

研究报告

工业纤维素酶水解效率的影响因素分析

王修胜¹, 于占春², 张小希², 邓红波², 鲍杰[†]

(1 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

2 中国石油天然气股份有限公司吉林燃料乙醇有限公司, 吉林 吉林 132101)

摘要: 研究了影响工业纤维素酶 Accellerase 1000 水解效率的因素, 及 Accellerase 100Q Spezyme CP 和 Novozyme 188 在不同水解状态下失活情况和葡萄糖对纤维素酶的抑制情况。结果表明反应器类型对水解影响不大, 而固含量、酶量、搅拌速率和温度对 Accellerase 1000 水解效率影响很大。在醋酸缓冲液中, Accellerase 1000 的滤纸酶活和纤维二糖酶活失活速率最快; 在有木质素存在的醋酸缓冲液中相比各纤维素酶的滤纸酶活失活变慢, 但纤维二糖酶失活加快; 在滤纸水解过程中, Spezyme CP 和 Novozyme 188 相对较为稳定。葡萄糖对纤维素酶有明显的抑制作用。

关键词: 木质纤维素; 工业纤维素酶; 水解效率

中图分类号: TQ352.78 TQ351

文献标识码: A

文章编号: 1673-5854(2010)05-0001-07

Analysis on Effect Factors of Hydrolysis Efficiency of Industrial Cellulases

WANG Xiu-sheng¹, YU Zhan-chun², ZHANG Xiao-xi², DENG Hong-bo², BAO Jie¹

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China 2. Jilin Fuel Alcohol Co. Ltd., PetroChina Jilin 132101, China)

Abstract The factors affecting the efficiency of enzymatic hydrolysis by Accellerase 100Q and the glucose inhibition and deactivation property of several typical industrial cellulases including Accellerase 100Q, Spezyme CP, and Novozyme 188 were investigated. The results showed that the hydrolysis efficiency was not significantly affected by the reactor geometry, while the solid content, the cellulase loading, the stirring rate and the temperature had great influence on the hydrolysis efficiency of Accellerase 100Q. The activities of filter paper units (FPU) and cellulbioase (CBU) of Accellerase 1000 decreased faster in the acetate buffer than Spezyme CP and Novozyme 188. With the existence of lignin particles, the deactivation rate of the filter paper units was decreased, while the deactivation rate of cellulbioase activity was increased. The activities of Spezyme CP and Novozyme 188 were more stable than Accellerase 1000. Glucose showed an obvious inhibition effect on the cellulase enzymes.

Key words lignocellulose; industrial cellulase; hydrolysis efficiency

农作物秸秆生产燃料乙醇是未来替代车用燃料的主要方向, 而实现这一过程产业化的主要障碍之一是纤维素酶的成本过高^[1-5]。对现有工业纤维素酶的水解特性及在水解过程中的失活情况进行研究, 将有助于提高纤维素酶在纤维素水解过程中的使用效率, 从而尽可能降低纤维素酶的使用量。影响纤维素酶催化农作物秸秆类木质纤维素原料水解效果的主要因素包括底物、纤维素水解产物及预处理过程中产生的抑制物对纤维素酶的抑制作用; 酶催化过程中的剪切失活、热失活; 底物和产物的传质; 纤维素酶在木质素等固体介质上的无效吸附等^[6-12]。纤维素酶是一种复合酶, 不同微生物产生的纤维素酶组分不同, 同一种微生物在不同条件下产生的纤维素酶也不同, 不同品牌的酶制剂中各组分的含量也

收稿日期: 2010-06-07

基金项目: 国家自然科学基金 (20976051); 国家重点基础研究发展计划 (2011CB707406); 教育部博士点基金 (20090074110013); 中央高校基本科研业务费专项资金 (无编号); 上海市重点学科建设项目 (B505); 科技部生物反应器工程国家重点实验室专项基金 (2060204)

作者简介: 王修胜 (1984-), 男, 山东淄博人, 硕士生, 主要从事生物质能源研究工作

* 通讯作者: 鲍杰, 教授, 博士生导师, 从事生物炼制和生物能源方向的研究; E-mail: jba@ecust.edu.cn

有差别。在以往的工作中,对纤维素酶水解已做了大量研究,而对于目前液体生物燃料相关的主流工业纤维素酶的水解效率和失活影响因素则未见相关报道。本研究主要对几种常用的工业纤维素酶的水解特性和失活情况进行了实验和比较,考察了包括纤维素固含量、反应器类型、酶量、搅拌速率、温度等因素对纤维素酶水解的影响,并研究了葡萄糖对纤维素酶的抑制情况,研究结果在高效率地使用纤维素酶对纤维素进行降解方面有着重要的参考价值。

1 实验

1.1 材料、试剂和仪器

蒸汽膨爆预处理后的玉米秸秆由中国石油吉林燃料乙醇有限公司提供。纤维素酶活测定使用 Whatman 1号定性滤纸(Whatman No. 1),购自 Whatman International Ltd (Maidstone, UK)。酶水解时所用滤纸为新华 1号滤纸(Xinhua No. 1),购自杭州新华纸业有限公司,用碎纸机粉碎成 0.2×0.6 cm 的滤纸片。葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术有限公司,蛋白酶 K 购自 Sigma 化学试剂公司。

工业纤维素酶 Accellerase 1000 和 Spezyme CP, 由 Genencor International (Rochester, NY, USA) 提供, 纤维二糖酶 Novozyme 188 购自 Novo Industrial A/S (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)。

5L 发酵罐, FMG-5L (II), 国强生化装备有限公司; 2L 发酵罐, Biotech-2L, 上海保兴生物设备工程有限公司; 高效液相色谱 (LC-20AD, 示差检测器 RID-10A), 日本岛津公司; 色谱柱, Bio-Rad Amix HPX-87H, 美国 Bio-Rad 公司; 722 可见分光光度计, 722N, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 滤纸的纤维素酶水解实验 分别在三角摇瓶、挡板摇瓶和酶反应器中的 0.05 mol/L 的 pH 值 5.0 醋酸缓冲液内加入滤纸片和纤维素酶, 水解 12 h 或 24 h。三角摇瓶为 250 mL, 缓冲液 95 mL; 挡板摇瓶为底部直径两端带有向上突出的高约 1 cm 圆锥形凸起的 250 mL 三角瓶, 缓冲液 95 mL; 酶反应器结构参见文献 [13], 容积为 2 L, 内部带有螺带式搅拌桨, 缓冲液 1 L。滤纸加入量为 5% 固含量(质量分数), Accellerase 1000 加入量为 15 FPU/g (以绝干物料计, 下同)。每 2 h 取样一次, 离心后取上清液经适当稀释并过滤后进行 HPLC 分析测定。考察反应器类型、酶量、搅拌速率和温度对纤维素酶水解的影响。

考察固含量对纤维素酶水解影响时, 称取 50 g 滤纸片加入酶反应器中, 加入一定量 0.05 mol/L 的 pH 值 5.0 醋酸缓冲液和所需 Accellerase 1000 (15 FPU/g); 将所需滤纸于 2~6 h 内分批补加到酶反应器中, 使最终水解的固含量为实验固含量 (5%~30%), 工作体积为 1 L, 于 50°C 、200 r/min 下水解 24 h。水解中每 2 h 取样一次, 取样量为 2 mL。

1.2.2 葡萄糖对纤维素酶抑制实验 在装有 0.05 mol/L 的 pH 值 5.0 醋酸缓冲液的 250 mL 三角瓶中加入 88 mL 不同质量浓度 (0~220 g/L) 的葡萄糖溶液, 并加入 12 g 滤纸和 7 FPU/g 的纤维素酶 (Spezyme CP 和 Accellerase 1000), 于 50°C 、200 r/min 水浴中水解 24 h 后测葡萄糖质量浓度。

1.2.3 木质素制备实验 按文献 [14] 的方法, 取干基质量为 100 g 蒸汽膨爆后玉米秸秆于 5 L 酶反应器中, 加入去离子水调整固含量为 5%, 以 15 FPU/g 的加酶量加入 Accellerase 1000 于 50°C 、200 r/min 下水解 48 h, 然后 8000 r/min 离心 10 min 去掉上清液, 并加入去离子水混匀, 8000 r/min 离心 10 min 去掉上清液, 如此反复洗涤 3 次。然后用磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4) 调至固含量为 5%, 加入蛋白酶 K 于 37°C 处理过夜, 然后 80°C 加热 15 min 后再次离心, 并用 1 mol/L NaCl 洗涤后反应用去离子水洗涤离心 3 次后于 105°C 下烘干得木质素, 存于 4°C 备用。

1.2.4 纤维素酶失活实验 在装有 0.05 mol/L 的 pH 值 5.0 醋酸缓冲液的 250 mL 三角瓶中加入 5 g 木质素或滤纸, 加入纤维素酶或纤维二糖酶或其混合物 (Accellerase 1000, Spezyme CP, Novozyme 188), 加入量为 15 FPU/g 31 CBU/g 于 50°C 、200 r/min 的水浴摇床中反应 24 h, 并分别在 0, 3, 7, 12, 24 h 取样, 经适当稀释后测定滤纸酶活 (FPU) 和纤维二糖酶活 (CBU)。

1.2.5 分析方法 水解过程中生成的葡萄糖和纤维二糖通过高效液相色谱 (HPLC) 测定, 色谱柱柱温为 65°C , 流动相 $5 \text{ mmol/L H}_2\text{SO}_4$, 流速 0.6 mL/min 。所有样品 13000 r/min 离心 3 min, 取上清液适当稀释后经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

纤维素酶活测定根据国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 推荐纤维素酶活测定方法^[15], 一个纤维素酶滤纸酶活单位 (FPU) 定义为 50 °C 时 1 h 内从 50 mg Whatman 1 号滤纸中释放 2 mg 还原糖所需酶量。主要步骤为: 准确称取 50 mg 滤纸于试管中, 加入 1 mL 0.05 mol/L 的 pH 值 4.8 柠檬酸缓冲液然后加入 0.5 mL 适当稀释的酶液, 于 50 °C 水浴中反应 1 h, 后加入 3 mL DNS 试剂并在沸水浴中煮沸 5 min, 然后取 0.2 mL 显色液于 2.5 mL 去离子水中混匀, 于 540 nm 下比色。实验中同时以缓冲液作背景, 以滤纸和酶液分别作对照, 并做出吸光度与葡萄糖质量浓度的标准曲线。

纤维二糖酶活测定亦根据国际应用化学联合会 (IUPAC) 推荐纤维素酶活测定方法^[15], 并做了如下修改: 酶活测定的反应体系包括 1 mL 的浓度 80 mmol/L 的纤维二糖溶液 (0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液 pH 值 4.8) 和 1 mL 适当稀释的酶液, 50 °C 下反应 10 min 用葡萄糖试剂盒测定产生的葡萄糖量。一个纤维二糖酶活单位 (CBU) 定义为每分钟从纤维二糖水解出 2 μmol 葡萄糖所需的酶量。

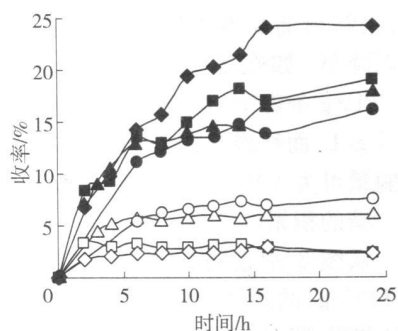
2 结果与讨论

2.1 水解条件对纤维素酶水解效率的影响

纤维素酶 Accellerase 1000 是目前最常用的工业纤维素酶, 而且相对其它纤维素酶具有较高的纤维二糖酶活, 其催化纤维素水解过程中可直接得到较高葡萄糖转化率而无须另外添加纤维二糖酶, 因此实验中考察了包括纤维素固含量、反应器类型、酶量、搅拌速率和温度等对 Accellerase 1000 水解效率的影响。

2.1.1 纤维素固含量 在酶反应器中加入 5% ~ 30% 的固含量的纤维素 (即水解体系中固体物料占总体积的质量分数), Accellerase 1000 水解纤维素的葡萄糖和纤维二糖收率随时间的变化结果见图 1。图 1 表明, 在糖化初期 (0~2 h) 葡萄糖收率在不同固含量下相差并不大; 随着时间的延长, 葡萄糖和纤维二糖收率都逐渐增加, 但增加的速度逐渐减缓; 随着固含量的增加, 葡萄糖和纤维二糖质量浓度增加, 但葡萄糖收率逐渐降低, 而纤维二糖收率增加。原因可能是由于固含量较高时, 纤维素水解后产生的葡萄糖质量浓度较高, 抑制了纤维二糖酶的活性^[8], 导致纤维二糖的积累。在水解初期, 虽然葡萄糖质量浓度相差较大, 但由于纤维素酶活性较高, 而滤纸在反应初期还没全部补加到酶反应器中, 纤维素酶此时相对过量, 因此糖收率也没有大的差别。因此, 在纤维素水解时要得到较高的糖质量浓度就要在较高固含量下水解, 而要获得较高的糖收率就要降低固体含量。

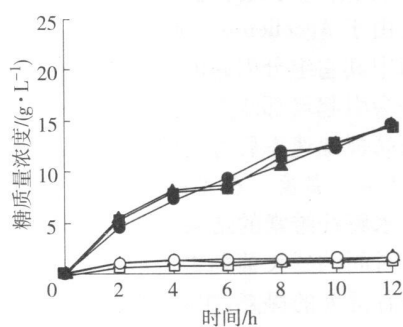
2.1.2 反应器类型 在不同反应器中搅拌速率为 50 r/min 的条件下 Accellerase 1000 催化水解纤维素的结果见图 2。图 2 表明, 在实验条件为 5% 固含量、加酶量 15 FPU/g 相同搅拌速率 (50 r/min) 下, 不同反应器中的水解情况差别不大, 在水解 12 h 后酶反应器、普通三角瓶和挡板三角瓶中基本上都能得到相同的糖质量浓度, 葡萄糖质量浓度分别为 14.2、14.4 和 14.5 g/L, 纤维二糖质量浓度分别为 1.48、1.44 和 1.35 g/L。



葡萄糖 glucose:
—◆— 5%; —■— 15%; —▲— 25%; —●— 30%
纤维二糖 cellobiose:
—◇— 5%; —□— 15%; —△— 25%; —○— 30%

图 1 不同纤维素固含量下滤纸水解的糖和收率随时间的变化

Fig. 1 Relationship of glucides yields of filter paper hydrolysis with time at different cellulose solid contents



葡萄糖 glucose:
—●— 酶反应器 bioreactor;
—▲— 普通三角瓶 common flask;
—■— 挡板三角瓶 flask with baffles
纤维二糖 cellobiose:
—○— 酶反应器 bioreactor;
—△— 普通三角瓶 common flask;
—□— 挡板三角瓶 flask with baffles

图 2 酶反应器类型对纤维素酶催化滤纸水解的影响

Fig. 2 Effect of reactor type on filter paper enzymatic hydrolysis

反应器类型对水解影响不大,原因可能是在此实验条件下传质问题可能已经不是影响纤维素酶水解的主要原因。

2.1.3 酶量和搅拌速率 在不同加酶量的条件下,普通摇瓶中 Accellerase 1000 催化水解纤维素随搅拌速率变化的情况见图 3。

图 3 表明,在相同固含量和搅拌速率条件下随着酶量的提高,水解后葡萄糖质量浓度提高,而纤维二糖则随着酶量的提高而降低,如在 5% 固含量、150 r/min 加酶量分别为 3 和 15 FPU/g 条件下,水解 12 h 后葡萄糖质量浓度分别为 2.4 和 12.1 g/L,而纤维二糖分别为 2.2 和 1.1 g/L。此结果说明,提高酶量可大大提高纤维素的水解效率,同时减少水解过程中纤维二糖的积累。

从图 3 中还可以看出,在较低固含量(5%)、较低酶量(3 FPU/g)的条件下,随着搅拌速率的提高酶解葡萄糖质量浓度逐渐降低,而纤维二糖却随之升高;在较低固含量(5%)、较高加酶量(15 FPU/g)的条件下,酶解后的葡萄糖和纤维二糖质量浓度都随着搅拌速率的提高而降低;在较高固含量(10%)的条件下,随着搅拌速率的提高,酶解后的葡萄糖质量浓度逐渐提高,而纤维二糖的质量浓度随之降低。

这说明搅拌速率对纤维素水解效率的影响在不同固含量和酶量条件下表现结果不同,原因可能是在较低固含量、高搅拌速率下搅拌剪切较强,从而引起了纤维素酶失活加速;而在酶量较低、高搅拌速率下纤维二糖的积累和葡萄糖的降低可能是由于 Accellerase 1000 中纤维二糖酶的失活速率高于纤维素酶中其它组分引起的。在固含量较高时,低搅拌速率下混合较差会引起局部浓度过高而增大产物对纤维素酶的抑制作用,但提高搅拌速率后可缓解此影响。

2.1.4 温度 在不同温度下,普通摇瓶中 Accellerase 1000 催化水解纤维素的结果见图 4。从图 4 中可以看出,温度不变,随着时间的延长葡萄糖的收率逐渐增加,但增加速率逐渐降低;随着温度的提高,相同时间内温度较高时产生的葡萄糖收率较高。低于 50℃ 时,提高温度有利于增加糖收率和葡萄糖产生速率;高于 50℃ 时,提高温度初期葡萄糖产生速率加快,但之后葡萄糖几乎没有增加。由此可以看出,较高的温度有利于提高纤维素酶的催化速率。因此获得耐高温纤维素酶有利于提高水解速率和缩短水解时间。

2.2 纤维素酶的失活情况

2.2.1 在醋酸缓冲液中的失活 两种工业纤维素酶(Accellerase 1000、Spezyme CP)和一种纤维二糖酶(Novozyme 188)在醋酸缓冲液中的失活情况见图 5。

从图 5(a)可以看出,纤维素酶的滤纸酶活随时间延长逐渐降低,Accellerase 1000 的失活速率较 Spezyme CP 快;Spezyme CP 与 Novozyme 188 混合后的酶活较 Accellerase 1000 和 Spezyme CP 高,可能是由于酶活测定时产生的葡萄糖相对较多,增大了酶活测定时的吸光度,或由于 Novozyme 188 中具有少量的纤维素酶的滤纸酶活引起;从图 5(a)还可看出,在初期纤维素酶的失活速率较快,而随着时间延长,失活速率逐渐变慢。

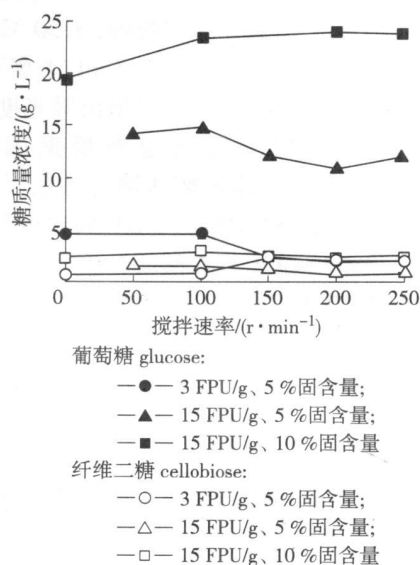


图 3 酶量和搅拌速率对纤维素酶催化滤纸水解的影响

Fig. 3 Effect of cellulase loading and stirring rate on filter paper enzymatic hydrolysis dosage

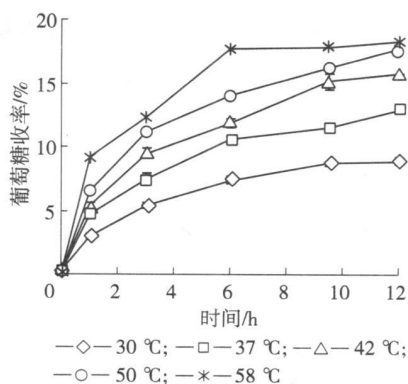


图 4 温度对纤维素酶催化滤纸水解的影响

Fig. 4 Effect of temperature on filter paper enzymatic hydrolysis

纤维二糖酶的酶活随时间变化见图 5 (b), 由于 Spezyme CP 中的纤维二糖酶的酶活很低, 故实验中并没有测定 Spezyme CP 的纤维二糖酶失活曲线。从图 5 (b)可以看出, Novozyme 188 和 Spezyme CP 与 Novozyme 188 的混合物在醋酸缓冲液中的失活并不明显, 说明其在最佳 pH 缓冲液中具有较强的稳定性。而 Accellerase 1000 中的纤维二糖酶的稳定性相对较低, 随着时间的延长, 酶活降低较大。结果说明, 不同的纤维素酶在缓冲液中的稳定性是不同的, 酶活都随着时间的延长而降低, 但失活程度不同, 因此在酶水解过程中选择稳定性较高的纤维素酶是很有必要的^[6-7]。

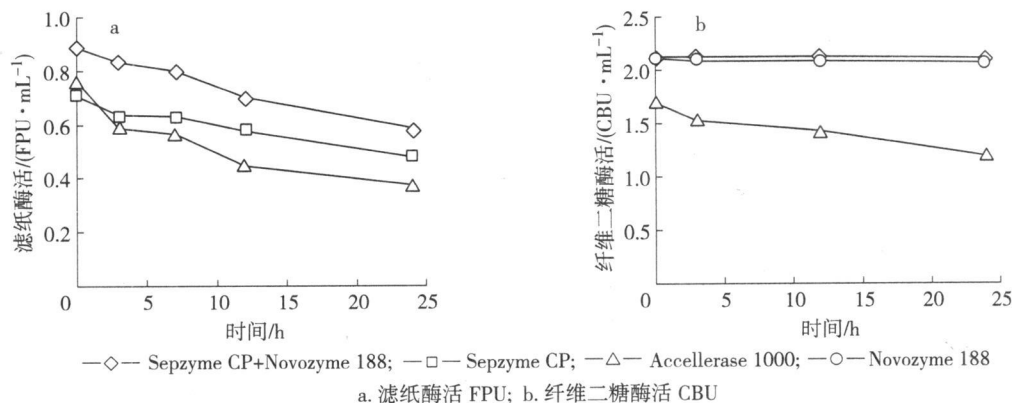


图 5 不同纤维素酶在醋酸缓冲液中的失活情况
Fig. 5 Deactivation of cellulases in acetate buffer

2.2.2 在木质素存在的缓冲液中的失活 不同纤维素酶在木质素存在的缓冲液中失活结果见图 6。图 6 表明, 木质素存在时纤维素酶的失活趋势和在醋酸缓冲液中类似, 但木质素存在时纤维素酶的滤纸酶活平均失活速率有所降低, 如在 24 h 时 Spezyme CP 和 Accellerase 1000 的残存酶活分别为 0.56 和 0.47 FPU /mL (图 6 (a)), 而在醋酸缓冲液中分别为 0.48 和 0.36 FPU /mL; 而纤维二糖酶活失活速率则比缓冲液中快 (图 6 (b))。这可能是由于木质素对纤维素酶的吸附对纤维素酶有一定的保护作用, 从而减小了失活速率, 而对于纤维二糖酶, 由于木质素固体颗粒的存在增大了剪切强度, 使其失活速率加快。

2.2.3 在滤纸水解过程中的失活 以滤纸为底物水解过程中纤维素酶失活情况如图 7。从图 7 (a) 中可以看出, 随着时间的延长滤纸水解过程中纤维素酶活逐渐降低, 且失活速率在前 6 h 内最快, 超过 6 h 基本不变。Spezyme CP 与 Novozyme 188 的混合物的酶活比 Spezyme CP 和 Accellerase 1000 高, 失活速率也较慢, 而 Accellerase 1000 的失活速率最快。

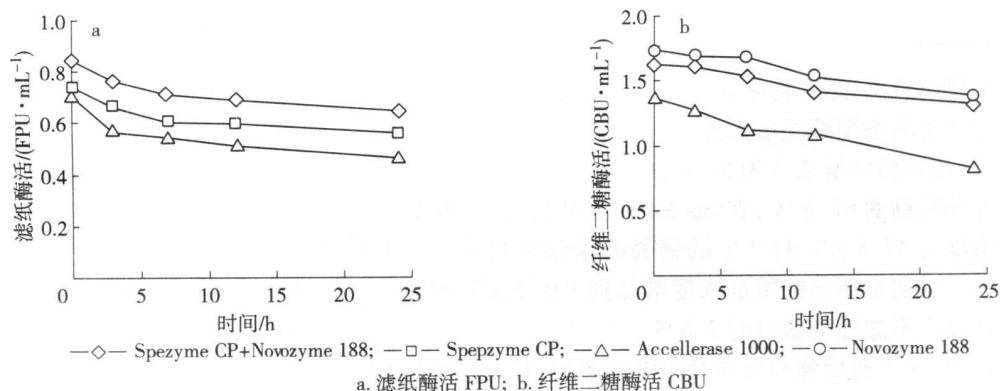


图 6 不同纤维素酶在木质素存在的醋酸缓冲液中的失活情况
Fig. 6 Deactivation of cellulases in acetate buffer with the existence of lignin

图 7 (b) 为滤纸水解过程中的纤维二糖酶失活情况。纤维二糖酶活同样随时间延长酶活逐渐降低, 但并没有滤纸酶活那样迅速。Novozyme 188 和 Spezyme CP 相对失活较慢, 而 Accellerase 1000 失活则较快。

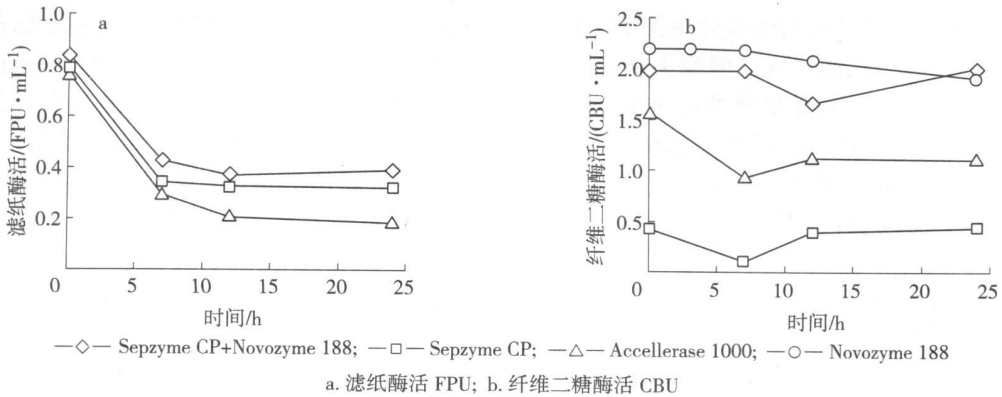


图 7 不同纤维素酶在滤纸水解过程中的失活情况

Fig. 7 Deactivation of cellulases during filter paper hydrolysis

2.2.4 葡萄糖对纤维素酶的抑制情况 初始葡萄糖质量浓度对纤维素酶的抑制情况见表 1。

表 1 初始葡萄糖质量浓度对不同纤维素酶催化滤纸酶水解的影响

Table 1 Effect of initial mass concentration of glucose on filter paper enzymatic hydrolysis by different cellulases

纤维素酶 cellulase	初始葡萄糖质量浓度 / (g L^{-1}) initial glucose mass concentration	水解 24 h 后葡萄糖 质量浓度 / (g L^{-1}) glucose mass concentration after hydrolysis	葡萄糖产生量 / (g L^{-1}) glucose produced	葡萄糖相对增加 质量分数 / % relative production mass fraction
Spezyme CP	0	38.4	38.4	100
	47.8	73.6	25.8	67.2
	95.6	114.8	19.2	50.0
	133.9	147.9	14.0	36.5
	172.2	179.8	7.6	19.8
	191.3	194.2	2.9	7.6
Accellerase 1000	0	52.9	52.9	100
	12.8	58.2	45.4	85.9
	26.5	63.9	37.4	70.8
	50.4	83.1	32.7	62.0
	74.9	105.5	30.6	57.8
	101.0	123.6	22.6	42.7
	121.9	141.5	19.6	37.1
	185.7	194.4	8.7	16.5

从表 1 可以看出,随着初始葡萄糖质量浓度的增加,在水解相同时间后产生的葡萄糖的量大大减少。如在 Accellerase 1000 催化下,初始葡萄糖质量浓度为 50.4 g/L 时产生的葡萄糖量仅相当于不加葡萄糖的 61.8%; 在 Spezyme CP 催化下,初始葡萄糖质量浓度为 47.8 g/L 时产生的葡萄糖量仅相当于不加葡萄糖的 67%, 当初始葡萄糖质量浓度增加到 191.3 g/L 时产生的葡萄糖量仅为不加葡萄糖时的 7.6%。

图 8 表明,随着初始葡萄糖质量浓度的增加,其对纤维素酶的抑制程度也增加,当初始葡萄糖质量浓度达到 100 g/L 时期对 Accellerase 1000 和 Spezyme CP 的抑制程度就已分别达到 50% 和 56%。这说明初始加入的葡萄糖对纤维素酶产生很大抑制作用,且葡萄糖质量浓度越高,抑制效果跟明显。从图 8 还可以看出,Spezyme CP 与 Accellerase 1000 相比,在初始葡萄糖质量浓度较低时其受到的抑制程度较低,而 Accellerase

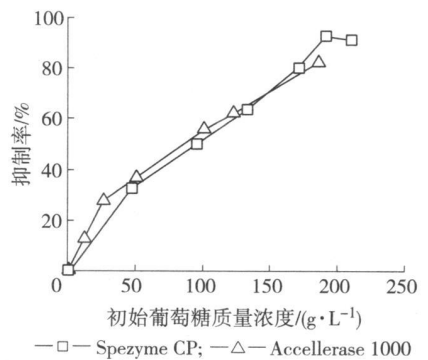


图 8 葡萄糖对不同纤维素酶催化滤纸酶水解的抑制情况

Fig. 8 Glucose inhibition on filter paper enzymatic hydrolysis with different cellulases

1000在初始葡萄糖质量浓度较低时所受到的抑制就较强。

3 结论

3.1 研究了影响工业纤维素酶 *Accellerase 1000* 水解效率的因素, 结果表明: 反应器类型对水解影响不大, 而固含量、酶量、搅拌速率和温度对 *Accellerase 1000* 酶解效率影响很大; 提高酶量可以提高纤维素转化率并降低纤维二糖的积累; 低固含量下高搅拌速率不利于最终糖收率提高, 而高固含量下提高搅拌速率则可促进纤维素的转化; 提高温度可提高纤维素水解速率从而缩短水解时间。

3.2 比较了 3 种工业纤维素酶在不同状态下的失活情况, 结果表明: 纤维素酶在水解初期的失活速率最大, 随着时间延长失活速率会降低; 在醋酸缓冲液中, *Accellerase 1000* 的滤纸酶活失活速率最快, 而 *Spezyme CP* 失活相对较慢, 纤维二糖酶活比滤纸酶活稳定, *Spezyme CP* 和 *Novozyme 188* 的纤维二糖酶活稳定, 但 *Accellerase 1000* 失活速率较快; 在有木质素存在的醋酸缓冲液中, 各纤维素酶的滤纸酶活失活变慢, 但纤维二糖酶失活加快; 在滤纸水解过程中, *Accellerase 1000* 的滤纸酶活和纤维二糖酶活失活最快, 而 *Spezyme CP* 和 *Novozyme 188* 相对较为稳定。

3.3 纤维素水解过程中初始葡萄糖质量浓度对纤维素酶有明显的抑制作用, 且葡萄糖质量浓度越高抑制越明显; 不同纤维素酶受葡萄糖抑制情况不同, 葡萄糖对 *Accellerase 1000* 的抑制作用比 *Spezyme CP* 更强。

参考文献:

- [1] LYND L R, CUSHMAN J H, NICHOLS R J, et al Fuel ethanol from cellulosic biomass [J]. *Science*, 1991, 251: 1318-1323
- [2] LUGAR R G, WOOLSEY R J The new petroleum [J]. *Foreign Affairs*, 1999, 78: 88-102
- [3] YANG Bin, LU Y arping Perspective The promise of cellulosic ethanol production in China [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007, 82: 6-10.
- [4] WYMAN C E Twenty years of trials tribulations and research progress in bioethanol technology—selected key events along the way [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 91/92/93(1-9): 5-21.
- [5] ADEN A, RUTH M, IBSEN K, et al Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover [M]. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, USA, NREL/TP-510-32438 2002.
- [6] GANESH K, JOSHI J B, SAWANT S B. Cellulase deactivation in a stirred reactor [J]. *Biochemical Engineering Journal* 2000, 4: 137-141.
- [7] GUNJKAR T P, SAWANT S B, JOSHI J B. Shear deactivation of cellulase, exoglucanase, endoglucanase, and β -glucosidase in a mechanically agitated reactor [J]. *Biotechnology Progress* 2001, 17: 1166-1168.
- [8] JING Xinyun, ZHANG Xiaoxi, BAO Jie. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, 159(3): 2273-2289
- [9] YANG Bin, WILLIES D M, WYMAN C E. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of avicel cellulose with conversion [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 2006, 94(6): 1122-1129.
- [10] YANG Bin, WYMAN C E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 2006, 94(4): 611-617.
- [11] 陈牧, 连之娜, 李鑫. 玉米秸秆蒸爆渣的氨基酸辅助纤维素酶水解 [J]. *生物质化学工程*, 2010, 44(2): 15-19
- [12] 徐勇, 勇强, 单谷, 等. 汽喷玉米秸秆纤维素酶水解的研究 [J]. *林产化工通讯*, 1999, 33(6): 15-19.
- [13] ZHANG Jian, CHU Deqiang, HUANG Juan, et al Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 2010, 105(4): 718-728
- [14] KUMAR R, WYMAN C E. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 2009, 103(2): 252-267
- [15] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.