

预处理对废纸纤维素酶水解的影响

邓立红 肖领平 唐 勇 宋先亮

(北京林业大学材料科学与技术学院)

摘要:为了促进废纸类生物质资源的回收利用,采用蒸汽爆破、 NaClO_2 处理、 NaClO_2 结合 NaOH 处理、 NaOH 处理和氨水浸泡这 5 种方法对废鞋盒碎片进行预处理,以改善废纸的纤维素酶水解。分析了预处理后废纸中木素和半纤维素含量、纤维的表面结构和结晶度的变化,并探讨了这些变化对纤维素酶水解效果的影响。结果表明:蒸汽爆破预处理对木素和半纤维素的去除效果最好,碱处理对半纤维素的去除效果不好。预处理使原料的表面变得粗糙,尤其是 NaOH 处理导致的变化最大。预处理后,原料的结晶度有升有降。酶解试验表明木素和半纤维素的含量、原料表面粗糙程度与纤维素酶水解速率之间均不存在明显的相关性。但是结晶度与纤维素酶水解速率关系明显,结晶度越低,酶水解速率越快。 NaOH 预处理的原料结晶度最低,纤维素酶水解率最高,为 45.4%。

关键词: 预处理; 木素; 半纤维素; 表面结构特征; 结晶度

中图分类号: TQ9 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)03-0170-06

DENG Li-hong; XIAO Ling-ping; TANG Yong; SONG Xian-liang. **Effects of pretreatment on enzymatic hydrolysis of cellulose for waste paper.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(3) 170-175 [Ch, 21 ref.] College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

In order to accelerate the recovery and reuse of biomass resources, such as waste paper, different pretreatment methods were adopted to pretreat shredded shoe boxes as a model of waste paper to enhance the enzymatic hydrolysis of cellulose. These pretreatment were steam explosion, NaClO_2 pretreatment, a pretreatment combination of NaClO_2 and NaOH , NaOH pretreatment and aqueous ammonia steeping. We investigated the modification of the concentration of lignin and hemicellulose, surface structure and degree of crystallinity of the materials after pretreatments and discussed the effects of these modifications on the enzymatic hydrolysis of cellulose. Our experimental results indicate that steam explosion is the most efficient method in the removal of lignin and hemicellulose, while the alkali pretreatment exhibits a weak capacity in the removal of hemicellulose. The surface of the pretreated material became coarser, especially for NaOH pretreated samples. The pretreatments also resulted in an increase or decrease in the degree of crystallinity of the material. The results of enzymatic hydrolysis revealed no significant correlation between the rate of enzymatic hydrolysis and concentrations of lignin and hemicellulose, nor with the degree of coarseness of the material surface. But we found a significant correlation between the degree of crystallinity and the rate of enzymatic hydrolysis: the lower the degree of crystallinity, the faster the rate of hydrolysis. The degree of crystallinity was lowest in the NaOH pretreated material, with the highest rate of cellulose hydrolysis, i. e. 45.4%.

Key words pretreatment; lignin; hemicellulose; feature of surface structure; crystallinity

收稿日期: 2009-04-06

基金项目: 北京林业大学新进教师科研启动基金项目 (BLX2008011)。

第一作者: 邓立红, 博士, 讲师。主要研究方向: 植物纤维原料的生物转化与利用。电话: 010-62338152 Email: dlhone@163.com 地址: 100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学材料科学与技术学院。

责任作者: 宋先亮, 博士, 副教授。主要研究方向: 植物资源化学。电话: 010-62338152 Email: sxlsd@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

在城市垃圾中,大约含有1/3至1/2的包装废弃物,其中纸包装废弃物约占30%。回收这些资源,可产生巨大的社会财富,并可节约大量木材。据统计,我国每年未回收利用的废纸有600万t。据专家估算,利用1t废纸相当于节约3m³的木材^[1]。我国每年抛弃的各类木材制品有6000万t,折合8500万m³木材,相当于2100万棵大树的产材量。可见回收利用垃圾中的木质纤维资源,可节约大量的木材、产生巨大社会财富,并对保护森林资源、回收能源^[2]具有重要意义。

此外,对废纸的开发利用可以减少环境污染,降低污染处理负荷。因此,我国国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年)中明确把综合治污与废弃物循环利用列入重点领域及其优先主题,研究垃圾中可回收资源的利用,以减少垃圾处理的负荷和环境污染。

废纸是木质纤维原料之一,含有丰富的纤维素成分。将纤维素水解成可发酵性糖后,可通过微生物发酵的方式制备生物酒精、乳酸等许多产品,也可以生产生物燃气。

植物纤维原料的水解方法有酸水解和酶水解两种,而酶水解具有水解条件温和、副产物少、对环境友好等优点,故而具有成本更低的优势^[3]。可以说,通过酶水解纤维素材料的生物化工途径来生产可发酵糖,是解决全球粮食和能源需求的有效途径^[4]。但是,相比淀粉等多糖,纤维素水解难度要大很多。植物纤维原料中的纤维素链之间通过氢键结合成微细纤维,微细纤维与半纤维素附着在一起,外面被木素所覆盖。这种特殊而复杂的结构使得纤维素对生物和化学处理都有抵抗力。一般认为,纤维素的结晶度、可及的表面积、木素和半纤维素的保护等是影响原料酶解速率的重要因素^[5]。特别是木素,其含量越高,化学解或酶解木质纤维原料的阻力越大。因此,在酶水解木质纤维原料前,有必要进行预处理,以改善酶解效果。

预处理的方法可分为物理法、物理—化学法、化学法和生物法几种。物理法包括粉碎法^[6]、辐射法^[7]等,这些方法存在能耗高、木素去除率不高、不适于工业生产等问题,但是一般不需要消耗化学药品。物理—化学法中蒸汽爆破法^[8-9]受到了极大的关注。该方法所采用的温度一般在160~260℃,时间为几十秒至几分钟,能去除大部分的半纤维素,且能耗适中。化学法中碱处理是常用的方法,所用的碱包括NaOH、Ca(OH)₂、氨水等,对木素的去除效果较好,同时能去除部分半纤维素,有效提高酶对纤维素的可及性。碱处理可以采用低温但时间较长和

碱浓度较高的处理条件^[10]。生物法预处理是采用微生物来处理木质纤维原料提高纤维素酶解效果,所用的微生物包括白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)和褐腐菌(*Monilia fructicola*)等,它们能降解木素和半纤维素,但是对纤维素的破坏很少。

尽管有效的预处理方法很多,但最佳的预处理方法和条件决定于原料的类型。本文以废鞋盒为原料,采用蒸汽爆破法和化学法对原料进行预处理,研究这些方法对纤维素酶水解的影响。

1 材料与方法

1.1 废纸原料

以从生活场所收集的多种品牌的废鞋盒为原料,破碎成1cm×2cm大小的碎片,采用蒸汽爆破和化学法进行预处理。

1.2 纤维素酶

纤维素酶为粉末状制剂,由奥博新生物技术有限公司生产。纤维素酶活的测定方法按IUPAC推荐的国际标准方法测定^[11],测得滤纸酶活为30.52U/g。

1.3 原料的预处理

1.3.1 蒸汽爆破预处理

所用的蒸汽爆破装置由北京林业大学爆破制浆课题组自行设计、加工、安装。爆破器为直立圆筒状,容积为7.5L,可装绝干木片约1kg。高压蒸汽由电热锅炉产生,电热锅炉输入功率为9kW,工作压力最高可达3.5MPa,2台爆破器并联,可交替爆破。

将废纸原料置于汽爆罐中,关闭容器,迅速升压至1.7MPa,保温3min后瞬间泄压,使原料在压差作用下进入接受容器中。收集汽爆原料,风干保存。

1.3.2 化学试剂预处理

废纸原料分别按照下列方式处理:1)6%的NaClO₂溶液于25℃下处理2h;2)NaClO₂处理与NaOH处理相结合,即25℃下,先用6%NaClO₂溶液处理2h,再用18%NaOH溶液处理2h;3)18%的NaOH溶液于25℃下处理2h;4)10%的氨水溶液25℃下处理24h。原料装于三角瓶中,化学试剂按照固液比1:10(g/mL)加入原料中,置于水浴恒温振荡器上振荡,转速150r/min。处理结束后,抽滤原料,滤渣用去离子水洗涤至滤液呈中性后,风干保存备用。

1.4 纤维素酶水解

称取一定量的酶粉,用添加了质量浓度为0.02%苯甲酸钠的柠檬酸缓冲溶液(pH4.8)配制

成酶液,在3 000 r/min下离心5 min后,上清液即可用来水解。称取一定量的预处理原料放入锥形瓶中,按照3 U/g底物加入酶液,补充柠檬酸缓冲液,使初始底物浓度控制在20 g/L。于50℃、100 r/min下水浴振荡24 h后,迅速将酶解液置于离心机中,在4 000 r/min下离心10 min,上清液于沸水浴中加热5 min,以使蛋白质变性和阻止进一步水解。将上清液再适当稀释后,测定其中的还原糖浓度。

原料的纤维素水解率按下式计算:

$$\text{纤维素水解率} = \frac{\text{还原糖质量} \times 0.9}{\text{原料质量} \times \text{纤维素含量}} \times 100\%$$

1.5 分析方法

1.5.1 原料成分分析

原料及预处理原料中纤维素、半纤维素、木素的测定详见文献[12]。

1.5.2 还原糖浓度的测定

采用3,5-二硝基水杨酸法,简称DNS法。

1.5.3 纤维素结晶度分析

纤维素结晶度的测定用X射线衍射法,仪器型号为XRD-6000,日本岛津公司生产。其条件为CuK α 铜靶辐射($\lambda = 0.154 \text{ nm}$),辐射管电压40 kV,辐射管电流30 mA。扫描范围: $2\theta = 5^\circ \sim 50^\circ$,步进: 0.02° ;扫描速度: $2^\circ/\text{min}$ 。根据Segal公式计算相对结晶度^[13]:

$$C_{rl} = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100\%$$

式中: C_{rl} 为相对结晶度; I_{002} 为002面衍射峰的极大强度, $2\theta = 22.5^\circ$; I_{am} 为 $2\theta = 18.7^\circ$ 时的峰,即无定形区的衍射强度。

1.5.4 扫描电子显微镜分析

用S-3400N型扫描电子显微镜(日本日立公司

生产,加速电压10 kV)对预处理前后的原料进行观察。

2 结果与讨论

2.1 预处理对原料化学组成的影响

预处理所期望达到的效果之一就是去除原料中的木素和半纤维素,使包裹于其中的纤维素能更好地与酶接触。但是从很多研究结果可看出,这两种成分对不同种类木质纤维原料的纤维素酶水解的影响是不同的^[14-17]。本研究对废纸原料预处理前后的化学组成与原料质量回收情况进行了分析,结果如表1所示。

相对原始的木质纤维原料如木材、秸秆等,废鞋盒由于经过了制浆造纸过程,纤维素含量比较高,半纤维素和木素含量较低。从表1可知:通过各种预处理以后,原料的化学组成发生了不同程度的变化。每种预处理方法都使纤维素和木素的含量有所下降,其中NaOH处理的原料纤维素含量下降最多。为此对NaOH处理的废液进行了水解和定性分析,表明其中含有不少还原糖,说明碱对纤维素破坏比较严重。蒸汽爆破处理后木素含量最低,说明此方法去除木素的效率较高。预处理后半纤维素都有损失,其中蒸汽爆破处理去除半纤维素的效果最好,预处理原料的半纤维素含量仅9.2%。蒸汽爆破处理和NaClO₂处理原料质量损失小,回收率约95%。NaClO₂结合NaOH处理时原料质量损失最多,回收率只有83%。由此可认为,这些处理方法中,蒸汽爆破对木素和半纤维素的去除效果最好,纤维素的损失也最小;碱处理对半纤维素的去除效果不佳。

表1 预处理前后原料化学组成及质量回收

Tab.1 Chemical compositions and mass recovery of materials before and after pretreatments

预处理方法	纤维素含量	预处理后纤维素损失	半纤维素含量	预处理后半纤维素损失	木素含量	预处理后木素损失	预处理后总质量回收
A 未处理	63.0 ± 0.5	0	16.5 ± 0.2	0	14.4 ± 0.2	0	100 ± 0
B 蒸汽爆破处理	62.9 ± 0.6	5.2	9.2 ± 0.3	47.0	11.0 ± 0.3	27.4	95 ± 3
C 6% NaClO ₂ 处理	62.8 ± 0.3	5.3	14.5 ± 0.1	16.5	12.1 ± 0.2	20.2	95 ± 2
D 6% NaClO ₂ 结合 18% NaOH 处理	61.1 ± 0.4	19.5	17.6 ± 0.3	11.5	13.9 ± 0.1	19.9	83 ± 2
E 18% NaOH 处理	58.3 ± 0.0	21.3	16.7 ± 0.1	14.0	13.6 ± 0.1	19.7	85 ± 3
F 10% 氨水处理	60.7 ± 0.0	13.3	16.2 ± 0.1	11.6	12.1 ± 0.3	24.4	90 ± 3

2.2 预处理对纤维微观表面结构的影响

预处理能去除原料中的木素和半纤维素,因而能增加底物的孔隙,改变底物的微观结构,使原料的可接触表面积增大,甚至使包裹在半纤维素和木素中的微细纤维裸露出来,提高酶对纤维素的可及度。特别是蒸汽爆破法,由于在爆破过程中能对原料产

生机械撞击和撕裂作用,因此往往预期它能产生更好的效果。本文对预处理前后的原料进行了扫描电镜观察,如图1所示。

从图1可知:未处理原料纤维表面比较光滑平整,经过预处理后,纤维表面不同程度地变得粗糙。蒸汽爆破和NaClO₂结合NaOH这两种预处理对原

料表面的改变较小。 NaClO_2 处理后,原料表面呈条索状,应该是有微细纤维裸露出来; NaOH 处理后,原料表面变得甚为粗糙,也有微细纤维裸露出来,同时出现明显的孔隙;氨水处理后的原料表面也露出不少微细纤维。这些情况表明,原料表面的改变程

度与半纤维素、木素的脱除程度不相关。蒸汽爆破法对木素和半纤维素的去除效果最好,但是对原料表面改变不明显;碱处理对半纤维素去除效果较差,但是对原料表面结构改变明显。

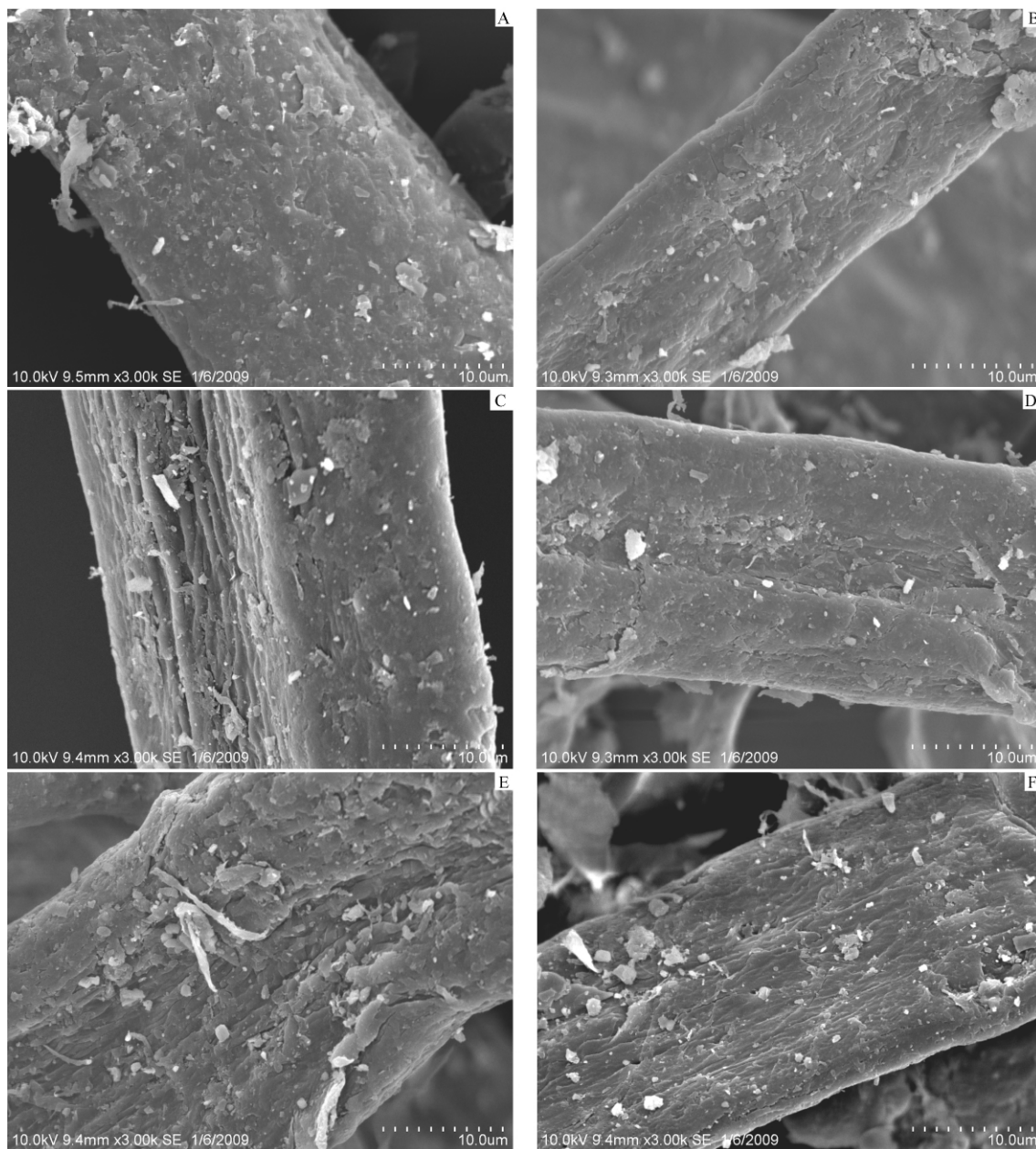


图 1 预处理对纤维表面微观结构的影响

Fig.1 Effects of pretreatments on microstructure of fibre surface

注:放大倍数 3 000。

2.3 预处理对纤维素结晶度的影响

预处理对原料结构的另一改变体现在结晶度的变化上,结晶度可影响纤维素酶向纤维素的扩散,从而影响纤维素酶水解。预处理引起结晶度变化的原因很多。Kim 等^[18]发现,用氢氧化钙处理玉米(*Zea mays*)秸秆以后,由于半纤维素和木素等无定形组

分的减少,纤维素的结晶度由 43% 上升到 60%。Fan 等^[19]研究了球磨对纤维结晶度的影响,发现球磨后纤维的结晶度上升,认为球磨纤维在用水润涨的过程中发生了重结晶作用。

本文对预处理前后的原料结晶度进行了测定(表 2)。结果显示:经过 NaOH 以及 NaClO_2 结合

NaOH 处理后,纤维素结晶度有所下降;而其他处理方式均使纤维素结晶度上升,其中以 NaClO_2 处理后上升幅度最大。

表2 预处理对纤维素结晶度的改变

Tab.2 Effects of pretreatments on degree of crystallinity of cellulose %

预处理方法	结晶度	预处理方法	结晶度
A	11.53	D	10.86
B	13.30	E	10.82
C	14.35	F	12.27

2.4 预处理对纤维素酶水解的影响

预处理的目的在于提高纤维素的酶水解率,预处理对纤维素酶水解的影响如图2所示。

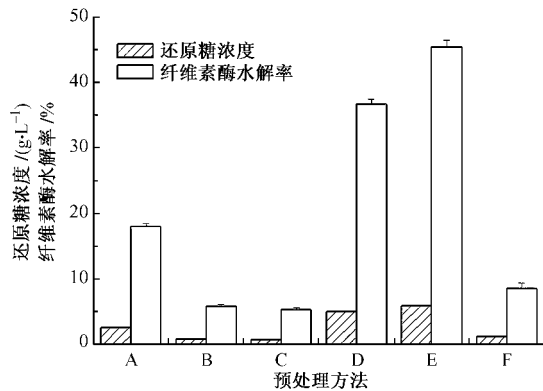


图2 预处理对纤维素酶水解的影响

Fig.2 Effects of pretreatments on cellulose hydrolysis of materials

比较图2、表1发现:纤维素酶水解率与原料木素、半纤维素的含量没有明显相关性。各种预处理方法中以蒸汽爆破料中木素和半纤维素的含量最低,而其酶水解速率在所有方法中仅仅稍高于 NaClO_2 处理过的原料。NaOH 处理的原料中半纤维素的含量比较高,木素含量相对其他处理方法也不低,但是酶水解情况是最好的。这一结果与 Solange 等^[17]的结论不一致,他们认为,啤酒糟中半纤维素和木素含量越低,纤维素酶水解为葡萄糖的效果越好。陈洪章等^[20]认为,木素和半纤维素对纤维素酶水解效果的影响不在于二者含量的高低,而在于预处理后它们是否还呈天然状态,也就是它们的去除是否能提高酶对纤维素的可及性。

比较图1、2发现:酶水解情况与纤维的表面结构之间也没有明显的相关性。但是应该说明的是,扫描电镜只对纤维的外部微观结构进行了观察,定性地对纤维可接触面积进行了比较,而实际上,纤维的可接触面积还包括内部毛细管形成的表面积^[10],这是扫描电镜所不能观察到的。水解结果与纤维素结晶度的比较显示,二者之间呈现明显的相关性。纤维素结晶度降低能提高纤维素向还原糖的转化速

率。Sulaiman^[21]在对无定形的羧甲基纤维素和高结晶度的刨花进行酶水解时发现,刨花的水解速率比羧甲基纤维素要低得多,而且还原糖持续快速增加的时间要短得多。这一结果与本研究结果一致。

本研究中,结晶度最低的 NaOH 预处理原料的纤维素酶水解率最高,为 45.4%。但是,该处理方法对纤维素的破坏较多,故处理工艺还有待优化。

3 结 论

1) 5 种预处理方法对废纸原料三大主要化学成分的含量有不同程度的改变。蒸汽爆破对木素和半纤维素的去除效果最好,纤维素的损失也最小;碱处理对半纤维素的去除效果不好,而且纤维素的损失比较大。预处理原料中木素和半纤维素的含量与纤维素的酶水解速率之间关系不明显。

2) 预处理使原料的表面变得粗糙,但表面变得粗糙的程度并不与木素、半纤维素的去除程度相关。NaOH 处理使原料的表面状况改变最大,变得最粗糙。表面粗糙的程度与纤维素的酶解速率之间关系也不明显。

3) 预处理后,纤维素的结晶度有升有降。纤维素结晶度的高低与原料的纤维素酶水解效果关系明显,纤维素结晶度越低,酶水解速率越快。NaOH 预处理的原料纤维素结晶度最低,纤维素酶水解率最高,为 45.4%。

参 考 文 献

- [1] 张春红. 我国废纸的回收利用现状及发展趋势[J]. 西南造纸, 2006, 35(2): 7-8.
- [2] WILLIAM E F. Some perspectives on the paper industry's use of waste paper[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1975, 4(2): 175-188.
- [3] SULAIMAN A. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4078-4085.
- [4] GAN Q, ALLEN S J, TAYLOR G. Design and operation of integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis[J]. *Biochemical Engineering Journal* 2002, 12(3): 223-229.
- [5] MANSFIELD S D, MOONEY C, SADDLER J N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 804-816.
- [6] MAIS U, ESTEGHLALIAN A R, SADDLER J N, et al. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 98-100: 815-832.
- [7] ESKICIOGLU C, TERZIAN N, KENNEDY K J, et al. Athermal microwave effects for enhancing digestibility of waste activated sludge[J]. *Water Research*, 2007, 41: 2457-2466.

- [8] CAPEK-MENARD E ,JOLLEZ P ,CHORNET E. Pretreatment of waste paper for increased ethanol yields [J]. *Biotechnology Letters* ,1992 ,14(10) :985-988.
- [9] BALLESTEROS I ,OLIVA J M ,NAVARRO A A *et al.* Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* ,2000 84-86 :97-110.
- [10] MOHAMMAD J T , KEIKHOSRO K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas rroduction :A review [J]. *International Journal of Molecular Science* ,2008 ,9(9) :1621-1651.
- [11] GHOSE T K. Measurement of cellulose activities [J]. *Pure and Applied Chemistry* ,1987 59(2) :257-268.
- [12] 石淑兰 ,何福望 ,张曾 ,等. 制浆造纸分析与检测 [M]. 北京 :中国轻工业出版社 2003 :24-49.
- [13] SEGAL L ,CREELY J ,MARTIN A *et al.* An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X ray diffractometer [J]. *Textile Research Journal* ,1959 29(10) :786-794.
- [14] LIAO W ,WEN Z ,HURLEY S *et al.* Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* ,2005 ,121-124 :1017-1029.
- [15] ÖHGREN K ,BURA R ,SADDLER J N *et al.* Effects of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover [J]. *Bioresource Technology* ,2007 ,98(13) :2503-2510.
- [16] MARTÍN C ,KLINKE H B ,THOMSEN A B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse [J]. *Enzyme and Microbial Technology* ,2007 40(3) :426-432.
- [17] SOLANGE I M ,MARCELA F ,ADRIANE M F M *et al.* Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellose from brewer's spent grain [J]. *Enzyme and Microbial Technology* 2008 43(2) :124-129.
- [18] KIM S ,HOLTZAPPLE M T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover [J]. *Bioresource Technology* ,2006 97(4) :583-591.
- [19] FAN L T ,LEE Y ,BEARDMORE D H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering* ,1980 22(1) :177-199.
- [20] 陈洪章 ,李佐虎. 影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究 [J]. *化学反应工程与工艺* ,2000 ,16(1) :30-36.
- [21] SULAIMAN A. The effet of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis [J]. *Bioresource Technology* 2008 99(10) :4078-4085.

(责任编辑 李文军)