

稻草超高压爆破前处理研究*

Studies on Pretreatment of Rice Straw by Ultra-high Pressure Explosion with a High-pressure Homogenizer

陈东¹, 陆琦², 黄俊¹, 黄日波²CHEN Dong¹, LU Qi², HUANG Jun¹, HUANG Ribao²

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China;

2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:应用高压均质技术对稻草进行超高压爆破前处理。稻草粉碎后经 1% 的 NaOH 加热处理, 保持悬浮状态下通过高压均质机实施超高压爆破。结果表明, 100M Pa 爆破使稻草颗粒悬浮液变为粘稠流体, 粒度显著变小, 超微结构由纤维状变为松软的中空多孔状, 纤维素结晶指数降低 19.76%, 耗碱量增加 163.41%。爆破对还原糖、木质素和灰分等成分含量几乎没有影响。处理后每克稻草用 5.8FPU 的纤维素酶, 6.6IU 的木聚糖酶和 0.5CBU 的 β -葡萄糖苷酶酶解 72h, 酶解率达 100.09%, 较对照提高 44.85%。超高压爆破显著破坏了木质纤维的超微结构, 增大了酶的作用面积。

关键词: 超高压爆破 前处理 稻草

中图分类号: TQ92 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)02-0180-05

Abstract Rice straw was treated by Homogenization in a constant suspended state with a homogenizer, a process termed as ultra-high pressure explosion (UHPE). The stalk of rice straw was grinded into powder, heated in 1% NaOH solution, then 100M Pa UHPE-treated through a homogenizer under a constant suspended state. The results verified that UHPE changed the suspension of rice straw powder into a stick fluid. The granularity determination and scanning electron microscope observation confirm that UHPE can decrease the granularity of rice straw powder significantly and disrupt the lignocellulosics microstructure of rice straw from a rigid and highly ordered fibril to a distorted, poly-porous and "center empty" structure. UHPE also decreased 19.76% of the crystallinity index of cellulose and increased 163.41% of NaOH consuming. However, the effect of UHPE on the contents of reduced sugar, lignin and ash was minor. After pretreatment, the enzymatic digestibility of rice straw reached to 100.09%, a complete hydrolysis within 72h by a low enzymes loading, 5.8FPU of cellulase, 6.6IU of xylanase and 0.5CBU of β -glucosidase per gram substrate, 44.85% higher than that of NaOH treated control sample. The result that UHPE disrupted the microstructure of lignocellulosic biomass was not observed in previous investigation.

Key words ultra-high pressure explosion, pretreatment, rice straw

我国农业秸秆的年产量高达 7 亿多吨, 稻草占

1%, 资源极为丰富^[1]。稻草秸秆中所含的纤维素和半纤维素组分可以水解成葡萄糖、木糖等单糖, 经微生物发酵转化为生物质能源^[2]或生物化工原料^[3]。开发利用稻草秸秆具有重要意义。不过, 与其它木质纤维材料一样, 稻草秸秆的纤维素、半纤维素、木质素等组分相互结合构成一个相当坚实的木质纤维结构, 无法彻底酶解或直接用于微生物发酵, 酶解前需进行前

收稿日期: 2008-11-17

作者简介: 陈东 (1962-), 男, 博士研究生, 主要从事微生物技术和生物质能源研究工作。

* 国家自然科学基金项目 (20666002), 广西自然科学基金项目 (桂科配 0728001), 广西重点实验室培育基金项目 (07-109-001A) 广西科学院基金项目 (08Y16SW04) 资助。

处理^[4]。对稻草已进行了多种前处理研究,如微波处理^[5]、氨爆处理^[6]、酸处理^[7]、碱和过乙酸处理^[8]、核辐射处理^[1,9]等。但是这些方法均存在一定的不足。处理后酶解效率较低或需酶量较大^[10,11]等问题。

高压均质技术自上世纪70年代发明以来主要用于液体或微粒悬浮溶液的加工,为生产乳化产品的重要工艺手段。80年代开始高压均质技术被用于破碎微生物细胞,已成功破碎大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus delbrueckii* ssp.)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、丝状真菌黑曲霉(*Rhizopus nigricans*)等菌种的细胞^[12,13]。另外,该技术还能够降低羧甲基纤维素的聚合度^[14]。高压均质的作用过程和蒸汽爆破、氨爆等木质纤维材料的前处理技术极为相似,即先对物料进行高压处理,然后将压力瞬间释放,产生爆破作用,使物料破碎^[12,13]。不同的是处理压力为液压,而且极高(30~200 MPa),远高于蒸汽爆破法(2.0~2.2 MPa)^[15]和氨爆法(约2.3 MPa)^[16]。因此,高压均质实质上是一个采用液压为处理手段的超高压爆破过程。该技术对微生物的破胞和降低羧甲基纤维素聚合度的作用暗示可以将它用于破坏木质纤维材料的结构,对生物质进行前处理。据此,我们利用高压均质设备对稻草进行超高压爆破前处理,显著提高了其酶解率。

1 材料和方法

1.1 稻草

稻草于2008年10月从广西南宁市郊区收割取回,自然风干,剪成约3cm长,用粉碎机粉碎,过40目筛,含水量约7%,干燥保存备用。

1.2 纤维素酶

纤维素酶是国药集团产品,来自绿色木霉,生化试剂级混合酶制剂。其滤纸活力和 β -葡萄糖苷酶活力按文献^[17]测定,木聚糖酶活力按文献^[18]的方法测定,分别为 87.67 ± 4.84 滤纸活力单位(FPU)/g、 7.46 ± 0.09 纤维二糖酶活力单位(CBU)/g和 99.35 ± 0.61 国际单位(IU)/g。测定 β -葡萄糖苷酶活力时用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定葡萄糖含量,葡萄糖测定试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司的产品。木聚糖酶的活力测定用桦树木聚糖作底物。

1.3 高压均质机

高压均质机是上海东华高压均质机厂产品。型号:GYB 40-10S,最大压力:100 MPa,最大流量:40 L/h。实验时在进料斗加装搅拌装置,搅拌速度70 rpm。

试验所用的其它试剂均为分析纯以上级别。

1.4 前处理

将稻草干粉用1.0%的NaOH配成6%的悬浮液,125℃加热120 min,自然冷却至常温,加入均质机进料斗,70 rpm搅拌使物料保持悬浮状态,然后通过均质机,循环物料并逐步升压,压力达到100 MPa时开始收集物料,为黑褐色粘稠浆状流体。用3号砂芯漏斗真空抽滤。滤液用于测定碱消耗量。滤渣用悬浮液同体积的蒸馏水洗涤3次,至pH值中性,真空滤干,低温真空干燥得处理样品(TS),常温干燥保存备用。为比较分析,对样品(SC)不作任何处理,碱处理对照样品(TC)只作1%的NaOH处理,不作爆破处理,过滤、水洗、干燥等与TS相同。

1.5 粒度测定

用Rise-2008型激光粒度分析仪测定,水为分散介质,70 rpm搅拌,40次/分钟循环。测定前仪器用国标微粒乳液GBW(E)120021(批号:20070201,平均粒径2.1 μ m)和德国Duke公司的微粒标准乳液(批号:28626,平均粒径0.08 μ m)校准。

1.6 X射线衍射分析

仪器为日本Rigaku粉末X射线衍射仪。测定的扫描角度为 $2\theta = 10^\circ \sim 40^\circ$,步进 0.02° ,扫描速度 $4^\circ/\text{min}$ 。纤维素的结晶度用结晶指数CrI表示,按Segal方法计算^[19]。具体为 $CrI = ((I_{002} - I_{am}) / I_{002}) \times 100\%$, I_{002} 为 $2\theta \approx 22.6^\circ$ 的衍射强度, I_{am} 为 $2\theta \approx 18.7^\circ$ 的衍射强度。

1.7 扫描电镜观察

用日立S-3400N扫描电子显微镜观察各样品的超微结构。按仪器指南制备样品。

1.8 成分分析

灰分含量按文献^[20]的方法测定。酸溶性木质素Klason木质素含量按文献^[21]的方法测定。酸溶性木质素的测定波长为240 nm,吸光系数为15。还原糖用DNS法^[22]测定,以葡萄糖为外标绘制标准曲线,其中,固体样品按文献^[21]用硫酸水解,取水解液用CaCO₃中和至pH值6.0后测定,酶解液的还原糖取上清液测定。

1.9 碱消耗量测定

用0.1 N的盐酸标准溶液滴定处理前碱溶液和处理后滤液的碱浓度,根据二者的浓度差计算NaOH的消耗量。

1.10 酶解

0.5 g绝干样品,加13 ml 0.05 M (pH值4.8)柠檬酸缓冲液,1.0 ml 0.4% NaN₃溶液和1 ml纤维素酶液(柠檬酸缓冲液配制),含纤维素酶2.9滤纸活力单位(FPU), β -葡萄糖苷酶0.25纤维二糖酶活力单

位 (CBU)和木聚糖酶 3.3 国际单位 (IU), 50°C, 160rpm 摇动下水解 72h 水解过程定时抽样 100 μ l, 用 DNS 法^[22]测定水解液的还原糖含量。以水解液的还原糖含量占酶解前样品总还原糖含量的百分比来表示酶解率。

2 结果与分析

2.1 超高压爆破对稻草结构的影响

采用高压均质机进行超高压爆破使稻草颗粒悬浮液变成粘稠状流体。粒度分布显著变小。对照样品 (SC) 的平均粒径为 380.8 μ m, NaOH 处理后略降低为 331.8 μ m (TC), 二者无显著性差异 ($P > 0.05$), 处理样品 (TS) 爆破处理后则显著降低为 61.54 μ m (图 1) 表明超高压爆破显著降低了稻草的粒度, 并使颗粒悬浮液变为流体。这对后续工艺, 如物料输送、加热、酶解等极为有利。

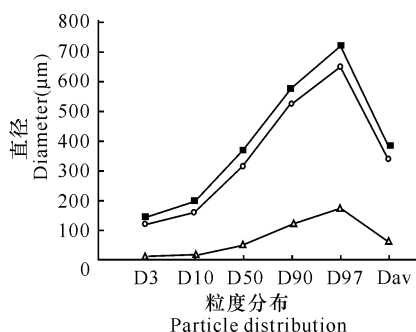


图 1 超高压爆破对稻草粒度分布的影响

Fig. 1 Effect of UHPE on the granularity distribution of rice straw

■: SC; ○: TC; △: TS; D3 D10 D50 D90 D97: 3% 分布概率的颗粒直径, Dav: 平均直径

D3, D10, D50, D90, D97 Diameter of particles distribution of 3% probability, Dav: average diameter.

用扫描电镜观察超高压爆破对稻草超微结构的作用发现, 未爆破的样品 (SC TC) 均保持原有整齐的纤维状结构。1% NaOH 处理使稻草表面略变光滑, 可能是表面的角质和硅晶结构被碱除去的原因。超高压爆破后的处理样品 (TS) 由纤维状结构变为无定形中空多孔结构 (图 2)。前处理这种显著破坏木质纤维材料超微结构的作用至今未见报道。陈洪章和李佐虎^[23]曾报道蒸汽爆破使麦草的纤维束之间松开, 纤维变得柔软。Kim 和 Lee^[24]报道了氨循环渗透使玉米秸秆微纤维束相互分离和暴露。但是, 这些报道的作用强度远不如超高压爆破。稻草由纤维状结构转变为中空多孔结构后, 将显著增大酶的作用面积, 对后续的酶解极为有利。

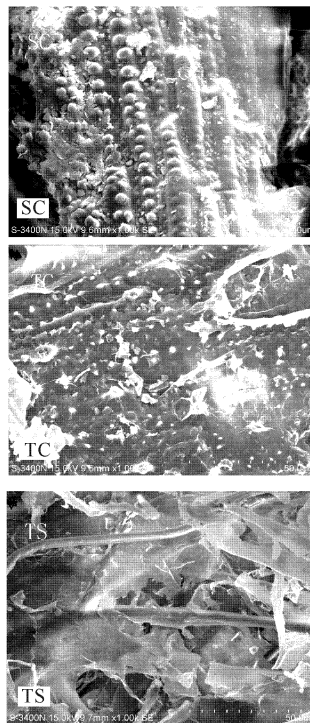


图 2 超高压爆破处理稻草的扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning electronic microscope pictures of UHPE-treated rice straw

2.2 超高压爆破对稻草纤维素结晶度的影响

图 3 结果显示, 各样品在 $2\theta = 22.6^\circ$ 附近均有结晶纤维素吸收峰, 对照样品 (SC) 的吸收峰最高, 碱处理对照样品 (TC) 次之, 爆破处理样品 (TS) 最低, 表明 NaOH 处理和超高压爆破均可降低结晶纤维素的含量。

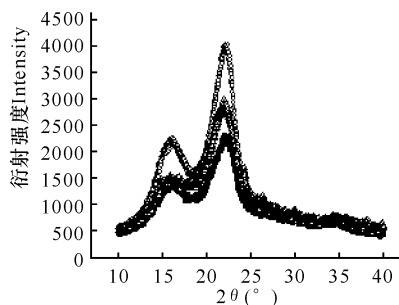


图 3 超高压爆破前后稻草 X 射线衍射图谱

Fig. 3 X-ray diffraction diagram of UHPE treated rice straw

■: TS; □: SC; △: TG

根据扫描图谱, 按 Segal 公式计算样品的结晶指数的结果见图 4。样品 SC 的 CrI 为 50.20%, NaOH 处理使 CrI 增至 57.94%, 而超高压爆破则使 CrI 显著降低为 46.49%。碱处理使木质纤维材料的结晶指数增加已有许多报道^[25, 26], 原因是按 Segal 公式计算的结晶指数只表征结晶纤维素占固体物质的百分含量, 碱处理可溶出无定形的木质素和半纤维素, 使结晶指数上升。不过, 即使无定形的木质素和半纤维素含量明显降低, 碱处理之后的超高压爆破却使结晶指

数显著降低,表明超高压爆破极大地破坏了纤维素的结晶结构,与其破坏超微结构的结果完全一致

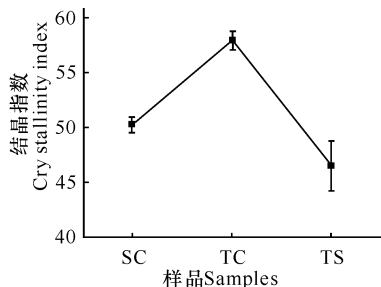


图 4 超高压爆破对稻草纤维素结晶指数的影响

Fig. 4 Effect of UHPE on the Crystallinity indexes of rice straw cellulose

2.3 超高压爆破对稻草成分的影响

在各样品的化学成分分析结果(表 1)中,比较样品 SC和 TC可见,NaOH处理使样品的 Klason木质素、酸溶性木质素和灰分含量显著降低,还原糖含量则明显上升。碱处理之后的超高压爆破处理(TS)只略降低 Klason木质素和酸溶性木质素的含量,由此使还原糖含量略为增加,灰分含量几乎没有变化,说明超高压爆破对稻草化学成分的作用不大。

表 1 超高压爆破对稻草成分的影响

样品 Samples	还原糖 Reduced sugar(%)	Klason 木质素 Klason- lignin(%)	酸溶性 木质素 aASL(%)	灰分 Ash (%)	合计 Total (%)
SC	51.00±0.21	26.10±0.14	10.23±0.02	16.00±0.12	103.33
TC	87.53±2.06	4.97±0.03	6.32±0.03	4.84±0.07	103.66
TS	91.16±0.14	4.69±0.03	6.02±0.03	4.79±0.07	106.66

2.4 超高压爆破对碱处理的耗碱量影响

表 2结果显示,用 1% NaOH处理稻草时,耗碱量为 31.43g/kg。碱处理后超高压爆破使耗碱量增加为 82.79g/kg,增加了 163.4%。这可以解析为超高压爆破破坏了稻草的超微结构,增大了碱的作用面积所致。

表 2 超高压爆破对碱处理 NaOH消耗量的影响

样品 Sample	稻草量 Rice straw (g)	处理液 NaOH浓度 aNCTS (%)	滤液 NaOH浓度 aNCFS (%)	NaOH耗量 [NaOH/稻草] [NaOH/ rice straw] (g/kg)
TC	61.05	0.98±0.003	0.78±0.015	31.43±1.170
TS	60.09	0.96±0.001	0.46±0.001	82.79±0.010

2.5 超高压爆破对酶解的影响

每克稻草样品添加的酶量含 5.8FPU的纤维素酶活力,6.6IU的木聚糖酶活力和 0.5CBU的β-葡萄

糖苷酶活力,酶解结果见图 5。作用 72h酶解率达到最大值。未处理稻草(SC)的酶解率只有 32.3%,1% NaOH处理(TC)使酶解率提高到 69.10%,与文献[8]采用相同的 NaOH浓度 121℃加热处理的结果(69%)相同。碱处理后超高压爆破使酶解率进一步提高到 100.09%,达到完全酶解,较碱处理对照提高了 44.85%。说明超高压爆破有效提高了稻草的酶解率。许多文献报道了前处理提高稻草的酶解率^[5-9],效果均不如本文。

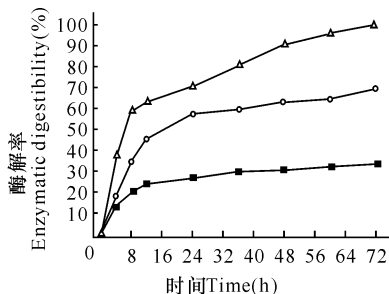


图 5 超高压爆破处理样品的酶解曲线

Fig. 5 Enzymatic hydrolysis curve of UHPE-treated samples

○—: TS; ■—: SC; △—: TC

一般认为,阻碍木质纤维材料酶解的主要原因有木质素、半纤维素以及硅晶结构(对稻草而言)等组分在纤维素表面的覆盖并形成的坚实复合结构,即木质纤维材料本身的结构,纤维素本身的高度结晶化,木质素对纤维素水解酶的非作用性吸附等^[10,15,19]。已有报道表明增加木质纤维材料的酶可及面积是提高酶解率的关键之一^[27-29]。由于超高压爆破显著破坏稻草的超微结构,增加了酶的作用面积(图 2),而对稻草的化学组分影响很小(表 2),我们认为超高压爆破可能是通过破坏木质纤维材料的结构来提高酶解率。

3 结论

利用高压均质设备进行超高压爆破前处理可以破坏稻草的超微结构,使之由坚实的纤维状变为松软的中空多孔状,显著增大了酶的作用面积,提高了酶解率。处理后稻草颗粒悬浮液转变为粘稠流体,对后续工艺,如物料输送、加热、酶解等极为有利。鉴于这种功能其它前处理方法从未报道,我们认为超高压爆破可能是一种有潜力的木质纤维材料前处理方法。

参考文献:

[1] 陈静萍,王克勤,彭伟正,等.⁶⁰Co-γ射线处理稻草秸秆对其纤维质酶解效果的影响[J].激光生物学报,2008,17(1): 38-42.
[2] 王丽,陈卫平.纤维质原料制燃料酒精的研究进展[J].酿酒科技,2005,129(3): 57-60.

- [3] 庄桂. 利用纤维素原料发酵生产乳酸的研究 [J]. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(1): 10-12.
- [4] 伊晓路, 孙立. 生物质秸秆预处理技术 [J]. 可再生能源, 2005, 120(2): 312-33
- [5] 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(1): 112-114
- [6] Gollapalli L, Dale B, Rivers D M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2002, 98-100: 23-35.
- [7] Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh M J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme and Microbial Technol, 2006, 40: 138-144.
- [8] Taniguchi M, Tanaka M, Matsuno R, et al. Evaluation of chemical pretreatment for enzymatic solubilization of rice straw [J]. Applied Microbiol Biotechnol, 1982, 14: 35-39.
- [9] Jin S B, Ko J K, Han Y H, et al. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment [J]. Bioresource Technol, 2009, 100(3): 1285-1290
- [10] 沈恒胜, 陈君琛, 倪德斌. 稻草硅化和溶解特性对稻草纤维降解率及其利用的影响 [J]. 中国农业科学, 2001, 34(6): 672-678.
- [11] 沈恒胜, 陈君琛. 稻草品质促变因素的系统评价与秸秆种类品质比较 [J]. 福建农业学报, 2003, 18(4): 222-226.
- [12] Geciova J, Bury D, Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review [J]. International Dairy J, 2002, 12: 541-553.
- [13] Middelberg A P J. Process-scale disruption of microorganisms [J]. Biotechnol Advances, 1995, 13(3): 491-551.
- [14] Flourey J, Desrumaux A, Axelos M A V, et al. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16: 47-53
- [15] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. Bioresource Technol, 2005, 96: 673-686.
- [16] Kim T H, Kim J S, Sunwoo C, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia [J]. Bioresource Technol, 2003, 90: 39-47.
- [17] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257-286.
- [18] Saddler J N, Yu E K C, et al. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels [J]. Applied and Environmental Microbiol, 1983, 45: 153-160.
- [19] Kim S, Holtzapple M T. Effect of structural features on enzymatic digestibility of corn stover [J]. Bioresource Technol, 2006, 97: 583-591.
- [20] National Renewable Energy laboratory (NREL). Determination of ash in biomass [S]. Laboratory Analytical Procedure, 2005.
- [21] National Renewable Energy laboratory (NREL). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [S]. Laboratory Analytical Procedure, 2007.
- [22] National Renewable Energy laboratory (NREL). Measurement of cellulase activities. In: Laboratory analytical procedure, Lap-006, Golden, Co, 1996.
- [23] 陈洪章, 李佐虎. 麦草蒸汽爆破处理的研究II: 麦草蒸汽爆破处理作用机制分析 [J]. 纤维素科学与技术, 1999, 7(4): 14-21.
- [24] Kim T H, Lee Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process [J]. Bioresource Technol, 2005, 96: 2007-2013.
- [25] Chang V S, Holtzapple M T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity [J]. Applied Biochem and Biotechnol, 2000, 84: 3-17.
- [26] Kasahara K, Sasaki H, Donkai N, et al. Modification of tencel with treatment of ferric sodium tartrate complex solution I—Effect of treatment condition [J]. Cellulose, 2001, 8: 23-28.
- [27] Grethlein H E. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates [J]. Nature Biotechnol, 1985, 3(2): 155-160.
- [28] Tanaka M, Ikesaka M, Matsuno R, et al. Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases [J]. Biotechnol Bioeng, 1988, 32(5): 698-706.
- [29] Burns D S, Ooshima H, Converse A O. Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1989, 20/21(1): 79-94.

(责任编辑: 邓大玉)