

## 摘 要

本文以资源综合利用为目的,对植物纤维废弃物中的玉米秸秆、玉米芯及纺织厂残棉的水解进行了研究,水解方式包括浓硫酸水解、稀硫酸水解、纤维素酶水解;并对水解液的乳酸发酵利用进行了初步探索。

本文研究了纤维材料的浓硫酸水解,考察温度、硫酸浓度(50%~80%)、原料粒度、底物浓度对水解的影响。通过实验发现,影响玉米秸秆浓硫酸水解的主要影响因素是硫酸浓度和水解温度,底物浓度和颗粒尺寸对水解速度及还原糖产率影响较小。对于玉米秸秆,水解速率随温度提高而提高,随硫酸浓度提高而提高,但是浓硫酸浓度超过70%、温度超过60℃时,单糖降解速率大于纤维的水解速率。此外,研究了玉米秸秆浓硫酸水解的动力学,建立了动力学模型,该模型能较好的关联实验数据。浓硫酸水解的优点是常温常压下操作,糖产率高,缺点是酸消耗量大,并且硫酸回收困难,容易造成环境污染。因此,考虑研究纤维材料的稀硫酸水解。

国内利用稀硫酸处理玉米芯的研究较少,本文在常压条件下研究了纤维材料的稀硫酸水解,考察温度、硫酸浓度(0.5%~3%)、原料粒度、固液比对水解的影响。研究表明,水解速率随温度提高而提高,水解速率随硫酸浓度提高而提高,当硫酸浓度是1%时,不但水解速率快,而且纤维水解得率高,但硫酸浓度超过2%时,反应后期单糖开始降解。将玉米秸秆和残棉在相同条件下进行反应,发现,玉米芯的水解效率及还原糖含量都较高,其次为玉米秸秆。通过实验研究,不但得到最佳水解条件,而且所得水解效率及水解液中还原糖的浓度都较高。稀硫酸水解的优点是水解速率大,可不回收酸,缺点是葡萄糖含量低,后续发酵利用较困难,水解温度高。所以,考虑研究酶水解。

目前,大多数酶水解研究都采用*Trichoderma reesi*和*Trichoderma viride*,这些酶还处在实验研究阶段,反应速率也较慢。本实验采用Cellusoft L和Suhong Cellish L进行纤维素酶水解研究,这两种纤维素酶均为纺织工业中用于棉麻织物抛光的制剂,在本实验中将其用于废弃纤维材料的生物降解,属首创,还未见相关报道,并且取得良好效果,该酶水解速率较高,24小时已基本达到平衡值。本实验采用的两种酶已应用于纺

织品的工业化生产，一旦纤维素酶水解条件成熟，可立即大规模投入生产，从而节省纤维素酶研发的时间和费用。

酶水解的主要影响因素为温度、PH值、微量元素及底物浓度，以酶解得率为主要指标设计了四因素三水平的正交实验。并研究了时间对酶解的影响，对不同纤维素酶及不同材料的酶解也进行了初步研究。通过本实验得出：玉米秸秆降解到48h时反应可以停止；温度和pH对酶解效率的影响明显；微量的金属离子 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 能促进酶的降解，而过多的金属离子则不利于纤维素的降解。在相同条件下研究了残棉和玉米芯的转化，玉米芯的转化率较高。酶水解优点是糖产率较高，反应条件温和，降解少，糖质量好，缺点是酶成本高，水解速率小。

最后，采用米根霉对水解液的乳酸发酵进行初步研究。稀酸水解液中木糖含量超过90%，米根霉利用木糖较慢，第三天开始产酸。米根霉对酶水解液的适应时间也较长。

**关键词：**纤维材料 水解效率 浓硫酸 稀硫酸 纤维素酶 发酵

## Hydrolysis of abandoned cellulosic materials

### ABSTRACT

The main purpose of this paper is about the utilization of renewable materials, which includes waste cotton from textile factory, corncob and corn stalk. Hydrolysis of abandoned cellulose was studied. Three techniques were used, concentrated sulfuric acid hydrolysis, dilute sulfuric acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis. Lactic acid fermentation of hydrolyzate of cellulosic materials had also been studied.

At first, the concentrated sulfuric acid hydrolysis was studied. The influential factors, the concentration of sulfuric acid, hydrolyzing temperature, the granularity of corn stalk, solid content, were investigated. From the experimental result, concentration of sulfuric acid and hydrolyzing temperature were the main factors among them. As for corn stalk, the hydrolysis rate was accelerated as hydrolyzing temperature and the concentration of sulfuric acid rising. But when hydrolyzing temperature was higher than 60°C and the concentration was larger than 70%, the rate of hydrolysis dropped. According to the mechanism of the concentrated sulfuric acid hydrolysis, the kinetic equation of hydrolysis had been deduced, the calculation value was coincide well with experimental result.

The hydrolysis of concentrated sulfuric acid can be carried out at low temperature, atmospheric pressure, and the reducing sugar concentration is large. However, it needs a large quantity of sulfuric acid to hydrolysis, and difficult to reuse the waste sulfuric acid, so it may pollute the environment. In order to overcome the shortcoming, dilute sulfuric acid hydrolysis had been studied.

The dilute sulfuric acid (0.5%~3%) hydrolysis was carried out at atmospheric pressure, and the influential factors are the same as mentioned

above. According to the results, the hydrolysis rate was accelerated as hydrolyzing temperature and the concentration of sulfuric acid rising. When hydrolysis concentration reached to 1%, both hydrolysis rate and reducing sugar concentration were high. While hydrolysis concentration was larger than 2%, reducing sugar concentration began dropping. Hydrolyzing waste cotton and corncob on the same condition. It was found that the hydrolysis rate of corn core was the highest, while the hydrolysis rate of waste cotton was the lowest. Through research, the most suitable hydrolyzing conditions were found.

Dilute sulfuric acid hydrolysis needs high temperature, and obtains low reducing sugar concentration, which will be difficult to ferment. So enzymatic hydrolysis was studied next.

Most enzymatic hydrolysis researches using *Trichoderma reesi* and *Trichoderma viride*, these cellulases are researching in laboratory. In this experiment we use Cellusoft L and Suhong Cellish L as hydrolysis enzymes, which were widely used in textile industry. It was the first time that was applied to cellulosic materials enzymatic hydrolysis. The results of enzymatic hydrolysis were very good: high hydrolysis rate (almost reached to balance within twenty-four hours). The cellulases we used can adapt to industrialization producing, when enzymatic hydrolysis conditions becomes maturity, it can be put into producing immediately, so it will save the capital and time of research on cellulose enzyme.

The main influential factors of enzymatic hydrolysis were temperature, pH, microelement and solid content. In consideration of the factors, we designed four factors and three levels orthogonal experiment. The impacts of time and different materials on enzymatic hydrolysis were also studied. The notable effects are temperature and pH. Hydrolyzing waste cotton and corncob were on the same condition. The hydrolysis rate of corncob was the highest. The advantages of enzymatic hydrolysis are large sugar concentration, high

quality of sugar, and moderate reaction conditions.

At last, lactic acid fermentation of hydrolyzate of cellulosic materials by *Rhizopus oryzae* had been studied briefly.

**YangXiaohan(Environment Engineering)**

**Supervised by: Prof. Zhou Meihua**

**Keywords: cellulosic material, hydrolysis rate, concentrated sulfuric acid, dilute sulfuric acid, cellulase, fermentation**

附件一：

## 东华大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：杨小寒

日期：2003年12月28日

附件二:

## 东华大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权东华大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ，在 \_\_\_\_ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 。

学位论文作者签名: 杨小寒

指导教师签名: 周美华

日期: 2003年12月28日

日期: 2003年12月30日

## 第一章 植物纤维资源化现状与发展

植物纤维素是人类可利用的最丰富的天然可再生资源。相当于草木细胞壁材料的50%，若以干重计世界年产生量为1640亿吨<sup>[1]</sup>。其中植物纤维素物质占40~50%、就整个植物生物量来说，除种子外，仅每年进入死亡循环过程的部分、相当于世界能耗量的10倍左右，或粮食消费量的200倍。

### 1.1 世界植物纤维素的资源概况

在世界范围内，大地植物约产生24吨/人·年的纤维素，现在每年可方便地用纤维素进行加工的为40亿吨。其中有26亿吨存在于木材和纸浆中，农作物秸秆、茎叶和蔗渣等都是植物纤维素的天然来源。此外，食品、制材、化工等工业生产中还产生大量的含纤维素类的废渣、废液。全世界木材加工业采伐的木材中，大约三分之一最终将变成剩余物或废品。仅全世界每年剥落的树皮就有2.8亿立方米<sup>[2]</sup>。美国全年生产农业废弃物6.87亿吨，城市垃圾20900万吨（按干重计）。就整个世界看，资源的利用率较低，据国外估计，在国民经济周转中，社会需要的最终产品仅占原料同量的20~30%，最少的只有1%~2%，即70~80%或更多的资源成为废弃物<sup>[3]</sup>。怎样提高资源利用率，综合开发利用废弃物资源已成为当今世界各国的热门课题。

### 1.2 我国植物纤维素的资源概况

我国农副产品和野生植物资源丰富。据估计仅纤维素物质每年就有10亿吨。农业植物纤维废料的年产量约11780万吨，其中稻壳3386万吨，麦秆6500万吨，玉米芯1250万吨，甘蔗渣405万吨，棉籽壳200万吨，向日葵壳27万吨，油菜壳12.5万吨<sup>[4]</sup>。林业生产每年还可提供采伐和加工剩余物1000万吨之多。还有工业排放废弃物甜菜粕240万吨，淀粉渣500万吨等等。我国植物纤维素资源在国际上居于前列。我国是一个农业大国，随着农村经济的发展，农村科技的进步，农作物秸秆产量随着粮食产量的增加逐年增加。这是一笔很大的自然资源，很多人对它的综合利用技术进行了研究。但目前其有效利用率很低，科技含量少。主要的利用方式有，秸秆作为低级燃料，农作物收获后其秸秆直接人土腐败为肥，秸秆过



腹还田<sup>[5]</sup>。此外还有相当部分农作物秸秆废弃田间；放火焚烧现象仍然存在，浓烟影响民航航班事件就是例证，火灾事故经常发生。另一方面，科学地开发利用农作物秸秆，是我们解决未来能源和资源问题的主要途径之一。这对国民经济的发展、清洁生产以及生态环境的保护，都是可行和必要的。

### 1.3 植物纤维资源化的目的意义

可持续发展是当前人们关注的焦点，而可持续发展的关键是资源，资源是制约社会进步、经济发展和人民生活水平提高的关键因素之一。地球上一次性矿物资源是有限的，并随着经济发展正在以越来越快的速度消减。可再生资源则可以不断地得到更新。从这一意义上说，是取之不尽、用之不竭的。植物纤维类材料这一巨大而未被充分利用的资源，含有大量纤维素、半纤维素物质，是丰富的可再生资源。这类资源中的半纤维素、纤维素经水解后，可以获得以木糖为主的五碳糖及以葡萄糖为主的六碳糖，是发酵工业和许多化学工业及其它工业部门的重要原料。只要利用可再生资源中的一部分作为工业原料，就可缓解上述工业部门原料紧张的问题，产生巨大的经济和社会效益<sup>[6]</sup>。

目前水解产品主要有：酒精、乳酸、糠醛、木糖醇、木糖、饲料酵母及活性碳等。酒精是十分重要的工业产品，其用途十分广泛。水解液经发酵生产酒精，可取代粮食酒精应用于工业生产中，并可取代汽油燃料用做汽车燃料。乳酸是用途广泛的有机酸之一，应用于食品饮料、化工、皮革、医药、卷烟等行业，乳酸需求量特别是L-乳酸正日益增大。乳酸的生产方法很多，工业生产主要有化学合成法、发酵法等，但传统乳酸发酵所用原料主要是淀粉质原料，如果能采用价廉的植物纤维原料，将大大拓展其生产原料的后备来源。原料糖转化为乳酸的产率依所用菌种不同可达75%~97%。因此，采用植物纤维水解液发酵制酒精和乳酸，既可节约粮食和石油资源，还可降低原料成本。植物纤维原料中的多聚戊糖水解后形成了戊糖和糠醛酸，经脱水而生成糠醛。糠醛可生产糠醇、四氢糠醇及四氢呋喃。木糖醇是一种五碳糖醇，被广泛用于国防、医药、食品和化学等工业，木糖醇可作为糖尿病人的食糖代用品，另外木糖醇还可作为防龋食品。水解液还可直接作为发酵基质，生产饲料酵母和单细胞蛋白来满足对蛋白质的需求。

在我国利用纤维原料水解液生产化工产品，符合我国的国情和产业政策、是

一个大有作为的项目。传统的酒精和乳酸生产工艺主要以粮食为原料。以红薯干生产酒精为例，每生产1吨酒精需要3.08吨红薯干，目前红薯干的市场价格约为1400元/吨左右，酒精的销售价格在4500元/吨左右，仅原料成本一项就占销售收入的90%以上，由于原料成本过大，目前国内仍在开工的酒精厂很多都处于亏本运行状态。而如果利用农林纤维废弃物生产酒精，由于原料可以免费收集或低价收购，因此可以极大地降低生产原料成本，使酒精生产扭亏为盈。根据浙江大学在河北省完成的以玉米棒芯生产酒精的中试结果分析，用植物纤维废弃物代替粮食生产酒精，在技术上可行、经济上有效<sup>[5]</sup>。中试工厂地处冀中平原，附近农村盛产玉米，在收获季节，玉米棒经脱粒后余下的玉米棒芯堆积如山，大多数没有得到充分的利用，并且造成一定的环境污染。实际上，玉米棒芯是一种很好的生产酒精的植物纤维原料。根据试验结果，每生产1吨酒精大约需要4.5吨玉米棒芯，玉米棒芯收购价为210元/吨，每吨酒精原料成本约为945元，仅为红薯干成本的1/5，加上辅料、工资、水电支出、折旧、车间费用、管理费用等其他各项费用，酒精生产总成本为3500~4000元/吨，一个年产1万吨酒精的工厂，每年可获利500~1000万元。我国每年废弃的上亿吨的农作物秸秆、甘蔗渣及木材加工剩余物，若能合理加以开发利用，将产生十分明显的经济和社会效益。

### 1. 节约粮食

目前我国酒精生产70%以薯干、玉米、大米等粮食为原料(不包括饮用酒精)，而乳酸生产则主要依赖粮食，每年为此消耗大量的粮食资源。我国人口众多，耕地面积相对较少，人均粮食产量仅为经济发达国家平均水平的50%，再加上近年来饲料用粮的不断增加，粮食供应形势日趋严峻。利用农林植物纤维废弃物发酵酒精，可节约大量粮食，缓解粮食紧张局势。

### 2. 改善环境条件

由农林纤维废弃物引起的大气污染和水质污染等环境问题长期以来一直未得到根本解决，近年来，由于农民焚烧农作物秸秆，造成烟雾弥漫，迫使机场临时关闭的事件已屡有发生，这种现象已经引起有关部门的高度重视。利用农林纤维废弃物生产化工产品。可以变废为宝，既减少生物质资源的浪费，减少污染、美化环境，又可以产生直接的经济效益，因此具有一箭双雕的功效。

### 3. 盘活固定资产存量，解决下岗职工再就业

由于酒精、乳酸生产成本过高,近年来,很多工厂入不敷出,长期处于亏本经营或停业待产状态,一大批职工下岗待业。仅1993年上半年,山东省就有10余家酒精厂停产。江苏省以粮食为原料的酒精厂有20多家,目前经济效益普遍不佳。这些企业的固定资产少则几百万,多则数亿元,很多固定资产都通过银行贷款而购置的,目前这些固定资产不仅产出少,而且企业每年要支付一笔数目不少的利息以及设备保养维修费。若这些企业能引进新的生产技术,对原有的设备进行小规模改造,将会产生十分可观的经济收益,并可盘活一大批固定资产,使长期闲置的固定资产重新运转起来。同时,也能解决一大批下岗职工的再就业,产生巨大的社会效益。

#### 4. 有利于国民经济可持续发展

随着经济的飞速发展,地球上的石油、煤炭储量正以惊人的速度减少,人类将面临一场严峻的能源危机。植物纤维废弃物是廉价的可再生资源。在自然界的物质循环中,植物可以通过光合作用,利用水和二氧化碳合成纤维素物质(有机碳水化合物),这是取之不尽、用之不竭的。利用这种可再生资源生产酒精,乳酸、木糖醇或其它工业原料,进一步替代石油、煤炭等一次性资源,对于缓解未来面临的能源危机,确保经济的可持续发展,以及解决人口剧增间产生的粮食危机,都具有重大意义<sup>[7]</sup>。因此,加强植物纤维素废弃物的转化利用研究,在我国具有现实和深远的意义。

### 1.4 植物纤维素物质水解产品现状及应用前景

当前工业生产的水解产品主要有饲料酵母、酒精、糠醛及其衍生物、饲料糖浆、木糖醇、木糖、液体CO<sub>2</sub>以及木素植物刺激剂与活性炭等<sup>[8-11]</sup>。下面将几种主要产品作一介绍。

#### 1.4.1 饲料酵母和单细胞蛋白

饲料酵母是当前水解工业中最重要的产品,世界年产量达60万吨以上,其中俄罗斯产量达40~50万吨,保加利亚和中国也有少量生产。

俄罗斯的水解酵母厂主要有3种类型:一是专业的水解酵母厂,即水解液直接用来作发酵基质。二是利用酒精发酵后的水解废液或其与水解液的混合物作发酵

基质。三是利用糠醛和木糖醇生产后的残渣，再次水解的水解液作发酵基质<sup>1</sup>。目前最大厂一年的产量达6万吨，还原糖生产酵母得率50%~55%，生产一吨饲料酵母(含水8%)产品成本远低于批发价，经济上可行。

在已制取酒精和饲料酵母的繁殖发酵液中，含有大量营养丰富的有机物。俄罗斯一大批研究所正在研究第二次加工利用酵母菌，再发酵、再次生产蛋白饲料，得率可达30%，蛋白质含量可达45%~50%。这样既减少了污染，又进一步降低了饲料成本。

由于世界人口增加，食物蛋白短缺现象严重，估计到本世纪末人类对蛋白质的需求量将比现在大2~3倍，到那时，供需之间相差达2500万吨之多。开辟新的获取蛋白质的途径已成为当务之急。酵母、细菌、霉菌、藻类等单细胞微生物由于含有丰富的蛋白质和维生素等多种营养成分，具有很强的繁殖能力，引起了人们的重视。各国对微生物蛋白的制备进行了广泛的研究，现在生产单细胞蛋白原料除了传统的糖类以外，有木材(包括林业原料、废料)、农业废料、石油、醇类(甲醇、乙醇)天然气及含糖工业废水等。其中木材、农业废料因其是自然界中存在量最大的一类再生资源，价格低廉，且具有环境保护意义，因此上述单细胞蛋白的生产方法受到人们的关注。这一工艺目前已日趋完善。

为了简化生产过程，目前又流行起来了生物的方法。一是间接地先把植物原料酶解，然后培养微生物得到单细胞蛋白。二是直接利用微生物对植物原料进行降解、增殖菌体获得单细胞蛋白。美国、加拿大、日本和法国等国政府对这项研究都很重视，目前在原料预处理、菌种选育和发酵工艺上都有很大进展。

#### 1.4.2 酒精

酒精是水解工业的传统产品，现在全世界水解酒精年产量为20万吨，其中俄罗斯达12万吨，占全国酒精总产量的50%，此外，保加利亚和中国也有生产<sup>[12]</sup>。

前苏联的水解酒精原来主要用于生产丁二烯，制取合成橡胶。70年代以后石油化工工业的发展使得用丁烷直接制取丁二烯获得了成功，而且经济上更为合理。为了提高水解酒精的纯度，前苏联改进了生产工艺，使水解酒精达到了粮食酒精的水平，并取代粮食酒精而应用于工业生产部门。因此，纯度高是俄罗斯水解酒精的特点。

由于石油紧缺，各国都尝试利用农林废料生产酒精以取代汽油燃料，其中巴西最为积极，他们试制了专用汽车，目前，这种汽车有85%~90%的发动机用酒精作燃料。生产酒精的原料，除了甘蔗、糖蜜外，巴西对甘蔗渣、桉树等农林原料用稀酸水解法生产酒精也很热衷<sup>[13]</sup>。在前苏联的帮助下，巴西曾设计并建立了一家年产3000万L酒精的工厂，产量曾达到设计产量的1/3。

### 1.4.3 糠醛

植物纤维原料中多聚戊糖水解后形成了戊糖和糠醛酸，经脱水而生成糠醛。糠醛是迄今为止唯一的无法从石油化工产品合成，只能用植物水解方法得到的产品。因而糠醛的发现为水解工业打开了一个新的突破口。糠醛的用途极为广泛，它是一种卓越的选择性溶剂，应用在精制油料(石油润滑油、柴油、催化循环的原料油和植物油)、合成燃料。它可制取多种重要的化工原料(糠醇、四氢糠醇、呋喃、四氢呋喃和： $\alpha$ -甲基呋喃等)及各种化学中间体和树脂(酚醛类、糠醇类)，又可制取呋喃药物、防腐剂、杀菌剂及除莠剂等<sup>[14]</sup>。

因为糠醛的用途大，全世界已有30多个国家建立糠醛厂，年产量达20万吨左右。美国最多，其次为多米尼加、俄罗斯和中国。

美国桂格燕麦公司是世界上最大的糠醛生产公司，已有50多年的生产历史，从投产以来一直保持技术领先。其产量占世界总量的43%，并垄断了全美国的糠醛、糠醇生产及经营，也控制着国际糠醛市场。

世界上生产糠醛的方法主要是直接法<sup>[15]</sup>，生产工艺以美国的桂格法、芬兰的罗森林法、法国的农业呋喃法和意大利的罗西法最为出名。

### 1.4.4 乳酸

乳酸是一种重要的有机酸，在食品饮料、化工、皮革、医药、卷烟等行业应用十分广泛。比如可以用聚乳酸制成手术缝合线，它会随着伤口的愈合而被人体组织吸收而无须拆线。特别是近年发现可以用乳酸为原料制造可生物降解的新型包装材料，用其代替当前广泛使用的塑料包装材料可以从根本上解决困扰人类多年的白色污染问题，这就为乳酸工业的发展提供了巨大的应用市场。据估计，今后10年内聚合乳酸将发展成年需求45.5万吨的市场规模<sup>[16]</sup>。目前，全世界的乳酸

产量约为10万吨，其中90%采用细菌发酵法生产，10%通过乳晴水解以化学合成法生产<sup>[17]</sup>。常规乳酸发酵的主料是淀粉质原料，将纤维素和半纤维素水解成可发酵糖（主要是葡萄糖和戊糖），采用微生物发酵生产乳酸，既可节约粮食，又可降低乳酸发酵的原料成本。

在1994年，美国的乳酸消耗约为2万吨左右，其中50%需要进口。1999年，美国的乳酸消耗上升至6万吨，其中20%进口。年需求增长率为5%~8%。美国发酵乳酸的主要生产商是ADM、A. E. S. 和CARGILL公司。估计这些公司的产量合计为5万吨。而以合成法生产乳酸的厂家是美国德州的标液化学公司，其合成乳酸的生产能力是8600吨/年。美国还需进口部分乳酸。国内目前乳酸的年实际需求量约为2~3万吨，然而一旦以L-乳酸为基础的聚乳酸生产开发和应用有突破，乳酸的需求量势必大大增加。中国目前只有少量的乳酸出口到日本、西欧和东南亚，但从长远来看很可能成为一个重要的乳酸出口国。中国目前的乳酸生产能力为1万余吨，其中只有10%是L-乳酸。乳酸的市场前景十分看好，预计在今后十年内，乳酸产品的需求将达到200~300万吨，一跃而成为大宗日用化学品。一旦高质量88%含量的L-乳酸价格降至0.5美元/磅，则聚乳酸产品将大量取代现在广泛使用的热塑产品，在消除白色污染方面将做出重大贡献。

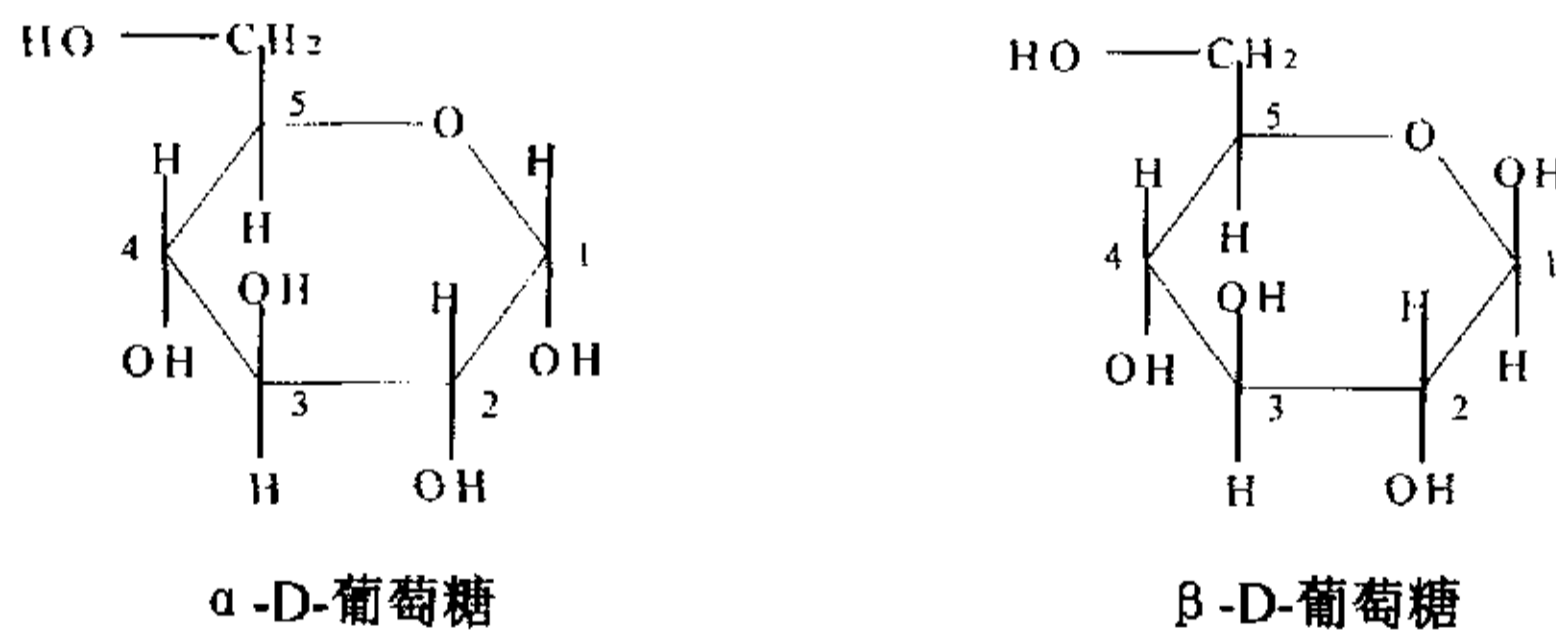
## 第二章 植物纤维的预处理技术

### 2.1 植物纤维的化学组分

植物纤维原料的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素，它们的大致比例为4:3:3，还含有少量的灰分、粗蛋白、水等物质<sup>[18]</sup>。

#### 2.1.1 纤维素

纤维素分子是由 $\beta$ -D-葡萄糖通过 $\beta$ -1,4-糖苷键(由半缩醛羟基和C<sub>4</sub>上的醇羟基之间缩水形成苷键)结合而成的高聚物。由于纤维素分子的长链能依靠数目众多的氢键结合形成纤维素束，几个纤维素束又可绞合在一起形成束状结构，束状结构可以再定向排布形成肉眼可见的纤维，因而纤维素比同样是葡萄糖构成的淀粉(由 $\alpha$ -D-葡萄糖缩合而成)有高得多的机械强度，在植物体内起着支撑作用<sup>[19]</sup>。由于人体的消化道中没有水解 $\beta$ -1,4-糖苷键的纤维素酶，所以人不能消化、利用纤维素。



纤维素的重复单元是纤维二糖 (Cellobiose)。纤维二糖的C<sub>1</sub>位上保持着半缩醛的形式，因而有还原性。纤维素分子的一端也有一个半缩醛结构，因而纤维素分子端基可以分为还原端和非还原端，然而，由于纤维素的分子量通常很大，约有200万，因而纤维素分子的还原性可以忽略。

纤维素的分子式可用(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>表示，其中n为聚合度，有时也常用英文缩写DP表示，并可由聚合度计算出分子量(分子量=162n)。纤维素是由一系列不同长度的线型高分子组成的，这就决定了纤维素分子量是不均一的或多分散的，实验测定的分子量是一种统计的平均值。纤维素的分子量及其分布会影响纤维素材料

的物理机械性能(强度、模量和耐折度)、纤维素溶液的性质(溶解度、粘度和流变性等)和纤维素的微细结构(结晶度和取向度)以及纤维素的降解、老化和各种化学反应。当纤维素酶作用时将明显影响酶的作用特性。

与其它高聚物相比,纤维素分子的重复单元是简单而单一的,分子表面较平整,在长度方向易于伸展,再加上葡萄糖环上有反应性强的侧基,十分有利于形成分子内和分子间的氢键,从而使这种带状、刚性的分子链易于聚集在一起,成为结晶性的原纤结构,并形成多种纤维素结晶变体。

### 2.1.2 木质素

木质素是植物中仅次于纤维素的最丰富和最重要的有机高聚物。它广泛分布于具有纤维管束的羊齿类植物以上的高等植物中,是裸子植物和被子植物所特有的化学成分。木质素在木材中的含量为20~40%。禾本科植物中木质素含量比一般木材低,约为15~25%。由一系列的苯丙烷单元通过醚键和碳碳键连接的复杂无定形的高聚物。它和半纤维素、果胶一起作为细胞间质填充在细胞壁的微细纤维之间,加固木化组织的细胞壁,并起着把相邻的细胞粘结在一起的作用<sup>[20]</sup>。木质化的细胞壁能阻止微生物的攻击,增强茎干的抗压强度,减小细胞壁的透水性对植物中输导水分的组织也很重要。

木质素的化学结构复杂,对许多植物的木质素结构仍未完全清楚,仅有一些结构的模型。木质素的单体具有酚基结构,因而木质素主要是通过氧化还原酶(主要是漆酶)催化形成苯氧自由基,通过自由基反应完成木质素生化聚合或降解的。

### 2.1.3 半纤维素

半纤维素是植物原料中除纤维素、淀粉和果胶以外的碳水化合物。最初将植物细胞壁中可以被碱溶出的部分称为半纤维素,但这种分类比较粗糙,因为溶出度还和碱浓度有关,有的半纤维素并不能被碱溶出。1962年Aspinall将半纤维素描述为:“半纤维素是来源于植物的聚糖类,它们分别来自一至几种糖基,如D-木糖基、D-甘露糖基和D-葡萄糖基或半乳糖基等,并由这些糖基构成基础链,而其它糖基作为支链联接于此基础链上。这揭示了半纤维素的本质。半纤维素和纤维素之间差别主要有:



(1)分子结构由不同的糖单元组成;

(2)分子链要短得多;

(3)分子中有支链;

(4)其主链可以由均一聚糖,如聚木糖类半纤维素,也可由两种或更多的糖单元构成的非均一聚糖,如聚葡萄糖甘露糖类半纤维素等构成;

(5)有的糖单元主要出现在支链上,如4-氧甲基葡萄糖醛酸和半乳糖等。

半纤维素主要存在于植物的细胞壁中,半纤维素的结构随植物种类而不同,不同的细胞壁层面半纤维素的组分也有差异,因而半纤维素的结构比纤维素要复杂得多。由于半纤维素的分子量比纤维素要小得多,因而还原性端基大约是纤维素的20~40倍,有一定的还原性。

以麻纤维为例,其中的半纤维素的组成比较复杂。如在较低碱液抽提的情况下,苧麻的半纤维素中以葡萄糖、半乳糖及甘露糖的糖基含量最高,其次为鼠李糖,但随着抽提碱液浓度的增加,葡萄糖、甘露糖的提取量逐渐增加,并大多以葡萄甘露聚糖的形式存在。目前对麻纤维中半纤维素的结构和组成还未真正搞清楚。一般认为麻类半纤维素的主要成分为戊糖中的阿拉伯糖、木糖和鼠李糖,己糖中的半乳糖、甘露糖和葡萄糖及其醛酸衍生物。

正是由于纤维原料组成成分复杂、稳定,使得酸或生物降解难于迅速进行。在纤维素的微小构成单位周围被半纤维素层和木质素层包围。影响纤维素和半纤维素分子降解的两个主要因素是纤维素的晶体结构和缠裹在其周围的木质素,所以,破坏木质素保护层和改变纤维素的晶体结构<sup>[21]</sup>,将会促进纤维材料的降解效果。木质素阻止纤维素分解物对纤维素的作用,因此人们不得不借助物理的、化学的、生物的方法来进行预处理,使纤维素、半纤维素、木质素等分离开来,破坏纤维素的晶体结构,降低聚合度,使纤维材料的降解得以顺利进行<sup>[22]</sup>。业已表明,在酶促降解、直接微生物降解及酸催化水解之前,对纤维原料进行预处理,可以显著提高纤维原料的降解速度和增加葡萄糖的产率<sup>[23]</sup>。

## 2.2 植物纤维预处理技术研究进展

### 2.2.1 物理预处理技术

#### 1. 机械粉碎

用球磨、振动磨、辊筒等将纤维素原料进行粉碎处理，木质素和半纤维素与纤维素的结合层被破坏，半纤维素、纤维素和木质素的聚合度降低，纤维素的结晶构造改变。粉碎处理能提高反应性能和提高水解糖化率，有利于酶解过程中纤维素酶或木质素酶的进攻。经粉碎后，物料各成分的量没有变化，但粉碎的物料没有膨胀性，体积小，可以提高基质浓度，水解可得到较高浓度的糖液。废旧报纸经7天研磨，只需48小时就可以被绿色木霉完全消化<sup>[21]</sup>，棉花浆粕经60分钟研磨，在10天之内可被酶制剂完全降解。花旗松及废旧报纸经120小时研磨，酶降解转化率几乎达到它们的理论值。干磨法要比湿法打浆优越。加酸作用前采取干磨法，使结构应力得到利用，导致水解速度加快；而湿法打浆，就不能贮存结构应力，这是溶胀作用和纤维化作用的缘故。然而，湿浆粕的酶解速度却又比干样品快，显然，在酶制剂作用下，内应力的影响已被抵销掉了，因而提高了纤维素对酶在接受能力。机械粉碎处理提高糖化率的程度有限，缺点是能耗大，其能耗占工艺过程总耗能的50%~60%，对有些材料，粉碎处理不一定适合，研磨成本高，如颗粒尺寸减小到20目，每吨纤维素物质的研磨费用高达53~110美元。

## 2. 高能辐射处理

高能辐射作用是提高对酶在接受能力、提高酸水解速度最为有效的物理预处理方法之一。辐射处理本身是很简单的。废旧报纸首先打成水浆，然后附加于一定兆德拉(magards)的辐射剂量，最后采用酸法催化水解。辐射作用在常温和有空气存在下进行。研究表明，水合浆状的废纤维素在受到电子辐射作用后，葡萄糖产率明显增加。在较低剂量时，无法破坏木质素壳层，因而不能经露出新鲜的纤维素表面，使其与酶制剂分子相作用。辐照预处理时间短，操作简单，提高糖化率效果明显，但处理费用昂贵，因此，这种方法在实际应用上受到限制。

## 3. 蒸汽处理

使用水蒸汽处理纤维物料的优点是无须添加酸或碱等化学药品。Aoyama M<sup>[24,25]</sup>等在一个不锈钢压热釜中，使用10%干物质的悬浮体系，操作压力约 $3.447 \times 10^7$  Pa，温度650°F，经蒸汽处理过的样品，进行酶法降解。结果表明，蒸汽处理5~10min，水解液的糖浓度变化，不会出现最大值，而经过30min的预处理，还原糖浓度经历一个最大值，又开始逐渐减小，这种情况表明，在高温下延长预处理时间，会导致生成糖的进一步分解。蒸汽处理过的样品，其反应性能大大增加，

约为碱处理样品的4~6倍，为水洗样品的10~12倍<sup>[26]</sup>。通常作肥料用的纤维素物质，经蒸汽预处理后，反应能力增加，其原因可能是由于半纤维素被移除，而使得纤维素的有效表面增加的缘故<sup>[27]</sup>。

#### 4. 热解处理

在高热作用下，木材纤维素被转化成挥发相和固体相，它们将被进一步加工成各种化学品<sup>[28]</sup>。高温热解已作为一种预处理技术，增加纤维素对酶制剂的接受能力。根据Kubikova J及其同行的研究<sup>[29]</sup>，热解处理对纤维素结晶度的影响甚微，尽管比表面积有所减少，但这种预处理还是有利于酶促反应。研究结果表明，在空气和氦气中高温热解过的样品，其降解速度比原样品分别提高了1.25倍和2.18倍。

### 2.2.2 化学预处理技术

#### 1. 酸水解

将纤维素原料用1%左右的酸液在106~110℃的高温下经几个小时的处理是人们较常采用的方法。稀酸处理效率较高，在温度高时所需时间较短，处理后半纤维素水解成单糖进入水解液，木质素量不变，纤维素的平均聚合度下降，反应能力增大。Torget R等<sup>[30]</sup>研究了在100L的不锈钢釜中对纤维素物料进行预处理的情况。实验结果表明，半纤维素能被有效地水解，纤维素的可消化度达80%，高装料量(10%~15%)和大至10mm的物料粒度不影响处理效果。但高温所致的某些分解物对后续发酵不利，而采用离子交换方法除去分解物又将增大生产成本。使用CSBR反应器对物料进行稀酸处理<sup>[31]</sup>，可从所处理的物料中所含的半纤维素和纤维素中得到97%的木糖和87%的葡萄糖。稀酸处理所得产物主要含木糖，通过Candida sp.11-2菌发酵，可得到0.57g木糖醇/g木糖。

#### 2. 溶剂预处理

溶剂分有机溶剂(如Cadoxen, CMCS)和无机溶剂(如高浓度的硫酸、盐酸、磷酸)两类。业已确定，溶剂处理引起纤维素晶体结构变化，因而使水解速度及水解程度都大大提高<sup>[32,33]</sup>。木材浆粕经Cadoxen(含乙二胺与氧化镉的碱溶液)溶剂处理，然后进行酸催化水解，使平均聚合度从160下降到26。该样品应用70%硫酸处理，亦得出类似结果。应用CMCS(含酒石酸钠、氯化铁、亚硫酸钠的碱溶液)溶剂进行

预处理的研究,最近已有许多报导。用CMCS处理的样品的结晶指数,略高于用60%硫酸处理过的相同样品,然而,两种样品的水解速度则大体相同。由此可见,溶剂预处理的效果十分明显,关键是经济问题,如果溶剂可以回收或循环使用,这种预处理方法则有可能实现低成本,而在工业上得以推广使用。

### 3. 溶胀预处理

纤维素物质的溶胀剂亦分为两类:晶间溶胀剂(如水、吗啡)和晶内溶胀剂(如NaOH溶液、某些胺类溶液、氯化锌溶液等)。前一种溶胀剂的特征是试剂进入晶体之间,使体积发生变化;后一种溶胀剂的特征是试剂渗透到晶体内部,使天然纤维素结构发生变化。氯化锌溶液浓度在65~70%时,溶胀即出现极大值,浓度65%时,溶胀效果较好。两类溶胀剂的溶胀机理有本质区别,前者归因于乙二胺-水合物的作用,后者归因于氯化锌溶液中四水化物的作用。棉花纤维素的氢键断裂,纤维素链段即游离出来,从而相对增加了无序区的缘故。

NaOH溶液作为一种增加纤维素消化率的化学试剂,许多学者都进行过反复的研究。Bjerre AB等用等<sup>[34]</sup>量体积的96%乙醇和8%NaOH混合溶液在170℃处理稻草30min,可使其酶酵解糖化率从未处理时的不足10%提高到65%。Playne MJ<sup>[35]</sup>将原料经NaOH高温处理,采用曲霉-酵母,木霉-酵母混合菌种发酵,使纤维原料中的蛋白质含量由原来的2.2%提高到18.8%,蔗渣经NaOH处理后,用里氏木霉所产纤维素酶进行酶解,2.5%的底物浓度经48h后,糖化率可达60%。Marto Anez及其同行<sup>[33]</sup>指出,每100g纤维素物质使用6gNaOH,将导致最大的消化率。使用30%的氢氧化钠溶液处理过的纤维素物质,水流后其重量损失一般在25~70%,这样在不溶性残余物中,纤维素浓度大大增加,几乎是原始物料的2倍,应用1%氢氧化钠溶液于室温下浸泡,测得该纤维素物质的比表面积,不同于经过压热处理的相同样品,尽管它们的结晶指数大体相同,上述室温下与压热条件下处理的样品,其相对降解速率分别为1.37和1.45倍。NaOH有较强的脱木质素和降低结晶度的作用,虽可促进后续酶解的进行,但碱处理的药剂费用较高。

氨处理是将纤维素在10%左右的氨溶液中浸泡24~48h,以脱除原料中大部分木质素的方法。氨处理条件温和,所需设备简单,纤维素原料中所含对发酵不利的乙酰基在氨处理时将被除去,半纤维素在氨浓度较高时在处理进程中有部分损失。美国普度大学的可再生资源工程实验室(LORRE)用氨水处理纤维素原料,继

而用选育的木糖发酵菌株将水解得到的木糖以0.74g/g的转化率转化为木糖醇，浙江大学生物化工研究所用氨处理纤维素原料进行同步糖化乳酸发酵，有关研究工作正在进行。

### 2.2.3 综合处理

#### 1. 蒸汽爆破处理

蒸爆技术将植物纤维素类原料在高温高压下用水或蒸汽等经几十秒到几十分钟的处理后降至常压，处理过程根据需要添加或不加化学药品<sup>[36]</sup>。Grethlein HE<sup>[37,38]</sup>等对几种预处理方法处理木材的结果进行比较，转化率以还原糖和全糖百分比为基础。结果表明，蒸爆预处理法所得糖转化率最高。

蒸爆原理是利用水蒸汽在高温高压下通过纤维素表面微孔渗入纤维素内部，蒸煮一段时间，在此过程中发生水解反应。然后突然降压，纤维素原料被内含水闪蒸产生巨大的爆破力、机械摩擦与碰撞力而破碎。研究表明，用于酶解或酸解的原料在蒸爆时加入稀酸可以降低处理压力和减少处理时间，效果更好<sup>[39]</sup>。利用造纸厂亚铵蒸煮废液抽提蒸汽爆碎备料废料制成全培养基，连续发酵生产单细胞蛋白，菌体生物量，菌体得率和生产率分别为8.45g/L，0.692g/g，2.56g/L·h。

蒸爆技术被认为是生物量利用过程中取得的重大进展之一，加拿大、美国、西欧和日本均在积极发展与应用该技术。1g蒸爆处理过的蔗渣水解后可得到0.65g的总糖。蒸爆技术较有代表性的是加拿大的Iotech工艺和澳大利亚的Siropulper工艺，前者主要是通入高温饱和水蒸气来达到一定温度和压力。后者的加压措施还包括充入高压N<sub>2</sub>等以提高处理压力，出口设计一定结构的喷嘴以使纤维分离更完全。

#### 2. 氨爆破处理

因为蒸汽爆破处理的温度较高，蒸汽消耗量较大，处理过程还将使物料产生一部分对微生物有抑制作用的物质，为此人们采用处理温度相对较低的氨爆破处理方法，氨爆破处理在较低的温度20~80℃和1~5.2MPa下处理纤维素原料10~60min，处理结束时突然释压，氨因压力的突然降低而蒸发，导致温度急剧变化使纤维素结构破坏；将增加纤维素表面积和酵解的可及度。氨能与纤维素上的部分羟基形成Cell-OH···NH<sub>3</sub>形式的络合物，从而使纤维素发生膨胀。处理后纤维素发

生碎裂，X射线衍射因显示其结晶结构出现纤维素 I 和纤维素 II 的混晶，碘吸收值增大，碱溶解度增大。氨处理不会产生对微生物有抑制作用的物质，且木质素去除后，大部分半纤维素和纤维素保留下来得以充分利用。虽然在较高的温度和较低的温度下进行氨爆破处理都能提高纤维素的糖化率，但较低温度的处理显然从节能和对设备要求方面更具优势。与蒸汽爆破相比，氨处理对设备的要求和所需的能耗大为降低，但氨的有效回收是氨爆破必须妥善解决的问题。

#### 2.2.4 生物处理

生物处理方法能耗低，操作简单，不污染环境，适用于农业纤维素原料的饲料化处理，但其缺点是处理周期长，处理效率不高。生物处理是利用分解木质素的微生物除去木质素以解除其对纤维素的包裹作用，降解木质素的微生物通常有白腐菌。以茎秆为底物，白腐真菌可在3周时间内将原料中的木质素降解65%。用此类菌处理杨木，6周后木质素脱除19.3%，而处理稻草，木质素脱除率达59%<sup>[40]</sup>。

总之，已经提出的各种预处理技术，对于提高纤维素物质对酶制剂、微生物及化学品的接受能力，有比较明显的效果。过去，这方面的工作主要着眼于增进反刍动物对纤维系物质的消化能力，近期的工作则同时着眼于提高纤维素物质的糖化程度和糖化速度，以促进纤维素能源的开发利用。然而，上述各种预处理技术能否付诸于工业实践，关键问题是它的成本费用。众所周知，预处理成本包括设备、试剂、能耗、劳动力及管理费用。粉碎处理能破坏木质素和半纤维素与纤维素的结合层，在一定程度上提高物料糖化率，但处理过程耗能较多；稀酸处理能有效去除半纤维素，效率较高，但对设备的防腐要求和能耗较高；蒸汽爆破处理能有效地分离纤维素，半纤维素和木质素这三种成分，所处理物料酶解转化率高，然而处理过程需专用设备，过程中所产生的一些对微生物有抑制作用的物质将影响其应用范围。显然，机械粉碎、高能辐射，因处理费用过高，难于在工业上采用；蒸汽处理，热解处理、酸解处理、溶胀处理技术，虽然已在工业上得到应用，但毕竟它的费用在糖化总过程中所占比例仍相当可观。溶剂预处理技术，处理所需条件温和，能有效地去除木质素，处理物料水解效率也较高，如果溶剂能够定量地回收并加以循环使用，那么，这种方法则有可能实现转变性突破。近

10多年来，美国、俄罗斯、加拿大和日本等国的科技工作者对纤维素原料的开发利用，进行了广泛、深入的研究，有的还进行了生产性试验。从目前的技术进展来看，利用木质纤维素原料生产液体燃料酒精的技术比较成熟，一种含10%无水酒精的汽油醇在美国、加拿大等国已经广泛用作汽车等发动机的动力燃料。但是，利用纤维素物质直接生产糖浆、酒精及其它化学制品的公司，则仍然很少，除了技术(包括预处理技术)、经济方面的原因外，收集、运输、贮藏这些体积庞大的原料亦是一个很大的问题。纤维素物质作为染料、食物和化学资源的开发，将给人类带来无穷无尽的财富。但目前的预处理工艺技术尚未达到大规模工业生产的水平，大量深入细致的研究仍须进行。

## 第三章 植物纤维水解机理及动力学

纤维素的水解降解包括酸水解、酶水解和微生物水解。酸水解和酶水解既可生产糖浆，供食品工业作甜味剂，还可通过发酵转变为醇、燃料和其它化学产品；微生物水解用于生产供动物作饲料的单细胞蛋白。

### 3.1 纤维素的酸水解降解

纤维素大分子中的 $\beta$ -1,4-糖苷键是一种缩醛键，对酸特别敏感，在适当的氢离子浓度、温度和时间作用下，糖苷键断裂、聚合度下降、还原能力提高，这类反应称为纤维素的酸性降解，部分水解后的纤维素产物称为水解纤维，纤维素完全水解时则生成葡萄糖。

纤维素糖苷的酸水解断裂经历三个连续的反应步骤<sup>[19]</sup>：

- ①失水葡萄糖单元上某一个缩醛氧原子迅速质子化，形成一个共轭酸；
- ②糖苷键上的正电荷缓慢地转移到 $C_1$ 上，由于C-O键的断裂，形成一个碳鎓阳离子；
- ③由于水分子迅速攻击碳鎓阳离子，得到游离的糖残基并重新形成水合氢离子。

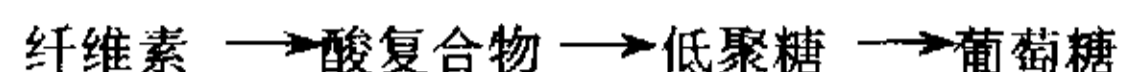
纤维素酸水解有浓酸、稀酸、非水介质和无水无机酸，水解方法有多相和均相两种方式。

#### 3.1.1 浓酸水解

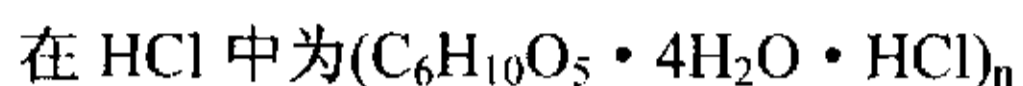
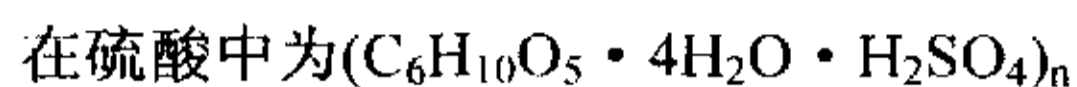
纤维素在浓酸中的水解是均相水解。在浓的无机酸如 41~42% HCl，65~70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 80~85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 中进行水解。其水解特点是：(1)反应基本上为均相方式；(2)水解过程有回聚作用并发生葡萄糖的分解。例如，Saeman 等用 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 首先在 30℃ 下水解，然后在 100℃ 或 120℃ 下蒸汽压水解，存在不完全解聚的多糖和部分单糖的分解。葡萄糖的回聚是纤维素水解的逆过程，水解溶液中的单糖和酸的浓度越大，回聚的程度越大，葡萄糖的回聚生成二糖或三聚糖，为了提高葡萄糖的得率，在水解末期，必须稀释溶液和加热，使回聚的低聚糖再行水解。



纤维素在浓酸中的均相水解，是纤维素晶体结构在酸中润胀或溶解后，通过形成酸的复合物再水解成低聚糖和葡萄糖：

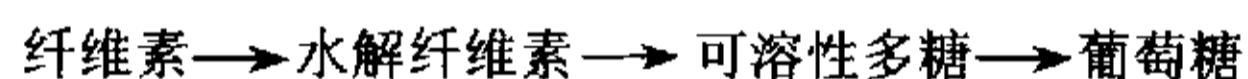


不同酸形成的酸复合物如下<sup>[19]</sup>：



### 3.1.2 稀酸水解

稀酸水解属多相水解,水解发生于固相纤维素和稀酸溶液之间，在高温高压下，稀酸可将纤维素完全水解成葡萄糖：



天然状态下的纤维素与木素和半纤维素结合在一起，其大概组成如下表：

表 3-1 纤维素质材料的组成

物质成分	占干纤维素质百分数 (%)
纤维素	40—60
半纤维素	20—40
木质素	10—15

纤维素水解得到的可溶性成分主要是糖(如木糖、葡萄糖、纤维二糖)、糖醛类(如糠醛、羟甲基糠醛)和有机酸(如乙酰丙酸、甲酸、乙酸)等。

表 3-2 水解 1000kg 木屑所得产物

产物	重量 (kg)
乙醇	150—200
饲料酵母	35—40
糠醛	5—10
木素	250—300

半纤维素主要成分是戊糖，依原料来源不同，可含高达 85% 的木聚糖，经水解生成木糖。木糖可发酵成醇或转化成微生物物质，也可经氢化生成木糖醇，可作糖尿病人的甜味剂。木素占总生物质含量 1/5 左右，可进一步制备多种木素聚合物。由于原料来源和水解工艺的不同，不同水解产物的得率也不同，表 3-2 可供参考。

### 3.1.3 纤维素化学结构和物理结构对酸水解的影响

#### 1. 纤维素化学结构对水解的影响<sup>[19]</sup>

如果纤维素的物理结构可通过某种适当的水解介质加以破坏，则反应动力学上的不规则只与分子链化学结构偏离正常的  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键有关。例如，沿纤维素分子链存在半缩醛结构、氧化的基团（醛基和羧基）、糖（木糖和甘露糖），能大大提高纤维素分子链的断裂速率。在磷酸溶液中均相水解时，木浆的水解速率大约为棉花的两倍，是由于木浆中所含上述外来基团和糖较棉花中高。

#### 2. 纤维素物理结构对水解的影响

##### (1) 初期阶段

由于纤维素纤维存在晶区和无定形区的两相结构，对于多相水解，酸首先攻击无定形区的糖苷键，水解迅速，粘度下降和重量损失较大，以后水解主要在微晶区上进行，反应速率逐渐减慢，当无定形区消耗完后，聚合度保持在某一固定的值，称为平衡聚合度(LODP)，LODP 与纤维素类型和水解预处理方法有关，当 2~5% 的纤维素试样被水解时即达到 LODP，电子显微镜的观测证明，LODP 与纤维素试样微晶的平均长度相一致。

在多相水解期间，由于已断裂分子链链端可移动性增加，伴随着微细结构有序度和结晶度的提高，即所谓重结晶。例如，用 2.5mol/L 硫酸溶液煮沸粘胶纤维半小时，结晶部分的含量由 39% 增加到 49%，研究表明再生纤维素较天然纤维素重结晶的程度更大。纤维素的重结晶只发生于酸水解的初期阶段，随后，结晶度不再改变，只是密度稍有增加。

##### (2) 后期阶段

早期酸水解除去无定形部分之后，水解将在留下的晶区中进行，速度大大下降，重量损失的速率减慢 100 倍左右，水解残余纤维素量的对数与水解时间为直

线关系，用这些直线外推到时间为零时的截距可求出无定形区的含量，称为水解重量损失法。经水解降解得到的水解纤维素为棒状颗粒，其长度与原料来源有关，对棉花长约  $400 \times 10^{-10} \text{m}$ ，相当于微晶区中分子链的长度；宽约  $100 \times 10^{-10} \text{m}$ 。

水解纤维素在水解过程中性质保持不变(一直到重量损失 80%)，X 射线衍射测定的晶型也不改变。

### (3) 折叠链结构和弱键

纤维素三醋酸酯可诱导结晶形成单晶晶片，所以有的研究者认为，纤维素材料的微晶中可能存在折叠链结构，在分子链的折叠部分成为较易被酸水解的部位，引起水解反应的不均一。

另外，多年来不少研究者认为，纤维素长的分子链中存在对酸特别敏感的弱键，也可能在其结构中存在不正常的物理应力，使其水解速率大大增加。弱键大约占纤维素 0.1% 左右，大约每隔 250~500 个失水葡萄糖单元间隔一个弱键。但折叠链结构和弱键在天然纤维素中是否存在，至今未有绝对的证据。

## 3.2 纤维素的酶水解

### 3.2.1 纤维素酶的组分及催化协同作用

#### 1 纤维素酶的组分<sup>[41]</sup>

随着各种分离技术如分子筛、离子交换树脂、层析和电泳技术的发展，人们已经成功地将纤维素酶分离出不同的组分，纤维素酶是复合酶已经成为共识。从目前的研究看，纤维素酶中至少包括3类不同性质的酶，即纤维素内切酶、纤维素外切酶和纤维二糖酶。纤维素内切酶可以沿纤维素分子链随机地水解，而纤维素外切酶则只能从  $\beta$ -1,4-糖苷键纤维素分子链的一端(通常为非还原端)切断纤维素分子，并形成纤维二糖或葡萄糖。纤维二糖酶的作用是将纤维二糖水解释成葡萄糖。纤维二糖酶对反应动力学的作用很大，因为内切和外切酶水解的主要产物为纤维二糖，随着反应的进行，纤维二糖的产物积累将使外切酶的活力受到抑制，要使反应高效率地进行，必须将纤维二糖转化成为其它形式，而纤维二糖酶恰恰承担了这个功能。

纤维素酶的各组分在催化水解过程中互相配合，起着协同作用，但各组分如何作用，许多研究者提出了不同的看法，这对研究纤维素酶的作用机理、高效率

产酶菌的培养以及酶制剂的工业应用起着重要的指导作用。

## 2. C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub>理论

1950年, Reese等对纤维素酶作用方式提出了一个著名的C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub>假说。即认为纤维素酶中的C<sub>1</sub>酶首先作用于纤维素结晶区, 使其转化成可被C<sub>x</sub>酶作用的非结晶形式, C<sub>x</sub>酶随机水解非结晶纤维素、可溶性纤维素衍生物和葡萄糖的 $\beta$ -1,4-寡聚物, 然后 $\beta$ -葡萄糖苷酶(纤维二糖酶)将纤维二糖水解成葡萄糖。这种理论首次提出了纤维素酶水解纤维素是分阶段进行的概念, 和水解酶难以水解高聚物结晶区的事实相符, 而且也的确在纤维素酶中分离出了和假说性能相符的、可作用于结晶结构的C<sub>1</sub>酶和只能水解非结晶纤维素的C<sub>x</sub>酶, 因而一度被人们普遍接受。

但是, 随着研究的进行, C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub>假说和许多实验事实相矛盾。如先用C<sub>1</sub>酶作用底物(结晶纤维素), 然后将C<sub>1</sub>酶和底物分开再加入C<sub>x</sub>酶, 结果并不能使结晶纤维素水解。而且后来的事实表明, 只有3组分共同作用才能将结晶纤维素(如棉花)水解成可溶性产物, 如果将3组分分开, 则失去水解能力。而分离的3组分按比例混合后又可以恢复这种水解能力。因而越来越多的实验证明纤维素酶对结晶纤维素的降解是3组分共同作用的结果。尤其值得注意的是, 研究表明C<sub>1</sub>酶也是一种水解酶, 可以作用结晶纤维素, 主要产物为纤维二糖, 从而证明C<sub>1</sub>酶是一种 $\beta$ -1,4-葡聚糖纤维二糖水解酶。因而实际的C<sub>1</sub>酶和C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub>假说中的性能具有本质的不同。

## 3. EG、CBH和BG酶及其协同作用

目前认为纤维素酶水解纤维素是 $\beta$ -1,4-内切葡聚糖(纤维二糖水解)酶(EG, Endo- $\beta$ -glucanase)、 $\beta$ -1,4-外切葡聚糖(纤维二糖水解)酶(CBH, Cellobio-hydrolase)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG,  $\beta$ -Glucosidase)协同作用下进行的。首先, EG酶随机水解切断无定形区的纤维素分子链, 使结晶纤维素出现更多的纤维素分子端基, 为CBH酶水解纤维素创造了条件。CBH酶的水解产物纤维二糖则由BG酶水解成葡萄糖。因而纤维素酶水解结晶纤维素的过程可以简单表示为: EG CBH BG, EG酶的水解作用增加了CBH的水解作用点, 因而, 起着CBH酶水解纤维素的活化作用。这种活化作用和纤维素结构的性能是相符的, 因为结晶纤维素的分子量都很大, 端基在纤维总量中的比例可以忽略, 原始的结晶纤维素对外切的CBH酶来说没有可作用的位置。即使是CMC等可溶性纤维素, 由于端基的比例少, CBH的活性也是很低的。根据缨状原纤结构理论, 纤维中的结晶结构是不完整的, 结晶区之间

存在纤维素分子的穿插，因而，在EG酶的作用下，就可以在纤维的结晶结构的表面形成CBH酶可作用的位置(端基)，从而使纤维素的结晶结构水解。

由此可见，EG酶相当于 $C_1$ - $C_x$ 假说中的 $C_x$ 酶，而CBH相当于 $C_1$ - $C_x$ 假说的 $C_1$ 酶。虽然从作用的步骤来看EG和CBH酶的协同作用正好和 $C_1$ - $C_x$ 假说次序相反，但对酶组分作用结晶纤维素的区域认定还是一致的，因而， $C_1$ 酶和 $C_x$ 酶的说法在某些场合仍被沿用。另外，目前的研究表明，EG酶实际上至少包括EG I、EG II、EG III和EG IV 4种，CBH至少包括CBH I和CBH II 2种，各亚种酶制剂除了具有每类的共性外，在催化效率、对聚集结构作用的特异性方面均有一定的差别，如对织物的生物抛光通常要求酶制剂有较高的EG II酶活力。

纤维素酶各组分之间的协同作用已经得到实验的证实。研究发现，对不同菌种来源的组分进行混合，同样表现出协同作用(又叫交互协同作用)。纤维素酶各组分的交互协同作用，为工业化配制特定性能的酶制剂提供了可能。

虽然目前对纤维素酶作用结晶纤维素的机理已经有了比较一致的认识，但新的现象仍被不断地发现，如现在发现个别EG酶也有外切酶的功能，它可以将纤维素水解为纤维二糖或葡萄糖，但不能将纤维二糖水解释为葡萄糖。而CBH酶也不仅仅可以水解纤维素分子的非还原端，对还原端同样可以水解。由于纤维素酶的复杂组分，目前对纤维素酶的研究还有许多未知的内容，需要进行深入的研究。

#### 4. 纤维素酶的纤维素结合区域(CBD)

现在已知纤维素酶各组分大多是糖蛋白，不同纤维素酶的含糖比例很不相同。糖和蛋白质结合方式也不同，有的是通过共价键结合，有的是可解离的复合物。糖通常通过天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸和蛋白质结合形成N-糖肽键和O-糖肽键。纤维素酶中的糖链主要是促进纤维素酶和纤维素的结合，同时也具有保护纤维素酶，防止蛋白酶攻击的作用。

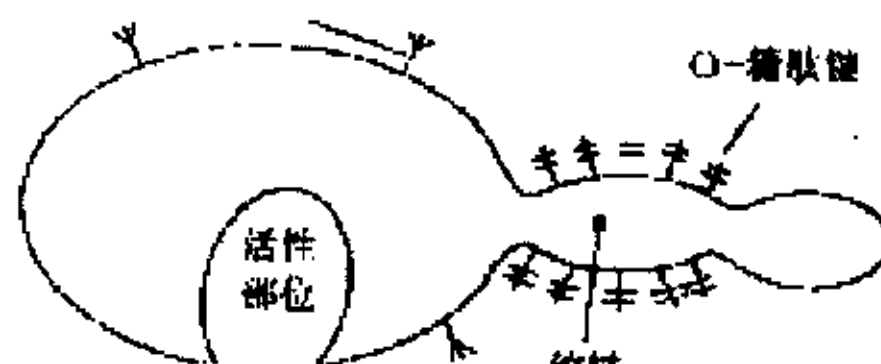


图3-1 “酶虫”模型

纤维素酶中的糖链可能是形成纤维素结合区域(Cellulose Binding Domain, CBD)的重要结构。现在已知, 绝大部分纤维素酶(包括亚组分)都含有一个易于和纤维素结合的CBD和包含纤维素酶活性部位的主蛋白结构(活性核), 二者之间通过肽链连接, 它们的关系如图2-1所示。连接的肽链类似于绞链, 使活性核可围绕CBD进行转动。

纤维素酶的CBD在催化水解纤维素过程中的具体功能还不是特别清楚, 目前认为, CBD可能有下列功能:

(1)可以促进纤维素酶在纤维素表面的吸附, 提高纤维素表面的局部酶浓度。但CBD并不是纤维素酶活性部位的结合位置。若去除纤维素酶的CBD, 纤维素酶仍然表现出催化活性。

(2)可以使酶在纤维素表面优化排布, 促进催化反应的进行。

(3)有可能撕裂纤维素的表面结晶区, 但还未得到实验的证实。

根据氨基酸的组成, 纤维素酶的CBD可以分为两类, 第一类由30~36个氨基酸组成, 存在于由*Trichoderma reesei*(酸性)和*Humi-cola insolens*(中性)等霉菌获得的纤维素酶中; 第二类由103~146个氨基酸组成, 存在于从细菌(如*Cellulomonas fimi*)获得的纤维素酶中。

### 3.2.2 影响纤维素酶催化效率的因素

和任何酶制剂相同, 纤维素酶均有一个最佳活性域, 因而温度和pH值将极大地影响纤维素酶的催化效率。在工艺处理过程中, 只有在一定的温度和pH值范围内, 纤维素酶才会发挥其应有的催化效率。除此之外, 纤维素酶催化水解纤维素的催化效率还和纤维素酶的来源、纤维素的超分子结构和抑制剂、活化剂有关, 了解这些性能对纤维素酶的培养与选择、工艺的确定与优化、发挥纤维素酶的催化效率、降低处理成本、获得满意的处理效果方面均有重要的指导意义。

#### 1. 纤维素酶来源的影响

纤维素酶的来源十分广泛, 昆虫、软体动物、原生动物、细菌、放线菌和真菌都能产生纤维素酶。但从生产纤维素酶的角度看, 利用微生物以外的生物生产没有现实意义。虽然许多微生物都能利用纤维素, 但有的微生物细胞只产生甲烷类代谢产物, 有的微生物只能溶解水溶性纤维素, 而不能降解天然纤维素。因此,

筛选和培育高产高效菌种是纤维素酶生产的关键。作为工业生产的菌种通常要求微生物产生的酶具有高活力的纤维素酶各组分，能够有效地降解天然纤维素，并且是胞外酶，以有利于收集。从现有的资料看，不同的微生物、不同来源的相同微生物生产的纤维素酶，在酶的分子结构、空间结构、酶的组分(包括亚组分)上都有明显的不同(如表3-3和表3-4所示)。

表3-3 几种真菌产生的纤维素酶分子的大小及形状

菌名	分子量	相当于球形直径 /nm	相当于椭圆形宽× 长/nm
绿色木霉 ( <i>Trichoderma viride</i> )	76000	7.6	4.2×25.0
	49000	6.3	3.5×20.8
	61000	7.0	3.8×23.0
	12600	3.5	1.9×11.5
康氏木霉 ( <i>Trichodenna koningii</i> )	51000	6.4	3.5×21.0
	26000	4.6	2.5×15.2
特异青霉 ( <i>Penicillium notatum</i> )	35000	6.4	3.5×21.0
	35000	5.5	2.5×15.2

表3-4 几种真菌纤维素酶产品的比较

菌名	C <sub>1</sub> 单位	C <sub>x</sub> 单位	棉花的水解 / %	
			产糖	失重
绿色木霉( <i>Trichoderma viride</i> )	50.0	50.0	58	53
细小青霉( <i>Penicillium pusillum</i> )	27.0	110.0	22	23
土曲霉( <i>Aspergillus terreus</i> )	5.0	36.0	28	24
担子菌( <i>Basidiomycete</i> )	5.0	75.0	15	23
串珠镰孢( <i>Fusarium moniliforme</i> )	---	3.5	39	39

酶的含量和酶对某一底物的活力没有对应关系，如串珠镰孢虽然C<sub>1</sub>和C<sub>x</sub>的活

力都相低，但对棉花的水解能力却很强，细小青霉虽然能产生较高活力的 $C_1$ 和 $C_x$ 酶，但稳定性和对棉花的分解能力明显不如绿色木霉，因而不同菌种产生的纤维素酶的特异性是有明显区别的。由于纤维素的化学结构非常相似，这种区别很可能是不同的酶对不同的超分子结构具有特异性造成的，即不同的纤维素酶或纤维素酶组分对纤维素具有聚集结构的特异性，如对不同的亚晶结构、结晶表面的水解效率不同等。纤维素酶对纤维素聚集结构的特异性也得到了一些研究的支持，单就纤维素酶的分子量和空间结构(表3-3)的不同而言，就有可能造成纤维素酶对纤维素不同区域的可及度不同，从而造成纤维素酶的水解性能不同。

由于细菌和放线菌产生的纤维素酶不是提取困难、分泌的纤维素酶组分不全，就是分解纤维素的能力弱，目前研究生产纤维素酶的微生物大多属于真菌，研究得较多的是木霉属、曲霉属、青霉属和根霉属等。木霉(*Trichoderma*)产生的纤维素酶活力最高，且含有目前已知的所有纤维素酶组分，因而研究和应用最广。我国生产中应用的菌种大多属于木霉。另外，还有一种*Humicola*(腐殖根霉)的菌种，也在纤维素酶的生产中得到较为广泛的应用。为了得到所需要的酶制剂，在生产过程中，人们已经可以通过生化技术，如菌种诱变、基因改性等实现纤维素酶的定向生产，开发高效、能满足某种功能需要的酶制剂，Genencor、Novozyme等世界知名公司，其主打产品均通过基因改性生产，因而性能优良。

## 2. 纤维素超分子结构的影响

纤维素纤维的超分子结构对纤维素酶的作用有较大影响。纤维素纤维的超分子结构主要包括结晶度、取向度、原纤堆砌结构等。从纤维素酶各组分对纤维素纤维作用的协同性来看，纤维素中无定形区越大，EG酶的作用点越多，可形成的纤维素端基的量越大，使CBH酶有更多的作用点。根据酶作用的动力学特性，在底物浓度不是太高的情况下，水解速率将和底物浓度成正比，从而，使CBH酶水解纤维素的速率增加。因而，在同等条件下，结晶度越高(无定形区比例越低)，纤维素酶的作用效率越低。这种理论的推测和实际处理的结果是相符的，如棉织物经丝光处理后，结晶度明显下降，在同等处理条件下，丝光处理后的棉织物减量明显高于未丝光的棉织物。虽然对纤维素聚集态结构影响纤维素酶作用的细节还了解得很不够，但结晶度越大，纤维素酶的水解速率越低的规律还是基本肯定的。

虽然如此，大量的研究表明，纤维素酶处理并不会明显提高处理产品的结晶



度。这主要是因为结晶纤维素的结构是结晶区和无定形区相互分散，纤维素酶只能在纤维的表面对纤维素进行作用，对纤维素纤维的内部没有影响，再加上CBH酶能催化水解纤维素的结晶结构，因而对纤维素的总结晶度没有影响。这种实验结果和纤维素酶催化水解纤维素是一多相(表面)催化反应的特性是一致的。

### 3.抑制剂和活化剂

纤维素酶在催化水解纤维素的过程中，酶促反应的产物和类似底物的某些物质可引起竞争性抑制。常见的竞争性抑制剂有纤维二糖、葡萄糖和甲基纤维素等。一些蛋白质试剂如卤素化合物、重金属离子( $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Hg}^+$ 等)、去垢剂和某些染料能使纤维素酶失活。某些还原剂如巯基试剂也能抑制纤维素酶。在天然底物中，植物体内的某些附生物，如酚、单宁和色素是纤维素酶的天然抑制剂。

与抑制剂相反，某些试剂能使纤维素酶活化。有些物质在一定条件下是抑制剂，当条件改变后可能变成活化剂，如纤维二糖在大多数情况下是抑制剂，但作用羟甲基纤维素(CMC)时，有部分纤维素酶品种被活化。另外，大多数羟基化合物是抑制剂，但少数几种羟基化合，如甘油、山梨醇等则对纤维素酶起活化作用。

因而，一种物质对纤维素酶起有活化或抑制作用，有一定的规律，但需要具体分析，特别是对新的纤维素酶制剂，在应用和配制时需要实验来说明问题。

### 3.2.3 影响纤维素酶催化速度的主要因素

#### 1. pH值对酶催化反应速度有的影响<sup>[41]</sup>

pH值对酶催化反应速度有很大的影响，其原因复杂。在一定的pH值条件下，酶反应有最大的速度。高于或低于此值，反应速度下降。多数情况下，酶催化反应的速度随pH值的变化呈左右对称的钟罩形，最适pH的影响因素很多，可以随着底物浓度、底物种类、温度、反应时间、缓冲液的种类和浓度的变化而变化，即使是同一种酶也并不一定是常数。所以，酶的最适pH只有针对特定的反应系统才有意义。

pH值对酶及其反应系统可能产生两种影响，一是破坏酶的空间构象，使酶变性失活。这种失活可能是可逆的，也有可能是不可逆的。在这方面目前还无法进行定量表达，通常是通过实验测定来确定pH值对酶活性的影响。二是改变了反应

系统的组成成分，从而影响酶催化反应的速度。不同的pH值将改变和影响酶的解离状态、底物的解离状态及酶-底物络合物的解离等。

### (1) pH值对酶稳定性的影响

酶都有一定的酸碱稳定性范围，超过这个范围，酶就会变性失活。为了解酶在酸碱中的稳定性情况，通常要制定一条酶稳定性pH曲线。方法是将酶溶液分成若干份，然后分别放在不同的pH溶液中保温一定时间，最后在调整成某一相同的pH值(通常为最适pH)再进行酶活性的测定。通常情况下，酶的pH稳定域要比酶的最适pH域宽。

pH稳定曲线的制备会受酶在不同pH溶液中保存温度和保存时间的影响，还会受溶液的组成，如水的软硬度、金属离子的强度的影响，在测定时要注意测定条件。作为工业应用的酶制剂来说，最好与生产工艺条件相结合，以获得最经济的酶保存条件。

### (2) pH值对酶活力的影响

典型的酶活力pH曲线有如钟罩形，它和两性电解质在不同pH值时的解离曲线(不同pH条件下两性电解质的两性离子含量曲线)很相似。因此最初就认为，pH值影响酶活力的原因可能是由于改变了酶的解离状态。深入的研究发现：

- 1)酶反应都有各自的最适pH，而这种最适pH往往和它的等电点不一致；
- 2)经过部分修饰的酶，其最适pH通常不变；
- 3)对某些酶的研究表明，它们的最适pH主要和活性部位侧链基团的解离直接有关。

由此可见，酸碱对酶活性的影响非常类似于抑制剂的作用，因此，pH值对酶催化反应的影响可简化为对抑制剂的影响进行讨论。通常，在一定的pH值范围内，酶有一个最适pH域，超过最适pH域而处在稳定的pH值范围内，酸碱对酶的抑制可看成为可逆抑制，超过稳定pH域，酸碱对酶将产生不可逆抑制。

## 2. 温度对酶催化反应速度的影响

酶反应速度随温度的升高而增大。但由于酶会高温失活，酶催化反应速度和温度的关系并不是一个单调的函数，酶催化反应有一个最适温度问题。只有在最适温度下，酶催化反应才表现出最大的反应速度。因而，温度对酶催化反应的影

响包含两方面的影响，即温度对酶失活的影响和对反应速度提高的影响。

酶的温度稳定性和最适处理温度，影响酶温度稳定性的因素很多。就温度的影响来说，通常在0~10℃(最好是0~5℃)酶的稳定性较好，低于0℃，酶也可能因冻结而失活。但也有例外，有的酶在0~10℃时比在20~30℃时更不稳定。有个别的酶有着极其稳定的耐高温性能，如核糖核酸酶在100℃保持几分钟仍有活力，结晶胰蛋白酶在pH值为2~3时，加热到沸腾酶活力也不会永久地消失。因而，不同的酶在热稳定性上会显示一定的差别。

现在的研究认为，酶分子的大小和结构的复杂性对热敏感性有着一定的相关关系。如果酶是由分子量为12000~50000的单条肽链构成，并且含有二硫键，那么耐热性通常较好。酶分子越大，结构越复杂，对高温越敏感。酶的热稳定性还和它的来源有关，由嗜热菌获得的酶，具有极好的耐热性。

酶催化反应的最适温度，通常要根据实际测定确定。酶的最适温度是不同的。在处理时间较短时，最适温度通常较高，而处理时间较长时，最适温度较低。由此可见，酶的最适作用温度并不是常数，它和处理时间有关。对一个反应系统，如果不考虑处理时间，那么所谓的最适作用温度将毫无意义。而这种和时间的关系，实际上是由于酶处理随时间失活引起的，对单个酶来说，随温度的提高，酶催化速度将提高。

实际应用的酶制剂产品，供应商会推荐一个最适处理温度。该最适处理温度实际上是推荐作用条件下(如pH值、时间)的最适处理温度，并不是独立指标。

### 3.2.4 纤维素酶水解机理

若干种来自真菌的纤维素酶具有较好的催化水解作用，如：*Trichoderma reesei*, *Aspergillus culeatus*, *Sclerotium*, *Thermonospora*等。多年来，菌种的选育进展很大，纤维素酶的活性提高到原来的约40倍。纤维素酶具有一定的专一性，一定的酶按照一定的催化方式水解，而且酶水解条件温和。纤维素酶水解的研究，约开始于30年前，目前，研究各种因素的影响规律、提高酶水解速率及转化率成了研究的重点。影响纤维素酶水解的因素主要有水解温度、pH值、底物种类、酶来源及浓度、水解时间、失活剂和激活剂等。

有若干种酶能催化水解纤维素成葡萄糖，酸性纤维素酶是一种具有3~10个或

更多组分构成的多组分酶。依其作用可分为外切葡聚糖苷酶、内切葡聚糖苷酶和β-葡萄糖苷酶；而碱性纤维素酶与酸性纤维素酶不同,它是一种单组分或多组分的只具有内切β-葡聚糖苷酶活性的纤维素酶。已知天然纤维素分子完全降解为葡萄糖至少需要三类酶的协同作用,外切葡聚糖酶(又称C<sub>1</sub>)、内切葡聚糖苷酶(又称C<sub>x</sub>)和β-葡萄糖苷酶(纤维二糖水解酶)。酶水解纤维素的历程分三步进行,结晶纤维素被内切葡聚糖酶攻击生成无定型纤维素和可溶性低聚糖,然后被外切葡聚糖酶作用直接生成葡萄糖,也可被纤维二糖水解酶水解生成纤维二糖,接着被β-葡糖苷酶水解得到葡萄糖,内切葡聚糖酶主要作用是将纤维素水解成纤维二糖和纤维三糖,不能将纤维素直接水解成葡萄糖。整个反应可看成两个步骤,即将纤维素变成纤维二糖和将纤维二糖水解成葡萄糖。纤维二糖的积累对于内切和外切葡聚糖酶的催化作用有抑制的影响,及时将其水解成葡萄糖,对降低此影响是有利的。葡萄糖的积累对于β-葡糖苷酶的催化也有一定的抑制。这三种酶单独使用时,对纤维素无水解作用。

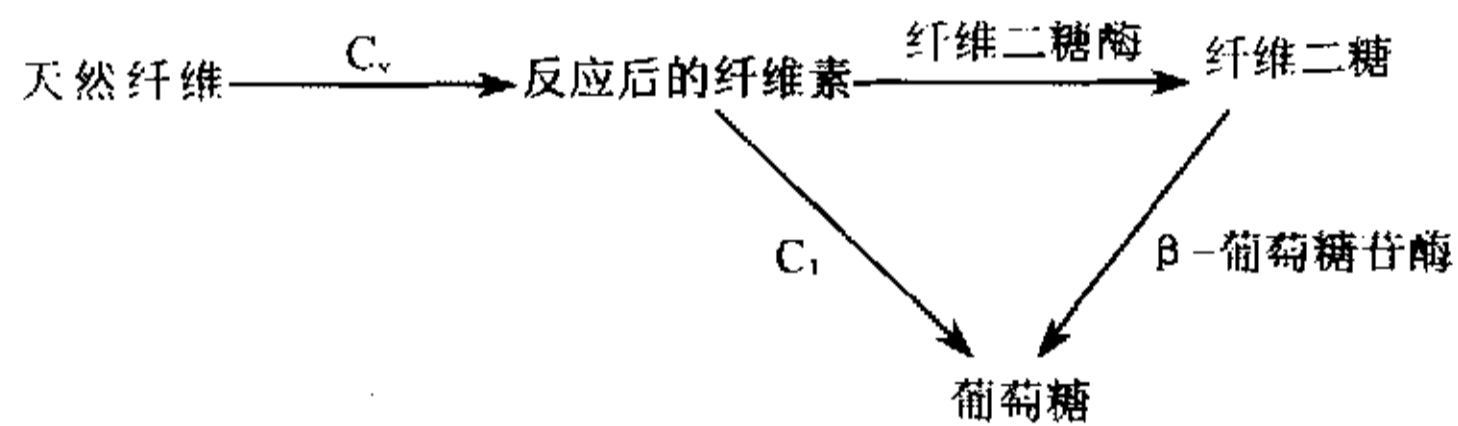


表 3-5 纤维素的酶水解糖化

纤维素酶	棉花溶解度%
外切葡聚糖酶	1
内切葡聚糖酶	1
β-葡糖苷酶	微量
内切和外切葡聚糖酶	53
外切和β-葡糖苷酶	20
三种酶合用	72
原培养液	71

苏茂尧等研究<sup>[42]</sup>，将 *Trichoderma koningii* 纤维素酶体系中内切、外切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡糖苷酶分离开来，单独和合并使用纯酶作用于棉花。这三种酶单独使用时对棉花没有水解作用，不能增加棉花的溶解度。当内切和外切葡聚糖酶合用时，棉花的溶解度为53%；外切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡糖苷酶合用时，溶解度为20%；三种酶合用，溶解度为72%，与用含有这三种酶的原培养液的溶解度71%基本相当。该试验的结果清楚地表明，三种酶间的相互协同作用，只有  $C_x$ 、 $C_1$  和  $\beta$ -葡糖苷酶合用才能将纤维素最后水解成葡萄糖。实际上，一般常用的纤维素酶制剂中往往混有半纤维素酶成分，因此，其对半纤维素也有一定的酶解作用。

### 3.3 木质素的降解

#### 3.3.1 木质素的化学降解

##### 1. 乙醇解<sup>[41]</sup>

将木质素（或木粉）用含 2.5% HCl 的乙醇溶液回流，得到一系列具有酮基的苯丙烷结构的酚类和紫丁香基衍生。

##### 2. 酸解

将木质素（或木粉）用含 0.2 mol/L HCl 的二氧六环水溶液（9:1）加热回流，鉴定出来的产物有松柏醇、香豆醇及它们的醛类，还有香草醛、香草酸、紫丁香基衍生物，此外还有二聚物和一些三聚物。

#### 3.3.2 木质素的生物降解

与纤维素相比，木质素的组成单位、空间结构都要复杂，这种结构的复杂性决定了降解木质素需要多种酶的协同作用。木质素在植物中的功能之一就是保护植物细胞不被外界微生物所侵蚀，这种性质决定了木质素不能被大多数微生物所分解。在自然界中能彻底降解木质素的生物种类不多，在降解木质素的微生物中，真菌起主要作用，但其降解速度大都缓慢，这样应用传统的微生物方法来降解木质素就会遇到许多困难。而分子生物学的发展为解决这一问题提供了新的途径，应用DNA重组技术能使木质素降解酶相关基因进行克隆表达，这是该领域近二十年来的一个研究热点；不同的植物种类，植物不同的生长阶段，其木质素的含量和成分是不同的，由于重复单元间缺乏规律性和有序性。迄今为止，人们仍没能

把整个木质素分子以其完整的状态分离出来,因此,它是天然高聚物中结构最难搞清楚的物质。木质素的降解酶系是非常复杂的体系,目前对它的研究较多,认为最重要的木质素降解酶有3种:木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶,除此之外,还有芳醇氧化酶、乙二醛氧化酶、葡萄糖氧化酶、酚氧化酶、过氧化氢酶等都参与了木质素的降解或对其降解产生一定的影响。

木质素酶的生产菌种较少,这为木质素酶的生产带来了很大难度,生产成本高。在已知的木质素降解微生物中,研究得比较多的是白腐菌。根据白腐菌对木质素降解后木质素碎片及其低分子产物的研究,证明白腐菌可以使木质素的C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>键氧化断裂、C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub>键的断裂、β-芳醚键断裂、芳香环氧化开裂、C<sub>3</sub>和C<sub>5</sub>的脱甲氧基以及C<sub>4</sub>上甲基化等反应,并使木质素降解。由此可见,白腐菌对木质素的降解形式是多种多样的。根据目前的研究<sup>[43]</sup>,白腐菌能分泌漆酶、木质素酶LiP(二芳基丙烷:氧化还原酶Ecl.11.1.14)和锰过氧化物酶MnP(锰II:过氧化氢氧化还原酶Ecl.11.1.13),或至少含有其中的一种。MnP通过形成的Mn<sup>2+</sup>/Mn<sup>3+</sup>氧化还原对攻击酚类底物进行氧化还原反应,而LiP则通过形成的自由基达到氧化反应的目的,LiP对没有甲氧基取代酚的木质素单元的氧化还原能力较强。因而白腐菌分泌的木质素酶也是一种多酶复合体,氧化还原酶是木质素分解酶的主体,当然可能还有其它种类的酶存在。由于木质素结构的复杂性,对木质素酶降解木质素的具体历程和机理尚不清楚,有待进一步的研究。

### 3.4 半纤维素的降解

#### 3.4.1 半纤维素的酸水解

半纤维素主要成分是戊糖,依原料来源不同,可含高达85%的木聚糖,经水解生成木糖。木糖可发酵成醇或转化成微生物生物质,也可经氢化生成木糖醇,可作糖尿病人的甜味剂。木素占总生物质含量1/5左右,可进一步制备多种木素聚合物。由于原料来源和水解工艺的不同,不同水解产物的得率也不同。

#### 3.4.2 半纤维素酶降解

根据半纤维素的结构可知,半纤维素酶是水解由戊糖或除果糖以外的己糖聚合成的多糖(半纤维素)的酶的总称,有的也将半纤维素酶称为细胞间质酶。半纤维

素酶中能水解木聚糖、阿拉伯聚糖和甘露聚糖的酶分别称为木聚糖酶、阿拉伯聚糖酶和甘露聚糖酶。所以半纤维素酶也是一种多酶混合物。

在微生物酶中，半纤维素酶通常和纤维素酶、果胶酶等混合在一起，纤维素酶制品中一般含有少量的半纤维素酶。在木霉制剂和黑曲霉制剂中，若没有进行特定的分离和纯化，一般均有纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶和果胶酶的活力，因而目前的半纤维素酶商品通常不是纯的纤维素酶。半纤维素酶的最适温度一般在40~50℃左右，最适pH值大多为酸性条件，但也有微碱性的半纤维素酶。

即使是同一微生物分泌的酶制剂，不同酶的活性域也略有不同。甘露聚糖分解酶的活性域和纤维素酶的活性域比较类似，而木聚糖分解酶的最佳活性温度比其它两种酶都高，活性pH基本处在中性范围。由于半纤维素酶对纤维的主体——纤维素没有作用，因而纤维素酶中的半纤维素酶对纤维的强度是没有损伤的。由于半纤维素在植物的细胞壁间和果胶、木质素等共生在一起，因而半纤维素酶的存在对植物纤维材料的降解是有利的。

### 3.5 水解动力学

研究含纤维材料水解动力学对于反应器设计及过程控制具有十分重要的意义。含纤维材料的水解是一个十分复杂的过程，包括很多反应<sup>[44]</sup>。水解过程的中间产物是一系列具有不同聚合度的低聚糖，水解的目标产物是单糖，如木糖和葡萄糖，但它们又会进一步降解为糖醛、羟甲基糖醛等。而在溶液中含糖量决定于多糖生产为单糖的速度与单糖分解速度之差<sup>[45-48]</sup>。如多糖变成单糖的反应速率快，单糖变为非糖分的反应速率慢，则溶液中含单糖量必然增多。反之，则溶液中残存的单糖量减少。

Bhandari MM<sup>[45]</sup>等对纤维素水解的动力学进行研究，认为纤维素的酸水解反应是一个总反应为一级的串联反应：



式中：C 为纤维素及半纤维素之总和；G 为还原糖；D 为糖分解产物。

纤维素酸水解生成葡萄糖为液固两相体系，是一扩散控制反应，酸及糖在固相中的扩散极为重要：

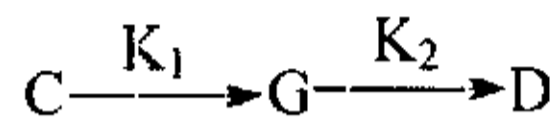
$$d[G]/dt = D_c [H^+]_s [X]_s [S] / r_c$$

式中： $D_c$  为水解质在纤维素相中的扩散系数； $r_c$  为水解过程中，在纤维素相中形成的凝胶膜厚度； $[H^+]_s$  为溶液中  $H^+$  浓度； $[X]_s$  为溶液中酸根离子的浓度； $[S]$  为纤维素浓度。

由于  $D_c$  及  $r_c$  无法确定，在酸浓度、温度及酸的种类等固定的稳定条件下，可以认为  $D_c [H^+]_s [X]_s / r_c$  是一常数  $K_1$ ，则上式写为：

$$d[G]/dt = K_1 [S]$$

对于反应：



$$t=0 \text{ 时 } C=[C_0], G=0, D=0; t=t \text{ 时 } C=[C], G=[G], D=[D]$$

$$\text{可得: } -d[C]/dt = K_1 [C] \tag{1}$$

$$d[G]/dt = K_1 [C] - K_2 [G] \tag{2}$$

$$\text{积分 (1) 式得: } [C] = [C_0] \exp(-K_1 t) \tag{3}$$

将 (3) 式代入 (2) 式得：

$$d[G]/dt = K_1 [C_0] \exp(-K_1 t) - K_2 [G] \tag{4}$$

积分 (4) 式可得：

$$G = K_1 [C_0] [\exp(-K_1 t) - \exp(-K_2 t)] / (K_2 - K_1) \tag{5}$$

可表示成糖产率：

$$\eta = [G] / [C_0] = K_1 [\exp(-K_1 t) - \exp(-K_2 t)] / (K_2 - K_1) \tag{6}$$

式中， $[C_0]$  为原料中纤维素及半纤维素含量(g)； $K_2$ ， $K_1$  分别为反应速度常数 ( $\text{min}^{-1}$ )； $t$  为时间 (min)。

本实验对纤维原料的硫酸水解过程进行了动力学研究，该模型对浓硫酸水解和稀硫酸水解都适用。通过某一时刻测得的实际产率 ( $y_i$ ) 与模型计算值  $f(t_i, K_1, K_2)$  可建立目标函数：

$$S = \sum_{i=1}^n [y_i - f(t_i, K_1, K_2)]$$

用计算机进行非线性最小二乘拟合，求出实验值与计算值的残差平方和达到最小时的  $K_1, K_2$  值，即为动力方程 (1) ~ (6) 中的参数。



## 第四章 浓硫酸水解

水解是可再生资源利用的第一步，也是最关键的一步。水解糖的产率、生产成本及能耗关系到水解工艺是否具有竞争力和生命力。正因为如此，对于含纤维材料的水解研究一直受到各国研究者的重视。植物纤维材料的水解方法可分为稀酸法、浓酸法和酶法。三种方法都各有自己的优缺点，本章是废弃植物纤维材料水解利用研究工作的一部分，对影响水解的主要因素，如酸浓度、底物浓度、粒度、温度等进行了研究，获得最佳水解条件，并建立浓硫酸水解动力学模型。

### 4.1 实验仪器设备与药品

#### 4.1.1 主要实验设备

序号	仪器名称	型号	生产商
1	恒温油浴锅	W201B	上海申胜生物技术有限公司
2	高速台式离心机	TGL-16G	上海安亭科学仪器厂
3	强力电动搅拌机	JB180-D	上海标本模型厂
4	循环水式多用真空泵	SHB-III A	河南省太康教材仪器厂
5	分析天平	FA1004N	上海精密科学仪器厂
6	可见光分光光度计	WFJ7200	尤尼柯（上海）仪器有限公司
7	多功能食品粉碎机	SL-250	上海帅菱电器有限公司

#### 4.1.2 实验药品

序号	试剂名称	级别	产地
1	3, 5-二硝基水杨酸	CP	中国医药集团上海化学试剂公司
2	酒石酸钾钠	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
3	无水亚硫酸钠	AR	浙江平湖化工试剂厂
4	氢氧化钠	AR	上海伊嘉利化工试剂有限公司
5	碳酸钙	AR	上海泗联化工
6	硫酸	AR	浙江平湖化工试剂厂
7	葡萄糖	AR	中国医药集团上海化学试剂公司

## 4.2 试剂的配制

### (1) 3, 5-二硝基水杨酸试剂(DNS)<sup>[49]</sup>

甲液：溶解 6.9g 结晶酚于 15.2mL 10% 氢氧化钠溶液中，并稀释至 69mL，在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸钠。乙液：称取 255g 酒石酸钾钠，加到 300mL 10% 氢氧化钠中，再加入 880mL 1% 3, 5-二硝基水杨酸溶液。将甲液与乙液相混合即得黄色试剂，贮于棕色试剂瓶中。在室温下放置 7~10 天以后使用。

### (2) 1mg/mL 葡萄糖标准液：

准确称取 100mg 分析纯的葡萄糖(预先在 105℃ 干燥至恒重)。用少量蒸馏水溶解后定容至 100mL，冰箱保存备用。

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 水分测定

105℃ 烘干称重

### 4.3.2 筛分

将粉碎后的玉米秸秆和玉米芯分别过 20 目、40 目和 60 目筛，分为四类：过 60 目、40~60 目、20~40 目、不过 20 目，残棉剪碎至 1mm 左右备用。

### 4.3.3 灰分测定方法

在 600℃ 下将一定量秸秆中的有机物灼烧氧化后，把残余的白色物质用分析天平称重，即得灰分质量<sup>[49]</sup>。

### 4.3.4 水解方法

在 500ml 三口烧瓶中加入一定体积和浓度的硫酸，置于恒温水浴锅中，温度恒定后，加入筛分后的纤维质材料并搅拌，在给定温度、浓度等条件下反应，按一定时间间隔取样。反应条件：温度分为 40℃、50℃、60℃、70℃，浓度分为 50%、60%、70%、80%，粒度分为不过 20 目、20~40 目、40~60 目、过 60 目四种，底物浓度分为 2.5%、5.0%、7.5%、10%。

### 4.3.5 还原糖的测定

还原糖的测定方法有蒽酮比色法、斐林试剂比色法、薄层层析法、直接滴定法、3, 5-二硝基水杨酸比色法(又称 DNS 法)等。其中蒽酮比色法是普遍采用的方法之一, 但蒽酮试剂不稳定, 操作条件不易控制, 准确度差, 因此在使用上受到一定限制。DNS 法是近几年得到广泛应用的方法, 具有方法简单、快速、试剂稳定、较少受杂质干扰、重现性好等优点。本研究要求快速准确测定, 所以采用 DNS 法测定样品中还原糖含量。

原理: 3, 5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原糖的醛基还原成棕红色的氨基化合物, 在一定范围内, 还原糖的量和反应液的颜色深度呈比例关系, 利用比色法可测知样品的糖含量<sup>[50,51]</sup>。

葡萄糖标准曲线制备: 取葡萄糖标准液(1mg/mL)0.1~0.7mL分别放入具塞试管中, 均用蒸馏水稀释至1mL, 加入1mLDNS试剂, 在沸水浴中加热5min, 取出以自来水冷却, 再加入蒸馏水8mL, 混匀, 在波长520nm下, 以1cm比色皿测定各管光密度(空白管溶液调零), 以葡萄糖含量(mg)为横坐标, 相应各管光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

样品中还原糖含量测定: 按一定时间间隔取约5mL水解样品, 10000r/min离心5min, 取上清液稀释一定倍数, 再用 $\text{CaCO}_3$ 中和至 $\text{pH}=6\sim7$ , 中和液经真空过滤除去未水解残渣及中和产物后, 取滤液1mL, 加入1mLDNS试剂, 振荡混匀, 在沸水浴中加热5min, 取出以自来水冷却, 再加入蒸馏水8mL, 混匀, 在波长520nm下, 用1cm比色杯测定样品液光密度值。查标准曲线即可计算出还原水解样品中的还原糖量, 分析其中总还原糖含量, 算出水解效率。

$$\text{水解效率} = \frac{a}{m \times (1 - \omega)} \times 100$$

a 为单糖质量, m 为秸秆质量,  $\omega$  为含水率

## 4.4 结果及讨论

### 4.4.1 温度的影响

表 4-1 不同温度下的反应速度常数

	K1	K2
40℃	0.021	0.0050
50℃	0.024	0.0028
60℃	0.031	0.0052
70℃	0.061	0.0080

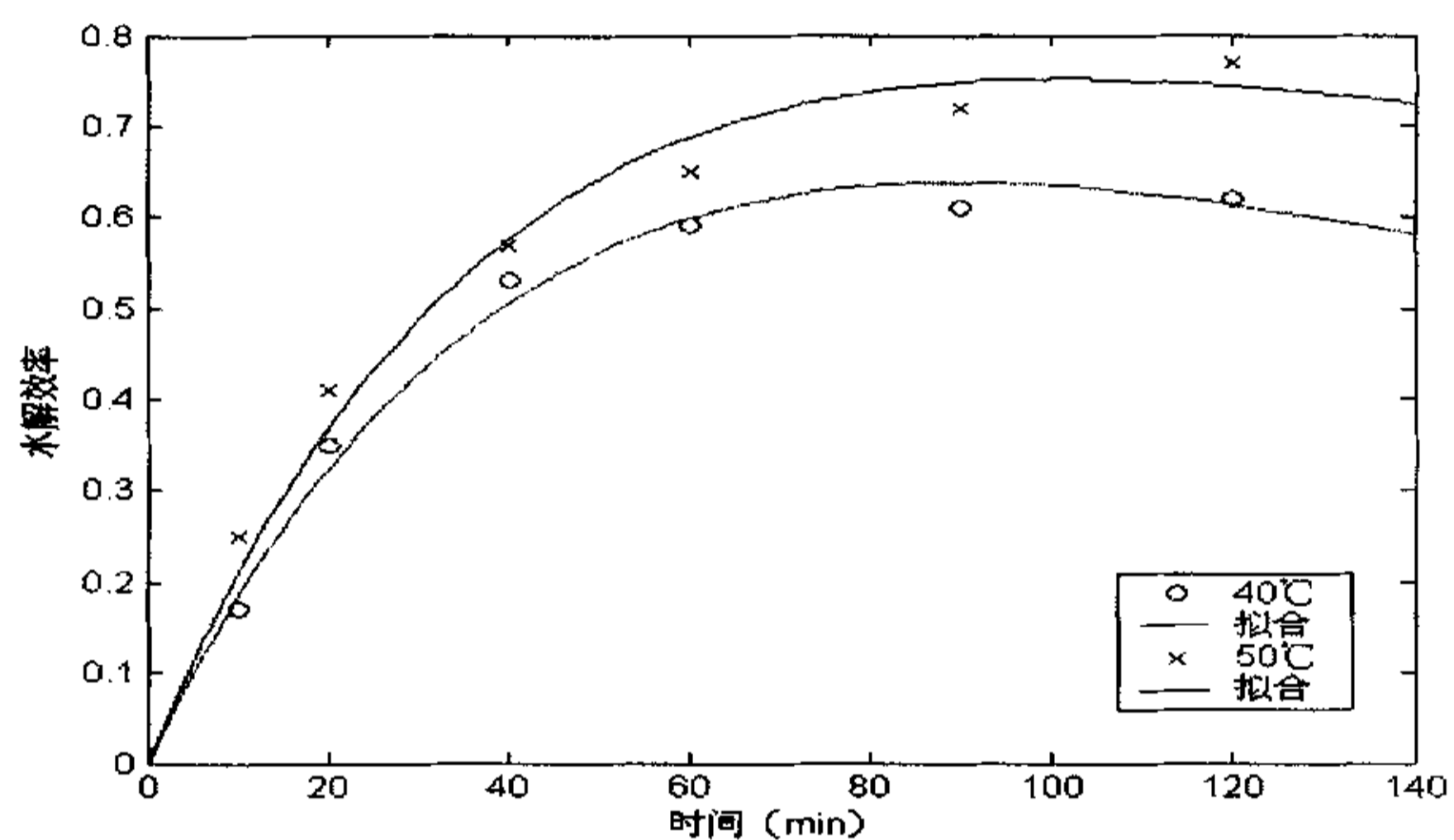


图 4-1 温度对水解效率的影响

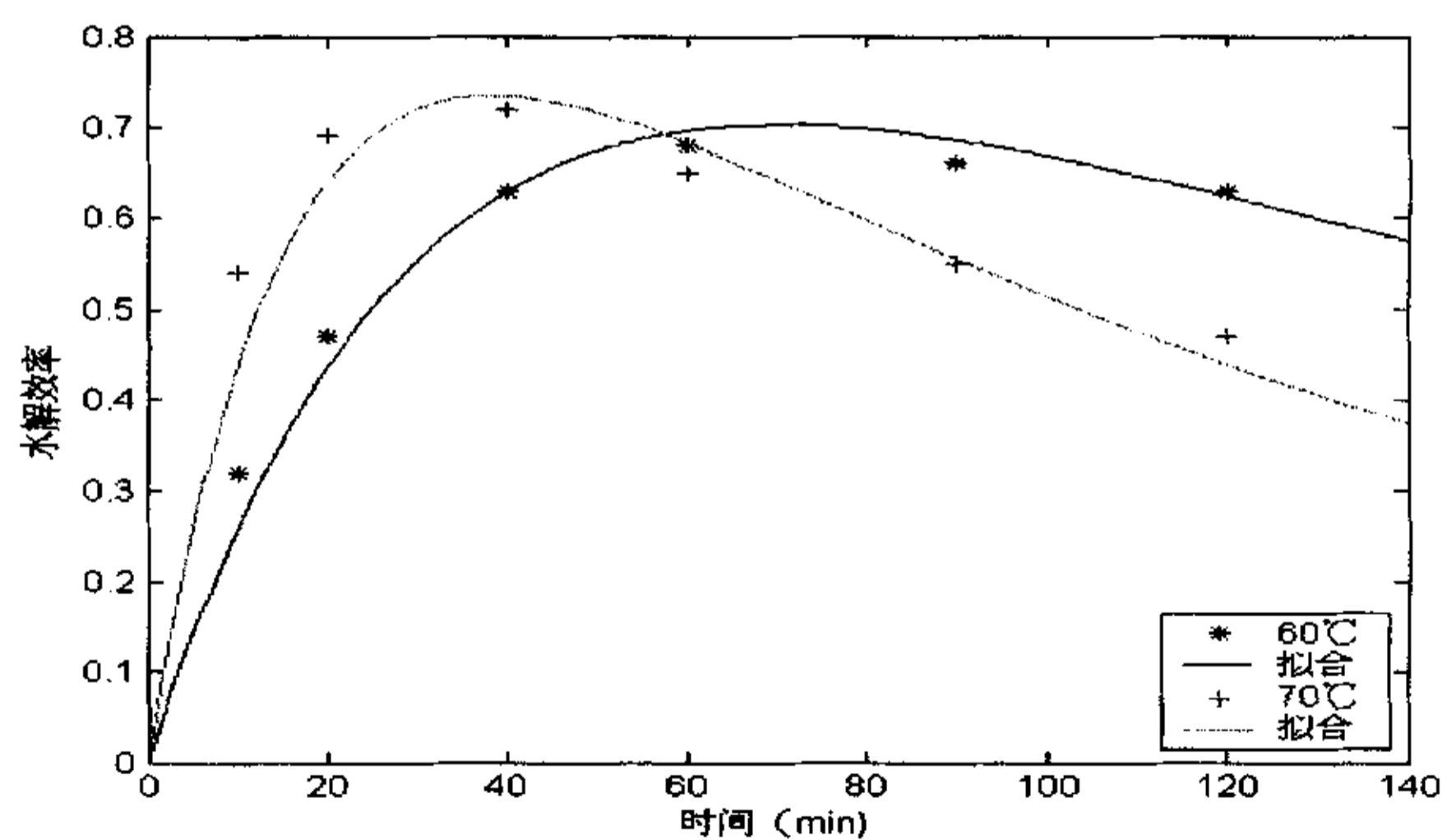


图 4-2 温度对水解效率的影响

图 4-1、4-2 反映了采用 70%的浓硫酸、5%底物浓度 (12.5g/250ml 硫酸) 及

20~40 目玉米秸秆时的水解情况。在硫酸浓度一定的情况下，玉米秸秆的水解率随着温度的升高而提高；而且随着水解时间的延长，这种作用越来越明显。随着温度的升高，水解还原糖的量迅速增加，在 40℃和 50℃时，水解率随时间的增加而逐渐升高，单糖转化率也随之上升；而在 60℃和 70℃时，虽然水解效率有较明显提高，但较高的温度使单糖的降解速率也随着增大，70℃时尤其明显，秸秆的碳化速度最快，说明温度对水解率有明显影响。秸秆浓硫酸水解的温度可定为 50℃。

#### 4.4.2 硫酸浓度的影响

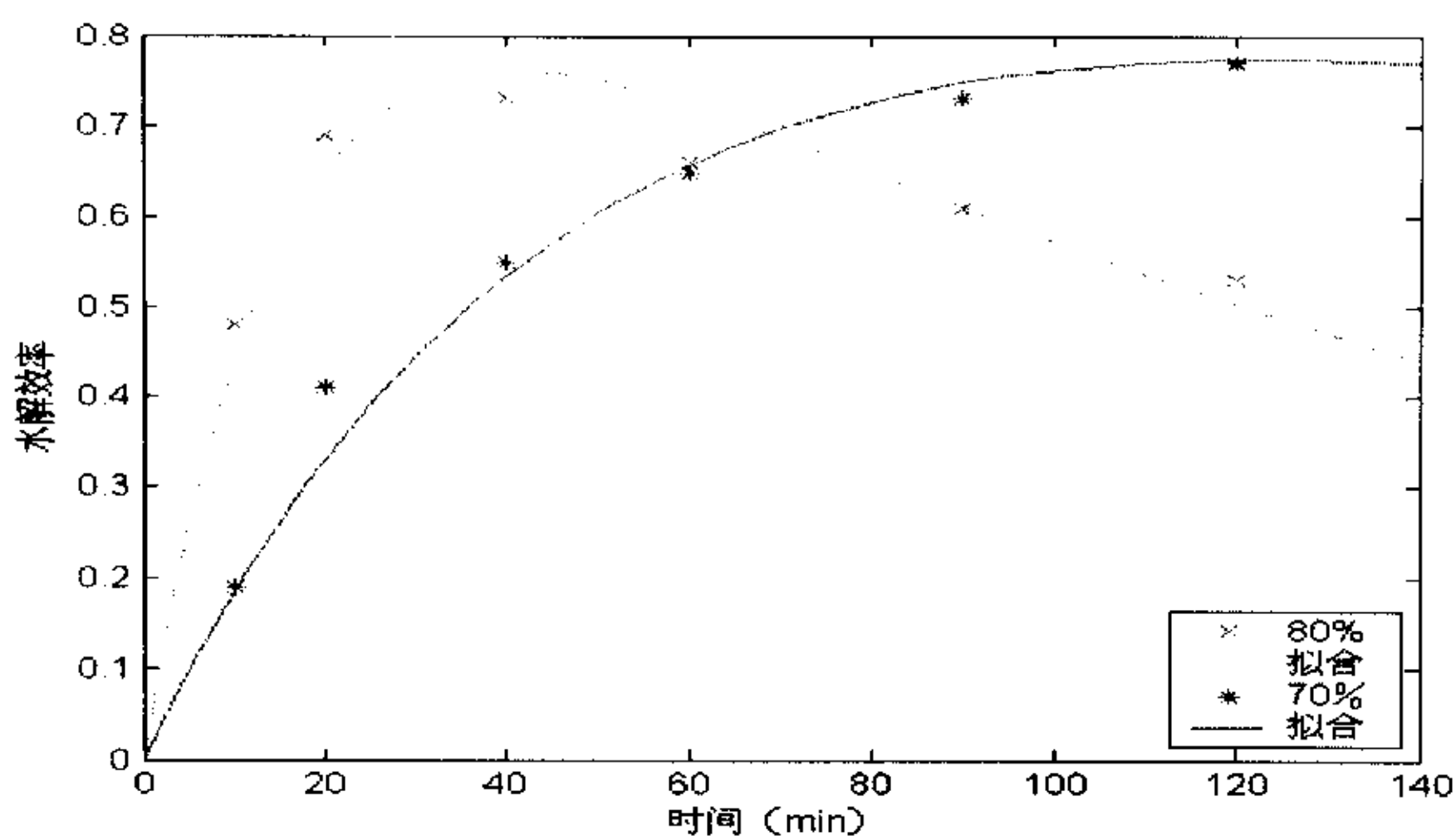


图 4-3 硫酸浓度的影响

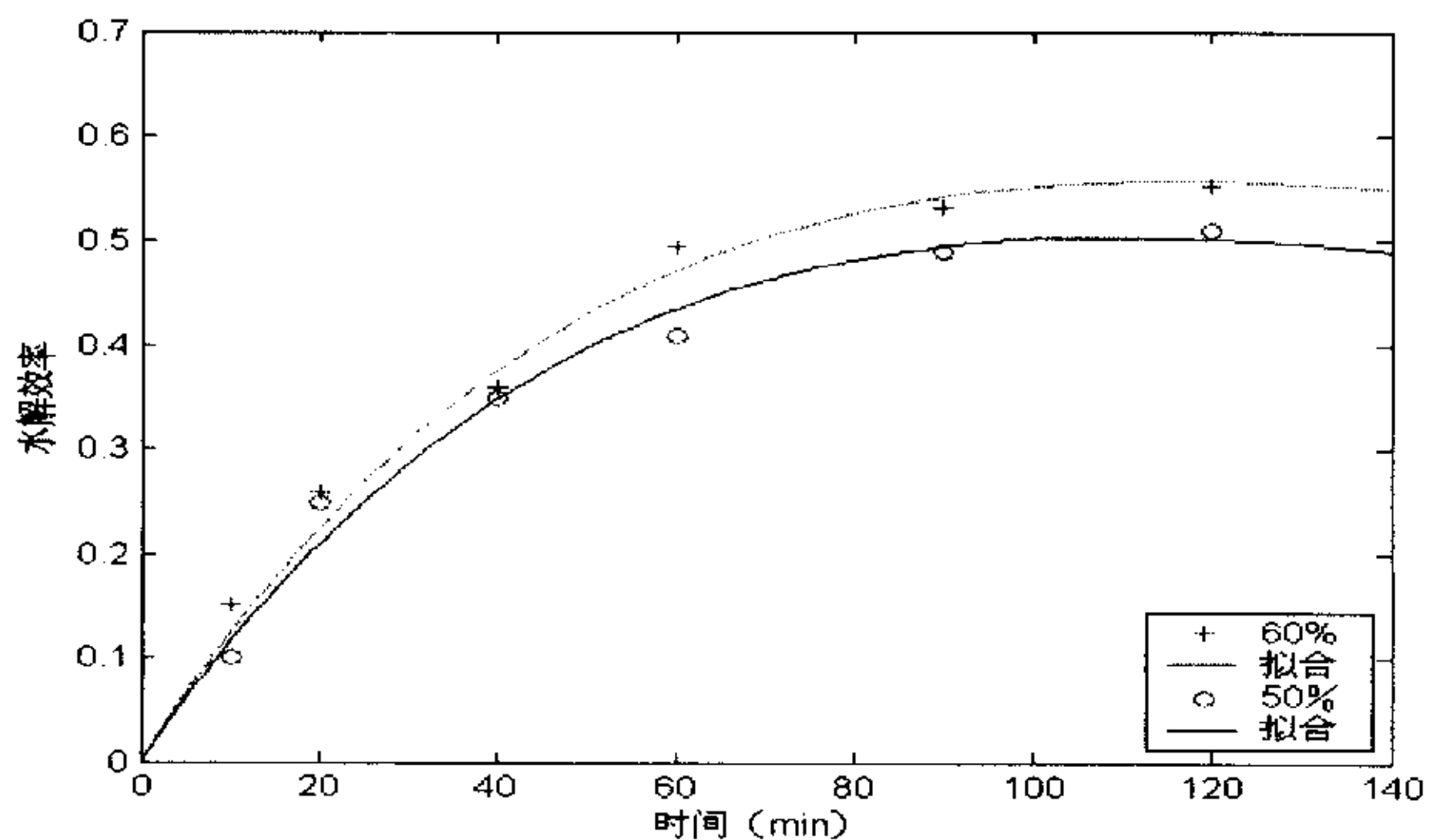


图 4-4 硫酸浓度的影响

在反应温度 50℃、粒度 20~40 目及 5%底物浓度时，随着硫酸浓度的提高，玉米秸秆的水解率逐渐趋于平稳。对 50℃下不同浓度硫酸对 20~40 目玉米秸秆水解率影响的分析可以看出，当硫酸浓度是 50%和 60%时，水解效率增加缓慢，最大转化率分别只有 49%和 55%。硫酸浓度为 80%时，玉米秸秆的水解率在 20 分钟达到最大值，但是高浓度的酸使单糖迅速降解，秸秆的碳化现象也较严重，因此导致转化率也快速下降<sup>[52]</sup>。当硫酸浓度是 70%时，不但水解速率快，而且最大转率达 77%。因此，在利用硫酸水解玉米秸秆的过程中，硫酸的浓度初步定为 70%。

表 4-2 不同浓度下的反应速度常数

	K1	K2
80%	0.061	0.0067
70%	0.021	0.0020
60%	0.014	0.0050
50%	0.013	0.0063

#### 4.4.3 粒度的影响

经过筛分得四种颗粒尺寸：不过 20 目、20~40 目、40~60 目及过 60 目。图 4-5、4-6 为水解温度 50℃、底物浓度 5%及浓度 70%的情况下，不同粒度的玉米秸秆在不同时间的水解情况。将秸秆粉碎，有利于硫酸向颗粒内部渗透，有利于水解的进行，不过 20 目的秸秆颗粒过大，酸不能充分渗透，水解率最低，20~40 目秸秆的水解率最高，而 40~60 目及过 60 目秸秆的水解率比 20~40 目样品低，猜测一方面与试样灰分含量不一致有关，对灰分的分析也证实了这一点，40~60 目及过 60 目秸秆的灰分含量比 20~40 目样品高，另一方面可能是因为颗粒小比表面积大容易被硫酸炭化<sup>[53]</sup>。

表 4-3 不同粒度秸秆的灰分含量

粒度	不过 20 目	20-40 目	40-60 目	过 60 目
灰分含量/%	5.49	6.99	7.20	8.10

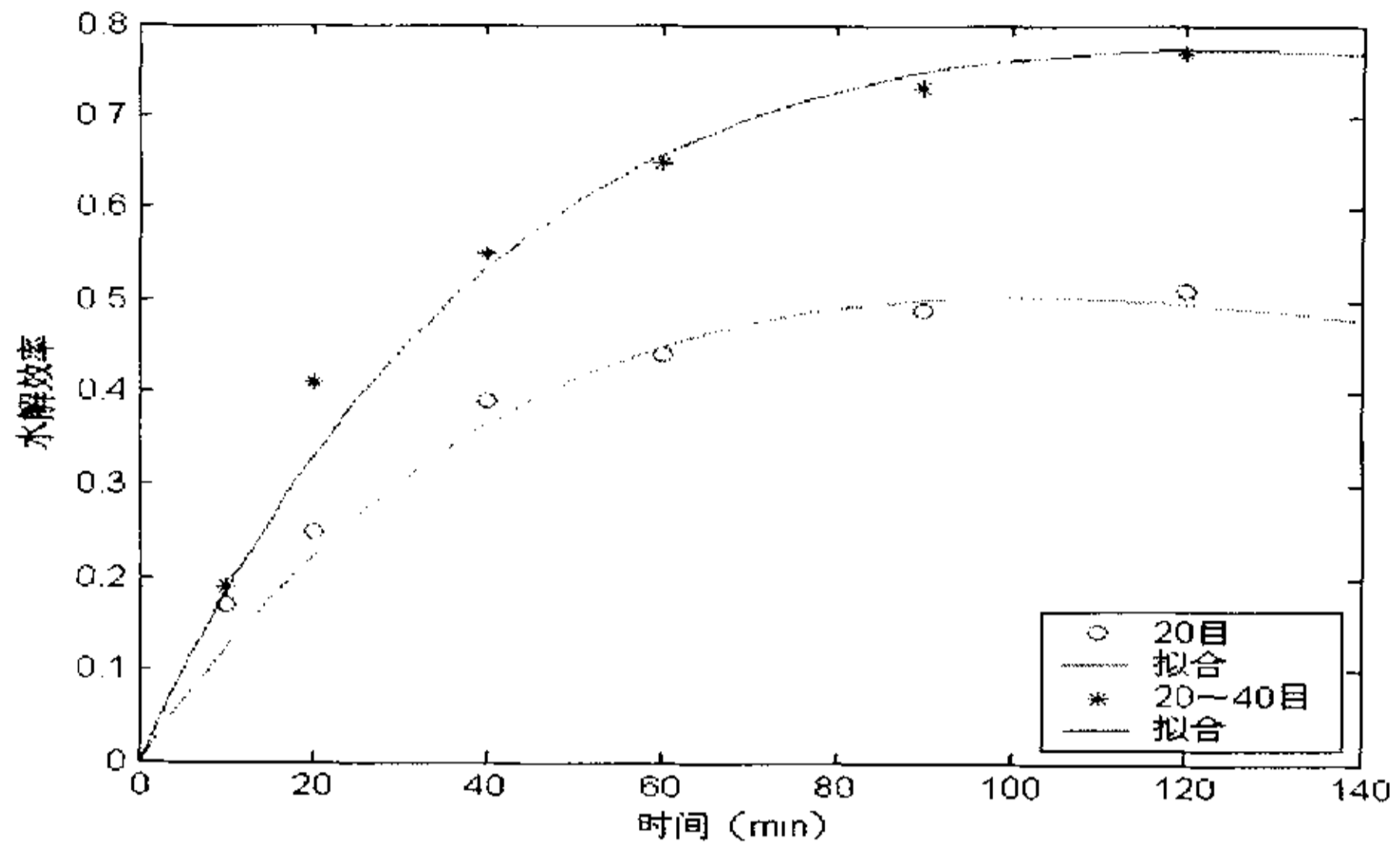


图 4-5 粒度对水解效率的影响

表 4-4 不同粒度的反应速度常数

	K1	K2
20 目	0.014	0.0067
20~40 目	0.021	0.0020
40~60 目	0.016	0.0040
60 目	0.010	0.0030

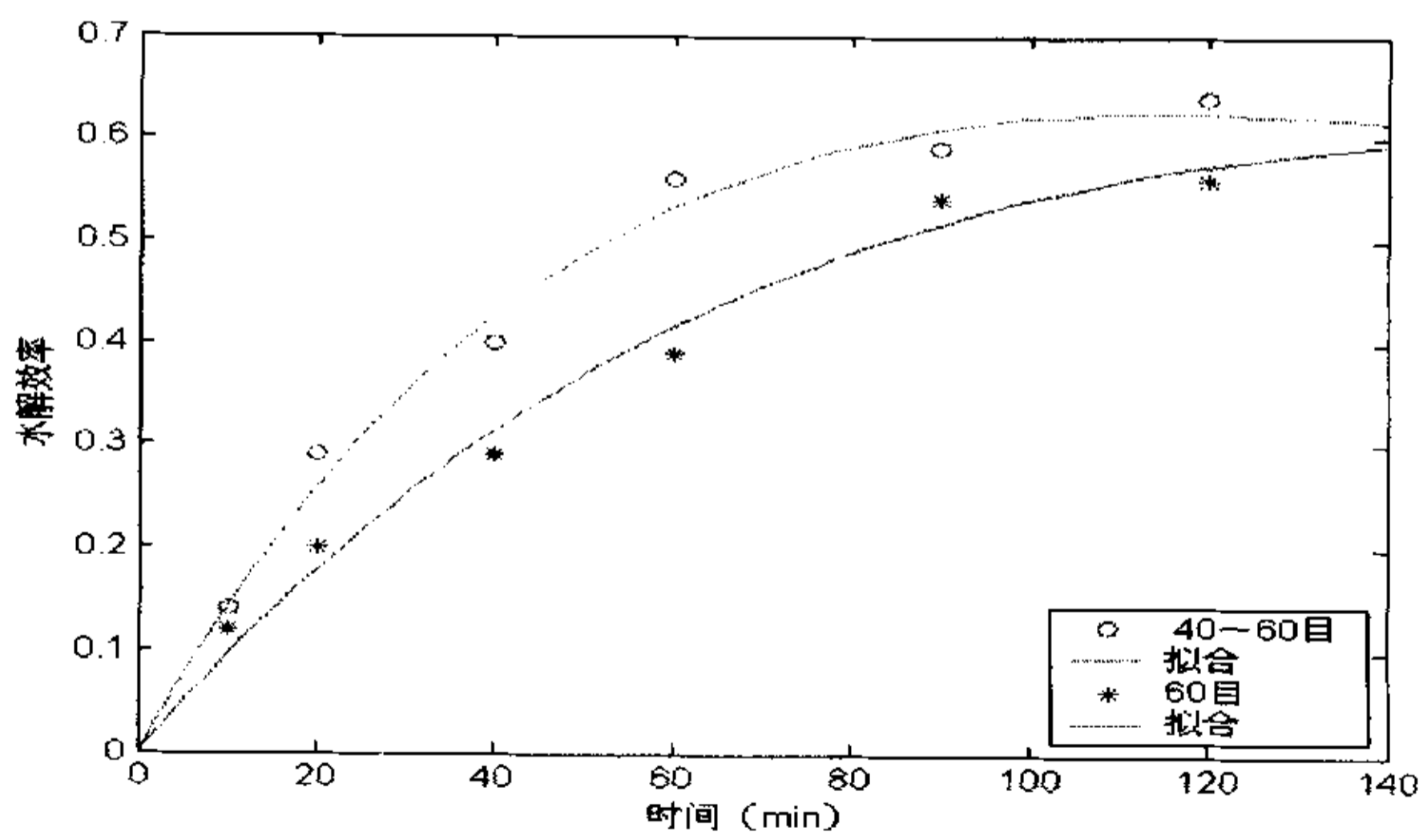


图 4-6 粒度对水解效率的影响

#### 4.4.4 底物浓度的影响

将 20~40 目秸秆在水解温度 50℃，硫酸浓度分别为 70%，水解时间为 2h 条件下研究底物含量对水解率的影响。

表 4-5 不同底物浓度的反应速度常数

	K1	K2
2.50%	0.015	0.0040
5%	0.021	0.0020
7.50%	0.016	0.0064
10%	0.014	0.0064

在底物浓度 5% 时，试验的水解率较高，含量的增加水解率下降，原因是固体含量增加导致搅拌困难，使硫酸不能与秸秆颗粒充分接触，阻碍了酸向纤维颗粒内部渗透，从而使秸秆转化不完全<sup>[54]</sup>。但高固液可以降低酸的消耗，增加水解液中的糖浓度，对水解液的后续利用有利，因此，宜在不会大幅降低转化率的条件下适当提高底物浓度。

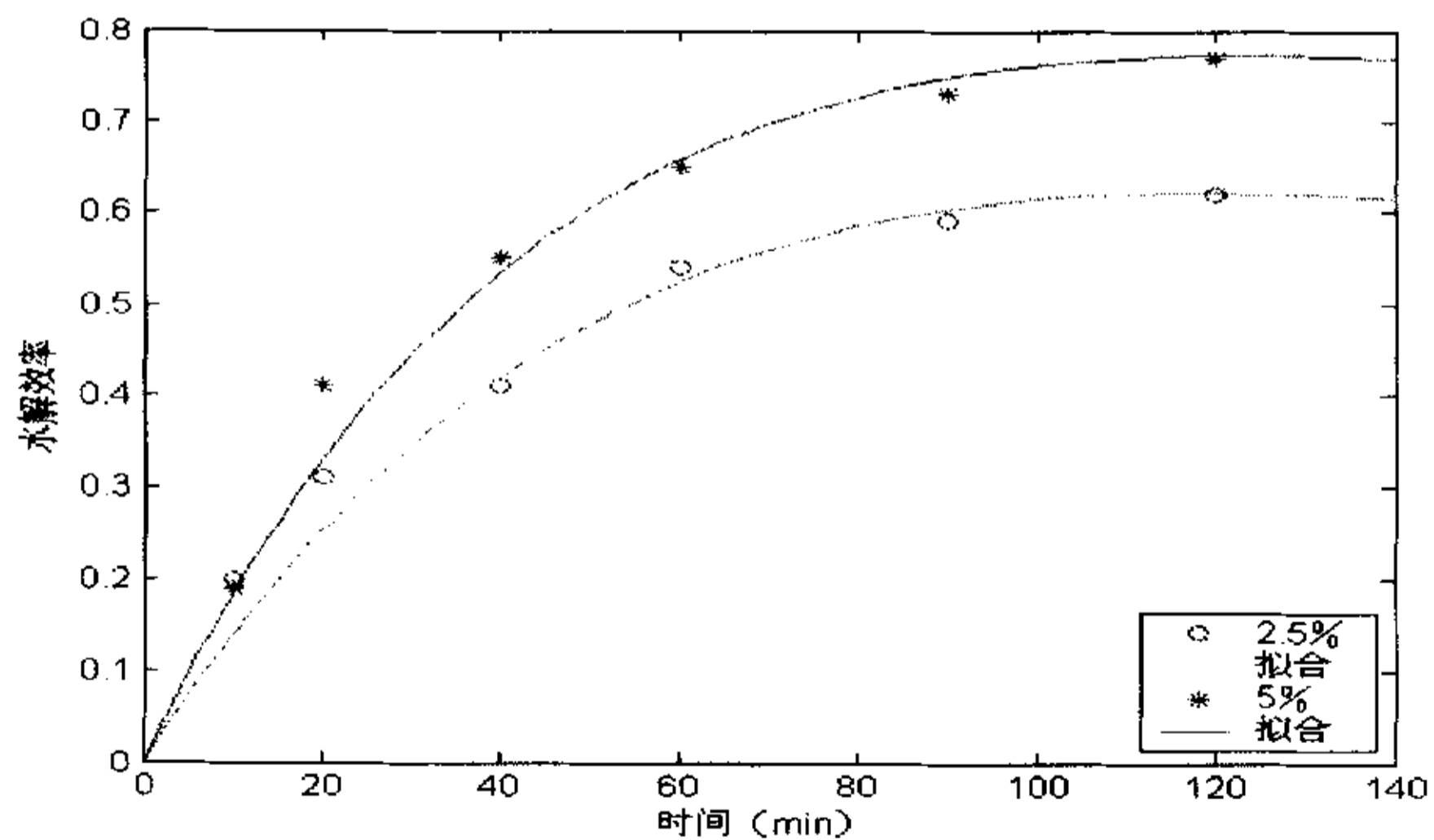


图 4-7 底物浓度对水解效率的影响



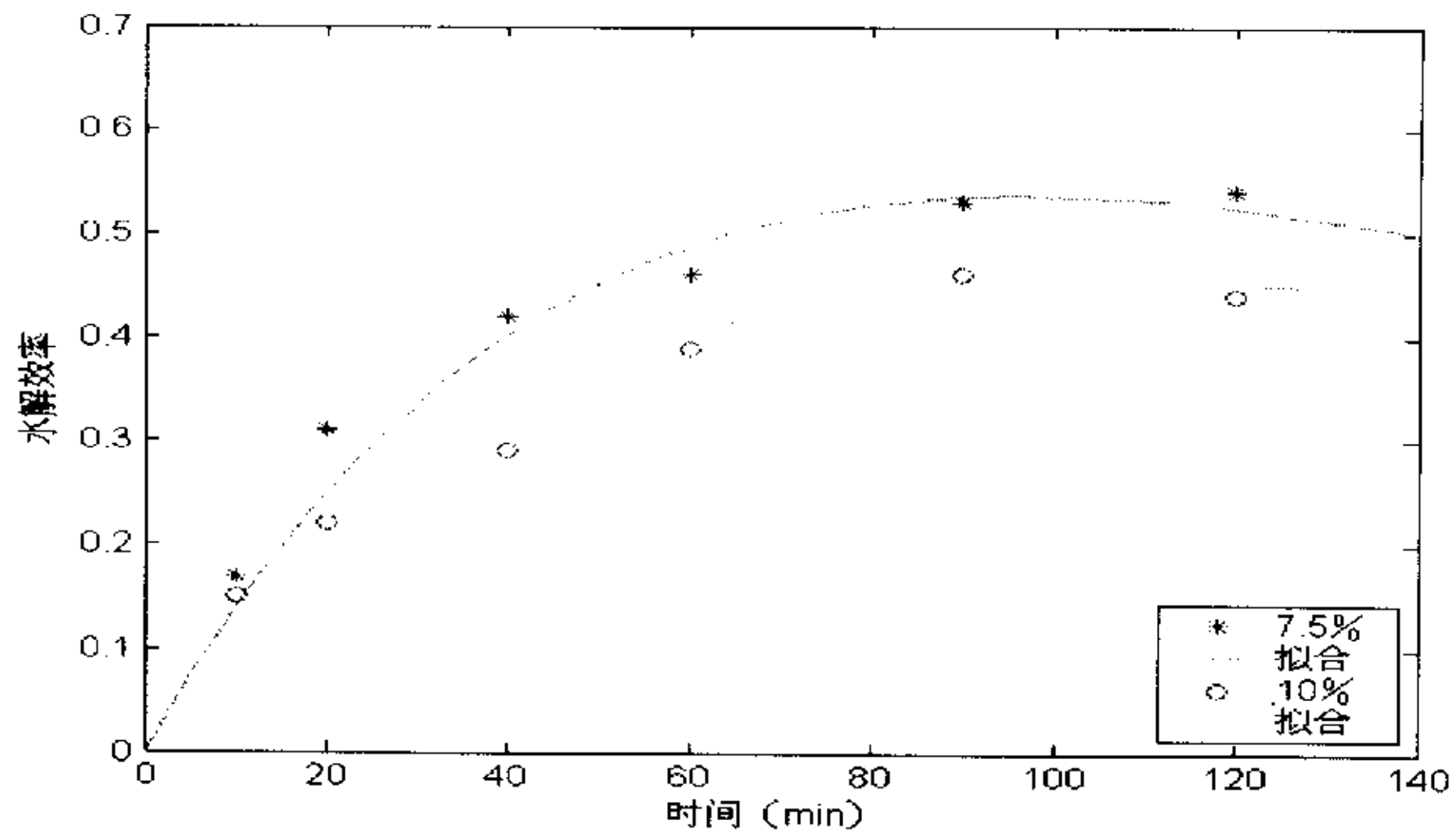


图 4-8 底物浓度对水解效率的影响

#### 4.4.5 水解时间的影响及水解动力学分析

水解反应时间的选择与温度有密切的关系，不同温度水解效率达到最高所需的时间不同。反应条件为浓度 70%、温度 50℃、粒度 20~40 目及 5%底物浓度，反应开始时水解效率随时间增加而提高，但随着水解时间延长，单糖产率缓慢下降，这是由于随着水解时间延长降解速率大于水解速率，一部分单糖被进一步降解为糖醛，羟甲基糖醛等产物，另一部分生成的单糖又缩合成多糖。所以反应 2 小时即可停止。

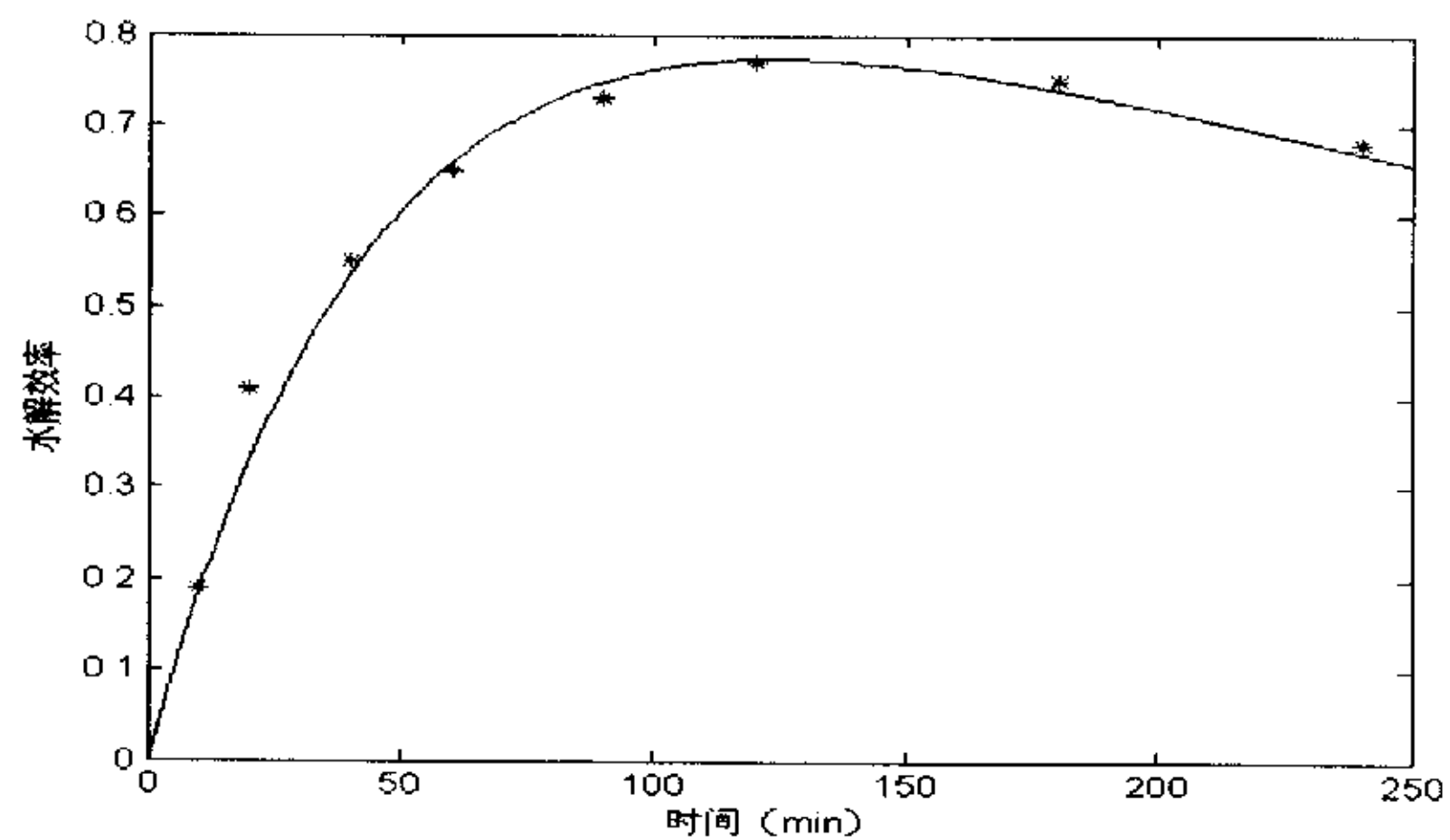


图 4-9 时间对水解效率的影响

表 4-1,4-2,4-4,4-5 中列出了不同水解体系的速度常数。

以水解最佳条件为例(硫酸浓度 70%, 温度 50%, 底物浓度 5%, 颗粒数 20~40 目), 根据式  $\eta = [G] / [C_0] = K_1[\exp(-K_1t) - \exp(-K_2t)] / (K_2 - K_1)$ , 计算  $K_2$ ,  $K_1$  值得:

$$K_1 = 2.06 \times 10^{-2}, K_2 = 2.02 \times 10^{-3}$$

由此可见,反应速率常数  $K_1$  比  $K_2$  大一个数量级,即在实验最佳条件时玉米秸秆中的纤维素、半纤维素水解为单糖的速率比较快,而单糖的降解速率比较慢。所以,单糖产率可达到最高产率 79.5%。

$$\text{最佳条件下的动力学方程为: } \eta = -1.1085 \times (e^{-0.0206t} - e^{-0.00202t})$$

#### 4.5 小结

1.在实验范围内,对于玉米秸秆,影响玉米秸秆浓硫酸水解的主要因素是硫酸浓度和水解温度,水解速率随温度提高而提高,但是单糖的降解率也随之增大,单糖产率在 50℃时最高,几乎达到 80%。但超过此温度,水解效率则降低。

2.水解速率随硫酸浓度提高而提高,单糖产率在硫酸浓度 70%时最高。当浓度为 80%时,水解效率降低

3.底物浓度和颗粒尺寸对水解速度及单糖产率影响较小。在 50℃, 70%硫酸、5%底物浓度及 20-40 目粒度,水解速率和单糖产率两项指标都较高。

4.建立的动力学模型能较好地关联数据,实验数据与计算值拟合较好。

## 第五章 稀硫酸水解

### 5.1 实验仪器设备与药品

同第四章

### 5.2 实验方法

#### 5.2.1 筛分

将粉碎后的玉米芯分别过 20 目、40 目和 60 目筛，分为四类：过 60 目、40~60 目、20~40 目、不过 20 目，未筛分。

#### 5.2.2 水解方法

在 500ml 三口烧瓶中加入一定体积和浓度的硫酸，置于恒温油浴锅中，温度恒定后，加入筛分后的玉米芯并搅拌，在给定温度、浓度等条件下反应，按一定时间间隔取样。反应条件：温度分为 60℃、80℃、100℃，浓度分为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%，粒度分为不过 20 目、20~40 目、40~60 目、过 60 目、未筛分五种，底物浓度分为 2.5%、5.0%、10%、15%。

#### 5.2.3 还原糖的测定

还原糖测定采用 DNS 法，水解样品经稀释、中和、真空过滤除去未水解残渣后，分析其中总还原糖含量，算出水解效率。

$$\text{水解效率} = \frac{a}{m \times (1 - \omega)} \times 100$$

a 为单糖质量，m 为玉米芯质量， $\omega$  为含水率

### 5.3 结果及讨论

#### 5.3.1 温度的影响

图 5-1 反映了采用 1% 的浓硫酸、5% 底物浓度（12.5g/250ml 硫酸）及 20~40 目玉米芯时的水解情况。在硫酸浓度一定的情况下，玉米芯的水解率随着温度的升高而提高；而且随着水解时间的延长，这种作用越来越明显。随着温度的升高，

水解还原糖的量迅速增加，在 60℃时，水解率随着时间的增加而升高，单糖转化率也随之上升，但反应终止时水解效率只有 11.9%；在 80℃时，水解效率为 22.5%，有较明显提高；100℃时水解效率达到 24.8%。由此可见，温度对水解效率影响显著，但较高的温度导致能量消耗也随着增大，超过 100℃时更需要耐压设备<sup>[55,56]</sup>，对节约成本和资源都不利，因此本实验中均采用 100℃。因此，选择合适的反应温度对提高糖的收率及节约成本都十分重要。

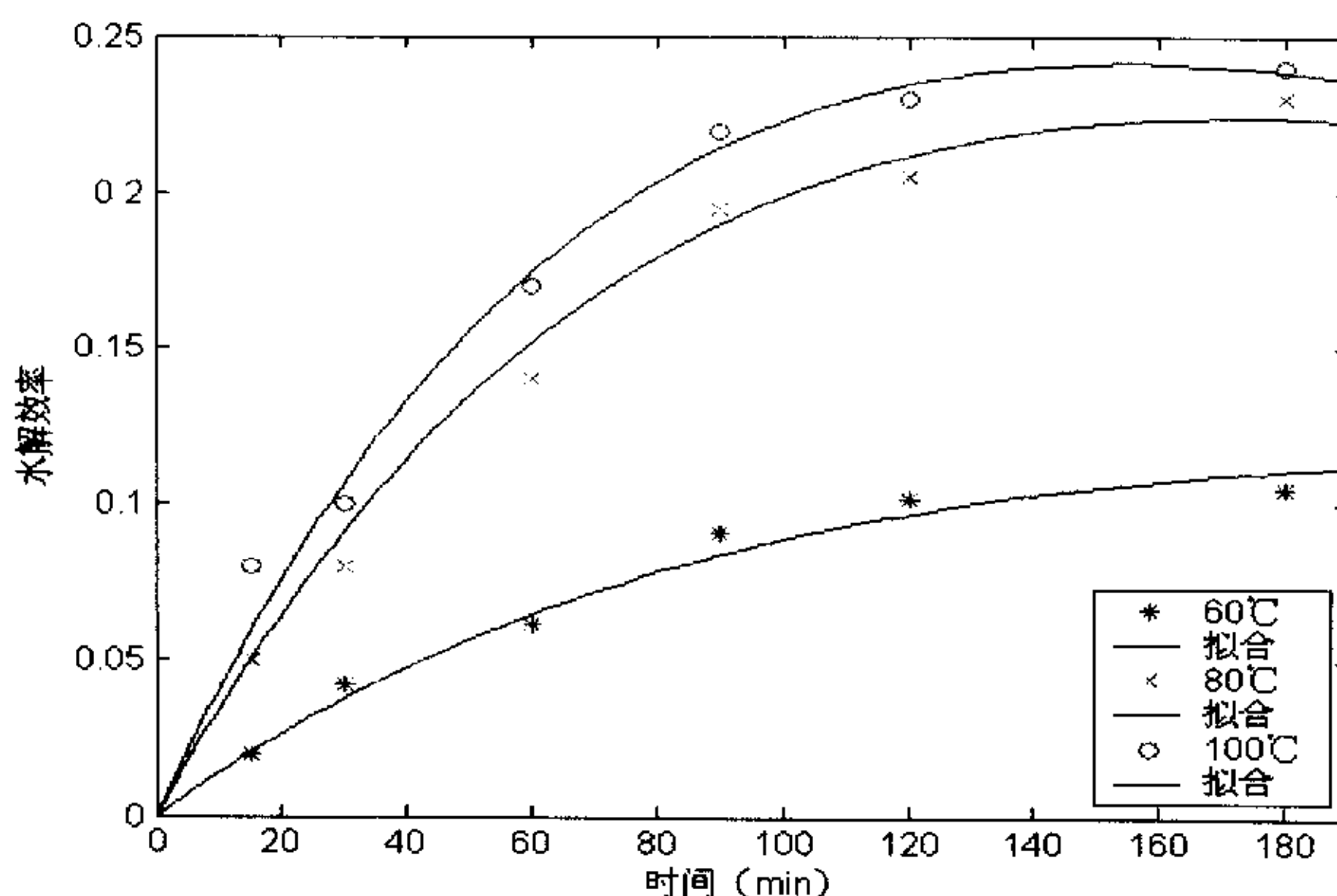


图 5-1 温度对水解效率的影响

表 5-1 不同温度下的反应速度常数

	K1	K2
60℃	0.0015	0.0091
80℃	0.0035	0.0087
100℃	0.0043	0.0092

### 5.3.2 硫酸浓度的影响

在反应温度 100℃、粒度 20~40 目及 5%底物浓度时，随着硫酸浓度的提高，玉米芯的水解率逐渐趋于平稳。从图 5-2, 5-3 对 100℃下不同浓度硫酸对 20~40 目玉米芯水解率影响的分析可以看出，当硫酸浓度是 0.5%和 1%时，水解效率增加缓慢，最大转化率分别有 21.7%和 24.8%。硫酸浓度为 2%和 3%时，玉米芯的

水解率在 2 左右小时达到最大值，但是较高硫酸浓度并未使水解转化率明显提高，且酸消耗多，会提高成本。当硫酸浓度是 1% 时，不但水解速率快，而且最大转率达 24.8%。因此，在利用硫酸水解玉米芯的过程中，硫酸的浓度初步定为 1%。

表 5-2 不同浓度下的反应速度常数

	K1	K2
0.5%	0.0035	0.0093
1.0%	0.0045	0.0095
2.0%	0.0048	0.0094
3.0%	0.052	0.0093

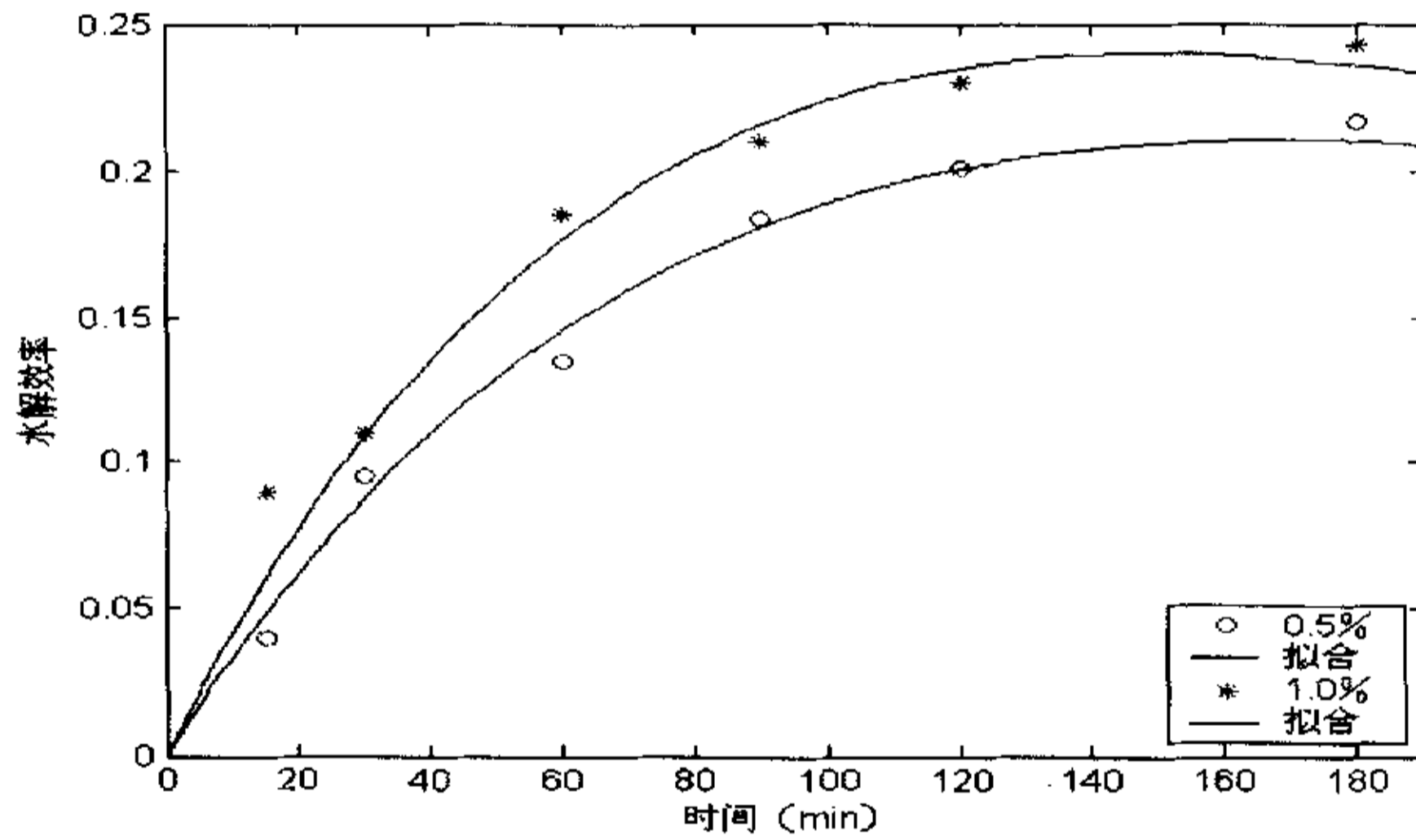


图 5-2 浓度对水解效率的影响

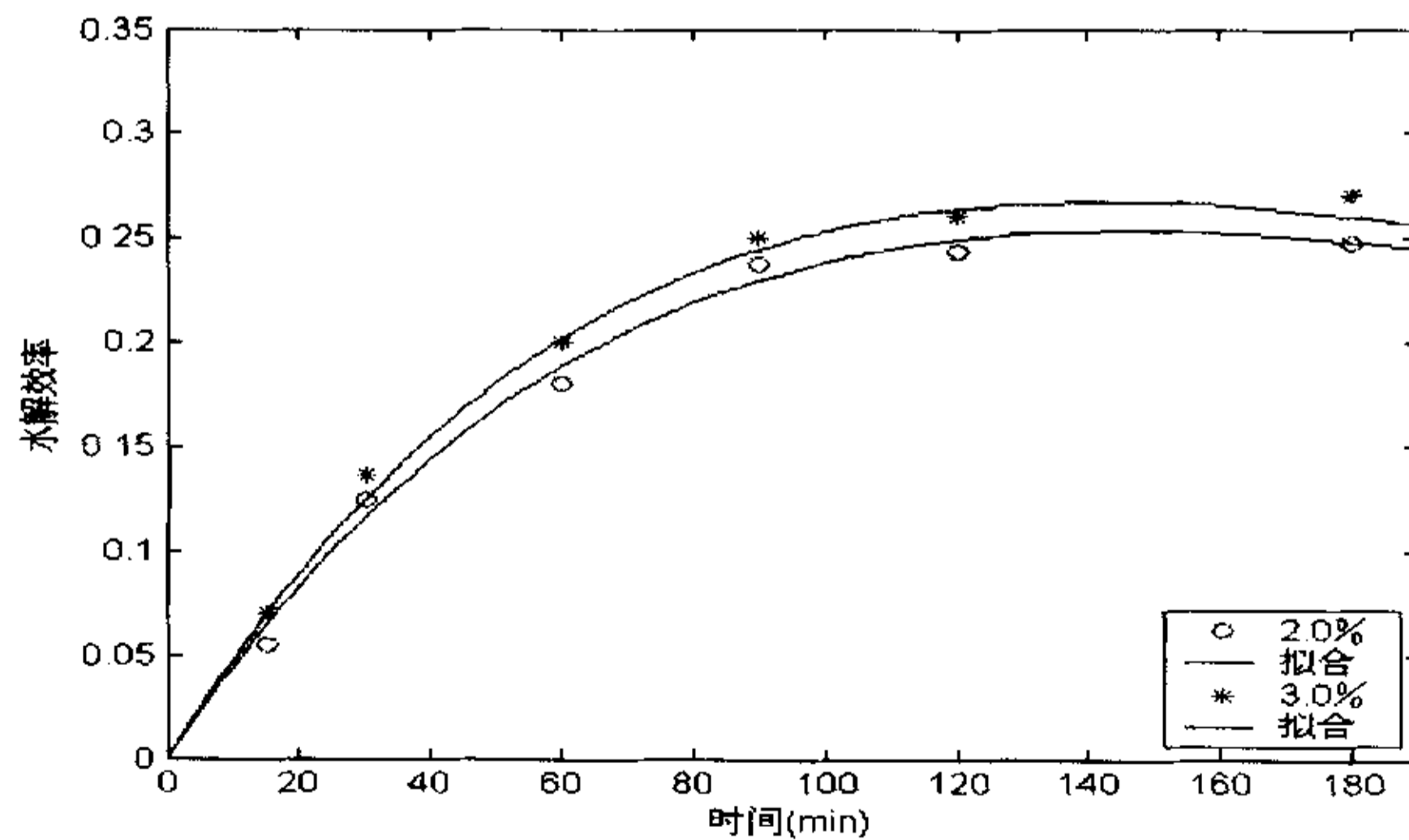


图 5-3 硫酸浓度对水解效率的影响

### 5.3.3 粒度的影响

经过筛分得五种颗粒尺寸：未筛分、不过 20 目、20~40 目、40~60 目及过 60 目。图 5-4,5-5 为水解温度 100℃、底物浓度 5%及硫酸浓度 1%的情况下，不同粒度的玉米芯在不同时间的水解情况。在水解温度与底物浓度一定的情况下，五种试验玉米芯样水解率达到稳定的时间基本一致；将玉米芯粉碎，有利于硫酸向颗粒内部渗透，有利于水解的进行，不过 20 目的玉米芯颗粒过大，酸不能充分渗透，水解率最低，60 目玉米芯的水解率最高，但原料粉碎至 60 目消耗的动力和能量大，会使成本升高。20~40 目的水解效率已接近 60 目的得率。而经过粉碎，未经筛分的材料水解效率为 22.9%，虽然得率略低，但省去筛分这道程序，既可节约人力及动力费用，还可充分利用原料，不会造成材料浪费。

表 5-3 不同粒度下的反应速度常数

	K1	K2
20 目	0.0035	0.0090
20~40 目	0.0045	0.0095
40~60 目	0.0046	0.0093
60 目	0.0051	0.0094
未筛分	0.0040	0.0091

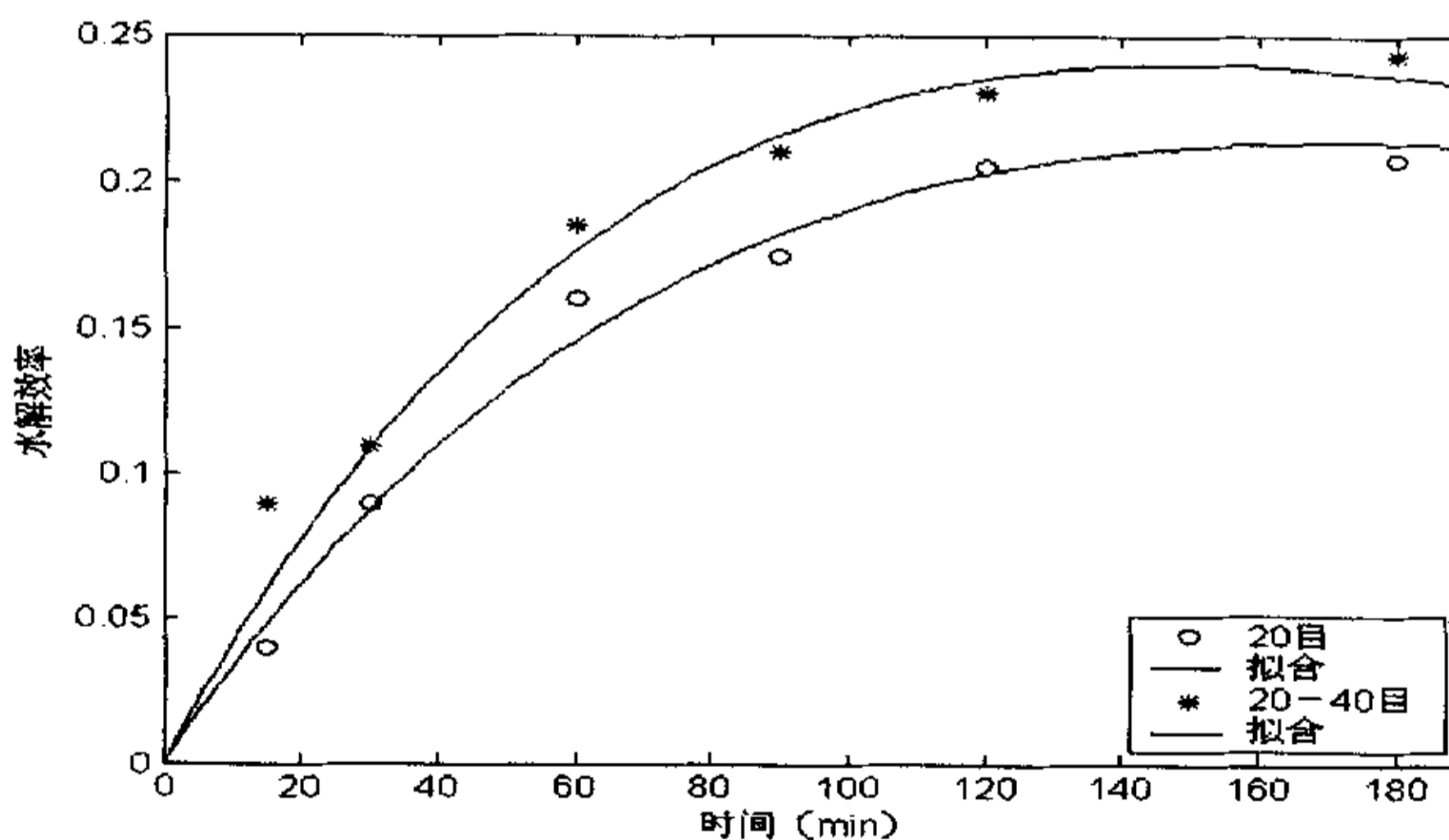


图 5-4 粒度的影响

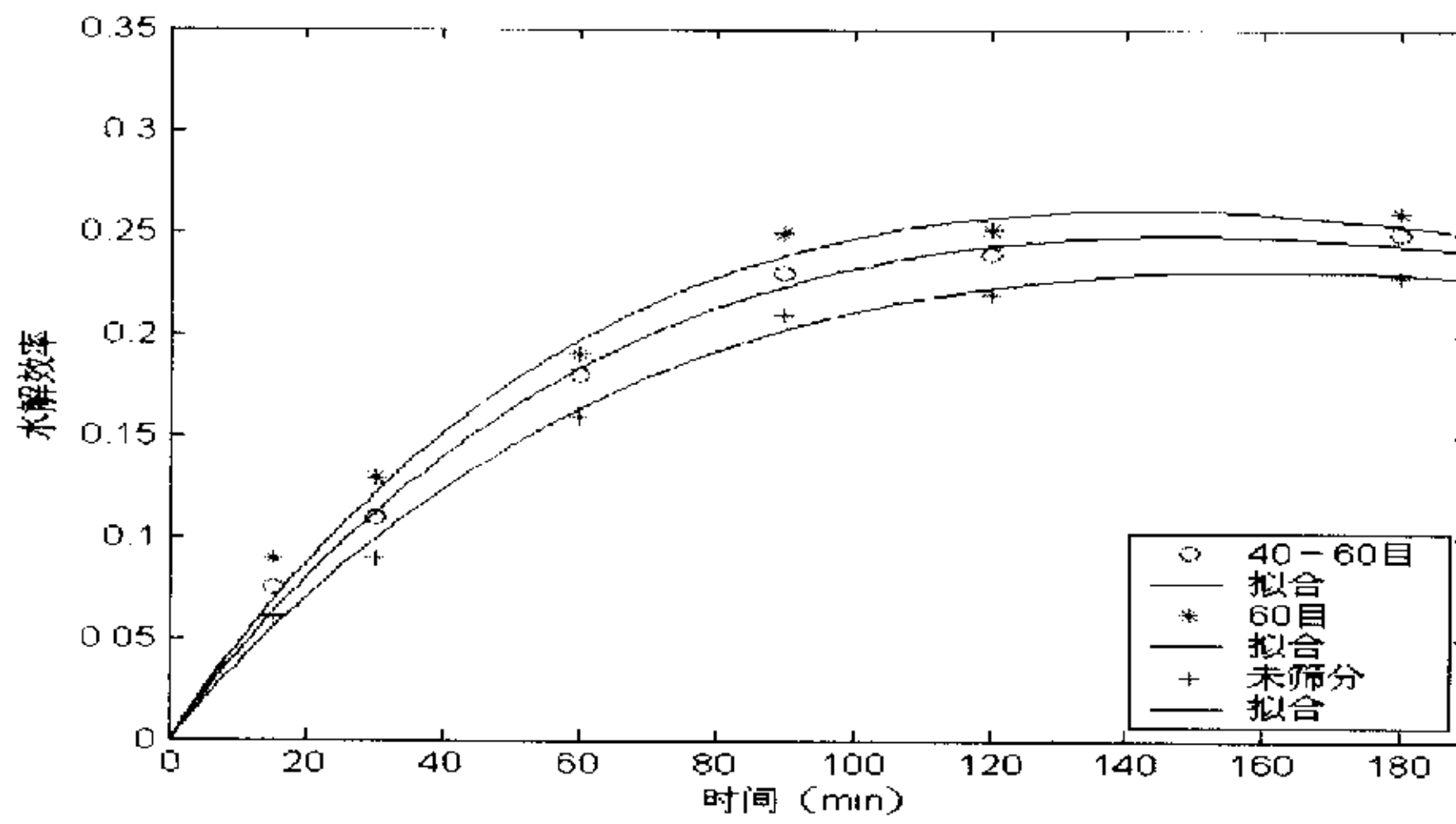


图 5-5 粒度对水解效率的影响

表 5-4 不同粒度玉米芯的灰分含量

粒度	不过 20 目	20~40 目	40~60 目	过 60 目
灰分含量/%	2.49	2.99	3.20	4.10

### 5.3.4 底物浓度的影响

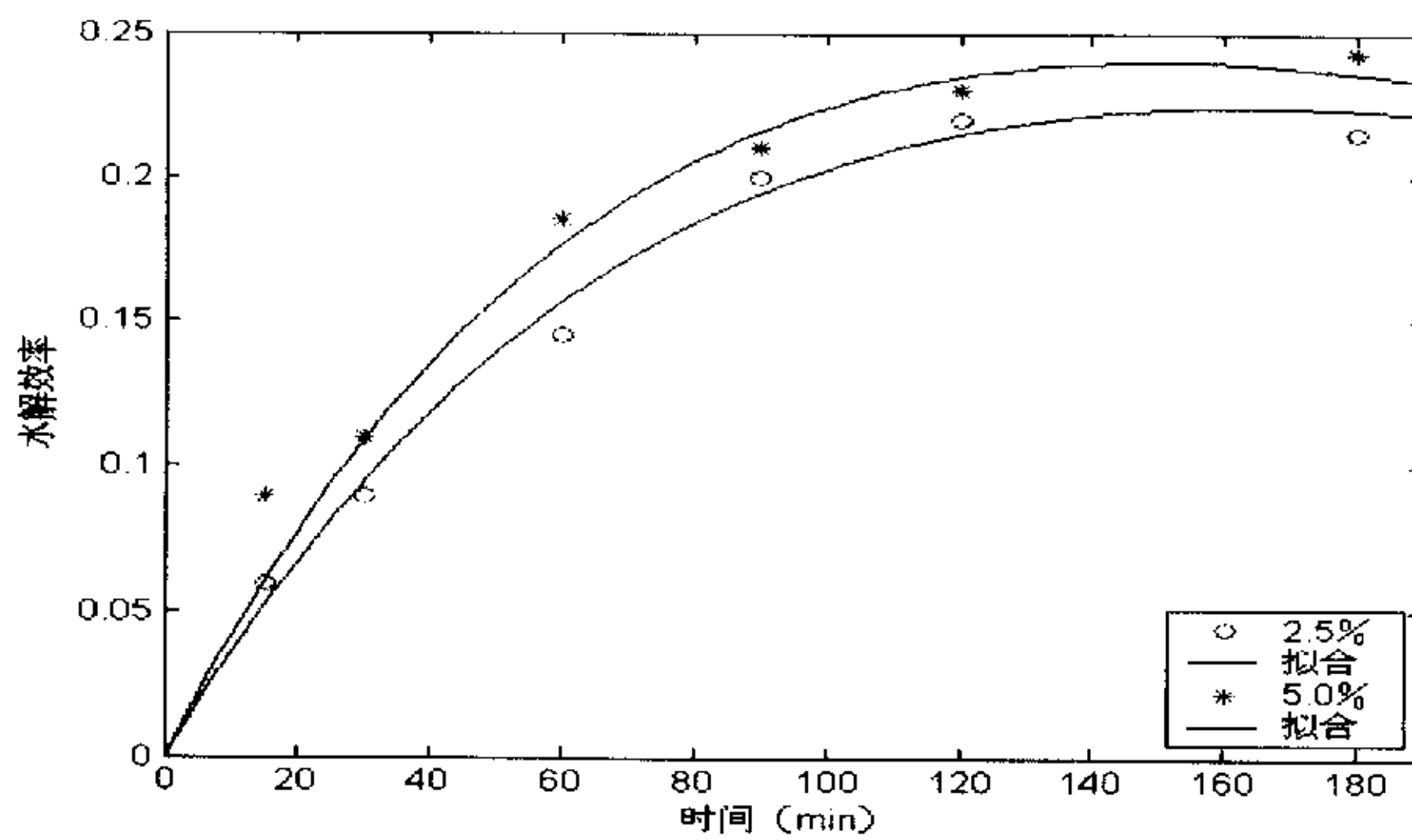


图 5-6 底物浓度对水解效率的影响

表 5-5 不同底物浓度的反应速度常数

	K1	K2
2.5%	0.0047	0.0096
5.0%	0.0045	0.0095
10.0%	0.0038	0.0094
15.0%	0.0033	0.0092

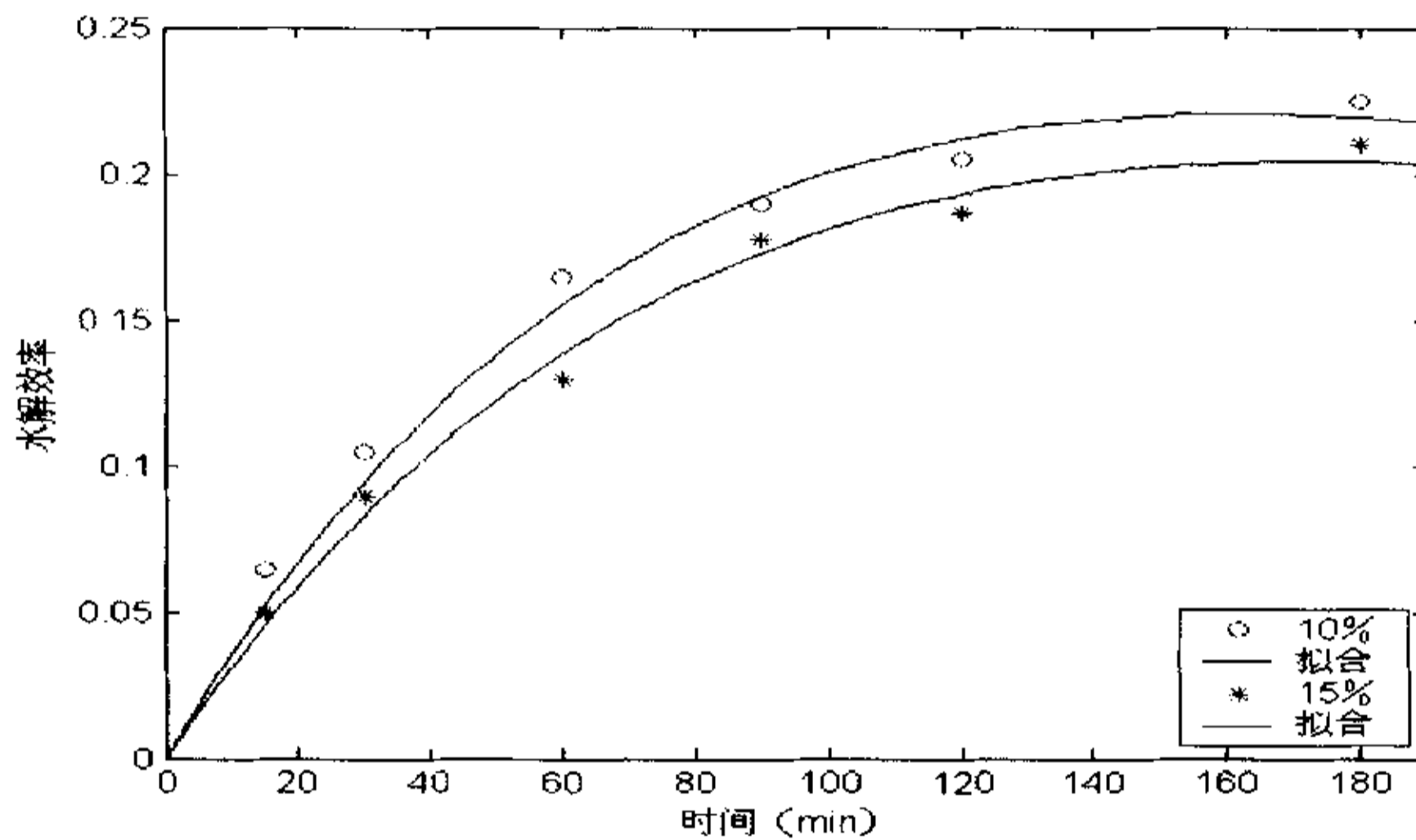


图 5-7 底物浓度对水解效率的影响

将 20~40 目玉米芯在水解温度 100℃，硫酸浓度分别为 1%，水解时间为 3h 条件下研究含量对水解率的影响。

在底物浓度 5%时，试验的水解率较高，含量的增加水解率下降，原因是固体含量增加导致搅拌困难，造成底物过量，使硫酸不能与玉米芯颗粒充分接触，转化不完全，从而使玉米芯转化不完全。底物浓度低，则酸过量，同样会造成水解效率下降。但高底物浓度可以降低酸的消耗，提高水解液中糖的浓度。因此，工业生产中，可在不会大幅降低转化率的前提下适当提高底物浓度。

### 5.3.5 水解时间的影响及动力学分析

表 5-1,5-2,5-3,5-5 中列出了不同水解体系的速度常数。

反应条件为浓度 1%、温度 100℃、粒度 20~40 目及 5%底物浓度，反应开始时水解效率随时间增加而提高，但随着水解时间延长，还原糖产率开始下降，并



且下降速率比浓酸水解要快，这是由于随着水解时间延长糖的降解速率大于水解速率，一部分单糖被进一步降解。因此，选择合适的反应时间很重要，稀酸水解反应3小时即可。根据式  $\eta = [G] / [C_0] = K_1 [\exp(-K_1 t) - \exp(-K_2 t)] / (K_2 - K_1)$ ，计算  $K_2$ ， $K_1$  值得：

$$K_1 = 4.51 \times 10^{-2}, K_2 = 9.53 \times 10^{-2}$$

由此可见,反应速率常数  $K_1$  和  $K_2$  属同一个数量级,且单糖降解速率略大于生成速率<sup>[57,59]</sup>。所以，单糖产率最高产率只能达到 24.8%。

最佳条件下的动力学方程为： $\eta = 0.8814 \times (e^{-0.00451t} - e^{-0.00953t})$

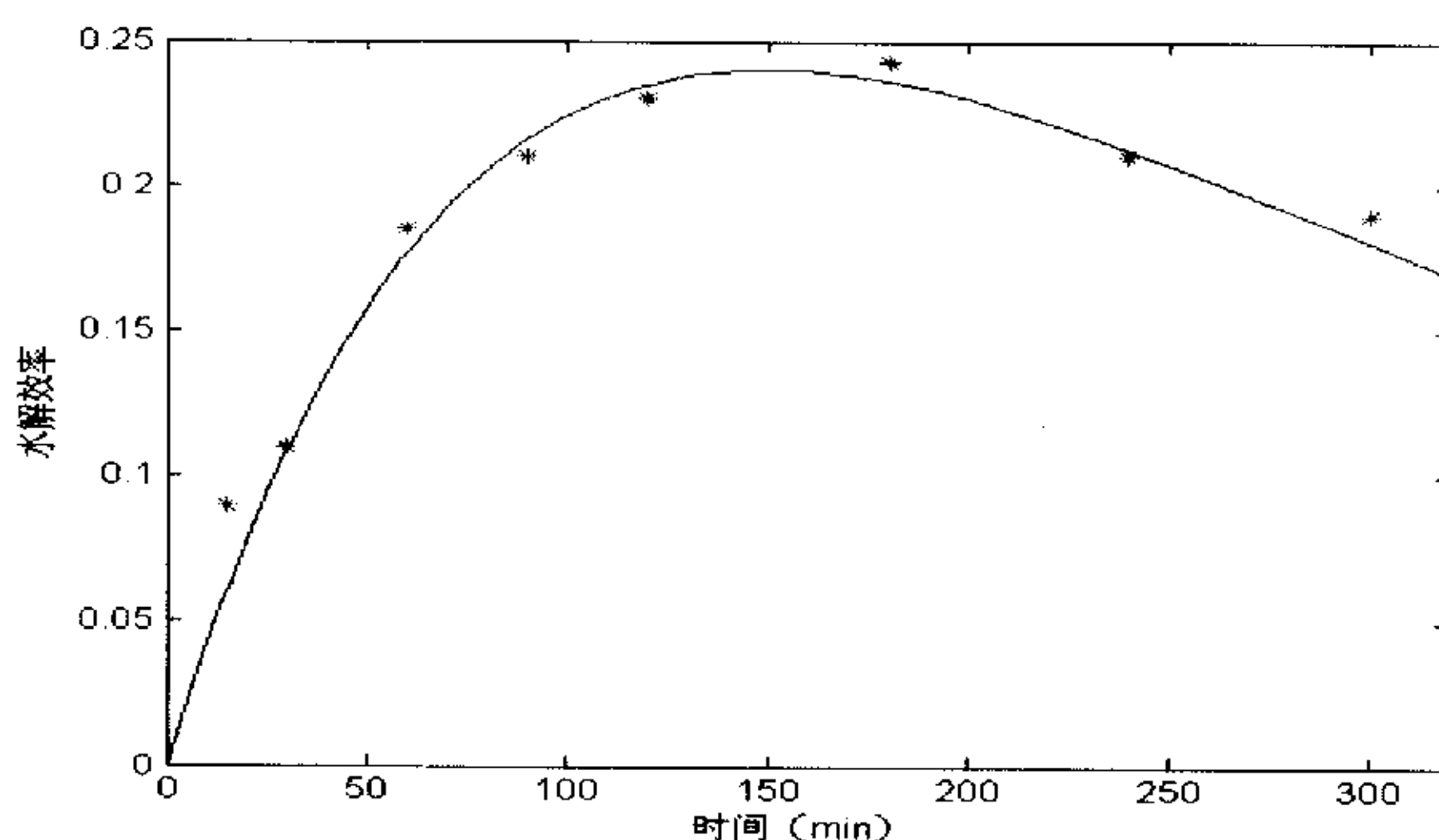


图 5-8 时间对水解效率的影响

### 5.3.6 不同材料水解效果的比较

表5-6 纤维原料主要成分表<sup>[18]</sup>

原料名称	半纤维素 (%)	纤维素 (%)	木质素 (%)	灰分 (%)
玉米芯	47	33	10.2	3.4
玉米秸秆	25.6	37.7	17.4	6.6
残棉	-	91.35	-	0.12

将玉米芯和玉米秸秆粉碎至20目，纺织厂废弃的残棉剪碎至大约1mm长，反应条件为浓度1%、温度100℃、粒度20~40目及5%固液比。玉米芯水解液的还原

糖量较多，水解效率高，是因为稀酸主要对原料中的半纤维素起作用，玉米芯中半纤维素含量较高，且玉米芯结构较疏松，酸较容易渗透。稀酸只能水解少量纤维素，残棉中的纤维素含量超过90%，因此转化率最低。

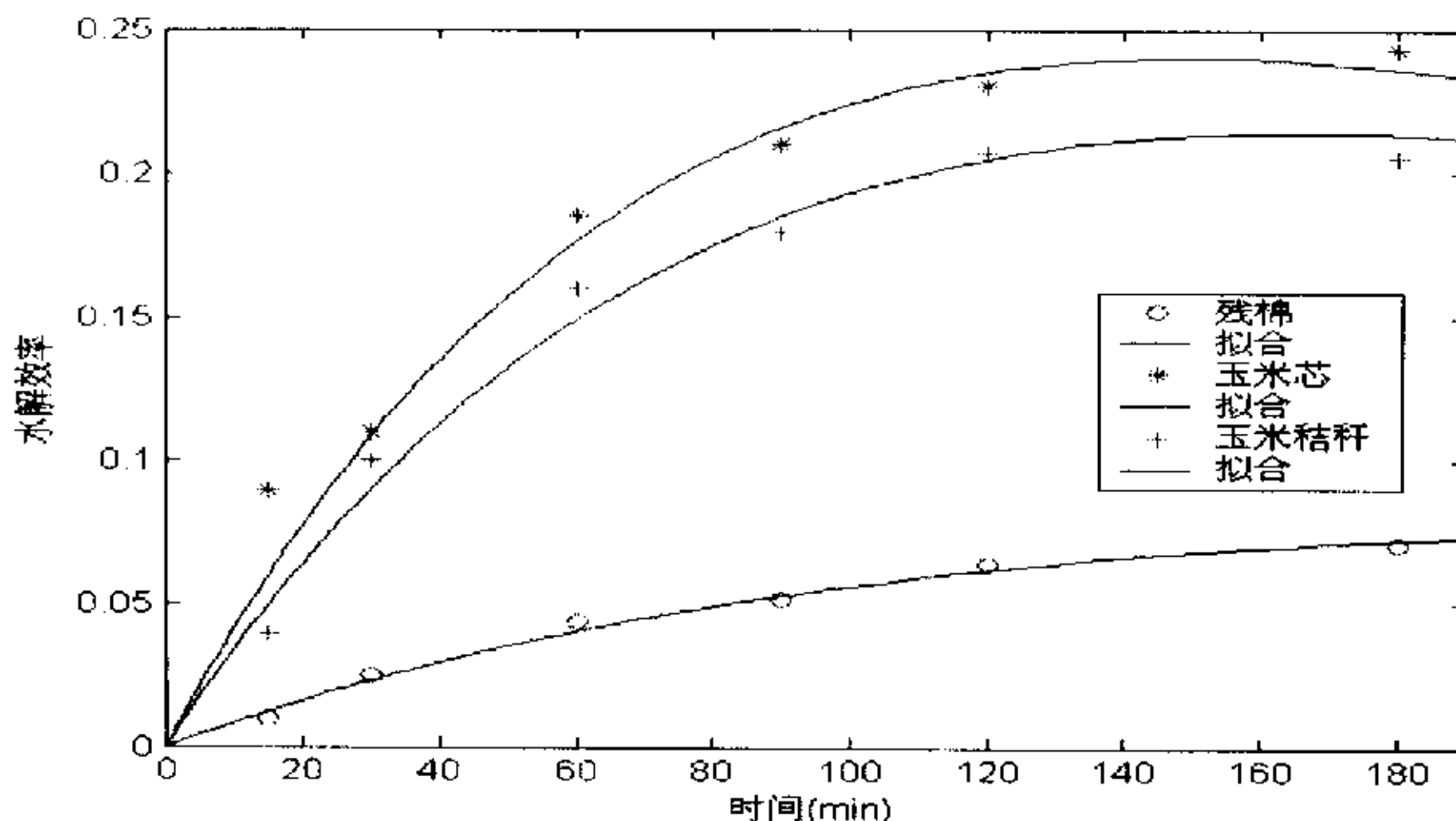


图 5-9 材料对水解效率的影响

#### 5.4 稀酸水解糖液成分分析

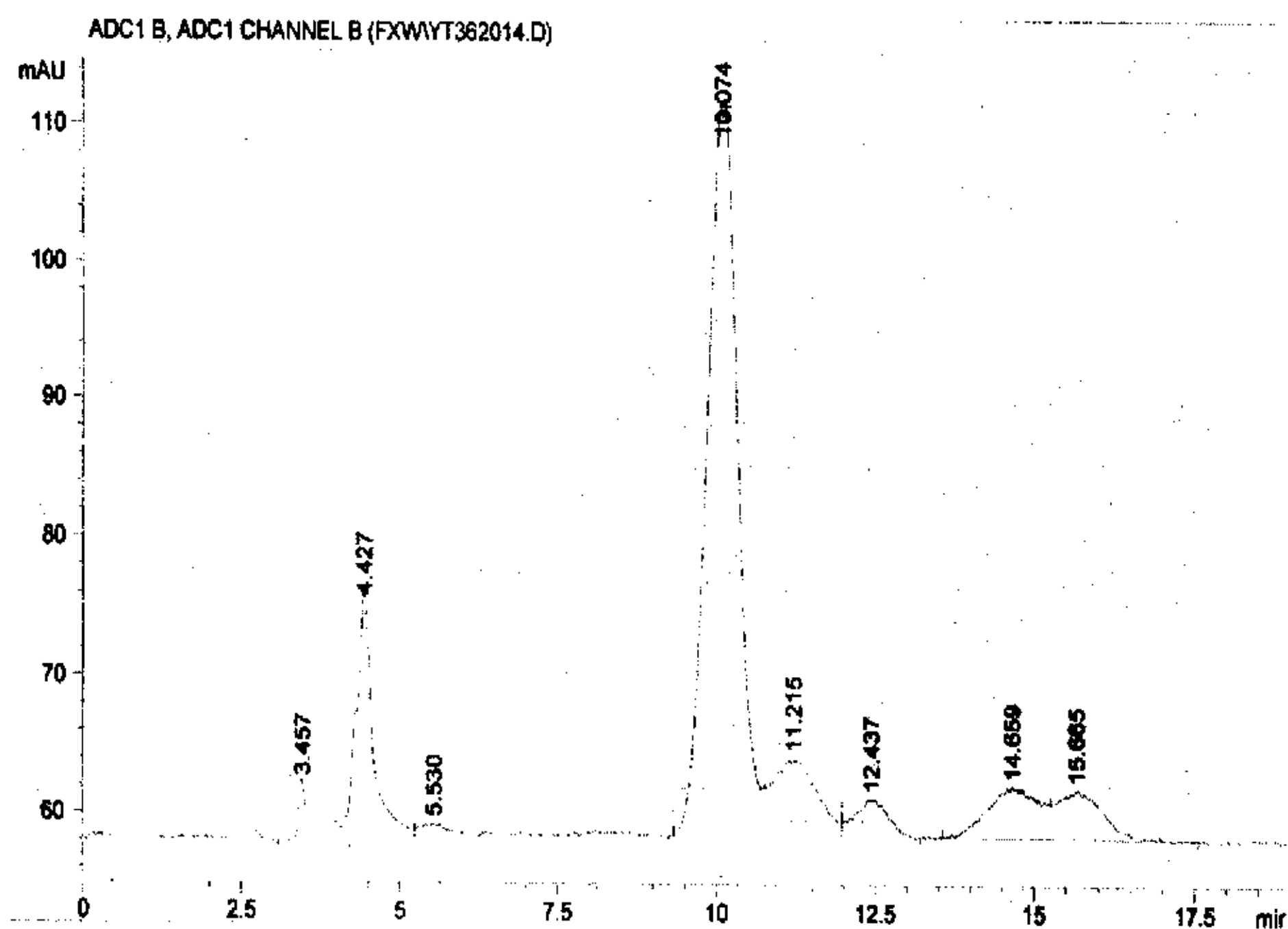


图 5-10 稀酸水解液高压液相色谱 (HPLC) 图

取玉米芯稀硫酸水解液，用高压液相色谱 (HPLC) 测定水解液中单糖成分及

其含量。稀酸水解液的主要成分为木糖（图中主峰），因为，利用稀酸水解玉米芯时，水解液中单糖主要来源于半纤维素的水解，半纤维素的主要成分是戊糖，根据原料的不同半纤维素中可含高达 85% 的木聚糖，所以水解液中含有大量木糖。稀酸只能水解少量的纤维素，纤维素水解产物主要为葡萄糖（木糖峰右侧小峰），木糖与葡萄糖之比约为 9:1。这与稀酸水解机理是符合的<sup>[60]</sup>。

## 5.5 小结

本实验尝试在常压下进行稀硫酸水解，可节省能源，对设备的要求也比高温高压水解要求低。并且水解效果较好，还原糖得率也较高。水解液中含有大量木糖，可提纯利用，玉米芯中的大部分半纤维素被去除，这对纤维素酶水解极为有利，水解渣洗涤至中性后可用作纤维素酶解材料。因此，纤维材料稀硫酸水解即可产糖，又可作为酶水解材料的预处理方法。

1. 影响玉米芯稀硫酸水解的主要因素是水解温度和硫酸浓度，在实验范围内，对于玉米芯，水解速率随温度和硫酸浓度的提高而提高，100℃时水解速度快，还原糖产率高；硫酸浓度为 3% 时水解效率最高，但增加硫酸浓度会增加生产成本，也会增加硫酸的回收利用负担，工业生产中大多采用浓度为 1% 的硫酸。

2. 底物浓度和颗粒尺寸对水解速度及单糖产率影响较小。60 目玉米芯的水解率最高，但原料粉碎至 60 目消耗的动力和能量大，会使成本升高。而经过粉碎，未经筛分的材料水解效率虽然略低，但省去筛分这道程序，既可节约人力及动力费用，还可充分利用原料，不会造成材料浪费。在底物浓度 5% 时，试验的水解率较高，高底物浓度可以降低酸的消耗，提高水解液中糖的浓度，应根据实际需要选择合适的条件。

5. 建立的动力学模型能较好地关联数据，实验数据与计算值拟合较好。

6. 在三种材料中，玉米芯的水解效率和糖产率最高。

7. 高压液相色谱（HPLC）测定水解液中单糖成分及其含量，木糖与葡萄糖含量之比约为 9:1。

## 第六章 酶水解

### 6.1 实验仪器设备及药品

#### 6.1.1 主要实验设备

序号	仪器名称	型号	生产商
1	pH 酸度计	PHB-4	上海晶科雷磁厂
2	高速台式离心机	TGL-16G	上海安亭科学仪器厂
3	回转式恒温调速摇瓶柜	YPW- I	上海通特电讯设备厂
4	循环水式多用真空泵	SHB-III A	河南省太康教材仪器厂
5	分析天平	FA1004N	上海精密科学仪器厂
6	可见光分光光度计	WFJ7200	尤尼柯（上海）仪器有限公司
7	多功能食品粉碎机	SL-250	上海帅菱电器有限公司

#### 6.1.2 实验药品

序号	试剂名称	级别	产地
1	3, 5-二硝基水杨酸	CP	中国医药集团上海化学试剂公司
2	酒石酸钾钠	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
3	无水亚硫酸钠	AR	浙江平湖化工试剂厂
4	氢氧化钠	AR	上海伊嘉利化工试剂有限公司
5	柠檬酸	AR	上海曹阳试剂厂
6	二水合柠檬醇三钠	AR	上海化学试剂有限公司
7	硫酸锰	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
8	硫酸亚铁	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
9	葡萄糖	AR	中国医药集团上海化学试剂公司

### 6.2 试剂的配制

#### (1) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液

柠檬酸和柠檬酸钠按摩尔比配制，分别配制 pH=4.4, 4.8, 6.2 的缓冲溶液，

并用酸度计校正，储于试剂瓶中备用。

## (2) 微量元素

精确称取 5mg 硫酸亚铁和硫酸锰，用约 50mL 蒸馏水溶液溶解，定容至 500mL，贮于棕色试剂瓶中备用。

## 6.3 实验方法

### 6.3.1 筛分

将玉米秸秆和玉米芯风干，粉碎至 20 目，将残棉剪碎至长约 1mm。

### 6.3.2 纤维素酶

纤柔酶 L (Cellusoft L) 和苏宏抛光酶 (Suhong Cellish L) 均由上海诺维信 (Novozymes) 公司提供，产品均含有 750EGU/g (Endo Glucanase Units) 的活力成分，其活性依据诺维信公司分析方法 (AF275)。Cellusoft L 是纤维素酶 (EC 4.2.1.4)，由木霉 (Trichoderma) 微生物经液体深层发酵而制成；而 Suhong Cellish L 是一种由非病原菌在水体中发酵而成的液体纤维素酶。

### 6.3.3 酶解方法

在 250mL 锥形瓶中加入一定质量的经粉碎的原料、10mL 一定 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液、一定体积 (0.01mg/mL) 的微量元素、10mL 酶液，置于恒温摇瓶柜中，温度恒定后，调至 150r/min 振荡，在给定温度下反应 48 小时后取出，迅速测定其还原糖含量。

### 6.3.4 还原糖的测定

样品中还原糖含量的测定采用 DNS 法，具体操作步骤参见第四章。

$$\text{水解效率} = \frac{a}{m \times (1 - \omega)} \times 100$$

a 为单糖质量，m 为纤维素和半纤维素含量， $\omega$  为含水率

## 6.4 结果及讨论

### 6.4.1 时间对纤维素酶降解作用的影响

纤维素酶水解过程变化非常复杂，纤维材料的成分和结构、酶组分和浓度、水解产物浓度等都随水解时间变化而变化，这些因素都会影响水解效率<sup>[61,62]</sup>。水解条件：0.1mL微量元素，pH=4.8，底物浓度60g/L，温度45℃（Cellusoft L）、55℃（Suhong Cellish L）。按一定时间间隔取样，迅速测定还原糖含量，得到如图1所示的水解效率-时间曲线。Cellusoft L的酶解曲线，在0~24小时之间还原糖含量迅速上升，而24~48小时之间上升较慢，48~72小时之间还原糖含量只有微量增加。因此，反应到48小时即可停止。从Suhong Cellish L的酶解曲线可看出，在0~24小时之间还原糖含量迅速上升，而24~48小时之间上升较慢，48~72小时之间还原糖含量也只有有微量增加。因此，反应到48小时即可停止。

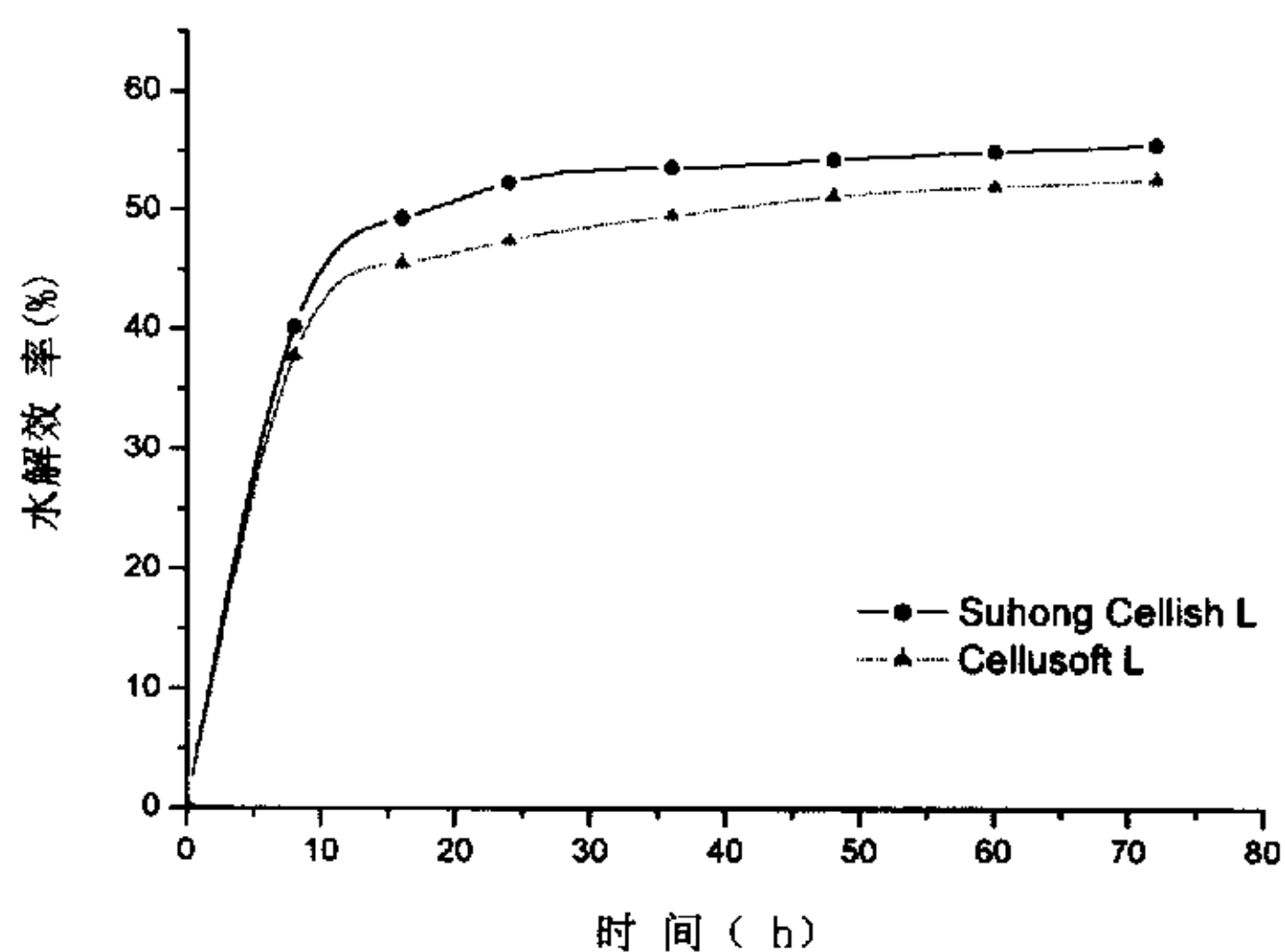


图6-1 时间对酶水解效率的影响

### 6.4.2 影响纤维素酶水解因素的正交实验

酶的作用主要依赖于反应系统中温度、pH、底物浓度和微量元素，考虑上述四因素对酶水解的影响，以酶解得率来评价酶解效果<sup>[63]</sup>。设计了4因素3水平正交实验，采用的酶为 Cellusoft L，每个实验重复两次。表 6-1 为正交实验因素水平表。

表6-1 正交实验因素水平表

水平	温度(°C)	pH值	微量元素 (mL)	底物浓度 (g/L)
1	45	4.4	不加	60
2	50	4.8	0.1	70
3	55	6.2	1	80

表6-2 Cellusoft L正交实验数据分析

试验号	温度 A	pH B	微量元素 C	底物浓度 D	水解效 率(x <sub>1</sub> )	水解效 率(x <sub>2</sub> )	小计 Ti
1	1	1	1	1	46.3	46.9	91.2
2	1	2	2	2	50.0	50.6	100.6
3	1	3	3	3	44.5	46.1	89.6
4	2	1	2	3	40.6	40.2	80.8
5	2	2	3	1	46.0	46.3	88.0
6	2	3	1	2	40.7	39.8	80.5
7	3	1	3	2	30.7	31.2	62.0
8	3	2	1	3	34.9	36.4	70.3
9	3	3	2	1	32.9	32.3	66.2
K <sub>1</sub>	94.8	78.0	80.7	82.2			
K <sub>2</sub>	84.9	87.1	82.2	81.0			
K <sub>3</sub>	66.8	78.4	80.6	80.2			
极差 R	28.0	9.1	1.6	2.0			
方差 S	604.1	79.4	1.0	2.0			

正交实验结果如表 6-2 所示。从方差分析表 6-3可以看出，温度影响很大，pH值影响也较大。微量元素及底物浓度影响较小。直观看序号为2的实验酶解得率最高，其工艺条件为A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>，即pH4.8，温度45℃，微量元素0.1ml，底物浓度60g/L，酶解得率50.3%。

表6-3 方差分析

来源	S	自由度	平均平方	F值	显著性
A	604.1	2	302.1	1314.3	**
B	79.4	2	39.7	172.6	**
C	1.0	2	0.5	2.17	
D	2.0	2	1.0	4.35	*
误差	4.06	18	0.23		

$$F_{0.05}(2, 18)=4.55, F_{0.01}(2, 18)=6.01$$

关于温度对酶催化反应的影响问题，由于其复杂性，实际上至今还没有真正解决<sup>[64]</sup>。但无用置疑，温度是影响酶解反应的重要因素之一。一般而言，温度主要影响酶的稳定性、酶蛋白的热变性、酶和底物的结合，影响酶和抑制剂、激活剂或辅酶的结合，影响反应系统内各种平衡<sup>[41,65]</sup>。所以酶解反应对温度有严格的限制，各种酶都有最适宜的生长温度及生长温度的上限和下限。相对而言，酶对高温的敏感性比对低温的敏感性表现更为明显；随着温度的升高，酶可能遭受不可逆破坏。此外我们还注意到，温度不但影响反应动力学，而且也影响热力学平衡。因此，就某一酶催化反应而言，只有通过实验才能确定最适宜温度。固定pH4.8、微量0.1mL及底物60g/L三因素，改变温度(50℃, 55℃)进行水解试验，结果为：50℃及55℃时酶解得率分别为46.6%，36.4%。由此可见，温度越高Cellusoft L的酶解得率越低，这是因为每一种酶均有其最佳温度。纤维素酶的最适温度不是特征物理常数，并非一成不变，反应的pH值、水解时间及底物浓度等涉及酶稳定性的因素都可能影响最佳反应温度的变化。

纤维素酶的化学本质是一种蛋白质，它在水解体系中的解离状态和行为都受到pH的影响。pH对酶水解速度有明显的影响，且影响机理很复杂。pH对纤维素酶水解的影响主要是影响酶与底物的吸附平衡常数和亲和力，表现为两方面<sup>[67]</sup>：一、pH的变化影响纤维素酶的带电状态，直接影响酶的活化和酶与底物的亲和力。纤维素酶分子的表面极性基团随pH变化而发生不同程度的解离，改变了酶活性部位的原有构象，影响酶与底物的结合以及酶的催化能力，从而导致水解速度的变化。二，影响纤维素酶的稳定性，从而影响酶与底物分子的结合与分离，影响到酶与



底物的吸附平衡常数<sup>[68]</sup>。酶解反应最适宜的pH值与酶最稳定的pH值不一定相同；前者与反应温度、底物浓度和其他反应条件有关，由具体的实验来确定。本实验温度为45℃，pH值在4.4~6.2之间变化，最适pH值为4.8。

酶的成本占纤维素酶解过程总成本的一半以上，所以应精心选择酶与底物的用量，以求达到较高的投入产出比。本实验仅改变底物浓度，进行酶解反应，60g/L时酶解转化率高。减少底物用量，理论上可以使更多的纤维素水解，从而提高酶解产率，但会增加成本，实际应用中应根据具体情况选择合适的比例。

微量元素对酶解得率的影响较小，实际应用中可根据具体情况选择是否添加。

### 6.4.3 两种酶水解性能的比较

表6-4Suhong Cellish L正交实验数据分析

试验号	温度 A	pH B	微量元 素 C	底物浓 度 D	水解效 率(x <sub>1</sub> )	水解效 率(x <sub>2</sub> )	小计 Ti
1	1	1	1	1	46.0	46.7	90.7
2	1	2	2	2	47.9	46.1	94
3	1	3	3	3	46.1	46.9	92
4	2	1	2	3	47.0	46.6	94.6
5	2	2	3	1	48.7	48.1	96.8
6	2	3	1	2	48	47.4	96.4
7	3	1	3	2	50.6	49.6	100.2
8	3	2	1	3	52.3	51.0	104.3
9	3	3	2	1	52.3	54.5	106.8
K <sub>1</sub>	92.2	94.9	96.5	97.8			
K <sub>2</sub>	96.3	98.1	97.8	96.5			
K <sub>3</sub>	104.1	97.7	96.4	96.3			
极差 R	7.8	4.19	1.46	1.47			
方差 S	94.8	9.2	2.0	1.9			

设计与上述正交实验相同的因素和水平，采用苏宏抛光酶进行实验，得出最

佳工艺条件为：温度55℃，pH值4.8，微量元素0.1，底物浓度60g/L，且温度对水解效率的影响最大，其最高转化率为54.85%，比纤柔酶 L的水解效率约高3%。由此可见，不同酶水解的最适条件并不相同。实际应用中要根据不同的酶，采用相应的反应条件。

表6-5 Suhong Cellish L方差分析

来源	S	自由度	平均平方	F值	显著性
A	94.8	2	46.9	204.9	**
B	9.2	2	4.6	20	**
C	2.0	2	1.0	4.2	*
D	1.9	2	0.95	4.1	*
误差	4.3	18	0.24		

$$F_{0.05}(2, 18)=4.55, F_{0.01}(2, 18)=6.01$$

#### 6.4.4 不同材料水解效果的比较

表 6-6 不同材料水解效果的比较

材料	Cellusoft L酶解 得率 (%)	Suhong Cellish L 酶解得率 (%)
玉米秸秆	51.9	48.3
玉米芯	57.7	53.3
残棉	41.5	39.2

将玉米芯和玉米秸秆粉碎至20目，纺织厂废弃的残棉剪碎至大约1mm长，在45℃、pH4.8、微量元素0.1mL及底物浓度60g/L条件下进行水解反应。残棉的还原糖量较少，是因为残棉中的纤维素含量超过90%，纤维素结晶度高；并且，残棉经过纺织厂纺纱等工艺后，结构致密，酶难以附着，所以，降解率不高。玉米芯中纤维素和半纤维素总含量超过秸秆，且结构较疏松，因此，水解效率比较高<sup>[70]</sup>。

#### 6.4.5 底物浓度对酶水解的影响

随着底物浓度增加，酶解得率呈下降趋势。尤其是当底物浓度超过60%以后。

酶解得率下降更加明显。酶和底物的作用是通过酶与底物生成复合物而进行的，当底物浓度较低时，相当于酶过量。底物的量不足以结合所有的酶，换句话说，底物最大程度地被酶解，因此酶解得率较高；当底物浓度较高时，相当于底物过量，底物过量部分不能被酶附着<sup>[69]</sup>。同时，底物过量会增加酶解反应的不均匀性，不利于酶和底物进行充分接触，最终影响酶解得率。酶的成本占纤维素酶解过程总成本的一半以上，所以应精心选择酶与底物的质量比，以求达到较高的投入产出比。

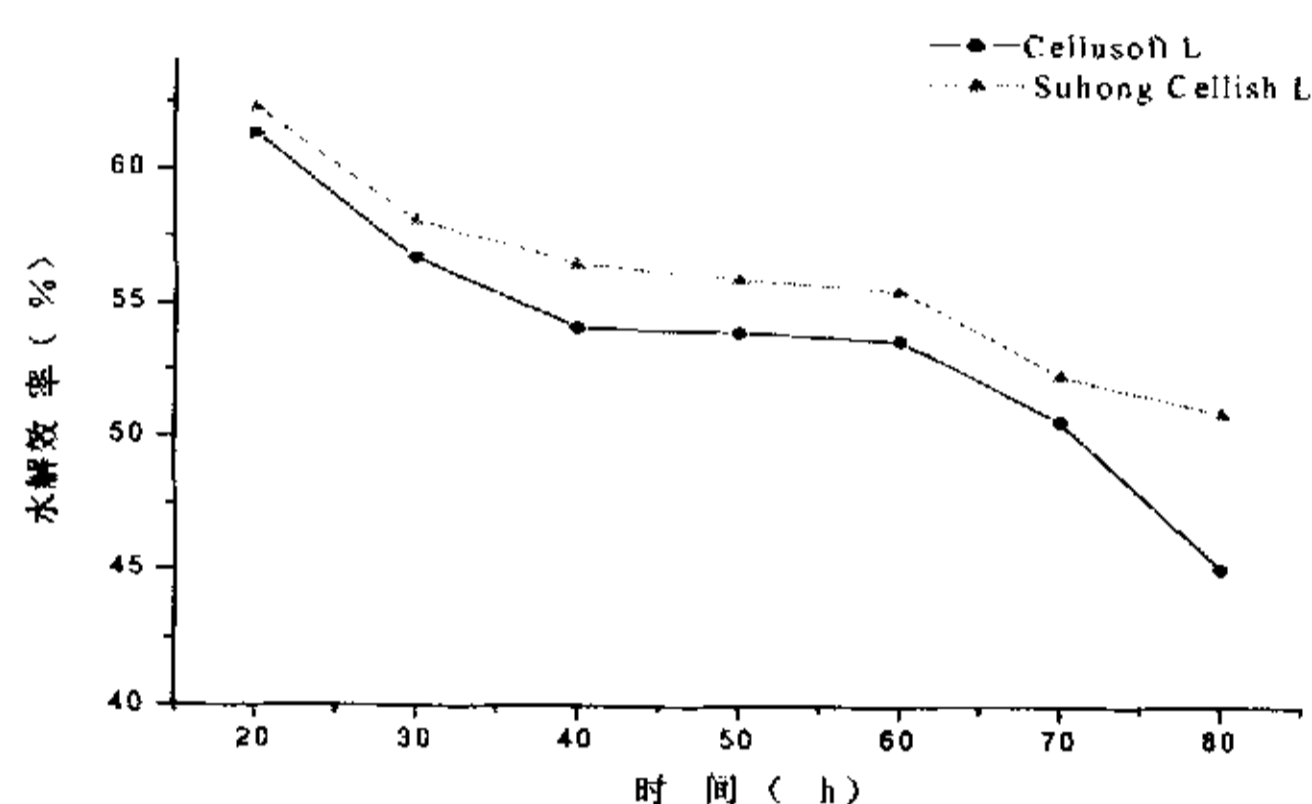


图6-2 底物浓度对Cellusoft L酶解的影响

本实验仅改变底物浓度，进行酶解反应。降低底物浓度用量，理论上可以使更多的纤维素水解，从而可以提高酶解产率，但酶解液中还原糖浓度低，为提高后续发酵利用的效率，通常希望增加酶解液中还原糖的浓度。由图看出，二者并非简单的线性关系。底物浓度高于30%时，酶解产率低近十个百分点；40g/L~60g/L时水解效率变化较小，高于60g/L时，水解效率明显下降，所以底物用量不宜太高。当然，底物浓度过低，相当于水解同样质量底物酶用量增加，从经济上说也是不合算的。所以相比而言，底物浓度采用60g/L较为适宜。

## 6.5 酶水解糖液成分分析

取玉米秸秆纤维素酶水解液，用高压液相色谱（HPLC）测定水解液中单糖成分及其含量。酶水解液的主要成分为葡萄糖（图中主峰），因为，利用纤维素酶水解玉米秸秆时，水解液中单糖主要来源于纤维素的水解，纤维素的主要由葡萄糖

聚合而成，所以水解产物大多为葡萄糖。但是 Cellusoft L 和 Suhong Cellish L 都是工业用纤维素酶，其中往往混有半纤维素酶，水解产物也含有相当多的木糖（葡萄糖峰左侧小峰），葡萄糖与木糖之比约为 5:2。这与纤维素酶水解机理是符合的。

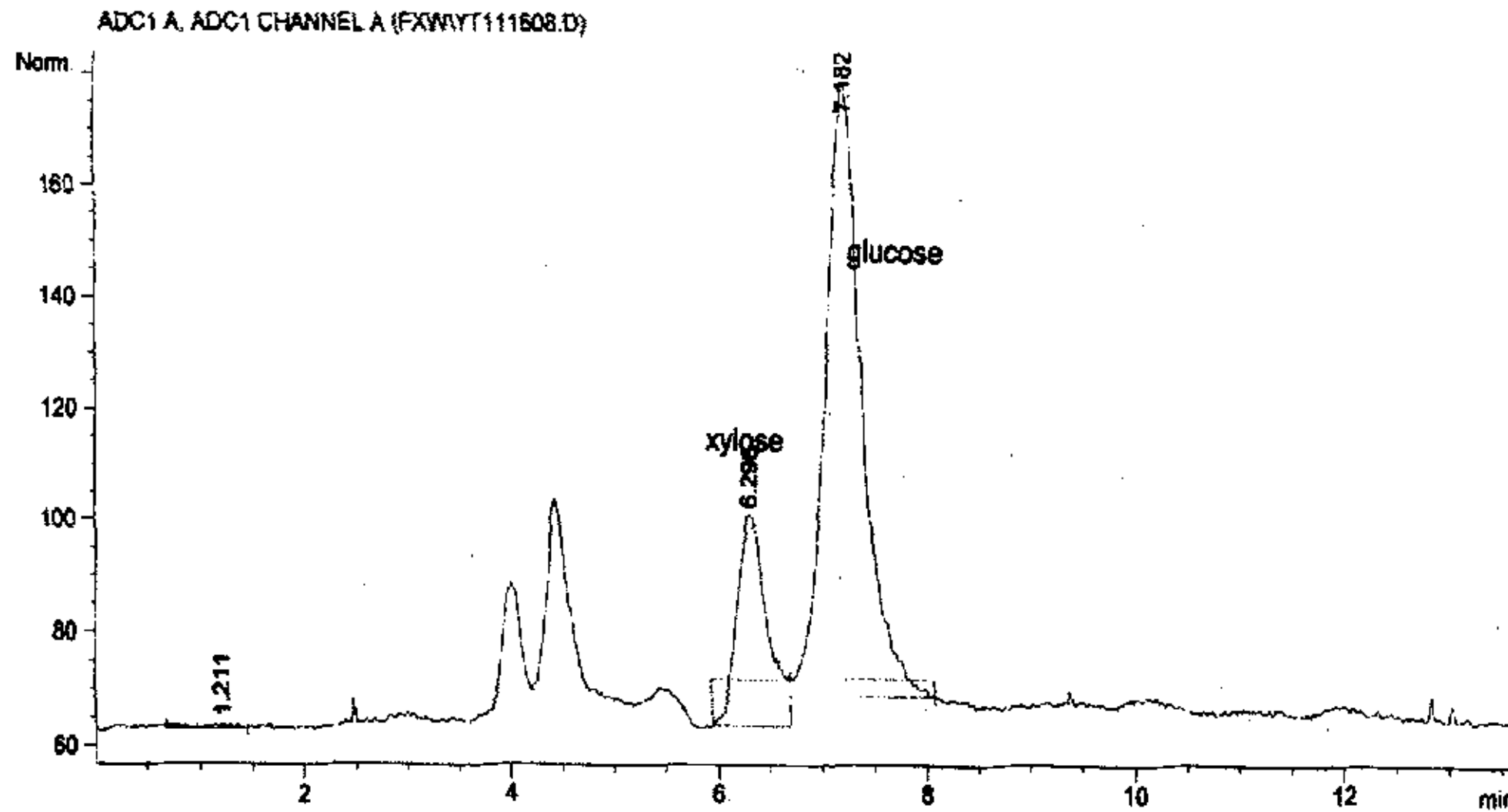


图6-3 秸秆酶解液高压液相色谱（HPLC）图

## 6.6 小结

使用的两种纤维素酶均为纺织工业中用于棉麻织物抛光的制剂，在本实验中将其用于废弃纤维材料的生物降解也取得良好效果，并且，该酶在24小时内的反应速率较高。通过本实验得到以下结论：

1. 玉米秸秆降解到48h时反应可以停止。
2. 温度的影响最明显，纤柔酶的最适反应温度为45℃，苏宏抛光酶的最佳酶解温度为55℃。
3. 酶降解玉米秸秆的最适pH值约为4.8。
4. 微量的金属离子 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 能促进酶的降解，而过多的金属离子则不利于纤维素的降解。
5. 当底物浓度过高或过低时，都不利于酶和底物进行充分接触，最终影响酶解得率。当底物浓度60g/L时，酶解率较高。
6. 同样反应条件下，玉米芯的转化率较高。
7. 酶水解糖液成分分析，葡萄糖与木糖之比约为5:2。

## 第七章 水解液发酵制乳酸

### 7.1 材料

玉米秸秆和玉米芯均取自河北邯郸，干燥粉碎后备用。

纤维素酶：由里氏木霉固体发酵而成。苏宏抛光酶（Suhong Cellish L）由上海诺维信（Novozymes）公司提供，产品含有750EGU/g（Endo Glucanase Units）的活力成分，其活性依据诺维信公司分析方法（AF275）。

米根霉(3.819, 中科院微生物研究所), 菌种保存在PDA培养基上, 每二个月转接一次。

米根霉菌丝培养基:葡萄糖13%; 尿素0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%<sup>[71]</sup>。

米根霉发酵培养基: 葡萄糖量随实验条件而定, 尿素加量为0.1%; 因粗纤维素酶中含有氮源故用于米根霉发酵的曲解液发酵的培养基中不再加氮源, 其他营养组分添加量同菌丝培养基。

### 7.2 实验方法

米根霉菌丝培养: 灭菌后的培养基接入米根霉种子, 在33℃, 180r/min的条件下在恒温振荡器中进行培养, 约30小时后接入发酵培养基。

水解液乳酸发酵: 水解滤液按乳酸发酵培养基加入发酵所需营养组分后灭菌, 接入在菌丝培养基中预培养好的米根霉菌丝, 在33℃, 180r/min转速的恒温振荡器中进行L-乳酸发酵<sup>[72]</sup>, 定时取样测定发酵液pH值、还原糖和乳酸量, 发酵液pH值通过加入经灭菌的碳酸钙控制。

乳酸糖转化率计算方法如下:

$$\text{乳酸糖转化率}(\%) = \frac{\text{乳酸量}}{\text{还原糖量}} \times 100\%$$

### 7.3 分析方法

还原糖采用3, 5—二硝基水杨酸比色法测定。

L-乳酸采用EDTA定钙法测定。

### 7.4 结果与讨论

#### 7.4.1 玉米粉的 L-乳酸发酵

称取10g玉米粉, 加入蒸馏水配成100mL发酵培养基, 121℃灭菌20min, 冷却

后，接入在菌丝培养基中预培养好的米根霉菌丝及单独灭菌的 $G_aCO_3$ ，在 $33^\circ C$ ， $180r/min$ 转速的恒温摇瓶柜中进行L-乳酸发酵，定时取样测定发酵液pH值、还原糖和乳酸量，发酵液pH值通过加入经灭菌的碳酸钙控制<sup>[71]</sup>。由于玉米粉中已含有一定氮源，因此不需添加其它营养盐即可发酵。米根霉对玉米粉发酵液有一个适应过程，所以，发酵初始阶段乳酸的产生速率较低。随后，乳酸的产量明显提高，受菌种等条件限制，反应终止时（72小时）乳酸浓度仅为 $34.6g/L$ 。

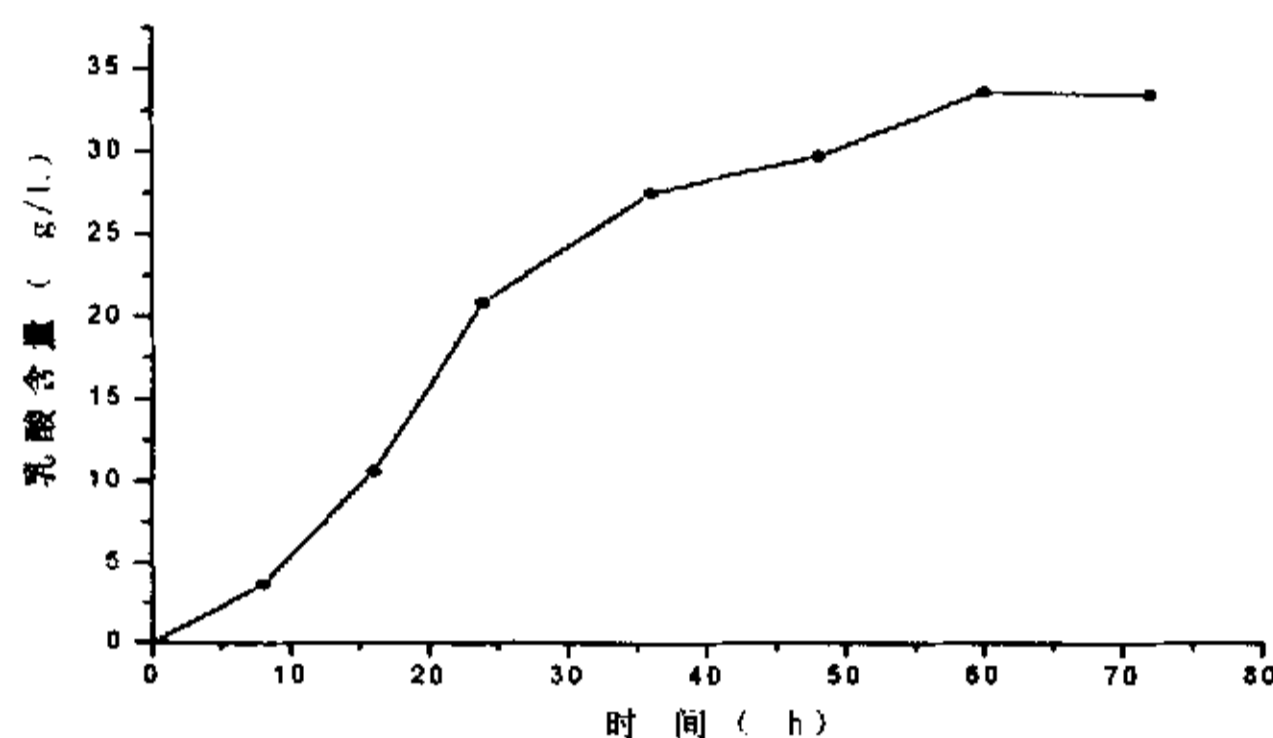


图7-1 玉米粉乳酸发酵

#### 7.4.2 玉米芯稀酸水解液的乳酸发酵

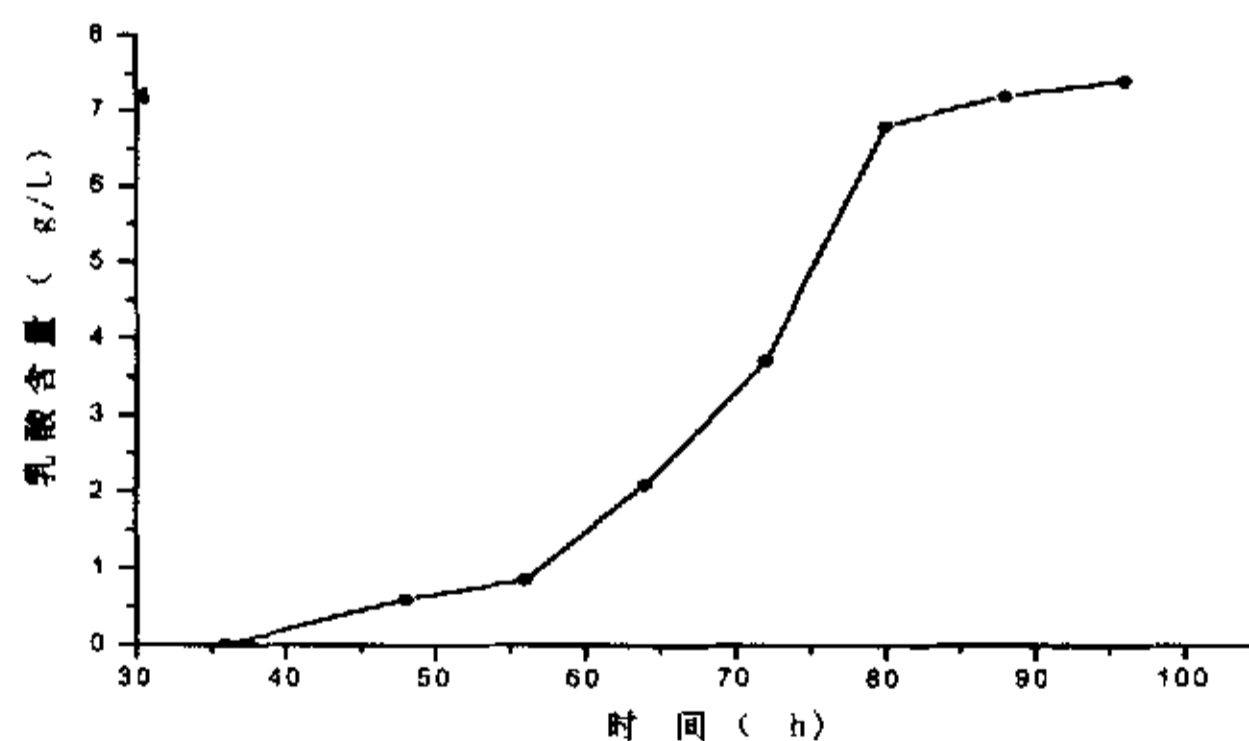


图7-2 玉米芯稀酸水解液乳酸发酵

玉米芯稀酸水解滤液按乳酸发酵培养基加入发酵所需营养组分后灭菌，接入在菌丝培养基中预培养好的米根霉菌丝，在 $33^\circ C$ ， $180r/min$ 转速的恒温振荡器中进行L-乳酸发酵<sup>[73]</sup>，定时取样测定发酵液pH值、还原糖和乳酸量，发酵液pH值通过

加入经灭菌的碳酸钙控制。发现米根霉对稀酸水解液的适应时间将近48小时，原因是：一、玉米芯稀酸水解滤液的还原糖浓度较低，约10 g/L（未经浓缩），低浓度的营养源对米根霉发酵不利；二、水解液中90%以上为木糖，10%为葡萄糖，米根霉可直接利用葡萄糖，但是对木糖的利用速度较慢，48小时发酵液才有酸味溢出，经测定只有0.6 g/L的乳酸。在56~80小时，乳酸对糖的转化率明显提高，达到69.3%。但由于发酵时间长，且正值夏天，温度较高，反应进行到96小时常常感染杂菌，反应终止。

#### 7.4.3 秸秆酶解液乳酸发酵

秸秆酶解液加入发酵所需营养组分后灭菌，接入在菌丝培养基中预培养好的米根霉菌丝<sup>[74,75]</sup>，在33℃，180r/min转速的恒温振荡器中进行L-乳酸发酵，定时取样测定发酵液pH值、还原糖和乳酸量，发酵液pH值通过加入经灭菌的碳酸钙控制。酶解液经高温灭菌后较粘稠，传质较困难，在第二天才开始产乳酸。

#### 7.5 小结

由于时间有限，没有对水解液的乳酸发酵进行深入的研究，只做了一些探索性工作。

1. 采用米根霉3.819进行玉米粉的乳酸发酵，乳酸含量为34.6 g/L。
2. 玉米芯稀酸水解滤液的发酵速度慢，乳酸含量为7.4 g/L。
3. 秸秆酶解液较粘稠，传质慢，在第二天才开始产乳酸。

## 第八章 结论

本文以资源综合利用为目的，对植物纤维废弃物中的玉米秸秆、玉米芯及纺织厂残棉的水解进行了研究，水解方式包括浓硫酸水解、稀硫酸水解、纤维素酶水解；并对水解液的乳酸发酵进行了初步探索。

1. 研究了纤维材料的浓硫酸水解，不同温度、硫酸浓度、原料粒度、底物浓度对水解都有一定程度的影响。通过实验发现，对于玉米秸秆，影响玉米秸秆浓硫酸水解的主要因素是硫酸浓度和水解温度，水解速率随温度提高而提高，但是还原糖的降解率也随之增大，还原糖产率在50℃时几乎达到80%。水解速率随硫酸浓度提高而提高，还原糖产率在硫酸浓度70%时单糖产率最高。底物浓度和颗粒尺寸对水解速度及还原糖产率影响较小。建立的动力学模型能较好地关联数据。在50℃，70%硫酸、5%底物浓度及20~40目粒度，水解速率和还原糖产率两项指标都较高。

2. 在常压条件下研究了纤维材料的稀硫酸水解。研究表明，水解速率随温度提高而提高，100℃时水解效率达到最高；水解速率随硫酸浓度提高而提高，当硫酸浓度是1%时，不但水解速率快，而且最大转率较高；60目玉米芯的水解率最高，但原料粉碎至60目消耗的动力和能量大，会使成本升高。经过粉碎，未经筛分的材料水解效率为22.9%，虽然得率略低，但省去筛分这道程序，既可节约人力及动力费用，还可充分利用原料，不会造成材料浪费，在生产中很适用；在100℃，1%硫酸、5%底物浓度及20~40目粒度，水解速率较高在底物浓度。建立的动力学模型能较好地关联数据。将玉米芯和残棉在上述条件下进行反应，玉米芯的水解效率及还原糖含量都较高，其次为玉米秸秆。水解液中单糖成分分析显示，木糖与葡萄糖含量之比约为9:1。

3. 使用Cellusoft L和Suhong Cellish L进行纤维素酶水解研究，这两种纤维素酶均为纺织工业中用于棉麻织物抛光的制剂，在本实验中将其用于废弃纤维材料的生物降解也取得良好效果。通过本实验得出：玉米秸秆降解到48h时反应可以停止；温度的影响最明显，纤柔酶的最适反应温度为45℃，苏宏抛光酶的最佳酶解温度为55℃；pH对酶解效率的影响也较大，酶降解玉米秸秆的最适pH值约为4.8；微量的金属离子 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 能促进酶的降解，而过多的金属离子则不利于纤维素的降



解。当底物浓度过高或过低时，都不利于酶和底物进行充分接触，最终影响酶解得率。当底物浓度60g/L时，酶解率较高。同样反应条件下，玉米芯的转化率较高。酶水解糖液成分分析显示，葡萄糖与木糖之比约为5:2。

4.采用米根霉对水解液的乳酸发酵进行初步研究。稀酸水解液中木糖含量超过90%，米根霉利用木糖较慢，第三天开始产酸。米根霉对酶水解液的适应时间也较长。

5.浓酸水解糖产率高，但酸消耗大，酸回收困难，需大量钙盐中和，易造成资源浪费和新的废弃物，只有当有效解决酸回收问题后才有实用价值；稀酸水解虽然得率较低，但含有大量木糖，可生产木糖、木糖醇、酒精等，水解残渣还可用于酶解发酵，与酶水解联合使用有推广价值；酶水解产葡萄糖较多，大量发酵菌株可直接利用葡萄糖发酵，对发酵生产乳酸、酒精等极为有利，酶水解对环境污染相对较小，有很大的实用价值。

## 参考文献

- 1.庄馥萃.植物纤维和纤维植物.生物学通报.2001, 36 (11): 16~18
- 2.叶克林, 陈广琪, 于文吉.国内外城市废弃植物纤维材料的利用.世界林业研究.1996 (2)
- 3.勇强.植物纤维资源高效生物利用.林业科技开发.2002, 16 (3): 6~9
- 4.陈彪, 叶红等.植物纤维资源的利用.化工时刊.1999 (8)
- 5.陈庆云, 王云海.农作物秸秆综合利用新技术.再生资源研究, 2002 (2)
- 6.余燕春.利用农林纤维废弃物生产酒精的社会经济效益.1998 (6)
7. Ballerini D, Desmarquest JP, PourquieÂ J, Nativel F, Rebeller M.Ethanol production from lignocellulosics: large scale experimentation and economics. Biores. Technol. 1994,50: 17~23
- 8.王体科.世界植物纤维水解概况.世界林业研究.1993(6):91~97
- 9.秦玉楠.木糖的生产工艺及其效益.精细化工, 1992 (9)
- 10.Blanch HW, Wilke CR. Sugars and chemicals from cellulose. Rev. Chem. Eng. 1983,1: 72~119
- 11.Saska M, Ozer E .Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. Biotechnol. Bio-eng. 1995,45: 517~523
- 12.王璃明, 关凤掸, 马霞, 张继泉, 贾士儒, 玉米秸秆水解与木糖酒精发酵的初步研究, 酿酒, 2002 (1) 25~27
- 13.San MartõAn R, PeÁrez C, Briones R . Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. Biores. Technol. 1995,53: 217~223
- 14.Riera FA, A Á lvarez R, Coca J. Production of furfural by acid hydrolysis of corncobs. J. Chem. Technol. Biotechnol. 1991,50: 149~155
- 15.Root DF, Saeman JF, Harris JF.Chemical conversion of wood residues. Part II: Kinetics of the acid-catalyzed conversion of xylose to furfural. Forest Prod. J. 1959),9: 158~165
- 16.钱志良, 胡军等.乳酸的工业化生产、应用和市场.工业微生物.2001 (6)

17. Chen, R.; Lee, Y.Y.: Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997, 65:435~448
18. 江苏省轻化工业厅纤维水解研究所. 植物纤维水解生产. 燃料化学工业出版社. 1974
19. 高洁 汤烈贵. 纤维素科学. 科学出版社. 1996, 183~189
20. Parajo JC, Alonso JL, Vázquez D. On the behaviour of lignin and hemicelluloses during the Acetosolv processing of wood. *Biores. Technol.* 1993, 46: 233~240
21. 陈育如, 夏黎明, 吴棉斌, 岑沛霖, 植物纤维素原料预处理基础的研究进展. *化工进展*, 1999 (4) 24-26
22. 欧阳平凯, 韩祖国. 木质纤维素物质水解新技术及应用. *化工进展*. 1992 (1)
23. Tewari HK, Singh L, Marwaha SS, Kennedy JF Role of pretreatments on enzymatic hydrolysis of agricultural residues for reducing sugar production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1987
24. Aoyama M, Seki K, Saito N . Solubilization of bamboo grass xylan by steaming treatment. *Holzforschung.* 1995, 49: 193~196
25. Aoyama M . Steaming treatment of bamboo grass. II. Characterization of solubilized hemicellulose and enzymatic digestibility of water-extracted residue. *Cellulose Chem. Technol.* 1996, 30: 385~393
26. Biermann CJ, Schultz TP, McGinnis GD. Rapid steam hydrolysis/extraction of mixed hardwoods as a biomass pretreatment. *J. Wood Chem. Technol.* 1984, 4: 111~128
27. Lamptey J, Robinson CW, Moo-Young M. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass pretreated by low-pressure steam autohydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 1985, 7: 531~536
28. Bonn G, Concina R, Bobleter O. Hydrothermolysis—a new process for the utilization of biomass. *Wood Sci. Technol.* 1983, 17: 195~202
29. Kubikova J, Zemann A, Krkoska P, Bobleter O . Hydro-thermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper. *TAPPI J.* 1996, 79: 163~169
30. Torget R, Tsu TA. Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan

- using a percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994,45/46: 5~22
31. Učár G. Pretreatment of poplar by acid and alkali for enzymatic hydrolysis. *Wood Sci. Technol.* 1990,24: 171~180
32. Bjerre AB, Olesen AB, Fernqvist T, Plo Eger A, Schmidt AS. Pretreatment of rice straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose. *Biotech. Bioeng.* 1996,49 : 568~577
33. Martínez JM, Granado JM, Montañe D, Salvado J, Farriol X. Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: application to almond shells. *Biores. Technol.* 1995,52: 59~67
34. Patel MM, Bhatt RM. Optimisation of the alkaline peroxide pretreatment for the delignification of wheat straw and its applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1992,53: 253~263
35. Playne MJ. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 1984,26: 426~433
36. Dekker RFH, Wallis AFA. Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls. *Biotech. Lett.* 1983, 5: 311~316
37. Grethlein HE, Converse AO. Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Biores. Technol.* 1991,36: 77~82
38. Grouss WR, Converse AO, Grethlein HE. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 1986, 8: 274~280
39. Schultz TP, Biermann CJ, McGinnins GD. Steam explosion of mixed hardwoods chips as a biomass pretreatment. *Ind. Eng. Prod. Res. Dev.* 1983,22: 344~348
40. David C, Fornasier R, Lejong W, Vanlaetern N. Pretreatment of Eucalyptus wood with sodium hypochlorite and enzymatic hydrolysis by cellulases of *Trichoderma viride*. *J. Appl. Polym. Sci.* 1988,36: 29~41
41. 周文龙. 酶在纺织中的应用. 中国纺织出版社. 2002 (6)
42. 苏茂尧, 张力田. 纤维素的酶水解糖化. 纤维素科学与技术, 1995 (3)
43. 欧阳平凯, 陈 芜, 陈育如, 木质纤维素原料浓酸水解的动力学研究林产化学

- 与工业。1993 (1) 77~82
44. Bhandari MM, MacDonald DG, Bakshi NN (1984) Kinetic studies of corn stover saccharification using sulphuric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 320~327
45. Conner AH (1984) Kinetic modeling of hardwood prehydrolysis. Part I: Xylan removal by water prehydrolysis. *Wood Fiber Sci.* 16: 268~277
46. Grant GA, Han YW, Anderson AW, Frey KL (1977) Kinetics of straw hydrolysis. *Dev. Ind. Microbiol.* no 18 pp. 599~611
47. Ranganathan S, McDonald DG, Bakshi NN (1985) Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid. *Can. J. Chem. Eng.* 63: 840~844
48. 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术. 中国轻工业出版社. 1999: 168~169
49. 冯吉, 朱杰, 吴新硕, 改良 DNS 法测定新鲜果蔬中的糖分. *浙江农业大学学报*, 1989 (15)
50. 周利均, 周淑平, 韩峰. DNS 比色法测定烟草中的糖分含量. *贵州农业科学*. 1997: 25 (6): 41-43
51. Fan TL, Gharpuray MM, Lee YH . *Cellulose hydrolysis*. Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1987
52. Rijkens BA. Hydrolysis process for lignocellulosic materials. CECD Workshop Cellulose Programme. Braunschweig, Germany . 1984
53. AngleÁS MN, Reguant J, MartóÁnez JM, Farriol X, MontaneÁ D, SalvadoÁ J . Influence of the ash fraction on the mass balanceduring the summative analysis of high-ash content lignocellulose. *Biores. Technol.* 1997, 59: 185~193
54. Brennan AH, Hoagland W, Schell DJ High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor: results of low solids testing. *Biotech. Bioeng. Symp.* 1986, 17: 53~70
55. Harris JF, Baker AJ, Zerbe JJ . Two-stage, dilute acid hydrolysis of hardwood for ethanol production. In: *Energy from biomass and wastes VIII: Symp. Papers* pp. 1984, 1151~1170
56. ParajoÁ JC, VaÁzquez D, Alonso JL, Santos V . Prehydrolysis of Eucalyptus wood with dilute sulphuric acid: operation at atmospheric pressure. *Holz Roh Werk.*

- 1993, 51: 357~363
57. Carrasco F, Roy C .Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. Wood Sci. Technol. 1992, 26:189~208
58. Kim SB, Lee YY Kinetics in acid-catalized hydrolysis of hardwood hemicellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1987, 17: 71~84
59. Maloney MT, Chapman TW, Baker AJ . Dilute acid hydrolysis of paper birch: kinetic studies of xylan and acetyl-group Hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 1985, 27: 355~361
60. Maloney MT, Chapman TW, Baker AJ. An engineering analysis of the production of xylose by dilute acid hydrolysis of hardwood hemicellulose. Biotechnol. Prog. 1986, 2: 192~202
61. 夏安, 何泽超. 水解条件对纤维素酶解速度的影响. 化工设计, 2002, 12 (1)
62. 夏安. 纤维素酶水解动力学及影响因素研究. 四川大学硕士学位论文. 2002 (05)
63. G.V. Chowdary, S. Hari Krishna, Hanumantha Rao. Optimization of enzymatic hydrolysis of mango kernel starch by response surface methodology. Bioprocess Engineering. 2000(23):681-685
64. 赵文慧. 固态发酵生产纤维素酶及纤维原料酶法糖化的研究. 浙江大学硕士学位论文. 2002 (03)
65. Herr, D.: Conversion of cellulose to glucose with cellulase of *Trichoderma viride* ITCC-1433. Biotechnol. Bioeng. 22 (1980)1601~161125.
66. Vallander, L.; Erikson, K.E.: Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. Biotechnol. Bioeng. 27 (1985) 650~659
67. GonzaÁlez, G.; Caminal, G.; Mas. C.; LoÁpez-SantóÁn, J. Enzymatic hydrolysis of wheat straw: studies on a column reactor with enzyme recycling. Process Biochem. 4 (1989) 62~67
68. Moritz, J.W.; Duff, S.J.B.: Simultaneous saccharification and extractive fermentation of cellulosic substrates. Biotechnol. Bioeng. 49 (1996) 504~511
69. D. Irwin · T.D. Leathers · R.V. Greene · D.B. Wilson. Corn fiber hydrolysis by *Thermobifida fusca* extracellular enzymes .Appl Microbiol Biotechnol (2003)61:352

-358

70. Lee, S.B.; Kim, I.H.; Ryu, D.D.Y.; Taguchi, H.: Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983) 33~51
71. 白冬梅, 赵学明, 胡宗定, 玉米生粉发酵生产 L-乳酸的研究. *化学工程*. 2002(6):50-55
72. 罗珺, 夏黎明等. 纤维素酶水解及同时糖化和乳酸发酵过程的动力学. *化工学报*. 1998, 49 (2)
73. A. B. Moldes, J. L. Alonso, J. C. Parajo. Multi-step feeding systems for lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of processed wood. *Bioprocess Engineering* 22 (2000) 175~180
74. Parajo, J.C.; Alonso, J.L.; Moldes, A.B.: Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation. *Food Biotechnol.* 11 (1997) 45~58
75. Szczodrak J. The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 32 (1988): 771~776

## 攻读学位期间发表的学术论文

1. 发酵法在有机废弃物资源化中的应用. 上海环境科学年会第 10 届学术年会论文选集, 2002.12. (第一作者)
2. 发酵法在有机废弃物资源化中的应用. 中国资源综合利用. 2003.01. (第一作者)
3. 玉米秸秆浓硫酸水解的初步研究. 中国资源综合利用. 2003.11. (第一作者)
4. 废弃纤维素的酶水解. 东华大学学报. 待发. (第一作者)



## 致 谢

本文是在周美华教授的悉心指导下完成的，周老师在学习生活等方面给予我无微不至的指导、关怀和帮助；周老师学识渊博，治学态度严谨，胸襟宽广，德行高尚，有幸聆听教诲，将使我终生受益。在论文完成之际，谨向周老师致以衷心的感谢！

在实验过程中，还得到黄爱玲、张高奇、黄莉、王艳丽等同学的无私帮助，在此表示由衷的感谢！