

# 稀酸预处理对酶解巨菌草纤维素的影响

师 静<sup>1,2</sup>, 林占熺<sup>1,2</sup>, 林冬梅<sup>1</sup>, 苏德伟<sup>1,2</sup>, 罗海凌<sup>1</sup>, 林兴生<sup>1</sup>

(1. 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002)

**摘 要:**以巨菌草为试材,研究了稀酸( $H_2SO_4$ )的固液比、酸浓度、处理时间和反应温度对巨菌草化学组成和酶解液中还原糖含量的影响。结果表明:稀酸的最佳预处理条件为:固液比 1:20、酸浓度 2.0%、处理时间 60 min、反应温度 100℃。该研究为巨菌草作为制备生物乙醇的材料提供了理论依据。

**关键词:**巨菌草;纤维素;稀酸处理;酶解

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0151-04

能源危机与环境危机已成为当今世界各国面临的两大挑战。化石燃料的大量燃烧,释放出引发一系列污染环境事件的气体;而随着人类不断开采,传统资源已面临枯竭,若继续以当前的速度开采,煤炭资源可供开采 100 a、天然气 50~60 a、石油 30~40 a<sup>[1]</sup>。因此发展和推广可再生能源,是我国可持续发展的必经之路<sup>[2]</sup>。巨菌草具有生长周期短、纤维含量高、生物量大、抗逆性强等特点<sup>[3]</sup>,并已经在治理荒漠化方面取得了良好的效果,因此利用巨菌草生产生物乙醇既可以整治环境,又可以生产能源,可以达到促进经济、整治环境的双赢效果。

纤维素乙醇生产工艺一般分为以下 4 个步骤<sup>[4]</sup>:预处理、糖化、发酵产乙醇、收集乙醇。酶解反应前的预处理工艺是产纤维素乙醇过程中最重要的步骤之一,也是阻碍发展生物乙醇产业最难解决的瓶颈。天然纤维素原料结构复杂,纤维素被半纤维素与木质素形成的网络结构包围在里层,若直接进行纤维素酶解反应,酶解率极低。因此要借助一些预处理方法,通过破坏半纤维素与木质素形成的网络结构,提高原料组织疏松性,脱除木质素,降低纤维素结晶度,增加纤维素表面积等途径来提高纤维素酶解率<sup>[5-7]</sup>。该试验分别选取了固液比、酸浓度、处理时间、反应温度 4 个因素对巨菌草主要化学组成的影响和酶解效果的影响进行了研究,以期探讨

稀酸预处理对巨菌草酶解效果的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试巨菌草由福建农林大学菌草研究所提供;纤维素酶来自宁夏夏盛实业有限公司。

仪器:高速多功能粉碎机(上海久品工贸有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);恒温电热套(海宁市华星仪器厂);漩涡混匀器(Crystal Technology&Industries, Inc);电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);箱式电阻炉(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);摇床(上海苏坤实业有限公司)。

### 1.2 试验方法

将巨菌草粉碎过 20 目筛,于 65℃烘箱中烘干至恒重,并装入自封袋中备用。

**1.2.1 不同固液比对酶解反应的影响** 准确称取草粉 10 g(精确到 0.0001 g)于 500 mL 圆底烧瓶中,在水浴锅温度为 100℃,硫酸浓度为 1%,酸处理时间 1 h 反应条件下分别测定固液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 时的酸液中还原糖浓度以及处理后草粉的纤维素、半纤维素、木质素含量的变化。

**1.2.2 不同酸浓度对酶解反应的影响** 准确称取草粉 10 g(精确到 0.0001 g)于 500 mL 圆底烧瓶中,在水浴锅温度为 100℃,固液比为 1:10,酸处理时间 1 h 反应条件下分别测定酸浓度为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%时的酸液中还原糖浓度以及处理后草粉的纤维素、半纤维素、木质素含量的变化。

**1.2.3 不同处理时间对酶解反应的影响** 准确称取草粉 10 g(精确到 0.0001 g)于 500 mL 圆底烧瓶中,在水浴

**第一作者简介:**师静(1988-),女,硕士,现主要从事生物技术研究工作。

**责任作者:**林占熺(1943-),男,本科,研究员,博士生导师,菌草技术发明人,联合国国际生态安全科学院院士,研究方向为菌草技术。

**基金项目:**国家林业局公益性行业资助项目(201004019);福建省科技重大专项资助项目(2012NZ0002)。

**收稿日期:**2013-04-15

锅温度为 100℃,固液比为 1:10,酸浓度为 1%反应条件下分别测定处理时间为 20、40、60、80、100、120 min 时的酸液中还原糖浓度以及处理后草粉的纤维素、半纤维素、木质素含量的变化。

1.2.4 不同反应温度对酶解反应的影响 准确称取草粉 10 g(精确到 0.0001 g)于 500 mL 圆底烧瓶中,在处理时间 1 h,固液比为 1:10,酸浓度为 1%反应条件下分别测定反应温度为 50、60、70、80、90、100℃时的酸液中还原糖浓度以及处理后草粉的纤维素、半纤维素、木质素含量的变化。

### 1.3 项目测定

以上各处理后的样品用去离子水洗涤至中性后,在反应时间 60 h,酶用量 44.8 U/g,底物浓度 10 g/L, pH 5.0,酶解温度 45℃条件下酶解巨菌草纤维素,并测定酶解液中的还原糖浓度。还原糖含量测定采用 DNS 法。将酶解液进行煮沸灭活,后经抽滤、稀释适当浓度后利用 DNS 法测定酶解液中还原糖的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同固液比对酶解反应的影响

从表 1 可以看出,不同固液比对巨菌草中的纤维素、半纤维素、木质素含量变化的影响不同。随着固液比的增加,半纤维含量在下降,由 18.75% 下降到 13.90%,但当固液比超过 1:25 后,半纤维素降解速度减慢,纤维素含量有所上升,由 53.11% 增加到 56.44%。固液比对木质素含量变化的影响不大,始终处于 10% 左右。酸解液中还原糖含量随着半纤维素的降解而增加。表明稀酸对于巨菌草中的半纤维具有明显的降解作用,当固液比较小时,由于酸液较少,因此酸对半纤维降解不充分,随着酸加入量的增加,半纤维含量也随之减少。降解后生成还原糖,因此酸解液中的还原糖含量也随之增加。

表 1 不同固液比对巨菌草化学组成的影响

Table 1 Effect of different solid-liquid ratios on chemical composition of *Pennisetum* sp.

固液比	纤维素含量 / %	半纤维素含量 / %	木质素含量 / %	酸解液中还原糖含量 / mg · g <sup>-1</sup>
1:10	53.11	18.75	10.53	217.61
1:15	55.33	16.85	10.87	241.75
1:20	54.63	15.07	10.74	251.87
1:25	54.64	14.36	10.92	254.79
1:30	56.60	14.06	10.72	259.14
1:35	56.44	13.90	10.56	258.18

从图 1 可以看出,随着固液比的增加,酶解液中还原糖含量也在增加,当固液比超过 1:20 后,还原糖含量基本不变,说明酸液已经和草粉充分反应。从减小化学试剂消耗的角度上,应选择固液比为 1:20 的酸处理。

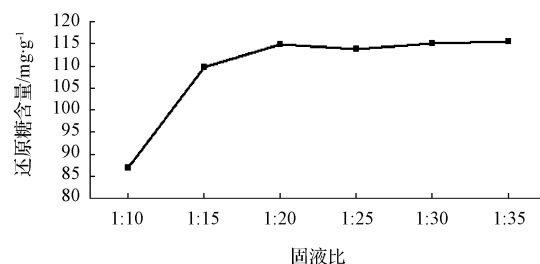


图 1 不同固液比对酶解液中还原糖含量的影响

Fig. 1 Effect of different solid-liquid ratios on the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution

### 2.2 不同酸浓度对酶解反应的影响

从表 2 可以看出,随着酸浓度的增加,巨菌草粉中的半纤维素含量急速下降,从最初的 18.95% 下降到 0.94%,几乎将半纤维素降解完全,说明巨菌草中的半纤维素对酸液极度敏感。酸解液中的还原糖含量也从 117.14 mg/g 迅速增加到 462.80 mg/g,增加了将近 4 倍。纤维素含量和木质素含量稍有增加,分别增加了 11 和 6 个百分点。

表 2 不同酸浓度对巨菌草化学组成的影响

Table 2 Effect of different acid concentrations on chemical composition of *Pennisetum* sp.

酸浓度 / %	纤维素含量 / %	半纤维素含量 / %	木质素含量 / %	酸解液中还原糖含量 / mg · g <sup>-1</sup>
0.5	53.67	18.95	10.82	117.14
1.0	57.79	13.61	11.78	246.48
2.0	60.89	7.55	13.71	346.05
3.0	63.19	4.34	14.40	400.83
4.0	64.24	1.37	16.64	452.48
5.0	64.74	0.94	16.75	462.80

从图 2 可以看出,不同酸浓度对酶解巨菌草也有很大影响。当酸浓度在 0.5%~2.0% 时,酶解液中还原糖含量呈线性增加。当酸浓度超过 2.0% 后,还原糖含量的增加速度趋于平缓。在酸浓度较高时,虽然半纤维素基本被酸液降解,但酶解液中的还原糖含量并没有明显

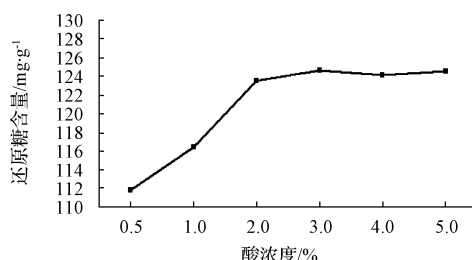


图 2 不同酸浓度对酶解液中还原糖含量的影响

Fig. 2 Effect of different acid concentrations on the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution

增加。这是由于半纤维素的大量降解,导致了草粉中木质素充分暴露,使纤维素酶无效吸附在木质素上,酶解效果没有明显变化。因此,选择最佳酸处理浓度为 2.0%。

### 2.3 不同处理时间对酶解反应的影响

从表 3 可以看出,不同处理时间对巨菌草化学组成变化的影响。随着处理时间的增加半纤维素含量有所下降,由 21.45%下降到 9.32%。纤维素含量和木质素含量有所上升,纤维素含量由 53.15%增加到 60.10%,木质素含量由 10.32%增加到 14.14%。酸解液中还原糖含量随着半纤维素含量的减少而增加,由 173.45 mg/g 增加到 296.84 mg/g。

表 3 不同反应时间对巨菌草化学组成的影响

Table 3 Effect of different processing time on chemical composition of *Pennisetum* sp.

反应时间 /min	纤维素含量 /%	半纤维素含量 /%	木质素含量 /%	酸解液中还原糖含量 /mg·g <sup>-1</sup>
20	53.15	21.45	10.32	173.45
40	57.22	15.30	11.69	223.78
60	56.44	15.60	13.02	256.83
80	57.92	11.54	13.95	263.44
100	59.07	10.33	13.84	283.84
120	60.10	9.32	14.14	296.84

从图 3 可以看出,不同处理时间对酶解巨菌草纤维素的影响也是不同的。随着处理时间的增加,酶解液中还原糖含量有所增加。当处理时间在 20~60 min 之间时,还原糖的含量增加速度最快。当处理时间超过 60 min 后,还原糖增加速度减慢。因此,从减少能耗的角度上,应选择处理时间为 60 min。

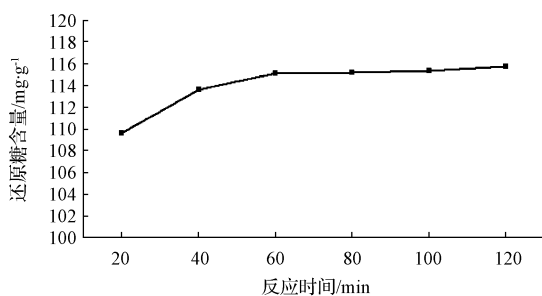


图 3 不同反应时间对酶解液中还原糖含量的影响

Fig. 3 Effect of different processing time on the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution

### 2.4 不同反应温度对酶解反应的影响

从表 4 可以看出,不同反应温度对巨菌草化学组成变化的有较明显的影响。随着反应温度的增加,半纤维素含量下降,由 23.10%下降到 13.98%。纤维素含量有所上升,由 46.71%增加到 56.23%,木质素含量由 8.87%增加到 11.78%。酸解液中还原糖含量随着半纤维素含量的减少而增加,由 120.50 mg/g 增加到

表 4 不同反应温度对巨菌草化学组成的影响

Table 4 Effect of different processing temperatures on chemical composition of *Pennisetum* sp.

反应温度 /°C	纤维素含量 /%	半纤维素含量 /%	木质素含量 /%	酸解液中还原糖浓度 /mg·g <sup>-1</sup>
50	46.71	23.10	8.87	120.50
60	47.67	21.85	9.07	131.06
70	48.30	19.55	9.46	137.82
80	49.49	19.72	9.64	141.88
90	49.80	18.04	9.95	165.59
100	56.23	13.98	11.78	215.28

215.28 mg/g。

从图 4 可以看出,随着反应温度的增加,酶解液中还原糖含量也在增加。当反应温度为 100°C 时,酶解液中还原糖含量达到最大值。当反应温度在 50~90°C 时,酶解液中的还原糖含量逐步增加。因此,酸处理的最佳反应温度应该为 100°C。

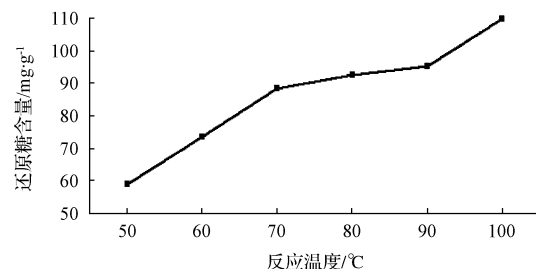


图 4 不同反应温度对酶解液中还原糖含量的影响

Fig. 4 Effect of different processing temperatures on the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution

## 3 结论

试验结果表明,稀酸对巨菌草中的半纤维素有明显的降解作用,随着酸液浓度和体积的增加,酸解液中的还原糖含量逐渐升高,但稀酸对木质素的降解作用较小。而随着处理温度的升高和处理时间的增加,巨菌草的主要化学成分和酶解液中的还原糖含量也发生了改变。从减少能耗的角度来看,选择适中的处理温度和处理时间是明智的选择。通过试验得出最佳稀酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)预处理条件为:固液比 1:20、酸浓度 2.0%、处理时间 60 min 和反应温度 100°C。

(该文作者还有林占森,单位为国家菌草工程技术研究中心,郑丹、姚俊新、陈锦华,单位同第一作者)。

### 参考文献

- [1] 万泉. 能源植物的开发和利用[J]. 福建林业科技, 2005, 32(2): 1-5.
- [2] 熊兴耀, 苏小军, 谭兴和, 等. 能源安全与湖南省生物质能的发展[J]. 湖南农业大学学报(社会科学版), 2007, 8(5): 18-20.
- [3] 林占焯. 菌草栽培香菇[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 59-62.
- [4] Hahn H B, Galbe M, Gorwa-Grauslund M F, et al. Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(12): 249-256.

# 金荞麦叶总黄酮含量测定方法研究

李 光<sup>1,2,3</sup>, 余 霜<sup>1</sup>, 邓 银<sup>1</sup>, 周永红<sup>2</sup>, 陈庆富<sup>1</sup>

(1. 贵州师范大学 生命科学院 植物遗传育种研究所, 荞麦产业技术研究中心, 贵州 贵阳 550001;

2. 四川农业大学 小麦研究所, 四川 温江 611130; 3. 安顺学院 化学与生物农学系, 贵州 安顺 561000)

**摘 要:**以金荞麦叶为试材, 采用超声波辅助法提取金荞麦叶中的黄酮类化合物, 研究了基于亚硝酸钠-硝酸铝法的金荞麦叶总黄酮含量测定的改良方法。结果表明:该方法稳定性好, 操作简单方便, 可适用于金荞麦叶提取液中总黄酮含量的测定。

**关键词:**金荞麦叶; 黄酮; 测定方法

**中图分类号:**S 567 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)17-0154-03

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物, 它能清除生物体内的自由基, 具有抗氧化作用<sup>[1]</sup>。金荞麦 (*Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn.) 属蓼科

(Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 植物。别名天荞麦、赤地利(唐本草)、透骨消、苦荞麦、野桥荞麦<sup>[2]</sup>, 它是国家二级保护植物, 药用价值极大。金荞麦叶富含黄酮类化合物, 而有关金荞麦叶总黄酮含量的研究鲜见报道。该研究拟以建立基于亚硝酸钠-硝酸铝法的金荞麦叶总黄酮含量的改良测定方法为目标, 以期在金荞麦的合理开发利用提供理论基础和科学依据。

**第一作者简介:**李光(1980-), 男, 河南商丘人, 博士, 副教授, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail:lg20029@126.com.

**责任作者:**陈庆富(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail:cqf1966@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31060207, 31171609); 国家现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-08-A4); 贵州省农业科技攻关资助项目(黔科合 NY 字[2010]3094); 贵州省科技创新团队资助项目(黔科合人才团队(2011)4007); 贵阳市科技计划资助项目(筑科合同[2011102]1-12)。

**收稿日期:**2013-04-15

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

金荞麦叶采自贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所。芦丁标准品购自贵州迪大生物有限公司; 乙醇(95%)为分析纯, 12.5 cm 快速试纸(杭州特种纸业公司)。DHG-90A(101AB)干燥箱(上海索谱仪

[5] Duff S J B, Murray William D. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: a review[J]. Bioresource Technology, 1996, 55:1-33.

[6] Lee D, Yu A H C, Saddler J N. Evaluation of cellulase recycling

strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 45(4):328-336.

[7] Kim T H, Kim J S, Lee Y Y, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia[J]. Bioresource Technology, 2003, 90(1):39-47.

## Effect of Dilute Acid Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis *Pennisetum* sp. Cellulose

SHI Jing<sup>1,2</sup>, LIN Zhan-xi<sup>1,2</sup>, LIN Dong-mei<sup>1</sup>, SU De-wei<sup>1,2</sup>, LUO Hai-ling<sup>1</sup>, LIN Xing-sheng<sup>1</sup>,

LIN Zhan-sen<sup>1</sup>, ZHENG Dan<sup>1,2</sup>, YAO Jun-xin<sup>1,2</sup>, CHEN Jin-hua<sup>1,2</sup>

(1. The National Juncao Engineering Research Center, Fuzhou, Fujian 350002; 2. College of Life Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

**Abstract:** Taking *Pennisetum* sp. as material, the effect of solid-liquid ratio, acid concentration, processing time and processing temperature of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on chemical composition of *Pennisetum* sp. and the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution were studied. The results showed that the best dilute acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pretreatment methods were as follows: solid-liquid ratio 1 : 20, acid concentration 2.0%, treatment time 60 min and processing temperature 100°C. This article conducted a preliminary exploration for giant Juncao as bio-ethanol fuel.

**Key words:** *Pennisetum* sp.; cellulose; dilute acid pretreatment; enzymatic hydrolysis