

Pretreatment Corncob by Sulfuric Acid for Solid-Fermentation

Lixia Lu, Youjiao Xu, Xiaohui Xiong

College of food science and light industry, Nanjing University of Technology, Nanjing, China

lixialu@njut.edu.cn

Abstract: The corncob was treated with sulfuric acid to decompose cellulose for microbe protein by solid fermentation. The effect of sodium hydroxide and sulfuric acid was compared to hydrolysis corncob, then the sulfuric acid was selected for microbe protein by solid fermentation. The optimum conditions with sulfuric acid hydrolysis were sulfuric acid concentration 4.5%, ratio of material of liquid 5.5:1 for three hours through response surface methodology, and the maximum total soluble sugar and reducing sugar was released 64.78% and 44.17%, respectively. The photographs of the corncob by sulfuric acid pretreatment with scan electron microscope (SEM) were observed. The aperture of the corncob by sulfuric acid pretreatment was 44.44 μm , and bigger than that by hot water pretreatment.

Keywords: corncob; sulfuric acid; total soluble sugars; reducing sugars

基于固体发酵的玉米芯酸法预处理条件

陆利霞, 许友娇, 熊晓辉

南京工业大学食品与轻工学院, 南京, 中国, 210009

lixialu@njut.edu.cn

摘要: 为便于固体发酵玉米芯生产微生物蛋白质, 将玉米芯进行硫酸水解提高纤维素的分解及利用率。比较了 NaOH 与 H_2SO_4 水解的效果, 选择硫酸进行水解并利于后续固体发酵。分析了硫酸浓度、水解时间及料液比等对玉米芯水解产生可溶性总糖及还原糖的影响, 并通过响应面法优化硫酸水解的适宜条件。优化获得玉米芯酸水解的适宜条件为硫酸浓度为 4.5%, 料液比为 5.5:1, 处理时间为 3h, 所获得的还原糖得率为 44.17%, 可溶性总糖得率为 64.78%。对硫酸水解的玉米芯进行电子显微镜观察, 硫酸处理的玉米芯孔径约为 44.44 μm , 孔径明显比水处理的孔径大。

关键词: 玉米芯; 硫酸; 可溶性总糖; 还原糖

我国是农业大国, 农作物秸秆等纤维素资源丰富, 每年约产 6.2 亿吨, 但是利用率太低, 仅有 15% 左右的秸秆用作了饲料, 若把其中的 30% 通过微生物转化蛋白质, 可饲料的营养价值, 则可增加 1 亿头牛的载畜量, 每年能节约粮食 5300 万吨。而进行微生物发酵农作物秸秆生产蛋白饲料的研究, 可解决蛋白饲料严重不足, 缓解人畜争粮的矛盾。因而秸秆的处理, 提高其利用率成为人们关注的研究^[1]。由于纤维素的结构紧密, 目前国内外针对其预处理以提高微生物发酵作用的研究成为热点之一。所用的方法包括物理方法、化学方法及生物法^[2,3]。已有的方法多以满足液体发酵

为目的。为了满足固体发酵的需要, 本研究针对玉米芯的预处理进行了探索, 减少营养损失, 减少废物排放, 同时也可促进纤维素的利用, 缩短发酵周期。

1 材料与方法

1.1 玉米芯, 20 目, 市售, 水分含量为 9.8%。

1.2 仪器设备: 电镜, 型号 Quanta 200, FEI 公司。

1.3 方法

1.3.1 预处理方法:

将玉米芯粉碎, 过 20 目筛。然后将 5g 玉米芯放入三角瓶, 在室温 (27℃ 左右) 和 100℃ 水浴条件下, 分别加入不同浓度的硫酸溶液、氢氧化钠溶液、采用不

同的料液比、预处理不同的时间。待处理结束后，过滤，滤液用于总糖及还原糖的测定。

1.3.2 检测方法：

可溶性总糖测定，苯酚-硫酸法。

还原糖测定，DNS 法。

1.3.3 酸处理后玉米芯微观结构观察^[4]

将粉碎至 20 目的玉米芯，用四分法缩减至 40g，各取 5g 分别装入两个三角瓶中，按料液比 1/5.8 分别加入 4.8% 的硫酸和水，在 100℃ 水浴条件下处理 2.8h。过滤所得滤渣在真空度 50pa. 冷冻升华温度 -50℃，处理 12h，冻干后取出。取适量样品固定在样品台上，在 0.1Mp，电流 30mA，喷金 100s 后用 Quanta 200 扫描电子显微镜进行观察。采用的加速电压为 15KV，束斑直径为 4-4.5nm，放大倍数为 400 倍。

2. 结果与讨论

2.1 预处理试剂的选择

2.1.1 氢氧化钠处理

室温及 100℃ 水浴条件下，料液比为 4:1，分别用不同浓度氢氧化钠处理玉米芯，分别测定还原糖得率及总糖得率，结果如图 3-1，3-2，3-3。

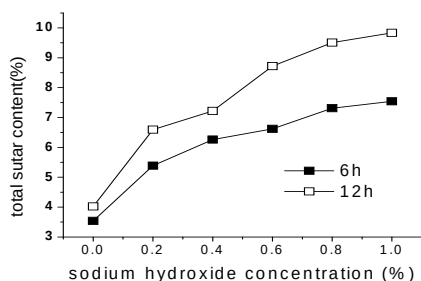


Fig.3-1 total sugar yield of corncob by sodium hydroxide

图 3-1 氢氧化钠处理玉米芯可溶性总糖得率

由图 3-1—图 3-3 可以看出，还原糖和可溶性总糖得率都随着处理时间的延长和氢氧化钠浓度的增加而逐渐升高，1% 氢氧化钠处理 12h 后，可溶性总糖得率

为 9.63%，还原糖得率为 5.31%。当温度升高到 100℃ 时，可溶性总糖得率明显升高。1% 氢氧化钠处理 2h 后，可溶性总糖得率为 30.46%。

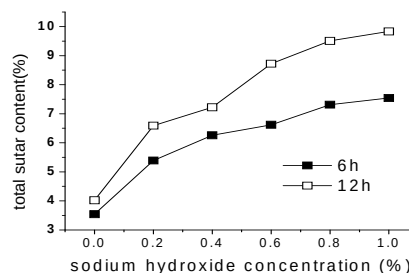


Fig.3-2 total sugar yield of corncob by sodium hydroxide

图 3-2 氢氧化钠处理玉米芯可溶性总糖得率

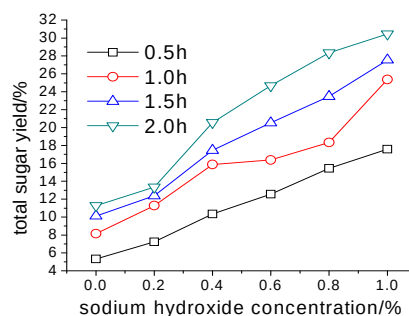


Fig.3-3 total sugar yield of corncob by sodium hydroxide at 100℃

图 3-3 100℃ 氢氧化钠处理玉米芯可溶性总糖得率

2.1.2 硫酸处理

在室温及 100℃ 水浴条件下，料液比为 4:1，用不同浓度硫酸处理玉米芯，测定还原糖及可溶性总糖得率，结果如图 3-4，图 3-5。

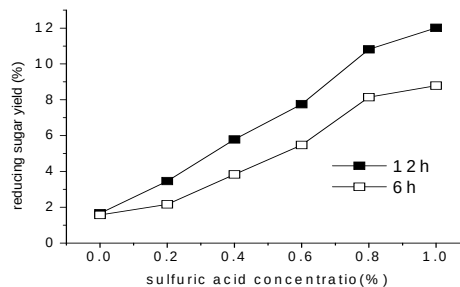


Fig.3-4 reducing sugar yield of corncob by sulfuric acid

图 3-4 硫酸处理玉米芯还原糖得率

100℃水浴条件下, 硫酸处理玉米芯不同时间可溶性总糖得率结果如图 3-5。

由图 3-4 至 3-5 可以看出, 硫酸处理玉米芯时, 可溶性总糖得率和还原糖得率都随着硫酸浓度的增加和时间的延长而逐渐增大, 室温下 1%硫酸处理玉米芯 12h 的还原糖得率为 12.01%。当预处理的温度升高, 达到 100℃时, 总糖得率明显升高。用 1%硫酸处理 2h 后可溶性总糖得率达到 40.55%。

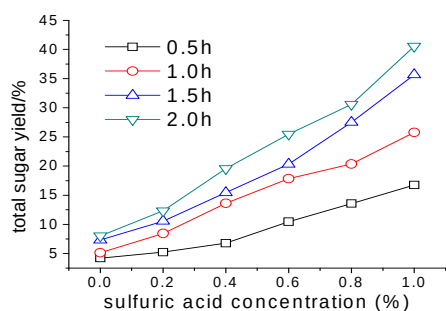


Fig.3-5 total sugar yield of corncob by sulfuric acid at 100℃

图 3-5 100℃下硫酸处理玉米芯可溶性总糖得率

与图 3-1 至 3-3 氢氧化钠处理相比, 室温及 100℃处理时, 硫酸处理的还原糖得率及可溶性总糖得率的基本变化趋势基本一致, 均随着温度的升高和时间的延长而增加, 但硫酸处理的总糖得率要比用氢氧化钠处理的总糖得率高, 因而选取硫酸作为玉米芯预处理的试剂。此外, 选取硫酸预处理便于满足后续的固态发酵, 采用氢氧化钙将硫酸中和, 既能调节 pH, Ca^{2+} 又能作为微生物的营养因子, 促进微生物的生长。若选用氢氧化钠处理, 则在中和的过程中产生较多的盐类物质, 难以分离而不利于发酵的进行。酸处理玉米芯也是发酵生产酒精的适宜处理方法^[5]。

2.2 料液比对预处理的影响

为满足下一步固体发酵的需要, 料液比不能太高; 在加热处理的过程中, 挥发掉一部分水, 因而选取的料液比分别为 3:1、4:1、5:1、6:1、7:1。在 100℃,

硫酸浓度为 1%的条件下处理玉米芯 1h。得到的滤液中总糖得率结果如图 3-6 所示。

由图 3-6 可知, 料液比为 5:1 和 7:1 的时候, 可溶性总糖得率较高, 分别为 26.77%和 25.87%。柯静等^[6]利用 1%的硫酸处理玉米秸秆时, 采用料液比为 6:1, 121℃下处理 1h, 还原糖产量为 8.2mg/g 即得率为 0.82%。结合本实验为了满足固体发酵的条件, 选取 5:1 作为适宜的料液比。

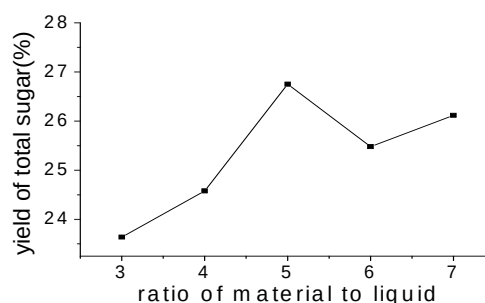


Fig.3-6 influence of ratio of material of liquid on total sugar

图 3-6 料液比对玉米芯可溶性总糖得率影响

2.3 时间对预处理的影响

采用料液比 5:1, 硫酸浓度为 1%, 分别处理 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 比较预处理后的可溶性总糖得率, 结果见图 3-7。

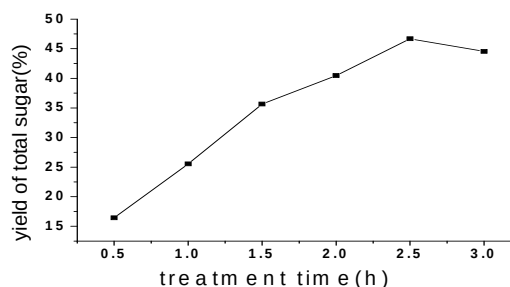


Fig.3-7 influence of treatment time on total sugar

图 3-7 处理时间玉米芯对可溶性总糖得率的影响

由图 3-7 可知, 硫酸处理玉米芯时, 随着时间的延长, 可溶性总糖得率逐渐增大, 在 2.5h 前增加较为显著, 在 2.5h 达到最高值 46.83%, 2.5h 后到 3h 时略

有下降。生产中在 100℃条件下,对原料进行 2.5h 的处理后再结合高压灭菌,灭菌效果也更好。

2.4 硫酸浓度对预处理的影响

采用 5:1 的料液比,选取的硫酸浓度分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 在 100℃条件下处理 2h, 比较预处理后的可溶性总糖得率, 结果如图 3-8。

分析图 3-8 可以看出, 硫酸浓度对可溶性总糖得率有显著影响。在硫酸浓度为 3%时可溶性总糖得率达到最高点, 为 55.09%, 硫酸浓度高于 3%可溶性总糖得率不再增加, 变化不显著, 趋于平缓。说明硫酸浓度对秸秆玉米芯等的处理有显著性影响, 但并非浓度越高效果越好, 与梁新红等[9]处理玉米秸秆时的结果相一致。

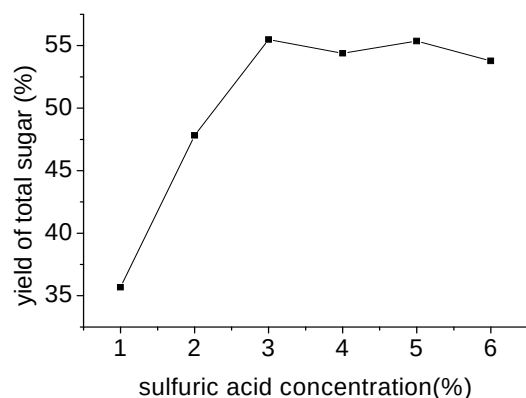


Fig.3-8 influence of sulfuric acid concentration on total sugar

图 3-8 硫酸浓度玉米芯对可溶性总糖得率影响

2.5 响应面法优化酸处理玉米芯条件

根据 Box-Benhnken 的中心组合实验设计原理,以及综合单因素影响可溶性总糖的实验结果采用响应面分析法优化玉米芯预处理条件。选取对可溶性总糖有较显著影响的 3 个因素, 即时间、料液比和硫酸浓度, 设计 3 因素 3 水平共 16 个实验点的响应面分析实验的方案。响应面分析因素与水平见表 3-1。响应面分析方案及试验结果分析见表 3-2。

Table.3-1 factors and levels of RSD

表 3-1 响应面分析因素与水平

水平	时间/h	料液比	硫酸浓度 /%
-1	1	3/1	1
0	2	5/1	3
1	3	7/1	5

Table.2 Design and results of Box-behnken

表 3-2 实验设计及结果

序号	影响因素			结果	
	时间 (h)	料液比	硫酸浓度 (%)	可溶性总糖得率 (%)	还原糖得率 (%)
1	1.00	3.00	1.00	23.52	20.47
2	1.00	7.00	5.00	50.86	32.35
3	3.76	5.00	3.00	62.23	40.72
4	2.00	5.00	0.00	7.06	8.65
5	3.00	3.00	5.00	61.43	40.51
6	2.00	5.00	3.00	55.77	38.96
7	2.00	5.00	6.53	54.34	40.58
8	0.24	5.00	3.00	10.04	7.34
9	2.00	5.00	3.00	62.93	39.96
10	2.00	8.53	3.00	55.22	37.42
11	3.00	7.00	1.00	40.51	31.22
12	1.00	3.00	5.00	48.22	33.87
13	3.00	3.00	1.00	41.58	32.86
14	1.00	7.00	1.00	24.86	21.58
15	2.00	1.47	3.00	15.97	11.19
16	3.00	7.00	5.00	54.97	41.76

通过方差分析, 表明处理时间、硫酸浓度为显著影响因素。通过在三维图和等高线图上找到响应值最高的点, 依据可溶性总糖得率较高对应处理条件为: 时间 2.8h、料液比 5.8: 1、硫酸浓度 4.8%时, 获得可溶性总糖得率(响应值)最高为 66.56%。进行验证实验, 可溶性总糖得率为 65.8%。

同样方法, 对还原糖得率较高的处理条件为: 时间 3h、料液比 5.5: 1、硫酸浓度 4.5%时, 还原糖得率响应值为 45.58%。经验证, 还原糖得率为 44.17%, 可溶性总糖得率为 64.78%, 与总糖分析结果相吻合, 均达到较高的得率水平。说明经过预处理后, 还原糖得率与可溶性总糖得率均得到明显提高, 可起到对纤维素分解, 利于微生物生长。

综上所述, 硫酸预处理玉米芯的适宜条件为: 硫酸浓度为 4.5%, 料液比为 5.5: 1, 处理时间为 3h 时, 还原糖得率为 44.17%, 此时可溶性总糖得率为 64.78%。

2.6 硫酸预处理玉米芯的微观结构

将在 100℃水浴条件下, 分别用水和优化硫酸处理的玉米芯, 然后将样品经冷冻干燥、喷金后用扫描电子显微镜进行观察, 结果如图 3-9 和图 3-10。

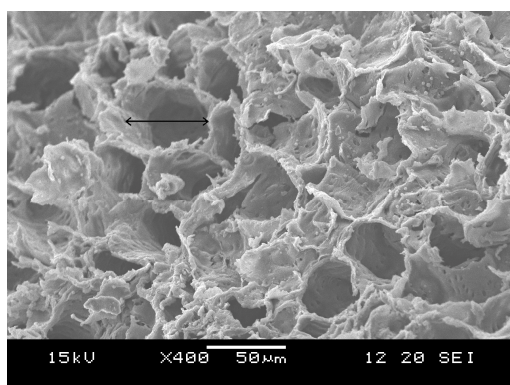


Fig.3-9 SEM photographs of corn cob by sulfuric acid×400

图 3-9 4.8%硫酸处理玉米芯扫描电镜结构图×400

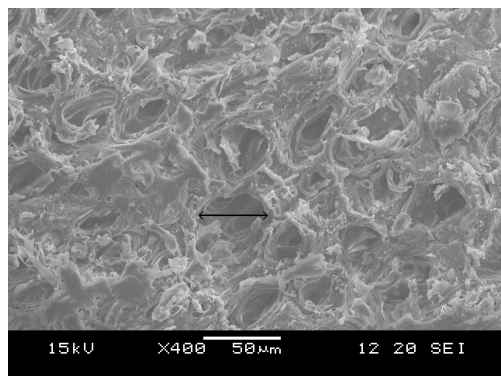


Fig.3-10 SEM photographs of corn cob by water×400

图 3-10 100℃水处理玉米芯扫描电镜结构图×400

由扫描电镜图片可以看出, 4.8%硫酸处理后的纤维要比用 100℃水处理的要疏松很多, 有明显的孔洞产生, 硫酸处理的玉米芯孔径明显比水处理的孔径大, 硫酸处理的玉米芯的孔径约为 44.44 μm , 而水处理的孔径约为 27.78 μm , 硫酸处理的比水处理的孔径大 16.66 μm , 且孔洞大小均匀, 孔与孔之间结构疏松, 而水处理的玉米芯结构依然致密。在纤维素类材料中,

半纤维素主要由戊聚糖构成, 分支化程度较大, 结晶化程度最低, 且与木质素结合包裹在纤维素的外层, 容易与酸发生水解反应而溶出^[7]。因而酸处理使得纤维素, 内部表面积增加, 结晶度下降, 木质素保护层被破坏, 疏松的结构使得纤维素酶作用的有效表面积增大, 为微生物更好的利用纤维素物质提供了有利条件, 为后续实验奠定了良好的基础。实验证明硫酸处理玉米芯的方法可行性较高, 但是硫酸酸处理过的玉米芯不能直接用来进行微生物发酵, 要用碱中和到合适的 pH 值, 然后再进行发酵, 此外微生物发酵所需要的初始糖含量还需要进一步研究。

References (参考文献)

- [1] LU Xiaoxia; LI Haiyan; HUANG Keying. Effect of different pretreatment methods on constituents of corncob. [J] Journal of Chemical Industry of Forest Products, 2004,38(2):11-13. (Ch). 吕晓霞,李海燕,黄克瀛.不同预处理方法对玉米芯成分的影响[J]林产化工通讯 2004,38(2):11-13.
- [2] LI Xiang; WEI Xiuying; DONG Renjie. A study of degradation efficiency of corn straw pretreated with different methods. [J] Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(S1):110-116. (Ch). 李湘,魏秀英,董仁杰.秸秆微生物降解过程中不同预处理方法的比较研究[J], 农业工程学报,2006, 22(S1):110-116.
- [3] ZHANG Xin; LIU Yan. Advance of Lignocelluloses Pretreatment Technology. [J] Journal of Cellulose Science and Technology, 2005, 13 (2):P54-58. (Ch). 张鑫, 刘岩.木质纤维原料预处理技术的研究进展[J]. 纤维素科学与技术,2005, 13 (2):54-58.
- [4] WU Suyan; TIAN Chun-ying; WANG Jun;et al. Morphology Observation Through Scanning Electron Microscope for Several Biological Materials. [J] Journal of Jiamusi University(Natural Science Edition), 2006, 24 (2):P172-173,181. (Ch). 武淑艳, 田春英,王军等.几种生物材料的扫描电镜观察[J],佳木斯大学学报(自然科学版).2006, 24(2):172-173,181.
- [5] Meng Zhang; Pratyooosh Shukla.; Manimaran Ayyachamy; et al. Improved bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by Kluyveromyces marxianus 6556. [J] World J Microbiol Biotechnol 2010, 26:1041-1046
- [6] KE Jing; YU Hong-bo; XU Chun-yan;et al. Comparative Study on Chemical Pretreatments to Accelerate Enzymatic Hydrolysis of Corn Straw. [J] Journal of Cellulose Science and Technology, 2008,16(1):P7-12. (Ch). 柯 静,余洪波,徐春燕等.促进玉米秸秆酶解效率的化学预处理方法比较[J],纤维素科学与技术,2008,16(1):7-12.
- [7] LIU Jianhong; CHEN Qingsen; CHEN Jianvong; et al. Research on Biotransformation to Single Cell Proteins by Using Diluted Sulfuric Acid Solution to Pretreat Corn Stalk. [J]. Journal of Tianjin University of Commerce, 2001, 21(3):P1-5. (Ch). 刘剑虹,陈庆森,陈剑勇等.酸处理玉米秸秆生物转化单细胞蛋白的研究[J],天津商学院学报.2001, 21(3):1-5.