

# 辽宁省教育厅科学技术研究项目结题报告

(辽宁石化职业技术学院 刘淼)

我国是农业大国, 生物质资源十分丰富。作物秸秆是农作物生产系统中一项重要的生物资源, 也是当今世界上仅次于煤炭、石油和天然气的第四大能源。目前, 全世界每年可产生超过 20 亿吨秸秆, 而我国年产各类农作物秸秆到 2015 年将达 9 亿吨左右, 列世界之首。我国秸秆综合利用还存在着水平较粗放、利用范围比较狭隘、秸秆综合利用的政策尚不完善、焚烧、废弃和流失还十分严重等问题, 造成秸秆资源的浪费。如何充分利用这些资源而又使环境不受污染, 是现代农业面临的难题。常用的物理法和化学法, 都存在诸多缺点, 如在处理秸秆过程中会对环境造成一定的污染, 秸秆的营养价值和利用价值都不高, 不适于大规模推广。而微生物法在秸秆转化中有用途多、营养价值高、周期短、可再生等优点, 更能提高秸秆利用的综合效益, 并利于农业的可持续发展。所以, 利用微生物的广泛适应性和多功能性来转化秸秆, 已日益受到国内外科学研究者重视, 秸秆的微生物处理被认为是最有前途的处理方法。

秸秆因其量大、结构和组分复杂, 需要多种酶进行协同作用达到将其资源化利用的效果。丝状真菌, 尤其是黑曲霉能产生水解生物质的纤维素酶、半纤维素酶、木质素酶和果胶酶等多种酶类, 可以在生物质资源化中发挥重要作用。而且, 黑曲霉是一个表达工业用酶的模式微生物。已经有多种酶在黑曲霉中成功表达, 例如木质素过氧化物酶, 阿魏酸酯酶和锰过氧化物酶等。因此, 本研究总结了黑曲霉在降解秸秆方面的优势, 为黑曲霉在秸秆资源化利用中的应用提供参考。进一步研究秸秆底物对纤维素酶活性的预处理效果, 以获得水分和发酵时间对纤维素酶活性的最佳条件, 通过确定最佳的 pH 值和温度来表征粗酶的最高活性。酶促反应的反应, 并从最高活性的粗酶中确定酶促反应的动力学参数。

## 一、黑曲霉在秸秆资源化利用中的应用

### 1、黑曲霉是具有丰富的降解生物质酶系

秸秆主要组分为由葡萄糖以 $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的纤维素、木聚糖为主的半纤维素、酚类物质聚合而成的木质素和少量果胶。降解纤维素的酶有内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶。降解半纤维素的酶有内切 $\beta$ -木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶、内切 $\beta$ -甘露聚糖酶、 $\beta$ -甘露糖苷酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -阿拉伯呋喃糖

酶、 $\alpha$ -葡糖苷酸酶、乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶和 p-香豆酯酶。降解木质素的酶有木质素过氧化酶、漆酶、锰过氧化酶、多样性过氧化酶。降解果胶的酶有果胶裂合酶、聚半乳糖醛酸酶、转化酶。

丝状真菌，例如黑曲霉、米曲霉、米根霉和里氏木霉，是水解生物物质酶的重要来源。表 1 总结了 4 种丝状真菌水解生物物质酶的研究水平。由于生物物质含有果胶，所以表 1 也包含了水解果胶的酶。根据表 1 可以看出 4 种丝状真菌所产生的酶类有所不同。在 19 种酶中，黑曲霉、米曲霉、米根霉和里氏木霉分别存在 3、6、13、5 种酶缺失。黑曲霉能产生的酶类最多，而且有 11 种来自黑曲霉的比酶活比来自里氏木霉的比酶活高。这说明黑曲霉更加适合作为产生水解生物物质酶的工业微生物。黑曲霉是一个表达工业用酶的模式微生物，已经有多种酶在黑曲霉中成功表达，例如木质素过氧化酶、阿魏酸酯酶和锰过氧化酶等。

近年来通过对多株黑曲霉基因组进行研究，结果也表明黑曲霉自身并不能产生水解生物物质组分需要的所有酶。有学者利用多种微生物的协同作用来生产所需要的酶，从而达到单一微生物无法达到的作用，不仅提高了酶产量，也为微生物水解生物物质提供了思路。混合多种微生物水解生物物质的不足在于控制多种酶的比例技术复杂，而且高菌体量降低了生物物质的利用率。黑曲霉被改造后可以高效表达多种外源酶。利用黑曲霉同时表达多种酶水解生物物质是目前热门研究方向。为了避免一种微生物同时高效表达多种酶的困境，Brunecky 等开发出了一种具有多种纤维素酶活力的纤维素酶 CelA。

## 2、黑曲霉作为优秀的细胞工厂

随着生物技术的发展，围绕黑曲霉的信息、研究技术和方法也较为完善。例如，已经有多株代表性的黑曲霉菌株完成基因组测序，进一步建立了蛋白质分泌途径，有利于黑曲霉表达外源基因。通过优化同源重组步骤中同源序列长度、载体构型、打靶位点敲除了黑曲霉中的 NHEJ(非同源结合)修复途径的蛋白 Ku70 和蛋白 Ku80，实现了可以定向同源重组的遗传操作系统。此外，通过强启动子的开发、蛋白酶缺陷菌株的构建、系统生物研究技术等方式将黑曲霉改造成优秀的细胞工厂。

除了黑曲霉自身分泌很多种酶，黑曲霉作为细胞工厂已经表达多种外源酶：木聚糖酶、葡萄糖苷酶、阿拉伯呋喃糖酶、果胶甲酯酶、磷酸脂肪酶、植酸酶、果胶酶、葡萄糖氧化酶、木质素过氧化酶、葡萄糖糖化酶和呋喃果糖苷酶。黑曲

霉表达真菌来源酶的表达量比其他来源的蛋白表达量高,这可能是由于真菌来源的蛋白在蛋白水解、糖基化等方面较为适合黑曲霉。目前,基于基因组数据也建立了黑曲霉代谢网络调控技术,有利于柠檬酸等代谢物的积累。早在20世纪30~40年代黑曲霉就是生产柠檬酸的工业菌株。目前全世界99%的柠檬酸(150万t/a)是由黑曲霉菌生产。黑曲霉积累柠檬酸伴随着多个酶的上调表达,其中13种酶对高产柠檬酸是必要的。黑曲霉还可以生产葡萄糖酸(4.5g/(L·h))、半乳糖醛酸和琥珀酸。

黑曲霉还可以利用羟基化、氧化、还原、去甲基化、硫化、脱氯、开环和接合等反应生物转化生产高附加值化合物。例如,黑曲霉将丁酰乙酸乙酯还原为光学纯度99%以上的3(R)羟基己酸乙酯,转化杂环化合物、环氧化合物和芳香族碳水化合物、萜类化合物、类固醇和类黄酮等物质成为药物和化工中间体。随着新一代基因编辑技术CRISPR/Cas(规律成簇间隔短回文重复/核酸酶)的出现,黑曲霉基因改造的效率得到快速的提高。Sarkari等报道瞬时表达Cas9可以100%整合基因的技术,还展示了基于CRISPR/Cas技术提高乌头酸产量的效果。Zheng等建立了基于CRISPR/Cas的黑曲霉U6启动子表达系统。这些技术必将加速黑曲霉作为细胞工厂方面的应用。

### 3、黑曲霉利用生物质废弃物可以产酶或者高附加值产品。

黑曲霉来源的酶制剂具有产量大、应用范围广、安全性高的特点,已愈来愈受到人们的重视。黑曲霉已成为工业应用常见的菌种之一。已经商品化的来自黑曲霉的酶有 $\alpha$ 淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、糖化酶、过氧化氢酶、 $\beta$ 半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、半纤维素酶、葡萄糖苷酶、橙皮苷酶、葡萄糖酶、单宁酶、柚苷酶、蛋白酶和果胶酶等。美国食品药品监督管理局(FDA)允许食品工业使用的酶以来自黑曲霉的酶数量最多。

#### 3.1 纤维素酶

黑曲霉广泛应用于纤维素酶的生产。黑曲霉的纤维素酶活力比来自里氏木霉的酶活高。以生物质为基质培养黑曲霉生产纤维素酶,既可以有效利用生物质,又可以生产酶等高附加值产品。目前已有多种生物质被用来培养黑曲霉生产纤维素酶。例如,Chandra等以落花生秸秆和麦麸为基质培养黑曲霉产生的纤维素酶活力和 $\beta$ 葡萄糖苷酶活力均显著高于其他菌类的活力。乔君毅等利用玉米秸秆培养黑曲霉3.3148菌株,经发酵后玉米秸秆的成分发生了变化:粗蛋白含量提高了

1.2 倍,粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维质量分数分别下降了 34%、19%、23%;黑曲霉产生的 CMCase 和 FPase 的比酶活别达 29.94U/g 和 13.56U/g。Sharma 等利用豌豆荚废料固态发酵培养黑曲霉 HN1 得到滤纸纤维素酶(FB)的比酶活可达 30FPU/g。还有很多学者尝试从自然界分离高产纤维素酶的黑曲霉菌株。因此,筛选高产纤维素的黑曲霉菌株是非常重要的方向,也具有广阔的应用前景。

### 3.2 半纤维素酶

木聚糖酶是半纤维素酶类的重要组成部分,可以分解秸秆细胞壁中半纤维素的木聚糖,降低物料的黏度,促进有效物质的释放,以利于营养物质的吸收。同时木聚糖水解得到的低聚木糖作为功能性低聚糖,可促进机体对酸性饮料和发酵食品中钙的吸收。所以木聚糖酶不仅在生物质利用中有重要作用。魏桃英等优化了含玉米芯和豆饼粉的培养基培养黑曲霉后产生 26371U/g 的木聚糖酶。高木糖含量的玉米棒和麦麸等废弃物是诱导黑曲霉产生木聚糖酶的良好物质。Dobrev 等以玉米芯为基质培养黑曲霉 B03,使其木聚糖酶活力提高了 33%。Ottenheim 等以棕榈果壳为基质培养黑曲霉 DSM26641 产生 24.5mU/mL 木聚糖酶,转录组学分析显示这株菌产生 3 种木聚糖内切酶、2 种 $\beta$ 木糖苷酶、4 种阿拉伯呋喃糖酶、1 种乙酰木聚糖酯酶、2 种阿魏酸酯酶。黑曲霉 SCTCC400264 产生耐热的木聚糖酶的比酶活可达 2547.7U/mg,该木聚糖酶在 80℃ 条件下保持 30min 仍有 74% 活力。

### 3.3 木质素降解酶

黑曲霉 ATCC1015 基因组中有多个可能的漆酶序列, McoB 基因已经被证实可以表达较高量的漆酶。利用玉米秸秆固态发酵培养黑曲霉 CGMCC5992,产生木质素过氧化酶的酶活达到 652.34U/L。虽然黑曲霉本身不产生锰过氧化酶和多样性过氧化酶,但是 CortesEspinosa 等利用黑曲霉作为宿主高效表达了黄孢原毛平革菌的锰过氧化酶,并且成功用于降解土壤中的菲。

### 3.4 果胶酶

果胶酶已经用于果汁澄清、果蔬汁提取、果实脱皮、木材防腐、麻类脱胶和棉织物精炼加工等行业。黑曲霉可以产生 3 种果胶酶:果胶裂合酶、聚半乳糖醛酸酶和转化酶。黑曲霉利用秸秆产生果胶酶的研究有很多。近年来研究人员通过原生质体突变、紫外线诱变以及紫外与 LiCl 复合诱变等方式提高黑曲霉产生的果胶酶产量。

#### 4、黑曲霉在秸秆资源化利用中的缺点

黑曲霉在生物质资源化利用中的主要优势为黑曲霉作为食品安全级的微生物已经应用于很多方面。黑曲霉具有较丰富的自身水解酶系，黑曲霉的遗传操作技术较成熟，为黑曲霉同时产生水解生物质组分的全酶系提供技术支撑，黑曲霉可以积累多种高附加值物质，这些优势有助于黑曲霉在生物质资源化过程中发挥作用。

但是，黑曲霉在生物质资源化利用过程中仍有大量的工作需要开展。首先，解析黑曲霉调控表达水解酶的机制。黑曲霉利用不同生物质组分时表达不同水解酶。这说明黑曲霉可以感应底物组分，并进行相应的反馈。探究黑曲霉控制水解酶表达的转录机制，解析表达机制有利于调控黑曲霉表达水解酶系。其次，构建高效表达全酶系的工业菌株。近年来基因编辑技术的出现为黑曲霉表达多种外源酶提供了技术支撑，但是目前还没有关于表达水解生物质全酶系的黑曲霉菌株的报道。最后，优化生物过程高效利用生物质。黑曲霉利用水解酶将生物质资源化的过程受到生物过程中多个条件的影响，例如传质、传热等，所以生物过程的控制也是重要研究内容。

随着研究的深入，黑曲霉将在生物质资源化方面发挥更大的作用，不仅推进生物质资源化利用的进程，还为黑曲霉的应用提供了舞台。

## 二、黑曲霉固态发酵秸秆生产纤维素酶工艺条件优化

秸秆是世界上最丰富的农林废弃物之一。全世界秸秆产量为约 7.31 亿吨，非洲 2090 万吨，亚洲 6.676 亿吨，欧洲 390 万吨，美国 3720 万吨，大洋洲 170 万吨。根据 BPS 2016 年的数据，大米的未去壳干稻产量为 7536 万吨，秸秆的产量很高，因为大部分纤维素含量无法充分利用，利用率却较低，秸秆只能用作饲料，有机肥料，因此，秸秆很有潜力用作生物燃料生产的原料。

随着石油产量的下降，需要其他能源来满足未来的需求。化石燃料储备是国家能源安全的“卡脖子”因素之一，同时石油等染料不可再生，非环境友好型燃料，会产生大量污染。为此，需要一种来自环境友好型生物质的可再生能源。其中之一是通过水解和酶促发酵过程从木质纤维素生产生物燃料，例如生物乙醇，可以利用真菌产生葡萄糖的酶，然后将葡萄糖发酵为乙醇。

秸秆是具有高纤维素含量的废物，可以用作生产纤维素酶的底物。纤维素酶

是一种重要的酶，因其在各个领域的材料转换和加工中都发挥着作用。在酶贸易中，有 20% 是纤维素酶，随着饮料，食品，洗涤剂，制浆造纸工业，乙醇，制药和其他行业中纤维素酶の利用，酶需求有显著增加趋势。纤维素酶大规模使用仍然受到成本因素的限制，降低纤维素酶成本的一些策略包括：提高酶的生产率，以更便宜的底物生产酶以及以更高的活性生产纤维素酶。由生物质生产纤维素酶是降低纤维素酶价格的一种方法和增加农业废物的价值。从各种农业废料生产纤维素酶已被广泛实践，但是所得的酶活性仍然很低。纤维素酶是由多种微生物合成的，因此，微生物类型的选择也会极大地影响酶的生产率。

## 1、实验部分

### 1.1 材料

秸秆（辽宁省某农业基地）；真菌黑曲霉（*Aspergillus niger*）由种植基地泥土中筛选并分离保藏，其他相关化学试剂，如苯酚，DNS，BSA，PDA 等均购于国药集团。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 材料准备

原料的制备是通过将秸秆在阳光下干燥，然后进行切割，粉碎和筛分，通过 1mm 筛子获得最大含水量为 10% 的秸秆粉末。木质纤维素含量分析参考相关文献，热重法分析灰分。

#### 1.2.2 预处理

通过添加 1 : 75 (w/v) 的秸秆粉比 2.75% (V/V) NaOH 溶液进行预处理，然后将混合物通过热板搅拌器在 100℃ 加热 80 min。冷却后，将混合物在滤纸和真空过滤器上使用 0.2M HCl 溶液中和至 pH 值为 7。使用烘箱在 70℃ 下将固体干燥至恒定的水含量。冷却后，将基板存储在装有硅胶的塑料中。

#### 1.2.3 培养微生物

黑曲霉在马铃薯琼脂 (PDA) 的培养基上培养。真菌在无菌条件下 (30±2) °C 的温度下孵育。

#### 1.2.4 接种

通过将黑曲霉的纯培养物添加到培养基溶液获得接种物。接种液的培养基用 10g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖溶液 50mL，然后加入 5mL 葡萄糖溶液。根据 Mendels 配方提供

的营养:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g; 尿素 0.3g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0014g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005g;  $\text{MnSO}_4$  0.0016g;  $\text{CoCl}_2$  0.002g;  $\text{CaCl}_2$  0.002g; 吐温 80 2.0ml 加入 1L 去离子水中。调节 pH 值 3.5 并灭菌。冷却后, 加入微生物, 并将接种物在 30°C 下摇瓶。

### 1.2.5 纤维素酶的生产

纤维素酶的生产是通过将样品放入锥形烧瓶中, 然后将营养液和水添加到含水量 60%, 65%, 70%, 75% 和 80%, 然后将 pH 值设置为 3.5, 灭菌。冷却后, 加入孵育接种物。随后, 将混合物在  $(30 \pm 2)$  °C 下以 3、4、5、6 d 的发酵时间进行恒温培养箱中培养, 补充  $\text{O}_2$ 。

### 1.2.6 酶提取

通过使用漏斗和滤纸在 250mL 的烧杯上以底物与水的比例为 1 : 50 (w/v) 提取发酵产物。使用培养箱摇床以  $200\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  在 30°C 下摇动滤液 1h。在  $6000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15min 后获得上清液, 进行分析。

### 1.2.7 纤维素酶活性测定

酶的活性是通过在 1mL 粗麦芽中插入粗酶的初始处理来确定的。加入 1% CMC (w/v) 和 0.1 M 柠檬酸钠溶液 (pH 值 4.8) 的缓冲液。将混合物在 40°C 下孵育 30min。还原糖通过 DNS 方法 (3, 5-二硝基水杨酸) 测定。酶活性的一个单位 (U) 是在分析条件下每分钟产生  $1.0\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量。

为了通过在 40、50、60 和 70°C 下进行的具有最高酶活性的粗酶的酶活性测试中改变底物浓度 (S) 来确定动力学参数。不同的底物浓度导致不同的酶活性 ( $V_0$ )。根据 Michaelis-Menten 方程获得每个温度的  $1/K_m$  和  $1/V_{\text{max}}$ 。

## 2、结果与讨论

### 2.1 预处理对纤维素酶活性的影响

预处理或去木质素化是改变木质纤维素生物质的化学结构, 以降低木质素选择性, 从而分解化学键和其他成分的过程。纤维素和半纤维素是秸秆中的碳水化合物, 可以通过酶促水解为葡萄糖。因为材料中木质素的存在会抑制酶水解和微生物发酵期间的纤维素消化, 所以需要对原材料进行预处理。表 1 列出了原材料表征的结果。

从表 1 中可以看出, 预处理引起的纤维素含量增加了 70.25%, 半纤维素含

量增加了 35.14%，木质素含量减少了 37.2%。这是因为碱性预处理可以除去木质素而不影响其他组分。使用 NaOH 进行预处理会导致材料中的亚麻酸减少，表面积增加，孔径增加以及木质素与纤维素和半纤维素之间的键断裂，从而降低了结晶度。碱预处理期间纤维素的增加主要是由于木质素的减少。木质素随着其溶解而碱性溶液减少。

表 1 原料分析结果

参数	未经预处理 /%	碱预处理 /%
纤维素	42.26	71.95
半纤维素	9.79	13.23
木质素	11.28	7.08
蛋白	5.11	1.14
灰份	4.92	5.12

从表 1 也可以看出，蛋白质含量下降了 3 倍。这是因为蛋白质在 45℃ 时开始变性。蛋白质是具有 C, H, O, N 元素作为产生酶的营养素的氨基酸。碳充当酶的辅助因子，而发酵过程中则需要氮，其影响黑曲霉的活性。灰份不会改变，因为 NaOH 只除去木质素而没有去除其他成分。因此，与相关学者研究结果相比在不同底物，真菌和方法进行预处理的情况下，生产纤维素酶的方法与使用 pH 值为 4 的本研究略有不同，最高纤维素酶活性提高了 21.40%。在本研究中，纤维素酶的最高活性为水分含量为 75% 和发酵 4d 时的  $3.12\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，见图 1。

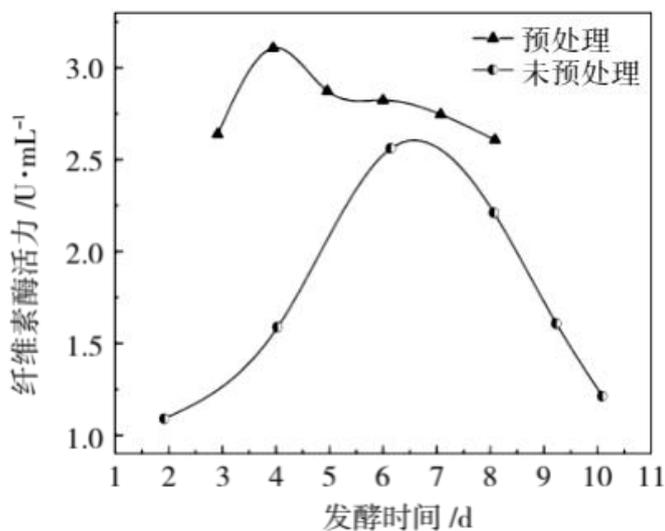


图 1 预处理和未预处理的纤维素酶活性

## 2.2 含水量和发酵时间对纤维素酶活性的影响

### 2.2.1 水分含量对纤维素酶活性的影响

水分含量影响微生物的生长，生物合成和酶分泌，因此，水分是固态发酵的

重要因素之一。水含量对纤维素酶活性的影响见图 2。酶活性将随着水含量的增加而增加，在发酵时间为 4d 的情况下，当水含量为 75% 时，最佳酶活性为  $3.12\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。但是，酶活性在含水量为 80% 时下降。对于发酵时间的所有变化，不同含水量固态发酵秸秆进行考察。水分含量低，导致微生物生长缓慢，营养物质的发育和可及性较低。虽然水含量很高，但会导致基材孔隙率降低，因此，减少了氧对颗粒的渗透。

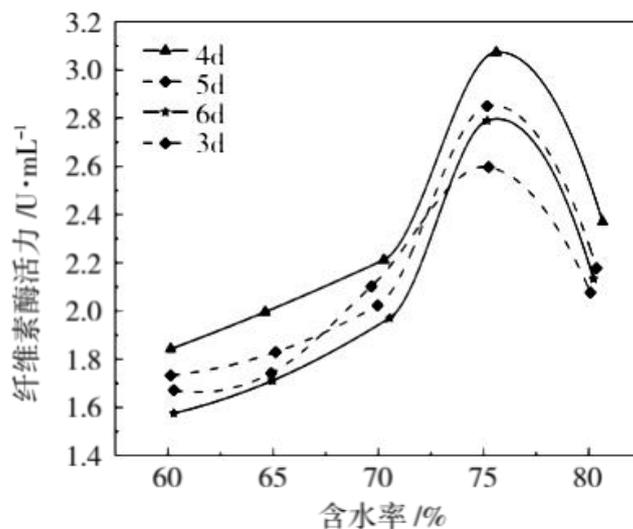


图 2 水分含量对纤维素酶活性的影响

从图 2 可以看出，在含水量为 75% 的秸秆可获得了最高的纤维素酶活性。黑曲霉在含水量为 70%~80% 时可以很好地生长。物质中蛋白质含量的存在表明材料中酶的存在。由于真菌体由含氮元素组成，因此，随着霉菌（真菌）的生长而增加了蛋白质含量。真菌产生的酶也是一种蛋白质。真菌的细胞壁含有 6.3% 的蛋白质，而带有菌丝的真菌细胞膜含有 25%~45% 的蛋白质和 25%~30% 的碳水化合物。在其生长过程中，真菌使用碳和氮作为真菌的体细胞成分。发生此过程的原因是，在黑曲霉的发酵过程中，使用了营养素（尤其是碳水化合物）来促进生长并增加了蛋白质含量。

发酵 4d 时，在 75% 的水含量时获得最高的蛋白质含量为  $0.34\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，而在 60% 水分和 3d 的发酵时间时获得的最低蛋白质含量为  $0.22\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在含有复杂分子的生长培养基中的黑曲霉可以分泌细胞外酶，例如  $\alpha$ -淀粉酶， $\beta$ -淀粉酶，葡糖淀粉酶，蛋白酶和纤维素酶。因为粗酶滤液中的大多数蛋白质由纤维素酶组成。

### 2.2.2 发酵时间对纤维素酶活性的影响

发酵时间对纤维素酶活性的影响见图 3。从图 3 中可以看出，对于所有水分

含量的变化，酶活性随发酵时间增加而提高。在第四天发酵时都获得了最高的纤维素酶活性。但是，酶活性在第五天和第六天下降。在发酵初期，酶的活性仍然很低。酶活性随发酵时间的增加而提高，而当可用营养素耗尽时则降低。形成孢子的生物通常在指数后阶段产生酶。

当产生的酶活性高时，霉菌就处于该阶段。由于培养基特性，微生物类型，养分浓度和所用过程的生理条件的差异，纤维素酶生产的各种最佳发酵期。

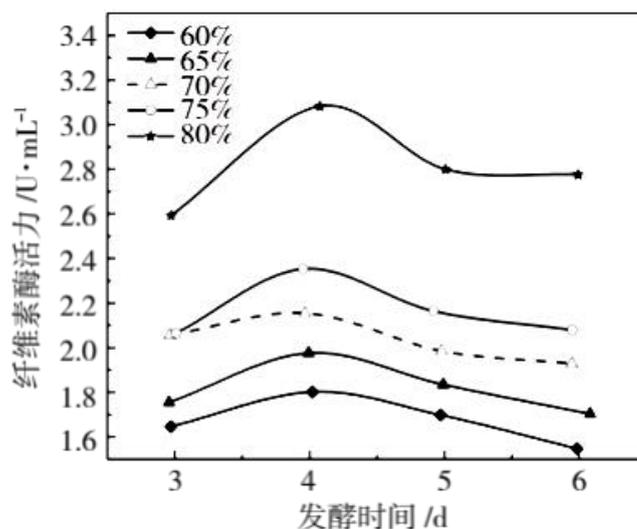


图 3 发酵时间对纤维素酶活性的影响

### 2.3 pH 值和温度对纤维素酶活性的影响

为了发挥 pH 值对酶活性的影响，具有离子基团酶的活性位点需处于最适 pH 值（酸或碱）。pH 值的介质变化导致活性位点的离子形成和酶活性的改变，从而影响反应速率。pH 值的变化也可以改变酶活性的大小。或者换言之，酶具有活性位点，其中某些基团在底物（ES）复合物的形成中充当催化剂。pH 值的变化会影响官能团的电离，从而导致酶构象及其催化性能发生变化。因此，该酶仅在一定的 pH 值范围内才有活性。最大反应速率， $K_m$  和酶的稳定性受培养基 pH 值的影响。

当底物浓度为 1% 时，pH 值对纤维素酶活性的影响见图 4。从图 4 中可以看出，在 pH 值为 2 时纤维素酶的活性很低，在 pH 值为 3 和 4 时有所增加。在 pH 值为 4 时，纤维素酶活性最高，为  $3.28U \cdot mL^{-1}$ ；之后开始下降，pH 值为 8 时，其活性降低，下降幅度高达 55.45%。相关研究结果同样得出了相似结论：在 pH 值为 3~6.5 下，纤维素酶的活性最佳。

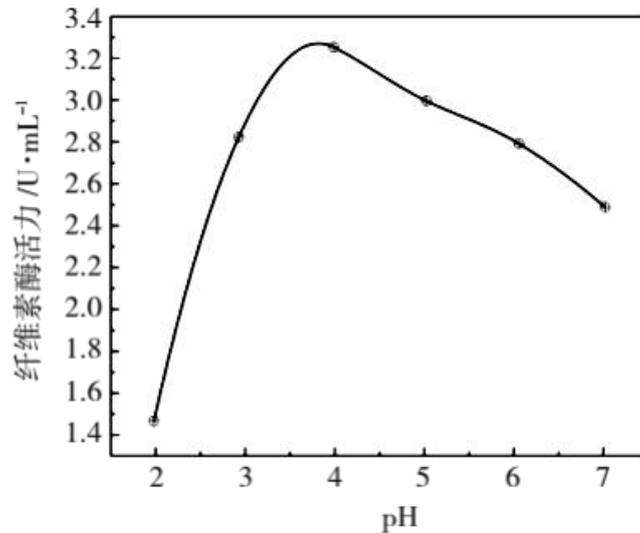


图 4 pH 值对纤维素酶活性的影响

温度是影响酶活性发展的环境因素之一。酶-催化剂反应的速率随着温度的升高而有所提高。温度升高将使反应速率仅增加到一定范围。反应速率随着温度的升高而增加，并且反应速率的提高是由反应分子动能的增加引起的。然而，更高的能量增加将破坏保留酶二级结构的弱氢键和疏水键。另外，高温也可能影响底物构象，因此，对进入酶的活性位点具有抵抗力。在 pH 值为 4 时，各底物浓度下，温度对酶活性之间的影响见图 5。

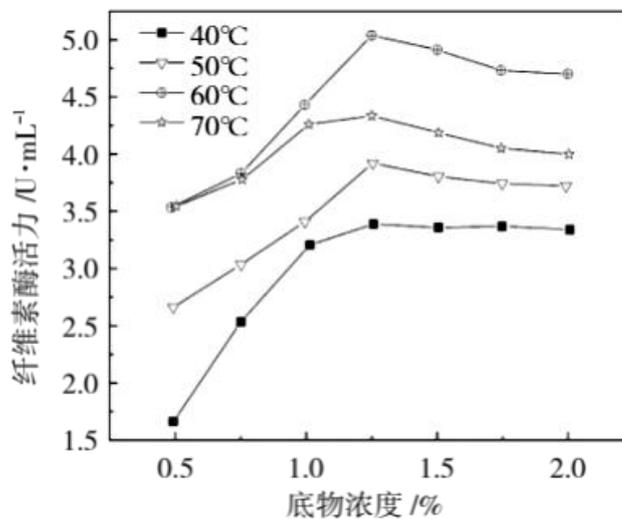


图 5 底物浓度对纤维素酶活性的影响

从各个底物浓度的 4 个变化中出现的现象是相同的：首先是酶活性较低，随着温度的升高，酶活性也在增加；然后在 60°C 后酶活性开始降低；最高的酶活性出现在 60°C，羧甲基纤维素酶 (CMC) 浓度为  $5.05 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  时，底物浓度为 1.25%。纤维素酶是一种嗜热酶，具有 50~65°C 的最大活性。较高的温度可能会增加产物的形成，因此，纤维素酶在工业中具有潜在应用前景。

## 2.4 酶促反应动力学

确定最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 和米氏 (MichaelisMenten) 常数 ( $K_m$ ) 是了解该酶特性的重要步骤。 $V_{max}$  值表示酶在底物上的饱和度, 而  $K_m$  表示酶的催化效率, 定义为酶的催化速度达到最大速率的一半时的底物浓度。用作亲和力测量值 ES 的  $K_m$  值还与 ES 复合物的脱硫平衡平衡常数变为 E 和 S 有关。如果  $K_m$  值较小, 则表示 ES 复合物稳定且对底物的酶亲和力高, 如果酶的  $K_m$  值大, 则变低。 $K_m$  值随基材类型, 环境状态和离子强度的不同而有很大差异。

基于 Michaelis-Menten 方程, 底物浓度和纤维素酶之间的关系。图 5 显示了在 40、50、60、70°C 温度下的活性。根据动力学理论, 底物浓度越高, 分子之间碰撞的能量和频率越高, 因此, 更多的纤维素酶可以与纤维素结合形成糖基酶复合物, 从而进一步形成葡萄糖产物。如图 5 所示, 随着底物浓度的增加, 酶的活性也增加。然而, 底物浓度增加至一定浓度后, 酶活性的增加将停止。 $V_{max}$  和  $K_m$  值可以通过将 MichaelisMenten 方程转换为 Lineweaver-Burk 方程, 每个温度变化的  $V_{max}$  和  $K_m$  值见表 2。

表 2 酶促反应动力学

温度/°C	线性方程	$R^2$	$V_{max}/U \cdot mL^{-1}$	$K_m/mmol \cdot L^{-1}$
40	$Y=0.2053x+0.1558$	0.8949	6.42	1.32
50	$Y=0.0813x+0.2129$	0.9364	4.70	0.38
60	$Y=0.0553x+0.1719$	0.8757	5.82	0.32
70	$Y=0.0271x+0.2243$	0.6076	4.46	0.12

从表 2 看出,  $V_{max}$  和  $K_m$  在每个温度的差异是由于酶催化剂具有不同的反应温度导致不同的反应率。外部温度的增加通常会增加酶的化学反应速率, 但过高的温度上升会使酶变性。过多的热能可以增加酶的动力学, 可以超过所需的能量极限破坏共价键构成酶的结构。由于多肽链变得展开或变性, 降低催化活性。

## 3 结论

利用黑曲霉固态发酵方法从秸秆中生产纤维素酶。通过在使用底物上进行预处理, 可以增加纤维素酶的酶活性为 21.40%。在水含量为 75% 且发酵时间 4d 的情况下, 最高酶活性为  $3.12U \cdot mL^{-1}$ 。从产生的纤维素酶和最高的活性出发, 研究了 pH 值和温度对酶活性的影响。在 pH 值为 4 和温度 60°C 时, 酶活性最高, 为  $5.05U \cdot mL^{-1}$ 。从酶促反应动力学所获得的 60°C 温度下的动力学参数为  $V_{max}$  为  $5.82U \cdot mL^{-1}$ ;  $K_m$  为  $0.32mmol \cdot L^{-1}$ 。