

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2021.03.009

磷酸钠组合氧气预处理提高玉米秸秆 酶解糖化效率

徐 忠¹, 宁艳春², 严生虎¹, 岳 军², 张 跃¹, 徐友海², 王利群¹, 卿 青¹

(1. 常州大学 药学院, 江苏 常州 213164; 2. 中国石油公司吉林石化研究院, 吉林 吉林 132021)

摘要:以高效的预处理方法打开木质纤维素结构,促进纤维素在酶水解过程中的酶解糖化效率是高效制备生物物质乙醇的关键。以磷酸钠溶液作为预处理试剂结合氧气在高温高压条件下对玉米秸秆进行预处理,并通过扫描电子显微镜(SEM)与傅里叶变换红外光谱(FT-IR)对预处理前后玉米秸秆的形貌和化学态进行了分析。采用响应面法考察了磷酸钠的质量分数、氧气压力、反应温度和预处理时间对于还原糖得率的影响,对反应体系进行了优化,并建立二次回归模型并进行验证。结果表明在最佳预处理条件为磷酸钠质量分数 7.6%、氧气压力 0.76 MPa、反应温度 140 ℃ 和处理时间 37 min 时,得到玉米秸秆酶水解的还原糖得率最高为 90.9%,葡萄糖得率为 61.0%。该预处理方法具有较强的脱除木质素能力,能够有效提高酶水解过程中还原糖得率。

关键词:预处理;玉米秸秆;磷酸钠;氧气;响应面法

中图分类号:S 216.2

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2021)03-0065-10

Improvement of Enzymatic Saccharification Efficiency of Corn Stover by a Sodium Phosphate and Oxygen Combined Pretreatment

XU Zhong¹, NING Yanchun², YAN Shenghu¹, YUE Jun², ZHANG Yue¹,

XU Youhai², WANG Liqun¹, QING Qing¹

(1. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. PetroChina Jilin Petro-Chemical Company Research Institute, Jilin 132021, China)

Abstract: Opening the lignocellulose structure by an efficient pretreatment method to enhance the enzymatic digestibility of pretreated biomass is essential to highly efficient production of bioethanol. Corn stover was pretreated by sodium phosphate with the combined effect of oxygen as an oxidant under high temperature and high pressure. The morphology and chemical state of corn stover before and

收稿日期:2020-12-12。

基金项目:江苏省自然科学基金面上资助项目(BK20181465);中国石油股份有限公司资助项目(2017A-4807)。

作者简介:徐忠(1995—),男,江苏盐城人,硕士生。通信联系人:卿青(1982—),E-mail:qqing@cczu.edu.cn

引用本文:徐忠,宁艳春,严生虎,等.磷酸钠组合氧气预处理提高玉米秸秆酶解糖化效率[J].常州大学学报(自然科学版),2021,33(3):65-74.

after pretreatment were analyzed by SEM and FT-IR. The impacts of the sodium phosphate concentration(w/v), the oxygen pressure, the reaction temperature and the pretreatment time on the reducing sugar yields were investigated by the response surface method. A quadratic regression model was established and verified to optimize the reaction system. The optimum pretreatment conditions were found to be 7.6% Na_3PO_4 concentration, under the oxygen pressure of 0.76 MPa, and reacted at 140 °C for 37 min. The optimized reducing sugar yield was 90.9% and the glucose yield was 61.0%. This method had a strong ability to remove lignin, which could effectively improve the yield of reducing sugar in the process of enzymatic hydrolysis.

Key words: pretreatment; corn stover; sodium phosphate; oxygen; response surface method

日益严峻的能源和环境问题使人类迫切需要寻找一种清洁、可再生的化石燃料替代品。因此,以木质纤维素为原料的生物质能源和生物基化学品近年来备受关注^[1-2]。玉米秸秆(Corn Stover,CS)是中国重要的农业废弃物,因其分布广泛,采收价格低廉而成为生产燃料乙醇最具吸引力的原料之一^[3-5]。虽然利用木质纤维素生产能源的前景很美好,但其生产技术仍存在诸多瓶颈问题有待突破,这主要是其自身结构的顽固性所造成的。因此,为提高酶水解过程中纤维素酶对于纤维素的可及度^[6],对木质纤维素进行预处理显得尤为重要^[7]。碱法预处理是现有预处理方法中应用最广泛的方法之一,对木质纤维素底物中的木质素具有较好的去除效果^[8-9]。碱预处理过后的底物通常呈现多孔状态,对纤维素酶的可及性较高^[10]。传统的碱预处理常采用氢氧化钠或氨水等强碱性试剂,反应后得到的“黑液”难以处理,极易造成环境污染^[11]。近年来,采用弱碱性的碱性盐对木质纤维素底物进行预处理的研究开始受到关注,这主要是因为碱性盐具有腐蚀性小且易于回收等优点^[12-13]。李坤等^[14]使用亚硫酸钠对甘蔗渣进行预处理,并通过对浆料进行酶解测定酶解液中葡萄糖与木糖的总糖得率来评价预处理效果,发现在使用18%的亚硫酸钠,160 °C保温1 h的条件下,总糖得率达73.9%;尉慰奇等^[15]利用10%的亚硫酸钠与3%的氢氧化钠的组合溶液在170 °C下对桉木进行预处理,保温3 h,葡萄糖与木糖的总糖得率达76.1%。尽管上述预处理方法相对于常规预处理在还原糖得率上略有提高,但仍存在碱性盐浓度较大,处理时间较长等缺陷。预处理结束后,剩余的黑液在处理上仍存在问题,目前实验室中常采用酸中和的处理方式调节黑液的pH,同时可以使木质素脱钠,再次成为不溶性物质进而被分离出来。

有关文献报道,碱预处理过程中搭配氧化剂可以深层次的脱除木质纤维素固体中的木质素^[16],常选用的氧化剂有臭氧、氧气和过氧化氢。其中氧气是一种强氧化剂,分子中有2个未成对电子,在碱性条件下木质素酚型结构中的酚羟基发生电离,给出电子使氧气形成 $\text{OO}\cdot$,并与木质素发生游离基反应,分子氧在反应过程中逐渐被还原^[17]。采用磷酸钠组合氧气预处理改善CS的酶水解性能,通过响应面法(Response Surface Method)进行多元回归分析,分别考察了磷酸钠质量分数、氧气压力、反应温度和时间对于预处理效果的影响,并通过对预处理前后底物的表征,分析其反应机制。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

实验所用的CS来自吉林省吉林市附近的农田,将CS清洗烘干后粉碎至0.4~0.9 mm待用。实验中用到的主要化学药品,如十二水合磷酸钠(纯度 $\geq 98.0\%$)购自江苏强盛功能化学股份有限公司,氧气(纯度 $\geq 99.5\%$)购自常州华阳气体有限公司,纤维素酶(C109262, 10 000 U/g)购自上海阿拉丁试剂有限公司,木聚糖酶(C10063192, 10万 U/g)购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

CS的碱性盐氧化预处理是在100 mL的高温高压间歇反应釜(镇江丹徒通用电气设备有限公司)中进行的,该装置包含不锈钢压力容器、用于加热反应器的夹套、温度探针、压力表、通气阀以及搅拌装置。首先将一定量的CS添加至不同质量分数的磷酸钠溶液中,再将两者转移至反应器中并密封反应器,随后通入氧气置换空气并升至指定压力,将反应器在500 r/min下加热至所需温度,并维持相应的反应时间。预处理之后,将反应器放置于冰水浴中降温,真空过滤分离固体和液体。收集预处理液以测定溶解的单糖和木质素。固体样品冲洗至中性,40 ℃以下干燥收集备用。相应的计算式见式(1)~式(3):

$$R_s = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$R_c = \frac{m_1 \times w_{c_1}}{m_0 \times w_{c_0}} \times 100\% \quad (2)$$

$$D = (1 - \frac{m_1 \times w_1}{m_0 \times w_0}) \times 100\% \quad (3)$$

式中: R_s 为固体回收率,%; m_0 为玉米秸秆起始固体质量,g; m_1 为预处理后回收的固体质量,g; R_c 为纤维素回收率,%; w_{c_0} 为预处理前原料中纤维素含量,%; w_{c_1} 为预处理后固体中纤维素含量,%; D 为各组分去除率,%; w_0 为预处理前原料中该组分含量,%; w_1 为预处理后固体中该组分含量,%。

预处理组合强度因子(f_{CS})^[18]用于体现预处理条件对于底物的反应强度,受温度、时间和pH等变量的调控,相应计算式见式(4)

$$R_0 = t \times \exp\left(\frac{\theta_H - \theta_R}{14.75}\right)$$

$$f_{CS} = \log R_0 + |\text{pH} - 7| \quad (4)$$

式中: R_0 为强度因素; t 为反应时间,min; θ_H 为预处理温度,℃; θ_R 为参考温度,100 ℃;pH为预处理液的起始pH。

1.2.2 纤维素酶水解

按照美国国家再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory)实验方法对预处理前后的CS进行酶水解实验^[19]。称取1 g样品装入150 mL锥形瓶中,加入水35 mL与pH=4.8的醋酸/醋酸钠缓冲液12.25 mL。为了防止可能的微生物污染,添加0.25 mL四环素溶液(20 mg/mL)。纤维素酶与木聚糖酶的添加量分别为20 FPU/g纤维素和60 IU/g纤维素。将锥形瓶放置于50 ℃,160 r/min的恒温摇床中反应72 h,每隔一定时间取样并用离心机8 000 r/min离心5 min,取上清液用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定酶解液中单糖的含量。其中每个样品需设置3个平行样,还原糖得率按3个样品的平均值计算。糖得率的偏差值计算公式见式(5)

$$E_s = \sqrt{\sum (L_s - A_s)^2 / 3} \quad (5)$$

式中: E_s 为糖得率偏差,%; L_s 为糖得率的测量值; A_s 为糖得率的平均值。

1.2.3 实验设计

采用Design-Expert 8.0.6软件进行响应面设计与实验分析,设定固液比为1:10,选取反应温度(A)、预处理时间(B)、氧气压力(C)和磷酸钠质量分数(D)4个因素作为变量,以还原糖得率作为响应值,具体范围见表1。利用Box-Behnken设计法^[20]共设计出29组实验,对每个反应进行回归分析,便于估计组合的独立变量对反应的影响。比较 R^2 来评价模型的失拟性,利用 F 值和 P 值确定统计学的显著性。

1.3 分析方法

1.3.1 原料组分分析

用两步酸水解法对预处理前后的 CS 进行组分分析^[21]。用 0.22 μm 针式滤器(上海安普实验科技股份有限公司)过滤水解液,通过 HPLC 测定液体中的单糖含量。收集固体残留物于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干称重。将烘干后的固体于 550 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧 4 h,测定灰分含量,计算挥发掉的木质素质量。其中每个样品需设置 3 个平行样。各成分含量偏差值计算见式(6)

$$E_w = \sqrt{\frac{\sum (L_w - A_w)^2}{3}} \quad (6)$$

式中: E_w 为各组分含量偏差,%; L_w 为该组分含量的测量值; A_w 为该组分含量的平均值。

1.3.2 单糖质量分数的测定

利用 HPLC 测定液体样品中的葡萄糖与木糖的含量。检测系统为 Waters Alliance HPLC 系统,色谱柱为 Aminex HPX-87H(美国伯乐公司),柱温为 65 $^{\circ}\text{C}$,流动相为 0.5 mmol/L 硫酸,流速为 0.6 mL/min。相应的糖得率计算见式(7)~ 式(9):

$$Y_s = \frac{m_{he} \times 0.9 + m_{pe} \times 0.88}{m_c + m_h} \times 100\% \quad (7)$$

$$Y_g = \frac{m_g \times 0.9}{m_c + m_h} \times 100\% \quad (8)$$

$$Y_x = \frac{m_x \times 0.88}{m_c + m_h} \times 100\% \quad (9)$$

式中: Y_s 、 Y_g 和 Y_x 分别为还原糖得率、葡萄糖得率和木糖得率,%; m_{he} 和 m_{pe} 分别为水解液中六碳糖(葡萄糖、纤维二糖)和五碳糖(木糖、阿拉伯糖)的质量,g; m_g 和 m_x 分别为水解液中葡萄糖和木糖的质量,g; m_c 和 m_h 分别为水解底物中纤维素和半纤维素的质量,g。

1.3.3 固体结构表征

使用 SUPRA55 型扫描电子显微镜(SEM,德国蔡司)对预处理前后的 CS 表面形态进行表征,显示样品表面图像信息。利用 IS50 型傅里叶红外光谱仪(FT-IR,美国赛默飞世尔)测定样品的化学键变化,红外光谱范围为 4 000~500 cm^{-1} 。

2 结果与讨论

2.1 响应面模型分析

依据 Box-Behnken 设计原则,对磷酸钠组合氧气预处理效果进行优化,使得经预处理的固体在后续酶水解过程中获得较高的还原糖得率。选取反应温度(θ)、处理时间(t)、氧气压力(p)和磷酸钠质量分数(ω)4 个条件因素进行响应面实验。预处理后测定固体回收率、预处理固体酶解还原糖得率、葡萄糖得率和木糖得率等指标。从表 2 可看出,在反应温度 140 $^{\circ}\text{C}$ 、处理时间 60 min、氧气压力 1 MPa、磷酸钠质量分数 6%的条件下,组合预处理效果最佳,在酶水解过程中可得到最高的还原糖得率为 90.2%。

表 1 磷酸钠与氧气组合预处理中 4 个变量的编码水平

Table 1 Coding levels of four variables in the combined pretreatment of sodium phosphate and oxygen

因素	符号	编码水平		
		-1	0	1
温度/ $^{\circ}\text{C}$	A	100	120	140
时间/min	B	20	40	60
氧压/MPa	C	0.5	1	1.5
ω (磷酸钠)/%	D	2	6	10

表 2 预处理固体酶水解情况分析

Table 2 Analysis of enzymatic hydrolysis of pretreated solids

组号	因素				糖得率/%			固体回收率/%
	$\theta/^{\circ}\text{C}$	t/min	p/MPa	$\omega/\%$	还原糖	葡萄糖	木糖	
1	100	40	1	2	60.1	36.5 ± 3.1	18.5 ± 2.2	68.7 ± 3.8
2	120	40	0.5	2	61.1	38.6 ± 2.1	16.1 ± 1.7	68.2 ± 4.1
3	120	20	1	2	52.3	33.5 ± 2.8	14.6 ± 3.3	70.1 ± 3.3
4	100	20	1	6	75.8	48.3 ± 3.6	18.1 ± 3.1	60.4 ± 2.7
5	120	40	1.5	2	63.6	41.1 ± 2.9	16.0 ± 4.1	63.7 ± 3.4
6	100	40	1	10	85.5	56.0 ± 2.2	19.1 ± 1.3	53.2 ± 2.8
7	120	60	1	2	69.4	44.1 ± 2.8	16.5 ± 3.5	59.7 ± 3.1
8	100	40	1.5	6	83.6	57.3 ± 1.7	19.5 ± 1.2	55.4 ± 2.5
9	100	40	0.5	6	81.7	54.0 ± 2.5	20.3 ± 1.4	57.1 ± 1.4
10	140	40	1	2	74.8	48.8 ± 2.7	18.1 ± 3.5	59.1 ± 2.1
11	120	40	1	6	87.3	57.9 ± 1.9	20.6 ± 2.8	53.6 ± 2.3
12	100	60	1	6	85.9	57.0 ± 2.1	19.0 ± 1.4	54.2 ± 2.7
13	120	40	1	6	87.5	58.7 ± 2.3	20.3 ± 2.0	53.2 ± 3.2
14	120	40	1	6	86.1	56.0 ± 0.7	18.5 ± 1.5	54.0 ± 2.6
15	120	40	1	6	84.4	55.2 ± 2.8	19.6 ± 1.4	55.5 ± 3.4
16	120	60	0.5	6	87.5	56.5 ± 2.4	20.7 ± 3.3	52.7 ± 2.4
17	120	20	1.5	6	82.6	53.9 ± 2.7	19.6 ± 3.1	56.1 ± 1.6
18	120	20	0.5	6	81.6	54.5 ± 1.8	20.4 ± 2.4	55.9 ± 2.5
19	120	40	1	6	84.9	55.5 ± 3.2	19.7 ± 2.4	55.0 ± 1.8
20	140	40	1.5	6	85.0	56.1 ± 3.3	19.2 ± 2.8	54.8 ± 2.3
21	140	40	0.5	6	85.1	57.3 ± 2.1	18.5 ± 3.2	53.8 ± 2.7
22	120	40	0.5	10	83.4	56.2 ± 3.0	19.5 ± 2.2	53.3 ± 1.8
23	120	60	1.5	6	82.6	55.4 ± 3.2	19.4 ± 3.7	55.0 ± 2.1
24	120	40	1.5	10	89.3	59.3 ± 1.2	19.3 ± 0.7	52.2 ± 2.6
25	120	60	1	10	89.0	59.7 ± 0.9	19.8 ± 1.2	51.2 ± 1.7
26	140	20	1	6	83.7	57.2 ± 2.1	18.3 ± 1.5	54.6 ± 1.9
27	120	20	1	10	86.5	56.6 ± 3.1	18.7 ± 2.5	52.3 ± 2.1
28	140	40	1	10	88.6	60.8 ± 1.4	17.9 ± 2.4	52.7 ± 1.5
29	140	60	1	6	90.2	60.4 ± 0.4	20.2 ± 1.2	53.7 ± 1.1

分析表 2 中的实验数据,以预处理固体的还原糖得率(Y)为响应值,建立其与反应温度(θ)、处理时间(t)、氧气压力(p)和磷酸钠质量分数(ω)的二次多项回归方程: $Y=85.55+2.33\times\theta+2.16\times t+12.75\times\omega-3.65\times\theta\times\omega-10.76\times\omega^2$ 。对该回归方程进行方差分析(表 3),发现模型的 $P>F$ 值且小于 0.000 1,表明这个模型的构建是有意义的,它可以和实验数据有效拟合。在显著($P<0.05$)的条件下,基于回归方程的因素性显著性分析,回归模型中一次项 ω 因素 D($P<0.000\ 1$)表现显著,一次项 θ 因素 A($P=0.063\ 8$)和 t 因素 B($P=0.082\ 2$)不显著;二次项 ω^2 因素 D²显著;交互项 $\theta\times\omega$ 因素 AD($P=0.089\ 4$)不显著。其次,回归方程中系数为正值时,表示协同效应的发生;负值时,则表示拮抗效应。通过比较各影响因素的 P 值大小,发现影响预处理后固体还原糖得率的因素由强到弱为 D,A,B,C。模型的失拟项 $P=0.057\ 2>0.05$,表明失拟不显著,即该模型是稳定的,能较好地预测实际碱盐组合氧化剂预处理 CS 还原糖质量分数的变化情况。此外模型的 R^2 值为 0.930 9,说明实验值与预测值具有较高的相关性,模型能很好地反映实验情况,实验误差较小。

表 3 还原糖得率二次多项式模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of the quadratic polynomial model of reducing sugar yield

来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P > F$	显著性
模型	3 029.34	14	216.38	13.49	< 0.000 1	显著
A	64.97	1	64.97	4.05	0.063 8	
B	56.23	1	56.23	3.51	0.082 2	
C	2.51	1	2.51	0.16	0.698 5	
D	1 951.91	1	1 951.91	121.69	< 0.000 1	
AB	18.57	1	18.57	1.16	0.300 1	
AC	12.18	1	12.18	0.76	0.398 2	
AD	53.42	1	53.42	3.33	0.089 4	
BC	2.79×10^{-3}	1	2.79×10^{-3}	1.74×10^{-4}	0.989 7	
BD	7.95	1	7.95	0.5	0.493 1	
CD	2.99	1	2.99	0.19	0.672 6	
A ²	4.77	1	4.77	0.3	0.594	
B ²	28.88	1	28.88	1.8	0.201	
C ²	6.43	1	6.43	0.4	0.537	
D ²	794.95	1	794.95	49.56	< 0.000 1	
残差	224.57	14	16.04			
失拟项	209.37	10	20.94	5.51	0.057 2	不显著
误差项	15.2	4	3.8			
R ²					0.930 9	
总和	3 253.91	28				

由分析可知,磷酸钠质量分数在预处理过程中起关键作用。如图 1 所示,随着磷酸钠质量分数的增加,还原糖得率呈先上升后下降的趋势,其中上升的幅度很大,下降略微平缓。这可能是因为较高的碱浓度促使小部分纤维素降解为单糖或者寡糖,导致回收固体中纤维素所占比例下降,进而降低了酶解液中还原糖的得率(图 1(c)、图 1(e)、图 1(f))。反应温度和处理时间同样是影响预处理效果的重要因素。在实验温度范围内,随着反应温度的增加,样品水解还原糖得率逐步升高,这说明较高的反应温度确实能有助于脱除木质素与少量半纤维素(图 1(a)、图 1(c))。在一定温度下,较长的处理时间也可能导致纤维素降解的发生,使固体中纤维素的回收率下降,因此适当的缩短处理时间有助于还原糖得率的升高(图 1(e))。通过对模型的解析,确定了最佳的反应参数:反应温度 140 ℃,处理时间 37 min,氧气压力 0.76 MPa,磷酸钠质量分数 7.6%。

2.2 响应面模型验证

为了验证模型的准确性,根据模型提供的实验条件选取 3 组进行验证,具体条件见表 4。将实验值与模型预测值进行对比可知,实验结果与模型预测结果接近,表明构建的模型具备有效性。因此选择 7.6%磷酸钠和 0.76 MPa 氧气在 140 ℃下反应 37 min 作为后续实验的预处理条件。

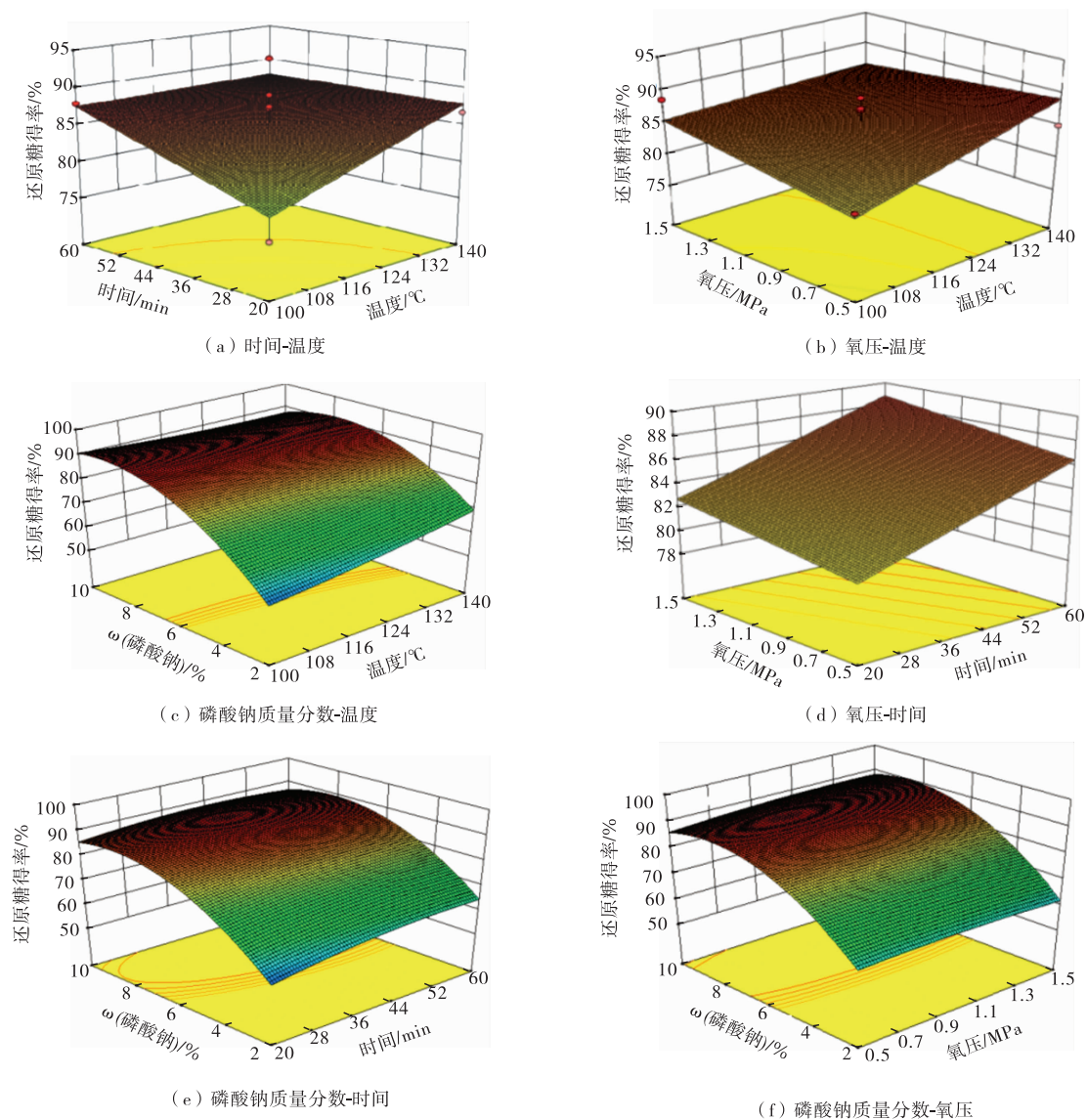


图 1 预处理之后反应温度、处理时间、氧气压力、磷酸钠质量分数两两因素对还原糖得率的响应面图

Fig.1 Response surface diagram of reaction temperature, treatment time, oxygen pressure, and sodium phosphate concentration on the yield of reducing sugar after pretreatment

2.3 磷酸钠组合氧气预处理对组分结构和酶水解的影响

为了进一步研究组合预处理对 CS 化学组分及酶水解效率的影响,对模型中固体回收率在 51.2%~70.1% 的 9 个样品以及最优条件下 (140 ℃,37 min,7.6%磷酸钠,0.76 MPa 氧气)得到的预处理样品 X 进行了组分及酶水解分析。

分析表 5 发现,随着预处理强度的增加,固体残留物的回收率降低,这主要是因为 CS 中的木质素和半纤维素去除率增加。在这些样品中,样品 25 的固体回收率最低,为 51.2%,其半纤维素去除率为 47.3%,木质素去除率为几组样品中最大值,达到 92.1%。与此同时,随着预处理强度的增大,酶水解过程中样品的还原糖得率和葡萄糖得率明显升

表 4 评价模型的精确度					
Table 4 Evaluation of the model precision					
温度/ ℃	时间/ min	ω(磷酸钠)/ %	氧压/ MPa	还原糖得率/%	
				实验值	预测值
140	37	7.60	0.76	90.9±1.2	91.9
	28	6.30	0.63	88.2±1.4	90.2
	20	5.24	0.50	85.8±1.8	86.0

高。这可能是与木质素和半纤维素去除后,玉米秸秆的孔隙增多,比表面积增大,从而提高了纤维素酶的可及性相关。

表 5 9 个样品的化学组分和酶水解比较

Table 5 Comparative analysis of chemical composition and enzymatic hydrolysis of 9 samples

样品	固体回 收率/%	ω (纤维 素)/%	ω (半纤维 素)/%	ω (木质 素)/%	纤维素回 收率/%	半纤维素 去除率/%	木质素去 除率/%	还原糖 得率/%	葡萄糖 得率/%	f_{CS}
原料	100.0	43.7 \pm 3.7	24.0 \pm 2.4	18.2 \pm 1.1						
3	70.1 \pm 3.3	59.4 \pm 2.9	26.6 \pm 0.8	8.6 \pm 0.8	95.3	22.3	66.9	52.3 \pm 3.1	33.5 \pm 2.8	7.75
10	59.0 \pm 2.1	63.7 \pm 2.2	27.3 \pm 0.7	6.8 \pm 0.4	86.0	32.8	77.9	74.8 \pm 3.1	48.8 \pm 2.7	7.96
9	57.1 \pm 1.4	66.7 \pm 2.7	27.6 \pm 1.1	4.5 \pm 0.6	87.2	34.3	85.8	81.7 \pm 2.1	54.0 \pm 2.5	8.15
19	55.0 \pm 1.8	68.0 \pm 3.1	27.3 \pm 0.4	4.0 \pm 0.2	85.6	37.4	87.9	84.9 \pm 3.2	55.5 \pm 3.2	8.27
20	54.8 \pm 2.3	68.7 \pm 1.5	26.9 \pm 1.2	3.4 \pm 0.2	86.2	38.5	89.7	85.0 \pm 3.2	56.1 \pm 3.3	8.84
29	53.7 \pm 1.1	71.9 \pm 1.9	23.1 \pm 0.7	2.7 \pm 0.5	88.4	48.3	91.9	90.1 \pm 0.5	60.4 \pm 0.4	9.01
25	51.2 \pm 1.7	71.2 \pm 2.2	24.7 \pm 1.5	2.8 \pm 0.2	83.2	47.3	92.1	89.0 \pm 0.7	59.7 \pm 0.9	9.06
28	52.7 \pm 1.5	71.7 \pm 2.4	23.1 \pm 1.6	2.8 \pm 0.2	86.5	49.2	91.8	88.6 \pm 1.5	60.8 \pm 1.4	8.96
X	54.2 \pm 2.4	69.9 \pm 2.6	25.3 \pm 1.1	3.5 \pm 0.3	86.7	42.9	89.5	90.9 \pm 1.2	61.0 \pm 1.5	8.97

对木质素去除率、半纤维素去除率和样品糖得率进行分析(图 2),进一步发现三者之间存在明显的线性关系:半纤维素去除率与还原糖得率与葡萄糖得率的 R^2 值分别为 0.813 4 和 0.858 5,木质素去除率与还原糖得率和葡萄糖得率的 R^2 值分别为 0.957 9 和 0.960 7。

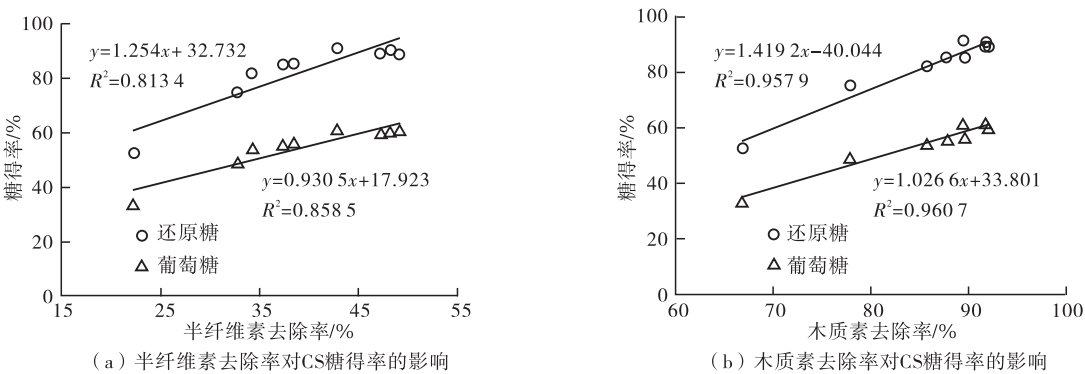


图 2 木质素去除率与半纤维素去除率对 CS 糖得率的影响

Fig.2 Effect of lignin and hemicellulose removal rate on CS sugar yield

2.4 CS 固体样品的表征

选用 SEM 和 FT-IR 分别对预处理前后的样品进行分析,以探究该组合预处理方法对于玉米秸秆结构的影响。检测选用的样品分别为:未处理的 CS、较弱处理条件下得到的样品 3 (2%磷酸钠、1 MPa 氧气、120 °C 和 20 min) 以及最佳条件处理得到的样品 X (7.6%磷酸钠、0.76 MPa 氧气、140 °C 和 37 min)。利用扫描电镜表征分析了不同预处理条件下样品的内部结构(图 3),未处理的样品表面规则光滑,结构紧密,进行酶水解时纤维素酶与纤维素结合位点稀少。样品 3 表面出现部分碎片物质,但仍贴合在纤维素表层,影响酶的渗入。但从图 3(c)中却可以看到样品 X 的表层木质素与部分半纤维素已被去除,出现了大量孔隙,下层机械组织暴露,外壁比表面积增加,酶解时酶与纤维素表层的接触度也因此提高。

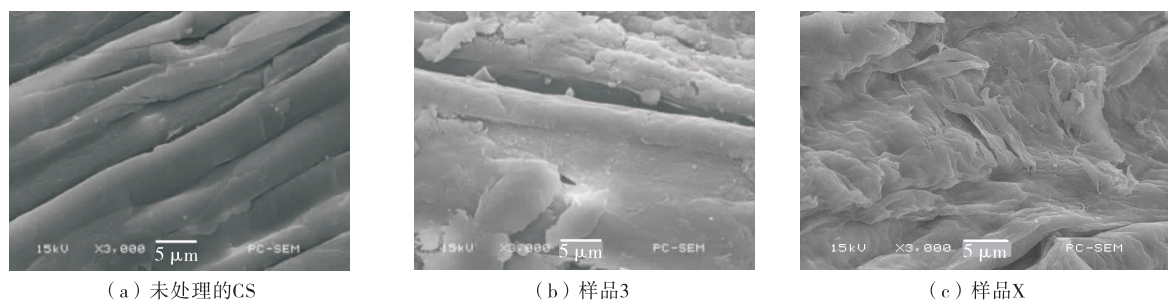


图3 不同处理条件下样品的SEM图

Fig.3 SEM image under different processing conditions

对未处理的CS、样品3与样品X进行红外光谱分析发现(图4),样品X在 904 , 1048 , 1157 , 2897 , 3420 cm^{-1} 处的吸收峰^[22]远强于未处理的CS样品吸收峰,其中 β -葡萄糖苷键出现在 904 cm^{-1} 处,C—O—C的反对称伸缩振动出现在 1157 cm^{-1} 处,而 2897 cm^{-1} 处是甲基和亚甲基的C—H伸缩振动峰, 3420 cm^{-1} 处是—OH的伸缩振动。这些峰值的增强均表明在预处理过程中去除了大部分的粗蛋白、粗脂肪、半纤维素和部分木质素,增加了纤维素的含量。而样品3的这些吸收峰相对于未处理原料来说也略有增加。随着处理条件的增强,可以发现样品X与样品3在 1734 cm^{-1} 处的吸收峰显著减弱,这是因为处理后的样品中羧基减少,木质素含量降低。 1264 cm^{-1} 处的吸收峰一般与C=O伸缩振动有关^[23],它一般存在于木质素与半纤维素中,从图中可以看出从CS原料到样品X,峰值都在逐步减少,说明样品中木质素与部分半纤维素被去除。 1509 cm^{-1} 与 1644 cm^{-1} 处与芳环上的C=C伸缩振动有关^[24],样品X与样品3相较于原料而言峰强度减弱,再次验证了预处理后样品中木质素含量减少。

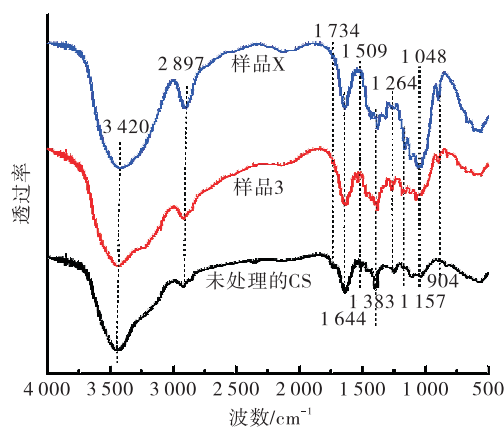


图4 不同处理条件下样品的红外光谱图

Fig.4 FT-IR image under different processing conditions

3 结论

首次以磷酸钠与氧气的组合法对玉米秸秆进行预处理,有效脱除了玉米秸秆中的木质素组分。相比于传统的强酸强碱预处理方法,碱性盐磷酸钠组合氧气的方法对反应装置的腐蚀更小且对木质素具有更强的脱除作用,因此经该方法预处理得到的玉米秸秆在酶水解过程中的还原糖与葡萄糖得率更高。通过响应面组合优化法分析,发现磷酸钠质量分数是预处理过程的关键影响因素并优化得到最佳的预处理条件。在最优条件下,预处理固体中89.5%的木质素被去除,预处理后的玉米秸秆固体72 h酶水解的还原糖得率与葡萄糖得率分别达到90.9%和61.0%。化学组分分析及SEM和FT-IR表征分析表明,磷酸钠与氧气组合预处理法可有效脱除木质素并去除部分的半纤维素,破坏木质纤维素结构,从而增强酶水解效果。由于本方法采用的碱性盐浓度较高,因此如能实现预处理液的循环再利用及碱性盐的回收,将进一步提高其应用性和工业化可行性。

参考文献:

[1]李永莲,刘文锋,林凯诚,等.木质纤维素预处理技术的研究进展[J].贵州农业科学,2013,41(10):158-161.

- [2]姜楠. 木质纤维素制备生物质能源与生物基化学品的研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [3]刘建胜. 我国秸秆资源分布及利用现状的分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [4]王志刚, 吕杰, 郝凤明, 等. 区域秸秆资源利用现状、存量估算及潜力分析: 以辽中县为例[J]. 资源与产业, 2016, 18(5): 71-77.
- [5]郭冬生, 黄春红. 近 10 年来中国农作物秸秆资源量的时空分布与利用模式[J]. 西南农业学报, 2016, 29(4): 948-954.
- [6]SINGH A, ABIDI A B, DARMWAL N S, et al. Saccharification of cellulosic substrates by *Aspergillus Niger* cellulase [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1990, 6(3): 333-336.
- [7]张鑫, 刘岩. 木质纤维素原料预处理技术的研究进展[J]. 节能与环保, 2005(3): 19-21.
- [8]PARK Y C, KIM J S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass[J]. Energy, 2012, 47(1): 31-35.
- [9]欧阳嘉, 李鑫, 董郑伟, 等. 碱法-酶法处理玉米秸秆的制糖工艺研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(3): 1-5.
- [10]CHENG Y S, ZHENG Y, YU C W, et al. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(6): 1768-1784.
- [11]葛建团, 徐敏, 王三反. 采用氯化钙预处理碱法麦草浆黑液的研究[J]. 工业水处理, 2003, 23(6): 37-39.
- [12]黄婷, 张帅, 金永灿, 等. 碳酸钠预处理对麦草酶水解糖化的影响[J]. 纤维素科学与技术, 2012, 20(1): 8-15, 25.
- [13]SEWSYNKER-SUKAI Y, SUINYUY T N, GUEGUIM KANA E B. Development of a sequential alkalic salt and dilute acid pretreatment for enhanced sugar recovery from corn cobs[J]. Energy Conversion and Management, 2018, 160: 22-30.
- [14]李坤, 付时雨, 陈成聪, 等. 弱碱性亚硫酸盐预处理对甘蔗渣纤维素酶酶解过程的影响[J]. 中华纸业, 2010, 31(12): 16-20.
- [15]尉慰奇, 武书彬, 刘立国. 碱性亚硫酸盐预处理对桉木酶解糖化的影响[J]. 林产化学与工业, 2011, 31(6): 29-34.
- [16]李辉勇, 黄可龙, 金密, 等. 稻草秸秆的碱性臭氧预处理效果[J]. 农业工程学报, 2010, 26(4): 264-268.
- [17]李新生, 陈中豪, 罗清. 废纸袋纸浆氧脱木素的实验[J]. 中国造纸, 2005, 24(3): 8-10.
- [18]CHUM H L, JOHNSON D K, BLACK S K, et al. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990, 24/25(1): 1-14.
- [19]SELIG M, WEISS N, JI Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass[R]. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008: 2-4.
- [20]张冕, 胡小莲, 姚芳芳. Box-Behnken 实验设计法优化红薯叶中绿原酸的提取工艺[J]. 德州学院学报, 2013, 29(4): 56-60.
- [21]SHUKLA M K, LAL R, EBINGER M. Principal component analysis for predicting corn biomass and grain yields [J]. Soil Science, 2004, 169(3): 215-224.
- [22]CHEN H M, ZHAO J, HU T H, et al. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: substrate digestibility, fermentability and structural features[J]. Applied Energy, 2015, 150(7): 224-232.
- [23]HAYKIR N I, BAHCEGUL E, BICAK N, et al. Pretreatment of cotton stalk with ionic liquids including 2-hydroxy ethyl ammonium formate to enhance biomass digestibility[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 41(1): 430-436.
- [24]SALEHI S M A, KARIMI K, BEHZAD T, et al. Efficient conversion of rice straw to bioethanol using sodium carbonate pretreatment[J]. Energy & Fuels, 2012, 26(12): 7354-7361.

(责任编辑:谭晓荷)