

Kinetics of Cellulose Hydrolysis

Yi-Hong Tian, Hong-Cheng Wu, Jin-Ting Tang, Da-Chun Gong*

Alan G. Macdiarmid Research Institute of Renewable Energy, China Three Gorges University, Yichang, Hubei, 443002, China

*Corresponding author email: dchgong_2004@163.com

Abstract: There are about 50% cellulose in the steam explosion treatment of wheat straw. The main issue is the use of liquid and *Aspergillus niger* cellulase hydrolysis of the cellulose, the effects of different substrate concentrations and different particle substrate, different concentrations of *Aspergillus niger* solution, metal ions, surfactants, and the interaction between the two processes of cellulose hydrolysis to obtain higher sugar concentration and glycation rate, to lay a good foundation for later fermentation. The results show that: When the substrate particle size 20-40 mesh, the concentration of 7.5% solution of *Aspergillus niger* β -glucosidase concentration 1.4U/mL, while adding metal ions and non-ionic surfactants, sugar concentration and saccharification rates obtained by cellulose hydrolysis are higher. The kinetics of the enzyme can be used Michaelis-Menten equation to describe in the first two hours of cellulose hydrolysis, Kinetic parameters obtained by using L-B method, with the β -glucosidase enzyme concentration increasing, K_m unchanged, V_{max} increasing, V_{max} also increasing by adding metal ions and non-ionic surface active agent.

Key words: cellulose; cellulase hydrolysis; saccharification rate; β -glucosidase; kinetic

纤维素酶解动力学研究

田毅红, 吴红成, 汤金婷, 龚大春*

三峡大学化学与生命科学院 湖北宜昌 443003

E-mail: tyh1994@163.com; *通讯作者邮箱: dchgong_2004@163.com

摘要: 本文主要是利用黑曲霉和饲用纤维素酶对纤维素进行水解, 所用原料为经汽爆处理后的麦草, 其中纤维素约占 50%。考察不同底物浓度, 颗粒大小, β -葡萄糖苷酶浓度, 金属离子, 表面活性剂及二者的共同作用对纤维素酶解过程的影响, 得到较高的糖浓度和糖化率, 为后期发酵打下良好基础。结果表明: 当底物颗粒大小为 20-40 目, 浓度为 7.5%, β -葡萄糖苷酶浓度为 1.4U/mL, 同时加入金属离子和非离子型表面活性剂时, 纤维素酶解得到的糖浓度和糖化率均较高。纤维素酶解前 0-2 小时, 可以用米氏方程描述其酶解动力学特征, 采用 L-B 法作图可求出动力学参数, 随着 β -葡萄糖苷酶浓度的增加, K_m 不变, V_{max} 增加, 加入金属离子和非离子型表面活性剂也能促进 V_{max} 的提高。

关键词: 纤维素; 酶解; 糖浓度; 糖化率; β -葡萄糖苷酶; 动力学

1 引言

纤维素酶是分解纤维素的一类复合酶, 其中 β -葡萄糖苷酶是纤维素酶中的一种非常重要的酶。在利用纤维素酶水解纤维素的过程中, 由于 β -葡萄糖苷酶的不足造成纤维二糖的积累, 而纤维二糖又会对纤维素酶的酶解形成强烈的反馈抑制。因此, 加入纤维素酶体系中 β -葡萄糖苷酶, 是提高纤维素水解得率和葡萄糖产量的关键措施之一。

目前由于市用 β -葡萄糖苷酶的价格比较昂贵, 而黑曲霉能产生高活力的 β -葡萄糖苷酶, 在酶解时加一定量的饲用纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶, 能起到较好的

酶解效果。目前国内对纤维素酶解糖化的影响因素的研究不少: 如曾晶研究表面活性剂对纤维素酶解糖化过程, 表明添加表面活性剂对纤维素酶水解过程有明显影响; 添加非离子型表面活性剂 (PEG6000、吐温 80) 可以提高纤维素的溶解性、可发酵糖的转化水平^[1]。而李德莹在考察不同金属离子对纤维素酶解糖化的过程中, 发现, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 对纤维素酶活力有激活作用^[2-3], 尤其对 β -葡萄糖苷酶活力激活作用明显。随着 Fe^{3+} 离子浓度增大, 相对酶活也越高, 最佳离子浓 1.2mg/mL; Co^{2+} 则是在低浓度时有激活作用, 高浓度时表现为抑制作用, 酶被激活, 其酶解糖

化速度就会加快。

纤维素酶对纤维素的作用是个多相催化反应,与酶的均相反应相比,反应过程要复杂许多,建立合适的反应模型,对纤维素酶解过程具有理论意义^[4]。

本文建了纤维素酶对纤维水解反应的动力学方程,考察底物浓度、底物颗粒大小,β-葡萄糖苷酶浓度,金属离子、表面活性剂用量对酶解动力学参数的影响,以便能够对纤维素酶处理纤维素的过程进行控制,为工业大规模生产提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 原料

麸皮(市购),汽爆稻草(由中粮集团提供)。

2.2 菌种

黑曲霉(*Aspergillus Niger*)由三峡大学-艾伦·麦克德尔米德再生能源研究所提供。接种至PDA斜面培养基上,在28℃培养3~5d,待孢子生成后保存于4℃冰箱中。

2.3 培养基

种子培养基:0.5g磷酸二氢钾,1g硫酸铵,0.1g硫酸镁,6g葡萄糖定容到100mL加入1g左右的麸皮(有利于孢子分散,防止黑曲霉菌丝形成球状)

固体培养基:麦草25g 麦麸6g 磷酸二氢钾0.4g 硫酸铵0.5g 硫酸镁0.4g 蒸馏水60mL

2.4 培养方法

菌种斜面→种子培养→固体浅盘培养→固体曲浸→过滤→离心→纤维素酶液→测定β-葡萄糖苷酶活取斜面菌种1~2环接入三角瓶种子培养液置于100 r/min摇床培养48 h

取种子液加入固体培养基,固液比为1:1加入,混匀30℃培养箱培养2-3 d

2.5 纤维素酶液的制备

在固体曲中加pH4.8柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,固液比为1:5得到酶液,将其用尼龙纱布过滤,3000rpm

离心15min,得上清酶液。

2.6 酶活力单位定义

β-葡萄糖苷酶活的测定^[5]

在(50±0.1)℃、pH4.8条件下,1分钟水解水杨素,产生出相当于1μmol葡萄糖的还原糖量,为1个酶活力单位,以IU/g(或IU/mL)表示

2.7 纤维素酶解糖化率的计算

糖化率 = $\frac{\text{还原糖浓度}}{\text{底物重量} \times 50\%}$ (其中汽爆麦草中纤维素的含量按50%计算)

3. 结果与讨论

3.1 底物浓度、β-葡萄糖苷酶浓度,金属离子和表面活性剂对酶解动力学参数的影响

3.1.1 底物浓度对酶解动力学参数的影响

根据四种不同底物浓度下糖浓度随时间变化的曲线,发现在前2小时内四条曲线均为直线,其斜率为其初速度,列表如下。

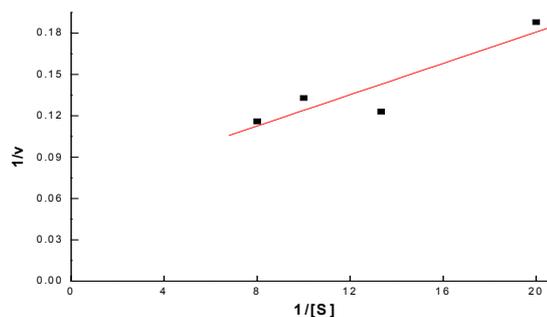


Figure 1. Kinetic parameters obtained by using L-B method

图1 L-B 法作图求动力学参数

Table 1. 1/s and 1/v of different substrate concentrations

表1 不同底物浓度的1/s和1/v

编号	底物浓度	1/s	水解还原糖-t (0.33-2h)	初速度 (g/L·h)	1/v
1	5%	20	Y=5.308x+3.211(R=0.988)	5.308	0.188
2	7.5%	13.3	Y=8.158x+5.849(R=0.994)	8.158	0.123
3	10%	10	Y=7.539x+13.576(R=0.992)	7.539	0.133
4	12.5%	8	Y=8.652x+15.397(R=0.998)	8.652	0.116

以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图, 结果如图 1, 这证明该反应速率符合米氏方程线性拟合结果: $y=0.568x+0.6712(R=0.912)$, 根据 L-B 作图法, 得出: $K_m=0.85g/L, V_{max}=1.49 g/L \cdot h$

3.1.2 不同 β -葡萄糖苷酶浓度对酶解动力学参数的影响

采用同样的处理方法, 求取动力学参数

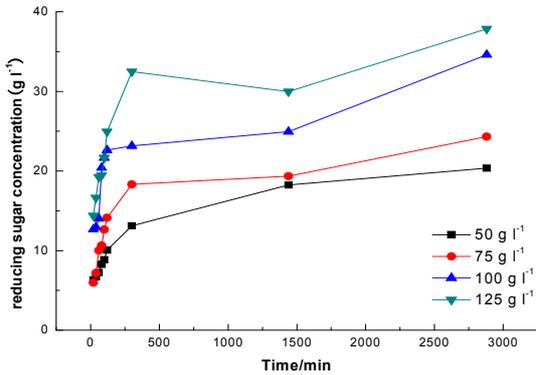


Figure 2. Glycation curve of different substrate concentrations (β -glucosidase concentration=0).

图 2 不同底物浓度 (β -葡萄糖苷酶浓度为 0) 酶解糖化曲线.

Table 2. $1/s$ and $1/v$ of different substrate concentrations
表 2 不同底物浓度的 $1/s$ 和 $1/v$ (β -葡萄糖苷酶浓度为 0)

编号	底物浓度	$1/s$	水解还原糖-t (0.33-2h)	初速度 (g/L·h)	$1/v$
1	5%	20	$Y=0.037x+5.291(R=0.985)$	0.037	27.027
2	7.5%	13.3	$Y=0.082x+4.331(R=0.991)$	0.082	12.195
3	10%	10	$Y=0.112x+7.37(R=0.984)$	0.112	8.929
4	12.5%	8	$Y=0.183x+9.1553(R=0.987)$	0.183	5.475

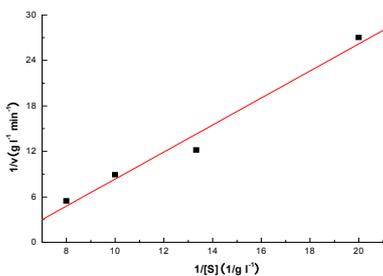


Figure 3. Kinetic parameters obtained by using L-B method.

图 3 L-B 法求取动力学参数.

线性拟合结果: $Y=0.871x+1.255(R=0.985)$, 根据 L-B

作图法得出: $K_m=1.135 g/L, V_{max}=0.79 g/L \cdot h$
为此我们可以将不同 β -葡萄糖苷酶浓度的三组 K_m, V_{max} 列表 3.

Table 3. K_m, V_{max} of different β -glucosidase concentration.
表 3 不同 β -葡萄糖苷酶浓度的 K_m, V_{max} .

编号	条件	酶浓度 (U/mL)	K_m (g/L)	V_{max} (g/L·h)
1	不加金属离子	2.8	1.27	1.31
2	加金属离子	2.8	1.31	2.10
3	加 PEG 和 Tween80	2.8	1.35	2.51
4	金属离子、PEG 和 Tween80	2.8	1.40	2.71

从表 3 可以看出, 随着 β -葡萄糖苷酶浓度的变化, K_m 在误差范围内基本上不变, 而 V_{max} 则是随着酶浓度的增大而增大. K_m 反映了酶和底物的结合强弱程度, K_m 越小, 说明酶和底物的亲和力越强, 而 V_{max} 表示当全部的酶都成为复合物状态时的反应速率^[6]. 根据公式 $V_{max}=k_{+2} \times C_{E0}$, k_{+2} 反应酶分子活力的大小, 在同一反应中 k_{+2} 不会变, 只有 C_{E0} 可变, 即初始酶浓度改变, V_{max} 改变.

3.1.3 金属离子、表面活性剂及金属离子和表面活性剂共同的酶解动力学

根据上面同样处理数据的方法, 我们对金属离子和表面活性剂对动力学参数进行了求取, 见表 4.

Table 4. K_m, V_{max} of adding metal ions and non-ionic surfactants.
表 4 金属离子和表面活性剂对 K_m, V_{max} 的影响.

编号	条件	酶浓度 (U/mL)	K_m (g/L)	V_{max} (g/L·h)
1	不加金属离子	2.8	1.27	1.31
2	加金属离子	2.8	1.31	2.10
3	加 PEG 和 Tween80	2.8	1.35	2.51
4	金属离子、PEG 和 Tween80	2.8	1.40	2.71

由表 4 可知加入金属离子和表面活性剂后, K_m 基本上没有变化, V_{max} 一直在增大, 推测其原因: 金属离子和非离子型表面活性剂都对酶有激活作用, 在刚开始的两小时内, C_{E0} 基本上不变, 根据公式 $V_{max}=k_{+2} \times C_{E0}$ 即金属离子和非离子型表面活性剂都加大了酶催化反应的能力.

4 结论

本文主要是利用黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶和饲用纤维素酶对汽爆纤维素进行水解,考察不同底物浓度,底物颗粒大小, β -葡萄糖苷酶浓度,金属离子,表面活性剂及二者的共同作用对纤维素酶解过程的影响,力求得到较高的糖浓度和糖化率,为后期发酵打下良好基础。通过单因素实验,得出以下优化条件:

1) 当底物浓度为 7.5%、即固体底物与液体酶比例为 1: 13.3,饲用纤维素酶的加量为 0.1g/g 底物,黑曲霉浓度为 1.4U/mL, pH 值为 4.8,温度为 50℃,加入表面活性剂吐温 80 和 PEG2000,金属离子为 0.1 μ mol/L 镁离子、铁离子和钴离子,纤维素酶解速度和糖化率可达到最大。

2) 纤维素酶解前 0-2 小时,可以用米氏方程描述其酶解动力学特征,采用 L-B 法作图可求出动力学参数,随着 β -葡萄糖苷酶浓度的增加, K_m 不变, V_{max} 增加,加入金属离子和非离子型表面活性剂也能促进 V_{max} 的提高。

References (参考文献)

[1] ZENG Jing, YE Yuan, GONG Dachun, TIAN Yihong, LI Deying

- and WANG Dong. Effects of the use of surface active agent. on the hydrolysis of cellulase[J]. LIQUOR MAKING SCIENCE TECHNOLOGY 2008, (12): p38-40(Ch).
- 曾晶, 叶媛, 龚大春, 等. 表面活性剂对纤维素酶水解过程的影响[J]. 酿酒科技, 2008, (12): 38-40.
- [2] LI Deying, GONG Dachun, TIAN Yihong, Yu Yan. Study on the Effects of metal ions on cellulase activity [J] Liquor Making Science Technology. 2009, (3): p125-128(Ch)
- 李德莹, 龚大春, 田毅红, 余燕. 金属离子对纤维素酶活力影响的研究.[J]酿酒科技, 2009, (6): 40-43.
- [3] TANG Jinting, DONG Lingling, LI Zhijun, Zeng Jing, Gong Da-chun. Study on the Saccharification and Fermentation of Lignocellulose. Liquor Making Science Technology 2009, (3): p125-128(Ch).
- 汤金婷, 董玲玲, 李志军, 曾晶, 龚大春. 木质纤维素酶解糖化发酵研究[J]. 酿酒科技, 2009, (3): 125-128.
- [4] Shen yong, Wang liming, Sun Kai. Research on the cellulose hydrolysis of cellulose to cellulose Fibers in Biofinishing[J]. Journal of Donghua University. 2001 (27): p14-17 (Ch)
- 沈勇, 王黎明, 孙铠. 纤维素酶对纤维素纤维酶解动力学研究[J]. 东华大学学报 (自然科学版), 2001 (27): 14-17
- [5] CHEN Hong zhang, Li Zuo hu. Factors of Enzymatic hydrolysis for cellulose and Absorption on of cellulose[J]. Chemical Reaction Engineering and Technology, 2000, 16(1), p30-34(Ch).
- 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), 30-34.
- [6] Qi Yizheng, Xia Jie. Bioreaction Engineering[M] Beijing: Chemical Industry Press, 1999; 2004: 9-10
- 戚以政, 夏杰. 生物反应工程[M]. 化学工业出版社, 2004: 9-10.