



## 酶水解纤维素条件的优化

崔立, 刘忠

(天津市制浆造纸重点实验室, 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了探究酶水解纤维素的最优条件,以麦草浆为原料,研究纤维素酶用量、pH、水解温度、底物质量分数和酶水解时间对酶水解得率的影响,通过正交实验对酶水解纤维素的工艺条件进行优化。最佳条件为:酶用量 27 U, pH 5.5,水解温度 50 °C,底物质量分数 2%,水解时间 60 h。在此条件下,酶水解得率可以达到 75.8%。

**关键词:** 预处理; 纤维素酶; 水解; 正交实验

中图分类号: TQ352.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2010)02-0041-04

## Optimization Conditions of Cellulose Enzymatic Hydrolysis

CUI Li, LIU Zhong

(Tianjin Key Laboratory of Pulp and Paper, College of Materials Science and Chemical Engineering,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The optimal condition of enzymatic hydrolysis was studied by using straw pulp as a raw material. The influences of enzyme dosage, pH value, hydrolysis temperature, pulp concentration and hydrolysis time were investigated, and enzymatic hydrolysis was optimized by orthogonal experiment. The optimal condition of enzymatic hydrolysis was determined as follow: enzyme dose 27 U, pH 5.5, hydrolysis temperature 50 °C, pulp concentration 2%, hydrolysis time 60 h. Under this condition, the cellulose enzymatic hydrolysis yield can reach 75.8%.

**Keywords:** pretreatment; cellulase; hydrolysis; orthogonal experiment

随着全球经济的飞速发展,石油、煤炭的储量正以惊人的速度减少,能源危机成了世界大多数国家所面临的一个严峻问题。由于对资源的破坏性开采和利用,人类赖以生存的环境正在不断地恶化,对可再生资源利用的研究与开发的可持续发展战略已在世界各国逐步展开<sup>[1-2]</sup>。

我国是一个农业大国,农业废弃物如稻秆、麦秆、玉米秸杆等十分丰富,每年产生大量的生物质废弃物未被充分利用,而且还常因就地焚烧而污染环境,另一方面,由于我国的石油资源有限,不能满足不断增长的燃料需求,所以需要生物质资源来弥补这一不足<sup>[3-4]</sup>。因此,如何充分利用农作物中的纤维素和半纤维素是实现生物质资源充分利用的关键。以木质资源为原料制备燃料乙醇是一项对国民经济和社会发展有着重要战略意义的利国利民之举。所以,在我

国发展以木质资源为原料来制备燃料乙醇显得更有意义<sup>[5-7]</sup>。本文以麦草浆为原料,探讨了纤维素酶用量、pH、水解温度、底物质量分数和酶水解时间对水解反应的影响,采用正交实验对酶水解纤维素的条件进行优化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

实验所用麦草取自河北无极,使用实验室切草刀将麦草切为 30 mm 左右的草片,经 14 目筛筛选后平衡水分备用;质量分数 93%~95%工业酒精;浓硫酸、无水乙醇、苯、硝酸,均为分析纯;纤维素酶制剂原液,诺维信公司,实验用酶活为 43.52 U/mL。

ZQS<sub>1</sub> 型电热回转蒸煮锅,陕西科技大学机械厂;

收稿日期: 2009-09-07; 修回日期: 2009-10-26

基金项目: 天津市科技发展计划科技攻关资助项目(05YFPGX05700)

作者简介: 崔立(1984—),男,陕西咸阳人,硕士研究生;通信作者: 刘忠,教授, mglz@tust.edu.cn.

HNY-100B 型恒温培养振荡器,天津市欧诺仪器仪表有限公司;SBA-40 C 型生物传感分析仪,山东省科学院生物研究所;UV-1600 型紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原料预处理

采用酸催化乙醇法按照前期实验确定的最佳处理条件对麦草原料进行预处理;最佳的预处理条件为乙醇质量分数 65%, 催化剂用量 1.2%, 蒸煮温度 180 °C, 保温时间 60 min, 液比(绝干原料质量与蒸煮液总体积之比, g : mL) 1 : 6.

#### 1.2.2 水解实验

在保持其他条件不变的情况下分别改变纤维素酶用量、pH、水解温度、底物质量分数和酶水解时间进行单因素实验;通过正交实验对水解条件进行优化.

## 2 结果与分析

### 2.1 原料预处理结果

对麦草进行原料分析,其结果见表 1.

表 1 麦草原料的化学成分

Tab.1 Chemical constituents of wheat straw

%

水分	灰分	苯醇抽合物	聚戊糖	Klason 木素	综纤维素	硝酸-乙醇纤维素
7.21	7.13	3.26	23.16	17.74	74.96	36.14

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 酶用量对酶解得率的影响

水解温度 50 °C、pH = 4.5、底物质量分数 2%、反应时间 24 h 时,不同酶用量对酶解得率的影响如图 1 所示. 由图 1 可以看出,当酶用量低于 27 U 时,酶解得率随酶用量的增加而迅速升高,此后,随着酶用量的增加,酶解得率升高缓慢. 按酶促动力学原理,底物质量分数一定时,酶用量增加,催化反应速率应按正比增大. 但纤维素酶水解时酶与底物先要形成一个中间配合物,因此酶要能吸附在纤维素的界面上,过多的酶如果不能被吸附则不起作用<sup>[8]</sup>. 所以选取纤维素酶用量为 27 U.

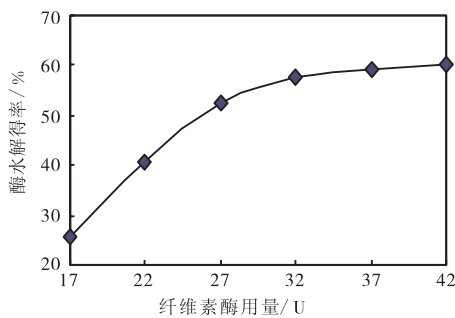


图 1 不同酶用量对酶解得率的影响

Fig.1 Effect of different cellulase dosages on cellulose enzymatic hydrolysis

#### 2.2.2 pH 对酶解得率的影响

水解温度 50 °C, 酶用量 27 U, 底物质量分数 2%, 反应时间 24 h 时,不同 pH 对酶解得率的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出, pH 小于 4.0 时,酶解得率随 pH 的增大而快速升高,当 pH 介于 4.0 到 5.0 之间时,酶解得率变化缓慢,当 pH 为 4.5 时,酶解得率

达到最大值,随后,酶解得率随 pH 的增大出现下降的趋势. 因此,在纤维素酶水解时,要适当控制水解体系的 pH,使纤维素酶表现出最大的活力,特别要注意防止酶发生不可逆失活<sup>[9]</sup>. 所以选取 pH 为 4.5.

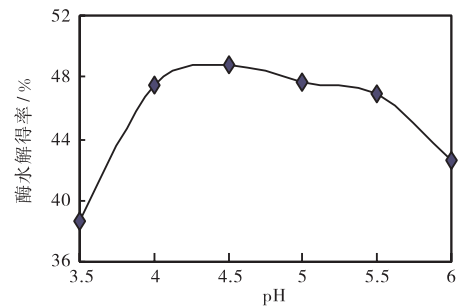


图 2 不同 pH 对酶解得率的影响

Fig.2 Effect of different pH values on cellulose enzymatic hydrolysis

#### 2.2.3 水解温度对酶解得率的影响

pH = 4.5、酶用量 27 U、底物质量分数 2%、反应时间 24 h 时,不同水解温度对酶解得率的影响如图 3 所示.

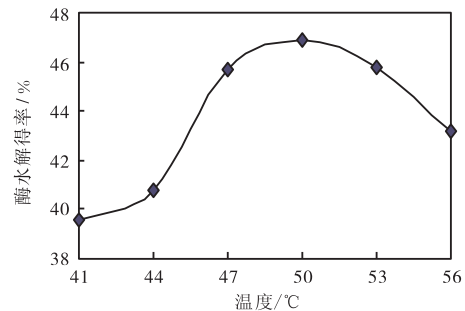


图 3 不同温度对酶解得率的影响

Fig.3 Effect of different temperatures on cellulose enzymatic hydrolysis

由图3可以看出,酶解得率是随温度的升高而升高,当温度为50℃时,酶解得率达到最大值,当温度高于50℃时,酶解得率反而随温度的升高而降低.这说明酶的最适温度为50℃,此时酶活性最大.如果温度过高,有可能使纤维素酶发生完全变性而产生不可逆失活<sup>[10]</sup>.所以选取水解温度为50℃.

2.2.4 底物质量分数对酶解得率的影响

pH = 4.5、酶用量 27 U、水解温度 50℃、反应时间 24 h 时,不同底物质量分数对酶解得率的影响如图4所示.由图4可以看出,底物质量分数低时酶解得率较高.随着底物质量分数的逐渐增大,酶解得率出现下降的趋势.当底物质量分数在4%~8%时,酶解得率变化较小,底物质量分数高于8%时酶解得率急剧降低.这是因为较高的底物质量分数导致液体中的传质阻力增大,不利于酶和底物充分接触,降低了纤维素对水解的敏感度,最终影响酶解得率<sup>[11]</sup>.所以将底物质量分数定为2%~3%.

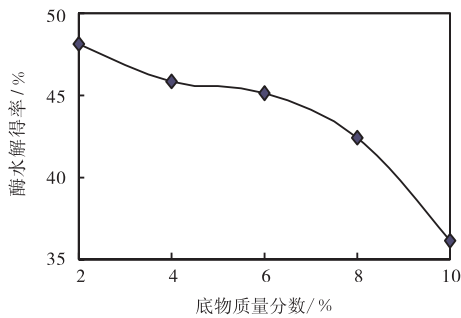


图4 不同底物质量分数对酶解得率的影响

Fig.4 Effect of different pulp concentrations on cellulose enzymatic hydrolysis

2.2.5 水解时间对酶解得率的影响

pH = 4.5、酶用量 27U、水解温度 50℃、底物质量分数 2%时,不同酶水解时间对酶解得率的影响如图5所示.由图5可以看出,在较短的时间内,纤维素酶解速率较快,随着反应时间的延长,对酶水解有抑制作用的产物量增加,使得酶解速率减缓<sup>[12]</sup>.在0~

50 h 范围内时,酶解得率随反应时间的增加而迅速上升,反应时间到达 50 h 后,酶解得率上升趋势逐渐平缓,因此将酶水解的时间定为 50 h.

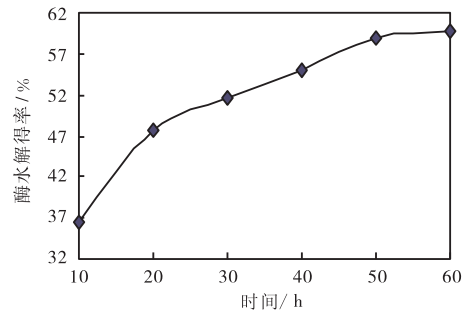


图5 不同酶解时间对酶解得率的影响

Fig.5 Effect of different enzymatic hydrolysis holding times on cellulose enzymatic hydrolysis

2.3 正交实验结果

根据上述单因素的实验结果,选取纤维素酶用量、pH、水解温度、底物质量分数和酶水解时间 5 因素进行 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交实验,对酶水解的最佳条件进行优化.正交实验因素水平设计见表2,结果见表3.由表3可以看出,R<sub>B</sub>>R<sub>E</sub>>R<sub>A</sub>>R<sub>C</sub>>R<sub>D</sub>,这说明因素B即初始 pH 对纤维素酶水解得率的影响最大,其次为水解时间、酶用量、水解温度和底物质量分数.

根据正交实验结果,确定酶水解的最佳组合条件为 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>4</sub>,即酶用量 27 U,pH 5.5,温度 50℃,底物质量分数 2%,水解时间 60 h.按此条件进行验证实验,得出该实验条件下的酶水解得率为 75.8%,所以确定该最佳组合条件即为酶水解的最优条件.

表2 正交实验因素与水平

Tab.2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	(A)酶用量/U	(B)初始 pH	(C)水解温度/℃	(D)底物质量分数/%	(E)水解时间/h
1	17	4.0	40	1	30
2	22	4.5	45	2	40
3	27	5.0	50	3	50
4	32	5.5	55	4	60

表3 正交实验结果

Tab.3 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	E	水解液葡萄糖质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	水解液还原糖质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	酶水解得率/%
1	1	1	1	1	1	3.94	5.08	39.40
2	1	2	2	2	2	10.31	13.43	51.55
3	1	3	3	3	3	12.63	18.50	42.10
4	1	4	4	4	4	22.60	28.37	56.50
5	2	1	2	3	4	13.68	19.73	45.60
6	2	2	1	4	3	20.72	27.41	51.80
7	2	3	4	1	2	2.14	2.68	21.40
8	2	4	3	2	1	11.83	15.52	59.15

续 表

实验号	A	B	C	D	E	水解液葡萄糖质量 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	水解液还原糖质量 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	酶水解得率/ %
9	3	1	3	4	2	19.68	25.62	49.20
10	3	2	4	3	1	16.71	21.35	55.70
11	3	3	1	2	4	10.47	13.31	52.35
12	3	4	2	1	3	6.59	7.21	65.90
13	4	1	4	2	3	9.58	11.23	47.90
14	4	2	3	1	4	7.16	8.59	71.60
15	4	3	2	4	1	17.43	24.98	43.58
16	4	4	1	3	2	15.61	20.77	52.03
$k_1$	47.387	45.525	48.895	49.575	49.457			
$k_2$	44.488	57.663	51.657	52.737	43.545			
$k_3$	55.788	39.858	55.512	48.858	51.925			
$k_4$	53.777	58.395	45.375	50.270	56.512			
极差 $R$	11.300	18.537	10.137	3.879	12.967			

### 3 结 论

通过正交实验对酶水解纤维素(麦草浆)工艺条件进行优化;最佳条件为:纤维素酶用量 27 U, pH 5.5, 纤维素水解温度 50 ℃, 底物质量分数 2%, 水解时间 60 h;在该条件下酶水解得率可以达到 75.8%。

#### 参考文献:

- [1] Prasad S, Singh A, Joshi H C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues [J]. Resources, Conservation and Recycling, 2006, 50(1): 1-39.
- [2] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials [J]. Science, 2006, 311(5760): 484-489.
- [3] 孙多志, 许庆利, 王复, 等. 木质纤维素制取燃料乙醇水解工艺技术进展[J]. 河南化工, 2008, 25(4): 1-4.
- [4] 王丹, 林建强, 张萧, 等. 直接生物转化纤维素类资源生产燃料乙醇的研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2002, 33(4): 525-529.
- [5] 龚大春, 田毅红, 李德莹, 等. 纤维素乙醇的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(1): 4-6.
- [6] 刘荣厚, 李金霞, 沈飞, 等. 甜高粱茎秆汁液固定化酵母酒精发酵的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(9): 137-140.
- [7] Chum H L, Overend R P. Biomass and renewable fuels [J]. Fuel Processing Technology, 2001, 71(1/2/3): 187-195.
- [8] 金士威, 朱圣东, 吴元欣, 等. 木质纤维原料酶水解研究进展[J]. 生物质化学工程, 2006, 40(3): 48-53.
- [9] 苏东海, 孙君社. 提高纤维素酶水解效率和降低水解成本[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1147-1152.
- [10] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 等. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展[J]. 石油与天然气化工, 2007, 36(6): 452-461.
- [11] Cheung S W, Anderson B C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids [J]. Bioresource Technology, 1997, 59(1): 81-96.
- [12] Krishnan M S. Process development of ethanol production from lignocellulosic sugars using genetically engineered yeast[D]. West Lafayette: Purdue University, 1996.
- [10] 孙利芹, 林剑, 王长海, 等. 均匀设计在紫球藻培养基优化中的应用[J]. 海洋通报, 2004, 23(6): 66-70.
- [11] 张青田, 胡桂坤. 硝氮, 磷酸盐, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>影响小球藻生长的均匀设计实验[J]. 盐业与化工, 2006, 35(6): 25-27.
- [12] 廖承义, 欧毓麟, 程樱. 卤虫的发育与蜕皮[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, 20(2): 70-79.
- [13] 杨光, 蔡含筠, 侯林. 中国六个盐湖卤虫品系生物学特征的研究[J]. 海洋湖沼通报, 1995(3): 39-47.
- [14] 宁卓, 张波. 不同品系卤虫无节幼体的生物学特征[J]. 盐业与化工, 2007, 36(1): 30-32.
- [15] 杜鹃. 有机磷农药对卤虫的联合毒性研究[J]. 江苏环境科技, 2001, 14(1): 9-10.

(上接第 29 页)

出版社, 1994: 1-100.