

鲜浒苔稀硫酸水解产糖工艺研究

冯大伟^{1,2}, 姜 鹏², 李富超², 秦 松¹, 赵 瑾², 陈华新²

(1. 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室 中国科学院 烟台海岸带研究所 山东烟台 264003; 2. 实验海洋生物学重点实验室 中国科学院 海洋研究所 山东青岛 266071)

摘要:分别用质量分数为 0.6%、1.0%、1.4%、1.8%、2.2%的稀硫酸在 121℃ 高温高压的条件下水解鲜浒苔 30、60、90 min, 浒苔水解残留物再用纤维素酶酶解, 用 DNS 法测定上述各步骤中的还原糖产量。结果表明, 浒苔总糖含量为 67.2%。稀硫酸水解工艺中, 硫酸质量分数为 1.8%、水解 90 min, 浒苔还原糖转化率最高, 达 59.9%, 每克干质量浒苔可产生 447.0 mg 还原糖。稀硫酸水解残留物纤维素酶酶解工艺中, 浒苔还原糖转化率较低, 在硫酸质量分数为 0.6%、水解时间为 60 min 时还原糖转化率出现最大值, 仅为 6.5%。结果显示浒苔稀硫酸水解产还原糖效果显著, 但不能促进纤维素酶酶解。浒苔糖化可单独采用稀硫酸水解工艺, 本实验条件下的最佳工艺条件为 1.8% 硫酸水解 90 min。本研究探索了浒苔糖化工艺条件, 对后续的浒苔燃料乙醇发酵研究具有一定的参考意义。

关键词: 浒苔; 糖化工艺; 酸水解; 酶水解

中图分类号: Q53, Q599

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2014)12-0029-05

doi: 10.11759/hyxx20130804001

浒苔属大型绿藻, 在我国南、北方海区均有分布^[1]。浒苔兼具有性、无性及营养繁殖等多种繁殖方式^[2], 日生长率可达 12.7%^[3], 有些种类还可漂浮生长并大量聚集, 短期内形成可观的生物量^[4-5], 是一种亟待开发的资源生物。尽管浒苔可作为食品、饲料、肥料和药物开发的原料^[6], 但应用仍非常有限, 缺乏大规模资源化利用的新途径。

目前, 生物质产燃料乙醇研究主要是以农业废弃物为原料, 如玉米芯^[7]、甘蔗渣、小麦与稻米秸秆和木屑等^[8]。以大型海藻作为生物质产燃料乙醇的尝试仍非常有限, 仅见 Horn 等^[9]以北方海带 *Laminaria hyperborea* 的提取物——褐藻淀粉和甘露醇为原料进行乙醇发酵, 每克提取物最高可产生 0.43 g 乙醇, 其褐藻淀粉与甘露醇的提取工艺和酒精发酵工艺仍有待进一步优化。由于浒苔藻体柔软, 由单层细胞构成, 较陆地生物质更易于被酸、碱和酶消化, 且浒苔生物量可观, 干基含有 50% 以上的多糖和 10% 左右的纤维素^[10-12], 具有发酵产燃料乙醇的潜力, 作为能源生物开发将为浒苔的资源利用开辟新途径。

生物质糖化是产燃料乙醇的关键工艺, 常见的生物质糖化方法有酸法、酶法, 以及先用酸预处理, 再用酶解生物质等方法^[13-17]。本文对利用浒苔进行稀硫酸水解及纤维素酶酶解进行了比较研究, 确定了本文实验条件下浒苔糖化的最佳工艺, 为进一步

的燃料乙醇发酵研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2008 年 6 月自青岛第一海水浴场采集岸边搁浅堆积的新鲜漂浮浒苔。

1.2 测定浒苔总糖含量

使用改进的硫酸两步水解法测定浒苔总糖含量^[18]。将新鲜浒苔清洗除去盐分、泥沙和杂藻, 于 105℃ 恒温干燥 4 h 至恒重, 为了使浒苔能被硫酸充分水解, 用液氮充分研磨成细微粉末, 然后再次 105℃ 恒温干燥 4 h 至恒重, 称取上述浒苔样品 200 mg 转入试管, 加入 2 mL 72% 的硫酸, 30℃ 水解 60 min, 之后将水解液完全转移至可密封的聚四氟乙烯罐中, 并加入 51.1 mL 蒸馏水将硫酸浓度稀释至 4%, 高压灭菌锅中 121℃ 反应 60 min, 水解液 8 000 r/min 离心 5 min,

收稿日期: 2013-08-04; 修回日期: 2013-11-20

基金项目: 海洋公益项目(201205010); 国家自然科学基金项目(3130-0365); 青岛市科技项目(13-1-4-259-jch); 海洋先导专项(XDA1102-0304, XDA11020303)

作者简介: 冯大伟(1981-), 男, 山东滨州人, 助理研究员, 研究方向: 海岸带生物资源加工与利用, 电话: 0535-2109163, E-mail: dwfeng@yic.ac.cn; 姜鹏, 通信作者, 副研究员, 电话: 0532-82898500, E-mail: jiangpeng@qdio.ac.cn

上清液用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定还原糖含量(测 3 个平行样品)^[19], 浒苔总糖含量计算公式如下:

$$E_s = C \times 53.1 \times 0.9 \times 100/m\%$$

式中, E_s ——浒苔总糖含量; C ——浒苔水解液还原糖浓度; m ——反应体系中浒苔质量; 53.1——水解液总体积; 0.9——换算系数^[16]。

1.3 浒苔稀硫酸水解工艺

将新鲜浒苔清洗除去盐分、泥沙和杂藻, 加入适量蒸馏水后用高速组织粉碎机彻底打碎, 过滤挤压除去水分, 4℃冷藏备用。称取适量新鲜浒苔(干质量 1.0 g)置于 50 mL 的聚四氟乙烯消化罐中, 加 19 mL 蒸馏水使浒苔干物质含量为 5%, 再加入浓硫酸, 设置硫酸梯度终浓度分别为 0.6%、1.0%、1.4%、1.8%、2.2%, 消化罐加盖密封后于高压灭菌锅中 121℃ 分别处理 30、60、90 min, 将反应液过滤、8 000 r/min 离心 5 min, DNS 比色法测定上清液中还原糖含量(测两个平行样品), 浒苔固体残留物用蒸馏水冲洗至 pH 中性(用 pH 试纸测量 pH 为 7.0)并分别收集。

1.4 纤维素酶水解

将每个冲洗至 pH 中性(用 pH 试纸测量 pH 为 7.0)的浒苔稀硫酸水解残留物样品分别与 30 mL 柠檬酸钠缓冲液(pH = 4.6)混合于 150 mL 三角瓶中, 加入 5 mg 纤维素酶(酶活力>30 000 U/g), 恒温摇床中 45℃酶解 48 h, 摇床转速为 120 r/min, 酶解后 8 000 r/min 离心 5min, 上清液用 DNS 比色法测定还原糖含量。

2 结果

DNS 比色法测定浒苔总糖含量为 67.2%。浒苔经不同浓度稀硫酸水解不同反应时间后的还原糖产量(mg/g, 干浒苔)、浒苔稀硫酸水解残留物经酶解后还原糖产量以及二者数值相加的还原糖总产量见表 1。浒苔经不同浓度稀硫酸水解不同反应时间的还原糖转化率(还原糖转化率(%)= 还原糖产量 × 0.9 × 100/(1000 × 浒苔总糖含量))见图 1, 公式中 0.9 为换算系数^[16]。浒苔稀硫酸水解残留物经酶解后还原糖转化率见图 2。

表 1 浒苔经不同浓度稀硫酸水解不同反应时间后的还原糖产量、浒苔稀硫酸水解残留物经酶解后还原糖产量以及还原糖总产量

Tab. 1 Release of reducing sugars from fresh *U. prolifera* (after dilute sulfuric acid hydrolysis; after enzymatic hydrolysis; reducing sugars of the two steps)

H ₂ SO ₄ 质量分数 (%)	反应时间(min)	稀酸水解后还原糖产量 (mg/g)	酶解后还原糖产量 (mg/g)	还原糖总产量 (mg/g)
0.6	30	54.9	30.0	84.9
1	30	87.1	30.0	117.1
1.4	30	90.0	25.0	115.0
1.8	30	84.5	27.3	111.8
2.2	30	82.7	26.1	108.8
0.6	60	195.8	48.8	244.6
1	60	285.8	39.5	325.3
1.4	60	317.2	31.1	348.3
1.8	60	332.4	27.7	360.1
2.2	60	336.0	24.5	360.5
0.6	90	255.7	31.9	287.6
1	90	373.8	28.4	402.2
1.4	90	421.8	21.5	443.3
1.8	90	447.0	17.7	464.7
2.2	90	443.2	14.6	457.8

注: 还原糖总产量(mg/g 浒苔干质量)系将稀酸水解后还原糖产量(mg/g 浒苔干质量)与酶解后还原糖产量(mg/g 浒苔干质量)二者数值相加

3 讨论

DNS 比色法测定浒苔总糖含量高达 67.2%, 进

行燃料乙醇发酵开发具有较好前景。稀硫酸水解和纤维素酶酶解是主要的生物质糖化工艺, 稀硫酸水解能够得到一部分还原糖, 并破坏剩余多糖的结构, 从

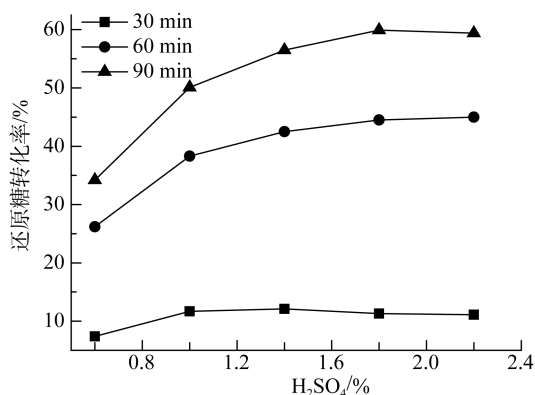


图 1 浒苔经稀硫酸水解后的还原糖转化率

Fig. 1 Conversion rate of reducing sugars after dilute sulfuric acid hydrolysis of fresh *U. prolifera*

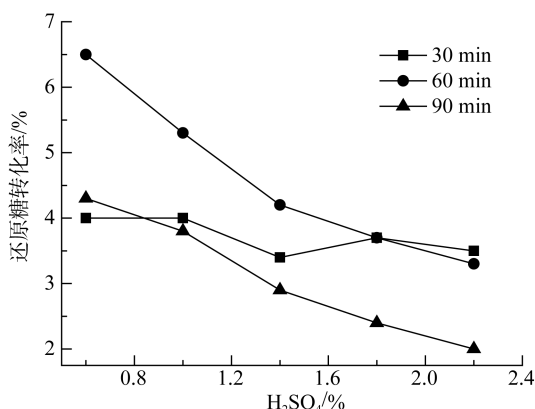


图 2 浒苔稀硫酸水解残留物经酶解后的还原糖转化率

Fig. 2 Conversion rate of reducing sugars after enzymatic hydrolysis of fresh *U. prolifera* residues obtained with dilute sulfuric acid hydrolysis

而有利于后续的纤维素酶酶解进一步释放还原糖^[16]。

在 121℃ 高温高压条件下, 用不同浓度的稀硫酸经不同反应时间水解浒苔, 对浒苔水解残留物再进行过量纤维素酶酶解。如图 1 所示, 单独的稀硫酸水解工艺即可得到很高的浒苔还原糖转化率。随着反应时间的增加, 不同浓度的稀硫酸条件下还原糖产量均明显增加, 但还原糖产量增加幅度随稀硫酸反应时间的增加而减小, 并最终停止增长, 这是由于部分还原糖在高温高压条件下会转变成糠醛等副产物^[14, 16]。在硫酸质量分数为 1.8%、反应时间为 90 min 条件下, 还原糖转化率可达 59.9%, 此时每克干质量浒苔可产生 447.0 mg 还原糖(表 1), 此条件可以作为浒苔稀硫酸水解工艺的最佳条件。

如图 2 所示, 稀硫酸水解残留物的纤维素酶酶解工艺中, 浒苔还原糖转化率很低, 在硫酸质量分数为 0.6%、水解时间为 60 min 的时候还原糖转化率出现最大值, 仅为 6.5%, 此时每克干质量浒苔只产

生了 48.8 mg 还原糖(表 1)。随稀硫酸浓度提高, 残留物经纤维素酶酶解产生的还原糖反而减少, 表明单独的稀硫酸水解工艺释放还原糖已较为充分。另外, 浒苔多糖中纤维素含量较低可能也是造成酶解释放还原糖效果较差的原因^[6]。麦秸干基中含有 70% 以上的纤维素, 在硫酸质量分数为 1.5%、反应 90 min 条件下每克干物质可产生约 330 mg 还原糖, 酸处理后经纤维素酶酶解最多可再产生 197.1 mg 还原糖^[16], 浒苔与麦秸相比在稀硫酸水解阶段产还原糖较多, 但后续酶解处理产糖量很少, 这种差异提示建立海藻原料的糖化工艺应充分考虑海藻自身的生化组成特点。

浒苔稀硫酸水解产还原糖效果显著, 而后续纤维素酶酶解的补充释放效果不够理想, 提示浒苔糖化工艺可单独采用稀硫酸水解, 这样可大大降低生产成本。在建立浒苔糖化工艺的基础上, 可进一步对浒苔进行酒精发酵, 生产燃料乙醇。同样的稀硫酸水解工艺条件下, 本文中的新鲜浒苔原料和后续研究中晒干之后贮存两个月以上的浒苔原料得到的水解产糖结果存在明显差异, 这提示了浒苔原料的新鲜程度对浒苔的酸解产糖也有较大影响, 在浒苔的晒干和贮存过程中, 自然界存在的白腐菌^[20]、其他微生物对浒苔的分解消化作用以及浒苔自身的物理化学变化可能是造成这种差异的原因。浒苔多糖中含有鼠李糖、葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖和糖醛酸等单糖^[21], 后续研究中将具体研究浒苔稀硫酸水解工艺中各个单糖的产量和变化, 为浒苔燃料乙醇发酵提供更为细致的理论指导。

参考文献:

- [1] 曾呈奎, 张德瑞, 张峻甫. 中国经济海藻志[M], 北京, 科学出版社, 1962: 43-50.
- [2] Lin A P, Shen S D, Wang J W, Yan B L. Reproduction diversity of *Enteromorpha prolifera*[J]. J Integrative Plant Biology, 2008, 50(5): 622-629.
- [3] Pérez-Lloréns J L, Brun F G, Andría J, et al. Seasonal and tidal variability of environmental carbon related physico-chemical variables and inorganic C acquisition in *Gracilariopsis longissima* and *Enteromorpha intestinalis* from Los Toruños salt marsh (Cádiz Bay, Spain)[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 304(2): 183-201.
- [4] Fletcher R L. The occurrence of "green tides": a review[C]//Schramm W and Nienhuis P H. Marine

- benthic vegetation: Recent changes and the effects of eutrophication. Berlin, Germany: Springer, 1996: 7-43.
- [5] Sun S, Wang F, Li C L, et al. Emerging challenges: massive green algae blooms in the Yellow Sea[J]. Nature Precedings, hdl: 10101/npre. 2008. 2266. 1
- [6] Aguilera-Morales M, Casas-Valdeza M, Carrillo-Dominguez S, et al. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18: 79-88.
- [7] 王晨霞, 方慧英, 诸葛健. 两步酸水解玉米芯条件及其酒精发酵的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 36-39.
- [8] Mielenz J R. Ethanol production from biomass technology and commercialization status[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4: 324-329.
- [9] Horn S J, Aasen I M, Østgaard K. Ethanol production from seaweed extract[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 25: 249-254.
- [10] Bimalendu R. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66: 408-416.
- [11] 何清, 胡晓波, 周峙苗, 等. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 34-38.
- [12] 林文庭. 浅论浒苔的开发与利用[J]. 中国食物与营养, 2007: 23-25.
- [13] 文新亚, 李燕松, 张志鹏, 等. 酶解木质纤维素的预处理技术研究进展[J]. 酿酒科技, 2006: 97-100.
- [14] 何北海, 林鹿, 孙润仓, 等. 木质纤维素化学水解产生可发酵糖研究[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1141-1146.
- [15] 张毅民, 杨静, 吕学斌, 等. 木质纤维素类生物质酸水解研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2007, 29(1): 48- 54.
- [16] Sun Y, Cheng J J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production[J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 1599-1606.
- [17] Silverstein R A, Chen Y, Sharma-Shivappa R R, et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 3000-3011.
- [18] Moxley G, Zhang Y H P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification[J]. Energy & Fuels, 2007, 21(6): 3684-3688.
- [19] 庄新姝. 生物质超低酸水解制取燃料乙醇的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [20] 杜甫佑, 张晓昱, 王宏勋. 木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 46-48.
- [21] Chattopadhyay K, Mandal P, Lerouge P, et al. Sulphated polysaccharides from Indian samples of *Enteromorpha compressa* (Ulvaes, Chlorophyta): Isolation and structural features[J]. Food Chemistry, 2007, 104: 928-935.

The study of dilute sulfuric acid hydrolysis process of fresh *Ulva prolifera* for reducing sugars yield

FENG Da-wei^{1, 2}, JIANG Peng², LI Fu-chao², QIN Song¹, ZHAO Jin², CHEN Hua-xin²

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug., 4, 2013

Key words: *Ulva prolifera*; saccharification; acid hydrolysis; enzymatic hydrolysis

Abstract: Based on the improved two-stage sulfuric acid hydrolysis method, the total sugar content of *Ulva prolifera* was determined as 67.2%. The samples of fresh *U. prolifera* were mixed with gradient dilute sulfuric acid (0.6、1.0、1.4、1.8、2.2%(w/w)) and hydrolyzed at 121 °C with reaction time of 30, 60 and 90 min, the solid *U. prolifera* residues recovered after sulfuric acid hydrolysis were hydrolyzed by cellulases, the yield of the reducing sugars from each step was determined by DNS method. It was showed that in the process of acid hydrolysis, the highest conversion rate of reducing sugars was obtained as 59.9% when the concentration of the sulfuric acid was 1.8% and the hydrolyzing time was 90 min, the yield of reducing sugars was 447.0 mg every 1000 mg dry sample. However, in the process of enzymatic hydrolysis, the conversion rate of reducing sugars from residue was low, the maximum value was only 6.5% when the concentration of sulfuric acid was 0.6% and the hydrolyzing time was 60 min. It was revealed that the acid hydrolysis was effective to hydrolyze *U. prolifera* sugars independently, and the optimized condition in this experiment was 1.8%(w/w) sulfuric acid with 90 min of hydrolyzing time, this will improve the further research on transferring the *U. prolifera* as a potential material to produce fuel ethanol.

(本文编辑: 张培新)