

LiCl/DMSO 溶剂体系对分离球磨稻草木质素的影响

吴文娟* 王博伟 何贤 闫雪晴 邹春阳

(南京林业大学 江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心,南京 210037)

摘要 为探讨 LiCl/DMSO 溶剂体系对稻草化学组成溶出行为的影响,以球磨稻草为原料,分别选取稻草的秆和叶部位,通过 LiCl/DMSO 溶剂体系处理,测定再生前后的秆和叶部位的化学成分,采用碱性硝基苯氧化来分析木质素的结构单元变化。结果表明:球磨时间越长,木质素和高聚糖的再生得率会降低,球磨原料中灰分的再生不受球磨操作条件影响;稻草秆的再生能力高于叶,其中木质素和高聚糖的再生得率比叶的高,灰分的保留则较低。稻草的秆和叶经过 LiCl/DMSO 溶剂体系处理可促进木质素的溶出,处理后的秆更易于进行酶水解。经球磨后的木质素缩合程度增加,球磨改进了硝基苯氧化环境,其反应的均相性得到提高。再生酶水解后,各球磨部位缩合程度有所增加。其中从球磨 1.0~2.0 h 的叶和秆分离出的木质素能代表相应原料中不同部位的原木质素。

关键词 木质素; LiCl/DMSO; 溶解再生; 稻草; 酶水解

中图分类号 O636.2

文章编号 1007-4333(2020)06-0046-11

文献标志码 A

Effect of LiCl/DMSO solvent system on isolation of lignin from ball milled rice straw

WU Wenjuan*, WANG Bowei, HE Xian, YAN Xueqing, ZOU Chunyang

(Jiangsu Co-Innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstracts In order to investigate the dissolution behavior of chemical component of rice straw and the feasibility of lignin isolation based on LiCl/DMSO solvent system, ball milled rice straw, was taken as study object. The internode and leaf of ball milled rice straw were treated with LiCl/DMSO solvent system, and general chemical composition analysis was conducted. The contents of structural unit of lignin were investigated by alkaline nitrobenzene oxidation. The results showed that: The longer the milling time, the lower the regeneration rate of lignin and polysaccharide; The regeneration of ash in the milling material was not affected by the operating conditions of ball milling; The regeneration ability of the internode sample was higher than that of the leaf, and the regeneration rates of lignin and polysaccharide were higher than that of the leaf, but the ash retention was lower; The ball milled rice straw samples treated by LiCl/DMSO solvent system could promote the dissolution of lignin, and the internode sample treated by LiCl/DMSO solvent system was easier to be hydrolyzed by enzyme. The results from nitrobenzene oxidation showed that the condensation degree of lignin increased after milling, and the condensation degree of lignin in leaf sample was higher than that in internode. After regeneration and enzymatic hydrolysis, the condensation degree of both ball mill samples increased. The lignin of leaf and internode, which was isolated from rice straw with ball milling for 1.0–2.0 h, could represent the original lignin in different parts of the raw material.

Keywords lignin; LiCl/DMSO; dissolution and regeneration; rice straw; enzymatic hydrolysis

收稿日期: 2019-08-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(21704045);江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(201910298034Y);南京林业大学大学生创新训练计划(2018NFUSPITP673)

作者简介: 吴文娟,副教授,主要从事生物质资源化学与工程研究,E-mail:wenjuanwu@njfu.edu.cn

木质素是可再生资源中唯一能大量提供可再生芳香基的化合物,可用于生产生物质燃料、轻质芳烃及其他芳香性小分子化合物等,应用潜力巨大^[1]。

木质纤维原料主要由纤维素、半纤维素和木质素相互交织组成的致密、不易降解的复合体系,其中化学组分之间存在的化学或物理上的链接决定了任何一种化学组分的完全分离必然受到其他组分的阻碍。到目前为止,还没有找到一种理想可行的分离方法,可以将木质素这单一组分从原料中无破坏地分离出来。磨木木质素(MWL)和纤维素酶解木质素(CEL)是目前比较经典的分离方法,CEL是在MWL分离的基础上增加纤维素酶水解处理以降解高聚糖,但木质素分离的得率还是不高。自Swatloski等^[2]首次提出可溶木粉的离子液体以来,寻找能溶解木质纤维原料溶剂体系用于木质素分离就一直受到研究者的关注。Fasching等^[3]以球磨木粉为原料,采用二甲基亚砷/甲基咪唑溶剂,将球磨原料完全溶解于该溶剂体系,通过液-液提取的方式来分离木质素,得到的木质素与经典方法分离出来的磨木木质素类似。研究发现溶解再生处理可以提高木质纤维原料的酶解效率^[4-5],木质纤维原料经溶剂体系溶解再生后,纤维素结晶区会遭到破坏,与未经处理的原料相比,再生、酶水解处理会导致更多的高聚糖降解^[6-8],该处理方法可以尝试用于木质素的分离。Zhang等^[9]用二甲亚砷/N-甲基咪唑溶剂对球磨 8 h 椴木和球磨 10 h 湿地松进行预润胀、经再生后进行纤维素酶解、提取 CEL,木质素得率分别提高 9%和 5%,结果表明通过溶剂溶胀再生得到的 CEL 与传统的 CEL 相比无明显的结构差异。氯化锂/二甲基亚砷(LiCl/DMSO)溶剂体系,一直都

用作高聚物的反应溶剂介质^[10],也常用作溶解纤维素和半纤维素的溶剂,DMSO 通过破坏分子间和分子内的氢键使微纤丝发生润胀,LiCl 通过与纤维素分子中羟基上氢结合,形成氢键,并破坏纤维素晶格中的原有氢键网络,还可阻止氢键的重建^[11-12],导致结晶区破坏,进一步促进纤维原料在该体系中的溶解。LiCl/DMSO 溶剂体系是本课题组基于针叶材和阔叶材开发的全溶体系溶剂,研究结果表明球磨 2 h 的木粉可完全溶解在该体系中,再生处理后,纤维素的结晶度下降,但木质素的含量、结构没有受到影响^[13]。这样的体系也能溶解球磨稻草等非木材原料,也得到了同样的再生结果^[14-17]。

通过溶剂的溶解再生探讨稻草中化学成分溶出规律方面的研究尚未见报道。本研究用 LiCl/DMSO 溶剂体系对球磨稻草进行溶解再生,结合纤维素酶水解来研究原木质素分离的可行性,旨在通过溶解再生木质纤维原料,得到木质素的溶出行为规律,并用于分离原料中原木质素,以期获得高纯度和高得率的非木材分离木质素提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用稻草取自江苏省高邮市,原料经风干后,选取稻草的秆和叶部位,剪成约 40 mm 的段、在 Wiley 微型粉碎机中粉碎,取 40~80 目组分,用苯醇(2:1, *v/v*)抽提 8 h,经风干、真空干燥后,贮存于广口瓶中,供分析使用。

经脱脂后草片原料的化学成分见表 1,脱脂原料的处理过程见图 1。

表 1 脱脂稻草主要化学成分

Table 1 Chemical compositions of extractive free rice straw

样品 Sample	木质素含量/(mg/g) Content of lignin			高聚糖含量/(mg/g) Content of polysaccharide				灰分 含量/ (mg/g) Content of ash
	酸不溶 木质素 Klason lignin	酸溶木 质素 Acid soluble lignin	总量 Total	葡聚糖 Glucan	木聚糖 Xylan	其他 Others	总量 Total	
叶 Leaf	12.6	3.6	16.2	34.4	14.9	4.4	53.9	14.2
秆 Internode	11.3	3.1	14.4	36.6	14.8	4.1	55.4	15.8

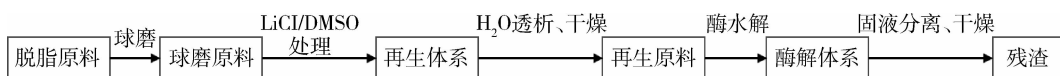


图1 脱脂稻草原料的工艺流程

Fig. 1 Technological procedure of the treatment of extractive free rice straw raw material

1.2 球磨

稻草的各部位球磨在德国 Fritsch 公司 Pulverisette 7 微型行星式高能球磨机中进行。在 45 mL 氧化锆制的罐子里称取 4 g 干燥后的脱脂草粉,内装 18 只内径 1 cm 的氧化锆球,在 600 r/min 条件下进行 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 及 8.0 h 不同时间的球磨,每运行 5 min, 休停 10 min, 以避免设备过热。球磨草粉经真空干燥后,装瓶备用。

1.3 再生处理

取球磨 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 及 8.0 h 的原料各 10 g, 分别用 90 mL 8% (w/w) LiCl/DMSO 溶剂体系处理, 室温下磁力搅拌 48 h 后, 整个混合体系全部转移入透析袋(孔径 50 Å、直径 28 mm、透过分子量为 14 000), 将透析袋浸入去离子水中进行透析, 每隔 4 h 换水, 每次用 AgNO₃ 溶液检测透析液中是否有 Cl⁻, 直至完全置换出 LiCl/DMSO 溶剂体系。透析后的物料经冷冻干燥、真空干燥后, 装瓶备用。

再生得率为再生后原料的质量占再生前球磨原料质量的百分含量。

1.4 酶水解

分别称取绝干球磨 0.5~8.0 h 的再生原料 5 g 于 250 mL 锥形瓶中, 加入酶活为 30 U/mL 的混合酶液, 按每克绝干葡聚糖为基准, 酶用量取 30 U/g, 用 pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液, 调节酶水解底物质量分数为 5%, 将 250 mL 锥形瓶置于 SHA-C 恒温振荡器中, 在 50 °C, 180 r/min 的条件下振荡反应 72 h。酶水解结束后混合体系在 5 000 r/min 下离心 15 min, 分离出的残渣依次用缓冲液和蒸馏水离心洗涤各 3 次, 酶水解残渣经冷冻干燥、真空干燥后, 保存备用。

酶水解得率为酶水解后残渣质量占酶水解前用于酶水解的再生原料质量的百分含量。

混合酶液 (Novozymes 提供) 组成: CCN03110 纤维素酶, 酶活 118 U/mL; CFN00244 木聚糖酶, 酶活 1 196 U/mL; DCN00207β-纤维二糖酶, 酶活 480 U/mL。酶活按文献[18]方法测定。

1.5 分析方法

1.5.1 化学成分测定

木质素含量、灰分的含量按照文献[19]方法测定酸不溶木质素 (Klason 木质素) 含量和灰分含量。以 4% H₂SO₄ 为参比, 水解液用日本 Shimadzu 公司的紫外-可见分光光度计 (UV-240) 测定在波长 205 nm 处的吸光度, 计算酸溶木质素的含量。木质素总量 = 酸不溶木质素含量 + 酸溶木质素含量。

高聚糖含量的测定参照文献[20]。用日本 Shimadzu 公司的气相色谱仪 (GC-14b) 分析高聚糖。气相色谱条件如下: 毛细管柱 TC-17 (0.25 mm × 30 m); FID 检测器; 柱温程序, 220 °C 保留 20 min, 进样温度, 220 °C, 检测温度, 230 °C; GC 分析得到的单糖均转换为高聚糖。同时进行 2 次测定, 取其平均值。

1.5.2 硝基苯氧化

硝基苯氧化操作可参照文献[21]。同时进行 2 次测定, 取其平均值。

1.5.3 可萃取木质素测定

按照文献[22]测定可萃取木质素的含量。同时测定 2 次, 取其平均值。萃取得率为可萃取木质素质量占样品中木质素质量的百分含量。

$$\text{可萃取木质素} = \frac{A \times D \times V}{13 \times W} \times 100\%$$

式中: A, 280 nm 的吸光度; D, 稀释倍数; V, 萃取的滤液体积, mL; W, 样品木质素绝干重, g; 13, 吸光系数。

2 结果与讨论

2.1 球磨草粉经 LiCl/DMSO 体系处理后再生得率

由表 2 可知, 木质纤维原料在生物构造和化学组成上的差异性决定了 LiCl/DMSO 溶剂体系处理不同木质纤维原料的效果会不一样。作为非木材原料, 稻草容积比重大、质地较疏松, 化学组成中木质素含量远小于木材中木质素含量, 但是稻草灰分含量较高, 再生能力普遍低于木材。另外, 稻草在化学构造上是不均一的, 叶、秆、穗和鞘等不同部位的化

学成分分布也不均匀。随着球磨作用程度的增加, 球磨稻草叶中的化学组分在 LiCl/DMSO 体系处理

过程中更易于溶出, 与稻草中秆相比, 其再生后的得率较低。

表 2 不同球磨时间 LiCl/DMSO 处理的稻草部位再生得率

Table 2 Yield of regenerated straw samples with different milling time from LiCl/DMSO %

样品 Sample	球磨时间/h Milling time					
	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
叶 Leaf	85.8	80.2	77.4	75.7	79.7	72.0
秆 Internode	90.5	89.1	87.0	85.0	82.7	75.9

2.2 球磨草粉的化学成分

2.2.1 再生处理

由表 3 可知, 随着球磨时间增加, 秆或叶中的木质素经过 LiCl/DMSO 体系处理, 水中再生后, 不同球磨时间下的木质素再生得率均下降, 在球磨初期 (0.5~2.0 h), 木质素得率在 80% 以上, 随着球磨

的继续, 再生后木质素的保留越来越少, 球磨的处理会导致小粒径或小分子量的木质素产生, 并能在 LiCl/DMSO 溶剂体系处理过程中进一步溶出, 木质素的再生得率因此下降。另外发现, 在相同球磨的处理条件下, 稻草秆中木质素的再生得率要高于叶中的木质素。

表 3 再生球磨稻草各部位木质素和灰分含量(基于原料)

Table 3 Content of lignin and ash of regenerated straw samples (based on raw material)

样品 Sample	球磨时间/h Milling time	木质素含量/(mg/g) Content of lignin			灰分/(mg/g) Ash	木质素 得率/ % Lignin yield	灰分 得率/ % Ash yield
		酸溶 Acid soluble lignin	酸不溶 Klason lignin	总量 Total			
叶 Leaf	0.5	25.1	112.0	136.9	97.2	84.8	69.0
	1.0	23.2	108.0	131.4	100.0	81.1	71.1
	2.0	23.0	109.3	131.6	93.4	82.2	65.5
	4.0	21.8	104.3	126.0	98.8	78.1	69.8
	6.0	25.3	96.2	122.0	93.4	75.5	66.2
	8.0	16.6	88.4	104.7	88.3	65.2	62.4
秆 Internode	0.5	18.8	115.8	134.7	58.0	93.9	36.7
	1.0	17.1	116.0	132.8	55.2	92.8	34.9
	2.0	16.0	110.6	128.4	54.4	89.1	34.4
	4.0	16.0	108.0	122.8	56.2	86.0	35.6
	6.0	18.9	106.9	121.0	54.8	84.7	35.2
	8.0	17.4	88.5	105.6	44.9	74.0	28.9

注: 木质素得率, % = 再生后原料中总木质素含量 × 再生得率 / 再生前球磨原料中的总木质素含量 × 100%。灰分得率, % = 再生后原料中灰分含量 × 再生得率 / 再生前球磨原料中的灰分含量 × 100%。

Note: lignin yield, % = total lignin content in regenerated raw material × regenerated yield / total lignin content in original raw material × 100%; ash yield, % = ash content in regenerated raw material × regenerated yield / ash content in original raw material × 100%.

球磨时间的长短决定球磨作用的程度,其对稻草中叶、秆部位中灰分的保留也有一定的影响,叶中灰分的得率在整个球磨时间内几乎保持在65%左右,灰分的保留随球磨时间长短的变化不大,说明LiCl/DMSO溶剂体系的处理对于叶中灰分的留着几乎没有影响。与叶中灰分溶出相比,稻草秆中的灰分更容易溶出,在球磨时间0.5~8.0 h,只有近30%灰分在LiCl/DMSO溶剂体系再生过程中

保留。

由表4可知,随着球磨时间的增加,高聚糖的再生得率也逐渐下降,球磨作用会产生小分子的糖,在LiCl/DMSO溶剂体系的再生中会进一步溶出,使得高聚糖再生得率下降。但在球磨4.0 h时,高聚糖含量仍在440.0 mg/g以上,结合表3,球磨4.0 h草粉经溶剂再生后仍能得到高得率的木质素和高聚糖。

表4 球磨稻草再生后各部位高聚糖含量(基于原料)

Table 4 Polysaccharide content of regenerated straw samples (based on raw material)

样品 Sample	球磨时间/h Milling time	高聚糖含量/(mg/g) Content of polysaccharide				高聚糖 得率/% Sugar yield
		葡聚糖 Glucan	木聚糖 Xylan	其他 Other	总量 Total	
叶 Leaf	0.5	311.1	133.3	28.3	472.7	87.9
	1.0	313.1	127.3	17.2	456.5	84.9
	2.0	312.1	129.3	18.2	460.6	85.6
	4.0	309.1	118.2	15.2	442.4	82.3
	6.0	300.0	112.1	15.2	427.2	79.4
	8.0	270.7	71.7	9.1	351.5	65.3
秆 Internode	0.5	354.5	142.4	16.2	512.1	92.1
	1.0	325.2	138.4	23.2	486.8	87.5
	2.0	305.0	124.2	14.1	443.4	79.7
	4.0	309.1	129.3	8.1	447.4	80.3
	6.0	304.0	123.2	4.0	430.3	77.4
	8.0	298.0	101.0	8.1	407.0	73.1

注:高聚糖得率,%=再生后原料中高聚糖总糖含量×再生得率/再生前球磨原料中的高聚糖总糖含量×100%。

Note: polysaccharide yield,% = total polysaccharide content in regenerated raw material × regenerated yield/total polysaccharide content in original raw material × 100%.

2.2.2 酶水解处理

由表5可知,再生稻草原料随着球磨时间的延长,其酶水解得率会进一步降低。

Zhang等^[23]以球磨木粉为原料,经LiCl/DMSO溶剂体系处理、乙醇再生,分离木质素,但木质素得率比较低。在本研究中将球磨稻草粉经LiCl/DMSO溶剂体系处理,在水中透析再生,随后进行酶水解得到以木质素为主的残渣。由表6和表7可知,随着球磨作用的进一步加强,稻草秆和叶中的木质素的再

生得率呈现出下降趋势,叶子的木质素得率经纤维素酶水解后从74.8%下降至48.7%,稻草秆中木质素的得率从84.6%下降至63.1%,下降的幅度比叶小。与稻草秆相比,叶中木质素在LiCl/DMSO溶剂体系处理过程中溶出较多。木质素经溶剂再生后得率普遍不高,可能是由于稻草木质素中醚键链接在球磨、再生处理过程中遭到断裂;也可能是稻草中有部分木质素链接到高聚糖的大分子结构上。

表 5 再生球磨稻草各部位酶水解残渣得率 (基于原料)

样品 Sample	球磨时间/h Milling time					%
	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	
秆 Internode	47.1	31.8	29.8	29.4	27.2	25.7
叶 Leaf	31.0	28.2	26.1	23.3	22.3	21.7

表 6 再生稻草各部位酶水解后的木质素和灰分含量 (基于原料)

Table 6 Lignin and ash content of enzymatic hydrolysis residual of regenerated straw samples (based on raw material)

样品 Sample	球磨时间/h Milling time	木质素含量/(mg/g) Content of lignin			灰分 含量/ (mg/g) Content of ash	木质素 得率/ % Lignin yield	灰分 得率/ % Ash yield
		酸溶 Acid soluble	酸不溶 Klason	总量 Total			
		叶 Leaf	0.5	13.1			
叶 Leaf	1.0	11.1	107.1	121.2	89.9	74.6	62.9
	2.0	8.1	81.8	88.9	87.9	54.9	61.3
	4.0	7.1	81.8	88.9	88.9	54.7	62.1
	6.0	7.1	78.8	84.8	82.8	52.4	58.4
	8.0	7.1	72.7	78.8	78.8	48.7	55.0
秆 Internode	0.5	7.1	115.1	122.2	52.5	84.6	33.0
	1.0	6.1	112.1	118.2	48.5	81.7	30.5
	2.0	5.1	105.0	110.1	49.5	76.2	31.1
	4.0	4.0	100.0	104.0	45.5	71.8	28.4
	6.0	4.0	98.0	102.0	45.5	70.6	29.0
	8.0	4.0	86.9	90.9	38.4	63.1	24.0

注:木质素得率,%=酶水解后残渣中总木质素含量×再生得率×酶水解得率/再生前球磨原料中的总木质素含量×100%。灰分得率,%=酶水解后残渣中灰分含量×再生得率×酶水解得率/再生前球磨原料中的灰分含量×100%。

Note: lignin yield,% = total lignin content in enzymatic hydrolyzed residue × regenerated yield × hydrolyzed yield/total lignin content in original raw material × 100%; ash yield,% = ash content in enzymatic hydrolyzed residue × regenerated yield × hydrolyzed yield/ash content in original raw material × 100%.

再生球磨稻草中的大部分糖都在酶水解过程中生成小分子的糖溶出,见表 7。在木质纤维原料进行生物乙醇转化过程中,原料的预处理是生物炼制中的关键。预处理的目的是:1)破坏纤维素、木质素、半纤维素之间的连接;2)破坏纤维素内部氢键,降低结晶度,促进纤维素结晶无定型化;3)提高

底物的孔隙率和比表面积^[21-22]。预处理的最终目的都是为了增加纤维素的可及性,使纤维素酶可以进入木质纤维原料内部与高聚糖充分接触。而且有报道指出木质素的存在会对纤维素酶解过程产生影响,木质素是天然的生物质抗降解屏障,其含量越高,对纤维素和酶的屏蔽作用越大,酶水解效率越低^[24-27]。

表7 再生稻草各部位酶水解后的高聚糖含量(基于原料)

Table 7 polysaccharide content of enzymatic hydrolysis residual of regenerated straw samples

样品 Sample	球磨时间/h Milling time	高聚糖含量/(mg/g) Content of polysaccharide				高聚糖 得率/% Sugar yield
		葡聚糖 Glucan	木聚糖 Xylan	其他 Other	总量 Total	
		叶 Leaf	0.5	59.6	48.5	
	1.0	26.3	30.3	15.2	71.7	13.4
	2.0	21.2	25.3	13.1	59.6	11.2
	4.0	12.1	13.1	11.1	36.4	6.7
	6.0	14.1	12.1	12.1	38.4	7.1
	8.0	8.1	4.0	13.1	25.3	4.7
秆 Internode	0.5	40.4	35.4	8.1	84.8	15.3
	1.0	18.2	23.2	9.1	49.5	9.0
	2.0	14.1	15.2	8.1	37.4	6.7
	4.0	6.1	10.1	8.1	24.2	4.9
	6.0	9.1	11.1	8.1	28.3	5.1
	8.0	7.1	7.1	7.1	21.2	3.7

注:高聚糖得率,%=酶水解后残渣中高聚糖总含量×再生得率×酶水解得率/再生前球磨原料中的高聚糖总糖含量×100%。

Note: polysaccharide yield,% = total polysaccharide content in enzymatic hydrolyzed residue × regenerated yield × hydrolyzed yield / total polysaccharide content in original raw material × 100%.

因此,在酶水解之前有必要对纤维原料进行预处理,改善纤维素对酶的可及性。本研究中以球磨稻草为原料,通过 LiCl/DMSO 溶剂体系润胀处理、破坏纤维素结晶区,降低结晶度,碳水化合物降解溶出,但木质素含量及结构不受溶剂处理的影响。比较稻草中不同部位的酶解结果可知,相同球磨条件下稻草秆更易于酶解。

2.3 可萃取木质素分析

由图2可知,随着球磨时间的增加,球磨稻草中可萃取木质素的含量会进一步增加,经球磨机械处理的作用,里面的木质素有更多裸露出来,草粉颗粒的粒径越来越小,比表面积越来越大,经溶剂萃取后,可萃取木质素的含量逐渐增加。从图中可以看出,球磨初期,球磨时间短,可萃取木质素的含量变化小,球磨处理带来的木质素结构变化也小,基本保留了草粉中原木质素的结构。随着球磨的继续,在球磨时间为8.0 h时,秆中的可萃取木质素得率达

到33.4%,叶为29.1%,都比球磨初期提高了1倍。Fujimoto等^[22,28]认为当球磨设备、球磨条件、或者球磨强度都不一样时候,球磨时间是不适合作为球磨作用对木质素结构的影响标准。如果球磨样品中可萃取木质素的得率相同,即使球磨处理条件不同,球磨设备不一样,也可认为由球磨作用导致的木质素结构变化是一样的,可建议用球磨样品的可萃取木质素得率来评判物料的球磨程度。球磨前2 h的草粉在木质素结构上可认为是没有差异的。

由图3可知,在球磨初期(0.5~2.0 h),球磨稻草经再生处理后,有更多的木质素会游离出来,经水透析再生后,更多木质素被留下,因此,有机溶剂萃取后游离木质素的含量也高。相较于再生前,球磨初期秆和叶中的可萃取木质素的含量都有一定的提高,且高于球磨再生前的可萃取木质素含量。对球磨初期的样品,LiCl/DMSO溶剂体系处理对稻草叶的效果尤其明显。

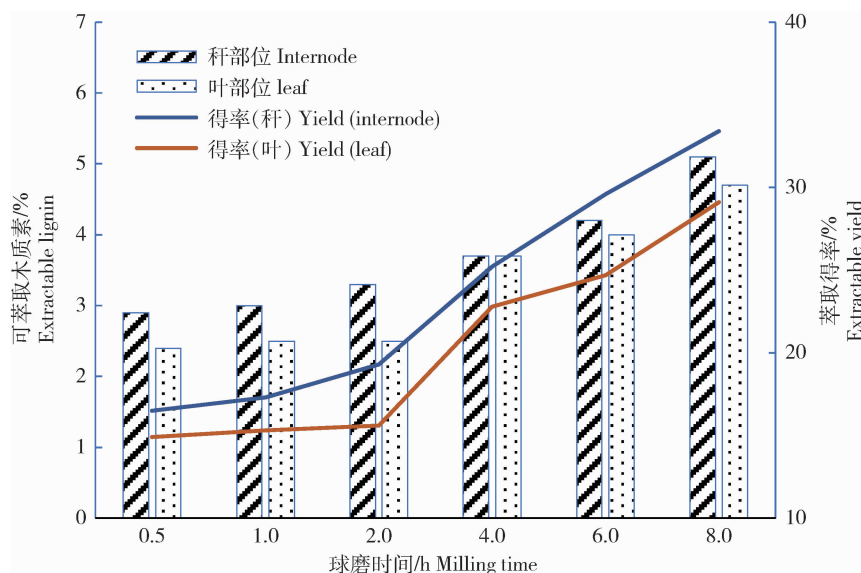


图 2 球磨稻草中各部位的可萃取木质素 (EL)

Fig. 2 Extractable lignin content of ball milled straw samples

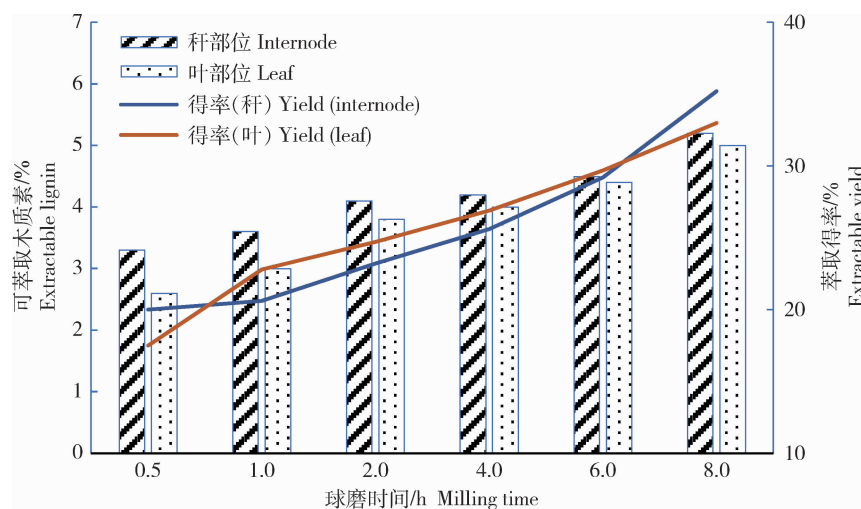


图 3 再生球磨稻草中各部位的可萃取木质素 (EL)

Fig. 3 Extractable lignin content of regenerated straw samples

由图 4 可知,再生处理会促进更多的木质素游离出来,再生原料经纤维素酶水解后,更多的高聚糖会溶出,木质素纯度也随之提高,来自高聚糖的阻碍减少了,在溶剂体系中的溶出量会进一步得到提高。球磨作用的程度会影响可萃取木质素的溶出,球磨越激烈,酶水解残渣中可萃取木质素含量越高,其中稻草秆溶出的木质素更多。

2.4 木质素结构单元的变化

稻草木质素中的结构单元不同于针叶材(以愈创木基为主),也不同于阔叶材(以愈创木基和紫丁香基为主),其结构单元包括愈创木基、对羟

基苯基及紫丁香基。碱性硝基苯氧化反应一般用于木质素的结构单元分析,未缩合的对羟基苯基、愈创木基和紫丁香基单元在高温碱性条件下分别氧化为对羟基苯甲醛(H)、香草醛(V)和紫丁香醛(S)。由表 8 可知,稻草秆中木质素的结构单元包括愈创木基、对羟基苯基及紫丁香基,球磨时间 0.5~8.0 h 时,其得率均为 255.3 mg/g,木质素中未缩合单元在球磨过程中基本没有变化,S/(V+H)的摩尔比在整个球磨过程中变化不大,因此,球磨时间长短对稻草秆中木质素结构基本单元影响甚微。

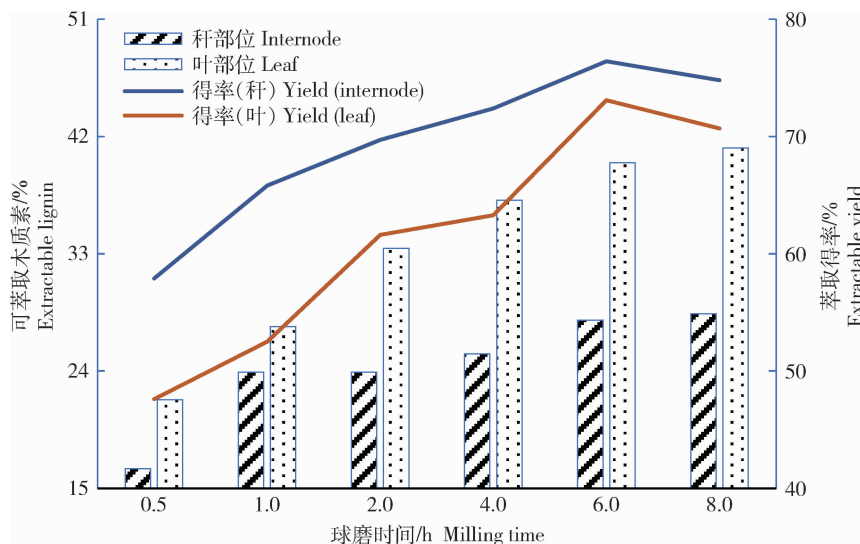


图4 再生球磨稻草酶水解后残渣中的可萃取木质素(EL)

Fig. 4 Extractable lignin of enzymatic hydrolysis residual of regenerated straw samples

表8 稻草秆部位的硝基苯氧化产物的得率及S/(H+V)摩尔比

Table 8 Nitrobenzene oxidation products yields and S/(H+V) molar ratio of internode sample

球磨时间/h Milling time	得率/(mg/g) Yield			S/(H+V)		
	原料 Original	再生 Regenerated	残渣 Enzymatic residue	原料 Original	再生 Regenerated	残渣 Enzymatic residue
0.5	255.3	255.3	225.2	0.6	0.6	0.6
1.0	255.3	255.3	225.2	0.6	0.6	0.6
2.0	255.3	255.3	210.2	0.6	0.6	0.6
4.0	255.3	225.2	195.2	0.6	0.6	0.6
6.0	255.3	210.2	210.2	0.6	0.6	0.6
8.0	240.2	240.2	195.2	0.6	0.6	0.6

注:S,紫丁香醛;H,对羟基苯甲醛;V,香草醛。下同。

Note: S, syringaldehyde; H, p-hydroxybenzaldehyde; V, vanillin. The same below.

在球磨初期(0.5~2.0 h),再生后稻草秆的硝基苯氧化产物的得率、S/(V+H)比例与未经处理的球磨原料相当,说明再生处理几乎保留了原料中的未缩合单元的木质素。酶水解后残渣中木质素的未缩合单元的得率降低,缩合程度有所增加,木质素大分子结构其本身不会在酶水解过程中破坏、溶出,但在纤维素酶水解过程中,会有一些木质素-碳水化合物复合物(LCC)溶出,留在残渣中的木质素不影响原本木质素的结构分析。

由表9可知,球磨时间的长短对稻草叶中木质素未缩合单元的得率基本没有影响。不同时间的球

磨作用下,球磨稻草叶中木质素结构的未缩合单元含量要低于稻草秆,其缩合程度要高于秆部位。

经LiCl/DMSO溶剂体系再生后,叶中木质素的缩合程度提高了,再生处理后,木质素有约1/5的溶出,溶出部分会带走部分未缩合单元木质素,使得硝基苯氧化后木质素结构单元的得率降低,缩合程度提高;纤维素酶水解后,部分未缩合木质素随着LCC的溶出而溶出,酶水解残渣硝基苯氧化得率随之降低,缩合程度进一步提高。稻草秆的情况与叶有所不同,主要因为叶和秆在木质素的结构单元的含量、组成和分布上有差异。

表 9 稻草叶部位的硝基苯氧化产物的得率及 S/(V+H)摩尔比

Table 9 Nitrobenzene oxidation products yields and S/(V+H) molar ratio of leaf samples

球磨时间/h Milling time	得率/(mg/g) Yield			S/(V+H)		
	原料 Original	再生 Regenerated	残渣 Enzymatic residue	原料 Original	再生 Regenerated	残渣 Enzymatic residue
0.5	225.2	195.2	210.2	0.6	0.6	0.6
1.0	225.2	195.2	180.2	0.6	0.6	0.6
2.0	225.2	195.2	180.2	0.6	0.6	0.6
4.0	225.2	210.2	180.2	0.6	0.6	0.6
6.0	225.2	210.2	165.2	0.6	0.6	0.6
8.0	210.2	180.2	165.2	0.6	0.6	0.6

3 结 论

以脱脂稻草的秆和叶为原料,分别经 LiCl/DMSO 溶剂体系处理,可得到如下结论:

1)球磨时间的长短会影响稻草中木质素、高聚糖的再生得率,秆中木质素和高聚糖的再生得率比叶部位的高,灰分的保留则较低。球磨原料中灰分的再生能力不受球磨操作条件影响。

2)LiCl/DMSO 溶剂体系处理可促进稻草秆和叶木质素的溶出,经过 LiCl/DMSO 溶剂体系处理的秆更易于进行酶水解。

3)球磨 1.0~8.0 h 的原料,经 LiCl/DMSO 溶剂体系再生和酶水解处理后,分离出的木质素:叶中木质素含原料原本木质素的 48.7%~74.6%,葡聚糖为 4.7%~13.4%;秆部位中木质素含原料中木质素的 63.1%~81.7%,葡聚糖为 3.7%~9.0%,都能代表原球磨原料中的木质素。其中从球磨 1.0~2.0 h 的叶、秆分离出来的木质素得率高、纯度高,可用于原料中原木质素的结构解析。

参考文献 References

[1] Rinaldi R, Jastrzebski R, Clough M T, Ralph J, Kennema M, Buijninx P C, Weckhuysen B M. Paving the way for lignin valorisation: Recent advances in bioengineering, biorefining and catalysis[J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 55(29): 8164-8215

[2] Swatloski R P, Spear S K, Holbrey J D, Rogers R D. Dissolution of cellulose with ionic liquids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(18): 4974-4975

[3] Fasching M, Schröder P, Wollboldt R P. A new and facile method for isolation of lignin from wood based on complete wood dissolution[J]. *Holzforchung*, 2008, 62(1): 15-23

[4] Papa G, Varanasi P, Sun L, Cheng G, Stavila V, Holmes B, Simmons B A, Adani F, Singh S. Exploring the effect of different plant content and composition on ionic liquid pretreatment efficiency and enzymatic saccharification of *Eucalyptus globules* mutants[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117(15): 352-359

[5] Sun S N, Li M F, Yuan T, Xu F, Sun R C. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43(3): 570-577

[6] Li B, Asikkala J, Filpponen I, Argyropoulos D S. Factors affecting wood dissolution and regeneration of ionic liquids[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, 49(5): 2477-2484

[7] Qiu Z, Aita G M, Walker M S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117(15): 251-256

[8] Kilpeläinen I, Xie H B, King A, Granstrom M, Heikkinen S, Argyropoulos D S. Dissolution of wood in ionic liquids[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(22): 9142-9148

[9] Zhang A P, Liu C F. Isolation of cellulolytic enzyme lignin from wood preswollen/dissolved in dimethyl sulfoxide/N-methylimidazole [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(21): 11287-11293

[10] Zhang X Q, Chen M J, Liu C F, Sun R C. Dual-Component system dimethyl sulfoxide/LiCl as a solvent and catalyst for homogeneous ring-opening grafted polymerization of ϵ -caprolactone onto xylan[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(3): 682-690

- [11] Petruš L, Gray D G, BeMiller J N. Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/dimethyl sulfoxide solvent with dimethyl sodium activation[J]. *Carbohydrate Research*, 1995, 268(2): 319-323
- [12] Suzanne E B, Gijs E, Henk A S. The solubility of primary plant cell wall polysaccharides in LiCl-DMSO[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 200(22): 332-340
- [13] Wang Z, Yokoyama T, Chang H M, Matsumoto Y. Dissolution of beech and spruce milled woods in LiCl/DMSO[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(14): 6167-6170
- [14] Cao T Y, Jiang B, Gu F, Wu W J, Jin Y C. Characterization of lignin isolated from wheat leaf based on LiCl/DMSO dissolution and regeneration[J]. *Bioresources*, 2016, 11(4): 9676-9685
- [15] Gu F, Wu W J, Wang Z G, Yokoyama T, Jin Y C, Matsumoto Y. Effect of complete dissolution in LiCl/DMSO on the isolation and characteristics of lignin from wheat straw internode[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 74(6): 703-711
- [16] Jiang B, Cao T Y, Gu F, Wu W J, Jin Y C. Comparison of the structural characteristics of cellulolytic enzyme lignin preparations isolated from wheat straw stem and leaf[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(1): 342-349
- [17] Wu W J, Wang Z G, Jin Y C, Zhai H M. Effects of LiCl/DMSO dissolution and enzymatic hydrolysis on the chemical composition and lignin structure of rice straw[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 71(12): 357-362
- [18] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure & Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268
- [19] Dence C W, Lin S Y. *Introduction in Methods in Lignin Chemistry*[M]. Heidelberg: Springer Verlag Press, 1992
- [20] Borchardt L G, Piper C V. A gas chromatographic method for carbohydrates as alditol-acetates[J]. *Tappi*, 1970, 53: 257-260
- [21] Lin S Y, Dence C W. *Methods in Lignin Chemistry*[M]. Berlin: Springer-Verlag Press, 1992
- [22] Fujimoto A, Matsumoto Y, Chang H M, Meshitsuka G. Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin[J]. *Journal of Wood Science*, 2005, 51(1): 89-91
- [23] Zhang X M, Yuan T Q, Peng F, Xu F. Separation and structural characterization of lignin from hybrid poplar based on complete dissolution in LiCl/DMSO[J]. *Separation Science Technology*, 2010, 45(16): 2497-2506
- [24] Guo H, Chang Y, Lee D. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 252(6): 198-215
- [25] Dos Santos A C, Ximenes E, Kim Y, Michael R. Lignin-enzyme interactions in the hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 37(5): 1-14
- [26] Zeng Y N, Zhao S, Yang S H, Ding S Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27(3): 38-45
- [27] Ponnusamy V, Nguyenc D, Dharmarajad J, Shobana S, Banu J R, Saratale R G, Chang S W, Kumar G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271(11): 462-472
- [28] Hu Z, Yeh T F, Chang H M, Matsumoto Y, Kada J F. Elucidation of the structure of cellulolytic enzyme lignin[J]. *Holzforchung*, 2006, 60(4): 389-397

责任编辑: 吕晓梅