

纤维素酶酶解玉米秸秆新型蒸煮浆的工艺研究

张鹤, 佟心洁, 庞春生, 谢土均

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以玉米秸秆活性氧固体碱蒸煮浆(木素脱除率 82.1%)为原料, 用国产纤维素酶(酶活为 13.94 FPU/100 mL)进行酶解试验, 探索酶解最佳工艺条件。结果显示: 底物固液比为 0.47% (*m/V*), 酶解 pH 值为 4.70, 酶解温度为 50 °C, 酶解时间为 72 h 时酶解液还原糖含量最大, 即糖得率最大, 达 59.41%。本研究也进行玉米秸秆经不同方法预处理后的酶解实验, 结果显示其纤维素酶解效果顺序为: 活性氧固体碱蒸煮浆 > 硫酸盐浆 > 机械粉碎 > 未预处理玉米秸秆。

关键词: 玉米秸秆浆; 活性氧; 固体碱; 纤维素酶; 酶解

文章编号: 1673-9078(2012)2-182-186

Research of Enzymatic Hydrolysis of Corn Stalk Pulp with New Cooking Method

ZHANG He, TONG Xin-jie, PANG Chun-sheng, XIE Tu-jun

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The objective of this study was to explore technique of enzymatic hydrolysis of corn stalk pulp (removal rate of lignin of 82.1%) from active oxygen cooking with a solid alkali with Chinese cellulase (enzyme activity: 13.94 FPU/100ml). The results showed that the optimum process conditions were the following: enzyme-substrate ratio of 0.47% (*m/V*), pH value of 4.70, temperature of 50 °C and enzymatic reaction time of 72 h. The highest yield of sugar was 59.41% under the optimum process conditions. The paper also presented the different enzymolysis of corn stalk pretreated by different methods, and the order of the effect of enzymolysis was as follows: corn stalk pulp from active oxygen cooking with a solid base > corn stalk pulp from alkaline cooking >> corn stalk pretreated by mechanical crushing > raw corn stalk.

Key words: corn stalk pulp; active oxygen; solid alkali; cellulase; enzymatic hydrolysis.

伴随全球能源与环境问题的日益突出, 低碳经济的浪潮正在到来^[1]。在此背景下, 燃料乙醇被广泛视为替代和节约汽油的最佳燃料, 已成为世界上生产规模最大的生物质能源^[2]。以资源丰富的木质纤维素为原料生产燃料乙醇被认为是 21 世纪发展循环经济的有效途径^[3], 除生产燃料外, 木质纤维素也是制备乳酸等化学物质的资源^[4]。

我国是世界上秸秆资源最为丰富的国家之一。据统计, 我国各种农作物秸秆年产量约 7.9 亿 t, 占世界作物秸秆总产量的 20.96~30%, 可获得量为 3.9~4.2 亿 t^[5]。其中, 玉米秸秆年产量达 3.6 亿 t, 占农作物秸秆总量的 40%。我国秸秆循环再利用的途径与方法是多年来备受关注的技术一大问题。近些年, 随着作物生产水平和复种指数的提高以及农村经济状况、农民生活质量的改善, 秸秆的绝对过剩现象更加突出,

农民不再把农作物秸秆作为生活主要燃料, 造成大量的农作物秸秆被废弃在田间地头, 甚至在农田中一把火焚烧^[6], 造成严重的环境污染, 秸秆焚烧带来的环境污染、人身伤害、交通隐患、资源浪费等现象更加严重。虽然有些地方的秸秆被用来加工饲料或制备沼气^[7], 但是许多地方的秸秆仍然被弃置, 或就地点火焚烧, 浪费和污染现象十分严重。因此, 开展秸秆的高效能源转化利用已经成为亟待解决的涉及农业、能源和环境保护的重要问题, 也有利于解决农民增收问题。

在以秸秆为原料生产燃料乙醇的过程中, 需要预先将纤维素变成葡萄糖, 这有两种主要的预处理方法, 一是直接水解, 这种方法需要比较严苛的水解条件, 如使用强酸, 高温高压等, 而且水解产物复杂, 难以分离, 或发酵前需脱毒, 这就限制了它的使用; 二是先进行分离木素的预处理, 得到纤维素, 再用酶解的方法得到糖。第二种方法具有产物相对纯, 且后续生产可以使用较为温和的条件等优点。对于第二种方法, 目前最常用的是硫酸盐法和亚硫酸盐法蒸煮。这两种

收稿日期: 2011-09-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2010CB732201);

华南理工大学轻工与食品实验教学示范中心建设项目资助

作者简介: 张鹤, (1989-), 女, 本科, 研究方向糖工程

方法均使用到含硫化合物,因此生产过程会产生较严重的污染。为了解决这个问题,本研究采用一种新型的蒸煮方法“活性氧固体碱蒸煮法”对玉米秸秆进行蒸煮脱木素。这种方法的优点在于只使用了O₂和H₂O₂与难溶于水的固体碱作为蒸煮剂,没有使用含硫化合物,因此生产过程清洁,有利于环保,改善生产环境。此蒸煮方法是新开发的技术,在提供蒸煮碱性环境上有别于传统的蒸煮工艺,即传统的蒸煮工艺采用的是可溶性强碱(如NaOH),而本法采用了难溶于水的固体碱。本研究以采用这种新型蒸煮方法所得到的玉米秸秆浆为原料,探讨此浆使用国产纤维素酶的可酶解性。国产纤维素酶与进口纤维素酶相比,活性相对较低,但价格也较低。本文的研究目的就是尝试使用价格相对低的国产纤维素酶对新型玉米秸秆蒸煮浆进行酶解试验,并探索其最佳工艺条件,为实现工业化生产进行初步的研究。

纤维素酶解的主要影响因素包括温度、pH、酶用量和底物浓度等^[8]。其中,酶解温度和pH由纤维素酶的性质决定。目前,来源于木霉的纤维素酶被广泛用于木质纤维素糖化,其酶解温度一般为45~50℃,pH为4.8^[9]。

本研究采用玉米秸秆经过活性氧固体碱蒸煮所得的浆为原料,采用国产纤维素酶,考察在一定底物固液比、温度、pH值和处理时间四种因素条件下水解玉米秸秆所产可溶性糖含量,并确定了此四种因素最佳酶解条件。此外,本研究也以硫酸盐浆、经机械粉碎处理所得的玉米秸秆、未经预处理的玉米秸秆为底物,在最佳酶解条件下进行酶解反应,考察预处理方法对糖得率的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料

玉米秸秆活性氧固体碱蒸煮浆的主要组成是纤维素、半纤维素、少量木质素及其它(如灰分、抽出物)等(表1)。组分测定按相应国标方法进行。

表1 玉米秸秆浆组分含量

Table 1 Composition of corn stalk pulp

组分	含量/%
纤维素	68.96
半纤维素	12.72
木质素	7.36
其它	10.96

1.1.2 试剂

纤维素酶:上海伯奥生物科技有限公司,生化试

剂,分子量52000,规格>15 U/mg。

DNS溶液:5 g 苯酚,18.2 g 酒石酸钠钾,15 g NaOH,6.2 g 3,5-二硝基苯甲酸,5 g Na₂SO₃。

柠檬酸,天津市红岩化学试剂厂,分析纯;柠檬酸钠,成都市联合化工试剂研究所,分析纯;无水葡萄糖,上海伯奥生物科技有限公司,分析纯;乙酸乙酯,天津市大茂化学试剂厂,分析纯。

1.1.3 仪器

Fuhe SHA-BA 水浴恒温振荡器,金坛市富华仪器有限公司;紫外可见分光光度计(Agilent 8453),上海精密科学仪器厂。

1.2 玉米秸秆预处理方法

1.2.1 活性氧固体碱蒸煮浆

蒸煮条件为:固液比1:6(m/m),氧氧初始压力1.0 MPa,固体碱(金属氧化物)用量15.0%(对原料质量干基),H₂O₂用量3.0%(对原料质量干基),蒸煮温度165℃,时间2 h,所得浆的木素脱除率为82.1%。

1.2.2 硫酸盐浆

蒸煮条件为:用碱量(以NaOH计)为14.25%,Na₂S为4.25%,固液比为1:4(m/m)。保温温度165℃,保温时间2 h,所得浆的木素含量为8.44%。

1.2.3 直接机械破碎过60目。

1.3 测定方法与酶解

1.3.1 纤维素酶活性测定

采用滤纸纤维素酶活性定义及测定方法^[10]:即在37℃,pH为5.5,反应60 min条件下,每分钟降解滤纸释放1 μmol葡萄糖所需的酶量,定义为一个滤纸纤维素酶活单位,以U表示。从浓度为10 mg/mL的羧甲基纤维素钠溶液中释放还原糖所需要的酶量为一个活力单位(IU)。

1.3.2 酶解率的计算^[11]:

$$\text{糖得率}(\%) = \frac{\text{还原糖量} \times 0.9}{\text{底物量}} \times 100\%$$

1.3.3 酶解

以玉米秸秆活性氧固体碱蒸煮浆为底物,加入2 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.5 M pH=4.8),浸润原料,加入10 mL 纤维素酶(酶活13.94 FPU/100 mL),滴加5~6滴乙酸乙酯。用橡皮塞封好,并置于一定温度的控温摇床(转速为120 r/min)中反应一段时间。酶解完成后,水解液在沸水浴中加热3 min使酶灭活。从每瓶样品中各取5 mL酶解液,各加入一定量活性炭(0.02~0.03 g,脱色以测紫外分光光度值),在沸水浴中加热进行吸附,两层滤纸进行抽滤。将滤出液稀释21倍(稀释到一定范围以保证吸光度值的测定精准

度), 取 2 mL 稀释液, 加入 1.5 mL DNS 溶液。在沸水浴中加热 5 min 进行显色。冷却至室温, 用蒸馏水定容至 10 mL, 在 540 nm 条件下使用紫外分光光度计读取吸光度值。计算还原糖量: 还原糖含量 (mg/mL) = 0.2477 × 吸光度(540 nm) + 0.0428

2 结果与讨论

2.1 玉米秸秆活性氧固体碱浆的酶解

2.1.1 活性炭吸附酶解液色素对其含糖量的影响

加活性炭原因: 未加活性炭时, 由于酶解液颜色较深, 紫外分光光度计测得吸光度值大于 2, 并且各样品测得数值差别甚微, 难以得到良好的数据并对其进行分析。加入少量活性炭, 不仅酶解液色素大幅度褪去有利于测得可信度较高的吸光度值, 而且被活性炭所吸附的还原糖量很小。通过测定加入活性炭量与还原糖被吸附量的关系, 可尽可能消除活性炭所带来的实验误差。

配制 0.324 mg/mL 葡萄糖溶液, 加入不同量的活性炭, 并测定对应的活性炭吸附糖量, 如图 1。

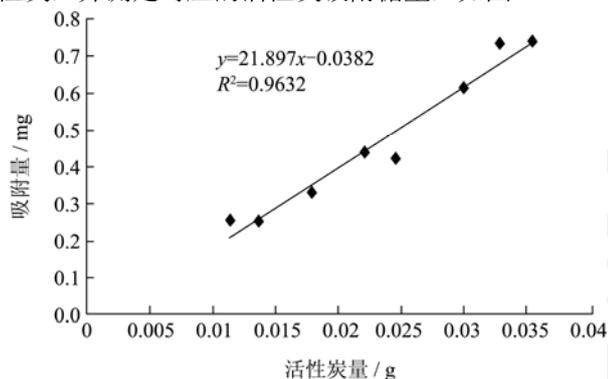


图 1 活性炭量与吸附糖量的关系

Fig.1 The relationship between activated carbon content and adsorbed reducing sugar content

$$\text{吸附糖量}(\text{mg}) = 21.897 \times \text{活性炭量}(\text{g}) - 0.0382 \quad (1)$$

$$\text{还原糖含量}(\text{mg/mL}) = 0.2477 \times \text{吸光度}(540\text{nm}) + 0.0428 \quad (2)$$

由公式(1)、(2)得:

$$\text{还原糖量}(\text{mg/mL}) = 5.2007 \times \text{吸光度}(540\text{nm}) + 4.3794 \times \text{活性炭量}(\text{g}) + 0.8929$$

由图 1 以及公式可看出活性炭加入量为 0.02~0.03 g 时, 其吸附还原糖量很少, 约为酶解所得糖量的 1%。因此活性炭的使用仍可获得较准确的数据。

2.1.2 底物浓度对糖得率的影响

FPA ≥ 27.85 IU/g 纤维素酶与湿氧化玉米秸秆, 酶用量 60 mg/g 较为合适^[12], 以此为参考, 根据配制出的 13.94 FPU/100 mL 纤维素酶, 确定较合适的底物浓度可能为 0.50% (m/V), 因此以 0.50% 为中心, 拟定出

5 组不同底物浓度作对比实验。

在酶解温度、pH 值、酶解时间不变的条件下, 固液比不同时得到的酶解液糖得率如图 2。

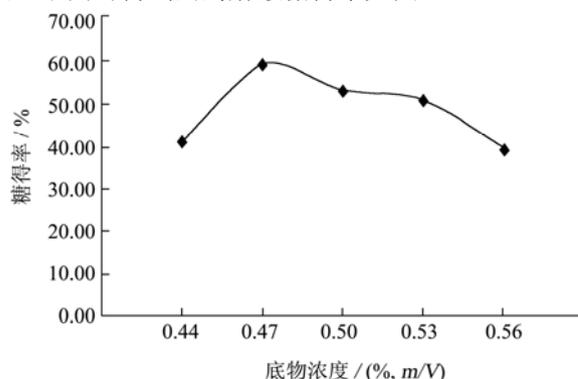


图 2 底物浓度对糖得率的影响

Fig.2 The effect of enzyme-substrate ratio having on the enzymatic saccharification yield

由图 2 可以看出, 在底物浓度较低的情况下, 随着固液比的增大, 糖得率上升, 因为酶液与秸秆粉的接触面积有所增加。然而底物浓度较高时, 随着固液比的增大, 糖得率有所降低, 这可能是因为当酶液与秸秆的接触面积达到峰值后, 由于底物的致密性, 导致多余的底物难以参与反应, 甚至会在酶解期间摇成团状, 影响糖得率。

由于纤维素是不溶于水的固相物, 所以纤维素酶对纤维素的水解反应属于固-液双相反应。液相中的酶分子首先被吸附在纤维素表面上, 酶和底物形成不稳定的复合物, 并在纤维素表面上进行酶水解反应产生还原糖^[13]。所以在一定的固液比条件下, 当酶浓度达到一定值时, 其酶水解反应速度也达到相应的最大值。

在此实验的五组样品中, 最适酶解底物浓度为 0.47% (m/V), 即酶用量为 24.89 FPU/g。

2.1.3 pH 值对糖得率的影响

在酶解温度、底物浓度、酶解时间不变的条件下, pH 值不同时得到的酶解液糖得率如图 3。

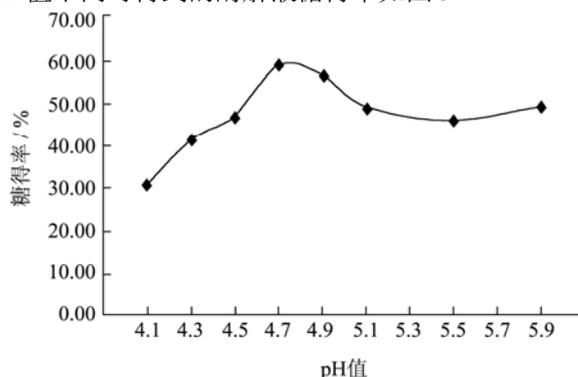


图 3 pH 值对糖得率的影响

Fig.3 The effect of pH value having on the enzymatic saccharification yield

从图3中不难看出, pH值为4.7时糖得率达最大值, 随着pH值的增大, 糖得率大幅度降低。但从pH值5.2开始, 随着pH值增大, 糖得率转而增大, 到pH为6时糖得率基本保持稳定。本实验所用纤维素酶的最适pH值为4.7。

pH值对酶催化反应的影响原因比较复杂, 目前普遍认为pH值从以下两个方面影响纤维素酶的水解能力^[14]。一是破坏酶的空间结构, 使酶变性失活; 二是pH值改变了酶、底物以及酶-底物络合物的解离状态。只有在最适pH值下, 酶与底物分子处于最佳的电离状态, 才有利于两者的结合和催化反应的进行。因此应用缓冲溶液配制酶处理液, 防止在酶处理过程中pH值发生较大变化。

2.1.4 酶解时间对糖得率的影响

在酶解温度、底物浓度、pH值不变的条件下, 酶解时间不同时得到的酶解液糖得率如图4。

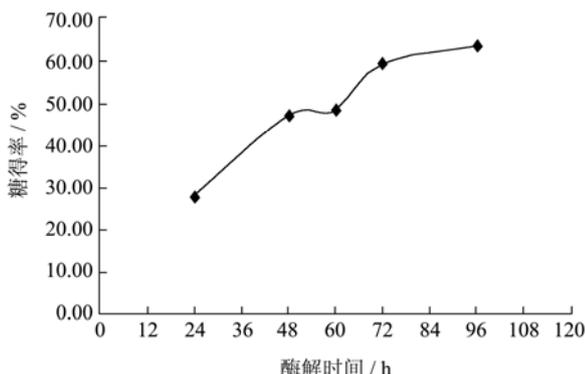


图4 酶解时间对糖得率的影响

Fig.4 The effect of the enzymatic reaction time having on the enzymatic saccharification yield

由图4可以看出, 在酶解过程中, 随着碱水解时间增加, 糖得率提高, 到100h左右糖得率提高幅度较小, 可能是因为处理时间的增加会导致纤维素水解后产生非可溶性糖类物质。综合考虑酶解过程所需外界能量消耗以及糖得率的高低, 得出结论: 72h为最适酶解时间。

2.1.5 温度对糖得率的影响

在酶解时间、底物浓度、pH值不变的条件下, 酶解温度不同时得到的酶解液糖得率如图5。

由图5可以看出, 在40℃及45℃的温度下, 糖得率较相似, 在50℃时, 水解效果显著提高。这可能是因为水解温度越高, 越利于纤维素的糖苷键断裂, 越利于水解过程的进行, 化学反应越充分。但在50℃以后, 可溶性糖产量有所下降, 这可能是因为随着水解温度不断升高, 影响纤维素糖苷键的断裂, 或由于高温使部分酶失活导致预处理过程中降解的纤维素量减少所致^[15]。

根据图5可得: 50℃为适宜的水解温度, 既可以减少能量消耗, 又能保证获得最高的糖得率。

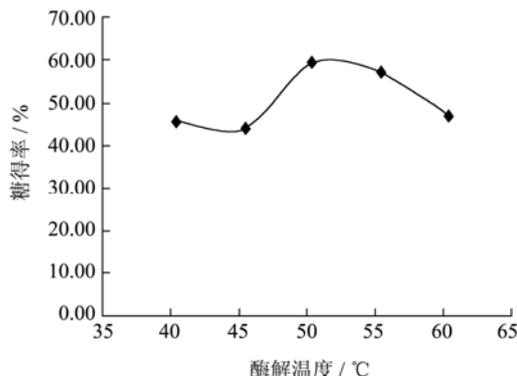


图5 酶解温度对糖得率的影响

Fig.5 The effect of temperature of enzymatic reaction having on the enzymatic saccharification yield

2.2 不同预处理玉米秸秆酶解试验

在底物浓度为0.47% (w/v), pH值为4.70, 酶解温度为50℃, 酶解时间为72h的条件下, 分别对活性氧固体碱蒸煮浆、硫酸盐浆、直接机械粉碎玉米秸秆、未预处理玉米秸秆进行酶解实验, 测定各种底物的糖得率。实验方法和测定方法与2.1相同, 测定结果如图6。

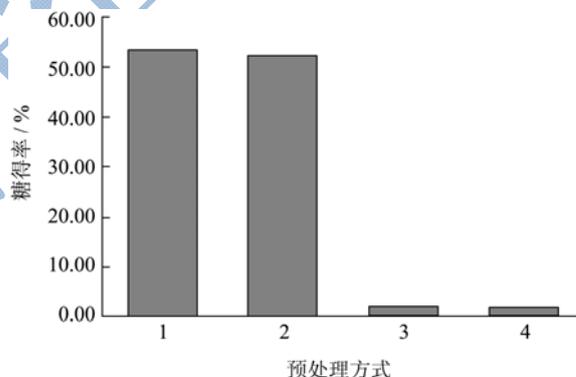


图6 预处理方法对糖得率的影响

Fig.6 The effect of the pre-processing methods of corn stalk having on enzymatic saccharification yield

注: 1-活性氧固体碱蒸煮浆; 2-硫酸盐浆; 3-机械粉碎; 4-未预处理玉米秸秆。

由图6可以看出, 经化学方法处理成浆的玉米秸秆糖得率远比机械处理以及未预处理的玉米秸秆高, 达到50%以上。活性氧固体碱蒸煮浆效果略优于硫酸盐浆。机械粉碎处理有助于酶解, 但效果较差。

活性氧固体碱蒸煮浆在与硫酸盐浆有相似的酶解性能外, 生产过程清洁, 属环境友好型蒸煮浆, 其不含有水溶解强碱, 不含硫化物。

3 结论

3.1 用不同方法预处理玉米秸秆,其纤维素酶解效果顺序为:活性氧固体碱蒸煮浆>硫酸盐浆>机械粉碎>未预处理玉米秸秆,新型的蒸煮方法在此实验条件下具有更优的可酶解性。

3.2 以温度、pH 值、水解时间、固液比为参数进行玉米秸秆纤维素酶解最佳条件探究,在酶用量 24.89 FPU/g 时,得出纤维素酶解玉米秸秆活性氧固体碱蒸煮浆的最佳条件:固液比为 0.47% (m/V), pH 值为 4.70,水解温度为 50 ℃,水解时间为 72 h。在此条件下,玉米秸秆能得到充分酶解,酶解液可溶性糖产量最高,即糖得率最高,达 59.41%。并且在此条件下能有效地节约能源,减少副产物的产生。

3.3 在相同底物和酶浓度下,采用较低温度和延长酶解时间,可获得较高糖度和提高糖得率;在一定的酶浓度下提高底物浓度,虽然酶解速度减慢,但糖度较高,延长酶解时间可获得较高糖得率。但是,由于纤维素酶对纤维素的水解反应属于固-液双相反应,酶和底物需形成不稳定的复合物来进行酶水解反应,因此过高的底物浓度会因抑制复合物的合成而导致糖得率降低。

3.4 就中国目前酶工业发展来看,短期几年内纤维素酶活无法大幅度提升,而进口纤维素酶造价高,性价比比较低。本次实验运用新型的蒸煮方法得到浆料,并采用国产纤维素酶进行酶解,力求利用造价相对低廉的国产纤维素酶来达到性价高的酶解效果。实验结果表明,酶活为 13.94 FPU/mL,酶用量 24.89 FPU/g,在优化后的酶解条件下,糖得率可达 59.41%。因此,利用国产纤维素酶对玉米秸秆新型蒸煮浆进行酶解,对新能源生产的探索具有重要意义。

参考文献

- [1] 张愉,陈徐梅,张跃军.低碳经济是实现科学发展观的必由之路[J].中国能源,2008,(7):21-23
- [2] 宋安东.生物质(秸秆)纤维燃料乙醇生产工艺试验研究[D].郑州:河南农业大学,2003
- [3] 吴创之,马隆龙.生物质能现代化利用技术[M].北京:化学工业出版社,2003
- [4] 邹水洋,郭祀远,肖凯军.生物转化木质纤维素原料生产乳酸的研究进展[J].现代食品科技,2008,24(4):394-400
- [5] 叶小梅,常志州.有机固体废物干法厌氧发酵技术研究综述[J].生态与农村环境学报.2008,1(3):24-27
- [6] 杨兴,张起凯,李萍.玉米秸秆预处理技术及资源化研究进展[J].辽宁农业科学.2009.6(4):28-31
- [7] 朱圣权,张衍林,张文倩等.厌氧干发酵技术研究进展[J].可再生能源,2009,2(3):27-31
- [8] David J G, John N S. Factors Affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 51: 375-383
- [9] Martin C, Thomsen A B. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007, 82: 174-181
- [10] GB/T 23881-2009,中华人民共和国国家标准[S].
- [11] 詹小明,夏黎明.纤维素酶在玉米芯上的吸附及其水解作用[J].林产化学与工业,2005,25(3):76-80
- [12] 刘娇,宋公明,马丽娟等.不同预处理方法对玉米秸秆水解糖化效果的影响[J].饲料工业,2008,29(1):31-32
- [13] 志水一允.用微生物和酶进行生物量的转化[J].应用微生物,1987,1:25
- [14] Miettinen-Oinonen, Heikinheimo A, Buchert L, et al. The role of trichoderma reesei cellulases in cotton finishing [J]. The Magazine of the Textile Dyeing Printing & Finishing Industry, 2001, 1(1): 33-35
- [15] 余兴莲,王丽,徐伟民.纤维素酶降解纤维素机理的研究进展[J].宁波大学学报,2007,1(20):79-82