

糠醛渣纤维素酶解研究

王琰¹, 杨森^{1*}, 李十中^{2*}

(1. 中国农业大学资源与环境学院生物质工程中心, 北京 100094; 2. 清华大学核能与新能源技术研究院, 北京 100084)

摘要:以糠醛渣为原料进行纤维素酶解研究, 考察了预处理方式、酶用量、底物浓度和酶解时间对糠醛渣酶解的影响, 并将其与稀酸预处理的玉米芯进行对比. 结果表明, 未经处理的糠醛渣由于酸性较强并含有糠醛等抑制性的物质, 不能直接用于酶解, 水洗和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 脱毒法都可以显著提高糠醛渣的酶解效果; 水洗糠醛渣的酶解最佳条件为: 1:9(g:mL)的底物浓度、20 FPU/g(酶活/底物), 酶解时间为 48 h, 在此条件下, 还原糖浓度为 35 g/L, 糠醛渣的转化率为 30%, 糠醛渣中纤维素的转化率为 61%.

关键词: 糠醛渣; 酶解; 纤维素酶

中图分类号: X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2129-05

Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob Residues from Furfural Production

WANG Yan¹, YANG Sen¹, LI Shi-zhong²

(1. Center of Biomass Engineering, College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The effect of pretreatment, enzyme loading, substrate concentration and reaction time on enzymatic hydrolysis of corn cob residues from furfural production was studied, and was compared with dilute acid pretreated corn cob. The result shows that the corn cob residues from furfural production couldn't be used directly due to higher acidity and inhibitor such as furfural etc. The enzymatic hydrolysis of the corn cob residues could be enhanced by water of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pretreatment. The best condition of corn cob residues after washed is 20 FPU/g substrate, 1:9 (substrate: buffer). The concentration and productivity of reducing sugar was 35 g/L and 30% at 48 h, and the conversion of cellulose was 61%.

Key words: cellulosic material; enzymatic hydrolysis; cellulase

随着人类社会和经济的发展, 如何解决资源短缺问题和实现可持续发展成为人类社会面临的巨大挑战. 利用发酵法生产的燃料乙醇作为一种可再生的清洁能源受到人们的关注, 目前燃料乙醇的发酵原料主要以淀粉类和糖类物质为主, 高昂的原料成本使发酵法生产乙醇的工业应用受到限制. 木质纤维素类生物质具有成本低廉、来源广泛、可再生等特点, 是生产乙醇的潜在资源.

木质纤维素类生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成, 其中的纤维素可以水解成单糖然后被微生物利用发酵成酒精. 纤维素的水解方法可以分为酸水解法和酶水解法(简称酶解), 其中酶解由于反应条件温和、设备简单、能耗低、污染小、副产物少等原因受到了广泛关注^[1~5]. 在纤维素酶解过程中, 纤维素底物的特性如纤维素底物中纤维素结晶度、聚合度、比表面积及底物中半纤维素、木质素的含量等对酶解效率和产率起着至关重要的作用. 因此在酶解前需对纤维素底物进行必要的预处理以改变天然纤维素的结构, 降低它的结晶度, 脱去木质素和半纤维素, 增加原料的空隙率, 从而增加纤维素酶

系与纤维素的有效接触和催化水解率, 提高酶解效率^[6~8]. 好的预处理方法要求既可以提高纤维素的酶解得率, 又要尽量避免糖的损失、抑制物的产生以及经济上可行. 目前研究较多的预处理方法主要分为物理方法如超声波处理、物理-化学方法如汽爆法、化学方法如稀酸水解以及生物方法如白腐菌处理等方法. 这些方法既可以单独使用, 也可以几种方法结合起来用^[9~12]. 其中稀酸水解是一种比较成功的预处理方式^[13~16], 它能够有效地降解半纤维素, 降低纤维素的结晶度, 增加纤维素的比表面积, 提高酶解速率和底物转化率.

目前, 糠醛生产多以农林副产品中的植物纤维尤其是玉米芯为原料, 利用稀酸在高温高压下将原料中的半纤维素转化为糠醛, 剩余残渣的主要成分是纤维素、木质素和少量残留的半纤维素^[17], 新鲜的糠醛残渣含水量高达 80% 以上, pH 值在 2~4 之

收稿日期: 2006-11-16; 修订日期: 2007-01-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD07A01)

作者简介: 王琰(1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物质利用, E-mail: wangyan9912345@163.com

* 通讯联系人, E-mail: syang@cau.edu.cn, szli@mail.tsinghua.edu.cn

间,具有排放量大、污染性强的特点.如果能够将其丰富的纤维素转化为可发酵酒精的还原糖,不仅解决了糠醛工业的环境污染问题,而且对于加速可再生资源的生物转化与利用具有重要的促进作用.本研究探讨了直接利用糠醛渣中纤维素进行酶解的可能性,并将其与稀酸预处理后的玉米芯进行对比.

1 材料与方法

1.1 原料与酶

糠醛渣和玉米芯取自山东某公司.糠醛渣和玉米芯于常温下自然风干后置于 105℃ 烘箱中烘干 24 h 备用.

纤维素酶: NS50013 酶是纤维素复合酶,滤纸酶活(FPA)为 70 FPU/mL,1 FPU 为 1 IU 的滤纸酶活,由 Novozyme 公司提供.

1.2 酶解

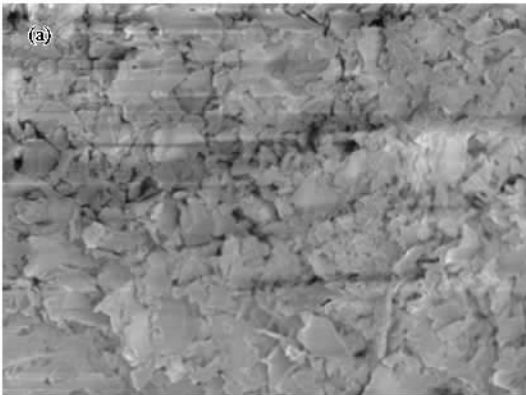
取适量的底物、缓冲液和酶液混合均匀,放入水浴摇床进行酶解实验,未经特殊说明酶解条件均为:酶用量为 20 FPU/g(酶活/底物),pH 4.8 的 HAc-NaAc 缓冲液,摇床转速为 140 r/min,水浴温度为 50℃,酶解时间为 72 h.还原糖浓度的测定采用水杨酸(DNS)法^[18].底物转化率的计算方法分为 2 种:

底物转化率(%) =

$$\frac{\text{还原糖浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{溶液体积}(\text{mL}) \times 0.9}{\text{底物质量}(\text{mg})} \times 100\%$$

纤维素转化率(%) =

$$\frac{\text{还原糖浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{溶液体积}(\text{mL}) \times 0.9}{\text{底物质量}(\text{mg}) \times \text{纤维素含量}(\%) } \times 100\%$$



1.3 纤维素成分的测定

应用范氏法测定底物和酶解残渣中各组分如纤维素、半纤维素等的含量^[19].

2 结果与讨论

2.1 原料特点

表 1 列出了不同玉米芯包括原玉米芯、稀酸预处理后的玉米芯和糠醛渣的组成,其中稀酸预处理条件是:10 g 玉米芯与 100 mL 1.0%(质量浓度)的稀硫酸混合均匀后,置于 121℃ 的反应器里反应 30 min.从表 1 可以看出糠醛渣与稀酸预处理后的玉米芯的组成表现出很好的相似性,都具有纤维素含量高和半纤维素含量低的特点,与原玉米芯相比,纤维素的含量分别提高了 57% 和 54%,而半纤维素的含量则分别降低了 80% 和 65%.

表 1 玉米芯组成/%

Table 1 Composition of corn cob/%				
材料	可溶性物质	纤维素	半纤维素	木质素和灰分
原玉米芯	13	28	46	13
玉米芯 ¹⁾	8	43	16	33
糠醛渣	21	44	9	26

1)稀酸预处理

图 1 是糠醛渣和未经任何处理的玉米芯的电镜照片,放大倍数均为 1 000 倍.从图 1 可明显看出糠醛渣的结构比较疏松,比表面积较大,有利于纤维素酶的吸附和作用.

2.2 原料预处理对酶解的影响

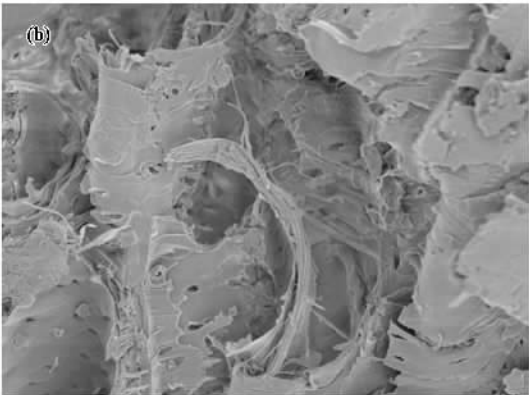


图 1 糠醛渣(a)和玉米芯(b)的电镜照片

Fig.1 FSEM-pictures of corn cob residues from furfural production (a) and corn cob (b)

取未经处理的玉米芯、稀酸水解过的玉米芯和未经处理的糠醛渣各 10 g 分别置于三角瓶里进行酶解,缓冲液和酶液的体积共为 100 mL,纤维素酶

用量为 20 FPU/g(酶活/底物),酶解时间 72 h.实验结果如表 2 所示.稀酸预处理后的玉米芯表现出较好的酶解效果,与原玉米芯相比,底物转化率提高了

5.4 倍,但是组成与之相似的糠醛渣的底物转化率却仅有 10%.通过对糠醛渣浸提液酸度和组成成分分析,发现主要原因在于糠醛渣中含有一定的酸性物质如生产工艺中残存的硫酸和有机酸副产物等,酸性比较强,如以 20 mL/g糠醛渣(蒸馏水/糠醛渣)的配比得到浸提液的 pH 值为 2.3,另外糠醛渣中还残留有少量的糠醛,这种物质对纤维素酶具有强烈的抑制作用,因此需要对糠醛渣进行处理以改善它的酶解效果.

本研究比较了 2 种脱毒方法的效果:①水洗法,即将糠醛渣用自来水清洗至上清液基本无色,将水溶性的糠醛和其它有害物质除去,然后于 105℃烘箱中烘 24 h 即得到水洗糠醛渣,它的纤维素含量为 49%,半纤维素含量为 7%;②Ca(OH)₂ 中和法,用适量的 Ca(OH)₂ 将糠醛渣浸提液中和至 pH 值为 4.8,然后加入纤维素酶进行酶解.

从表 2 可以发现无论是水洗法还是 Ca(OH)₂ 中和法,随着酸性物质和糠醛等抑制物的去除,糠醛渣的酶解效果得到了很好地改善,底物转化率分别达到了 27.4%和 25.6%,比未经处理的糠醛渣提高了将近 3 倍,与稀酸预处理后玉米芯的酶解效果相当,也就是说这 2 种方法均可以大幅度提高糠醛渣的酶解效果.本文以水洗糠醛渣为原料,进行更深入的研究.

表 2 原料性质对纤维素酶解的影响

Table 2 Effect of material characteristic on enzymatic hydrolysis			
材料	还原糖浓度 /mg·mL ⁻¹	底物转化 率/%	纤维素 转化率/%
原玉米芯	5	4.5	16
玉米芯 ¹⁾	27	24.3	57
糠醛渣	11	10	23
水洗糠醛渣	31	27.4	56
糠醛渣 ²⁾	29	25.6	52

1)稀酸预处理;2)Ca(OH)₂ 脱毒;酶解条件:10 g/100 mL(底物/缓冲液),20 FPU/g(酶活/底物),酶解时间 72 h

2.3 纤维素酶用量对酶解的影响

作为酶催化剂,纤维素酶的用量对纤维素的酶解起着决定性的作用.一般而言,高酶量有利于提高酶解效率和底物转化率,但高昂的纤维素酶价格决定了酶用量却是越少越好^[13],另外纤维素和纤维素酶的结合为点数有限,当这些位点全被纤维素酶占据后,进一步增加的纤维素酶对酶解的促进作用则显著降低.本研究在固定 10 g/100 mL(底物/缓冲液)的条件下考察了 4 种酶量 10、20、30 和 40 FPU/g(酶活/底物)对酶解的影响,试图寻找最佳酶量.

实验结果如图 2 所示,底物转化率随酶量的增加而提高.当酶量从 10 FPU/g增加到 20 FPU/g(酶活/底物)时,72 h 的底物转化率提高了 38%,但是进一步提高酶用量,底物转化率增幅明显下降.主要原因在于纤维素酶解是 1 个固-液反应^[20],可溶性的酶需要吸附在纤维素的表面,然后才能作用于不溶性的纤维素固体.受底物性质和结构的影响,酶与底物的有效结合位点数是有限的,当反应体系中酶量少于底物有效结合位点数所需的酶量时,增加酶量,有利于促进纤维素酶解的进行;当吸附到有效位点上的酶达到饱和时,多余的酶不能与纤维素有效结合,或是游离在溶液中,达不到对酶解的促进作用.因此综合考虑酶解效率和酶成本,20 FPU/g(酶活/底物)是最佳用量.

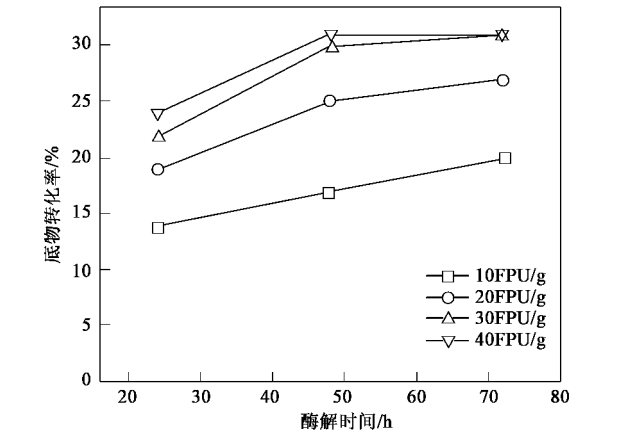


图 2 纤维素酶用量对底物转化率的影响
Fig.2 Effect of enzyme loading on the substrate conversion

2.4 底物浓度对酶解效果的影响

底物浓度是影响纤维素酶解产率和起始速度的一个主要因素.在低底物浓度的条件下,提高底物浓度通常有利于提高酶解产率和起始速度;但是高底物浓度会导致底物抑制作用的发生,这种抑制作用将会降低酶解速率.图 3 和图 4 显示了在固定酶用量为 20 FPU/g(酶活/底物)时,不同底物浓度(也称固液比即底物质量与酶解液体积的比值, g:mL)对酶解的影响.

由图 3 可知,酶解液中还原糖浓度随底物浓度的增加而增加,但底物转化率则是先升高然后逐渐降低,在底物浓度为 1:9(g:mL)时达到最大值为 30%,即纤维素的转化率为 61%(图 4).相同现象在别的纤维素类物质如软木、甘蔗渣等的酶解过程中也可看到^[21~23].但是 Wen 等^[24]认为当底物和纤维素酶的比值固定时,提高底物浓度意味着有更多的

酶用于酶解,也就是说酶解效果不会随底物浓度的改变而改变.他们曾经报道在底物浓度范围 10 ~ 50 g/L 的条件下,葡萄糖的产率几乎保持不变,而进一步提高底物浓度(50 ~ 100 g/L)则会由于葡萄糖的强抑制作用降低葡萄糖的产率.事实上,当酶与底物的比值固定时,酶浓度会随底物浓度增加而提高,高的酶浓度有利于纤维素酶解的进行,但是进一步提高底物浓度则会使反应体系中的传质传热变得困难,使得局部糖浓度过高,产物抑制作用明显.另外高浓度的底物也不利于纤维素酶的迁移,会在一定程度上增加纤维素酶的无效吸附,降低酶的活性.

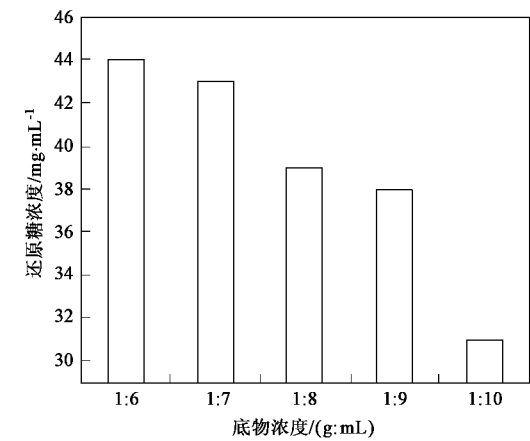


图 3 底物浓度对还原糖浓度的影响
Fig.3 Effect of substrate concentration on the reducing sugar concentration

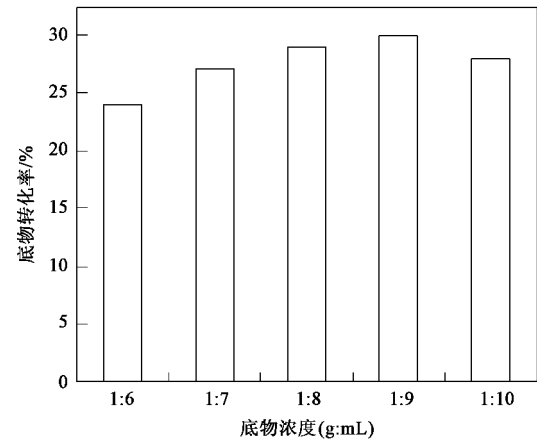


图 4 底物浓度对底物转化率的影响
Fig.4 Effect of substrate concentration on the substrate conversion

2.5 酶解时间对酶解效果的影响

酶解时间对底物转化率和酶解速度的影响是显著的,本研究从 1 ~ 72 h 选取了不同的时间点测得

了相应点的底物转化率和平均酶解速度(r),见图 5 和图 6.平均酶解速度(r)定义为从 0 ~ t 每 h 每 L 酶解液中产生的还原糖的量[$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$].

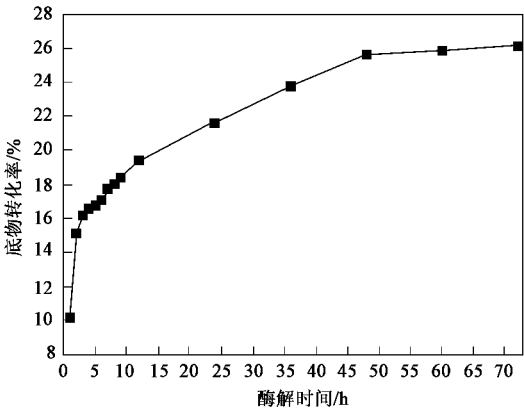


图 5 底物转化率随时间变化曲线
Fig.5 Time course of substrate conversion

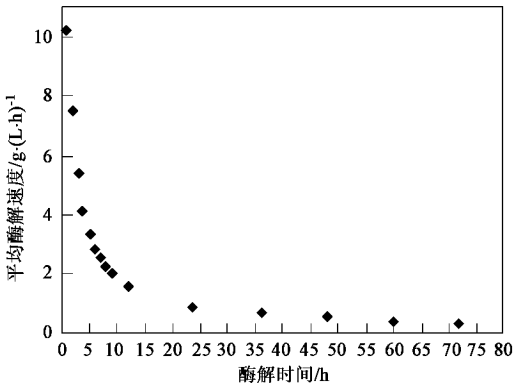


图 6 平均酶解速度随时间变化曲线
Fig.6 Time course of the average hydrolysis rates

由图 5 可知,底物转化率随着时间的推移而逐渐提高,但是底物转化率与酶解时间并不是正比关系,12 h 和 48 h 时的底物转化率已分别达到总转化率(假设 3 d 后酶解液中还原糖的量为最终产糖量)的 74.3% 和 98%,因此可以认为水洗糠醛渣的酶解在 48 h 时就已结束,比常规的稀酸预处理的玉米芯提前了 1 d.但是水洗糠醛渣中的纤维素并没有完全转化成还原糖,酶解残渣中仍有少量纤维素(15%).主要原因在于:①纤维素酶解是强产物抑制过程,高的还原糖浓度阻碍了酶解的进一步进行;②水洗糠醛渣的高木质素含量阻碍了酶解的进行;③随着酶解的进行,原料的结构发生了变化,无定形结构的纤维素几乎被酶解完,剩下部分结晶区的纤维素很难被纤维素酶所利用;④纤维素酶失活或无效吸附的

增加,导致酶解液里酶活的降低,也是酶解速度降低的 1 个原因.平均酶解速度(图 6)的变化趋势也证明了这一点,随着反应时间的增加,反应速度迅速下降,5 h 后糖浓度增加速度降到 $3.3\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ 以下,48 h 以后反应速度接近于 0.这与一般纤维素的酶解特点是一致的,即在酶解初期表现出很大的酶解速率,然后迅速降低直至为 $0^{[25]}$.

3 结论

糠醛渣的组成与稀酸预处理的玉米芯的组成具有很好的相似性,都是纤维素和木质素含量高,而半纤维素含量低.但由于糠醛渣酸性较强并含有糠醛等抑制性的物质,不能直接用于酶解,通过水洗或 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 脱毒法能显著提高糠醛渣的酶解效果.水洗糠醛渣能直接用于纤维素酶解,酶解最佳条件为:20 FPU/g(酶活/底物),1:9 的固液比,当酶解时间为 48 h 时,还原糖浓度为 35 g/L,还原糖产率为 30%,纤维素的转化率为 61%.但糠醛渣中高木质素的含量阻碍了纤维素的进一步降解,因此还需对木质素进行去除,以进一步提高酶解效率.

参考文献:

[1] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(7): 797 ~ 824.

[2] Berlin A, Maximenko V, Bura R, *et al.* A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(5): 880 ~ 886.

[3] Yang S, Ding W Y, Chen H Z. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane[J]. *Pro Biochem*, 2006, **41**(3): 721 ~ 725.

[4] 杨森, 丁文勇, 陈洪章. 膜生物反应器在汽爆稻草秸秆酶解中应用研究[J]. *环境科学*, 2005, **26**(5): 161 ~ 163.

[5] Huber G W, Iborra S, Coma A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering[J]. *Chem Rev*, 2006, **106**(9): 4044 ~ 4098.

[6] Zheng Y Z, Lin H M, Tsao G T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion[J]. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(6): 890 ~ 896.

[7] Bjerre A B, Olesen A B, Fernqvist T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **49**(5): 568 ~ 577.

[8] Nunes A P, Pourquie J. Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood[J]. *Bioresource Technol*, 1996, **57**(2): 107 ~ 110.

[9] Mosier N, Wyman C, Dale B, *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technol*, 2005, **96**(6): 673 ~ 686.

[10] Kim T H, Kim J S, Sunwoo C, *et al.* Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia[J]. *Bioresource Technol*, 2003, **90**(1): 39 ~ 47.

[11] Zhao J, Li X, Qu Y, *et al.* Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw[J]. *Enzyme and Microbial Technol*, 2002, **30**(6): 734 ~ 740.

[12] Kim T H, Lee Y Y, Sunwoo C, *et al.* Pretreatment of corn stover by low-liquid ammonia recycle percolation process [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, **133**(1): 41 ~ 57.

[13] Vlasenko E Y, Ding H, Labavitch J M, *et al.* Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw[J]. *Bioresource Technol*, 1997, **59**(2-3): 109 ~ 119.

[14] Converse A O, Kwarteng I K, Grethlein H E, *et al.* Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1989, **20**(1): 63 ~ 78.

[15] Esteghlalian A, Hashimoto A G, Fenske J J, *et al.* Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass[J]. *Bioresource Technol*, 1997, **59**(2-3): 129 ~ 136.

[16] Zhao H B, Kwak J H, Wang Y, *et al.* Effects of crystallinity on dilute acid hydrolysis of cellulose by cellulose ball-milling study[J]. *Energy & Fuels*, 2006, **20**(2): 807 ~ 811.

[17] Basta A H, El-Saied H. Furfural production and kinetics of pentosans hydrolysis in corn cobs[J]. *Cellul Chem Technol*, 2003, **37**(1-2): 79 ~ 94.

[18] Ghose T K. Measurement of Cellulase Activities [J]. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257 ~ 268.

[19] Goering H K, Van Soest P J. Forage fibre analysis. Apparatus, reagents procedure and some applications [M]. *Agriculture Handbook* 379, ARS. USDA, Washington D C, 1970. 1 ~ 20.

[20] Ye S, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technol*, 2002, **83**(1): 1 ~ 11.

[21] Zacchi G, Skoog K, HahnHagerdal B. Economic evaluation of enzymatic hydrolysis of phenol-pretreated wheat straw[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32**(4): 460 ~ 466.

[22] Sarkar A K, Etters J N. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. *AATCC Rev*, 2001, **1**(3): 48 ~ 52.

[23] Kamyar M, Morteza S, Tahereh K, *et al.* A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems[J]. *Biochem Eng J*, 2000, **4**(3): 197 ~ 206.

[24] Wen Z, Liao W, Chen S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production [J]. *Bioresource Technol*, 2004, **91**(1): 31 ~ 39.

[25] Gan Q, Allen S J, Taylor G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis[J]. *Biochem Eng J*, 2002, **12**(3): 223 ~ 229.