

超临界 CO₂ 流体对纤维素酶催化反应的影响

辛 玮¹ 王秀道² 尹卓容² 高培基^{1*}

¹(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

²(山东省轻工业学院, 济南 250100)

摘 要 超临界二氧化碳流体预处理对纤维素超分子结构及纤维素酶催化反应有重要影响。一定含水量的微晶纤维素用 SC-CO₂ 在 10MPa, 50℃ 处理 30 min, 其结构发生了有利于进一步被酶解的变化。上述超临界条件单独作用于纤维素酶时, 并未造成酶催化活力的降低; 但与纤维素共同进行 SC-CO₂ 处理时, 纤维素酶则失去催化活性, 但这种处理却能提高纤维素进一步被酶解的效率。一定范围内处理时的酶用量与酶解效率的增加正相关。纤维素的含水量对 SC-CO₂ 处理后的酶解效率有显著影响。

关键词 纤维素, 纤维素酶, SC-CO₂, 预处理, 酶解

中图分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0770-04

纤维素是地球上最丰富的可再生性自然资源(全球一年由光合作用生成的纤维素约为 1000 亿吨)^[1], 有效水解纤维素为葡萄糖进而发酵为乙醇等, 将会减轻人类粮食和能源压力, 它的全利用无疑是新千年中对人类最为重要的生物技术之一。纤维素的多相水解反应必须经历由表及里的逐层反应过程, 尤其是纤维素结晶区的反应更是如此。因此, 对纤维素进行适当的预处理是充分利用纤维素资源的重要一步^[2,3]。

超临界流体技术已广泛应用于化学萃取领域^[4]。超临界流体的扩散系数大, 粘度小, 能增加反应物的溶解度, 使反应和分离相耦合。二氧化碳无毒、价廉、不可燃、易回收、清洁无污染, 并且它的超临界条件(31.5℃, 7.29MPa)很易达到。早在上世纪 90 年代, 超临界二氧化碳(supercritical CO₂, SC-CO₂)便已应用于制浆方面。Jansson MB 等将评价浆质量的二氯甲烷萃取物用超临界二氧化碳萃取物来替代, 结果表明实验时间大为缩短而对人体无害^[5]。曾有 SC-CO₂ 处理不能使松木的显微形态发生变化的报道, 从而认为 SC-CO₂ 对纤维材料不是一种有效的处理手段^[6,7]。但也有研究表明高温高压下的 SC-CO₂ 能显著提高木质纤维素的酶解效率^[8], 且木

素含量降低^[9]。

近来, 超临界流体在酶催化反应, 尤其是 SC-CO₂ 酶催化反应在生物工程中的应用, 引起人们广泛兴趣^[8,10,11]。而一种经济有效的预处理技术, 正是提高纤维素酶解效率的关键所在^[12,13]。基于以上分析, 本实验研究了 SC-CO₂ 预处理对纤维素超分子结构及对酶催化反应的影响, 并探讨了预处理后纤维素的酶解情况, 有利于进一步探索纤维素酶作用机理。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 纤维素粉:微晶纤维素购自 Sigma 公司, 直接过筛, 100~160 目。

1.1.2 纤维素酶:本实验室保存菌种 *Trichoderma pseudokoningee* S-38 在麸皮、玉米秸粉固体培养基上 28℃ 静置培养。用 0.05mol/L, pH4.8 的醋酸缓冲液浸泡 4h, 离心超滤得粗酶液。酶活力为 3IU/mL(1IU 定义为 pH4.8, 50℃, 1min 产生 1μmol 葡萄糖所需酶量^[3])。

1.2 方法

1.2.1 SC-CO₂ 处理:自制超临界设备, 容积 2L, 最

收稿日期:2004-03-02, 修回日期:2004-06-11。

基金项目:科技部重点基础研究发展规划项目("973")资助(No.2003CB716006)。

* 通讯作者。 Tel:86-531-8364384-8201; Fax:86-531-8565610; E-mail:gaopj@sdu.edu.cn

大压力 45MPa。处理条件 10MPa, 50℃, 30 min。为了研究加酶超临界处理的情况, 处理前向纤维素粉中加入一定量的纤维素酶液。用蒸馏水调节纤维素含水量的不同。预处理后的纤维素置于冰箱冷藏以待分析。

1.2.2 纤维素的酶解:干重为 50mg 经不同处理的纤维素材料加适量酶液与 0.02mol/L, pH4.8 醋酸缓冲液, 50℃ 水浴摇床酶解。每隔一定时间取样 1mL, 10000r/min 离心 5 min。取上清 DNS 法测定还原糖量^[8]。每个样品做 3 个平行。对照用灭活的酶代替有活力的酶。以还原糖的减少来表示酶解率。

1.2.3 红外分析:SC-CO₂ 处理后的纤维素粉置于 28℃ 烘箱中 48h, 轻研磨, 用傅立叶变换红外光谱分析仪做表面反射分析。用 OMNIC 软件分析红外图谱。2900cm⁻¹ 谱带属于 CH 伸缩振动, 以其强度的变化为内标, 表征纤维素内氢键网络强度的变化; 710cm⁻¹ 和 750cm⁻¹ 分别为纤维素晶体 I_β 和 I_α 的特征谱带, I_β 晶体更难以被降解^[14]。

2 结果及分析

2.1 SC-CO₂ 处理对纤维素酶活力的影响

10mL 酶液经 10MPa, 50℃ 处理 30 min, 酶水解活力几乎无损失。但当纤维素酶与纤维素共处理时, 相同条件下酶催化活力(水解活力)则已丧失(如图 1), 而无还原糖的产生。

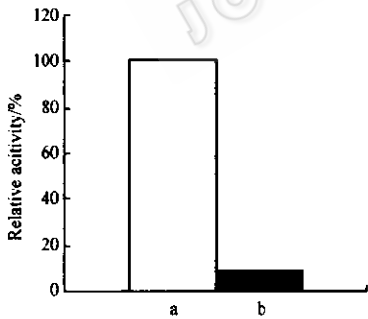


图 1 与纤维素共存时 SC-CO₂ 处理对纤维素酶活的影响

Fig.1 The cellulase activity before(a) and after(b) SC-CO₂ pretreatment in the presence of cellulose

2.2 SC-CO₂ 处理后纤维素的酶解实验

2.2.1 加纤维素酶 SC-CO₂ 处理的样品比不加酶处理的样品对纤维素酶有更高的敏感性:依实验方法 1.2.2, 加 5mL 酶液, 50℃ 水浴摇床酶解, 测还原糖-时间曲线。从酶解效率来看, 处理效果 Cellulase + SC-CO₂ > SC-CO₂ (如图 2)。

2.2.2 经 SC-CO₂ 处理过的纤维素的酶解与处理过

程中加酶量的关系: 在 SC-CO₂ 处理前的微晶纤维素中加入不等量纤维素酶, 处理后取样进行酶解实验。结果表明, SC-CO₂ 处理使纤维素有利于酶解, 而这种效应是随处理过程中酶用量的增大而加强的(如图 3)。

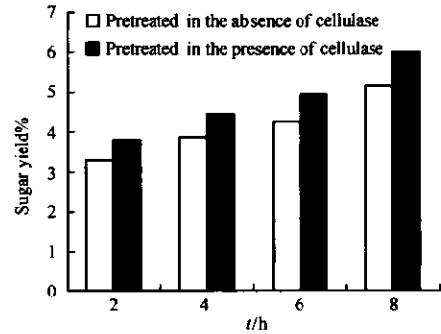


图 2 SC-CO₂ 处理后纤维素的酶解-时间曲线

Fig.2 Time course of the enzymatic hydrolysis of cellulose SC-CO₂ pretreated in the presence or absence of cellulase

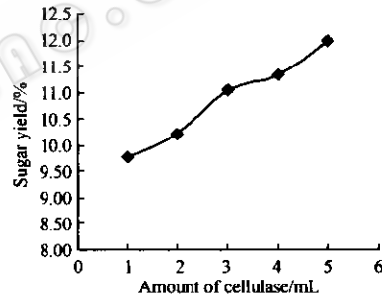


图 3 SC-CO₂ 处理中加酶量与纤维素酶解

Fig.3 The effect of the amount of cellulase during SC-CO₂ pretreatment to the enzymatic hydrolysis of cellulose

2.3 纤维素含水量对预处理效果的影响

60% 含水量纤维素的超临界预处理效果显著大于充分吸水后 (> 100 %) 的纤维素, 如图 4。说明处理前纤维素样品的含水量对 SC-CO₂ 预处理效果有重要影响。

2.4 SC-CO₂ 处理后纤维素的红外结构分析

综合以上实验, SC-CO₂ 加酶处理的效果比不加酶处理更为明显, 而在加酶处理过程中并无还原糖的产生, 且处理效果随处理过程中酶用量的加大而增强, 我们推测可能是 SC-CO₂ 处理使纤维素结构发生变化的缘故。依实验方法 1.2.3 做红外结构分析, SC-CO₂ 处理前后及加酶处理试样的 FT-IR 谱带如图 5 所示。

从图 5-A 可以看出, 存在纤维素酶时, 经 SC-CO₂ 处理, 纤维素的氢键区强度较单纯 SC-CO₂ 处理

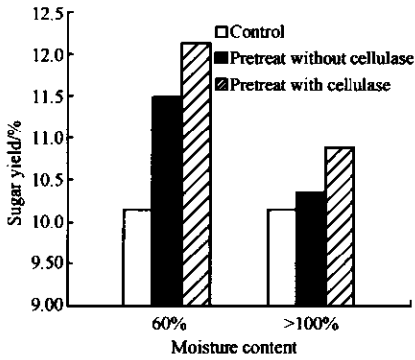


图4 纤维素含水量与 SC-CO₂ 处理后的酶解

Fig.4 The effect of moisture content of cellulose before SC-CO₂ pretreatment to the enzymatic hydrolysis

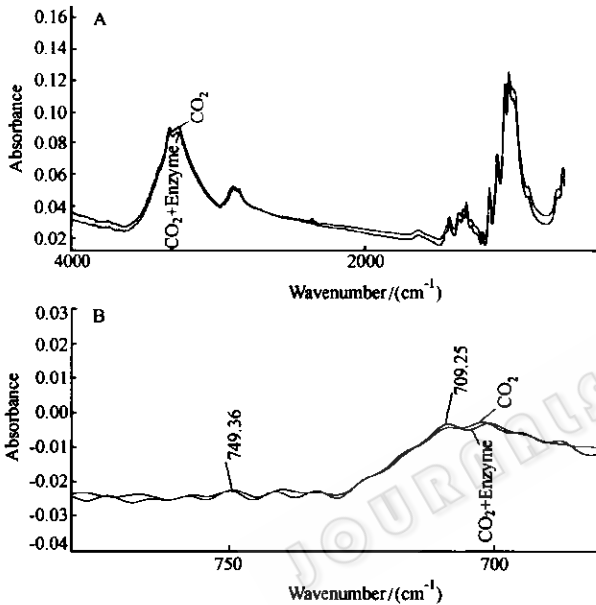


图5 纤维素经 SC-CO₂ 预处理后的红外图谱

Fig.5 IR spectra of cellulose SC-CO₂ pretreated with and without cellulase

为低。而且从图 5-B 可以看出,加酶处理后的样品表征 I_β 的 710cm⁻¹ 谱带的强度有所降低。说明纤维素的超分子结构发生了有利于酶解的变化。

3 结 论

纤维素的酶解首先为纤维素分子链的解聚、断裂,在此过程中,分子内、间氢键网络的存在起关键作用^[3]。图 5-A 表明,在 SC-CO₂ 条件下,纤维素酶的催化活力虽然全部丧失,但在处理过程中却可导致纤维素氢键网络强度的降低。进一步的分析表示(图 5-B),最难被酶解的 I_β 晶体的强度(710cm⁻¹)在上述处理中也会降低。

这些变化都有利于纤维素材料进一步被酶解。

SC-CO₂ 预处理可提高纤维素的酶解效率已有报道^[8],但在 SC-CO₂ 条件下,纤维素酶可使纤维素材料发生有利于进一步被酶解的变化的结果尚未见报道。在同样条件下,酶的催化(水解)活力却全丧失,这表明纤维素酶分子的水解催化活力与导致纤维素结构变化的“活力”显然来自不同的结构域^[3]。这为我们发现的纤维素酶结合结构域可导致纤维素氢键的断裂,提供了一个新的有力的证据。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bellamy WD. Single cell protein from cellulosic wastes. *Biotechnol Bioeng*, 1974, 26: 869 - 880
- [2] Wang LS(王禄山), Zhang YZ(张玉忠), Gao PJ(高培基). Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(4): 819 - 824
- [3] Gao PJ(高培基). Progress in the mechanism of cellulose degradation and structure-function studies of cellulases. *Progress in Natural Science* (自然科学进展), 2003, 13(1): 21 - 29
- [4] Sequeira AJ, Taylor LT. Supercritical fluid extraction of wood pulps. *J Chromatography Sci*, 1992, 30(10): 405
- [5] Jansson MB. Analysis of pulp extraction. 7th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, 1993, 2: 795 - 801
- [6] Ritter DC, Campbell AG. The effect of supercritical carbon dioxide extraction on pine wood structure. In: Scott, C D (Ed.), Eighth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Wiley, New York, 1986, pp. 179 - 182
- [7] Ritter DC, Campbell AG. Supercritical carbon dioxide extraction of southern pine and ponderosa pine. *Wood Fiber Science*, 1991, 23: 98 - 113
- [8] Kyoung HK, Juan H. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 2001, 77: 139 - 144
- [9] Shan MM, Lee YY. Effect of pretreatment on simultaneous saccharification and fermentation of hardwood into acetone/butanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, 28/29: 99 - 109
- [10] Xu HJ(徐慧娟), Zhu ZQ(朱自强), Yang LR(杨立荣). Enzymatic catalysis in supercritical fluids. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1996, 12(3): 232 - 237
- [11] Lin CM(林春绵). Enzymatic reactions in supercritical fluid. *Journal of Zhejiang University of Technology* (浙江工业大学学报), 1996, 24(4): 335 - 342
- [12] He T(何涛), Chen MC(陈鸣才), Hu HQ(胡红旗) et al. The application of supercritical fluid to cellulose. *Journal of Cellulose Science and Technology* (纤维素科学与技术), 2003, 11(3): 40 - 49
- [13] Chen HZ(陈洪章), Li ZH(李佐虎). Lignocellulose cellulose fractionation. *Journal of Science and Technology* (纤维素科学与技术), 2003, 11(4): 31 - 40
- [14] Kataoka Y, Kondo T. Quantitative analysis for the cellulose Ia crystalline phase in developing wood cell walls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 24(1): 37 - 41

Effect of Supercritical CO₂ to Cellulase Reaction

XIN Wei¹ WANG Xiu-Dao² YIN Zhuo-Rong² GAO Pei-Ji^{1*}

¹(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

²(Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250100, China)

Abstract The effects of pretreatment of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) on the supramolecular structure of cellulose and the cellulase catalyzed reaction were investigated. The cellulase activity was not affected when it was treated with SC-CO₂ at 10MPa and at 50°C for 30 min. But when the cellulase was treated by SC-CO₂ in the presence of cellulose, the catalytic activity of the cellulase was lost. The cellulose pretreated with or without cellulase under the same SC-CO₂ condition was then hydrolyzed with fresh crude cellulase. The final reducing sugar yield from the hydrolysis of the cellulose pretreated with cellulase was higher than that of the cellulose pretreated without cellulase. It was also found that the improvement of the enzymolysis had a direct relevance with the amount of cellulase used during the SC-CO₂ pretreatment. The moisture content of cellulose before SC-CO₂ pretreatment had an obvious influence on the subsequent enzymolysis. When the moisture content of cellulose was 60 % (W/W), the reducing sugar yield was higher than when the moisture content was over 100 % (W/W).

The FT-IR spectra showed that the structure of the cellulose pretreated with cellulase under the SC-CO₂ condition was different from that of the cellulose pretreated without cellulase. In the presence of the enzyme, the strength of the hydrogen bonds and the I_β phase at 710cm⁻¹ in the crystalline cellulose was weakened. These results suggest that the change in the cellulose structure induced by the SC-CO₂ treatment favours the subsequent enzymolysis.

Key words cellulose, cellulase, SC-CO₂

Received: 03-02-2004

This work was supported by National Basic Research Priorities Program of China(No. 2003CB716006).

* Corresponding author. Tel:86-531-8364384-8201; Fax:86-531-8565610; E-mail:gaopj@sdu.edu.cn

多酚化合物防癌抗癌研究

多酚化合物是抗氧化物之一,这种化合物在绿茶中含量丰富,其中如 EGCG(中文名:表没食子儿茶素没食子酸酯,也有叫“表儿茶素鞣酸盐”),在防癌、抗癌中起重要作用。我国中南大学研究人员开展这方面研究已多年,发现 EGCG 抗癌(指血癌),效力在于它具有诱导癌细胞“自杀”的功能,也就是说,它具有抑制癌基因的低表达,诱导抗癌基因的高表达,这些基因的表达改变,最终诱使血癌(白血病)细胞凋亡,从而证实 EGCG 诱导癌细胞“自杀”现象的分子机理,这些已通过实验研究加以证实。7年后美国研究人员的试验获得了类似的结果,发现 EGCG 的成分通过干扰血癌细胞生存所需要的信号传递之助以促使血癌细胞的死亡,这项实验室研究成果证实,绿茶中的 EGCG 能诱导实质性瘤中的癌细胞死亡。其实,绿茶的抗氧化物不仅对血癌有预防和诱导癌细胞“自杀”或死亡的效果,而且对多种癌症如肝癌、肺癌、皮肤癌和食道癌等有预防作用。有的研究者发现绿茶中的抗氧化物(EGCG)能与肿瘤细胞的一种蛋白质(指粘蛋白受体)结合,并减慢肿瘤细胞生长速度,这一发现有助于进一步了解 EGCG 与癌细胞之间的作用,为什么它能使癌细胞生长减慢?以及它们之间的分子生态关系等方面探究,这样将会更有效地使 EGCG 在防癌、抗癌方面得到应用。

总之,尽管喝绿茶有众多好处,但对那些结石病人来说,不宜喝茶。

(柯 为)