

# 液氨过氧化氢联合预处理对玉米芯酶解的影响\*

赵超<sup>1</sup> 邵千钧<sup>2,3</sup> 曹艳<sup>1,2</sup> 丁为民<sup>4</sup> 彭何欢<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学工程学院, 杭州 311300; 2. 国家木质资源综合利用工程中心, 杭州 311300;

3. 宁波大学机械工程与力学学院, 宁波 315211; 4. 南京农业大学工学院, 南京 210031)

**摘要:** 为提高木质纤维原料可发酵单糖的酶解转化率, 采用液氨过氧化氢联合预处理(H-LAT)玉米芯, 研究了温度与过氧化氢用量比对玉米芯固体回收率、化学成分及聚糖酶解转化率的影响, 并采用X射线衍射图谱和红外光谱对玉米芯H-LAT预处理前后的纤维结构特性进行了分析。结果表明: H-LAT预处理能有效地去除玉米芯中的木质素并能保留绝大部分碳水化合物; 在最优的预处理条件下, 添加纤维素酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和木聚糖酶组成的复合酶系酶解72 h, 玉米芯糖化率达85.0%, 1 000 g干基玉米芯可获得可发酵单糖593.1 g, 是未处理的3.53倍; X射线衍射表明, 经H-LAT预处理后玉米芯结晶区与无定形区同步下降; 红外光谱分析表明, H-LAT预处理能打破纤维素的氢键连接, 破坏木质素-碳水化合物复合体内部的酯键连接, 同时使残留木质素分子结构受到一定的破坏, 这些变化有效地降低了玉米芯的抗水解屏障, 是酶解率提高的根本原因。

**关键词:** 玉米芯 液氨 过氧化氢 预处理 酶水解

**中图分类号:** TK6; S216.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)06-0193-08

## Effects of Combined Hydrogen Peroxide and Liquid Ammonia Treatment on Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob

Zhao Chao<sup>1</sup> Shao Qianjun<sup>2,3</sup> Cao Yan<sup>1,2</sup> Ding Weimin<sup>4</sup> Peng Hehuan<sup>1</sup>

(1. School of Engineering, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

2. National Engineering Research Center for Wood-based Resource Utilization, Hangzhou 311300, China

3. Faculty of Mechanical Engineering & Mechanics, Ningbo University, Ningbo 315211, China

4. College of Engineering, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210031, China)

**Abstract:** To effectively improve the enzymatic digestibility of carbohydrates in lignocelluloses, the combined hydrogen peroxide and liquid ammonia treatment (H-LAT) was employed as pretreatment for corn cob. The effects of temperature and  $H_2O_2$  loading on solid recovery, enzymatic digestibility and lignocellulosic structure of corn cob were investigated. The results showed that the H-LAT pretreatment could effectively remove lignin and retain the most of carbohydrate in the corn cob. Enzymatic hydrolysis using cocktail enzymes including cellulase,  $\beta$ -glucosidase and xylanase for 72 h after pretreatment under optimal conditions, the H-LAT pretreatment achieved 85.0% of theoretical sugar yield, and it could produce 593.1 g fermentable monosaccharide per kilogram of dry biomass. Compared with untreated substrates, it was about 3.53-fold in sugars yields for H-LAT treated substrates. X-ray diffraction analysis showed that the crystalline region and amorphous region of corn cob were synchronously decreased; the crystallinity changes were depended on the interaction of the two effects. Infrared spectrum analysis showed that the H-LAT pretreatment effectively broke down cellulose hydrogen bonds, and disrupted ester linkage in lignin-carbohydrate complexes. Meanwhile, lignin molecular structure was partly destructed,

收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2014-12-22

\* 浙江省重点科技创新团队资助项目(2011R09012-5)和浙江农林大学预研资助项目(2013SWZ03)

**作者简介:** 赵超, 讲师, 博士, 主要从事生物质能源转化与利用研究, E-mail: zhaochao@zafu.edu.cn

**通讯作者:** 邵千钧, 教授, 主要从事生物质能源转化与利用研究, E-mail: shaoqianjun@nbu.edu.cn

and the distribution of lignin produced certain changes. As a result, these changes effectively reduced the biomass recalcitrance of corn cob.

**Key words:** Corn cob Liquid ammonia Hydrogen peroxide Pretreatment Enzymatic hydrolysis

## 引言

农业剩余物数量庞大、形式多样,被认为是具有战略意义的可再生能源的原材料之一;燃料乙醇技术成熟、使用广泛,作为即将枯竭的化石燃料的补充或替代品应用前景广阔;以农业剩余物为原料制取纤维素乙醇的技术与工艺已成为能源领域的热点课题<sup>[1-2]</sup>。中国年产约3000万t玉米芯,除了少量用于生产糠醛、木糖醇之外,绝大部分以焚烧或固体废弃物形式处理,以玉米芯为原料制备燃料乙醇及其他糖基化学品对于资源利用和环境保护具有重要的意义<sup>[3-4]</sup>。

木质纤维原料乙醇化的生化转化路线主要包括预处理、酶水解和发酵3个主要步骤,其中预处理是实现高效酶解的关键技术<sup>[5-7]</sup>。目前预处理方法很多,如酸法、碱法、氨化、蒸汽爆破法等。氨化法行之有效且被广泛研究,包括氨水浸泡、氨水循环、氨纤维膨胀、低含水率液氨预处理等<sup>[8-12]</sup>。但单一的氨化技术均存在一定的局限性,与其他技术相结合是氨化预处理的发展趋势。作为强氧化剂的过氧化氢价格低廉且环境友好,是与碱性试剂联合预处理的常用选择,其通过更好地移除木质素提升酶解效果。如Wei等<sup>[13]</sup>采用质量比为0.25 g/g的过氧化氢在1% NaOH碱性环境中处理稻草,使纤维素酶解率提升了4倍。Yu等<sup>[14]</sup>采用先氨水后过氧化氢2步法处理五节芒,木质素去除率达89.5%,纤维素和半纤维素酶解率分别达90.2%和73.4%。

在碱性过氧化氢预处理中,从已有报道的文献来看,与过氧化氢联合的碱局限在NaOH或者氨水<sup>[13-14]</sup>;而氨水与过氧化氢联合预处理的对象又局限在能源作物(如芒、柳枝稷等)<sup>[14-15]</sup>。在课题组前期研究中,发现经质量分数30%过氧化氢溶液浸润后再进行液氨处理的竹子和玉米秸秆显著地提高了木质素去除能力和糖化率<sup>[16-17]</sup>。本文将进一步探索将液氨过氧化氢联合预处理技术(Combined hydrogen peroxide and liquid ammonia treatment, H-LAT)应用于玉米芯,研究其对玉米芯化学成分及酶解转化率的影响,分析木质纤维素结构特性在预处理前后的变化,这将为木质纤维原料新型预处理工艺设计提供理论依据,同时可推进纤维素乙醇的开发利用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原材料与试剂

原材料:玉米芯(绵单4号)采自四川省绵阳市(东经104.43°、北纬31.23°),采收期为2013年8月(播种至采收约120d)。将收集的玉米芯切割成1~2cm长度,初晒后经40℃干燥至含水率低于15%,经粉碎过40目分析筛后放入自封袋于-20℃冷藏备用。

试验试剂:葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等标准对照品及柠檬酸、柠檬酸钠,上海Sigma-Aldrich公司;98%硫酸,浙江明星化工有限公司;99%液氨,浙江龙山化工有限公司;30%过氧化氢溶液,分析纯,江苏彤晟化学试剂有限公司;纤维素酶(Novozyme 50013)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶(Novozyme 50010),丹麦诺维信公司;木聚糖酶,山东泽生生物科技有限公司。

### 1.2 H-LAT 预处理

在室温下将20g干基原料添加不同用量比的30%过氧化氢溶液对其进行预浸混合,加去离子水使其达到液固质量比0.7,混合均匀并平衡10min;将待处理的原料放置于高压反应釜中,反应釜抽真空;将20g液氨注入称量小钢瓶,加热小钢瓶至50℃将氨注入反应釜;加热反应釜到设定温度并保持10min,预处理结束以开阀释放氨为时间计算点。经预处理的样品在通风柜中冷却至室温后置于40℃干燥箱中干燥24h;测定含水率并将原料放入自封袋于-20℃冷藏直至成分分析或酶水解。

H-LAT预处理变量为温度和 $H_2O_2$ 用量比,温度分别设置为90、110、130℃; $H_2O_2$ 用量比分别设置为0.1、0.4、0.7(30% $H_2O_2$ 溶液与干生物物质的质量比)。参数的选择与设定范围根据课题组前期的试验结果确定<sup>[16-17]</sup>。预处理固体回收率计算式为

$$S_r = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $S_r$ ——固体回收率, %

$m_1$ ——预处理后生物质干基质量, g

$m_2$ ——预处理前生物质干基质量, g

### 1.3 组分含量测定

本文的主要分析方法参照了美国国家可再生能源实验室(National renewable energy laboratory, NREL)制订的试验规程(Laboratory analytical procedure, LAP)<sup>[18]</sup>。

原材料及预处理后样品的含水率由水分测定仪测定。碳水化合物由 LAP 002 方法测定,酸不溶木质素由 LAP 003 方法测定,由试验规程可知碳水化合物和酸不溶木质素均采用 2 步酸解法,可在一次试验中完成。成分分析试验采用 2 组重复,试验结果以平均值表示。

#### 1.4 酶水解

酶水解依据 LAP 009 进行,并作适当调整。具体过程如下:称取 0.15 g 葡聚糖当量的酶解底物放入 20 mL 酶解瓶,依次加入 pH 值为 4.8 柠檬酸钠缓冲溶液和去离子水使其总量为 15 mL;加入 30 mg/L 的环己酰亚胺和 40 mg/L 的四环素作为抗生素防止酶解过程中细菌的滋生;振荡培养(50℃, 150 r/min) 1 h 后添加纤维素酶 15 FPU/g、 $\beta$ -葡萄糖苷酶 64 CGU/g 和木聚糖酶 1 000 IU/g(酶的添加量按每克葡聚糖折算,后文同),继续培养并记录为酶解开始的时间。在酶解 72 h 时进行取样,用移液枪取 1 mL 样品注入离心管,在 99℃ 加热器中放置 20 min 后放入 -20℃ 冰箱冷冻 5 min,使酶失去活性;再在离心机中以 15 000 r/min 离心 5 min,将酶解液经 22  $\mu$ m 聚醚砜膜过滤后注入分析瓶,最后置于 -20℃ 冷藏直至 HPLC 分析。酶解试验均以未处理原料为对照,采用 2 组重复,试验结果以平均值与标准偏差表示。

采用 HPLC 法定量分析酸解和酶解液的单糖浓度,色谱仪为 Agilent Technologies 1200 Series,带示差检测器且自动进样,色谱柱选用 Bio-Rad 公司的 HPX-87H Ion Exclusion Column。HPLC 试验条件:进样量 15  $\mu$ L,每个样品运行 20 min,柱温 50℃,流动相 0.005 mol/L 稀硫酸,流速 0.5 mL/min。

聚糖的酶解转化率为实际获得单糖含量与理论最高可得单糖含量之比,而理论最高可得单糖量根据原料中组分分析获得。计算时将 HPLC 分析所得单糖数据折算成对应的聚糖量,葡聚糖/木聚糖转化率计算式为

$$E_d = \frac{m_s c}{p_s} \times 100\% \quad (2)$$

式中  $E_d$ ——聚糖酶解率, %

$m_s$ ——酶解过程中所释放的单糖质量, g

$p_s$ ——原材料中的聚糖质量, g

$c$ ——单糖与等量聚糖的折算系数,葡萄糖对葡聚糖为 0.9;木糖对木聚糖为 0.88

总糖产量定义为 1 000 g 干基原材料经预处理和酶解后所释放的葡萄糖和木糖的质量总和;糖化率定义为原材料经预处理和酶解后所释放的实际单糖总量与理论最高可得单糖总量之比。

### 1.5 物理化学结构特性分析

#### 1.5.1 X 射线衍射光谱分析

对原材料及 H-LAT 预处理优化条件下的样品过 100 目分析筛后进行 X 射线衍射测定。具体条件为:石墨单色滤光片,管压 40 kV,电流 200 mA, Cu 靶,扫描范围 10° ~ 40°,扫描速率 2 (°)/min,步进扫描,步宽 0.02°。结晶度根据衍射曲线拟合分峰计算,即

$$Q_{cr} = \frac{I_c}{I_c + KI_a} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $Q_{cr}$ ——纤维素结晶度, %

$I_c$ ——结晶峰衍射强度, CPS

$I_a$ ——无定型峰衍射强度, CPS

$K$ ——校正因子,取值为 0.1

#### 1.5.2 红外光谱分析

对原材料及 H-LAT 预处理优化条件下的样品过 200 目分析筛后进行红外光谱的测定。取样品少许放入玛瑙研钵内,加入 KBr 混合研磨后压片,扫描范围为 400 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为 2  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.6 试验仪器

试验中所用到的主要仪器与设备有:微型植物粉碎机(FZ102型,天津泰斯特仪器有限公司)、高压反应釜(GCF-1L20/350型,大连自控设备厂)、电热恒温鼓风干燥箱(101-2A型,上海东星试验设备有限公司)、振荡培养箱(ZHY-111B型,上海智诚分析仪器制造有限公司)、水分测定仪(MA35型, Sartorius AG Germany)、分析天平(AL204型, Mettler-Toledo 仪器上海有限公司)、高效液相色谱仪(1200 Series, Agilent Technologies)、X 射线衍射仪(XRD-6000型, Shimadzu)、红外光谱仪(IR Prestige-21型, Shimadzu)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 预处理对固体回收率的影响

在液固质量比为 0.7 g/g、氨用量比(氨与干生物质质量比)为 1.0 g/g、驻留时间为 10 min 的预处理条件下,考察了温度与  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量比对玉米芯固体回收率的影响,结果见表 1。由表 1 可知,在 H-LAT 预处理中,固体回收率随着温度的升高或  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量比的增加而下降,在 130℃、0.7 g/g  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量比的条件下固体回收率最小(84.5%)。当温度小于 110℃ 或  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量比低于 0.4 g/g 时,固体回收率均大于 90%。较高的固体回收率意味着预处理底物中碳水化合物的保留,可为后续高效酶解和总糖的利用打下基础。

表1 H-LAT 预处理对玉米芯固体回收率及成分变化的影响

Tab.1 Effects of H-LAT pretreatment on solid recovery and composition changes of corn cob

材料	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 用量比 /(g·g <sup>-1</sup> )	温度 /°C	固体 回收率/%	成分含量(质量分数)/%			葡聚糖 保留率/%	木聚糖 保留率/%	木质素 去除率/%
				葡聚糖	木聚糖	木质素			
未处理		—	100	36.0	26.2	27.5	—	—	—
		90	93.2	32.8	25.2	13.9	91.2	96.1	49.5
		110	92.4	31.9	25.0	13.1	88.5	95.5	52.4
		130	87.2	31.6	24.7	11.6	87.7	94.3	58.0
H-LAT 预处理	0.1	90	93.1	32.2	24.9	12.1	89.4	94.9	56.0
		110	91.0	31.8	24.6	12.0	88.3	93.7	56.5
		130	89.2	31.2	24.1	10.5	86.6	91.9	62.0
		90	89.9	31.4	23.1	11.7	87.2	88.2	57.6
	0.4	110	89.8	30.5	22.3	10.3	84.7	85.2	62.6
		130	84.5	30.2	21.4	9.0	83.9	81.6	67.4

注:成分含量、聚糖保留率及木质素去除率基于原材料计算。

## 2.2 预处理对化学成分的影响

温度与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量比对玉米芯主要化学成分的影响如表 1 所示。在试验条件范围内,葡聚糖和木聚糖的保留率均高于 80%,说明 H-LAT 预处理能有效地保留聚糖。在相同的预处理条件下,木聚糖的保留率高于葡聚糖,如在 110°C、0.4 g/g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量比的条件下,葡聚糖和木聚糖的保留率分别为 88.3% 和 93.7%。这与其他学者的研究结论存在差异,如 Nlewem 等<sup>[19]</sup> 和 Jin 等<sup>[20]</sup> 认为在相同的预处理条件下,葡聚糖由于其聚合度和结晶度的关系比木聚糖更稳定,其保留率更高。这可能是由于对聚糖的折算包含了玉米芯中原有的葡萄糖基的单糖和寡糖的原因,导致了葡聚糖保留率偏低,但这种折算方法能准确了解预处理中葡萄糖基的总糖损耗。

在试验条件范围内,玉米芯的木质素去除率为 49.5%~67.4%,这说明 H-LAT 预处理能有效地去除玉米芯中绝大部分木质素。在最温和的条件下(90°C,0.1 g/g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量比),玉米芯的木质素去除率为 49.5%。木质素主要通过以下两种作用方式影响纤维素的酶解效率:一是包裹在纤维素外面作为物理屏障阻碍纤维素酶分子接近纤维素糖苷键;二是木质素对纤维素酶产生不可逆吸附,大大降低了纤维素酶的有效性<sup>[21-22]</sup>。Zeng 等<sup>[21]</sup> 认为木质素含量与酶解率之间具有很强的负相关性,木质素的大量去除有利于后续的酶水解。

H-LAT 预处理能有效地去除玉米芯中绝大部分木质素,却不能有效地去除玉米秸秆中的木质素。课题组前期研究表明在液氨过氧化氢联合预处理玉米秸秆时,其木质素去除率十分有限<sup>[17]</sup>。结合成分分析发现:在原材料中玉米秸秆与玉米芯的木质素含量接近,可见在相同的预处理方法中其木质素去除率的差异并不是由木质素含量引起的,该差异可

能来源于木质素结构及单体连接类型,如木质素不同亚组分或者不同的结合键分布。这与 Zeng 等<sup>[21]</sup> 的研究结论一致,木质素结构单体及连接键类型对预处理的响应及酶解的抑制作用有待于进一步研究。

结合固体回收率与组分变化的结果可知,在玉米芯的 H-LAT 预处理过程中,固体回收率的下降主要来源于木质素及其他可溶性成分的去,而非聚糖的降解。在去除木质素的同时聚糖的完整保留是一个有效的预处理准则。这说明玉米芯经 H-LAT 预处理后,在底物成分上达到了理想的预处理效果。

## 2.3 预处理对酶解转化率的影响

玉米芯未处理及 H-LAT 预处理底物的酶解转化率及总糖产量如图 1 所示。聚糖转化率是酶解阶段的指标,用来评价预处理的效果;总糖产量考虑了固体损失,是预处理和酶解阶段的总体评价指标,通过固体回收率和聚糖转化率计算得到。

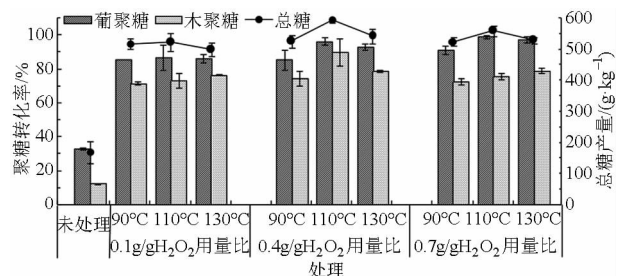


图1 H-LAT 预处理对玉米芯聚糖转化率及总糖产量的影响

Fig.1 Effects of H-LAT pretreatment on glucan/xylan conversion and total sugar yield of corn cob

未处理玉米芯的葡聚糖、木聚糖酶解率分别为 33.0% 和 12.2%,经 H-LAT 预处理后,在试验条件范围内葡聚糖转化率均高于 85%,木聚糖转化率均高于 70%,可见 H-LAT 预处理能有效地促进聚糖的转化。由图 1 可知,随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量比的增加,其聚

糖转化率有一定的增幅;在相同的  $H_2O_2$  用量比条件下,总糖产量均在  $110^\circ\text{C}$  时达最大值。较高的温度有利于木质素的去除,从而对聚糖的转化率有一定的促进作用,但木质素大量去除伴随着固体回收率的下降及聚糖的损失(表1),进而直接导致总糖产量降低。如同在  $110^\circ\text{C}$  的温度下,玉米芯在  $0.7\text{ g/g}$   $H_2O_2$  用量比条件下的葡聚糖转化率(98.8%)高于  $0.4\text{ g/g}$   $H_2O_2$  用量比(96.2%),但其总糖产量(557.1 g/kg)却低于后者(593.1 g/kg)。这再次说明了总糖产量是由聚糖保留率(固体回收率)和聚糖转化率共同决定。在  $110^\circ\text{C}$ 、 $0.4\text{ g/g}$   $H_2O_2$  用量比的条件下,玉米芯总糖产量最大,达 593.1 g/kg,是未处理的 3.53 倍,此时,葡聚糖和木聚糖转化率分别为 96.2% 和 89.6%,分别是未处理的 2.92 和 7.34 倍。

$H_2O_2$  在 H-LAT 预处理中释放出大量的活性基团,当 pH 值高于 8~9 时,  $H_2O_2$  很容易分解生成羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、氢过氧负离子( $\text{HOO}^-$ )和超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ ),氨源适时地为  $H_2O_2$  提供碱性环境,分解的活性基团降解和氧化木质素、打破纤维素的晶体结构;同时液氨引起纤维素的溶胀,在综合作用下增加酶的可及面积,进而有效地提高了酶解率。

## 2.4 预处理下物理化学结构特性分析

### 2.4.1 预处理对结晶度的影响

木质纤维原料的主要成分纤维素是具有结晶区和无定形区的两相结构体,其结晶度用结晶区占其整体的百分比来表征。在结晶区域,纤维素链规则紧密排列、结构致密,不利于纤维素酶在其表面的键结;在无定形区域,纤维素链松散随机排列、结构疏松,较有利于纤维素酶在其表面的键结。因此,纤维素的结晶度能够显著影响木质纤维素的酶解率。

图2为玉米芯 H-LAT 预处理前后 X 射线衍射图谱, H-LAT 预处理条件为液固质量比  $0.7\text{ g/g}$ 、氨用量比  $1.0\text{ g/g}$ 、驻留时间 10 min、 $110^\circ\text{C}$ 、 $H_2O_2$  用量比  $0.4\text{ g/g}$ 。从图中可以看出,未处理的玉米芯在  $2\theta$  衍射角为  $16^\circ$ 、 $22^\circ$ 、 $27^\circ$  时均出现衍射峰,经 H-LAT 预处理后,在  $16^\circ$  的衍射峰基本没有变化;在  $22^\circ$  的衍射峰变得更为尖锐且衍射强度有所增加;在  $27^\circ$  衍射峰基本消失;同时在  $37^\circ$  处产生了新的衍射峰。这说明玉米芯在 H-LAT 预处理前后结晶结构有明显变化,有部分结晶区变为无定形区且有少量结晶生成或结晶重定向。

玉米芯 H-LAT 预处理前后结晶度的变化如表 2 所示。从表中得知,玉米芯 H-LAT 预处理前后的结晶度分别为 47.48% 和 49.53%,预处理后其结晶度上升了 4.32%。从结晶部分和非结晶部分累积衍

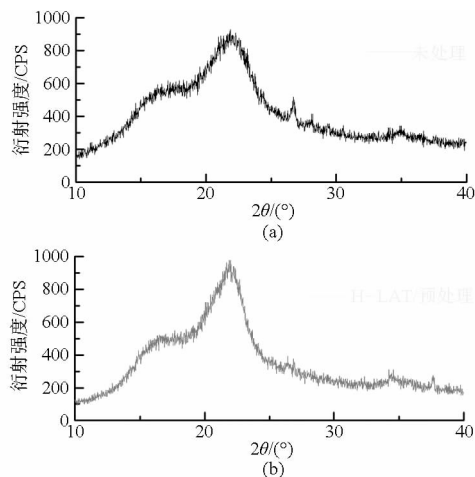


图2 未处理及 H-LAT 预处理玉米芯 X 射线衍射图谱

Fig.2 X ray diffraction spectra of untreated and H-LAT treated corn cobs

(a) 未处理 (b) H-LAT 预处理

射强度来看结晶区与无定形区同步下降。可见, H-LAT 预处理对木质纤维素的结晶度影响具有双重作用:一方面它能破坏纤维素链的氢键连接引起结晶度下降;另一方面它能去除无定形区的木质素和半纤维素引起结晶度上升。因而,在 H-LAT 预处理中玉米芯结晶度大小变化依赖于这二者作用的强弱。酶解率与结晶度绝对值大小没有直接关系,但与结晶区的破坏程度紧密相关。

表2 H-LAT 预处理前后玉米芯结晶度的变化

Tab.2 Crystallinity changes of untreated and H-LAT treated corn cobs

样品	$I_c/\text{CPS}$	$I_a/\text{CPS}$	结晶度/%
未处理	1.85	20.43	47.48
H-LAT 预处理	1.71	17.39	49.53

木质纤维原料预处理后结晶度增加的现象也被其他研究者所发现:如 Kim 等<sup>[9]</sup>和 Zhang 等<sup>[10]</sup>采用氨水预处理玉米秸秆时同时发现其结晶度增加的事实,这主要归因于其无定形区的下降大于其对结晶区的破坏;而预处理对结晶度的双重作用也被其他研究者所证实:如陈尚钐等<sup>[23]</sup>采用稀酸、Pang 等<sup>[24]</sup>采用微波蒸汽联合预处理玉米秸秆时均发现了预处理对结晶度影响的双重效应。

### 2.4.2 预处理对化学结构特性的影响

玉米芯 H-LAT 预处理前后红外光谱图如图 3 所示。由图 3 可见, H-LAT 预处理前后红外吸收峰形状相似,差异在于某些特征峰的消失或吸收强度的变化。波数  $1050\text{ cm}^{-1}$  的谱峰是纤维素、半纤维素一级和二级醇的 C—O—H 伸展振动特征峰,与原料的谱图相比,经 H-LAT 预处理后该处的峰型变缓,吸收区域增大,说明预处理后底物的纤维特性增

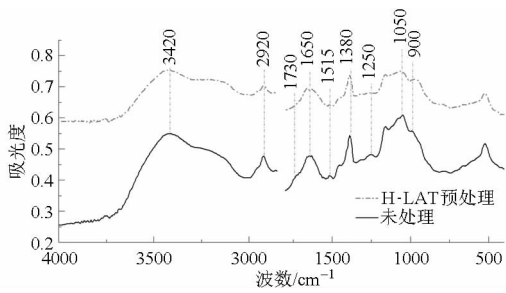


图3 未处理及 H-LAT 预处理玉米芯红外光谱图

Fig. 3 Infrared red spectra of untreated and H-LAT treated corn cobs

强。波数  $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$  的谱峰归因于乙酰酯键,与原料的谱图相比,经 H-LAT 预处理后此峰基本消失,说明在预处理中木质素-碳水化合物复合体内部的酯键连接发生了断裂。波数  $1\ 515\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  的谱峰为木质素振动吸收特征峰,与原料的谱图相比,经 H-LAT 预处理后在  $1\ 515\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰基本消失,在  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰强度减弱且出现了分峰现象,这说明 H-LAT 预处理有效地去除了木质素,且使残余木质素分子结构受到了一定破坏。波数  $2\ 920\ \text{cm}^{-1}$  的谱峰是木质纤维结构中甲基、亚甲基、次甲基的 C—H 伸展振动,与原料的谱图相比,经 H-LAT 预处理后此吸收峰强度明显下降,这说明 H-LAT 预处理使部分纤维素和木质素中的甲基、亚甲基及次甲基基团发生了断裂。波数

$3\ 420\ \text{cm}^{-1}$  的谱峰是木质纤维素内羟基 O—H 伸缩振动,与原料的谱图相比,经 H-LAT 预处理后该处的峰型变缓,吸收区域增大,说明在 H-LAT 预处理后打破了部分纤维素的氢键连接,产生了一定的脂肪族羟基或酚羟基。

红外光谱图分析结果表明,H-LAT 预处理能去除玉米芯中大部分木质素,且使残余木质素分子结构受到一定的破坏;还能打破纤维素的氢键连接,使部分纤维素和木质素中的甲基、亚甲基及次甲基基团发生断裂;同时破坏木质素-碳水化合物复合体内部的酯键连接。这些变化有效地降低了玉米芯的抗水解屏障,是其酶解率提高的根本原因所在。

## 2.5 质量平衡与预处理效果比较

为了追踪预处理及酶解过程中碳水化合物的变化与降解,对玉米芯未处理及 H-LAT 预处理和酶解进行了质量平衡分析,如图 4 所示。质量平衡的预处理条件为 H-LAT 预处理在试验范围内优化的结果,采用复合酶系酶解 72 h。由图 4 可知,1 000 g 干基玉米芯经 H-LAT 预处理及酶解后可获得可发酵单糖 593.1 g,而未处理玉米芯的可发酵单糖的获得量为 168.1 g,总糖产量提高了 3.53 倍。此时,葡萄糖的产量从未处理的 131.9 g 提高到 350.2 g;木糖的产量从未处理的 36.2 g 提高到 242.9 g,葡萄糖和木糖的产量分别是未处理的 2.66 和 6.71 倍。

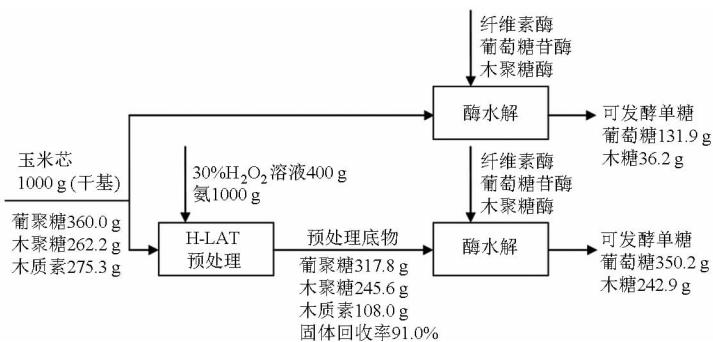


图4 玉米芯未处理/H-LAT 预处理及酶解质量平衡图

Fig. 4 Overall mass balance for untreated/H-LAT treated and enzymatic hydrolysis of corn cob

H-LAT 预处理总糖化率为 85.0%,与碱、汽爆及其他联合预处理方式相比糖化率有一定的提高。近年来其他学者开发的其他预处理方法的糖化率在 69.2%~82.3% 之间:如采用碱液预处理,玉米芯经氨水质量分数 2.5%、 $\text{H}_2\text{O}_2$  质量分数 0.6%、液固质量比为 23:1、70℃ 处理 12 h 后,酶解 48 h 的糖化率为 69.2% (纤维素酶 45 FPU/g, 木聚糖酶 200 IU/g)<sup>[25]</sup>;如采用碱氧和稀酸 2 步预处理,玉米芯经 1.2% NaOH 和质量分数为 0.225%  $\text{H}_2\text{O}_2$  于 70℃ 水浴中处理 3.0 h 后用质量分数 1.0% 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  于 120℃ 处理 1 h,酶解 48 h 的糖化率为 78.2%

(纤维素酶 75 FPU/g,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 6.5 CBU/g)<sup>[26]</sup>;如采用蒸汽爆破,玉米芯在压力为 2.8 MPa 蒸汽中处理 4 min,酶解 48 h 的糖化率达 80.85% (纤维素酶 15 FPU/g, 木聚糖酶 225 IU/g)<sup>[3]</sup>;如采用氨水预处理,玉米芯在 15% 的氨水下,以 16 g/mL 的固液比在 60℃ 处理 12 h,酶解 24 h 的糖化率达 82.3% (纤维素酶 30 FPU/g,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 60 CBU/g)<sup>[27]</sup>。研究表明,H-LAT 预处理对玉米芯是一种有效的预处理方式,并优于普通的碱液、碱氧加稀酸、蒸爆、氨水等预处理方式。

### 3 结论

(1) 玉米芯经 H-LAT 预处理后能有效地保留聚糖并去除大部分木质素,因此,玉米芯在 H-LAT 预处理中固体回收率的下降主要来源于木质素和其他可溶性成分的去,而非聚糖的降解。玉米芯经 H-LAT 预处理后,在底物成分上达到了理想的预处理效果。

(2) 试验所得玉米芯 H-LAT 预处理优化条件为:0.7 g/g 液固质量比、1.0 g/g 氨用量比、滞留时间 10 min、110℃、0.4 g/g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量比,此时玉米芯固体回收率为 91.0%,葡聚糖、木聚糖保留率和木质素去除率分别为 88.3%、93.7% 和 56.5%。玉米芯在此优化条件下预处理后,添加纤维素酶 15 FPU/g、β-葡萄糖苷酶 64 CGU/g 和木聚糖酶 1 000 IU/g 组成的复合酶系酶解 72 h,其葡聚糖和

木聚糖酶解转化率分别达 96.2% 和 89.6%,总糖化率为 85.0%,1 000 g 干基玉米芯可获得可发酵单糖 593.1 g,是未处理的 3.53 倍。

(3) 玉米芯经 H-LAT 预处理后纤维素结晶度上升了 4.32%,X 射线衍射图谱表明玉米芯在 H-LAT 预处理后有部分结晶区变为无定形区,同时有少量结晶生成或结晶重定向;从结晶部分和非结晶部分累积衍射强度来看结晶区与无定形区同步下降,H-LAT 预处理对木质纤维素的结晶度影响具有双重作用。

(4) 红外光谱分析表明:H-LAT 预处理能打破纤维素的氢键连接;破坏木质素-碳水化合物复合体内部的酯键连接;同时使残余木质素分子结构受到一定的破坏,这些变化有效地降低了玉米芯的抗水解屏障,是其酶解率提高的根本原因。

### 参 考 文 献

- Somerville C, Youngs H, Taylor C, et al. Feedstocks for lignocellulosic biofuels[J]. *Science*, 2010, 329(5993):790-792.
- 马欢,刘伟伟,刘萍,等.微波预处理对水稻秸秆糖化率与成分和结构的影响[J]. *农业机械学报*, 2014,45(10):180-186. Ma Huan, Liu Weiwei, Liu Ping, et al. Effects of microwave pretreatment on enzymatic saccharification and lignocellulosic structure of rice straw[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(10):180-186. (in Chinese)
- 任天宝,邱盼,任秀娟,等.蒸汽爆破预处理玉米芯及其酶解工艺研究[J]. *可再生能源*, 2012,30(5):59-63. Ren Tianbao, Qiu Pan, Ren Xiujuan, et al. Steam explosion pretreatment and zymohydrolysis of corn cobs[J]. *Renewable Energy Resources*, 2012,30(5):59-63. (in Chinese)
- 曹红亮,杨龙元,袁巧霞,等.稻草、玉米芯调理牛粪堆肥成型育苗基质试验[J]. *农业机械学报*, 2015,46(3):197-202. Cao Hongliang, Yang Longyuan, Yuan Qiaoxia, et al. Experimental research of seedling substrate compressed of cattle manures [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015,46(3):197-202. (in Chinese)
- Yang B, Wyman C E. Pretreatment; the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol[J]. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2(1):26-40.
- 王振斌,张杰,王世清,等.超声波预处理对固定化纤维素酶活性的影响[J]. *农业机械学报*, 2011,42(3):150-155. Wang Zhenbin, Zhang Jie, Wang Shiqing, et al. Effect on activity of immobilized cellulase by ultrasound assisted pretreatment[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2011,42(3):150-155. (in Chinese)
- 王殿龙,艾平,鄢烈亮,等.稀酸稀碱预处理的稻秸两步厌氧发酵性能分析[J]. *农业机械学报*, 2015,46(2):168-175. Wang Dianlong, Ai Ping, Yan Lieliang, et al. Property analysis of two-step anaerobic digestion of rice straw pretreated by dilute acid and dilute alkali[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015,46(2):168-175. (in Chinese)
- Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18):2014-2018.
- Kim T H, Lee Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18):2007-2013.
- Zhang C, Pang F, Li B, et al. Recycled aqueous ammonia expansion (RAAE) pretreatment to improve enzymatic digestibility of corn stalks[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 138:314-320.
- Yoo C G, Nghiem N P, Hicks K B, et al. Pretreatment of corn stover using low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) process [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21):10028-10034.
- Kim T H, Lee Y Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121(1-3):1119-1131.
- Wei C J, Cheng C Y. Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the structural features and the enzymatic hydrolysis of rice straw [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(10):1418-1426.
- Yu G, Afzal W, Yang F, et al. Pretreatment of *Miscanthus × giganteus* using aqueous ammonia with hydrogen peroxide to increase enzymatic hydrolysis to sugars[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2014, 89(5):698-706.
- Kim S B, Lee Y Y. Fractionation of herbaceous biomass by ammonia-hydrogen peroxide percolation treatment [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 57(8):147-156.
- Shao Q, Cheng C, Ong R G, et al. Hydrogen peroxide presoaking of bamboo prior to AFEX pretreatment and impact on enzymatic

- conversion to fermentable sugars[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142:26 – 31.
- 17 Zhao C, Ding W, Chen F, et al. Effects of compositional changes of AFEX-treated and H-AFEX-treated corn stover on enzymatic digestibility[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155:34 – 40.
- 18 NREL. Standard Biomass Analytical Procedures (LAPs) [R]. NREL (National Renewable Energy Laboratory), 2010.
- 19 Nlewem K C, Thrash Jr M E. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101:5426 – 5430.
- 20 Jin Y, Huang T, Geng W, et al. Comparison of sodium carbonate pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw stem and leaf to produce fermentable sugars[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137:294 – 301.
- 21 Zeng Y, Zhao S, Yang S, et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27:38 – 45.
- 22 Himmel M E, Ding S, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813):804 – 807.
- 23 陈尚妍, 勇强, 徐勇, 等. 稀酸预处理对玉米秸秆纤维组分及结构的影响[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(6):13 – 19.  
Chen Shangxing, Yong Qiang, Xu Yong, et al. Effects of dilute acid pretreatment on fibre components and structure of corn stover [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2011, 26(6):13 – 19. (in Chinese)
- 24 Pang F, Xue S, Yu S, et al. Effects of combination of steam explosion and microwave irradiation (SE-MI) pretreatment on enzymatic hydrolysis, sugar yields and structural properties of corn stover[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 42:402 – 408.
- 25 秦伟军, 陈叶福, 赵换英, 等. 玉米芯碱液预处理条件优化[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(4):248 – 253.  
Qin Weijun, Chen Yefu, Zhao Huanying, et al. Optimization of pretreatment conditions for corn cob with alkali liquor [J]. *Transactions of the CSAE*, 2010, 26(4):248 – 253. (in Chinese)
- 26 吕海丹, 柯扬船. 玉米芯的 2 步法预处理及其酶解条件优化研究[J]. *高校化学工程学报*, 2013, 27(2):236 – 242.  
Lü Haidan, Ke Yangchuan. Investigations of two-step pretreatment and enzymatic hydration conditions optimizations of corn cob [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2013, 27(2):236 – 242. (in Chinese)
- 27 黄仁亮, 刘锐, 苏荣欣, 等. 玉米芯氨水预处理及酶解工艺研究[J]. *化学工程*, 2009, 37(9):40 – 43.  
Huang Renliang, Liu Rui, Su Rongxin, et al. Aqueous ammonia pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn cobs [J]. *Chemical Engineering*, 2009, 37(9):40 – 43. (in Chinese)

~~~~~

(上接第 192 页)

- 34 Lehmann J, Rillig M C, Thies J, et al. Biochar effects on soil biota—a review [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(9):1812 – 1836.
- 35 Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6):1301 – 1310.
- 36 Kalbitz K, Solinger S, Park J H, et al. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review[J]. *Soil Science*, 2000, 164(5):277 – 304.
- 37 McLauchlan K K, Ilobbie S E. Comparison of labile soil organic matter fractionation techniques [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2004, 68:1616 – 1625.
- 38 王苑, 宋新山, 王君, 等. 干湿交替对土壤碳库和有机碳矿化的影响[J]. *土壤学报*, 2014, 51(2):342 – 349.  
Wang Yuan, Song Xinshan, Wang Jun, et al. Effect of drying-rewetting alternation on soil carbon pool and mineralization of soil organic carbon [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51(2):342 – 349. (in Chinese)
- 39 房飞, 胡玉昆, 公延明, 等. 荒漠土壤微生物碳垂直分布规律对有机碳库的表征作用 [J]. *中国沙漠*, 2013, 33(3):777 – 781.  
Fang Fei, Hu Yukun, Gong Yanming, et al. Desert soil organic carbon characterized by the vertical distribution of soil microbial carbon [J]. *Journal of Desert Research*, 2013, 33(3):777 – 781. (in Chinese)
- 40 Liu Z, Demisie W, Zhang M. Simulated degradation of biochar and its potential environmental implications [J]. *Environmental Pollution*, 2013, 179:146 – 152.
- 41 吴鹏豹, 解钰, 漆智平, 等. 生物炭对花岗岩砖红壤团聚体稳定性及其总碳分布特征的影响 [J]. *草地学报*, 2012, 20(4):643 – 649.  
Wu Pengbao, Xie Yu, Qi Zhiping, et al. Effects of biochar on stability and total carbon distribution of aggregates in granitic laterite [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2012, 20(4):643 – 649. (in Chinese)
- 42 Hammes K, Torn M S, Lapenas A G, et al. Centennial black carbon turnover observed in a Russian steppe soil [J]. *Biogeosciences Discussions*, 2008, 5(1):1339 – 1350.
- 43 Cheng C H, Lehmann J, Engelhard M H. Natural oxidation of black carbon in soils: changes in molecular form and surface charge along a climosequence [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2008, 72(6):1598 – 1610.
- 44 Lehmann J. Bio-energy in the black [J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(7):381 – 387.