

# 磷酸-丙酮预处理对水稻秸秆酶解糖化的影响

曾青兰 李晓宏

咸宁职业技术学院生物工程系, 咸宁 437100

**摘要** 为提高水稻秸秆木质纤维素的能源化利用效率, 采用磷酸-丙酮对水稻秸秆进行预处理, 研究预处理水稻秸秆粒径、固液比、温度、时间对纤维素酶水解糖化率的影响, 并用扫描电镜分析预处理前后水稻秸秆结构的变化。结果表明, 水稻秸秆预处理的适宜条件为: 粒径 $\leq 380 \mu\text{m}$ 、固液比 1:8、温度 80 °C、处理时间为 1.5 h, 在此条件下预处理的水稻秸秆纤维素酶水解糖化率从未处理水稻秸秆的 18.6% 提高到预处理后的 65.4%。SEM 分析表明, 经磷酸-丙酮预处理, 水稻秸秆晶状结构遭到破坏, 并崩解为碎片, 从而使后续的纤维素酶水解糖化率显著提高。

**关键词** 磷酸; 丙酮; 水稻秸秆; 纤维素; 糖化; 预处理

**中图分类号** S 216.3; X 712 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0077-05

农作物秸秆是世界上最丰富的纤维素类物质之一。中国是农业大国, 每年产生农作物秸秆的总量约 7 亿 t<sup>[1]</sup>, 这是一类巨大的可利用的再生资源, 但目前对秸秆的利用率普遍较低, 约有 2/3 的秸秆被焚烧或弃置于自然环境而成为一大污染源。如何充分合理地利用这类可再生资源, 变废为宝, 是全球研究的热点之一, 而以农作物秸秆为代表的纤维素乙醇则是该热点中的一个亮点<sup>[2-3]</sup>。由于农作物秸秆中高聚合纤维素分子形成结构紧密的晶状结构, 外面被难以分解的木质素缠绕包围, 使得纤维素酶和半纤维素酶对其可及性差, 酶解糖化用酶量大且作用时间长、效率低、成本高<sup>[4-5]</sup>。因此, 酶水解之前的预处理是秸秆纤维素转化为燃料乙醇的关键技术, 已成为国内外研究的焦点之一<sup>[6-9]</sup>。通过预处理, 破坏木质素保护层, 改变纤维素的晶体结构, 使结晶纤维素成为无定型纤维素, 进一步打断部分  $\beta$ -1,4-糖苷键, 降低聚合度, 改变天然纤维素的结构, 破坏纤维素-木质素-半纤维素之间的连接, 降低纤维素的结晶度以及提高基质的孔隙率, 提高纤维素酶等对纤维素的可及性, 促进纤维素的降解, 达到提高酶解糖化率的目的。预处理技术主要有物理处理、化学处理、物理化学处理和生物处理<sup>[10-14]</sup>。其中, 化学处理中的酸预处理是研究较多的一种预处理方

式, 但所用酸一般为稀硫酸, 预处理多需 100 °C 以上的高温, 能耗大<sup>[15-16]</sup>, 对设备要求高, 且需增加后续酸处理工艺, 成本高, 对环境影响较大。因而, 仍未突破预处理技术的瓶颈。

笔者采用磷酸-丙酮预处理水稻秸秆, 使用磷酸在常压、较低温度下破坏木质素-碳水化合物之间的氢键从而溶解纤维素中的原纤维和半纤维素, 减弱纤维素和半纤维素水解成低聚合程度聚合物片段的作用, 同时从半纤维素上移去乙酰基团形成乙酸; 利用丙酮进一步剥离木质素并萃取纤维素和半纤维素<sup>[17]</sup>。利用磷酸和丙酮的挥发性差异回收溶剂并循环使用, 研究预处理水稻秸秆颗粒度、固液比、温度、时间对纤维素酶水解糖化率的影响; 用扫描电镜分析预处理前后水稻秸秆结构的变化, 并对磷酸-丙酮预处理后的水稻秸秆和未处理水稻秸秆的酶解得率进行考查, 以期为其他农作物秸秆的预处理和酶解糖化以及水稻秸秆乙醇化工业生产提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1) 水稻秸秆。水稻秸秆采自咸宁市白鹤村, 其主要成分为粗纤维素 34.7%、半纤维素 26.6%、木

收稿日期: 2013-01-10

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2011CDC092)、湖北省教育厅科学技术研究项目(B20129303)和咸宁职业技术学院级重点课题基金(2012yja002)

曾青兰, 副教授. 研究方向: 生物质降解与转化. E-mail: zql10106@163.com

质素 4.9%、粗蛋白质 5.2%。

2) 纤维素酶。纤维素酶购自宁夏和氏璧生物技术有限公司。纤维素酶(固体)酶活为: 滤纸酶(FPA)  $\geq 2.2$  万 U/g、内切酶活(Cx, CMC)  $\geq 30$  万 U/g、外切酶活(C1, 脱脂棉)  $\geq 1.2$  万 U/g、二糖酶活(Cb)  $\geq 1.0$  万 U/g。

3) 化学试剂。试验中的化学试剂均购自武汉厚积生物科技有限公司, 其中丙酮和磷酸均为化学纯。

## 1.2 试验方法

1) 水稻秸秆的预处理方法。将水稻秸秆剪成 2~3 cm 的小段, 烘干后粉碎至粒径  $\leq 830$ 、 $\leq 380$ 、 $\leq 250$ 、 $\leq 180$ 、 $\leq 150$   $\mu\text{m}$ , 烘干备用。称取 10 g 水稻秸秆粉装入小烧杯, 加适量磷酸与秸秆粉充分混匀, 一定温度下水浴一段时间后, 自然冷却至 50  $^{\circ}\text{C}$  左右后加 260 mL 丙酮充分搅拌 20 min, 将混合物置于旋转蒸发仪上(或回流装置中)加热至 58  $^{\circ}\text{C}$ , 去除丙酮和磷酸, 回收后的丙酮再用于预处理。将去除丙酮和磷酸的混合物移入烧杯, 加入 200 mL 蒸馏水, 充分混匀后过滤, 收集滤液和滤饼, 滤液是以磷酸为主并含有半纤维素分解物的溶液, 可用于制造磷肥, 滤饼用蒸馏水洗至中性, 烘干即得水稻秸秆预处理试样, 称质量后计算出预处理后所获试样占预处理前试样的比例, 并将其置于干燥器中备用。

2) 水稻秸秆的预处理试验设计。分别考查水稻秸秆粒径  $\leq 830$ 、 $\leq 380$ 、 $\leq 250$ 、 $\leq 180$ 、 $\leq 150$   $\mu\text{m}$ , 固液比[水稻秸秆粉(g): 磷酸(mL)]为 1: 6、1: 7、1: 8、1: 9、1: 10, 温度为 40、50、60、70、80、90、100  $^{\circ}\text{C}$ , 时间为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 共 4 个因素不同水平的预处理条件对水稻秸秆酶解糖化的影响。

3) 水稻秸秆的纤维素酶解方法。准确称取水稻秸秆试样, 用 pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液配成质量浓度为 4 mg/mL 溶液, 取该溶液 1.5 mL 置于 25 mL 具塞刻度试管中, 加入过量纤维素酶液, 在 50  $^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴中保温进行酶解反应试验, 用 DNS 法在 520 nm 处测定其中的葡萄糖质量, 再根据公式(1)计算出纤维素的糖化率<sup>[8,18]</sup>。

$$\text{糖化率} = \frac{\text{酶解生成的葡萄糖质量} \times 0.9}{\text{水稻秸秆样品的质量} \times \text{纤维素的质量分数}} \times 100\% \quad (1)$$

式中的 0.9 为修正系数; 水稻秸秆样品的质量 = 预处理后所获试样的质量/该试样占预处理前

试样的比例。

4) 预处理后水稻秸秆结构变化分析。利用 JSM-6390LV 扫描式电子显微镜(SEM)对预处理前后的水稻秸秆结构扫描观察, 分析磷酸-丙酮预处理对水稻秸秆结构的影响。扫描电镜的加速电压为 20 kV, 工作距离为 15 mm, 分辨率为 3 nm。

5) 试验仪器。旋转蒸发器 RE-52A, 购自上海亚荣生化仪器厂; 电热数字显示恒温水浴锅 Q/IKEF02-2001, 购自上海浦东荣丰科学仪器有限公司。

6) 数据统计分析。试验数据用 Excel 2003 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻秸秆粒径对水稻秸秆糖化的影响

取不同粒径的水稻秸秆粉 10 g, 以固液比为 1: 9 的比例加入 90 mL 磷酸搅拌均匀后于 70  $^{\circ}\text{C}$  保温预处理 2 h 后, 再用丙酮处理。粒径  $\leq 380$   $\mu\text{m}$  的水稻秸秆粉预处理后所获糖化率最高(表 1)。水稻秸秆粒径越小, 水稻秸秆的比表面积越大、水稻秸秆和磷酸及丙酮的接触面积也越大, 磷酸对其作用就越强, 丙酮的剥离和萃取效果则越好。但粒径过小, 纤维素会发生过度降解, 降低了预处理后水稻秸秆的收率, 从而使水稻秸秆的糖化率下降。另外, 过小的粒径也会在粉碎工序上消耗较多的能源和人力物力, 增加生产成本。因此, 适宜的水稻秸秆粒径应  $\leq 380$   $\mu\text{m}$ 。

### 2.2 固液比对水稻秸秆糖化的影响

取粒径  $\leq 380$   $\mu\text{m}$  的水稻秸秆粉, 分别加入不同固液比的磷酸, 70  $^{\circ}\text{C}$  保温预处理 2 h 后, 再用丙酮处理。固液比为 1: 8 时, 效果最好(表 1)。磷酸用量不足, 不能充分破坏水稻秸秆的晶状结构, 预处理的效果不明显, 后续的酶解酶化率较低。这与 Li 等<sup>[17]</sup>在丙酮-磷酸预处理狗牙根以及曾青兰<sup>[19]</sup>在用磷酸预处理小麦秸秆中发现的磷酸浓度与酶解糖化率呈现正相关性的规律基本一致。但是, 磷酸用量过高, 也会导致纤维素的过度分解。因此, 适宜的固液比为 1: 8。

### 2.3 预处理温度对水稻秸秆糖化的影响

设定不同的温度, 以 1: 8 的固液比向  $\leq 380$   $\mu\text{m}$  的水稻秸秆粉中加入磷酸, 保温预处理 2 h 后, 再加丙酮处理。温度为 80  $^{\circ}\text{C}$  时, 所获得的水稻秸秆糖化率最高(表 1)。较高温度会促进水稻秸秆半纤

纤维素分解和木质素的溶解,以去除半纤维素和木质素,增大空隙度,但也会导致纤维素分解,在两方面因素的共同作用下,80 °C 的预处理效果最佳。采用

该温度时,一方面可避免高温预处理带来的能量消耗以及高聚糖的大量降解;另一方面可获得最佳的酶解糖化率。

表 1 预处理条件对水稻秸秆酶解糖化的影响

Table 1 Effect of pretreatment condition on the saccharification ratio of rice straw

| 预处理条件<br>Pretreatment condition       | 酶解糖化率/%<br>Saccharification ratio | 预处理条件<br>Pretreatment condition | 酶解糖化率/%<br>Saccharification ratio |        |                |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------|----------------|
| 粒径/ $\mu\text{m}$<br>Particle size    | $\leq 830$                        | 43.3 $\pm$ 0.2                  | 固液比<br>Materials to liquid ratio  | 1 : 6  | 41.5 $\pm$ 0.3 |
|                                       | $\leq 380$                        | 45.4 $\pm$ 0.2                  |                                   | 1 : 7  | 43.2 $\pm$ 0.2 |
|                                       | $\leq 250$                        | 45.0 $\pm$ 0.2                  |                                   | 1 : 8  | 46.7 $\pm$ 0.2 |
|                                       | $\leq 180$                        | 42.1 $\pm$ 0.1                  |                                   | 1 : 9  | 45.3 $\pm$ 0.1 |
|                                       | $\leq 150$                        | 41.2 $\pm$ 0.2                  |                                   | 1 : 10 | 41.1 $\pm$ 0.1 |
| 温度/ $^{\circ}\text{C}$<br>Temperature | 40                                | 42.3 $\pm$ 0.3                  | 时间/h Time                         | 1.0    | 57.3 $\pm$ 0.2 |
|                                       | 50                                | 42.9 $\pm$ 0.3                  |                                   | 1.5    | 64.3 $\pm$ 0.1 |
|                                       | 60                                | 44.5 $\pm$ 0.1                  |                                   | 2.0    | 57.1 $\pm$ 0.2 |
|                                       | 70                                | 47.1 $\pm$ 0.1                  |                                   | 2.5    | 51.0 $\pm$ 0.1 |
|                                       | 80                                | 56.1 $\pm$ 0.1                  |                                   | 3.0    | 49.5 $\pm$ 0.1 |
|                                       | 90                                | 51.6 $\pm$ 0.2                  |                                   |        |                |
|                                       | 100                               | 47.3 $\pm$ 0.1                  |                                   |        |                |

2.4 预处理时间对水稻秸秆糖化的影响

设定不同的预处理时间,取 $\leq 380 \mu\text{m}$ 的水稻秸秆粉,按 1 : 8 的固液比加入磷酸,在 80 °C 下保温预处理后,再加丙酮处理。预处理时间较短,半纤维素的分解和木质素的溶解不充分,达不到破坏水稻秸秆晶状结构的目的;而预处理时间太长,不但使半纤维素分解、木质素溶解,也会使纤维素过度分解,影响后续酶解糖化的纤维素总量。在本试验条件下预处理时间 1.5 h 最为适宜,可避免长时间预处理带来的能量消耗以及纤维素过度分解,同时酶解糖化率最理想(表 1)。

2.5 酶解糖化时间进程曲线

在粒径 $\leq 380 \mu\text{m}$ 、固液比 1 : 8、温度 80 °C、处理时间 1.5 h 条件下预处理水稻秸秆,并将预处理后得到的水稻秸秆试样和未经预处理的水稻秸秆试样在相同条件下进行纤维素酶解糖化试验,其酶解糖化时间进程曲线见图 1。酶解反应开始时,经过预处理的水稻秸秆纤维素酶解糖化率逐步增加,到 40 min 时达最大值 65.4%,随着时间的延长,糖化率略有下降。一方面是由于底物减少及反馈抑制的增强,另一方面也可能是发生了复合反应,一部分葡萄糖又重新结合生成纤维二糖等复合糖类。未经预处理的水稻秸秆纤维素酶解糖化率很低,酶解 40 min 时只有 18.6%,与其他酶解时间的糖化率接近。

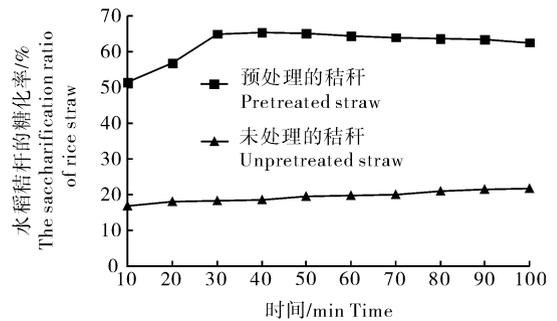


图 1 水稻秸秆的酶解糖化进程曲线

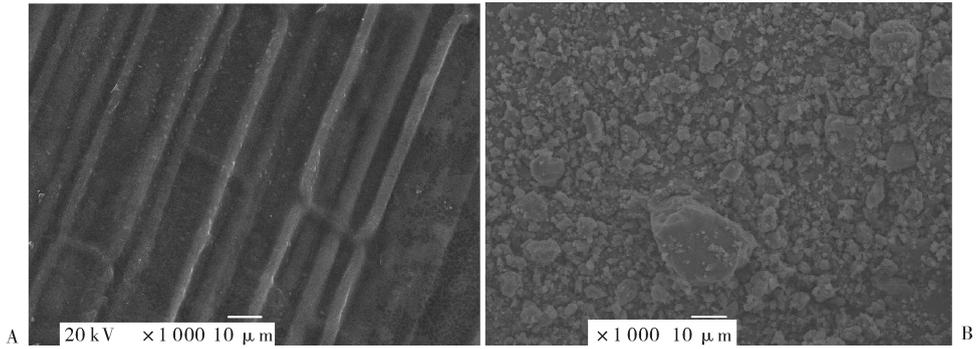
Fig. 1 The course of enzymatic hydrolysis of rice straw

2.6 预处理后水稻秸秆结构的变化

由图 2 可知,经过预处理,原来秸秆内、外表面完整清晰的结构遭到破坏,出现崩解的碎片,水稻内结晶区已完全转变为无定形区,水稻秸秆的空隙度增大,比表面积相应增大,从而大大提高了纤维素酶对水稻秸秆纤维素的可及性,为后续的酶解糖化提供了良好的条件。

3 讨论

采用磷酸-丙酮预处理水稻秸秆后,可显著提高水稻秸秆的酶解糖化率。水稻秸秆预处理的适宜条件为:粒径 $\leq 380 \mu\text{m}$ 、固液比 1 : 8、温度 80 °C、处理时间为 1.5 h。在此预处理条件下,所获水稻秸秆试样的纤维素酶水解糖化率从未处理水稻秸秆的 18.6% 提高到预处理的 65.4%。扫描电镜分析表



A: 未处理的水稻秸秆 Unpretreated straw; B: 预处理的水稻秸秆 Pretreated straw.

图 2 水稻秸秆样品的扫描电镜分析

Fig. 2 The analyse of structure of rice straw before and after pretreatment

明, 预处理后的水稻秸秆的结构完全崩解成碎片, 表明木质素和半纤维素之间的交联结构被破坏, 水稻秸秆紧密的晶状结构转变为膨松状的碎片, 孔隙度和比表面积都增大, 从而大大增加了纤维素酶对纤维素的可及性, 使其可充分作用于水稻秸秆纤维素, 从而大幅度地提高酶解糖化率。

用磷酸-丙酮预处理水稻秸秆, 条件比较温和, 不需高温高压和特殊的设备。与目前常用的稀硫酸在 100 °C 以上的高温下预处理的方法相比<sup>[15-16]</sup>, 用磷酸-丙酮预处理水稻秸秆可在很大程度上降低能耗, 节约成本, 预处理后的样品中既含纤维素、半纤维素, 也含有木质素, 由于三者之间原来紧密的结构已完全被破坏, 无需将三者彼此分开, 只需利用磷酸和丙酮的挥发性差异即可回收溶剂; 与田龙等<sup>[8]</sup>方法相比, 节省了分离纤维素、半纤维素和木质素的工序及其相应的成本。预处理后的水稻秸秆酶解 40 min 即可达最大糖化率, 与田龙等<sup>[8]</sup>及陈魏等<sup>[18]</sup>方法相比, 酶解时间短, 一方面可大大地省时省工, 另一方面也可避免长时间酶解所造成的微生物污染。预处理回收的丙酮可循环利用, 过滤收集的磷酸废液可作制造磷肥的原料, 从而节约成本, 减少了对环境的污染。因此, 用磷酸-丙酮预处理水稻秸秆是一种操作简单、能耗低、效果较好、对环境较友好的预处理方式。但是, 该预处理方式下所获的酶解糖化率, 与理论值相比, 仍有一定的提升空间, 其主要的原因之一, 可能是纤维素降解过程中二糖的累积抑制了酶解的程度。另外, 磷酸-丙酮预处理水稻秸秆过滤所获滤饼用蒸馏水洗至中性时, 废液中仍含有少量的磷酸和丙酮, 若直接排放, 对环境仍有一定的影响。因此, 下一步研究的重点是预处理秸秆的酶

解糖工艺的优化, 以进一步提高秸秆原料的酶水解糖化率; 同时进一步研究试验废液中的残余磷酸和丙酮的测定、回收和监测工作, 使其对环境的影响降到最低限度。

## 参 考 文 献

- [1] 汪海波, 秦元萍, 余康. 我国农作物秸秆资源的分布、利用与开发策略[J]. 国土与自然资源研究, 2008(2): 92-93.
- [2] 于婷, 傅永福. 纤维素乙醇发展的现状与对策[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(Z1): 35-40.
- [3] 彭良才. 论中国生物能源发展的根本出路[J]. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2011(2): 1-6.
- [4] HENDRIKS A T W M, ZEEMAN G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10-18.
- [5] 张建安, 张小勇, 韩润林, 等. 木素对纤维素酶解的影响及纤维素酶解[J]. 化学工程, 2000, 28(1): 38-39, 43.
- [6] SUN Y, CHENG J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1): 1-11.
- [7] YU J, ZHANG J, HE J, et al. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(13): 903-908.
- [8] 田龙, 马晓建. 常压温和条件下丙酮预处理小麦秸秆的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2011, 27(7): 295-299.
- [9] 龚大春, 王栋, 田毅红, 等. 稀酸法一酶法处理小麦秸秆木质纤维素的最优条件[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(4): 463-466.
- [10] CURRELI N, AGELLI M, PISU B, et al. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37: 937-941.
- [11] SAHA C B, COTTA A M. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol

- [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(4): 528-532.
- [12] 孙麟, 高慧俊, 宝力德. 不同的预处理方式对甜高粱秸秆纤维素酶降解效率的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(9): 346-351.
- [13] 赵志刚, 程可可, 张建安, 等. 木质纤维素可再生生物质资源预处理技术的研究进展[J]. *现代化工*, 2006, 26(Z2): 39-42.
- [14] 余洪波, 张晓昱, 柯静, 等. 生物-碱氧化预处理玉米秸秆酶解条件的优化[J]. *农业工程学报*, 2009, 25(4): 201-205.
- [15] SUN Y, CHENG J J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(14): 1599-1606.
- [16] BOWER S, WICKRAMASINGHE R, NAGLE N J, et al. Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 7354-7362.
- [17] LI H, KIM N J, JIANG M, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for ioethanol production[J]. *Bioresource Technol.*, 2009, 100(13): 3245-3251.
- [18] 陈魏, 徐龙君, 陈坤. 乙醇-磷酸预处理对稻草酶解糖化的影响[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(11): 268-272.
- [19] 曾青兰. 磷酸预处理对小麦秸秆酶解糖化的影响[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(15): 3311-3314.

## Effects of phosphoric acid-acetone pretreatment on enzymatic saccharification of rice straw

ZENG Qing-lan LI Xiao-hong

*Department of Biological Engineering, Xianning Vocational Technical College, Xianning 437100, China*

**Abstract** To improve lignocellulose energy-oriented use efficiency of the rice straw, rice straw was pretreated with phosphoric acid-acetone. The effects of particle size, materials to liquid ratio, temperature and time on enzymatic saccharification ratio of rice straw were studied. The construction of the rice straw was scanned before and after the pretreatment by SEM. The results showed that when the particle size of rice straw was  $\leq 380 \mu\text{m}$ , the materials to liquid ratio was 1 : 8, the pretreated temperature was 80 °C and the pretreated time was 1.5 h, the enzymatic saccharification ratio of rice straw increased from 18.6% to 65.4%. The crystalline structure of the rice straw was destroyed to pieces by SEM, providing good working conditions for the subsequent enzymatic saccharification. The research could provide an effective pretreated way of straw under mildness conditions.

**Key words** phosphoric acid; acetone; rice straw; cellulose; saccharification; pretreatment

(责任编辑: 陆文昌)