

磁性 Fe_3O_4 微粒对葵花籽壳酶水解的影响研究

陈玲 袁兴中* 曾光明 梁运珊 鲁爱华 赵佳佳

(湖南大学环境科学与工程学院 湖南 长沙 410082)

摘要: 将磁化后的 Fe_3O_4 微粒添加于葵花籽壳酶水解过程中, 分析在不同的 Fe_3O_4 添加量和不同的添加方法下, 葵花籽壳酶水解过程中纤维素酶酶活、纤维素转化率及还原糖浓度的变化特征, 研究磁性 Fe_3O_4 微粒对纤维素酶水解葵花籽壳的影响。并通过考察酶水解反应前后水解液的表面张力值和 pH 值的变化, 探讨和分析磁性 Fe_3O_4 微粒作用下纤维素酶的磁效应机制。结果表明, 磁性 Fe_3O_4 添加量为 0.5 g/L~2.0 g/L 时, 对纤维素酶酶活的提高、还原糖浓度的增加和纤维素的转化在 48 h 后表现出较明显的促进作用。磁性 Fe_3O_4 添加量为 2 g/L 时, 纤维素酶 60 h 酶活最高可提高 25.9%。添加量为 1.5 g/L 时, 还原糖浓度从 6.950 mg/mL 提高到 8.775 mg/mL; 同时, 添加 Fe_3O_4 微粒的样品中纤维素的最高转化率达 60.531%, 明显高于不添加 Fe_3O_4 样品的纤维素转化率 47.932%。此外, 分次添加磁性 Fe_3O_4 的酶活稳定性要优于一次添加。反应结束后, 与不添加磁性 Fe_3O_4 的水解液相比, 磁性 Fe_3O_4 添加量为 1.5 g/L 时, 水解液的表面张力值降低程度最大。但添加磁性 Fe_3O_4 微粒的水解液 pH 值变化不显著。

关键词: 磁性 Fe_3O_4 , 纤维素酶, 酶水解, 葵花籽壳, 磁场

Effect of Magnetic Fe_3O_4 Particles on Enzymatic Hydrolysis of Sunflower Seed Hull

CHEN Ling YUAN Xing-Zhong* ZENG Guang-Ming LIANG Yun-Shan
LU Ai-Hua ZHAO Jia-Jia

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

Abstract: The effect of magnetic Fe_3O_4 particles on cellulase in the enzymatic hydrolysis of sunflower seed hull was studied in different adding ways and additive amount. In the process of enzymatic hydrolysis of sunflower seed hull, the variations of cellulase activity, reducing sugar concentration and cellulose conversion were evaluated. After the reaction, the analysis of pH and surface tension of hydrolysate were also used to determine the mechanisms of cellulase by the magnetic effect. The results indicated that after adding magnetic Fe_3O_4 , the cellulase activity, reducing sugar concentration and conversion of cellulose had an increased between the 0.5 g/L and 2.0 g/L cases after 48 h. When the additive amount of magnetic Fe_3O_4 was 2 g/L, the cellulase activity at 60 h was improved significantly by 25.9%. It was found that the concentration of reducing sugar was increased from 6.950 mg/mL to 8.775 mg/mL with magnetic Fe_3O_4 1.5 g/L. Simultaneously, compared with the blank, which the conversion of cellulose was 47.932%, the maximum cellulose

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 50678062)

* 通讯作者: Tel: 86-731-8821413; ✉: yxz@hnu.cn

收稿日期: 2009-03-05; 接受日期: 2009-05-12

conversion of samples with adding magnetic Fe₃O₄ was 60.531%. Besides, the stability of cellulase activity adding in times was better than in one time. After the reaction, the final surface tension of hydrolysate with 1.5 g/L magnetic Fe₃O₄ was the lowest in comparison with the blank. However, no significant differences were observed in the final pH of the hydrolysate.

Keywords: Magnetic Fe₃O₄, Cellulase, Enzymatic hydrolysis, Sunflower seed hull, Magnetic field

利用生物技术将植物纤维素水解发酵, 转化成可以利用的乙醇新能源早已经成为世界性的研究课题。与已得到广泛而深入研究的稻草、秸秆、玉米芯相比, 葵花籽壳由于纤维素含量高, 木质素含量低, 作为一种新的能源物质引起了新的研究热点^[1-3]。葵花籽壳可从榨油、食品加工厂直接获得, 相比而言, 有节约收集和运输成本的优势^[4]。与酸水解相比, 酶解由于反应条件温和、无副产物和污染少等优点, 而成为优先选择的木质纤维素水解方法。

近年来, 随着生物磁效应原理和磁性纳米技术的进一步研究与发展, Fe₃O₄ 磁性微粒由于具有体积小、超级顺磁性和低毒性等多功能特性得到广泛的关注^[5,6]。特别是作为一种新的吸附载体, 用于固定化多种酶如磷酸酶(ALP)^[7]、果胶酶^[8]、H₂O₂ 酶^[9]时, 发现这些酶的稳定性和活性都会得到显著提高。另外, 在 500 mT 的磁场范围内, 游离纤维素酶的酶活随外加磁场强度与曝磁时间的增加而增加^[10]。而在温度和 pH 的最适点, 磁场也可使纤维素酶活性升高 10.0%~16.4%^[11]。

Fe₃O₄ 微粒具有聚集吸附能力, 是因为在粒子之间有能够产生强引力的磁偶极子。它们具有超级顺磁性, 一旦被磁场活化后, 就能产生一定的磁力作用, 使酶、跨膜离子流、RNA、蛋白质等生物大分子产生生物磁效应, 导致分子的构象、活性发生改变^[6,12]。目前对磁性 Fe₃O₄ 微粒影响纤维素酶水解糖化的报道极为罕见。本试验将磁化后的 Fe₃O₄ 微粒(简称磁粉)作为一种添加剂, 考察其在葵花籽壳的酶解过程中, 对纤维素酶的酶活、还原糖浓度、纤维素的转化、水解液的表面张力和 pH 值的影响和作用, 并初步研究和探讨产生这些变化的原因。此外, 对磁粉的添加方式, 即 1 次添加和分次添加产生的效果进行了比较和分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

实验材料: 葵花籽壳(湖南长沙市望月湖食品加

工厂); 纤维素酶(上海贝塔生物制品有限公司); 试验所用磁粉为实验室自制。

主要仪器: Foss 半自动纤维测定仪(Fibertec 2010); CT3-A 型特斯拉计; JYW-200A 自动界面张力仪; 721 分光光度计; TDA-8002 电热恒温水浴锅; HZQ-C 空气浴振荡培养箱; FZ102 微型高速粉碎机; RE-52AAA 旋转蒸发器。

1.2 磁粉的制备

将浓度为 0.5 mol/L 的二价铁盐(FeSO₄·7H₂O)、三价铁盐(FeCl₃·6H₂O)和 0.25 mol/L 的沉淀剂(NH₃·H₂O)按 Fe²⁺:Fe³⁺:OH⁻ = 1:2:12 混合, 水浴恒温 30°C 以 1000 r/min 速度搅拌, 反应至黑色后, 搅拌 15 min 停止。将溶液离心, 用蒸馏水反复洗涤至中性, 移去上层清液, 在 60°C 真空干燥 24 h 即得^[13]。所制得的 Fe₃O₄ 微粒平均粒径为 21.6 nm~23.8 nm, 磁化强度为 1000 A/m, 置于静磁场中磁化至表面磁感应强度为 100 mT/g~200 mT/g 而成。

1.3 葵花籽壳的预处理

将葵花籽壳用微型高速粉碎机粉碎到 40 目后放于 70°C 干燥箱。将烘干后的葵花籽壳分别与 0.5 mol/L 的 NaOH 按固液比 5% 进行稀碱预处理^[3], 1% 的 H₂SO₄ 按固液比 10% 进行稀酸预处理^[4]。均置于高压灭菌锅 1 × 10⁵ Pa 反应 30 min, 抽滤, 用清水洗至无色呈中性后 60°C 烘干。

1.4 葵花籽壳的酶水解

取等量的原葵花籽壳和预处理葵花籽壳 3 g, 置于 250 mL 的三角瓶中。加入 pH 4.8 的柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液 100 mL, 设定恒温摇床温度 50°C, 转速 100 r/min 预热 10 min 后加入纤维素酶, 使纤维素酶浓度达 10 FPU/g。反应 72 h 后离心移去上清液, 将酶解后的葵花籽壳于 60°C 烘干。分别测定原葵花籽壳和预处理葵花籽壳在酶解前的纤维素、半纤维素、木质素以及酶解后的纤维素含量。

取适量稀碱预处理后的葵花籽壳, 并 1 次添加不同量的磁粉 0.5 g/L~5 g/L(表面磁感应强度为 50 mT~500 mT), 每份不同的磁粉量设定 3 个平行

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

样。按上述同等酶解条件开始反应计时, 定时取样, 酶水解产物 4000 r/min, 离心 10 min 后取上清液测定 FPA 和还原糖。水解 96 h 后, 平行测定水解液的表面张力和 pH 值。

分次添加测定时, 将 1 次添加量磁粉等分为 3 份, 第 1 份磁粉与底物, 缓冲液同时加入。按上述酶解条件加入等量纤维素酶后开始反应计时。反应 24 h、48 h 时分别继续添加第 2 份和第 3 份磁粉。定时取样, 酶水解产物 4000 r/min, 离心 10 min 后取上清液平行测定 FPA 和还原糖。

1.5 测定方法

葵花籽壳的纤维素、半纤维素、木质素含量, 采用德国 FOSS 半自动纤维素测定仪测定。还原糖浓度采用水杨酸(DNS)法^[14]进行测定。滤纸酶活力按照国际理论和应用化学协会(IUPAC)推荐的国际标准方法测定, 一个滤纸酶活力国际单位(FPIU)等于酶促反应每分钟生成 1.0 μmol 葡萄糖(以还原糖表示)的酶量^[15]。水解液表面张力采用自动表面张力仪测定。

各转化率按以下公式计算^[16]:

1) 底物转化率(%)=

$$\frac{0.9 \times \text{还原糖浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{溶液体积}(\text{mL})}{\text{底物质量}(\text{mg})} \times 100\%$$

2) 纤维素转化率(%)=

$$\frac{0.9 \times \text{还原糖浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{溶液体积}(\text{mL})}{\text{底物质量}(\text{mg}) \times \text{纤维素含量}(\%)} \times 100\%$$

2 结果

2.1 葵花籽壳预处理

将葵花籽壳分别进行稀酸和稀碱预处理后, 从表 1 中可以看出, 两种预处理均使葵花籽壳纤维素的含量得到显著提高, 并都脱除了一定比例的半纤维素和木质素。稀酸预处理主要脱除半纤维素, 对

木质素的脱除作用十分微弱。而碱预处理则均可脱除木质素和纤维素, 其中脱木质素的能力更强。与原葵花籽壳相比, 纤维素含量分别提高了 15%和 25%, 半纤维含量分别降低了 50%和 10%, 而木质素含量分别降低了 8%和 70%。在相同的酶解条件下, 两种预处理都得到了较好的纤维素转化率, 分别由原来较低的转化率 13%提高到 30%和 47%。碱预处理后的葵花籽壳的纤维素转化率明显要高。根据比较结果, 将经过碱处理的葵花籽壳作为下一步试验研究的材料。

2.2 磁粉添加量对纤维素酶水解的影响

本试验以不添加磁粉的葵花籽壳酶解溶液为空白, 添加不同量的磁粉, 得出不同磁场强度的磁粉对纤维素酶酶活、还原糖浓度、纤维素转化率、表面张力和 pH 的影响趋势和效果。

2.2.1 磁粉添加量对纤维素酶酶活的影响: 图 1 结果表明, 磁粉在酶解的各阶段能够对 FPA(Filter paper activity)产生不同程度地影响。在反应最初 1 h, 添加磁粉 0.5 g/L~2.0 g/L 时的相对 FPA 较对照增幅最小, 此后反应进行到 12 h 时, 相对 FPA 陡然升高, 随后下降, 呈现波浪式的周期变化。其中磁粉添加量为 2 g/L 时促进作用最明显, 相对 FPA 最高值 25.9%出现在 60 h 时。添加磁粉 3 g/L~5 g/L 时的 FPA 则表现出较明显的抑制作用, 但 48 h 后的相对 FPA 出现了一定的上升趋势。表明在一定范围内, 酶活的提高随着磁粉添加量的增加而增加, 当超过了这一范围时, 磁粉对酶活也会表现出一定的抑制作用。

2.2.2 磁粉添加量对还原糖浓度的影响: 图 2 结果表明, 随着磁粉量的增加, 还原糖浓度也逐渐增大。当磁粉量超过 3 g/L 时, 还原糖浓度开始下降。空白的 96 h 还原糖浓度为 6.950 mg/mL, 底物转化率为 20.85%。与空白相比, 添加磁粉 48 h 后, 还原糖浓

表 1 葵花籽壳组成
Table 1 Composition of sunflower seed hull

材料 Material	酶解前纤维素的含量(%) Cellulose content before zymolysis (%)	酶解前半纤维素的含量(%) Hemicellulose content before zymolysis (%)	酶解前木质素的含量(%) Xylogen content before zymolysis (%)	酶解结束时的纤维素含量(%) Cellulose content after zymolysis (%)
原葵花籽壳 Hull sample	34.791	14.227	10.410	30.268
稀酸预处理 Dilute acid pretreatment	40.010	7.114	9.577	28.077
稀碱预处理 Mildbase pretreatment	43.489	12.804	3.123	22.644

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

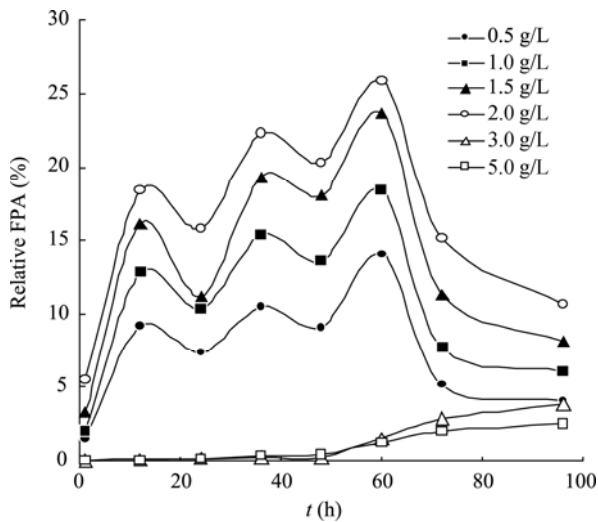


图 1 磁粉添加量对纤维素酶相对 FPA 的影响
Fig. 1 Effect of magnetic powder amount on cellulase relative FPA

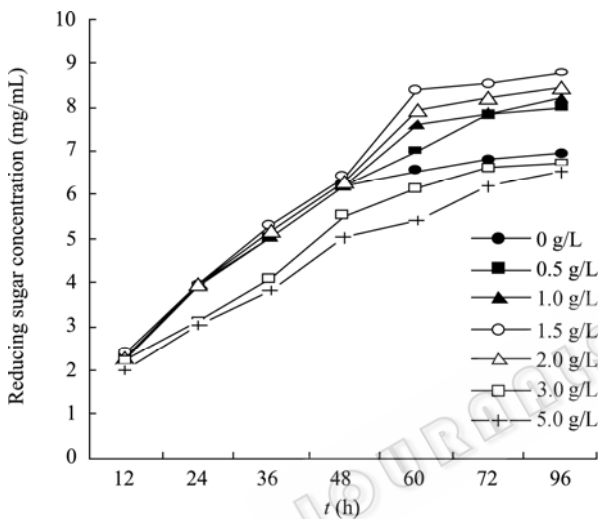


图 2 磁粉添加量对还原糖浓度的影响
Fig. 2 Effect of magnetic powder amount on reducing sugar concentration

度要提高 2.20%~10.37%。其中磁粉量 1.5 g/L 时 96 h 还原糖浓度最高, 为 8.775 mg/mL, 底物转化率为 26.325%。从图 2 中可以看出, 空白的还原糖浓度前 48 h 增长趋势比较明显, 48 h 后就趋于稳定。与空白相比, 前 48 h, 添加 0.5 g/L~2.0 g/L 磁粉对产还原糖浓度的提高并没有表现出特别明显的促进作用。但可以发现酶解 48 h 后, 还原糖浓度仍表现出一定程度的上升, 促进作用变得比较明显。这可能是受磁场作用, 酶活的稳定性受到一定影响, 导致水解作用出现了一定的延时。磁粉添加量为 3 g/L 和 5 g/L 时, 还原糖浓度尽管一直低于空白的还原糖浓

度, 最高的底物转化率也仅达 20.71%, 但 48 h 后也仍表现出了一定的上升趋势。

2.2.3 磁粉添加量对纤维素转化率的影响: 磁粉对葵花籽壳中纤维素的转化率产生的影响较为显著, 如图 3 所示。酶解反应结束后, 未添加磁粉的空白样品中纤维素含量从 43.489%降低到 22.644%, 纤维素的转化率为 47.932%。添加磁粉后, 纤维素的转化率与未加磁粉的空白相比, 出现了不同的变化趋势。添加量为 0.5 g/L~2.0 g/L 时, 纤维素的转化率都明显高于空白。其中磁粉量为 1.5 g/L 时, 纤维素的转化率最高, 达到 60.531%。磁粉添加量为 5 g/L 时, 纤维转化率最低, 为 44.852%。

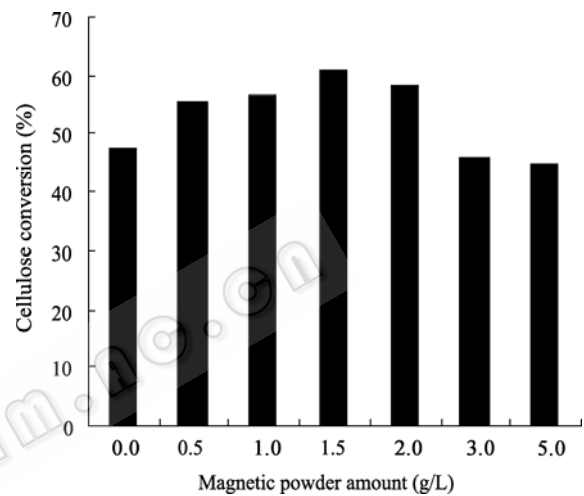


图 3 磁粉添加量对纤维素转化率的影响
Fig. 3 Effect of magnetic powder amount on cellulose conversion

2.2.4 磁粉添加量对表面张力值的影响: 整个酶解反应过程中, 随着纤维素酶的不断消耗和磁粉的不断作用, 酶解结束后, 水解液的表面张力发生了变化, 其变化情况见图 4。试验初始时, 空白水解液的表面张力值为 78.3 mN/m, 加入纤维素酶酶解反应 96 h 后, 空白水解液的表面张力值明显下降至 59.7 mN/m。由于纤维素酶是蛋白类物质, 也是两性电解质的高分子胶体物质, 所以在一定程度上能够降低表面张力。添加不同量的磁粉酶解 96 h 后, 与空白相比, 水解液表面张力值则呈现了不同的变化趋势。添加磁粉量为 0.5 g/L~1.5 g/L 时, 水解液的表面张力值要略低于空白。添加磁粉量为 2 g/L~5 g/L 时, 水解液的表面张力值要稍高于空白。其中磁粉量为 1.5 g/L 时, 水解液的表面张力值降低最多, 从 78.4 mN/m 降低到 55.4 mN/m。

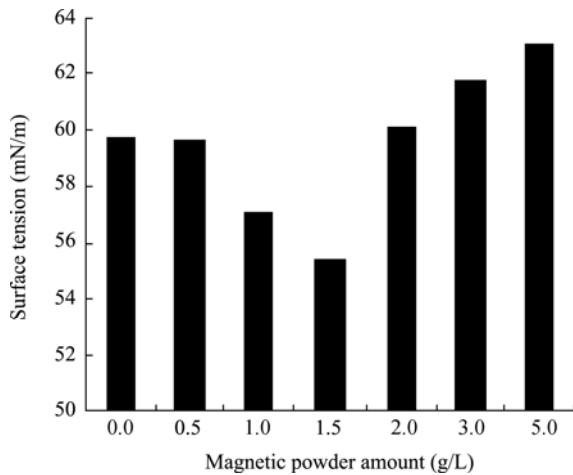


图4 不同磁粉量下酶解结束时的表面张力
Fig. 4 Final surface tension of the enzymatic hydrolysis with magnetic powder amount

2.2.5 磁粉添加量对 pH 值的影响: 在反应体系中未加入磁粉时, 酶解溶液的 pH 值均为 4.80。在纤维素酶解过程中, 会伴随着葡萄糖, 纤维二糖和微量的挥发酸性物质的产生。但受柠檬酸盐缓冲体系的调节作用, 96 h 后整个反应体系的 pH 值降低不多, 空白溶液的 pH 值仅降为 4.55。从图 5 中可以看出, 添加磁粉后的溶液与空白相比, 96 h 后的 pH 值都有所升高, 但都仍在纤维素酶反应最适 pH 值 4.4~5.2 范围内, 变化不是很明显。由于纤维素酶对溶液的 pH 值十分敏感, pH 值对酶活性中心基团的电离程度, 底物的解离状态, 以及酶与底物结合的最佳状态都会产生重要影响^[17]。结果表明, 磁粉对酶、底物的解离以及酶与底物的结合状态影响不大。溶液 pH

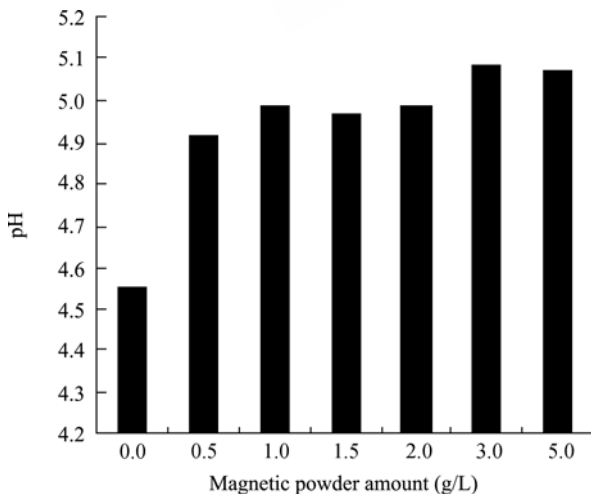


图5 不同磁粉量下酶解结束时的 pH
Fig. 5 Final pH of the enzymatic hydrolysis with magnetic powder amount

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

的增大, 可能是随着反应的进行, 磁粉促进了碱预处理后底物中残留碱离子的解离所导致的现象。

2.3 磁粉添加方式对纤维素酶水解的影响

磁粉产生的静磁场具有唯一性和叠加效应, 采取不同的添加方式就会产生不同的磁场作用, 从而对纤维素酶的水解产生影响。图 6 和图 7 结果表明, 与不添加磁粉的空白相比, 两种磁粉添加方式对酶活和还原糖浓度都产生了一定影响。在磁粉的作用下, 酶活都出现了不稳定的周期性波动, 48 h 后的还原糖浓度也都出现增长趋势。分次添加磁粉时, 48 h 后的酶活波动性比一次添加时的波动性要低, 稳定性要好, 酶活值要高。比较两种添加方式的最终还

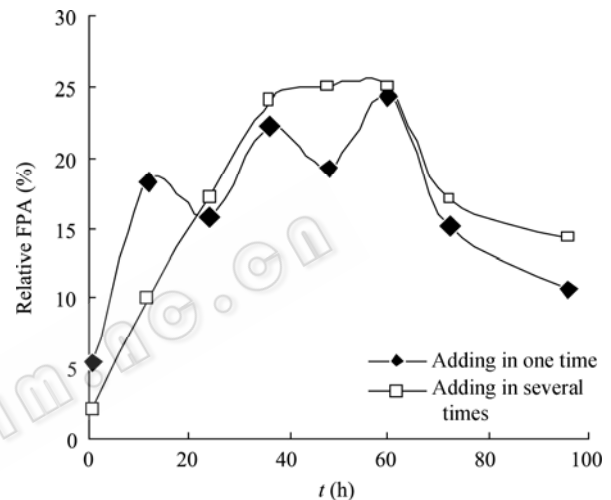


图6 磁粉添加方式对纤维素酶酶活的影响
Fig. 6 Effect of adding ways on cellulase activity with magnetic powder

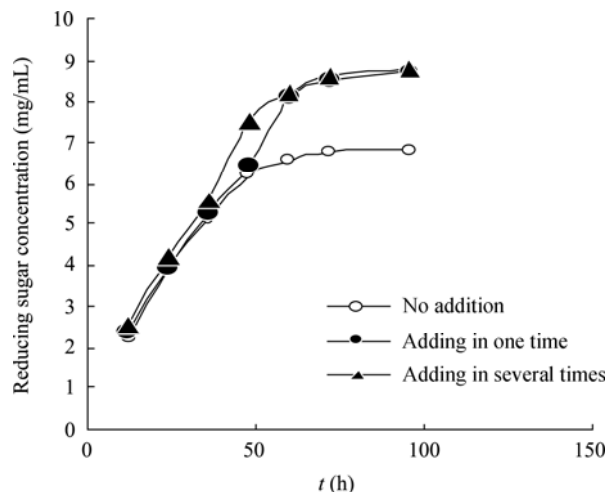


图7 磁粉添加方式对还原糖浓度的影响
Fig. 7 Effect of adding ways on reducing sugar concentration with magnetic powder

原糖浓度, 尽管差别不大, 但还原糖浓度的上升幅度却不太相同, 分次添加磁粉的幅度要稍大。由此可见, 分次添加磁粉的效果要比一次添加稍好。这一现象很有可能是新添加磁粉后, 产生的新磁场与原磁场出现的叠加共同作用, 在一定程度上减弱了原磁场产生的滞后效应和波动效应。

3 讨论

3.1 不同预处理方法对葵花籽壳酶解的影响

McMillan^[18]指出, 天然纤维素中含有的大量木质素和半纤维素, 它们覆盖于纤维素表面并填充纤维素微孔。除去半纤维素和木质素后, 纤维素中形成了更理想的反应通道, 可以使纤维素更好地与酶接触。根据葵花籽的原料特性, 本试验通过比较两种简便有效的预处理方式, 选择合适的预处理方法。结果表明, 在相同的酶解条件下, 碱预处理后的葵花籽壳的纤维素转化率明显要高。从原理上看, 脱除半纤维素只改变了原料结构, 并没有破坏掉主要结构。当木质素被脱除后, 原料结构全都被破坏, 纤维素的纤维全部从最初的接合结构中脱离, 完全暴露出来, 极大的增加了外孔表面积。特别是提高了酶分子对纤维的可及度, 从而影响酶分子与纤维的接触程度和酶组分间协同作用的发挥, 因而更好的提高了酶解效率^[19]。另外, 由于半纤维素和木质素均是碱溶性的, 随着它们的不断溶出, 纤维素的相对含量也不断增加^[20]。这些都有利于纤维素酶与底物的接触, 从而促进酶解作用, 因而碱处理后的纤维素转化率能得到较明显提高。

3.2 磁粉作用下酶水解的磁效应分析

纤维素酶分子中普遍存在催化结构域(CD), 吸附结构域(CBD)和纤维素酶活性中心, 它们在磁场的作用下会发生构象, 活性等方面的变化^[21]。由于不同质量的磁粉微粒会产生不同强度的静磁场, 不同的磁粉添加方式会因叠加效应导致磁场强度的改变, 势必都会对纤维素酶的分子构象和活性中心产生不同的影响效果。

酶活则是表征酶催化特定化学反应能力的重要指标之一, 如图 1 和图 6 所示。结果表明, 不管采用哪种添加方式, 哪种添加量, 加入磁粉后, 在整个酶水解期间, 相对酶活的变化曲线都是呈波浪式的周期变化。一般研究表明, 纤维素的最高酶活^[22]和还原糖最高产量^[16]均出现在 48 h 左右。本试验中,

添加磁粉后, 酶活和还原糖的最高值出现在 60 h。这都表明在磁粉的磁场作用下, 纤维素酶会产生相应的生物磁效应, 在水解作用过程中表现为一定的波动性和滞后效应。

高培基^[23]指出, 纤维素酶对纤维素的吸附作用实际上是一种快速起始吸附, 然后才通过一种稳态过程使纤维素酶回到溶液中。纤维素酶的吸附达到平衡值所需要时间相对于纤维素的水解所需要的时间要少得多, 但其吸附过程也可能受到外界因素和环境的干扰和影响。因此, 起始相对酶活较低可能是由于磁场的作用, 不同添加量的磁粉对纤维素酶的吸附作用产生了一定影响, 延长了纤维素酶的起始吸附和水解时间, 从而导致滞后效应的产生。相对酶活曲线之所以是呈波浪式的周期变化, 则是由于磁粉存在一定的磁场强度, 随着磁粉表面吸附量的增加, 被吸附的粒子电性相同, 斥力增大, 抵消了一部分磁力, 造成在较小的磁场强度下, 当吸附量增大到一定程度后, 吸附量开始下降, 又会产生解吸附作用, 从而对纤维素酶产生交替性的磁力作用, 引起酶活发生相应的周期性变化。从图 1 和图 2 中还可以看出, 磁粉添加量为 0.5 g/L~2.0 g/L 时, 酶活的提高和还原糖的产量都是随着磁粉量的增大而增大。当磁粉添加量超过 3 g/L 时, 酶活和还原糖产量却并没有表现出明显的提高作用。这是由于在一定范围内, 磁粉量越高, 磁力作用越大, 对纤维素酶的吸附量也越大, 对纤维素酶的活性基团作用也越显著, 从而可以有效阻止酶失活提高反应效率, 增加还原糖产量。一旦磁粉量过高, 超过一定磁场强度范围时, 会使酶的活性基团发生暂时性的变形甚至破坏酶的分子结构, 使酶的活性受到限制或者失活, 反应效率降低^[11]。此外, 磁粉量添加为 3 g/L 和 5 g/L 时, 一直受到抑制作用的酶活和还原糖产量 48 h 后表现出一定程度的上升趋势。其原因可能是过强的磁力作用使得酶的活性基团发生了暂时性变形, 但随着反应的进行, 磁粉微粒间的磁场强度逐渐降低。当磁力作用减弱到一定程度时, 受外力限制作用的酶的两个功能结构域和活性中心又重新开始活跃起来^[24]。

还有研究表明, 对于纤维素及其衍生物, 其分子链具有半刚性, 其分子磁化率各向异性都是为负性的, 它们的分子链在足够强的磁场作用下会垂直于磁场方向排列, 而且磁场对物质体系能量的影响

会随着磁场强度的平方呈正比增加^[25]。因此,磁粉也有可能通过磁场强度对底物中微纤维的超分子链空间结构产生一定影响。比较图 1、图 2 和图 3,可以注意到当磁粉添加量为 2 g/L 时, FPA 虽然大幅度提高,但纤维素转化率和还原糖浓度没有随之上升反而显著下降,明显低于磁粉添加量为 1.5 g/L 时的转化率和还原糖浓度。因此, FPA 提高,还原糖浓度及纤维素的转化率却下降的不同步现象,很有可能就是磁粉通过磁场作用影响了底物中微纤维的超分子空间结构。而是否由于磁力作用变得足够大,使得微纤维排列和取向的无序化作用更明显,造成纤维素酶吸附的困难,导致纤维素酶的水解活化能虽然显著增加,但是纤维素酶在残存的纤维上吸附能力却显著下降,结晶纤维素难以被继续降解为可发酵糖^[26-28],因而使得还原糖的产量降低,还有待进一步的考察和证实。

加入磁粉后,水溶液经过一定磁场强度磁化后会产生物理化学性质的变化,如表面张力, pH 值都会发生改变。一般认为磁场会破坏水原来的结构,使原来较大的缔合水分子集团变成较小的水分子集团,甚至是单分子。分子中的氢键也会有部分因为洛仑兹力的作用下正负离子反方向旋转而断裂,导致氢键的偶极取向在磁场的作用下会发生改变,使溶液的表面张力变小。纤维素酶分子表面具有疏水性能的疏水基。疏水基在水溶液中会富集形成表面层,形成的吸附层使水溶液表面为碳氢基团覆盖,也会使溶液表面张力降低^[29,30]。从图 4 中可以看出,磁粉量为 1.5 g/L 时的表面张力降低程度比较大。表明磁粉量在 1.5 g/L 时,产生的磁场会对纤维素酶疏水基的富集作用产生比较明显的影响。当磁粉添加量达 2 g/L 以上,表面张力开始升高。说明磁粉添加量越多,磁场对纤维素酶疏水基的富集作用变得越不明显。但其中的机理目前尚不能肯定。

4 结论

1) 磁性 Fe_3O_4 添加量为 0.5 g/L~2.0 g/L 时,对纤维素酶酶活的提高、还原糖浓度的增加和纤维素的转化 48 h 后有较明显的促进作用。分次添加磁性 Fe_3O_4 的纤维素酶酶活稳定性要优于一次添加。

2) 磁性 Fe_3O_4 不仅能使纤维素酶酶活产生波动性和滞后性的生物磁效应,还可能通过磁场作用对纤维素酶的吸附作用以及底物微纤维的超分子空间

结构产生一定影响。

3) 磁性 Fe_3O_4 能改变水解溶液的表面张力值,但对溶液 pH 值的改变无显著影响。





参考文献

- [1] Nurdan Eken-saracoglu, Mutlu SF, Günes Dilmac, *et al.* A comparative kinetic study of acidic hemicellulose hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Bioresource Technology*, 1998, **65**(1): 29-33.
- [2] Hasan Ferdi Gercel. Production and characterization of pyrolysis liquids from sunflower-pressed bagasse. *Bioresource Technology*, 2002, **85**(2): 113-117.
- [3] Sanjeev KS, Krishan LK, Gurbinder SK. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy*, 2004, **27**(4): 399-402.
- [4] Müjgan TO, Nurdan ES. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by pichia stipitis. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(7): 2162-2169.
- [5] Gordula Grüttner, Sandra Rudershausen, Joachim Teller. Improved properties of materials as particle matrix. *Magn Mater*, 2001, **225**(1): 1-7.
- [6] Li Guiyin, Jiang Yuren, Huang Kelong, *et al.* Preparation and properties of magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 2008, **466**(1-2): 451-456.
- [7] Saiyed ZM, Sharma S, Godawat R, *et al.* Activity and stability of alkaline phosphatase (ALP) immobilized onto magnetic nanoparticles (Fe_3O_4). *Journal of Biotechnology*, 2007, **131**(3): 240-244.
- [8] Lei Zhongli, Bi Shuxian, Hu Bing, *et al.* Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. *Food Chemistry*, 2007, **105**(3): 889-896.
- [9] Horst F, Rueda EH, Ferreira ML, *et al.* Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38**(7): 1005-1012.
- [10] 寇灵梅, 李冰, 郭祀远, 等. 磁性固定化纤维素酶的制备及其磁响应性. *食品科学*, 2006, **27**(12): 335-338.
- [11] 贺华君, 朱元保, 钟科军, 等. 磁场对纤维素酶的活性及构象的影响. *吉首大学学报(自然科学版)*, 1998, **19**(1): 41-46.
- [12] 王山杉, 李琳, 李冰. 磁场对酶学效应影响的研究进展. *现代生物医学进展*, 2006, **6**(10): 111-114.
- [13] 秦润华, 姜炜, 刘宏英, 等. 纳米磁性四氧化三铁的制备及表征. *材料导报*, 2003, **9**(17): 66-68.

- [14] 史 锋. 生物化学实验. 杭州: 浙江大学出版社, 2002. pp.1-3.
- [15] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257-268.
- [16] 王 琰, 杨 森, 李十中. 糠醛渣纤维素酶解研究. *环境科学*, 2007, **28**(9): 2129-2133.
- [17] Gregg DJ, Saddler JN. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Bio-technol Bioeng*, 1996, **51**(3): 75-83.
- [18] McMillan JD. Pretreatment of lignocellulosic biomass //Himmel ME, Baker JO, Overend RP. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. USA: ACS Symposium Series, 1994, pp.292-324.
- [19] Solange IM, Marcela Fernandes, Adriane MFM, *et al.* Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, **43**(2): 124-129.
- [20] 钟文文. 秸秆预处理对纤维素酶水解效果的影响. *湖北农业科学*, 2007, **46**(6): 1006-1008.
- [21] 陈洪章. *纤维素生物技术*. 北京: 化学工业出版社, 2004, pp.46-48.
- [22] 莫 丹, 袁兴中, 曾光明, 等. Tween 80 和鼠李糖脂对稻草酶解的影响. *环境科学*, 2008, **29**(7): 2998-3004.
- [23] 高培基, 许 平. *资源环境微生物技术*. 北京: 化学工业出版社, 2004, pp.27-36.
- [24] 钟科军, 草祉祥, 文陵飞, 等. 超氧化物歧化酶磁效应的研究. *湖南大学学报(自然科学版)*, 1999, **26**(5): 18-23.
- [25] 王林格, 黄 勇. 磁场对乙基氰乙基纤维素胆甾型液晶相的影响. *纤维素科学与技术*, 2000, **8**(4): 7-13.
- [26] Sugiyama. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules*, 1991, **24**: 2461-2466.
- [27] Barbara Hinterstoisser, Lennart Salmén. Application of dynamic 2D FTIR to cellulose. *Vibrational Spectroscopy*, 2000, **22**(1-2): 111-118.
- [28] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展. *自然科学进展*, 2003, **13**(1): 21-29.
- [29] Tomme P, Warren RAJ, Gilkes NR, *et al.* Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol*, 1995, **37**: 1-81.
- [30] Gong Liangfa, KU Ruxiong, Xu Xin, *et al.* Surface tension of aqueous solutions of inorganic salts and those surfactant. *Journal of Beijing Institute of Petro-chemical Technology*, 2000, **8**(1-2): 42-46.

征订启事

2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>