

木质纤维素微波强化预处理方法的初步研究

黄美子, 卿 青, 胡 蓉, 周琳琳, 张 跃*
(常州大学制药与生命科学学院, 江苏常州 213164)

摘要:以水稻秸秆为原料,采用微波辐射联合小分子有机酸预处理手段,考察了微波强度、酸质量分数、微波时间、固液比对木质素的移除和经预处理底物的酶水解效果的影响。通过正交实验确定了各因素的影响次序为:酸质量分数 > 固液比 > 微波时间 > 微波强度。在最佳的预处理条件下(柠檬酸质量分数为20%,固液比为1:20,微波时间为8 min,微波强度为600 W),酶水解96 h后的还原糖产率可达50.6%,比未处理的秸秆(22.5%)提高了28.1%。随后对最佳条件下处理的底物进行了一系列酶水解条件的优化,确定了酶水解的最优条件,即底物质量浓度为20 mg/mL,控制添加的酶的总蛋白量为20 mg,纤维素酶: β -葡萄糖苷酶:木聚糖酶蛋白量为1:1:2,最佳表面活性剂吐温-80的质量分数为2%,此时的还原糖产率可达58.4%,比未优化的有明显的提高。

关键词:稻草秸秆;微波;有机酸;预处理;酶水解;优化

中图分类号:Q93;X703

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)09-0075-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.09.018

A preliminary research on microwave strengthened pretreatment of lignocellulosic materials

HUANG Mei-zi¹, QING Qing, HU Rong, ZHOU Lin-lin, ZHANG Yue*

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: The effects of microwave intensity, acid concentration, microwave time, solid-liquid ratio on lignin removal and enzymatic hydrolysis of pretreated substrate are studied by microwave radiation technology combined with small molecular organic acid pretreatment method, using rice straw as raw material. The influencing order of different parameters is determined as acid concentration > microwave time > solid-liquid ratio > microwave intensity. The optimal pretreatment conditions are shown as follows: 20% mass fraction of citric acid, 1:20 of a solid-liquid ratio, 8 minutes of microwave time and 600 W of microwave intensity. Under optimal pretreatment condition, the yield of reducing sugar can reach 50.6% after 96 hours of enzymatic hydrolysis, which is improved by 28.1% in comparison with the un-pretreated substrate. The optimization of enzymatic hydrolysis conditions for the pretreated substrate is also proceeded. The yield of reducing sugar can reach 58.4% under the following enzymatic hydrolysis conditions: 20 mg/mL of substrate concentration, 20 mg of total enzyme protein amount, 1:1:2 ratio of cellulase: β -glucosidase: xylanase and 2% of Tween-80, obviously higher than the control sample.

Key words: straw stalk; microwave; organic acids; pretreatment; enzymatic hydrolysis; optimization

随着人口的不断增加,环境污染与能源枯竭已成为人类面临的棘手问题^[1]。我国的水稻种植业发达,而废弃的稻草秸秆却一直未得到充分利用^[2-3]。因此,对于稻草资源合理利用的研究和探索有着重要的意义^[4]。将稻草经预处理后糖化,最后,通过微生物发酵生产燃料乙醇是有效的利用途径之一^[5-7],然而,目前成功用于工业化的并不多,其主要原因是预处理效果欠佳,稻草糖化效率较低,因此,有必要对稻草的预处理和糖化过程进行更进一步的研究^[8-9]。

稻草秸秆是一种主要包括纤维素、半纤维素和

木质素的木质纤维素原料,其性质稳定,通常难以被直接降解利用,因此,需要有效的预处理方法破坏木质纤维素的结构^[10],即破坏其内部的氢键,使得木质纤维素易于被纤维素酶降解^[11]。目前木质纤维素原料的预处理方法主要有物理法、化学法、生物法以及组合预处理方法^[12]。其中稀酸预处理方法已成为一种较为成熟的手段。为了提高预处理效率^[13],常用无机酸进行催化反应,常用的无机酸有HCl、H₂SO₄、H₃PO₄^[14-16]。但无机酸易造成反应设备腐蚀,增大了后续分离难度,并且残留在底物上的无机酸通常被认为给生物酶和发酵微生物带来了一

收稿日期:2016-02-26

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20140258)

作者简介:黄美子(1991-),女,硕士研究生,研究方向为生物化工,736040297@qq.com;张跃(1964-),男,博士,研究员,研究方向为生物化工,通讯联系人,zyjs@cczu.edu.cn。

定的抑制作用。有机酸作为一种相对温和的酸类,对反应器腐蚀小,有望作为有效的催化剂替代无机酸^[17]。

微波加热能在极短的时间内迅速加热反应底物,从而使一些在常规条件下不能被活化而无法进行或难以进行的反应得以发生^[18-20]。笔者采用有机酸结合微波反应器对稻草秸秆进行辅助催化反应,探索了不同反应条件下不同有机酸对稻草秸秆的处理效果。利用有机酸取代无机酸作催化剂,简化了后续反应液的处理步骤,并能实现纤维素原料的高效预处理。

1 实验部分

1.1 主要原料和试剂

稻草秸秆取自常州农田,将其剪成 2~3 cm,洗净烘干后粉碎备用,其主要成分如表 1 所示。纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶均购自 Sigma。

表 1 稻草秸秆的主要成分

组成	纤维素	半纤维素	木质素	灰分	其他
质量分数/%	36.1	24.9	17.5	2.6	18.9

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

称取 1 g 稻草秸秆于锥形瓶中,加入稀酸,搅匀后在 200~600 W 的微波条件下反应 5~10 min,处理后的秸秆洗净烘干备用。

1.3 分析与测定

1.3.1 还原糖测定^[23]

还原糖质量浓度采用 DNS 法测定^[11]。用紫外分光光度计在 520 nm 下测其 OD 值,并按下式计算

还原糖产率(mg/mL):

$$\text{还原糖产率} = \left[\frac{\text{还原糖浓度}}{\text{纤维素浓度} + \text{半纤维素浓度}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 各种糖质量浓度的测定

采用 Waters 高效液相色谱仪分析葡萄糖的含量。色谱柱为 Aminex[®] HPX-87H 柱,色谱条件:流动相采用 0.005 mol/L H₂SO₄;流速为 0.6 mL/min;柱温为 65℃,单次进样 20 μ L。

1.3.3 组分测定

组分测定方法依据 NREL 标准实验方法^[22],其中糖质量浓度用 HPLC 测得。半纤维素质量分数及纤维素质量分数计算式分别如下,式中的糖均为质量浓度:

$$\text{半纤维素质量分数} = \left\{ \frac{(\text{木糖} + \text{半乳糖} + \text{阿拉伯糖}) \times 87 \times 0.88}{(0.3 \times 1000)} \right\} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{纤维素质量分数} = \left\{ \frac{[(\text{纤维二糖} + \text{葡萄糖} + \text{甘露糖}) \times 87 \times 0.9]}{(0.3 \times 1000)} \right\} \times 100\% \quad (3)$$

2 实验结果与讨论

2.1 微波结合小分子有机酸预处理工艺

2.1.1 小分子有机酸的筛选

在相同条件下选取小分子有机酸(醋酸、丙酸、苹果酸、丁二酸、柠檬酸)进行预处理。酸质量分数为 5%,固液比为 1:30,在微波强度 400 W 的条件下预处理 8 min。预处理后的固体经酶水解^[21-22],结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,未处理的稻草秸秆 96 h 时糖化产率为 22.5%,而利用微波结合小分子有机酸预处理后糖化率大大提高,尤其采用柠檬酸所得到的糖化率最高为 30.0%,其次是苹果酸,约为 26.6%。

(上接第 74 页)

[6] Leelajariyakul S, Noguchi H, Kiatkamjornwong S. Surface-modified and micro-encapsulated pigmented inks for ink jet printing on textile fabrics[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2008, 62:145-161.

[7] 张天永,周春隆. 聚苯乙烯对酞菁铜颜料微胶囊化的研究[J]. *应用化学*, 1999, 16(2):96-98.

[8] Zhang Tianyong, Fei Xuening, Song Jian, *et al.* Properties of copper phthalocyanine microencapsulated in polystyrene by phase separation[J]. *Dyes and Pigments*, 2000, 44:1-7.

[9] 戚栋明,张睿,许玲玉. 有机颜料酞菁蓝微胶囊的原位微悬浮法制备及其表征[J]. *高分子学报*, 2011, (2):145-150.

[10] Isao Kimura, Sen-Ichi Ikarashi, Natsukaze Aaito. Microencapsulation of thermal-sensitive pigment with inorganic wall material by in-

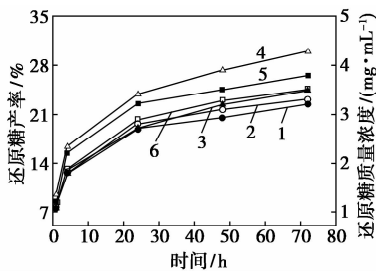
terfacial reaction in multiple dispersion[J]. *Advanced Powder Technol*, 1997, 8(1):1-13.

[11] Lelu S, Novat C, Graillat C, *et al.* Encapsulation of an organic phthalocyanine blue pigment into polystyrene latex particles using a miniemulsion polymerization process[J]. *Polymer International*, 2003, 52:542-547.

[12] Zhang Tianyong, Zhou Chunlong. Properties of copper phthalocyanine blue (C. I. pigment blue 15:3) treated with poly(ethylene glycol)s[J]. *Dyes and Pigments*, 1997, 35(2):123-130.

[13] 周雪琴,赵娟娟,刘东志,等. 油酸钠对酞菁铜颜料的分散作用[J]. *染料与染色*, 2009, 46(1):11-13.

[14] 荀育军. 微胶囊化有机颜料耐晒黄 G 的研制[D]. 长沙:中南大学化学化工学院, 2003:21-25. ■



1—未处理;2—醋酸;3—丙酸;4—柠檬酸;5—苹果酸;6—丁二酸

图1 小分子有机酸种类对秸秆水解糖化效果的影响

2.1.2 预处理条件优化

影响木质素移出和酶水解效果的主要因素有酸质量分数、固液比、微波强度和微波时间。通过考察木质素移除和酶水解效果设计正交实验,以柠檬酸为考察对象设计正交实验。正交设计实验如表2所示,正交实验结果如表3所示。

表2 因素水平表

水平	因素			
	微波强度/ W	w(柠檬酸)/ %	微波时间/ min	固液比 (W/V)
1	200	5	5	1:20
2	400	10	8	1:30
3	600	20	10	1:40

表3 柠檬酸预处理极差分析表

	微波强度/W	w(柠檬酸)/%	微波时间/min	固液比(W/V)	酶水解96h的还原糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)
实验1	200	5	5	1:20	4.911
实验2	200	10	8	1:30	5.576
实验3	200	20	10	1:40	5.883
实验4	400	5	8	1:40	5.248
实验5	400	10	10	1:20	5.599
实验6	400	20	5	1:30	5.158
实验7	600	5	10	1:30	5.546
实验8	600	10	5	1:40	4.874
实验9	600	20	8	1:20	7.108
均值1	5.457	5.235	4.981	5.873	
均值2	5.335	5.350	5.977	5.427	
均值3	5.843	6.050	5.676	5.335	
极差R	0.508	0.815	0.996	0.538	

由表3可以看出,各因素的影响次序为:酸质量分数>固液比>微波时间>微波强度。因此移除木

质素的最佳条件为:酸质量分数为20%,固液比为1:20,微波强度为600W,微波时间为8min,即实验9为最佳实验条件。

此外,以还原糖产率对其进行表征来考察酶水解效果。确定底物质量浓度为20mg/mL,加入纤维素酶20FPU/(g底物), β -葡萄糖苷酶40CBU/(g底物),以未处理的稻草秸秆为空白对照,结果如表4所示。

表4 不同预处理条件下的酶水解96h的还原糖含量

	还原糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	还原糖产率/%
未处理	3.221	22.5
实验1	4.911	34.3
实验2	5.576	39.0
实验3	5.883	41.1
实验4	5.248	36.7
实验5	5.599	39.2
实验6	5.158	36.1
实验7	5.546	38.8
实验8	4.874	34.1
实验9	7.108	50.6

由表4可以看出,实验9的还原糖产率最高,与正交实验中确定的移除木质素效果最好的预处理条件相同。由此可以看出,木质素的移除与酶水解的效果有很大的联系,木质素会阻碍酶进攻纤维素和半纤维素,木质素移除的越多,酶水解效果会有明显提高。在此条件下,酶水解96h得到还原糖产率最高可达50.6%;实验3次之,为41.1%;而未处理的秸秆的还原糖产率只有22.5%。实验9的还原糖产率比未处理的提高了28.1%。最终可确定预处理的最佳条件为:柠檬酸质量分数为20%;固液比为1:20;微波时间为8min;微波强度为600W。

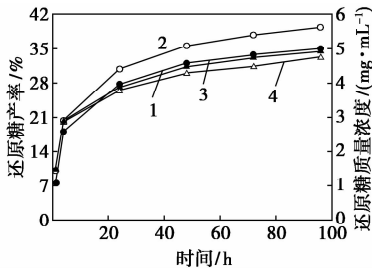
2.2 强化酶水解工艺的优化

根据实验确定了最佳预处理条件为正交实验中的第9组,由于反应条件太强,导致处理后部分秸秆会变焦,因此,选择用预处理效果次之的第3组条件来处理秸秆。

2.2.1 底物质量浓度对酶水解效果的影响

底物质量浓度(10、20、30mg/mL和50mg/mL)对酶水解效果的影响如图2所示。由图2可以看出,当底物质量浓度由10mg/mL增加到20mg/mL时,糖化率有所提高;当底物质量浓度继续提高后,糖化率降低。这是因为底物质量浓度过多提高后,酶的剂量相对不够,无法满足与底物的足量结合催

化,导致底物过量,从而降低了糖化率。当底物质量浓度为 20 mg/mL 时,还原糖产率达到最大,96 h 糖化率最高达到 40.3%。

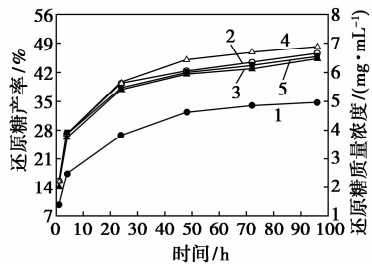


1—10 mg/mL;2—20 mg/mL;3—30 mg/mL;4—40 mg/mL

图 2 不同底物质量浓度下的酶水解曲线

2.2.2 酶配比对酶水解效果的影响

调节纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶之间的质量比(蛋白量之比)分别为 1:1:1、1:2:1、1:1:2 和 2:1:1(以只加入纤维素酶作对照),总酶蛋白添加量为 20 mg,酶配比对酶水解效果的影响如图 3 所示。



1—纤维素酶;2— m (纤维素酶): m (β -葡萄糖苷酶): m (木聚糖酶)=1:1:1;3— m (纤维素酶): m (β -葡萄糖苷酶): m (木聚糖酶)=1:2:1;4— m (纤维素酶): m (β -葡萄糖苷酶): m (木聚糖酶)=1:1:2;5— m (纤维素酶): m (β -葡萄糖苷酶): m (木聚糖酶)=2:1:1

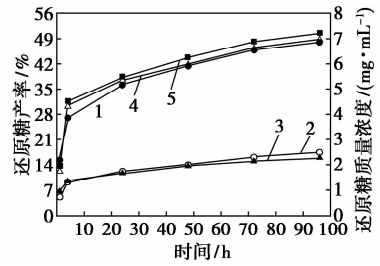
图 3 添加酶的总蛋白量为 20 mg 的糖化率

由图 3 可以看出,所添加的 3 种酶的质量比为 1:1:2 时,96 h 的还原糖产率最高达到 48.2%。与只添加纤维素酶(最大的还原糖产率为 34.8%)相比,还原糖产率提高了 13.4% 左右。因此,添加适量的木聚糖酶可有效地水解酶解过程中产生的寡聚木糖,从而提高酶水解效果,并且可以有效减少纤维素酶的用量,降低了酶解成本。

2.2.3 表面活性剂种类对酶水解效果的影响

不同表面活性剂(离子型表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵 CTMAB、十二烷基磺酸钠 SDS 和非离子型表面活性剂 PEG-6000、吐温-80,以不加表面活性剂的作为空白)对酶水解效果的影响如图 4 所示^[24]。质量分数为 1%,选用最优酶配比条件进行

酶水解。

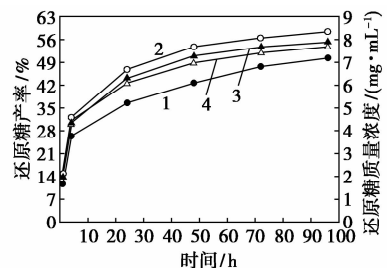


1—不添加表面活性剂;2—十六烷基三甲基溴化铵;3—十二烷基磺酸钠;4—PEG-600;5—吐温-80

图 4 加不同表面活性剂时的酶水解曲线

从图 4 中可以看出,不添加表面活性剂时的 96 h 的糖化率为 48.2%,而添加 CTMAB 和 SDS 时的 96 h 的糖化率分别为 17.4% 和 15.7%,比不添加表面活性剂的要小很多。相反,添加 PEG-6000 和吐温-80 时的 96 h 的糖化率分别可以达到 49.0% 和 50.5%,相比之下有所提高。由此可知,CTMAB 和 SDS 对酶水解过程具有明显的抑制作用,而 PEG-6000 和吐温-80 具有促进纤维素糖化的作用,并且吐温-80 的促进作用比 PEG-6000 大。最终确定最佳的表面活性剂为吐温-80。

表面活性剂固液比[1%~4%(W/V)]对酶水解效果的影响如图 5 所示。从图 5 中可以看出,还原糖产率随着吐温-80 质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势,当吐温-80 的质量分数为 2% 时,还原糖产率最大,达到 58.4%,继续增加吐温-80 的质量分数会抑制酶水解过程的进行,导致还原糖产率有所下降,因此,最后确定吐温-80 的最佳质量分数为 2%。

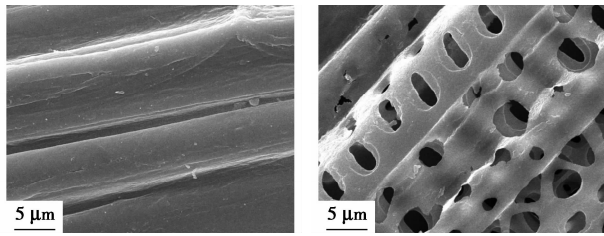


1—1%;2—2%;3—3%;4—4%

图 5 不同吐温-80 质量分数下的酶水解曲线

2.3 经预处理稻草秸秆的表征

对以质量分数为 20% 柠檬酸为催化剂,固液比为 1:20,600 W 微波强度下处理 8 min 后的样品进行电镜表征,考察其预处理前后的微观结构变化,结果如图 6 所示^[25]。



(a) 未处理的稻草秸秆 (b) 柠檬酸预处理的稻草秸秆

图6 稻草秸秆预处理前后 SEM 图

未处理的稻草秸秆表面平滑且紧凑,而微波辅助柠檬酸预处理后的稻草秸秆的表面明显变得粗糙且疏松,呈现出多孔隙的结构,这是由于微波辅助柠檬酸预处理使得稻草秸秆的细胞壁部分溶解,并且去除了部分的木质素,破坏了原本紧密的表面结构。这些破坏的裂缝增加了纤维素酶对再生秸秆的可及性,从而改善了其糖化效果。

3 结论

筛选出效果最好的柠檬酸结合微波辐射对稻草进行预处理。通过正交实验确定了最佳预处理条件为酸的质量分数为 20%,固液比为 1:20,微波强度 600 W 下处理 8 min,此时,酶水解 96 h 还原糖产率为 50.6%,比未处理的提高了 28.1%。并进一步对底物质量浓度、酶配比及表面活性剂的种类和质量分数等酶水解条件的优化,筛选出最优酶水解条件,即底物质量浓度为 20 mg/mL,控制添加的酶的总蛋白量为 20 mg [$m(\text{纤维素酶}):m(\beta\text{-葡萄糖苷酶}):m(\text{木聚糖酶})$ 为 1:1:2],添加 2% (W/V) 的吐温-80,此时的还原糖产率可达 58.4%,比未优化的有明显提高。选用有机酸降低了对反应设备的要求,简化了后续处理步骤,为稻草等农作物废弃物的高效预处理提供了一种环保有效的思路,具有潜在的应用价值。

参考文献

[1] Raveendran Sindhu, Mathiyazhakan Kuttiraja, Parameswaran Binod. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102:10915-10921.

[2] 朱圣东,吴元欣,喻子牛.微波预处理稻草糖化工艺研究[J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(1):112-115.

[3] 罗鹏,杨传民,赵登辉.蒸汽爆破预处理对稻草刨花板性能的影响[J]. *功能材料*, 2015, 18(46):18054-180560.

[4] 朱启,董冰,汪海峰.稻草预处理及补充桑叶对湖羊生产性能的影响[J]. *饲料研究*, 2012, 9:57-97.

[5] 王霞,王岚,陈思宇.微波辅助稻草预处理提取纤维素实验条件研究[J]. *广州化工*, 2013, 41(18):58-63.

[6] Jae-Won Lee, Carl J Houtman, Hye-Yun Kim. Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 23(102):7451-7456.

[7] Qian Li, Chen Guo, Chun-Zhao Liu. Dynamic microwave-assisted alkali pretreatment of cornstalk to enhance hydrogen production via co-culture fermentation of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum*[J]. *Science Direct*, 2014, 64:220-2229.

[8] 尹婵,魏晓奕,李积华.天然植物纤维素的改性技术及研究进展[J]. *广东化工*, 2012, 39(15):17-19.

[9] 王联结,陈建华.木质纤维素原料预处理技术[J]. *现代化工*, 2007, 27(6):66-69.

[10] 岳军,胡世洋,惠继星,等.木质纤维素材料预处理研究进展[J]. 2007, 21(2):4-9.

[11] Eulogio Castro, Manuel J Díaz, Cristóbal Cara, et al. Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102:1270-1276.

[12] 孙付保,王亮,谭玲.木质纤维素糖平台基质组成结构的分析表征技术研究进展[J]. *化工进展*, 2014, 33(4):883-895.

[13] 蒋发现,徐勇,朱均均.稀酸预处理对玉米秸秆中 4 类非木质素组分的降解规律研究[J]. *林产化学与工业*, 2015, 35(2):38-46.

[14] 任向荣,徐敏强,李伟然.蒸汽爆破生物质秸秆的工业应用[J]. *现代化工*, 2009, 29(11):89-91.

[15] 卫民,陈玉平,杨德琴.玉米秸秆稀硫酸水解研究[J]. *生物质化学工程*, 2007, 41(5):36-38.

[16] 赵志刚,程可.木质纤维素可再生生物质资源预处理技术的研究进展[J]. *现代化工*, 2006, 26(2):39-44.

[17] Qing Qing, Meizi Huang, Yucai He, et al. Dilute oxalic acid pretreatment for high total sugar recovery in pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(7):1-15.

[18] Motasemi F, Muhammad T Afzal. A review on the microwave-assisted pyrolysis technique[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 28:317-330.

[19] Chunzhao Liu, Xiyu Cheng. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment[J]. *Science Direct*, 2010, 35:8945-8952.

[20] 岳建芝,徐桂转,李刚,等.微波辐射预处理高粱秸秆对酶水解的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2011, 44(5):449-552.

[21] Qing Qing, Bin Yang, Charles E Wyman. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101:5941-5951.

[22] Sluiter A, Hames B, Ruiz R. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[J]. *National Renewable Energy Laboratory*, 2008, 23(11):334-356.

[23] 陈魏,徐龙君,陈坤.乙醇-磷酸预处理对稻草酶解糖化的影响[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(11):268-272.

[24] 刘伟,庞浩,计红.不同预处理方法对玉米秸秆吐温-80/酶水解的影响[J]. *化工进展*, 2009, 28(10):1868-1871.

[25] 张守雷,何玉财,纪俊玲,等.盐酸-乙二醇-水介质高效预处理山核桃壳及其糖化工艺[J]. *化工进展*, 2015, 34(8):3188-3193. ■