

应用化工

Applied Chemical Industry

ISSN 1671-3206, CN 61-1370/TQ

## 《应用化工》网络首发论文

题目: 木聚糖酶原位协同水解预处理大米草的研究  
作者: 杨旸, 刘健, 甘礼惠, 龙敏南  
DOI: 10.16581/j.cnki.issn1671-3206.20191104.003  
网络首发日期: 2019-11-04  
引用格式: 杨旸, 刘健, 甘礼惠, 龙敏南. 木聚糖酶原位协同水解预处理大米草的研究. 应用化工. <https://doi.org/10.16581/j.cnki.issn1671-3206.20191104.003>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 木聚糖酶原位协同水解预处理大米草的研究

杨旻, 刘 健<sup>✉</sup>, 甘礼惠, 龙敏南

(厦门大学能源学院, 福建 厦门 361102)

✉通信作者 刘健(1978-), 男(汉), 山东乐陵人, 教授级高工, 主要研究方向为生物质化工, 电子邮箱: jianliu@xmu.edu.cn, 电话: 0592-5952787

**摘要** 实验主要研究了氨水/双氧水结合球磨预处理对重组木聚糖酶协同水解大米草的增强效果。首先使用氨水与双氧水预处理大米草, 预处理物与原料大米草随后用于球磨。然后将预处理底物分别用于结构表征及木聚糖酶的协同酶解。结果说明氨水结合双氧水预处理能有效脱除大米草中的木质素(63.81%), 球磨处理能对纤维素结晶结构有所破坏, 两者有效提高木聚糖酶的水解率。而经预处理过的大米草的酶水解物主要成分为木糖(12.54%), 木二糖(40.38%), 及少量阿拉伯糖(5.50%)。以上结果说明碱预处理结合球磨预处理对后续木聚糖酶协同水解大米草产木寡糖具有明显的促进作用。

**关键词** 碱预处理; 球磨预处理; 协同水解; 木糖; 木寡糖

**中图分类号** TQ150

## In-situ synergistic hydrolysis of pretreated *Spartina* by xylan enzymes

YANG Yang, LIU Jian<sup>✉</sup>, GAN Lihui, LONG Minnan

(College of Energy, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract** In the experiment, the effect of ammonia/hydrogen peroxide combined with ball milling pretreatment on the synergistic hydrolysis of *Spartina* by recombinant xylan enzymes was studied. Firstly, the *Spartina* is pretreated with ammonia/hydrogen peroxide, and the pretreated samples and raw material are subsequently used for ball milling. Then the substrate obtained from pretreatment was used for structural characterization and synergistic enzymatic hydrolysis using xylan enzymes. The results showed that ammonia/hydrogen peroxide pretreatment could effectively remove lignin from *Spartina* (63.81%), and ball milling treatment can destroy the crystal structure of cellulose. The two pretreatments both can effectively improve the hydrolysis efficiency of xylan enzymes. The main components of the enzymatic hydrolysate of ammonia/hydrogen peroxide combined with ball milling pretreated *Spartina* are xylose (12.54%), xylobiose (40.38%), and a small amount of arabinose (5.50%). The above results indicate that ammonia/hydrogen peroxide pretreatment combined with ball milling pretreatment can significantly enhance the synergistic hydrolysis efficiency of xylan enzymes to produce xylooligosaccharides from *Spartina*.

**Key words** alkali pretreatment; ball-milling pretreatment; synergistic hydrolysis; xylose; xylooligosaccharides

目前, 利用半纤维素获取木寡糖的常用方法为酶水解。相较于其他方式<sup>[1, 2]</sup>, 酶水解污染小且产生的副产物少<sup>[3, 4]</sup>。然而由于生物质结构复杂, 使直接酶解的效率低<sup>[5]</sup>, 故实验使用了氨水/双氧水与球磨相结合的方式预处理大米草, 在脱除木质素的同时保留了相当量的半纤维素, 并破坏其结晶结构。大米草中除木聚糖外还含有 2.13% 的侧链阿拉伯糖<sup>[6]</sup>, 因此实验选择了源于黑曲霉, 在毕赤酵母中高效表达的重组内切- $\beta$ -1,4-木聚糖降解酶和重组  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶水解经预处理后的大米草。探究了氨水/双氧水与球磨预处理方式相结合及协同酶解对大米草木聚糖水解效率及协同降解机制的影响。

基金项目: 厦门大学能源发展基金(2018NYFZ03)

作者简介: 杨旻(1991-), 女(汉), 贵州贵阳人, 在读硕士, 师从龙敏南教授和刘健教授, 研究方向为生物质高值化利用, 电子邮箱: 3093786672@qq.com, 电话: 18860027231

网络首发时间: 2019-11-04 09:34:40 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1370.TQ.20191104.0846.006.html>

## 一、实验部分

### (一)、材料与仪器

实验所用大米草收割于福建省，厦门市翔安区沿海滩涂，粉碎至 40~60 目待用；氨水(25%~28%)，双氧水(30%)，硫酸(98%)为分析纯，购自西陇科学股份有限公司；柠檬酸缓冲液(50mmol/L, pH 5)；实验所用酶为实验室保存重组内切- $\beta$ -1,4-木聚糖降解酶(AnXyn10C, XC, 306 IU/ml, GenBank accession No.KJ601783)， $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶(AnAxb62A, AX, 38.9 IU/ml, GenBank accession No. KJ601782)来源于黑曲霉，在毕赤酵母中高效表达。

意大利 VELP 公司 FIWE 纤维素测定仪；南京大学仪器厂 QM-3Spartina04 行星式球磨机；日本 Rigaku 公司 ULTIMA IV X 射线衍射仪；赛默飞世尔科技公司 Nicolet iS5 傅立叶变换红外光谱仪；德国卡尔蔡司公司场发射扫描电镜 SUPRA 55；Molecular Devices 美国 M2 多功能酶标仪；美国 Waters 公司 Waters2695 高效液相色谱仪。

### (二)、氨水/双氧水预处理

称取 2 g 大米草，32 g 去离子水，2 g 双氧水及 6 g 氨水加入 120 mL(46mm $\times$ 130 mm)耐压瓶中。充分浸泡后的混合物分别在 110 $^{\circ}$ C，120 $^{\circ}$ C，130 $^{\circ}$ C 的恒温油浴锅中反应 1 h, 3 h, 4 h, 5 h 及 6 h。反应结束后过滤分离固体，并用去离子水多次冲洗固体至中性，所得固体在 75 $^{\circ}$ C 下烘至绝干，称重后置于干燥皿室温保存待用。

### (三)、球磨预处理

称取 200 mg 氨水/双氧水预处理大米草及原料大米草于玛瑙球磨罐，400 r/min 下球磨 2 h。球磨后的固体置于干燥皿室温保存待用。

### (四)、酶水解

准确称取 200 mg 底物于离心管，分别或同时加入 135  $\mu$ L 的 AnXyn10C 与 46  $\mu$ L 的 AnAxb62A，再添加柠檬酸缓冲液至固：液=1:100，在 50 $^{\circ}$ C 恒温混匀仪中 300 r/min 反应 24 h。反应结束后将离心管置于沸水中煮 10 min 灭活，再置于离心机 12,000r/min 离心 5 min，收集上层清液，-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。木聚糖水解率按[1]中计算：

$$\text{木聚糖水解率(\%)} = (\text{C}_{\text{还原糖}} * 10) / \text{S}_{\text{保留半纤维素含量}} \quad [1]$$

其中 C<sub>还原糖</sub> (mg/ml)是酶水解产物中还原糖浓度，S<sub>保留半纤维素含量</sub>是预处理剩余固体中半纤维素的百分含量。

### (五)、结构与表征

#### 1、化学组成分析

原料大米草及预处理后的大米草的成分确定方法参考 NREL 方案<sup>[7]</sup>。酶水解液中的成分由带有紫外检测器及 C18 柱(CAPCELL PAK C18 MG II)的高效液相(HPLC)分析确定，方法参考前文<sup>[8]</sup>。

#### 2、SEM 分析

原料大米草及预处理后的大米草的表面形态由场发射扫描电子显微镜(SEM)观察表面形态。所有样品粉末经过喷金处理，在 20 kV 下操作。

#### 3、XRD 分析

将原料大米草及预处理后的大米草于红外干燥箱下干燥 2 h，用玛瑙研磨皿充分研磨至粉状待测。测试条件：Cu 靶 ( $K\alpha=0.154$  nm)；管电流：40 mA；管电压：40 kV；扫描率为 3%/min，从 10 $^{\circ}$  到 60 $^{\circ}$ 。

#### 4、FTIR 分析

将原料大米草及预处理后的大米草与 KBr 按 1:100 (w/w) 混合，在红外烘干箱中研磨至粉末状。用 Nicolet-iS5 仪进行分析，测试条件：4000  $\text{cm}^{-1}$ ~500  $\text{cm}^{-1}$  波数范围，32 次扫描，所有情况下光谱分辨率保持在 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

## 二、结果与讨论

### (一)、氨水/双氧水预处理的大米草的化学组成

原料大米草的组成为纤维素 34.04%，半纤维素 26.45%，木质素 25.73%，水分含量约 9.80%。从表 1 可以看出，基于原始物料重，经过不同碱预处理条件的大米草的固体回收率从 49.00% 到 57.01%，其中固体的损失主要是由于生物质在碱预处理中有部分成分溶解，如木质素及半纤维素等。从成分分析可以看出大部分的纤维素及相当量的半纤维素被保留在了固体中，尤其是纤维素，大米草中超过 95.00% 的纤维素被保留了下来，没有受到碱预处理的影响。这是由于氨水对纤维素/半纤维素的低反应性<sup>[9]</sup>纤维素结晶区域高结晶度的结果。从表 1 可以看出，最高和最低的木质素脱除率分别为 73.39% 及 61.75%，分别在碱处理条件为 120℃，6 h 和 120℃，1 h 时发生。木质素的脱除主要是由于氨破坏了木质素分子间的酯键，而双氧水通过其氧化作用加速了这一过程<sup>[9, 10]</sup>。这些结果说明，氨水/双氧水的预处理可以在保留相当量的纤维素/半纤维素的情况下，脱除大部分的木质素，而木质素的脱除程度则随着预处理条件的加剧而增大。从表 1 中还可以看出，碱预处理温度从 110℃ 升至 130℃，木质素脱除率从 65.36% 升到 68.87%，尽管木质素脱除量增加，但纤维素/半纤维素损失也随之增大。这说明严苛的氨水/双氧水预处理条件尽管有利于木质素的脱除，但同时也会导致纤维素/半纤维素的损失增大，从而使后续酶水解的糖得率降低。

表1 经不同碱预处理条件处理的底物的化学成分  
Table 1 Chemical compositions of substrate which through different pretreatment conditions

时间(h)	温度(℃)	固体得率 (%)	纤维素 (%)	半纤维素 (%)	酸溶性木质素 (%)	脱木质素 (%)
4	110	55.36	41.82	19.11	11.18	65.36
4	120	54.71	54.22	20.72	9.20	67.79
4	130	52.88	55.14	20.48	9.20	68.87
1	120	57.49	48.92	26.67	10.40	61.75
3	120	52.97	46.07	20.63	10.68	63.81
5	120	51.21	57.01	24.27	9.00	71.87
6	120	49.00	45.75	27.72	8.20	73.39

### (二)、预处理大米草结构的表征

从图 1 可以看出经不同预处理的底物对比原料底物表面形态的变化。图 1(A)中大米草原料微观呈杆状，相较其他两组表面更光滑，原料经球磨后破碎成硬质细小颗粒状分散，如图 2(b)。从图 2(c)可以看出，经过碱预处理的大米草本身结构被一定程度的破坏，其微观形态虽然不如球磨处理物细小，但呈更为松散的絮状物状态。从酶解效率来说，底物结构破坏程度越大，酶对底物的可及性越高，酶解效率也就越高，因此无论经过碱处理还是球磨处理，都有利于后续的酶解效率的提高。

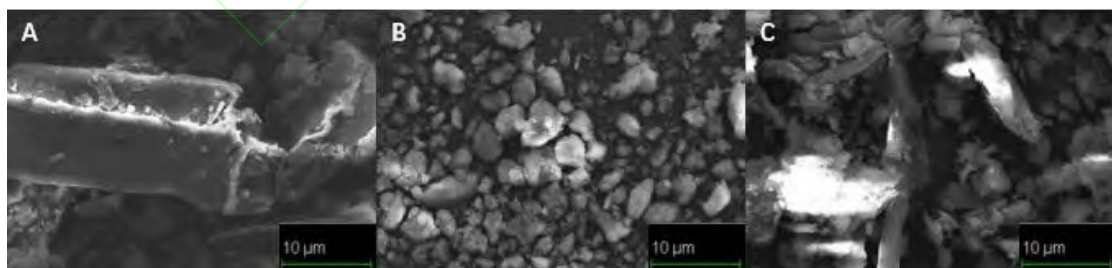


图 1 (A)原料，(B)经球磨处理的原料，(C)120℃，4h 碱预处理的大米草的扫描电子显微镜图片

Fig 1 SEM micrographs of (A) raw material, (B) raw material through ball-milling (C) 120℃, 4h alkaline-treated condition Spartina

经过球磨处理的大米草及其原料的结晶情况分析如图 2，最大的峰  $2\theta = 22^\circ$  代表了天然纤维素 (0 0 2) 衍射面<sup>[9]</sup>，小峰  $2\theta = 34^\circ$  代表了 (0 0 4) 衍射面，这个峰在球磨预处理的底物图 2 (b) 中不再明显，说明结晶区有所破坏。而在经过球磨预处理的底物图 2 (c) 中则已经被完全消失。可以看出，球

磨对生物质底物结晶度的破坏明显，已有文献说明这是因为球磨对纤维素的结晶区域具有破坏作用<sup>[11]</sup>。

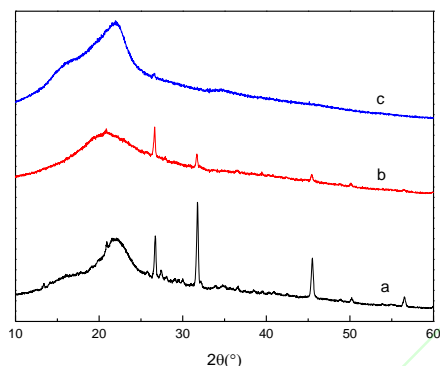


图2 (a)原料, (b)120°C, 4 h 碱预处理的大米草, (c)经球磨处理的原料的 X 射线衍射图  
Fig 2 X-ray diffraction patterns of (a) raw material, (b) 120°C, 4 h alkaline-treated condition Spartina, (c) raw material through ball-milling,

图3 是不同处理条件下底物的红外分析谱图。3400  $\text{cm}^{-1}$  的峰代表生物质中吸附的水分子的 O-H 伸缩振动峰。2910  $\text{cm}^{-1}$  和 1420  $\text{cm}^{-1}$  处的峰主要对应的是对称和不对称的 C-H 伸缩振动。1060  $\text{cm}^{-1}$  附近的两个峰与碳水化合物的 C-O 和 C-H 伸缩振动有关<sup>[12]</sup>。在 895  $\text{cm}^{-1}$  的峰与纤维素中的 C-H 振动有关，是纤维素的吸收特征峰。在 1260  $\text{cm}^{-1}$  处的峰是木质素酯键的 C-O-C 振动造成的。可以看出，无论是球磨还是氨水/双氧水的预处理，基本都不改变底物的成分，只改变组分含量。

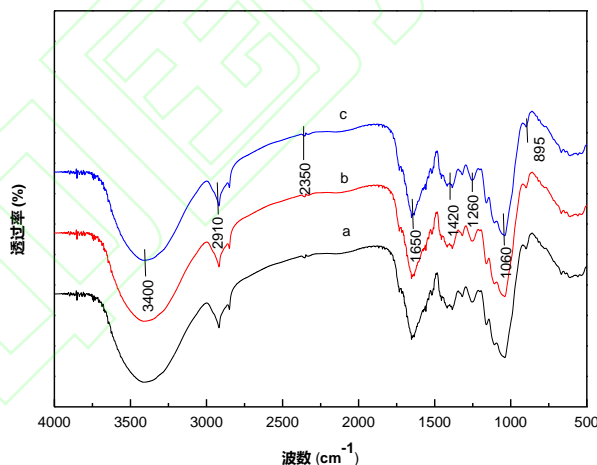


图3 (a)原料, (b)经球磨处理的原料, (c)120°C, 4 h 碱预处理的原料的傅里叶红外光谱图  
Fig 3 FTIR of (a) the raw material, (b) the raw powder through ball-milling, (c) 120°C 4 h, alkaline-treated condition Spartina

### (三)、预处理对木聚糖降解酶协同作用的影响

如图4 (A, B), 当大米草只经过氨水/双氧水预处理时, 相比于未经过预处理的原料, 水解效率极大地提高。

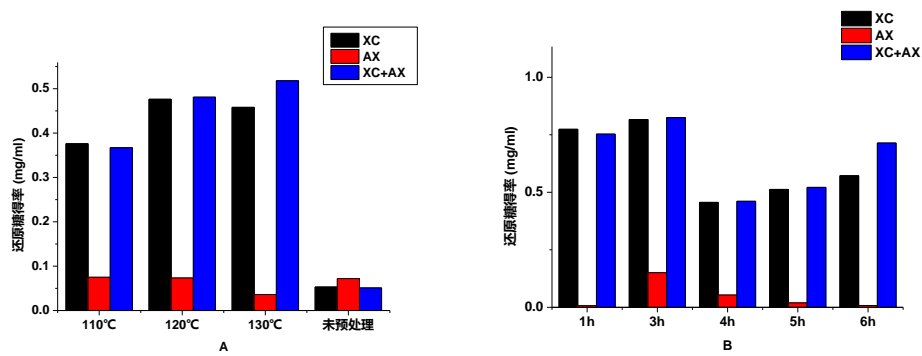


图 4 (A) 经不同温度, 4 小时 (B) 经不同时间, 120°C 碱预处理的底物及原料的酶解所得还原糖浓度  
 Fig 4 The reducing sugar concentration of substrate just pretreated by alkali (A) at different temperatures, 4 hours (B) at different time, 120°C and raw material

从表 2 及表 3 可以看出, 经过球磨预处理的底物, 协同酶解所得的还原糖浓度是没有经过球磨的近七倍, 未经过球磨的底物即使在木质素脱除率很高的情况下, 半纤维素仍然没有很高的协同酶解率(表 2), 两种木聚糖降解酶间的协同作用并不明显。这主要是由于碱预处理无法破坏纤维素的结晶结构, 而这些结晶结构阻碍了木聚糖降解酶对半纤维素的可及性。

表2 经过不同碱预处理条件处理的底物的还原糖得率  
 Table 2 The reducing sugar yield of substrates which through different alkali pretreatment conditions

时间(h)	温度(°C)	还原糖浓度(mg/ml)	半纤维素降解率(%)
4	110	0.367	19.20
4	120	0.481	23.21
4	130	0.518	25.29
1	120	0.753	28.23
3	120	0.825	39.99
5	120	0.521	21.47
6	120	0.714	25.76
a	/	0.0397	2.33

a 未处理大米草

表3 经过不同条件碱预处理结合球磨处理的底物的还原糖得率  
 Table 3 The reducing sugar yield at different alkali pretreatment conditions that combined with ball-milling

时间(h)	温度(°C)	还原糖浓度(mg/ml)	半纤维素降解率(%)
4	110	1.189	62.22
4	120	1.185	57.19
4	130	0.995	48.58
1	120	1.698	63.67
3	120	1.381	66.94
5	120	1.186	48.87
6	120	1.057	38.13
b	/	0.262	15.36

b 只经球磨处理的大米草

从图 5 可以看出, 同时经过碱预处理及球磨预处理的底物酶解还原糖得率高于仅用碱预处理的底物。而与图 4 一样, 两种酶协同的效果优于单独使用其中一种酶。这主要是因为 AnXyn10C 能够切断木糖单元间的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 从木聚糖主链上释放木单糖<sup>[13]</sup>, Axh62A 则能通过水解木聚糖侧链上阻碍 AnXyn10C 作用于主链的的阿拉伯糖基来改善水解效果<sup>[14]</sup>。在 110°C, 4 h 的碱预处理结合球磨, 木聚糖降解酶的协同酶解可以得到最高的还原糖得率。故选择 110°C, 4 h 作为酶解底物的预处理条

件, 通过液相分析水解物成分可知木糖占 12.54%, 木二糖占 40.38%, 阿拉伯糖占 4.65%。说明经过预处理的底物由木聚糖降解酶协同酶解, 除了产生木糖外, 更多产生具有高附加价值的木寡糖。

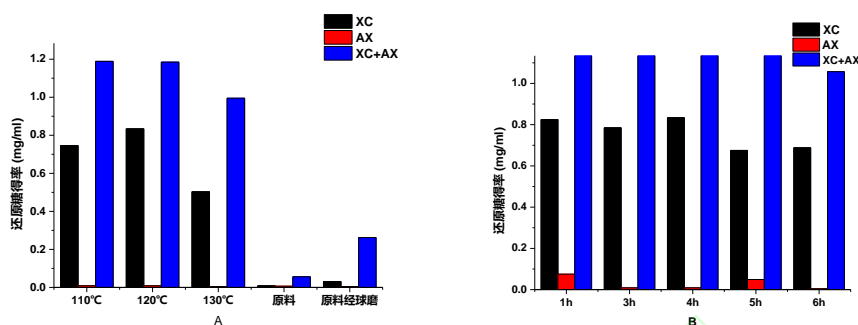


图 5 (A) 经不同温度, 4 小时 (B) 经不同时间, 120°C 碱预处理结合球磨(BM)预处理的底物及原料(R)酶解所得还原糖浓度  
Fig 5 The reducing sugar concentration of substrate powder from alkali with ball-milling (A) at different temperatures, 4 hours (B) at different time, 120°C

### 三、 结论

(1)氨水/双氧水预处理能够有效脱除大米草中所含的木质素, 有利于后续木聚糖降解酶的水解, 但对纤维素的结晶结构无影响。

(2)球磨预处理可以破坏生物质所含纤维素的结晶区域, 从而降低底物的结晶度, 使得木聚糖降解酶对底物的可及性增大。故球磨可以与氨水/双氧水预处理相结合, 共同作用于大米草, 辅助后续木聚糖降解酶的酶解。

(3)实验室的重组木聚糖主链酶及侧链酶可以结合氨水/双氧水及球磨预处理更大程度的发挥对大米草的协同酶解效果。生产具有高附加价值的木寡糖和阿拉伯糖。

### 参考文献

- [1] Akpinar O, Erdogan K, Bakir U, et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010,43(1):119-25.
- [2] Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials[J]. Carbohydrate Research, 2009,344(5):660-66.
- [3] Moure A, Dominguez G H, Parajo J C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals[J]. Process Biochemistry, 2006,41(9):1913-23.
- [4] Álvarez C, González A, Negro M J, et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides[J]. Industrial Crops and Products, 2017,99:41-48.
- [5] Otieno D O, Ahring B K. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS)[J]. Carbohydrate Research, 2012,360(none):84--92.
- [6] 谢茹胜, 刘健, 龙敏南. NREL 法测定大米草原料组分的含量[J]. 井冈山大学学报(自然科学版). 2016, 37(05): 43-46.
- [7] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[J]. LAPs, 2008,1617:1-16.
- [8] Li H, Long C, Zhou J, et al. Rapid analysis of mono-saccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC[J]. Biotechnology Letters, 2013,35(9):1405-09.
- [9] Mittal A, Rui K, Himmel M E, et al. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011,4(1):41-41.
- [10] Tae Hyun K, Jun Seok K, Changshin S, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia[J]. Bioresource Technology, 2003,90(1):39-47.
- [11] Schwanninger M, Rodrigues J C, Pereira H, et al. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose[J]. Vibrational Spectroscopy, 2004,36(1):23-40.
- [12] Saelee K, Yingkamhaeng N, Nimchua T, et al. An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization[J]. Industrial Crops and Products, 2016,82:S0926669015305665.
- [13] Li H L, Wu J L, Jiang F J, et al. Functional expression and synergistic cooperation of xylan-degrading enzymes from *Hypocrea orientalis* and *Aspergillus niger*[J]. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 2015,90(11):2083-91.
- [14] P. Raweesri P R, P. Pinphanichakarn.  $\alpha$ -L -Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22 : Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues[J]. Bioresource Technology, 2008,99(18):8981-86.