

亚硫酸盐蔗渣浆酶解工艺及外源物辅助作用的研究



LIU Bao-tian

刘宝田, 蔡聪, 冯萌, 李鑫, 欧阳嘉*

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 以亚硫酸盐蔗渣浆为研究对象,研究了底物浓度、外源添加物种类和浓度对纤维素酶解工艺的影响以及 PEG6000 强化酶解效率的作用机理。研究表明,纤维素酶用量 15 FPIU/g(以绝干纤维素计,下同)、 β -葡萄糖苷酶用量 30 CBU/g,纤维素质量浓度 80 g/L 条件下水解 48 h,葡萄糖质量浓度达 72.51 g/L,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率达 81.58%、86.79% 和 84.23%。PEG6000 可有效强化酶解,添加量为 2 g/L 时,水解 48 h 葡萄糖质量浓度可升至 78.54 g/L,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率达 88.36%、95.02% 和 92.54%。添加 2 g/L 的 PEG6000 使纤维素酶 Celluclast 1.5 L 滤纸酶活力提高到原酶活力的 117.33%;同时 50 °C, pH 值 4.8, 保温 48 h, 残余酶活力同比增加 38.99%。

关键词: 甘蔗浆;酶水解;外源添加物;PEG6000

中图分类号:TQ35

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2012)03-0028-05

The Study about Enzymatic Hydrolysis of Bagasse Sulfite Pulp and the Assistant Effect of Additives

LIU Bao-tian, CAI Cong, FENG Meng, LI Xin, OUYANG Jia

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to optimize the hydrolysis conditions of bagasse sulfite pulp, the influences of substrate concentration, species and concentration of exogenous additives on hydrolysis were investigated in present study. The results showed that the sample with 72.51 g/L glucose concentration, 81.58% glucose yield, 86.79% hydrolysis yield and 84.23% total sugar yield were obtained by using 15 FPIU/g cellulase and 30 CBU/g β -glucosidase with 80 g/L cellulose after 48h hydrolysis. Addition of PEG6000 could enhance the hydrolysis process remarkably. The glucose concentration reached 78.54 g/L after 48 h of hydrolysis in presence of 2 g/L PEG6000. Meanwhile, glucose yield, hydrolysis yield and total sugar yield increased to 88.36%, 95.02% and 92.54%, respectively. In addition, 117.33% increase in enzyme activity and 38.99% in stability of Celluclast 1.5L were observed when 2g/L PEG6000 was applied.

Key words: bagasse sulfite pulp; enzymatic hydrolysis; additive; PEG6000

能源是当今社会赖以生存和发展的基础,石油等传统化石燃料所造成的环境污染日益严重,而且其储量逐渐减少^[1]。由于纤维素和半纤维素可作为乙醇发酵的原料,自从世界各国逐步调整政策减少或禁止将粮食(淀粉)转换为燃料乙醇后,利用年产量巨大的植物纤维资源生产纤维质乙醇和其它化学品的技术更成为发展工业生物技术的重点^[2]。一些研究者指出,生物酶解糖化过程不仅是植物纤维资源生物转化的第一步和共同途径,更是该路线经济性的关键步骤。由于纤维素本身复杂的超分子结构,以及其他外部组分木质素、半纤维素等的保护作用,并且纤维素的结晶区含有易与水分子形成氢键的羟基,纤维素通常很难发生水解^[3-5]。一般认为,酶水解木质纤维原料的效率会受到原料结晶度、聚合度、水含量、有效表面积以及木质素含量等许多因素限制^[6-7]。为了克服这些障碍,各种原料预处理技术被

收稿日期:2011-08-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070513);江苏省高校自然科学研究重大项目(10KJA22019);2011年江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXLX11_0527)

作者简介:刘宝田(1987-),男,江苏南京人,硕士生,主要从事生物质生物转化研究工作

* 通讯作者:欧阳嘉,教授,硕士生导师,从事生物质能源开发利用和酶工程研究;E-mail:hgouyj@njfu.edu.cn。

利用以提高酶解过程中酶的可及度和使用效率^[8-11]。亚硫酸盐处理是造纸工业制浆工艺中的传统方法,该工艺可以较好地将木质素与纤维素分离,而且预处理后的废水主要富含磺化木质素,目前在表面活性剂、减水剂或药物等工业化合物领域表现出良好的回收利用价值。考虑到亚硫酸盐浆工艺可能真正实现预处理过程的清洁生产,作者研究了亚硫酸盐处理后蔗渣浆的纤维素酶解工艺过程及影响因素,主要对亚硫酸盐蔗渣浆水解过程的条件进行优化,考察了外源添加物对酶解的强化作用,最终探讨了亚硫酸盐预处理成为木质纤维生物转化重要步骤的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

亚硫酸盐蔗渣浆,广东甘化江门纸厂。原料成分分析方法来自 NREL 方法^[12],分析结果如下:纤维素 69.54% ± 0.20%,半纤维素 17.07% ± 0.20%,木质素 12.86% ± 0.50%,均以绝干计。实验所用酶和试剂均购自 Sigma 公司。纤维素酶 Celluclast 1.5 L 为 Novozymes 商品酶,里氏木霉 ATCC 26921 生产,滤纸酶活为 130.11 FPIU/mL;β-葡萄糖苷酶 Novozyme 188 为 Novozymes 商品酶,黑曲霉生产,β-葡萄糖苷酶酶活为 574.82 CBU/mL。

1.2 酶解实验

称取一定量的亚硫酸盐蔗渣浆于 100 mL 锥形瓶中,加入 1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH 值 4.5) 2.5 mL 及一定量的 2 种酶和水至总体积 50 mL 后置于 50 °C 水浴锅,转速 150 r/min 开始酶解反应。反应体系控制纤维素酶用量为 15 FPIU/g(以绝干纤维素计,下同),β-葡萄糖苷酶量为 30 CBU/g。

水解结束后于 5 000 r/min 离心 10 min,取清液沸水浴灭活 5 min,测定上清液中的糖组分,按公式计算出得率。得率计算公式如下:

$$y_1 = (C_{Ce} \times 1.05 + C_G) / (C_C / 0.9) \times 100 \%$$

$$y_2 = C_G / (C_C / 0.9) \times 100 \%$$

$$y_3 = C_X / (C_S / 0.88) \times 100 \%$$

$$y_4 = (C_{Ce} \times 1.05 + C_G + C_X) / (C_C / 0.9 + C_S / 0.88) \times 100 \%$$

式中: y_1 —纤维素酶解得率,%; C_{Ce} —水解液中纤维二糖的质量浓度,g/L; 1.05—纤维二糖浓度转化为葡萄糖浓度的比例系数; C_G —水解液中葡萄糖的质量浓度,g/L; C_C —酶解体系中纤维素的绝干质量浓度,g/L; y_2 —葡萄糖得率,%; 0.9—纤维素和葡萄糖之间的转化系数; y_3 —木糖得率,%; C_X —酶解体系中木糖的绝干质量浓度,g/L; C_S —酶解体系中半纤维素的绝干质量浓度,g/L; y_4 —总糖得率,%; 0.88—半纤维素和木糖之间的转化系数。

1.3 分析方法

水解液中糖含量的测定采用 HPLC 分析^[12]。HPLC 条件为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱,5 mmol/L H₂SO₄ 作为流动相,流速为 0.6 mL/min,柱温 55 °C。采用示差折光检测器检测,外标法测定。

滤纸酶活力和β-葡萄糖苷酶活力采用国际理论和应用化学协会推荐的标准方法测定^[14]。滤纸酶活定义为在标准反应条件下每分钟生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量,FPIU/mL。β-葡萄糖苷酶酶活定义为每 min 水解生成 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量,CBU/mL。

2 结果与分析

2.1 亚硫酸盐蔗渣浆水解特性的研究

甘蔗渣主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,其中纤维素质量分数约 35.4%,半纤维素 20.6%,木质素 18.6%^[15]。经过亚硫酸盐处理后的蔗渣固形物半纤维素和木质素均略有下降,木质素质量分数仅为 13.41%,而纤维素含量增加近一倍,可作为潜在的酶解底物制备葡萄糖和木糖。暗示亚硫酸盐处理可以有效脱除木质素,从而有利于原料的酶解。分别在 50、60、70 和 80 g/L 底物质量浓度(以绝干纤维素计,下同)下,以亚硫酸盐蔗渣浆为底物进行 48 h 酶解。底物质量浓度对亚硫酸盐蔗渣浆酶解效果的影响如表 1 所示。

表1 底物浓度对亚硫酸盐蔗渣浆酶水解的影响

Table 1 Effects of substrate concentration on the enzymatic hydrolysis of sulfite bagasse pulp

底物/(g·L ⁻¹) substrate concentration	纤维二糖/ (g·L ⁻¹) cellulose	葡萄糖/ (g·L ⁻¹) glucose	木糖/ (g·L ⁻¹) xylose	葡萄糖得率/% glucose yield	纤维素酶解 得率/% hydrolysis yield	木糖得率/% xylose yield	总糖得率/% total sugar yield
50	3.15	52.83	10.59	95.11	101.05	68.96	99.64
60	3.15	60.06	11.02	90.11	95.07	59.82	91.71
70	3.61	64.45	11.49	82.87	87.74	53.45	85.03
80	4.41	72.51	13.11	81.58	86.79	53.37	84.23

从表1可以看出,亚硫酸盐预处理可以有效削弱底物对纤维素酶的抗性,提高酶水解转化率,在试验底物浓度范围内,亚硫酸盐蔗渣浆酶解的葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率均可以80%以上。随着底物浓度的不断增加,产物抑制作用和浆料的传质阻力明显加大导致各项糖得率逐渐降低,当纤维素质量80 g/L时,酶解48 h葡萄糖浓度72.51 g/L,但酶解过程传质困难,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率分别达到81.58%、86.79%和84.23%。为了获得最高糖浓以利于后期的发酵工艺,本试验选择纤维素80 g/L为最佳底物浓度。

在酶用量15 FPIU/g和30 CBU/g,底物质量浓度80 g/L,温度50℃,pH值4.8条件下水解亚硫酸盐蔗渣浆,水解过程中得率和糖浓度随时间的变化规律如图1所示。酶解过程可以分为3个阶段。第一阶段为酶解前8h,是酶解过程效率最高的时期,由于不存在产物抑制作用,纤维二糖质量浓度较低,酶的失活现象还不明显,此阶段葡萄糖质量浓度和木糖质量浓度都增加显著,反应速率最快;第二阶段为8~36 h,虽然较第一阶段反应速率有所下降,但各项糖浓度和得率均呈现出稳定增长。纤维二糖由8 h的1.44 g/L上升至36 h的4.13 g/L,表明此阶段纤维二糖积累严重,负责水解纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶受逐渐升高的葡萄糖浓度影响,产生明显的产物抑制作用,从而制约单糖得率。反应36 h葡萄糖得率和木糖得率分别达到76.89%和51.31%。酶解最后阶段为36 h后,此时纤维二糖的变化处于比较缓和的水平,酶解效率逐渐趋于饱和。由于纤维二糖是酶系中纤维素酶的重要产物,同时也是 β -葡萄糖苷酶的作用底物,分析认为较高水平的纤维二糖含量和较长的反应时间造成纤维素酶的产物抑制和热失活均很严重,并最终导致葡萄糖和木糖质量浓度的变化变得缓慢,纤维素和半纤维素的酶解速率均有所减缓。

2.2 外源添加物对酶解过程的辅助作用

2.2 外源添加物对酶解过程的辅助作用

对亚硫酸盐蔗渣浆酶解过程的研究显示反应时间的延长不利于维持较高的反应速度,反应过程酶的失效被认为是导致酶解效率不高的重要因素。有研究报道表明,一些外源添加物的加入对纤维素酶解具有较好的辅助作用。为了进一步提高亚硫酸盐蔗渣浆酶解效率,在相同酶用量和实验条件下添加2 g/L外源物进行48 h酶解实验。外源添加物对亚硫酸盐蔗渣浆酶解过程的影响见表2。

加入的7种外源添加物,蛋白胨和酵母膏属于成分复杂的有机物,Tween80和PEG6000为非离子型表面活性剂,其余3种为无机盐类。从表2可以看出,盐类的加入对酶解过程没有任何促进作用,其中FeCl₃、CuCl₂对酶解还有明显的抑制作用,这一结论对于同步糖化发酵工艺体系中Fe³⁺和Cu²⁺的含量控制具有重要的参考意义;复杂有机物和非离子表面活性剂对酶解效果均有积极影响,其中,非离子表面活性剂PEG6000的影响效果最为明显,不仅可以促进纤维素的酶解,同时也有效提高了半纤维素的酶解效率。Börjesson等^[16]研究表明,在酶解过程中,表面活性剂的加入可以吸附在木质纤维原料中的木质素上,从而有效减少了木质素对酶分子的无效吸附。

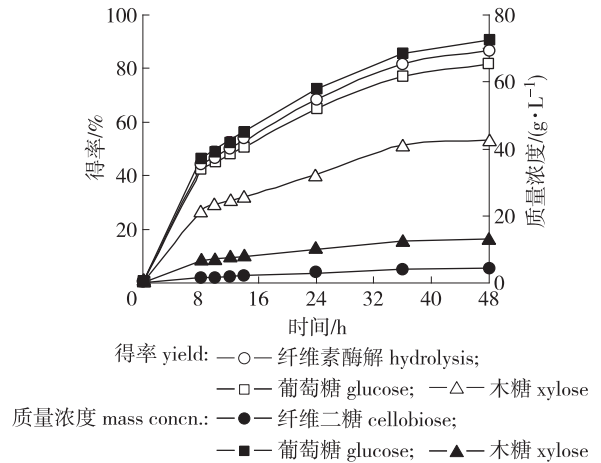


图1 反应时间对亚硫酸盐蔗渣浆酶解效率的影响

Fig.1 Effects of reaction time on the enzymatic hydrolysis

Fig.1 Effects of reaction time on the enzymatic hydrolysis

表 2 不同添加物对亚硫酸盐蔗渣浆酶水解的影响

Table 2 Effects of different additives on the enzymatic hydrolysis of sulfite bagasse pulp

项目 contents	纤维二糖/ (g·L ⁻¹) cellulose	葡萄糖/ (g·L ⁻¹) glucose	木糖/ (g·L ⁻¹) xylose	葡萄糖得率/% glucose yield	纤维素酶解 得率/% hydrolysis yield	木糖得率/% xylose yield	总糖得率/% total sugar yield
蛋白胨 peptone	5.28	76.02	13.76	85.52	91.75	56.01	88.96
酵母膏 yeast	4.90	74.49	13.45	83.80	89.59	54.73	86.87
聚乙二醇 PEG6000	5.64	78.54	14.69	88.36	95.02	59.80	92.54
吐温 80 Tween80	4.48	73.82	13.49	83.05	88.33	54.91	85.87
FeCl ₃	0	7.11	1.17	8.00	8.00	4.75	7.73
CuCl ₂	0.46	20.56	3.91	23.13	23.67	15.93	23.29
CaCl ₂	4.18	72.47	13.07	81.52	86.46	53.17	83.92
空白对照 contral	4.14	72.57	13.36	81.64	86.54	54.37	84.26

图 2 显示了在底物质量浓度为 80 g/L 的酶解体系下,添加不同量 PEG6000 对酶解的影响。PEG6000 从 1 g/L 逐渐增加到 5 g/L,酶解效果均有提高,其中 3、4、5 g/L 时,影响几乎相同,在 PEG6000 2 g/L 时,促进最为显著,葡萄糖可升至 78.54 g/L,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率达到 88.36 %、95.02 % 和 92.54 %,提高幅度达 6.78 %、8.23 % 和 8.31 %。

2.3 PEG6000 对纤维素酶学性质的影响

外源添加物实验反映添加 2 g/L PEG6000 可以有效促进亚硫酸盐蔗渣浆的酶解。为了进一步考察 PEG6000 对酶解的影响机理,模拟酶解条件,在无底物状态下考察 PEG6000 对纤维素酶 Celluclast 1.5 L 活力和稳定性的影响。实验结果如图 3 和图 4 所示。以初始条件下不含 PEG6000 的商品酶 Celluclast 1.5 L 的滤纸酶活计 100 %。图 3 揭示了 PEG6000 质量浓度对纤维素酶活力的影响。由图可知,随着 PEG6000 质量浓度的上升,纤维素酶活力表现出先上升后下降的趋势。一方面,低质量浓度 PEG6000 的存在有利于纤维素酶活力的提高,当添加 2 g/L PEG6000 时,纤维素酶滤纸酶活较未添加提高到 117.33 %;另一方面,PEG6000 添加过多对酶活有一定的抑制作用,从 3 g/L 变化到 6 g/L 时,相对酶活力逐渐下降。添加 6 g/L PEG6000 时,相对酶活力为不添加的 91.94 %。PEG6000 质量浓度对纤维素酶活力的变化趋势几乎与对亚硫酸盐蔗渣浆酶解的影响趋势(见图 2)完全一致,暗示 PEG6000 对纤维素酶活的增强效应是其促进酶解的重要因素。对比 PEG6000 存在与否对纤维素酶在反应条件下稳定性的影响,结果见图 4。

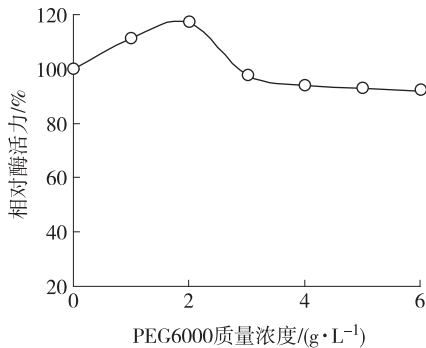


图 3 PEG6000 对纤维素酶活力的影响

Fig. 3 The effects of PEG6000 on cellulase activity

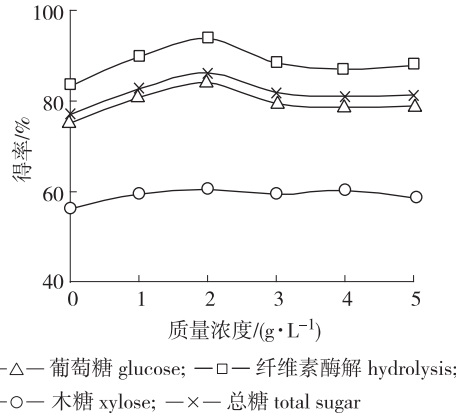


图 2 不同质量浓度 PEG6000 对亚硫酸盐蔗渣浆酶解的影响

Fig. 2 Enzymatic hydrolysis at different PEG6000 concentration

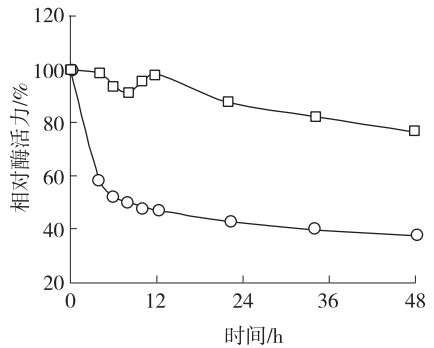


图 4 2 g/L PEG6000 对纤维素酶活力稳定性的影响

Fig. 4 The effect of 2 g/L PEG6000 addition on stability of FPA

未添加 PEG6000 的对照组纤维素酶活在 8 h 已降至初始酶活的 49.90 % ,48 h 后残余活力仅剩 37.36 % 。这一结果从侧面反映了酶解过程中纤维素酶稳定性的下降将是酶解后期效率下降的重要原因。比较而言,PEG6000 的存在不仅影响纤维素酶活力,对纤维素酶活力稳定性的影响也较为显著。加入 PEG6000 可导致纤维素酶 Celluclast 1.5 L 稳定性大幅度提高,48h 后纤维酶残余活力保持在 76.35 % ,同比增加 38.99 % 。对纤维素酶稳定性的考察说明加入 PEG6000 可有效提高纤维素酶在 48 h 反应时间内的稳定性,缓解酶的失活,从而促进酶解效率的提高。

3 结论

3.1 亚硫酸盐处理后蔗渣浆是一种较易水解的纤维素底物,经酶解可获得较高的葡萄糖得率和总糖得率。在纤维素酶用量为 15 FPIU/g(以绝干纤维素计,下同)和 β -葡萄糖苷酶用量 30 CBU/g,纤维素质量浓度 80 g/L,温度 50 °C ,pH 值 4.8 条件下水解亚硫酸盐蔗渣浆 48 h,葡萄糖质量浓度达 72.51 g/L,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率可以分别达到 81.58 % 、86.79 % 和 84.23 % 。

3.2 酶解体系添加适当蛋白胨、酵母膏和 PEG6000,对酶解效果有促进作用,其中 PEG6000 影响最为明显。PEG6000 添加量为 2 g/L 时,葡萄糖质量浓度可升至 78.54 g/L,葡萄糖得率、纤维素酶解得率和总糖得率达到 88.36 % ,95.02 % 和 92.54 % ,提高幅度达 6.78 % 、8.23 % 和 8.31 % 。

3.3 PEG6000 可以有效提高纤维素酶 Celluclast 1.5 L 的活力和稳定性。添加量为 2 g/L 时,滤纸酶活增至 117.33 % ,温度 50 °C ,pH 值 4.8 下保温 48 h 残余酶活达 76.35 % ,较空白对照同比增加 38.99 % 。

参考文献:

- [1] 陈洪章,邱日华. 秸秆发酵燃料乙醇关键问题及其进展[J]. 化学进展,2007,19(7/8):1116-1121.
- [2] 胡湛波,柴欣生,王景全,等. 以制浆造纸产业为平台的生物炼制新模式[J]. 化学进展,2008,20(9):1439-1446.
- [3] 吴连祯,张俊华,林鹿,等. 亚硫酸盐蔗渣浆的纤维素酶水解及其机理研究[J]. 林产化学与工业,2010,30(1):34-38.
- [4] 高洁,汤烈贵. 纤维素科学[M]. 北京:科学出版社,1996:57-69.
- [5] JEFFEY G A, SAEAGA W. Hydrogen Binding in Biological Structure[M]. 2nd ed. Berlin:Springer-Verlag,1994:125-138.
- [6] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. Biotechnology Advances,2000,18(5):355-383.
- [7] HENDRIKS A T W M, ZEEMAN G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology,2009,100(1):10-18.
- [8] AI-ZUHAIR S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis[J]. Bioresource Technology,2008,99(10):4078-4085.
- [9] ÖHGREN K, BURA R, SADDLER J, et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover[J]. Bioresource Technology,2007,98(13):2503-2510.
- [10] CHANDRA R P, EWANICK S M, CHUNG P A, et al. Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates[J]. Biotechnology Letters,2009,31(8):1217-1222.
- [11] ZHAO Hua, JONSEA C L, BAKER G A, et al. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Biotechnology,2009,139(1):47-54.
- [12] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analysis Procedure[M]. Golden, co, USA,2005.
- [13] CHEN Ming, ZHAO Jing, XIA Li-Ming. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars[J]. Carbohydrate Polymers,2008,71(3):411-415.
- [14] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry,1987,59(2):257-268.
- [15] 邓强,张焜,蔡燕飞,等. 甘蔗渣纤维素的微生物和酶降解研究进展[J]. 化学工程与设备,2008(5):79-83.
- [16] BÖRJESSON J, ENGQVIST M, SIPOS B, et al. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose[J]. Enzyme and Microbial Technology,2007,41(1/2):186-195.