木质素-碳水化合物复合体

1957年，Björkman首次提出木材细胞壁中木质素和高聚糖之间存在着相互作用。日本科学家越岛采用凝胶柱从日本红松中分离出木质素-碳水化合物复合体，证明了其存在，并且意识到木质素和碳水化合物之间存在着物理和化学作用。在植物新生组织中，没有木质素存在，伴随植物组织逐年老化，木质素含量逐年增加，木质素在生物体内的合成过程中产生亚甲基醌中间体，碳水化合物能够与亚甲基醌中间体发生反应，生成木质素-碳水化合物复合体 (lignin-carbohydrate complexes, LCC)<sup>[9]</sup>。Freudenberg<sup>[10,11]</sup>和Brownell<sup>[12]</sup>等从木质素与半纤维素化学结构出发，推测出木质纤维生物物质的LCC连接键可能存在五种结构： $\alpha$ -醚键、酯键、缩醛键、苯基糖苷键、自由基缩合而成的一C—O—或—C—C—。Fengel<sup>[13]</sup>和Koshijima<sup>[14]</sup>通过湿法化学和模型物研究，认为木质生物物质中主要的LCC结构有苯基糖苷键、酯键、苄基醚键三种。由于木质素的多变性、复杂性，使LCC也具有多样、

复杂和易变的特点<sup>[15]</sup>。

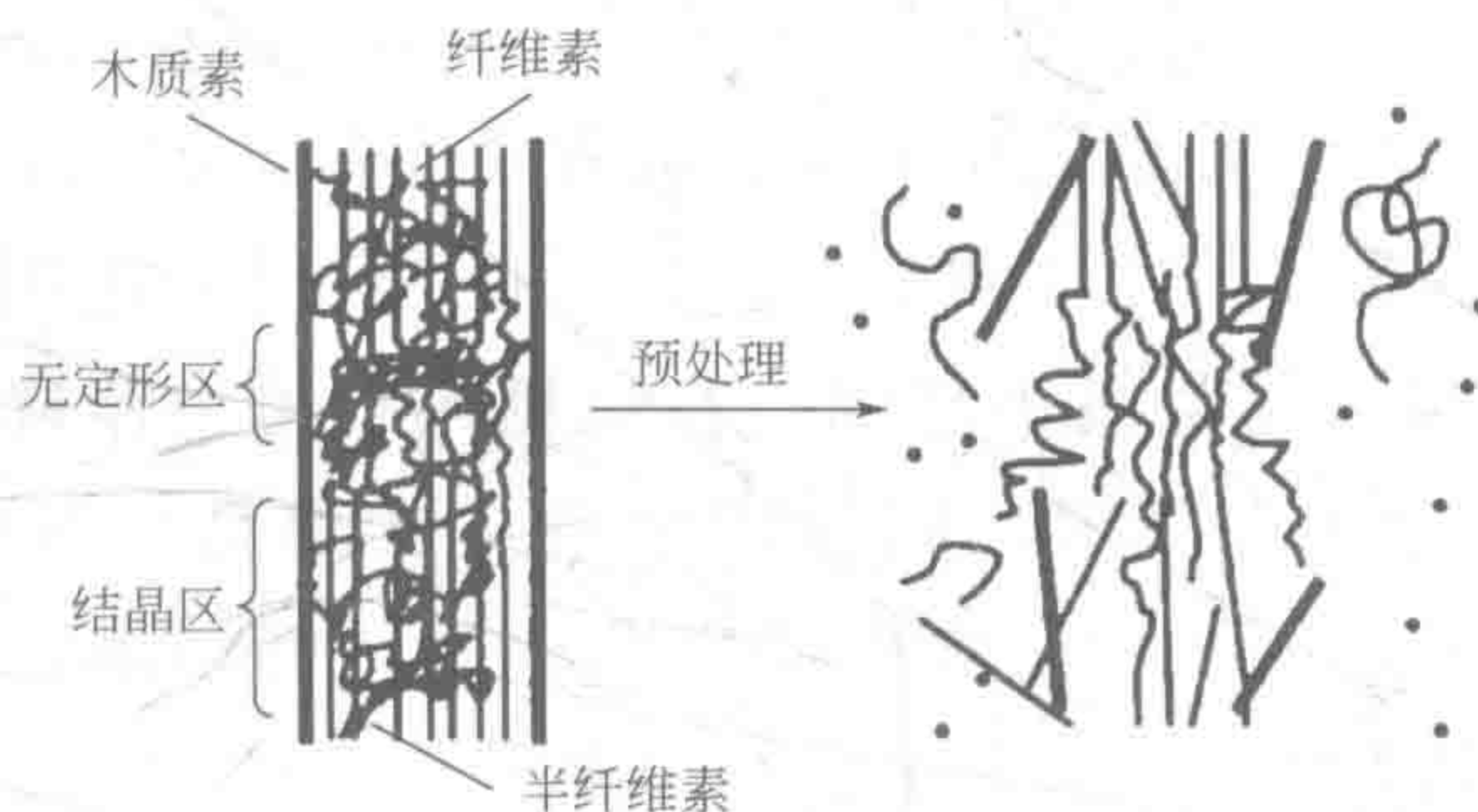
因此，纤维素、半纤维素和木质素之间并不是简单的物理混合，而是通过共价键和非共价键相互作用相连接。在木材原料中，半纤维素的羟基与木质素苯丙烷结构单元的 $\alpha$ -碳形成酯键和醚键。在草类原料中，半纤维素和木质素通过阿魏酸和对香豆酸形成了酯键-醚键的桥梁结构。木质素与高聚糖之间的连接键包括苯基糖苷键、酯键、缩醛键和 $\alpha$ -醚键等化学键，此外，还有大量的氢键，主要是由于木质素结构单元上有部分没有醚化的羟基，与碳水化合物糖基上的羟基能够形成氢键。目前，已经证实木质素和半纤维素之间存在共价键，纤维素和半纤维素之间不存在共价键，但是对于木质素和纤维素间是否存在共价键还尚未得到确认。尽管LCC结构在木质纤维原料中所占的比例相对较低，但这部分复合体引发了如何以化学结构完整的形式从木质纤维生物质中分离木质素、纤维素和半纤维素，以及如何利用合适的手段、有选择性地破坏木质素与碳水化合物之间的化学键是未来植物纤维多糖高效利用领域的重要课题<sup>[16,17]</sup>。

## 1.3 木质纤维原料的预处理技术

木质纤维素细胞壁多层次的超分子结构以及细胞壁中半纤维素和木质素对纤维素的包裹构成了生物质的“天然抗降解屏障”，并且纤维素高度规则的结晶结构也进一步妨碍了纤维素的降解。因此，木质纤维生物质的利用需要有效的预处理技术将其致密的结构解离。预处理指溶解和分离生物质主要成分纤维素、半纤维素和木质素中的一种或几种物质，使剩余的固体物质更易被化学或生物方法降解的过程，增加化学或生物试剂对纤维素的可及性。通过预处理，可以脱除木质素对纤维素的保护作用，降低纤维素的结晶度，增加纤维原料的多孔性和化学或生物试剂与底物的接触面积，从而提高后续的酶糖化效率。一般来说，木质纤维原料未经预处理时酶糖化效率不到20%，经预处理后可达到80%左右<sup>[18,19]</sup>。主要的预处理方法包括物理法（如粉碎、球磨及研磨等）、化学法（如酸处理、碱处理、氧化处理及有机溶液处理等）、生物法以及以上几种预处理方法的结合。预处理示意图见图1.1。

### 1.3.1 物理法

物理法<sup>[21,22]</sup>包括机械碾磨和辐射。机械碾磨可以破坏木质纤维生物质

图 1.1 木质纤维素预处理示意图<sup>[20]</sup>

紧密的细胞壁结构，减小生物质颗粒大小，改变其内部的超微结构，降低结晶度，从而提高纤维素的糖化效率。这种方法是通过人工或者机器破坏纤维素的晶体结构，使纤维素和半纤维素的颗粒变小，增加这两种高聚糖与酶的接触面积。物料经过粉碎后，结晶度下降，聚合度减小，物料的溶解性能迅速增加；当粒径在  $10\sim 30\mu\text{m}$  之间时，酶解效率将达到 80%。经过机械粉碎的物料体积小，无膨胀性，其物理化学性质发生变化的概率最低，能够得到高浓度的糖化液，但这种方法消耗较多的人力。辐射包括微波和超声波，其中，微波指  $300\text{MHz}\sim 300\text{GHz}$  范围的电磁波，微波辐射法的原理是通过微波辐射使木质纤维原料内部的分子碰撞产生热量，使得纤维素、半纤维素和木质素的软化温度达到一致，从而降低纤维素结晶度并提高纤维素的溶解度。微波辐射法的优点是反应的时间较短并且操作非常容易，但该方法必须保持温度在  $160^\circ\text{C}$  以上，但又不能高于  $220^\circ\text{C}$ ，否则物料将发生分解，影响预处理效果。

物理方法除了上述的机械粉碎和微波辐射法，还有电子射线、润湿法和热水预处理、冷冻处理等。物理方法可以破坏木质纤维原料结构、增大比表面积、降低纤维素结晶度，但是对设备有较高要求，作用不明显，成本较高，难以实现大规模工业化生产<sup>[23,24]</sup>。

### 1.3.2 化学法

化学法预处理主要是利用酸、碱或有机溶剂对木质纤维原料进行处理，除去半纤维素和木质素，破坏纤维素的结晶结构，以及增加纤维素的孔隙度和比表面积。酸处理主要是通过浓酸或稀酸溶解生物质中的半纤维素，尤其是木聚糖来实现破坏其细胞壁的方法。浓酸对设备腐蚀性强，操作和维护成本高，且回收困难，易造成环境污染，同时由于其反应强烈，导致产生的单

糖进一步降解,不利于后续的发醇利用,因此浓酸预处理基本上已不被采用。稀酸处理被认为是去除半纤维素较成熟又有效的方法,通常是采用较低浓度的无机酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{HCl}$ 和 $\text{HNO}_3$ ),在一定时间范围内,当温度低于 $160^\circ\text{C}$ 时,半纤维素可被降解为单糖,且单糖不被进一步降解;当温度高于 $160^\circ\text{C}$ 时,纤维素也将被降解,同时产生较多的单糖降解物和木质素降解物<sup>[25]</sup>。虽然稀酸预处理技术已取得许多令人鼓舞的结果,但稀酸处理容易造成单糖的进一步降解,生成糠醛、羟甲基糠醛、甲酸、乙酸以及乙酰丙酸等对纤维素酶和发醇菌有抑制作用的物质,并且高温或酸浓度较高的处理条件会引起木质素的缩合,这些缩合的木质素附着于纤维素表面不仅降低了纤维素的可及度,还会造成木质素对酶的不可逆吸附,进而增加纤维素酶的用量<sup>[26]</sup>。因此,采用稀酸处理木质纤维生物质时,控制操作条件非常重要。此外,稀酸预处理依然存在着设备腐蚀以及稀酸回收等问题。

碱处理是采用碱溶液 [ $\text{NaOH}$ 、 $\text{KOH}$ 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和氨水] 处理生物质,通过碱的作用削弱纤维素和半纤维素之间的氢键,皂化半纤维素和木质素之间的酯键,将木质素与碳水化合物分离,并打破木质素之间的酯键和醚键连接的预处理方法。在相同条件下,与其他预处理方法相比,碱处理去除木质素的效果更好,且更容易断裂木质素、纤维素和半纤维之间的酯键连接<sup>[27,28]</sup>。此外,碱处理不仅具有较强的脱木质素能力,还能降低纤维素的结晶度,并能将原料润胀,增加原料多孔性和内部比表面积。由于 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 价格便宜,在碱性预处理过程中应用较多,通常将 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 与水混合成浆后喷洒在物料表面,一般在室温下需要几小时至几星期的处理时间,升高温度能够缩短处理时间。与其他碱法预处理相比, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 处理优点在于成本低,使用安全,且 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 能够通过和 $\text{CO}_2$ 形成 $\text{CaCO}_3$ 沉淀,再煅烧 $\text{CaCO}_3$ 进行回收<sup>[29]</sup>。碱处理后的生物质需要耗费大量的水进行洗涤,以利于纤维素酶解,并且碱处理液会造成环境污染,需要采取合适的措施降低污染。

有机溶剂处理是采用多种有机溶剂(乙醇、甲醇、丙酮、有机酸、过氧有机酸和乙二醇等),在高温条件下,添加或不添加催化剂的条件下,单独或联合处理生物质的过程。生物质经过有机溶剂处理后,大部分的木质素和半纤维素被去除,纤维素几乎被全部保留。与其他化学处理相比,有机溶剂处理具有溶剂易于回收、环境污染小、回收的木质素品质高等优点;回收的高品质木质素可进一步用于生产抗氧化剂、分散剂、聚氨酯材料及环氧树脂等高附加值产品。但有机溶剂成本及回收成本均高,并且有机溶剂处理需要

在完全密封的装置中进行<sup>[30]</sup>。

### 1.3.3 生物法

生物法预处理是利用微生物或微生物产生的酶来分解木质纤维原料中的木质素和半纤维素，增加木质纤维原料对酶的可及性。微生物主要包括褐腐菌、白腐菌和软腐菌；酶主要是指白腐菌分解植物纤维原料中的木质素时产生的漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶<sup>[31]</sup>。尽管白腐菌具有较强的分解木质素能力，但其除分解木质素外，还产生分解纤维素和半纤维素的纤维素酶、半纤维素酶，造成纤维素和半纤维素的部分损失。Taniguchi<sup>[32]</sup>采用白腐菌（*pleurotus ostreatus*）处理稻秆 60d，发现与未处理稻秆相比较，样品中酸不溶木质素和综纤维素减少了 41% 和 65%；经白腐菌处理的稻秆中 52% 的综纤维素可被酶水解，而未处理稻秆中仅有 33% 的综纤维素发生了酶降解。生物法具有作用条件温和、专一性强、环境污染小、处理成本低等优点，但也存在木质素降解微生物种类少，木质素分解酶类的酶活低，处理时间长等技术问题，这些都需要进一步研究，才能拓展生物法预处理的实际应用空间。

### 1.3.4 联合法

联合法预处理主要是采用物理和化学相结合的方法，包括高温液态水预处理、蒸汽爆破预处理、氨纤维爆破预处理、CO<sub>2</sub> 爆破预处理和湿氧化预处理。高温液态水预处理是在高压水饱和蒸气压下，使水在 160~240℃ 范围内保持液体状态，水自发电离出来的水合氢离子可作为催化剂，参与生物质的降解反应。生物质经过高温液态水处理后，几乎全部的半纤维素和部分木质素被去除，纤维素几乎被全部保留，但整个过程耗水量大，能量消耗大，不利于工业化生产。蒸汽爆破预处理是目前认为最有潜力的预处理方式，主要是用加压蒸汽处理生物质数秒至数分钟后突然卸压，使渗入到生物质内部的水分瞬间变为蒸汽，破坏生物质结构，降解半纤维素和木质素，分离出纤维素，处理效果与温度、处理时间和物料颗粒大小等因素相关。蒸汽爆破处理生物质可比较完整地回收生物质的各种组分，具有更好的节能前景，并且成本投入低；其缺点在于半纤维素的降解物会对后续酶解和发酵产生不利影响<sup>[33]</sup>。为了使蒸汽爆破的效果更好，在较温和条件下（通常是常温）把生物质置于酸液、碱液或有机溶剂中浸泡一段时间后，再进行蒸汽爆破，其效



果要明显好于单纯的水蒸气爆破，如今各国研究者热衷于氨纤维爆破处理和 $\text{CO}_2$ 爆破处理<sup>[34]</sup>。湿氧化预处理是在一定时间内，温度高于 $120^\circ\text{C}$ 的条件下，以氧气或空气作为加压气体，对浸没在水中的生物质进行处理的过程。湿氧化对某些生物质的处理效率很高，可以破坏纤维素的结晶结构，且在湿氧处理条件下，脂肪族醛和饱和C—C键的反应很强烈，糖类降解产物会进一步分解生成 $\text{CO}_2$ 、糠醛和5-羟甲基糠醛等，但其浓度很低，不会对后续发酵造成不利影响<sup>[35]</sup>。木质素会被分解成 $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 和一些简单的有机氧化物，主要是小分子量的羧酸；但是氧气的成本高，不利于工业化生产。

如何提高预处理的效率和降低预处理成本已成为木质纤维生物制备糖平台化合物研究的核心目标。预处理技术的研究应结合原料的结构特点和组分性质，联合使用不同预处理方法，尽可能采用成本低、处理效果好、环境污染少、对后续工艺无毒等特点的多元化集成预处理技术；同时，通过科技创新来寻求新型的预处理技术，完善和开发更加高效、无污染且成本低的预处理技术，将是今后生物质预处理技术的发展趋势。

## 1.4 纤维素酶

自1906年Serlliere在蜗牛的消化液中发现纤维素酶之后，人们对纤维素酶的组成性质、作用方式、分离提纯、测定方法、固定化和工业应用等作了大量的研究工作，其中以纤维素转化为葡萄糖作为主要目标。但纤维素酶及其作用的底物非常复杂，影响因素繁多，糖化速度缓慢，酶的利用率低，酶解效率不高，所以实际应用还存在许多困难。

### 1.4.1 纤维素酶的来源

纤维素酶的来源广泛，在一定条件下真菌、细菌和放线菌等都能产生纤维素酶，一些原生动物、软体动物、昆虫和植物的组织也可分泌纤维素酶。不同微生物产生的纤维素酶的各组分比例有显著差异，且降解纤维素的能力也各不相同。其中，放线菌耐受高温和酸碱，但由于生长繁殖慢，且纤维素酶的产量低，研究较少。细菌的纤维素酶产量不高，且以内切酶为主，大多数酶对结晶纤维素没有活性，主要为中性和碱性纤维素酶，这种纤维素酶在纺织工业和洗涤剂工业中有着广泛的应用前景和经济价值，并且很多细菌能够产耐热纤维素酶，具有很大的研究价值，目前的研究主要集中在纤维黏菌