

不同方法预处理的玉米秸秆结构与酶解分析

史旭洋¹ 钱程² 刘艳¹ 刘心同¹ 尚鑫¹ 刘硕²
刘禹廷² 于蕴波² 张军² 任晓冬^{*1}

¹(吉林大学生命科学学院, 长春 130012) ²(吉林省公安厅物证鉴定中心, 长春 130000)

摘 要 在利用秸秆进行工业转化时,因为秸秆结构复杂,导致转化效率低,所以需对秸秆进行预处理,破坏秸秆复杂结构,提高转化效率。采用扫描电镜(SEM)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和X射线衍射技术分析不同预处理方式对玉米秸秆微观结构的影响,并利用纤维素酶对不同预处理秸秆进行酶解,评价预处理效果。扫描电镜结果表明,不同预处理方式对秸秆表面形态和秸秆整体结构造成不同程度的破坏,其中NaOH预处理后的秸秆表面结构坍塌明显,表明木质纤维素结构被有效打破。利用傅里叶变换红外光谱对不同预处理方式的秸秆进行分析,其中1600和1510 cm⁻¹为木质素的特征峰,NaOH预处理后的秸秆在此处的特征峰基本消失,表明NaOH预处理对秸秆木质素的去除效率比较明显。1744~1734 cm⁻¹为C=O伸缩振动特征峰,此峰的强度与木质素和半纤维素的含量有关,采用不同方法预处理后,此峰的吸收强度不同程度地减少,表明各种预处理方法不同程度地去除了秸秆的木质素和半纤维素。X-射线衍射分析表明,不同预处理后秸秆的结晶度均发生不同程度的改变,其中H₂SO₄预处理后秸秆的结晶度提高最大,达到43.4%。其中NaOH预处理秸秆后,用纤维素酶酶解60 h,使其酶解产糖量达到33.32 g/L。本研究分析了不同秸秆预处理方法的效果,为利用玉米秸秆生产生物化工产品提供了理论依据。

关键词 秸秆; 扫描电镜; 傅里叶变换红外光谱; X射线衍射; 预处理; 酶解

1 引言

木质纤维素是自然界上最丰富的自然资源,利用木质纤维素可以生产多种生物化工产品。目前,农业废弃物秸秆、麦秆等的处理成为影响环境和生态的重大问题。通过生物炼制的手段将秸秆、麦秆等木质纤维素制成生物化工产品,是秸秆高效转化的重要途径^[1]。利用木质纤维素进行生物炼制,首先需要对木质纤维素进行糖化,将木质纤维素转化为葡萄糖等单糖后,再通过发酵将葡萄糖转化成生物化工产品^[2]。木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素3种成分组成,其中半纤维素和木质素相互缠绕,将纤维素包裹起来形成一种相互缠绕的结构,这种复杂的空间结构使木质纤维素可以有效抵抗外部环境。在进行生物炼制时,这种特性使得纤维素酶降解纤维素的效率降低^[3]。因此,在利用木质纤维素时,需要对其进行预处理,打开纤维素、半纤维素和木质素相互缠绕的结构,以提高纤维素酶的水解效率。目前,工业上使用的预处理方法主要有H₂SO₄、NaOH、CaO和H₂O₂处理等方法^[4]。其中H₂SO₄等稀酸溶液在预处理过程中主要是破坏秸秆中的半纤维素成分,通过溶解部分半纤维素,从而打开秸秆本身纤维素、半纤维素和木质素相互缠绕的结构;NaOH、CaO和H₂O₂等碱性溶液主要是破坏秸秆中木质素成分,从而破坏秸秆原有的结构。

本研究采用不同方法对玉米秸秆进行预处理,分别用扫描电镜、傅里叶变换红外光谱和X-射线衍射对预处理的秸秆进行分析,探讨了不同的预处理方式对秸秆结构的影响。对不同方式预处理的秸秆进行了纤维素酶酶解效率评价,为利用玉米秸秆生产生物化工产品提供了理论依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 Series 高效液相色谱仪(德国安捷伦公司);FEI Quanta200 扫描电镜(荷兰 FEI 公司);Shimadzu IRPrestige-21 傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司);Bruker D8 晶体衍射仪(XRD,德国布鲁克公司);HZ-8802S 水浴恒温振荡器(上海智诚公司);722E 型可见分光光度计(上海光谱公司);标准品均购于自 Sigma-Aldrich 公司; H_2SO_4 、NaOH、CaO 和 H_2O_2 等试剂均为优级纯;实验用水为去离子水。玉米秸秆为吉林省种植的玉米的秸秆。

2.2 秸秆的预处理

秸秆的预处理参照文献[4]的方法。向 500 mL 摇瓶中加入 30 g 玉米秸秆,分别加入 60 mL 10% (m/V) H_2SO_4 、60 mL 10% (m/V) NaOH 或 12 g CaO,加水至总体积为 300 mL,使 H_2SO_4 、NaOH 或 CaO 的终浓度分别为 2%、2% 和 4%。用封口膜封口,121℃ 反应 1 h;另向 500 mL 摇瓶中加入 30 g 秸秆,之后加入 20 mL 30% H_2O_2 ,加水至总体积为 300 mL,即 H_2O_2 的终浓度为 2%,用 5 mol/L NaOH 调节至 pH 11.5,然后在 65℃ 水浴摇床中摇振 3 h。在 500 mL 摇瓶中加入 30 g 秸秆,加水至总体积为 300 mL,煮沸 1 h。

待上述各反应体系温度降至室温后,用八层纱布过滤预处理液,用去离子水冲洗处理后的秸秆,室温晾干后,-20℃ 保存,备用。

2.3 成分分析

玉米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的含量按美国能源部可再生能源实验室(NREL)的方法测定^[5]。

2.4 电镜观察

取少量预处理后的样品,分别烘干、粉碎、过筛,用导电双面胶带固定在样品台上,在真空环境下进行镀金处理,物料表面形成一层导电膜后,用扫描电子显微镜(SEM)进行观察。

2.5 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析

取预处理后的样品,以 1:100 比例同 KBr 混匀后,在玛瑙研钵中研磨至 200~300 目粉末,于红外压片机上制成透明薄片,利用傅里叶变换红外光谱仪进行测试,波数扫描范围为 4000~400 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,单一样品共进行 32 次累加。

2.6 X-射线衍射分析

取预处理后的样品,用 Bruker D8 晶体衍射仪进行纤维素的结晶度分析。其中,扫描范围 10°~50° (2θ),扫描速度 2°/min,扫描电压 30 kV,扫描电流 30 mA。样品的结晶度(CrI)采用公式(1)计算:

$$\text{CrI}(\%) = [(I_{002} - I_{\text{am}})/I_{002}] \times 100 \quad (1)$$

式中, I_{002} 为 002 晶格衍射角的峰值,即结晶区的衍射强度; I_{am} 为无定形区域衍射强度峰值。

2.7 纤维素酶酶解反应

取含 1.2 g 纤维素的上述预处理秸秆,加入 pH 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液和 15 FPU/(g 纤维素)的纤维素酶,补加水至 40 mL。置于水浴摇床上,50℃ 以 130 r/min 酶解 72 h,每 12 h 取样一次,离心,取上清液。利用高效液相色谱仪,采用伯乐 Aminex HPX-87H 柱测定葡萄糖浓度。高效液相色谱条件为:柱温 65℃,用 0.005 mol/L H_2SO_4 以 0.6 mL/min 的流速洗脱。

3 结果与讨论

3.1 不同预处理方式对秸秆成分的影响

秸秆中纤维素、半纤维素和木质素三者之间复杂的结构关系,严重阻碍了纤维素酶对纤维素的可及性,从而降低了纤维素酶水解产率。因此,需要采用化学和物理方法对秸秆进行预处理,尽可能除去秸秆中的木质素和半纤维素,打破秸秆原有的结构,从而提升酶解效率^[6]。采用不同方式预处理的秸秆成分如表 1 所示。经过不同方式预处理后,秸秆的纤维素含量均上升,而木质素含量均下降。 H_2SO_4 预

处理后秸秆的纤维素含量最高,达 59.8%,木质素含量为 16.8%。NaOH 预处理后,纤维素含量为 52.1%,木质素含量仅为 8.3%。CaO 和碱性 H₂O₂ 处理后,纤维素含量分别为 41.5% 和 49.9%,木质素含量分别为 14.7% 和 13.0%。相比于其它预处理方法,H₂SO₄ 预处理后,半纤维素含量下降最大(22.6%),表明 H₂SO₄ 预处理可有效去除半纤维素。热水预处理后,秸秆成分变化不明显。在所有预处理方式中,NaOH 去除木质素效果最好。在利用纤维素酶水解秸秆时,木质素会吸附纤维素酶,从而降低纤维素酶对纤维素的有效降解。通过预处理去除木质素,有利于提高纤维素酶对纤维素的降解效率。

3.2 电镜分析

利用扫描电镜观察到预处理后秸秆表面结构和形貌的变化,如图 1F 所示,未处理的秸秆表面被蜡质成分紧密包裹,十分光滑。稀 H₂SO₄ 处理后(图 1A),秸秆整齐、紧密的长管结构被打乱和切断,这是由于秸秆中的大部分半纤维素被稀酸水解^[7],秸秆的部分结构被破坏所致。NaOH 处理后的秸秆如图 1B 所示,由于 NaOH 溶解后,很多木质素被去除^[8],秸秆表面变得粗糙不平,而且表面结构有大片明显塌陷,部分纤维素被剥离,呈片状结构。图 1C 为碱性 H₂O₂ 预处理后的秸秆,可以看出,由于部分木质素的去除,出现很多的“碎片”。图 1D 为 CaO 预处理后的秸秆,相比 NaOH 处理和碱性 H₂O₂ 处理,CaO 处理对木质纤维素结构的改变不明显,因为木质素脱除效果不佳,秸秆表面结构未出现明显的坍塌情况。图 1E 为热水处理后的秸秆结构图,秸秆表面出现凹形小孔,而秸秆的长管结构未被切断,表面也没有出现大片的明显塌陷。

表 1 采用不同方式预处理后秸秆的成分分析
Table 1 Composition of corn stover pretreated with different methods

预处理方法 Pretreatment method	纤维素 Cellulose (%)	半纤维素 Hemicellulose (%)	木质素 Lignin (%)
H ₂ SO ₄	59.8	22.6	16.8
NaOH	52.1	30.2	8.3
CaO	41.5	32.6	14.7
H ₂ O ₂	49.9	29.1	13.0
热水 Hot water	38.7	30.8	18.8
未处理 Untreated	35.8	35.3	19.1

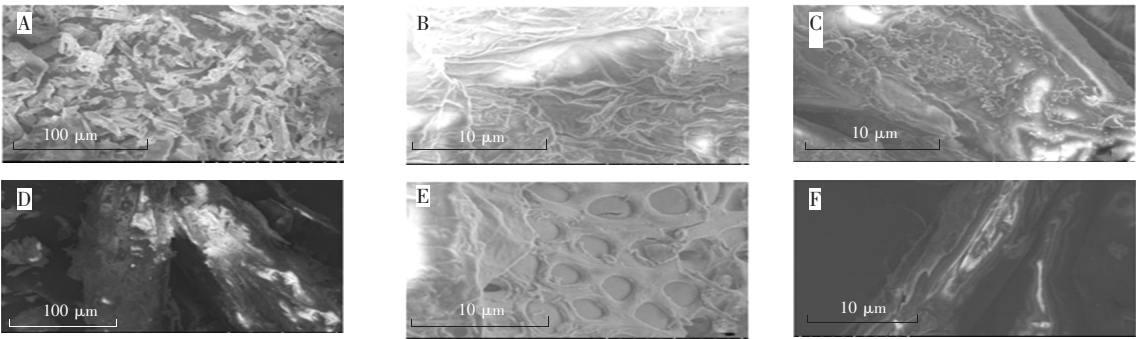


图 1 不同方法预处理后秸秆的电镜图：(A) H₂SO₄ 预处理后的秸秆；(B) NaOH 预处理；(C) 碱性 H₂O₂ 预处理后；(D) CaO 预处理后的秸秆；(E) 热水处理；(F) 未处理的秸秆
Fig. 1 Scanning electron microscopy (SEM) images of corn stove pretreated with (A) H₂SO₄；(B) NaOH；(C) H₂O₂；(D) CaO；(E) hot water；(F) SEM image of untreated corn stover

3.3 傅里叶变换红外光谱分析结果

利用傅里叶变换红外光谱对不同预处理的秸秆进行分析,结果如图 2 所示。预处理和未处理秸秆红外吸收峰的主要差异在于某些特征峰的增强、减弱或者消失,这表明采用不同预处理方法后,秸秆各成分的分子结构、空间结构或排列发生了变化。

3300 ~ 3500 cm⁻¹ 的红外吸收为分子间缔合态羟基 O—H 和酚羟基伸缩振动谱带。如图 2 所示,在 3300 ~ 3500 cm⁻¹,经过 NaOH 和碱性 H₂O₂ 预处理后,振动谱带明显减弱,说明碱处理能够打破纤维素分子间的氢键。而氢键的破坏能够使秸秆的纤维素结构发生变化,纤维素酶的可及度增加,有利于纤维素的降解^[9]。2910 cm⁻¹ 处的峰为 —CH₃、—CH₂ 伸缩振动吸收峰,相比于对照组,预处理后的样品其吸收峰减弱,表明预处理后部分碳链遭到破坏^[4]。1744 ~ 1734 cm⁻¹ 处的峰表示非共轭的酮和酯中的

C=O 伸缩振动, C=O 的伸缩振动与秸秆中的木质素和半纤维素有关^[10]。未处理的秸秆此吸收峰较为明显,而经过酸或碱处理后,吸收峰的强度都不同程度地下降,其中经过 NaOH 预处理后,吸收峰已基本消失,表明 NaOH 对木质素的去除效果较好。碱性 H₂O₂ 和 CaO 处理后的秸秆,在此波数处吸收峰强度也下降,但不及 NaOH 预处理后吸收峰强度变化明显。H₂SO₄ 预处理后的秸秆在此波数处的吸收峰强度减弱,但特征峰仍明显存在。经过预热水处理后的秸秆,1744 ~ 1734 cm⁻¹ 处特征峰的强度基本未变,表明热水预处理不能去除木质素或半纤维素。1600 和 1510 cm⁻¹ 处为木质素的特征峰,NaOH 处理的秸秆在此处的特征峰基本消失,说明经过强碱处理后的秸秆,木质素结构被较大破坏,木质素成分已经基本去除。碱性 H₂O₂ 和 CaO 处理后的秸秆,此特征峰的强度明显下降,表明碱对木质素的去除效果明显,但不及 NaOH 强烈。H₂SO₄ 和热水处理后的秸秆与未处理秸秆相比,在此处的吸收峰强度没有明显改变,表明 H₂SO₄ 和热水不能有效去除木质素。1431 和 1164 cm⁻¹ 处的吸收峰为纤维素的特征峰,在不同预处理前后变化不大,表明纤维素结构在预处理前后变化不大。

3.4 X-射线衍射分析结果

纤维素中存在结晶区和无定形两种区域,结晶区占纤维素整体的百分率称为纤维素的结晶度。纤维素的结晶度是衡量纤维素性能的重要指标,反映纤维素聚集时形成结晶的程度^[11]。利用 XRD 技术分析预处理后的秸秆,比较预处理前后秸秆结晶度变化,考察各种预处理方法的效果。经过不同的预处理后,由于秸秆中一些成分去除,秸秆结构发生改变,结晶度也发生改变。如表 2 所示,NaOH、碱性 H₂O₂ 和 CaO 这 3 种碱性方式预处理秸秆后,秸秆的结晶度分别为 40.5%、35.4% 和 14.2%。其中,NaOH 处理的秸秆结晶度上升幅度最大。NaOH 处理秸秆后,由于半纤维素和木质素这两种无定形区组分的溶出,使得纤维素含量增加,从而使整体结晶度大大提高^[12]。而碱性 H₂O₂ 和 CaO 的碱性比 NaOH 低,因此预处理后秸秆结晶度提升不大。H₂SO₄ 预处理秸秆后会引起纤维素基质的部分重结晶,因此秸秆的结晶度得到明显提升^[13]。由表 2 可见, H₂SO₄ 预处理后秸秆的结晶度最高(43.4%),结晶度的增加可能是由于 H₂SO₄ 去除了部分木质素和较多的半纤维素成分(表 1),使秸秆纤维结构发生重排,有序度增加,形成比较完整的结晶晶格,因此结晶度提高。热水预处理后秸秆的结晶度变化不明显(25.4%),表明热水预处理对秸秆的结构改变很小,其结晶度未发生明显改变。

3.5 纤维素酶酶解分析

在利用秸秆进行生物化工产品生产的过程中,需将秸秆进行酶解,这是秸秆利用的基础;为了提高秸秆的酶解效率,需要采用不同的预处理方法对秸秆进行处理,从而打开秸秆本身的结构。本研究以不同方式预处理的秸秆为底物,用纤维素酶进行酶解,评价预处理效果。酶解结果如图 3 所示,不同方式预处理的秸秆酶解效果差异较大。以未处理的秸秆为底物酶解,葡萄糖产量在 60 h 达到最高,浓度达到 11.95 g/L,而预处理秸秆酶解后葡萄糖产量都比未预处理秸秆高。其中 NaOH 预处理秸秆所产生的葡萄糖在 60 h 时达到最大浓度(33.32 g/L),明显高于其它预处理方式。NaOH 预处理后秸秆表面结构有明显坍塌(图 1),能够增加酶与底物接触面积。红外光谱分析表明,NaOH 预处理后,木质素得到有

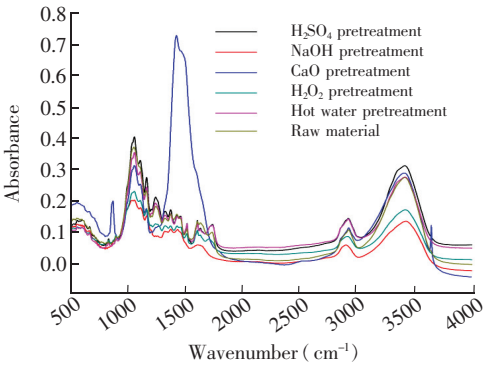


图 2 不同预处理方式秸秆的傅里叶变换红外光谱图
Fig. 2 Fourier transform-infrared (FT-IR) spectra of corn stover pretreated with different methods

表 2 不同预处理后秸秆的结晶度
Table 2 Crystalline of corn stover pretreated with different methods

	预处理方法 Pretreatment method	结晶度 Crystalline (%)
1	H ₂ SO ₄	43.4
2	NaOH	40.5
3	CaO	14.2
4	H ₂ O ₂	35.4
5	热水 Hot water	25.4
6	未处理 Untreated	22.3

效消除,有利于纤维素酶吸附到纤维素上,使得 NaOH 预处理后秸秆的酶解产糖量达到最大。 H_2O_2 预处理的秸秆酶解 60 h 时,产糖量最高(24.49 g/L)。 CaO 处理的秸秆酶解后在 60 h 时,产糖量最高达 15.88 g/L。电镜和红外光谱分析结果表明,碱性 H_2O_2 和 CaO 预处理与 NaOH 预处理结果相似,都是通过不同程度地溶解木质素,增加纤维素和纤维素酶的可及度,从而增加酶解产糖量。由于碱性 H_2O_2 和 CaO 碱性较弱,对木质素的溶解作用不强,因此酶解效果比 NaOH 预处理差。 H_2SO_4 预处理秸秆后,酶解产葡萄糖量在 60 h 时达到最大值(21.21 g/L),与未处理秸秆相比,糖化效果明显提升。电镜分析表明, H_2SO_4 处理后的秸秆表面出现明显塌陷,有利于纤维素酶附着。红外光谱分析表明,半纤维素和木质素等成分被去除,有利于纤维素酶作用于纤维素。热水预处理秸秆酶解后产糖量在 60 h 时达到最大值(13.13 g/L),相比于未处理秸秆,产糖量略有提升。从图 1 可见,热水预处理秸秆结构基本未发生变化;秸秆的红外光谱分析结果同样表明,热水预处理后,木质素和半纤维素等特征峰的强度均没有明显的改变,即秸秆的结构未明显改变,糖化产糖效率较低。

4 结论

采用不同方式预处理秸秆,利用扫描电镜、红外光谱和 X-射线衍射对不同方式预处理后的秸秆微观结构进行了分析,考察了不同的预处理方式对秸秆结构的影响。通过纤维素酶酶解预处理后的秸秆,对预处理秸秆效果进行了评价。本研究通过分析比较不同的方式预处理的秸秆,评价酶解效果,为利用秸秆高效生产生物化工产品提供了依据。

References

- Sarks C, Jin M, Sato T K, Balan V, Dale B E. *Biotechnol. Biofuels*, **2014**, 7: 73
- Saha B C, Cotta M A. *New Biotechnol.*, **2010**, 27(1): 10–16
- Papa G, Rodriguez S, George A, Schievano A, Orzi V, Sale K L, Singh S, Adani F, Simmons B A. *Bioresource Technol.*, **2015**, 183: 101–110
- Cao W, Sun, Liu R H, Yin R Z, Wu X W. *Bioresource Technol.*, **2012**, 111: 215–221
- Sluiter A, Hames B, Scarlata C. United States: National Renewable Energy Laboratory Golden, **2007**
- Brownell H H, Saddler J N. *Biotechnol. Bioengineer.*, **1987**, 29(2): 228–235
- Chen M, Zhao J, Xia L M. *Biomass Bioenergy*, **2009**, 13:1381–1385
- Li Q, Gao Y, Wang H S, Li B, Liu C, Yu G, Mu X D. *Bioresource Technol.*, **2012**, 125: 193–199
- ZHENG Ming-Xia, LI Lai-Qing, ZHENG Ming-Yue, WANG Xu, MA Hai-Ling, WANG Kai-Jun. *Environmental Science & Technology*, **2012**, 35(6): 27–31
- 郑明霞, 李来庆, 郑明月, 王旭, 马海玲, 王凯军. *环境科学与技术*, **2012**, 35(6): 27–31
- Gastaldi G, Capretti G, Focher B, Cosentino C. *Industrial Crops. Products*, **1998**, 8(3): 205–218
- LIU Shu-Chai. *Analysis and testing of pulping paper*. Beijing: Chemical Industry Press, **2004**, 19: 13–17
- 刘书钗. *制浆造纸分析与检测*. 北京: 化学工业出版社, **2004**, 19: 13–17
- TANG Hong-Tao, WANG Feng, LI Wei-Ming, LI An, LI Yan-Jie, HA Yi-Ming. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, **2012**, 26(3): 0535–0542
- 唐洪涛, 王锋, 李伟明, 李安, 李彦杰, 哈益明. *核农学报*, **2012**, 26(3): 0535–0542
- WANG Yong-Zhong, RAN Yao, CHEN Rong, LIAO Qiang, ZHU Xun. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, **2013**, 29(1): 225–231
- 王永忠, 冉尧, 陈蓉, 廖强, 朱恂. *农业工程学报*, **2013**, 29(1): 225–231

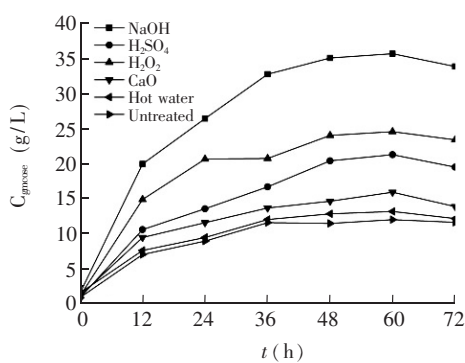


图3 不同方法预处理后的秸秆的纤维素酶降解结果

Fig. 3 Enzymatic hydrolysis of pretreated corn stovers hydrolyzed with cellulase

Structure and Enzymatic Hydrolysis Analysis of Corn Stover Pretreated with Different Pretreatment Methods

SHI Xu-Yang¹, QIAN Cheng², LIU Yan¹, LIU Xin-Tong¹, SHANG Xin¹, LIU Shuo², LIU Yu-Ting²,
YU Yun-Bo², ZHANG Jun², REN Xiao-Dong^{*1}

¹(School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China)

²(Certificate Appraisal Center of Public Security Department of Jilin Province, Changchun 130000, China)

Abstract In the process of industrial transformation of straw, due to the complicated structural relationship of straw itself, the conversion efficiency is low. Therefore, different pretreatment methods are required to pretreat straw to destroy the inherent structure of the straw and improve its enzymatic efficiency. In this study, the effects of different pretreatments on the microstructure of corn stover were investigated by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). Moreover, the hydrolysis of different pretreated corn stover with cellulase was studied. It was showed that the surface and structure of corn stover were damaged in some extent in pretreatment. The surface of corn stover pretreated with NaOH collapsed mostly, which showed that the structure of lignocellulose was broken effectively. The pretreated corn stover was analyzed with Fourier transform infrared spectroscopy. It was show that the characteristic peaks of ligin at 1600 and 1510 cm^{-1} disappeared for corn stover pretreated with NaOH, which indicated that the lignin was removed effectively. The peaks at 1744–1734 cm^{-1} of pretreated corn stovers (the characteristic peak of $\text{C}=\text{O}$), which related to ligin and hemicellulose, reduced in different extent. It was shown that the lignin and hemicellulose were removed with different pretreated methods. Moreover, it was shown that the crystallinities of pretreated corn stovers changed in different extent with X-ray scanning. The crystallinity of corn stover pretreated with H_2SO_4 got the maxium value of 43.4%. The effects of different pretreated methods were evaluated with corn stover hydrolysis by cellulase. The maxium value of glucose was 33.32 g/L. This study provided basis for the efficient production of biochemicals with different pretreated corn stover.

Keywords Corn stover; Scanning electron microscopy; Fourier transform infrared spectroscopy; X-ray diffraction; Pretreatment; Enzymatic hydrolysis

(Received 8 September 2017; accepted 14 July 2018)

This work was supported by the Project of Applied Innovation Plan of Ministry of Public Security of China (No. 2017YYCXJLST020).