

## 不同预处理方法对棉秆酶水解的影响

齐临冬<sup>1</sup>, 王高升<sup>1,2</sup>, 于孟辉<sup>1</sup>, 普春刚<sup>1</sup>

(1. 天津市制浆造纸重点实验室, 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457;

2. 制浆造纸工程国家重点实验室, 华南理工大学, 广州 510640)

**摘要:** 研究稀硫酸法、亚硫酸法、亚硫酸盐法预处理的化学药品添加量对棉秆酶水解的影响, 对预处理前后的棉秆进行扫描电镜观察, 并对3种方法进行了比较. 在固液比1:4、温度180℃、保温20min的预处理条件下, 纤维素酶用量(相对于绝干底物)10 U/g、纤维二糖酶用量(相对于绝干底物)3.6 U/g的酶水解条件下, 稀硫酸法预处理在98%浓硫酸添加量为5.52%时, 棉秆的酶水解转化率为42.63%; 亚硫酸法预处理在亚硫酸添加量7%时, 棉秆的酶水解转化率为81.25%; 亚硫酸盐法预处理在98%浓硫酸添加量0.92%、亚硫酸氢钠添加量为8%时, 棉秆的酶水解转化率为70.06%.

**关键词:** 棉秆; 酶水解; 预处理

中图分类号: TQ35

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)05-0027-05

## Effects of Different Pretreatment Methods on Enzymatic Hydrolysis of Cotton Stalk

QI Lin-dong<sup>1</sup>, WANG Gao-sheng<sup>1,2</sup>, YU Meng-hui<sup>1</sup>, PU Chun-gang<sup>1</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Pulp and Paper, College of Material Science and Chemical Engineering,

Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Effect of the chemicals dosage of dilute sulfuric acid, sulfurous acid and sulfite pretreatment and enzymatic hydrolysis of cotton stalk was investigated. The scanning electron microscopic (SEM) analysis of untreated and treated cotton stalk was performed for comparing these methods. Under conditions of liquid ratio 1:4, temperature 180℃ for 20 min, cellulase 10 U/g, cellobiase 3.6 U/g compared to substrate, enzymatic hydrolysis conversion rate was 42.63% when 5.52% sulfuric acid with mass fraction of 98% for pretreating cotton stalk, enzymatic hydrolysis conversion rate was 81.25% when 7% sulfurous acid for pretreating cotton stalk, and enzymatic hydrolysis conversion rate was 70.06% when 0.92% sulfuric acid with mass fraction of 98% and 8% sodium bisulfite for pretreating cotton stalk.

**Keywords:** cotton stalk; enzymatic hydrolysis; pretreatment method

目前, 燃料乙醇作为解决能源危机的有效途径, 已成为国内外研究的热点<sup>[1-4]</sup>. 利用木质纤维素生产燃料乙醇不需要消耗粮食, 而且来源广泛, 若能够产业化发展将能够部分代替石油燃料. 我国是农业大国, 农作物秸秆数量大、种类多、分布广, 但大多直接用作生活燃料, 或作为肥料直接还田, 废弃或露天焚烧的秸秆也占一大部分. 农作物秸秆中纤维素约占其干质量的35%~45%, 半纤维素约占20%~40%, 采

用适宜的技术将它们水解成可发酵的糖, 进一步将糖化液发酵成燃料乙醇, 对开发新能源、保护环境具有重要的意义<sup>[5]</sup>.

预处理是棉秆等木质纤维素生物转化为乙醇的关键步骤之一, 未经预处理的木质纤维素酶水解的效率很低. 研究木质纤维素预处理的方法很多, 如蒸汽爆破法、稀酸法、有机溶剂法、氨气爆破法等<sup>[6-8]</sup>. 但是, 针对棉秆预处理的研究<sup>[9-11]</sup>较少, 并且, 这些方法

收稿日期: 2011-02-28; 修回日期: 2011-03-10

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金资助项目(20080522); 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室开放基金资助项目(200924)

作者简介: 齐临冬(1985—), 男, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 王高升, 教授, gswang@tust.edu.cn.

对酶水解效率的提高较低,大部分糖类物质未能经酶水解溶出.亚硫酸盐法预处理是从亚硫酸盐制浆中得到启示而发展起来的一种方法,主要利用亚硫酸盐对木质纤维原料进行预处理,以克服木质纤维原料对酶的抗性.研究<sup>[12-16]</sup>表明,该法对云杉、红松、桉木和杨木等木材生物质原料以及玉米秸秆和麦草等农业剩余物有很好的适应性,促进酶水解,转化率可以达到90%以上.本文主要研究了稀硫酸法、亚硫酸法与亚硫酸盐法中预处理的药品添加量对提高棉秆酶水解效果的影响,并分析了酶水解效果提高的原因,对比3种预处理方法的优缺点,为进一步的研究奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

棉秆取自天津塘沽,风干后切成2~3 cm的小段备用.其中含水率为8.5%,葡聚糖质量分数34.29%,戊聚糖质量分数10.95%,木素质量分数25.90%.

实验用的纤维素酶和纤维二糖酶,酶活力分别为70 U/g(滤纸酶活)和250 U/g,均由诺维信(中国)生物技术有限公司提供.

其他化学药品,如浓硫酸(质量分数98%)、亚硫酸、亚硫酸氢钠、无水乙酸钠、冰醋酸、葡萄糖、D-木糖、盐酸、无水乙醇、间苯三酚和盐酸四环素等均为分析纯.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 相关测定

水分按照GB/T 2677.2—1993《造纸原料水分的测定》进行测定;木素含量按照GB/T 2677.8—1994《造纸原料酸不溶木素含量的测定》与GB/T 10337—2008《造纸原料和纸浆中酸溶木素的测定》进行测定;采用山东省科学院生物研究所生产的SBA-40D型生物传感分析仪测定葡萄糖含量;戊聚糖含量的测定参见文献[17];底物与原料中葡聚糖与戊聚糖含量的测定参见文献[18].

#### 1.2.2 预处理

称取100 g绝干质量的棉秆,加入预处理溶液,充分混匀后,在预定温度、时间、固液比(绝干原料质量(kg)与预处理总液量体积(L)之比)等条件下进行预处理.预处理完毕,将固相与液相物质分离,液相离心后收集在试剂瓶中用于后续的研究分析;固相物(底物)经高浓磨浆机(盘磨间隙0.2 mm)机械处理、

洗净并甩干后,贮于密封袋中,在4℃下冷藏用于后续的酶水解实验.

文中所述的化学药品添加量均为化学药品质量与绝干原料质量之比.

#### 1.2.3 酶水解

称取2 g绝干底物,加入50 mL pH为4.8的乙酸-乙酸钠溶液,纤维素酶加入量为10 U/g,纤维二糖酶加入量为3.6 U/g,并加入0.4 mL质量浓度为10 g/L的盐酸四环素溶液,补加水至100 mL.酶水解温度为50℃、摇床转速200 r/min,水解72 h,分别在1、3、6、12、24、48、72 h时取样,每次取上清液400 μL于离心管中,用微量高速离心机在 $1.6 \times 10^4$  r/min的转速下离心10 min后,取离心管中上清液用于测定葡萄糖含量.

#### 1.2.4 扫描电镜

将固相物质风干后进行喷金处理,然后使用JSM-6380LV扫描电子显微镜进行观察.

## 2 结果与讨论

### 2.1 药品添加量对酶水解效果的影响

#### 2.1.1 稀硫酸法预处理浓硫酸添加量的影响

稀硫酸法预处理是目前研究较为广泛的方法之一,能够使半纤维素水解成单糖进入液相,纤维素的平均聚合度降低,原料的比表面积增大,水解效率提高.稀硫酸法预处理中木质纤维素原料的质量损失主要来自半纤维的降解,半纤维水解后使木质纤维原料表面变得多孔,有利于增大纤维素与纤维素酶的接触面积,但是包裹纤维素的主要聚合物木素在酸处理过程中不能有效脱除,原料结构仍然较为紧密,导致该方法原料适应性差.

对棉秆进行稀硫酸法预处理,处理条件为:固液比1:4、温度180℃、保温时间20 min,质量分数98%浓硫酸添加量0%、1.84%、3.68%、5.52%、7.36%、9.20%.探讨硫酸添加量对预处理效果的影响,结果如图1所示.由图1可知,随着硫酸添加量的增加,底物的酶水解转化率呈上升趋势,在添加量为5.52%时,酶水解转化率达到42.63%,比空白样提高了10.04%,继续增加硫酸添加量对底物酶水解转化率的提高不明显.为了进一步对酶水解效果进行分析,考察了预处理后木素与半纤维(以戊聚糖为代表)的溶出情况.可以看出,硫酸添加量对木素溶出率的影响较小,当添加量从0%增加到9.20%时,木素溶出率仅

从 7.52% 提高到 12.23%; 而戊聚糖溶出效果较好, 随硫酸添加量的增加一直呈上升趋势, 在硫酸添加量为 9.20% 时达到 89.41%, 大部分的半纤维素在预处理过程中溶解出来. 为了得到较好的预处理效果, 同时考虑成本等因素, 确定硫酸最佳添加量为 5.52%.

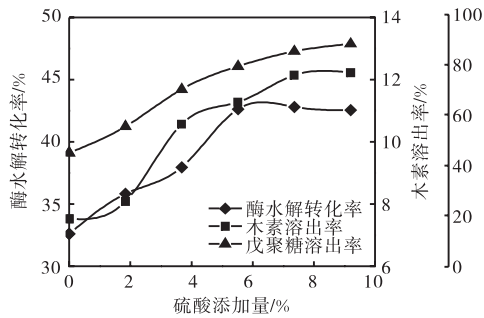


图 1 硫酸添加量对预处理效果的影响

Fig.1 Effect of sulfuric acid dosage on pretreatment

2.1.2 亚硫酸法预处理亚硫酸添加量的影响

亚硫酸可以提供酸性条件降解半纤维素, 而且含有亚硫酸氢根离子, 能够与木素发生磺化反应而溶出木素, 因此对亚硫酸法预处理的研究很有意义. 预处理的条件为: 固液比 1 : 4, 温度 180 °C, 保温时间 20 min; 酶水解条件为: 纤维素酶添加量 10 U/g, 纤维二糖酶添加量 3.6 U/g; 纯亚硫酸添加量分别为: 0%、1%、3%、5%、7%、9%. 探讨亚硫酸添加量对预处理效果的影响, 结果如图 2 所示.

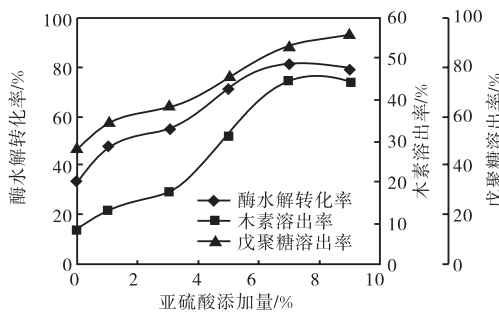


图 2 亚硫酸添加量对预处理效果的影响

Fig.2 Effect of sulfurous acid dosage on pretreatment

由图 2 可知, 随着亚硫酸添加量的增加, 棉秆酶水解转化率呈上升趋势, 在添加量为 7% 时达到 81.25%, 比空白样升高很多, 增加亚硫酸添加量至 9% 时无明显变化. 继续考察亚硫酸添加量对木素与半纤维素的溶出效果, 可以看出, 戊聚糖溶出率随着亚硫酸添加量的增加而升高, 在亚硫酸添加量为 9% 时达到最高值 93.40%. 木素溶出率与戊聚糖溶出率变化趋势相似, 但是在添加量为 7% 时就达到较高

值, 此时的木素溶出率为 44.67%, 亚硫酸添加量继续增加对木素溶出率影响较小; 这可能是由于木素的反应特性所导致的, 木素的磺化反应与缩合反应发生在同一位置, 缩合后的木素不能再反应溶出, 所以继续提高亚硫酸的添加量, 木素溶出率不再上升. 综合考虑, 确定亚硫酸最佳添加量为 7%.

2.1.3 亚硫酸盐法预处理亚硫酸氢钠添加量的影响

亚硫酸盐在酸性条件下游离出的亚硫酸氢根离子能够与木质纤维原料中的木素发生反应, 半纤维素在酸性条件下也在一定程度上发生降解, 破坏纤维结构, 增大原料的比表面积, 提高了酶的可及性.

亚硫酸盐法预处理的条件为: 固液比 1 : 4, 温度 180 °C, 保温时间 20 min; 酶水解条件为: 纤维素酶添加量 10 U/g, 纤维二糖酶添加量 3.6 U/g; 质量分数 98% 浓硫酸添加量为 0.92%, 以提供适当的酸性条件; 亚硫酸氢钠的添加量为: 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%. 探讨亚硫酸氢钠添加量对预处理效果的影响, 结果如图 3 所示.

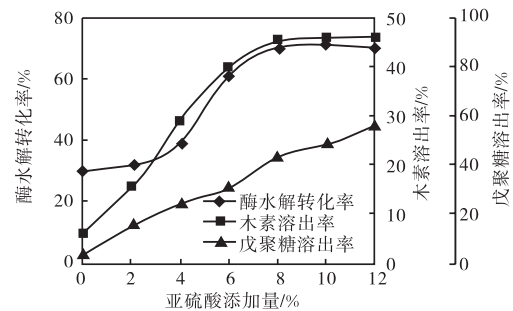


图 3 亚硫酸氢钠添加量对预处理效果的影响

Fig.3 Effect of sodium bisulfite dosage on pretreatment

由图 3 可知, 随着亚硫酸氢钠添加量的增加, 底物的酶水解转化率呈上升趋势, 在亚硫酸氢钠添加量为 8% 时, 酶水解转化率达到 70.06%, 继续增加添加量对酶水解转化率的影响不大. 木素溶出率与酶水解转化率的变化趋势相似, 开始时随着亚硫酸氢钠添加量的增加而上升, 在添加量为 8% 达到 45.31%, 随着亚硫酸氢钠添加量的继续增加变化较小, 这可能也是与木素的缩合有关. 而戊聚糖溶出率则随着亚硫酸氢钠添加量的增加始终呈上升的趋势, 在添加量为 12% 时达到最高值 59.16%. 综合考虑, 确定在 98% 浓硫酸添加量为 0.92% 的条件下, 亚硫酸氢钠最佳添加量为 8%.

2.2 不同预处理方法的效果比较

对不同预处理方法的效果进行比较, 结果见表

1. 稀硫酸法预处理的效果最差, 酶水解转化率最低. 这可能是因为: 虽然稀硫酸法预处理过程中半纤维素大部分发生了降解, 溶解出较多的戊聚糖, 但是由于没有磺化反应的进行, 对木素的溶解作用较差, 木素的溶出较少. 亚硫酸法预处理的酶水解转化率在3种方法中是最高的, 这可能是因为亚硫酸法预处理能够有效地脱除木素, 并降解半纤维素. 由表1可知, 亚硫酸法预处理的木素溶出率与亚硫酸盐法预处理相差不多, 但是戊聚糖的溶出较多, 这说明有更多的半纤维素发生降解. 亚硫酸盐法预处理的酶水解效果比亚硫酸法预处理稍差. 通过比较可知, 亚硫酸法预处理的酶水解效果最好, 亚硫酸盐法预处理效果稍差. 但是从表中也可看到, 亚硫酸法预处理液的pH比亚硫酸盐法预处理低很多, 因此对设备的腐蚀性就会更高, 要求防腐性更好的预处理设备, 导致成本的增加. 而且, 亚硫酸在使用过程中会释放出有刺激性的有毒气体  $SO_2$ , 对人员安全防护的要求也会更高, 因此, 相对而言亚硫酸盐法预处理更适合实际生产.

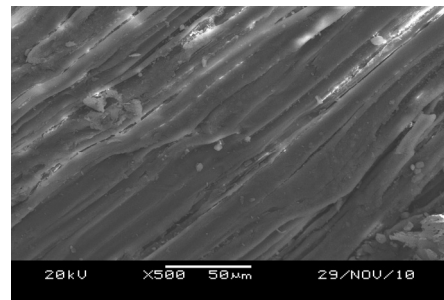
表1 不同预处理方法的效果比较

Tab.1 Comparison of the effect of different pretreatment methods

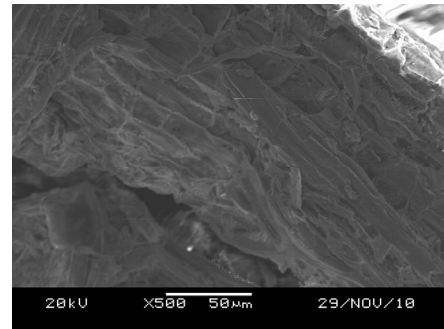
预处理方法	酶水解转化率/%	木素溶出率/%	戊聚糖溶出率/%	预处理液pH
稀硫酸法	42.63	11.28	80.36	1.22
亚硫酸法	81.25	44.67	88.07	1.43
亚硫酸盐法	70.06	45.31	55.77	2.65

### 2.3 预处理后底物的扫描电镜分析

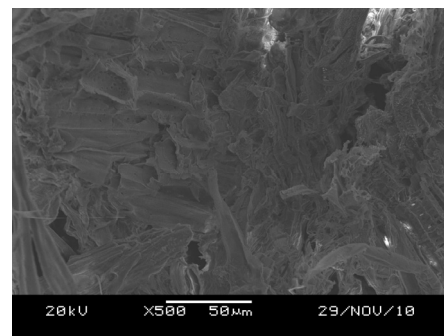
未经处理、稀硫酸预处理、亚硫酸预处理与亚硫酸盐预处理棉秆的扫描电镜结果见图4. 从图中可以看出, 未经处理的棉秆原料纤维排列结构紧密, 植物组织排列均匀整齐, 空隙少而且小, 其致密的结构可能是阻碍纤维素酶作用于纤维素的主要原因之一. 在预处理过程中原料受到化学和机械的双重作用, 其结构均发生了不同程度的破解, 使纤维成为碎片, 半纤维素与木质素溶解出来, 纤维细胞表面产生了许多小的孔洞, 提高了酶的可及度, 有利于水解作用. 对比硫酸预处理、亚硫酸预处理、亚硫酸盐预处理后棉秆底物的扫描电镜照片可以看出, 亚硫酸盐预处理与亚硫酸预处理后纤维碎片较小, 而硫酸预处理后的棉秆仍比较大, 这可能是因为木素没有有效地溶出, 仍作为纤维间的黏合剂在发生作用, 导致其酶水解效果较差.



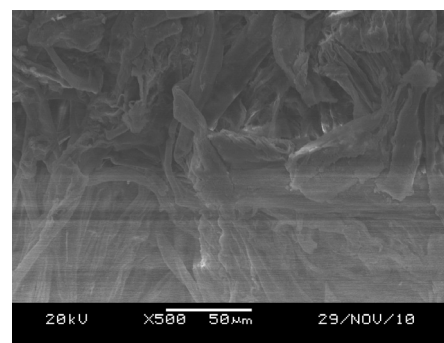
(a) 未经处理



(b) 稀硫酸预处理



(c) 亚硫酸预处理



(d) 亚硫酸盐预处理

图4 棉秆预处理前后的扫描电镜照片

Fig.4 SEM images of cotton stalk before and after pretreatment

## 3 结论

(1) 在固液比 1 : 4、温度 180 °C、保温 20 min 的

预处理条件及纤维素酶用量 10 U/g、纤维二糖酶用量 3.6 U/g 的酶水解条件下,稀硫酸法预处理棉秆,98%浓硫酸添加量为 5.52%时酶水解转化率达到较高值 42.63%;亚硫酸法预处理棉秆,亚硫酸添加量为 7%时酶水解转化率达到较高值 81.25%;亚硫酸盐法预处理棉秆,98%浓硫酸添加量 0.92%、亚硫酸氢钠添加量为 8%时,酶水解转化率达到较高值 70.06%。

(2)3 种预处理方法均可提高棉秆的酶水解转化率,但是稀硫酸法预处理对棉秆的处理效果较差;亚硫酸法预处理虽然效果较好,但预处理液的 pH 低,对设备的腐蚀性高。相对而言,亚硫酸盐法预处理更适合实际生产。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Jørgensen H, Kristensen J B, Felby C, et al. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2007, 1 (2) : 119–134.
- [ 2 ] 宋安东, 裴广庆, 王风芹, 等. 中国燃料乙醇生产用原料的多元化探索 [J]. *农业工程学报*, 2008, 24 (3) : 302–307.
- [ 3 ] 田宜水. 我国农业生物质能发展战略思考 [J]. *中国能源*, 2006, 28 (9) : 16–18.
- [ 4 ] 李静, 杨红霞, 杨勇, 等. 微波强化酸预处理玉米秸秆乙醇化工艺研究 [J]. *农业工程学报*, 2007, 23 (6) : 199–202.
- [ 5 ] 刘娜, 石淑兰. 木质纤维素转化为燃料乙醇的研究进展 [J]. *现代化工*, 2005, 25 (3) : 19–22.
- [ 6 ] 文新亚, 李燕松, 张志鹏, 等. 酶解木质纤维素的预处理技术研究进展 [J]. *酿酒科技*, 2006 (8) : 97–100.
- [ 7 ] 罗鹏, 刘忠. 用木质纤维原料生产乙醇的预处理工艺 [J]. *酿酒科技*, 2005 (8) : 43–47.
- [ 8 ] Yang B, Wyman C E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2 (1) : 26–40.
- [ 9 ] Silverstein R A, Chen Y, Sharma-Shivappa R R, et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98 (16) : 3000–3011.
- [ 10 ] 邓辉, 李春, 李飞, 等. 棉花秸秆糖化碱预处理条件优化 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25 (1) : 208–212.
- [ 11 ] 邓辉. 基于棉花秸秆的微生物合成乙醇研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2007.
- [ 12 ] Zhu J Y, Pan X J, Wang G S, et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (8) : 2411–2418.
- [ 13 ] Wang G S, Pan X J, Zhu J Y, et al. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods [J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25 (4) : 1086–1093.
- [ 14 ] Wang G S, Pan X J, Zhu J Y, et al. SPORL pretreatment technique for biorefining biomass: US, 20090298149 [P]. 2009–04–17.
- [ 15 ] 刘云云, 王高升, 普春刚, 等. 亚硫酸氢盐预处理对玉米秸秆酶水解的影响 [J]. *林产化学与工业*, 2010, 30 (4) : 73–77.
- [ 16 ] 杨甲一, 王高升, 许杰. 亚硫酸盐预处理对麦草组分分离和糖化的影响 [J]. *中华纸业*, 2010, 31 (14) : 15–20.
- [ 17 ] 于建仁, 张曾, 迟聪聪. 桉木半纤维素预提取液中戊聚糖快速测定方法 [J]. *中国造纸*, 2007, 26 (11) : 10–13.
- [ 18 ] 石淑兰, 何福望. 制浆造纸分析与检测 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.