



乙醇预处理对芦竹细胞壁的影响及荧光可视化分析

陈冰炜, 阚玉娜, 袁诚, 王新洲, 黄曹兴, 梅长彤, 翟胜丞

引用本文:

陈冰炜, 阚玉娜, 袁诚, 等. 乙醇预处理对芦竹细胞壁的影响及荧光可视化分析[J]. 林业工程学报, 2019, 4(4): 59-65.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2019.04.009>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

碱性亚硫酸盐预处理对杂交狼尾草酶水解特性的影响

Effect of alkaline sulfite pretreatment on enzymatic hydrolysis of hybrid China wolftailgrass

林业工程学报. 2018, 3(2): 95-101 <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2018.02.016>

酸催化离子液体预处理芦竹酶木质素结构研究

Structure elucidation of cellulytic enzyme lignin from Arundo donax Linn.after acid-catalyzed ionic liquid pretreatment

林业工程学报. 2016, 1(2): 82-87 <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2016.02.015>

不同预处理方法对玉米秸秆酶解性能的影响

Effect of different pretreatments on the enzymolysis properties of corn stalk

林业工程学报. 2017, 2(2): 89-94 <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2017.02.015>

γ -戊内酯/水体系下稀酸预处理对玉米秸秆酶解特性的影响

Structure and enzymatic hydrolysis of corn stover with dilute acid pretreatment in γ -valerolactone/ water system

林业工程学报. 2019, 4(1): 101-107 <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2019.01.015>

基于高底物浓度的纤维素酶三段水解桑木粉得率与形貌分析

Multi-stage enzymatic hydrolysis in high substrate concentration of NaOH-Fenton pretreated mulberry wood

林业工程学报. 2017, 2(2): 58-63 <https://doi.org/10.13360/j.issn.2096-1359.2017.02.010>

乙醇预处理对芦竹细胞壁的影响及荧光可视化分析

陈冰炜¹, 阚玉娜¹, 袁诚¹, 王新洲¹, 黄曹兴², 梅长彤¹, 翟胜丞^{1*}

(1. 南京林业大学材料科学与工程学院, 南京 210037; 2. 南京林业大学化学工程学院, 南京 210037)

摘要:为探究 NaOH-乙醇预处理过程中 NaOH 浓度变化对芦竹纤维表面结构、细胞壁区域化学成分以及酶解效果的影响, 采用 NaOH 质量浓度分别为 2.5, 5.0, 10.0 g/L 的 NaOH-乙醇溶液和 10.0 g/L 的 NaOH 水溶液于 90 °C 水浴条件下, 分别对芦竹粉末和切片预处理 2 h。结果表明: 当碱质量浓度为 10.0 g/L 时, NaOH-乙醇预处理后木质素和木聚糖脱除率达到最大值, 分别为 47.11% 和 35.12%, 芦竹酶解葡萄糖得率和木糖得率达到 49.41% 和 77.61%, 分别是未处理样品的 6.2 倍和 7.4 倍。场发射扫描电镜观察显示, NaOH-乙醇预处理后, 芦竹纤维细胞壁表面微纤维暴露。预处理过程的荧光显微镜跟踪观察表明, 木质素的脱除均由薄壁细胞开始, 逐渐向与之靠近的厚壁纤维过渡, 最后到维管束内部的厚壁纤维, 细胞角隅的木质素相对较难脱除, 预处理后仍显示较明显的木质素信号; NaOH-乙醇溶液预处理后的切片整体木质素自发荧光现象减弱, 细胞壁中木质素相对浓度下降, 对酶解葡萄糖和木糖得率的提高都起到促进作用。

关键词: 芦竹; 乙醇; 酶解; 细胞壁; 自发荧光

中图分类号: S781.9 文献标志码: A 文章编号: 2096-1359(2019)04-0059-07

Effects of ethanol pretreatment on the cell wall of *Arundo donax* and fluorescence visualization analysis

CHEN Bingwei¹, KAN Yuna¹, YUAN Cheng¹, WANG Xinzhou¹,
HUANG Caoxing², MEI Changtong¹, ZHAI Shengcheng^{1*}

(1. College of Materials Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Using enzymes, such as cellulases, the hydrolysis of lignocellulosic biomass has been considered as one of the eco-friendly methods to produce bioethanol in bioconversion. However, for the enzymatic hydrolysis, the biomass materials should be pretreated to improve hydrolysis efficiency. This is because of the intrinsic recalcitrance of cell walls in the biomass materials, which is caused by the complexity of chemical composition, multi-laminated cell-wall structure, diversity of cell types and cell combinations. Thus, an efficient pretreatment is an essential step for increasing enzymatic digestibility of the biomass. *Arundo donax*, the typical monocot family Gramineae, is widely cultivated in China, which has the characteristics of the high biomass yield and fast-growing for cultivation and offers great potential for bioethanol production. In this study, *A. donax* was pretreated by NaOH-ethanol solution. Both sections and powder of *A. donax* were pretreated by 2.5 g/L, 5.0 g/L and 10.0 g/L NaOH-ethanol solutions, and 10.0 g/L NaOH solution at a 90 °C water bath and kept for 2 h. After the pretreatment, using the field emission scanning electron microscope (FE-SEM), X-ray diffraction (XRD), fluorescence light microscope (FLM) and high-performance liquid chromatography (HPLC), the surface morphology of the fibers, the topochemical changes in the cell walls and the enzymatic hydrolysis efficiency were investigated. The 10.0 g/L NaOH-ethanol was demonstrated to be the optimal condition for the pretreatment and evidenced by the maximum yield of glucose and xylose, which was 6.2 times and 7.4 times of the yields using the un-treated *A. donax*. The results of the wet-chemical analysis and XRD examination indicated that changes of crystallinity were affected by the removal of the amorphous cellulose, hemicellulose and lignin in the cell walls together with the swelling of cellulose fibrils. FE-SEM images showed that, after the 10.0 g/L NaOH-ethanol pretreatment, more separated microfibrils were exposed on the surface of the cell walls, which could increase the accessibility of the enzyme. By tracing the pretreatment process, the autofluorescence images showed that the removal of lignin among different cell types began at the parenchyma, then the sclerenchyma fibers located at the

收稿日期: 2018-12-07

修回日期: 2019-01-03

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31400496); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20180774, BK20140981)。

作者简介: 陈冰炜, 女, 研究方向为生物质结构解析与生物降解。通信作者: 翟胜丞, 女, 副教授。E-mail: zhais@njfu.edu.cn

outer regions of vascular bundles and followed by the inner parts. The fluorescence signal still occurred in the cell corner after the pretreatment, indicating that the lignin in this region was relatively difficult to remove. After the NaOH-ethanol pretreatment, the whole autofluorescence from the sections was reduced, which suggested that the effect of the NaOH-ethanol pretreatment was more homogeneous compared with the NaOH pretreatment. Thus, the NaOH-ethanol pretreatment could be an effective method to gain fermentable sugars from *A. donax*.

Keywords: *Arundo donax*; ethanol; enzymatic hydrolysis; cell wall; autofluorescence

为缓解能源危机和环境污染问题,各国都在寻求新型可再生能源,将木质生物质原料用于制备生物乙醇以代替传统化石能源已受到广泛关注。芦竹(*Arundo donax*)是我国本土植物,产量可达45~75 t/hm²[1]。芦竹中纤维素等多糖含量较高,是一种制备生物乙醇的潜在原料,对于减少玉米、高粱等淀粉类能源作物的过度消耗具有重要意义[2]。与其他木质纤维原料一样,芦竹细胞壁结构致密,细胞壁主要化学组分相互交联形成复杂的三维结构,使纤维素酶难以直接作用于纤维素。因此,需要通过有效的预处理破坏细胞壁的天然抗降解屏障,以提高酶解效率[3]。

与酸碱预处理相比,乙醇预处理以低毒、可回收、不破坏环境等优点被广泛研究[4]。一些研究表明,乙醇预处理可以有效溶解脱除的木质素,达到提高酶解糖化率的效果[5-6]。在乙醇预处理中添加碱性药品(如NaOH、KOH、Ca(OH)₂等),不仅可以降低反应温度,还可减少预处理过程中糠醛、酚类或弱酸等抑制物的产生[7]。现阶段研究大多侧重于预处理后化学组分变化对酶解效果的影响,而在显微层面对细胞尺度水平上区域化学物质的变化与迁移研究较少。基于细胞水平对预处理前后细胞壁微区化学成分进行原位观察,可以更精准评价预处理效果。木质素等含有不饱和基团的有机物在不同波长的激发光源下会产生自发荧光现象,可用于原位分析区域化学物质相对浓度的变化。目前,共聚焦拉曼成像技术等已被广泛用于细胞壁区域化学与结构的分析[3,8],而荧光显微镜操作便捷,对样品损伤小,且在不需定量分析的情况下,可以快速判断具有荧光效应的化学物质的相对浓度。

本研究使用不同碱浓度的NaOH-乙醇溶液对芦竹进行预处理,采用湿化学法、X射线衍射分析、扫描电镜观察比较分析预处理前后芦竹细胞壁的变化,并结合预处理后切片的双染色及荧光图像,探究区域木质素溶出规律,以期揭示NaOH-乙醇对芦竹预处理的作用机理,优化预处理方法、提高芦竹酶解糖化率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验原料与试剂

陆上一年生芦竹,于2017年11月采于江苏省泰州市姜堰区。整株去叶去花,取节间部分去皮去髓,粉碎过筛,收集0.25~0.45 mm(40~60目)粒径的粉末。根据GB/T 2677.6—1994《造纸原料有机溶剂抽出物含量的测定》对粉末样品进行抽提。抽提后,样品常温干燥,于4℃冰箱保存,备用。

氢氧化钠,分析纯,购于南京化学试剂股份有限公司;乙醇,分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;纤维素二代酶(Cellic CTec2)购于诺维信(Novozymes)生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 预处理

NaOH-乙醇预处理在水浴锅中进行。取2g绝干粉末放入250 mL圆底烧瓶,按固液比1:20(g/mL)加入40 mL体积分数为70%的乙醇溶液[9],之后加入NaOH溶液(质量浓度分别为2.5, 5.0和10.0 g/L);样品于预处理液中常温预浸泡2 h,然后放入90℃水浴锅中反应2 h。另以质量浓度为10.0 g/L的NaOH水溶液,与NaOH-乙醇预处理进行对比分析。预处理结束后,过滤分离,收集处理液,固体残渣用热水洗至中性,均密封存放于4℃冰箱,备用。所有试验重复3次,取平均值。固体回收率(S)按下式计算:

$$S = \frac{(1 - w) \times m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: w 为预处理后样品的含水率,%; m 为预处理残渣的湿质量,g; M 为预处理前的固体质量,g。

为探究细胞壁中木质素脱除及迁移情况,采用上述条件对芦竹横切面切片(厚度10 μm)进行预处理。

1.2.2 化学成分测定

根据美国可再生能源实验室(NREL)制定的方法[10],测定预处理前后样品中葡聚糖、木聚糖、木质素的质量分数,平行测定3次,取平均值。按如下公式计算预处理后的化学成分变化情况:

$$\begin{cases} G = (G_2/G_1) \times 100\% \\ X = (1 - X_2/X_1) \times 100\% \\ L = (1 - L_2/L_1) \times 100\% \end{cases} \quad (2)$$

式中: G 、 X 、 L 分别为葡聚糖、木聚糖和木质素的回收率,%; G_1 、 G_2 、 X_1 、 X_2 、 L_1 、 L_2 分别为预处理前后的葡聚糖、木聚糖和木质素质量分数(基于原料计算),%。

1.2.3 紫外光谱分析

取少量反应后的预处理液体,加去离子水稀释。以去离子水为参照,使用紫外-可见分光光度计(Lambda 950, PE)在波长200~600 nm范围测定溶液的吸收光谱,根据吸光度与峰位反映愈创木基(G型)、紫丁香基(S型)木质素的溶出情况。

1.2.4 相对结晶度分析

使用X射线衍射仪(Ultima IV, Rigaku)表征预处理对芦竹相对结晶度的影响。采用Cu靶K α 辐射,设定电压40 kV,电流30 mA,扫描范围(2θ)为 5° ~ 50° ,步长 0.05° ,扫描速度 $5^\circ/\text{min}$ 。测试前,样品置于梯度升温(终温 $103 \pm 2^\circ\text{C}$)的烘箱中烘至绝干。相对结晶度指数(CrI)根据Segal经验方法计算^[11]:

$$\text{CrI} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: I_{002} 为结晶区纤维素(002)晶面衍射峰的最大强度, $2\theta = 21.8^\circ$; I_{am} 为 $2\theta = 18.6^\circ$ 处的无定形区域的衍射峰强度。

1.2.5 场发射扫描电镜(FE-SEM)分析

采用FE-SEM(JSM-7600F, JEOL)观察、分析预处理对样品微观形貌的影响,加速电压为5 kV。观察前使用离子溅射镀膜仪(JFC-1600, JEOL)对样品进行喷金处理。

1.2.6 组织化学定位显微分析

1) 显微构造:使用番红-星蓝对预处理前后的切片进行双染色,漂洗后用甘油封片,于荧光显微镜(BX41, Olympus)下进行可见光观察。

2) 木质素自发荧光效应:分别以绿光(510~550 nm)和紫外光(330~385 nm)为激发光源,使用荧光显微镜对切片样品进行观察,并使用DP70数字图像采集系统进行拍摄。

1.2.7 酶解性能分析

取预处理前后绝干质量为0.1 g的样品置于2 mL离心管中,纤维素二代酶(滤纸酶活为238 U/mL)的添加量为每克底物20 U/g,加入0.05 mol/L柠檬酸钠缓冲溶液(pH 4.8)至总液体体积为5 mL。恒温振荡器设定温度为 50°C ,转速150 r/min,反应72 h。酶解结束后,离心取上层清液,稀释后利用高效液相色谱(HPLC)测定酶解液中的单糖含量,葡萄糖得率、木糖得率(Y_r)按照如下公式计算:

$$Y_r = \frac{nVC_{g/x}}{M_{g/x}} \times 100\% \quad (4)$$

式中: n 为单糖与聚糖之间的转化系数,计算葡萄糖得率时 $n=0.90$,计算木糖得率时 $n=0.88$; V 为酶解液体积,L; $C_{g/x}$ 为酶解液中葡萄糖或木糖的质量浓度,g/L; $M_{g/x}$ 为酶解底物中原有葡聚糖或木聚糖质量,g。所有试验重复3次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 预处理对芦竹主要化学组分的影响

通过NREL方法测得原料中木质素、葡聚糖、木聚糖质量分数分别为 $(22.58 \pm 0.43)\%$ 、 $(43.19 \pm 0.94)\%$ 、 $(23.18 \pm 0.19)\%$ 。预处理后,原料固体质量及化学组分变化如表1所示。

表1 预处理后芦竹固体质量及化学成分变化

Table 1 Changes of mass and chemical composition of pretreated *A. donax*

预处理方式	NaOH 质量浓度/ (g·L ⁻¹)	脱除率/%			回收率/%	
		木质素	木聚糖	葡聚糖	固体	
70%乙醇	2.5	27.57±0.57	14.22±0.67	87.81±0.69	80.03±0.63	
	5.0	46.59±0.76	23.33±1.08	84.83±1.20	69.70±0.99	
	10.0	47.11±1.44	35.12±1.92	79.35±1.87	67.82±1.98	
水(对照组)	10.0	48.94±0.82	24.88±1.21	83.85±1.35	70.74±1.52	

由表1可知,NaOH质量浓度对葡聚糖回收率影响较小,对木质素与木聚糖脱除率影响相对较大。当NaOH质量浓度由2.5 g/L升高至5.0 g/L,木质素脱除率由27.57%升高至46.59%,木聚糖脱除率由14.22%升高至23.33%。由于木质素、木聚

糖大量脱除,使得预处理后物料的固体质量回收率明显下降。碱性条件下,诱导效应会使木质素中的 α -醚键易发生断裂,导致木质素大分子结构部分断裂;同时,木质素苯环上的甲基芳基醚键也会在OH⁻作用下断裂,发生脱甲基反应,增加木质素的

亲水性^[12]。因此,碱浓度提高可促进木质素脱除。当碱质量浓度由 5.0 g/L 增加为 10.0 g/L 时,木质素脱除率由 46.59% 升高为 47.11%,而对照组为 48.94%,木质素脱除率相近。这可能是由于木质素的深度碎裂与 β -O-4 芳基醚键及其侧链的碳-碳键断裂有关,当溶液中只存在 OH^- ,无其他强亲核试剂(如 HS^- 、 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 等)时,仅部分 β -O-4 芳基醚键发生反应,因而当碱质量浓度为 5.0 g/L 时,继续增加 NaOH 浓度对木质素脱除无明显促进作用。

木质素与木聚糖之间以酯键、醚键或苯苷键等连接,木质素脱除的同时可能会分离更多的木聚糖,碱性条件下木聚糖也会发生碱性水解或剥皮反应^[13],而乙醇的添加可能促进多糖的溶解。根据 Selig 等^[14]研究发现,木聚糖的适量脱除对酶解有明显的促进作用。

2.2 预处理对不同类型木质素溶出情况的影响

由表 1 可知,预处理会导致木质素和一部分木糖降解成单体或低聚物溶解于预处理液中。木质素为芳香族化合物,苯环对紫外光具有强烈的吸收作用。从预处理液的紫外光谱图(图 1)可以看出,波长 280 nm 处出现明显吸收峰,主要由苯环 π - π^* 跃迁引起,为木质素特征吸收峰;波长 310~330 nm 附近出现宽肩峰,可能由阿魏酸或对香豆酸等物质中不饱和官能团引起。当 NaOH 质量浓度由 2.5 g/L 上升为 5.0 g/L 时,280 nm 处特征峰强度明显增加,说明溶液中愈创木基结构吸收更强^[15];当 NaOH 质量浓度为 10.0 g/L 时,NaOH-乙醇预处理与对照组显示相似的紫外光谱,280 nm 处吸收峰强度相对下降,但 310~330 nm 的肩峰相对增强。这可能是由于预处理液中溶解了更多紫丁香基木质素,使得 280 nm 特征峰强度相对下降;310~330 nm 的峰可能是处理液中的羟基肉桂酸结构或其他物质降解产生的醛酮、酯类引起的^[5]。

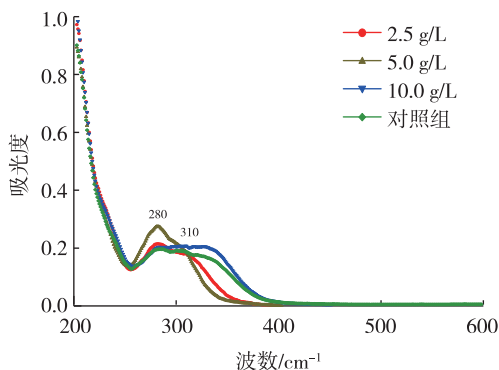


图 1 预处理液的紫外光谱
Fig. 1 UV spectra of pretreatment liquid

2.3 预处理对芦竹相对结晶度的影响

不同预处理条件下芦竹的 XRD 谱图如图 2 所示。在 $2\theta = 16.2^\circ$, 21.8° 和 34.5° 附近均出现吸收峰,是典型的纤维素 I 型结构,纤维素晶型未改变。但所有预处理样品的结晶度,相比未处理样品均有所上升,这与 Wu 等^[16]的研究结果相似。这可能是因为木质素与木聚糖等无定形物在预处理中降解,导致纤维素相对结晶度上升。此外, Toba 等^[17]研究指出,无定形区纤维素在高温烘干时会重新排列,与结晶区表面的纤维素形成分子间氢键,使结晶度上升。

比较不同碱浓度下的预处理样品可知,结晶度随 NaOH 浓度增加略呈下降趋势,这可能是由于碱浓度上升会增加纤维素的润胀程度,在保持纤维素 I 型结构的状态下使其相对结晶度略微下降^[18]。

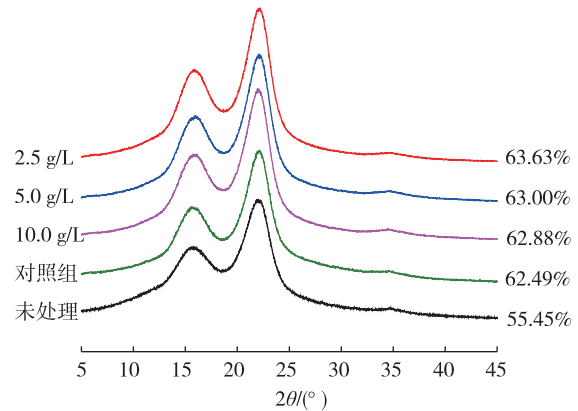


图 2 不同预处理条件下芦竹的 XRD 谱图
Fig. 2 XRD spectra of *A. donax* after pretreatments at different conditions

2.4 预处理对芦竹表面形貌的影响

通过 FE-SEM 观察分析不同预处理条件下芦竹的表面微观形貌特征(图 3)可知:预处理前,纤维表面较为光滑(图 3a);预处理后,纤维破损,表面粗糙度增加。对比图 3b、c 可知,随着碱浓度上升,木聚糖、木质素脱除率上升(表 1),细胞表面出现较多孔隙;并且微纤丝排列方向显露出来,可清楚地观察到细胞壁层微纤丝取向(图 3c 中箭头所示)。因此,酶与底物直接接触的可能性增加,酶解效率提高^[3]。对照组(图 3d)显示,NaOH 预处理后,纤维表面出现一些球状颗粒,这可能是低分子量木质素与多糖的降解产物发生缩聚反应,形成木质素-碳水化合物复合体(LCC),冷却后附着在细胞壁表面所形成的^[19]。与碱预处理相比,乙醇对溶出的木质素碎片有较好的溶解,因此,NaOH-乙醇预处理后的纤维表面较为光滑(图 3c)。

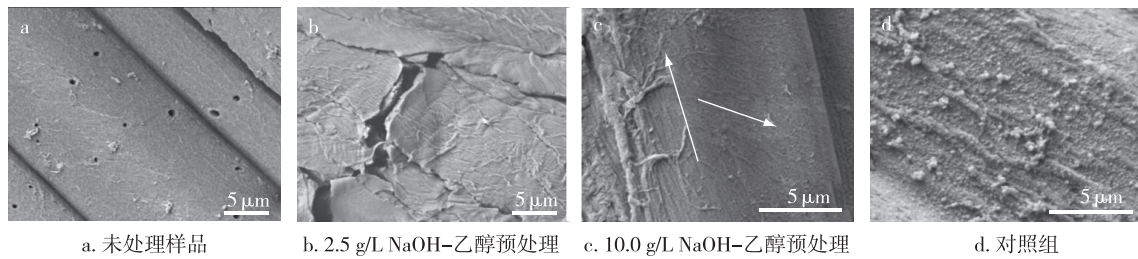
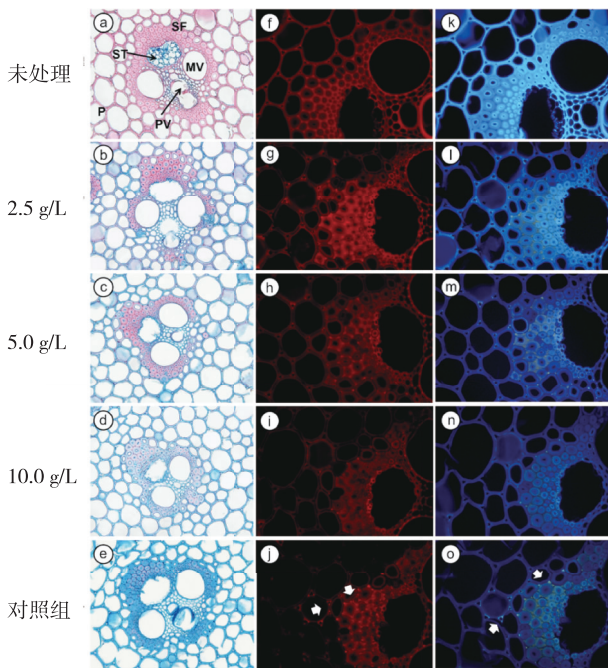


图3 不同预处理条件下芦竹的表面微观形貌

Fig. 3 Surface micromorphology of *A. donax* after pretreatments at different conditions

2.5 预处理对芦竹显微构造及木质素荧光效应的影响

芦竹横切面显微构造如图4a所示,包括薄壁组织(parenchyma,P)和维管束组织,其中,维管束组织包括原生导管(protoxylem vessel,PV)、后生导管(metaxylem vessel,MV)、筛管(sieve tube,ST)以及环绕在其外侧的厚壁纤维(sclerenchyma fiber,SF)。



a~e. 番红-星蓝双染色; f~j. 绿色光激发下的自发荧光;
k~o. 紫外光激发下的自发荧光; P为薄壁细胞;
PV为原生导管; MV为后生导管;
ST为筛管; SF为厚壁纤维

图4 不同预处理条件下芦竹的双染色及自发荧光图片
Fig. 4 Double staining sections and autofluorescence of *A. donax* after pretreatments at different conditions

未处理样品在番红-星蓝双染色后,维管束的厚壁纤维、导管、薄壁细胞的细胞壁都基本为红色,呈现较高的木质化程度;筛管为蓝色,表明其木质化程度较低,具有较多多糖类物质(图4a)。图4a~c显示,随NaOH浓度的增加,薄壁细胞红色部分不断减少,表明此区域的木质素发生脱除;但厚

壁纤维依旧呈现相对明显的红色,表明该区域木质素含量仍相对较高。NaOH质量浓度为10.0 g/L时,2种预处理后的厚壁纤维红色区域均有明显减少(图4d,e),表明大量木质素发生脱除,这与表1中的数据趋势一致。

大量文献^[15,20-22]表明,自发荧光主要是由木质素芳香骨架中的共轭键产生,因此,图像颜色的明暗程度可反映不同区域木质素的相对浓度。图4f~j是绿色光激发下的自发荧光图像,可清楚看到未处理样品在导管、细胞角隅、复合胞间层均显示较为强烈的荧光信号,表明该区域木质素含量相对较高。图4g显示,当NaOH质量浓度为2.5 g/L时,厚壁纤维细胞角隅、复合胞间层荧光信号相对增强,这可能是因为部分抽提物的去除使得荧光信号更为集中。此外,预处理初期木质素的迁移、再沉积也可能导致区域信号的增强^[23]。随着碱浓度上升,细胞壁自发荧光效应逐渐减弱。当NaOH质量浓度为10.0 g/L时,NaOH-乙醇预处理后薄壁细胞和厚壁纤维基本无非常强烈的荧光信号,表明木质素发生大量脱除(图4i)。对照组显示,NaOH预处理后薄壁细胞荧光信号基本消失,仅在细胞角隅出现,说明薄壁细胞中的木质素发生较明显降解;但厚壁纤维的复合胞间层与细胞角隅处依然存在相对较强的荧光信号(图4j中箭头所示)。

图4k~o是紫外光激发下的自发荧光图像。由图4l可以看出,预处理后细胞壁显示的颜色不再是单纯蓝色,厚壁纤维显示出一定绿色,Harris等^[24]认为绿色可能是碱处理后细胞壁中的阿魏酸产生的。对比图4g~i,l~n均可以发现,木质素的溶出首先开始于薄壁细胞,其次是厚壁纤维外侧,最后过渡到厚壁纤维内侧。此外,预处理过程中,薄壁细胞的复合胞间层荧光信号有明显减弱,次生壁荧光信号则相对明显。有研究表明,禾本科植物的复合胞间层中沉积了大量对羟基肉桂酸(HCA),脱木质素过程中,HCA会优先于木质素从细胞壁中脱除,同时,薄壁细胞中的HCA及木质素

脱除速率高于木质化程度较高的厚壁纤维^[25]。切片预处理过程中,各壁层与溶液接触更均匀,可能导致薄壁细胞复合胞间层中的HCA及木质素充分反应而被脱除,使得复合胞间层荧光强度有所减弱。

碱浓度相同的NaOH-乙醇预处理(图4i,n)与NaOH预处理(图4j,o)相比,NaOH-乙醇预处理后切片整体荧光效应均有所减弱,预处理效果更加均匀;NaOH预处理对薄壁细胞有明显的脱木质素效果,但部分细胞角隅(图4j,o中箭头所示)及厚壁纤维木质素含量仍相对较高。

2.6 预处理对芦竹酶解性能的影响

芦竹72 h酶解葡萄糖、木糖得率见图5。NaOH-乙醇预处理中,随着碱浓度增加,酶解还原糖得率均逐步上升。当NaOH质量浓度为10.0 g/L时,葡萄糖、木糖得率均达到最大值49.41%和77.61%,分别是原料的6.2倍和7.4倍。木质素的有效脱除减弱了木质素对底物造成的疏水作用和对酶的无效吸附^[26-27],增加了酶的可及性。适量木聚糖的脱除,不仅减弱了木聚糖对纤维素酶的物理位阻效应,而且木聚糖大分子链的断裂也暴露出更多可与木糖酶接触的活性位点,提高木糖与葡萄糖得率。

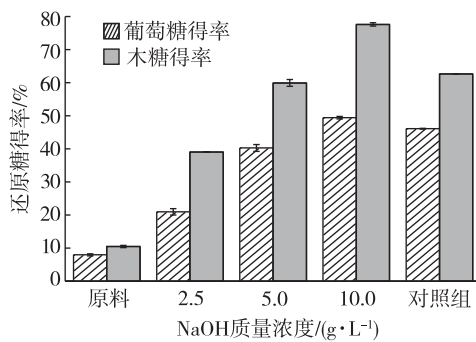


图5 预处理对芦竹72 h酶解葡萄糖得率和木糖得率的影响

Fig. 5 Effects of pretreatments on 72 h glucose yield and xylose yield of *A. donax*

与对照组相比,NaOH-乙醇预处理后芦竹的酶解效率相对更好。结合显微分析可以发现,NaOH-乙醇预处理对木质素的脱除效果更加均匀,预处理后纤维表面孔隙率增加,微纤丝显露,都增加了酶与底物的直接接触,从而提高了酶解效率。

3 结论

1)基于木质素自发荧光效应,通过原位可视化分析可获得乙醇预处理过程中芦竹细胞壁木质素迁移规律:木质素的脱除由薄壁细胞开始,逐渐

向厚壁纤维逐渐过渡;薄壁细胞复合胞间层的木质素脱除最明显,而细胞角隅处的木质素最难脱除。

2)预处理时,碱浓度的上升可促进木质素与木聚糖的脱除,特别是紫丁香基木质素与对羟基肉桂酸;木质素与木聚糖的溶出减少了位阻效应,同时破坏了细胞壁化学组分相互交联的致密结构,孔隙的增加与微纤丝的暴露,均增加了底物与酶的直接接触面积;10.0 g/L的NaOH-乙醇预处理后,芦竹可获得最佳酶解效果。

3)由于碳水化合物无自发荧光效应,后续试验将探索新的标记方法表征预处理中细胞壁的木糖、葡萄糖等的迁移规律,多角度分析乙醇预处理机制。

参考文献(References):

- [1] 余醉,李建龙,李高扬. 芦竹作为清洁生物质能源牧草开发的潜力分析[J]. 草业科学, 2009, 26(6): 62-69.
YU Z, LI J L, LI G Y. Analysis on the potential capacity of exploiting giant reed as an energy forage[J]. Pratacultural Science, 2009, 26(6): 62-69.
- [2] YOU T T, ZHANG L M, XU F. Progressive deconstruction of *Arundo donax* Linn. to fermentable sugars by acid catalyzed ionic liquid pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2016, 199: 271-274. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.152.
- [3] 许风,张逊,周霞,等. 农林生物质预处理过程中细胞壁主要组分溶解机理研究进展[J]. 林业工程学报, 2016, 1(4): 1-9. DOI: 10.13360/j.issn.2096-1359.2016.04.001.
XU F, ZHANG S, ZHOU X, et al. An investigation of dissolution mechanism of major components in cell walls of agricultural and forest biomass[J]. Journal of Forestry Engineering, 2016, 1(4): 1-9.
- [4] ZHANG K, PEI Z J, WANG D H. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review[J]. Bioresource Technology, 2016, 199: 21-33. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.102.
- [5] 元英进,秦磊,李炳志,等. 乙醇预处理对水稻秸秆物质迁移和酶解的影响[J]. 天津大学学报, 2012, 45(9): 757-762. DOI: 10.3969/j.issn.0493-2137.2012.09.003.
YUAN Y J, QIN L, LI B Z, et al. Effects of ethanol pretreatment on chemical conversion and enzymatic hydrolysis in rice straw[J]. Journal of Tianjin University, 2012, 45(9): 757-762.
- [6] 周静,沈葵忠,房桂干,等. 响应面优化碱醇预处理麦草酶解效率及木质素组分分离[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 81-86. DOI: 10.13386/j.issn.1002-0306.2018.14.016.
ZHOU J, SHEN K Z, FANG G G, et al. Optimization of the alkali-ethanol pretreatment of wheat straw for increasing enzymatic hydrolysis efficiency with response surface methodology and separation of lignin component[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(14): 81-86.
- [7] YUAN W, GONG Z W, WANG G H, et al. Alkaline organosolv pretreatment of corn stover for enhancing the enzymatic digestibility[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 464-470. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.06.038.
- [8] JI Z, MA J F, XU F. Multi-scale visualization of dynamic

- changes in poplar cell walls during alkali pretreatment [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2014, 20(2): 566–576. DOI: 10.1017/s1431927614000063.
- [9] NI Y, HU Q. Alcell® lignin solubility in ethanol-water mixtures [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1995, 57(12): 1441–1446. DOI: 10.1002/app.1995.070571203.
- [10] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [R]. National Renewable Energy Laboratory, 2012: 1–15.
- [11] 李新宇, 张明辉. 利用 X 射线衍射法探究木材含水率与结晶度的关系 [J]. *东北林业大学学报*, 2014, 42(2): 96–99. DOI: 10.13759/j.cnki.dlxb.2014.02.023.
- LI X Y, ZHANG M H. Relationship of wood moisture content and the degree of crystallinity by X-ray diffraction [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2014, 42(2): 96–99.
- [12] ZHAO X B, CHENG K K, LIU D H. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(5): 815–827. DOI: 10.1007/s00253-009-1883-1.
- [13] 周静, 沈葵忠, 房桂干, 等. 不同预处理方法对麦草化学组分及其酶解性能的影响 [J]. *林产化学与工业*, 2017, 37(5): 53–60. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2417.2017.05.007.
- ZHOU J, SHEN K Z, FANG G G, et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition and enzymatic hydrolysis of wheat straw [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2017, 37(5): 53–60.
- [14] SELIG M J, ADNEY W S, HIMMEL M E, et al. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes [J]. *Cellulose*, 2009, 16(4): 711–722. DOI: 10.1007/s10570-009-9322-0.
- [15] 马建锋, 杨淑敏, 田根林, 等. 植物细胞壁木质素区域化学紫外显微光谱研究进展 [J]. *林产化学与工业*, 2016, 36(1): 147–154. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2417.2016.01.021.
- MA J F, YANG S M, TIAN G L, et al. Application of UV-microspectrophotometry on lignin topochemistry in plant cell wall [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2016, 36(1): 147–154.
- [16] WU X X, HUANG C X, ZHAI S C, et al. Improving enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw through sequential autohydrolysis and alkaline post-extraction [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 374–380. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.066.
- [17] TOBA K, YAMAMOTO H, YOSHIDA M. Crystallization of cellulose microfibrils in wood cell wall by repeated dry-and-wet treatment, using X-ray diffraction technique [J]. *Cellulose*, 2013, 20(2): 633–643. DOI: 10.1007/s10570-012-9853-7.
- [18] LING Z, CHEN S, ZHANG X, et al. Exploring crystalline-structural variations of cellulose during alkaline pretreatment for enhanced enzymatic hydrolysis [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 611–617. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.064.
- [19] ZENG Y N, ZHAO S, WEI H, et al. In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 126. DOI: 10.1186/s13068-015-0312-1.
- [20] 邓建华, 管梦灵, 刘美芹. 高粱茎秆中木质素分布的显微技术研究 [J]. *植物学研究*, 2014, 3: 188–194. DOI: 10.12677/br.2014.35024.
- DENG J H, GUAN M L, LIU M Q. Study on microscopy techniques for identifying lignin distribution in the stem of sorghum [J]. *Botanical Research*, 2014, 3: 188–194.
- [21] DONALDSON L A. Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(6): 859–873. DOI: 10.1016/s0031-9422(01)00049-8.
- [22] JI Z, MA J F, ZHANG Z H, et al. Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 47: 212–217. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.03.006.
- [23] DONOHOE B S, DECKER S R, TUCKER M P, et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(5): 913–925. DOI: 10.1002/bit.21959.
- [24] HARRIS P J, HARTLEY R D. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy [J]. *Nature*, 1976, 259(5543): 508–510. DOI: 10.1038/259508a0.
- [25] SIQUEIRA G, MILAGRES A M, CARVALHO W, et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 7. DOI: 10.1186/1754-6834-4-7.
- [26] 徐栋梁, 任浩. 木质素对纤维素酶水解抑制作用的研究进展与展望 [J]. *中华纸业*, 2017, 38(20): 19–24.
- XU D L, REN H. The research progress and prospect on lignin inhibition in cellulose enzyme hydrolysis [J]. *China Pulp & Paper Industry*, 2017, 38(20): 19–24.
- [27] 杨淑娟, 游艳芝, 张威伟, 等. NaOH-乙醇预处理提高甘蔗渣酶法制备低聚木糖效率 [J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(2): 114–120. DOI: 10.13332/j.1000-1522.20170366.
- YANG S J, YOU Y Z, ZHANG W W, et al. NaOH-ethanol pretreatment increasing preparation efficiency of xylo-oligosaccharide from sugarcane bagasse with enzymatic hydrolysis [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2018, 40(2): 114–120.

(责任编辑 莫弦丰)