

# 不同方法糖化玉米秸秆的工艺优化

郭海鹏, 李秀欣, 马海燕, 田亚红\*

(河北联合大学 生命科学学院, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 以玉米秸秆为原料, 分别研究酶解糖化法和生物糖化法的糖化效果, 以找出最优糖化工艺。结果表明, 纤维素酶糖化玉米秸秆的最佳工艺条件为时间 40 h、纤维素酶量 1 400 U/g、温度 30 ℃、pH 值 4.8, 在此条件下的产糖量为 73.4 mg/g; 黑曲霉糖化玉米秸秆的最佳工艺条件为发酵时间 48 h、接种量 13%、发酵温度 35 ℃、pH 值 4.8, 在此条件下的产糖量为 69.7 mg/g。2 种方法产糖量相差不多, 从成本考虑, 建议采用生物糖化法。

**关键词:** 玉米秸秆; 纤维素酶; 黑曲霉; 糖化

**中图分类号:** TQ223.122 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)04-0137-05

## Process Optimization of Corn Straw Saccharification by Different Methods

GUO Hai-peng, LI Xiu-xin, MA Hai-yan, TIAN Ya-hong\*

(College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** The corn straws were saccharified by enzymolysis method and biological fermentation method respectively to find the optimum corn straw saccharification process. The results showed that the optimum conditions of enzymolysis with cellulase were hydrolysis time of 40 h, cellulase dosage of 1 400 U/g, temperature of 30 ℃, pH value of 4.8, and the reducing sugar yield was 73.4 mg/g under the above conditions. The optimum conditions of fermentation with *Aspergillus niger* were fermentation time of 48 h, inoculation amount of 13%, fermentation temperature of 35 ℃, pH value of 4.8, and the reducing sugar yield was 69.7 mg/g under the above conditions. The sugar yields of the two methods were very similar, but the biological fermentation method was recommended based on the cost.

**Key words:** corn straw; cellulase; *Aspergillus niger*; saccharification

进入 20 世纪以来, 能源短缺问题日趋严峻, 迫切需要人们开发替代能源。乙醇以其可再生、绿色无污染等优点受到普遍关注, 利用木质纤维素生产燃料乙醇是未来发展的一个重要方向, 既能解决能源危机, 又充分利用了废弃的秸秆等农业下脚料, 还可保护环境<sup>[1]</sup>。而不同的糖化方法由于其原理不同, 必然会对秸秆的降解效果产生不同的影响<sup>[2-3]</sup>。为此, 以产糖量为指标, 分别利用纤维素酶、黑曲霉糖化玉米秸秆, 并进行优化, 以期能为纤维素燃料乙醇的工业化生产提供技术参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

玉米秸秆采自唐山市区周边玉米地, 无发霉和天然降解现象。清洗, 烘干, 粉碎成 3 mm 以下的颗粒。黑曲霉为河北联合大学生物技术实验室保存。纤维素酶(15 000 U/g)购自上海国药集团化学试剂有限公司。

电热恒温培养箱(DNP-902)购自上海精宏实验设备有限公司, 水浴恒温振荡箱(SHA-C)、洁净工

收稿日期: 2013-12-04

基金项目: 河北省科技厅科技支撑项目(12227107D)

作者简介: 郭海鹏(1990-), 男, 河北遵化人, 在读本科生, 研究方向: 发酵工艺优化。E-mail: 994098341@qq.com

\* 通讯作者: 田亚红(1979-), 女, 河北无极人, 讲师, 硕士, 主要从事发酵工艺优化方面的研究。E-mail: t1979yh@126.com

作台(100 级)、电子天平(SLN)均购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

## 1.2 玉米秸秆的预处理

取 2.0 g 玉米秸秆粉,按照固液比为 1:10 加入 2.5% 的硫酸溶液,在 90 ℃ 条件下预处理 4 h,残渣用水洗至中性,60 ℃ 烘至恒质量,备用<sup>[4]</sup>。

## 1.3 纤维素酶糖化玉米秸秆

### 1.3.1 单因素试验

1.3.1.1 酶解时间 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在纤维素酶量 1 400 U/g、温度 35 ℃、pH 值 4.6 条件下,分别酶解 10、20、30、40、50、60 h,测定酶解后的还原糖含量,计算产糖量。

1.3.1.2 纤维素酶量 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,分别接种纤维素酶 600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 U/g,然后在酶解温度 35 ℃、pH 值 4.6 条件下酶解 40 h,计算产糖量。

1.3.1.3 酶解温度 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在纤维素酶 1 400 U/g、pH 值 4.6 条件下,分别在 25、30、35、40、45、50 ℃ 条件下酶解 40 h,计算产糖量。

1.3.1.4 pH 值 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在纤维素酶量 1 400 U/g、温度 35 ℃ 条件下,分别在 pH 值为 4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 条件下酶解 40 h,计算产糖量。

1.3.2 正交试验 在单因素试验结果的基础上,以产糖量为考察指标,对纤维素酶糖化玉米秸秆工艺中的酶解时间、纤维素酶量、温度和 pH 值进行  $L_9(3^4)$  正交试验(试验设计见表 1),确定最佳糖化工艺。

表 1 纤维素酶糖化玉米秸秆的正交试验设计

水平	因素			
	酶解时间 (A)/h	纤维素酶量 (B)/(U/g)	酶解温度 (C)/℃	pH(D)
1	30	1 200	30	4.4
2	40	1 400	35	4.6
3	50	1 600	40	4.8

## 1.4 黑曲霉糖化玉米秸秆

### 1.4.1 单因素试验

1.4.1.1 发酵时间 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在黑曲霉接种量 11%、发酵温度 30 ℃、pH 值 4.6 条件下,分别发酵 12、24、36、48、60、72 h,然后取样,测定发酵后的还原糖含量,计算产糖量。

1.4.1.2 接种量 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在发酵时间 36 h、发酵温度 30 ℃、pH 值 4.6 条件下,研究不同黑曲霉接种量(5%、7%、9%、11%、13%、15%)对产糖量的影响。

1.4.1.3 发酵温度 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在黑曲霉接种量 11%、发酵时间 36 h、pH 值 4.6 条件下,研究不同发酵温度(20、25、30、35、40 ℃)对产糖量的影响。

1.4.1.4 pH 值 称取预处理后的玉米秸秆 2.0 g,在黑曲霉接种量 11%、发酵时间 36 h、发酵温度 30 ℃ 条件下,研究不同 pH 值(4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0)对产糖量的影响。

1.4.2 正交试验 在单因素试验结果的基础上,以产糖量为考察指标,对黑曲霉发酵时间、接种量、发酵温度和 pH 值进行  $L_9(3^4)$  正交试验(试验设计见表 2),确定最佳糖化工艺。

表 2 黑曲霉糖化玉米秸秆的正交试验设计

水平	因素			
	发酵时间 (E)/h	接种量 (F)/%	发酵温度 (G)/℃	pH(H)
1	24	9	25	4.4
2	36	11	30	4.6
3	48	13	35	4.8

## 1.5 还原糖含量的测定

采用 DNS 法测定还原糖含量<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素酶糖化玉米秸秆的试验结果

#### 2.1.1 单因素试验

2.1.1.1 酶解时间 由图 1 可知,随着酶解时间的延长,产糖量先上升后下降,这是由于随着反应的进行,酶与底物充分结合,产糖量不断升高,当酶解时间为 40 h 时,产糖量达到最大,为 73.0 mg/g;当酶解时间超过 40 h 后,纤维素酶活性不断下降,产物的反馈抑制作用增强。因此,纤维素酶糖化玉米秸秆的最佳酶解时间为 40 h。

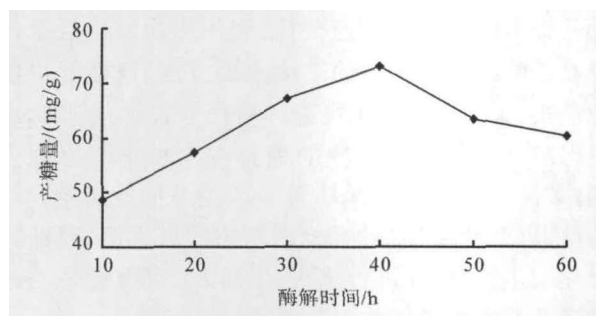


图 1 酶解时间对产糖量的影响

2.1.1.2 纤维素酶量 由图 2 可知,随着纤维素酶量的增加,产糖量不断升高;当纤维素酶量为 1 400 U/g 时,产糖量最大,达 72.9 mg/g;之后趋于平稳。这是由于纤维素酶作为一种生物催化剂,与底物的

吸附作用具有一定的饱和度,当纤维素酶量达到饱和时,增加酶用量对玉米秸秆糖化作用影响不大<sup>[6]</sup>。因此,纤维素酶糖化玉米秸秆的最佳酶用量为 1 400 U/g。

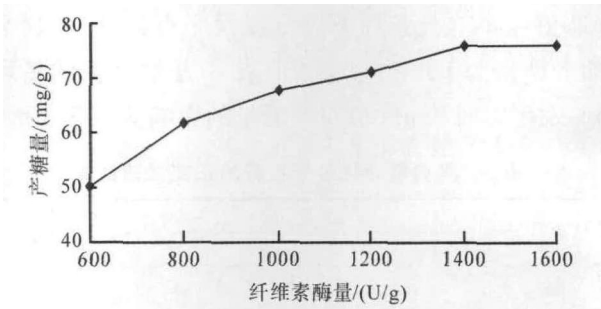


图 2 纤维素酶量对产糖量的影响

2.1.1.3 酶解温度 由图 3 可知,随酶解温度升高,产糖量增加,35 ℃时最大,达 73.1 mg/g;35 ℃以后产糖量开始下降,这是因为温度过高会导致纤维素酶失活,而使秸秆糖化率降低。因此,纤维素酶糖化玉米秸秆的最佳温度为 35 ℃。

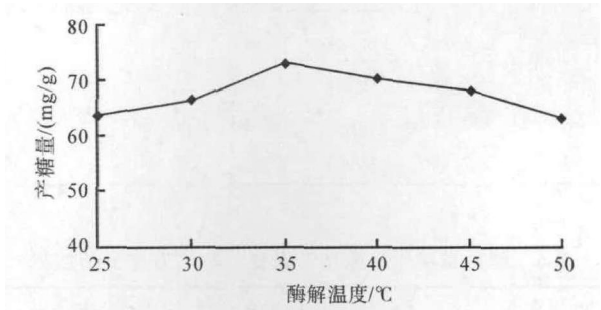


图 3 酶解温度对产糖量的影响

2.1.1.4 pH 值 由图 4 可知,当 pH 值为 4.0~4.6 时,产糖量随 pH 值增加而增加;当 pH 值为 4.6 时,产糖量最大,达 73.1 mg/g;当 pH 值超过 4.6 后,产糖量开始下降。因此,纤维素酶糖化玉米秸秆的最适 pH 值为 4.6。

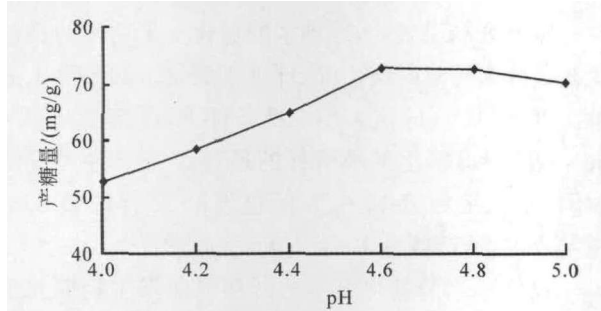


图 4 酶解 pH 值对产糖量的影响

2.1.2 正交试验 由表 3 的极差分析可知,纤维素酶糖化玉米秸秆过程中各因素对产糖量的影响顺序为酶解时间>pH 值>酶解温度>纤维素酶用量,最佳糖化条件为:酶解时间 40 h、纤维素酶用量

1 400 U/g、酶解温度 30 ℃、pH 值 4.8,在此条件下进行 3 次平行验证试验,平均产糖量为 73.4 mg/g。由表 4 方差分析结果可知,酶解时间对产糖量的影响达显著水平。

表 3 纤维素酶糖化玉米秸秆的正交试验结果

试验号	因素				产糖量/(mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	52.6
2	1	2	2	2	57.3
3	1	3	3	3	55.4
4	2	1	2	3	65.8
5	2	2	3	1	62.9
6	2	3	1	2	68.1
7	3	1	3	2	56.2
8	3	2	1	3	61.3
9	3	3	2	1	55.2
$k_1$	55.100	58.200	60.667	56.900	
$k_2$	65.600	60.500	59.433	60.533	
$k_3$	57.567	59.567	58.167	60.833	
R	10.500	2.300	2.500	3.933	

表 4 纤维素酶糖化玉米秸秆正交试验的方差分析结果

变异来源	SS	df	F
A	180.869	2	22.527*
B	8.029	2	1.000
C	9.376	2	1.168
D	28.762	2	3.582

注: \* 代表影响达显著水平( $P<0.05$ ),下同。

2.2 黑曲霉糖化玉米秸秆的试验结果

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 发酵时间 由图 5 可知,随着发酵时间的延长,产糖量呈先上升后下降的趋势,36 h 时最大,达 63.1 mg/g。这是因为发酵时间为 12~36 h 时,黑曲霉生长代谢旺盛,产生大量纤维素酶,产糖量会随之升高;随着培养时间的延长,由于受剪切力、抑制物等影响,纤维素酶会逐渐失活,产糖量下降。因此,黑曲霉糖化玉米秸秆的最佳发酵时间为 36 h。

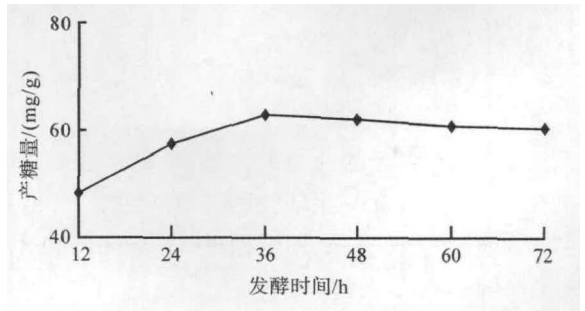


图 5 发酵时间对产糖量的影响

2.2.1.2 接种量 当黑曲霉接种量为 11% 时,不仅有利于菌体生长也有利于产酶,因此产糖量达到最大,达 65.4 mg/g(图 6)。而接种量过多或过少都不利于糖化,原因在于过少的接种量使得初期菌种不足,代谢产物少;过多的接种量使菌体生长过快,培养基黏度大,菌种提前衰老自溶,纤维素酶活力下降。因此,黑曲霉糖化玉米秸秆的最适接种量为 11%。

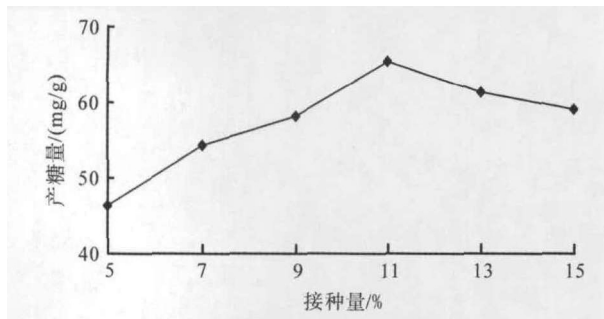


图 6 黑曲霉接种量对产糖量的影响

2.2.1.3 发酵温度 由图 7 可知,不同温度对黑曲霉代谢产生的酶酶解玉米秸秆产糖量的影响不同。早期随着发酵温度的升高产糖量逐渐增加,30℃ 最大,达 63.7 mg/g;而后随发酵温度升高逐渐减小。这是因为黑曲霉代谢产酶有最适温度,温度过低代谢缓慢,温度过高会使部分黑曲霉代谢受阻。因此,黑曲霉糖化玉米秸秆的最佳发酵温度为 30℃。

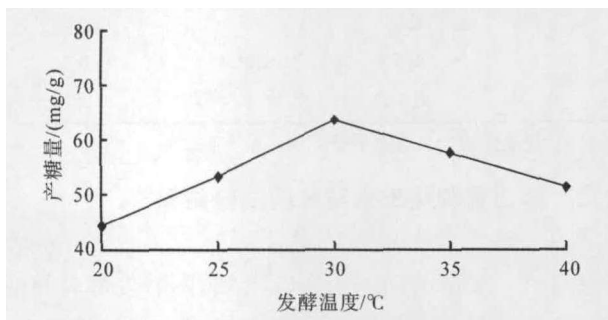


图 7 发酵温度对产糖量的影响

2.2.1.4 pH 值 由图 8 可知,产糖量随 pH 值增加而增加,pH 值为 4.6 时,产糖量最大,达 64.9 mg/g;当 pH 值超过 4.6 时产糖量开始下降。因此,黑曲霉糖化玉米秸秆的最适 pH 值为 4.6。

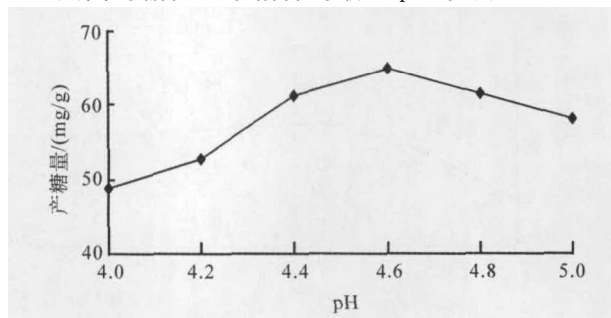


图 8 发酵 pH 值对产糖量的影响

2.2.2 正交试验 由表 5 极差分析可知,黑曲霉糖化玉米秸秆过程中各因素对产糖量的影响顺序为发酵时间> pH 值>发酵温度>接种量,最佳糖化条件为发酵时间 48 h、接种量 13%、发酵温度 35℃、pH 值 4.8,在此条件下进行 3 次平行验证试验,平均产糖量为 69.7 mg/g。由表 6 方差分析结果可知,发酵时间和 pH 值对产糖量的影响达显著水平。

表 5 黑曲霉糖化玉米秸秆的正交试验结果

试验号	因素				产糖量/(mg/g)
	E	F	G	H	
1	1	1	1	1	47.2
2	1	2	2	2	53.2
3	1	3	3	3	57.9
4	2	1	2	3	60.6
5	2	2	3	1	55.2
6	2	3	1	2	58.6
7	3	1	3	2	62.7
8	3	2	1	3	61.2
9	3	3	2	1	56.3
$k_1$	52.767	56.833	55.667	52.900	
$k_2$	58.133	56.533	56.700	58.167	
$k_3$	60.067	57.600	58.600	59.900	
R	7.300	1.067	2.933	7.000	

表 6 黑曲霉糖化玉米秸秆正交试验的方差分析结果

变异来源	SS	df	F
E	85.829	2	47.263*
F	1.816	2	1.000
G	13.282	2	7.314
H	79.742	2	43.911*

### 3 结论与讨论

本研究结果表明,纤维素酶糖化玉米秸秆的最佳工艺条件为酶解时间 40 h、纤维素酶量 1 400 U/g、酶解温度 30℃、pH 值 4.8,在此条件下,产糖量为 73.4 mg/g;黑曲霉糖化玉米秸秆的最佳工艺条件为发酵时间 48 h、接种量 13%、发酵温度 35℃、pH 值 4.8,在此条件下,产糖量为 69.7 mg/g。

在纤维素酶糖化玉米秸秆和黑曲霉生物糖化玉米秸秆的单因素试验中,相同条件下各因素试验结果之间略有差异,这可能是由于实验室环境中的尘埃和腐蚀性气体影响了分光光度计的准确性,纤维素酶活性随着储存时间的延长略有下降,黑曲霉活化效果不能保证完全一致等原因造成的。

本研究表明,在试验范围内, (下转第 151 页)

## 参考文献:

- [1] Hodge J E. Chemistry of browning reaction in model systems[J]. Agric Food Chem, 1953, 1: 928-943.
- [2] 杨义良, 吴峰, 杨通隆, 等. 不同品种对特色烟叶形成的影响研究[J]. 天津农业科学, 2010, 16(16): 28-31.
- [3] 扈英磊, 常保强, 严玉彬, 等. 气候条件对烟草生长的影响分析[J]. 现代农业科技, 2009(4): 204.
- [4] 卢剑, 王龙, 孙曙光, 等. 不同钾肥种类对烤烟品质的影响[J]. 山西农业科学, 2012, 40(12): 1277-1281.
- [5] 过伟民, 尹启生, 宋纪真. 烟草质体色素及其降解产物影响因素研究进展[J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 358-362.
- [6] 孟智勇, 张保占, 马浩波, 等. 密集烘烤转火时间对烤烟中性致香物质和评吸质量的影响[J]. 河南农业科学, 2010(9): 31-34.
- [7] 刘立全, 王月霞. 美拉德反应在烟草增香中的应用研究进展[J]. 烟草科技, 1994(6): 21-24.
- [8] 许萍, 宁敏. 非酶棕色化反应在烟草增香中的应用研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 1997, 20(4): 140-145.
- [9] 郭俊成, 张悠金, 舒俊生, 等. 烟用美拉德反应香料研究[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(1): 95-99.
- [10] 冯大炎. 美拉德反应及系列香料的合成[J]. 食品科

学, 1993(7): 3-7.

- [11] 方百盈, 冯大炎. Maillard 反应与烟用香料的开发[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 1997, 20(3): 253-256.
- [12] 吴冬梅, 殷广明. 棕色化反应产物的制备研究在烟草方面的应用[J]. 克山师专学报, 2000(3): 40-42.
- [13] 王育水, 陈京才. 梅拉德反应与反应香料[J]. 河南教育学院学报: 自然科学版, 2000, 9(4): 33-35.
- [14] 赵田, 史宏志, 姬小明, 等. 不同类型烟草游离氨基酸组成和含量的差异分析[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(2): 13-17.
- [15] 祖海道, 宋焕禄, 李大明, 等. 脯氨酸与木糖反应产物抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 67-69.
- [16] 刘志华, 毕莉莎, 刘春波, 等. 脯氨酸与葡萄糖美拉德反应模型产物抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 104-107.
- [17] 赵国玲, 杨华武, 钟科军, 等. 葡萄干提取物与脯氨酸的梅拉德反应[J]. 烟草科技, 2011(11): 44-49.
- [18] 魏明杰, 张弘涛, 朱智志, 等. 果糖与脯氨酸的 Maillard 反应及其在烟草中应用研究[J]. 安徽农学通报, 2009(2): 26-28.
- [19] 王莹. 美拉德反应的工艺条件优化及其产物的 GC-MS 鉴定、卷烟加香应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

(上接第 140 页) 酶解糖化比生物糖化产糖量略高。然而, 从成本考虑, 目前纤维素酶的价格仍然很高, 这也是利用纤维素生产乙醇成本居高不下的一个重要因素。而微生物直接降解糖化木质纤维素, 相对商品化酶, 成本较低, 而且动态生长的微生物可以充分渗透到秸秆结构内部, 同时能不断产生纤维素酶, 避免了由于长时间反应而导致的酶失活现象, 因此, 建议采用生物糖化法。

## 参考文献:

- [1] 张百良. 农村能源技术与经济管理[M]. 北京: 中国农业出

版社, 1995.

- [2] 贾朋君, 张仲欣, 任广跃, 等. 专用发酵剂降解玉米秸秆饲料的工艺优化[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2013, 34(2): 70-74.
- [3] 焦小丽. 秸秆饲料加工利用技术的研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2007, 34(7): 34-35, 37.
- [4] 高小朋, 任龙辉, 孙中锋, 等. 玉米秸秆酸解产糖条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(16): 3361-3364.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [6] 何珣, 缪冶炼, 陈介余, 等. 纤维素酶用量和底物浓度对玉米秸秆酶解的影响[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 47-58.