

研究开发

半纤维素酶添加对碱处理甘蔗渣结构及酶解的影响

高月淑¹, 许敬亮², 袁振宏², 张宁¹, 蒋剑春¹¹中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042;²中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 半纤维素作为木质纤维素的重要组成部分之一, 通过氢键与纤维素的微纤丝结合, 严重阻碍了纤维素表面与纤维素酶的接触, 降低了酶解的效率。该试验以碱处理甘蔗渣作为底物, 通过添加不同量的半纤维素酶去除不同比例的半纤维素。通过成分分析、X射线衍射(XRD)和扫描电镜(SEM)等手段分析添加半纤维素酶前后残渣的结构和酶解特性变化, 发现随着半纤维素酶添加量的增大, 残渣中木质素所占的比例逐渐增大, 结晶指数逐渐增大, 电镜表面沟壑逐渐加深, 纤维束之间结构变得疏松。以半纤维素酶处理过的甘蔗渣作为底物, 按照 5FPU/g 底物加入纤维素酶水解 72h, 与不添加半纤维素酶对照组相比, 添加 1600U/g 半纤维素酶处理的试验组木聚糖的转化率提高了 74.24%, 葡聚糖转化率提高了 35.30%。通过半纤维素酶添加可以有效促进纤维素酶解过程的进行, 节约反应时间提高酶解转化率。

关键词: 生物质; 半纤维素酶; 酶解

中图分类号: Q 556

文献标志码: A

文章编号: 1000-6613 (2016) s1-0270-06

DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2016.s1.044

Effects of the adding of hemicellulase on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis

GAO Yueshu¹, XU Jingliang², YUAN Zhenhong², ZHANG Ning¹, JIANG Jianchun¹¹Jiangsu Province Key Laboratory of Biomass Energy and Materials, Institute of Chemical Industry of Forest Products, Chinese Academy of Forest, Nanjing 210042, Jiangsu, China; ²Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: Hemicellulose, as one of the main compositions of lignocellulosic materials, leads to a complex structure characteristic, the presence of which hinders the access of enzyme to cellulose thus reduces efficiency of the hydrolysis. Different percentages of hemicellulose were removed from alkali-pretreated SCB since different concentrations of hemicellulase were added. Based on the results of composition analysis, SEM analysis, XRD analysis, as well as the enzymatic digestibility, it could be found that with the concentrations of hemicellulase added increasing, the content of lignin and crystalline index were larger and surface gap gradually deepened. Before the cellulase loading of 5FPU/g substrate added, extra 1600U/g hemicellulase were used to treat the alkali-pretreated SCB which showed that the xylan and glucose conversion rate increasing 74.24% and 35.30%, respectively. It demonstrated that the removal of hemicellulose could effectively promote the enzymatic hydrolysis process, save the reaction time and increase the enzymatic conversion rate.

Key words: biomass; hemicellulase; enzymatic hydrolysis

收稿日期: 2015-12-18; 修改稿日期: 2016-04-08。

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2014BAD02B02)、广州市科技攻关项目(2013J4300026)及中国科学院可再生能源重点实验室开放基金项目(y507k71001)。

第一作者: 高月淑(1986—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事生物质化学品研究工作。联系人: 蒋剑春, 博士生导师, 主要从事林产化学工业加工和生物质能源开发技术研究。E-mail: bio-energy@163.com。

木质纤维原料在生物炼制成清洁燃料或化学品的过程中，由于原料中纤维素、半纤维素和木质素致密复杂的结构，纤维素很难被酶水解成可发酵性糖。为了提高酶解速率和葡萄糖得率，必须对原料进行预处理，其主要目的是破坏木质纤维素结构、脱去木质素或半纤维素，同时增大酶与底物的接触面积^[1]。近年来，关于木质纤维素原料预处理工艺方法对纤维素结构及酶解的影响已有大量报道，如稀酸法^[2]、氨法^[3]和高温液态水法^[4]等，其中两种方式耦合的预处理方法也有一些报道，如 H₂O₂ 耦合生物预处理法^[5]及碱耦合高温液态水法^[6]等，以研究同时脱除木质素和半纤维素对纤维素酶解的促进作用。但这些方法主要集中在条件较为剧烈的化学预处理上，在脱除半纤维素的同时往往会对残留木质素产生一定的结构影响。

为了研究半纤维素脱除对酶解效果的影响，本文采用添加半纤维素酶的方式，作用条件温和，目标专一性强。以碱处理后的甘蔗渣作为原料，通过添加不同剂量的实验室自选半纤维素酶处理一定时间，改变残渣中半纤维素的脱除率，检测处理前后残渣的化学组成、表面形态和结晶指数的变化，最后着眼于其对纤维素酶解效果的影响，考察半纤维素的脱除对碱处理甘蔗渣结构特性和纤维素酶解效果的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种：黑曲霉 *Aspergillus niger* SM24/a，由中国科学院广州能源研究所生化转化实验室自行筛选。最高半纤维素酶活力可以达到 9100U/g 干曲。

甘蔗渣：由广西凭祥市丰浩酒精有限公司提供，洗剂晒干后粉碎至 40~60 目，105℃ 条件下烘 4h 以上至恒重，置于干燥器中备用。

纤维素酶 Cellic CTec2，由诺维信 (Novozymes A/S, Denmark) 生物工程有限公司提供，根据国际应用与纯粹化学联合会规定测得其滤纸酶活力为 310 FPU/mL。木聚糖 (X4252, Xylan from beechwood ≥ 90%)，购自 sigma 公司，其他试剂为分析纯。

1.2 实验培养基

种子培养基：5g/L 木聚糖，Mandel's 营养液，pH 为 5.6。

固态发酵培养基：玉米芯与麸皮质量比为

1:5，共计 3.6g。固体基质与营养液质量比为 1:3.5，营养液的 pH 为 5.0。

Mandel's 营养液：0.3g/L 尿素，1.4g/L (NH₄)₂SO₄，2.0g/L KH₂PO₄，0.3g/L CaCl₂，0.3g/L MgSO₄，0.25g/L 酵母膏，0.75g/L 蛋白胨。

所有培养基 115℃ 下灭菌 30min。

1.3 试 验 方 法

1.3.1 木聚糖酶的获取

在 150mL 的三角瓶中置入玉米芯麸皮共 3.6g，营养液 12.6mL，取 30℃ 摇瓶培养 72h 的种子培养液 1.0mL，接种到三角瓶中，于 30℃ 恒温箱中固体发酵培养 96h，加入 0.2mol/L pH 为 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液浸提 1h。用纱布先将大颗粒出去，再将滤液于 4℃，12000r/min 冷冻离心 10 分钟，取上清液经过 0.45μm 滤膜过滤即为粗酶液，置于 4℃ 冰箱中保藏备用。

1.3.2 木聚糖酶活测定

参照文献 [7] 在 15mL 刻度试管中加入 0.5mL 0.2mol/L pH 为 5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液，1mL 浓度为 1% 的木聚糖底物，于 50℃ 水浴中平衡 3min，然后加入适当稀释的酶液保温反应 30min，加 2mL DNS 试剂和 0.5mL 酶液，沸水浴中煮沸 5min，自来水迅速冷却后定容至 15mL，550nm 下测吸光度值，并将在 1min 内产生 1μmol/L 还原糖所需酶量定义为一个酶活力单位。

1.3.3 碱法预处理

具体操作如文献 [8] 所示，称取甘蔗渣原料 1.5kg，在固液比 1:6 的条件下与 1.8% (w/v) 的 NaOH 溶液混合，置于蒸煮锅 (TD1-15，购自咸阳通达有限公司) 中并密封，110℃ 条件下旋转蒸煮 1h。反应结束后，固体经过滤洗涤至 pH 中性，于 60℃ 烘干至恒重 (完全无水) 保存，用作进一步酶解的底物。

1.3.4 半纤维素酶解

取 2.5g 碱处理后的甘蔗渣，置于 150mL 的容量瓶中，按照 0、100U/g 底物、200U/g 底物、400U/g 底物、800U/g 底物、1600U/g 底物再加入相应体积的 0.2mol/L pH 为 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液至反应体系的溶液体积为 50mL。在 150r/min、50℃ 条件下半纤维素酶解处理 72h，取酶解 72h 后的残渣，反复离心洗涤以去掉残渣中的糖，50℃ 烘至恒重，用于后面的分析实验。

1.3.5 纤维素酶解

将经过 1.3.4 节中半纤维素酶处理的甘蔗渣醪

液,按照 5FPU/g 底物添加纤维素酶,在 150r/min、50℃ 条件下酶解 72h,每隔 24h 取样,12000r/min 离心 5min,取上清液进行糖的测定。

1.4 检测方法

1.4.1 成分分析

成分分析根据美国可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)标准分析方法进行测定^[9]。原料用 72% 硫酸,30℃ 下水解 1 h,再经 4% 硫酸,121℃ 高压水解 1 h,水解液中单糖用 HPLC 测定其浓度,再反推计算原料中的多糖含量。

1.4.2 XRD 衍射分析

采用 X 射线衍射仪 X' Pert Pro MPD (PW3040/60, Philips, Holand) 测试五种样品的结晶指数变化。测试的 2θ 范围为 10°~50°,在步长 0.017、电压 40kV 和电流 40mA 条件下,使用 Cu/K 放射线进行测试。结晶指数 (CrI, %) 按照式 (1) 进行计算。

$$CrI = \frac{I_{crystalline(002)} - I_{amorphous}}{I_{crystalline(002)}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, $I_{crystalline(002)}$ 为 002 衍射面的结晶强度 ($2\theta=22^\circ$); $I_{amorphous}$ 为非结晶区的衍射强度 ($2\theta=18.4^\circ$)。

1.4.3 SEM 分析

物料表面结构变化利用场发射扫描电镜 (S4800, Hitachi) 观察。首先将原料及 4 种预处理后的残渣烘干至恒重,取适量残渣放于载物台上并做好标记,在真空条件下先经过喷金处理,然后置于电镜观察室内,在 2.0kV 加速电压条件观察不同物料的表面形态并拍照,数字图像分辨率 1280×960,保留时间为 160s。

1.4.4 糖类测定

葡萄糖、木糖和纤维二糖的测定采用高效液相

色谱 (Waters 2698) 示差折光检测器进行检测。色谱柱型号为 Shodex sugar SH1011,流动相为 5mmol/L H₂SO₄,流速为 0.5mL/min,色谱柱及检测器的温度均为 50℃,示差折光检测器型号为 Waters 2410。

酶解转化率即葡聚糖和木聚糖转化率指底物经过酶水解后得到的葡萄糖和木糖对底物中的葡聚糖和木聚糖的百分比,计算公式分别如式 (2) 和式 (3)。

$$\text{葡聚糖转化率} = \frac{\text{葡萄糖生成量}(\text{g}) \times 0.9}{\text{底物总量}(\text{g}) \times \text{葡聚糖含量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{木聚糖转化率} = \frac{\text{木糖生成量}(\text{g}) \times 0.88}{\text{底物总量}(\text{g}) \times \text{木聚糖含量}} \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与讨论

2.1 半纤维素酶不同添加量对甘蔗渣组分的影响

以碱处理后的甘蔗渣作为底物,按照半纤维素酶用量的不同添加相应体积的粗酶液,处理 72h 后残渣成分分析结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出,碱处理甘蔗渣葡聚糖含量为 54.77%,木聚糖含量为 28.9%,木质素含量为 12.13%。随着加入的半纤维素酶量的增加,剩余固体的质量在逐渐减少,这是因为随着半纤维素酶添加量的增大,酶解掉的木聚糖成分越来越多;同时由于粗酶液中部分纤维素酶的干扰,酶解掉的葡聚糖成分越来越多,使得最后所得残渣中所含的葡聚糖和木聚糖含量都在降低,并与加酶量呈负相关,木质素所占的百分含量明显增高,并与加酶量呈正相关。当加入的半纤维素酶的量达到 1600U/g 时,残渣中葡聚糖的剩余率只有 28.73%,木聚糖剩余 18.35%,木质素含量达到 27.33%。

表 1 不同浓度半纤维素酶处理后的甘蔗渣组分分析

样品	固体量/%	葡聚糖		木聚糖		木质素质量分数/%
		质量分数/%	残余率/%	质量分数/%	残余率/%	
对照	100	54.77	—	28.90	—	12.13
100U/g	75.59	57.10	78.81	22.16	57.96	14.47
200U/g	68.51	57.12	71.45	21.12	50.07	15.93
400U/g	58.55	55.52	59.35	20.04	40.60	19.50
800U/g	46.74	52.09	44.45	19.18	31.02	22.00
1600U/g	33.14	47.48	28.73	18.35	21.04	27.33

2.2 半纤维素酶添加前后残渣的 XRD 分析

半纤维素酶添加前后残渣的结晶指数结果如表 2 所示，随着半纤维素酶量的增加，物料的结晶指数呈逐渐升高的趋势，但是变化幅度不大，这可能与粗酶液存在部分纤维素酶，在降解半纤维素这种非结晶态组分的同时，也降解掉了一部分纤维素，造成结晶指数的变化不明显。有研究证明，物料结晶指数的高低与物料结构破坏程度存在一定关系^[10]，这与本试验结果一致，随着物料结构破坏程度的增加，结晶指数也在呈增加的趋势。

表 2 半纤维素酶添加前后碱处理甘蔗渣的结晶指数

酶浓度 /U·g ⁻¹	结晶强度		结晶指数 /%
	2θ=18.4°	2θ=22.5°	
对照	4052.00	1842.93	54.52
100	2672.13	1196.55	55.22
200	3973.08	1697.00	57.29
400	3842.42	1519.22	60.46
800	4029.86	1565.29	61.16
1600	4031.39	1518.75	62.33

2.3 半纤维素酶添加前后残渣的 SEM 分析

经过不同浓度半纤维素酶处理后的残渣，除了在组分上发生明显变化外，物料的表面形态也有出现一定差异。图 1 给出了透射电镜扫描半纤维素酶酶解前后甘蔗渣的表面形态图。

从图 1 可以明显看出，未加入半纤维素酶之

前，碱处理后的甘蔗渣表面存在一些小沟，纤维束之间已经有了一些缝隙，表面结构也得到一定程度的破坏。随着加入半纤维素酶量的增加，物料表面结构越来越疏松，纤维束之间的沟壑明显变大，甚至出现了一些断层，这样一来使纤维素酶更易与纤维素接触而促进水解过程顺利进行。

2.4 半纤维素酶添加对酶解效果的影响

半纤维素酶主要作用于甘蔗渣底物中的木聚糖组分，通过几种组分的协同作用，将半纤维之间复杂的化学键打开并进一步分解产生木糖、阿拉伯糖等五碳糖。图 2 显示经过不同量的半纤维素酶作用后的碱处理残渣，加入 5FPU/g 底物的纤维素酶酶解 72h 产生的葡萄糖量、木糖量、葡聚糖转化率和木聚糖转化率。从图 2 中可以看出随半纤维素酶添加量的增大，酶解产生的葡萄糖和木糖的质量浓度逐渐增加，葡聚糖和木聚糖的转化率也相应提高。对照组（即不添加半纤维素酶实验组）酶解产生的葡萄糖和木糖浓度最低，仅有 17.27g/L 和 7.53g/L，葡聚糖转化率为 61.44%，木聚糖转化率为 57.18%；半纤维素酶添加量从 100U/g 到 400U/g 底物时，葡萄糖和木糖浓度大幅度提高至 20.66g/L 和 12.04g/L，同时葡聚糖和木聚糖转化率也相应提高至 72.8% 和 88.98%；尽管当半纤维素酶量继续增加至 1600U/g 底物时，葡萄糖和木糖浓度最高，分别可以达到 23.88g/L 和 13.55g/L，相应的葡聚糖和木聚糖转化率为 83.13% 和 99.63%，但增加的幅度不大。从经济性角度出发，木聚糖酶添加量应该控制在 400U/g 底物。

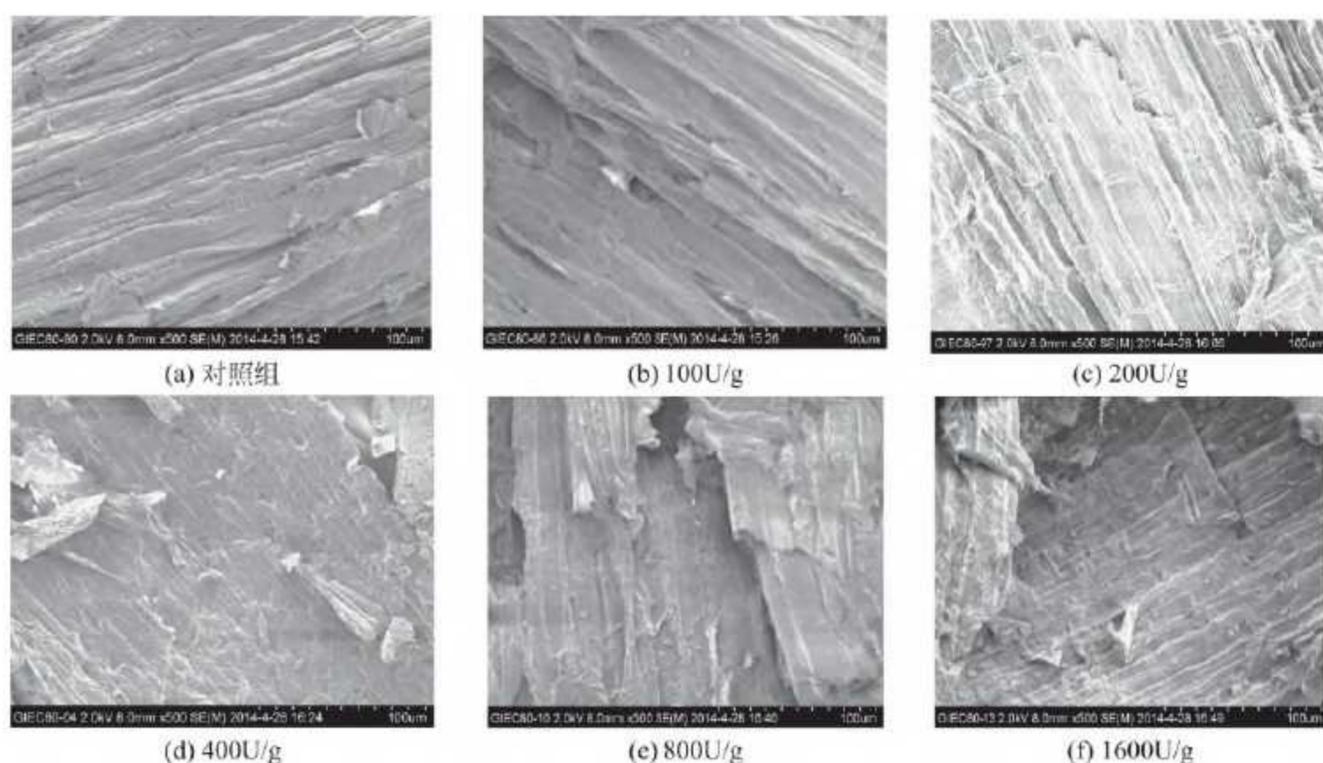


图 1 添加不同浓度半纤维素酶后碱处理甘蔗渣的扫描电镜图 (500×)

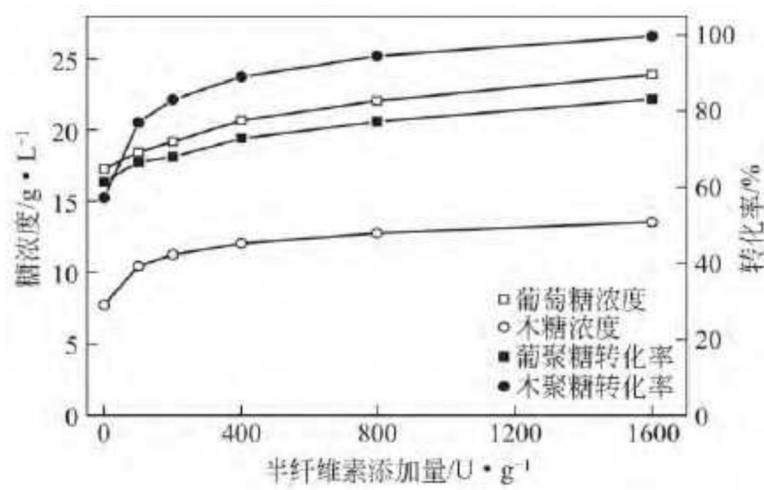


图 2 添加不同浓度半纤维素酶对酶解结果的影响 (酶解时间为 72h)

为了进一步考察半纤维素酶添加对整个酶解过程的促进作用, 额外添加了一组不经半纤维素酶处理, 而纤维素酶添加量为 $10FPU/g$ 底物的实验组。图 3 显示半纤维素酶添加量为 0、纤维素酶添加量为 $10FPU/g$ 底物酶解 72h 所得葡萄糖浓度、木糖浓度、葡聚糖转化率和木聚糖转化率。从图中可以看出葡萄糖和木糖浓度分别为 $20.81g/L$ 和 $10.14g/L$, 对应葡聚糖和木聚糖转化率为 73.33% 和 74.92% , 这与添加半纤维素酶 $400U/g$ 底物、纤维素酶 $5FPU/g$ 底物所产的葡萄糖浓度和转化率接近, 但后者木聚糖浓度和转化率更高, 这与 PENGILLY 等^[11] 研究结果相似。由于半纤维酶的加入可以除去大部分的木聚糖, 同时降低了纤维素酶和木质素之间的无效吸附, 在同等糖产量下可以减少纤维素酶的使用量并缩短反应时间。另外, 据 SADDLER 等^[12] 研究报道, 半纤维素酶与纤维素酶之间存在着相互协同作用, 同时添加两种酶可以提高纤维丝的润胀作用并增加底物对酶的可及性, 从而有效促进木聚糖和葡聚糖组分的共水解, 所以两种酶之间的比例关系可在总加酶量不变的前提下, 根据底物特性的差异寻找合适的组合关系。

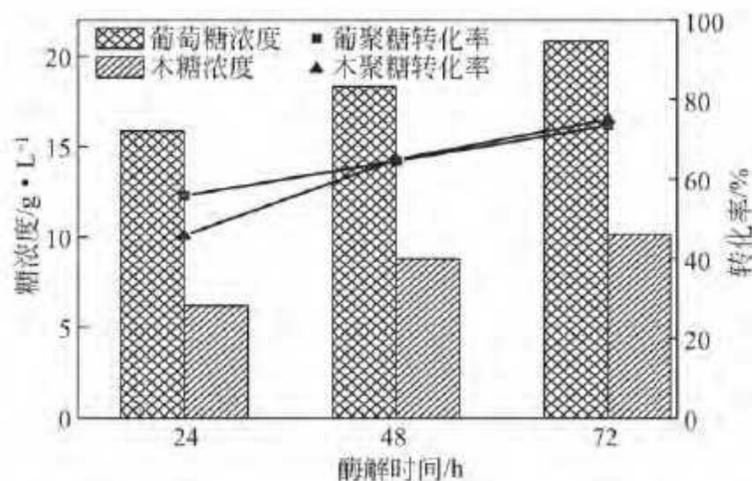


图 3 半纤维素酶添加量为 0、纤维素酶添加量为 $10FPU/g$ 底物 72h 酶解结果

3 结 论

(1) 半纤维素酶处理后残渣成分发生明显改变, 随着添加量的增大, 回收的固体质量减少。所得残渣中所含的葡聚糖和木聚糖百分含量明显降低, 并与半纤维素酶添加量呈负相关, 木质素所占百分含量明显增高, 并与加酶量呈正相关。当加入的半纤维素酶量达到 $1600U/g$ 底物时, 残渣剩余的葡聚糖量为 28.73% , 木聚糖仅剩 18.35% 。

(2) 通过添加半纤维素酶先行酶解部分木聚糖, 可以有效促进纤维素酶解过程的进行, 极大提高酶解转化率。当碱处理残渣不经半纤维素酶处理, 在 $5FPU/g$ 底物的纤维素酶添加量下酶解 72h, 葡聚糖和木聚糖转化率分别为 61.44% 和 57.18% ; 而残渣经过 $1600U/g$ 底物的半纤维素酶处理, 葡聚糖和木聚糖转化率分别为 83.13% 和 99.63% , 但从经济性角度出发, 木聚糖酶添加量最好控制在 $400U/g$ 底物;

(3) 当碱处理残渣不经半纤维素酶处理, 在纤维素酶添加量为 $10FPU/g$ 底物酶解 72h, 葡聚糖和木聚糖转化率分别为 73.33% 和 74.92% , 这与经 $400U/g$ 底物半纤维素酶处理的甘蔗渣仅添加 $5FPU/g$ 底物纤维素酶解结果基本一致。通过半纤维素酶添加可以脱除部分半纤维素, 增加底物对纤维素酶的可及性, 在促进纤维素酶解过程的同时, 有效降低纤维素酶的用量。

参 考 文 献

- [1] JØRGENSEN H, VIBE-PEDERSEN J, LARSEN J, et al Liquefaction of lignocellulose at high solids concentrations[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96: 862-870.
- [2] SCHELL D J, FARMER J, NEWMAN M, et al Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor *Biotechnology for Fuels and Chemicals* [M]//*Biotechnology for Fuel and Chemicals* Springer, 2003: 69-85.
- [3] KIM T H, KIM J S, SUNWOO C, LEE Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 90: 39-47.
- [4] YU Q, ZHUANG X, YUAN Z, et al Step-change flow rate liquid hot water pretreatment of sweet sorghum bagasse for enhancement of total sugars recovery[J]. *Applied Energy*, 2011, 88: 2472-2479.
- [5] YU J, ZHANG J, HE J, et al Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 903-908.
- [6] GAO Y, XU J, ZHANG Y, et al Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 396-400.
- [7] BAILEY M J, BIELY P, POUTANEN K. Interlaboratory

- testing of methods for assay of xylanase activity[J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23 (3): 257-70.
- [8] HAO J T, CHEN S G, YANG S Y. SC-SSF DOA estimation with mutual coupling presence[C]//*Proceedings of the 2004 China-Japan Joint Meeting on Microwaves*, 2004: 206-209.
- [9] SLUITER A, RUIZ R, SCARLATA C, et al Determination of extractives in biomass: NREL/TP-510-42619[S]. Golden, Colorado: Laboratory Analytical Procedure (LAP) . National Renewable Energy Laboratory, 2005.
- [10] KIM T H, LEE Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (18): 2007-13.
- [11] PENGILLY C, GARCIA-APARICIO M P, DIEDERICKS D. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase[J]. *Fuel*, 2015, 154: 352-360.
- [12] HU Jinguang, ARANTES Valdeir, SADDLER Jack N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 36-48.