

互花米草中温厌氧发酵木质纤维结构的变化

李继红^{1,2}, 杨世关², 郑正^{2*}, 陈广银², 邹星星², 孟卓²

(1. 生物质发电成套设备国家工程实验室, 华北电力大学可再生能源学院, 北京 102206;

2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093)

摘要: 采用扫描电子显微镜 (SEM)、傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 和 X 射线衍射 (XRD) 对互花米草中温 (35℃) 厌氧发酵前后木质纤维结构的变化进行了对比分析。结果表明, 互花米草茎秆的生物降解主要发生在维管束组织部位, 而薄壁细胞是一种生物难降解组织; 发酵 60 d 后互花米草木质素的相对含量升高, 木质素官能团所对应的 FTIR 光谱的特征峰的峰强与其纤维素和半纤维素所对应的特征峰的峰强的比值是发酵前的 2 倍以上; 厌氧发酵使互花米草的结晶度有所降低, 由发酵前的 0.510 降到了 0.479。总之, 木质素对纤维素和半纤维素的包裹作用, 以及纤维素的结晶结构是影响互花米草厌氧生物转化的主要因素。

关键词: 木质纤维结构, 厌氧发酵, 降解, 互花米草

中图分类号: X705

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)-2-0199-05

李继红, 杨世关, 郑正, 等. 互花米草中温厌氧发酵木质纤维结构的变化[J]. 农业工程学报, 2009, 25(2): 199—203.
Li Jihong, Yang Shiguan, Zheng Zheng, et al. Effect of anaerobic fermentation of *Spartina alterniflora* under mesophilic conditions on the changes of lignocellulosic structure[J]. Transactions of the CSAE, 2009,25(2): 199—203.(in Chinese with English abstract)

0 引言

互花米草 (*Spartina alterniflora*) 是一种分布广泛、生物量很高的盐沼植被。1979 年引入中国, 在消浪护岸、保滩促淤等方面起了积极的作用, 但其快速扩张也引起了一系列的生态和环境问题, 因此 2003 年国家环保局将其确定为生物入侵种^[1]。作者前期开展的研究表明, 通过厌氧发酵将互花米草转化为沼气是开发利用这种资源的一种潜在的有效途径, 但目前尚存在转化率的问题。

互花米草作为一种多年生禾本科植物, 其细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[2]。木质素与纤维素和半纤维素等碳水化合物结合在一起形成“木质素—碳水化合物联合体”(Lignin-carbohydrate complexes, LCC)。LCC 能保护植物细胞免受微生物的攻击, 从而对植物的生长起到保护作用, 而这也成了这类原料厌氧生物降解面临的主要障碍^[3]。Lissens 等人研究认为 LCC 的生物降解率最高只能达到纯碳水化合物生物降解率的 50% (< 200 mL/g)^[4]。在 LCC 中, 纤维素和半纤维素与木质素之间有化学连接, 而纤维素和半纤维之间没有化学连接, 只有结合比较紧密的物理连接。这种连接作用使得纤维

素酶难以接近纤维素^[5]。木质素对木质纤维原料生物降解的阻碍, 被认为主要是由木质素对纤维素等的屏蔽产生的物理性抑制作用引起的, 而不是化学抑制的结果。木质素在纤维素纤维中的存在, 降低了原料可利用表面, 从而阻碍了微生物和酶与易生物降解部分的接触^[6,7]。据此推断, 导致互花米草厌氧发酵转化率的主要原因应是结构抑制。文献检索发现目前还没有针对此所开展的研究, 因此, 为了深入认识互花米草厌氧发酵存在的结构性抑制问题, 本文采用扫描电子显微镜 (SEM)、傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 和 X 射线衍射 (XRD) 等手段对互花米草厌氧发酵前后结构的变化进行了研究, 以便为有针对性地削弱互花米草木质纤维结构对其厌氧发酵的抑制提供理论依据。

1 材料与方法

研究过程中, 分别取未发酵的和中温厌氧发酵 60 d 的互花米草作为测试样品, 采用扫描电子显微镜 (SEM)、X 射线衍射 (XRD) 和傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 分析发酵前后互花米草的物理和化学结构的变化。其中 SEM 的一组观察样品取的是发酵 4 d 和 6 d 后的互花米草, 未发酵米草的 SEM 观察结果见参考文献[2]。

样品 SEM 观察: 将从发酵瓶取出的互花米草用蒸馏水冲洗干净后放在冷冻干燥机内干燥 48 h, 取出后切片, 然后用双面胶带粘贴在样品台上, 喷金镀膜后利用 Philips XL30 型环境扫描电镜观察照相。

样品 FTIR 分析: 取未发酵和发酵后互花米草的冻干样品, 用高速粉碎机粉碎, 然后取过 100 目筛的粉状样品少许放入玛瑙研钵中, 加入适量干燥 KBr 晶体, 磨细

收稿日期: 2008-06-11 修订日期: 2008-10-20

基金项目: 中国博士后科学基金 (20060400277); 江苏省博士后科研资助计划 (0602016B)

作者简介: 李继红 (1972—), 女, 河南禹州人, 博士, 从事生物质厌氧生物转化技术研究。北京市德外朱辛庄 华北电力大学可再生能源学院, 102206。Email: yzlijihong@163.com

*通讯作者: 郑正 (1957—), 男, 江苏南京人, 教授、博士生导师, 从事固体废弃物资源化技术研究。南京市汉口路 22 号 南京大学环境学院, 210093。Email: zzheng@nju.edu.cn

混匀, 取少许磨细样品压片后在美国 Nicolet 公司生产的 NEXUS-870 型 FTIR 光谱仪上进行测定。根据 FTIR 测试结果分析互花米草官能团的变化, 进而研究其化学结构的变化。用 OMNIC (version 7.3) 软件绘制谱图并进行峰高、峰面积的计算。基线的处理采用两点基线法, 即将被分析谱带两边的两个最低点连起来作为基线。峰顶到基线的垂直距离即为峰高, 基线和峰围成的面积即为峰面积。采用 1512 cm^{-1} 处木质素所对应的特征峰的峰强和 1730 、 1375 、 1158 和 895 cm^{-1} 处纤维素和半纤维素所对应的特征峰的峰强的比值分析发酵前后 3 种成分相对含量的变化^[8]。

样品 XRD 分析: 取粉碎且过 100 目筛的样品, 用瑞士 ARL 公司生产的 X'TRA 型 X 射线衍射仪进行分析。X

光管为铜靶, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, 采用 2θ 联动扫描, 扫描范围 5° 至 40° , 取样间隔 0.02° 。并根据下式计算纤维素的结晶指数^[9]:

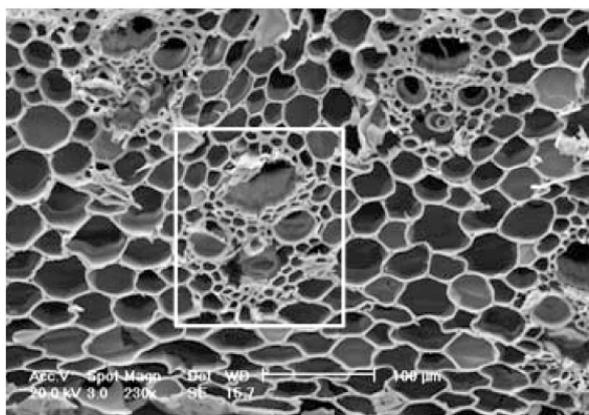
$$C_r I = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}}$$

式中 $C_r I$ ——结晶指数; I_{002} —— $2\theta=22^\circ$ 附近 (002) 晶面衍射强度; I_{am} ——无定形区衍射强度, 对于天然纤维素, 为 2θ 接近 18° 时的衍射强度。

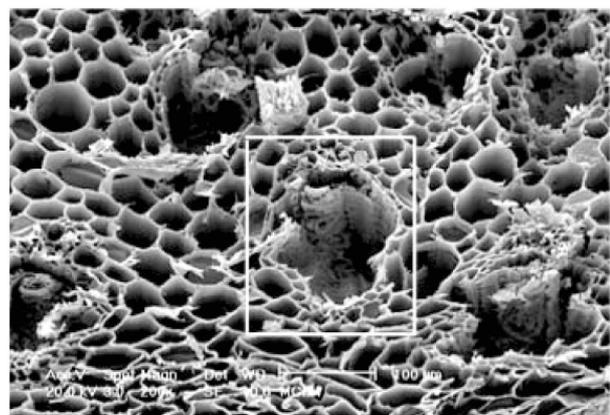
2 结果与分析

2.1 SEM 分析

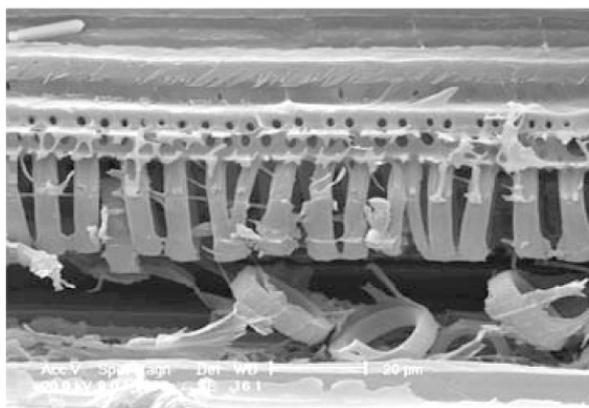
发酵 4 d 后和 60 d 后互花米草茎秆部位的 SEM 观察结果见图 1。



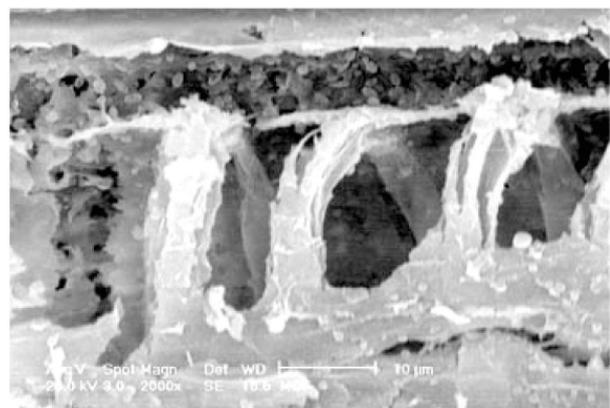
a. 发酵 4 d 后维管束结构 (SEM×230)



b. 发酵 60 d 后维管束结构 (SEM×200)



c. 发酵 4 d 后导管结构 (SEM×1000)



d. 发酵 60 d 后导管结构 (SEM×2000)

图1 互花米草厌氧发酵4 d和60 d后的茎秆部SEM图

Fig.1 Scanning electron microscopic graphs of stem of the *S. alterniflora* digested for 4 and 60 days

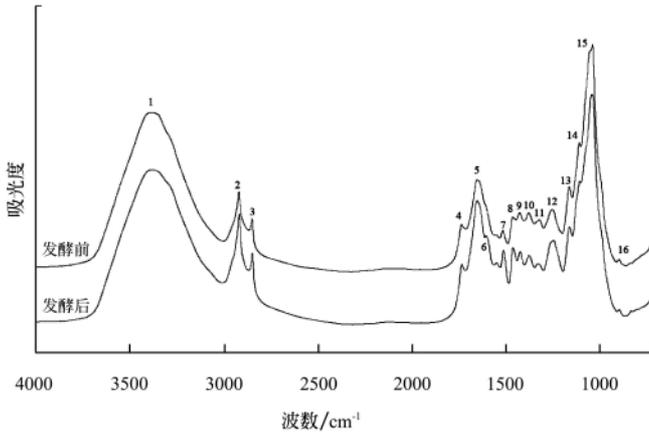
禾本科植物的纤维细胞主要生长在维管束和纤维组织带中, 维管束组织主要由纤维、导管和筛管等组成^[10]。对比图1a和b可以发现, 发酵结束后维管束组织 (方框内部分) 发生了明显降解, 这主要是由于纤维细胞的降解造成的。而维管束周围的薄壁细胞, 却基本没发生降解。薄壁细胞难降解的原因可能是其木质化程度较高, 因为植物不同组织的生物降解性的差异反映了其木质化程度的差异^[11]。也可能与其所含木质素的分子量有关, 翟华

敏等人研究发现麦草薄壁细胞磨木木质素的分子量比纤维细胞磨木木质素的分子量大^[12]。图1c和d显示了导管结构的变化, 发酵开始4 d后导管壁已发生了明显的降解, 使得内部的木质化环状增厚的次生壁暴露出来, 为微生物降解环状次生壁提供了便利。发酵结束后环状次生壁虽然发生了较为严重的降解, 但其结构轮廓依然被保留了下来, 而且观察还发现许多环状次生壁并未发生明显降解 (没在图中显示), 由此可以看出这部分组织的生

物降解性是比较差的。因此，根据SEM观察结果可以认为，互花米草秆部的厌氧生物降解主要发生在维管束组织，而薄壁组织是难生物降解的。

2.2 FTIR 分析

互花米草厌氧发酵前和发酵 60 d 后的 FTIR 谱图如图 2 所示。将图 2 所示互花米草 FTIR 谱图的谱峰进行归属分析，结果见表 1^[8,13,14]。



注：图上数字为峰标号

图2 互花米草厌氧发酵前以及中温厌氧发酵60 d后FTIR谱图
Fig.2 Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR) spectra of the *S. alterniflora* before digestion and after digestion for 60 days at 35°C under mesophilic conditions

表 1 互花米草 FTIR 光谱谱峰归属

Table 1 Peak assignments of FTIR spectra of *S. alterniflora*

峰标号	波数/cm ⁻¹	谱峰归属
1	3365	纤维素羟基官能团的 O-H 伸缩振动
2	2920	-CH ₂ 官能团的 C-H 伸缩振动
3	2852	-CH ₃ 官能团的 C-H 伸缩振动
4	1730	半纤维素中未键和的 C=O 伸缩振动
5	1653	O-H 和共轭 C-O 振动
6	1606	木质素中苯环骨架的伸缩振动
7	1512	木质素中苯环骨架的伸缩振动
8	1461	木质素和碳水化合物中 C-H 的弯曲振动
9	1425	木质素和碳水化合物中 C-H 的弯曲振动
10	1375	纤维素和半纤维素中 C-H 的变形振动
11	1328	纤维素中 C-H 和紫丁香基衍生物中 C-O 的振动
12	1246	木质素中紫丁香基芳香环和 C-O 的伸缩振动
13	1162	纤维素和半纤维素中 C-O-C 的振动
14	1109	苯环的骨架振动和 C-O 的伸缩振动
15	1050	纤维素和半纤维素中 C-O 伸缩振动
16	895	纤维素中 C-H 弯曲振动

2920 cm⁻¹ 处 -CH₂ 官能团的 C-H 伸缩振动峰的峰高和峰面积分别由发酵前的 0.249 和 9.801 增加到了发酵后的 0.351 和 14.159。2852 cm⁻¹ 处 -CH₃ 官能团的 C-H 伸缩振动峰的峰高和峰面积分别由发酵前的 0.095 和 1.049 增加到了发酵后的 0.157 和 1.888。造成上述变化的原因

长链被切断，从而使 -CH₂ 和 -CH₃ 增加的缘故。FTIR 光谱指纹区 (1800~600 cm⁻¹) 的变化也很明显，特别是木质素苯环振动峰的变化。1512 cm⁻¹ 处木质素苯环骨架的伸缩振动峰的峰高和峰面积分别由发酵前的 0.054 和 0.985 提高到了发酵后的 0.140 和 2.741，是发酵前的 2.6 和 2.8 倍；1246 cm⁻¹ 处木质素中紫丁香基芳香环和 C-O 的伸缩振动峰的峰高和峰面积也分别由发酵前的 0.124 和 5.862 提高到了发酵后 0.176 和 10.163；而且，发酵结束后 1606 cm⁻¹ 处苯环骨架的伸缩振动峰也显现了出来。这种变化主要与木质素是一种难生物降解的高分子化合物有关^[7,15]。由于木质素基本上不发生降解或降解程度很低，所以随着纤维素和半纤维素的降解其所占的比例就会提高。下面通过 1512 cm⁻¹ 处木质素所对应的特征峰和纤维素、半纤维素所对应的特征峰的峰强度比值来分析木质素和纤维素、半纤维素相对含量的变化，结果见表 2。

表 2 互花米草发酵前后木质素与碳水化合物特征峰强度比值
Table 2 Ratios of the intensity of characteristic peak of lignin to that of carbohydrate for *S. alterniflora* before and after digestion

样品	苯环骨架振动的相对强度 I ₁₅₁₂ 与碳水化合物特征峰相对强度的比值			
	I ₁₅₁₂ /I ₁₇₃₀	I ₁₅₁₂ /I ₁₃₇₅	I ₁₅₁₂ /I ₁₁₆₂	I ₁₅₁₂ /I ₈₉₅
未发酵互花米草	1.13 (1.23)	1.00 (0.63)	0.42 (0.32)	2.52 (2.70)
发酵后互花米草	2.16 (2.95)	2.23 (1.71)	1.16 (1.11)	7.56 (11.51)

注：括号外是根据峰高计算出的比值，括号内是根据峰面积计算出的比值。

由表 2 可以看出，厌氧发酵后互花米草 I₁₅₁₂/I₁₇₃₀、I₁₅₁₂/I₁₃₇₅、I₁₅₁₂/I₁₁₆₂ 和 I₁₅₁₂/I₈₉₅ 的比值均较发酵前有了显著提高，均为未发酵互花米草的 2 倍以上。这进一步表明发酵过程主要使得纤维素和半纤维素发生了降解，而如何破坏木质素依然是提高互花米草厌氧生物转化率的关键。

2.3 XRD 分析

互花米草厌氧发酵前后 XRD 的变化情况见图 3。

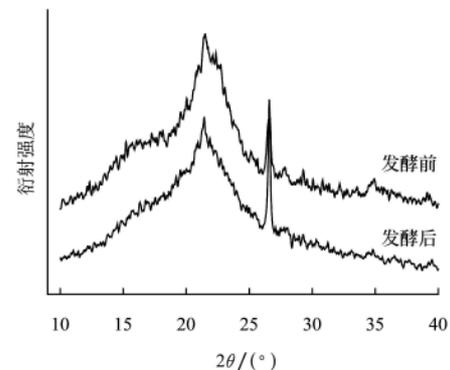


图3 互花米草厌氧发酵前以及中温厌氧发酵60 d后XRD谱图
Fig.3 X-ray diffraction spectra of the *S. alterniflora* before digestion and after anaerobic digestion for 60 days at 35°C

由图 3 可以看出，互花米草的衍射强度在 2θ=22° 附近有一极大峰，这是 (002) 晶面的衍射强度峰；在 2θ=35° 附近有一小峰，是 (040) 晶面的衍射强度峰。(002)

晶面的 X 射线衍射强度高, 而 (040) 晶面的衍射强度低, 是因为纤维素内葡萄糖分子所在的平面基本上平行于 (002) 晶面的缘故^[16]。与未发酵互花米草相比, 发酵后的互花米草 (002) 晶面和 (040) 晶面的衍射强度均有所下降。未发酵互花米草的结晶指数 C_rI 为 0.510, 发酵后 C_rI 降到了 0.479。2 θ =26.6° 处的峰是互花米草所携带的 SiO₂ 的衍射强度峰^[17]。总的来看, 厌氧发酵对纤维素的结晶结构造成了一定程度的破坏。

3 结 论

1) SEM 分析结果表明, 互花米草茎秆部的厌氧生物降解主要发生在维管束组织部位, 而薄壁细胞是一种难厌氧生物降解的组织。

2) 根据 FTIR 分析发现, 发酵后互花米草木质素官能团所对应的特征峰的峰强度与其纤维素和半纤维素所对应的特征峰的峰强度的比值是发酵处理前的 2 倍以上, 这主要归功于纤维素和半纤维素的降解。

3) XRD 的变化表明厌氧发酵过程对互花米草纤维素的结晶结构产生了一定的破坏作用, 其结晶指数由发酵前的 0.510 降到了发酵后的 0.479。

4) 与其他木质纤维原料厌氧生物降解遇到的技术瓶颈相似, 木质素对纤维素和半纤维素的包裹作用, 以及纤维素的结晶结构是制约互花米草厌氧生物转化的主要因素。

[参 考 文 献]

- [1] 生物多样性履行简报[EB/OL]. http://www.mep.gov.cn/natu/swdyx/jianbao/200301/t20030131_62359.htm.
- [2] 杨世关, 李继红, 郑 正, 等. 互花米草厌氧生物转化可行性分析与试验研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 196—199.
Yang Shiguan, Li Jihong, Zheng Zheng, et al. Feasibility analysis and experiment of anaerobic digestion of *Spartina alterniflora*[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(5): 196—199. (in Chinese with English abstract)
- [3] Ghosh A, Bhattacharyya B C. Biomethanation of white rotted and brown rotted rice straw[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1999, 20(4): 297—302.
- [4] Lissens G, Thomsen A B, Baere L D, et al. Thermal wet oxidation improves anaerobic biodegradability of raw and digested biowaste[J]. Environ Sci Technol, 2004, 38(12): 3418—3424.
- [5] Mussatto S I, et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain [J]. Enzyme Microb Technol, 2007, doi: 10.1016/j.enzmictec, 2007.11.06.
- [6] Claassen P A M, Van Lier J B, Lopez Contreras A M, et al. Utilization of biomass for the supply of energy carriers[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52(6): 741—755.
- [7] 雷中方, 陆雍森. 木质素在厌氧生物处理过程中的转化 [J]. 同济大学学报, 1995, 23(4): 421—426.
Lei Zhongfang, Lu Yongsen. Lignin degradation through anaerobic biological treatment process[J]. Journal of Tongji University, 1995, 23(4): 421—426. (in Chinese with English abstract)
- [8] Pandey K K, Pitman A J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 52(3): 151—160.
- [9] Segal L, Creely J J, Jr Martin A E, et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer[J]. Textile Research Journal, 1959, 29(10): 786—794.
- [10] 詹怀宇, 李志强, 蔡再生. 纤维化学与物理[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [11] Dabo S M, Taliaferro C M, Coleman S W. Anatomical and histological factors affecting the ruminal degradation of stem tissues in *Bothriochloa* species[J]. Animal Feed Science Technology, 1997, 67(4): 299—309.
- [12] 翟华敏, 李忠正. 麦草纤维细胞和薄壁细胞木质素特性 [J]. 中国造纸, 1992, (1): 18—21.
Zhai Huamin, Lee Zhongzheng. Characteristics of the fiber cell and parenchyma cell lignins from wheat straw[J]. China Pulp and Paper, 1992, (1): 18—21. (in Chinese with English abstract)
- [13] Stark N M, Matuana L M. Characterization of weathered wood-plastic composite surfaces using FTIR spectroscopy, contact angle, and XPS[J]. Polymer Degradation and Stability, 2007, 92(10): 1883—1890.
- [14] Schultz T P, Glasser W G. Quantitative structural analysis of lignin by diffuse reflectance Fourier transform spectrometry [J]. Holzforschung, 1986, 40(Suppl): 37—44.
- [15] Komilis Dimitris P, Ham Robert K. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid waste[J]. Waste Management, 2003, 23(5): 419—423.
- [16] 李 坚. 木材波谱学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [17] Roncero M B, Torres A L, Colom J F, et al. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: paper quality assessment[J]. Bioresource Technology, 2003, 87(3): 305—314.

Effect of anaerobic fermentation of *Spartina alterniflora* under mesophilic conditions on the changes of lignocellulosic structure

Li Jihong^{1,2}, Yang Shiguan², Zheng Zheng^{2*}, Chen Guangyin², Zou Xingxing², Meng Zhuo²

(1. National Engineering Laboratory of Biomass Power Generation Equipment, School of Renewable Energy,
North China Electric Power University, Beijing 102206, China;

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Lignocellulosic structural changes of *Spartina alterniflora* before and after anaerobic fermentation under mesophilic conditions (35°C) were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and X-ray diffractometer (XRD). The results of SEM microphoto analysis indicated that vascular bundle in stem of *S. alterniflora* was easily biodegradable tissue compared with parenchyma cell. The analyses of FTIR spectra showed that ratios of the intensity of characteristic peak of lignin to that of carbohydrate for *S. alterniflora* after anaerobic fermentation were more than twice as much as those of the undigested one. Crystallinity index of *S. alterniflora* cellulose dropped from 0.510 before fermentation to 0.479 after fermentation, as indicated by XRD results. It can be concluded that the shielding effects of lignin on cellulose and hemicellulose and the crystalline cellulose are the main factors of inhibiting anaerobic bioconversion of *S. alterniflora*.

Key words: lignocellulosic structure, anaerobic fermentation, decomposition, *Spartina alterniflora*