竹材纤维纳米微晶纤维素的

受控酶解制备与性能表征

李 厦¹ 卢潇冰¹ 陈霖铮¹ 张 勇^{1,2}

(1. 浙江理工大学材料与纺织学院,浙江杭州,310018;2. 浙江工业大学化学工程与材料学院,浙江杭州,310014)

摘 要: 以毛竹纤维素构建实验基质,选用丝状真菌里氏木霉所产胞外纤维素酶,通过受控水解工艺制备竹材纤维纳米微晶纤维素 (NCC)。同时利用场发射扫描电镜(FESEM)观察毛竹纤维 NCC 的形貌尺寸,利用 X 射线衍射仪(XRD)评价毛竹 NCC 的结晶程 度,利用北欧标准黏度计测定 NCC 的纤维素聚合度,利用 Zeta 电位测定仪表征 NCC 胶体溶液的表面电荷。结果表明,通过纤维素 酶受控水解工艺制备的毛竹 NCC 材料,均呈现棒状形貌,平均直径 24.7 nm,平均长度 286 nm,长径比 12。酶解制备的毛竹 NCC, 其化学结构中没有引入磺酸基团,Zeta 电位仅为传统硫酸水解工艺制备的毛竹 NCC 1/4。 关键词:纳米微晶纤维素;竹材纤维;里氏木霉;纤维素酶;性能表征

纤维素是地球上含量最丰富的天然高分子化合物,由单一的 D-葡萄糖单元通过 β-1,4-糖苷键链状连接 而成^[1]。纳米微晶纤维素(Nanocrystalline Cellulose, NCC),是由天然纤维素经微晶化过程得到的具有纳 米尺度且性能优异的极限聚合度固体产物^[2]。不但具有普通纤维素的基本结构和性能,还具备纳米颗粒的 特性^[3],其性质与普通纤维素存在较大差异,可用于高效纤维素化学改性^[4]。丝状真菌里氏木霉是最重要的 高效纤维素酶产生菌之一。其产生的胞外纤维素酶主要由 60%~80%的外切葡聚糖酶(EC3.2.1.91)、20%~36% 的内切葡聚糖酶 (EC3.2.1.4) 和 1%的 β-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)构成^[5]。其中,内切葡聚糖酶主要作用 于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 β-1,4-糖苷键,将长链纤维素分子截短,产生大量带非还原性末 端的小分子纤维素;外切葡聚糖酶为 β-1,4-葡聚糖纤维二糖酶,是从纤维素的非还原端水解 β-1,4-葡萄 糖苷键,产生纤维二糖;而 β-葡萄糖苷酶可水解纤维二糖,产生葡萄糖^[6]。毛竹是一种速生植物资源,具 有生长速度快、成材周期短、纤维含量高等优点,其纤维形态及纤维细胞含量接近甚至高于一般阔叶木, 资源化利用前景广阔^[7]。

传统的 NCC 制备工艺通常采用浓硫酸水解微晶纤维素(Microcrystalline Cellulose, MCC),破坏其无定型 区以获得高结晶度的 NCC 材料。但这一过程具有腐蚀性,对人体有害,所需工艺条件苛刻,同时反应体系 残留的酸和杂质需要洗涤除去,会消耗大量的水和动力资源。更重要的是,硫化作用会在 NCC 表面引入磺 酸基,从而限制 NCC 材料在食品、医学、医药等相关材料领域的应用^[8]。采用酶法水解纤维素制备 NCC, 可在常温常压条件下进行,不仅可提高 NCC 产品的质量和纯度,减少化学药品使用,降低水资源消耗和环 境污染负荷,同时还可以保持纤维素原有的化学结构,进而增加了 NCC 材料的生物相容性,拓展了其在食 品、医学、医药等相关领域的应用。

本研究以毛竹纤维素构建实验基质,选用丝状真菌里氏木霉所产胞外纤维素酶,通过受控水解工艺制备毛 竹纤维 NCC,并探讨其最佳制备条件,同时利用场发射扫描电镜(FESEM)、X 射线衍射仪(XRD)、北欧标 准黏度计、Zeta 电位测定仪等分析手段对制备的毛竹纤维 NCC 的物化性能进行表征,以期获得一种环境友好 且生物相容性好的竹类纤维 NCC 的低污染制备方法。

1 实验

1.1 实验原料

本课题得到浙江省新材料及加工工程省重中之重学科开放课题(20110946)和浙江省应用化学与生态染整工程重中之重学科开放基金(YR2011017)支持。

毛竹购自中国浙江安吉县毛竹种植场;里氏木霉(ATCC 13631)购自中国科学院微生物研究所菌种保藏 中心;实验用化学试剂盐酸、硫酸、氢氧化钠、乙酸、次氯酸钠均为分析纯,购自浙江杭州大方化学试剂公 司。

1.2 实验方法

1.2.1 毛竹纤维制备

毛竹原料经 FRITSCH 公司 Pulverisette 粉碎为粉末。在机械搅拌作用下,于 80℃、质量分数为 4.0% 的 NaOH 溶液中反应 90 min,这一过程重复 3 次,其间用蒸馏水洗净残碱,以除去毛竹的木素、半纤维素、树脂等非纤维素组分。采用 1:1:1 的醋酸缓冲液、质量分数为 1.7% 的 NaClO 溶液、蒸馏水组成的混合溶液在机械搅拌作用下,于 80℃漂白处理毛竹纤维 180 min,这一过程重复 4 次,其间用蒸馏水洗净残氯,以获得高纯度的毛竹纤维原料。

1.2.2 毛竹特征 MCC 制备

采用 4.0 mol/L HCl 水解漂白处理后的毛竹纤维,获得在微米范围内尺寸广泛分布的毛竹 MCC,经筛网过 滤获取 50~70 μm 组分,即毛竹特征 MCC,作为纤维素酶受控水解制备毛竹纤维 NCC 的实验原料。图 1 为制 备的毛竹特征 MCC 的 SEM 照片。



图 1 4.0 mol/L HCl 水解制备的毛竹特征 MCC 的 SEM 照片

1.2.3 纤维素酶受控水解 MCC

将里氏木霉接种于马铃薯葡萄糖培养基振荡培养 24 h,以毛竹特征 MCC 作为唯一碳源,将获得的质量分数为 5.0 %的种子液接种于 Mandel 培养基,在 250 mL 三角瓶中于 25℃条件下振荡发酵,所得溶液经离心分离除去 1 μm 以上的固体颗粒^[9],悬浮液经截留相对分子质量为 10 万的超滤膜过滤,用蒸馏水收集膜面截留的毛竹纤维 NCC 组分,冷冻干燥后待分析用。NCC 得率为获得的毛竹纤维 NCC 质量与原始毛竹特征 MCC 质量之比。

对照样采用传统硫酸水解工艺,将毛竹特征 MCC 溶于质量分数为 60% H₂SO4 溶液,于 45℃条件下反应 1 h, 蒸馏水重复离心过滤,将制备的毛竹纤维 NCC 洗至 pH 值中性,冷冻干燥后待分析用。 1.2.4 纤维素酶活测定

里氏木霉所产胞外纤维素酶酶活测定通过分析其滤纸酶活、CMC 酶活、ρNPG 酶活进行^[10]。采用 Nelson Somogyi 法测定滤纸酶活、CMC 酶活的还原糖产生量^[11],以 ρ-硝基苯葡萄糖产生量衡量纤维素酶 ρNPG 酶活^[12]。 酶活单位 IU/mL 表示 1 mL 酶液中, 1 min 水解聚糖生成相当于 1μmol 单糖还原物质的酶量。 1.2.5 FESEM 分析

将 50 µL NCC 悬浮液(质量分数约 0.01%)滴至清洁硅片上,风干 24 h 后喷金 6 nm,利用 JEOL 6400F 型 FESEM 观察毛竹 NCC 的形貌尺寸,操作条件:加速电压 2 kV、工作距离 4.4 mm。采用 UTHSCSA 图像处理工具测定、张 SEM 照片上至少 250 根 NCC 外观尺寸,通过 OriginPro 8 统计软件分析毛竹 NCC 的平均长度及直径。

1.2.6 XRD 和 DP 分析

利用 Rigaku D/Max-2500V 型 XRD 测定毛竹 NCC 的结晶度, 2*θ* 扫描范围 5°~40°、2°/min。依据铜乙二胺 溶液法利用北欧标准黏度计测定毛竹 NCC 的特性黏度,参照文献标准方法^[13]计算其平均聚合度。

1.2.7 Zeta 电位测定

将质量分数为 0.05%的毛竹 NCC 悬浮液超声分散 5 min,利用 Malvern 3000 型 Zeta 电位测定仪测定 NCC 溶 液的 Zeta 电位,用以分析毛竹 NCC 胶体溶液的稳定性。

2 结果与讨论

2.1 毛竹 NCC 得率

纤维素酶水解断裂纤维素分子链,特别是对分子间氢 键和纤维素结晶区的破坏,是一个复杂的生物化学过程。 里氏木霉所产胞外纤维素酶由于其 β-葡萄糖苷酶含量较



图 2 纤维素酶受控水解过程的毛竹纤维 NCC 得率

低,可抑制纤维素分子完全水解为葡萄糖,使酶解过程受控,从而可以获得期望的 NCC 材料。在里氏木霉深层 发酵过程中,其所产纤维素酶活在第5天时达到峰值,分别为滤纸酶活 0.61 IU/mL、CMC 酶活 0.04 IU/mL、β-葡萄糖苷酶活 60.36 IU/mL,在此之后,纤维素酶各酶活出现明显下降。与纤维素酶活对应的 NCC 得率,测定 结果如图 2 所示。里氏木霉深层发酵前 3 天, NCC 得率维持在 4%以下的较低水平,在此之后呈现快速增长的趋势, 在发酵第5天时达到较高值 18%,此后增速缓慢。NCC 得率的增长趋势与胞外纤维素酶的产生趋势基本保持一致。 2.2 毛竹 NCC 形貌尺寸

图 3 为采用传统硫酸水解工艺制备的毛竹纤维 NCC(a)和里氏木霉所产纤维素酶水解制备的毛竹纤维 NCC (b) FESEM 照片。两种工艺制备的毛竹 NCC 均为棒状结构。硫酸水解制备的 NCC 由于其表面硫化作用,呈 现出较好的分散性能;由纤维素酶水解制备的 NCC 则开始出现轻微的絮聚现象。统计分析得出的毛竹 NCC 外 观尺寸如表 1 所示。纤维素酶水解制备的毛竹 NCC 平均直径 24.7 nm、平均长度 286 nm,长径比 12,而硫酸 水解制备的毛竹 NCC,形貌更为纤细,具有更大的长径比(平均为 15)。毛竹 NCC 的形貌差异主要源于硫酸 和纤维素酶的作用方式不同,硫酸水解完全是表面行为,其反应过程只受结晶区尺寸和均匀混合程度的影响; 纤维素酶水解除受到混合程度影响外,还与纤维素蛋白酶活性区域的形状与纤维素结晶结构是否吻合,以及其 在 MCC 中的穿透能力密切相关。



图 3 硫酸水解制备的毛竹纤维 NCC (al 和 a2) 和纤维素酶水解制备的毛竹纤维 NCC (bl 和 b2) FESEM 照片

2.3 结晶度和聚合度

利用 XRD 分析测定毛竹特征 MCC 和 NCC 的结晶度,可以用于衡量其吸水和润胀能力,以及与纤维素酶 的可及程度。相对于硫酸水解制备的毛竹 NCC,纤维素酶水解获得的 NCC 结晶度明显下降,降幅在 8%左右, 其主要是由于里氏木霉所产胞外纤维素酶在 MCC 中具有较强的穿透能力,导致其部分纤维素结晶区受到破坏。

表1呈现了实验获得的毛竹 NCC 的结晶度和聚合度数据。在硫酸水解制备 NCC 过程中,纤维素聚合度从 392.4 降至 174.1,降幅在 50%左右。而在纤维素酶水解过程中,纤维素聚合度从第1天至第5天逐渐下降,分 别为 371.0、350.4、314.1、259.7、211.5。而在纤维素酶水解过程初期,如图1所示,由于毛竹 NCC 得率较低, 其纤维素聚合度下降并不明显。

	表1 实验获	得的毛竹 NCC	: 结晶度、 聚	合度、形貌和历	<u> て す </u>	
样品	结晶度/%	聚合度	形 态	尺 寸		
				长 度/nm	直径	长径比
毛竹特征 MCC	80.2	392.4	—	50~70 μm(筛选后)		
硫酸水解制备 NCC	78.8	174.1	棒状	205	14.0nm	15
纤维素酶水解制备 NCC	72.0	211.5	棒状	286	24.7nm	12

2.4 NCC 胶体稳定性

在胶体溶液中,静电排斥作用是维持其稳定性的 主要机理。胶体粒子由于本身带有电荷,相互排斥在 溶液中均匀分散,从而保持胶体溶液稳定存在。通过 测定其 Zeta 电位,即可判断胶体粒子带电性强弱, 评价胶体溶液的稳定性。从图 4 可以看出,硫酸水解 制备的毛竹 NCC 胶体溶液 Zeta 电位一40.8 mV,纤 维素酶水解制备的毛竹 NCC Zeta 电位仅为一11.4 mV。前者高负电性的主要原因是在 NCC 制备过程 中,其分子链上接枝了磺酸基,进而使生成的胶体溶 液更为稳定,但同时获得的毛竹 NCC 材料损失了生 物相容性,限制了其在食品、医学、医药等相关材料 领域的应用。



图 4 硫酸水解和纤维素酶水解制备的 毛竹 NCC 悬浮液的 Zeta 电位

3 结 论

3.1 由于 NCC 材料优良的机械性能、生物可降解性和环境友好性,其低污染制备工艺现已成为纤维素材料领 域研究的热点之一。本研究探讨了利用丝状真菌里氏木霉所产胞外纤维素酶作用于毛竹特征 MCC,通过受控水 解过程制备毛竹 NCC 工艺的可行性,并最终获得了 18%的毛竹 NCC 得率。

3.2 由于里氏木霉所产纤维素酶在深层发酵过程中对毛竹特征 MCC 结晶区具有较强的穿透能力,致使纤维素 酶水解制备的毛竹 NCC 较硫酸水解制备的 NCC 结晶度出现明显下降。

3.3 采用传统硫酸水解工艺制备的毛竹 NCC 会在其分子链上引入磺酸基,而采用纤维素酶水解制备的毛竹 NCC 分子结构不会改变,从而增加了 NCC 的生物相容性,拓展了其在食品、医学、医药等相关材料领域的应用。

参考文献

[1] Spence K L, Venditti R A, Habibi Y, et al. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: Mechanical processing and physical properties [J]. Bioresource Technol., 2010, 101: 5961.

[2] Juan I M, Vera AA, Viviana PC, et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers [J]. Cellulose, 2008, 15: 149.

[3] Sturcov A, Davies G R, Eichhorn S J. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers [J]. Biomacromolecules, 2005, 6:

1055.

- [4] Dufresne A. Comparing the mechanical properties of high performance polymer nanocomposites from biological sources [J]. J. Nanosci. Nanotechnol., 2006, 6: 322.
- [5] Zaldivr M, Velasquez J C, Contreras I, et al. Trichoderma aureoviride 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: Its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol agent. Electron [J]. J. Biotechn., 2001, (4): 1.
- [6] Prasad S, Prateek J, Rudrapatna HB, et al. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis [J]. Carbohyd. Polym., 2011, 83: 122.
- [7] Zhang Y, Xue G X, Zhang X M, et al. Extraction of bamboo nanofibers using acid hydrolysis for functional chemicals of ecological dyeing and finishing [J]. Advanced Materials Research, 2012, 441: 759.
- [8] Araki J, Wada M, Kuga S, et al. Influence of dope solvents on physical properties of wet-spun cellulose [J]. Colloids and Surfaces A, 1998, 42: 75.
- [9] Bai W, Holbery J, Li K. A technique for production of nanocrystalline cellulose with a narrow size distribution [J]. Cellulose, 2009, 26: 455.
- [10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure Appl. Chem., 1987, 59: 257.
- [11] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose [J]. J. Biol. Chem., 1944, 153: 375.
- [12] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, et al. Selection, characterization and comparison of β-glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications [J]. Enzyme Microb. Tech., 2004, 35: 58.
- [13] Lu P, Hsieh Y L. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres and network [J]. Carbohyd. Polym., 2010, 82:329.

Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose from Bamboo Fibers by Controlled Cellulase Hydrolysis

LI Sha¹ LU Xiao-bing¹ CHEN Lin-zheng¹ ZHANG Yong^{1,2,*}

(1. College of Material and Textiles, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang province, 310018;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang Province, 310014) (*E-mail: zhangyong@zstu.edu.cn)

Abstract: The extracellular cellulase enzyme produced by Trichoderma reesei was used to prepare nanocrystalline cellulose (NCC) by controlled hydrolysis of bamboo fibers. The morphology of the prepared bamboo cellulose nanocrystals was characterized by field emission scanning electron microscopy and the crystallinity was measured by X-ray diffraction. The degree of polymerization was tested by automatic viscosimeter. The surface charge in suspension was estimated by Zeta-potential. The results showed that all NCC from bamboo fibers presented a rod-like shape, an average diameter of 24.7 nm and length of 286 nm, with an aspect ratio of around 12. The zeta potential of cellulase hydrolyzed NCC was 4 times lower than that of NCC prepared by acid hydrolysis process.

Key words: Nanocrystalline cellulose; Bamboo fibers; Trichoderma reesei; Cellulase; Characterization