

不同预处理提高棉花秸秆还原糖酶解效果的研究

吴书奇¹, 马金萍², 王家佳¹, 席琳乔^{1,3}, 史卉玲¹, 张 玲¹, 马春晖¹

(1. 塔里木大学 动物科技学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆呼图壁种牛场, 新疆 呼图壁 831203; 3. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为缓解饲草短缺的问题,采用硫酸处理、微波处理、蒸汽爆破处理等9种方法预处理棉花秸秆,软化棉花秸秆中的木质素,增强饲喂时的适口性,提高棉花秸秆的利用率。结果表明:蒸汽爆破处理棉花秸秆的损失量最大,为39.00%。纤维素含量除了蒸汽爆破处理较低,其它处理均高于对照。木质素含量,除氯化(16℃)与对照接近外,其它的处理均低于对照。对预处理的棉花秸秆分别添加筛选自牛粪一组纤维素降解复合系和绿色木霉进行酶解试验。酶解结果表明:微波处理、氯化处理(16℃)、碱+微波处理、双氧水处理、蒸汽爆破处理绿色木霉的活性强于纤维素复合酶,碱/微波处理、氯化处理(30℃)、碱处理、硫酸处理的预处理棉花秸秆进行酶解效果纤维素复合酶的作用优于绿色木霉的效果。微波处理、氯化处理、碱+微波处理、双氧水处理、硫酸预处理酶解的效果较好。碱+微波处理失重率最高,达到19.32%、酶解率最高,达到32.20%;硫酸处理糖化率最高,达到18.20%、转化率最高,达到20.23%;碱+微波处理葡萄糖得率最高,达到1.013%。

关键词:预处理;棉花秸秆;纤维素复合酶;降解率

中图分类号:S811.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0074-04

新疆是棉花主产区,棉花秸秆是发展草畜产业的巨大饲草资源。多年来,由于棉花秸秆的收集贮存和加工无法得到很好的解决,牛、羊对其利用率不到50%,造成了极大的浪费。随着退牧还草和禁牧等项目的实施,饲草短缺的问题更为突出,通过棉花秸秆的预处理,可软化棉花秸秆中的木质素,增强饲喂时的适口性,提高棉花秸秆利用率,棉花秸秆在棉花生产区也是解决草畜矛盾的重要措施之一。

秸秆预处理的主要作用是将秸秆外层的木质素破坏掉,使被包裹在里面的纤维素和半纤维素裸露出来,在酶解过程中纤维素才能与纤维素酶有充分的接触,纤维素酶才能充分发挥作用。目前,木质纤维素原料预处理的方法主要有物理法、化学法、物理化学法和生物法^[1]。传统的物理预处理法对木质素含量较低的生物物质的处理效果较好,而化学预处理法能有效降低纤维素的结晶度,除去半纤维素或木质素,能耗低、周期短、效率

高、条件较温和,但是污染较大^[2]。近年来,微波也应用于秸秆预处理中。Haykir通过碱预处理、漆酶和纤维素酶的复合处理,使棉花秸秆溶出的葡萄糖产量达到5.45%^[3]。邓辉等通过优化棉花秸秆糖化碱预处理条件,使棉花秸秆水解率达到20.05%^[4],另外人们开始研究通过微生物和酶的作用来降解木质纤维素,以实现建立各种方法的优化和综合利用技术体系,张琴等利用微生物降解经稀酸常温处理的棉花秸秆,实现棉花秸秆糖化率最高30%左右^[4]。

该研究通过棉花秸秆预处理试验,降低纤维素的聚合度、结晶度,再通过添加筛选纤维素降解复合系进行酶解试验,以提高秸秆还原糖的得率,为提高棉花秸秆饲料的利用效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试棉花秸秆采自新疆阿拉尔市周边地区,粉碎过40目筛。纤维素酶为绿色木霉是商品酶,购自上海蓝季科技有限公司。降解复合菌系为新鲜牛粪中筛选而得。

1.2 方法

1.2.1 棉花秸秆预处理 (1)微波处理:取100 g棉花秸秆(水分调至60%),室温浸泡48 h后微波炉给定功率(700 W),处理15 min;(2)氯化处理(16℃):取100 g棉花秸秆样品,加入2.5%氨水溶液,固液比1:20,16℃处理48 h;(3)碱/微波

收稿日期:2012-02-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3096026);“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAD17B05);国家牧草产业技术体系塔里木综合试验站资助项目(CARS-35)

第一作者简介:吴书奇(1984-),男,河南省平顶山市人,在读硕士,从事动物营养与饲料科学方面的研究。E-mail:wsqa109@yahoo.com.cn。

通讯作者:马春晖(1966-),男,新疆维吾尔自治区哈密市人,博士,教授,从事牧草生产与加工方面的研究。E-mail:chunhuima@126.com。

处理:取 100 g 棉花秸秆,加入 2% NaOH 溶液,固液比 1:20,室温浸泡 48 h。预处理结束后,水洗至中性,蒸馏水洗 2 次,然后微波炉给定功率(700 W),处理 15 min;(4)碱+微波处理:取 100 g 棉花秸秆样品,加入 2% NaOH 溶液后,微波炉给定功率(700 W),处理 15 min;(5)氨化处理(30℃):取 100 g 棉花秸秆样品,加入 2.5% 氨水溶液,固液比 1:20,30℃ 处理 48 h;(6)碱处理:取 100 g 棉花秸秆,加入 2% NaOH 溶液,固液比 1:20,室温浸泡 48 h;(7)H₂O₂ 处理:取 100 g 棉花秸秆样品,加入 1.3% H₂O₂ 溶液,固液比 1:20,30℃ 处理 48 h;(8)硫酸处理:取 100 g 棉花秸秆样品,加入 2.5% 的稀硫酸溶液,固液比为 1:12,室温浸泡 48 h;(9)蒸汽爆破处理:取 100 g 棉花秸秆样品,试样送河南鹤壁市气爆工程研究中心进行处理,压力 2.5 MPa,时间 4 min,温度 225℃;(10)空白对照:取 100 g 棉花秸秆样品,蒸馏水冲洗。

各样品预处理结束后,水洗至中性,蒸馏水洗 2 次。65℃ 烘干,称重量,计算失重率,然后采用范式洗涤法测定其中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、酸性洗涤木质素(ADL)。

$$\text{失重率}/\% = \frac{\text{处理前重量} - \text{处理后重量}}{\text{处理前重量}} \times 100$$

1.2.2 复合菌系的筛选 参照李为^[6]等的方法取新鲜牛粪 5 g 加入到 100 mL PCS 培养基中,37℃ 静置培养,待滤纸崩解以后,按照 10% (v/v) 接种量再转接到新鲜的培养液中,如此转接数代,淘汰失去分解能力和不稳定的培养物,待滤纸崩解时间和速度稳定以后,即初步筛选到纤维素分解混合菌群。吸取经过筛选的转接复合菌系 10 mL 于离心管中,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液即得到粗酶液^[7]。

1.2.3 酶活测定方法 酶活测定采用 DNS 法^[8],主要测定羧甲基纤维素酶(CMC 酶)、滤纸活性酶(FPA 酶)和β-葡萄糖苷酶(β-G 酶)。活力定义:在 pH5.0,40℃ 下,每分钟催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位(U)。FPA 酶活力定义:在 pH4.8,50℃ 下,每分钟催化滤纸水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位(U)。β-G 酶活力定义:每分钟催化水解水杨苷产生 1 μmol 的葡萄糖所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.2.4 对预处理的棉花秸秆进行酶解试验 称取一定质量的预处理的棉花秸秆,按照 10 U·g⁻¹ 的添加量分别添加纤维素复合酶菌系和绿色木霉

进行酶解试验,充分混匀,于 50℃ 水解 48 h,分别测定糖化率、失重率和转化效率等指标。

2 结果与分析

2.1 不同预处理对棉花秸秆木质素、纤维素和半纤维素含量的影响

不同的预处理棉花秸秆的半纤维素均低于对照组,说明不同的预处理有利于棉花秸秆半纤维素的水解;蒸汽爆破处理棉花秸秆的失重率最大,为 39.00%,半纤维素含量也最低,为 1.54%。纤维素的含量除了蒸汽爆破处理较低,其它处理均高于对照。木质素的含量,除了氨化(16℃)处理与对照组接近外,处理均低于对照组(见表 1)。

2.2 纤维素酶活的测定结果

按照 1.2.3 方法测定复合菌系酶活性和绿色木霉酶活性(见图 1)。测定条件在温度为 50℃,pH 为 4.8 时的复合菌系酶活性大小是 CMCase 为 5.889 U·mL⁻¹,FPA 为 3.222 U·mL⁻¹,β-葡萄糖苷酶为 6.671 U·mL⁻¹;绿色木霉的酶活性大小是 CMCase 为 16.642 U·mL⁻¹,FPA 为 6.133 U·mL⁻¹,β-葡萄糖苷酶为 5.286 U·mL⁻¹。

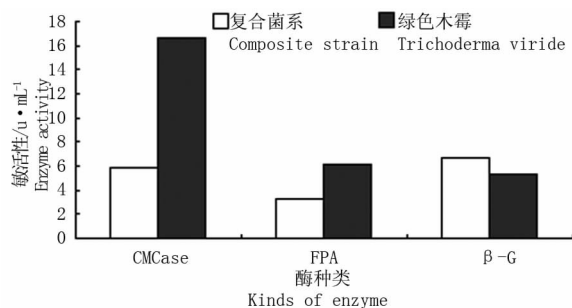


图 1 两种菌的基础酶活的测定

Fig. 1 Determination on the basis enzyme activity of two kinds of cellulase

2.3 复合菌系酶对棉花秸秆的降解效果影响

按照 1.2.4 的方法对不同预处理的棉花秸秆进行酶解试验,就酶解效果看(见表 2),绿色木霉对微波处理、氨化处理(16℃)、碱+微波处理、双氧水处理、蒸汽爆破处理的效果强于纤维素复合酶,而纤维素复合酶在碱/微波处理、氨化处理(30℃)、碱处理、硫酸处理棉秆酶解效果作用较绿色木霉好。总体来看微波处理、氨化处理、碱+微波处理、双氧水处理、硫酸处理的预处理酶解的效果较好。碱+微波处理失重率最高,达到 19.32%、酶解率最高,达到 32.20%;硫酸处理糖化率最高,达到 18.20%、转化率也最高,达到 20.23%;碱+微波处理葡萄糖得率最高,达到 1.013%。

表 1 不同预处理对棉秆木质素、纤维素和半纤维素含量的影响

Table 1 Effect of different pretreatments on contents of lignin, cellulose and hemicellulose in cotton stalk

预处理 Pretreatment	样品号 Sample	失重率/% Lose weight	木质素/% Lignin	纤维素/% Cellulose	半纤维素/% Hemicellulose
微波处理 Microwave processing	(1)	20.00	17.61	45.32	10.73
氨化处理(16℃) Ammonia treatment (16℃)	(2)	25.00	19.11	51.14	11.09
碱/微波 Alkali/microwave	(3)	35.00	17.35	56.08	6.11
碱+微波 Alkali+microwave	(4)	32.00	13.75	60.16	5.96
氨化处理(30℃) Ammonia treatment (30℃)	(5)	22.00	18.75	51.37	12.99
碱处理 Alkali treatment	(6)	27.00	17.39	55.13	8.90
双氧水处理 H ₂ O ₂ treatment	(7)	21.00	17.40	54.93	3.50
硫酸处理 Sulfuric acid treatment	(8)	29.00	18.10	47.53	9.58
蒸汽爆破 Steam explosion processing	(9)	39.00	16.60	32.91	1.54
空白对照 Blank control	(10)	15.50	19.87	36.74	21.98

表 2 纤维素酶对棉花秸秆的降解效果的影响

Table 2 Effect of cellulase on degradation of cotton stalk

样品编号 Sample	失重率/% Lose weight	酶解率/% Enzymolysis rate	糖化率/% Saccharification rate	转化率/% Conversion rate	葡萄糖得率/% Glucose yield rate
(1)-1	11.90	19.83	12.11	13.45	0.610
(1)-2	14.45	24.08	11.88	13.20	0.598
(2)-1	9.64	16.07	10.81	12.01	0.614
(2)-2	10.84	18.07	11.42	12.69	0.649
(3)-1	8.19	13.65	9.30	10.34	0.580
(3)-2	6.41	10.68	9.52	10.58	0.594
(4)-1	15.70	26.17	14.87	16.52	0.994
(4)-2	19.32	32.20	15.15	16.83	1.013
(5)-1	5.00	8.33	14.21	15.79	0.811
(5)-2	4.74	7.90	15.95	17.72	0.911
(6)-1	5.16	8.60	12.26	13.62	0.751
(6)-2	4.68	7.80	13.51	15.01	0.827
(7)-1	11.19	18.65	10.79	11.98	0.658
(7)-2	11.44	19.07	8.66	9.62	0.529
(8)-1	15.94	26.57	16.19	17.99	0.855
(8)-2	15.03	25.05	18.20	20.23	0.962
(9)-1	12.78	21.30	14.96	16.62	0.665
(9)-2	7.25	12.08	16.62	18.47	0.739
(10)-1	8.17	13.62	16.67	18.52	0.610
(10)-2	8.47	14.12	16.93	18.81	0.619

注:-1表示添加复合菌系处理,-2表示添加绿色木霉处理。

Note:-1 means treatment with composite strain,-2 means treatment with trichoderma viride.

3 结论与讨论

棉花秸秆是一类有一定粗蛋白含量,但是干物质有效降解率和代谢能都较低的粗饲料,纤维素消化率低是棉花秸秆消化利用的主要问题^[9]。

试验采用硫酸处理、微波处理、蒸汽爆破处理等 9 种方法预处理棉花秸秆。其中蒸汽爆破处理棉花秸秆的损失量最大,为 39.00%,酶解效果也较好。分析原因是蒸汽爆破导致棉花秸秆木质纤维结构变化,从而加速棉花秸秆的微生物降解进程提高其降解率。纤维素含量除了蒸汽爆破处理较低,其它处理均高于对照。木质素含量,除氨化(16℃)与对照接近外,其它的处理均低于对照组。不同的预处理棉花秸秆的半纤维素均低于对照组,说明不同的预处理有利于棉花秸秆半纤维素的水解,其中蒸汽爆破处理棉花秸秆的失重率最大,为 39.00%,半纤维素含量也最低为 1.54%。纤维素的含量除了蒸汽爆破处理较低,其它处理均高于对照。

植物秸秆在碱溶液处理过程中的失重主要是因为纤维原料中的半纤维素和木质素溶于碱溶液造成的,在试验中棉花秸秆在碱+微波处理条件下失重率最高,达到 19.32%,酶解率最高达到 32.20%;硫酸处理糖化率最高,达到 18.20%,转化率最高,达到 20.23%;碱+微波同时处理葡萄糖得率最高达到 1.013%。碱+微波处理的棉花秸秆水解产生的还原糖高于其它处理,这与朱圣东^[10]等人微波处理稻草的结果相似,棉花秸秆中的极性分子在高频电磁场的作用下,分子运动和相互摩擦均加剧,使更多的纤维素和木质素分子

被碱液作用使棉花秸秆的纤维结构破坏得更为彻底,纤维素酶更能迅速到达作用位点,木质纤维素结构破坏得比较严重,易于水解,因而加快棉花秸秆的酶水解速度^[11-12]。

参考文献:

- [1] 杨涛. 水稻秸秆纤维素发酵转化燃料乙醇的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2008.
- [2] 宋安东,任天宝,谢慧,等. 化学与处理对玉米秸秆酶解糖化效果的实验[J]. 化学与生物工程,2006,23(8):22-27.
- [3] Haykir. A comparative study on lignocellulose pretreatments for bioethanol production from cotton stalk[J]. New biotechnology,2009,25(1):253-254.
- [4] 邓辉,李春,李飞,等. 棉花秸秆糖化碱预处理条件优化[J]. 农业工程学报,2009,25(1):208-212.
- [5] 张琴,李艳宾,岳耀峰,等. 棉花秸秆的微生物降解及糖化工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(2):142-145.
- [6] 李为,薛红蕾,王江丽,等. 一组高效棉花秸秆降解菌复合系的构建及其降解特性的研究[J]. 新疆农业科学,2009,46(1):72-77.
- [7] 尹璠,夏乐先,柳建设,等. 一株纤维素降解菌株的分离鉴定及产酶特征研究[J]. 环境科学与技术,2009,32(3):50-53.
- [8] 刘德海,杨玉华,张发旺,等. 饲用纤维素酶活力的测定方法的探讨[J]. 饲料工业,2002,23(4):34-35.
- [9] 魏敏,雒秋江,王东宝,等. 棉花秸秆作为绵羊粗饲料的研究[J]. 草食家畜,2003(3):47-49.
- [10] Zhu Shengdong, Wu Yuanxin, Yu Ziniu, et al. Pretreatment by microwave/alika of rice straw and its enzymic hydrolysis[J]. Process Chemistry,2005,40,3082-3086.
- [11] Riedel K, Bronnenmeier K. Active-site mutations which change the substratespecificity of the Clostridium stercorarium cellulase CelZ implications for synergism[J]. Eur J Biochem,1999,262(1):218-223.
- [12] Lee R, Lynd, Paul J, et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,2002,66(3):506-577.

Effects of Different Pretreatments on Enhancing Reducing Sugar Hydrolysis Result of Cotton Stalk

WU Shu-qi¹, MA Jin-ping², WANG Jia-jia¹, XI Lin-qiao^{1,3}, SHI Hui-ling¹, ZHANG Ling¹, MA Chun-hui¹

(1. Animal Science and Technology College of Tarim University/Xinjiang Production and Construction Crops Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Alaer, Xinjiang 843300; 2. Hutubi Cow Breeding Farm, Hutubi, Xinjiang 831203; 3. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: With the aim of alleviating the shortage of forage problems, using nine pretreatments of cotton stalk, such as sulfuric acid, microwave processing, steam explosion processing and so on, to soften the lignin in cotton stalks, enhance the palatability of feeding and improve the efficiency of cotton stalk. The results showed that: under steam explosion, the loss rate of cotton straw was the biggest, 39.00%. cellulose content of the pretreatments were higher than blank control, except the steam explosion process. Lignin content of pretreatments were lower than the control, except for ammonification (16℃) treatment nearly with the control. The enzyme solution

黑龙江省发酵床养猪冬季温度研究

吴赛辉,何鑫森,彭福刚,王文涛,刘 娣

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了研究稻壳、稻壳粉发酵床在生猪饲养中的实用性,在黑龙江地区发展生态养猪模式,用稻壳、稻壳粉代替锯末,作为垫料原料制作猪发酵床,对猪舍内温度进行观测,分析使用此廉价垫料的可行性。结果表明:冬季发酵床床面温度和舍内温度基本恒定,不受舍外温度变化影响,适合猪生长需求。

关键词:发酵床;生态养猪;恒定

中图分类号:S828.4

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)05-0078-02

猪肉是我国人民主要摄入的肉食,与我国庞大的人口问题共同造就了我国的第一养猪大国地位,养猪业成为了我国不可缺少的主要产业。目前我国的生猪存栏已经超过 4.5 亿头^[1],养猪生产对周边环境的污染一直非常严重,得不到很好的解决,然而,养猪业的发展不能以环境污染和资源的浪费为代价,必须走保护环境、节约生产资料的可持续发展之路。

黑龙江省是我国的“大粮仓”,由于在这片土地上有足够的饲料资源,造成养猪业的迅猛发展,同时黑龙江地区纬度较高,阳光照射少,尤其是冬季,温度非常低,不利于猪的育肥,又制约着养猪业的发展。近年来,发酵床养猪模式的推广较好

地解决了两大问题:养猪生产对周边环境污染的问题和东北高寒地区温度对养猪的制约问题。但是,由于锯末作为发酵床垫料是对环境的又一项压力,且造价很高,因此,该研究设计了用稻壳、稻壳粉代替锯末,作为垫料原料,同时解决了水稻主产区农副产品垃圾污染。

1 材料与方法

1.1 材料

供试稻壳与稻壳粉为 7:3,EM 菌(来源:黑龙江省农业科学院畜牧研究所益康生物技术有限责任公司)。

1.2 方法

按比例将稻壳、稻壳粉混合,代替锯末填入建造好的深 50~70 cm 垫料池,垫料表面距地面 2~5 cm,按 0.5 L·m⁻² 接入菌种,调节垫料湿度 25%~30%。在此发酵床上养殖法系大白猪,监测期间,养殖密度为 1.1 m²·头⁻¹,养殖过程中测量了 2010 年较冷的连续 10 d 每天 5 个时间点的发酵床床面、发酵床舍内、舍外的温度。

收稿日期:2012-03-09

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-36)

第一作者简介:吴赛辉(1980-),男,河北省栾城县人,学士,研究实习员,从事畜牧科研工作。E-mail: wusaihuigzqy@163.com。

通讯作者:刘娣(1963-),女,吉林省四平市人,教授,博士生导师,从事分子生物学方面的研究。

experiment was conducted by adding cellulose degradation of composite performance screening from a group of cow dung and trichoderma viride on the pretreatment cotton stalk respectively. Crude enzyme liquid was extracted. The pretreatment cotton straw, which was pretreated with microwaves, ammonia water, alkali and microwaves, hydrogen peroxide and steam exploded, was decomposed by cellulase of *Trichoderma viride* more than cellulose degrading microbial flora. And others cellulose degrading microbial flora more than *Trichoderma viride*. Overall microwaves, ammonia water, alkali and microwaves, hydrogen peroxide, sulphuric acid pretreatment enzymolysis were better than others. Alkali and microwaves lose weight was the highest, 19.32%, and the rate of enzymolysis was the highest, 32.20%. Sulphuric acid pretreatment glycosylated ratio was the most of 18.20% and the highest convert ratio was 20.23%. Alkali and microwaves glucose yield was the highest, 1.013%.

Key words: pretreatment; cotton straw; cellulose complex enzyme; enzymatic hydrolyzation