

固定化纤维素酶水解玉米秸秆的研究

胡 龄¹, 张红漫¹, 林增祥², 黄 和²

(1. 南京工业大学理学院, 江苏 南京 210009; 2. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009)

摘要:以壳聚糖小球为载体固定纤维素酶,研究了固定化纤维素酶的酶学性质,并以经过蒸汽爆破预处理的玉米秸秆为底物,研究了固定化酶水解的最优条件。结果表明纤维素酶经过固定化后,其米氏常数为 0.42 mg/mL,半衰期为 162 h;酶解的最佳条件为固定化酶与底物的质量比为 1:2.5、固液比为 1:2.4(m/V)、温度为 50℃, pH 为 5.0。秸秆水解率可达 33%,纤维素水解率可达 70%。

关键词:壳聚糖;纤维素酶;固定化;玉米秸秆

中图分类号:Q556

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2009)08-0044-03

Study on hydrolysis of corn straw with immobilized cellulase

HU Ling¹, ZHANG Hong-man¹, LIN Zeng-xiang², HUANG He²

(1. College of Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The enzymological characteristics of immobilized cellulase that supported by chitosan beads are investigated. And the optimal hydrolytic conditions under which the corn straw pretreated by steam-explosion is hydrolyzed with the immobilized cellulase are also studied. The results show that the Michaelis-Menton constant of the immobilized cellulase is 0.42 mg/mL and the halflife is 162 hours. The optimal hydrolytic conditions are obtained as follows: 1:2.5 of the mass ratio between immobilized cellulase and substrate, 1:2.4 of the solid-to-liquid ratio (m/V), 50℃, pH = 5.0. Then the hydrolysis rate of corn straw can be up to 33% and the hydrolysis rate of cellulose can reach 70%.

Key words: chitosan; cellulase; immobilized; corn straw

纤维素经过糖化、发酵,可以转化为燃料、材料或平台化合物等各类化学品,其中糖化过程是整个工艺过程中的关键环节之一,利用纤维素酶水解纤维素原料,条件温和,专一性强,水解效率高,是理想的水解方法。但实际上纤维素酶价格昂贵,消耗量大,成本高,针对这一问题,采用固定化技术将纤维素酶固定在载体上,可以达到简化工艺、降低成本的目的^[1-2]。目前有关固定化纤维素酶的报道中,大多是针对不同载体的固定化效果及固定化酶的酶学性质进行研究^[3-4],只有少数文献对利用固定化纤维素酶水解可溶性纤维素(如羧甲基纤维素)进行了研究^[1],而对于水解结构较为复杂的纤维素实际物料(如玉米秸秆)的研究几乎未有报道。笔者以壳聚糖小球为载体,用交联法固定纤维素酶,探讨利用固定化酶水解实际底物的最佳条件及酶的回收利用情况。实验采用经蒸汽爆破处理过的玉米秸秆作为底

物。蒸汽爆破预处理有助于破坏玉米秸秆的天然结构,使纤维素酶能与底物充分接触,从而有助于酶解反应顺利进行^[5]。

1 实验部分

1.1 主要材料与实验仪器

ZSL-1300 纤维素酶,山东泽生生物科技有限公司;蒸汽爆破玉米秸秆(处理条件为 204℃、1.7 MP 维压 5 min;蒸爆后的物料组成为纤维素 43.1%、半纤维素 8.1%、木质素 22.3%,均为质量分数);壳聚糖,脱乙酰度 $\geq 90.0\%$;3,5-二硝基水杨酸(DNS),化学纯;其他试剂均为分析纯。SBA-40C 型生物传感分析仪,山东省科学院生物研究所。

1.2 实验方法

用 2%(体积分数)的醋酸溶液配制固液比(m/V)为 2.5%的壳聚糖溶液,用此壳聚糖溶液滴入成型

收稿日期:2009-04-04

基金项目:国家自然科学基金(20876078);国家“863”计划(2006AA020103、2006AA02Z240);NSFC-广东联合基金项目(U0733001)

作者简介:胡龄(1985-),女,硕士生;张红漫(1968-),女,博士,副教授,主要从事生物质能源、现代分离分析及代谢组学方面的研究,通讯联系人,025-83172094, hzmzhang9607@sina.com。

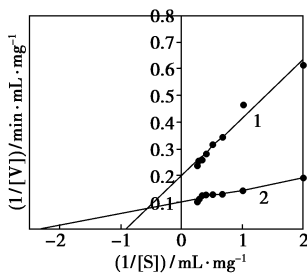
剂内形成直径约为 4.0 mm 的载体小球。成型剂为 30% (体积分数) 的乙醇溶液与 10% (m/V) 的氢氧化钠溶液配制成的混合溶液。将制好的载体用水冲洗至 pH 呈中性, 加入体积分数为 5% 的戊二醛溶液。室温静置过夜后, 将小球漂洗数次。加入泽生原酶液, 静置 11 h 后用水漂洗, 待用。分别测试游离酶和固定化酶的活力 (U)。

酶解液糖浓度的测定采用 DNS 显色法。葡萄糖浓度用生物传感分析仪测定。将玉米秸秆在最优条件下水解 48 h, 分别测定酶解前后固定化酶的酶活。固定化酶半衰期 $t_{1/2}$ 按文献[3]。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶的米氏常数

用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液配制质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g/L 的羧甲基纤维素 (CMC) 溶液, 分别测定游离酶和固定化酶的 CMC 酶活力。用双倒数作图法^[4] 求得其米氏常数 K_m , 如图 1 所示。根据米氏方程^[4] 计算可得游离酶的 K_m 值为 1.09 mg/mL, 固定化酶的 K_m 值为 0.42 mg/mL, 纤维素酶的固定化可增加其与底物的亲和力, 这是因为固定化后使酶的结构以及酶所处的化学环境均发生了变化^[6]。在本实验条件下, 载体带正电荷, 带电载体与底物之间的静电作用会引起底物分子在扩散层和整个溶液之间分布不均, 使固定化酶需要更高的底物浓度才能达到最大反应速度, 所以固定化纤维素酶的表现米氏常数比游离酶的高^[7]。



1—游离酶; 2—固定化酶

图 1 游离酶和固定化酶的米氏常数 K_m

2.2 酶的最适温度及热稳定性

实验考察了温度对固定化和游离纤维素酶的影响, 在 40 ~ 80 °C 范围内, 测定纤维素游离酶和固定化酶的 CMC 酶活力, 结果如表 1 所示。由表 1 可知, 游离酶和固定化酶的最适温度均为 60 °C, 高于此温度后, 酶活迅速下降。理论上而言, 固定化酶的

热稳定性应该比游离酶的高, 而上述实验结果中未明显体现出这一点, 可能是由于温度选择的间隔较大。在正交实验温度的 3 个水平中, 选择最适温度 60 °C 附近的点, 分别为 50、58、66 °C。

表 1 不同温度下游离酶和固定化酶的 CMC 酶活力

温度/°C	40	50	60	70	80
游离酶活/ $U \cdot mL^{-1}$	4.22	4.39	4.56	3.22	3.10
固定酶活/ $U \cdot g^{-1}$	0.70	0.85	1.56	0.98	0.93

2.3 正交实验优化固定化纤维素酶水解蒸爆玉米秸秆的酶解条件

实验主要考查酶添加量、底物添加量、温度、pH 4 个因素对固定化酶酶解效果的影响, 将以上 4 个因素进行正交实验设计 (见表 2), 加入不同 pH 的缓冲溶液 50 mL, 酶解 48 h 后测定酶解液中的总糖和葡萄糖含量, 见表 3。其中酶解使用的底物为蒸爆物料。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

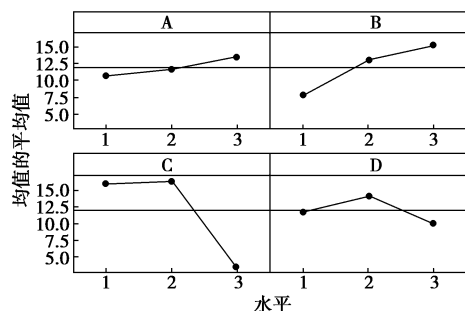
水平	因素			
	载体量(A)/g	底物量(B)/g	温度(C)/°C	pH(D)
1	2	5	50	4.5
2	4	10	58	5.0
3	6	15	66	5.5

表 3 正交实验设计和酶解后总糖、葡萄糖浓度响应值

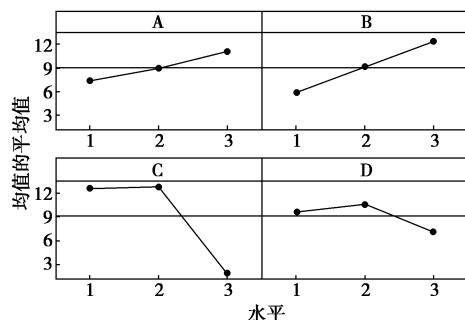
实验号	A	B	C	D	葡萄糖质量浓度/总糖质量浓度/ $mg \cdot mL^{-1}$	
					$mg \cdot mL^{-1}$	$mg \cdot mL^{-1}$
1	1	1	1	1	8.1	10.32
2	1	2	2	2	12.6	18.25
3	1	3	3	3	1.2	3.41
4	2	1	2	3	7.4	9.89
5	2	2	3	1	2.3	3.95
6	2	3	1	2	17.1	21.17
7	3	1	3	2	2.0	2.95
8	3	2	1	3	12.6	16.60
9	3	3	2	1	18.6	21.01

图 2 分别是上述 4 个因素对总糖和葡萄糖得率影响的极差分析图, 图 2 中可见, 载体添加量 (A)、底物添加量 (B)、pH (C) 和温度 (D) 这 4 个因素对总糖浓度的影响从大到小排列为 $C > B > D > A$, 对葡萄糖浓度的影响从大到小排列为 $C > B > A > D$ 。对固定化酶水解底物影响最大的 2 个因素是温度和底物添加量。pH 虽然也对酶活力有较大影响, 但由于在该实验中所取的 pH 范围是游离纤维素酶本身的最适值 (pH = 4 ~ 5) 附近, 因此对水解结果影响也较

小,说明酶经过固定化以后最适 pH 的改变很小。



(a) 总糖均值主效应图(数据平均值)



(b) 葡萄糖均值主效应图(数据平均值)

图 2 总糖和葡萄糖的极差分析图

由图 2 还可看出,4 个因素对总糖和葡萄糖浓度的影响总趋势是一样的。随着载体添加量和底物添加量的增大,酶解后的总糖和葡萄糖浓度都有不同程度的增加,其中葡萄糖浓度的增加更为明显。随着温度的升高和 pH 的增大,总糖和葡萄糖浓度出现一个峰值,说明固定化后的纤维素酶的最适温度为 58℃,最适 pH 为 5.0;其中,温度范围在 50~58℃时,总糖及葡萄糖浓度变化并不明显,而在 58℃之后,糖浓度迅速下降,因此从成本的角度考虑,可以选择酶解的温度为 50℃。

对总糖得率和葡萄糖得率而言,4 种条件的最优方案相同,均为 C₂B₃D₂A₃,其验证实验结果显示葡萄糖质量浓度达到 19.1 mg/mL,总糖质量浓度达到 21.33 mg/mL,糖得率最高。一般认为,纤维素属于大分子物质,酶分子不易接近不溶性纤维素底物^[3],但是由该实验可以看出,该固定化纤维素酶对蒸爆玉米秸秆有较好的水解效果,秸秆水解率达到了 0.33 g(总糖)/g(秸秆),纤维素水解率达到了 0.70 g(葡萄糖)/g(纤维素)(而蒸爆玉米秸秆干基含量为 21.40%)。这是由于在蒸爆过程中,纤维素的结晶结构被破坏,半纤维素水解成可溶性的糖,同时木质素软化和部分分解,物料从胞间层解离成单个纤维细胞^[5]。半纤维素的去除提高了酶对纤维素微纤丝的可及性,使酶与底物可以充分接触,因此水解效果较好。

2.4 固定化纤维素酶的半衰期

固定化酶的半衰期^[8]是衡量固定化酶操作稳定性的关键指标。在最优水解条件下,测得酶解前后该固定化酶的活力分别为 $E_0 = 0.058 \text{ U/mL}$, $E = 0.048 \text{ U/mL}$,半衰期达到了 162 h,可重复利用 3 次。目前许多文献的报道中,半衰期的测定方法都是在未加底物的情况下直接定期测定固定化酶的酶活力,因此半衰期较长;有些文献则是用可溶性纤维素作为底物进行测定^[3],因此重复利用次数较多。而在本实验中,测定所用的底物为结构复杂的不溶性纤维素,半衰期同样达到了 162 h,因此可以认为该固定化酶的半衰期较长,在一定程度上能够降低成本,有一定的实用价值。

3 结论

将固定化后的纤维素酶应用于玉米秸秆的酶解中,对酶解条件进行了优化,其最佳条件为:添加的载体与底物的质量比为 1:2.5,固液比(m/V)为 1:2.4,50℃,pH=5.0。其中固定化纤维素酶的米氏常数为 0.42 mg/mL,酶的半衰期达到了 162 h。固定化纤维素酶对蒸爆过后的玉米秸秆有较好的水解效果,且操作半衰期较长,易于回收重复利用,在一定程度上可以减少工业生产成本,但该方法的扩大实验将有待进一步完善。

参考文献

- [1] Paljevac M, Primožič M, Habulin M, *et al.* Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 43: 74-80.
- [2] Li C Z, Yoshimoto M, Fukunaga K, *et al.* Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 1366-1372.
- [3] Dinger A, Telefoncu A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 45: 10-14.
- [4] Mao X P, Guo G J, Huang J F, *et al.* A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81: 189-195.
- [5] Laser M, Schulman D, Allen S G, *et al.* A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 81: 33-44.
- [6] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35: 126-139.
- [7] 刘冠卉, 马海乐, 屠洁, 等. 海绵态壳聚糖固定化单宁酶及其酶学性质研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 231-234.
- [8] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1451-1463. ■