不同预处理方法对飞机草茎干酶解性能的影响

赵雪冰[1], 张黎华[2], 刘德华[1]
(1. 清华大学 化学 工程系, 北京 100084;
2. 中国科学 院西 双版 纳热带植物 园昆 明分 部, 云南 昆 明 650223)

摘要: 为综合利用和防治外来入侵的飞机草, 提出了可将其用于生物能源原料的设想, 并采用稀硫酸、氢氧化钠和过氧乙酸分别对飞机草茎干进行预处理, 以提高其纤维素酶解性能。通过正交实验分别研究了影响这 3 种试剂预处理效果的因素, 并得出相对优化的预处理条件。此 3 种处理方法相比, 过氧乙酸预处理可得到最高的纤维素转化率。

关键词: 飞机草; 预处理; 酶解; 生物能源
中图分类号: TQ353; S451　　文献标识码: A　　文章编号: 0253- 4320(2007)S2- 0293- 04

Effects of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Chromolaena odorata* stem

ZHAO Xue-bing[1], *ZHANG Li-hua*[2], *LIU De-hua*[1]
(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Kunming Devision, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: A potential pathway to utilize and control the invasive weed, *Chromolaena odorata*, was proposed. The stem of this weed contained relatively high holocellulose content, which made it available as a feedstock for bioenergy production. Three pretreatment reagents including diluted sulfuric acid, sodium hydroxide, or peracetic acid, were respectively used attemptinh to enhance the enzymatic digestibility of the material. The influential factors of three reagents to the results are studied with orthodox experiments, and the optimal conditions are obtained. Results show peracetic acid is the best one for the pretreatment.

Key words: *Chromolaena odorata*; pretreatment; enzymatic hydrolysis; bioenergy

飞机草(*Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob)是一种在热带和亚热带地区广泛分布的恶性入侵杂草, 在我国台湾、广东、海南、广西、云南、贵州等省均有广泛分布, 严重破坏了入侵地区的生态环境, 被列于 2003 年国家环保局发布《中国第一批外来入侵物种名单》中[1]。该入侵物种危害多种作物, 并侵犯牧场, 当高度达 15 cm 或更高时, 就能明显地影响其他草本植物的生长, 且能产生化感物质, 抑制邻近植物的生长[2-3]。该杂草生命力极强, 生物量大, 目前飞机草防治的主要方法包括机械除草、化学防治、替代控制、生物防治等[3-4], 但效果都不理想, 但如能有效综合利用, 不仅可以起到防治的作用, 而且可以实现变废为宝。近年来已有将飞机草用作绿肥、饲料、生物杀虫剂、化妆品添加剂等报道[5-8], 但尚未见到将飞机草用于生产可发酵糖, 进而发酵生产乙醇等方面的研究。笔者测定了飞机草茎干中聚糖的含量, 发现其综纤维素和纤维素含量与一些常见作物秸秆, 例如玉米杆、麦杆、稻杆等的相近甚至更高。在本文中采用 3 种不同的试剂(稀硫酸、氢氧化钠和过氧乙酸), 对飞机草茎干进行预处理, 并采用纤维素酶催化其水解生产可发酵糖, 为进一步利用该杂草生产乙醇或其他化工产品提供基础。

1　实验部分

1.1　实验材料

飞机草取自云南西双版纳, 为一年或多年生植株。茎干部分经自然风干后粉碎过筛, 取 20~ 40 目部分进行预处理。经测定, 其中纤维素、综纤维素和克拉森木素的质量分数分别为 37.72%、71.55% 和 20.74%。

所用化学试剂均为分析纯。过氧乙酸溶液是将

收稿日期: 2007-04-13
作者简介: 赵雪冰(1981-), 男, 博士生; 刘德华(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然可再生资源的综合利用, 通讯联系人, 010-62794742, dhliu@tsinghua.edu.cn。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

冰乙酸和 30%过氧化氢以 1.5∶1 的体积比混合, 加入 1.5%(质量分数) 的硫酸作为催化剂, 在室温下反应 24 h 制得。所用纤维素酶为日本产 Cellulase R-10。

1.2 分析方法

原料克拉森木质素和综纤维素含量分别参照国家标准 GB/T 2677.8—1994 和 GB/T 2677.10—1995 测定, 纤维素含量按照硝酸-乙醇法测定[9], 过氧乙酸浓度按国标 GB/T 19108—2003 测定。酸解还原糖采用岛津 HPLC 测定, 采用 Aminex HPX-87H 型色谱柱, RID-10A 折光率示差检测器, 0.005 mol/L 硫酸为流动相, 流速为 0.8 mL/min。

1.3 预处理过程

取一定量的原料, 置于 250 mL 锥形瓶中, 采用合适的正交表安排实验。处理后的原料经洗涤至中性, 在 105℃下烘干后测定纤维素含量。以 20 FPU/g 纤维素的纤维素酶用量进行酶解。酶解条件为: 50℃、130 r/min、pH 4.8 的醋酸缓冲液, 纤维素酶浓度为 0.15 FPU/mL。每隔一定时间取样, 用 DNS 法测定酶解还原糖含量[10], 纤维素转化率按下式计算: 纤维素转化率(%) = 总还原糖质量×0.9/初始纤维素质量×100%。

2 结果与讨论

2.1 温和稀酸预处理

稀酸预处理可以水解半纤维素, 破坏纤维素的结晶度, 使原料结构疏松, 增加原料的比表面积, 从而增加原料的酶解性能[11-12]。稀酸预处理同时可以将原料中部分半纤维素转变为单糖, 或者在更高温度下将纤维素转变为葡萄糖, 因此是为研究最多、工艺较为成熟的一种预处理方法。影响酸水解效率的因素有原料粒度、液固比、反应温度、时间、酸种类和浓度等[13]。一般稀酸水解过程中, 常用稀硫酸在高温(> 160℃) 或较低温(< 160℃) 下进行预处理, 所用酸浓度也从 0.45% ~ 3% 不等, 液固比一般为 8~10[11,13]。由于半纤维素在较为温和条件即可水解, 较高的水解温度会导致更多的糖损失, 因此选择 8∶1 的液固比, 小于或等于 120℃的温和条件进行预处理, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验。结果显示, 稀酸预处理对于 72 h 的酶解纤维素转化率仅有较小提高, 且明显小于酸解还原糖得率。其极差分析也得出, 影响飞机草温和稀酸预处理的因素主次顺序为: 温度> 酸浓度> 时间。随着温度升高和酸浓度增加, 酸解还原糖得率增加。预处理时间以 120 min 最好, 增加时间有降低还原糖得率的趋势, 可能是由于还原糖损失的缘故。HPLC 分析, 酸解还原糖主要组成为木糖、葡萄糖和阿拉伯糖。其中木糖占很大部分。这 3 种单糖的得率(基于初始综纤维素) 列于表 1 中。可看出随着预处理温度的升高, 3 种糖得率均增加, 木糖的增加最为显著。

值得注意的是, 经过温和稀酸预处理后的试样, 酶解性能并未得到显著提高, 这主要是由于酸处理不能有效脱除木素, 而木素的存在会显著阻碍原料的酶解的缘故[14-15]。同时由于所用酸处理条件相对温和, 在此条件下处理的原料物理结构尚未得到明显的改变, 因此酶解性能提高不显著。正交实验结果得出稀酸预处理的最佳水平组合为 100℃、120 min、酸浓度 3%(指 V/m), 但以此水平组合进行实验, 发现所得酸解还原糖得率为 23.9%, 略低于正交实验中其他某些组合的结果。因此考虑到较高酸浓度会增加预处理成本, 同时会增加对设备的腐蚀, 选择表 1 第 8 组的条件: 温度为 120℃, 时间为 120 min, 硫酸浓度为 1%。此条件下预处理所得酸解总还原糖得率为 25.46%(基于初始综纤维素), 木糖得率为 17.43%(基于初始综纤维素), 72 h 酶解纤维素转化率为 4.52%。

表 1 温和稀酸预处理中不同单糖得率

编号	处理条件			木糖得率/%	葡萄糖得率/%	阿拉伯糖得率/%
	温度/℃	时间/min	酸浓度/%			
1	100	90	1	6.79	1.47	0.84
2	100	120	2	8.82	1.55	0.99
3	100	150	3	12.85	1.65	1.03
4	110	90	2	10.71	1.48	1.03
5	110	120	3	14.90	1.70	1.14
6	110	150	1	8.27	1.40	0.89
7	120	90	3	17.65	2.08	1.25
8	120	120	1	17.43	2.09	1.22
9	120	150	2	18.68	2.11	1.29

2.2 氢氧化钠预处理

氢氧化钠是碱法预处理木质纤维素最常用的碱之一。碱处理可以部分脱除木素、润胀纤维素、降低纤维素结晶度以及脱除乙酰基, 从而增加原料的多孔性和比接触面积[11-12]。因此进一步采用与酸处理类似的处理条件, 用氢氧化钠对飞机草进行预处理。先前的实验发现, 当氢氧化钠用量(基于绝干原料) 一定时, 最佳的液固比(V/m) 为 6∶1, 在此液固

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

比基础上, 通过 $L_9(3^4)$ 正交实验进一步考察温度、时间、氢氧化钠用量对预处理的影响。

与酸处理相比, 碱处理可以得到更高的纤维素转化率, 但纤维素转化率并非很高。极差分析表明影响氢氧化钠预处理的因素主次顺序是: 时间> 温度> 碱用量。但纤维素转化率随碱用量增加反而成下降的趋势; 一般来讲碱用量的增加, 使木素脱除率相应增加, 酶解转化率应该随之增加, 但实验得出与此相反的结论。极差分析指出不同碱用量时纤维素转化率最大偏差也只有 0.3%, 因此该现象应为实验误差所致。

考虑到碱用量对转化率影响不显著, 得出最优预处理条件为: 110℃、150 min、碱用量 14%, 此时 72 h 酶解纤维素转化率为 8.38%。

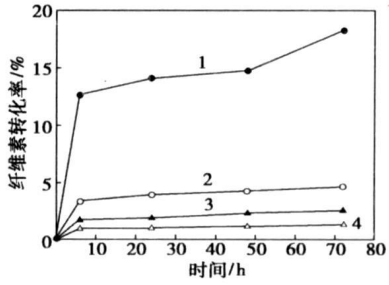
2.3 过氧乙酸**(PAA)**预处理

为进一步提高飞机草原料的酶解性能, 笔者又尝试了采用过氧乙酸进行预处理。过氧乙酸可在较低温度下选择性地脱除木素。经过过氧乙酸预处理的原料, 其纤维素酶解性能有显著提高[16-19]。采用了 $L_{16}(4^5)$ 正交表安排实验, 主要考察了温度、时间、PAA 用量(基于绝干原料的质量, %)和液固比(V/m) 4 个因素对纤维素转化率的影响。结果显示在不同的水平组合下, 纤维素转化率有较显著区别, 影响纤维素转化率的因素主次顺序为: PAA 用量> 液固比> 温度> 时间。除时间因素外, 纤维素转化率随其余 3 个因素的水平变化均有明显的递增或递减趋势。随着温度和 PAA 用量的增加, 由于木素脱除率增加, 纤维素转化率也随之增加。而当 PAA 用量一定时, 增加液固比, 会降低处理液中 PAA 浓度, 因此纤维素转化率降低。当液固比低于 4 时, 发现固、液不能均匀混合, 反而降低了预处理效果。时间对于纤维素转化率的影响并未表现出明显的趋势。对实验数据进行方差分析发现除时间外, 其余 3 个因素对纤维素转化率均有显著影响。

正交实验得出 PAA 预处理的最优水平组合为: 60℃、90 min、PAA 用量 50%、液固比 4∶1, 但按此最优水平组合进行补充实验发现 72 h 酶解纤维素转化率仅为 18.3%, 并不是最高的纤维素转化率。这可能是由于因素间存在较强的交互作用, 导致最优水平组合未必得到最优的预处理效果。因此实际可选择 70℃、120 min、PAA 用量 50%、液固比 4 为最优实验条件, 在此条件下纤维素转化率为 28.02%。

2.4 3 种预处理方法比较

进一步比较 3 种预处理方法对原料酶解性能的影响, 在相同条件(90℃、90 min、预处理剂用量 50%, 液固比为 4∶1)下采用 3 种试剂对飞机草进行预处理。预处理后的试样酶解还原糖曲线如图 1 所示。PAA 预处理可以显著提高原料的酶解性能。这主要是由于 PAA 具有较强的脱木素能力的缘故。温和稀酸预处理以及碱处理一定程度上提高了飞机草原料的酶解性能, 但效果并非十分显著。



1—PPA 处理; 2—酸处理; 3—NaOH 处理; 4—控制

图 1　预处理后的试样酶解还原曲线

3　结语

外来入侵杂草飞机草严重破坏了当地的生态环境和生态多样性, 其茎干含有 71.6% 的综纤维素和 37.7% 的纤维素, 因而可将其用做生物能源生产的原料。与常见的农业废弃物如秸秆、玉米秆等相比, 飞机草相对较难处理。但经过适当的预处理, 可以有效提高还原糖得率: 采用 1% 稀硫酸以 8∶1 的液固比, 在 120℃对飞机草茎干处理 120 min, 可得酸解总还原糖得率为 25.46%, 木糖得率为 17.43%, 72 h 酶解纤维素转化率为 4.52%; 在 110℃下, 用 14% 的氢氧化钠(基于绝干原料)以 6∶1 的液固比处理 150 min 时, 72 h 酶解纤维素转化率为可提高至 8.38%; 采用过氧乙酸预处理, 原料的酶解性能可显著提高。当过氧乙酸用量为 50%(基于绝干原料), 在 70℃下以液固比 4∶1 处理 120 min, 原料纤维素转化率为 28%。3 种处理方法相比, 过氧乙酸预处理可得到最高的纤维素转化率。利用该杂草生长迅速、生物量大的特点, 将其用作生物能源原料, 可为综合利用和防治该杂草提供一条途径。

参考文献

[1] 环发(2003) 11 号. 中国第一批外来入侵物种名单[OL]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2003/content_62285.htm. 2007-04-13.

[2] Day M D, McFadyen R E C. *Chromolaena* in the Asia-Pacific region [C]// Proceedings of the 6th International Workshop on biological control and management of *chromolaena* held in Cairns, Australia, 2003.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. 19- 24.

[3] 张黎华,冯玉龙. 飞机草的生防作用物[J]. 中国生物防治, 2007, 23(1): 83- 88.

[4] McFadyen R I E C. *Chromolaena* in Asia and the Pacific: Spread continues but control prospects improve. Proceedings of the fifth international workshop on biological control and management of Chromolaena odorata, Durban, South Africa, 2000. [C/OL]. http://www.ehs.cdu.edu.au/chromolaena/proceedings/fith/pdf/AsiaPacific.pdf[2007- 04- 13].

[5] Quansah C, Fening J O, Ampontuah E O, *et al*. Potential of *Chromolaena odorata*, *Panicum maximum* and *Pueraria phaseoloides* as nutrient sources and organic matter amendments for soil fertility maintenance in Ghana[J]. Biological Agriculture & Horticulture, 2001, 19(2): 101- 113.

[6] Bouda H, Tapondjou L A, Fontem D A, *et al*. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)[J]. Journal of Stored Products Research, 2001, 37: 103- 109.

[7] Ngane A N, Etame R E, Ndifor F, *et al*. Antifungal activity of *Chromolaena odorata*(L.) King & Robinson (Asteraceae) of Cameroon[J]. Chemotherapy, 2006, 52(2): 103- 106.

[8] Donovan R M. Skin treatment composition to provide anti-aging and wide variety of other skin care benefits uses extract of *Chromolaena Odorata* as active ingredient: WO, 02/36091A1[P]. 2002- 05- 10.

[9] 石淑兰,何福望. 制浆造纸分析与检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.

[10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257- 268.

[11] Sun Ye, Cheng Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1- 11.

[12] Mosier N, Wyman C, Dale B, *et al*. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(6): 673- 686.

[13] 吴创之, 马隆龙. 生物质能现代利用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

[14] Chang V S, Holtzapple M T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84/85/86: 5- 37.

[15] Kim Tae Hyun, Lee Yoon Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(18): 2007- 2013.

[16] Teixeira L C, Linden J C, Schroeder H A. Alkaline and peracetic acid pretreatments of biomass for ethanol production[J]. Appllied Biochemistry and Biotechnology, 1999, 77- 79: 9- 34.

[18] Teixeira L C, Linden J C, Schroeder H A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel[J]. Renewable Energy, 1999, 16(1/2/3/4): 1070- 1073.

[19] Teixeira L C, Linden J C, Schroeder H A. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2000, 84- 86: 111- 127. ■

(上接第 292 页)

相对较小, 萃取率分别为 61.40%、64.72%。萃取后巴戟天中 3 种元素含量显著下降, 工艺重现性较好, 有害元素含量可达到美国 FDA 标准, 说明该最佳工艺是可靠的。

3 结语

(1) 使用 NaDDC 作为配合剂, 在乙醇的改性作用促进下, 超临界 CO_2 将中药材巴戟天中有害元素 Cu、Pb、As 成功脱除。预先加入 DDC 配合剂与药材中元素反应, 可以使配合反应更加完全, 萃取效率好于原位配位萃取的方式。适当提高萃取温度、压力, 控制配位剂用量, 延长萃取时间有助于提高元素配位萃取效率。

(2) 巴戟天药材中有害元素最优萃取工艺为: 萃取压力 28 MPa, 萃取温度 60 ℃, m(药材): m(NaDDC) = 5∶1, m(药材): m(乙醇) = 1∶1, 静态萃取 1 h, 动态萃取 2 h。在此条件下, Cu 的脱除率达到 80% 以上, Pb、As 的脱除率达到 60% 以上, 萃取后药材中有害元素含量显著下降, 可达到美国 FDA 标准, 研究成果为降低中药材中有害元素含量, 促进药材出口提供了一条新途径。

参考文献

[1] 王锦伟, 董华军. 中药重金属残留研究进展[J]. 中华医药杂志, 2005, 5(8): 15- 19.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 55- 56.

[3] 陈荣溢, 宋婷婷. 广东植物类中药材出口现状及对策初探[J]. 广东农业科学, 2007(2): 105- 106.

[4] 文震, 党志, 余德顺, 等. 超临界 CO_2 流体萃取重金属的研究进展[J]. 化学进展, 2001, 13(4): 310- 314.

[5] Burford M D, Ozel M Z, Clifford A A, *et al*. Extraction and recovery of metals using a supercritical fluids with chelating agents[J]. Analyst, 1999, 124(4): 609- 614.

[6] Murphy J M, Erkey C. Copper (Ⅱ) removal from aqueous solutions by chelation in supercritical carbon dioxide using fluorinated β-diketones[J]. Ind & Eng Chem Res, 1997, 12(36): 5371- 5376.

[7] Wai C M, Wang S F, Liu Y, *et al*. Evaluation of dithiocarbamates and β-diketones as chelating agents in supercritical fluid extraction of Cd, Pb, and Hg from solid samples[J]. Talanta, 1996, 43(12): 2083- 2091.

[8] 崔洪友, 沈忠耀, 王涛. 超临界 CO_2 螯合萃取金属离子及其影响因素[J]. 化工环保, 2000, 20(4): 14- 19. ■

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net