

# 柳枝稷超高压爆破前处理研究\*

## Studies on Pretreatment of Switchgrass by Ultra-high Pressure Explosion with a High-pressure Homogenizer

陈东<sup>1</sup>, 陆琦<sup>2</sup>, 黄俊<sup>1</sup>, 黄日波<sup>2</sup>

CHEN Dong<sup>1</sup>, LU Qi<sup>2</sup>, HUANG Jun<sup>1</sup>, HUANG Ri-bo<sup>2</sup>

(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柳枝稷 (*Panicum virgatum*) 进行超高压爆破前处理。柳枝稷秸秆粉碎后用 0.5% 的 NaOH 加热处理, 保持悬浮状态下通过高压均机进行 100MPa 爆破。结果表明, 超高压爆破使柳枝稷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疏松的中空多孔状, 木质素、灰分含量显著减少, 碱消耗量显著增加, 但对纤维素的结晶指数影响很小。处理后每克材料用 4.7FPU 的纤维素酶, 5.3IU 的木聚糖酶和 0.4CBU 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解 48h, 酶解率 97.6%, 较未爆破对照提高 21.1%。超高压爆破显著提高酶解率的主要原因是破坏了木质纤维的超微结构, 增大了酶的作用面积, 是一种有潜力的木质纤维材料前处理方法。

**关键词:**超高压爆破 前处理 柳枝稷

**中图分类号:**TQ92 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2009)03-0317-05

**Abstract:** Switchgrass was treated by using a homogenizer in a constant suspended state, a process termed as ultra-high pressure explosion (UHPE). The stalk of switchgrass was grinded to powder, heated in 0.5% NaOH solution, and then 100MPa UHPE-treated through a homogenizer under a suspended state. The results verified that UHPE changed the suspension solution of powder into a stick fluid. The granularity analysis and scanning electron microscope (SEM) observation confirm that UHPE can decrease the granularity significantly and disrupt the microstructure of lignocellulosic from a rigid and highly ordered fibril to a distorted, poly-porous and "center empty" structure. The contents of lignin and ash were decreased significantly. The NaOH consuming was enhanced. However, the effect by UHPE on *CrI* was minor. After pretreatment, the switchgrass was near completely hydrolyzed to digestibility of 97.6% within 48 hours by a low enzymes loading, 4.7FPU of cellulase, 5.3IU of xylanase and 0.4CBU of  $\beta$ -glucosidase per gram substrate, 21.1% higher than that of NaOH treated control sample. The major mechanism for UHPE enhancing the digestibility is by disrupting the microstructure of biomass, enlarging the accessible area for enzyme attack, which was not observed in previous investigation. Therefore, UHPE is argued to be a potential alternative technology for pretreatment of lignocellulosic biomass.

**Key words:** ultra-high pressure explosion, pretreatment, switchgrass

利用能源作物生产生物燃料是开发生物质能源的有效途径。柳枝稷 (*Panicum virgatum*) 是一种公认

的能源模式作物, 原产于美洲, 具有生长迅速, 产量高、适应力强、需肥少、虫害少等优点<sup>[1]</sup>。但和其它木质纤维材料一样, 酶解柳枝稷成单糖组分用于生产生物燃料需先对其进行前处理。而且, 前处理是有效提高酶解效率, 降低生产成本的技术关键之一。国外已报道了多种柳枝稷的前处理方法, 如碱处理<sup>[2]</sup>、微波处理<sup>[3]</sup>、氨爆处理<sup>[4]</sup>、稀酸处理<sup>[5]</sup>等。另外, 蒸汽爆破是目前研究最多的木质纤维材料前处理方法, 也被认

收稿日期: 2009-02-26

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。

\* 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资金项目 (07-109-001A), 广西科学院资金项目 (08Y16SW04) 资助。

为最接近实用要求<sup>[6,7]</sup>。不过,这些前处理方法仍存在一定的不足,包括工艺成本过高、设备复杂或处理条件过于苛刻等等。探讨新的前处理方法仍然必要<sup>[8]</sup>。

高压均质技术主要用于对液态或微粒悬浮液的乳化和均质化加工,20世纪80年代开始用于破碎微生物细胞,已成功破碎大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. 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<sup>[9,10]</sup>。比较发现,高压均质和蒸汽爆破、氨爆等前处理技术的作用过程极为相似,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<sup>[9,10]</sup>。不同的是高压均质的处理压力为液压,而且压力极高(30~200MPa),远高于蒸汽爆破法(2.0~2.2MPa)<sup>[6]</sup>和氨爆法(约2.3MPa)<sup>[4]</sup>。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,这就提示该技术可用于木质纤维材料的前处理。据此,我们开展了木质纤维材料的超高压爆破前处理技术研究,现将柳枝稷超高压爆破前处理的研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 柳枝稷

从美国引进的低地型 Alamo 品种,2008年5月大田种植,8月收割。取其秸秆自然风干,剪成约3cm长,用悬锤粉碎机粉碎,过40目筛,含水量约7%,干燥保存备用。

### 1.2 纤维素酶

国药集团产品,生化混合酶制剂,来自绿色木霉。按文献<sup>[11,12]</sup>的方法测定其滤纸活力、木聚糖酶活力和 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力,分别为 $87.67 \pm 4.84$ 滤纸活力单位(FPU)/g、 $99.35 \pm 0.61$ 国际单位(IU)/g和 $7.46 \pm 0.09$ 纤维二糖酶活力单位(CBU)/g。木聚糖酶活力的测定用桦树木聚糖作底物。 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定葡萄糖产物。葡萄糖测定试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司出品。

实验所用其它试剂均为分析纯以上级别。

### 1.3 高压均质机

高压均质机为上海东华高压均质机厂产品,型号:GYB40-10S,最大压力:100MPa,最大流量:40L/h。实验时在进料斗加装搅拌装置,搅拌速度70rpm。

### 1.4 前处理

柳枝稷干粉用0.5%的NaOH溶液配成3%的悬浮液,125℃处理120min,自然冷却至常温,加入均质机进料斗,70rpm搅拌保持悬浮状态,通过均质机,循

环物料并逐步升压,压力达到100MPa时收集物料。为黑褐色粘稠状流体。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2次,至pH值中性,真空滤干,低温真空干燥,碾成粉末,得处理样品(TS)。对照样品(SC)不作任何处理。碱处理对照样品(TC)按相同条件作碱处理、抽滤和碾成粉末,不作爆破处理。处理后样品常温干燥保存备用。

### 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,70rpm搅拌,每分钟40次循环。测定前仪器用国标微粒乳液GBW(E)120021(批号:20070201,平均粒径 $2.1\mu\text{m}$ )和德国Duke公司的微粒标准乳液(批号:28626,平均粒径 $0.08\mu\text{m}$ )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 $0.02^\circ$ ,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<sup>[13]</sup>计算。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。样品按仪器的使用指南制备。

### 1.8 成分分析

灰分含量按文献<sup>[14]</sup>的方法测定。酸溶性木质素、Klason木质素含量按文献<sup>[15]</sup>的方法测定。还原糖按文献<sup>[15]</sup>的方法水解后用DNS法<sup>[16]</sup>测定,以葡萄糖为标准。

### 1.9 碱消耗量测定

用0.1N HCl标准溶液滴定处理前碱溶液和处理后滤液的碱浓度,根据两者的浓度差计算NaOH的消耗量。

### 1.10 酶解

称取0.5g样品,加13ml 0.05mol/L (pH值4.8)柠檬酸缓冲液,1.0ml 0.4%的 $\text{NaN}_3$ 溶液和1.0ml纤维素酶液(柠檬酸缓冲液配制),其中含滤纸活力2.34 FPU, $\beta$ -葡萄糖苷酶活力0.20 CBU和木聚糖酶活力2.65 IU,50℃,160rpm振动酶解48h,定时抽样DNS法测定还原糖的释放量,以酶解释放的还原糖占样品总还原糖的百分比表示酶解率。

## 2 结果

### 2.1 结构变化

超高压爆破后柳枝稷粉末的粒度变化见图1。

0.5%NaOH 处理半爆破对照样品 TC 的粒度略小于不作任何处理的对照样品 SC, 二者的平均粒径(Dav) 无显著差异( $P > 0.05$ )。超高压爆破明显降低柳枝稷粉末的粒度, 平均粒径由爆破前的 514.66 $\mu\text{m}$ (TC) 降低为爆破后的 53.22 $\mu\text{m}$ (TS)。这与均质机的均质作用完全一致, 主要是均质过程的高速剪切作用所致<sup>[10]</sup>。另外, 爆破后柳枝稷粉末悬浮液变为粘稠浆状, 由极易沉降的非均质液体变为均质流体。

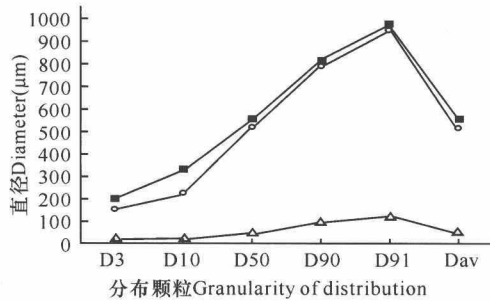


图1 超高压爆破对柳枝稷粒度分布的影响

Fig.1 Effect of UHPE on the granularity distribution of switchgrass powder

D3、D10、D50、D90、D97: 分别是 3%、10%、50%、90%、99% 分布概率的颗粒直径, Dav: 平均直径。

D3: Diameter of particles distribution of 3% probability, D10, D50, D90, D97 Diameter of particles of 10%, 50%, 90%, 99% respectively; Dav: average diameter.

■: SC, ○: TC, △: TS.

图2 结果显示, 对照样品 SC 呈纤维状结构, 碱处理对照样品 TC 仍保持原有的纤维状结构, 但纤维束之间的空隙变大。爆破处理样品 TS 由原来的纤维状结构转变为疏松的中空多孔结构, 表明超高压爆破不仅使物料粒度显著降低, 而且破坏了木质纤维的超微结构。

## 2.2 X-射线衍射分析

样品的 X-射线衍射图谱见图 3。碱处理对照样品 TC 在  $2\theta \approx 22.6^\circ$  处的结晶纤维素特征吸收峰高于未作任何处理的对照样品 SC, 二者在  $2\theta \approx 18.7^\circ$  的背景吸收几乎重叠, 表明碱处理使纤维素的结晶度增加。0.5%NaOH 处理 100MPa 爆破处理样品 TS 的吸收强度变小, 谱线水平下移, 说明超高压爆破使柳枝稷的 X-射线衍射吸收变小, 这与上述爆破后样品超微结构的变化一致。

图4 结果显示, 碱处理使  $CrI$  值显著增加, 由处理前的 48.83%(SC) 增加至 59.51%(TC)。超高压爆破后  $CrI$  由处理前的 59.51% 略降低为 58.92%(TS), 表示超高压爆破对柳枝稷纤维素的结晶指数影响很小。

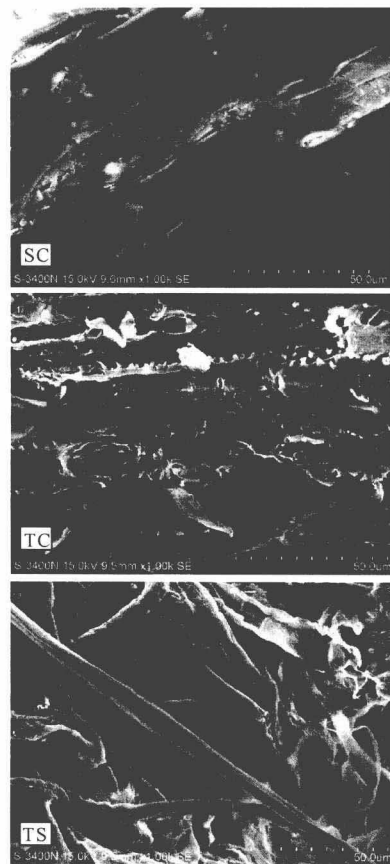


图2 超高压爆破处理柳枝稷的扫描电镜照片

Fig.2 SEM pictures of UHPE-treated switchgrass

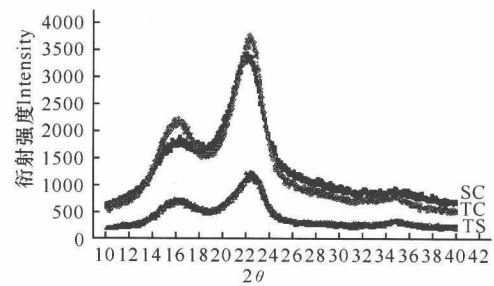


图3 超高压爆破前后柳枝稷的 X-射线衍射图谱

Fig.3 XRD diagram of UHPE treated switchgrass

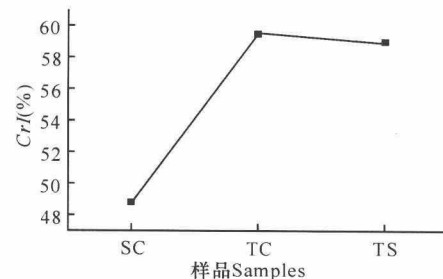


图4 超高压爆破对柳枝稷纤维素结晶指数的影响

Fig.4 Effect of UHPE on the  $CrI$ s of switchgrass cellulose

## 2.3 超高压爆破对化学成分的影响

表1 结果显示, 碱处理使灰分含量略为上升, 由 7.85%(SC) 上升至 8.74%(TC), 还原糖含量大幅度由

59.01%上升至87.18%，而酸溶性木质素和 Klason 木质素的含量则分别由 13.03%和 18.7%降低为 6.41%和 6.47%。超高压爆破使柳枝稷的灰分、酸溶性木质素和 Klason 木质素等组分含量同时下降，并由此使还原糖的含量上升至 89.49%。

表1 超高压爆破处理对柳枝稷成分的影响

Table 1 Effect of UHPE on the chemical contents of switchgrass

| 样品<br>Samples | 灰分<br>Ash (%) | 还原糖<br>Reduced sugar (%) | Klason<br>木质素<br>Klason<br>lignin (%) | 酸溶性木<br>质素<br>Acid<br>soluble<br>lignin (%) | 总计<br>Total (%) |
|---------------|---------------|--------------------------|---------------------------------------|---|-----------------|
| SC            | 7.85±0.02     | 59.01±0.28               | 18.7±0.25                             | 13.03±0.28                                  | 98.59           |
| TC            | 8.74±0.29     | 87.18±0.39               | 6.47±0.08                             | 6.41±0.08                                   | 108.8           |
| TS            | 4.20±0.18     | 89.49±2.57               | 4.15±0.04                             | 5.99±0.04                                   | 103.83          |

### 2.4 超高压爆破对耗碱量的影响

表2结果显示，超高压爆破使柳枝稷对 NaOH 的消耗量由 4.19g/kg 提高到 6.45g/kg，提高了 53.94%。这应该是超高压爆破破坏了柳枝稷木质纤维的超微结构，增大碱的作用面积所致。

表2 超高压爆破对碱处理柳枝稷 NaOH 消耗量的影响

Table 2 Effect of UHPE on the NaOH consuming of alkaline treatment

| 样品<br>Samples | 柳枝稷量<br>Switchgrass (g) | NaOH 浓度<br>NaOH concentration (%) |                              | NaOH<br>耗量*<br>Consumed (g/kg) |
|---------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|               |                         | 处理液<br>Treating<br>solution       | 滤液<br>Filtration<br>solution |                                |
| TC            | 31.01±0.01              | 0.50±0.002                        | 0.37±0.01                    | 4.19±0.26                      |
| TS            | 31.01±0.01              | 0.51±0.004                        | 0.31±0.01                    | 6.45±0.20                      |

\* NaOH 耗量 = NaOH/柳枝稷。NaOH consumed = NaOH (g)/switchgrass(kg).

### 2.5 超高压爆破对酶解的影响

用绿色木霉的复合纤维素酶制剂水解各样品，酶解曲线见图5。酶解48h的酶解率几乎达到最大值，曲线呈水平变化。对照样品 SC 的酶解率只有 23.5%，碱处理对照样品 TC 的酶解率增加至 80.6%，增加了 243.0%，爆破处理样品 TS 的酶解率

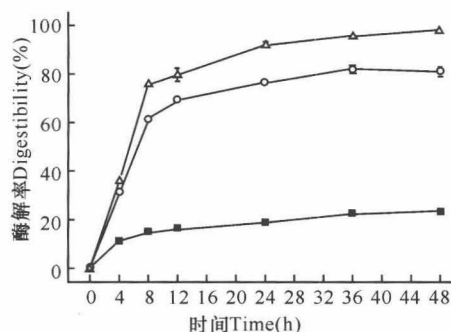


图5 超高压爆破处理样品的酶解曲线

Fig. 5 Enzymatic hydrolysis curve of UHPE-treated samples

—■—: SC, —○—: TC, —△—: TS.

进一步增加至 97.6%，基本达到了完全酶解，较碱处理对照样品 TC 提高了 21.1%，表明超高压爆破显著提高了柳枝稷秸秆的酶解率。

### 3 讨论

高压均质技术目前主要用于对物料的乳化和破碎均质等加工，要求物料为液体或较均匀的微粒悬浮液。悬浮液中的固体颗粒沉降过快将使设备极易堵塞，物料无法通过。利用高压均质设备对固态的木质纤维材料进行前处理至今未见报道。本文首先用 0.5% 的 NaOH 溶液加热处理柳枝稷粉末，使之呈易悬浮状态，再通过设备的进料斗加装搅拌装置进行搅拌，使物料保持悬浮状态，顺利通过高压均质设备，利用高压均质的作用过程对木质纤维材料实现了 100MPa 的超高压爆破。一般认为，高压均质对物料产生剪切、冲击、“空穴”等多种作用<sup>[10]</sup>。我们的结果表明，利用高压均质设备进行超高压爆破处理能够彻底改变柳枝稷木质纤维的结构，使其颗粒变小(图1)，颗粒悬浮液变为粘稠流体，超微结构由纤维状变成松散的中空多孔结构(图2)。这种结构改变无疑显著增大了木质纤维的可及面积，由此增强碱对木质素、灰分等成分的溶出作用，提高了酶的作用效果。碱处理结果显示木质素、灰分的含量显著下降，还原糖含量由此上升(表1)，碱处理的耗碱量相应提高(表2)，酶解率显著提高，达到了 97.6%，而且用酶量很少，只有 4.7FPU/g(图5)。酶解效果高于已报道的其它柳枝稷前处理方法<sup>[2~5]</sup>。不过，超高压爆破对柳枝稷纤维素的结晶指数(CrI)影响很小，这可能是利用 Segal 公式计算的 CrI 只表征结晶纤维素占总固体的百分含量，超高压爆破由于促进了碱对非结晶的木质素和半纤维素等组分的溶出，抵消了本身对结晶纤维素的破坏作用。前处理使 CrI 上升以前已有报道<sup>[17,18]</sup>，结果与本文一致。

目前普遍认为，阻碍木质纤维酶解的因素主要有木质素、半纤维素等组分在纤维素表面的覆盖并形成的坚实复合结构，纤维素的高度结晶化以及木质素对纤维素水解酶的非作用性吸附等<sup>[13,19]</sup>。以稻草为材料，我们发现超高压爆破使酶解率显著提高至 100.09%，纤维素的 CrI 明显降低，但材料的理化成分变化不大<sup>[20]</sup>。结合上述结果，我们认为超高压爆破显著提高酶解率的作用机理主要是破坏了木质纤维的超微结构，使酶的作用面积显著增加。蒸汽爆破<sup>[21]</sup>、氨爆<sup>[17]</sup>和氨循环处理<sup>[18]</sup>对木质纤维材料的纤维结构也有一定的破坏作用，但是其作用只是使微纤维束发生分离，并不能破坏其中的超微结构，作用效

果远不如超高压爆破。有学者认为对木质纤维结构的这种轻微破坏并不是这些前处理方法提高酶解率的主要原因<sup>[19]</sup>。因此,超高压爆破破坏木质纤维超微结构的作用是独特的。鉴于该技术不需要高温加热和特殊的设备,使木质纤维变成流体后对后续工序,如物料输送、酶解等极为有利,我们认为该技术可能是一种很有潜力的木质纤维材料前处理方法。

#### 参考文献:

- [1] Mclaughlin S, Bouton J, Bransby D, et al. Developing switchgrass as a bioenergy crop[M]//Janick J. Perspectives on Crops and New Uses. Alexandria, VA: ASHS press, 1999: 282-299.
- [2] Chang V, Burr B, Holtzapple M. Lime pretreatment of switchgrass[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1997, 63(17): 3-19.
- [3] Hu Z H, Wen Z Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment [J]. Biochemical Engineering J, 2008, 38(3): 369-378.
- [4] Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert T I, et al. Pretreatment of switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX) [J]. Appl Biochem and Biotechnol, 2005, 121-124: 1133-1142.
- [5] Alireza E, Andrew G H, John J F, et al. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass [J]. Bioresource Technol, 1997, 59(2-3): 129-136.
- [6] Sun Ye, Cheng Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production; a review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83: 1-11.
- [7] Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 618-628.
- [8] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies [J]. Bioresource Technol, 2005, 96: 1959-1966.
- [9] 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.
- [10] Middelberg Anton P J. Process-Scale disruption of microorganisms [J]. Biotechnology Advances, 1995, 13(3): 491-551.
- [11] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257-286.
- [12] Saddler J N, Yu E K C, Mes-hartree M, et al. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels [J]. Applied and Environ Microbiol, 1983, 45: 153-160.
- [13] Kim S, Holtzapple M T. Effect of structural features on enzymatic digestibility of corn stover [J]. Bioresource Technol, 2006, 97: 583-591.
- [14] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of ash in biomass [S]. Laboratory Analytical Procedure, 2005.
- [15] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[S]. Laboratory Analytical Procedure, 2007.
- [16] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulase activities [S]. Laboratory Analytical Procedure, 1996.
- [17] Kim T H, Kim J S, Sunwoo C, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia [J]. Bioresource Technol, 2003, 90: 39-47.
- [18] Kim T H, Lee Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process[J]. Bioresource Technol, 2005, 96: 2007-2013.
- [19] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. Bioresource Technol, 2005, 96: 673-686.
- [20] 陈东, 陆琦, 黄俊, 等. 稻草超高压爆破前处理研究[J]. 广西科学, 2009, 16(2): 180-184.
- [21] 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.

(责任编辑: 邓大玉)

## HIV-1 RNA 基因组二级结构被确定

单链病毒 RNA 基因组内的二级结构具有几种功能和调控作用。最近科研究人员从感染性病毒颗粒分析提取出的真实 HIV RNA, 已确定出一个完整 HIV-1 RNA 基因组的二级结构。他们应用 SHAPE 技术(由引物延伸催化的高通量选择性 2'-羟基酰化)对由 HIV-1 RNA 基因组形成的所有结构进行定性, 从而发现了无数高结构性主题, 其中很多主题的功能也可以被推断出来。重要的是, 他们还发现 RNA 结构元素的存在影响蛋白的翻译, 有助于正确的蛋白折叠。这表明, HIV-1 基因组的构成元素对病毒适应性非常关键。从这项工作获得的信息, 有可能使我们对 HIV-1 生物学有更好的认识, 并有可能导致新的抗逆转录病毒干预方法的问世。

(据科学网)