

文章编号: 1006-9941(2007)06-0583-04

细菌纤维素在炸药环境中的酶解研究

杜艳芳¹, 陈彦¹, 聂福德², 裴重华¹

(1. 西南科技大学 材料科学与工程学院, 四川 绵阳 621010;

2. 中国工程物理研究院化工材料研究所, 四川 绵阳 621900)

摘要: 采用酶解将细菌纤维素/黑索今中的细菌纤维素载体去除可提高炸药含量, 为研究炸药对细菌纤维素酶解的影响, 从黑索今炸药环境下酶含量、酶解时间及酶解温度等工艺条件对细菌纤维素酶解程度的影响进行了研究。结果表明: 黑索今对细菌纤维素的酶解有一定的抑制作用。细菌纤维素的酶降解程度因处理的温度、酶量及时间等工艺条件的不同而表现出差异; 在 45 °C、50 °C 和 55 °C 条件下, 细菌纤维素的酶解程度随酶量的增加和酶解时间的延长而不断提高; 在炸药环境下, 细菌纤维素酶解的适宜温度在 50 °C 附近。

关键词: 有机高分子材料; 细菌纤维素; 黑索今; 酶; 酶解

中图分类号: TJ55; TQ352.78

文献标识码: A

1 引言

纳米级炸药, 由于颗粒尺寸小, 比表面积增大, 具有新的燃烧、爆炸性能, 因此对它的制备技术、性能与应用研究近年来被列为重点研究课题。但是目前较为常用的制备方法只能将炸药细化到 0.5 ~ 5 μm, 采用溶胶凝胶法制备的纳米结构炸药中炸药颗粒粒度可以控制在纳米尺度, 但含量仅能达到 90%, 而凝胶又无法去除, 因此不能直接制备出纳米炸药。选用可降解的载体材料制备出纳米结构炸药, 然后再降解除去载体材料, 从而制备出纳米炸药, 为纳米炸药的制备提供了一个新的途径。本实验选用了具有可降解性的细菌纤维素作为载体材料。

细菌纤维素^[1-2] (bacterial cellulose, BC), 是由 β-1,4-糖苷键连接而成的天然聚合体, 细菌纤维素的化学纯度非常高, 具有良好的生物可降解性; 它具有精致的天然超微纤维网状结构, 这种网状结构是由一种天然形成的纳米纤维构成, 其直径仅为 1.5 nm。由于细菌纤维素精致的超微纤维结构, 可将其作为载体材料用于纳米材料的制备^[3]。

为了考察细菌纤维素能否在纳米结构炸药中降解, 首先研究细菌纤维素在炸药环境下能否降解, 以及降解的方式。目前细菌纤维素的降解方式主要有酸降解、酶降解和生物降解, 由于酸对炸药性能有明显影响, 且对

设备的腐蚀作用大、条件苛刻^[4], 不适宜于炸药环境下的降解; 炸药含有硝基基团, 对微生物具有一定的毒性^[5-6], 因而生物降解也受到限制; 而酶降解具有反应条件温和、易于控制等优点, 故本实验采用酶降解的方式, 研究了炸药环境对细菌纤维素酶解的影响, 并对影响细菌纤维素酶解的部分工艺因素进行了初步研究。

2 材料与方 法

2.1 材 料

细菌纤维素: 以木醋杆菌 (Acetobacter xylinum, Ax) 在培养基 (Schramm and Hestrin Medium) 中静置培养 7 天, 将培养基表面上生成的白色细菌纤维素凝胶用水反复清洗除去培养基, 再将凝胶于 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液中煮沸 0.5 h, 去除凝胶中的残留菌体和培养基, 然后水洗至中性, 80 °C 下干燥即获得细菌纤维素。

酶制剂: 纤维素酶, 购于和氏璧生物技术有限公司。

黑索今 (RDX): 中国工程物理研究院化工材料研究所提供。粒径: 6 ~ 15 μm。

2.2 仪器设备

GZX-9146 MBE 数显鼓风干燥箱 (上海博迅); CS501-3C 恒温水浴摇床 (重庆万达); pH5-3C 型 pH 计 (上海雷磁); ALPHA1-2 冻干机 (德国 Martin Christ); NIKON4500 数码相机 (日本); TM-1000 扫描电子显微镜 (日立) 等。

2.3 方 法

2.3.1 酶 解

2.3.1.1 非炸药环境下酶解

(1) 50 mL 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 4.8) 放入锥形瓶中, 溶解定量纤维素酶;

收稿日期: 2007-03-05; 修回日期: 2007-06-04

基金项目: 中国工程物理研究院化工材料研究所院外合作项目资金资助
作者简介: 杜艳芳 (1979 -), 女, 硕士研究生, 研究方向为高分子及其复合材料。

通讯联系人: 裴重华, 男, 教授。e-mail: peichonghua@swust.edu.cn

(2) 称取定量剪成 5 mm × 8 mm 的块状的细菌纤维素样品,放入锥形瓶;

(3) 以保鲜膜封口,放入恒温反应容器中,按照不同温度、时间等条件进行酶降解。

2.3.1.2 炸药环境下酶解

在步骤(2)后按照细菌纤维素:炸药(质量比) = 1:4称取炸药,分散到酶溶液中。其余步骤同非炸药环境下酶解。细菌纤维素是由葡萄糖大分子构成的。在大分子链中,葡萄糖以 β -1,4-糖苷键结合。纤维素酶对纤维素的水解就发生在 β -1,4-糖苷键上,将大分子切断,使纤维素降解,降解的最终产物为具有还原性的葡萄糖。

2.3.2 还原糖测定

采用菲林试剂法^[7]。

葡萄糖具有还原性,能将费林溶液中的硫酸铜还原为氧化铜,根据次甲基蓝的变化终点,滴定出酶解液中的还原糖含量。设还原定量费林溶液消耗的标准葡萄糖量为 A_1 mL,加入样品液之后还原定量费林溶液消耗的标准葡萄糖量设为 A_2 mL,根据两者之间的差值($A_1 - A_2$),可得出样品液中的还原糖含量。

2.3.2.1 药 品

标准葡萄糖溶液:称取烘干的葡萄糖 2.5000 g,溶于水,定容至 1000 mL。

费林溶液 I、费林溶液 II、次甲基蓝指示剂、酚酞指示剂的配制参照 GB/T 603 - 2002^[8]。

2.3.2.2 测试方法

标准葡萄糖溶液的标定:分别取费林溶液 I、II 于三角瓶中,加水摇匀,在电炉上加热至沸腾,用葡萄糖标准溶液滴定,当溶液的蓝色将消失至红色时,加次甲基蓝指示液,继续滴定至蓝色消失。

样品液中还原糖测定:将费林溶液 I、II 和样品液加入到三角瓶中,滴定步骤同上。

2.3.3 降解评价

以细菌纤维素降解的最终产物——葡萄糖的含量作为降解程度的评价指标。

3 结果与讨论

3.1 细菌纤维素酶解现象

细菌纤维素在非炸药环境下进行酶解,对其酶解过程进行观察,其典型特点如图 1 所示。

从图 1 可以看出,细菌纤维素酶解的一般特点为:在酶解的初期,细菌纤维素经历一个润胀过程后酶解开始发生,细菌纤维素逐渐变薄;随酶解的进行,原细菌纤维素片断裂产生出不规则形状碎片;在酶解的后期,细菌纤维素基本以细微的颗粒状碎片形式存在。

在酶降解过程中细菌纤维素会出现分层现象,随着酶解过程的进行,纤维素片逐渐变薄,这可能是由于在静置条件下培养产生的细菌纤维素膜是以无序的层状结构存在^[2]。

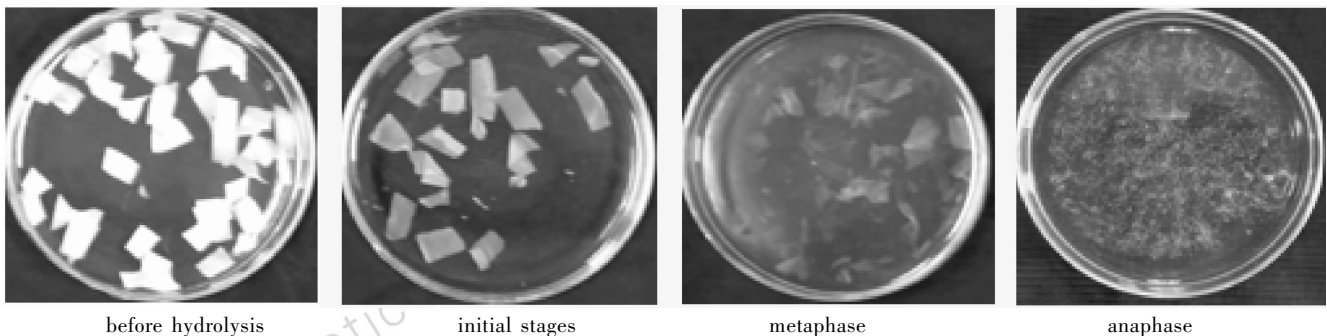


图 1 细菌纤维素酶解不同程度典型特征

Fig. 1 Different degree of enzymatic hydrolysis of BC

3.2 炸药环境对细菌纤维素酶解的影响

在 50 °C 下,研究非炸药环境与炸药环境下细菌纤维素的酶解情况,酶含量为 1% (体积比, $V_{\text{酶}}/V_{\text{缓冲液}}$,下同)时反应 7 天后的结果如图 2 所示。

在图 2 中可以清晰地看到,在相同的酶量下,炸药环境中细菌纤维素的酶解要慢一些。在酶含量为 1% 的对比样品中,非炸药环境下的细菌纤维素已基本全

部破碎为不规则碎片,而炸药环境下的细菌纤维素仍可观察到完整的片状。

与非炸药环境下细菌纤维素的酶解相比,炸药环境对细菌纤维素的酶解造成了一定的抑制作用。这可能是由于黑索今与酶的活性部位结合后,改变了酶活性中心的结构与性质,抑制了纤维素酶的活性,使得细菌纤维素的酶解速率减缓。

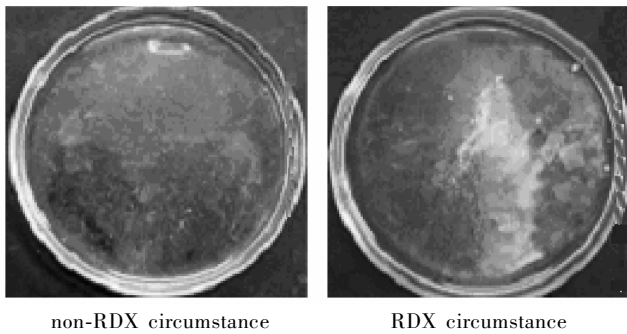


图 2 非炸药环境与炸药环境下细菌纤维素的酶解效果对比图
Fig. 2 Comparison of hydrolysis degree of BC under non-RDX and RDX circumstance

3.3 酶含量对细菌纤维素酶解的影响

在 50 °C 条件下,反应时间为 7 天,考察不同酶含量对细菌纤维素酶解的影响,结果如图 3 所示。

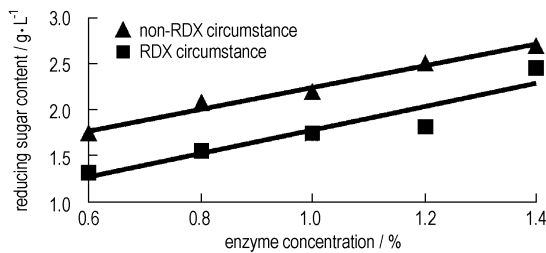


图 3 酶含量对细菌纤维素酶解的影响
Fig. 3 Relationship between enzyme concentrations and reducing sugar

由图 3 可以看到,炸药环境下细菌纤维素的酶解程度变化趋势与非炸药环境下的变化趋势相同,均是随着酶含量的增加,酶解液中还原糖量随之呈线性增加,酶解程度加深。

在相同的酶含量时,炸药环境下细菌纤维素的酶解液中还原糖的含量要低于非炸药环境下的含量,反应程度减缓,此结果与反应现象的观察结果一致(见图 2),验证了炸药对细菌纤维素的酶解具有抑制作用。

3.4 酶解方式对细菌纤维素酶解的影响

在 50 °C,炸药环境下,考察以动态方式进行反应对细菌纤维素酶解效果的影响。动态酶解所使用的设备为恒温水浴摇床,转速为 70 r · min⁻¹。

图 4 为动态和静态两种反应条件下酶解液中还原糖含量的比较。可以看到动态条件下反应 5 天时酶解液中还原糖含量要明显高于静态条件下反应 7 天的含量;且随着酶含量的增加,两者还原糖含量的差别增大。

动态反应的周期比静态反应要短。从视觉观察,动态反应的第 3 天就已经达到静态反应第 7 天的状

态,第 4 天时细菌纤维素均呈现为微小颗粒状。

在动态条件下,酶与细菌纤维素的作用机会增加,通过震荡的方式有利于酶进入到细菌纤维素网状结构的内部,对纤维素的分子链进行破坏,加速了酶解过程的进行,使得酶解时间大大缩短。

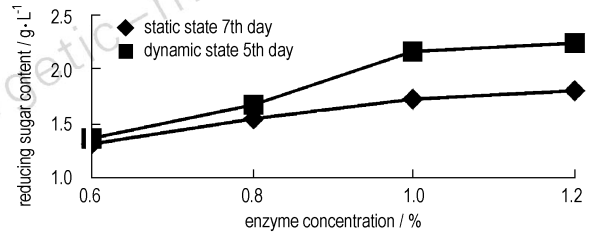


图 4 动态与静态反应条件下酶解液中还原糖含量比较
Fig. 4 Comparison of reducing sugar content of degradation solution in dynamic state and static state

3.5 反应温度对细菌纤维素酶解的影响

采用转速为 70 r · min⁻¹的动态反应,在炸药环境下,研究不同温度对细菌纤维素酶降解的影响,酶含量为 0.4% 时的酶解结果见表 1。

表 1 不同温度下酶解液中还原糖含量比较

Table 1 Comparison of reducing sugar content from enzymatic hydrolysis of BC at different temperature (g · L⁻¹)

hydrolysis time/h	hydrolysis temperature/°C		
	45	50	55
1	0.61	0.96	0.55
2	0.56	0.94	0.56
3	0.59	0.99	0.61

根据表 1 可看到,在相同的反应时间条件下,随着温度的升高,酶解液中还原糖的含量呈现出一个先升高后降低的趋势。其中在 50 °C 时酶解液中还原糖含量相对于 45 °C 和 55 °C 均明显升高,因此,纤维素酶的最佳酶解温度在 50 °C 附近。

温度对酶的作用有两方面:一方面是当温度升高时,活化分子数增加而加速反应速度;另一方面,随着温度升高而使酶蛋白逐渐失活变性而降低酶的反应速度,酶反应的最适温度就是这两种过程平衡的结果。在低于最适温度时,以前一种影响为主,高于最适温度时,以后一种影响为主,由于酶活性迅速衰变,反应速度很快下降。

3.6 细菌纤维素酶解后的 SEM 结果

为缩短反应时间并达到酶解纤维素的目的,选择在 50 °C,动态反应条件下,酶含量为 2.0% 时对细菌纤维素酶解 24 h。反应后非炸药环境的酶解液中还原

糖含量达到 $2.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 炸药环境的酶解液中还原糖含量达到 $1.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

将酶解后的物质进行过滤和清洗, 冷冻干燥。干燥后样品的 SEM 结果如图 5 所示。

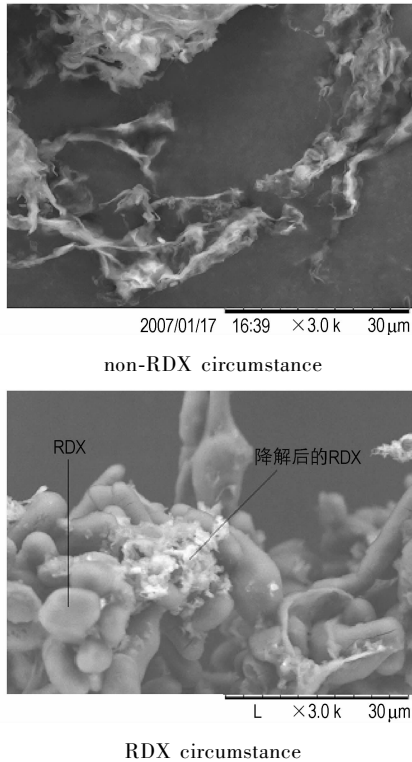


图 5 细菌纤维素酶解后的 SEM 图

Fig. 5 SEM micrographs of hydrolysed bacterial cellulose

从图 5 中可以看到, 非炸药环境下细菌纤维素经过 24 h 的酶解, 其宏观的网格结构被破坏, 呈絮状, 可观察到清晰的纤维脉络; 炸药环境下的细菌纤维素酶解 24 h 后, 干燥后与炸药共混, 附着在炸药的表面, 呈絮状, 观察不到纤维脉络。在炸药环境下细菌纤维素

酶解后, 干燥后的 RDX 颗粒大小在 $6 \sim 15 \mu\text{m}$ 范围, 与反应前相比粒径变化不大。

4 结论

(1) 细菌纤维素的酶解有典型的过程特征, 即: 在酶解的初期, 细菌纤维素逐渐开始变薄; 随酶解的发展, 有不规则形状纤维素碎片出现; 在酶解的后期, 细菌纤维素全部破碎为细微的颗粒状碎片。

(2) 采用纤维素酶可以在 RDX 存在的环境下酶解细菌纤维素, 通过测试酶解液中的还原糖含量显示出 RDX 对细菌纤维素的酶解具有一定的抑制性。

(3) 采用动态方式进行酶解, 反应周期比静态方式的缩短。

(4) 在炸药环境下随着酶量或是反应时间的增加, 纤维素的酶解程度加深; 细菌纤维素酶解的最佳反应温度在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 附近。

参考文献:

- [1] Brown R M. Microbial cellulose: A new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products[D]. Austin: University of Texas, 1995.
- [2] Vandamme E J, Baets S De, Steinbüchel A. 生物高分子第五卷[M]. 陈代杰, 金飞燕译. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] ZHANG Da-yong, QI Li-min. Synthesis of mesoporous titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes[J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2005. 2735 - 2737.
- [4] 陈坚. 环境生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [5] Bharat Bhushan, Annamaria Halasz, Jim C Spain, et al. Diaphorase catalyzed biotransformation of RDX via N-denitration mechanism[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 296: 779 - 784.
- [6] 乌锡康. 有机化工废水治理技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [7] GB/T15038 - 2005. 葡萄糖、果酒通用分析方法[S].
- [8] GB/T 603 - 2002. 化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备[S].

Enzymatic Hydrolysis of Bacterial Cellulose Under RDX Circumstance

DU Yan-fang¹, CHEN Yan¹, NIE Fu-de², PEI Chong-hua¹

(1. School of Materials Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2. Institute of Chemical Materials, CAEP, Mianyang 621900, China)

Abstract: In order to improve the purity of RDX in nano-structured explosive by eliminating bacterial cellulose(BC), enzymatic hydrolysis was adopted. The effects of explosive on enzymatic hydrolysis of BC, such as enzyme concentration, hydrolysis time and temperature were investigated. The results show that RDX inhibits enzymatic hydrolysis of BC and hydrolysis degree of BC (HDBC) varies with enzyme concentration, hydrolysis temperature and time; HDBC increases with the increase of enzyme concentration and hydrolysis time at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and $55 \text{ }^\circ\text{C}$; the best temperature of enzymatic hydrolysis for BC is around $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Key words: organic polymer materials; bacterial cellulose(BC); RDX; enzyme; enzymatic hydrolysis