

影响纤维素酶水解木屑的若干因子的研究

李传友 谢玉梅

(中国科学院微生物研究所, 北京)

木霉 201、79、SA₃和1096产生的纤维素酶对天然木屑的水解能力都极其低微,但当木屑经过适当的预处理以后,酶的水解能力明显地提高。X₂-85菌纤维素酶在45℃保温24h,酶活损失15%左右。用三种底物考察酶用量与酶解率之间的关系:酶浓度增加100%,木纸浆的酶解增长率为120%,脱脂棉的酶解增长率为31%,酸处理木粉的酶解增长率为2%。差别很悬殊,说明提高酶解率的主要途径,是把对酶亲和力小的木屑转变为对酶亲和力大的底物。

关键词 纤维素酶, 木屑

近十几年来,对纤维素酶系组成及其本身的性质方面已有不少报道^[1,2],在应用研究中诸因素相互关系的实质方面的报道也很多。本文从实际应用的角度出发,对木霉纤维素酶水解木屑系统中诸因素的相互关系进行了考察。

材料与 方法

(一) 材料

1. 木霉菌种: X₂-85、201、79、SA₃和1096。
2. 木屑: (A) 阔叶树混合木屑(文中未注明树种名称的实验均用此种木屑)。(B) 单一树种木屑: 楸木、水曲柳、红松、白松、椴木。
3. 木纸浆: 北京造纸实验厂清水回收塔沉积纸浆。
4. 脱脂棉: 一般医用脱脂棉,剪成1mm左右使用。
5. Cellulose-powder-123; E. Merck 产品。
6. 3,5-二硝基水杨酸: 北京化工厂

产品; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

(二) 方法

1. 碱处理木屑方法: 用木屑重量5%的NaOH溶于一定量水中,按固液比为1:2拌浸木屑,直接晒干或经15磅30min蒸煮后晒干,在滚动球磨机上粉碎(具体条件另行注释)3.5h。
2. H₂SO₄处理木屑方法: 用木屑重量4%的H₂SO₄稀释成一定体积,按固液比为1:2拌浸木屑,85℃烘干后振动球磨粉碎30min。(条件有变另行注释)。
3. 培养方法: 麸皮: 麦芽根: 小米壳: 水 = 4:4:2:15, 拌匀, 250ml三角瓶装料5g, 15磅蒸汽灭菌30min, 冷却, 孢子接种, 在30—31℃培养72h即为成曲。
4. 粗酶提取: 水与曲之比为5:1, 37℃浸提1h, 用30%(NH₄)₂SO₄或1—2%CaCl₂沉淀除去孢子, 然后加饱和度达80%的(NH₄)₂SO₄沉淀, 离心取沉淀, 风干即为粗酶。

本文于1986年10月15日收到。

肖永澜、范桂芳二同志参加部份实验工作, 并对本文提出宝贵意见, 特此致谢。

5. 酶解条件: 鲜曲 1g(或酶液2ml) 加0.2M pH4.5醋酸缓冲液10ml(或8ml) (含0.2%苯甲酸钠), 底物 1g, 45°C 酶解72h, 定容到500ml过滤, 取滤液1ml, 用DNS法测定还原糖^[3]。以葡萄糖作标准曲线计算酶解率。

6. 葡萄糖测定: 参看Diapa等人的方法^[4]。

7. 纤维素测定: 参看(日)农艺化学实验书第3卷^[5]。

8. 木质素及多缩戊糖测定方法: 参

考文献[6]。

结 果

(一) 不同菌株的纤维素酶水解不同粉碎时间的木粉的效果

不管是野生菌株还是人工变异株所产生的纤维素酶, 尽管它们水解滤纸的能力相差很大, 但对天然木屑的水解活性均很低。可是, 当木屑经过粉碎以后, 酶解效果就显出明显的差别。(表1)

表1 不同菌株的纤维素酶水解木屑的效果比较
Table 1 Comparison of hydrolytic rate of wood powder by cellulases obtained from different strains

菌株*	水解滤纸活性 ^[7] Filter paper activity (Reducing suger $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$) ^[7]	不同粉碎时间的木屑酶 Hydrolysis of wood powder grinding for different times(%)				
		0	1h	2.5h	3.5h	5h
201	37.0	1.85	22.6	34.3	41.2	47.3
79	28.0	0	19.1	30.7	35.3	41.8
SA3	24.3	1.12	19.3	30.0	33.5	38.2
1096	7.8	1.93	16.1	23.7	30.1	35.4

*201, 79, SA3 为不同来源的木霉变异株, 1096为野生菌株

201, 79, SA3 are variants from different source, 1096 is the wild strain

滤纸酶活按M. Mandels^[7]方法, 这里酶活单位用 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$ 表示

filter paper activity assay was according to the method of M. Mandels^[7], but the unite of activity here expressed in $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$

(二) 酶的稳定性与实用前景的关系

由于受木质化底物的限制, 酶解速度缓慢, 因而往往酶解时间很长。因此, 除了了解酶的最适作用条件之外, 需要着重了解酶在最适作用条件下的稳定性、某些化学试剂对酶活性的影响以及由于水解程度的差异引起产物构成上变化对酶解工艺可行性的影响, 借以判断此酶的应用前景。

1. 纤维素酶系在45°C下的稳定性: 与AS3.4001液体曲霉相似^[8], X₂-85 固体曲霉的最适作用温度为40—50°C, 最适pH4—5。45°C及pH4.5 选定为常规的实验条件。因此考察了酶在此条件下的稳定

性。

(1) 鲜曲预热不同时间对酶活的影响: 鲜曲1g 加 pH4.5 0.2M 醋酸缓冲液 10ml(含0.2%苯甲酸钠防腐, 以下同), 45°C 预热1、24、48及72h, 然后分别加入底物木纸浆、碱处理木粉、酸处理木粉及脱脂棉各1g, 45°C 酶解72h, 用DNS法测定还原糖。

(2) 鲜曲在45°C浸提不同时间后滤取酶液的活性: 鲜曲以固液比为1:10 (0.02M pH4.5醋酸缓冲液) 在45°C浸提 1、24、48及72h, 然后滤取酶液, 取相当于1g鲜曲的酶量10ml, 加入底物木纸

浆、碱处理木粉、酸处理木粉及脱脂棉各1g, 45℃酶解72h, 用DNS法测定还原糖。结果见表2。

从表2看出, 浸提的酶液的酶解率均不如直接用鲜曲酶解底物的酶解率高; 二者的酶解率都随预热时间的延长而下降, 其中以脱脂棉的酶解率下降的幅度最大。C₁酶作用于不溶性的结晶纤维素, 而脱脂棉正是一种高度结晶的纤维素, 因此, 水解率的大步下降可能与C₁的失活有

关。木纸浆与碱木粉都是经过碱预处理的底物, 木质素得到不同程度的去除和膨胀, 结晶性也都有所下降, 所以酶解率都较高。且随保温时间的延长酶解率下降的速度不如脱脂棉大。唯独酸处理木粉不仅酶解率低, 而且几乎不受酶活下降的影响。从结果可知, 尽管此酶系在45℃具有较强的耐受性, 但按酶解率下降值估算, 保温24h失活率已达15%左右(木纸浆), 从酶解工艺考虑, 缩短保温时间是

表2 X₂-85 纤维素酶的热稳定性
Table 2 Thermostability of X₂-85 cellulase

酶解率 Hydrolysis (%) 底物 Substrates	预保温时间 Pre-incubation time(h)	实验 Experiment (1)				实验 Experiment (2)			
		0	24	48	72	0	24	48	72
木纸浆 Wood pulps		85.75	73.2	63.3	56.7	52.5	38.7	40.1	36.2
碱木粉* Wood powder treated with NaOH*		45.2	44.4	40.7	43.0	37.1	33.3	33.8	33.8
酸木粉** Wood powder treated with H ₂ SO ₄ **		27.0	27.5	25.3	25.1	26.8	24.4	24.3	25.1
脱脂棉 Absorbent cotton		29.6	24.2	17.9	14.5	23.0	3.7	4.2	3.6

表中(1), (2)项见正文说明。

(1) and (2) as described in text

*用5% NaOH处理木屑, 球磨粉碎3.5h, 钢球比例用第2组^[8]

The sawdust treated with 5% NaOH and grinding for 3.5h in ball grinder, the proportion of steel ball size was according to the group 2^[8]

**4% H₂SO₄处理木屑

The sawdust treated with 4% H₂SO₄

个尚待解决的问题, 这自然与底物预处理密切相关。

2. 孢子凝集剂对酶活的影响: 为了适应各种应用目的的需要, 生产者可以根据自己的条件选择适宜的生产方式。因此, 在研究液体曲纤维素酶的同时^[8], 也研究了固体曲酶的一些共同性的问题。用固体曲生产酶制剂, 浸出液中的孢子及其

它悬浮物影响酶的质量, 需要预先除去。我们筛选了几种凝集剂并考察了它们对酶活的影响(表3)。

3. 酶解液中葡萄糖的百分含量: 酶解液中, 葡萄糖的含量随酶解率的变化而变化(表4)。

从表4看出, 三种不同底物酶解液的葡萄糖含量占总还原糖的34.9—74.3%之

表 3 不同化合物对孢子悬浮物的凝集效果及其对酶活的影响

Table 3 Effect of some compounds on aggregation of spore suspensions and activity of cellulase

化 合 物 Compounds	浓 度 Concentration (%)	溶 液 外 观 The appearance of solution	相 对 酶 活 Relative activity (%)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5	无变化 No change	102
CaCl_2	1.5	凝集现象明显 Obvious precipitation	113
CaSO_4	1.5	凝集不如 CaCl_2 显著 Precipitation not good as CaCl_2	108
FeSO_4	1.5	无变化 No change	96
Na_2SiO_4	1.5	无变化 No change	64
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	1.5	凝集明显 Obvious precipitation	98
ZnO	1.5	有白色沉淀 White precipitate	110
原酶液	0	无变化 No change	100

表 4 酶解液中葡萄糖的百分含量

Table 4 Glucose percentage in hydrolysate

底 物 Substrates	酶 解 率 Hydrolysis (%)	葡 萄 糖 百 分 含 量 Percentage of glucose (%)
纤维素粉-123 Cellulose-powder -123	48.2	63.6
木纸浆 Wood pulps	78.6	74.3
水曲柳木粉 The powder of traxinus mandshurca rup:	44.2	34.9

表 5 木粉细度对酶解率的影响

Table 5 Effect of the sizes of wood powder on hydrolysis rate

木粉细度(筛目) Sizes (mesh)	酶解率 Hydrolysis (%)	
	不处理木粉 Untreated wood powder	10% NaOH处理木粉 Wood powder treated with 10% NaOH
120	0.0	22.5
200	9.6	24.6
300	13.8	26.1

*木屑用NaOH在室温下处理24h,用水洗去NaOH,85℃烘干,用72转/min小球磨机研磨3.5h

The sawdust treated with NaOH at room temperature for 24h, washing by water to remove the NaOH, dried in 85℃, grinding in 72 rpm for 3.5h, used ball grinder

间。水解率高的,葡萄糖的比例也高,反之亦然。这反映了底物纤维素的可利用程度。如果以生产葡萄糖为目的(包括以葡

萄糖为中间产物)的工艺,必须设法提高纤维素的利用率,这也与底物的预处理有关。

(三) 酶活性与作用底物的关系

1. 底物粉碎细度对酶解率的影响, 粉碎, 既可以加大底物与酶分子的接触面, 也可以破坏纤维素的有序结构, 因此能明显地提高酶解率。结果见表5。

表5的结果与表1的结果完全一致。不同粉碎方式对酶解效果的影响很大。砂磨6min可与球磨3.5h的结果相当(未发

表结果)。

2. 碱酸处理木粉对酶解率的影响, 木屑80℃烘12h, 然后滚动球磨粉碎3.5h, 制成木粉。取木粉2g, 加2%NaOH或2%H₂SO₄ 4ml, 17℃放24h, 分别加入4%的H₂SO₄或NaOH 2ml中和, 再加2%粗酶制剂7.5ml(溶于含0.2M%苯甲酸钠的0.2MpH4.5醋酸缓冲液中)45℃

表6 木粉用碱和酸处理后对酶解率的影响

Table 6 Effect of wood powder treated with NaOH and H₂SO₄ on hydrolysis

树种名称 Trees	酶解率 The hydrolysis (%)		
	不处理木粉 Untreated wood powder	碱处理木粉 Wood powder treated with NaOH	酸处理木粉 Wood powder treated with H ₂ SO ₄
白松 <i>Abies holophylla</i> Maxin	23.5	23.5	23.3
红松 Pine	11.3	12.8	11.8
椴木 <i>Tilia amurensis</i> Rupr	14.2	23.7	15.7
楸木 <i>Guglans mandshurica</i>	18.0	24.8	17.4
水曲柳 <i>Fraxinus mandshrica</i> Rupr	29.2	34.2	30.2

表7 木质素含量对酶解率的影响

Table 7 Effect of wood powder with different lignin contents on hydrolysis

底物名称 Substrates	木质素含量 Contents of lignin (%)	酶解率 Hydrolysis (%)
木纸浆 Wood pulps	10.191	88.0
NaOH处理的木粉 Wood powder treated with NaOH	18.7	49.5
H ₂ SO ₄ 处理的木粉 Wood powder treated with H ₂ SO ₄	22.0	27.9

酶解72h, 用DNS法测定还原糖。结果见表6。由表6看出, 木粉经碱处理以后, 除白松之外, 其余树种木粉的酶解率都有显著增加, 这与木质素的溶出和纤维素的无序化有关。酸处理则没有这样的效果。

3. 底物木质素含量对酶解率的影响: 木质素妨碍酶的作用。底物木质素含量低的, 水解率就高(表7)。

(四) 酶量与酶解率的关系

从表8看出, 同一酶量, 不同底物的水解率差别很大。对于木纸浆, 酶量增加, 酶解率几乎同步增加; 但对于酸处理木粉, 酶量增加, 酶解率几乎没有什么增

加。

讨 论

1. 木霉X₂-85纤维素酶不仅能适应很宽的温度, pH范围, 且具有较好的热稳定性, 不受Ca²⁺、Zn²⁺、NH₄⁺、Al³⁺及SO₄²⁻、Cl⁻等可能常接触到的离子的毒

害, 据此推断, 酶本身在实际应用上不会造成重大障碍。

2. 粉碎方法对提高酶解效率具有很大的潜力。表5的数据是用一台72转/min的球磨机粉碎3.5h的木粉, 天然木粉与碱处理木粉的最大酶解率分别只为13.8%和26.1%, 而表1中所用的木粉是一台较大的、钢球比例按第2组合^[6]生产的木粉,

表8 不同加酶量对酶解率的影响
Table 8 Effect of different amount of enzyme on hydrolysis

酶 量 The amount of enzyme (mg)	4% H ₂ SO ₄ 处理木粉 Wood powder treated with 4% H ₂ SO ₄		木 纸 浆 Wood pulps		脱 脂 棉 Absorbent cotton	
	酶解率 Hydrolysis (%)	增长率 Increasing rate (%)	酶解率 Hydrolysis (%)	增长率 Increasing rate (%)	酶解率 Hydrolysis (%)	增长率 Increasing rate (%)
50	23.58	100	9.00	100	13.10	100
100	24.82	105	19.80	220	18.10	138
150	25.72	109	34.20	380	22.30	170
200	25.72	109	43.10	479	26.20	200
300	25.98	110	62.80	689	27.70	211

酶解率比前者显著提高。不经预处理的木屑, 酶几乎不起水解作用。

3. 底物经酸碱预处理以后, 酶解率也有不同程度的提高。一般说, 碱预处理比酸预处理的效果好。碱预处理的木粉木质素的含量低, 且木粉较疏松, 而酸预处理的木粉木质素含量较高, 木粉硬结。从酶解率的变化来看, 酸预处理的木粉一开始酶解率就达到较高水平, 但以后增加很少, 虽然突出了酸预处理的局部水解作用, 可是不能为酶的进一步作用提供更有利的条件。就此而言, 酸预处理不如碱预处理好。

4. 不同酶量作用于三种不同类型的底物, 它们的酶解速率差别很大。从表8可以看到, 当酶量增加100%, 木纸浆的平均酶解增长率近120%, 脱脂棉为31%, 酸木粉为2%。表1中, 同一个酶作用于木屑, 酶解率不到2%, 此木屑经过充分粉碎以后, 酶解率可以提高20多倍。同一种底物的不同物理状态会引起反应速度如此巨大的差别, 说明天然木屑不能直接用作纤维素酶的底物, 同时也说明, 提高酶解率的主要途径, 是寻求某种有效的方法, 把对酶亲和力的木屑转变为对酶亲和力的底物。

参 考 文 献

- [1] Berghem, E.R. and Petterssong, G., *Eur. J. Biochem.*, 37:21, 1973.
- [2] 汪大受, 张静娟等, 生物化学与生物物理学报, 12(3):299, 1980.
- [3] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组, 微生物学报, 16(3):240, 1976.
- [4] Diapa, M.K. and Pameda, M., *T. Anal. Biochem.*, 27:555, 1969.
- [5] 日本德大学农学艺化学教室编, 农艺化学实验书第3卷, p.1222, 产业图书株式会社出版, 1957.
- [6] 张永惠, 陈华编著, 造纸工业化学分析, 轻工业出版社, pp.44, 55, 1961.
- [7] Mandis, M., Androtti, R. and Roche, C., *Enzymatic conversion of cellulosic materials: Technology and Application*, p21, 1976.
- [8] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组, 微生物学通报, 6(3):17, 1979.
- [9] Baker, A. J., *J. Anim. Sci.*, 36(4):708, 1973.

STUDY ON THE EFFECTS OF SOME FACTORS IN THE HYDROLYSIS OF SAWDUST BY CELLULASE

Li Shuanyou Xie Yumei

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The ability of cellulase produced by strains 201,79, SA3 and 1096 for attacking sawdusts were low, while that for the pretreated sawdust were high. The activity of the X₂-85 enzymes lost 15% after incubated in 45°C for 24 h. When the enzyme incubated with three different substrates at the same time, the increase of enzyme concentration for 100% resulted an increase of hydrolytic rate of wood pulp to 120%, but that for the absorbent cotton and acid treated wood powder only 31% and 2% were observed respectively. The great difference among the three substrates in hydrolytic rate suggest that the primary ways of increasing the hydrolysis of sawdust is to seek the methods for changing the sawdust substrate from small affinity to great affinity for enzymes.

Key words

Cellulase; sawdust