

聚乙二醇对不同木质纤维底物 酶解生产葡萄糖的影响

王新明, 肖林, 覃树林, 刘立存, 夏蕊蕊*

(山东龙力生物科技股份有限公司 山东省秸秆炼制技术重点实验室, 山东禹城 251200)

摘要:研究了聚乙二醇(PEG)对纤维素酶水解两种不同底物产葡萄糖的影响,添加PEG后两种底物的纤维素生成葡萄糖的转化率均得到提高,PEG400浓度为9 g/L时转化率达到最大值。PEG对经酸处理的玉米秸秆的糖化促进效果(提高30%)大于经酸碱处理的玉米秸秆(提高10%)。当反应体系的固形物提高或酶加量增大时,PEG对糖化作用的促进效果降低。发酵实验结果表明PEG对酵母无不良影响。

关键词:玉米秸秆,聚乙二醇,纤维素酶,糖化

Effect of polyethylene glycol on enzymatic hydrolysis for glucose production with different lignocellulosic substrates

WANG Xin-ming, XIAO Lin, QIN Shu-lin, LIU Li-cun, XIA Rui-rui*

(Shandong Key Laboratory of Straw Biorefinery Technology,
Shandong Longlive Biotechnology Co., LTD, Yucheng 251200, China)

Abstract: The effects of polyethylene glycol (PEG) on the production of glucose from two different substrates by cellulase hydrolysis were studied. The conversion of cellulose to glucose was improved after the addition of PEG to the two substrates. The conversion rate reached maximum value when PEG concentration was 9 g/L. The promoting effect of PEG on acid-treated corn straw (increased by 30%) was greater than the acid-alkali-treated corn straw (increased by 10%). The promoting effect of PEG on saccharification was reduced when the solid content of the reaction mixture was increased or the amount of the enzyme was increased. The fermentation experiment showed that PEG had no adverse effect on yeast.

Key words: corn straw; polyethylene glycol; cellulase; saccharification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)23-0135-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.23.017

以价格低廉的农业废弃物为原料,将其中的聚合糖——纤维素、半纤维素转化为葡萄糖和木糖等单糖,它们可以被微生物发酵制备乙醇、沼气等^[1-2]。利用生物酶水解木质纤维素中的纤维素、半纤维素之前需要对原料进行一定的预处理,打破纤维素、半纤维素和木质素形成的致密结构;降低纤维素和半纤维素的聚合度;除去木质素对纤维素和半纤维素的包裹^[3-4]。经过有效的预处理后酶解效率会得到提高,但是与淀粉酶相比,纤维素酶的酶解效率仍然低得多。

纤维素酶是由外切酶、内切酶和 β -糖苷酶等组成的^[5],其酶解效率低的主要原因是吸附-解吸底物速率低、酶非特异性结合木质素失活等^[6]。研究表明在糖化过程中添加一些蛋白质、表面活性剂、脂类等可以提高酶解效率^[7-9]。本文通过在酶解过程中加入聚乙二醇改善溶液性质,减少纤维素酶失活,考察

聚乙二醇对纤维素酶水解不同底物的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

玉米秸秆 2015年收集于山东省德州市,晾干、粉碎后储存于通风干燥处;纤维素酶(Cellic CTec2) 诺维信(中国)有限公司;聚乙二醇(PEG,聚合度 $n=400$) 青岛天力源生物科技有限公司;酿酒高活性干酵母 湖北安琪酵母股份有限公司;玉米浆 山东龙力生物科技股份有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

汽爆工艺实验台(QBS-200B) 鹤壁正道生物能源公司;ZHWHY-100D恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;SPX-250B-Z生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;TGL-18C高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂;SBA-40E

收稿日期:2016-05-12

作者简介:王新明(1988-),硕士,工程师,研究方向:生物质综合利用,E-mail:wangxinming@longlive.cn。

*通讯作者:夏蕊蕊(1978-),女,博士,高级工程师,研究方向:生物质开发与利用,E-mail:xrr@longlive.cn。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA021903);山东省科技重大专项(2015ZDXX0403A01)。

生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 将玉米秸秆剪切至1~2 cm,利用1%的硫酸浸泡过夜后淋干水分,置于汽爆台,0.8 MPa保压处理5 min,瞬时降压排出,得到经酸处理后的玉米秸秆(ATCS),测得纤维素含量约为50%,木质素含量约25%;经酸处理后的秸秆再用1%氢氧化钠80℃保温处理60 min。得到经酸碱处理后的玉米秸秆(AATCS),测得纤维素含量约为80%,木质素含量约5%。

1.2.2 酶解糖化 在250 mL三角瓶中加入干重为10 g的预处理的秸秆,加水使总体系达到100 g,利用1%的硫酸或1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH约为5,底物为AATCS的酶加量为0.035 g/g纤维素,底物为ATCS的酶加量为0.05 g/g纤维素,加入一定量的聚乙二醇(PEG400),使反应液中PEG浓度为9 g/L。将三角瓶置于恒温培养振荡器中,120 r/min,50℃进行糖化,反应48 h取样测定葡萄糖浓度,三平行实验取平均值。实验中通过改变PEG添加量、固形物含量、酶加量,考察PEG对糖化促进效果的影响。

1.2.3 发酵 糖化完成后,待糖化液降温,加入0.4 mL玉米浆,4 mL活化好的酵母,密封,置于36℃生化培养箱中静置发酵。发酵反应48 h后取样测定乙醇浓度,三平行实验取平均值。

1.2.4 酵母活化 取3 g葡萄糖溶于100 mL去离子水中,加入1 g酿酒高活性干酵母,摇匀,棉塞封口,置于34℃生化培养箱中静置4 h。

1.3 测定及计算方法

取1 mL糖化液于1.5 mL离心管中,8000 r/min离心10 min,取上清液25 μL于2.475 mL水中($\times 100$),混匀,利用生物传感分析仪测定样品中葡萄糖浓度。

取1 mL发酵液于1.5 mL离心管中,8000 r/min离心10 min,取上清液25 μL于2.475 mL水中($\times 100$),混匀,利用生物传感分析仪测定样品中乙醇浓度。

纤维素葡萄糖转化率(%) = 葡萄糖浓度 \times 糖化液体积 $\times 0.9$ / 底物中纤维素质量 $\times 100$

纤维素乙醇转化率(%) = 乙醇浓度 \times 发酵液体积 $\times 0.9$ / 底物中纤维素质量 $\times 0.511 \times 100$

2 结果与分析

2.1 不同浓度 PEG 对底物酶解产糖的影响

图1中是纤维素葡萄糖转化率随糖化液中PEG400添加量的变化,由图可以看出,在经酸碱处理的秸秆和经酸处理的秸秆的糖化液中添加PEG,反应48 h两种底物的纤维素葡萄糖转化率均得到提高,两种底物的糖化反应中添加PEG的浓度为9 g/L时纤维素葡萄糖转化率达到最大值,其中经酸碱处理的秸秆转化率提高了约10%,经酸处理的秸秆转化率提高了约30%。

PEG可以减少酶无效吸附木质素,提高酶的利用率^[10],因为PEG比纤维素酶更容易吸附木质素,研究表明PEG比纤维素酶吸附底物中木质素的能力高

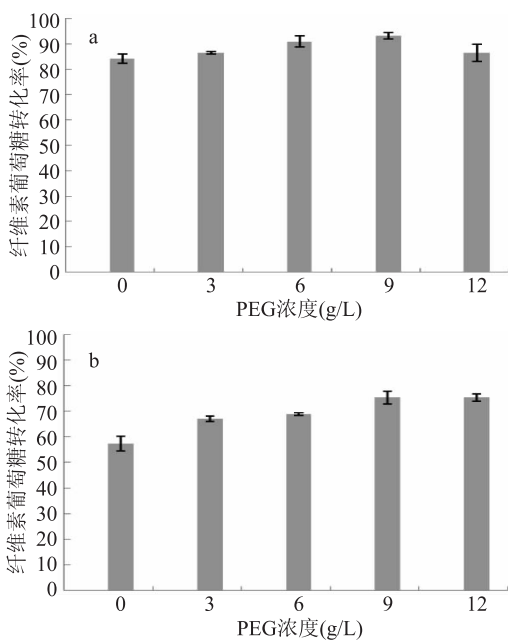


图1 不同浓度 PEG 对底物酶解产糖的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of PEG on glucose production

注:(a)底物是AATCS;(b)底物是ATCS,图2~图5同。

11倍多^[11]。添加PEG对经酸处理的秸秆糖化促进效果更为明显,与文献[12]中结果相同。当糖化液中PEG浓度为12 g/L时纤维素葡萄糖转化率与9 g/L时相比不再上升甚至下降,这可能是因为PEG与底物中的木质素结合后,过量的PEG游离在溶液中会与纤维素酶系中的部分酶结合导致酶失活^[13]。

2.2 底物浓度不同时 PEG 对底物酶解产糖的影响

图2中是不同固形物含量下、是否添加PEG400时糖化反应48 h后底物纤维素葡萄糖转化率的对

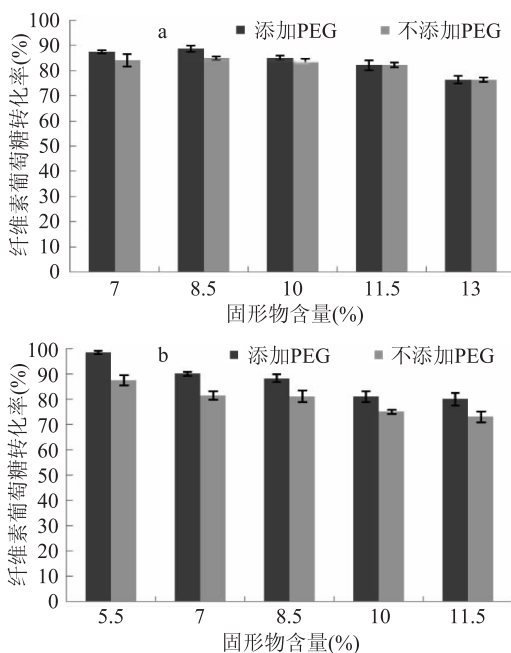


图2 底物浓度不同时 PEG 对底物酶解产糖量的影响

Fig.2 Effects of PEG on glucose production under different substrate concentrations

比。由图可以看出,经酸碱处理的秸秆糖化反应体系的固形物不大于10%时,添加PEG对糖化有促进作用;经酸处理的秸秆糖化反应体系的固形物在5.5%~11.5%之间,添加PEG对糖化均有促进作用,PEG可以改善固液传质,加速底物与酶运动,这增加了酶与底物的吸附-解吸速率^[14],当固形物浓度越高时这种作用效果越不明显。

2.3 酶加量不同时 PEG 对底物酶解的影响

图3中是不同酶加量下、是否添加PEG400时糖化反应48h后底物纤维素葡萄糖转化率的对比。由图可以看出,经酸碱处理的秸秆随酶加量提高,纤维素葡萄糖转化率相应提高,当酶加量小于0.05g/g纤维素时,添加PEG可以促进糖化,当酶加量继续提高后,PEG抑制糖化;经酸处理的秸秆随酶加量提高,纤维素葡萄糖转化率提高,在设计酶加量范围内,添加PEG对糖化均有促进。

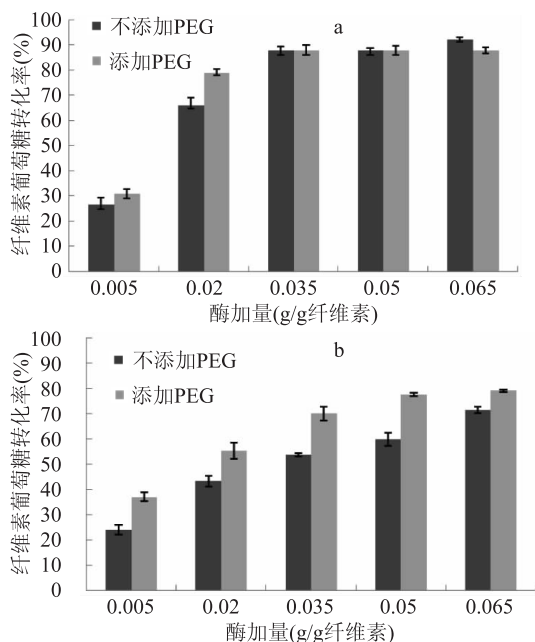


图3 酶加量不同时 PEG 对底物酶解产糖量的影响
Fig.3 Effects of PEG on glucose production under different enzyme loading

PEG对酶解反应有促进作用,可以加速酶的吸附-解吸速率,减少酶吸附木质素失活。但当反应体系中酶过量时,过量的酶有可能会与PEG结合^[15],降低了PEG改善传质的作用,导致糖化反应速率降低。

2.4 酶加量不同时 PEG 对发酵的影响

图4中是糖化反应48h后得到的糖化液进行接种、发酵48h后产乙醇情况。图中纤维素乙醇转化率随酶加量提高的变化趋势与糖化反应基本相同,可以说明添加PEG对发酵过程没有负影响(酸碱处理中酶添加量0.05、0.065g/g纤维素除外)。这在图5中也可以直观的看出。

大量的实验研究表明,聚乙二醇对纤维素酶水解纤维素有促进效果,可以提高和保持体系中酶活性。通过添加少量PEG,可以减少酶用量或将高活性的酶回收循环使用,从而降低产生成本^[14-16]。聚乙二醇主要通过和纤维素酶竞争木质素吸附位点,降

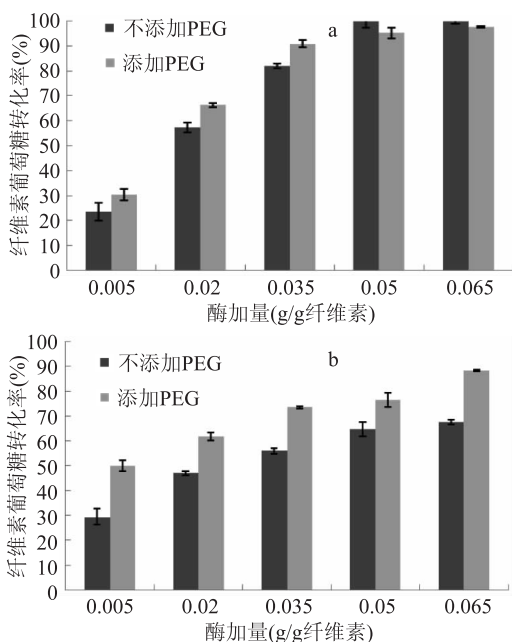


图4 酶加量不同时 PEG 对底物发酵产乙醇的影响
Fig.4 Effects of PEG on ethanol production under different enzyme loading

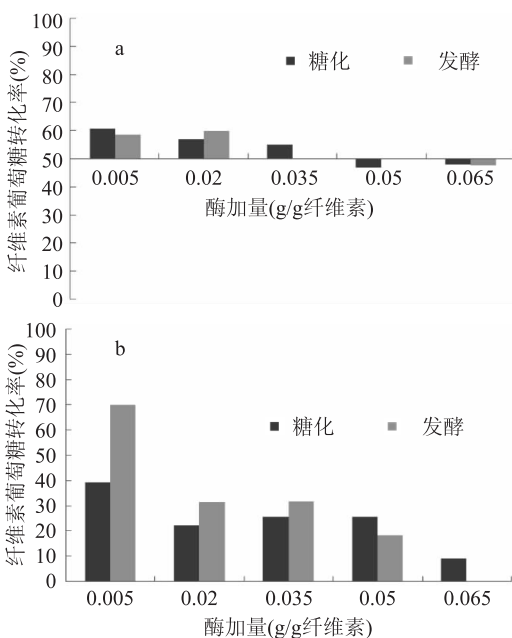


图5 酶加量不同时 PEG 对底物酶解、发酵促进作用的直观图

Fig.5 The visualized graph of the promoting effect of PEG on the enzymatic hydrolysis and fermentation under different enzyme loading

低酶吸附木质素失活来发挥作用,主要是 β -葡萄糖苷酶^[17]。文献[18]中在糖化体系中添加少量木质素有利于酶解反应进行,这种游离木质素也可以吸附底物中的木质素与纤维素酶竞争木质素吸附位点,与本文的结论并不冲突。

3 结论

玉米秸秆经稀硫酸浸泡和蒸汽爆破处理后,原料中半纤维素大部分被除去;经氢氧化钠处理后半

纤维素全部除去,木质素大部分被除去。利用两种底物考察聚乙二醇对纤维素酶水解纤维素产糖的影响。

聚乙二醇对两种底物的纤维素葡萄糖转化率均得到提高。两种底物的糖化反应液中添加 PEG 的浓度为 9 g/L 时酶解率达到最大值。PEG 对木质素含量较高的经酸处理的秸秆的促进效果大于经酸碱处理的秸秆,前者纤维素葡萄糖转化率提高约 30%,后者提高约 10%,说明 PEG 可以有效降低纤维素酶吸附木质素失活。当反应体系固形物提高时,PEG 对糖化的作用的促进效果降低,这说明 PEG 可以改善反应体系传质,提高酶吸附-解吸速率。当反应中酶加量增大时,PEG 对糖化作用的促进效果降低,说明反应体系中过量的 PEG 和过量的纤维素酶间会发生吸附,导致酶活降低。底物水解得到的糖可以被酵母代谢产生乙醇,PEG 对酵母无不良影响。

参考文献

- [1] Limayem A, Ricke S C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, 8 (4): 449-467.
- [2] 毕于运, 高春雨, 王亚静, 等. 中国秸秆资源数量估算 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25 (12): 211-217.
- [3] 王新明, 肖林, 夏蕊蕊. 木质纤维素乙醇预处理技术研究进展 [J]. *生物产业技术*, 2014 (2): 67-69.
- [4] Nguyen T Y, Cai C M, Kumar R, et al. Co-solvent pretreatment reduces costly enzyme requirements for high sugar and ethanol yields from lignocellulosic biomass [J]. *ChemSusChem*, 2015, 8 (10): 1716-1725.
- [5] 罗鹏, 刘忠. 表面活性剂对麦草同步糖化发酵转化乙醇的影响 [J]. *过程工程学报*, 2009, 9 (2): 355-359.
- [6] 王新明, 王联结, 于猛. 牛血清蛋白对纤维素酶水解小麦秸秆的影响 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33 (19): 194-196, 200.
- [7] Eckard A D, Muthukumarappan K, Gibbons W. Enhanced bioethanol production from pretreated corn stover via multi-positive effect of casein micelles [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135 (2): 93-102.
- [8] Kumar R, Wyman C E. Effect of additives on the digestibility

of corn stover solids following pretreatment by leading technologies [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102 (6): 1544-1557.

- [9] Li J H, Li S Z, Fan C Y, et al. The mechanism of poly (ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 89 (1): 203-210.
- [10] 陈洪章, 李佐虎. 影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究 [J]. *化学反应工程与工艺*, 2000, 16 (1): 31-37.
- [11] Vaidya A A, Newman R H, Campion S H, et al. Strength of adsorption of polyethylene glycol on pretreated *Pinus radiata* wood and consequences for enzymatic saccharification [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 70: 339-346.
- [12] Lu Y P, Yang B, Gregg D, et al. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 98 (1): 641-654.
- [13] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, et al. Inhibition of cellulases by phenols [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46 (4): 170-176.
- [14] Ouyang J, Dong Z W, Song X Y, et al. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (17): 6685-6691.
- [15] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31 (3): 353-364.
- [16] Ouyang J, Ma R, Huang W T, et al. Enhanced saccharification of SO₂ catalyzed steam-exploded corn stover by polyethylene glycol addition [J]. *Biomass and bioenergy*, 2011, 35 (5): 2053-2058.
- [17] Sipos B, Szilágyi M, Sebestyén Z, et al. Mechanism of the positive effect of poly (ethylene glycol) addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2011, 334 (11): 812-823.
- [18] Wang W X, Zhu Y S, Du J, et al. Influence of lignin addition on the enzymatic digestibility of pretreated lignocellulosic biomasses [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 181C: 7-12.

(上接第 134 页)

- [23] Prasad A S. Role of metallothioneins in human health [J]. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1992, 120 (3): 357-358.
- [24] 吴云辉, 王俊坤, 孙继鹏, 等. DTNB 比色法测定金属硫蛋白含量 [J]. *食品科学*, 2013, 34 (16): 196-199.
- [25] 朱海超, 王洋, 杨丽, 等. 氨基酸分析法测定金属硫蛋白 [J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17 (7): 1326-1327.
- [26] 邓川, 张玮玮, 燕艳, 等. 毛细管电泳法测定化妆品中的金属硫蛋白 [J]. *实验技术与管理*, 2012, 29 (11): 41-49.
- [27] 林哲韵, 张源, 罗红军, 等. 石墨炉原子吸收光谱法测定镉中毒小鼠尸体中大头金蝇体内的镉和金属硫蛋白 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2012, 25 (1): 11-16.
- [28] Andrew D, Laorie. Quantitation of metallothionein mRNA from the New Zealand common bully (*Gobiomorphus cotidianus*)

and its implications for biomonitoring [J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2004, 38: 869-877.

- [29] 王强, 王东进, 李庆国, 等. 改良的原代心肌细胞培养方法 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (6): 1168-1169.
- [230] 张琳, 李东野, 王志荣, 等. 新生大鼠心脏肌细胞原代培养方法的改良 [J]. *徐州医学院学报*, 2008, 28 (5): 303-306.
- [31] 李影, 杨公社, 卢荣华, 等. 原代猪前体脂肪细胞培养方法的优化 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27: 697-700.
- [32] 马彬云, 任宏伟, 吴建平, 等. 牦牛 MT-I cDNA 分子克隆及其蛋白质结构分析 [J]. *中国生物工程*, 2005, 25 (4): 62-68.
- [33] Romero-Isart N, Vasak K M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 88: 388-396.