

钢球振荡酶解汽爆麦草的研究

孙占威^{1,2} 陈洪章^{2*} 王艳辉¹ 马润宇¹

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 为了寻求一种提高纤维素酶解速度和转化率的新方法, 采用静置、摇床振荡和钢球振荡三种不同的酶解方式进行汽爆麦草酶解和吸附实验。结果表明, 钢球振荡方式不但增加了汽爆麦草对纤维素酶的吸附量, 而且明显提高了酶解速度和底物转化率。采用钢球振荡进行汽爆麦草酶解的最佳酶活性浓度为 3.6×10^{-7} mol/(s·mL), 最佳转速为 150 r/min, 最佳酶解时间为 24 h, 还原糖得率为 0.43。用环境扫描电镜观察三种不同方式酶解后的汽爆麦草的形态, 经分析发现, 钢球振荡还有助于减少产物对酶的抑制和提高底物对纤维素酶的吸附和解吸频率。

关键词: 纤维素酶; 纤维素; 不锈钢球; 环境扫描电镜

中图分类号: X24

纤维素是地球上最丰富的可再生性资源, 在纤维素酶的作用下可降解生成葡萄糖, 再通过发酵可进一步生成液体燃料乙醇^[1]。

数十年来, 研究者们采用静置方式对木质纤维素的酶解进行了广泛研究。通常情况下, 汽爆预处理后的木质纤维素材料的结构被裂解^[2], 使纤维素酶的可及性增强, 酶解效率得以提高。但是, 在静置酶解方式下, 由于汽爆麦草存在微纤维网络结构, 纤维素酶流动性能较差, 吸附、解吸频率降低; 同时也使产生并存在于微结构的产物(糖)不能顺利释放, 抑制了酶解反应的继续进行^[3]。

本文作者根据汽爆麦草具有微纤维网络结构这一特征, 采用在圆形容器中加入不锈钢球强制振荡的新型酶解的方式, 提高纤维素酶解速度和转化率, 为更有效地利用植物纤维提供了理论或依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

羧甲基纤维素钠(CMC)为试剂纯。

纤维素酶滤纸酶活性浓度为 1.8×10^{-6} mol/(s·mL), -葡萄糖苷酶活性浓度为 6.3×10^{-6} mol/(s·mL), CMC 酶活性浓度为 2.0×10^{-4} mol/

(s·mL), 半纤维素酶活性浓度为 1.0×10^{-5} mol/(s·mL), 购于夏盛公司的商业酶。

原麦草(收割时间 2000 年 6 月)取自山东济南郊区。

不锈钢球: 材质 316L, $\phi 20$ mm。

1.2 实验方法

1.2.1 测定方法 纤维素、半纤维素、木质素的测定方法参考文献[4-5], 滤纸酶活性浓度测定方法见文献[6], 葡萄糖苷酶活性浓度测定方法见文献[7], 半纤维素酶活性浓度测定方法见文献[8], CMC 酶活性浓度测定方法见文献[9], 还原糖测定见 DNS 法^[10]。酶活性浓度的测定均在 50 和 pH 值 4.8 条件下进行。

1.2.2 汽爆麦草的预处理 麦草汽爆条件: 罐压 1.523 MPa; 维压时间 4.51 min。将汽爆麦草用蒸馏水洗 3 遍, 通风晾干, 测得其组分(质量分数)为水 10.11%, 纤维素 39.21%, 半纤维素 10.09%, 木质素 25.46%。

1.2.3 汽爆麦草的酶解过程 取 18 只塑料瓶, 分别加入 10 g 水洗后的汽爆麦草, 灭菌, 冷却至室温, 分别加入液体纤维素酶 2 mL, pH 值为 4.8 的醋酸缓冲液 100 mL。按以下三种不同方式进行酶解: 在 150 r/min 的摇床中进行酶解反应, 并在塑料瓶中加入不锈钢球一枚; 在 150 r/min 的摇床中进行酶解反应, 塑料瓶中无钢球; 恒温培养箱中进行酶解反应。为了有所区分, 分别简称为钢球振荡酶解、摇床振荡酶解和静置酶解。实验均在 50 下进行, 酶解一段

收稿日期: 2005-11-18

基金项目: 国家“973”计划(2004CB71700)

第一作者: 男, 1970 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

时间后,检测三种酶解方式下的还原糖得率 y 。

$$y = \frac{C_1 \times V_1}{M}$$

式中, C_1 为还原糖质量浓度, g/mL ; V_1 为酶解液体积, mL ; M 为底物质量, g 。

1.2.4 纤维素酶吸附率 取 3 只塑料瓶,分别加入 10 g 水洗后汽爆麦草,灭菌,冷却至室温,分别加入液体纤维素酶 2 mL, pH 值为 4.8 的醋酸缓冲液 100 mL。然后分别以钢球振荡 (150 r/min)、摇床振荡 (150 r/min) 和静置三种不同方式进行酶解。本实验均在 50 ℃ 下进行,酶解 5 min 后,分别检测 3 种酶解方式下的 CMC 酶吸附率 Y 。

$$Y = 1 - (C_2 \times V_2) / (C_1 \times V_1)$$

式中, C_1 为吸附前溶液中的 CMC 酶活性浓度, $\text{mol/(s} \cdot \text{mL)}$; V_1 为吸附前酶液体积, mL ; C_2 为吸附后溶液中的 CMC 酶活性浓度, $\text{mol/(s} \cdot \text{mL)}$; V_2 为吸附后酶液体积, mL 。

1.2.5 转速与还原糖得率 取 15 只塑料瓶,分别加入 10 g 汽爆麦草,灭菌,冷却至室温,加入 100 mL pH 值为 4.8 醋酸缓冲液。分别加入不同的液体纤维素酶 (1、2、3 mL) 及不同的转速条件下进行酶解反应。在 50 ℃ 酶解 24 h 后测还原糖得率。

2 结果与讨论

2.1 钢球振荡酶解汽爆麦草

2.1.1 不同酶解方式对还原糖得率的影响 由于在 pH 值 4.8, 50 ℃ 时的纤维素酶活性较高^[11-13], 所以本实验在此条件下进行了钢球振荡、摇床振荡、静置三种不同方式酶解的比较。本实验中酶解液初始酶活浓度为 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol/(s} \cdot \text{mL)}$, 酶解反应进行了 96 h, 结果如图 1 所示。实验结束时, 采用钢球振荡、摇床振荡、静置三种不同酶解方式的还原糖得率分别为 0.442、0.407、0.345。在钢球振荡方式下酶解 12 h 的还原糖得率为 0.366, 高于传统的静置酶解 96 h 的还原糖得率。

采用三种不同方式酶解, 酶解反应初期均能以较高速度进行。这是由于纤维素的无定形结构区域首先进行水解, 无定形纤维素的水解速度是结晶纤维素的 5~10 倍^[1]。另外, 在酶解过程中, 24 h 后的还原糖得率曲线均逐渐平缓, 延长酶解时间底物转化率不会有大的变化。

2.1.2 不同酶解方式对纤维素酶吸附的影响 酶吸附是纤维素酶解的前提。所以, 为了找到三种酶解方式对酶解速度产生差别的原因, 测定了 CMC

酶的吸附率, 为了防止酶解反应的发生, 吸附实验在 5 ℃ 下进行了 5 min。结果如图 2 所示, 不同酶解方式下, 汽爆麦草对酶的吸附率不同: 钢球振荡酶解方式下, CMC 酶的吸附率最高 (62 %); 而在恒温静置方式下, CMC 酶的吸附率最低 (57.7 %)。

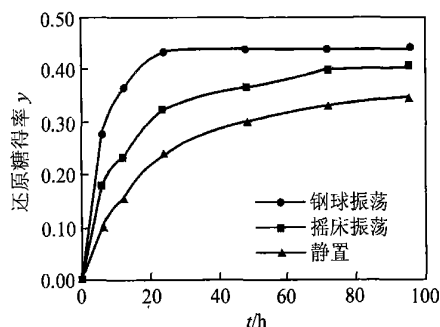


图 1 不同酶解方式对还原糖得率的影响

Fig. 1 Effect of different methods of enzymatic hydrolysis on the yield of reducing sugar

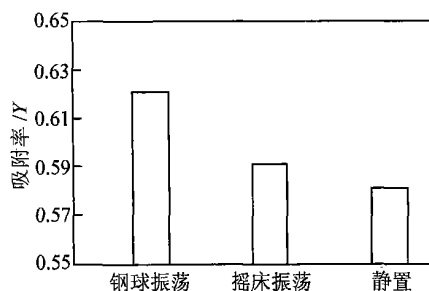


图 2 不同酶解方式对纤维素 CMC 酶吸附率的影响

Fig. 2 Adsorption of CMCase using different methods of enzymatic hydrolysis

2.1.3 转速对还原糖得率的影响 由 2.1.1 节可知, 在钢球振荡酶解方式下, 汽爆麦草的酶解速度和底物转化率均有提高。于是, 有必要研究钢球振荡方式下的转速和纤维素酶活性浓度对纤维素酶解的影响。

由图 3 中可见, 在相同的酶活性浓度条件下, 转速对酶解效果有较大影响, 当转速低于 150 r/min 时, 随着转速的增加, 还原糖得率增加; 当高于 150 r/min 时, 随转速的增加, 还原糖得率降低。最佳转速为 150 r/min。原因是适当的混合可以确保酶和底物充分的接触, 以及提高反应器内的热量和质量传递。但是, 过分的混合可以降低酶的活性和反应速度。在高速混合状态下, 可以产生底物与底物、底物与钢球间剪切力, 从而影响酶的活性^[14]。

随着酶活性浓度的增加, 纤维素酶和底物接触

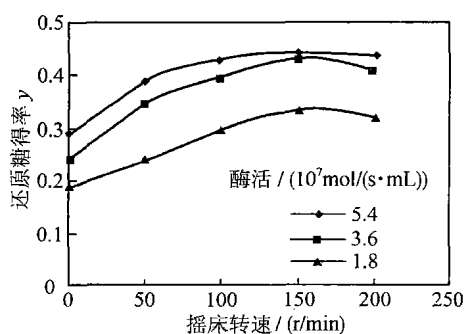


图3 转速对还原糖得率的影响

Fig. 3 Effect of varying ball mill speed on the yield of reducing sugar

的频率增加,还原糖得率提高。图3中还发现,在相同转速条件下,酶活性浓度低于 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$ 时,随酶用量增加,还原糖得率明显增加,当高于 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$ 时,随酶用量增加,还原糖得率增加缓慢。最佳酶活性浓度为 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$ 。

当滤纸酶活性浓度为 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$, 转速为 $150 \text{ r}/\text{min}$ 时,采用钢球振荡酶解 24 h 的还原糖得率为 0.432。相当于 98.7% 的纤维素被酶解。

2.2 钢球振荡方式下的酶解机理

2.2.1 不同酶解方式下,纤维素形态的电镜观察

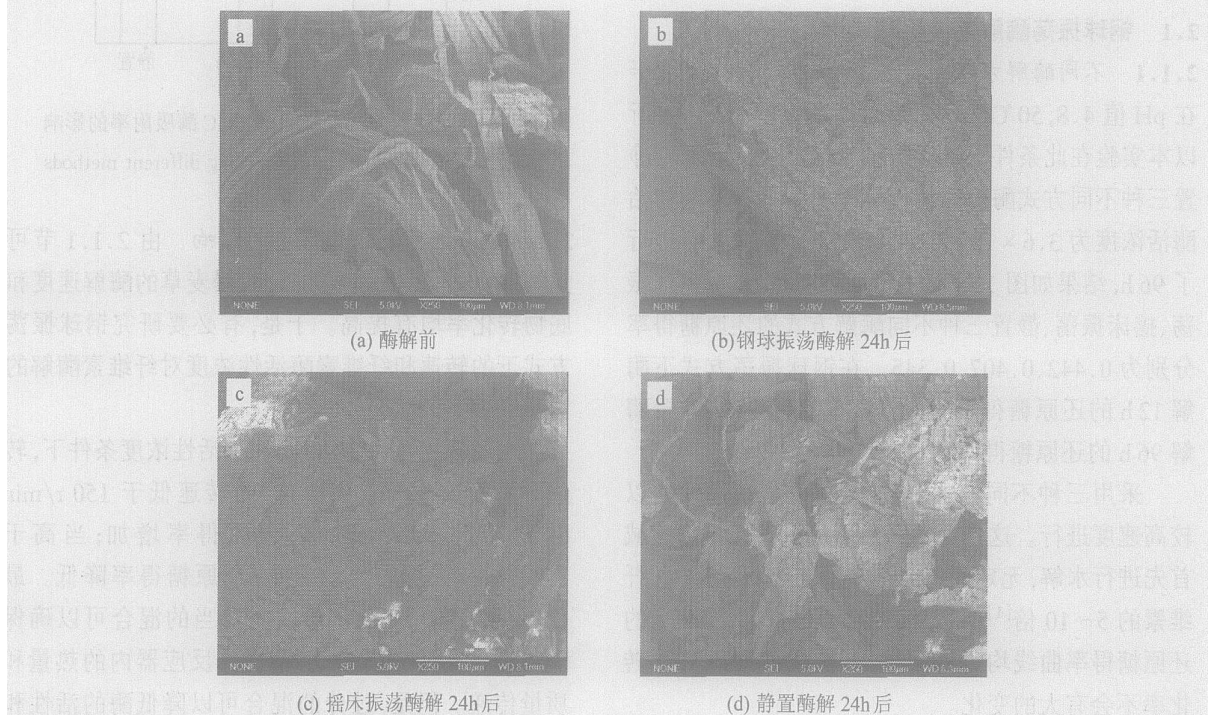


图4 不同方式酶解 24 h 前后的汽爆麦草电镜照片

Fig. 4 SEM micrographs of steam-treated straw obtained using different methods of enzymatic hydrolysis before (a) and after treatment for 24 hours (b)-(d)

为了进一步探讨钢球振荡方式的酶解机理,利用环境扫描电镜观察了静置、摇床振荡和钢球振荡三种不同方式下酶解 24 h 后的麦草纤维形态。在电镜下可见(图 4a),在酶解前经过汽爆处理过的麦草,纤维爆裂,其纤维材料结构瓦解。由图 4 可见,在 pH 值为 4.8,滤纸酶活浓度为 $3.6 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$ 的酶解液中,在 50 下酶解,经过不同方式酶解后的汽爆麦草的纤维形态不同:当摇床转速为 $150 \text{ r}/\text{min}$,采用钢球振荡酶解方式,酶解 24 h 后的汽爆麦草形成粉末状(图 4b);相同转速条件时,采用摇床振荡酶解方式,酶解 24 h 后的汽爆麦草纤维呈短棒状(图 4c);而静置酶解 24 h 后的汽爆麦草的纤维仍然很长(图 4d)。

2.2.2 钢球振荡酶解过程中麦草纤维形态变化与分析 木质纤维素是一个包括纤维素、半纤维素、木质素的复杂聚合物^[15]。有效转化麦草为葡萄糖和酒精的主要难点在于稻草纤维素的紧密的晶形结构和纤维素周围的半纤维素和木质素阻挡着纤维素的水解^[16]。

汽爆技术作为一种有效的预处理方法,可以使纤维素结晶度降低;比表面积增加;孔隙率增加(图 4a);强度降低。同时,由于在汽爆过程中有部分半纤维素被分解,从而暴露出更多的活性位点。这样

使麦草纤维的可及性增加(图 5b),提高了木质纤维素的降解性能。

但由于许多原因,经过汽爆后的纤维素的酶解效率仍有待于提高。原因是影响反应速度的因素有许多,如:底物可及性、纤维素酶的吸附量、纤维素酶吸附解吸频率、酶活性浓度、木质素上纤维素酶的无效吸附、终产物抑制等。在钢球振荡方式下进行酶解,由于在振荡过程中不锈钢球对汽爆麦草不断的“挤压”,可以产生多方面(酶的吸附量增加,底物可及性能提高,终产物抑制降低,纤维素酶吸附、解吸频率增加)的效果,如图 5 所示。

由于汽爆麦草具有微纤维网络结构,纤维在其网络交织点处的孔隙较小(图 4a,图 5a),使纤维素酶分子的扩散受阻(图 5b)。所以,通过不锈钢球的挤压作用,可以使微纤维素网络形状发生变化,从而有可能使纤维素酶的吸附率增加(图 2,图 5d),底物

转化率得到提高(图 1)。

在酶解过程中,纤维素酶的催化作用发生在纤维表面。随着外层的水解,酶解反应从纤维表层向内层接近,产生可溶性寡糖,并进一步生成纤维二糖。随着酶解的进行,需要增加内切葡聚糖酶(EG)和外切葡聚糖酶(CBH)的协调作用,及时将吸附催化完毕的 EG 和 CBH 解吸,并吸附到另一个未吸附的区域。同时,总糖(中间产物寡糖、纤维二糖和葡萄糖)也会被局部积累,并对 EG 和 CBH 形成竞争抑制^[3]。特别是,吸附到微纤维表面的 EG 和 CBH,可能由于寡糖浓度高和微纤维网络位阻而造成失活。但在钢球振荡酶解过程中,不锈钢球对汽爆麦草的不断的“挤压”,使微纤维网络内的液体不断的被“挤出”、“吸进”,同时,微纤维网络之间的纤维素酶和寡糖分子扩散速度也得到加强。从而达到提高纤维素酶吸附、解吸的频率、降低局部产物抑制的效

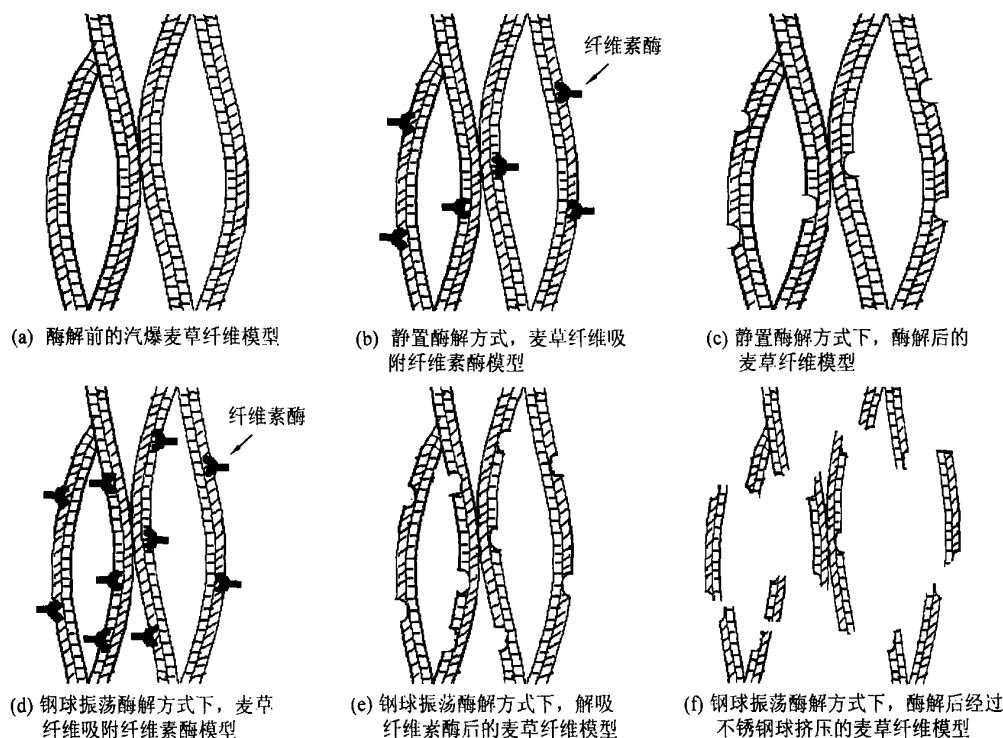


图 5 汽爆麦草在不同酶解方式下的酶解过程模型

Fig. 5 Model of steam-treated straw before and after enzymatic hydrolysis using different methods

果(图 5d)。

经过纤维素酶解后,麦草纤维强度进一步降低(图 5e),在不锈钢球的“挤压”下,麦草纤维从酶解完毕的位点处发生折裂(图 5f)。从而在断痕处可能暴露出更多的活性位点,使酶解反应继续以较高速率进行。所以,采用钢球振荡酶解方式时,汽爆麦

草经过一定时间酶解后形成粉末形状(图 4b),而静置方式酶解后的麦草纤维仍然较长(图 4d,图 5c)。

3 结论

在温度为 50 ℃,pH 值为 4.8 的条件下,采用钢球振荡进行汽爆麦草酶解的最佳酶活性浓度为 $3.6 \times$

10^{-7} mol/(s·mL), 最佳转速为 150 r/min, 最佳酶解时间为 24 h, 还原糖得率为 0.43, 相当于 98.7% 的纤维素被酶解, 是相同条件下采用传统静置酶解方式的 1.78 倍。

参 考 文 献

- [1] Kadam K L, Rydholm E C, McMillan J D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass [J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(3): 698 - 705.
- [2] Aliyu M, Hephher M J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2000, (7): 265 - 268.
- [3] Li C, Yoshimoto M, Tsukuda N, *et al.* A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004(19): 155 - 164.
- [4] 波钦诺克 X H. 植物生物化学分析方法[M]. 荆家海, 丁钟荣, 译. 北京: 科学出版社, 1981: 158 - 181.
- [5] Van Soest P J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin[J]. *Journal of Association Office Agriculture Chemistry*, 1963, 46: 829 - 835.
- [6] Mandels M, Sterberg D. Recent advances in cellulose technology [J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1976, 54: 267 - 272.
- [7] Kubicek C P. α -glucosidase Excretion by *Trichoderma pseudokoningii* correlation with cell wall bound α -1,3-glucanase activities [J]. *Archives of Microbiology*, 1982, 132: 349 - 354.
- [8] Tan L U L, Yu E K C, Louis-Seize G, *et al.* Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulose-free α -1,4-D-Xylanase for high specific activity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 30: 96 - 106.
- [9] 曲音波, 高培基, 王祖农. 青霉纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育[J]. *真菌学报*, 1984, 3(4): 238 - 243.
- [10] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426 - 428.
- [11] 夏安, 何贵超, 陈党生. 水解条件对纤维素酶解速度的影响[J]. *化工设计*, 2002, 12(1): 18 - 21.
- [12] 杭志喜. 植物纤维原料纤维素酶水解的研究[J]. *化学世界*, 2004(7): 369 - 372.
- [13] 张瑞萍, 方云. 纤维素的主要酶学性质[J]. *纺织学报*, 2003, 24(1): 59 - 60.
- [14] Ingesson H, Zacchi G, Yang B, *et al.* The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 88: 177 - 182.
- [15] Mosier N, Wyman C, Dale B, *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 673 - 686.
- [16] Zhu S, Wu Y, Yu Z, *et al.* Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis [J]. *Process Biochemistry*, 2005(5): 1 - 5.

Enzymatic hydrolysis of steam-treated straw using a ball mill shaker

SUN Zhan-wei^{1,2} CHEN Hong-zhang² WANG Yan-hui¹ MA Run-yu¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A novel method of enzymatic hydrolysis by cellulase, characterized by high conversion yields and hydrolysis rates, is described. Three methods of enzyme adsorption and hydrolysis of steam-treated straw are compared: ball mill shaker, plate shaker, and static state. It was found that the ball mill shaker afforded the maximum extent of adsorption of cellulase, conversion yield, and hydrolysis rate. The optimum enzyme activity, mill speed and reaction time were found to be 3.6×10^{-7} mol/(s·mL), 150 r/min and 24 h, respectively, giving a maximum reducing sugar yield of 0.43. The morphological changes in the steam-treated straw were characterized by scanning electron microscopy. It is proposed that the use of the ball mill shaker both reduces the degree of inhibition of the enzyme by reaction products and increases the rate of adsorption and desorption of the enzyme on the substrate.

Key words: cellulase; cellulose; stainless steel ball mill shaker; SEM