

稀酸水解玉米皮制备丁二酸发酵糖液的研究*

姜 岷,姚嘉旻,吴 昊,万永敏,陈可泉,孙娜娅,于 丽

(南京工业大学制药与生命科学学院,江苏 南京,210009)

摘 要 研究了稀酸水解玉米皮制备丁二酸发酵糖液的工艺条件,通过正交试验及优化调整得到稀酸水解玉米皮的优化工艺条件:水解温度 110℃、加酸量 1%、粒径 20~40 目、反应时间 90 min,总糖收率 90.37%,总糖浓度 85g/L。其糖液经活性炭脱色,脱色率达 92.27%,脱色的总糖损失率低于 5%,糠醛含量仅为 0.236g/L。经厌氧发酵实验初步验证,玉米皮水解液可替代葡萄糖作为丁二酸发酵的碳源。

关键词 玉米皮,酸水解,丁二酸,发酵

随着石油、天然气、煤炭等石化资源的日益枯竭,生物质资源以其储量丰富、可再生等优势,将成为一种重要的替代资源^[1]。玉米皮是玉米深加工过程的副产物,占玉米籽粒质量的 10%~14%,主要成分为淀粉、半纤维素及纤维素^[2]。目前我国玉米皮利用率较低,只有部分被用作饲料^[3],是一种潜在的廉价生物质资源。丁二酸又称琥珀酸,是一种重要的化工原料,在医药、食品、化工等行业具有广泛的用途,目前一些高产丁二酸的菌株,可以利用葡萄糖、木糖等作为碳源^[4]。因此,如能利用玉米皮水解生成的葡萄糖、木糖的混合糖液作为碳源,用于厌氧发酵制备丁二酸,将有效减少丁二酸发酵碳源对淀粉类原料的依赖性,并可降低原料成本。

纤维素类生物质的水解工艺^[5],一般可分为酸水解法和酶水解法。酶法具有水解条件温和、不产生抑制物的特点,但目前高效纤维素酶的成本昂贵、水解周期长,制约了该工艺的推广。酸水解法又分为浓酸水解法和稀酸水解法,浓酸水解对设备要求很高,并且浓酸的分离增加了工艺复杂性和生产成本;而稀酸水解工艺简单、酸用量少、成本较低。

实验以玉米皮为原料,对稀酸水解玉米皮制备丁二酸发酵糖液的工艺条件进行了研究,制备出高品质的糖液,并对其替代葡萄糖作为丁二酸发酵碳源进行了初步验证。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

第一作者:博士,副研究员。

* 国家高技术发展计划“863”(No. 2006AA02Z235),国家自然科学基金资助(No. 20606017),国家自然科学基金重点项目(No. 20336010),江苏省高校自然科学研究计划(No. 05KJB180043)资助

收稿日期:2007-05-11

1.1.1 仪器

752 型紫外可见分光光度计,上海启威电子有限公司;SBA-40C 型生物传感分析仪,山东省科学院生物研究所研制;高效液相色谱仪(426 HPLC pump, Alltech; UVIS2201, LINEAR; Prevail C18, Alltech; Waters HPLC 2010 工作站)。

1.1.2 原料

玉米皮,山东正德食品有限公司提供(淀粉 15.37%,半纤维素 31.64%,纤维素 21.70%,木质素 3.60%,蛋白质 9.94%,灰分 5.42%,水分 9.60%,按参考文献[6]中提供的方法测定);糖用活性炭、酵母膏、玉米浆为工业级;H₂SO₄、HCl、乙腈均为化学纯试剂;DNS 显色液按文献[7]中的方法配制备用。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

取干燥的玉米皮粉碎后备用,粒径为 20~100 目不等。

1.2.2 稀酸水解玉米皮制备糖液及发酵制备丁二酸的研究

将粉碎好的玉米皮,按一定料液比配制成反应液,反应后,真空抽滤,并用少量热水洗涤滤饼、合并至滤液。在确定水解用酸、料液比的基础上,通过正交试验探讨用酸量、粒径、反应时间和水解温度对玉米皮水解液中总糖收率的影响,优化玉米皮稀酸水解的工艺条件,并对水解糖液进行脱色精制,并对玉米皮水解糖液替代葡萄糖用于厌氧发酵制备丁二酸的可行性进行验证。

1.2.3 总糖、糠醛及丁二酸含量的测定方法

按文献^[8~10]方法分别测定玉米皮水解液中的总糖、糠醛以及发酵液中的丁二酸含量。

1.2.4 色度的检测

精确移取 1 mL 待测液,在比色管中稀释至 10 mL,在 $\lambda = 520\text{nm}$ 下测定其吸光度 A ,脱色率的定义:

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为未经脱色的玉米皮水解液的吸光度; A 为脱色后的玉米皮水解液的吸光度。

1.2.5 总糖收率

$$\text{总糖收率}/\% = \frac{G}{G_0} \times 100$$

式中: G 为玉米皮经稀酸水解得到的实际总糖含量; G_0 为玉米皮中淀粉和半纤维素经稀酸完全水解后得到的总糖理论含量。

1.2.6 总糖损失率

$$\text{总糖损失率}/\% = \frac{S}{S_0} \times 100$$

式中: S 为经脱色后的玉米皮水解液中总糖含量; S_0 为未经脱色的玉米皮水解液中总糖含量。

2 结果与分析

2.1 稀酸水解的用酸选择

选取 HCl 和 H_2SO_4 作为实验水解用酸。由表 1 可知,在相同 $C_{[\text{H}^+]}$ 情况下, H_2SO_4 与 HCl 的水解总糖收率相近,而 H_2SO_4 的用量仅为 HCl 的 1/3,故选取 H_2SO_4 作为玉米皮的水解用酸为宜。

表 1 酸的种类对玉米皮水解液的总糖得率的影响

酸的种类	酸的用量 /%	摩尔浓度 /mmol · (100mL) ⁻¹	总糖收率 /%
H_2SO_4 (98%)	0.5	9.20	92.52
HCl (36.5%)	1.55	18.40	95.54

2.2 稀酸水解玉米皮的料液比选择

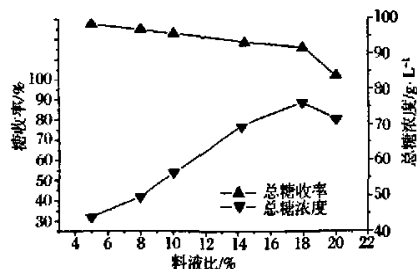


图 1 料液比对玉米皮水解液的总糖收率的影响

由图 1 可知,玉米皮稀酸水解的料液比小于 8% 时,其得到的总糖浓度很低;而料液比在 8%~18%,总糖浓度随着料液比递增而迅速增大,料液比为

18% 时达到最大值;但当料液比超过 18% 时,总糖浓度又出现显著下降,其原因是在较高料液比情况下,随着料液比的增加,反应体系中未被降解的纤维素含量显著增加,在固液分离时形成的滤饼层逐渐增厚,对还原糖的吸附量显著增加,总糖浓度呈减少趋势。同时,料液比在 5%~18%,水解液的总糖收率变化不大,而料液比超过 18% 时,滤液中的总糖浓度明显降低。因此,从总糖浓度和总糖收率两者角度考虑,选择料液比为 18% 较为适宜。

2.3 稀酸水解工艺条件的确定

以加酸量、粉碎粒径、水解温度和反应时间为考察因素,设计 $L_{16}(4^4)$ 正交实验对稀酸水解玉米皮的总糖得率进行研究,实验方案见表 2,实验结果见表 3。

表 2 正交实验因素水平

水平	因素			
	(A) 加酸量 /%	(B) 粒径 /目	(C) 水解温度 /℃	(D) 反应时间 /min
1	0.30	20~40	90	50
2	0.50	40~60	100	75
3	0.75	60~80	110	100
4	1.00	80~100	121	120

表 3 正交实验结果及极差分析

实验号	因素				总糖收率 /%
	(A) 加酸量 /%	(B) 粒径 /目	(C) 水解温度 /℃	(D) 反应时间 /min	
1	0.30	20~40	90	50	9.18
2	0.30	40~60	100	75	19.14
3	0.30	60~80	110	100	37.63
4	0.30	80~100	121	120	83.20
5	0.50	20~40	100	100	23.21
6	0.50	40~60	90	120	16.98
7	0.50	60~80	121	50	80.20
8	0.50	80~100	110	75	39.93
9	0.75	20~40	110	120	66.83
10	0.75	40~60	121	100	91.84
11	0.75	60~80	90	75	16.28
12	0.75	80~100	100	50	21.61
13	1.00	20~40	121	75	91.73
14	1.00	40~60	110	50	56.29
15	1.00	60~80	100	120	43.93
16	1.00	80~100	90	100	26.13
K_1	37.29	47.74	17.14	41.82	
K_2	40.08	46.06	26.97	41.77	
K_3	49.14	44.51	50.17	44.70	
K_4	54.52	42.72	86.74	52.74	
极差	17.232	5.019	69.601	10.965	
优化方案	A_4	B_1	C_4	D_4	

分析表3,影响玉米皮稀酸水解总糖收率的因素依次为:水解温度>加酸量>反应时间>粒径,通过极差分析可知,较高的水解温度和加酸量有利于破坏玉米皮的组织结构,是玉米皮水解的关键因素;玉米皮粒径越小,水解总糖收率越低,这可能是玉米皮粒径越小,其颗粒比表面积越大,有利于其表面吸附^[11],纤维素颗粒对糖分吸附增加,导致总糖损失率增加。通过正交实验确定的玉米皮水解工艺为:粒径20~40目、加酸量1.0%、酸解温度121℃、水解时间2h。经实验验证,该工艺条件下的总糖收率达92.52%,但水解液呈浑浊的黑褐色。

2.4 水解工艺条件的调整

通过正交实验确定了玉米皮水解的工艺条件,但长时间高温酸水解会发生美拉德等显色反应,产生大量色素;同时在高温水解过程中,木糖、葡萄糖往往易降解成糠醛等产物,对微生物发酵有一定抑制作用^[6],因此,在正交实验的基础上对反应温度、加酸量和水解时间进行调整,以达到既能保持水解总糖收率又能减少色素和糠醛等有害物质产生的目的。

2.4.1 水解温度的调整

表4 水解温度对总糖得率的影响

反应温度/°C	105	110	115	121
总糖收率/%	86.95	91.33	91.97	92.52

由表4可知,玉米皮稀酸水解的反应温度低于

表5 两种工艺条件下的水解结果对比

水解工艺类型	水解工艺条件				总糖收率/%	总糖浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	色度 $\text{OD}_{520\text{nm}}$	糠醛含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
	反应温度/°C	水解时间/min	用酸量/%	粒径/目				
A	121	120	1	20~40	92.52	87	0.560	2.991
B	110	90	1	20~40	90.37	85	0.440	0.665

与原工艺A相比,水解工艺B的反应温度降低9.1%,水解时间缩短25%,色素含量减少21.4%,糠醛含量减少77.67%。经实验验证,该优化工艺下稀酸水解玉米皮的总糖得率可达90.37%,总糖浓度约为85g/L,糠醛含量仅为0.665g/L。因此,本文确定的稀酸水解玉米皮的优化工艺条件为:粒径20~40目、加酸量1.0%、水解温度110℃、反应时间90min。

为了进一步提高玉米皮水解糖液的品质,本文对糖液进行了脱色精制,脱色条件为1%糖用活性炭、脱色温度30℃、脱色时间30min,脱色率达92.27%,糖液呈浅黄透明状,有害物质糠醛含量仅为0.236g/L,总糖脱色损失低于5%。

110℃时,其总糖收率低于88%,而水解反应温度升至110℃时,总糖收率上升至91.33%,之后再提高反应温度,总糖收率没有显著的增加,所以选用110℃作为水解反应温度较适宜。

2.4.2 加酸量与反应时间的调整

实验中发现,加酸量与反应时间关系密切:加酸量减少,反应时间要相对延长;加酸量增加,反应时间可相对缩短。但酸的加入量也不可过高,否则将会对设备产生严重的腐蚀,增加糖液中的盐类和金属离子的浓度,对微生物发酵不利。

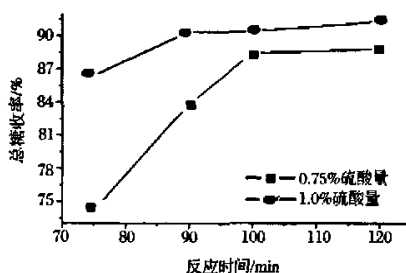


图2 加酸量和反应时间对总糖得率的影响

从图2可知,1.0%加酸量的水解总糖收率优于0.75%加酸量的水解收率。当反应时间超过90min,1.0%加酸量的总糖收率无显著增加,故将反应时间由120min调整至90min,将正交实验确定的水解工艺条件(A)和调整后的水解工艺条件(B)的水解结果进行对比,见表5。

2.5 利用玉米皮水解液替代葡萄糖作为碳源发酵制备丁二酸的初步研究

实验室已筛选出1株产丁二酸的放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*) NJ113,可同时利用葡萄糖和木糖进行发酵。分别以经脱色精制的玉米皮水解液和葡萄糖作为发酵碳源,与其他培养基营养成分(酵母膏10g/L,富马酸二钠1g/L, KH_2PO_4 3g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/L, CaCl_2 0.3g/L, NaCl 1g/L, 玉米浆5g/L, MgCO_3 40g/L)分开灭菌后接种于37℃条件下培养48h,考察50g/L总糖浓度下菌体的生长情况和丁二酸产量,结果见表6。

表6 玉米皮水解液与葡萄糖作为碳源发酵丁二酸的对比

碳源	起始总糖 含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞干重 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	丁二酸浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	丁二酸收率 /%
葡萄糖	50	3.5	39.8	79.6
玉米皮水解液	50	3.4	35.8	71.6

从表6可知,分别以经脱色精制的玉米皮水解液与葡萄糖作为发酵碳源,其菌体生长情况大致相同;从丁二酸收率来看,以玉米皮水解液作为碳源的发酵结果略低于以葡萄糖作为碳源的发酵结果,其原因是:玉米皮水解液是葡萄糖与木糖的混合糖液,木糖转化为丁二酸的理论值比葡萄糖转化为丁二酸的理论值低。实验结果证明用经脱色精制的玉米皮水解液替代葡萄糖作为碳源发酵制备丁二酸是可行的,而对利用玉米皮水解液发酵制备丁二酸的工艺优化的研究将是下一步工作的重点。

3 结论

经正交实验确定,影响稀 H_2SO_4 水解玉米皮的总糖得率的因素依次为:水解温度>加酸量>反应时间>粒径。确定的玉米皮稀酸水解的工艺条件为:水解温度 110°C 、加酸量 1%、粒径 20~40 目、反应时间 90 min,在此工艺条件下的总糖得率达 90.37%,总糖浓度达 85 g/L,有害物质糠醛含量仅为 0.665 g/L,同时水解工艺的反应温度较低、反应时间较短。

对玉米皮水解糖液进行了脱色精制,脱色率达 92.27%,糠醛含量仅为 0.236 g/L,脱色的总糖损失

率低于 5%,水解糖液品质显著改善。经厌氧发酵实验初步验证,玉米皮水解液可替代葡萄糖作为碳源发酵制备丁二酸,具有良好的应用前景。

参考文献

- 1 李 军,吴平治,李美茹,等. 能源植物的研究进展及其发展趋势[J]. 自然杂志, 2006, 29(1): 21~25
- 2 曹 毅. 玉米淀粉皮渣的主要成分含量[J]. 中国饲料, 1998, 14: 33~35
- 3 马传国,程亚芳,王 伟,等. 玉米皮油提取及其理化指标的分析研究[J]. 中国油脂, 2006, (2): 63~64
- 4 张洪勋,罗海峰,庄绪亮. 丁二酸发酵研究进展[J]. 微生物通报, 2003, 30(5): 102~106
- 5 张毅民,杨 静,吕学斌,等. 木质纤维素类生物质酸水解研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2007, 29(1): 48~54
- 6 张宇昊,王 颖,张 伟,等. 半纤维素发酵生产燃料乙醇的研究进展[J]. 酿酒科技, 2004, (5): 72~74
- 7 Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426~428
- 8 中山大学生物系生化微生物教研室. 生物化学技术导论[M]. 北京:人民教育出版社, 1981. 61~62
- 9 石起增,杨光瑞,刘巧茹. 反相高效液相色谱法测定糠酸、糠醇和糠醛[J]. 分析实验室, 2006, 25(6): 73~74
- 10 陈可泉,韦 萍,蔡 婷,等. 反相高效液相色谱在发酵制备丁二酸中的应用[J]. 生物加工过程, 2005, 3(2): 50~52
- 11 王正烈,周亚平,李松林,等. 物理化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2001. 179~180

Preparation of Saccharifying Liquid for Succinic Acid by Fermentation from Cornhusks Sulphuric Acid Hydrolysis

Jiang Min, Yao Jiamin, Wu Hao, Chen Kequan, Sun Naya, Yu Li

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Chemical Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT The techniques of saccharifying liquid preparation from cornhusks by acid hydrolysis were studied. The optimum parameters for the hydrolysis based on the yield of total sugar were determined by means of orthogonal experiments and regulative experiments. The best conditions of hydrolysis were as follows: hydrolysis temperature 110°C , vitriol concentration 1.0%, particle diameter 20 ~ 40 meshes, reaction time 90min. The yield of total sugar was 90.37% and the concentration of total sugar was 85 g/L. The saccharifying liquid from cornhusks was decolorized by active carbon. Yield of decolorization was 92.27%. Losing rate of total sugar was below 5% and the concentration of furfural was 0.236 g/L. The shaking flasks experiment for the production of succinic acid was carried out and the results showed that the saccharifying liquid could be used as the carbon source substitute for microbe fermentation of succinic acid.

Key words cornhusks, acid hydrolysis, succinic acid, fermentation