

纤维素高效酶水解方法的探讨

李清春¹, 张景强^{1*}, 林鹿²

(1. 电子科技大学中山学院化学与生物工程学院, 广东 中山 528402;
2. 厦门大学能源学院, 福建 厦门 361005)

摘要:纤维素酶解可为生物质基的能源与化工品开发提供必需的水溶性还原糖。实验以浓磷酸解结晶处理结合纤维素酶- β -葡萄糖苷酶混合酶液的协同酶解, 构建了一种高效酶解方法。实验结果表明, 酶水解的最佳条件为: 酶液质量浓度为 0.062 5 mg/mL, 底物质量浓度为 12.5 mg/mL, pH 为 4.8 缓冲溶液, 酶解温度为 50℃, 转速为 120 r/min。解结晶 MCC 结合协同酶解方法作用 120 h 和解结晶麦草结合协同酶解方法作用 120 h, 产物得率均得到大幅提高。

关键词:纤维素; 解结晶; 酶水解; 纤维素酶; β -葡萄糖苷酶

中图分类号: TQ35

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)07-0089-04

Discussion on effective enzymatic hydrolysis of cellulose

LI Qing-chun¹, ZHANG Jing-qiang^{1*}, LIN Lu²

(1. College of Chemistry & Biology Engineering, University of Electronic Science and Technology of China Zhongshan Institute, Zhongshan 528402, China; 2. College of Energy, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Enzymatic hydrolysis can provide necessary soluble reducing sugars for biomass based energy and chemicals. An effective enzymatic hydrolytic method is established by using the concentrated phosphoric acid to decrystallize the microcrystalline cellulose (MCC) and wheat straw, and cellulose to mix with β -Glucosidase. The optimal enzymatic hydrolysis conditions are shown as follows: 0.062 5 mg/mL of cellulose, 12.5 mg/mL of substrate, pH 4.8 of citric acid buffer solution, 50℃ of enzymolysis temperature and 120r/min of shaking speed. The yields are both greatly improved for decrystallization of MCC/enzymolysis and decrystallization of wheat straw /enzymolysis for 120 hours.

Key words: cellulose; decrystallization; enzymatic hydrolysis; cellulose; β -Glucosidase

纤维素(Cellulose)转化为清洁燃料和化学品是当前研究的热点。纤维素是高等植物细胞壁的主要成分, 全球每年通过光合作用产生的各种生物质高达 1.55×10^{12} t 干重, 我国每年产生的秸秆、稻梗等生物质就有 7 亿多 t, 但是高达 89% 未被利用^[1]。纤维素转化利用的关键是寻找有效途径将纤维素水解为葡萄糖等可溶性发酵糖。纤维素水解主要有生物酶水解和化学水解 2 种途径。化学水解污染大, 对环境不利; 酶水解则是环保的处理方式, 其反应条件温和, 易于控制, 产物单纯。但是目前酶水解也存在着反应时间长, 得率低, 酶活力不高, 使用成本高等缺点。

影响纤维素酶水解得率的因素有温度、pH、底物质量浓度及酶用量等^[2-3]。另外, 纤维素底物的结构, 如纤维中木质素的质量分数、结晶度等也会影响酶水解得率^[4]。笔者在获得酶水解最佳条件基础上, 将改变底物晶体结构和提高酶活力两方面结合起来探讨一种高效的酶水解方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纤维素酶(EC3.2.1.4, 来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)), 上海伯奥生物科技有限公司生产, 酶活单位定义为: 1 U = 1 mg 酶 1 min 产生 1 μ g 还原糖(以葡萄糖计), 测试条件为 pH 4.8 柠檬酸盐缓冲液, 50℃ 下反应 30 min, 该酶的滤纸酶活为 1.163 U; β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.4, 来源于杏仁), 上海伯奥生物科技有限公司生产, 以纤维二糖为标准底物检测其酶活, 测试条件为 pH 4.8 柠檬酸盐缓冲液, 50℃ 下反应 30 min, 该酶的酶活为 7.288 U; 微晶纤维素(Microcrystalline cellulose, MCC), 上海恒信化学试剂有限公司生产; 麦草, 来自于山东德州市平原县, 麦草秸秆经自来水淋洗后自然晒干, 再在 40℃ 烘箱里过夜烘干, 粉碎过 40 目筛网, 贮存备用。

FUMA 恒温培养摇床, 上海福玛实验设备有限公司生产; 紫外检测仪, 德国 Merck 公司生产。

收稿日期: 2015-01-27

基金项目: 中山市科技技术项目(2014A2FC333); 电子科技大学中山学院科研团队培育项目(412YT02)

作者简介: 李清春(1975-), 女, 硕士, 讲师, 从事农产品加工与生物质资源利用, 635612709@qq.com; 张景强(1974-), 男, 博士, 副教授, 从事食品分析与生物质资源开发, 通讯联系人, zsgzyaoyao@126.com。

1.2 实验方法

1.2.1 解结晶处理

称取 5.0 g 的 MCC 或 2.0 g 麦草粉末于 100 mL 烧杯中,首先加入 5 mL 去离子水充分润湿,然后缓慢加入 50 mL 磷酸(85%),边加入边搅拌,混合均匀后于 50℃ 的水浴锅中反应 6 h,立即加入 100 mL 去离子水并剧烈搅拌,离心(6 000 r/min, 10 min)收集全部固体部分,先用无水乙醇 100 mL 洗涤(5 次,每次 20 mL),离心收集固体部分后再用去离子水充分洗涤,以氢氧化钠溶液中和至 pH 7.0 左右,最后用丙酮脱水。样品于 50℃ 下真空烘干备用。经 X 射线粉末衍射技术分析, MCC 的结晶度为 92.2%, 解结晶处理所得 MCC 样品的结晶度为 40.3%, 麦草样品的结晶度为 56.8%, 解结晶处理所得麦草的结晶度为 40.1%。

1.2.2 酶水解方法

在最佳条件下进行酶水解,时间分别为 2、4、6、8、10、12、14、16、20、24、36、72、96、120 h;反应结束后,立即在沸水浴中灭活 5 min,用滤纸过滤得到清亮滤液,再用聚四氟乙烯膜过滤,所得滤液用超纯水稀释 400 倍后上离子色谱仪检测。糖得率计算式:

$$Y\% = (M/M_c) \times 100\%$$

其中, $Y\%$ 为相应糖得率, M 为生成的糖的质量, M_c 为底物的质量。

1.2.3 离子色谱检测方法

利用美国戴安公司生产的 ICS-3000 离子色谱进行色谱检测。配脉冲安培检测器(PAD), AS40 自动进样器,保护柱为 CarboPac™ PA1 guard(2 mm × 50 mm),色谱柱为 CarboPac™ PA1 column(2 mm × 250 mm)。淋洗液流速为 0.25 mL/min,进样体积为 50 μL;检测 MCC 样品时,淋洗液氢氧化钠的浓度为 200 mmol/L,检测麦草样品时,则为 10 mmol/L。

1.2.4 纤维素酶相对分子质量检测

采用 MALDI TOF 检测纤维素酶相对分子质量。N₂ 激光器,激光波长为 337 nm,加速电压为 30 kV,吸引电压为 913 kV,检测电压为 24 175 kV。

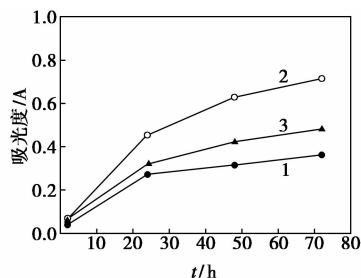
2 结果与讨论

2.1 酶水解最适条件

纤维素酶水解是固液两相的反应^[2],其水解过程受到多种因素的影响,如酶解温度、溶液 pH、底物质量浓度及酶的用量等。

MCC 在不同温度下的酶解溶液中的还原糖在 520 nm 下吸光值的变化曲线如图 1 所示。由图 1

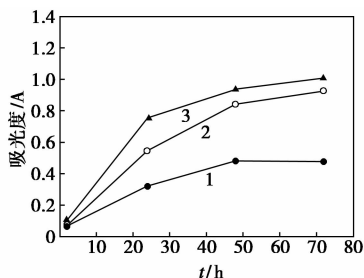
可知,45℃ 和 55℃ 时的还原糖产量均低于 50℃ 时的产量,说明纤维素酶蛋白对温度比较敏感;酶蛋白在较低温度时活力较低,较高时又易导致酶蛋白变性失活,因此以 50℃ 为最佳酶解温度。



1—45℃; 2—50℃; 3—55℃

图 1 温度对酶解的影响

酶液质量浓度对酶解的影响如图 2 所示。酶液质量浓度为 0.037 5 mg/mL 时的酶解效果远低于其他 2 个质量浓度下酶解效果;0.062 5 mg/mL 酶液与 0.087 5 mg/mL 酶液效果均较好,二者相差不大,综合考虑以 0.062 5 mg/mL 为最佳酶液质量浓度。

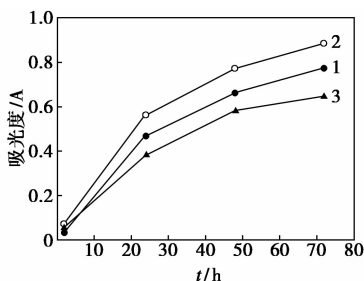


1—0.037 5 mg/mL; 2—0.062 mg/mL; 3—0.087 5 mg/mL

图 2 酶液质量浓度对酶解的影响

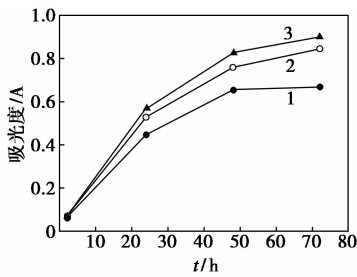
pH 和底物质量浓度对酶解的影响分别如图 3 和图 4 所示。

由图 3 可知,酶蛋白对 pH 很敏感,该纤维素酶在 pH 4.8 时的酶解效果最好,最佳 pH 选 4.8。由图 4 可知,随着底物质量浓度的增加,纤维素的酶解效率也增加,17.5 mg/mL 底物质量浓度的酶解效果



1—pH=4.6; 2—pH=4.8; 3—pH=5.2

图 3 pH 对酶解的影响

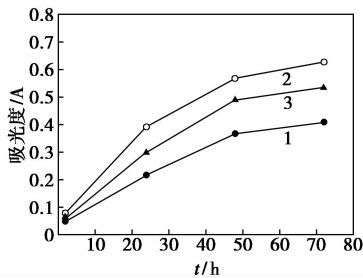


1—7.6 mg/mL;2—12.6 mg/mL;3—17.6 mg/mL

图4 底物质量浓度对酶解的影响

最好,但增幅趋缓,与12.5 mg/mL底物质量浓度相比,二者差别不大。酶液质量浓度一定时,酶对底物吸附浓度是一定的,因此最佳底物质量浓度为12.5 mg/mL。

酶水解反应时,适当转动可增加酶与底物的接触,加速酶解产物从底物上扩散到溶液中,但转速过高又不利于酶与底物的接触。转速对酶解的影响如图5所示。由图5可知,转速为120 r/min时酶解效率较好。



1—90 r/min;2—120 r/min;3—150 r/min

图5 转速对酶解的影响

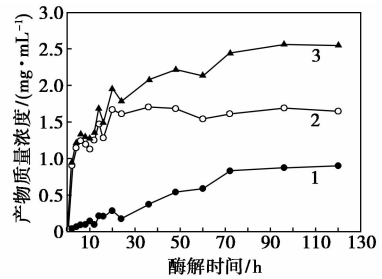
综上所述,最佳的酶解条件为:酶液质量浓度为0.0625 mg/mL,底物质量浓度为12.5 mg/mL,pH 4.8缓冲溶液,温度为50℃,转速为120 r/min。

2.2 酶水解

MCC在最佳条件酶解溶液经离子色谱仪检测表明,有2个明显的吸收峰,保留时间分别为3.89 min与7.62 min,此外没有其他吸收峰。与葡萄糖、纤维二糖混合标样的离子色谱图比对可以确认,MCC水解产物主要是葡萄糖与纤维二糖。

以不同浓度标样绘制葡萄糖与纤维二糖的标准曲线,拟合所得葡萄糖的线性方程为: $Y_{HC} = 152150X_C + 2.8339$,其中 Y_{HC} 为葡萄糖的峰高, X_C 为葡萄糖的质量浓度(mg/mL),其相关系数为0.9998。所得纤维二糖的线性方程为: $Y_{HC} = 5398.4X_C + 0.9419$,其中 Y_{HC} 为纤维二糖的峰高, X_C 为纤维二糖的质量浓度(mg/mL),其相关系数为

0.9992。MCC酶水解过程葡萄糖与纤维二糖以及总糖(二者合计)质量浓度的变化曲线如图6所示。

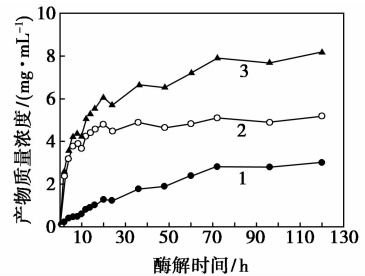


1—葡萄糖;2—纤维二糖;3—总糖

图6 MCC酶水解的产物浓度曲线

由图6可知,水解液中2种产物的质量浓度都比较低。72 h时葡萄糖质量浓度趋于最大值,但仍低于1.0 mg/mL;纤维二糖的质量浓度则明显高于葡萄糖的质量浓度,在酶解24 h时就超过了1.5 mg/mL,但之后增长缓慢,稳定在1.5 mg/mL左右。MCC酶解120 h时,葡萄糖得率约为7.2%,纤维二糖得率约为13.5%,总糖得率约为20.5%。

纤维素酶对解结晶MCC水解的产物质量浓度的影响如图7所示。由图7可知,解结晶MCC酶解溶液中,在120 h时,葡萄糖质量浓度约为2.0 mg/mL;而纤维二糖质量浓度在10 h就超过了4.0 mg/mL,之后增速放缓;在120 h时总糖质量浓度约为8.0 mg/mL。葡萄糖最终得率约为24.1%,纤维二糖得率约为41.4%,总糖得率约为65.5%,分别是MCC样品的3.3、3.0、3.2倍。



1—葡萄糖;2—纤维二糖;3—总糖

图7 纤维素酶对解结晶MCC水解的产物浓度曲线

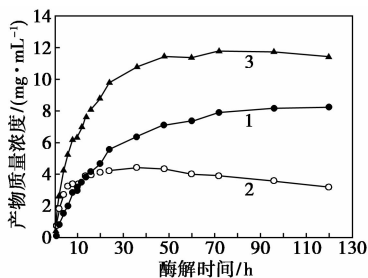
对比微晶纤维素解结晶前后纤维二糖得率变化可知,MCC在酶解20 h时达到13%得率,之后增幅明显放缓,趋于稳定;而解结晶MCC在酶解2 h得率就超过18%,6 h后超过30%,之后增幅减小,逐渐达到40%以上。可见,解结晶处理对酶解效率的提高是因为大幅度地提高了纤维素转化为纤维二糖的速度,从而提高了葡萄糖的酶解效率。

2.3 纤维素酶

在上述酶解过程中,中间产物纤维二糖的大量积累说明由纤维二糖到葡萄糖的转化效率不高,可能与纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶组分的活性有关。与其他研究小组得出的超过 90% 的总糖得率相比^[5],实验中解结晶处理的 MCC 样品的酶解总糖得率不高。为此,实验中以 MALDI TOF 质谱技术检测了纤维素酶的分子质量,由纤维素酶的时间飞行质谱图可知,纤维素酶有 4 个吸收强度明显的峰,其质荷比 (m/z) 分别为 5 895.343、6 671.545、11 320.754、13 510.534。结合文献[6-7]与纤维素酶的相对分子质量判断,这 4 个峰分别对应内切葡聚糖酶(EGI)、外切葡聚糖酶(CBHII)、外切葡聚糖酶(CBHI)、 β -葡萄糖苷酶(BG)。一般纤维素酶各组分的相对分子质量大约为 26 000(EGI)、47 000(CBHII)、55 000(CBHI)、74 000(BG)。可见,所用纤维素酶的相对分子质量偏低,活性较弱。因此,在原有纤维素酶液中添加适量的 β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.4)(质量浓度为 0.03 mg/mL)进行协同酶解。

2.4 协同酶解

纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶协同水解结晶 MCC 样品的结果如图 8 所示。与单纯使用纤维素酶相比,葡萄糖质量浓度大幅度提高,且远超过纤维二糖的质量浓度,酶解 72 h 时葡萄糖质量浓度就超过 7 mg/mL;而纤维二糖质量浓度在达到 4 mg/mL 后呈现逐渐降低趋势。



1—葡萄糖;2—纤维二糖;3—总糖

图 8 纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶协同酶解结晶 MCC 的产物浓度曲线

解结晶 MCC 结合协同酶解、解结晶 MCC 结合单独酶解、MCC 单独酶解 3 种处理方式作用 120 h 时,葡萄糖、纤维二糖和总糖得率对比如表 1 所示。由表 1 可知,解结晶 MCC 协同酶解的葡萄糖、纤维二糖、总糖得率分别为 65.8%、25.2%、94.3%,与解结晶 MCC 单独酶解相比,葡萄糖与总糖得率分别

提高了 173%、44.0%,纤维二糖得率则降低了 38.4%。再与 MCC 单独酶解相比,则葡萄糖得率提高了 813.9%,总糖得率提高了 361.0%,纤维二糖得率则提高了 86.7%。可见解结晶处理降低纤维素结晶度,提高了酶与底物的接触,纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶协同酶解降低了纤维二糖的反馈抑制作用,这二者共同作用大幅度提高了水解得率。

表 1 2 种酶解方式水解结晶 MCC 样品 120 h 产物得率对比

处理方式	葡萄糖得率/%	纤维二糖得率/%	总糖得率/%
解结晶 MCC 协同酶解	65.8	25.2	94.3
解结晶 MCC 单独酶解	24.1	41.4	65.5
MCC 单独酶解	7.2	13.5	20.5

2.5 麦草酶解

采用解结晶结合协同酶解处理麦草样品,其产物经检测主要有甘露糖、葡萄糖、木糖、乳糖、纤维二糖等。麦草三大组分中木质素不酶解,而葡萄糖与纤维二糖是纤维素的酶解产物,木糖是半纤维素的主要酶解产物。因此,麦草的酶解产物主要讨论葡萄糖、纤维二糖与木糖,其余糖类暂不讨论,并以这 3 种糖的总量来计算麦草酶解总糖得率。结果如表 2 所示。

表 2 麦草 2 种方式酶解 120 h 产物得率对比

处理方式	葡萄糖得率/%	木糖得率/%	总糖得率/%
解结晶协同酶解	26.5	21.6	54.3
未解结晶单独酶解	3.5	9.8	13.3

由表 2 可知,解结晶麦草协同酶解 120 h 时,葡萄糖、木糖与总糖得率分别为 26.5%、21.6%、54.3%,与未解结晶麦草单独酶解相比,三者分别提高了 657.1%、120.4%、308.3%。再考虑到麦草中纤维素质量分数约 40%,半纤维素与纤维素合计质量分数约 80%^[8],则这样得率还是比较高的。因此,解结晶结合协同酶解方法可以显著提高麦草的水解效率。

3 结论

以解结晶处理结合协同酶解方式构建了一种高效的酶水解方法。

(1)酶水解的最佳条件为:酶液质量浓度为 0.062 5 mg/mL,底物质量浓度为 12.5 mg/mL,pH

(下转第 94 页)

