

有机溶剂对秸秆蜡质层溶解和生物降解率的影响

钱玉婷^{1,2}, 常志州², 王世梅¹, 吴军伟^{1,2}, 徐 霄²

(1.南京农业大学资源与环境学院, 江苏 南京 210095; 2.江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:水稻或小麦秸秆表面均有蜡质层,它的存在是否影响微生物对秸秆的降解? 试验选用几种不同有机溶剂,并以传统的酸碱预处理方法为对照,以溶解水稻秸秆表层的蜡质,然后接种微生物,探讨秸秆蜡质层对秸秆微生物降解速率的影响。结果表明,用乙醚、氯仿、正己烷等3种有机溶剂对秸秆进行预处理后,生物降解速率明显提高,正己烷处理效果最佳,秸秆失重率为29.4%,比未处理样(24.3%)提高了21.0%;有机溶剂正己烷预处理秸秆的半纤维素、纤维素和木质素的降解率分别为50.4%、28.1%、27.8%,比对照分别提高了22.2%、20.8%、28.0%,但低于传统的碱预处理。结果表明秸秆蜡质层影响秸秆生物降解,如果将秸秆蜡收集利用与秸秆生物降解预处理相结合,可探索出一条秸秆综合利用与生物降解新途径。

关键词:秸秆;蜡质层;预处理;生物降解;有机溶剂

中图分类号:X712 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)05-1060-05

Effects of Organic Solvent on Epicuticular Wax Dissolution and Biodegradation of Rice Straw

QIAN Yu-ting^{1,2}, CHANG Zhi-zhou², WANG Shi-mei¹, WU Jun-wei^{1,2}, XU Xiao²

(1.College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Microbial degradation of straw may be affected by the epicuticular wax covered on straw surface. The influences of the pre-treatments with five organic solvents (ethanol, aether, methylbenzene, chloroform and n-hexane), and the traditional acid or alkali solution on the dissolution of the epicuticular wax before microbial inoculation and the biodegradation rate of rice straw after inoculating were investigated and compared. The effects of hydrolysis time and temperature on the removal of the epicuticular wax were also studied. The optimal hydrolysis time and temperature for pre-treatment were 3 hours under hydrolyzation temperature which was lower than it's boiling temperature. After the pre-treatments with aether, chloroform and n-hexane, the biological degradation rates of the straw increased obviously, with n-hexane pre-treatment being the best. The weight loss rate of straw treated by n-hexane was 29.4 %, and increased by 21.0 % compared with non-pretreatment. After pre-treatment with n-hexane, the average degradation rates of hemicellulose, cellulose and lignin were 50.4 %, 28.1 % and 27.8%, respectively, which increased by 22.2%, 20.8 %, 28.0%, respectively, compared with the control, but still lower than the traditional alkali pre-treatment. The results showed that the epicuticular wax could affect straw biodegradation. To explore a new method for comprehensive utilization and biodegradation of straw, the study on combining the collection and utilization of wax with straw pre-treatments using organic solvents before biological degradation is needed.

Keywords: rice straw; epicuticular wax; pre-treatment; biodegradation; organic solvent

天然植物纤维素原料主要由纤维素、半纤维素和木质素组成,结构非常复杂。由于木质素、半纤维素对纤维素的保护作用以及纤维素自身的晶体结构,使得木质纤维素形成致密不透水的高级结构,使酶制剂很难与纤维素接触,直接影响了秸秆的水解和发酵。因此,要充分利用纤维素类资源必须先对其进行有效的

预处理,预处理的效果直接影响着纤维素酶水解糖化的效果^[1-2]。

酸碱法是预处理过程中两种最为常见的处理方法,但是酸溶液作为反应介质会导致设备腐蚀、环境污染。尽管碱处理对原料的可降解性效果好,但在处理过程中有部分半纤维素被溶解,致使损失太多。此外,酸碱预处理同时还存在试剂的回收、中和、洗涤等问题,从而导致成本升高。秸秆表面存在着角质蜡状膜,这种蜡质一般由脂溶性的脂肪酸、烷烃、脂肪醇、醛类、酮类和酯类组成^[3],其是否阻碍了微生物进入秸

收稿日期:2008-08-01

作者简介:钱玉婷(1984—),女,江苏南通人,硕士研究生,研究方向为固体废物处理与资源化利用。E-mail:yutingqian2006@163.com

通讯作者:常志州 E-mail:czhizhou@hotmail.com

秆内部进行降解?本试验通过利用有机溶剂去除秸秆表层的蜡质,以原料失重率和木质纤维各组分的降解率作为衡量指标,考察了有机溶剂预处理对秸秆生物降解的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

秸秆取自江苏南京农村稻田秸秆,无霉变,无异味,去除稻秸叶、节、鞘,只取从稻穗根部往下 15 cm 长度的秸秆,剪成 1~2 cm 烘干后备用。稻秸成分分析如表 1。菌种来自本实验室所筛选的混合纤维素降解菌群。

表 1 稻草秸秆成分
Table 1 Straw components

半纤维素/%	纤维素/%	木质素/%	全 N/g·kg ⁻¹	全 P/g·kg ⁻¹	灰分/%
25.51	40.39	9.00	0.58	0.15	9.74

1.2 秸秆预处理

(1)酸预处理:加入浓度为 1%的 H₂SO₄, 105 ℃下水解反应 4 h。用碱中和至 pH 中性,60 ℃烘干至恒重,粉碎后备用^[4]。

(2)碱预处理:1.5%的 NaOH 常温下水解反应 24 h。其他同酸法处理。

(3)有机溶剂预处理:准确称取一定质量秸秆于 150 mL 三角瓶中,按体积比 1:6 加入各有机溶剂,密封后在常温下(30 ℃)溶解反应 3 h,取出秸秆置于通风橱,待有机溶剂完全挥发后,烘干至恒重,粉碎后备用。

选择的有机溶剂分别为乙醇、乙醚、甲苯、氯仿、正己烷,均为分析纯^[5-6]。预处理后,以秸秆失重率为指标,筛选预处理效果较好的溶剂,以水作为对照。

以正己烷为例,考察了预处理温度与时间对秸秆失重率的影响,温度设 20、30、40、50 及 60 ℃等 5 个不同温度,预处理时间为 3 h,在 60 ℃条件下,设置 1、2、3、4、5 h 等 5 个不同预处理时间。

1.3 生物降解试验

以经过酸、碱及有机溶剂预处理过的水稻秸秆为唯一碳源,按 1%的稻草秸秆量配置改良 PCS 培养基^[7] 95 mL,灭菌。将活化后培养 3 d 的复合菌群摇荡均匀后,按 5%的接种量同时接种到上述培养基中,作为 0 记时,37 ℃静止培养,每 24 h 分别测定发酵液的 pH 值、复合菌群的生长曲线及培养液中的纤维素降解酶活性,连续 10 d。抽滤得滤渣,烘干后,称重,计算经生

物降解后秸秆的失重率。同时测定经生物降解后秸秆的半纤维素、纤维素和木质素的降解率。每样品设置 3 个重复。

1.4 分析方法

预处理秸秆失重率测定:将经过有机溶剂预处理的水稻秸秆,过滤,然后将样品在 60 ℃下烘至恒重,计算处理后样品相对于处理前的重量损失。失重率=处理后样品的重量/未处理前样品的原重×100%。

pH 测定:pHs-25 型 pH 计测定。

OD 值测定:Spectrum lab 725s 分光光度计在波长 600 nm 条件下测定。

纤维素酶活性测定:采用 CMC 法^[8-11],使用仪器为 Spectrum lab 725s 分光光度计,定义 1 mL 酶底物反应液 1 min 产生相当于 1 mg 葡萄糖的还原糖量为 1 个酶活力单位(U)。

半纤维素、纤维素及木质素含量测定:采用 Van Soest 法^[12]。降解木质纤维素的降解率=(A/B)×100%^[13],式中:A 为半纤维素(或纤维素、木质素)的降解总量;B 为秸秆原样中半纤维素(纤维素、木质素)的总量。

数据整理与分析:采用 SPASS 11.5 统计分析软件进行试验方差分析。

2 结果与分析

2.1 有机溶剂的选择

经有机溶剂预处理,溶解了水稻秸秆中有机可溶物,秸秆的失重率均大于 1%(表 2),与对照相比,各处理差异达显著水平($P<0.05$),其中乙醚、氯仿、正己烷 3 种溶剂处理的效果较好,秸秆的失重率分别为 1.85%、1.96%、2.13%。由于秸秆中可溶性脂肪酸含量较少,从本试验结果可推断,有机溶剂去除的主要是蜡质等有机可溶性物,但这仍需要得到蜡质化合物分析结果的佐证。

表 2 不同有机溶剂预处理对秸秆失重的影响

Table 2 Different organic solvent pretreatment on the impact of weightlessness

溶剂名称	秸秆失重率/%
对照	0.02±0.01d
乙醇	1.12±0.11c
乙醚	1.85±0.07b
甲苯	1.20±0.12c
氯仿	1.96±0.06b
正己烷	2.13±0.06a

注:标有相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.2 有机溶剂预处理温度及时间对秸秆失重率的影响

秸秆的失重率随着反应温度的升高而增加(图1),这可能是因为水稻表面蜡质组分在低温条件下溶解度不高,提高反应的温度,使得蜡质组成成分的溶解度大幅度增加的缘故。但考虑到不同有机溶剂的沸点不同,因此,以后的试验中,有机溶剂的处理温度选择略低于各溶剂沸点的温度。秸秆失重率随着反应时间的延长而增加,3 h 之后,达到稳定,不再变化(图2),因此,在以后的试验中有机溶剂处理的时间选择3 h 为宜。

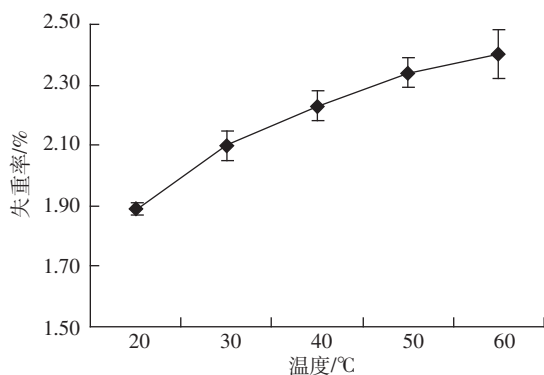


图1 温度对秸秆蜡质去除的影响

Figure 1 Effect of temperature on the removal of epicuticular wax

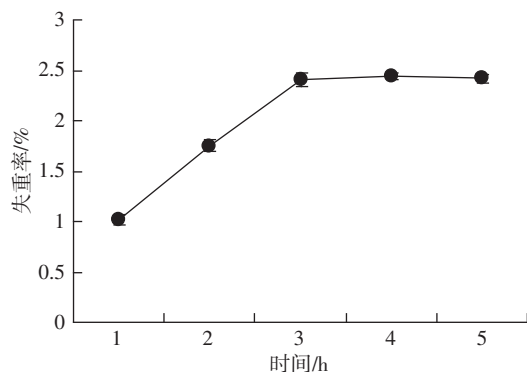


图2 水解时间对秸秆蜡质去除的影响

Figure 2 Effect of hydrolysis time on the removal of epicuticular wax

2.3 不同预处理对秸秆生物降解的影响

不同预处理样的初始 pH 值均为 6.4 左右(图3),但随后的 96 h 之内,逐步上升,最高可达 9.0,但各处理样的 pH 值的上升呈现一定的差异,经酸碱预处理的样其 pH 值低于其他处理,这可能是因为各溶剂对秸秆预处理的原理不同,使得处理后秸秆结构不同所致。酸解预处理在一定程度上破坏了纤维素和半纤维素及木质素的紧密结合,使得培养过程中菌群对纤维素的分解更为方便,产生的有机酸量相对于其他较

多。而有机溶剂预处理是去除了秸秆表层的蜡质,而蜡质的组成成分中含有显酸性的脂肪酸等^[14],这就使得反应开始时有机溶剂预处理的各样发酵液中的 pH 较高于空白样。120 h 时,各处理 pH 值变化基本一致且达到稳定,反应结束后,各培养液中的 pH 均维持在 8.5。这可能是因为混合菌群对 pH 的自我调节能力较强,培养较短时间后就能调节 pH 趋于中性,而当大部分纤维素降解后,可使 pH 稳定在 8.5 左右^[7]。

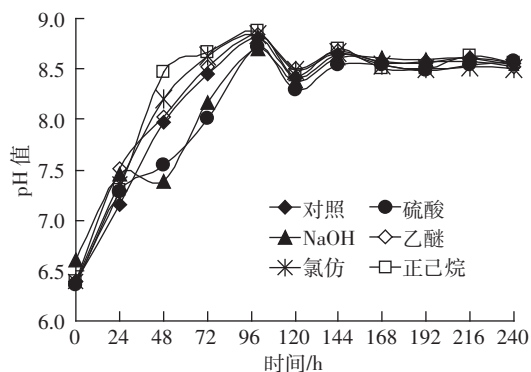


图3 培养液中 pH 变化情况

Figure 3 Variation of pH in the culture solution

由各处理样发酵液中菌体的生长曲线(图4)可见,在 0~96 h 内,菌体的生长量处于对数生长期,OD_{600nm} 急剧增加。此后生长缓慢,发酵液的 OD_{600nm} 值有所下降,但基本保持稳定。从图中可以看出,菌体在发酵前期的生长量很多,在第 48 h 发酵液中的菌体浊度就达到 0.8,72 h 时达到高峰,约为 1.0,此后也一直维持在 0.7 左右。经 NaOH 预处理的样其发酵液中的菌体浊度比其他各处理要高,这可能是由于 NaOH 预处理大大破坏了秸秆结构,使得菌体能够更好地利用秸秆碳源生长。

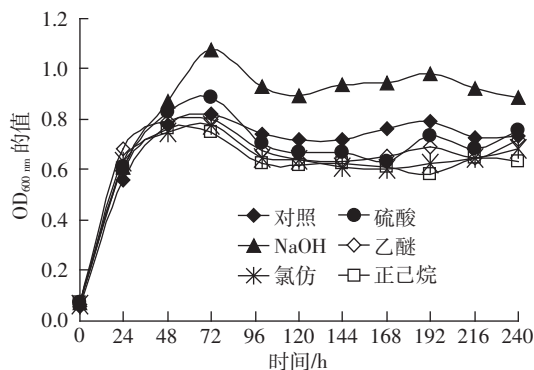


图4 培养液光密度(OD_{600nm})的变化

Figure 4 Change in optical density in the culture solution

图5为培养液中CMCase变化情况。各处理的变化规律基本一致,随着生长时间的增加,纤维素酶活性逐渐增加,酶活性最高峰出现在80 h左右,硫酸处理的酶活性最高,为 $180 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,其次为NaOH处理,酶活性最高为 $130 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,有机溶剂处理样和空白对照样酶活性差异不大,各组酶活性96 h之后逐渐下降。

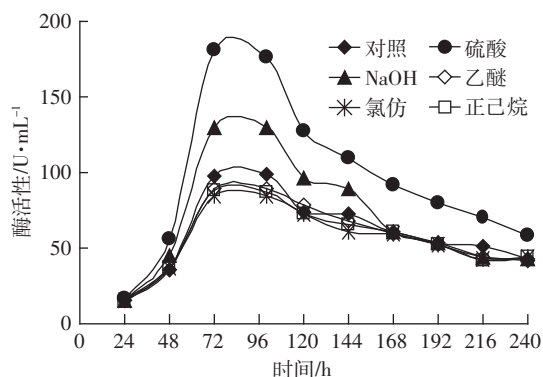


图5 培养液中酶活变化情况

Figure 5 Change in saccharification activity in culture solution

经生物降解后,各处理的秸秆失重率均高于对照(图6)。NaOH预处理后秸秆失重率明显高于其他处理,这是因为经碱作用后,秸秆中的纤维素结晶被破坏,木质素降解为小分子物质,此时秸秆容易被微生物作用分解。酸处理次之,经稀酸作用后,秸秆中的半纤维素水解为木糖^[15],此处的重量损失主要是由于半纤维素和纤维素的溶解所致。有机溶剂处理后秸秆失重率虽低于酸碱处理但高于未经过处理的对照组,而其中以正己烷的效果最好,失重率达29.4%,比未处理的样24.3%提高了21.0%。统计分析结果表明,各处理与空白之间的差异显著($P < 0.05$),正己烷与空白之间达到极显著差异($P < 0.01$),说明有机溶剂预处理对秸秆的生物降解率有一定的提高。

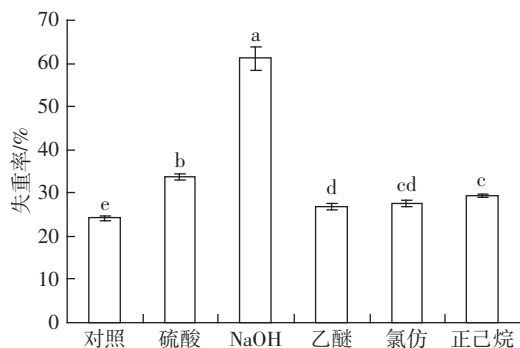


图6 各处理样品生物降解后的秸秆失重率

Figure 6 Weight loss of different samples after the biodegradable

分析测定了经生物降解后的对照和有机溶剂处理样中各化学组分含量的变化,相对于对照,各处理的物质纤维降解率都有所增加(图7)。尤以正己烷效果最为明显,其半纤维素、纤维素和木质素的降解率分别为50.4%、28.1%、27.8%,比对照组分别提高了22.2%、20.8%、28.0%,统计分析表明与对照差异极显著($P < 0.01$),说明秸秆经有机溶剂预处理后,比未经过处理的秸秆更容易被微生物降解。

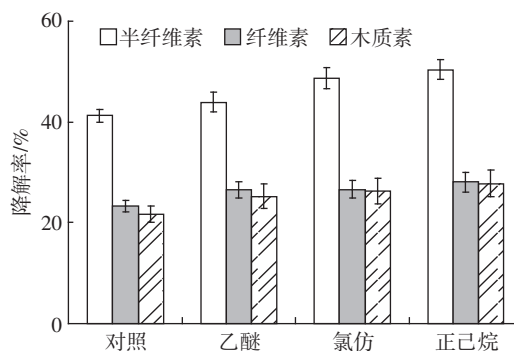


图7 经降解后样品中木质纤维各组分的降解率

Figure 7 Samples of wood fiber components of the degradation rate after the degradation

3 结论

生物降解试验结果表明,秸秆蜡质层一定程度上影响了秸秆的生物降解,采用有机溶剂预处理的方法,在一定程度上可以提高秸秆的生物可降解性,如果将秸秆蜡收集利用与秸秆生物降解预处理相结合,可探索出一条秸秆综合利用与生物降解的新途径。

参考文献:

- [1] 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:126-132.
CHEN Hong-zhang. Cellulose biotechnology [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing Company, 2005:126-132.
- [2] Lissens G, Thomsen A B, De Baere Luc, et al. Thermal wet oxidation improves anaerobic biodegradability of raw and digested biowaste[J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(12):3418-3427.
- [3] Kolattukudy P E. Biosynthetic pathways of cutin and waxes and their sensitivity to environmental stresses[C]//G Kerstiens. Plant cuticles. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996:83-108.
- [4] 常景玲, 李慧. 预处理对作物秸秆纤维素降解的影响[J]. 江苏农业科学, 2006(4):177-179.
CHANG Jing-ling, LI Hui. Influence of pretreatment on cellulose biodegradation of straw[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2006(4):177-179.
- [5] 连海兰, 周定国, 尤纪雪. 麦秸秆成分剖析及其胶合性能的研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(1):69-72.
LIAN Hai-lan, ZHOU Ding-guo, YOU Ji-xue. Studies on layer compos-

- ites of wheat stalk and their adhesion properties[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2005, 25(1):69-72.
- [6] 周小云, 陈信波, 徐向丽, 等. 稻叶表皮蜡质提取方法及含量的比较[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(3):273-276.
- ZHOU Xiao-yun, CHEN Xin-bo, XU Xiang-li, et al. On comparison of extraction methods of epicuticular wax and content of rice leaves[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2007, 33(3):273-276.
- [7] 费辉盈, 常志洲, 王世梅, 等. 常温纤维素降解菌群的筛选及其特性初探[J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(3):60-64, 69.
- FEI Hui-ying, CHANG Zhi-zhou, WANG Shi-mei, et al. Screening and characteristics of cellulose degrading microbial flora under a constant temperature[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2007, 23(3):60-64, 69.
- [8] 王琳, 刘国生, 王林蒿, 等. DNS法测定纤维素酶活力最适条件的研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 1998, 26(3):69-72.
- WANG lin, LIU Guo-sheng, WANG Lin-song, et al. The optimal conditions for cellulase activity measurement with DNA method[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science)*, 1998, 26(3):69-72.
- [9] 傅力, 丁友昉, 张箴. 纤维素酶测定方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(2):45-48.
- FU Li, DING You-fang, ZHANG Chi. Studies on methods for determination of cellulase activity[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2000, 23(2):45-48.
- [10] 房兴堂, 陈宏, 赵雪锋, 等. 秸秆纤维素分解菌的酶活力测定[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(4):628-630.
- FANG Xing-tang, CHEN Hong, ZHAO Xue-feng, et al. Determination of enzyme activity of straw cellulose-decomposing microorganisms[J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(4):628-630.
- [11] 包衍, 王晓辉, 张伟琼, 等. 纤维素分解菌的选育及酶活测定[J]. 生物学杂志, 2007, 24(2):56-58.
- BAO Kan, WANG Xiao-hui, ZHANG Wei-qiong, et al. Screening of cellulolytic microbes and determination of cellulase activity[J]. *Journal of Biology*, 2007, 24(2):56-58.
- [12] Goering H K, Van Soest P S. Forage fiber analysis USDA-ARS agric[M]. Washington: Gov Print, 1971:387-598.
- [13] 尤纪雪, 叶汉林, 童国林, 等. 白腐菌预处理对杨木化学制浆性能的影响[J]. 中国造纸, 2004, 23(3):12-15.
- YOU Ji-xue, YE Han-lin, TONG guo-lin, et al. Effect of white rot fungi phellinus pini pretreatment on the kraft pulping of populus[J]. *China Making-paper*, 2004, 23(3):81-85.
- [14] R J Hamilton. Waxes:chemistry, molecular biology and functions[J]. *The Oil Press, Dundee*, 1995, 99:131-155.
- [15] Jose G, Savoie J M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14:513-519.