

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.07.021

玉米芯糖化微波与酸/碱联合预处理效果实验分析*

杨培周^{1,2} 姜绍通^{1,2} 潘丽军^{1,2} 罗水忠^{1,2} 许燕¹ 易守连¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009;

2. 合肥工业大学食品科学与工程博士后科研流动站, 合肥 230009)

【摘要】 采用微波和酸/碱预处理玉米芯,研究不同微波功率密度和时间对酸/碱预处理后秸秆糖化的影响。结果表明:微波/碱处理组中获得的还原糖平均为 51.71 mg,比对照提高了 33.82%;微波/酸预处理组中,平均还原糖质量为 8.76 mg。酸/碱预处理后进行微波处理,发酵液中的 FPA 酶活平均为 2.23 U/mL 和 10.90 U/mL,分别比对照提高 17.26% 和 35.05%;CMC 酶活平均为 3.43 U/mL 和 12.41 U/mL,分别比对照下降 15.96% 和提高 34.32%。微波处理对碱预处理后的玉米芯优于对酸预处理后的效果。

关键词: 玉米芯 预处理 微波 酸碱 纤维素酶 实验

中图分类号: S38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)07-0101-04

Experiment Analysis on Pretreatment of Corn Cob Saccharification by Acid and Alkali Coordination with Microwave

Yang Peizhou^{1,2} Jiang Shaotong^{1,2} Pan Lijun^{1,2} Luo Shuizhong^{1,2} Xu Yan¹ Yi Shoulian¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

2. Food Science and Engineering Post-doctoral Research Center, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

Pretreatment of corn cob was carried out by microwave/alkali and microwave/acid, including different power densities and time of microwave pretreatment. The results showed that average weight of reducing sugar received by microwave/alkali pretreatment was 51.71 mg, over 33.82% than the control. And the weight was 8.76 mg by microwave/acid. Acid/alkali pretreatments were followed by microwave treatment. Average FPA activities were 2.23 U/mL and 10.90 U/mL in fermentation fluid, respectively, increasing 35.05% and 17.26% compared with the control. Meantime average CMC activities were 3.43 U/mL and 12.41 U/mL, respectively, decreasing 15.96% and increasing 34.32% respectively compared with the control. Alkali pretreatment of corn cob followed by microwave was better than the acid pretreatment.

Key words Corn cob, Pretreatment, Microwave, Acid and alkali, Cellulase, Experiment

引言

将农作物秸秆转化为乙醇等能源和化工原料将为缓解未来能源危机以及对保持农业的可持续发展具有重要作用。农作物秸秆的高效率预处理是其进

一步转化成能源和化工材料的一个关键前提,目前采用的技术包括机械粉碎^[1]、超声波、高能电子辐射^[2-3]、热解^[4]、酸预处理^[5-6]、碱预处理^[7-8]、氧化预处理^[9]等物理化学方法,生物法^[10-11]以及联合法^[12]。微波是指频率为 300 MHz ~ 300 GHz 的电

收稿日期: 2009-09-09 修回日期: 2009-11-03

* “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAD34B03)、教育部科学技术研究重点项目(107127)和合肥工业大学科学研究发展基金资助项目(113-036404)

作者简介: 杨培周, 博士后, 主要从事生物炼制研究, E-mail: yangpeizhou@163.com

通讯作者: 姜绍通, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品生物化工研究, E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

磁波。近年来,利用微波对纤维质原料进行预处理引起了人们的重视,研究侧重于辅助化学法预处理水稻秸秆^[13-15]。

目前实际生产应用的木质纤维素糖化主要采用碱/酸预处理,微波对酸/碱预处理后秸秆进行处理对发酵的影响还未见系统的报道。本文分别在酸/碱预处理玉米芯的基础上进行微波处理,通过绿色木霉的发酵实验,结合电镜观察,研究微波对酸/碱预处理后糖化的影响,为微波技术在农作物预处理中的利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

玉米芯收集自安徽省肥东县白龙镇玉米地,晒干,粉碎后过40目筛,去除灰尘等杂质,备用;绿色木霉2941购自中国微生物所菌种保存中心;微波炉为格兰仕WD800型家用微波炉;JEOL JSM-6490LV型扫描电镜为日本电子株式会社生产;其他化学试剂均为分析纯;发酵培养基:0.1% (NH₄)₂SO₄、0.2% KH₂PO₄、0.1% 吐温80,碳源为预处理后的玉米芯材料。

1.2 实验方法

1.2.1 酸/碱预处理

①酸处理:分别称取4g玉米芯,以固液比1:15加入盛有60mL 0.4%~2.5% H₂SO₄的三角瓶中,沸水浴2h,用DNS法测定上清液的还原糖含量。过滤离心,清水洗净至pH值7.0,烘干称重固体芯沉淀。②碱处理:分别称取4g玉米芯,以固液比1:15加入盛有60mL 0.4%~2.0% NaOH溶液的三角瓶中,80℃,水浴48h,以下操作同酸处理。

1.2.2 酸/碱和微波协同预处理

分别将1.5% H₂SO₄和1.0% NaOH处理后的固体芯沉淀回收,置于微波炉中,微波频率2450MHz,设定功率密度(240、400、800W/cm²)、规定时间(3、6、9min)进行微波处理。

1.2.3 发酵培养

分别将微波后的芯作为碳源,加入含50mL发酵培养液的300mL三角瓶中,高压灭菌。绿色木霉在PDA培养上培养3~5d,待菌丝长满平板时,将菌丝刮出,均质化,转入装有50mL液体发酵培养基的三角瓶中,然后分别向以上不同碳源的发酵培养基中加入1mL绿色木霉菌液,30℃,150r/min,培养3d。

1.2.4 滤纸酶活和CMC酶活的测定

采用DNS还原糖法测定纤维素酶活^[16],酶活的单位定义为每分钟由底物生成1μmol葡萄糖所

需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.2.5 电镜扫描

用蒸馏水清洗样品多次后,将样品浸泡在2.5%的戊二醛固定液中,置于冰箱中24h;用蒸馏水清洗多次后,将样品依次置于体积分数为30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的酒精中各10min,然后将样品放入真空干燥机中,20℃,干燥2h。将干燥的样品用导电性好的粘合剂或其他粘合剂粘在金属样品台上,然后放在真空蒸发器中喷镀一层50~300埃厚的金属膜。用JEOL JSM-6490LV型扫描电镜进行扫描观察,摄相。

2 结果及分析

2.1 酸/碱预处理玉米芯

通过不同浓度的H₂SO₄溶液(0.4%~2.5%)预处理玉米芯,测定还原糖得率以及过滤回收固体沉淀量(图1)。结果表明,随H₂SO₄浓度的增加,还原糖得率逐渐增大,其中浓度为0.4%~1.5%的还原糖得率增加趋势明显,而浓度为1.5%~2.5%的得率增加趋势较缓慢;随酸浓度增加,通过过滤和离心回收获得的固体沉淀逐渐下降(3.3~2.4g)。研究发现稀酸的预处理水解液澄清,稀H₂SO₄能够将木质纤维素中的半纤维素降解为单糖,因此,回收获得的固体沉淀绝大多数为纤维素和木质素组成的混合物。

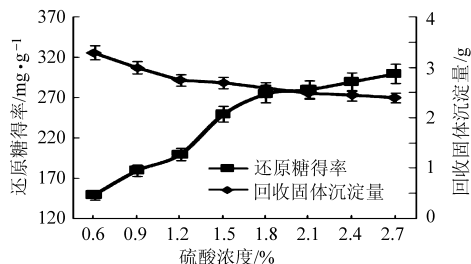


图1 稀硫酸预处理玉米芯性能曲线
Fig. 1 Pretreatment of corn cob using dilute sulfuric acid

通过不同浓度的NaOH预处理玉米芯(图2)的结果表明,水解液中的还原糖浓度低,为0.4~3.4mg/g,其中NaOH浓度小于1.2%时的还原糖得率增加趋势较强,浓度大于1.2%时,得率增加趋势减弱。随碱浓度的增大,回收的秸秆固体沉淀的质量逐渐减少,最大为3.36g,最小为2.80g,与加入的秸秆相比,分别下降16%和30%。发现处理后的水解液颜色棕褐色,由于稀碱处理能够将木质纤维素中的木质素分离出,并溶解于稀酸溶液中。因此获得的固体沉淀绝大多数为纤维素和半纤维素的混合物。

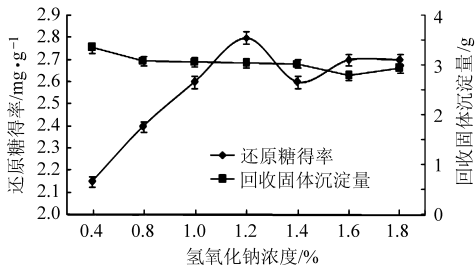


图 2 不同浓度 NaOH 预处理玉米芯

Fig. 2 Pretreatment of corn cob using different concentrations of NaOH

2.2 微波预处理对玉米芯发酵的影响

2.2.1 对发酵液还原糖浓度的影响

采用不同微波功率密度(240、400、800 W/cm²)以及不同的处理时间(3、6、9 min)处理酸/碱预处理后的玉米芯,测定发酵液中的还原糖(图 3)。结果表明,经微波处理后,各实验组的发酵液中的还原糖显著高于对照,微波处理能提高玉米芯的糖产率,其中微波/碱处理组中效果较显著,平均还原糖的质量为 51.71 mg,比对照提高了 33.82%;功率密度 800 W/cm²条件下处理 6 min 后的还原糖最高,达到 58.80 mg;在微波/酸处理组中,平均还原糖质量为 8.76 mg,比对照提高 31.50%。图 3 不同功率密度酸碱处理均为 1.5% H₂SO₄ 预处理和 1.0% NaOH 预处理;对照为未经微波处理但用相应的酸/碱浸泡处理。

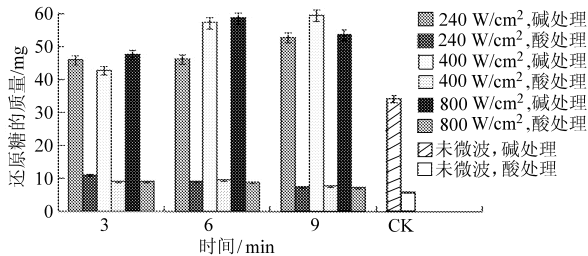


图 3 不同微波预处理方法对发酵液还原糖质量的影响

Fig. 3 Effects of reducing sugar in fermentation broth using different methods of microwave pretreatment

2.2.2 对发酵液滤纸(FPA)酶活的影响

将经发酵后的发酵液离心取上清,按照 FPA 酶活的测定方法,测定不同微波功率密度(240、400、800 W/cm²)下玉米芯发酵液 FPA 酶活(图 4)。结果表明:酸/碱预处理后的酶活平均为 2.23 U/mL、10.90 U/mL,分别比对照提高 17.26%、35.05%,其中,功率密度 400 W/cm² 9 min 时的酶活最高为 13.73 U/mL,比对照(7.08 U/mL)增加了 48.43%。

2.2.3 对发酵液 CMC 酶活的影响

将经发酵后的发酵液离心取上清,测定微波预处理玉米芯后的发酵液的 CMC 酶活(图 5)。结果表明,碱预处理后的发酵液的 CMC 平均酶活为

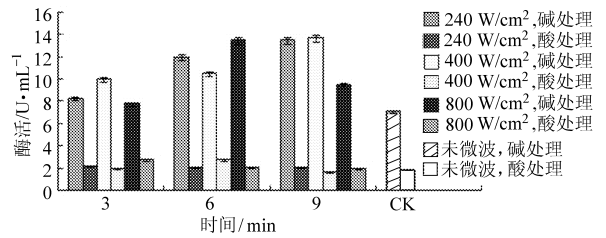


图 4 微波预处理玉米芯后的发酵液 FPA

Fig. 4 FPA of fermentation broth using corn cob pretreatment by microwave

12.41 U/mL,比对照提高 34.32%;酸预处理的为 3.43 U/mL,比对照下降 15.96%。酶活最大的为碱预处理,微波功率密度 240 W/cm²,9 min,酶活为 15.69 U/mL,比对照(8.02 U/mL)提高 48.88%。

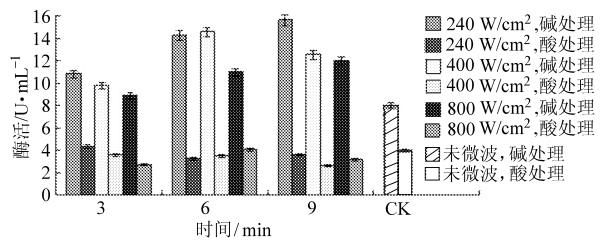


图 5 微波预处理玉米芯后的发酵液 CMCCase

Fig. 5 CMCCase of fermentation broth using corn cob by microwave pretreatment

2.3 碱和微波协同预处理秸秆的显微观察

通过电镜扫描观察碱和碱/微波功率密度(240 W/cm²,9 min)预处理玉米芯的显微结构(图 6)。结果表明,碱预处理后的秸秆表面粗糙,部分纤维突出秸秆表面(图 6a);经碱/微波预处理后,秸秆表面纤维结构更加粗糙,纤维突出明显,部分形成空洞结构,细胞结构破坏程度更加明显(图 6b)。

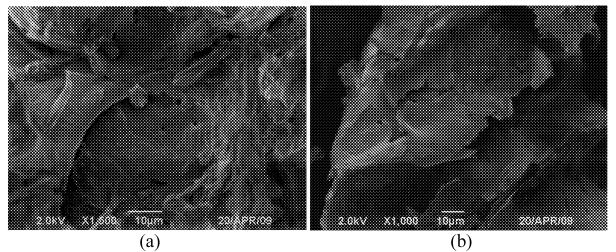


图 6 碱预处理和微波/碱协同预处理玉米芯电镜扫描
Fig. 6 Picture of corn cob scanned by scanning electron microscope using alkali and microwave/alkali pretreatments

(a) 碱预处理 (b) 微波/碱协同预处理

3 结论

(1) 在经过酸/碱预处理的基础上,通过设置不同的微波强度和时间进行预处理,微波/碱处理组中获得的还原糖平均为 51.71 mg,比对照提高了 33.82%;而微波/酸处理组中,平均还原糖质量为 8.76 mg。

(2) 分别酸/碱预处理后进行微波处理,发酵液中的 FPA 酶活平均为 2.23 U/mL、10.90 U/mL,分别比对照提高 17.26% 和 35.05%; CMC 酶活平均为 3.43 U/mL 和 12.41 U/mL,分别比对照下降

15.96% 和提高 34.32%。显微观察表明,碱预处理后经过微波处理,玉米芯的细胞破坏严重。因此,微波处理对碱预处理后的玉米芯的破坏程度大于酸预处理后。

参 考 文 献

- 辛芬,陈汉平,王贤华,等. 木质纤维素生物质生产乙醇的预处理技术[J]. 能源工程,2006(3): 24~28.
Xin Fen, Chen Hanping, Wang Xianhua, et al. The pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for ethanol production[J]. Energy Engineering, 2006(3): 24~28. (in Chinese)
- 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.
Wen Xinya, Li Yansong, Zhang Zhipeng, et al. Research progress in pretreatment of lignocellulose by enzymolysis[J]. Liquor-making Science & Technology, 2006(8): 97~100. (in Chinese)
- 李松晔,刘晓非,庄旭品,等. 棉浆粕纤维素的超声波处理[J]. 应用化学,2003,20(11): 1030~1034.
Li Songye, Liu Xiaofei, Zhuang Xupin, et al. Ultrasonic treatment of cotton pulp cellulose[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2003, 20(11): 1030~1034. (in Chinese)
- Palmqvist E, Hahn Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000,74(1): 25~33.
- Ojumu T V, Ogunkunle O A. Production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach[J]. Journal of Applied Sciences, 2005, 5(1):15~17.
- Saha Badal C, Iten Loen B, Cotta Michael A, et al. Dilute acid pretreatment enzymatic saccharification of wheat straw to ethanol[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(12):3693~3700.
- Curreli Nicoletta, Agelli Mario, Pisu Brunella, et al. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(9):937~941.
- 杨勇,杨红霞,李静,等. 超声波强化秸秆乙醇化原料碱预处理效果研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2007,29(7):149~152.
Yang Yong, Yang Hongxia, Li Jing, et al. Alkalized pretreatment of ethanolized maize stalk accelerated by ultrasonic wave [J]. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2007,29(7):149~152. (in Chinese)
- Curreli N, Fadda M B, Rescigno A, et al, Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw[J]. Process Biochemistry, 1997, 32(8):665~670.
- 潘亚杰,张雷,郭军,等. 农作物秸秆生物法降解的研究[J]. 可再生能源,2005(3): 33~35.
Pan Yajie, Zhang Lei, Guo Ju, et al. The study on biological degrading of crops straw [J]. Renewable Energy, 2005(3): 33~35. (in Chinese)
- 罗鹏,刘忠. 用木质纤维素原料生产乙醇的预处理工艺[J]. 酿酒科技,2005(8):42~47.
Luo Peng, Liu Zhong. Pretreatment of lignocellulosic biomass for producing ethanol [J]. Liquor-making Science & Technology, 2005(8): 42~47. (in Chinese)
- 朱圣东,吴元欣,喻子牛,等. 植物纤维素原料生产燃料酒精研究进展[J]. 化学与生物工程,2003,20(5): 8~11.
Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Progress in production of fuel ethanol from lignocellulosic materials[J]. Chemistry & Bioengineering, 2003, 20(5): 8~11. (in Chinese)
- 朱圣东,吴元欣,喻子牛,等. 微波预处理稻草糖化工艺研究[J]. 林产化学与工业,2005,25(1): 112~114.
Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Study on microwave pretreatment of rice straw in saccharification process [J]. Chemistry & Industry of Forest Products, 2005, 25(1): 112~114. (in Chinese)
- Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw[J]. Biosystems Engineering, 2006, 93(3): 279~283.
- Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Production of ethanol from microwave assisted alkali pretreated wheat straw [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(4): 869~873.
- Lechner B E, Papinutti V L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(3): 594~598.