

# CSLF 法提取蔗渣半纤维素 工艺条件的响应面优化

陈宏文, 谢桂贞, 李晨, 杨春发

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 利用中心组合设计法(CCD),对蔗渣半纤维素的纤维素溶剂的木质纤维素组分分离(CSLF法)进行优化.在单因素实验的基础上,确定磷酸质量分数、磷酸蔗渣液固比和水浴温度是影响蔗渣半纤维素提取的3个关键因素.以半纤维素提取率为响应目标,采用 CCD 和响应面分析法(RSM),确定 CSLF 法半纤维素的最佳提取工艺:磷酸质量分数为 83%,磷酸蔗渣液固比为  $8.95 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  和水浴温度为  $48.94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .结果表明:蔗渣半纤维素提取率可达到 75.29%,比优化前提高 9%.

**关键词:** 蔗渣;半纤维素;CSLF 法;中心组合设计法;响应面分析法

**中图分类号:** TQ 914.3

**文献标志码:** A

木质纤维素由纤维素、半纤维素和木质素组成.其中,质量分数占 25%~40%的半纤维素是自然界中丰富的可再生纤维资源.半纤维素已被广泛应用于工业生产,如黏合剂、增稠剂、稳定剂、水凝胶、食用纤维、乳化剂、湿强剂、食品级酶制剂和低聚木糖等<sup>[1]</sup>;同时,半纤维素水解物木糖能够生产燃料乙醇、生物氢和糖醇等<sup>[2-3]</sup>.在常压,50  $^{\circ}\text{C}$  下,基于纤维素溶剂的木质纤维素组分分离(cellulose solvent-based lignocellulose fractionation,CSLF)<sup>[4]</sup>避免了半纤维素糖降解,减少了发酵抑制物的生成和成本的投入,其反应介质是非挥发性及挥发性的丙酮或乙醇,易于试剂回收.CSLF 纤维素糖化率高,对农作物和木材等具有良好预处理效果<sup>[5-8]</sup>.影响 CSLF 预处理效果的参数主要包括:磷酸质量分数、处理温度和处理时间.许多顽固性原料,如玉米秸秆、柳枝稷和杨树通过对这 3 个参数优化可获得较高的纤维素糖化产率或生物乙醇转化率<sup>[4,8-9]</sup>.利用 CSLF 对芦苇进行优化,纤维素固体中却残留了大量的木聚糖<sup>[10]</sup>,几乎与水提取液中的木聚糖量相近,造成较低的半纤维素利用率,及较高的微生物双糖利用能力.即使采用工程菌,糖利用效率仍是关键问题,且下游复杂的产品分离也会大大提高生产成本.甘蔗是我国制糖的主要原料,其废料甘蔗渣中含丰富的半纤维素,质量比高达 31.8%~35%<sup>[11-12]</sup>.为了进一步提高 CSLF 法半纤维素提取率,本文以蔗渣为原料,通过中心组合设计(central composite design,CCD)和响应面分析法(response surface method,RSM)对蔗渣半纤维素的 CSLF 法提取工艺进行优化.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

1) 材料.蔗渣(用水冲洗,去除残留的蔗糖,置于 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 96 h,将干燥的蔗渣用中药粉碎机粉碎,筛取 40~60 目蔗渣粉备用);硫酸、丙酮、磷酸(上海国药集团化学试剂有限公司);D-木糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖(上海 BioChemika 有限公司);实验用水为二次蒸馏水.2) 仪器设备. Agi

**收稿日期:** 2015-06-12

**通信作者:** 陈宏文(1969-),女,副教授,博士,主要从事微生物代谢工程和生物炼制的研究. E-mail:chenhw@hqu.edu.cn.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(21476093);福建省自然科学基金资助项目(2013J01049);华侨大学科研基金资助项目(12BS132)

lent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Shodex 型糖类色谱柱(日本岛津公司);Sigma 4K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 蔗渣单糖成分的测定

用色谱法测定蔗渣中单糖组分<sup>[13]</sup>,色谱条件如下:Shodex 型糖类色谱柱;乙腈流动相为 80%;流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温为 60 ℃;示差折光检测器 RID,进样量为 20 μL;4 个平行.单糖质量分数为

$$W_x = \frac{C_x \times V_x \times C_{a,x}}{0.3C_{b,x}} \times 100\%.$$

式中:W<sub>x</sub> 为样品各种单糖的质量分数(%);V<sub>x</sub> 为水解液体积(L);C<sub>x</sub> 为样品中液相色谱测定的单糖质量浓度(g · L<sup>-1</sup>);0.3 为蔗渣粉质量(g);C<sub>a,x</sub> 为混合糖溶液未酸解前的已知某单糖质量浓度(g · L<sup>-1</sup>);C<sub>b,x</sub> 为混合糖溶液酸解后测定的某单糖质量浓度(g · L<sup>-1</sup>)。

1.3 半纤维素的提取和测定

CSLF 法提取半纤维素流程图(未优化前数据),如图 1 所示。

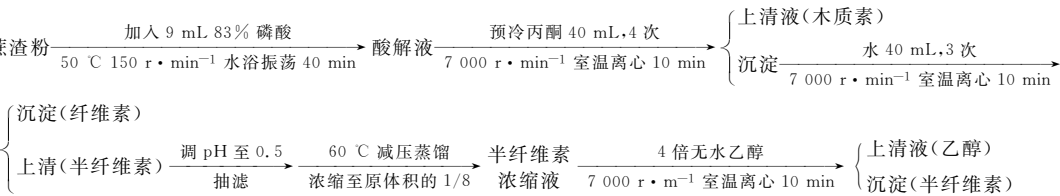


图 1 基于 CSLF 法提取蔗渣半纤维素流程图

Fig. 1 Scheme for fractional isolation of hemicellulose from sugarcane bagasse using the CSLF method

通过 CSLF 获得半纤维素,通过高效液相色谱(HPLC)分析获取水提液中木糖质量分数,进而得到木聚糖的提取率,即半纤维素提取率.采用质量分数为 1%硫酸,在 121 ℃下,高压酸解半纤维素水溶液 1 h,可以完全水解木聚糖,且木糖降解率大大降低<sup>[14]</sup>.用 Shodex SUGER SZ5532 柱检测木糖质量分数,同节 1.2 的 3 个平行,半纤维素提率为

$$R_x = \frac{C_x V}{m V} \times 100\%.$$

式中:R<sub>x</sub> 为半纤维素提取率(%);C<sub>x</sub> 为半纤维素水提液稀酸水解后的木糖质量浓度(g · L<sup>-1</sup>);V 为半纤维素水提液的体积(L);m 为蔗渣粉质量(g)。

1.4 响应面试验设计

根据 CCD 中心组合设计原理<sup>[15]</sup>,利用单因素试验,在磷酸质量分数为 83%、磷酸蔗渣液固比为 9 mL · g<sup>-1</sup> 和水浴温度为 50 ℃ 的条件下,半纤维素提取率分别出现峰值.因此,以磷酸质量分数(X<sub>1</sub>)、磷酸蔗渣液固比(X<sub>2</sub>)和水浴温度(X<sub>3</sub>)确定磷酸质量分数、磷酸蔗渣液固比和水浴温度是影响蔗渣半纤维素提取的 3 个关键因素.3 个因素为自变量,以半纤维素 R<sub>x</sub> 为响应值,作 3 因素 5 水平的响应面分析试验,响应面因素水平设计表、试验设计安排,如表 1 所示.表 1 中:ω 为磷酸的质量分数;ρ 为磷酸蔗渣液固比;θ 为水域温度.共 20 个试验。

表 1 水平设计表  
Tab. 1 Factorial design

水平	因素		
	X <sub>1</sub> (ω/%)	X <sub>2</sub> (ρ/mL · g <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (θ/℃)
—1.682	81.00	7.32	45.80
—1.000	82.00	8.00	47.50
0	83.00	9.00	50.00
1.000	84.00	10.00	52.50
1.682	85.00	10.68	54.20

2 结果与分析

2.1 蔗渣单糖成分分析

葡萄糖质量分数为 39.11%,木糖为 22.03%,阿拉伯糖为 5.55%,半乳糖为 2.10%。

2.2 CSLF 法提取蔗渣半纤维素工艺条件的优化

以磷酸质量分数、磷酸蔗渣液固比和水浴温度为参数,根据 CCD 试验设计原理,以半纤维素提取率为响应值,得到的响应面实验结果,如表 2 所示.表 2 中:R<sub>x,exp</sub> 为预测值;R<sub>x,p</sub> 为实验值.响应面全模型方差分析,如表 3 所示。

表 2 初始工艺条件的优化实验结果

Tab. 2 Optimal results of the primary extraction conditions

编号	1. 000 编码水平			$R_{\text{x,exp}}/\%$	$R_{\text{x,p}}/\%$	相对误差
	$X_1$	$X_2$	$X_3$			
1	−1. 000	−1. 000	−1. 000	65. 103	64. 822	0. 433
2	1. 000	−1. 000	−1. 000	71. 582	71. 517	0. 091
3	−1. 000	1. 000	−1. 000	68. 026	67. 996	0. 045
4	1. 000	1. 000	−1. 000	73. 509	73. 343	0. 226
5	−1. 000	−1. 000	1. 000	71. 869	71. 843	0. 036
6	1. 000	−1. 000	1. 000	66. 389	66. 227	0. 244
7	−1. 000	1. 000	1. 000	66. 725	66. 598	0. 191
8	1. 000	1. 000	1. 000	59. 547	59. 636	−0. 150
9	0	0	0	69. 368	69. 724	−0. 510
10	0	0	0	69. 213	69. 724	−0. 730
11	0	0	0	71. 007	69. 724	1. 840
12	0	0	0	69. 309	69. 724	−0. 600
13	−1. 682	0	0	65. 919	66. 055	−0. 210
14	+1. 682	0	0	68. 012	68. 068	−0. 080
15	0	−1. 682	0	71. 698	71. 923	−0. 310
16	0	+1. 682	0	69. 006	69. 052	−0. 070
17	0	0	−1. 682	67. 690	67. 920	−0. 340
18	0	0	+1. 682	62. 261	62. 303	−0. 070
19	0	0	0	74. 391	73. 883	0. 687
20	0	0	0	73. 344	73. 883	−0. 730

表 3 响应面模型方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for response surface models

方差来源	平方和	自由度	均方和	$F$	$P$
模型	224. 13	9	24. 900	65. 400	$<0. 000\ 1^{**}$
$X_1$	2. 06	1	2. 060	5. 420	$0. 048\ 3^*$
$X_2$	9. 96	1	9. 960	26. 160	$0. 000\ 9^{**}$
$X_3$	38. 13	1	38. 130	100. 140	$<0. 000\ 1^{**}$
$X_1X_2$	0. 91	1	0. 910	2. 380	$0. 161\ 2$
$X_1X_3$	75. 77	1	75. 770	198. 980	$<0. 000\ 1^{**}$
$X_2X_3$	35. 43	1	35. 430	93. 050	$<0. 000\ 1^{**}$
$X_1^2$	34. 24	1	34. 240	89. 920	$<0. 000\ 1^{**}$
$X_2^2$	12. 58	1	12. 580	33. 040	$0. 000\ 4^{**}$
$X_3^2$	55. 57	1	55. 570	145. 940	$<0. 000\ 1^{**}$
残差	3. 05	8	0. 380	—	—
失拟项	0. 29	4	0. 073	0. 110	$0. 974\ 2$
纯误差	2. 75	4	0. 690	—	—
总平方和	268. 01	19	19. 000	—	—

回归方程中各变量对响应值影响的显著性由  $F$  检验来验证,  $F$  值越大,  $P$  值越小, 则变量的显著程度越高. 表 3 中: “\*” 和 “\*\*” 分别代表  $P$  值为 0. 05 和 0. 01 显著水平. 由表 3 可知: 回归模型的  $F$  值为 65. 4,  $P<0. 000\ 1$ , 说明该模型进行因噪声产生 65. 4 偏差的概率小于 0. 01%, 该模型显著, 置信区间为 99. 99%; 同时, 各因素中一次项  $X_1$  为显著,  $X_2$  和  $X_3$  为极显著, 交互项  $X_1X_2$  交互不显著,  $X_1X_3$  和  $X_2X_3$  交互作用极显著, 二次项  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  和  $X_3^2$  皆极显著, 说明木聚糖提取率变化对 3 个因素都较为敏感; 失拟项  $F=0. 11$ ,  $\text{Prob}(P)=0. 974\ 2>0. 05$ , 表明该模型失拟不显著, 可以用于进一步优化分析.

采用 Design Expert 7. 0 软件进行多元回归拟合, 获得二次多项式回归模型方程, 即

$$Y=72. 88+0. 50X_1-0. 85X_2-1. 67X_3-0. 34X_1X_2-3. 08X_1X_3-2. 10X_2X_3-1. 99X_1^2-1. 20X_2^2-3. 51X_3^2.$$

式中:  $Y$  为半纤维素提取率;  $X_1$ ,  $X_2$  和  $X_3$  分别为磷酸质量分数、磷酸蔗渣液固比和水浴温度的编码值; 常数项 72.88 表明半纤维素的平均提取率在实验设计范围内处于较高的水平; 线性系数有正有负, 而所有的二次项系数和交叉项均为负值。

模型的响应预测值和实验值的相关性, 如图 2 所示。由图 2 可知: 模型预测值和实验值之间的相对误差都小于 0.8%, 模型的边际效应非常小; 响应的预测值和实验值之间的相关系数接近 1, 表明模型回归是显著的, 与实际相符合。

二次模型的决定系数  $R^2=0.986\ 6$ , 说明提取率变化有 98.66% 来源于磷酸质量分数, 磷酸蔗渣液固比和提取温度 3 个因素, 该模型能够反映模型中所选变量的真实关系。  $\text{adj } R^2=0.971\ 5$ ,  $\text{pred } R^2=0.912\ 2$  两者较为接近, 说明该模型的拟合显著性。 变异系数  $\text{CV}=0.9$ , 较低说明实验操作可信度高。  $\text{Adeq precision}=29.808\ 4$ , 说明模型信号够强, 可以用于指导试验。 由以上分析可知, 该回归方程可以较好地描述各因素和响应值(提取率)之间的真实关系, 可以利用该回归方程确定最佳提取条件。

2.3 响应面分析

磷酸质量分数和磷酸蔗渣液固比(温度为 50 ℃)、温度和磷酸质量分数(磷酸蔗渣液固比为 9 mL · g<sup>-1</sup>时)、磷酸蔗渣液固比和温度(磷酸质量分数为 83%时)对半纤维素提取率影响的响应曲面图和等高线图分别如图 3~5 所示。图 3~5 中:  $R$  代表半纤维素提取率;  $\rho$  代表磷酸蔗渣液固比;  $w$  代表磷酸质量分数。 响应面图可以直接反映出各因子对响应值的影响大小, 响应面曲线越陡, 说明因子对半纤维素提取率的影响越显著。 等高线的形状反映交互效应的强弱, 圆形表示两个因素交互作用不显著, 而椭圆形则表示两因素的交互作用显著。 图 3 等高线呈圆形, 而图 4, 5 等高线则是呈现椭圆形, 即磷酸质量分数和磷酸蔗渣液固比交互作用不显著, 而磷酸质量分数和温度、磷酸蔗渣液固比和温度之间的交互作用显著, 这与表 3 全模型方差分析结果相同。

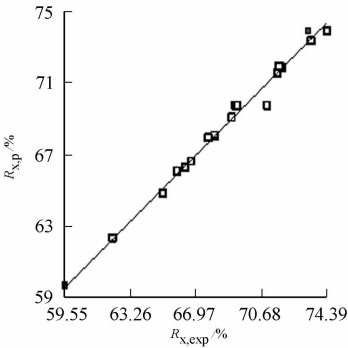
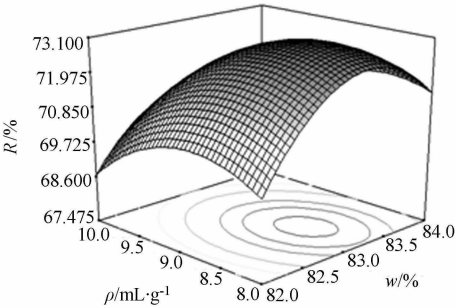
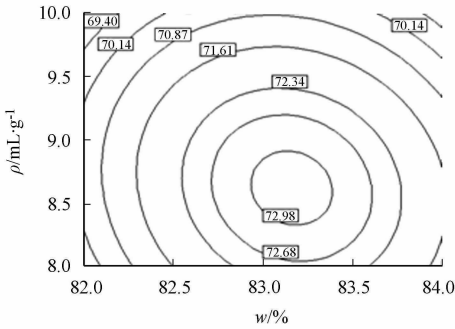


图 2 预测值与实验值的相关性

Fig. 2 Correlation of the predicted and the actual



(a) 响应曲面图



(b) 等高线图

图 3 磷酸质量分数和磷酸蔗渣液固比对提取率影响

Fig. 3 Effect of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentration and ratio of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> to sugarcane bagasse on extraction rate

响应面通过回归方程预测时, 一般不能超过自变量的取值范围, 故在磷酸质量分数、磷酸蔗渣液固比和水浴温度 3 个因素的取值范围内, 通过 Design Expert 7.0 软件得到优化提取工艺: 磷酸质量分数为 83%, 磷酸蔗渣液固比为 8.95 mL · g<sup>-1</sup>, 水浴温度为 48.94 ℃, 理论值半纤维素提取率为 73.37%。

优化后的提取条件如下: 1 g 蔗渣粉中按照 8.95 mL · g<sup>-1</sup>加入 83% 的浓磷酸搅匀, 在 48.94 ℃, 150 r · min<sup>-1</sup>水浴振荡 40 min; 再用丙酮、蒸馏水离心洗涤沉淀 4 次, 得到半纤维素水提液; 最后, 用 4 倍无水乙醇醇沉获得半纤维素, 共进行了 6 次重复验证实验, 并取平均值。 实验结果半纤维素提取率为 75.29%, 与 Design Expert 7.0 计算得到的理论值 73.37% 相近。

优化前, 按照磷酸质量分数为 83%, 磷酸蔗渣液固比为 9 mL · g<sup>-1</sup>和水浴温度为 50 ℃的预处理, 半纤维素的提取率为 69.30%。 通过响应面优化, 半纤维素提取率为 75.29%, 比优化前提高了 9%。 在上述优化条件下, 冻干后, 1.000 g 蔗渣可以提取得到干燥的 0.239 g 的半纤维素, 0.396 g 的纤维素。

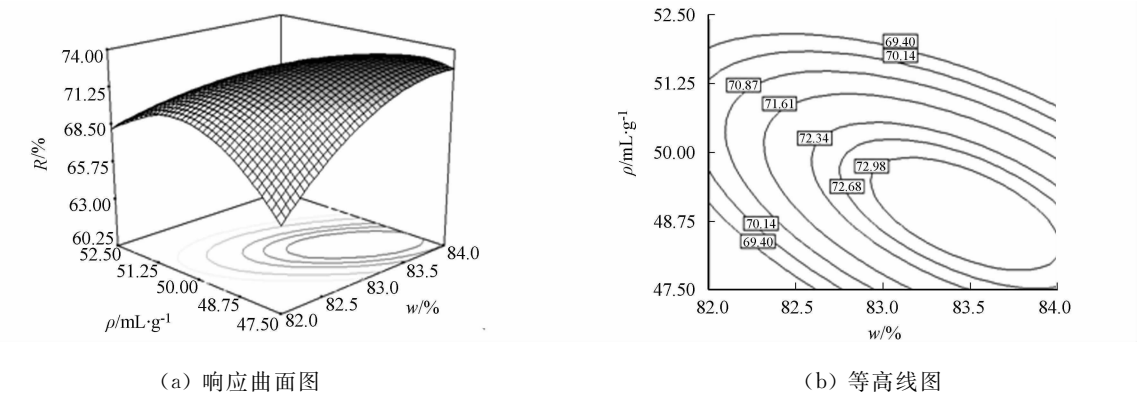


图 4 温度和磷酸质量分数对提取率影响

Fig. 4 Effect of temperature and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentration on extraction rate

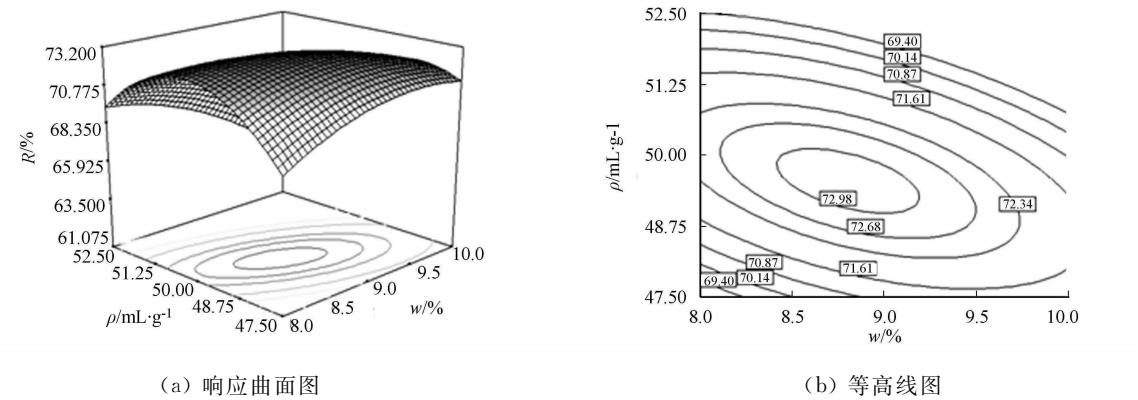


图 5 磷酸蔗渣液固比和温度对提取率影响

Fig. 5 Effect of ratio of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  to sugarcane bagasse and temperature on extraction rate

3 结束语

CSLF 是近年来开发的一种温和条件下的木质纤维素预处理方法,应用响应面法,优化 CSLF,提取蔗渣半纤维素的工艺条件如下:磷酸质量分数为 83%,磷酸蔗渣液固比为  $8.95 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  和水浴温度为  $48.94 \text{ }^\circ\text{C}$ ,蔗渣半纤维素提取率为 75.29%,比优化前提高了 9%。实验证明:液固比也是影响 CSLF 预处理的关键因素。对乙醇醇沉半纤维素后的上清液进行 HPLC 检测,结果显示:上清液中没有木糖、葡萄糖、阿拉伯糖等单糖及其副产物,表明通过优化不仅提高了蔗渣半纤维素的提取率,而且减少了半纤维糖的水解,有助于避免发酵抑制物的生成;CSLF 预处理获得的无定形纤维素、半纤维素可进一步作为生物炼制的原料。

参考文献:

[1] 张盆,胡惠仁,石淑兰. 半纤维素的应用[J]. 天津造纸,2006(2):16-18.

[2] GIRIO F M, FONSECA C, CARVALHEIRO F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13): 4775-4800.

[3] GIRIO F M, CARVALHERIO F, DUARTE L C, et al. D-xylitol[M]. Heidelberg: Springer-Verlag, 2012: 3-37.

[4] ZHANG Yiheng, DING Shiyong, MIELENZ J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(2): 214-223.

[5] SATHITSUKSANO N, GEORGE A, ZHANG Yiheng. Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 228-233.

[6] SATHITSUKSANO N, ZHU Zhiguang, ZHANG Yiheng. Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl[J]. Cellulose, 2012, 19(4): 1161-1172.

[7] SATHITSUKSANO N,GEORGE A,ZHANG Yiheng. New lignocellulose pretreatments by using cellulose solvents: A review[J]. Chem Eng Biotechnol,2013,88(2):169-180.

[8] SATHITSUKSANO N,XU Bin,ZHAO Bingyu,et al. Overcoming biomass recalcitrance by combining genetically modified switchgrass and cellulose solvent-based lignocellulose pretreatment[J]. Cellulose Solvent Pretreated Transgenic Plants,2013,8(9):e73523.

[9] ZHU Zhiguang,SATHITSUKSANO N,VINZANT T,et al. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility[J]. Bioengineering and Biotechnology,2009,103(4):715-724.

[10] SATHITSUKSANO N,ZHU ZhiGuang,TEMPLETON N,et al. Saccharification of a potential bioenergy crop, phragmites australis (common reed), by lignocellulose fractionation followed by enzymatic hydrolysis at decreased cellulase loadings[J]. Industrial and Engineering Chemistry Research,2009,48(13):6441-6447.

[11] GE Xumeng,BURNER D M,XU Jianfeng,et al. Bioethanol production from dedicated energy crops and residues in arkansas, USA[J]. Biotechnology Journal,2011,6(1):66-73.

[12] SUN Jinxia,SUN Xiaofeng,SUN Runcang,et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses[J]. Carbohydrate Polymers,2004,56(2):195-204.

[13] 彭云云,武书彬,程江娜,等. 离子色谱法测定蔗渣半纤维素中的单糖及糖醛酸含量[J]. 造纸科学与技术,2009,28(5):10-12.

[14] MOXLEY G,ZHANG Yiheng. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification[J]. Energy,2007,21(6):3684-3688.

[15] BEZERRA M A,SANTELLI R E,OLIVEIRA E P,et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta,2008,76(5):965-977.

Optimization of Sugarcane Bagasse Hemicelluloses Extraction by  
the Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation  
Using Response Surface Methodology

CHEN Hongwen, XIE Guizhen, LI Chen, YANG Chunfa

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, the central composition design (CCD) was applied to optimize the cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation (CSLF) extraction conditions of the sugarcane bagasse hemicelluloses. The single factor test results showed that the  $H_3PO_4$  concentration, the ratio of  $H_3PO_4$  to sugarcane bagasse, and the temperature were the main affecting factors. With hemicelluloses extraction rate as the target response, the optimal extraction conditions were determined by CCD and response surface method (RSM). The optimal extraction conditions were 83%  $H_3PO_4$  concentration, 8.95 mL · g<sup>-1</sup> ratio of  $H_3PO_4$  to sugarcane bagasse and 48.94 °C with sugarcane bagasse hemicelluloses extraction efficiency reaching up to 75.29%, which was 9% higher than that of the initial.

**Keywords:** sugarcane bagasse; hemicellulose; cellulose solvent-based lignocellulose fractionation; central composite design; response surface method

(责任编辑: 陈志贤      英文审校: 刘源岗)