

竹子化学成分的测定

陈 瑞¹, 朱圣东², 杨 武³, 薛华波³, 唐守运³

(1. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012;

2. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

3. 安徽省植物生物技术实验实训中心, 安徽 六安 237012)

摘 要:为了开发高效、低成本的预处理技术, 提高竹子生物质的能源化利用, 对竹子中的化学成分进行了提取和分析, 并用微波和碱对竹子进行预处理和酶解试验, 并设计正交试验, 对经微波与碱联合预处理的竹子的糖化条件进行了优化, 用硫酸蒽酮法检测酶解液中的可发酵单糖含量。其结果表明竹子中半纤维素的质量分数含量为 21.49%, 纤维素的质量分数含量为 43.52%, 可以作为生物能源生产的原料。微波与碱联合预处理的最佳条件是: 700 W, 6 min。对微波与碱联合预处理的竹屑糖化条件进行优化, 得到竹屑最佳糖化条件: 温度 45 °C, pH 5.0, 每克底物用酶量 20 U/g。

关键词:纤维素; 半纤维素; 分析; 预处理

中图分类号: Q5

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2013.02.012

0 引 言

植物纤维^[1]是世界上最为丰富的可再生资源, 以植物纤维为原料生产燃料乙醇的潜力巨大, 特别是农业与林业废弃物, 如稻草、玉米秸秆、竹屑等, 以它们为原料生产酒精, 不仅可以增加农民收入, 提高其附加值, 而且可以消除其处置不当造成的环境污染。纤维素^[2]、半纤维素^[3]和木质素^[4]是竹子的主要化学组分, 同时也是构成竹子细胞壁的支持骨架。其中由 D-葡萄糖以 β -1,4 糖苷键组成的大分子多糖纤维素组成微细纤维, 构成纤维细胞壁的网状骨架, 而半纤维素和木质素则是填充在纤维之间的“粘合剂”和“填充剂”。半纤维素指在植物细胞壁中与纤维素共生、可溶于碱溶液, 遇酸后远较纤维素易于水解的那部分植物多糖。一种植物往往含有几种由两或三种糖基构成的半纤维素, 其化学结构各不相同。

纤维素不溶于水和乙醇、乙醚等有机溶剂。水可使纤维素发生有限溶胀, 某些酸、碱和盐的水溶液可渗入纤维结晶区, 产生无限溶胀, 使纤维素溶解。纤维素加热到约 150 °C 时不发生显著变化, 超过这温度会由于脱水而逐渐焦化。纤维素与较浓的无机酸起水解作用生成葡萄糖等, 与较浓的苛性碱溶液作用生成碱纤维素, 与强氧化剂作用生

成氧化纤维素。植物纤维素的酶水解的效率受植物纤维素的可及度^[5]、结晶度^[6]、木质素和半纤维素的含量及纤维素的结合方式影响。植物纤维素原料预处理的目的是解除木质素和半纤维素对纤维素的封闭, 瓦解纤维素的晶体结构, 增加其可及度, 提高酶的水解效率。

1 实验部分

1.1 材 料

仪器: 电热恒温干燥箱 (202-I 型)、粉碎机、索氏提取器、旋转式蒸发器、TU3000-752 型分光光度计、高速冷冻离心机、高压灭菌锅、振荡培养箱、恒温培养箱、电子天平、数显恒温水浴锅 (HH-2)、微波炉 (LG)。

试剂: 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯仿、甲醇、丙酮、二甲基亚砜、草酸铵、氢氧化钾、硼氢化钠、硝酸、硫酸、盐酸、蒽酮、苔黑酚、葡萄糖、木糖以上试剂均为国产分析纯。纤维素酶采用的是上海博奥生物技术公司生产的李氏纤维素酶。

1.2 方 法

1.2.1 竹子化学成分的测定 将已粉碎过的竹屑在 65 °C 条件下烘干 4 h。混匀, 称取 0.100 0 g 干重样品于研钵中, 加入 2 mL pH 7.0 的 0.5 mol/L 磷酸缓冲液, 研磨 15 min, 混匀后加入

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 六安市定向委托皖西学院项目 (2012LW001)

作者简介: 陈 瑞 (1985-), 男, 安徽六安人, 助教, 硕士, 研究方向: 微生物学。

离心管中,定容. 4 mol/L KOH 提取半纤维素,于沉淀中加入 5 mL 4 mol/L 的 KOH(内含 1 mg/mL 的 NaHB_4),室温下提取 1 h. 在这期间每隔 10 min,离心,收集上清. 收集所有上清液,定容,测糖含量^[7]. 于沉淀中加入 5 mL 乙酸-硝酸-水(8:1:2, v/v/v)在沸水浴中加热 1 h,在这期间每隔 10 min 1 次,离心,沉淀再用 5 mL 蒸馏水洗 2 次. 收集所有上清液,定容. 在纤维素沉淀中(约 30 mg)加入 2 mL 67%(v/v)硫酸,在 30 ℃摇床(100 r/min)振荡 1 h,加蒸馏水至 10 mL,离心,蒽酮/硫酸法测六碳糖含量^[8].

1.2.2 竹屑的预处理和糖化 称取 20 g 干燥竹屑,加入盛有 160 mL 质量分数为 1%的 NaOH 溶液中,放入微波炉中,在设定功率处理规定时间,离心,测上清液五碳糖和六碳糖含量,沉淀用作糖化的底物^[9],加入装有 20 mL pH 为 4.8 的 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液中,加入纤维素酶 20 U/g,于 45 ℃、150 r/min 糖化 7 d,每隔 24 h 进行还原糖分析^[10].

1.2.3 糖化最佳工艺条件的优化 当对竹屑的预处理方法发生改变时,预处理后糖化的最佳工艺条件也可能发生变化,为了得到微波与碱联合处理的竹屑糖化最佳工艺条件^[11],按照表 1 设计 3 因素 3 水平的正交试验.

表 1 糖化正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

	pH	温度/℃	酶用量/(U/g)
1	4.5	45	10
2	5.0	50	20
3	5.5	55	30

2 实验结果

2.1 葡萄糖标准曲线

图 1 为葡萄糖标准曲线,拟合线性方程:
 $y=107x-1.202, R^2=0.996$.

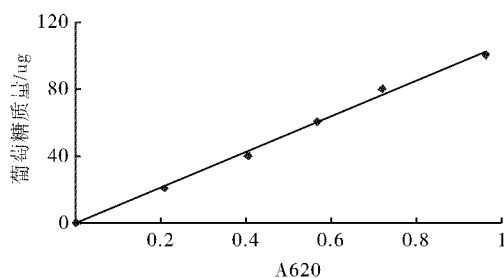


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

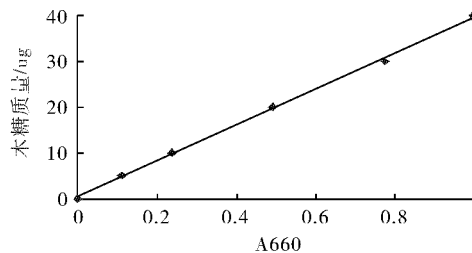


图 2 木糖标准曲线

Fig. 2 Standard curve of oxylose

2.2 木糖标准曲线

拟合线性方程: $y=38.98x+0.633, R^2=0.998$.

2.3 竹子的化学组成

竹子的化学组成主要是纤维素、半纤维素和木质素. 竹子各种属的纤维形态差别不大,是一种非常好的纤维提取原料. 表 2 为斑竹园、长岭和江店三个地区竹子中纤维素、半纤维素、木质素的质量分数.

表 2 竹子的化学组成

Table 2 Composition of bamboo /%

产地	纤维素	半纤维素	木质素
斑竹园	42.68	21.32	22.68
长岭	43.54	21.51	22.54
江店	44.34	21.65	22.24

此外,实验测得竹子中可溶性糖的质量含量为 0.85%,竹子中淀粉的含量为 2.46%,果胶的含量为 1.41%,与纤维素半纤维素的含量相比较低. 纤维素和半纤维素是竹子的主要化学组分,是一种较为理想的用作生产酒精的植物纤维素原料.

2.4 微波预处理对酶解糖化的影响

微波功率与处理时间是影响微波与碱联合预处理竹屑的效果的 2 个重要因素,图 3、4、5 分别给出了不同微波功率及处理时间下微波与碱联合处理的竹屑的糖化过程. 可知 3 个不同的功率,均有其对应的最佳处理时间,功率越高,对应的最佳处理时间越短. 但无论微波功率如何,在最佳处理时间是还原糖的终浓度变化不大,因此选取 700 W 处理 6 min 为最佳预处理条件.

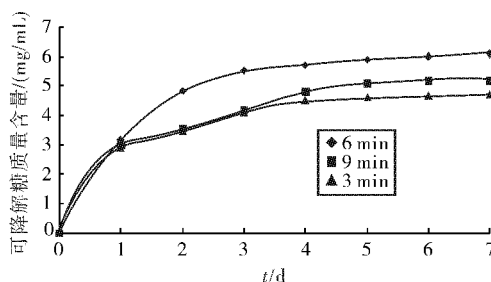


图 3 微波对水解糖化的影响(700 W)

Fig. 3 The effect of microwave/alkali pretreatment on hydrosis

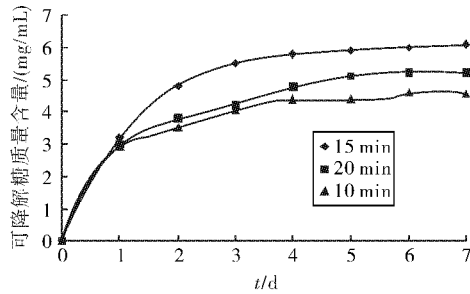


图4 微波对水解糖化的影响(500 W)

Fig. 4 The effect of microwave/alkali pretreatment on hydrosolysis

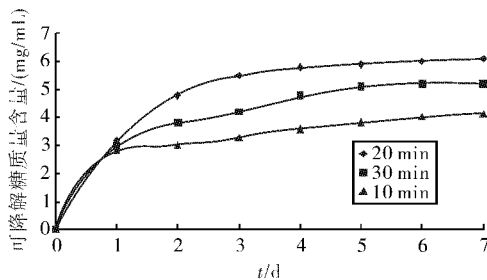


图5 微波对水解糖化的影响(300 W)

Fig. 5 The effect of microwave/alkali pretreatment on hydrosolysis

2.5 糖化最佳工艺条件的优化

为了对微波处理的竹屑糖化工艺条件进行优化,按照表3设计了正交实验,实验结果与数据分析见表3.表3中的因素离差平方和(S)的大小可以判断各个因素对竹屑水解的影响程度, S 值越大,表明其影响程度越大.各因素对竹屑糖化的影响顺序为:温度最大,酶用量次之,pH最小.根据

表3 糖化正交试验结果与数据分析

Table 3 The results and analysis of orthogonal experiment

编号	pH	温度/℃	酶用量/(U/g)	得率/%
1	4.5	45	10	13.3
2	4.5	50	20	15.2
3	4.5	55	30	6.4
4	5.0	45	20	27.2
5	5.0	50	30	26.8
6	5.0	55	10	7.8
7	5.5	45	30	22.6
8	5.5	50	10	13.2
9	5.5	55	20	7.6
K_1	34.9	63.1	28.7	
K_2	61.8	55.2	50	
K_3	43.4	21.8	55.8	
R_1	11.6	21.0	9.6	
R_2	20.6	18.4	16.7	
R_3	14.5	7.3	18.6	
S	42.2	102.61	45.01	

表3平均还原糖得率(R 值), R 值越大,表明该水平还原糖得率越高,由此确定最佳工艺条件为:45℃、pH5.0、酶用量20 U/g.

3 结果与讨论

实验测得竹子中纤维素的质量分数为42.51%,半纤维素的质量分数为21.97%,可知纤维素和半纤维素是竹子的主要化学组分,是一种较为理想的用作生产酒精的植物纤维素原料.三个地区的竹子中纤维素、半纤维素、木质素等含量的不同可能是由于这三个地区土壤中C、N、P的含量不同造成的.

微波与碱的联合预处理,可提高竹屑的糖化速度,还原糖的得率基本不变.微波与碱联合预处理时,微波的最佳条件:700 W,6 min.糖化最佳条件:45℃,pH5.0,每克底物用酶量20 U/g.

致谢

感谢六安市科技局的资金支持.

参考文献:

- [1] 朱圣东,吴元欣,喻子牛,等.植物纤维素原料生产燃料酒精研究进展[J].化学与生物工程,2003,20(5):8-11.
- [2] 何明雄.竹子生物质废弃物前处理技术比较研究[J].应用与环境生物学报,2011,17(2):232-236.
- [3] 宋向阳,余世袁.植物纤维原料酶水解的工艺条件[J].东北林业大学学报,2000,28(6):116-118.
- [4] 安鑫南.林产化学工艺学[M].北京:中国林业出版社,2002:22-26.
- [5] 孟雷,陈冠军,王怡,等.纤维素酶的多型性[J].纤维素科学与技术,2002,10(2):47-55.
- [6] 姚汝华.微生物工程工艺原理[M].广州:华南理工大学出版社,2003:126-135.
- [7] Shimokawa T, Ishida M, Yoshida S, et al. Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production [J]. Bioresource Technology, 2009,100(24):6651-6654.
- [8] 肖忻,李佐虎.分散、耦合、并行强化的纤维素酒精生物转化[J].化工冶金,2000,21(3):283-287.
- [9] 赖智乐,常春,马晓建.汽爆玉米秸秆同步糖化发酵产乙醇的工艺优化[J].农业工程学报,2010,26(7):250-254.
- [10] 李建政,汪群慧.废物资源化与生物能源[M].北京:化学工业出版社,2004:11-15.
- [11] 张娟,赵燕,杨益琴.四种竹子化学成分与纤维形态[J].化学工程,2011,30(10):33-35. (下转第64页)