

⑫  
67-71

# 预处理对纤维素酶降解影响的研究

刘家健 陆 怡

C627.8

(中国林业科学研究院林产化学工业研究所 南京 210037)

**A** **摘 要** 以酸、碱及蒸汽爆碎预处理的蔗渣、杨树作底物,进行纤维素酶解(50℃、24 h)试验,其中以碱预处理的蔗渣得糖率为最高。通过测定不同原料不同预处理方法得到的水解液的总糖、糖组分及紫外吸收;分析不同预处理所引起的植物纤维组成变化、同时对预处理前后的蔗渣和杨树进行了X-衍射分析测定,从结晶度的变化综合分析了预处理对纤维素酶降解的影响,并对植物纤维生物量的全利用进行了初步探讨。

**关键词** 预处理; 纤维素酶; 酶水解

降解

纤维素物质是自然界中存在的一类最大的可再生资源,目前尚未能充分利用,但通过微生物学方法将之转化成能源、化学品、饲料和食品潜力很大。

纤维素分子是由大量的β-D葡萄糖分子以1,4-糖苷键连接组成的链状聚合物。在天然植物纤维原料中,纤维素通常总是与半纤维素、木质素共存,形成复杂的结构。由于目前所筛选的许多高酶活的纤维素分解菌,其半纤维素酶及木质素酶活性不高,很难将天然植物纤维的三大组成降解。另一方面,由于天然的复杂结构,又直接影响着纤维素酶的作用。进行植物纤维原料的预处理有利于纤维素酶降解和转化,并且预处理的效果直接影响着纤维素酶水解的结果。目前预处理方法大致可分三种类型:化学法、物理法和生物法。本文主要选择酸、碱及蒸汽爆碎三种预处理手段,比较其三种预处理方法的特点及其对纤维素酶水解影响的因素,并对植物纤维原料生物量的全利用进行了探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 原料与试剂

蔗渣 购自云南红河自治州糖厂;杨树 采自滨海农场;纤维素酶 上海生化所东风生化技术公司生产。每克含滤纸酶活在15000单位以上。

### 1.2 分析测试方法

1.2.1 还原糖、总糖含量测定 斐林试剂法<sup>[1]</sup>。

1.2.2 糖组成分析 采用Waters HPLC 234 高压液相色谱仪<sup>[2]</sup>。分析条件:Waters 碳水化合物分析柱(No. 84038)分离;流动相是高纯水,流速为0.61 mL/min;T10 泵 680 梯度洗

脱;示差检测系统检测。

1.2.3 结晶度测定<sup>[3]</sup> 试样粉碎至80~120目,在60℃真空烘箱中干燥一夜,然后进行X-衍射分析。分析条件:电压40 kV,电流20 mA,扫描速度为4°/min。

1.2.4 木质素含量分析<sup>[3]</sup> 取预处理溶液作适当稀释,在Perkin-Elmer紫外分析仪上λ400~190 nm范围内扫描、记录OD<sub>205 nm</sub>。

1.2.5 电镜分析 用Philips SEM-505电子显微镜照像。加速电压为15.2 kV,标尺为10 μ,273E3。

### 1.3 预处理条件

1.3.1 酸预处理 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%~6%,固液比1:20,常压煮沸回流3 h。通过实验最终选择H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%。

1.3.2 碱预处理 NaOH 0.5%~2.0%,固液比1:10,室温处理2 h。通过实验最终选择NaOH 1.6%。

1.3.3 蒸汽爆碎 采用浙江省林科所爆碎设备。压力为8~12大气压,保压时间为10~20 min,湿爆。

### 1.4 纤维素酶水解

1.4.1 纤维素酶配制 将0.5 g纤维素酶溶解于5 mL pH 4.8、0.2 mol/L的醋酸-醋酸钠缓冲溶液。

1.4.2 酶降解反应<sup>[4]</sup> 称取0.5 g预处理原料,加入0.2 mL纤维素酶溶液和14.8 mL pH 4.8、0.2 mol/L的醋酸-醋酸钠缓冲液,再加入两滴甲苯,在50℃静置保温24 h后煮沸灭活,然后进行还原糖测定。

## 2 实验结果

### 2.1 预处理方法对纤维素酶解的影响

进行了蔗渣、杨树两种原料的酸、碱及蒸汽爆碎三种预处理。重点分析了上述三种条件下的得糖率、酶解得糖率,结果见表1。

表1 预处理后得糖率及酶解得糖率

Table 1 Sugar yield of pretreated and enzymatic hydrolyzed substrates

得糖率 Sugar yield	酸预处理 Acid pretr.		碱预处理 Alkali pretr.		汽爆预处理的蔗渣 Bagasse of steam explosive pretr.	微晶纤维 MCC	未处理 Unpretreated	
	杨树 Poplar	蔗渣 Bagasse	杨树 Poplar	蔗渣 Bagasse			蔗渣 Bagasse	杨树 Poplar
预处理得糖率(%) Pretreated	17.72	27.19	0.86	2.06	8.40	—	—	—
预处理酶解得糖率(%) Enzymatic hydrolyzed	24.98	24.98	25.58	31.92	23.98	55.96	11.73	8.42
总得糖率(%) Total	42.70	52.17	26.44	33.96	32.38	—	—	—

注:表中的%指各种预处理或酶解后的总还原糖含量相对于未处理原料或底物的百分含量

从表1可以看出:①无论哪种预处理手段均较未处理酶解得率高,说明上述三种预处

理均对酶解有不同程度的影响;② 预处理得糖率以酸预处理条件下最高,汽爆次之,碱预处理最低;③ 预处理后原料的纤维素酶水解得糖率以蔗渣碱处理条件下最高,其它相差不大;④ 植物纤维经过预处理及酶解,总的得糖率以酸预处理条件下最高,但从纤维素酶应用的角度,必须考虑到预处理的成本、预处理过程所产生的物质对纤维素分解菌的影响等因素,以便选择经济、合理有效的预处理手段。

## 2.2 预处理水解液糖组分分析<sup>[2]</sup>

预处理水解液经三氟乙酸水解后,用高压液相色谱分析其组分,结果见表 2(由于碱预处理得糖率最低,不便进行分析)。

表 2 预处理水解液糖组分分析(%)

Table 2 Sugar composition of hydrolyzates of pretreated substrates

底物 Substrates	纤维二糖 Cellobiose	葡萄糖 Glucose	木糖 Xylose	半乳糖 Galactose	阿拉伯糖 Arabinose	甘露糖 Mannose
酸预处理 Acid pretr. 蔗渣 Bagasse	—	10.38	82.09	—	7.52	—
杨树 Poplar	—	9.04	86.52	1.79	2.64	—
汽爆蔗渣 Steam explosive bagasse	—	9.54	85.03	—	3.31	1.03

注:表中%表示各种糖组分在水解液中的相对百分含量(总糖为 1)

从表 2 可以看出,经酸及汽爆预处理水解液单糖中以木糖为主,六碳糖含量则较少。而木糖是半纤维素的主要成分,这说明预处理过程导致了半纤维素的水解,而纤维素水解则较少。半纤维素以细胞壁 S<sub>1</sub> 区分布最高,由于半纤维素的水解从而影响了植物纤维的天然结构。便于纤维素酶的作用。

## 2.3 植物纤维预处理对结晶度的影响

天然植物纤维中纤维素的结构含有结晶区与非结晶区,通过分析各种预处理手段所导致的结晶度变化状况,可以推测结晶度对纤维素酶水解的影响,结果见表 3。

表 3 预处理对植物纤维结晶度的影响

Table 3 Effect of pretreatment on crystallinity of cellulose

	蔗渣 Bagasse			杨树 Poplar		
	原料 material	酸预处理 Acid pretr.	碱预处理 Alkali pretr.	原料 Raw material	碱预处理 Alkali pretr.	酸预处理 Acid pretr.
结晶度(CrI%) Crystallinity	60.64	59.02	57.30	—	55.01	49.11

从表 3 可以看出,碱预处理不同程度上引起了结晶度的下降,而酸预处理则保持甚至引起结晶度的升高。一般地说,结晶区难以被纤维素酶破坏、降解。结合表 1 的结果,说明了纤维素结晶度的下降有利于纤维素酶的水解。但从结果可以判定结晶度并不是影响纤维素酶水解最重要的因素,因为从表 1、表 3 可知,杨树在酸预处理条件下,尽管结晶度比未处理原料升高了,但纤维素酶解率仍比未处理的酶解率高。

## 2.4 植物纤维原料预处理水解液紫外吸收特征

将各种预处理纤维原料的水解液进行紫外吸收光谱分析,扫描范围为 400~190 nm,记录 OD<sub>205 nm</sub>,计算酸溶木质素的含量,结果见表 4。

表4 可溶木质素含量分析  
Table 4 Analysis of soluble lignin content

	酸预处理 Acid pretr.		碱预处理 Alkali pretr.		汽爆蔗渣 Steam explosive bagasse
	蔗渣 Bagasse	杨桐 Poplar	蔗渣 Bagasse	杨桐 Poplar	
OD <sub>205 nm</sub> (×100)	0.306	0.340	0.342	0.600	0.104
可溶木质素含量(%) Content of soluble lignin	1.05	1.33	3.54	1.52	2.36

注：“%”表示相对于原料预处理后木质素的得率

从表4中可以明显看出,碱预处理条件下蔗渣的可溶木质素含量最高,汽爆次之,酸预处理最低。溶出的木质素含量越高,说明天然植物纤维中木质素减少越多。木质素分布在植物细胞壁的胞间层,由于木质素的破坏、溶出,便会破坏天然植物纤维的结构,有利于纤维素酶的水解作用。

### 3 讨论

3.1 酸、碱、蒸汽爆碎三种处理方法均可作为纤维素酶水解的预处理方法。从表1的结果可以看出,蔗渣在碱预处理后其酶解得糖率最高。进一步研究表明:碱预处理蔗渣其结晶度下降、可溶木质素含量较高,纤维形态变化较大,因而推测植物纤维的结晶度、木质素含量及纤维结构形态均一定程度上影响着纤维素酶对纤维素的作用。根据文献[5]对麦草进行的纤维素酶降解经验模型指出:影响纤维素酶降解的主要因素为纤维素的比表面积、结晶度及木质素含量,本研究的结果基本与之一致。至于什么是影响纤维素酶对植物纤维中的纤维素水解的最重要的因素,本实验尚不足以提出明确定论。但从研究的结果可以推测,结晶度并非至关重要的因素。因为在酸预处理条件下,尽管结晶度增大了,但其纤维素酶解得糖率仍较未预处理物料酶解得率高。另一方面,从分子作用的角度看,植物纤维天然结构破坏越严重,其比表面积越大,越有利于纤维素酶大分子(一般为5.1 nm)的作用。从研究结果表明,酸及蒸汽爆碎预处理主要是引起半纤维素的水解,其显微结构变化较之碱处理要小,因而从侧面证实了文献[5]经验公式所提出的结论。

3.2 从研究结果可以看出,预处理水解液得糖率与酶解得糖率之和以碱处理为最少。从植物纤维生物量的全利用、经济成本、酸碱化学品污染及能耗各方面综合分析,酸碱预处理并非最佳选择,而蒸汽爆碎则是一种有效而合理的预处理方法。

### 参 考 文 献

- 1 朱 俭等. 生物化学实验. 上海:上海科技出版社,1981
- 2 余世袁,罗 廉,李 杰等. 休哈塔假丝酵母对半纤维素戊糖和己糖的同步发酵. 林产化学与工业,1991,11(1):17~25
- 3 小阿瑟 J C 著,陈德峻等译. 纤维素化学与工艺学. 北京:轻工业出版社,1983
- 4 陈洪章,曲音波,高培基. 纤维性废物蒸汽爆碎预处理和半纤维素水解物的水抽提. 林产化学与工业,1992,12(3):217~225

