

表面活性剂对纤维素酶水解过程的影响

曾 晶,叶 媛,龚大春,田毅红,李德莹,王 栋

(三峡大学艾伦麦克德尔米德再生能源研究所,湖北 宜昌 443002)

摘 要: 分别以湿氧化、稀酸常压水解和蒸汽爆破预处理麦草为底物,考察了不同表面活性剂及用量对纤维素酶水解过程的影响。实验表明,添加表面活性剂对纤维素酶水解过程有明显影响。添加非离子型表面活性剂(PEG6000、吐温 80)可以提高纤维素的溶解性、可发酵糖的转化水平,其中向湿氧化处理的麦草中加入 PEG6000 后转化水平提高得最大,而添加离子型表面活性剂对酶解起抑制作用。非离子型表面活性剂和纤维素水解底物的最佳比例大约是 0.05 g/g DM。

关键词: 木质纤维素; 麦草; 酶水解; 表面活性剂; 吸附

中图分类号: Q814.355

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)12-0038-03

Effects of the Use of Surface Active Agents on the Hydrolysis of Cellulase

ZENG Jing, YE Yuan, GONG Da-chun, TIAN Yi-hong, LI De-ying and WANG Dong

(Alan G. Macdiarmid Research Institute of Renewable Energy, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: Wheat straw pretreated by wet-oxidation, dilute-acid atmospheric hydrolysis and steam explosion respectively were used as substrate, and the effects of the use of different surface active agents at different use levels on the hydrolysis of lignocellulose were investigated. The experimental results showed that the addition of non-ionic surfactants (PEG6000 and Tween80) could increase the conversion of cellulose into soluble and fermentable sugars (the highest conversion level for wheat straw pretreated by wet-oxidation), and the addition of ionic surfactants had the opposite effects. The optimum ratio between non-ionic surfactant and substrate was approximately 0.05 g (g DM)⁻¹.

Key words: lignocellulose; wheat straw; enzyme hydrolysis; surfactant; absorption

纤维素是地球上最丰富、最廉价的可再生资源。资料表明,植物通过光合作用使光能以生物能形式固定下来,其生成量每年高达 50×10^9 t,这些能量相当于目前为止世界能耗总量的 10 倍,且这些生物能年复一年通过自然界物质循环生成,是不会枯竭的可再生资源^[1~3]。这些生物量中有大部分是以纤维素、半纤维素形式存在,因此研究开发纤维素转化技术,将秸秆、蔗渣、废纸、垃圾纤维等纤维素类物质高效转化为糖,进一步发酵成酒精,对开发新能源、保护环境,具有非常重要的现实意义^[4]。

已经证实,添加表面活性剂,如非离子去污剂和蛋白能有效提高纤维素向可溶性糖的转化水平。最近,对蒸汽处理过的软木物质的研究表明,非离子去污剂促进作用的主要机理依赖于纤维素表面活性剂和木质素表面相互作用的影响。木质素对表面活性剂的吸附可以阻止酶与木质素的无效结合^[5]。因此,可以得到高产量和易回收的酶,这与在有表面活性剂的情况下,木质纤维素与少量的酶吸附的结果是一致的。补加蛋白如 BSA 也

被认为是和木质素结合,阻止与纤维素酶的无效结合^[5]。

其他的机理包括表面活性剂可以改变底物的特性,增加了纤维素可供吸附的表面,依次刺激反应位点而吸附到酶上。表面活性剂对酶也有稳定效应,在水解过程中有效地阻止了酶的变性。这可能是表面活性剂与酶蛋白的三级结构发生键合,由其他酶类似情况可得。

酶将纤维素转化为可溶性糖的第一步,是酶吸附于纤维素表面。同实际的水解酶的活性相比较,吸附速率快得多。因此酶的吸附量是反应效率的一个重要因素。对木质纤维素底物的预处理或加工在水解效率和吸附率的程度上都有重大的影响。

上述的研究重点主要集中在木质材料上,尤其是有些地区有丰富的软木木质纤维素。然而,像以玉米秸秆和麦草这类农业废弃物作为原料,生产生物乙醇还没有被充分的开发利用。总的来说,草本植物的木质素含量低,且有不同的组成,这些不同点很可能影响到酶与底物的相互作用,从而影响表面活性剂的作用。本课题重点研究了不同表面活性剂对不同纤维素材料在酶解糖

收稿日期:2008-09-08

作者简介:曾晶(1981-),硕士,从事生物化学的教学和生物质的研究。

通讯作者:龚大春(1967-),男,生物化工博士,副教授,硕士生导师,主要从事生物质能的研究与开发以及手性化合物的合成技术研究。

化过程中的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及其预处理

田间废弃麦草:干燥后经粉碎机粉碎,过 40 目筛备用。

湿氧化^[6]:在高压反应釜中以 1:15 的固液比投料,溶液为 4 %碳酸钠溶液,氧气压力为 1.2 MPa,130 °C 下处理 25 min,迅速冷却,过滤得滤渣。

稀酸常压水解:采用 4 %稀硫酸,以 1:15 的固液比投料,在 100 °C 下处理 6 h,冷却后调整 pH 为中性,过滤得滤渣。

蒸汽爆破:将一定量经过粉碎的麦草原料用 3 %氢氧化钠浸泡处理 12 h 后,置于汽爆罐中,关闭容器,迅速升压至 0.8 MPa,保温 8 min,通过气动阀瞬间泄压,使原料在压差作用下通过旋风分离进入接收容器中。待原料冷却后过滤得滤渣。

将以上 3 种不同预处理方法得到的滤渣作为酶水解底物,干燥后备用。

1.2 纤维素粗酶液的制备

液态发酵法制取纤维素酶,菌种黑曲霉购自 CICC。培养基配方:麦草 4 %,麸皮 1 %,磷酸二氢钾 0.03 %,硫酸镁 0.002 %,硫酸铵 0.1 %。接种完毕后放在 28 °C,100 r/min 的恒温培养箱中进行振荡培养,培养 4~5 d 即发酵完成,4000 r/min 下离心 20 min 后,再进行过滤。滤液即为粗酶液,放于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3 表面活性剂

本实验所用表面活性剂包括十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基磺酸钠、PEG6000、十二烷基苯磺酸钠、吐温。

1.4 酶水解过程的研究

1.4.1 表面活性剂的初步考察

在相同酶用量和水解条件下考察了不同表面活性剂对以不同预处理麦草为底物的酶水解过程的影响。取数支干燥洁净试管分别加入 0.1 g 预处理麦草,1 mL 酶液,0.05 g/gDM 的不同表面活性剂(为提高实验准确性,表面活性剂先用 pH4.8 HAc-NaAc 缓冲液配制溶液后再添加,下同),用 pH4.8HAc-NaAc 缓冲液将反应总体积补足至 10 mL,50 °C 恒温振荡水解 1 h,以 DNS 法测还原糖来评价酶解结果。

1.4.2 表面活性剂用量考察

为了考察表面活性剂用量对酶水解过程的影响,以初步考察实验中效果最好的表面活性剂为研究对象,分别用 0.02 g/gDM、0.03 g/gDM、0.04 g/gDM、0.05 g/gDM、0.06 g/gDM 和 0.07 g/gDM 的用量来进行实验。实验方法同 1.4.1。

1.4.3 酶水解时间曲线的测定

文献报道不同纤维素底物酶水解率多在 48~72 h 达到最大,不同底物间有差别,且同一底物在不同反应条件下也有一定差别,这就增加了本实验的复杂性,因为本实验既考查水解底物又考察反应条件(不同表面活性剂)对水解过程的影响。因此,酶水解率最大值并不出现在某一固定时间,出于简化实验进程即统一时间便于比较的考虑,本实验统一水解 1 h 后即测还原糖考察酶解结果。此外,通过测水解时间曲线以作为数据补充。

1.4.4 酶吸附量的测定

纤维素酶具有一个催化活性区 CD 和一个纤维素结合区 CBD,二者由一个柔韧的肽链连接。水解前,纤维素酶首先通过 CBD 吸附于固体底物上,然后进行水解,所以纤维素酶水解底物的第一步就是要与底物结合。表面活性剂能促进纤维素材料水解是因为表面活性剂与木质纤维素中的木质素之间的疏水作用,木质素对表面活性剂的吸附可以阻止酶与木质素的无效结合。酶对底物的吸附可以通过测量溶液中内切葡聚糖酶的活性来计算。为了了解表面活性剂促进纤维素材料水解的作用机理,对酶吸附量的测定是有必要的。

测定方法:在水解前测定初始酶液的 CMC 酶活,酶活的测定方法见文献[6],酶活力单位定义为在一定条件下,1 min 内水解 CMC-Na 得到 1 mg 葡萄糖所需要的酶量为一个单位 U。然后将此酶液加到水解底物中进行水解,水解 1 h 后将水解液过滤,取部分水解液测 CMC 酶活。按以下公式计算吸附量:

$$\text{吸附量} = \frac{\text{水解前 CMC 酶活} - \text{水解后 CMC 酶活}}{\text{水解前 CMC 酶活}} \times 100\%$$

考察了以 3 种不同预处理麦草为底物,分别添加 3 种表面活性剂后对酶吸附量的影响。反应条件:麦草 0.1 g,酶液 10 mL,表面活性剂 0.005 g,50 °C 恒温振荡水解 1 h 进行测定。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂的初步考察结果

在相同的酶用量和水解条件下,不同表面活性剂对不同预处理麦草的酶水解过程的影响,结果见表 1。

表 1 表面活性剂对不同预处理麦草的酶水解结果

项目	湿氧化	稀酸低压水解	蒸汽爆破
空白对照 ^a	0.011 ^b	0.054	0.016
十六烷基三甲基溴化铵	0.008	0.053	0.008
十二烷基磺酸钠	0.009	0.048	0.012
十二烷基苯磺酸钠	0.010	0.045	0.026
PEG 6000	0.023	0.069	0.021
吐温 80	0.017	0.056	0.019

注: a 以未加任何表面活性剂作为空白对照; b 表中数值指水解 1 h 后水解液中 Glc 浓度,单位 mg/mL。

由表 1 中数据可以看出,表面活性剂的添加对酶水解过程有不同程度的影响。其中,离子型表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠对水解有抑制作用,非离子型表面活性剂对水解有促进作用,并且 PEG6000 对水解的促进作用要强于吐温 80。此外,表面活性剂对不同的预处理材料表现出趋势相同而程度不同的促进作用。水解率提高最大的是湿氧化处理的麦草,加了 PEG 的比没有加表面活性剂的麦草水解率提高了 1 倍多。酸水解的麦草水解率提高了 26.4 %,蒸汽爆破处理的麦草水解率提高了 35.1 %。

2.2 表面活性剂用量的考察结果

选取对酶水解过程有明显促进作用的 PEG6000 为研究对象,分别以 0.02 g/gDM、0.03g/gDM、0.04 g/gDM、0.05 g/gDM、0.06 g/gDM 和 0.07 g/gDM 的用量来进行实验,结果见图 1。

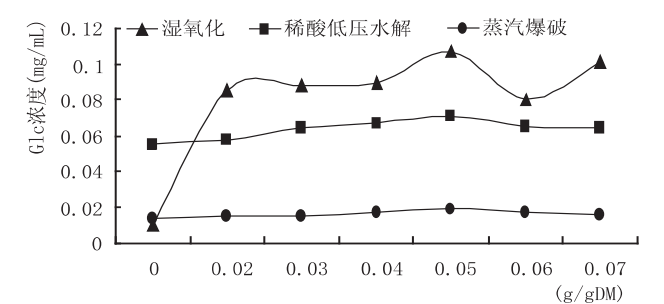


图 1 PEG600 用量对不同预处理麦草的酶水解结果

由图 1 可知,对于 3 种不同预处理材料,随着 PEG6000 浓度的增大,酶水解率有所提高,当表面活性剂和底物的质量比约为 0.05 g/g DM 时,水解率最大。

2.3 酶水解时间曲线的测定

对 3 种不同预处理麦草,考察了酶解率随时间变化的曲线,结果见图 2~图 4。

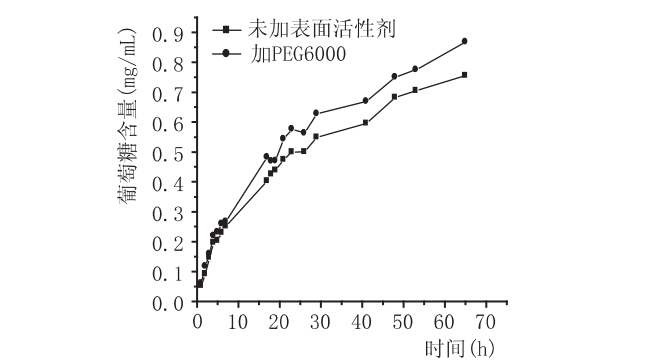


图 2 湿氧化处理的麦草水解曲线

由图 2~图 4 可以看出,麦草经过不同方式的预处理之后,水解效果不同,本实验条件下酸处理后的麦草水解效果最好,水解产物含糖量最高;酶解率达到最高点对应的时间不同,酸水解和蒸汽爆破底物 20~30 h

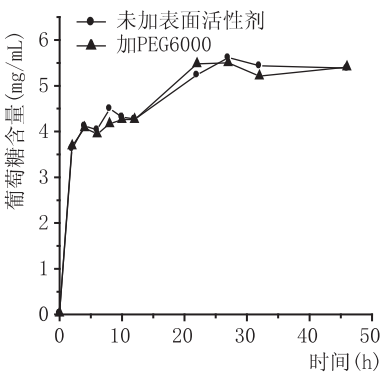


图 3 酸处理的麦草的水解曲线

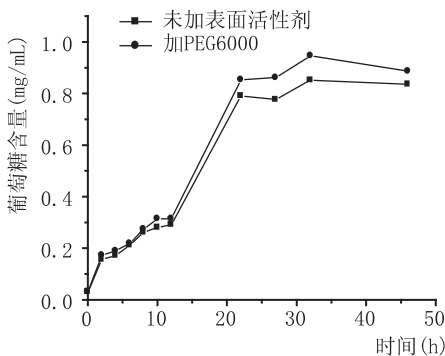


图 4 蒸汽爆破麦草水解曲线

后即达到最大,而湿氧化处理麦草水解 70 h 后仍未见下降。表面活性剂 PEG6000 对麦草水解有促进作用,对不同的预处理材料效果不同,其中 PEG6000 对湿氧化处理后的麦草的水解促进作用最大,但对酸处理过的麦草没有多大的促进作用。

2.4 酶吸附量的测定结果

考察了十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基苯磺酸钠和 PEG6000 对酶吸附量的影响,结果见表 2。

表 2 表面活性剂对酶吸附量的影响				
项目		湿氧化	稀酸低 压水解	蒸汽 爆破
空白对照	水解前酶活(U)	0.017	0.017	0.019
	水解后酶活(U)	0.007	0.006	0.013
	酶吸附量(%)	59.9	67.7	29.0
十六烷基三 甲基溴化铵	水解后酶活(U)	0.001	0.002	0.005
	酶吸附量(%)	94.6	86.5	73.3
十二烷基 苯磺酸钠	水解后酶活(U)	0.009	0.007	0.011
	酶吸附量(%)	50.0	57.8	42.5
PEG6000	水解后酶活(U)	0.011	0.009	0.017
	酶吸附量(%)	34.2	50.7	10.6

由表 2 可以看出,表面活性剂对酶吸附量的影响结果是十六烷基三甲基溴化铵>空白对照>十二烷基苯磺酸钠>PEG6000,由此验证了前人提出的部分结论,即非离子型表面活性剂 PEG6000 能与木质素部分结合从而降低纤维素酶的非特异性吸附,而未加表面活性剂

(下转第 43 页)

$R_B > R_C$, 即温度对试验的影响最大, pH 值次之, 接种量最小; 3 种因素的最大值分别为: $K_A = 9.133$, $K_B = 8.900$, $K_C = 9.100$, 因此 3 种因素的最佳水平分别是: 温度、pH 值和接种量都取水平 2, 即最佳理论组合为 $A_2B_2C_2$ 。

通过表 6 方差分析可知, 温度和 pH 值对酒精产量的影响差异显著($0.05 < P < 0.01$); 而接种量对酒精产量的影响差异不显著($P < 0.05$)。

2.5 最佳工艺条件的验证

通过试验把理论适宜工艺条件 $A_2B_2C_2$ 和正交试验表中产酒精最高的组合 $A_2B_2C_3$ 进行比较。结果理论适宜工艺条件 $A_2B_2C_2$ 的得到的酒精产量为 9.8 % (v/v), 而正交试验表中产酒精最高的组合 $A_2B_2C_3$ 的得到的酒精产量为 9.6 % (v/v)。由此可知, 此试验的最佳工艺组合为 $A_2B_2C_2$, 即发酵温度为 36 °C, pH 值为 4.5, 接种量为 10 %。

3 结论

3.1 通过单因子试验和正交试验对甜高粱汁发酵生产酒精的条件进行优化, 确定了以 Co-158 酵母菌为菌种, 含糖量 18 % 的甜高粱汁为原料发酵生产酒精的工艺条件为: 发酵温度为 36 °C, pH 值为 4.5, 接种量为 10 %。在此发酵条件下发酵 32 h 得到酒精 9.8 % (v/v)。

3.2 3 个因素对酒精度的影响顺序依次为温度、pH 值、接种量, 其中温度和 pH 值对酒精产量的影响差异显著,

接种量对酒精产量的影响差异不显著。

参考文献:

- [1] 曹俊峰, 高博平, 谷卫彬. 甜高粱汁酒精发酵条件初步研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 201-203.
- [2] Ghasem N, Habibollah Y, Ku S, et al. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresource Technology, 2004, 92: 251-260.
- [3] Seungdo Kim, Bruce E. Dale. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues [J]. Biomass and Bioenergy, 2004, 26: 361-375.
- [4] E. Gnansounou, A. Dauriat, C. E. Wyman. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar-economic trade-offs in the context of North China [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 985-1002.
- [5] 陈秀卿. 黑龙江省甜高粱研究现状与展望 [J]. 黑龙江农业科学, 1999, (1): 43-45.
- [6] 王艳秋, 朱翠云, 卢峰, 等. 甜高粱的用途及发展前景 [J]. 杂粮作物, 2004, 24(1): 55-56.
- [7] 大连轻工业学院, 等. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 177-178.
- [8] 田栖静, 等. 发酵产品与试验方法标准汇编 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1992, 207.
- [9] 寇运同, 胡永松, 王忠彦, 等. 高温酵母发酵特性及功能的研究 [J]. 酿酒科技, 1995, (3): 70-72.
- [10] 李松岗. 实用生物统计 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2002. 304-314.

(上接第 40 页)

的空白对照中酶吸附量加大即是酶同木质素结合的结果, 加入十六烷基三甲基溴化铵后酶吸附量进一步增大, 由此说明离子型表面活性剂不能与木质素部分有效结合从而阻止酶的非特异性吸附, 另据报道, 巯基试剂能抑制纤维素酶活力^[7], 所以水解液中酶活进一步降低。

3 结论

表面活性剂的添加对木质纤维素材料的酶水解过程有着重要的影响, 本实验考察了 5 种不同表面活性剂对不同预处理麦草酶解过程的影响, 结果表明, 非离子型表面活性剂 PEG6000、吐温 80, 能有效提高纤维素水解效率, 而离子型表面活性剂则对水解过程有一定抑制作用。此外, 同一材料的不同的预处理方法对表面活性剂的效果有影响, 表面活性剂的用量对纤维素材料水解程度也有影响, 但影响不大。表面活性剂在酶水解作用中的积极作用已被多次报道, 有关表面活性剂的作用机理虽然不能很肯定, 但通过对酶吸附量的测量可以认为其作用机理是: 非离子型表面活性剂能阻止酶与木质素无效的结合, 使酶能高效地与纤维素结合, 从而提高纤维素的水解效率。本实验采用 PEG6000, 用量为表面活

性剂和纤维素水解底物的比是 0.05 g/g DM 时, 水解效率最高。

参考文献:

- [1] 胡代泽. 我国农作物秸秆资源的利用现状与前景 [J]. 资源开发与市场, 2006, 16(1): 19-20.
- [2] 王堃, 蒋建新, 宋先亮. 蒸汽爆破预处理木质纤维素及其生物转化研究进展 [J]. 物质化学工程, 2006, 40(6): 38-41.
- [3] 武冬梅, 李冀新, 孙新纪. 纤维素类物质发酵生产燃料乙醇的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2007, 154(4): 116-119.
- [4] 李兰晓, 杜金华, 李军训, 徐海燕, 张志焱. CMC 糖化力法测定纤维素酶活性条件的研究 [J]. 饲料工业, 2006, 27(24): 49-51.
- [5] Jan B. Kristensen, Johan Borjesson, Maria H. Bruun, Folke Tjerneld, Henning Jørgensen. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 7(14): 1-8.
- [6] 王栋, 龚大春, 田毅红, 等. 酸法-酶法处理麦秆木质纤维素的工艺研究 [J]. 可再生资源, 2007, (7): 23-27.
- [7] 陈洪章, 李冬敏. 生物质转化的共性问题研究-生物质科学与工程学的建立与发展 [J]. 纤维素科学与技术, 2006, 14(4): 62-68.
- [8] 罗鹏, 刘忠. 用木质纤维原料生产乙醇的预处理工艺 [J]. 酿酒科技, 2005, (8): 12-16.