

碱性氧化物预处理玉米秸秆维管柱、皮层和表皮研究*

杨培周 姜绍通 郑志 罗水忠 高星星

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

【摘要】 以玉米秸秆的维管柱、皮层和表皮为材料,分别考察固液比、发酵时间、碱性氧化物浓度和预处理时间对发酵液中还原糖含量以及 FPA 酶活的影响;通过正交试验进一步优化糖化条件,结果表明,在固液比、发酵时间、碱性氧化物、预处理时间分别为 1:20、5 d、1%、3 d,1:15、5.5 d、1%、3.5 d 和 1:15、5 d、1%、3 d 条件下,发酵液中的还原糖含量最高,维管柱、皮层和表皮分别为 15.92%、12.43% 和 5.93%;木质纤维素糖化率分别为 31.84%、18.65% 和 8.9%。在糖含量较低时,FPA 与还原糖含量变化趋势基本一致。

关键词: 玉米秸秆 木质纤维素 预处理 里氏木霉 糖化

中图分类号: S38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)S0-0137-04

Pretreatment of Micro-column, Cortex and Epidermis of Corn Stover by Alkali Oxide

Yang Peizhou Jiang Shaotong Zheng Zhi Luo Shuizhong Gao Xingxing

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

Micro-column, cortex and epidermis of corn stover were used to produce cellulases. The effects of solid-liquid rate (SL), fermentation time (FT), concentration of alkali oxide (AO) and pretreatment time (PT) on reducing sugar contents and filter paper activity (FPA) of the solution in the broth were investigated. Orthogonal tests were performed to optimize the saccharification conditions further. The results showed that the highest contents of reducing sugars were determined for the micro-column, cortex and epidermis of corn stover under the conditions of SL 1:20/FT 5 d/AO 1%/PT 3 d, SL 1:15/FT 5.5 d/AO 1%/PT 3.5 d and SL 1:15/FT 5 d/AO 1%/PT 3 d, respectively. The contents of reducing sugar reached 15.92%, 12.43% and 5.93%, and the highest saccharification percentages of the lignocelluloses reached 31.84%, 18.65% and 8.9%, respectively under the above conditions. The developing trend of filter paper activity was similar to the concentration of reducing sugar under lower concentrations of reducing sugar.

Key words Corn stover, Lignocelluloses, Pretreatment, *Trichoderma reesei*, Saccharification

引言

生物质的高效糖化是制备生物燃料以及生物化工材料的前提和关键,其中,原料的预处理是糖化的必要过程^[1-2]。目前,主要采用物理法(粉碎、研磨、蒸煮、CO₂气爆、热解^[3-4]、化学法(酸^[5-6]、

碱、过氧化物法、离子液催化^[7-8]等)、物理化学联合法(碱气爆,氨气爆、碱微波^[9])和生物法^[10-11]等技术预处理原料以破坏晶体结构,增大木质纤维素的表面积,提高对纤维素酶的可及性和敏感度。其中,碱性双氧水预处理不仅能够高效脱除木质素,减小结晶度,而且处理过程中生成的副产物对微生物发

收稿日期:2010-07-01 修回日期:2010-07-16

*“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAD34B00)和合肥工业大学科学研究发展基金资助项目(113-036404)

作者简介:杨培周,博士后,主要从事生物炼制和酶工程研究, E-mail: yangpeizhou@163.com

通讯作者:姜绍通,教授,博士生导师,主要从事农产品生物化工研究, E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

醇以及纤维素酶活的抑制作用小^[12]。

不同种类秸秆以及同一种类不同部位的木质纤维素结构存在差异,不同组织结构的木质纤维素结晶特性影响预处理的效果,但对秸秆各组分进行预处理却鲜有报道。本文以玉米秸秆为材料,考察各组分(维管柱、皮层和表皮)对预处理后发酵过程中木质纤维素糖化的影响,为玉米秸秆高效预处理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 玉米秸秆预处理

玉米秸秆取自安徽肥东县农田,为农民收获玉米后遗留在农田里的秸秆。秸秆主要结构为维管柱、皮层和表皮(图1)。去除玉米植株的叶子、根和灰尘,晒干,切割成维管柱、皮层和表皮,粉碎至1~3 mm长度。称取粉碎后的玉米维管柱、皮层和表皮各15 g,根据试验设计加入不同比例和不同浓度的氢氧化钠溶液(碱液中含1%过氧水)浸泡,自来水冲洗至pH中性,尼龙布过滤,70℃干燥至恒重,然后粉碎至直径0.1~0.5 mm的粉末。

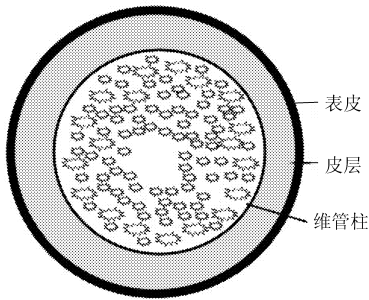


图1 玉米秸秆的维管柱、皮层和表皮横切面模式图

Fig.1 Cross-section model of micro-column, cortex and epidermis of corn stover

1.2 糖化

里氏木霉 13052(ATCC56765)购自中国工业微

生物菌株保藏管理中心。通过诱变选育出突变株 Tr-28。以秸秆为唯一碳源的发酵液中,该菌种分泌的纤维素酶系高效降解木质纤维素底物,转化为还原糖。发酵产糖培养基为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%; KH_2PO_4 0.1%; NaNO_3 0.3%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 根据 DNS 法测定总还原糖的含量^[13]。

1.3 试验设计

根据单因素的试验结果,选择正交试验的因素(表1),采用正交表 $L_9(3^4)$ 。

表1 正交试验因素水平

Tab.1 Factor level by orthogonal test

水平	因素				固液比 D
	发酵时间 A/d	碱液质量分数 B/%	浸泡时间 C/d		
1	2.5	0.5	2.5		1:15
2	3.0	1.0	3.0		1:10
3	3.5	1.5	3.5		1:20

2 结果与分析

2.1 固液比

2.1.1 固液比对还原糖含量的影响

将不同类型的秸秆以1%碱性双氧水浸泡2 d,发酵3 d,考察固液比对还原糖和 FPA 酶活的影响。结果表明,各类型秸秆在固液质量比为1:5和1:10时的还原糖含量较低,为0.5%~1%;固液比为1:15时,还原糖含量迅速增大,最高达到3.9%;固液比为1:20和1:25时,还原糖含量逐渐降低。还原糖含量最高的固液比为1:15,维管柱为底物发酵的发酵液中还原糖最多,以皮层和表皮为底物发酵的还原糖含量相近,如表2所示。

表2 固液比对发酵液中还原糖含量的影响

Tab.2 Effect of reducing sugar concentrations in broth on the solid-liquid rate

组分	固液比					%
	1:5	1:10	1:15	1:20	1:25	
维管柱	0.59 ± 0.04	0.82 ± 0.07	3.92 ± 0.11	3.61 ± 0.04	2.14 ± 0.09	
皮层	0.61 ± 0.02	0.95 ± 0.02	2.83 ± 0.12	2.42 ± 0.05	2.45 ± 0.05	
表皮	0.65 ± 0.05	0.80 ± 0.04	2.94 ± 0.23	2.80 ± 0.12	2.31 ± 0.08	

2.1.2 固液比对 FPA 酶活的影响

比较不同固液比对发酵液中 FPA 酶活的影响,如表3所示,结果表明,固液比为1:15时的 FPA 酶活最高,以预处理后维管柱为底物发酵的产 FPA 酶活性最高,达3.12 U/mL,其次为皮层。

2.2 发酵时间

2.2.1 发酵时间对还原糖含量的影响

测定发酵3~7 d发酵液中的还原糖含量,如图2所示,结果表明,产糖量最高的为维管柱为底物,其次为皮层,最小的为表皮。3种底物的还原糖

表3 固液比对 FPA 酶活的影响

Tab.3 Effect of filter paper activity in broth on solid-liquid rate

U/mL

组分	固液比				
	1: 5	1:10	1:15	1:20	1:25
维管柱	1.23 ± 0.05	2.35 ± 0.25	3.10 ± 0.12	1.55 ± 0.32	0.88 ± 0.09
皮层	1.31 ± 0.03	2.25 ± 0.05	3.12 ± 0.05	1.64 ± 0.25	0.90 ± 0.07
表皮	1.52 ± 0.04	2.71 ± 0.11	2.80 ± 0.02	2.04 ± 0.05	1.51 ± 0.01

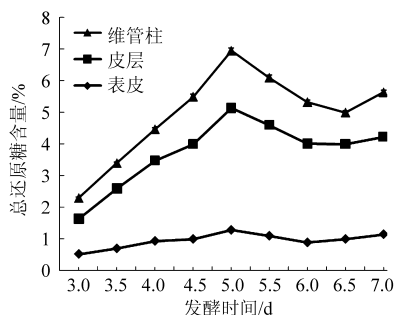


图2 发酵时间对发酵液还原糖含量的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on reducing sugar concentrations in broth

含量趋势基本一致,3~5 d 还原糖含量逐渐增加,第5天还原糖含量最高,第6天开始下降。

2.2.2 发酵时间对 FPA 酶活的影响

考察不同发酵时间后 FPA 酶活变化趋势,如图3所示,结果表明,发酵3~4 d 的酶活相对稳定在较低水平,4~5 d 期间的酶活急剧上升,5~6 d 上升趋势减弱,在第6天后酶活逐渐下降。其中以皮层为底物产酶较高,最高的为发酵6 d 后的酶活,达到2.10 U/mL。

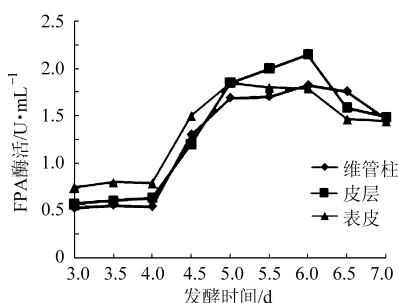


图3 发酵时间对发酵液 FPA 酶活的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on filter paper activity

2.3 碱性氧化物

2.3.1 碱质量分数对还原糖含量的影响

考察不同质量分数的碱性氧化物预处理各秸秆后,发酵液中还原糖量以及 FPA 酶活,其中浓度为零的表示蒸馏水浸泡的。不同浓度梯度预处理后总还原糖含量的测定结果表明(图4),碱浓度为零时,基本不产糖,碱质量分数为1%时,还原糖达到一个峰值,随着浓度的继续增大,糖产量下降。维管柱和皮层为底物的总还原糖含量较高,

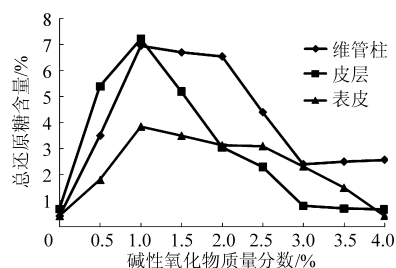


图4 碱性氧化物质量分数对还原糖含量的影响

Fig.4 Effect of alkali oxide concentrations on reducing sugar concentrations

最高为7%。

2.3.2 碱性氧化物质量分数对 FPA 酶活的影响

不同质量分数的碱性氧化物预处理后考察 FPA 酶活变化趋势如图5所示。结果表明以维管柱、皮层和表皮为底物的发酵液中 FPA 酶活性总体趋势相似,当以蒸馏水(0%)时的酶活最低,而采用1%质量分数的碱性氧化物浸泡后发酵液的酶活最高,达到1.8 U/mL,随着浓度的继续增加, FPA 酶活呈下降趋势。秸秆3种不同组分诱导纤维素酶的结果表明,诱导酶活较好的是皮层,其次是维管柱。

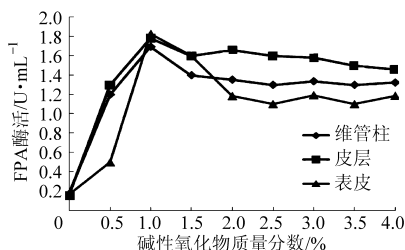


图5 碱性氧化物浓度对 FPA 酶活的影响

Fig.5 Effect of alkali oxide concentration on filter paper activity

2.4 预处理时间对发酵液中还原糖含量的影响

考察不同预处理时间对发酵液中还原糖含量的影响如图6所示。结果表明发酵液中还原糖的含量变化趋势明显,0~3 d 内随着时间的增加还原糖含量逐渐增大,预处理3 d 的还原糖含量最高,随后呈下降趋势,其中维管柱为底物的下降趋势明显,而以皮层和表皮为底物的下降趋势较平缓,维持较高的还原糖水平。

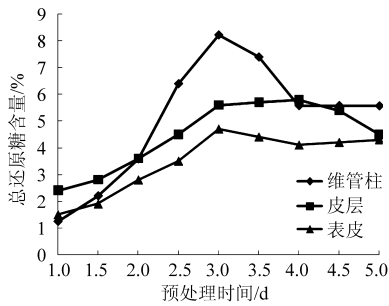


图6 预处理时间对发酵液中还原糖含量的影响

Fig. 6 Effect of pretreatment time on reducing sugar concentration

2.5 正交试验结果

通过正交试验,考察各秸秆组分发酵液中的最高还原糖含量以及各相应因素条件(表4),结果表明,通过优化维管柱、皮层和表皮为底物发酵液中还原糖含量分别为15.92%、12.43%和5.93%。通过相应固液比参数,计算出总还原糖量分别为636.8、372.9和177.9 mg;预处理后木质纤维素糖化率(2 g底物)分别为31.84%、18.65%和8.9%。

表4 正交试验后发酵液中最高产糖及因素条件

Tab. 4 Highest reducing sugar and factor level by orthogonal test

	固液比	发酵时间/d	碱性氧化物质量分数/%	预处理时间/d	还原糖含量/%
维管柱	1:20	5.0	1	3.0	15.92
皮层	1:15	5.5	1	3.5	12.43
表皮	1:15	5.0	1	3.0	5.93

3 结束语

通过研究发现不同玉米秸秆组分(包括维管柱、皮层和表皮)的不同预处理方式显著影响秸秆发酵液中的还原糖含量。维管柱、皮层和表皮在优化条件后发酵液的还原糖含量分别为15.92%、12.43%和5.93%,预处理后的木质纤维素糖化率分别为31.84%、18.65%和8.9%。发酵液中还原糖含量处于较低水平时,FPA酶活与还原糖含量的变化趋势基本一致。

参 考 文 献

- McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum bicolor straw using diluted alkali pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2010,101(17):6718~6727.
- 吴创之,周肇秋,阴秀丽,等.我国生物质能源发展现状与思考[J].*农业机械学报*,2009,40(1):91~100.
Wu Chuangzhi, Zhou Zhaoqiu, Yin Xiuli, et al. Current status of biomass energy development in China[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*,2009,40(1):91~100. (in Chinese)
- Sun Y, Cheng J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1):1~11.
- 陈东雨,刘荣厚.预处理棉花秆的热解动力学研究[J].*农业机械学报*,2007,38(6):95~99.
Chen Dongyu, Liu Ronghou. Study on the pyrolysis kinetics of pretreated cotton stalk[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*,2007,38(6):95~99. (in Chinese)
- Li C L, Knierim B, Manisseri C, et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification[J]. *Bioresource Technology*,2010,101(13):4900~4906.
- Zhu Z G, Sathitsuksanoh 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]. *Biotechnology and Bioengineering*,2009,103(4):715~724.
- Dadi A P, Schall C A, Varanasi S. Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*,2007,137~140(1~2):407~421.
- 张春梅,刘荣厚,易维明,等.玉米秸秆等离子体热裂解液化实验[J].*农业机械学报*,2009,40(8):96~100.
Zhang Chunmei, Liu Ronghou, Yi Weiming, et al. Experiment on plasma pyrolysis of corn stalk for liquid fuel[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*,2009,40(8):96~100. (in Chinese)
- Zhu S D, Wu Y X, Yu Z N, et al. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis[J]. *Process Biochemistry*,2005,40(9):3082~3086.
- Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation[J]. *FEBS Lett.*,1990,267(1):99~102.
- Ko E M, Leem Y E, Choi H T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001,57(1~2):98~102.
- Bjerre A B, Olesen A B, Fernqvist T, et al. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*,1996,49(5):568~577.
- Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*,1987,59(2):257~268.