

# 预处理对棉籽壳酶解特性和微观结构的影响

## Influence of properties and microstructure by different pretreatment of cotton seed hull enzyme solution

侯丽芬<sup>1</sup> 孙向阳<sup>2</sup> 丁长河<sup>3</sup>

HOU Li-fen<sup>1</sup> SUN Xiang-yang<sup>2</sup> DING Chang-he<sup>3</sup>

(1. 郑州旅游职业学院, 河南 郑州 450009; 2. 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450011;  
3. 河南工业大学, 河南 郑州 450052)

(1. Zhengzhou Tourism College, Zhengzhou, Henan 450009, China; 2. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan 450011, China; 3. Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**摘要:**以棉籽壳为原料, 研究稀酸、先碱后酸、稀碱和碱性  $H_2O_2$  4 种预处理方法对棉籽壳酶解特性和微观结构的影响。结果表明: 4 种预处理方法对棉籽壳酶解特性和微观结构均有不同程度的影响, 其中碱性  $H_2O_2$  效果最好。碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳, 木质素含量分别降低了 67.5%; 酶解 12 h 的木聚糖提取率为 21.4%; 木聚糖的水解率为 67.5%, 且酶解得到的木二糖较多; 同时, 扫描电镜分析显示碱性  $H_2O_2$  预处理后的棉籽壳纤维结构清晰、疏松。

**关键词:**棉籽壳; 预处理; 木质素; 木聚糖; 酶解; 微观结构

**Abstract:** With cotton seed hull as raw material, the influence was studied about the enzymatic properties and microstructure of cotton-seed hull by four pretreatment methods of the dilute acid, acid pretreatment after alkali, alkali and alkaline  $H_2O_2$ . The results showed that the lignin content of cotton seed hull by the pretreatment method of alkaline  $H_2O_2$  was decreased by 67.5%; the rate of xylan extraction about enzymatic hydrolysis for 12 hours was 21.4%; and more Xylobiose was obtained; at the same time, the microscopic structure appeared clear and loose.

**Keywords:** cotton seed hull; pretreatment; Lignin; Xylan; enzymatic hydrolysis; microstructure

进入本世纪以来, 中国的棉花年产量从 400 万 t 逐步跃升到 500,600 万 t, 据农业部估算, 2013 年国内棉花产量约为 630 万 t<sup>[1]</sup>。在获得大量棉花的同时也得到了极其可观的棉籽壳, 目前棉籽壳除少量进行初加工外, 绝大部分作为农家燃料被烧掉, 并未得到充分的利用, 既浪费了资源又污染了

环境。棉籽壳中含有 22%~28% 的半纤维素<sup>[2]</sup>, 是一种极其重要的可再生资源。半纤维素主要分为三类, 即聚木糖类、聚葡萄糖甘露糖类和聚半乳糖葡萄糖甘露糖类。若能利用生物酶解技术将大量廉价的棉籽壳制备成高附加值的低聚木糖产品, 不仅适合于肥胖症、糖尿病、高血压、动脉硬化、龋齿患者食用, 还可为中国棉籽壳资源的综合利用创造新的亮点, 变废为宝, 产生重要的经济、社会和生态效益。因此, 开展对以棉籽壳为原料, 生产低聚木糖的研究是十分必要的<sup>[3,4]</sup>。

在自然状态下, 纤维素结构致密, 纤维素、半纤维素和木质素交联在一起, 纤维素酶与纤维素的接触面积大大降低。破坏木质素保护层和改变纤维素的晶体结构, 有利于促进纤维素的酶解<sup>[5,6]</sup>。常用的预处理方法包括物理法、化学法、生物法以及 3 种方法的综合利用<sup>[7,8]</sup>。艾志录<sup>[9]</sup>报道了稀碱法预处理玉米芯, 其木质素含量降低了 54.1%; Gould<sup>[10]</sup>也报道了碱性  $H_2O_2$  预处理麦秆除去了一半以上的木质素; 而对于棉籽壳的研究未见有关文献报道。本研究拟利用廉价的棉籽壳为原料, 分别采用稀酸、先碱后酸、稀碱和碱性  $H_2O_2$  4 种预处理方法处理棉籽壳, 考察预处理后棉籽壳木质素去除率和酶解效果, 并通过扫描电镜探讨预处理方法对棉籽壳微观结构的影响, 旨在为棉籽壳预处理技术及其酶解糖化提供技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与设备

棉籽壳: 产地河南省郑州郊区, 带有绒毛经过粗粉碎(其主要成分见表 1);

**基金项目:**河南省杰出人才创新基金资助项目(编号:0621000900)

**作者简介:**侯丽芬(1978—), 女, 郑州旅游职业学院讲师, 硕士。

E-mail: houlf005@163.com

**通讯作者:**丁长河

**收稿日期:**2014-08-26

表1 棉籽壳原料的成分

Table 1 Cottonseed hull ingredients %

成分	木聚糖	木质素	水分	灰分
含量	12.1	17.4	9.2	3.4

木聚糖酶:优级纯,丹麦 Novozymes 公司;  
 3,5-二硝基水杨酸:分析纯,天津市化学试剂厂;  
 乙腈:分析纯,天津华东试剂厂;  
 硫酸、氢氧化钠:化学纯,洛阳化学试剂厂。  
 硅胶板:Gel Plate F 254 型,德国 Merck 公司;  
 紫外可见分光光度计:UV-2000 型,上海尤尼柯有限公司;  
 扫描电子显微镜:Amray-1000B 型,中国科学院科学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 预处理方法

(1) 酸法预处理:称取一定量的原料棉籽壳,加入 10 倍体积的 0.15% 稀硫酸溶液,在 70 °C 浸泡 12 h,然后水洗至 pH 值 5.0 左右,在 125 °C 蒸煮 2 h。

(2) 先碱后酸预处理:称取一定量的原料棉籽壳,加入 10 倍体积的 1.0% 的 NaOH 溶液,70 °C 条件下浸泡 12 h,110 °C 下预煮 90 min,然后用 0.15% 稀硫酸溶液调 pH 值到 4.0 左右,在 125 °C 蒸煮 2 h。

(3) 稀碱预处理:称取一定量的原料棉籽壳,加入 5.5 倍的 2.0% NaOH 溶液,在室温下浸泡 10~14 h。

(4) 碱性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理:称取一定量的原料棉籽壳,加入 10 倍体积 2.0%,pH 值 11.5(4 M NaOH 调)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,在室温下浸泡 12~14 h。

经上述预处理之后,用清水洗至洗出液呈中性,烘干,待用。

1.2.2 木质素含量的测定方法 根据文献[9]。准确称取样品 1.000 g,用定性滤纸包好,放入索氏抽提器中,加入醇苯混和液(乙醇:苯=1:1,V/V)100 mL 于水浴上抽提 6~8 h,取出滤纸包风干,并用洁净毛刷将包中试样刷入 500 mL 干燥烧杯中,加入 10 mL 沸蒸馏水,10 min 后将烧杯置于冷水中,搅拌,加入 25 mL 86% 硫酸溶液,18~22 °C 水浴中保持 4 h,浸入冷水浴 15 min,用预先恒重的古氏甘锅抽滤,用 70 °C 蒸馏水洗涤至洗液用 10% BaCl<sub>2</sub> 溶液测试不出混浊为止,吸干滤纸,取下坩锅,用蒸馏水将外壁吹洗干净,移入烘箱,105 °C 烘干至恒重,记录重量(G<sub>1</sub>)。将该甘锅移入马福炉,500~550 °C 灼烧 0.5 h,再在 105 °C 烘干恒重,记录重量(G<sub>3</sub>)。

$$C_L = \frac{(G_1 - G_3) \times 100}{G_2 \times (100 - W)} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C<sub>L</sub>——木质素含量,%;

G<sub>1</sub>——恒重后甘锅连同残渣重,g;

G<sub>2</sub>——样品棉籽壳重,g;

G<sub>3</sub>——灼烧后甘锅连同灰分重,g;

W——样品中棉籽壳粉含水量,g。

1.2.3 样品中木聚糖含量的测定 用地衣酚—盐酸法<sup>[11]</sup>测定总糖含量(mg/mL),按式(2)计算木聚糖含量。

$$C_X = \frac{C_T \times 250 \times 0.88}{500} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C<sub>X</sub>——木聚糖含量,mg/mL;

C<sub>T</sub>——测定总糖含量,mg/mL。

1.2.4 木聚糖的提取率和水解率的测定 原料棉籽壳和预处理后的棉籽壳与柠檬酸缓冲液固液比 1:20(m:V),加酶量为固体的 3%,50 °C 条件下,摇床中反应,分别取 0,3,6,12 h 的反应液用地衣酚—盐酸法测定木聚糖的提取率。

$$R_X = \frac{C_H \times 0.88}{C_X} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R<sub>X</sub>——木聚糖的水解率,%;

C<sub>H</sub>——酶解后所测得溶液中的木聚糖含量,mg/mL;

C<sub>X</sub>——原料中木聚糖含量,mg/mL。

1.2.5 还原糖的测定 采用 DNS 法<sup>[12]</sup>。

1.2.6 糖液中的组分确定方法 薄层层析法(TLC)<sup>[13]</sup>。不同预处理方法得到的样品经木聚糖酶(加酶量相对原料 3%)酶解 6 h 后的 TLC 成分分析(上样量 1.4 μL)。

1.2.7 扫描电镜观察样品微观结构 原料棉籽壳和预处理后的棉籽壳用微型粉碎机磨碎,过 200 目筛取筛上物,颗粒大小 0.5 mm 左右。样品经过离子溅射喷金装置处理后,置于扫描电镜上观察。

2 结果与讨论

2.1 预处理方法对于木质素含量的影响

由图 1 可知:4 种预处理方法不同程度地脱除了木质素,其中碱性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理后的棉籽壳木质素含量大幅降低。这是由于木质素的结构单元是苯丙烷,同时确认了在苯环上具有甲氧基存在<sup>[14]</sup>;另外,木质素的分子结构中存在着芳香

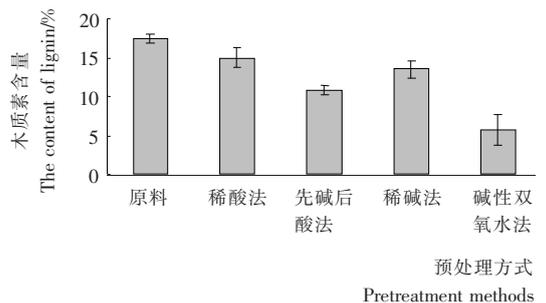


图 1 4 种预处理方法对棉籽壳中木质素的影响

Figure 1 Effect of pretreatment methods

on lignin cottonseed hull

基、酚羟基、醇羟基、羰基、甲氧基、羧基、共轭双键等活性基团,可以进行氧化、还原、水解、醇解、酸解、光解、酰化、磺化、烷基化等许多化学反应<sup>[15]</sup>。因此,不同的预处理方法会与原料中的木质素发生不同的反应,去除木质素的程度不同。碱性  $H_2O_2$  中的  $H_2O_2$  得到了活化,增加了脱除木质素的效果。碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳去除木质素效果较好。

## 2.2 原料预处理后的酶解效果比较

由图 2 可知:棉籽壳木聚糖提取率随着时间的延长而增加,酶解 12 h 的木聚糖提取率(对棉籽壳)分别为 0.5%(原料),10.0%(稀酸处理),17.6%(先碱后酸处理),12.9%(稀碱处理),21.4%(碱性  $H_2O_2$  处理);木聚糖的水解率(对原料木聚糖)分别为 4.5%,49.2%,60.1%,42.8%,67.5%(预处理顺序同上)。

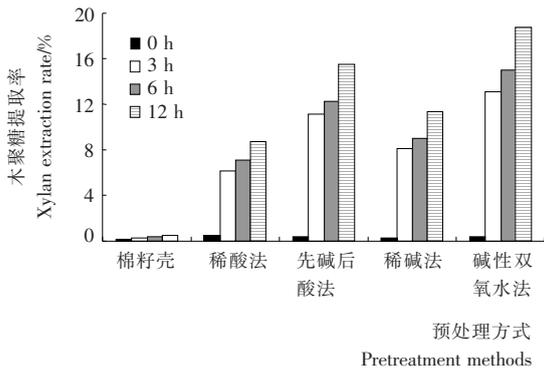


图 2 棉籽壳及各种预处理后棉籽壳酶解 0,3,6,12 h 的木聚糖提取率

Figure 2 Cottonseed shell and various pretreatment cottonseed shell enzyme 0 h, 3 h, 6 h, 12 h of xylan extraction rate

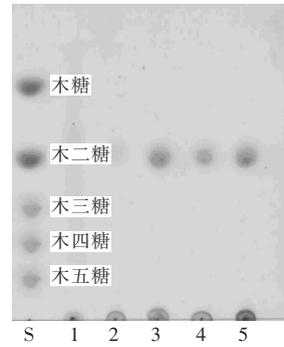
无论是木聚糖提取率还是水解率,碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳所得到的结果都比较高。这可能是因为木质素被认为是阻碍糖化酶与底物反应的主要物理障碍,碳水化合物的酶解程度和酶解速率与原料中的木质素含量有一定的正相关性的原因<sup>[16,17]</sup>。

## 2.3 TLC 成分分析

图 3 中除了木二糖和少量的木糖之外基本上没有发现其他糖类,而本研究所用的木聚糖酶不含有降解其他多糖类的活性,可见各种预处理过程中已经将大部分可溶性糖除去了。从图 3 中还可以看出:棉籽壳先碱后酸和碱性  $H_2O_2$  处理样品酶解得到的功能性成分木二糖较多,由于经过先碱后酸处理和碱性  $H_2O_2$  预处理后的棉籽壳脱除了较多的木质素,还大大减少了底物与木聚糖酶的空间障碍,从而更加有利于木聚糖酶的水解。

## 2.4 不同预处理后棉籽壳扫描电镜微观结构

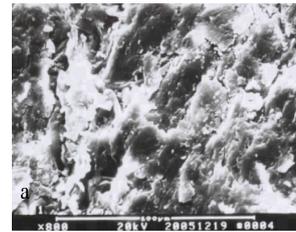
由图 4 可知:未经处理的棉籽壳结构致密,没有孔洞;但经过几种预处理后的棉籽壳表面和内部结构都发生了很大的变化。从表面的 SEM 图可以看出,先碱后酸预处理后棉



s. 低聚木糖标准 1. 原料棉籽壳 2. 稀酸预处理棉籽壳 3. 先碱后酸预处理棉籽壳 4. 稀碱预处理棉籽壳 5. 碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳

图 3 各种处理后棉籽壳酶解 6 h 的 TLC 薄层层析

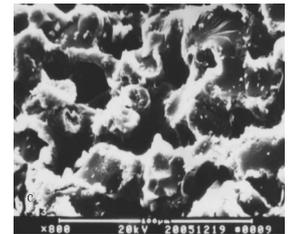
Figure 3 TLC thin layer chromatography cottonseed hull after various processing enzyme 6 h



(a) 原料棉籽壳的超微结构( $\times 800$ )



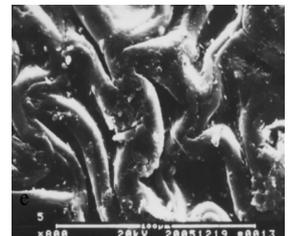
(b) 稀酸预处理棉籽壳的超微结构( $\times 800$ )



(c) 先碱后酸预处理棉籽壳的超微结构( $\times 800$ )



(d) 稀碱预处理棉籽壳的超微结构( $\times 800$ )



(e) 碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳的超微结构( $\times 800$ )

图 4 原料棉籽壳和预处理后的棉籽壳的扫描电镜图

Figure 4 SEM cottonseed shell raw cotton seed hull and after pretreatment

籽壳的整个纤维结构被破坏了,出现了较深、较大的孔洞;碱性  $H_2O_2$  预处理后的棉籽壳出现了较为清晰的纤维结构,有很多比较畅通的缝隙,碎屑基本脱除,结构变得很疏松。这与前面的木质素脱除程度也是相一致的。这无疑会在消除

了木质素屏蔽效应的同时大大增加酶与底物的接触面积,从而有利于棉籽壳的酶法水解。此研究未见到相关的报道。这为探索适合棉籽壳的预处理方法提供了研究基础。

### 3 结论

本研究以棉籽壳为原料,研究了稀酸、先碱后酸、稀碱和碱性  $H_2O_2$  4种预处理方法对棉籽壳酶解特性和微观结构的影响。试验结果证实,4种方法预处理棉籽壳在脱除木质素、微观结构和酶解效果方面均有不同程度的影响。其中,碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳酶解糖化效果较为理想。此方法预处理棉籽壳制取低聚木糖尚未见相关的报道。关于碱性  $H_2O_2$  预处理棉籽壳最佳工艺条件的研究应作为下一步研究的重点,以便为棉籽壳等廉价农副产品的高附加值转化提供依据。

#### 参考文献

- 翟雪玲,张雯丽,李冉. 未来10年中国棉花发展趋势分析[J]. 农业展望,2014(8):8~11.
- 王海,李里特. 用玉米芯酶法制备低聚木糖[J]. 食品科学,2002,23(5):81~83.
- 包怡红,李雪龙. 木聚糖酶在食品中的应用及其发展趋势[J]. 食品与机械,2006,22(4):130~133.
- 魏长庆. 利用农业废弃棉籽壳生物法制备功能性低聚木糖[D]. 石河子:石河子大学,2008.
- 杨培周,姜绍通,郑志. 草坪草糖化及发酵生产燃料乙醇[J]. 农业工程学报,2011,27(1):143~146.
- Saha C, Loren B. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(3): 816~822.
- 赫桂丹. 高电压脉冲电场白酒快速催陈的研究[D]. 长春:吉林大

学,2004.

- 彭长华,张清文. 过氧乙酸测定方法的改进[J]. 中国卫生检验杂志,2000,10(2):205~206.
- 艾志录. 橄榄绿链霉菌 E-86 木聚糖酶的固定化及低聚木糖制备研究[D]. 北京:中国农业大学,2004.
- Gould J M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1984, 26: 46~52.
- 李昊力,李家林,张雪飞. 地衣酚——盐酸法测定燕麦  $\beta$  葡聚糖中的戊聚糖含量[J]. 广东化工,2014,41(17):179~180.
- Lambert LA, Hines FA, Eppley RM, et al. Lack of initiation and promotion potential of deocynivalenol for skin tumorigenesis in semcar mice[J]. Food Chemistry Toxicology, 2005, 33(3): 217~222.
- Jiang Zheng-qiang, Deng Wei, Zhu Yun-ping, et al. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications[J]. Mol Cat B Enzymatic 2004, 27:207~213.
- 中野準三. 木质素的化学—基础与应用[M]. 李忠正,高洁,译. 北京:中国轻工业出版社,1988.
- 刘程. 表面活性剂应用大全[M]. 北京:北京工业大学出版社,1992.
- Lequart C, Nuzillard JM, Kurek B, et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides[J]. Carbohydrate Research, 1999, 319: 102~111.
- Zillox C, Debeire P. Immunolocalization of a purified xylanase during hydrolysis of wheat straw stems[J]. International Journal of Plant sciences, 1997, 158: 769~777.

(上接第18页)

低温条件下淀粉乳中盐溶液的溶解度、 $H^+$ 浓度共同作用的结果。研究不足之处在于未能从不同酸性条件下和不同盐浓度条件下对淀粉的耐酸耐盐性做进一步的研究。

#### 参考文献

- 潘伟明. 糯玉米生产现状及其产品开发进展[J]. 广东农业科学, 2010(6):155~156.
- 高卫帅,张燕萍,徐海娟. 3种玉米淀粉的性质比较[J]. 食品与发酵工业,2007,33(9):65~66.
- 赵伟,李红利,段莹莹. 羟丙基糯玉米淀粉的制备及其性质的研究[J]. 粮食与饲料工业,2011(9):28.
- 徐忠,赵丹. 羟丙基淀粉制备的影响因素及性能研究[J]. 农产品加工,2011(5):7.
- 张运艳,张晖,姚惠源,等. 冻融稳定型羟丙基—磷酸单酯糯玉米淀粉的制备工艺研究[J]. 食品工业科技,2008,29(5):235~240.
- 张继良. 交联羟丙基复合变性淀粉制备及性能研究[D]. 沈阳:沈

阳工业大学,2005.

- 羟丙基糯玉米淀粉  $POCl_3$  交联复合变性条件的研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(2):45~48.
- 张友松. 变性淀粉生产与应用手册[M]. 第一版. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- 刘松青,杨婉身,张祖民,等. 马铃薯羟丙基淀粉的制备及理化特性研究[J]. 食品科技,2008(2):133.
- 皱建,刘亚伟,郑岩. 交联羟丙基木薯淀粉性质研究[J]. 食品科学,2006,27(9):80~81.
- 曹余,韩舜愈,吴隆民,等. 小麦羟丙基淀粉的制备及其特性研究[J]. 粮食加工,2012,37(5):49~50.
- 黄强,罗发兴,张嘉诚. 交联复合变性对马铃薯淀粉糊黏度性质的影响[J]. 现代食品科技,2007,23(8):26~28.
- 皱建,刘亚伟,方桂红,等. 交联作用对合成交联羟丙基玉米淀粉的影响[J]. 粮食与饲料工业,2006(2):21~22.
- 张燕萍,周世英,樊文洵. 食用羟丙基二淀粉磷酸酯的制备及应用[J]. 粮食与饲料工业,1998(12):40~41.