

^{60}Co - γ 射线处理油菜秸秆降解产物分析及其对酶解发酵的影响

邓明 陈亮 齐慧 刘安 张勇 周毅吉 王克勤 武小芬

(湖南省农业科学院/湖南省核农学与航天育种研究所 长沙 410125)

摘要 本文以油菜秸秆为原料, 研究不同吸收剂量 ^{60}Co - γ 辐照处理后样品中木质纤维素组分、降解产物种类和含量的变化, 并对其酶解和分步糖化发酵特性进行评价。研究结果表明: 随着吸收剂量的升高, 油菜秸秆中纤维素、木聚糖和木质素含量降低, 水溶性组分总量逐渐增加, 水浸提液 pH 逐渐降低。降解产物中 4 种小分子脂肪酸总量随辐照吸收剂量的升高逐渐增加, 1 000 kGy 处理后达到最大值 9.25 mg/g; 9 种小分子芳香类降解产物总量呈先增后降趋势, 800 kGy 时达到最大值 0.22 mg/g。油菜秸秆酶解纤维素转化率和葡萄糖浓度随着吸收剂量的升高逐渐增加; 随着底物浓度的增加, 纤维素转化率逐渐降低, 酶解液中葡萄糖浓度逐渐升高; 15% 底物浓度下 800 kGy 辐照处理油菜秸秆酶解纤维素转化率为 57.55%, 分步糖化发酵乙醇转化率低于 10%。辐照结合水浸提处理显著提高油菜秸秆酶解发酵效率, 水浸提后 800 kGy 辐照油菜秸秆在 15% 底物浓度酶解纤维素转化率和葡萄糖浓度分别为 71.62% 和 40.38 mg/mL, 分步发酵 48 h 后乙醇转化率达到 64.00%, 且发酵液中葡萄糖被全部消耗。

关键词 ^{60}Co - γ 射线辐照, 油菜秸秆, 降解产物, 酶解, 分步糖化发酵

中图分类号 TL99, S216

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0043

引用该文:

邓明, 陈亮, 齐慧, 等. ^{60}Co - γ 射线处理油菜秸秆降解产物分析及其对酶解发酵的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2023, 41(6): 060401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0043.

DENG Ming, CHEN Liang, QI Hui, *et al.* Degradation products analysis of rapeseed straw pretreated with ^{60}Co - γ -ray irradiation and its effect on enzymatic hydrolysis and fermentation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2023, 41(6): 060401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0043.



Degradation products analysis of rapeseed straw pretreated with ^{60}Co - γ -ray irradiation and its effect on enzymatic hydrolysis and fermentation

DENG Ming CHEN Liang QI Hui LIU An ZHANG Yong ZHOU Yiji WANG Keqin WU Xiaofen

(Hunan Institute of Nuclear Agricultural Science and Space Mutation Breeding, Hunan Academy of Agricultural Sciences,

Changsha 410125, China)

基金资助: 湖南省农业科技创新基金项目(2022CX98)和国家自然科学基金(12005058)资助

第一作者: 邓明,男,1988年3月出生,2015年毕业于湖南农业大学环境工程专业,现从事生物质高效利用研究,研究实习员

通信作者: 武小芬,副研究员, E-mail: wxf334@163.com; 王克勤,研究员, E-mail: wkq6412@163.com

收稿日期: 初稿 2023-05-05; 修回 2023-06-11

Supported by Agricultural Science and Technology Innovation Fund of Hunan Province (2022CX98) and National Natural Science Foundation of China (12005058)

First author: DENG Ming (male) was born in March 1988, and graduated from Hunan Agricultural University in 2015 with a major in environmental engineering. Now he is an assistant professor engaging in the research on efficient utilization of biomass

Corresponding author: WU Xiaofen, associate professor, E-mail: wxf334@163.com; WANG Keqin, professor, E-mail: wkq6412@163.com

Received 05 May 2023; accepted 11 June 2023

ABSTRACT Rapeseed straw was used as raw material to investigate the changes in the lignocellulosic components, types and contents of degradation products after different absorbed doses of ^{60}Co - γ -ray irradiation, and the enzymatic hydrolysis and fermentation characteristics were evaluated in this research. The results showed that the contents of cellulose, xylan and lignin decreased, the total amount of water-soluble components increased, and the pH of water extract gradually decreased in the rapeseed straw with the increase of irradiation absorbed dose. The total amount of four types of small molecular fatty acids in the degradation products of rapeseed straw gradually increased with the irradiation absorbed dose increasing, reaching a maximum of 9.25 mg/g after 1 000 kGy irradiated. The total amount of nine types of small molecular aromatic degradation products first increased and then decreased, reaching a maximum of 0.22 mg/g in 800 kGy irradiated rapeseed straw. The cellulose conversion rate and glucose concentration of rapeseed straw by enzymatic hydrolysis increased with the increase of irradiation absorbed dose. The cellulose conversion rate decreased and the glucose concentration in enzymatic hydrolysate gradually increased with increasing substrate concentration. The cellulose conversion rate for enzymatic hydrolysis was 57.55% and ethanol conversion rate was less than 10% of 800 kGy irradiated rapeseed straw at 15% substrate concentration in separate hydrolysis and fermentation. Irradiation combined with water extraction significantly improved the enzymatic and fermentation efficiency of rapeseed straw. The cellulose conversion rate and glucose concentration for enzymatic hydrolysis were 71.62% and 40.38 mg/mL, respectively, the ethanol conversion rate was 64.00% after 48 h of separate fermentation, and the glucose in fermentation broth was completely consumed for 800 kGy irradiated rapeseed straw after water extraction at 15% substrate concentration.

KEYWORDS ^{60}Co - γ -ray irradiation, Rapeseed straw, Degradation products, Enzymatic hydrolysis, Separate hydrolysis and fermentation

CLC TL99, S216

油菜是继小麦、玉米、水稻和大豆之外的我国又一大农作物,耕作面积和收获产量约占世界1/3^[1]。油菜秸秆作为典型的木质纤维素类生物质,其纤维素、半纤维和木质素含量分别为41.37%、23.63%和13.03%,较高的纤维素含量使其成为具有潜力的燃料乙醇生产原料^[2]。但油菜秸秆木质纤维素组分之间紧密结合,需要通过预处理改变其微观结构、增加孔隙度、降低纤维素结晶度,提高其被酶和微生物的利用效率^[3]。目前,针对木质纤维素生物转化的预处理方法包括:物理法,如机械挤压、微波和爆破等,处理能耗高^[4-5];化学法,如酸、碱预处理等,严重污染环境^[6-7];生物预处理法,生产周期长^[8];离子液体预处理法,溶剂制备过程复杂、成本高^[9]。

辐照预处理技术是采用 γ 射线或电子束处理生物质,将其顽固的木质纤维素显著分解为无定形结构,并促进纤维素酶解转化为小分子碳水化合物^[10]。陈亮等^[11]研究发现,800 kGy处理的稻草采用分批补料法进行酶解,40%的底物浓度纤维素酶解转化率可达77.1%,葡萄糖的质量浓度可达104.6 g/L。Liu等^[12]采用800 kGy处理的玉米芯、松木、桉木进行酶解,底物浓度也能达到

30%~40%,纤维素酶水解产物中总糖浓度分别达到251 g/L、185.58 g/L和212.87 g/L。Zhang等^[13]研究发现,辐照能够降低油菜秸秆粒径,缩小粒度分布范围,增加比表面积,且处理后的油菜秸秆热稳定性降低,更加容易酶解。这些研究表明,高能氧化辐照预处理能够显著提高材料的酶水解性能,为生物物质的高效转化奠定了基础。

辐照预处理尽管可以破坏木质纤维素的顽固结构,增强酶对纤维素的可及性,但在此过程中会产生木质纤维素衍生的抑制物,影响酶解发酵,且不同种类原料经辐照处理产生的抑制物种类和含量均存在差异^[14]。Li等^[15]在辐照处理芒草中检测到一些潜在的抑制物,如葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甲酸、乙酸、糠醛和对香豆酸,且吸收剂量对这些产物的生成有明显的影 响。张春艳等^[16]采用GC-MS对处理后的油菜秸秆中降解产物分析发现,脂肪酸类降解产物相对含量在1 000 kGy时达到最大值,芳香类降解产物在800 kGy时含量最高。Liu等^[17]在800 kGy辐照处理的芦苇中检测到酚类抑制物的总含量为4.25 mg/mL。这些抑制物的产生会影响酵母发酵生产乙醇,但目前我们对辐照预处理油菜秸秆发酵抑制产物的生成规律,

及其对后续生物转化生产燃料乙醇产生什么样的影响并不清楚。因此，本文以0~1 000 kGy辐照处理的油菜秸秆为原料，研究不同吸收剂量处理后油菜秸秆组分变化、抑制物的种类和含量，并对其酶解发酵特性进行评价，为辐照预处理油菜秸秆发酵抑制物的脱除提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油菜秸秆，收集于湖南省农业科学院作物研究所试验基地，自然晾干，切成10~15 cm小段，备用。

98%浓硫酸、磷酸、乙酸、乙酸钠、硫酸铵、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钙、无水乙醇均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司；酵母提取粉为生化试剂，购于广东环凯微生物科技有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯，购于安徽天地高纯溶剂有限公司。

高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)标准样品：葡萄糖(Glucose)和木糖(Xylose)，购于Sigma-Aldrich公司；甲酸(Formic acid)、乙酸(Acetic acid)、丙酸(Propionic acid)和正丁酸(*n*-Butyric acid)，购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；对羟基苯甲酸(*p*-Hydroxybenzoic acid)、香草酸(Vanillic acid)、丁香酸(Syringic acid)、对羟基苯甲醛(*p*-Hydroxy benzaldehyde)、香草醛(Vanilline)、对香豆酸(*p*-Coumaric acid)、丁香醛(Syringaldehyde)、香草乙酮(Acetovanillone)和阿魏酸(Ferulic acid)，购于上海麦克林生化科技股份有限公司。

Cellulast 1.5 L纤维素酶购于丹麦诺维信公司。

CICC31014 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 仪器与设备

⁶⁰Co- γ 辐照装置，湖南省核农学与航天育种研究所；FW177粉碎机，天津泰斯特仪器有限公司；SHZ-III循环水式真空泵，上海贤德实验仪器有限公司；PHS-3C型pH计，上海仪电科学仪器股份有限公司；DGH-9246 A电热恒温鼓风干燥箱，上海精密实验设备有限公司；Thermo Ultimate 3000高效液相色谱仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公

司；YXQ-LS-50S11压力蒸汽灭菌器，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；Bluestar A紫外可见分光光度计，北京莱伯泰科仪器股份有限公司；HZQ-F100恒温摇床，常州诺基仪器有限公司；TG16-II台式高速离心机，长沙平凡仪器仪表有限公司。

1.3 ⁶⁰Co- γ 射线辐照处理

油菜秸秆，自然晾干，装入金属辐照箱，室温下采用⁶⁰Co- γ 射线进行动态辐照处理，辐照吸收剂量为：0 kGy、200 kGy、400 kGy、600 kGy、800 kGy、1 000 kGy，剂量率为2 kGy/h。辐照处理后的样品粉碎，过0.425 mm筛网，装入自封袋中备用。

1.4 油菜秸秆组分分析

1.4.1 水浸提物制备

称取2.0 g样品，加入60 mL去离子水，于50 °C条件下超声处理1 h。结束后反应液进行抽滤，收集滤液，进行pH、葡萄糖、木糖、可溶性葡聚糖、可溶性木聚糖、脂肪酸类和芳香类降解产物分析。滤渣，105 °C烘干，进行木质纤维素组分分析。

1.4.2 pH测定

取一定体积的油菜秸秆水浸提液，采用pH计测定其pH值。

1.4.3 葡萄糖、木糖、水溶性葡聚糖、木聚糖测定

取1 mL油菜秸秆水浸提液，过0.45 μ m水系滤膜，采用HPLC分析水浸提液中葡萄糖、木糖含量。取上清液7 mL，加入72%的硫酸0.25 mL，121 °C反应1 h，结束后稀释，过0.45 μ m水系滤膜，采用HPLC分析水浸提液中水溶性葡聚糖和木聚糖含量。

HPLC分析条件参考武小芬等^[18]的方法。Bio Rad Aminex HPX-87H (7.8 mm \times 300 mm)色谱柱、柱温55 °C，0.005 mol/L硫酸为流动相，流速0.6 mL/min，进样量10 μ L，示差折光检测器，温度45 °C。

1.4.4 脂肪酸类和芳香类降解产物分析

取1 mL油菜秸秆水浸提液，过0.45 μ m水系滤膜，采用HPLC分析甲酸、乙酸、丙酸和正丁酸等脂肪酸类降解产物；对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对羟基苯甲醛、香草醛、对香豆酸、丁香醛、香草乙酮和阿魏酸等芳香类降解产物。

HPLC分析条件参考Chen等^[19]的方法稍加修

改。色谱柱为Waters YMC类胡萝卜素柱S-3(250 mm×4.6 mm),流动相A为0.05%(v/v)磷酸(pH=2.2),流动相B为90%乙腈水溶液,流速0.8 mL/min,紫外可见检测器、波长210 nm,柱温30 °C,进样体积10 μL。梯度洗脱程序为:0.00~25.00 min,流动相B从5%梯度增加至20%;25.01~30.00 min,流动相B从20%梯度增加至80%;30.01~35.00 min,流动相B从80%梯度降低至5%;35.01~40.00 min,流动相B保持5%不变。

1.4.5 木质纤维素组分分析

称取0.3 g水浸提后滤渣于100 mL三角瓶中,加入3 mL 72%硫酸,涡旋振荡至样品与硫酸充分混合,放入30 °C水浴摇床反应1 h,然后加入84 mL去离子水,121 °C反应1 h。反应结束后冷却,过滤,滤渣105 °C烘干计算酸不溶性木质素含量;测定滤液在320 nm波长下吸光值,计算酸溶性木质素含量;纤维素和木聚糖含量通过HPLC测定滤液中的葡萄糖和木糖含量进行计算^[20]。

1.5 酶解试验

酶解试验根据Wu等^[21]报道的方法进行。不同吸收剂量(0 kGy、200 kGy、400 kGy、600 kGy、800 kGy、1 000 kGy)处理后的油菜秸秆,按照10%底物浓度加入0.1 mol/L乙酸-乙酸钠缓冲液(pH=4.8),纤维素酶添加量为15 FPU/g,酶解条件为:温度50 °C、转速130 r/min、时间96 h,分别在0 h、4 h、24 h、48 h、72 h和96 h取样,测定葡萄糖含量,根据公式(1)计算纤维素酶解转化率。

纤维素酶解转化率(%) = 酶解液中葡萄糖质量 × 0.9 × 100 / 样品中纤维素质量 (1)

1.6 分步糖化发酵

水浸提脱毒:800 kGy处理的油菜秸秆粉,按固液比1:30加入去离子水,于50 °C条件下超声处理1 h,结束后抽滤,收集滤渣,60 °C烘干,为水浸提脱毒后样品。

发酵培养基:含2 g/L硫酸铵、5 g/L磷酸二氢钾、1 g/L硫酸镁、0.2 g/L氯化钙、5 g/L酵母提取粉,pH≈6。

酶解试验:分别以800 kGy辐照处理和水浸提脱毒后油菜秸秆粉为原料,按照5%、10%和15%底物浓度加入发酵培养基,纤维素酶添加量为

15 FPU/g,酶解条件为:温度50 °C、转速130 r/min、时间72 h,分别在0 h、4 h、24 h、48 h和72 h取样,测定葡萄糖含量,根据公式(1)计算纤维素酶解转化率。

乙醇发酵:将上述酶解液115 °C灭菌20 min,按10%接种量接入活化后酵母菌,置于恒温摇床中,37 °C、150 r/min条件下进行分步糖化发酵,分别在发酵0 h、4 h、8 h、24 h和48 h取样,按§1.4.3中HPLC分析方法测定其中葡萄糖和乙醇含量,根据公式(2)计算乙醇转化率。

乙醇转化率(%) = 发酵液中乙醇质量 × 0.51 × 100 / 发酵初始葡萄糖质量 (2)

1.7 数据处理

所有试验均重复2次,采用Excel 2016进行数据统计,Origin 2019进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同吸收剂量辐照处理后油菜秸秆组分分析

不同吸收剂量辐照处理后油菜秸秆中各组分含量变化如图1所示。由图1(a)分析可知,未处理油菜秸秆中纤维素、木聚糖和木质素含量分别为35.17%、16.22%和28.70%,占秸秆总量的80.09%。在0~1 000 kGy剂量范围内,随着吸收剂量的升高,油菜秸秆中纤维素、木聚糖和木质素含量均呈降低趋势,其中木聚糖降解程度最大,其次为纤维素,木质素受辐照影响相对较小(图1(a))。油菜秸秆中水溶性组分总量随吸收剂量的升高逐渐增加,800 kGy时达到30.78%,是对照(10.13%)的3.04倍(图1(b))。由图1(c)和(d)可知,辐照处理后水溶性葡聚糖和木聚糖含量随吸收剂量的升高呈逐渐增加趋势,800 kGy辐照处理后均达到最大值,分别为19.37 mg/g和68.58 mg/g;葡萄糖和木糖含量随吸收剂量的增加无明显规律。木质纤维素的辐照降解属于随机裂解,分子越大被γ射线作用的概率越大,因此,辐照处理能够有效降低纤维素和木聚糖的分子量而增加其溶解度,而非直接降解为单糖^[21]。从分子结构来看,木质素具有苯环结构,稳定性高于纤维素和木聚糖,因此受辐照的影响相对较小。

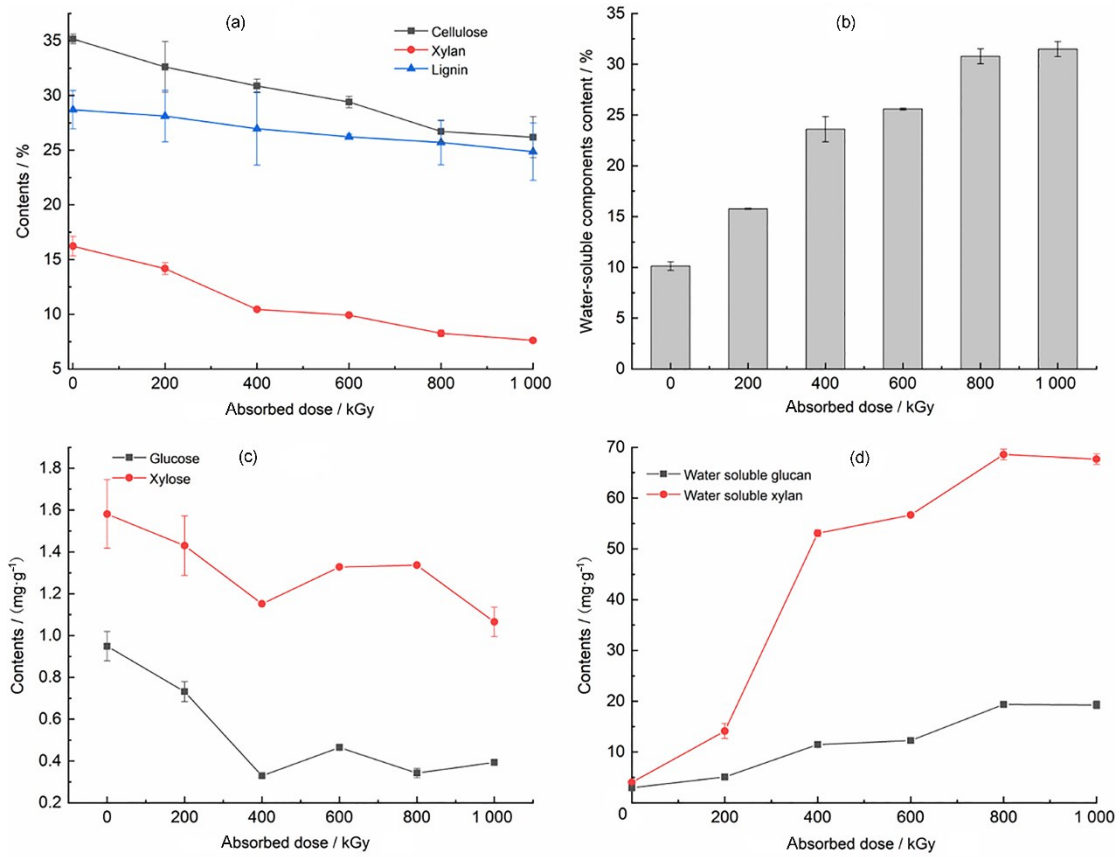


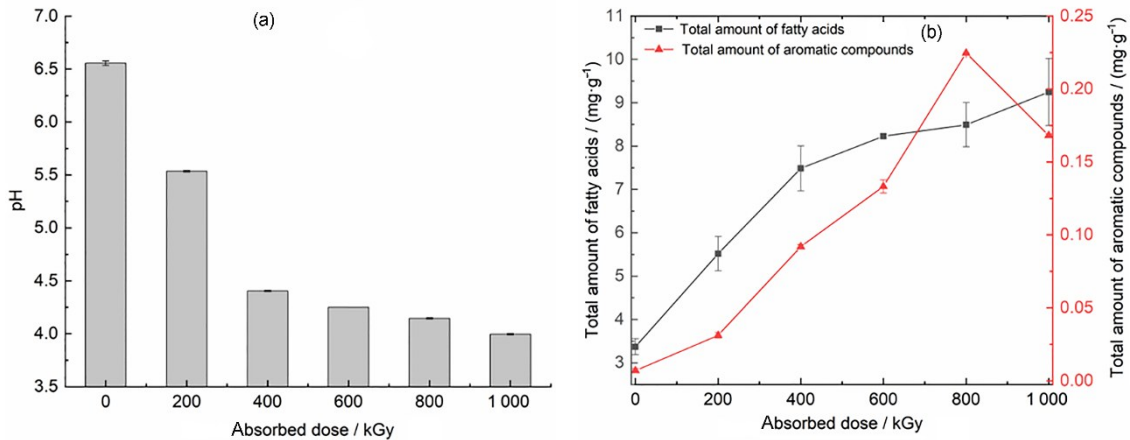
图1 辐照处理后油菜秸秆组分分析:(a)纤维素、木聚糖和木质素含量;(b)水溶性组分总量;(c)水溶性组分中葡萄糖和木糖含量;(d)水溶性组分中葡聚糖和木聚糖含量

Fig.1 Composition analysis of rapeseed straw after irradiation treatment: (a) contents of cellulose, xylan, and lignin; (b) total amount of water soluble components; (c) contents of glucose and xylose in water soluble fraction; (d) contents of glucan and xylan in water soluble fraction

2.2 不同吸收剂量辐照处理后油菜秸秆降解抑制物分析

对不同吸收剂量辐照处理后油菜秸秆水浸提液pH和4种主要脂肪酸类、9种芳香类抑制物进行定量分析,结果如图2所示。由图2(a)可知,未处理油菜秸秆水浸提液pH为6.56,随着吸收剂量的

升高,浸提液pH逐渐降低,1000 kGy处理后油菜秸秆水浸提液pH为4.00。甲酸、乙酸、丙酸和正丁酸及其总量均随吸收剂量的升高逐渐增加,吸收剂量为1000 kGy时小分子脂肪酸总量达到最大值9.25 mg/g,4种脂肪酸抑制物中甲酸和正丁酸含量相对较高(图2(b)、(c))。



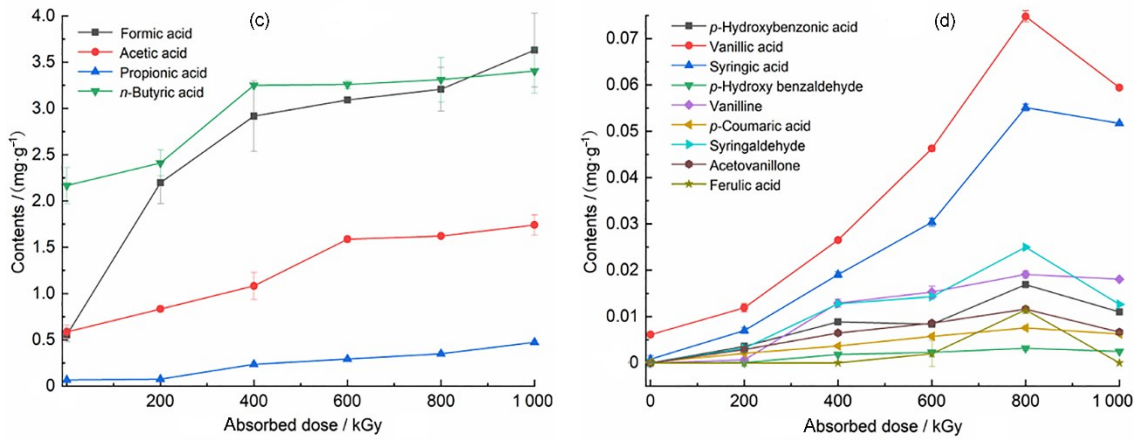


图2 辐照处理后油菜秸秆酶解发酵抑制物分析:(a)水浸提液pH分析;(b)脂肪酸类和芳香类抑制物总量;(c)水溶性组分中脂肪酸类抑制物含量;(d)水溶性组分中芳香类抑制物含量

Fig.2 Analysis of enzymatic hydrolysis and fermentation inhibitors of rapeseed straw after irradiation treatment: (a) pH analysis of water extracts; (b) contents of aromatic inhibitors in water soluble fractions; (c) total contents of fatty acid and aromatic inhibitors; (d) contents of fatty acid inhibitors in water soluble fraction

9种芳香类降解产物总量随吸收剂量的增加呈先增后降趋势,800 kGy达到最大值0.22 mg/g,其中香草酸和丁香酸是油菜秸秆主要的小分子芳香类降解产物(图2(b)、(d))。这是由于辐照处理后,油菜秸秆中纤维素、半纤维素降解以及木质素侧链断裂会产生小分子脂肪酸类降解产物,小分子

芳香类降解产物主要来自于木质素的降解^[22-24]。

2.3 不同吸收剂量辐照处理油菜秸秆酶解糖化研究

0~1 000 kGy 辐照处理油菜秸秆酶解纤维素转化率和葡萄糖浓度如图3所示。

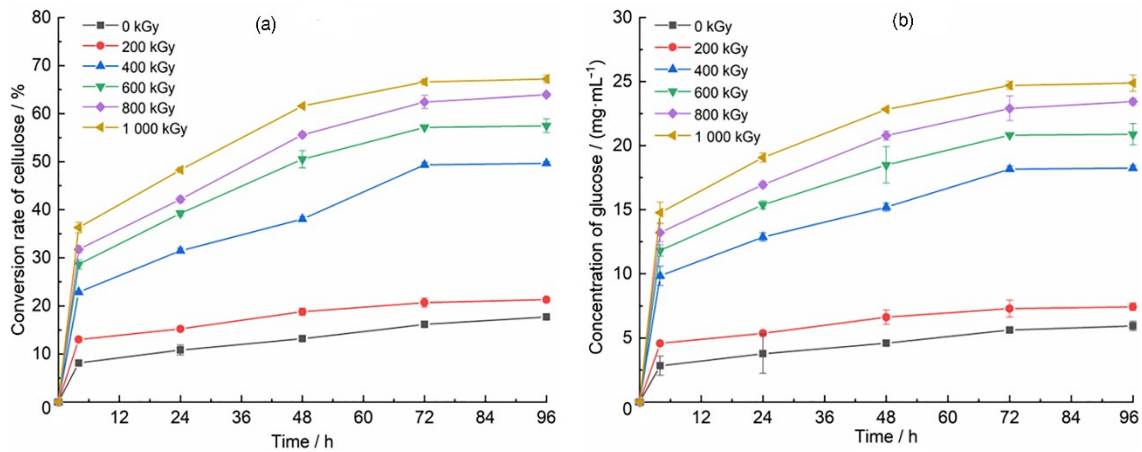


图3 不同吸收剂量辐照处理油菜秸秆酶解效果:(a)纤维素转化率;(b)葡萄糖浓度

Fig.3 Enzymatic hydrolysis of rapeseed straw pretreated with irradiation at different absorbed doses: (a) conversion rate of cellulose; (b) concentration of glucose

由图3(a)分析可知,随着吸收剂量的升高,油菜秸秆酶解纤维素转化率逐渐增加,当吸收剂量为400 kGy时,纤维素转化率明显提升。剂量为400 Gy、600 kGy、800 kGy和1 000 kGy辐照处理油菜秸秆酶解72 h,纤维素转化率分别为49.34%、57.15%、62.40%和66.62%,当酶解时间继续延

长,纤维素转化率增加较小。不同吸收剂量辐照处理油菜秸秆酶解葡萄糖浓度变化趋势与纤维素转化率一致,400~1 000 kGy辐照处理油菜秸秆酶解72 h后葡萄糖浓度在18.18~24.70 mg/mL(图3(b))。辐照处理促进油菜秸秆纤维素酶解转化率的原因主要有:(1)辐照处理破坏了油菜秸秆木

质纤维素的顽抗结构,使其由致密变得松散,比表面积增大,提高纤维素酶的可及性;(2)经辐照处理后的油菜秸秆纤维素结晶度降低,更加容易酶解;(3)辐照处理后的纤维素分子量降低,供纤维素酶作用的纤维素分子末端增多,促进酶解效率的提高^[13,21,25]。Lee等^[26]采用辐照处理洋麻芯发现,在0~500 kGy范围内,随着吸收剂量的增加,洋麻芯的酶解糖产量增加。Zhang等^[25]采用 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线处理油菜秸秆,处理后油菜秸秆酶解产糖率显著提高,1 200 kGy处理后油菜秸秆纤维素和半纤维素酶解消化率分别为79.21%和75.59%。以上研究结果均表明,辐照处理是一种有效的生物质预处理手段,能够显著提高处理后生物质酶解转化效率^[26-28]。

2.4 辐照处理后油菜秸秆分步糖化发酵

对比不同底物浓度下800 kGy辐照处理油菜秸秆分步糖化发酵纤维素和乙醇转化率的变化,结

果如图4所示。由图4(a)和(b)分析可知,随着底物浓度的增加,纤维素转化率逐渐降低,酶解液中葡萄糖含量逐渐升高,5%~15%底物浓度油菜秸秆酶解72 h,纤维素转化率在57.55%~72.55%,酶解液中葡萄糖浓度为12.58~31.07 mg/mL。提高底物浓度有助于增加酶解液中的葡萄糖浓度,为后续发酵过程中乙醇浓度的提高提供物质基础^[29]。由图4(c)可知,随着底物浓度的增加,发酵乙醇转化率显著降低,底物浓度为5%时,分步糖化发酵乙醇转化率为69.71%,当底物浓度增加至15%时,乙醇转化率低于10%。从发酵液中葡萄糖的利用情况来看,5%底物浓度时,发酵液中葡萄糖在24 h被完全利用;10%底物浓度时,葡萄糖利用率减慢;而15%底物浓度样品发酵48 h时,发酵液中还残留大量的葡萄糖(25.85 mg/mL);说明随着底物浓度的增加,发酵液中抑制物浓度也逐渐升高,从而导致酵母菌的发酵受到抑制(图4(d))。

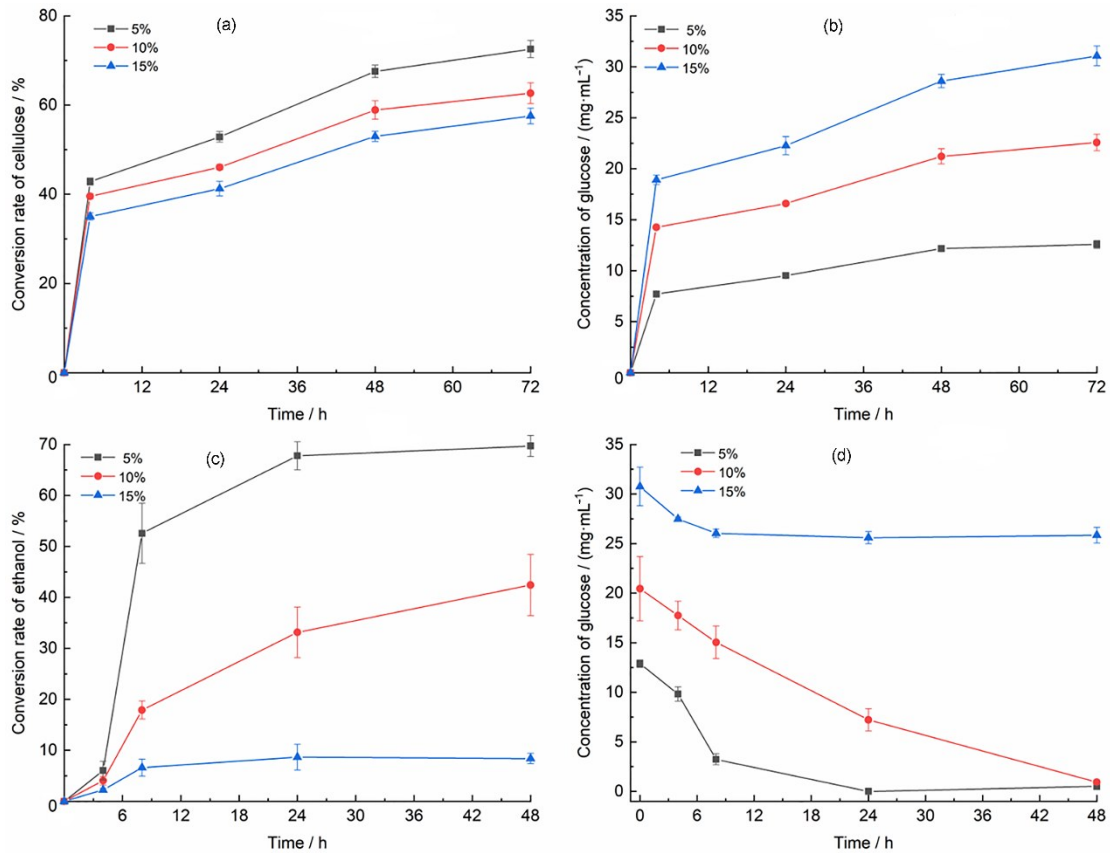


图4 800 kGy辐照处理油菜秸秆分步糖化发酵:

(a)酶解纤维素转化率;(b)酶解液葡萄糖浓度;(c)发酵乙醇转化率;(d)发酵液葡萄糖浓度

Fig.4 Separate hydrolysis and fermentation of 800 kGy irradiated rapeseed straw: (a) cellulose conversion rate of enzymatic hydrolysis; (b) glucose concentration of enzymatic hydrolysis; (c) ethanol conversion rate of fermentation; (d) glucose concentration of fermentation

以水浸提后 800 kGy 辐照处理油菜秸秆为原料进行分步糖化发酵, 结果如图 5 所示。由图 5(a)和(c)分析可知, 5%~15% 底物浓度水浸提后秸秆酶解纤维素转化率和发酵乙醇转化率均高于未处理秸秆, 其中 5% 底物浓度样品酶解 72 h 纤维素转化率为 85.41%, 发酵 48 h 乙醇转化率为 75.24%; 15% 底物浓度样品酶解 72 h, 纤维素转化率和葡萄糖浓度分别为 71.62% 和 40.38 mg/mL, 发酵 48 h 后乙醇转化率为 64.00%, 且发酵液中葡萄糖被消耗完。由水浸提液中抑制物分析结果可知, 800 kGy 处理的油菜秸秆中脂肪酸类和芳香类降解产物的含量分别为 8.46 mg/g 和 0.22 mg/g (图 2)。水浸提处理去除了油菜秸秆中辐照产生的小分子脂肪酸和芳香类降解产物, 降低了抑制物对酶解和发酵的影响, 从而促进酶解和发酵转化率的提高。

通常, 预处理后水解液中的发酵抑制物可以分为三类, 其中脂肪酸类和呋喃类主要来自于半纤维素及部分纤维素的降解, 酚类主要来自于木质素的降解^[30]。对于高能氧化辐照预处理后抑制物的种类和含量, 也有少量研究报道。Li 等^[15] 在

辐照处理芒草中检测到一些潜在的抑制物, 如葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甲酸、乙酸、糠醛和对香豆酸, 且吸收剂量对这些产物的生成有明显的影响。张春艳等^[16] 对处理后的油菜秸秆进行分析发现, 脂肪酸类降解产物相对含量在 1 000 kGy 时达到最大值 19.99%, 芳香类降解产物在 800 kGy 时含量最高为 8.97%。

发酵液中抑制物的脱除方法主要包括: 物理脱除法(吸附、萃取等)、化学脱除法(添加化学试剂中和、沉淀等)、生物脱除法(通过特定的微生物或酶系作用)等^[14]。发酵液中抑制物水洗脱毒具有操作简单、无需添加化学试剂、成本低等优点, Liu 等^[17] 在 800 kGy 辐照处理的芦苇中检测到酚类抑制物的总含量为 4.25 mg/mL, 通过辐照预处理水洗相结合, 使葡萄糖乙醇转化率达到 99.7%。张勇等^[31] 对 800 kGy 辐照处理的玉米秸秆采用水洗脱毒, 乙醇转化率比对照提高 10%。这些研究结果表明, 水洗处理能够有效去除辐照处理产生的抑制物, 提高发酵乙醇转化率。

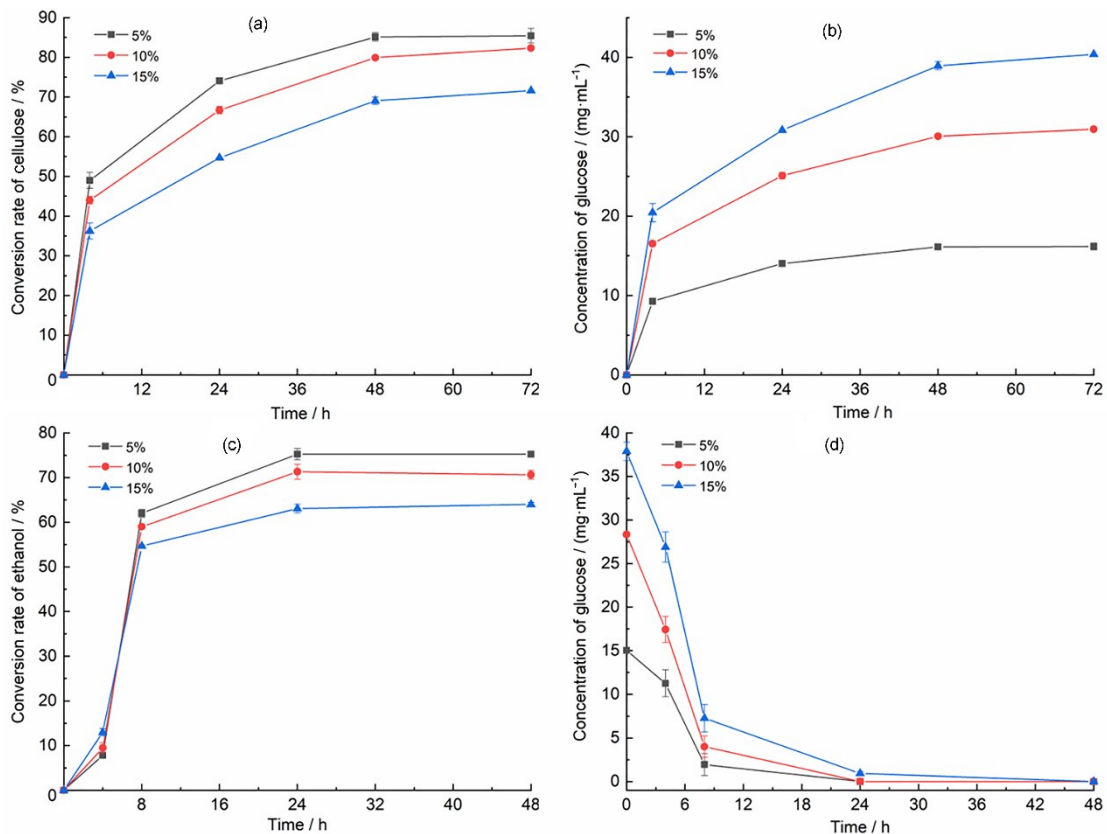


图5 水洗处理后 800 kGy 辐照处理油菜秸秆分步糖化发酵:(a)酶解纤维素转化率;(b)酶解液葡萄糖浓度;(c)发酵乙醇转化率;(d)发酵液葡萄糖浓度

Fig.5 Separate hydrolysis and fermentation of 800 kGy irradiated rapeseed straw after water extraction treatment: (a) cellulose conversion rate of enzymatic hydrolysis; (b) glucose concentration of enzymatic hydrolysis; (c) ethanol conversion rate of fermentation; (d) glucose concentration of fermentation

3 结论

辐照处理能够降解油菜秸秆中纤维素、半纤维素和木质素，产生小分子脂肪酸和芳香类化合物，造成水溶性组分增加和水浸提液pH降低。辐照处理后油菜秸秆酶解纤维素转化率逐渐增加，酶解液中葡萄糖浓度随辐照吸收剂量的升高而增加，均在1 000 kGy时达到最大值。分步糖化发酵随着底物浓度的增加，乙醇转化率显著降低，底物浓度15%时，800 kGy油菜秸秆乙醇转化率低于10%。水浸提处理可以有效去除小分子有机酸和芳香类化合物，经水浸提的800 kGy油菜秸秆酶解转化率和发酵乙醇转化率明显提高，15%底物浓度油菜秸秆酶解72 h，纤维素转化率和葡萄糖浓度分别为71.62%和40.38 mg/mL，发酵48 h后乙醇转化率达到64.00%。本研究为打破油菜秸秆⁶⁰Co- γ 辐照预处理瓶颈，合理有效地脱除预处理产生的抑制物，提供理论和技术支撑。后续将继续研究油菜秸秆高底物浓度酶解发酵工艺，实现油菜秸秆高效转化制备燃料乙醇的目标。

作者贡献声明 邓明完成论文试验的开展和初稿撰写；陈亮完成实验设计和论文修改；齐慧完成高效液相分析和提供经费支持；刘安完成酵母菌的活化；张勇完成辐照预处理；周毅吉完成辐照处理剂量计的跟踪测定；王克勤提供试验思路和经费支持；武小芬指导论文试验设计、初稿撰写、完成论文修改和试验经费支持。所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

参考文献

- 裴岩杰. 油菜秸秆细胞壁及其降解转化生物乙醇机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 75.
PEI Yanjie. Analysis of cell wall composition, biomass digestibility and bioethanol conversion in rapeseed straw [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016: 75.
- 张春艳. 辐照预处理对油菜秸秆降解产糖效果的影响及机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015: 134.
ZHANG Chunyan. Studies on the effect of sugar production and mechanism of hydrolysis of irradiation pretreated rapeseed straw[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015: 134.
- Chen H Y, Liu J B, Chang X, *et al.* A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals [J]. Fuel Processing Technology, 2017, **160**: 196-206. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.12.007.
- Bala A J, Singh B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production[J]. Renewable Energy, 2019, **130**: 12-24. DOI: 10.1016/j.renene.2018.06.033.
- Rastogi M, Shrivastava S. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, **80**: 330-340. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.225.
- Kuglarz M, Alvarado-Morales M, Dąbkowska K, *et al.* Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from rapeseed straw after dilute-acid pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2018, **265**: 191-199. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.099.
- Tsegaye B, Balomajumder C, Roy P. Optimization of microwave and NaOH pretreatments of wheat straw for enhancing biofuel yield[J]. Energy Conversion and Management, 2019, **186**: 82-92. DOI: 10.1016/j.enconman.2019.02.049.
- Prasad R K, Chatterjee S, Mazumder P B, *et al.* Bioethanol production from waste lignocelluloses: a review on microbial degradation potential[J]. Chemosphere, 2019, **231**: 588-606. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.142.
- Trinh L T P, Lee Y J, Park C S, *et al.* Aqueous acidified ionic liquid pretreatment for bioethanol production and concentration of produced ethanol by pervaporation[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019, **69**: 57-65. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.09.008.
- Chen J P, Wang L Y, Su X J, *et al.* Structure, morphology, thermostability and irradiation-mediated degradation fractions of hemicellulose treated with γ -irradiation[J]. Waste and Biomass Valorization, 2016, **7**(6): 1415-1425. DOI: 10.1007/s12649-016-9489-1.
- 陈亮, 苏小军, 陈静萍, 等. 辐照预处理水稻秸秆在高底物浓度下的酶解[J]. 林产化学与工业, 2015, **35**(2): 129-134. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2417.2015.02.020.
CHEN Liang, SU Xiaojun, CHEN Jingping, *et al.* Enzymatic hydrolysis of rice straw pretreated by irradiation at high solid loading[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2015, **35**(2): 129-134. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2417.2015.02.020.
- Liu Y, Guo L J, Wang L Y, *et al.* Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars

- concentration from lignocellulose biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2017, **232**: 270-277. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.061.
- 13 Zhang C Y, Su X J, Xiong X Y, *et al.* ^{60}Co - γ radiation-induced changes in the physical and chemical properties of rapeseed straw[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2016, **85**: 207-214. DOI: 10.1016/j.biombioe.2015.11.022.
- 14 杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, **37**(1): 15-29. DOI: 10.13345/j.cjb.200221.
- YANG Li, TAN Liping, LIU Tongjun. Progress in detoxification of inhibitors generated during lignocellulose pretreatment[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, **37**(1): 15-29. DOI: 10.13345/j.cjb.200221.
- 15 Li Q M, Li X J, Jiang Y L, *et al.* Analysis of degradation products and structural characterization of giant reed and Chinese silvergrass pretreated by ^{60}Co - γ irradiation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, **83**: 307-315. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.01.024.
- 16 张春艳, 谭兴和, 熊兴耀, 等. 油菜秸秆 ^{60}Co - γ 辐照降解产物分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, **43**(1): 92-97. DOI: 10.13331/j.cnki.jhau.2017.01.016.
- ZHANG Chunyan, TAN Xinghe, XIONG Xingyao, *et al.* Analysis of degradation products of rapeseed straw irradiated with ^{60}Co - γ [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2017, **43**(1): 92-97. DOI: 10.13331/j.cnki.jhau.2017.01.016.
- 17 Liu Y, Zhou H, Wang L Y, *et al.* Improving *Saccharomyces cerevisiae* growth against lignocellulose-derived inhibitors as well as maximizing ethanol production by a combination proposal of γ -irradiation pretreatment with *in situ* detoxification[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, **287**: 302-312. DOI: 10.1016/j.cej.2015.10.086.
- 18 武小芬, 雷舒婷, 储奕, 等. 5 MeV 电子加速器辐照对甲酸循环分离南荻木质纤维素的影响[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2022, **40**(2): 020402. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0210.
- WU Xiaofen, LEI Shuting, CHU Yi, *et al.* Effects of 5-MeV electron accelerator irradiation on cycling separation of lignocellulose from *Triarrhena lutarioriparia* by formic acid[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2022, **40**(2): 020402. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0210.
- 19 Chen S F, Mowery R A, Castleberry V A, *et al.* High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1104**(1/2): 54-61. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.136.
- 20 武小芬, 陈亮, 齐慧, 等. 辐照协同甲酸分离油茶壳中纤维素、木质素和木糖的工艺研究[J]. *核农学报*, 2020, **34**(9): 1975-1982. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2020.09.1975.
- WU Xiaofen, CHEN Liang, QI Hui, *et al.* Separation process of cellulose, lignin and xylose from camellia oleifera shell by irradiation and formic acid[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, **34**(9): 1975-1982. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2020.09.1975.
- 21 Wu X F, Chen L, He W Q, *et al.* Characterize the physicochemical structure and enzymatic efficiency of agricultural residues exposed to γ -irradiation pretreatment [J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, **150**: 112228. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112228.
- 22 陈亮, 武小芬, 陈静萍, 等. γ 射线辐照降解微晶纤维素的研究[J]. *核农学报*, 2016, **30**(9): 1731-1737. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.09.1731.
- CHEN Liang, WU Xiaofen, CHEN Jingping, *et al.* Study on the degradation of microcrystalline cellulose irradiated by γ rays[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, **30**(9): 1731-1737. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.09.1731.
- 23 武小芬, 陈亮, 陈静萍, 等. γ 射线辐照降解木聚糖的机理研究[J]. *核农学报*, 2017, **31**(5): 889-898. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2017.05.0889.
- WU Xiaofen, CHEN Liang, CHEN Jingping, *et al.* Study on the degradation mechanism of xylose by gamma rays irradiation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, **31**(5): 889-898. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2017.05.0889.
- 24 Wu X F, Chen L, Chen J P, *et al.* The effect of ^{60}Co γ -irradiation on the structure and thermostability of alkaline lignin and its irradiation derived degradation products[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2019, **10**(10): 3025-3035. DOI: 10.1007/s12649-018-0300-3.
- 25 Zhang C Y, Su X J, Hu Q L, *et al.* Effect of ^{60}Co - γ irradiation on the microstructure and enzymatic hydrolysis of rapeseed straw[J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2016, **50**(9/10): 973-981.
- 26 Lee B M, Jeun J P, Kang P H. Enhanced enzymatic

- hydrolysis of kenaf core using irradiation and dilute acid [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2017, **130**: 216-220. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.08.026.
- 27 Su X J, Zhang C Y, Li W J, *et al.* Radiation-induced structural changes of miscanthus biomass[J]. *Applied Sciences*, 2020, **10**(3): 1130-1142. DOI: 10.3390/app10031130.
- 28 Fei X H, Jia W B, Wang J Q, *et al.* Study on enzymatic hydrolysis efficiency and physicochemical properties of cellulose and lignocellulose after pretreatment with electron beam irradiation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, **145**: 733-739. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.232.
- 29 Climent Barba F, Rodríguez-Jasso R M, Sukumaran R K *et al.* High-solids loading processing for an integrated lignocellulosic biorefinery: effects of transport phenomena and rheology—a review[J]. *Bioresource Technology*, 2022, **351**: 127044. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127044.
- 30 Saravanakumar T, Park H S, Mo A Y, *et al.* Detoxification of furanic and phenolic lignocellulose derived inhibitors of yeast using laccase immobilized on bacterial cellulosic nanofibers[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, **134**: 196-205. DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.11.006.
- 31 张勇, 郭栋豪, 王克勤, 等. γ 射线辐照预处理玉米秸秆发酵产乙醇的研究[J]. *中国酿造*, 2018, **37**(9): 58-61. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2018.09.012.
- ZHANG Yong, GUO Donghao, WANG Keqin, *et al.* Fermentation for ethanol production with γ ray irradiation-pretreated corn straw[J]. *China Brewing*, 2018, **37**(9): 58-61. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2018.09.012.