不同条件对纤维素糖化反应动力学参数的影响

刘 璐[1]， 张志才[*1,2]， 樊亚娟[1]， 胡坤雅[1]， 汪 佳[1]

（1. 江苏大学，农业生产加工工程研究所，江苏 镇江 212013；2. 北京绿科天成生物有限公司，北京 102300）

摘要：纤维素是秸秆中发酵生产生物燃料的主要成分，将纤维素转化为可发酵性糖是秸秆发酵合成生物燃料的关键步骤。以糖得率作为指标，研究了不同反应条件对纤维素糖化反应的动力学模型参数的影响。The Impeded Michaelis Model(IMM)能很好的拟合试验数据，模型包含酶与底物的可接近度($K_{obs,0}$)和酶活性逐渐损失率(K_i)等两个参数。当 pH 4.41，温度 47 ℃，纤维素酶质量浓度 3 g/dL，底物质量浓度 5 g/dL 时，可获得糖得率 Y_{trs} 为 46%，$K_{obs,0}$ 为 0.265 4 h^{-1}，K_i 为 0.058 3 h^{-1}，与实验结果基本一致。温度和 pH 主要通过改变无效酶系数影响糖得率，而酶质量浓度和底物质量浓度主要改变酶对底物的可接性作用于糖得率；在试验浓度范围内 Y_{trs} 和 $K_{obs,0}$ 呈正相关关系，和 K_i 成负相关关系，对木质纤维素的糖化研究奠定了基础。

关键词：纤维素；水解；糖得率；动力学

中图分类号：TQ 352.78　**文章编号**：1673-1689(2019)09-0041-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.006

Effect of the Kinetics of Cellulose Saccharification under Different Conditions

LIU Lu[1]， *ZHANG Zhicai*[*1,2]， *FAN Yajuan*[1]， *HU Kunya*[1]， *WANG Jia*[1]

（1. Institute of Agro-Production Processing Engineering，Jiangsu University，Zhenjiang 212013，China；2. Beijing Green Technology and Nature Biotechnology Co. Ltd.，Beijing 102300，China）

Abstract：The cellulose is the main component of the strain to produce bio-fuel. The saccharification of cellulose to fermentable sugars is critical step to fermentation of stalk to synthesize biofuel. The effects of various reaction conditions on parameters of the kinetics of cellulose saccharifications reaction were studied using the sugar yield(Y_{trs}) as an index. The Impeded Michaelis model containing two parameters including the accessibility between enzyme and the substrate ($K_{obs,0}$) and the gradual loss of enzyme activity (K_i) could be fitted all experimental data well. The predicted maximum Y_{trs}(46%)，$K_{obs,0}$(0.265 4 h^{-1})，K_i(0.058 3 h^{-1})was obtained under the following conditions：pH of 4.41，temperature of 47 ℃，3% cellulase and 5% corn stover based on the model. The predicted results was in line with the experimental results. Temperature and pH mainly increase Y_{trs} by decreasing K_i，and the enzyme solubility and substrate concentration increases Y_{trs} mainly by increasing $K_{obs,0}$. Ytrs is significantly positively correlated with $K_{obs,0}$ and negatively correlated with K_i. This study lays the foundation for the saccharification of lignocellulose.

Keywords：cellulose，hydrolysis，sugar yield，kinetics

收稿日期：2017-12-05

基金项目：国家自然科学基金项目(31101269)；江苏省自然科学基金项目(BK2011154)。

*** 通信作者**：张志才(1966—)，男，研究员，主要从事微生物发酵研究。E-mail：zhangzhicai@ujs.edu.cn

引用本文：刘璐，张志才，樊亚娟，等. 不同条件对纤维素糖化反应动力学参数的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(09)：41-49.

秸秆转变成生物质能源包括 4 个步骤:秸秆的预处理、秸秆纤维素的糖化、发酵和生物能源的提取。其中纤维素糖化,即把秸秆中的纤维素转变成可发酵的己糖[1-3],是秸秆开发利用生产清洁能源过程中一个极其重要步骤。秸秆中的纤维素糖化反应是一个动态反应过程,为探究其行为机理需要进行动力模型学研究,利用该模型研究影响酶水解效率的因素及规律[4]。

由于纤维素酶水解过程是异相反应,且反应速率常数不断降低,准稳态理论不成立,再加上酶水解反应动力学较复杂,不能采用传统的米氏方程进行描述[5]。而米氏方程模型仅适用于均相体系中,许多生物催化反应发生在非均相系统中,受到扩散与传质,反应物分子、产物分子与催化剂表面发生的吸附、传递、脱附、酶变性等影响[6-7]。因此,无法用传统的米氏方程理论描述非常规的反应[8],需要对模型进行修改以描述非均质系统中的酶反应[9]。

Kopelman 等认为非均相反应的动力学不遵从经典动力学模型,速率常数随着时间而变,速率常数与反应级数和谱维数有关,酶解反应动力学属于类分形动力学模型[10-11]。Priit Väljamäe 采用类分形动力学研究了里氏木霉的水解过程,同时提出类分形动力学可能也适用于纤维素的酶解过程[12]。Huang 研究了不同浓度的不溶性酶对不同浓度的底物水解,提出了快速吸附的动力学模型,并讨论了确定动力学参数的方法[13]。

而 IMM 的研究对象是复杂、抽象和未简化的非线性系统,不仅可以认识其内在规律、反映事物的内在本质,还可以简化研究过程。简化的动力学模型使用 $K_{obs,0}$ 来考虑预处理前后底物酶的初始活性和可及性,K_i 表现出由酶对惰性和非反应性物质的阻碍反应引起的酶活性逐渐丧失的异构系统,IMM 可以清晰反应纤维素酶水解的反应过程。对此,作者选择 IMM 研究了不同反应条件对纤维素糖化反应动力学参数的影响,以获得最大糖得率,为木质纤维素的糖化奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

纤维素:购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;纤维素酶:购自和氏璧生物技术有限公司。

1.2 动力学模型

纤维素的糖化反应发生于非均相体系,反应过程可以用下列方程表示:

$$\underset{[s]}{S}+\underset{[E_0]-[ES]}{E}\underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}}\underset{[ES]}{ES}\xrightarrow{k_2}P+E$$

其中 S,P 和 ES 分别表示底物、产物,和酶-底物复合物。k_1 和 k_2 是指正向反应速率常数,k_{-1} 表示反向反应速率常数。模型假设:(i)与酶反应相比,固体底物对酶的吸附速率更快,(ii) 酶的反应受阻主要包括产物抑制,基质对酶非反应位点的吸附作用,以及酶的质量转移阻力,(iii)酶反应被认为是酶(E)与底物的结合形成酶-底物复合物,(iv)预处理对固体底物结构的影响通过相应的反应速率即 k_1,k_{-1} 和 k_2 反映出来。基于以上假设,在反应过程中,当[ES]处于准稳态,对于[ES]有,$\mu_{分解}=\mu_{合成}$,$\mu_{分解}=(k_{-1}+k_2)[ES]$,$\mu_{合成}=k_1[E][S]$,由此得到[$ES$] =[$E$][$S$] / K_m,这里 $K_m=(k_{-1}+k_2)/k_1$。因此,产物的生成速率可以表示为:

$$\frac{dp}{dt}=k_2[ES]=k_2\frac{[E][S]}{k_m}=(k_2\frac{[E]}{k_m})[S] \quad (1)$$

产物和底物达到平衡时,

$$[s_0]=[s]+[ES]+[p] \quad (2)$$

式(2)中:[S_0]表示底物初始浓度。因为[ES]<<[P] +[S],所以[ES]可忽略。(2)可简化为下式:

$$[s]=[s_0]-[p]=[s_0](1-\frac{[p]}{[s_0]}) \quad (3)$$

公式(3)代入公式(1),化简得到下列公式(4):

$$\frac{dp}{dt}=[s_0](k_2\frac{[E]}{k_m})(1-\frac{[p]}{[s_0]}) \quad (4)$$

令[P]/[S_0] = Y_{trs},代入式(4)中。

$$\frac{dY_{trs}}{dt}=k_2\frac{E_0}{K_m}(\frac{[E]}{[E_0]})(1-Y_{trs})=K_{obs,0}(\frac{[E]}{[E_0]})(1-Y_{trs}) \quad (5)$$

公式(5)中 $k_2[E_0]/K_m=K_{obs,0}$,且 $K_{obs,0}$ 取决于底物预处理的效果,酶对底物的可及性以及酶在固体基质中的活性。非均相反应体系中的糖化反应由于底物的不可溶解性导致酶与底物接触面积过小而使得反应速率很慢。因此,酶的活性受到阻碍,酶的水解速率逐渐减小。阻碍的反应可由下式表示出来,$E\xrightarrow{K_i}E_i$,其中,K_i 表示水解过程中无效酶的系数,E_i 表示无效酶。阻碍反应可通过如下一阶方程表示:

$$\frac{d[E_i]}{dt}=K_i[E] \quad (6)$$

随着反应的进行,可与酶反应的底物随着时间的增大而减少。基于对实验的观察,K_i 可用随时间

变化的下列函数表示：

$$K_i=\frac{2\alpha}{(1+\alpha t)} \tag{7}$$

酶的物料平衡组成为：

$$[E_0]=[E]+[ES]+[E_i] \tag{8}$$

式(8)中，$[E_0]$，$[E]$，$[ES]$，$[E_i]$指初始酶浓度，自由酶的浓度，一个酶–底物复合物的浓度，一个无效酶的浓度。式(8)对时间求导，得式(9)。

$$\frac{d[E]}{dt}+\frac{d[ES]}{dt}+\frac{d[E_i]}{dt}=0 \tag{9}$$

因为$[ES]$复合物被假设为稳定态且 $d[ES]/dt\approx 0$，所以，式(9)可被简化为下式。

$$-\frac{d[E]}{dt}=\frac{d[E_i]}{dt}=k_i[E] \tag{10}$$

将公式(7)带入公式(10)中，得下式。

$$-\frac{d[E]}{[E]}=\frac{2\alpha}{(1+\alpha t)}dt \tag{11}$$

公式(11)进行积分，得$[E]/[E_0] = 1/(1 +\alpha t)^2$，带入式(5)，得下式。

$$\frac{dY_{trs}}{dt}=K_{obs,0}\frac{1}{(1+\alpha t)^2}(1-Y_{trs}) \tag{12}$$

对公式(12)整理并积分给出下列公式。

$$-\ln(1-Y_{trs})=\frac{K_{obs,0}t}{1+\alpha t} \tag{13}$$

对式(13)进行变形，得下式。

$$\frac{t}{-\ln(1-Y_{trs})}=\frac{1}{K_{obs,0}}+\frac{\alpha}{K_{obs,0}}t \tag{14}$$

式(14)中，两边同时被 t 除，得到的 t 项和常数项系数分别为 $\alpha/K_{obs,0}$ 和 $1/K_{obs,0}$，K_i 可由式(7)进行计算，预测的 Y_{trs}($Y_{trs,pred}$)可由下式计算。

$$Y_{trs,pred}=1-e^{\left(-\frac{K_{obs,0}t}{(1+\alpha t)}\right)} \tag{15}$$

1.3　试验设计

由试验得到条件温度、pH、底物质量浓度和酶质量浓度对糖得率影响最大，因此设计 4 因素 3 水平的 29 组的 Box – Behnken 试验，研究温度(A)、pH(B)、底物质量浓度(C)和纤维素酶质量浓度(D)对糖得率 Y_{trs} 的影响，并采用 Design Expert 8.0.1、SPSS 17.0 软件进行分析[14-17]，通过比对各因素显著性筛选出最适合水解的条件，每组试验重复 3 次，试验因素及水平见表 1。对试验结果进行回归分析、方差分析。

为了探究 Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$、K_i 相关性，利用 SPSS 17.0 软件对其进行分析，通过显著性判断因素之间是否相关，获得方程，并解出方程，讨论三者之间的关系，获得最大糖得率。

表 1　Box–Behnken 设计方案

Table 1　Box–Behnken design of response surface design

组别	A/℃	B	C/%	D/%
1	50	7	10	1
2	50	7	5	2
3	50	5	10	2
4	50	5	10	2
5	50	3	15	2
6	50	5	5	3
7	40	5	10	1
8	60	7	10	2
9	50	5	15	1
10	50	7	15	2
11	40	5	5	2
12	60	5	15	2
13	40	3	10	2
14	50	3	5	2
15	60	3	10	2
16	40	5	10	3
17	50	5	5	1
18	50	5	10	2
19	60	5	5	2
20	40	7	10	2
21	50	5	10	2
22	50	3	10	1
23	40	5	15	2
24	60	5	10	1
25	50	5	10	2
26	60	5	10	3
27	50	5	15	3
28	50	7	10	3
29	50	3	10	3

1.4　分析方法

1.4.1　纤维素酶水解　将纤维素与纤维素酶在 pH 4.8 0.1 mol/L 的乙酸盐缓冲液混合后，加到 100 mL 三角瓶中用 DNS 法[18]测定初始还原糖质量浓度为 C_0。在 50 ℃，120 r/min 水浴摇床中的振荡糖化，分别于 0、1、2、4、8、16、32 h 取样，并将样品冰浴冷却。取样品与离心管中，4 000 r/min 离心 15 min，取上清液测定还原糖含量和酶活。

1.4.2　还原糖的测定　采用 3,5–二硝基水杨酸法[19]。

总还原糖的产量(Y_{trs})根据下列公式计算：

$$Y_{trs}=(C_1-C_0)\times V/G\times 100\% \quad (16)$$

其中,V 为反应体系的体积(mL),G 为底物质量(g),C_0、C_1 分别为反应前后还原糖质量浓度(g/mL)。

所有试验均经过 3 次平行试验,结果以平均值来表示。

1.5 数据处理

所有试验均经过 3 次平行试验,结果以平均值来表示,试验结果采用 EXCEL 2007 和 SPSS 17.0 统计分析软件来处理。

2 结果与讨论

2.1 模型拟合结果分析

影响酶反应速率的因素主要包括反应温度、溶液的 pH、酶质量分数和基质质量分数。试验选择响应面分析研究了这些因素的单独作用和交互作用对酶反应速率的影响。4 因素 3 水平 29 组试验的 BBD 运行,反应不同时间还原糖得率的结果显示在表 2。

用 IMM 模型(公式 14)拟合表 3 中的试验数据,得到表 3。

从表 3 可以看出,所有拟合的 R^2 都高于 0.96,并且与 adj-R^2 值极其接近,$p<0.001$,说明 IMM 模型能很好的拟合实验结果,而且具有较高的解释率和可信度。通过拟合的方程得到的 $K_{obs,0}$ 和 K_i 也显示在表 4。

表 2 Box–Behnken 设计运行结果

Table 2 Run results of Box–Behnken design of response surface design

组别	还原糖得率/%						
	0	1	2	4	8	16	32
1	4.20	5.78	6.62	6.82	7.73	8.08	8.81
2	15.71	18.04	19.19	19.89	21.02	21.59	22.08
3	8.55	13.02	13.97	16.95	19.84	23.52	24.03
4	6.72	11.66	13.33	16.78	18.48	22.97	24.11
5	4.96	7.91	9.05	9.80	12.40	13.23	16.41
6	28.60	30.54	31.64	35.46	43.33	45.88	53.64
7	4.26	6.62	7.57	8.90	10.79	12.65	14.54
8	8.42	9.34	10.38	10.17	11.45	11.72	12.57
9	4.01	6.20	6.93	8.23	10.47	11.94	15.85
10	5.60	7.35	7.90	8.19	8.99	10.07	10.67
11	16.12	18.94	20.88	23.68	26.61	30.79	32.96
12	5.80	8.57	9.53	12.82	13.04	13.35	14.10
13	7.67	8.93	11.76	12.97	13.76	15.57	18.81
14	14.27	18.98	20.92	22.81	26.81	27.56	31.07
15	7.67	9.41	10.62	11.50	12.09	12.47	13.31
16	11.48	13.42	16.21	17.31	20.10	24.10	25.36
17	11.41	14.09	15.63	17.73	20.62	23.54	30.62
18	6.74	11.53	11.66	15.48	17.80	21.50	26.95
19	16.12	20.88	22.85	24.89	26.43	27.48	28.38
20	8.42	9.17	11.65	12.17	12.99	13.91	14.41
21	7.37	11.40	11.69	15.70	16.77	21.63	27.00
22	3.90	6.37	7.15	8.21	9.50	10.55	11.40
23	5.80	7.56	8.84	9.82	11.28	14.07	15.73
24	4.26	7.64	9.12	10.36	12.16	12.38	13.83
25	6.75	11.73	11.82	15.30	17.13	20.87	26.52
26	11.48	15.87	17.29	20.36	20.98	21.36	21.97
27	6.58	11.77	12.60	15.58	16.84	19.03	20.92
28	11.55	14.13	15.03	15.15	16.72	18.29	18.97
29	10.24	13.67	15.52	17.27	21.43	22.52	25.81

表 3 Box–Behnken 设计运行结果的模型拟合分析

Table 3 Model fitting analysis of the run results of Box–Behnken design of response surface design

组别	拟合方程	R^2	Adj–R^2	$K_{obs,0}$/h^{-1}	K_i/h^{-1}
1	10.637t + 11.481	0.998	0.998	0.087 1	0.060 5
2	3.965 6t + 1.761 3	1.000	1.000	0.567 8	0.061 6
3	3.44t + 6.258 6	0.998	0.997	0.159 8	0.059 1
4	3.406 9t+ 7.610 8	0.997	0.996	0.131 4	0.058 4
5	5.346 5t + 14.484	0.985	0.981	0.069 0	0.057 6
6	1.241t + 3.455 2	0.986	0.983	0.289 4	0.057 5
7	5.999t + 16.177	0.994	0.992	0.061 8	0.057 6
8	7.347 1t + 5.880 5	0.999	0.998	0.170 1	0.061 0
9	5.416 1t + 22.077	0.971	0.964	0.045 3	0.055 4
10	8.639 3t + 9.854 2	0.998	0.998	0.101 5	0.060 3
11	2.389 1t + 4.489 2	0.997	0.996	0.222 8	0.059 0
12	6.441 4t + 5.651 1	0.999	0.999	0.177 0	0.060 8
13	4.637 2t + 10.908	0.987	0.984	0.091 7	0.058 2
14	2.615 6t + 4.200 4	0.995	0.994	0.238 1	0.059 5
15	6.913 2t+ 5.242 8	0.999	0.999	0.190 7	0.061 1
16	3.246 3t + 6.312 2	0.997	0.996	0.158 4	0.058 9
17	2.597 4t + 9.496	0.968	0.960	0.105 3	0.056 1
18	2.961 2t + 11.725	0.977	0.971	0.085 3	0.055 6
19	2.946 3t + 2.010 4	1.000	1.000	0.497 4	0.061 2
20	6.297 8t + 5.107 3	1.000	1.000	0.195 8	0.061 0
21	2.943 1t + 12.209	0.972	0.965	0.081 9	0.055 3
22	7.952 9t + 12.641	0.998	0.998	0.079 1	0.059 5
23	5.511 5t + 14.181	0.992	0.991	0.070 5	0.057 8
24	6.537 9t + 9.331 6	0.997	0.997	0.107 2	0.059 8
25	3.034 2t + 11.939	0.973	0.966	0.083 8	0.055 7
26	3.974 1t + 2.178 3	1.000	1.000	0.459 1	0.061 4
27	4.100 4t + 7.277 6	0.997	0.997	0.137 4	0.059 2
28	4.652 3t + 4.201 1	0.999	0.999	0.238 0	0.060 8
29	3.218 5t + 6.675 4	0.995	0.993	0.149 8	0.058 7

*:所有拟合方程的 p<0.001

2.2 响应面结果分析

从表 3 可见,反应时间 32 h 的糖得率最高,因此试验选择 32 h 的糖得率(Y_{trs})和表 4 中的 $K_{obs,0}$ 和 K_i 作为响应值,分析了反应温度,pH,底物质量浓度和纤维素酶质量浓度单独作用和交互作用对这 3 个响应值的影响。采用下列方程拟合实验数据:

$$Y=\beta_0+\sum_{i=1}^{4}\beta_i X_i+\sum_{i=1}^{3}\sum_{j=i+1}^{4}\beta_{ij}X_iX_j+\sum_{i=1}^{4}\beta_{ii}X^2{}_1 \quad (17)$$

其中 Y 是预测响应值(Y_{trs},$K_{obs,0}$ 和 K_i);β_0 是常数;β_i 是单独作用系数;β_{ij} 是不同因素间 X_iX_j 交互作用系数,β_{ii} 同一因素之间交互作用系数;X_i 和 X_j 表示自变量值。拟合结果显示在表 5。

方差分析的结果如表 5 所示。四元二次模型的 p < 0.05,Y_{trs} 值,$K_{obs,0}$ 和 K_i 的 F 值分别为 15.52,9.65 和 3.03,表明模型非常显著。模型的失拟项“Prob > F”值分别为 0.054 3,0.856 6,0.052 6 均大于 0.05,即失拟项不显著,因此模型具有统计意义。将表 5 中的各项系数分别带入方程(17),得到下列方程:

$$Y_{trs}=0.260-0.015A-0.024B-0.088C+0.060D+0.009AB+0.007AC+-0.007AD+0.008BC-0.011BD-0.045CD-0.051A^2-0.078B^2+0.088C^2+0.032D^2 \quad (18)$$

表 4　二次响应面模型的方差分析

Table 4　ANOVA analysis for quadratic response surface

来源	$K_{obs,0}$			K_i			Y_{trs}		
	系数	F 值	Prob> F	系数×10^{-4}	F 值	Prob> F	系数	F 值	Prob> F
模型		9.64	<0.000 1*		3.14	0.020 2*		15.52	<0.000 1*
Intercept	0.170			570			0.260		
A	0.067	6.92	0.014 7*	10.670	7.37	0.016 8*	−0.015	2.54	0.133 3*
B	0.045	3.17	0.087 6	8.883	5.05	0.041 3*	−0.024	7.00	0.019 2*
C	−0.110	18.82	0.000 2*	−3.167	0.65	0.433 9	−0.088	90.03	<0.000 1*
D	0.079	9.67	0.004 8*	6.333	2.60	0.129 4	0.060	41.83	<0.000 1*
AB				−7.250	1.13	0.304 9	0.009	0.33	0.576 1
AC				2.000	0.086	0.773 2	0.007	0.21	0.651 6
AD				0.750	0.012	0.913 8	−0.007	0.18	0.681 4
BC				1.500	0.049	0.828 8	0.008	0.26	0.619 1
BD				2.750	0.16	0.692 3	−0.011	0.44	0.517 0
CD				6.000	0.78	0.393 0	−0.045	7.88*	0.014 0*
A^2				19.610	13.45	0.002 5*	−0.051	16.67	0.001 1*
B^2				22.110	17.10	0.001 0*	−0.078	38.92	<0.000 1*
C^2				4.858	0. 83	0.378 88	0.088	6.43	0.023 7*
D^2				4.108	0.59	0.455 0	0.032	0.27	0.609 8
失拟项		7.19	0.034 2		0.46	0.856 6		5.79	0.052 6

注：A，B，C 和 D 分别表示温度，pH，底物浓度和酶浓度；*：模型显著

$$K_{obs,0}=0.170+0.067A+0.045B-0.110C+0.079D \quad (19)$$

$$K_i=(570+10.670A+8.833B-3.167C+6.333D-7.250AB+2.000AC+0.750AD+1.500BC+2.750BD-6.000CD+19.610A^2+22.110B^2+4.858C^2+4.108D^2)\times10^{-4} \quad (20)$$

采用 Design Expert 8.0.1 软件对试验结果进行分析。模型的“Prob > F”的 p 值小于 0.000 1，表明模型是显著的。在响应值为 Y_{trs} 的模型中，显著项为 B，C，D，CD，A^2，B^2，C^2，在响应值为 $K_{obs,0}$ 的模型中，显著项为 A，C，D，在响应值为 K_i 的模型中，显著项为 A，A^2，B^2。因此响应值为 Y_{trs} 模型中包含两个线性项（B，C，D），一个交互项（CD），三个交互项（A，B 和 C）；响应值为 $K_{obs,0}$ 模型包含两个线性项（A，C，D）；响应值为 K_i 模型包含两个线性项（A），和两个二次项（A^2，B^2）。

2.3　单因素作用分析

2.3.1　*温度对反应动力学模型参数的作用*　纤维素酶水解是一种化学反应，以分子运动为基础，以酶分子与底物分子的吸附、络合和解离为基础，分子动能与温度直接相关，且酶是生物催化剂，具有温度效应，影响酶解率[20]。在 40~48 ℃之间，温度升高，糖得率逐渐增大，无效酶（K_i）逐渐降低，在 48 ℃时，获得最大糖得率和最低的无效酶；当温度超过 48 ℃时，酶以失活为主无效酶逐渐增大，糖得率逐渐降低。在整个试验温度范围内随着温度升高，$K_{obs,0}$ 一直保持增加趋势，说明增加温度有利于增加酶与底物的可及性，提高酶的利用率。多数研究显示，纤维素酶作用底物的最佳温度范围为 40~65 ℃[21]，与实验所得结论一致。

2.3.2　*pH 对反应动力学模型参数的作用*　酶在一定的 pH 范围内才具有较高的催化活性，因此糖得率随 pH 变化的曲线呈抛物线形状。当pH<4.5 时，随 pH 值增加，糖得率逐渐增加，而无效酶逐渐减少；当 pH=4.5 时，糖得率取得最大值，而无效酶取得最低值；当 pH > 4.5，纤维素酶变性，较高的 pH 值会破会酶的空间结构，影响酶活性部分的解离状态，因此随着 pH 升高，虽然会保持蛋白质的天然性质，却失去了应有的活性[22]，导致无效酶活性增加，因此糖得率也随之减少。在 pH 在 4.5 时，糖得率取得最大值和无效酶取得最低值，证明 pH 的变化，通过影响纤维素酶的活力实现。在整个试验 pH 范围

内随着 pH 升高,$K_{obs,0}$ 一直保持增加趋势,说明增加 pH 有利于增加酶与底物的可及性,提高酶的利用率。研究显示,最适 pH 值范围为 4.0~5.5。

2.3.3 *底物质量浓度对反应动力学模型参数的作用* 增加底物质量浓度,尽管增加了酶与底物总的可接性,但是对于单位质量的底物来说,其相对可接性(K_{obs})是变小了,同时由于底物质量浓度增加,单位质量的酶失活作用(K_i)也表现的减少,因此导致单位底物的糖得率降低。当底物质量浓度较低,吸附到底物上的酶较少,大多数酶成游离状态,底物处于饱和吸附状态,因此当底物质量浓度增加,酶的可接性增加,底物吸附酶总量增加,但是单位重量的底物吸附的酶量减少,因而总的还原糖得率也降低。底物质量浓度增加,酶与底物的接触面积越大,酶解率提高。已有研究证明酶催化反应不是底物质量浓度越高越好,底物质量浓度越高,意味着酶溶液体积相对变小,造成反应产物不易扩散,会抑制酶的水解,严重降低水解速率。

2.3.4 *酶质量浓度对反应动力学模型参数的作用* 在一定酶质量浓度范围内,随着酶质量浓度的增加,增加底物质量浓度,可以增加单位底物酶可接性,因此在整个试验范围内,随着酶质量浓度增加,$K_{obs,0}$ 逐渐增加,酶质量浓度增多,导致酶非反应位点之间的吸附以及游离酶的增加,即单位底物无效酶(K_i)含量也在逐渐增加。因此随着酶质量浓度增加,糖得率增加是由于单位底物的酶可接近性增加产生。许多文献报道纤维素分子能和酶分子的结合点数有限,当这些结合点全部被酶分子占据后,再增加纤维素用量,起不到酶解作用。

2.4 交互作用分析

在响应面分析中,等高线通常用于研究各种因素之间的交互作用,分析等高线图,可以获得最优响应值时各因素的取值。表 5 显示,只有 CD(酶溶度和底物浓度)交互作用达到显著水平,说明其对糖得率影响显著。因此分析了这两个因素的交互作用。图 1 显示在实验范围内,酶质量浓度越高,底物质量浓度越低,其糖得率越高。该结果与单因素实验结果一致。

通过对回归方程 18,19 和 20 求解,得到获得最大 Y_{trs} 的条件为:pH 4.4,水解温度 47 ℃,纤维素酶质量浓度为 3 g/dL,底物质量分数 5%。预测最大糖得率为 0.485 4。可获得最大 $K_{obs,0}$ 的条件为:pH 7,水解温度 60 ℃,纤维素酶质量浓度为 3%,底物质量浓度5 g/dL。预测最大 $K_{obs,0}$ 为 0.474 0 h^{-1}。可获得最小 K_i 值的条件为:pH 4.47,水解温度 47.40 ℃,纤维素酶质量浓度为 1 g/dL,底物质量浓度 5 g/dL,预测最小 K_i 值为0.055 8 h^{-1}。综上所述,获得最大 Y_{trs},$K_{obs,0}$ 最小 K_i 的最优条件为:pH 4.84,温度 48.9 ℃,纤维素酶质量浓度 3 g/dL,底物质量浓度 5 g/dL。

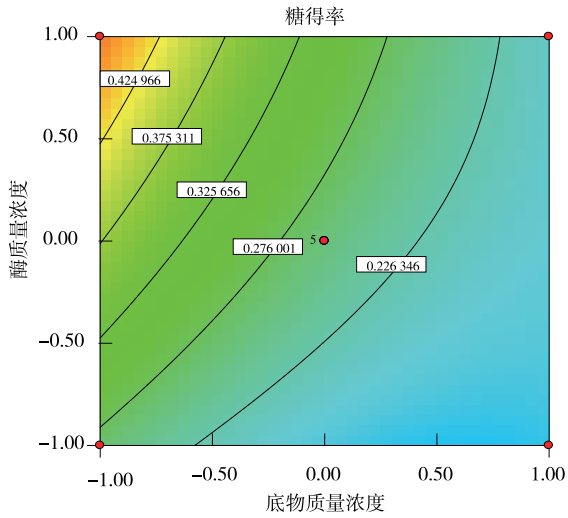


图 1 酶质量浓度和底物质量浓度对糖得率影响的响应面等高线图

Fig. 1 Response surface plot combined effects of Enzyme concentration and Substrate concentration ratio on Sugar yield

2.5 Y_{trs},$K_{obs,0}$ 和 K_i 的关系分析

因为 $K_{obs,0}$ 等于 $k_2[E_0]$ / K_m,$[E_0]$是纤维素酶初始浓度,在实验中是常数,$K_{obs,0}$ 与 $k_2[E_0]$ / K_m 成比例。k_2 是从酶–底物复合物到最终产物正向反应的速率常数。k_2 越大,Y_{trs} 越大。米氏常数 K_m 越小,亲和力越大。因此,可以推断 Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$ 呈正相关。K_i 是水解反应期间无效酶的系数,因此较低的K_i 表示较少的无效酶和更多的有效酶。因此,Y_{trs} 与 K_i 是负相关。为了验证这两个推导,以表 3 中 32 小时糖得率为因变量,表 4 中的 $k_{obs,0}$ 和 K_i 为自变量,采用下列方程(21)进行非线性回归分析:

$$Y_{trs}=a\times(K_{obs,0})^2+b\times K_{obs,0}+c\times(K_i)^2+d\times K_i+e \quad (21)$$

其中,a,b,c 和 d 分别为$(K_{obs,0})^2$,$K_{obs,0}$,$(K_i)^2$ 和 K_i 的系数,e 为常数。表 5 显示 F 试验的 F 值(68.304)和 t 检验的 p 值(0.000)表明 Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$、K_i

相关性非常显著,分析的可信度极高。R^2 为 0.919,高于 R^2 为 0.80 的置信度[27],以上均表明本模型的可预测性相对更可靠。调整 R^2 为 0.906,接近 R^2 值,即模型具有良好适应性。

表 5 每个项目 Y_{trs},$K_{obs,0}$ 和 K_i 之间的回归分析系数

Table 5 Coefficient of Regression Analysis Each Item between Y_{trs},$K_{obs,0}$,and K_i

Item	系数	Standard Error	t-value	Significance
常数	-15.925	5.012	-3.178	0.004
$(K_{obs,0})^2$	-2.272	0.334	-6.799	0.000
$K_{obs,0}$	2.049	0.200	10.253	0.000
$(K_i)^2$	-5 557.756	1 475.147	-3.768	0.001
K_i	597.650	172.168	3.471	0.002

注:*:F-value = 68.304,significance p = 0.000,R^2 = 0.919 adj-R^2 = 0.906

表 6 所有参数的系数均非常显著(p = 0.000)。其中$(K_{obs,0})^2$ 和$(K_i)^2$ 的系数为负值证明 Y_{trs} 和$K_{obs,0}$ 或 Y_{trs} 和 K_i 的关系曲线呈现倒 U 形,Y_{trs} 具有最大值。在将表 5 中的每项的系数引入等式(21)之后,得下式。

$$Y_{trs}=-2.272(K_{obs,0})^2+2.049K_{obs,0}-5\ 557.756(K_i)^2+597.650K_i-15.925 \quad (22)$$

分别对 $K_{obs,0}$、K_i 求导得式(23)、(24)

$$Y_{trs}'=-4.544K_{obs,0}+2.049 \quad (23)$$

$$Y_{trs}'=-11\ 115.512K_i+597.650 \quad (24)$$

令 $Y_{trs}'=0$,$K_{obs,0}$=0.450 9 和 K_i=0.053 8。当$K_{obs,0}<0.450\ 9$,$K_i<0.053\ 8$ 时,$Y_{trs}'>0$,即 Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$ 和 K_i 显著正相关。相反,$K_{obs,0}>0.450\ 9$ 和 $K_i>0.053\ 8$,$Y_{trs}'<0$,即 Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$ 和 K_i 显著负相关。当 $K_{obs,0}$=0.450 9,K_i=0.053 8 时,Y_{trs} 达到最大值 0.604 0。在表中,$K_{obs,0}$ 值大部分小于 0.450 9,所有 K_i 值大于 0.053 8,因此 Y_{trs} 与表征酶的初始活性和酶与底物的可及性的 $K_{obs,0}$ 显著正相关,与无效酶的系数 K_i 显著负相关。

3 结 语

对纤维素酶水解动力学进行了研究,建立了简单的动力学模型,响应面设计给出了获得最大 Y_{trs} 和 $K_{obs,0}$ 以及最小 K_i 的条件。分析了不同因素在水解过程中对糖得率的影响和各因素之间的交互作用对糖得率的影响。获得最大糖得率的条件为 pH 4.41,温度 47 ℃,纤维素酶质量浓度 3 g/dL 和底物质量浓度 5 g/dL。在最优条件下,最大 Y_{trs} 为 0.4854,与实验所获得最大糖得率的 0.442 9 接近。温度和 pH 主要通过改变无效酶系数影响糖得率,而酶和底物质量浓度主要改变酶对底物的可接性作用于糖得率;并进行了糖得率与动力学各参数之间的回归线性分析,得到相关性大于 0.9 的结果。在试验条件下,Y_{trs} 与 $K_{obs,0}$ 正相关,与 K_i 负相关。

参考文献:

[1] MURADOV N Z,VEZIROGLU T N. “Green”path from fossil-based to hydrogen economy:an overview of carbon-neutral technologies[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**,2008,33(23):6804-6839.

[2] ZHANG Quanguo,WANG Yi. Research progress of hydrogen production technology with photosynthetic bacteria [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2013,44(6):156-161.(in Chinese)

[3] WANG Yun,NI Ye,SUN Zhihao,et al. Production of biobutanol from corn stover hydrolyzate by *Clostridium saccharobutylicum* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(9):904-911.(in Chinese)

[4] LIU Mi,CHI Congcong,GONG Yahui,et al. Research progress in the fractal kinetics of lignocellulose enzymatic hydrolysis[J]. **China Pulp & Paper**,2015,34(8):62-67.(in Chinese)

[5] PRABUDDHA B,MELANIE H,MATTHEW J R,et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates [J]. **Biotechnology Advances**,2009,27(6):833.

[6] XU F,DING H. A new kinetic model for heterogeneous(or spatially confined) enzymatic catalysis:Contributions from the fractal and jamming(overcrowding) effects[J]. **Applied Catalysis A General**,2007,317(1):70-81.

[7] BANSAL P,HALL M,REALFF M J,et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates [J]. **Biotechnology Advances**,2009,27(6):833-848.

[8] ROTHSCHILD W G. Fractals in Chemistry[M]. New York:Wiley-Interscience,1998.

[9] YANG C Y,FANG T J. Kinetics for enzymatic hydrolysis of rice hulls by the ultrasonic pretreatment with a bio-based basic ionic liquid[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2015,100:23-29.

[10] KOPELMAN R. Fractal reaction kinetics[J]. **Science**,1988,241(4873):1620-1626.

[11] CHEN Jian. Application of the fractal theory in chemistry[J]. **Journal of Langfang Teachers College**,2012,12(03):51-53.(in Chinese)

[12] PRIIT V,KALLE K,GORAN P,et al. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetic [J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2003,84(2):254-257.

[13] HUANG A A. Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system [J]. **Biotechnology & Bioengineering**,1975,17(10):1421-1433.

[14] CORDOVA F J C,LEON A M G,REYES R B G,et al. Response surface methodology for lead biosorption on Aspergillus terreus [J]. **International Journal of Environmental Science and Technology**,2011,8(4):695-704.

[15] CERINO-CORDOVA F J,GARCIA-LENO A M,SOTO-REGALADO E,et al. Experimental design for the optimization of copper biosorption from aqueous solution by *Aspergillus terreus* [J]. **Journal of Environmental Management**,2012,95(2):S77-S82.

[16] DAVILA-GUZMAN N E,CERINO-CORDOVA F J,DIAZ-FLORES P E,et al. Equilibrium and kinetic studies of ferulic acid adsorption by Amberlite XAD-16[J]. **Chemical Engineering Journal**,2012,183(4):112-116.

[17] AMINI M,YOUNESI H,BAHRAMIFAR N. Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*:response surface methodology and isotherm study[J]. **Chemosphere**,2009,75(11):1483-1491.

[18] YANG C Y,FANG T J. Combination of ultrasonic irradiation with ionic liquid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw [J]. **Bioresource Technology**,2014,164(7):198-202.

[19] ZHOU Chunli,ZHONG Xianwu,FAN Hongbing,et al. Evaluation of different determination of water-soluble total sugar and reducing sugar in fruit and vegetable[J]. **The Food Industry**,2012,33(5):89-92.(in Chinese)

[20] LIN Yan,ZHANG Wei,HUA Xinyi,et al. Influencing factors of cellulase hydrolytic capability and changes of cellulose structure [J]. **Food and Fermentation Industries**,2012,38(4):39-43.(in Chinese)

[21] SHI Yazhong,FANG Jiaolong,QIAN Shiquan,et al. Response surface methodology for the optimization of enzymatic extraction of resveratrol grape pomace with cellulase[J]. **Food Science**,2013,34(4):75-79.(in Chinese)

[22] ZHAO Shiming,LU Qingshan,CHU Qiulu,et al. Enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by green liquor [J]. **Chemistry and Industry of Forest Products**,2012,32(5):69-76.(in Chinese)