

玉米秸秆 AFEX 预处理纤维素酶解特性研究

李骏宝 陆敏生 张海燕 韩鲁佳

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 为了探究氨纤维膨胀 (Ammonia fiber expansion, AFEX) 预处理产生的酚类物质和木质素暴露程度的变化对酶解的影响, 对玉米秸秆 (CK) 进行了高、低两个温度水平的 AFEX 预处理 (L-AFEX: 90℃、5 min; H-AFEX: 140℃、15 min, 载氨量和含水率分别为 1 g/g 和 60%), 对预处理后玉米秸秆的木质纤维成分、酚类物质含量及纤维素、木质素的表面暴露程度的变化进行了系统表征, 并分析了这些变化对酶解的影响。研究表明, L-AFEX 和 H-AFEX 预处理将玉米秸秆的酶解葡萄糖得率分别提高至 37.57% 和 74.74%, 随着 AFEX 预处理温度的升高, 玉米秸秆中纤维素和半纤维素含量不变, 酸溶木质素增多, 木质素亲水性增强, 减弱了酶解时木质素与纤维素酶间的非生产性吸附, 同时产生了更多的酚类物质。AFEX 预处理上清液中的酚类物质对纤维素酶水解能力的抑制作用显著, L-AFEX 和 H-AFEX 预处理的抑制率分别为 4.10% 和 10.40%, 酚类物质对 H-AFEX 固体残余物酶解的抑制率为 5.06%。AFEX 预处理显著增大了纤维素酶可及的表面积, 将纤维素表面积从 316.08 m²/g (CK) 增大至 430.97 m²/g (L-AFEX) 和 422.27 m²/g (H-AFEX), 将木质素表面积从 293.13 m²/g (CK) 减小至 271.25 m²/g (L-AFEX) 和 215.23 m²/g (H-AFEX), 使纤维素与木质素表面积比值从 1.08 (CK) 增大至 1.59 (L-AFEX) 和 1.96 (H-AFEX), 有效降低了木质素对纤维素酶解的空间阻碍, 提高了酶解效率。

关键词: 玉米秸秆; 氨纤维膨胀; 预处理; 酶解; 木质素; 酚类物质

中图分类号: S216.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2021)01-0294-09

OSID:



Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Cellulose in AFEX Pretreated Corn Stover

LI Junbao LU Minsheng ZHANG Haiyan HAN Lujia
(College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to further explore the changes of free total phenols content and lignin exposure after AFEX pretreatment and their effects on enzymatic hydrolysis, AFEX pretreatment experiments were conducted on corn stover (CK) under two conditions: L-AFEX (1 g/g, 60% moisture content, 90℃, 5 min) and H-AFEX (1 g/g, 60% moisture content, 140℃, 15 min). The changes of lignocellulosic composition, content of free total phenols, and exposure of cellulose and lignin of CK, L-AFEX pretreated corn stover, and H-AFEX pretreated corn stover were systematically characterized, and their effects on enzymatic hydrolysis were analyzed. The results showed that L-AFEX and H-AFEX enhanced the glucose yield of enzymatic hydrolysis of corn stover to 37.57% and 74.74%, respectively. As the condition of AFEX pretreatment was increased, the content of cellulose and hemicellulose in corn stover remained unchanged, the content of acid soluble lignin was increased, the hydrophilicity of lignin was enhanced which might weaken the non-productive adsorption between lignin and cellulase during enzymatic hydrolysis, and more phenols were produced. The inhibition effects of the phenols produced during AFEX pretreatment on cellulase hydrolysis ability were significant (4.10% for L-AFEX and 10.40% for H-AFEX). Moreover, the enzymatic hydrolysis of H-AFEX-pretreated solid residue was inhibited (5.06%) by phenols. After AFEX pretreatment, the cell wall structure was destroyed, the enzyme-accessible surface area was increased, surface area of cellulose was increased from 316.08 m²/g (CK) to 430.97 m²/g (L-AFEX) and 422.27 m²/g (H-AFEX), surface area of lignin was

收稿日期: 2020-03-19 修回日期: 2020-05-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571569)

作者简介: 李骏宝 (1990—), 男, 博士生, 主要从事农业纤维质物料预处理酶解研究, E-mail: lijunbao0702@cau.edu.cn

通信作者: 韩鲁佳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源与利用研究, E-mail: hanlj@cau.edu.cn

decreased from 293.13 m²/g (CK) to 271.25 m²/g (L-AFEX) and 215.23 m²/g (H-AFEX), and the ratio of cellulose surface area to lignin surface area was increased from 1.08 (CK) to 1.59 (L-AFEX) and 1.96 (H-AFEX), which effectively reduced the steric hindrance of lignin and enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency.

Key words: corn stover; ammonia fiber expansion; pretreatment; enzymatic hydrolysis; lignin; phenols

0 引言

木质纤维类生物质年产量大、分布广,是制取纤维素乙醇的主要原料^[1]。木质纤维类生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[2],纤维素被包裹在共价相连的木质素和半纤维素中,导致用酶水解法制取纤维素乙醇时降解率低,大大影响了乙醇的产率^[3]。因此,在酶水解前需对木质纤维类生物质进行预处理,以降低其抗降解特性,提高纤维素的酶可及度,从而提高酶水解效率。

文献[4]指出,理想的预处理方法能最大限度地脱除木质素、减少多糖的改性,从而保留原始的微纤丝结构。木质素是对木质纤维类生物质酶水解效率影响较大的因素,其主要抑制机制是木质素填充在纤维素和半纤维素的网络中,在空间上阻碍了纤维素酶和纤维素的接触,并能与纤维素酶发生非生产性吸附^[5]。木质素解聚后产生的水溶性酚类物质还会与纤维素酶形成沉淀复合物,从而不可逆地抑制纤维素酶的活性^[6]。但是,不同原料及其预处理方法和预处理条件的产物往往不同,对木质素解聚产生的酚类物质的影响也不同^[7]。

氨纤维膨胀(AFEX)预处理是一种有效的预处理方法,国内外已开展了大量系统的研究工作,研究表明,AFEX 预处理能有效地破坏细胞壁的亚显微结构,切断木质素与多糖的连接,并使半纤维素和木质素部分解聚,对纤维素产生消晶作用,去除半纤维素侧链上的乙酰基,从而提高纤维素的酶可及度和酶水解效率^[6-8]。此外,AFEX 预处理工艺还具有固体加载率高、不需水洗、绝大多数氨可回收、残留在物料中的氨能为发酵过程提供氮源等优点^[9-10]。文献[11]指出,虽然 AFEX 预处理后的木质纤维物料的木质素总量变化不显著,但木质素的溶解性显著提高。文献[12]研究分析了 AFEX 预处理柳枝稷木质素物化性质的变化及其对酶解的影响,结果表明,AFEX 预处理柳枝稷木质素的分子量、聚合度、紫丁香基与愈创木基的比例均有所提高,木质素对纤维素酶的非生产性吸附降低,对酶解过程的抑制作用随之减小,从而使酶解效率提高。文献[13]采用超速离心、超滤、固相萃取技术对 AFEX 预处理上清液中不同分子量的产物进行分离,并分析了它们对纤维素酶的抑制作用,发现主要的抑制作用系

由上清液中的低聚物(3~10 ku 或 0~3 ku)产生,并且大部分抑制物为疏水结构,其中含有许多酚类物质,推断酚类物质可能是 AFEX 预处理上清液产生抑制作用的重要成分。上述研究均未涉及 AFEX 预处理木质素对酶解的空间阻碍作用以及产生的酚类物质对后续酶解的影响。

本文以玉米秸秆为原料,进行高低两个温度条件的 AFEX 预处理,基于孔径分布、表面形貌、细胞壁结构和纤维素、木质素表面积的变化,研究 AFEX 预处理后木质素对酶解的空间阻碍作用以及产生的酚类物质对后续酶解的影响。

1 材料与方法

1.1 玉米秸秆及酶制剂

玉米秸秆取自中国农业大学上庄实验站(40°2'N, 116°20'E)。采集的玉米秸秆样品置于空旷通风处自然风干后进行机械粉碎(9ZP-0.4 型粉碎机,辽宁凤城县东风机械厂),在 40℃ 恒温干燥箱中干燥 48 h,使用 RT-34 型锤片式粉碎机(香港荣聪精密科技有限公司)粉碎至秸秆粉末全部通过 40 目振动筛,得到玉米秸秆制备样品(CK),置于自封袋中在干燥通风处室温(20℃)保存备用。

试验所用纤维素酶(Celluclast 1.5 L)和 β-葡萄糖苷酶(Novozyme 188)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。纤维素酶酶活的测定参照美国可再生能源实验室的滤纸酶活法^[14],β-葡萄糖苷酶的酶活测定参照文献[15]的方法,测得纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶的酶活分别为 72.8 U/mL 和 385.5 U/mL。

1.2 玉米秸秆 AFEX 预处理

已有相关文献表明,AFEX 预处理酶解的效果随着处理温度的上升(从 90℃ 升至 140℃)而显著增加^[12,16]。为便于分析,本研究选取文献中的高、低两个极端 AFEX 预处理条件(90℃、5 min 和 140℃、15 min)进行试验设计^[12,16],即:预处理在 Parr 4523 型反应釜(美国 Parr Instruments 公司)中进行。每 1 g CK 与 0.6 g 水混合,氨的加载量为 1 g/g(以单位质量玉米秸秆计),一组在 90℃ 下恒温处理 5 min(L-AFEX),另一组在 140℃ 下恒温处理 15 min(H-AFEX),然后迅速打开泄压阀排出氨气,取出样品置于通风橱中自然风干后于 60℃ 干燥箱中干燥。干燥的 AFEX 预处理样品于自封袋中封

存待用。

1.3 酶解试验

1.3.1 AFEX 预处理玉米秸秆的酶解试验

为了考察 AFEX 预处理对玉米秸秆酶解效果的影响,AFEX 预处理玉米秸秆的酶解试验在 pH 值 4.8 的 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液中进行,料液比为 0.05 g/mL,纤维素酶加载量为 20 U/g,β-葡萄糖苷酶加载量为 40 U/g,为避免酶解过程中微生物的干扰,添加四环素盐酸盐至 0.08 g/L。酶解 72 h 后,将样品取出置于沸水浴中 10 min 使纤维素酶灭活,利用抽滤进行固液分离,用适量的去离子水冲洗固体残余物 3 次,收集、混匀所有滤液(记为酶解液)并记录其体积。取部分酶解液用 CaCO₃调节 pH 值至 5~6 保存备用,用于葡萄糖得率的检测。酶解试验设置 3 组平行。

利用 Hitachi L-7200 型高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司)测定酶解液中单糖浓度,色谱柱使用 Benson BP-800 Pb⁺⁺型碳水化合物分析柱(美国 Benson Polymeric 公司),流动相为超纯水,流速为 0.6 mL/min,柱温为 80℃,进样体积 20 μL,洗脱时间为 40 min。单糖得率计算公式为

$$Y = \frac{m_E}{m_P} \times 100\%$$
 (1)

式中 m_E ——酶解 72 h 后产出单糖的质量,mg
 m_P ——不同底物中可转化成单糖的最大质量,mg

1.3.2 酚类物质对酶解的影响

不同分子量的酚类物质都会对酶解产生抑制效果^[17],而这些酚类物质由于结构复杂很难定量^[18],所以直接测定不同分子质量的酚类物质对酶解的抑制效果比较困难。故本文利用活性炭对各上清液中的酚类物质进行脱除,用活性炭吸附前后的预处理上清液稀释纤维素酶,并用稀释后的酶水解纤维素滤纸,测定产糖量来表征预处理过程中产生的酚类物质对纤维素酶水解能力的影响。取无磷活性炭(Activated carbon,AC,上海迪柏化学品技术有限公司),用大量去离子水和异丙醇冲洗^[19],再于通风橱自然风干后置于 105℃干燥箱中干燥至绝干。为了研究 AFEX 预处理产生的酚类物质对酶解的作用,分别将 CK、L-AFEX 和 H-AFEX 预处理玉米秸秆样品与 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液按料液比 0.05 g/mL 混合,在 50℃水浴中 150 r/min 振荡 1 h,3 000 r/min 离心 15 min 得上清液,并用 0.22 μm 的滤膜过滤。各上清液中的葡萄糖、甲酸、乙酸、乙醇、糠醛和羟甲基糠醛浓度的测定参照方法 NREL/TP-510-42623^[20]。取部分上清液与 0.05 g/mL 经清

洗处理的 AC(30℃,200 r/min,16 h)脱除酚类物质^[17]。试验设置 2 组平行。参照文献[21]的方法测定脱除酚类物质前后上清液中总酚类物质(Total phenolic component,TPC)的含量,上清液中 TPC 的脱除率计算公式为

$$R = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\%$$
 (2)

式中 m_i ——脱除酚类物质前上清液中 TPC 质量,mg
 m_f ——脱除酚类物质后上清液中 TPC 质量,mg

用脱除酚类物质前后的上清液将纤维素酶稀释 70 倍(约为 10 U/g),以 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液将纤维素酶稀释 70 倍作对照,分别将 0.5 mL 稀释的酶液、1.0 mL 柠檬酸缓冲液和 50 mg Whatman No.1 滤纸于 15 mL 具塞试管中混合并于 50℃水浴中恒温 1 h,而后加入 3 mL DNS(二硝基水杨酸)显色液终止反应并于沸水浴中恒温 5 min 显色,用蒸馏水将显色后的液体稀释一定倍数后用 UV-2550 型分光光度计(日本 Shimadzu 公司)在 540 nm 下测定吸光度。上清液对纤维素滤纸水解的抑制率计算公式为

$$I = \frac{P_{CBS} - P_s}{P_{CBS}} \times 100\%$$
 (3)

式中 P_{CBS} ——柠檬酸缓冲液稀释的纤维素酶水解滤纸产生的还原糖质量,mg
 P_s ——上清液稀释的纤维素酶水解滤纸产生的还原糖质量,mg

由于玉米秸秆的构成比纤维素滤纸复杂得多,且 AFEX 对玉米秸秆的结构造成了较大改变,故再用分散在柠檬酸缓冲液和 AC 吸附前后的预处理上清液中的 CK、L-AFEX 及 H-AFEX 预处理固体残余物的酶解葡萄糖得率来表征不同上清液中的酚类物质对酶解相应固体残余物的抑制作用。

每种提取上清液后的预处理固体残余物用柠檬酸缓冲液冲洗 3 遍并分成 3 组,分别被柠檬酸缓冲液及相应的 AC 吸附前后的预处理上清液冲洗 3 遍后再以 0.05 g/mL 的料液比分散。而后加入 20 U/g 的纤维素酶和 40 U/g 的纤维二糖酶。用不同上清液与酶的混合物做空白。将样品和空白置于 50℃、150 r/min 的恒温水浴振荡器中酶解 72 h,取出后于沸水浴中恒温 10 min 灭酶,而后 3 000 r/min 离心 15 min。收集上清液,用液相测定其中的葡萄糖浓度,抑制率的计算方法与式(3)相似。

1.4 木质纤维成分分析

纤维素、半纤维素、木质素含量的测定参照文

献[22],测定前样品于 105℃干燥箱中干燥至绝干。木质素含量为酸溶木质素含量和酸不溶木质素含量之和。每个样品分析设置 2 个重复。

1.5 微结构分析

1.5.1 孔径分布

利用溶质排斥的方法对样品的孔径分布进行分析。以葡萄糖、葡聚糖 T2000 (Dextran T2000) 和一系列的聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 为分子探针,各探针分子的相对分子质量和直径如表 1^[23-24]所示,每个探针分子设置 2 个重复。试验步骤主要参照文献[23],并稍作修改:将 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理样品用大量去离子水冲洗至滤液无色中性,将样品抽滤至固体质量分数近 20% 的湿样,测定湿样的干质量。称取 1.0 g 湿样于离心管中,加入 2 mL 质量浓度为 0.01 g/mL 的探针分子溶液于室温下混合 2.5 h,其间每 0.5 h 振荡 30 s。将样品与探针的混合物于 3 000 r/min 下离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 的尼龙膜,每个样品设置 2 组平行,并以水与湿样混合后的上清液作为样品空白。上清液中分子探针的浓度用装备有 Waters 2414 型示差检测器(美国 Waters 公司)的 Waters e2695 型高效液相色谱仪检测,进样器和检测器之间用一个直通接头代替分析柱,流动相为超纯水,流速为 0.4 mL/min,进样体积为 10 μL。

表 1 探针分子的相对分子质量和直径
Tab.1 Relative molecular masses and diameters of probes

探针分子	相对分子质量	直径/nm
葡萄糖	180	0.8
PEG400	400	1.8
PEG1000	1 000	2.7
PEG3000	3 000	5.0
PEG6000	6 000	7.0
PEG8000	8 000	8.4
PEG10000	10 000	9.8
PEG20000	20 000	13.0
PEG35000	35 000	24.0
Dextran T2000	2 000 000	56.0

单位干质量湿样中直径为 i 的分子探针不可进入的孔的体积 d_i 计算公式为^[25]

$$d_i = \frac{W + q}{p} - \frac{W}{p} \frac{C_i}{C_f} \tag{4}$$

式中 W ——探针溶液体积, mL
 q ——湿样中水体积, mL
 p ——湿样干质量, g
 C_i ——探针溶液的初始质量分数, %
 C_f ——上清液中探针溶液的质量分数, %
葡聚糖 T2000 的粒径为 56 nm, d_{56nm} 被认为是总

的不可进入的孔的体积,故单位干质量湿样中粒径为 i 的分子探针可进入的孔的体积 A_i 计算公式为

$$A_i = d_{56nm} - d_i \tag{5}$$

1.5.2 表面形貌

使用 Hitachi SU - 3500 型扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM; 日本 Hitachi 公司)分析不同样品的表面形貌。测试前需先将适量样品固定于粘有黑色导电胶的载物台上,并作喷 Au 处理,时间为 60 s。测试时加速电压为 15 kV。

1.5.3 细胞壁结构

挑选各样品中包含有厚壁细胞包围的维管束结构的颗粒,利用 Hitachi H - 7650B 型透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 观察这些颗粒的横截面,分析 AFEX 预处理后玉米秸秆细胞壁结构的变化。观察时,TEM 的加速电压为 80 kV。用于 TEM 观察的超薄切片样品的制作过程及超薄切片的乙酸双氧铀-柠檬酸铅双染色的操作流程同文献[26]。

1.5.4 纤维素、木质素表面积

同文献[27],通过测定刚果红和天青 B 与样品的最大吸附量来估算样品中纤维素和木质素的表面积。两种染料与样品的最大吸附量在 Matlab 2014a 中用 Langmuir 等温线拟合而得。

1.6 数据处理

本文所列数据均为统计平均值,误差由计算数据的标准偏差得到,均值的差异显著性检验借助 SPSS 20.0,基于 Duncan 单因素方差检验,检验水平为 99% ($P < 0.01$)。柱状图和折线图的制作均借助 Origin 8.5。

2 结果与讨论

2.1 AFEX 预处理玉米秸秆的酶解效果

如图 1 所示,酶解 72 h 后,CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆葡萄糖得率分别为 $(26.18 \pm 0.57)\%$ 、 $(37.57 \pm 0.01)\%$ 和 $(74.74 \pm 0.07)\%$,木糖和阿拉伯糖得率分别为 $(5.59 \pm 0.17)\%$ 、 $(26.05 \pm 0.23)\%$ 和 $(76.63 \pm 0.20)\%$ 。可以看出,AFEX 预处理对玉米秸秆酶解效果的改善随预处理条件的升高而增强。文献[16]用与本研究 H - AFEX 预处理相同的条件处理了玉米秸秆,再用优化的混合酶酶解 72 h,得到了近 80% 的葡萄糖得率,结果与本研究相近。从图 1 中还可看出,经过 AFEX 预处理的玉米秸秆在酶解时的葡萄糖得率、木糖和阿拉伯糖得率均得到显著提高,而相对于葡萄糖得率,预处理条件的增强对酶解时木糖和阿拉伯糖得率的影响更为显著。这可能是由于半纤维素在 AFEX 预处理过程中会发生解聚^[9],且半纤维素为非晶态,更容易

在酶解过程中被降解。

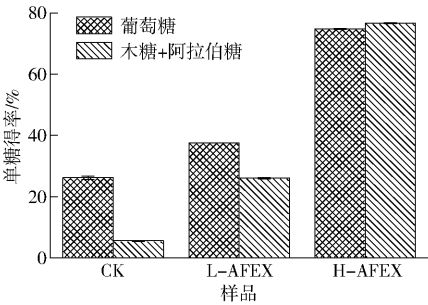


图1 AFEX 预处理前后玉米秸秆酶解 72 h 单糖得率
Fig.1 Monosaccharide yields of corn stover before and after AFEX pretreatment after 72 h of enzymatic hydrolysis

2.2 AFEX 预处理前后木质纤维成分的变化及其对酶解的影响

如表 2 所示,CK 中纤维素、半纤维素和木质素质量分数分别为 (35.16 ± 0.10)%、(19.01 ± 0.05)% 和 (18.82 ± 0.58)%。AFEX 预处理后,玉

米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素含量均无显著变化($P>0.01$)。但是,随着预处理条件的增强,酸溶木质素含量显著升高($P<0.01$),酸不溶木质素含量显著降低($P<0.01$)。这与文献[11]的结果一致,其认为酸不溶木质素的降低可能源于 AFEX 预处理对木质素的化学改性。根据文献[28],酸溶木质素可能是由木质素降解产物和次生的亲水物质(木质素和碳水化合物形成的化合物)组成。这说明 AFEX 预处理会提高玉米秸秆中部分木质素的亲水性,由于疏水相互作用是木质素与纤维素酶之间发生非生产性吸附的主要作用机制^[29],那么这部分木质素与纤维素之间发生非生产性吸附的能力也就变弱。此外,在各上清液中均未检出甲酸、乙醇、糠醛和羟甲基糠醛。AFEX 预处理仅产生了少量乙酸(CK:(0.06 ± 0.01) mg/mL; L - AFEX:(0.10 ± 0.01) mg/mL; H - AFEX:(0.22 ± 0.01) mg/mL)。根据先前的研究,乙酸对酶解几乎无影响^[30]。

表 2 AFEX 预处理前后玉米秸秆的木质纤维成分含量

Tab.2 Lignocellulosic composition contents of corn stover before and after AFEX pretreatment			
参数	CK	L - AFEX	H - AFEX
纤维素质量分数/%	(35.16 ± 0.10) ^A	(34.04 ± 0.30) ^A	(34.80 ± 1.00) ^A
半纤维素质量分数/%	(19.01 ± 0.05) ^A	(19.12 ± 0.05) ^A	(18.22 ± 0.52) ^A
木质素质量分数/%	(18.82 ± 0.58) ^A	(19.72 ± 0.33) ^A	(20.51 ± 0.51) ^A
酸溶木质素质量分数/%	(2.06 ± 0.01) ^C	(3.58 ± 0.03) ^B	(8.20 ± 0.26) ^A
酸不溶木质素质量分数/%	(16.76 ± 0.57) ^A	(16.14 ± 0.36) ^A	(12.31 ± 0.77) ^B

注:相同物理量数据不同大写字母表示差异显著($P<0.01$),下同。

2.3 AFEX 预处理产生的酚类物质及其对酶解的影响

AC 吸附前后,上清液中 TPC 的变化如表 3 所示。可以看出,AFEX 预处理后上清液中 TPC 含量显著增加($P<0.01$),且随 AFEX 预处理条件的增强,TPC 含量也显著增加($P<0.01$)。文献[31 - 32]中也得到了类似的结果。AC 吸附后 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理样品上清液中 TPC 的脱除率分别为 96.14%、98.72% 和 98.95%。

表 3 AC 吸附前后上清液中 TPC 含量
Tab.3 TPC contents in different supernatants before and after AC adsorption

样品名称	TPC 质量比/ (mg·g ⁻¹)	AC 吸附后 TPC 质量比/ (mg·g ⁻¹)	TPC 脱除率/ %
CK	(6.21 ± 0.12) ^C	(0.24 ± 0.01) ^A	96.14
L - AFEX	(10.12 ± 0.12) ^B	(0.13 ± 0.01) ^B	98.72
H - AFEX	(17.11 ± 0.03) ^A	(0.18 ± 0.02) ^{AB}	98.95

图 2 为 AC 吸附前后上清液对纤维素滤纸酶解效果的影响,“CBS”为对照组,为 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液稀释的酶液,标有“S”的是纤维素酶与不

同上清液混合,标有“AC”的是经 AC 脱除酚类物质的上清液稀释的酶液。以 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液稀释的酶液作为对照,经计算得 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理上清液对纤维素滤纸酶解的抑制率分别为 28.04%、4.10% 和 10.40%,差异极显著($P<0.01$)。但是,上清液脱除酚类物质后,L - AFEX 和 H - AFEX 预处理上清液对水解均未产生显著的抑制作用($P>0.01$)。在不同预处理过程中产生的纤维素酶可溶性抑制物主要有可溶性糖(如葡萄糖、纤维二糖)、发酵产物(如乙醇)和酚类物质^[33]。CK 上清液中葡萄糖的质量浓度为(2.51 ± 0.14) mg/mL,L - AFEX 和 H - AFEX 预处理上清液中均未检出葡萄糖,且各上清液中均未检出乙醇。CK 上清液中 TPC 含量最低但抑制率最高,可能是因为 CK 中有相当量的游离葡萄糖,这些葡萄糖作为酶解产物会抑制纤维素酶的水解能力^[33]。以上表明,酚类物质是 AFEX 上清液中抑制纤维素酶水解能力的主要成分。脱除酚类物质后,CK 上清液的抑制率降低为 17.43%,但依然大于脱除酚类物质前 L - AFEX 和 H - AFEX 预处理上清液的抑制效果。

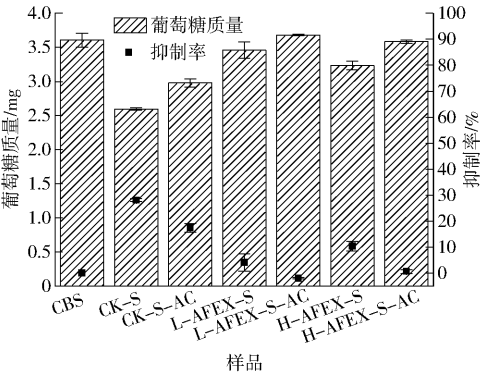


图 2 AC 吸附前后上清液对纤维素滤纸酶解产糖量的影响

Fig. 2 Influence of supernatants before and after AC adsorption on enzymatic hydrolysis of filter paper

图 3 为不同上清液中酚类物质对相应固体残余物酶解效果的影响,“CBS”为对照组,为分散在 pH 值 4.8 的柠檬酸缓冲液中的玉米秸秆,标有“S”的是预处理固体残余物分散在不同上清液中,标有“AC”的是预处理固体残余物分散在经 AC 脱除酚类物质的上清液中。以“CBS”为对照,用与图 2 相同的方式计算不同上清液中酚类物质对相应固体残余物酶解效果的抑制率。可以看出,CK 和 L - AFEX 预处理的上清液并未对其对应的固体残余物的酶解效果产生显著影响 ($P > 0.01$)。H - AFEX 预处理上清液对 H - AFEX 预处理固体残余物的酶解效果表现出显著的抑制效果(抑制率 8.07%)。AC 吸附后,H - AFEX 预处理上清液的抑制效果降低为 3.01%。这说明在本试验条件下,H - AFEX 预处理产生的酚类物质对酶解的抑制率为 5.06%。根据统计分析的结果,分散在 AC 吸附后的 H - AFEX 上清液中的 H - AFEX 预处理固体残余物的酶解效果与分散在柠檬酸缓冲液中的无显著差异 ($P > 0.01$)。尽管 CK 的上清液对酶水解能力有较强的抑制力,当酶解底物换成 CK 固体残余物后,抑制作用并没有体现出来。这大概是由于 CK 固体残余物本身具有较强的抗降解特性,上清液的抑制作用被掩盖了。H - AFEX 预处理固体残余物具有较理想的纤维素可及度,所以酶水解活性受到的影响就在酶解效果中体现了出来。

2.4 木质素、纤维素表面暴露程度的变化及其对酶解的影响

CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆样品中不同粒径的分子探针可扩散进入的孔体积如表 4 所示,L - AFEX 预处理玉米秸秆中葡萄糖可扩散进入的体积较 CK 无显著差异 ($P > 0.01$),在 H - AFEX 预处理后玉米秸秆中 0.8 nm 的探针可扩散进入的体积显著增大 ($P < 0.01$)。然而,在 AFEX

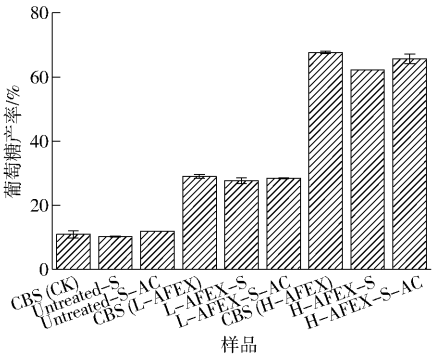


图 3 AC 吸附前后上清液对玉米秸秆酶解产糖量的影响

Fig. 3 Influence of supernatants before and after AC adsorption on enzymatic hydrolysis on corn stover

预处理玉米秸秆中,一系列 PEG 分子探针可扩散进入的体积总体上较 CK 并无显著差异 ($P > 0.01$)。0.8 nm 的探针小到几乎可以进入所有的孔,这说明 H - AFEX 预处理增大了玉米秸秆中的孔的总体积,并对其中小孔体积的增加作用更为明显。

表 4 AFEX 预处理前后玉米秸秆的孔径分布

Tab.4 Pore size distributions of corn stover before and after AFEX pretreatment

探针 直径/ nm	单位干质量样品中不同直径探针 可进入的孔体积/(mL·g ⁻¹)		
	CK	L - AFEX	H - AFEX
0.8	(1.08 ± 0.05) ^B	(1.18 ± 0.06) ^B	(1.46 ± 0.02) ^A
1.8	(0.87 ± 0.05) ^A	(0.96 ± 0.06) ^A	(1.05 ± 0.10) ^A
2.7	(0.83 ± 0.01) ^B	(0.92 ± 0.01) ^{AB}	(0.95 ± 0.03) ^A
5.0	(0.62 ± 0.02) ^A	(0.76 ± 0.06) ^A	(0.75 ± 0.01) ^A
7.0	(0.46 ± 0.04) ^A	(0.56 ± 0.03) ^A	(0.50 ± 0.11) ^A
8.4	(0.31 ± 0.03) ^A	(0.50 ± 0.03) ^A	(0.46 ± 0.12) ^A
9.8	(0.27 ± 0.03) ^A	(0.34 ± 0.02) ^A	(0.31 ± 0.13) ^A
13.0	(0.39 ± 0.03) ^A	(0.35 ± 0.05) ^A	(0.21 ± 0.07) ^A
24.0	(0.15 ± 0.01) ^A	(0.20 ± 0.07) ^A	(0.22 ± 0.07) ^A
56.0	0	0	0

文献[34]用 5.1 nm 来代表产自里氏木霉的纤维素酶的粒径,并发现 5.1 nm 粒径的分子可及的孔体积与酶水解的初始速率呈线性正相关关系。而 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆样品中粒径为 5.0 nm 的探针分子可进入的孔体积并无显著差异 ($P > 0.01$)。这说明,AFEX 预处理并未使玉米秸秆中纤维素酶可及的孔体积(孔径小于 56 nm)发生显著改变。

CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆样品及其酶解 72 h 样品的 SEM 结果如图 4 所示。CK (图 4a)的表面十分平整,结构完整紧凑。酶解 72 h 后(图 4b),秸秆表面虽有些褶皱,但整体结构并未受到破坏。说明 CK 中由纤维素、半纤维素和木质素构成的致密完整的网络结构严重阻碍了纤维素酶

的水解作用,致使酶解效率较低(酶解糖得率26.18%)。经过 L - AFEX 预处理后(图 4c),玉米秸秆表面形貌的变化明显,完整紧凑的结构被破坏,比表面积升高。酶解 72 h 后(图 4d),秸秆表面出现许多直径几微米的孔,但是整体结构较酶解前变化不大,这说明 L - AFEX 预处理虽然对玉米秸秆空间结构的影响作用显著,但是对酶解效率的提高仍有限(酶解糖得率 37.58%)。经过 H - AFEX 预处理后(图 4e),玉米秸秆的表面形貌发生了更大程度的改变,表面的破碎程度较 L - AFEX 预处理后的玉米秸秆更大,比面积的升高也就更大。经过 72 h 酶解后(图 4f),样品的结构被彻底破坏,这说明 H - AFEX 预处理大大提高了酶解效率(酶解糖得率 74.73%)。

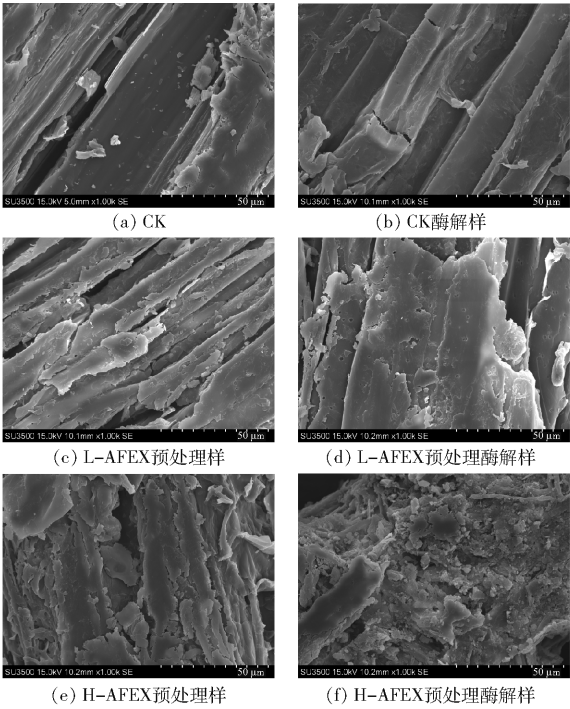


图 4 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆及其酶解样品的表面形貌分析

Fig. 4 Analysis of surface morphology of CK, L - AFEX-pretreated corn stover, and H - AFEX-pretreated corn stover and their enzymatically hydrolyzed samples

玉米秸秆中的各类多糖和木质素主要存在于细胞壁中,这些成分发生了显著变化一定会改变细胞壁的结构。CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆样品的细胞壁结构表征结果如图 5 所示,皆为厚壁细胞。如图 5a 所示,CK 的细胞壁结构完整清晰,初生壁(Primary cell wall, PCW)、次生壁(Secondary cell wall, SCW)、细胞角隅(Cell corner, CC)及胞间层(Middle lamella, ML)堆积紧密,无明显孔隙结构。又根据文献[35]的研究,在 TEM 下观察经过乙酸双氧铀-柠檬酸铅染色后的样品,木质

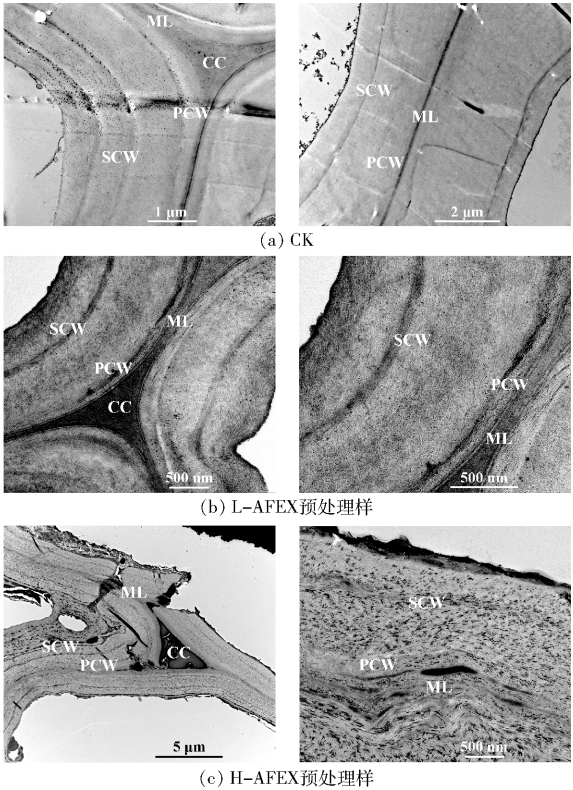


图 5 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆的细胞壁结构分析

Fig. 5 Analysis of cell wall structure of CK, L - AFEX-pretreated corn stover, and H - AFEX-pretreated corn stover

素会被染液中的重金属染成深色,纤维素则颜色较浅或呈无色。CK 中 CC 和 ML 的木质素含量显著高于 PCW 和 SCW,这与文献[35]中报道的一致。相同部位的不同位置被重金属染色的程度都比较均匀,说明相同部位中各组分排列均匀。L - AFEX 预处理后(图 5b),玉米秸秆细胞壁各部分的结构变化并不显著,但相同部位的不同位置被重金属染色的程度却不均一,尤其是 PCW 和 SCW 处均能看到明显较亮或较暗的部分。这可能是因为,经过 L - AFEX 预处理后,玉米秸秆细胞壁上原始的组分分布状态已被打破,木质素开始聚集,纤维素开始暴露。虽然从 SEM 结果看到 L - AFEX 预处理破坏了玉米秸秆的表面形貌,但从 TEM 结果来看此时细胞壁各部分的整体结构并未被破坏。H - AFEX 预处理后(图 5c),玉米秸秆细胞壁变得扭曲褶皱,甚至被撕裂,各部位之间出现错位,但并未产生更多的孔隙。这说明此时细胞壁各部位间的连接变得松散,这样的结构较 CK 和 L - AFEX 预处理玉米秸秆更容易在后续酶解过程中被进一步破坏,就可能有更多的纤维素暴露出来,被纤维素酶水解。另外,H - AFEX 预处理玉米秸秆细胞壁相同部位不同位置的染色程度较 L - AFEX 预处理样品显得更不均一。从图 5c 来看,在 CC 处、不同部位的连接处和细胞

壁断裂处能看到不同程度的木质素的聚集。而在细胞壁中的木质素组分发生了极为显著的聚集,形成了轮廓鲜明的黑点,此时木质素的比表面积显著缩小。

纤维素和木质素是木质纤维物料中吸附纤维素酶的两个主要成分^[36-37]。通过测定刚果红和天青 B 在底物上的最大吸附量,得到 CK、L - AFEX 和 H - AFEX 预处理玉米秸秆样品中纤维素及木质素的表面积,如图 6 所示。CK 的纤维素和木质素表面积分别为 $(316.08 \pm 7.01) \text{ m}^2/\text{g}$ 和 $(293.13 \pm 1.47) \text{ m}^2/\text{g}$, AFEX 预处理后,玉米秸秆中纤维素的表面积显著增大(L - AFEX: $(430.97 \pm 2.69) \text{ m}^2/\text{g}$, H - AFEX: $(422.27 \pm 6.64) \text{ m}^2/\text{g}$)、木质素的表面积显著减小(L - AFEX: $(271.25 \pm 2.75) \text{ m}^2/\text{g}$, H - AFEX: $(215.23 \pm 0.37) \text{ m}^2/\text{g}$),而预处理强度对纤维素的暴露影响不显著($P > 0.01$),木质素表面积却随着预处理强度的增强而显著减小($P < 0.01$)。这可能与细胞壁结构表征结果中在 H - AFEX 预处理后木质素发生的形态和分布变化有关,此时木质素的比表面积减小,同时木质素在秸秆表面的聚集可能会覆盖部分暴露的纤维素。CK、L - AFEX 和 H - AFEX

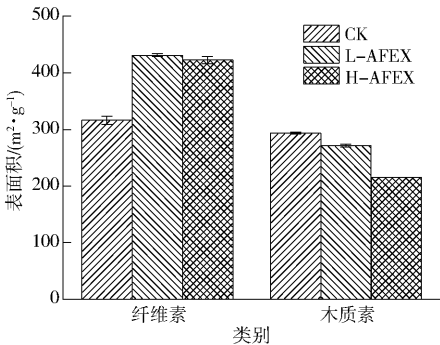


图 6 AFEX 预处理前后玉米秸秆纤维素、木质素表面积
Fig.6 Surface areas of cellulose and lignin in corn stover before and after AFEX pretreatment

预处理玉米秸秆样品中纤维素与木质素表面积比值分别为 1.08、1.59 和 1.96,假设纤维素和木质素在玉米秸秆表面的暴露分布均匀,由此推断,随着 AFEX 预处理条件的增强,玉米秸秆单位面积表面上纤维素酶可及的木质素对纤维素的空间阻碍逐渐降低。

因此,AFEX 预处理不仅增大了纤维素酶可及的表面积,还增大了纤维素酶可及的表面积中纤维素暴露的比例,从而有效降低了纤维素酶水解时的空间阻碍,提高了酶解效率。

3 结论

(1)从木质纤维组成、酚类物质和纤维素、木质素暴露程度 3 方面分析了 AFEX 预处理后玉米秸秆的变化及其对酶解效果的影响。

(2)随着 AFEX 预处理温度的升高和时间延长,玉米秸秆中纤维素和半纤维素含量不变,酸溶木质素增多,木质素亲水性增强,减弱了酶解时木质素与纤维素酶间的非生产性吸附,同时产生了更多的酚类物质。

(3)L - AFEX 和 H - AFEX 预处理上清液中的 TPC 对纤维素酶水解能力的抑制率分别为 4.10% 和 10.40%,TPC 对 H - AFEX 固体残余物的抑制率为 5.06% ($P < 0.01$)。

(4)AFEX 预处理显著增大了纤维素酶可及的表面积,将纤维素表面积从 $316.08 \text{ m}^2/\text{g}$ (CK) 增大至 $430.97 \text{ m}^2/\text{g}$ (L - AFEX) 和 $422.27 \text{ m}^2/\text{g}$ (H - AFEX),将木质素表面积从 $293.13 \text{ m}^2/\text{g}$ (CK) 减小至 $271.25 \text{ m}^2/\text{g}$ (L - AFEX) 和 $215.23 \text{ m}^2/\text{g}$ (H - AFEX),使纤维素与木质素表面积比值从 1.08 (CK) 增大至 1.59 (L - AFEX) 和 1.96 (H - AFEX),有效降低了木质素对纤维素酶解的空间阻碍,提高了酶解效率。

参 考 文 献

[1] BHUTTO A W, QURESHI K, HARIJAN K, et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass[J]. Energy, 2017, 122:724 - 745.

[2] JORGENSEN H, KRISTENSEN J B, FELBY C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars; challenges and opportunities[J]. Biofuel. Bioprod. Bior., 2007, 1(2):119 - 134.

[3] HIMMEL M E, PICATAGGIO S K. Our challenge is to acquire deeper understanding of biomass recalcitrance and conversion [M]//HIMMEL M E. Biomass recalcitrance; deconstructing the plant cell wall for bioenergy. Chichester: Blackwell Publishing Ltd., 2009: 1 - 6.

[4] DING S Y, LIU Y S, ZENG Y N, et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? [J]. Science, 2012, 338(6110):1055 - 1060.

[5] LI X, LI M, PU Y Q, et al. Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: the role of lignin chemistry and molecular weight[J]. Renew. Energ., 2018, 123(4):664 - 674.

[6] CHUNDAWAT S P S, VENKATESH B, DALE B E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility[J]. Biotechnol. Bioeng., 2007, 96(2):219 - 231.

[7] QIN L, LI W C, LIU L, et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase[J]. Biotechnol. Biofuels, 2016, 9(1): 70.

- [8] KIM J S, LEE Y Y, KIM T H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technol.*, 2016, 199:42–48.
- [9] BALAN V, BALS B, CHUNDAWAT S P S, et al. Lignocellulosic biomass pretreatment using AFEX[M]//MIELENZ J R. *Biofuels: methods and protocols*. New York: Humana Press Inc., 2009: 61–77.
- [10] LAU M W, DALE B E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH–ST)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(5):1368–1373.
- [11] UPPUGUNDLA N, SOUSA L D, CHUNDAWAT S P S, et al. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX (TM) pretreated corn stover[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2014, 7(1):72.
- [12] SHAO Q J, ZHAO C. Assessment of the lignin-derived inhibition of enzymatic hydrolysis by adding untreated and ammonia-fiber-expansion-treated lignin isolated from switchgrass[J]. *Energ. Fuel.*, 2016, 30(11):9517–9523.
- [13] HUMPULA J F, UPPUGUNDLA N, VISMEH R, et al. Probing the nature of AFEX-pretreated corn stover derived decomposition products that inhibit cellulase activity[J]. *Bioresource Technol.*, 2014, 152:38–45.
- [14] ADNEY B, BAKER J. Measurement of cellulase activities, NREL/TP–510–42628[R]. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [15] KIM S B, LEE S J, LEE J H, et al. Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, 6(1):109.
- [16] GAO X D, KUMAR R, SINGH S, et al. Comparison of enzymatic reactivity of corn stover solids prepared by dilute acid, AFEXTM, and ionic liquid pretreatments[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2014, 7(1):71.
- [17] ZHAI R, HU J G, SADDLER J N. Extent of enzyme inhibition by phenolics derived from pretreated biomass is significantly influenced by the size and carbonyl group content of the phenolics[J]. *ACS Sustain Chem. Eng.*, 2018, 6(3):3823–3829.
- [18] AGBLEVOR F A, FU J, HAMES B, et al. Identification of microbial inhibitory functional groups in corn stover hydrolysate by carbon–13 nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2004, 119(2):97–120.
- [19] KIM Y, KREKE T, HENDRICKSON R, et al. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood[J]. *Bioresource Technol.*, 2013, 135:30–38.
- [20] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples, NREL/TP–510–42623[R]. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2006.
- [21] FAUSTINO H, GIL N, BAPTISTA C, et al. Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors[J]. *Molecules*, 2010, 15(12):9308–9322.
- [22] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, NREL/TP–510–42618[R]. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2011.
- [23] ISHIZAWA C I, DAVIS M F, SCHELL D F, et al. Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover[J]. *J. Agr. Food Chem.*, 2007, 55(7):2575–2581.
- [24] VAN DYKE, HOOD B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: a kinetic study[D]. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology, 1972.
- [25] GRETHLEIN H E, ALLEN D C, CONVERSE A O. A comparative-study of the enzymatic-hydrolysis of acid-pretreated white-pine and mixed hardwood[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, 26(12):1498–1505.
- [26] LI J B, LU M S, GUO X M, et al. Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover: chemical and microstructural analyses[J]. *Bioresource Technol.*, 2018, 265:1–7.
- [27] LI J B, ZHANG H Y, LU M S, et al. Comparison and intrinsic correlation analysis based on composition, microstructure and enzymatic hydrolysis of corn stover after different types of pretreatments[J]. *Bioresource Technol.*, 2019, 293:122016.
- [28] YASUDA S, FUKUSHIMA K, KAKEHI A. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood[J]. *J. Wood Sci.*, 2001, 47(1):69–72.
- [29] QIN C R, CLARKE K, LI K C. Interactive forces between lignin and cellulase as determined by atomic force microscopy[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2014, 7(1):65.
- [30] KIM Y, XIMENES E, MOSIER N S, et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass[J]. *Enzyme Microb. Tech.*, 2011, 48(4–5):408–415.
- [31] CHUNDAWAT S P S, VISMEH R, SHARMA L N, et al. Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments[J]. *Bioresource Technol.*, 2010, 101:8429–8438.
- [32] BALAN V, SOUSA L C, CHUNDAWAT S P, et al. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*)[J]. *Biotechnol. Progr.*, 2009, 25(2):365–375.
- [33] JONSSON L J, ALRIKSSON B, NILVEBRANT N O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, 6(1):16.
- [34] GRETHLEIN H E. The effect of pore-size distribution on the rate of enzymatic-hydrolysis of cellulosic substrates[J]. *Bio/Technology*, 1985, 3(2):155–160.
- [35] DONOHOE B S, SELIG M J, VIAMAJALA S, et al. Detecting cellulase penetration into corn stover cell walls by immunoelectron microscopy[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 103(3):480–489.
- [36] KUMAR R, WYMAN C E. An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids[J]. *Enzyme Microb. Tech.*, 2008, 42(5):426–433.
- [37] PIHLAJANIEMI V, SIPPONEN M H, KALLIOINEN A, et al. Rate-constraining changes in surface properties, porosity and hydrolysis kinetics of lignocellulose in the course of enzymatic saccharification[J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2016, 9(1):18.