

文章编号:1673-1689(2010)01-0018-05

# 木质素与半纤维素对稻草秸秆酶解的影响

孙万里<sup>1,2</sup>, 陶文沂<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江西省宜春学院 化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

**摘要:** 分别采用稀酸和酸碱顺序两种方法处理稻草秸秆, 20 FPU/g (底物干重) 的纤维素酶、底物质量浓度为 80 g/L, 45 °C 酶解 72 h。结果表明, 木质素与半纤维素对纤维素转化为葡萄糖都有较大影响, 稀酸处理的秸秆酶解纤维素转化率 (43.4%, 葡萄糖质量浓度 24.1 g/L) 是未处理秸秆 (16.8%, 葡萄糖质量浓度 6.2 g/L) 的 2.6 倍, 而酸碱顺序处理的秸秆 (60.6%, 葡萄糖质量浓度 47.7 g/L) 则是未处理秸秆的 3.6 倍。采用上述两种方法处理秸秆后, 秸秆木质素和半纤维素被移去, 秸秆结构发生改变, 从而秸秆纤维更易受纤维素酶的攻击, 并且秸秆木质素和半纤维素质量分数越低, 纤维素的酶解得率就越高。

**关键词:** 预处理; 水解; 稻草秸秆; 纤维素; 半纤维素; 木质素

**中图分类号:** TQ 35

**文献标识码:** A

## Effect of Lignin and Hemicellulose on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Rice Straw

SUN Wan-li<sup>1,2</sup>, TAO Wei-yi<sup>\*1</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

**Abstract:** In this manuscript, the enzymatic hydrolysis of rice straw in three different forms: original (untreated), pretreated by dilute acid, and pretreated by a sequence of dilute acid and dilute alkali, were studied. The hydrolysis was carried out in an enzyme/substrate ratio of 20 FPU/g, 8% (w/v) substrate concentration, 45 °C for 72 h. The digestibility results suggested that the cellulose hydrolysis was greatly affected by the presence of hemicellulose and/or lignin in the rice straw. The cellulose conversion ratio 43.4% from dilute acid-treated rice straw was 2.6 times higher than that 16.8% from untreated rice straw, whereas from dilute acid and alkali rice straw such value was higher 3.6 times (60.6%). This result was probably due to the fact that the strong modification in the material structure caused by the hemicellulose and lignin removal from the rice straw. As a consequence, the cellulose fibers were separated being more susceptible to the enzymatic attack. It was concluded that the lower the hemicellulose and lignin in the rice straw, the higher efficiency of cellulose hydrolysis could be achieved at.

收稿日期: 2009-05-09

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目 (2008BAI63B06)。

作者简介: 孙万里 (1967-), 男, 江西修水人, 发酵工程博士研究生。

\*通讯作者: 陶文沂 (1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物工程和生物制药方面的研究。Email: wyttao1946@163.com

**Key words :** pretreatment ,enzymatic hydrolysis ,rice straw ,cellulose ,hemicellulose ,lignin

木质纤维原料在生物炼制成清洁燃料或化学品的过程中,由于原料中纤维素、半纤维素和木质素致密复杂的结构,纤维素很难被酶水解成可发酵性糖,木质纤维原料在酶解成可发酵性糖前必须进行预处理以脱去木质素或在一定程度上改变原料的物理化学结构,如降低结晶度、减小聚合度、增加孔隙度和表面积等,以促进酶与底物相互接触并反应,提高酶解速率和葡萄糖得率<sup>[1-2]</sup>。稀酸预处理是木质纤维材料最常用的方法之一,可去除木质纤维材料的半纤维素并增加纤维素酶对木质纤维的接触面积<sup>[3-4]</sup>;碱处理对连接半纤维素和其它组分的分子间酯键起到皂化作用,能胀润木质纤维材料,有效地去除木质素,进而提高纤维素转化率<sup>[5-6]</sup>。

作者采用稀酸和酸碱顺序两种方法处理稻草秸秆,然后进行酶解,以考察木质素和半纤维素对稻草秸秆酶解的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

稻草秸秆:取自江苏无锡,粉碎,过 16 目筛,水洗,65 ℃ 烘至恒重,室温贮存备用。纤维素酶,江苏无锡杰仁公司;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 秸秆预处理

**1.2.1 稀酸处理** 取粉碎后的秸秆 100 g,按液固比 10 : 1 的比例加入质量浓度为 15 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,搅拌均匀,于 121 ℃ 处理 1 h。抽滤,收集滤液,残渣水洗至中性,65 ℃ 烘至恒重,称重备用。

**1.2.2 酸碱顺序处理** 稀酸处理同上,取稀酸处理过秸秆 100 g,按液固比 8 : 1 的比例加入质量浓度为 20 g/L NaOH 搅拌均匀,于 121 ℃ 处理 30 min。残渣水洗至中性,65 ℃ 烘至恒重,称重备用。

### 1.3 秸秆纤维组分的测定

纤维素用硝酸乙醇法测定;木质素用 72 % 硫酸法测定;半纤维素用双溴法测定<sup>[7]</sup>。

### 1.4 纤维素酶的测定

量取酶液 0.5 mL,加入 1.5 mL 浓度为 0.05 mol/L、pH 4.8 的柠檬酸缓冲液和 50 mg 定量滤纸条,于 50 ℃ 水浴准确保温 30 min,然后加入 1.5 mL 的 DNS,煮沸 5 min,冷却后用蒸馏水定容到 20 mL,在波长 540 nm 处测定所得还原糖质量浓度<sup>[8]</sup>。一个滤纸酶活力国际单位等于酶促反应中

每分钟生成 1 μmol 葡萄糖(以还原糖表示)所需的酶量。

### 1.5 酶水解反应

称取 4.0 g 处理过的底物,加入 0.05 mol/L、pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,使底物质量浓度为 80 g/L。纤维素酶 20 FPU/g 底物(干重),NOVO ZYME 188 -葡萄糖酶 12 CBIU/g 底物,于 45 ℃ 水浴振荡器内反应 72 h,定时取样,过滤,滤液经适当稀释后进行还原糖与单糖分析。

### 1.6 水解液单糖测定

样品液于 10 000 r/min 条件下高速离心 10 min,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样测定,外标法定量。色谱条件为:高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司 Agilent 1100 Series;示差折光检测器,美国 HP 公司 RI Detecotor HP1047A;分析柱,kromasil NH<sub>2</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 氨基柱,柱温 30 ℃,流动相:V<sub>乙醇</sub> : V<sub>水</sub> = 80 : 20,流速 1 mL/min,进样量 10 μL。

### 1.7 纤维素转化率

纤维素转化率 (%) =  $\frac{\text{葡萄糖质量浓度}}{\text{纤维素质量浓度}} \times 100\% \times 0.9$

## 2 结果与分析

### 2.1 稻草秸秆处理前后组成的变化

稻草秸秆经过酸碱处理后成分变化见表 1。秸秆在质量浓度为 15 g/L 稀硫酸 121 ℃ 处理 1 h 后,纤维素质量分数从 41.5 % 上升到 62.5 %;在此基础上再经过质量浓度 20 g/L 氢氧化钠 121 ℃ 处理 30 min 后,纤维素质量分数达到 88.5 %,但从表中也可看到,酸碱顺序处理纤维素的质量损失也较大,达 11.32 g(相当于原料初质量的 1/4 多)。与此同时秸秆原料中的纤维素与半纤维素大部分都被去除。

### 2.2 稻草秸秆的酶水解

图 1 表示稻草秸秆在经过酸碱处理后的酶水解过程,从表 1,图 1 可看出,稻草秸秆在经过稀酸和稀碱顺序处理后,木质素与半纤维素质量分数都很低,酶解后葡萄糖质量浓度最高,为 47.7 g/L。与此相对应,未处理秸秆酶解后葡萄糖质量浓度很低。这些结果表明,秸秆原料的化学组成——木质素和半纤维素对纤维素酶解起到一定的阻碍作用。从稀酸处理的结果可以看出,尽管在稀酸处理后木质素质量分数增加,但半纤维素的脱除有助于纤维

表 1 未处理秸秆,稀酸处理和酸碱顺序处理后秸秆化学组成

Tab. 1 Chemical composition of rice straw in the original form (untreated), after the dilute acid pretreatment and after a sequence of dilute acid and dilute alkali pretreatment

成份	未处理组成/ (g/100 g)	酸处理回收量/ g	酸处理损失 质量分数/ %	酸处理后 组成/ (g/100 g)	碱处理后 回收量/ g	碱处理 损失质量 分数/ %	酸碱顺序 处理 总损失/ g	酸碱顺序 处理后组成/ (g/100 g)
纤维素	41.5	38.81(0.34)	6.5	62.5	30.18(0.55)	22.2	11.32	88.5
半纤维素	18	4.47(0.03)	75.2	7.2	0.48(0.07)	89.3	17.52	1.4
木质素	17.7	15.9(0.13)	10.2	25.6	1.53(0.02)	90.4	16.17	4.5
其它	22.8	2.92(0.1)	87.2	4.7	1.91(0.1)	34.6	20.89	5.6
总重	100	62.1	37.9	100	34.1	45.1	65.9	100

纤维物料的质量损失以物料的干重计; 酸处理回收量按酸处理后的总重乘以各自的组成得出; 碱处理回收量按碱处理后的总重乘以各自的组成得出。

素酶对底物纤维素的接触从而有助于纤维素的水解<sup>[4]</sup>, 葡萄糖质量浓度和纤维素的转化率都比未处理的秸秆要高。在酸处理后接着进行碱处理, 半纤维素与木质素大部分被去除, 葡萄糖质量浓度与纤维素转化率比稀酸处理高, 葡萄糖最高质量浓度为 47.7 g/L, 纤维素转化率为 60.6%, 它们分别是稀酸处理秸秆葡萄糖质量浓度的 2 倍和纤维素转化率的 1.4 倍, 是未处理秸秆的 7.7 倍和 3.6 倍。从这些结果可看出, 稻草秸秆半纤维素与木质素质量分数越低, 越有利于酶解。Mansfield 等认为木质纤维材料对微生物酶攻击有一定的抗性, 但在去除木质素和半纤维素后, 其纤维结构发生变化、表面积变大, 增加了酶的接触面积和可及性<sup>[9]</sup>, 因此在去除木质素和半纤维素之前, 木质纤维酶解效率很低。对其它木质纤维材料如牛粪<sup>[10]</sup>、稻壳<sup>[11]</sup>、玉米秸秆<sup>[12]</sup>、甘蔗渣<sup>[13]</sup>等的研究也得到这个结论。Liao 等认为半纤维素和木质素在物理和化学结构上阻碍酶对纤维素的水解<sup>[10]</sup>。去除这两个成分时, 纤维素结晶度减少、纤维材料多孔性和表面积增加, 进而有助于酶水解<sup>[2,10,14]</sup>。

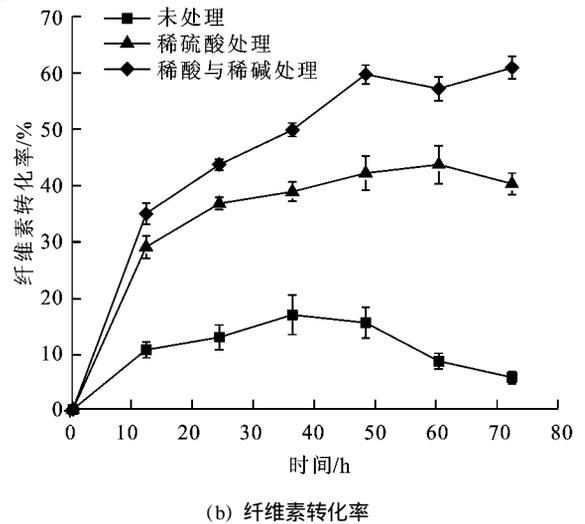
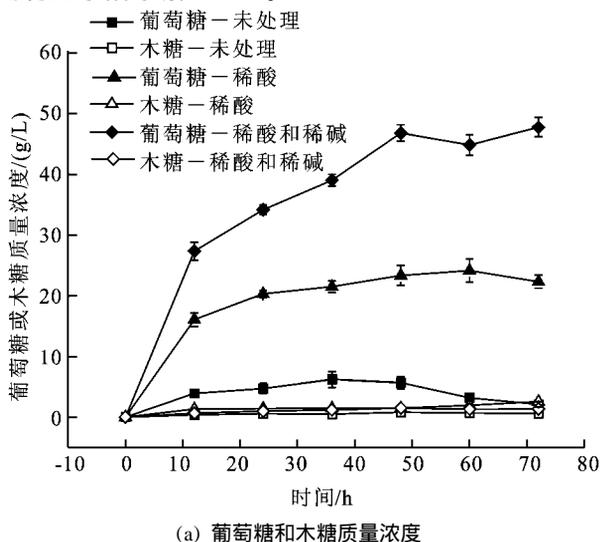


图 1 3 种不同底物的酶解进程

Fig. 1 Time courses of enzymatic of rice straw with different pretreatments

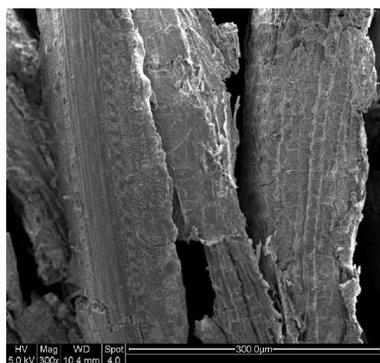
而 Pan 等认为, 木质素主要是形成物理屏障, 阻碍纤维素酶对纤维素的接触和木质素无效地吸收纤维素酶<sup>[15]</sup>。木质素会不可逆吸收纤维素酶, 阻止纤维素酶对纤维素的作用<sup>[9]</sup>, 因此含木质素高的底物在水解时, 由于纤维素酶被木质素吸附, 只有一部分纤维素酶能接触到纤维素表面, 纤维素水解率较低; 而木质素质量分数低材料则相反。

木质素是限制纤维素酶解的主要因素之一<sup>[16]</sup>, 研究证明, 半纤维素对木质纤维材料的酶解也会起到阻碍作用, 当半纤维素从稻草秸秆被脱除 75.7%, 木质素脱除率仅 12.1% 时, 纤维素转化率比未处理的转化率提高 2.6 倍, 为 43.4%, 相关的研究也证实, 木质纤维材料经过酸处理后提高了酶解得率<sup>[4]</sup>。另外, 经过稀酸或酸碱顺序处理的稻草秸秆在酶解最初阶段都有一个快速降解的对数期, 见图 1。酸碱顺序处理时酶解对数期更大, 特别在最初的 12 h, 出现这种现象的原因主要是酶解时纤

纤维素酶快速降解底物易接触的无定形组分,而随着酶解的推进,由于纤维素结晶度增加的原因,纤维素越来越能抵抗酶的水解<sup>[17-19]</sup>。

### 2.3 秸秆预处理前后的形态

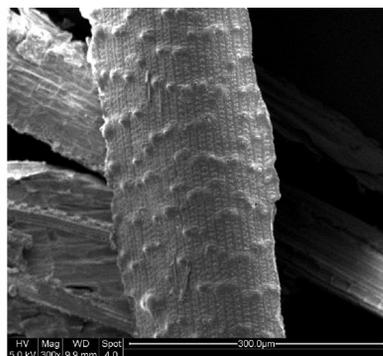
经过预处理的木质纤维材料酶解得率得到较大的提高,可能是由于预处理改变了木质纤维材料的结构和溶解部分木质素和半纤维素,导致了底物对酶的可及性增加<sup>[19]</sup>,进而有利于酶的作用。图 2 是经过稀酸以及酸碱顺序处理的稻草秸秆和未处理秸秆的扫描电镜图,秸秆处理后的结构变化证实了上述结论。可以看出,未处理的秸秆表面粗糙且高度有序(图 2a),稀酸处理后半纤维素得到大部分去除,秸秆表面较为光滑,其结构得到一定程度的修饰,但主要的结构并没有打断(图 2c)。当木质素被去除后,秸秆表面形态发生了很大的变化,秸秆纤维表面很光滑且成较薄的片状(图 2e),从而增加了其与酶接触的表面积,在酶解时更易受到酶的攻击。将上述 3 种材料酶解,发现未处理的秸秆结构几乎没发生变化(图 2b),与其很低的纤维素转化率相一致。当稀酸处理的秸秆酶解后纤维材料得到较大的变化(图 2d),纤维素转化率也较高。而酸碱顺序处理的材料经酶解后,纤维材料完全打断(图 2f),这也部分解释了处理后的底物能获得更高质量浓度的葡萄糖和纤维素转化率。



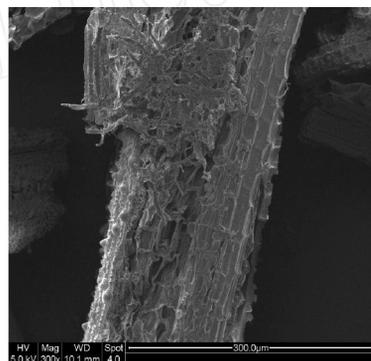
(a) 未处理秸秆酶解前



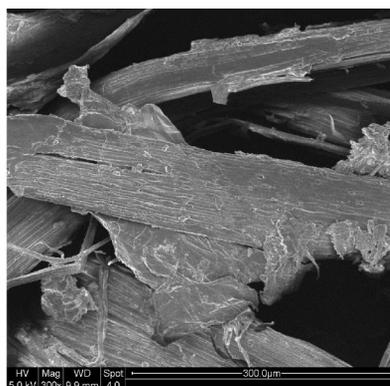
(b) 未处理秸秆酶解后



(c) 稀酸处理酶解前



(d) 稀酸处理酶解后



(e) 稀酸再用稀碱处理酶解前



(f) 稀酸再用稀碱处理酶解后

酶解时间均为 72 h,放大倍数均为 300 倍

图 3 3 种不同底物电镜扫描图

Fig. 3 Scanning electronic microscopy (SEM) of rice straw with different pretreatments

## 3 结 语

前人的研究表明,酸处理主要去除半纤维

素<sup>[3-4]</sup>,碱处理主要去除木质素<sup>[5]</sup>。为了提高木质纤维材料中的纤维素质量分数和酶解时纤维素的转化率,选用稀酸稀碱来处理稻草秸秆以除去所含的木质素和半纤维素(酸处理后的半纤维素水解液含大量木糖和少量葡萄糖,可利用)。本实验中,秸秆经稀酸处理后,半纤维素质量分数降低,木质素质量分数相对增加(纤维素、半纤维素、木质素和其它组成的部分溶解),处理后的秸秆经酶解后比未处

理的秸秆纤维素转化率高,为43.4%;秸秆稀酸再用稀碱处理,木质素和半纤维素质量分数大大降低,处理后的秸秆经过酶解,纤维素转化率提高很大,为60.6%。从这些结果可得出,由于木质素与半纤维素的去除,导致木质纤维材料结构发生变化,表面积变大,增加了酶的接触面积和可及性,从而秸秆越易酶解,相应的葡萄糖转化率就越高。

## 参考文献(References):

- [1] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. **Bioresource Technology**, 2005, 96:673 - 86.
- [2] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. **Bioresource Technology**, 2002, 83:1 - 11.
- [3] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Comparative sugar recovery data from Laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover[J]. **Bioresource Technology**, 2005, 96(18):2026 - 2032.
- [4] Zhao X B, Zhang L H, Liu D H. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem[J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99(9):3729 - 3736.
- [5] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 2004, 88: 797 - 824.
- [6] Ramos L P, Nazhad M M, Saddler J N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues[J]. **Enzyme Microbial Technology**, 1993, 15:821 - 831.
- [7] 刘书钊. 制浆造纸分析与检测[M]. 北京:化学工业出版社,2003:17 - 31.
- [8] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. **Pure Applied Chemistry**, 1987, 59(2):257 - 268.
- [9] Mansfield S D, Mooney C, Saddler J N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis[J]. **Biotechnology Progress**, 1999, 15:804 - 816.
- [10] Liao W, Wen Z, Hurley S, et al. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure[J]. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 2005, 121/124:1017 - 1029.
- [11] Yanez R, Alonso J L, Parajo J C. Enzymatic saccharification of hydrogenperoxide - treated solids from hydrothermal processing of rice husks[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41:1244 - 1252.
- [12] Ohgren K, Bura R, Saddler J, et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover[J]. **Bioresource Technology**, 2007, 98:2503 - 2510.
- [13] Martin C, Klinke H B, Thomsen A B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse[J]. **Enzyme Microbial Technology**, 2007, 40:426 - 432.
- [14] Wong K K Y, Deverell K F, Mackie K L, et al. The relationship between fibre porosity and cellulosic digestibility in steam exploded Pinus radiata[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1988, 31:447 - 456.
- [15] Pan X, Xie D, Gilkes N, Gregg D J, et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content[J]. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 2005, 121/124:1069 - 1079.
- [16] Berlin A, Gilkes N, Kurabi A, et al. Weak lignin-binding enzymes - a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics[J]. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 2005, 121:163 - 170.
- [17] Puri V P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1984, 26:1219 - 1222.
- [18] Gregg D J, Saddler J N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1996, 51:375 - 83.
- [19] Gharpuray M M, Lee Y H, Fan L T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1983, 25:157 - 172.

(责任编辑:李春丽)