

Tween-20 协同麦草酶水解的研究

罗 鹏¹, 刘 忠²

(1 天津商业大学 机械工程学院, 天津 300134; 2 天津科技大学 材料科学与化学工程学院, 天津 300222)

摘要:采用正交试验设计的方法,对在混合酶(纤维素酶 Celluclast 1.5 l, β -葡萄糖苷酶 Novozym 188)与 Tween-20 协同作用下,经乙醇预处理的麦草酶水解工艺条件进行研究,详细讨论了反应温度、底物浓度、Tween-20 用量、纤维素酶用量对还原糖浓度和得率的影响,并对酶水解工艺进行优化.结果表明,最佳工艺条件为反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$,底物质量浓度 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Tween-20 用量 0.03 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,纤维素酶用量 15 $\text{FPU} \cdot \text{g}^{-1}$.在此条件下,水解 72 h 时,还原糖质量浓度和得率分别达到 46.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 41.5%.

关键词:麦草; Tween-20; 酶水解; 还原糖

中图分类号:Q55; TQ91

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)01-0055-05

Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Cooperated with Tween-20

LUO Peng¹, LIU Zhong²

(1 College of Mechanical Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2 College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: Dilute sulfuric acid impregnated and ethanol pretreated wheat straw was used as substrate for enzymatic hydrolysis with Tween-20 additive through orthogonal experiment design. Cellulase mixture (Celluclast 1.5 l and β -glucosidase Novozym188) were used in combination with Tween-20. The effects of reaction temperature, substrate concentration, Tween-20 loading and enzyme loading were evaluated and the enzymatic saccharification conditions were optimized. The optimum reaction temperature was 50 $^{\circ}\text{C}$, 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for substrate concentration, 0.03 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ for Tween-20 loading, 15 $\text{FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ for enzyme loading. Under the optimum condition, the reducing sugar concentration increased with reaction time, 46.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of the reducing sugar concentration and 41.5% of the reducing sugar yield were obtained respectively after 72 h.

Key words: wheat straw; Tween-20; enzymatic hydrolysis; reducing sugar

石油对于社会的进步和经济的发展起到了巨大的推动作用,但是,地球上石油储量有限,不可再生.按目前的技术水平和开采量计算,在未来的几十年内石油资源将基本耗尽^[1].因此,石油替代品的研究开发势在必行.小麦是我国的主要农作物,每年小麦生产的剩余物——麦草产量巨大.麦草富含纤维素,水解后生成的单糖可发酵成乙醇,国内外许多学者

对此作了大量的研究与探索^[2-5].

无机酸和纤维素酶都可催化水解纤维素,由于纤维素酶水解具有葡萄糖得率高、反应条件温和(pH 4.8, 温度 45 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$)、不要求反应器具具有高耐腐蚀性的特点,水解成本比酸法低,是目前利用木质纤维原料生物转化乙醇的主要方法,具有良好的发展前景和巨大的应用潜力^[6].

收稿日期:2009-02-17

作者简介:罗 鹏(1966—),男,博士,副教授, E-mail: pengluo@yeah.net

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(05YFGPGX05700)

在酶水解过程中,由于纤维素酶不可逆地吸附在纤维素底物中的木素表面,使纤维素酶发生钝化,造成纤维素酶的活性急剧降低,水解反应速度急剧下降^[7-8].增加纤维素酶的用量,在一定程度上可以弥补纤维素酶的钝化作用,提高水解速度和得率,但使成本显著增加,经济上不具可行性^[9].纤维素酶的钝化是制约木质纤维原料生物转化为燃料乙醇的“瓶颈”,减少纤维素酶的失活和提高纤维素酶的稳定性成为近年来研究的热点.在纤维素酶水解过程中添加非离子型表面活性剂能够阻止木素对纤维素酶的无效吸附,提高纤维素酶的稳定性,提高酶水解速度和得率,减少昂贵的纤维素酶的用量^[8,10-11].目前,此方面研究多集中于特定的非离子型表面活性剂对木材酶水解强化效果的评价^[7-8],国内外鲜见对于非离子型表面活性剂 Tween-20 协同麦草酶水解的研究报道.由于麦草与木材的化学组成和结构存在显著差异,这些差异影响底物与纤维素酶的相互作用,进而影响表面活性剂的强化效果.因此,本试验以麦草为原料,采用乙醇预处理,通过正交试验,研究在 Tween-20 协同作用下麦草酶水解的工艺条件,初步分析其作用机制,为今后工业化推广提供参考.

1 材料与方法

1.1 麦草原料

所用麦草取自天津市北辰区双口镇,麦草中水的质量比为 23%.将麦草切成 3 cm 的草段,然后使用 8 目的筛子除去短小的碎料与杂质,得到合格的原料.

1.2 乙醇预处理

ZQS 型电热回转蒸煮锅由陕西科技大学机械厂制造,采用油浴加热,所用油为导热油.容积为 15 L,转速为 1 r/min.最高工作温度可达 300 ℃,最高工作压力可达 10 MPa.

将定量的经过粉碎与筛选的麦草原料按 $m_{\text{固}}:m_{\text{液}}=1:6$,用 w 为 1.5% 的稀硫酸浸泡处理 12 h 后,置于电热回转蒸煮锅中,按 $m_{\text{固}}:m_{\text{液}}=1:10$ 向蒸煮锅中加入 φ 为 60% 的乙醇水溶液,锁紧蒸煮锅,加热至 180 ℃,保温 60 min,待蒸煮锅冷却至 40 ℃ 时,开盖卸料,过滤,将固形物与液态水溶部分分离.先用 φ 为 60% 的乙醇水溶液,然后再用自来水常温常压下对固形物进行洗涤.对固形物进行化学成分的分析.

1.3 水解酶

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 纤维素酶 (Cellu-

clast 1.5 l),购自诺维信(中国)生物技术有限公司.其酶活力为 75.8 FPU/mL, β -葡萄糖苷酶酶活力为 38.5 IU/mL;

β -葡萄糖苷酶 (Novozym 188),购自诺维信(中国)生物技术有限公司,其 β -葡萄糖苷酶酶活力为 421.0 IU/mL.

1.4 纤维素酶解方法

将定量的已平衡水分的麦草固形物试样、定量的 Celluclast 1.5 l、Novozym 188 (15 IU/g)、定量的 Tween-20 装入 250 mL 锥形瓶中,用 0.05 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液调节酶解初始 pH 为 4.8,在水浴摇床转速为 150 r/min 的条件下振荡水解 72 h.定时取样,进行离心分离,用 DNS 法在 520 nm 处测上清液中还原糖含量,以葡萄糖计.

1.5 正交试验设计

在纤维素底物确定的情况下,影响酶水解的因素主要有反应温度、反应时间、底物浓度、水解液 pH、水解酶用量和表面活性剂用量^[6,8-11].通过单因素预备试验,并参考文献[8-11],认为反应时间为 72 h,水解液 pH 为 4.8,Novozym 188 用量为 15 IU/g 较为适宜,因此作为固定因子考虑.

本试验主要研究反应温度、底物浓度、纤维素酶用量和 Tween-20 用量对麦草酶水解的影响,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,因子与水平见表 1.

表 1 正交试验设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	$\theta/^\circ\text{C}$	$\rho_{\text{底物}}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	纤维素酶用量/ (FPU $\cdot \text{g}^{-1}$)	Tween-20 用量/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	40	60	10	0.01
2	45	80	15	0.03
3	50	100	20	0.05

1.6 分析测定方法

麦草原料和经乙醇预处理后的麦草固形物的碳水化合物含量的测定分别按文献[12-14]进行.滤纸酶活力和纤维二糖酶活力按照 IUPAC 推荐的国际标准方法测定^[15].

1.7 计算

经乙醇预处理后的麦草的酶水解得率的计算如下式^[16]:

酶水解得率 = 糖液中还原糖浓度/底物浓度 $\times 0.9 \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 乙醇预处理前后的麦草化学成分

表 2 表示乙醇预处理前后的麦草化学成分. 麦

草经乙醇预处理后,约 44% 的组分流失,固形物得率为 56.5%. 与未经处理的麦草相比,固形物中可用于酶水解的纤维素含量有了明显提高,而半纤维素含量明显下降.

表 2 乙醇预处理前后的麦草化学成分

Tab.2 Chemical composition of wheat straw before and after ethanol cooking pretreatment

麦草	固形物得率/%	w(葡萄糖)/%	w(木糖)/%	w(甘露糖)/%	w(阿拉伯糖)/%	w(半乳糖)/%	w(木素)/%
处理前	100.0	40.6	19.2	0.8	2.4	2.4	17.8
处理后	56.5	60.8	9.7	0.4	0	0.5	14.8

2.2 工艺条件对乙醇预处理后的麦草酶水解的影响

表 3 和表 4 分别给出了经乙醇预处理后的麦草酶水解正交试验条件与试验结果及正交试验统计分析.

从表 4 可以看出,当纤维素酶用量为水平 1 (10 FPU · g⁻¹) 时,经乙醇预处理后的麦草酶水解转化的还原糖质量浓度和得率均较低,分别为 34.2 g · L⁻¹ 和 38.9%. 当纤维素酶用量提高到水平 2 (15 FPU · g⁻¹) 时,还原糖质量浓度和得率相应提高,分别为 36.3 g · L⁻¹ 和 41.4%. 当纤维素酶用量为水平 3 (20 FPU · g⁻¹) 时,还原糖浓度和得率均达到最大值,分别为 36.6 g · L⁻¹ 和 43.0%,但提高幅度趋于平缓. Kaar 等^[10] 研究 Tween-20 对玉米芯酶水解的影响、姚日生等^[17] 研究 Tween-80 对稻草酶水解的影响时,均观察到了相似的现象. 这是由于反应体系中添加的 Tween-20 提高了纤维素酶的稳定性,阻止了底物中的木素对纤维素酶的无效吸附,使得纤维素酶可以完全与底物中的纤维素结合,酶水解效率提高,并且,在一定条件下,底物中的纤维素表面能与纤维素酶分子结合的位点有限,当这些位点全部被纤维素酶分子占据后,进一步提高纤维素酶用量对水解无明显的效果. 由于还原糖浓度在纤维素酶用量为

20 与 15 FPU · g⁻¹ 的差别很微小,从节约酶制剂成本的角度考虑,最佳的纤维素酶用量取水平 2 (15 FPU · g⁻¹).

当底物质量浓度为水平 3 (100 g · L⁻¹) 时,还原糖质量浓度为 39.3 g · L⁻¹,达到最大值. 而当底物质量浓度为水平 1 (60 g · L⁻¹) 时,还原糖得率为 46.0%,达到最大值. 还原糖浓度和得率达到最大值时的底物质量浓度不同. 这种现象与 Borjesson 等^[18] 用 PEG 4000 辅助针叶材酶水解时观察到的现象相吻合. 这表明,在试验条件下,提高底物浓度有助于提高生成的还原糖浓度,但是,相应地降低了还原糖得率. 这可能是由于当底物浓度较低时,生成的还原糖浓度较低,产物对纤维素酶水解的反馈抑制作用不大,因此,还原糖得率相对较高. 而当底物浓度较高时,由于生成的还原糖浓度较高,产物对纤维素酶水解的反馈抑制作用增强,并且水解液的流动性变差,传质阻力增大,难以对底物搅拌均匀,导致还原糖得率下降. 鉴于高的还原糖浓度能够在后续的乙醇发酵工序中提高产物浓度,从而降低乙醇提纯所耗费的能量,因此最佳的底物质量浓度取水平 3 (100 g · L⁻¹).

表 3 经乙醇预处理后的麦草酶水解正交试验条件与试验结果

Tab.3 Conditions and results of the orthogonal experiment for hydrolysis of ethanol cooked wheat straw

试验号	纤维素酶用量/ (FPU · g ⁻¹)	ρ _{底物} / (g · L ⁻¹)	Tween-20 用量/ (g · g ⁻¹)	θ/℃	ρ(还原糖)/ (g · L ⁻¹)	酶水解 得率/%
1	10	60	0.05	45	29.3	44.0
2	10	80	0.01	40	29.8	33.5
3	10	100	0.03	50	43.7	39.3
4	15	60	0.03	40	28.5	42.8
5	15	80	0.05	50	39.6	44.6
6	15	100	0.01	45	40.9	36.8
7	20	60	0.01	50	34.2	51.3
8	20	80	0.03	45	42.4	47.7
9	20	100	0.05	40	33.3	30.0

表4 经乙醇预处理后的麦草酶水解正交试验统计分析

Tab.4 Statistical analysis of the orthogonal experiment for hydrolysis of ethanol cooked wheat straw

工艺参数	$\rho(\text{还原糖})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$			标准差	酶水解平均得率/%			标准差
	水平1	水平2	水平3		水平1	水平2	水平3	
纤维素酶用量	34.2	36.3	36.6	1.31	38.9	41.4	43.0	2.07
$\rho_{\text{底物}}$	30.6	37.2	39.3	4.54	46.0	41.9	35.4	5.35
Tween-20 用量	35.0	38.2	34.1	2.16	40.5	43.3	39.5	1.97
θ	30.5	37.5	39.2	4.61	35.4	42.8	45.1	5.06

当 Tween-20 用量为水平 1 ($0.01 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) 时,还原糖浓度和得率均较低,分别为 $35.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 40.5%。当 Tween-20 用量提高到水平 2 ($0.03 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) 时,还原糖浓度和得率相应提高,分别为 $38.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 43.3%。当 Tween-20 用量进一步提高到水平 3 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) 时,还原糖浓度和得率均下降,分别为 $34.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 39.5%,均低于水平 1。这种现象与 Karr 等^[10]用 Tween-20 辅助玉米芯酶水解、Kristensen 等^[11]用 PEG 6000 辅助麦草酶水解时观察到的现象相吻合。这可能是由于在底物中的木素表面有一定数目的既可吸附表面活性剂又可吸附纤维素酶的位点,当表面活性剂用量达到一定程度时,这些位点全部被表面活性剂所吸附,进一步提高表面活性剂用量反而干扰水解液中的游离纤维素酶,致使还原糖浓度和得率较之前有所下降。很明显,最佳的 Tween-20 用量为水平 2 ($0.03 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

当反应温度为水平 1 (40°C) 时,还原糖质量浓度和得率均较低,分别为 $30.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 35.4%。当反应温度提高到水平 2 (45°C) 时,还原糖质量浓度和得率相应提高,分别为 $37.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 42.8%。当反应温度为水平 3 (50°C) 时,还原糖质量浓度和得率均达到最大值,分别为 $39.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 45.1%。Borjesson 等^[18]研究 PEG 4000 对针叶材酶水解的影响时,也观察到了相似的现象。这是由于纤维素酶的活力对温度高度敏感,在最适温度下,纤维素酶的活力最高,酶水解反应速度最大。当反应温度低于最适温度时,随着反应温度的提高,纤维素的水解糖化速度相应提高,使得生成的还原糖浓度和还原糖得率均提高。很明显,最佳的反应温度为水平 3 (50°C)。

表 4 中正交试验统计分析的标准差显示,工艺条件对经乙醇预处理后的麦草酶水解转化的还原糖浓度的影响程度依次为:反应温度 > 底物质量浓度 > Tween-20 用量 > 纤维素酶用量,而对还原糖得率的影响程度依次为:底物质量浓度 > 反应温度 > 纤维素酶用量 > Tween-20 用量。

通过以上分析,得出麦草酶水解转化还原糖的最佳工艺条件为反应温度 50°C ,底物质量浓度 100

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Tween-20 用量 $0.03 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,纤维素酶用量 $15 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在此条件下进行验证试验,麦草酶水解转化的还原糖质量浓度和还原糖得率分别为 $46.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 41.5%。虽然其还原糖得率不是最高,但还原糖浓度达到最大值,符合本研究的优化目标,证实了正交试验对麦草酶水解工艺条件优化的正确性。

2.3 经乙醇预处理后的麦草在最佳工艺条件下酶水解反应历程

图 1 给出了最佳工艺条件下经乙醇预处理后的麦草酶水解反应历程。由图 1 可见,在水解前 48 h 酶解反应速度持续快速提高,还原糖含量随着酶解反应的进行持续上升。水解 24 h 时,还原糖质量浓度达到 $27.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,水解 48 h,还原糖浓度达到 $42.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,优于一般未添加表面活性剂的木质纤维原料的酶水解体系^[19-21]。这表明,添加表面活性剂 Tween-20 对经乙醇预处理后的麦草酶水解具有明显的促进作用。这是由于 Tween-20 有效地阻止纤维素酶在木素表面上的无效吸附,使得纤维素酶可以充分作用于纤维素,从而提高酶解效率。值得注意的是,反应体系在水解 48 h 后,当进一步延长酶解时间时还原糖含量增加趋缓。这种现象与 Eriksson 等^[8]研究 Tween-20 对云杉酶水解的影响时观察到的现象相吻合。这是由于随着反应时间的延长,底物浓度相应降低,并且酶解产物葡萄糖的积累对纤维素酶产生反馈抑制作用,使得还原糖含量随后变化不大。

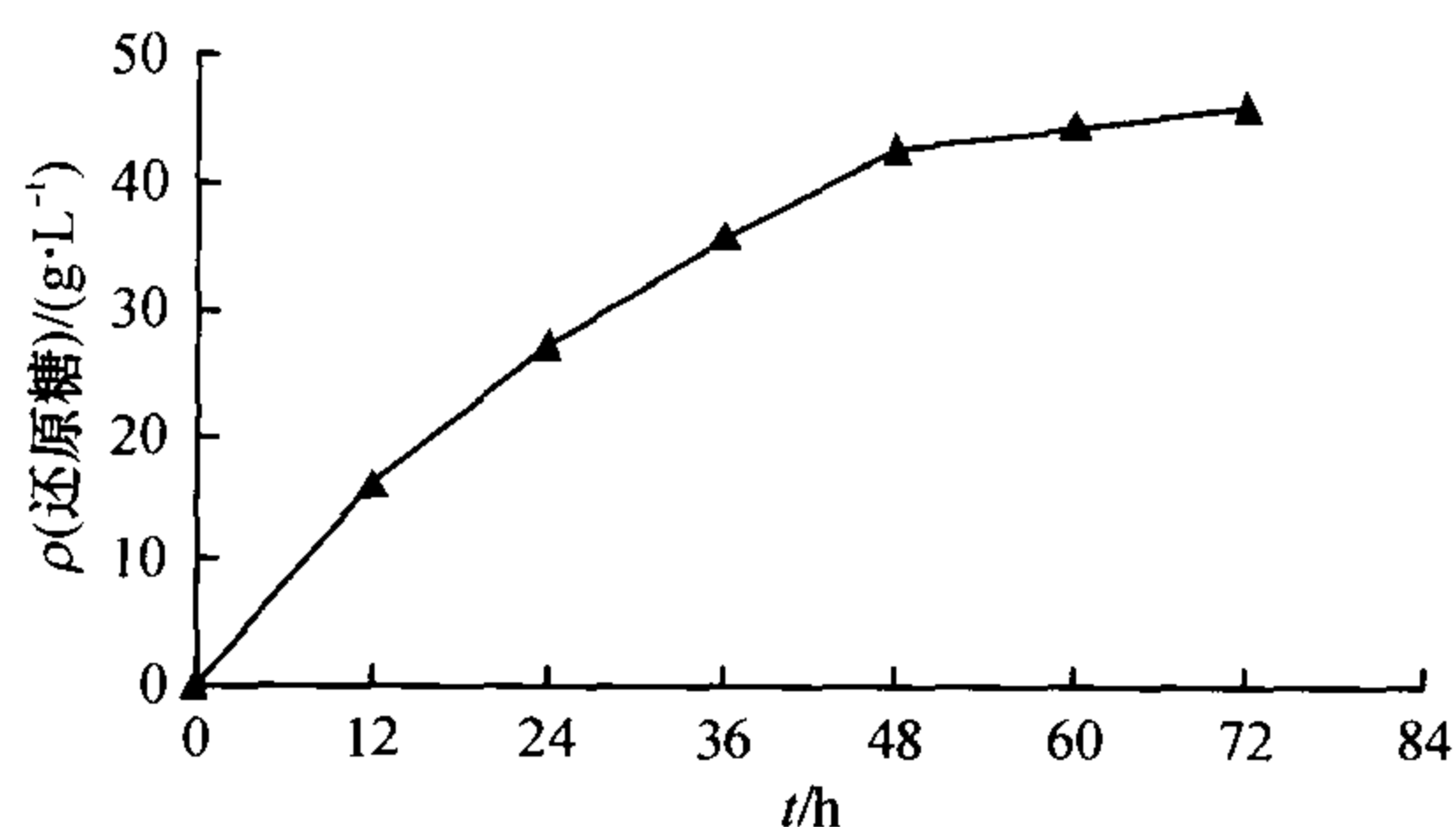


图1 经乙醇预处理后的麦草在最佳工艺条件下酶水解反应历程

Fig. 1 Time course for hydrolysis of the ethanol cooked wheat straw under optimal condition

3 结论

本文研究了非离子型表面活性剂 Tween-20 促进麦草酶水解的效果,考察了反应温度、底物浓度、Tween-20 用量、纤维素酶用量对还原糖浓度和得率的影响,并对酶水解工艺进行优化.在优化条件下,即反应温度 50 ℃,底物浓度 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,Tween-20 用量 $0.03 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,纤维素酶用量 $15 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$,还原糖质量浓度和得率分别达到 $46.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 41.5%,还原糖浓度和得率均较未添加表面活性剂的酶水解过程有明显提高^[17-19],但距离工业化生产还有一定差距,还需要做进一步的试验研究.

参考文献:

- [1] 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(12):355-359.
- [2] ZHU Sheng-dong, WU Yuan-xin, YU Zi-niu, et al. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(4): 869-873.
- [3] CHEN Hong-zhang, LIU Li-ying. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(3): 666-676.
- [4] TAE H K, TAYLOR F, KEVIN B H. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(4): 5694-5702.
- [5] KABEL M A, BOS G, ZEEVALKING J, et al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(10): 2034-2042.
- [6] MOSIER N, CHARLES W, BRUCE D, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(5): 673-686.
- [7] JOHAN B, RAGNA P, FOLKE T. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(6): 754-762.
- [8] ERIKSSON T, BÖRJESSON J, TJERNELD F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 353-364.
- [9] SUN Ye, CHENG Jian-yi. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review [J]. Bioresource Technology, 2002, 83(3): 21-31.
- [10] KARR W E, HOLTZAPPLE M T. The multiple benefits of adding non-ionic surfactant during the enzymatic hydrolysis of corn stover [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(6): 419-427.
- [11] KRISTENSEN J B, BORJESSON J, BRUUN M H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(4): 888-895.
- [12] American Society for Testing and Materials. ASTM. E 1721-95 Standard test method for determination of acid insoluble residues [S]. Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing and Materials, 1995.
- [13] American Society for Testing and Materials. ASTM. E 1821-96 Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by Gas Chromatography [S]. Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing and Materials, 1996.
- [14] American Society for Testing and Materials. ASTM. D 1106-84 Standard test method for acid-insoluble lignin in wood [S]. Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing and Materials, 1984.
- [15] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [16] ZHU Sheng-dong, WU Yuan-xin, YU Zi-niu, et al. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 3082-3086.
- [17] 姚日生,邓胜松,齐本坤,等. Tween80 对稻草水解及同步糖化与发酵产乳酸的影响 [J]. 精细化工, 2008, 25(2): 155-158.
- [18] BORJESSON J, PETERSON R, TJERNELD F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 754-762.
- [19] 罗鹏,刘忠,王高升. 酸催化的蒸汽爆破预处理强度对麦草酶水解影响的研究 [J]. 林产化学与工业, 2006, 26(4): 105-109.
- [20] 吕学斌,张毅民,杨静,等. 玉米秸秆酶水解条件的优化研究 [J]. 化学工程, 2008, 36(2): 59-62.
- [21] 朱圣东,吴元欣,喻子牛,等. 微波预处理稻草糖化工艺研究 [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(1): 112-114.

【责任编辑 李晓卉】