

酸酶法降解稻草纤维素工艺优化 及其发酵产乙醇的研究

李 健

(江西农业大学食品学院,江西 南昌 330000)

摘 要: 对纤维素降解工艺进行了优化,并将其应用于淀粉质原料酿酒中,在减少大米用料的同时增加发酵液糖含量,提高酒度,节约生产成本。实验采用酸法酶法两步处理稻草秸秆纤维素,结果表明,在盐酸浓度 2.5%,温度为 126℃,固液比(g/mL)为 1:2 的条件下处理 1 h,再在温度为 50℃,pH 值为 5.0,酶用量为 35 IU/g 干物质(自制酶液)的条件下水解 12 h,最终葡萄糖得率为 24.5%。水解糖液与大米糖化液按 6:4(v/v)配比混合,接入酿酒酵母发酵,产酒蒸馏酒度为 13.4%vol。

关键词: 稻草秸秆; 酸处理; 纤维素酶; 酒精发酵

中图分类号:TS262.2;X797;TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2012)01-0104-03

Study on Technical Optimization of the Hydrolysis of Straw Cellulose by Acid-enzymatic Method and Its Fermentation to Produce Ethanol

LI Jian

(Food Science College of Jiangxi Agriculture University, Nanchang, Jiangxi 330000, China)

Abstract: The hydrolysis of straw cellulose was optimized and then applied in liquor-making by starch raw materials which could reduce the use level of rice, increase sugar content in fermenting liquid, increase liquor alcoholicity, and save production cost. In the experiments, straw cellulose was pretreated by acid method and enzymatic method as follows: straw stalk treated for 1h in conditions of hydrochloric acid concentration of 2.5% and temperature at 126℃ and the ratio of solids to liquid (g/mL) as 1:2, then 12 h hydrolysis in conditions of temperature at 50℃, pH=5.0, and enzyme use level/dry substance=35IU/g (self-made enzyme liquid used). As a result, final glucose yield was 24.5%. The hydrolyzed sugar liquid mixed with rice saccharifying liquid according to the ratio of 6:4 (v/v) and then fermented by yeast, and the alcoholicity of the distilled liquor was as high as 13.4%vol.

Key words: straw stalk; acid pretreatment; cellulase; alcohol fermentation

随着全球能源危机、粮食危机、环境污染等问题的日趋严重,传统酒精产业逐步在将发酵原料由主粮向农产品加工副产物方向研究生产转变。由于目前生产乙醇的原料多采用淀粉类物质,成本较高,所以考虑在淀粉质原粮基础上添加富含纤维素的稻草秸秆作为附加原料来生产燃料乙醇进而降低生产成本。纤维素原料成分复杂,结构稳定,很难迅速降解,必须借助于一定的化学或生物方法。研究如何将化学处理和微生物酶水解工艺结合起来,提高纤维素糖化率,并且尽可能降低生产成本是发展纤维素乙醇工艺的关键。

本研究拟采用酸法酶法两步工艺处理稻草秸秆,并添加于淀粉质原料中用于发酵产酒精,以期进一步降低

酒精生产成本。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

稻草秸秆取自江西南昌某农村,烘干,经粉碎过 40 目筛,干燥后包装储藏备用;大米,江西省金佳谷物股份有限公司生产,粉碎过 40 目筛,干燥后储存储备用。

1.1.2 菌种

黑曲霉 A8:江西农业大学食品科学与工程学院微生物实验室选育保藏。

1.1.3 培养基

收稿日期:2011-08-26

作者简介:李健(1986-),男,江西省井冈山市人,在读硕士研究生,研究方向:食品微生物与发酵技术。

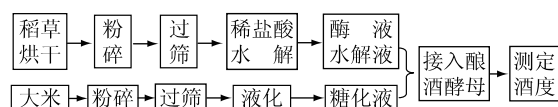
通讯作者:陈卫平,教授,硕士生导师,主持基金项目、科研项目多项,E-mail:517836749@qq.com。

土豆汁葡萄糖液体培养基^[1]。

产纤维素酶培养基: 酸解稻草粉滤渣 5 %、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 %、 KH_2PO_4 0.2 %、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 % , 初始 pH 值 5.0。

1.2 方法与步骤

实验流程如下:



稀盐酸处理稻秆的正交优化实验: 准确称取 5 g 稻草粉放入洁净的锥形瓶中, 然后按表 1 的酸处理条件进行处理。对酸处理条件(温度、水解时间、固液比、盐酸质量分数)进行优化, 按照 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交实验(表 1)设计进行实验, 以还原糖含量为考察指标, 得出稀盐酸处理稻草粉的最佳条件。还原糖浓度测定采用菲林试剂滴定法^[2]。

表 1 酸法水解稻草纤维正交表因子与水平

水	因素			
平	A: 固液比	B: 水解时间(min)	C: 盐酸浓度(%)	D: 温度(°C)
1	1:2	40	1.5	115
2	1:3	50	2.0	121
3	1:4	60	2.5	126

1.3 稻草秸秆的酶水解

1.3.1 纤维素酶粗酶液的制备^[3]

取保存于冰箱的纤维素酶产生菌种黑曲霉移植于 PDA 平板上 30 °C 培养 3~5 d, 以培养皿上长满黑色孢子为准。在 250 mL 三角瓶中装入 80 mL 土豆汁葡萄糖液体培养基中, 接入一环斜面菌种, 28 °C、200 r/min 旋转摇床培养 32 h 后供作种子。在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 产酶培养基, 接种量为 10 % (v/v), 28 °C、200 r/min 旋转摇床培养 5 d。

取发酵培养液于 4000 r/min 离心 20 min, 除去菌体及培养基, 上清液再用抽滤瓶抽滤, 滤液即为粗酶液。取 1 mL 粗酶液, 加 10 mL pH4.8 的 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 即为稀释 10 倍的原酶液, 可用来测酶活。

1.3.2 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)酶活测定

取 1 mL 稀释酶液于试管中, 加入 1 mL 1 % 羧甲基纤维素钠溶液(用 pH4.8 的醋酸缓冲液配制), 50 °C 恒温水浴中反应 30 min, 取出加 1.5 mL DNS 显色液, 终止反应, 煮沸 5 min, 取出用流水冷却, 定容至 25 mL, 摇匀, 用紫外可见分光光度计在 540 nm 波长下测定, 对照组用蒸馏水代替酶液^[4]。

以国际单位为依据, 定义每分钟催化纤维素水解(pH 值 4.8 的 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液)生成相当于 1 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖的还原糖所需酶量为 1 个酶活单位

(IU)。

$$\text{酶活力 (IU/mL)} = \frac{M \times D}{180 \times T \times V}$$

其中: M——依葡萄糖标准曲线得到的还原糖的含量(μg);

D——酶液稀释倍数;

T——反应时间(min);

V——酶液体积(mL);

180——葡萄糖的分子量。

1.3.3 酶水解的正交实验优化

取在最优条件下稀盐酸处理后的滤渣, 利用自制的纤维素粗酶液按表 2 酶处理条件进行水解处理。对酶处理条件(温度、pH 值、酶用量、时间)进行优化, 按照 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交实验表(表 2), 以处理液中还原糖含量为考察指标, 得出粗酶液处理稻草粉滤渣的最佳条件。

表 2 酶法水解稻草纤维正交表因子与水平

水	因素			
平	A: 温度(°C)	B: pH 值	C: 酶用量(IU/g)	D: 时间(h)
1	45	4.0	25	12
2	50	4.5	30	22
3	55	5.0	35	32

2 结果与分析

2.1 酸处理稻秆正交实验最优条件的考察

按 1.2.1 稀盐酸处理稻秆方案进行正交优化实验, 结果见表 3。

表 3 酸法水解稻草纤维正交试验结果

编号	A	B	C	D	还原糖含量(%)
1	1	1	1	1	10.35
2	1	2	2	2	5.57
3	1	3	3	3	14.10
4	2	1	2	3	9.80
5	2	2	3	1	9.04
6	2	3	1	2	9.59
7	3	1	3	2	6.92
8	3	2	1	3	7.69
9	3	3	2	1	5.77
K ₁	100.080	90.235	92.096	83.840	
K ₂	94.752	74.328	70.474	73.595	
K ₃	67.924	98.193	100.187	105.321	
极差	32.156	23.865	29.713	31.726	

由表 3 的极差数据可以看出, 稀酸对纤维素水解过程的影响大小依次为: 固液比>温度>酸浓度>处理时间。根据 K₁、K₂、K₃ 值的大小得出酸处理的最佳条件是固液比为 1:2, 水解时间为 60 min, 盐酸浓度 2.5 %, 温度为 126 °C, 该条件下还原糖含量为 14.1 %。

2.2 液态发酵酶液水解酸处理滤渣最佳条件

按 1.3.3 方法进行酶水解的正交实验, 结果见表 4。

液态发酵纤维素酶液经测定其 CMC-Na 酶活为

表4 酶法水解稻草纤维正交试验结果

编号	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	还原糖含量(%)
1	1	1	1	1	14.78
2	1	2	2	2	15.49
3	1	3	3	3	16.85
4	2	1	2	3	21.07
5	2	2	3	1	17.85
6	2	3	1	2	15.14
7	3	1	3	2	16.18
8	3	2	1	3	14.63
9	3	3	2	1	20.37
K ₁	17.743	15.023	14.130	17.373	
K ₂	18.247	17.297	17.457	16.443	
K ₃	14.300	17.970	18.703	16.473	
极差	3.947	2.947	4.573	0.930	

6.753 IU/mL,以此粗酶液作为酶解处理液酶解稻草秸秆草秸残渣。将经过酸处理后的稻草秸秆残渣进行正交试验,结果见表4。酶水解以获得最大葡萄糖含量为目标,各因子的影响大小依次为酶用量>温度>pH值>处理时间。酶水解的最佳条件:温度为50℃,pH值为5.0,酶用量为35 IU/g干物质、处理时间为12 h,在此最佳条件下的最大葡萄糖得率为24.5%。经过正交设计软件分析方差,可知酶用量对纤维素糖化有显著影响。

2.3 发酵试验结果

准确称取粉碎的大米淀粉90 g,置于500 mL锥形瓶中,加水300 mL,摇匀,加入CaCl₂ 0.2 g,α-淀粉酶0.5 g,调pH至6.5,在剧烈搅拌下先加热至72℃,保温15 min,再加热至90℃,维持30 min,碘反应测试为棕红色即液化结束。冷却至60℃,调pH至4.5,加入0.4 g糖

化酶,搅拌均匀后放入60℃恒温水浴锅中保温糖化3 h。取糖化醪过滤液(还原糖含量32.9%)40 mL,加入经酸法酶法两步处理的稻草纤维处理液(还原糖含量为24.5%)60 mL,0.3%的酵母粉,0.2%的硫酸铵,在0.1 MPa压力下灭菌30 min,接入10%的安琪酵母种子液,于30℃恒温培养箱发酵5 d。发酵结束取成熟发酵醪100 mL,加入100 mL蒸馏水进行蒸馏,用100 mL容量瓶接馏出液100 mL,用酒精计测出酒精度为13.4%vol,同时测定成熟的发酵醪中残余还原糖含量为0.64%。

3 结论

采用酸法-酶法结合工艺处理稻草秆进行纤维素糖化。得最优糖化条件为:盐酸浓度2.5%,温度为126℃,固液比(g/mL)为1:2的条件下水解1 h,再在温度为50℃,pH值为5.0,酶用量为35 IU/g干物质的条件下水解12 h,最终葡萄糖得率为24.5%,并将此水解糖液与大米糖化液按6:4(v/v)配比混合,接入酿酒酵母发酵产酒,蒸馏酒度可达13.4%vol。

参考文献:

- [1] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1999:216.
- [2] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002:97-100.
- [3] 冯培勇,刘执平,李红玉,等.一株黑曲霉产纤维素酶的性质研究[J].安徽农业科学,2007(36):11746-11747.
- [4] Charles. A new solid medium for enumerating cellulose utilizing bacteria in soil[J].Applied and Environmental Microbiology, 1995(5):2016-2019.

贵州省第一次数字出版工作会议在贵阳举行

本刊讯:为认真贯彻十七届六中全会《中共中央关于深化文化体制改革推动文化大发展大繁荣若干重大问题的决定》,传达全国数字出版工作会议精神,加快实施新闻出版业“十二五”发展规划,推动我省数字出版产业加快发展,2011年12月22日,由贵州省新闻出版局组织召开的首次数字出版工作会议在贵阳举行。贵阳市新闻出版局、遵义市新闻出版局、贵州省出版集团公司及其所属的数字出版工作部门、各图书出版社、新闻图片社、贵州日报报业集团及其所属开展数字出版业务单位、当代贵州期刊传媒集团、贵阳日报传媒集团、遵义日报传媒集团及其数字出版部门、贵大出版社、贵州文化音像出版社、部分报刊出版单位,已获得数字出版资质的有关单位,已列入省新闻出版局跟踪管理的具有数字出版业务的单位、动漫产业园部分企业、省数字出版协会等单位的相关负责人参加了会议。

会议传达了全国数字出版工作会议精神,提出了2012年的工作要点,并学习了数字出版业有关政策及法律法规。会议还就结合本单位实际,围绕实施“十二五”数字出版规划、设想、打算,成功案例及启示作了大会交流与深入的研讨。

“十一五”时期,我国数字出版产业营销收入增长迅速,从2006年的213亿元增长到2010年的1051亿元,5年间平均增幅接近50%。其中,手机出版、网络游戏出版和互联网广告三项产值均超过300亿元,占数字出版总产值的90%以上,成为数字出版产业营销收入的重要支柱。2010年数字出版总产出占新闻出版业总产出的比例已接近10%,成为新闻出版业重要的经济增长点。

新闻出版总署署长柳斌杰在合肥举行的全国首次数字出版工作会议上指出,我国数字出版产业呈现出强劲的发展势头,已成为新闻出版业的战略性新兴产业和新的经济增长点。他强调,中国数字出版要实现跨越式

发展,五年时间达到世界先进水平。

柳斌杰指出,“十一五”以来我国数字出版产业发展的主要特点:产业规模不断扩大,发展模式日渐清晰,高新技术应用水平不断提高,产品形态日益丰富,出版企业转型步伐不断加快,传统出版与数字出版呈现融合发展,产业集聚效应持续增强,区域整体发展初现端倪,数字阅读普及提速,消费需求日益旺盛,政府扶持力度不断加大,产业政策日趋完善等。

要切实转变观念,充分认识数字出版在文化产业发展中的战略地位和重要作用,切实采取行动,推动“十二五”时期数字出版产业发展实现新跨越。并提出了六项具体任务,包括加快内容资源整合,不断推出优质数字出版产品,加快产业结构调整,推动传统出版产业转型升级,加快投送平台建设,建立数字内容传播新体系,聚焦重点领域,发挥重大项目的带动引领作用,加快关键技术研发,提升新闻出版行业科技含量,充分满足人民群众的文化需求,推动公共文化的服务体系建设。

柳斌杰强调,“十二五”时期,将加快制定落实数字出版产业发展政策;加快建立数字出版企业准入退出机制,加快推进国家数字出版产业基地建设,大力推动数字出版“走出去”,努力营造良好的数字出版产业发展环境;加快实施数字出版人才培养工程。

柳斌杰还着重强调了发展数字出版产业,全行业要正确认识和妥善处理好几大关系:坚持正确导向,正确处理好几代文化传承与市场需求的关系;坚持两个效益,正确处理好几经济效益与社会效益的关系;坚持创新发展,正确处理好几传统产业与新兴业态的关系;坚持统筹兼顾,正确处理好几产业布局与结构调整的关系;坚持科技进步,正确处理好几自主创新与消化吸收的关系;坚持扶持引导,正确处理好几促进繁荣与加强管理的关系。(小小 江砂)