

复合酶耦合酶解酸处理后玉米秸秆的研究

蔡灵燕¹, 马玉龙^{1,2*}, 麻晓霞¹

(1. 宁夏大学化学化工学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学能源化工国家重点实验室培育基地, 银川 750021)

摘要:以玉米秸秆为研究对象, 经过 2% 硫酸预处理后, 利用果胶酶、 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶三种酶协同酶解, 以提高玉米秸秆的酶解产糖量。结果表明: 当酶解时间为 48h, 果胶酶、 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶分别为 45U/mL、30U/mL、60U/mL 时, 葡萄糖、木糖和酶水解得率分别为 67.83%、3.25%、73.65%, 相比纤维素酶单一酶解的葡萄糖、木糖和酶水解得率分别提高了 65.04%、20.82%、65.06%。分步糖化发酵 5 天后, 相比单一酶解发酵乙醇含量提高了 72.5%。说明利用三种酶复合处理, 能明显提高酶解产糖量。研究结果为玉米秸秆转化为可发酵糖技术的研究提供重要参考。

关键词: 生物质; 玉米秸秆; 酸水解; 酶解

引言

秸秆纤维素是一种来源丰富、价格低廉的可再生资源。然而秸秆纤维素不能被微生物利用转化为乙醇燃料, 也很难通过化学法直接转化为化学品或化工、医药中间体, 其主要原因是秸秆聚合物构筑单元间、单元内原子或原子团之间通过各种键而形成的复杂超分子结构, 致使秸秆对生物酶或化学催化剂产生很强的抗性。因此, 对秸秆高聚物结构实施解聚预处理, 以破坏其超分子结构, 打断存在于结构单元之间或单元内一些连接键, 使结构中有效组分得以暴露或解离, 是实现秸秆生物质能源或纤维素化学品制造的先决条件和关键一步^[1]。另外, 秸秆纤维中主要产糖的成分包括纤维素和半纤维素, 其中纤维素形成的致密结晶结构阻碍了其与酶的充分接触, 极大地降低了酶解效率。如何提高酶解产糖率是该领域的主要技术难点之一^[2~4]。

利用秸秆纤维素生产燃料乙醇技术主要包括原料结构解聚、酶解和发酵 3 个阶段, 但是每个阶段都存在提高乙醇产率的技术瓶颈。其中, 结构解聚目前研究报道的方法主要有物理法、化学法、生物法或几种方法的耦合, 但每种方法都有其优点和不足。秸秆解聚即通过解聚剂打破半纤维素和木质素的网状结构, 暴露纤维素, 再将纤维素进行酶解和发酵^[5~9]。木质纤维素的稀酸水解被认为是最容易实现商业化的生产工艺, 利用稀硫酸对玉米秸秆进行预处理可以有效去除半纤维素, 使之分解为木糖等可溶性糖类, 使纤维素水解生成葡萄糖的产率大大提高^[10~12]。目前, 酶解主要是以纤维素酶为主, 或是两种酶协同降解。本研究在纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶的基础上, 添加果胶酶, 以三种酶协同降解经过酸预处理的玉米秸秆。探讨了三种酶协同降解玉米秸秆的最佳条件, 为发酵生产燃料乙醇提供相关依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

BS224S 电子天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; FW177 中草药粉碎机: 天津市泰斯特仪器有限公司; DZF-1 电热恒温真空干燥箱: 上海一恒科学仪器有限公司; TD5A 台式高速离心机: 湖南省凯达

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.01.009

收稿: 2015-04-23; 修回: 2015-08-31;

基金项目: 国家自然科学基金(21266023);

作者简介: 蔡灵燕(1982—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物质能源方面的研究;

* 通讯联系人, E-mail: nxyhma@163.com.

实业发展有限公司;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵;郑州长城科工贸有限公司;HZ-9212SB 水浴恒温振荡器;太仓市璜泾南华科教器材厂;LC20AT 高效液相色谱仪;日本岛津;UV-1100 紫外分光光度计;上海美谱达仪器有限公司;FTIR-8400S 傅里叶红外变换光谱仪;日本岛津公司;JSM7500F 场发射电子扫描显微镜;日本 JEOL 公司;D/MARX2200/PCX-射线衍射仪;日本理学公司。玉米秸秆:由宁夏银川市贺兰牧场提供。纤维素酶(cellulose):购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase):(诺维信 188)购自上海一基实业有限公司;果胶酶(Pectinase):购自银川伟博鑫生物公司;硫酸、醋酸、醋酸钠等其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 稀酸解聚 酸解聚是将多糖(主要是半纤维素)水解成单糖,暴露纤维素而提高纤维素酶的水解效率^[13]。玉米秸秆经自来水洗净、风干、机械粉碎,过 80 目标准筛,于 105℃ 烘箱烘至恒重备用。玉米秸秆酸解聚条件为:2%硫酸,反应温度 120℃,反应时间 60min,固液比 1:10(此条件为实验室前期研究成果)。反应后固液分离,液体部分用 CaCO_3 调节 pH 至中性,经 0.22 μm 滤膜过滤,得到水解液待测样品,固体残渣用蒸馏水洗涤至中性,105℃ 下烘干备用。

1.2.2 酶解单因素试验 按照试验条件称取一定量上述玉米秸秆于 150mL 锥形瓶中,加入 0.1mol/L, pH 为 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液,分别添加不同量的纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和果胶酶于锥形瓶中进行酶解反应。反应结束后将样品在沸水浴中终止反应,抽滤后的澄清液为糖化液。用液相色谱法测糖含量。残渣用红外光谱及 X 射线衍射仪测各组分的特征官能团及纤维素结晶度的变化。

1.2.3 乙醇发酵 取一定量上述糖化液于发酵培养基中,接入重量比为 10%(菌浓度 $1\sim 2\times 10^5$)酒精酵母,在 37℃,120r/min 下发酵 5 天后,离心,过膜,得到发酵液。用气相色谱仪测乙醇的含量。

1.3 分析方法

1.3.1 液体产物分析 单糖含量采用高效液相色谱仪(LC-20AT,日本岛津公司)测定,示差折光检测器(日本岛津),色谱柱:Aminex HPX-87H(300mm $\times$ 7.8mm,美国 Bio-Rad 公司);流动相:0.005mol/L H_2SO_4 溶液;流速:0.6mL/min;进样量:20 μL ;柱温:65℃。

还原糖得率按下式计算:

$$Y = \frac{P \times V \times 0.9}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y 为还原糖得率(%);P 为各种单糖浓度(g/L);V 为溶液体积(L);0.9 为比例系数;M 为原料中纤维素和半纤维素的总质量(g)。

酶水解得率按下式计算:

$$Y_1 = \frac{P_1 \times V_1 \times 0.9}{M_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:Y₁ 为酶水解得率(%);P₁ 为葡萄糖浓度(g/L);V₁ 为溶液体积(L);0.9 为比例系数;M₁ 为原料中纤维素的质量(g)。

乙醇含量采用气相色谱仪(GC-2014,日本岛津公司)测定,FID 检测器,色谱柱:DB-WAX(0.25mm $\times$ 0.25mm,日本岛津公司);柱温:34℃;流量:1mL/min;进样量:0.1 μL ;升温程序:34 $\sim$ 210℃ 程序升温,34℃ 保持 5min,30℃/min 速率升至 210℃,保持 5min。

1.3.2 固体残渣分析 采用傅里叶红外变换光谱仪(FTIR-8400S)定性分析玉米秸秆原料、酸水解残渣、酶解残渣中各组分的特征官能团,波数范围从 4000 $\sim$ 500 cm^{-1} ,扫描次数为 50,分辨率为 4 cm^{-1} ,以溴化钾(KBr)压片。

采用 X 射线衍射仪(D/MARX2200/PC,日本理学公司)测定秸秆纤维结晶度。扫描范围:3 $\sim$ 85°。纤维素的结晶度(CrI)计算公式^[14]如下:

$$\text{CrI} = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] \times 100\% \quad (3)$$

公式中 I_{002} 是 X 射线衍射图谱中 002 面处最大衍射强度; I_{am} 为 18° 时的衍射强度。

采用扫描电子显微镜(JSM7500F,日本)对秸秆纤维素结构形态进行表征。扫描前,将含纤维素试样置于云母片内,真空喷金后,用扫描电子显微镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶对葡萄糖、木糖得率及酶解效果的影响

在温度 50°C , 转速 $150\text{r}/\text{min}$ 条件下,分别用 20 、 40 、 60 和 $80\text{U}/\text{mL}$ 的纤维素酶酶解经酸预处理后的玉米秸秆($10\text{g}/\text{L}$),结果见图 1 所示。在反应初始阶段,葡萄糖得率及酶解得率增加较快,之后增速减慢并趋于平缓;纤维素酶为 $60\text{U}/\text{mL}$ 时葡萄糖得率及酶水解得率最大(见表 1)。其原因一是随着反应进行,产物逐渐增多,反馈性抑制作用增强;二是在反应最初阶段,酶主要作用于纤维素表面的无定型区,酶易于与无定型区的纤维素分子结合,产生催化水解作用,水解速度快;但由于酶难于渗入结晶区,造成水解速度减缓的现象^[15,16]。图 1 中的还原糖以葡萄糖和木糖为主, $60\text{U}/\text{mL}$ 时纤维素酶与底物已经达到饱和,纤维素酶充分降解细胞壁的纤维素骨架,使木聚糖很容易从纤维素中溶出,所以总糖升高;而加入过多纤维素酶使其中木聚糖酶增加,降解木聚糖为其他低聚木糖等物质,浓度就降低。

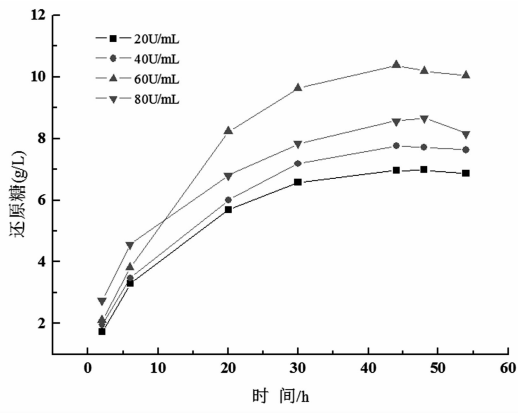


图 1 酶解时间对不同浓度纤维素酶效果的影响

Figure 1 Effect of the different concentration of cellulase with enzymatic hydrolysis time

表 1 不同浓度纤维素酶对糖得率及酶解影响

Table 1 Effect of sugar yield and enzymatic hydrolysis with the different concentration of cellulase

纤维素酶/(U·mL ⁻¹)	纤维二糖得率/%	葡萄糖得率/%	木糖得率/%	酶水解得率/%
20	3.11	35.66	2.31	38.72
40	1.65	50.48	3.00	54.81
60	1.04	51.01	2.75	55.39
80	0.22	50.10	2.82	54.40

注:酶解时间 48h。

2.2 β-葡萄糖苷酶与纤维素酶对葡萄糖、木糖得率及酶解效果的影响

在温度 50°C , 转速 $150\text{r}/\text{min}$ 条件下,纤维素酶为 $60\text{U}/\text{mL}$ 时,分别用活性配料比为 $1:4$ 、 $2:4$ 、 $3:4$ 、 $4:4$ 的 β -葡萄糖苷酶与纤维素酶酶解经酸预处理的玉米秸秆($10\text{g}/\text{L}$)酶解 48h ,结果见表 2 所示。纤维素降解过程中会产生大量葡萄糖和纤维二糖,由于 β -葡萄糖苷酶的含量很低,作用缓慢,酶解过程中的纤维二糖会逐渐堆积,但纤维二糖是纤维素水解作用的强抑制剂。有研究表明纤维二糖的抑制作用属于竞争性抑制^[17~19],并且这种抑制作用是可逆的,通过添加 β -葡萄糖苷酶消除纤维二糖,可增加水解作用,提高糖得

率; β -葡萄糖苷酶可以水解纤维二糖产生葡萄糖,由表 2 可知,随着 β -葡萄糖苷酶的逐渐增加,纤维二糖逐渐减少,葡萄糖逐渐增加;当添加比例为 2:4 时, β -葡萄糖苷酶可以最大程度把纤维二糖转化为葡萄糖,使葡萄糖得率达到最大。如果继续增大比例会导致其与纤维二糖结合后,对纤维素吸附变成无效吸附,在活性中心形成位阻效应,抑制水解作用进行。可见,当纤维素酶为 60U/mL 时, β -葡萄糖苷酶最佳为 30U/mL。

表 2 β -葡萄糖苷酶与纤维素酶对糖得率及酶解的影响
Table 2 Effect of sugar yield and enzymatic hydrolysis with the yields of β -glucosidase and cellulase

β -葡萄糖苷酶:纤维素酶	纤维二糖得率/%	葡萄糖得率/%	木糖得率/%	酶水解得率/%
1:4	1.61	44.05	3.11	47.83
2:4	1.45	55.68	3.17	60.46
3:4	1.30	54.03	2.64	58.67
4:4	0.74	54.00	2.48	58.64

2.3 复合酶对葡萄糖、木糖得率、酶解效果及发酵乙醇的影响

在温度 50℃,转速 150r/min 条件下,纤维素酶为 60U/mL, β -葡萄糖苷酶为 30U/mL 时,分别用活性配料比为 1:2:4、2:2:4、3:2:4、4:2:4 的果胶酶、 β -葡萄糖苷酶和纤维素酶酶解经酸预处理的玉米秸秆(10g/L)48h,结果见表 3 所示。随着果胶酶的添加,在三种复合酶协同作用下,葡萄糖、木糖及酶解得率在 3:2:4 时达到最高值。这是由于果胶酶破坏植物细胞壁,在除去纤维表面的果胶同时会增强纤维素酶的作用范围和作用效果,其它因素与酶之间存在一定规律,但交互作用不明显^[20]。可见,当纤维素酶为 60U/mL, β -葡萄糖苷酶为 30U/mL 时,果胶酶的最佳添加量为 45U/mL。由图 2 可知,相比单一酶解,复合酶解发酵乙醇含量提高了 72.5%。

表 3 复合酶对糖得率及酶解的影响
Table 3 Effect of sugar yield and enzymatic hydrolysis with the yields of compound enzymes

复合酶	纤维二糖得率/%	葡萄糖得率/%	木糖得率/%	酶水解得率/%
1:2:4	1.37	36.00	2.51	39.09
2:2:4	1.38	53.17	3.11	57.73
3:2:4	0.93	67.83	3.25	73.65
4:2:4	0.89	66.33	2.49	72.02

2.4 秸秆的红外光谱分析

采用红外光谱分析原料玉米秸秆、酸解残渣、酶解残渣中各组分的特征官能团,结果见图 3。3415cm⁻¹左右吸收峰代表木质素中羟基的伸缩振动;2932cm⁻¹左右吸收峰代表木质素中甲基、亚甲基的伸缩振动;1650 和 1510cm⁻¹代表木质素中苯环的特征吸收峰;1736cm⁻¹左右代表半纤维素的特征吸收峰;1237cm⁻¹处半纤维素和木质素都存在吸收;897cm⁻¹代表纤维素中 β -糖苷键吸收峰^[21,22]。从图 3 中可以看出,原料玉米秸秆、酸水解残渣、酶解残渣均保留了木质素的特征吸收峰,1736cm⁻¹和 1237cm⁻¹处吸收峰明显减弱,可见酸水解主要破坏了半纤维素结构,而酶解后 897cm⁻¹处纤维素特征吸收峰完全消失,说明酶解主要破坏了纤维素的结构使之发生水解。

2.5 秸秆的 XRD 表征分析

采用 XRD 技术测定玉米秸秆酸水解及酶解前后秸秆纤维素结晶度变化。由表 4 可以看出,酸预处理后,纤维素结晶度由 39.88% 提高到 47.06%,是因为酸预处理使无定型区的氢键受到攻击和破坏,致使纤维素的无定型区域结构发生改变,形成更加致密的结构从而结晶度有所上升。结晶度的变大使纤维

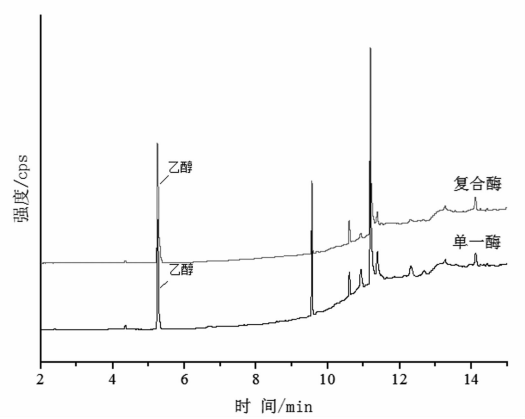


图 2 不同酶解方式乙醇气相色谱图

Figure 2 Gas chromatogram of ethanol with different ways of enzymatic hydrolysis

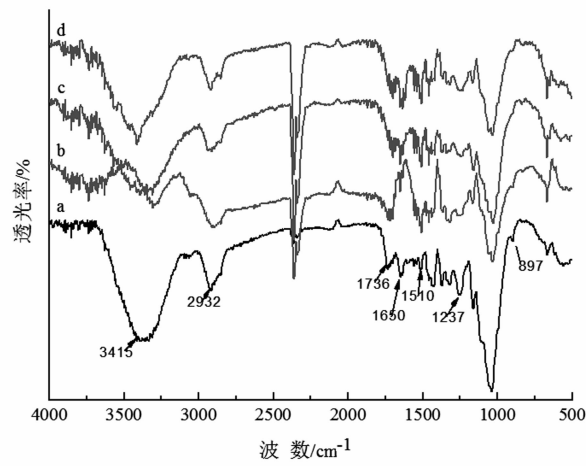


图 3 原料玉米秸秆、酸水解残渣和酶解残渣的红外光谱图

a—原料玉米秸秆,b—酸水解残渣,c—纤维素酶解残渣,d—复合酶酶解残渣

Figure 3 Fourier transform infrared spectra of raw corn straw, acid hydrolysis and enzymolysis residues

a-Raw corn straw, b-Acid hydrolysis residues, c-Cellulose enzymolysis residues, d-Composite enzymolysis residues

素的无定型区域更容易受到试剂的攻击,也将更有利于酶解其结晶区。之后纤维素结晶度下降为 37. 61%,是因为酶解破坏了纤维素的结晶区,使大部分纤维素转化成可溶性糖,所以结晶度有所下降。同时也可以看出复合酶酶解比单酶酶解效果要好。

表 4 纤维素酶解前后结晶度变化

Table 4 Change of cellulose crystallinity with enzymolysis

名称	纤维素结晶度/%
秸秆原样	39. 88
酸解残渣	47. 06
纤维素酶解残渣	40. 38
复合酶酶解残渣	37. 61

2. 6 秸秆的 SEM 表征分析

用扫描电镜技术对酶解前后玉米秸秆表面形态进行观察,见图 5 所示。由该图可见,秸秆酶解处理

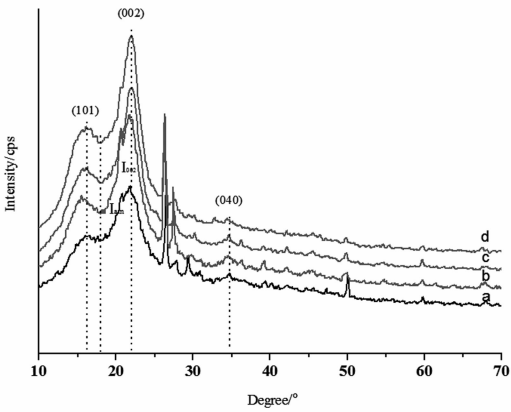


图 4 玉米秸秆酶解前后的 XRD 图

a—原料玉米秸秆, b—酸水解残渣, c—纤维素酶解残渣, d—复合酶酶解残渣

Figure 4 X-ray diffraction of corn straw enzymolysis residues

a-Raw corn straw, b-Acid hydrolysis residues, c-Cellulase enzymolysis residues, d-Composite enzymolysis residues

前后表面形态有所变化。图 5a 是秸秆原样的结构, 虽局部有磨损但整体表面形态紧凑, 平滑, 无裂缝和分层。而酸水解后秸秆表面出现“剥皮”现象, 表层结构出现脱落迹象(见图 5b)。由图 5c 和 5d 可以看出, 酶解后出现裂缝和孔道, 整体结构变得疏松, 层状结构被剥离, 束状结构的纤维沿其轴方向分裂, 纤维细胞壁皮层结构破坏, 完整结构转化为多层结构, 并发生强烈的断裂现象。说明玉米秸秆经酸预处理后酶解效果明显。

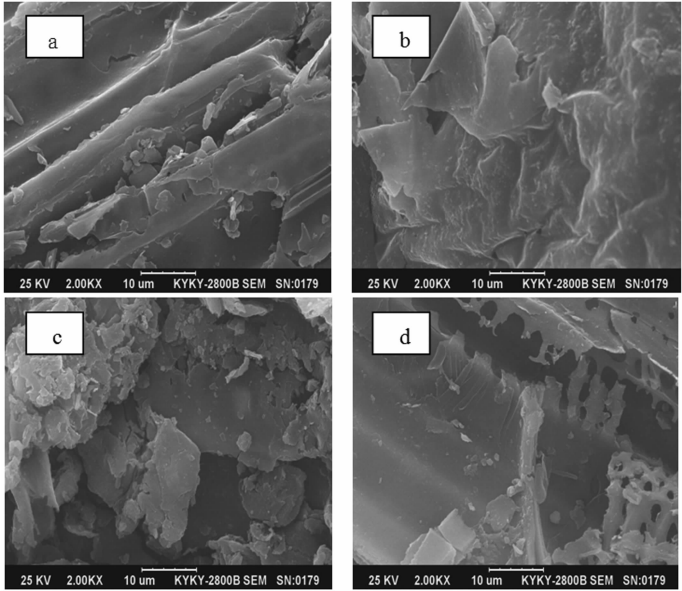


图 5 玉米秸秆酶解前后电镜扫描图

a—原料玉米秸秆, b—酸水解残渣, c—纤维素酶解残渣, d—复合酶酶解残渣

Figure 5 Scanning electron micrographs of corn straw enzymolysis residues

a-Raw corn straw, b-Acid hydrolysis residues, c-Cellulase enzymolysis residues, d-Composite enzymolysis residues

3 结论

(1)玉米秸秆经酸水解后再用复合酶酶解的条件为:当酶解时间为 48h,果胶酶、 β -葡萄糖苷酶、纤维

素酶分别为 45U/mL、30U/mL、60U/mL 时,在此条件下,葡萄糖、木糖和酶水解得率分别为 67.83%、3.25%、73.65%,相比纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶两种酶解,葡萄糖、木糖和酶水解得率分别提高了 21.82%、2.52%、21.67%,而相比单一纤维素酶酶解分别提高了 65.04%、20.82%、65.06%。分步糖化发酵 5 天后,相比纤维素酶单一酶解发酵乙醇含量提高了 72.5%;

(2)采用红外光谱分析原料玉米秸秆及处理后的残渣,经过酸水解及酶解处理后的残渣均保留了木质素的主要结构单元,大部分半纤维素被分解,纤维素几乎完全降解;

(3)XRD 测定玉米秸秆酸水解及酶解前后纤维素结晶度变化可知,酸解破坏了纤维素的无定型区域,而酶解主要破坏了纤维素的结晶区,使大部分纤维素转化成可溶性糖;

(4)通过扫描电镜观察可知,经过复合酶酶解后表面结构疏松,整体出现分层,并伴随有裂缝和孔道,秸秆纤维细胞壁皮层结构被破坏。

参考文献:

[1] Pedersen M, Meyer A S. New Biotechnol, 2010, 27: 739~750.

[2] Hendriks A T W M, Zeeman G. Bioresource Technology, 2009, 100(1): 10~18.

[3] 王凤芝,常璇,马玉龙,孙永刚,吴倩倩. 中国粮油学报, 2015, 30(3): 1~5.

[4] Sun Y G, Ma Y L, Wang Z, Yao J K. Bioresource Technology, 2014, 158: 307~312.

[5] 杨海涛,夏青,姚兰. 湖北工业大学学报, 2015, 30(1): 85~89.

[6] Kumar P, Barrett D M, Delwiche M J, Stroeve P. Industrial and Engineering Chemistry Research, 2009, 48(8): 3713~3729.

[7] Banerjee S, Sen R, Giri B, Pandey R A, Mudliar S, Satpute D, Chakrabarti T. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2010, 4(1): 77~93.

[8] Yang B, Wyman C E. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2008, 2(1): 26~40.

[9] Sun Y G, Ma Y L, Wang L Q, Wang F Z, Wu Q Q, Pan G Y. Carbohydrate Polymers, 2015, 117(6):486~493.

[10] 焱鑫,邵丽杰,张欢,寇巍,王小明,张大雷. 农业工程学报, 2014, 30(6): 179~184.

[11] Yang B, Wyman C E. Biotechnology and bioengineering, 2004, 86(1): 88~98.

[12] 孙军涛,孙婉莹,肖付刚. 食品工业, 2014, 35(5): 105~108.

[13] Taherzadeh M J, Karimi K. International Journal of Molecular Science, 2008, 9(9): 1621~1651.

[14] 郑明霞,李来庆,郑明月,王旭,马海玲,王凯军. 环境科学与技术, 2012, 35(6): 27~31.

[15] 章冬霞,张素平,许庆利,元伟,朱振兴,颜永捷. 太阳能学报, 2010, 31(4): 478~481.

[16] 汪维云,朱金华,吴守一. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 20~28.

[17] 高培基. 自然科学进展, 2003, 13(1): 21~29.

[18] 赵越,武彬,阎伯旭,高培基. 中国科学: C 辑, 2004, 33(5): 454~460.

[19] Våljamäe P, Sild V, Pettersson G, Johansson G. European journal of biochemistry, 1998, 253(2): 469~475.

[20] 贾佳,龙海如. 国际纺织导报, 2012 (1): 35~36.

[21] 孙永刚,马玉龙,麻晓霞,常璇,惠兴育,孙瑞珠. 中国粮油学报, 2013, 28(7): 29~35.

[22] 朱均均,杨金龙,张玲玲,黄鑫,徐勇,勇强,余世袁. 林产化学与工业, 2014, 34(5): 60~66.

Study on the Enzymatic Hydrolysis of Corn Straw with Compound Enzymes after Acid Pretreated

CAI Ling-yan¹, MA Yu-long^{1,2*}, MA Xiao-xia¹

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. State Key Laboratory Cultivation Base of Energy Sources and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The aim of this study was to improve the yields of sugar with enzymatic hydrolysis on 2% sulfuric acid pretreated corn straw using pectinase, β -glucosidase and cellulase. The results showed that the yields of glucose, xylose, and enzyme hydrolysis were 67.83%, 3.25%, and 73.65%, respectively, when the pretreated corn straw was hydrolyzed using pectinase, β -glucosidase, and cellulase were 45U/mL, 30U/mL and 60U/mL for a period of 48 h. Compared with single cellulose enzymatic hydrolysis, the yields of glucose, xylose and enzymatic hydrolysis with compound enzymes increased to 65.04%, 20.82%, and 65.06%. The yields of ethanol with compound enzymes increased to 72.5% in the step by step fermentation for 5 days. These results suggest that the mixture of three kind of enzyme can obviously increase the yield of sugar with enzymatic hydrolysis. The research results provide an important reference for the research of corn straw into fermentable sugar technology.

Key words: Biomass; Corn straw; Acid hydrolysis; Enzymatic hydrolysis