

# 微波与纤维素酶协同水解杨木 制备还原糖的研究

余先纯<sup>1,2</sup>, 龚铮午<sup>1,\*</sup>

(1. 中南林业科技大学材料科学与工程学院, 湖南长沙 410001;  
2. 岳阳职业技术学院基础部, 湖南岳阳 414000)

**摘要:**以速生杨木为原料, 采用微波辐射和纤维素酶协同水解制备还原糖。探讨了经过微波辐射处理后原料的粒度、酶液用量、水解温度和水解时间对还原性糖得率的影响, 并采用响应面法建立二次回归模型对水解工艺进行了优化, 在反应温度为 50.5℃、反应时间为 20.7h、酶液用量为 27U/g 时, 还原糖的得率可达到 32.40%, 比在相同工艺条件下未经微波处理的得率提高了 11.87%。

**关键词:**还原糖得率, 纤维素酶, 微波辐射, 协同水解, 响应面分析

## Preparation of reducing sugars with synergistic hydrolysis of microwave irradiation and cellulase from poplar

YU Xian-chun<sup>1,2</sup>, GONG Zheng-wu<sup>1,\*</sup>

(1. College of Material and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410001, China;  
2. Basis Department, Yueyang Vocational & Technical College, Yueyang 414000, China)

**Abstract:** Reducing sugars was made from poplar powder with synergistic hydrolysis of microwave irradiation and cellulase. The effects of sample size, amount of cellulase, reaction time and reaction temperature on the yield of reducing sugars were investigated. The condition of temperatures, times and amounts of cellulase were analyzed by response surface methodology (RSM), and the best processes were obtained. The result showed the yield of the reducing sugars was 32.40% as the reaction temperature was 50.5℃, the time was 20.7h and the amount of cellulase was 27U/g. The yield had been increased 11.87% compared with the sample which did not have microwave irradiation at the same condition.

**Key words:** yield of reducing sugars; cellulase; microwave irradiation; synergistic hydrolysis; response surface methodology

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0203-04

还原糖作为有机化合物, 由于其无毒害作用及良好的生物相容性而广泛应用于医疗、食品、化工等众多领域<sup>[1]</sup>。目前有多种制备还原糖的方法, 其中降解木材等生物质材料的方法倍受关注。全球每年由光合作用生成的生物质资源高达 1500~2000 亿 t, 但被作为能源利用的还不到 1%<sup>[2]</sup>, 所以, 开发利用生物质可再生资源具有十分重要的意义。有研究表明, 纤维素大分子中的  $\beta$ -1,4-糖苷键和半纤维素中的苷键在纤维素酶中聚合度降低, 水解得到木糖和葡萄糖等还原糖<sup>[3]</sup>。目前对水解工艺的研究主要集中在酸水解和酶水解两种途径<sup>[4-5]</sup>, 酶水解条件温和、能耗低、无污染; 酸水解污染严重、副产物多, 对

设备腐蚀性大。微波辐射是 20 世纪 80 年代后期兴起的一项有机合成技术, 能改变植物纤维原料的超分子结构, 使纤维结晶区尺寸发生变化, 提高其反应活性<sup>[6-7]</sup>, 从而提高酶解得率。近年来, 生物降解和微波辐射技术由于符合“绿色、环保”的要求而发展迅速, 但目前还没有关于利用生物降解和微波辐射协同水解木材制备还原糖的报道。在本研究中, 采用微波辐射协同纤维素酶对速生杨木进行降解合成还原糖, 对微波辐射处理后原料的粒度、酶液用量、水解温度和水解时间等因素对还原糖得率的影响进行了探讨, 并采用响应面法 (RSM) 建立回归方程, 对制备工艺进行优化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与设备

速生杨木 (*Populus euramericana* cv. '1-214')

5 年生; 纤维素酶 诺维信 (中国) 生物技术有限

收稿日期: 2009-08-21 \* 通讯联系人

作者简介: 余先纯 (1969-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 生物质材料与高分子材料。

基金项目: 湖南省教育厅科技项目 (08D124)。

公司。

SHZ-82 数显水浴恒温振荡器 江苏科兴;  
MAS-II 型常压微波合成/萃取反应工作站 上海新  
仪微波化学科技有限公司;三口烧瓶。

## 1.2 实验方法

1.2.1 杨木的预处理 将杨木粉碎,分别过 40、80、120、160、200 目筛,用液固比为 10:1、浓度为 3% 的稀硫酸浸泡 1h 后过滤,将滤渣用水洗净后于 80℃ 烘干至水分含量恒定,备用。

1.2.2 微波处理及还原糖的合成 在带回流装置的三口烧瓶中加入 8.0g 经过预处理的杨木木粉,用蒸馏水调节至液固比为 16:1,置于 MAS-II 型常压微波合成/萃取反应工作站中。根据刘龙飞<sup>[8]</sup>等学者的研究结果,将微波辐射功率选为 560W,升温至沸腾并保温 30min。将经过微波处理后的试样冷却至室温,然后加入一定量的酶液和 0.2mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH = 4.8),置于水浴恒温振荡器内,将反应温度升到指定温度进行降解反应,保温一段时间,冷却出料,测定水解产物中还原糖得率。

将未经过微波材料的杨木粉在同样的条件下进行对比实验。

1.2.3 还原糖的检测 用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂法检测杨木酶解液中的总还原糖。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微波辐射与酶解机理

协同理论 (Snergism) 是被普遍接受的天然纤维素的微生物降解机制。微波辐射使化学键振动或转动,导致化学键减弱,使纤维结晶区尺寸发生变化,提高其反应活性,促进反应的进行<sup>[9]</sup>。酶解作用能够导致结晶纤维素 (Cx) 被内切- $\beta$ -葡聚糖酶作用生成无定形纤维素和可溶性低聚糖,然后被外切- $\beta$ -葡聚糖酶作用直接生成葡萄糖 (C1),也可被  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解生成纤维二糖 (Cs),再被水解得到葡萄糖<sup>[5]</sup>。

### 2.2 单因素实验

经过预处理后的杨木粉在酶解液和微波辐射作用下水解生成还原糖。在探索性实验的基础上,以水解液中还原糖的得率为指标,采用单因素实验,考察原料粒度、酶解温度、酶解时间、酶的用量对还原糖得率的影响,以确定酶解杨木的最佳条件。

2.2.1 原料粒度的选择 原料粒度对还原糖得率的影响主要是由于机械粉碎可以破坏木质素和半纤维素与纤维素的结合层,降低三者的结晶度,改变纤维素的结晶构造<sup>[10]</sup>,有利于糖苷键断裂,从而增加还原糖的得率。同时,原料的粒度变小而使得与酶液的接触面增大,也能增加糖的得率。

分别取粒度为 40、80、120、160、200 目经过预处理后的杨木木粉,在酶液用量为 25U/g 干杨木粉、反应温度为 50℃、反应时间为 20h 等条件下进行对比实验,实验结果见图 1。120 目和 160 目还原糖的得率较高,分别为 31.11% 和 31.75%,而 80 目的则只有 26.48%,考虑到粉碎成本,主张采用 120 目的比较合适。

2.2.2 酶解温度的影响 升高温度能够提高反应体

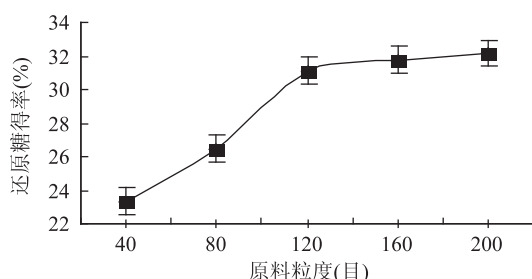


图1 原料粒度对还原糖得率的影响

系的活化能,进而提高反应速度,但太高的温度又会使酶液失活,因此适当的反应温度十分重要。取经过处理的 120 目的杨木粉 8g,加入蒸馏水和酶液,使总酶量到达 200U (即 25U/g 干杨木粉),设定不同的反应温度,微波加热 20h,结果见图 2。由图 2 可知,当温度为 40~50℃ 时,随着温度升高,酶解液中的还原糖量逐渐增加,并在 50℃ 时得率达到 32.11%;当温度高于 50℃ 时,随着温度升高,得率有降低的趋势,这可能是由于高温使部分酶失活所导致的,因此在本实验中选择 50℃ 为酶解反应的水解温度。

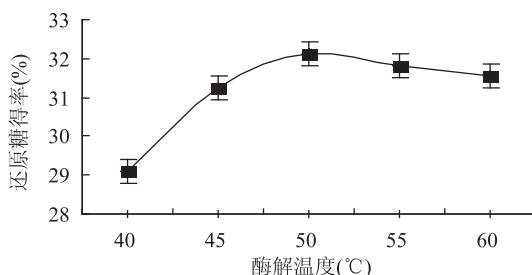


图2 酶解温度对还原糖得率的影响

2.2.3 酶液用量的影响 酶液的用量不仅直接关系到水解速度,还涉及到还原糖的得率以及生产成本等问题。在经过预处理的 120 目的杨木粉中加入一定量的蒸馏水和不同量的酶液,微波加热 20h,控制反应温度 50℃,结果见图 3。当酶液用量低于 25U/g 干杨木粉时,随着酶液用量的增加,还原糖释放量明显增加,当超过此值时,还原糖的得率增加缓慢。这可以解释为当其它条件相同时,增加酶液用量实际上是增加了酶液与木粉的接触面积,从而提高了还原糖的得率;但当酶液与木粉的接触面积达到一定量后,多余的酶液无法参与反应,因此还原糖的得率增加缓慢。

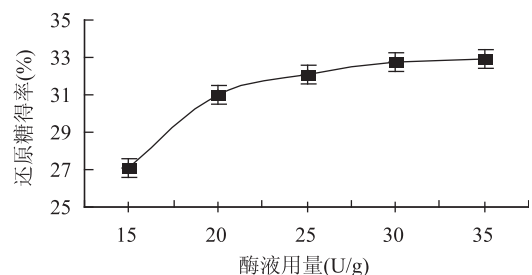


图3 酶液用量对还原糖得率的影响

2.2.4 酶解时间的影响 在反应温度为 50℃、酶液用量为 25U/g 干杨木粉、杨木粉粒度为 120 目的条件下,不同反应时间内反应体系中还原糖的得率见图 4 所示。随着酶解时间的延长,还原糖的得率逐渐增加,当酶解时间超过 20h 后,再延长反应时间,

还原糖得率增加幅度明显减小。因为随着反应时间的增加,反应体系中副产物的量会逐渐增多,致使还原糖自身分解并和副反应产物进行缩合。这说明通过 20h 的酶解反应,反应体系趋于平衡。

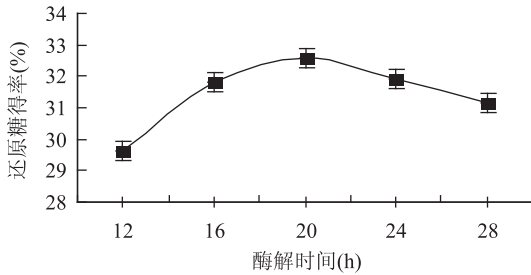


图4 酶解时间对还原糖得率的影响

### 2.3 响应面分析

2.3.1 响应面法实验设计 为了使水解工艺更加科学,在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 设计原则,选择反应温度、酶液用量和时间 3 个对杨木液化影响较大的因素,以还原糖在水解产物中含量为响应值,设计 3 因素 5 水平实验进行响应面分析,如表 1 所示。

表1 响应面实验设计因素水平编码表

因素	编码	水平	
		-1	1
酶解温度(°C)	A	45	55
酶解时间(h)	B	16	24
酶液用量(U/g)	C	20	30

2.3.2 多元回归模型分析与验证 根据实验结果,运用 Design-Expert 7.1.6 软件进行二次多元回归分析,得到二次多元回归方程:  $Y = 32.07 + 0.32A + 0.45B + 1.44C + 0.84AB - 0.34AC + 0.21BC - 1.82A^2 - 1.70B^2 - 1.88C^2$

同时得到如表 2 所示的模型与方差,其中模型的 P 值为 0.0001,表现为显著,而失拟项表现为不显著,  $R^2$  为 0.9532,接近 1,这表明模型与实际情况基本吻合。且  $A^2$ 、 $B^2$  和  $C^2$  的系数均为负值,表面有最优值。

表2 模型与方差

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P-值	显著性
模型	156.45	9	17.38	22.65	0.0001	显著
残差	7.67	10	0.77			
失拟项	2.84	5	0.57	0.59	0.7138	不显著
纯误差	4.84	5	0.97			

注:  $R^2$ : 0.9532; C.V.% : 3.09。

模型的响应面等高线见图 5 所示。从图 5 中可以发现:反应温度、时间和酶液用量等三因素的交互作用对反应体系中还原糖含量的影响非常明显。当某一因素固定时,随着其它两因素的增加,反应体系中还原糖的得率增加迅速,达到峰值后有所降低,这说明适当地控制酶解温度、时间和酶液的量有利于酶解体系中还原糖的生成。

采用 ANOVA(方差)分析,并通过对回归方程求解得最优工艺条件:酶解温度为 50.5°C,酶解时间为 20.7h,酶液用量为 27U/g,在此条件下反应体系中还原糖的得率为 32.40%。在此工艺条件下,进行验证

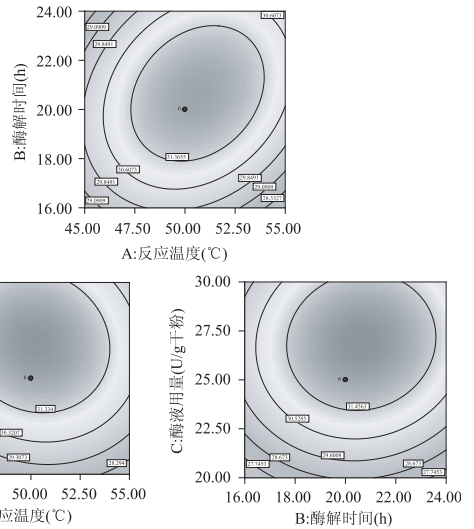


图5  $Y = f(A, B)$ 、 $f(A, C)$ 和  $f(B, C)$  的等高线

性实验,检测得到还原糖的得率为 31.93%,与理论计算值非常接近,而在相同工艺条件下,未经过微波处理的还原糖含量却只有 20.53%。

### 3 结论

在采用纤维素酶水解速生杨木制备还原糖的过程中,原料的粒度、酶解的温度、时间和酶液的用量对还原糖的得率有较大的影响,在微波的协同作用下,不仅能够大幅度提高还原糖的得率,而且还能降低酶解时间。较为优化的工艺为:粒度为 120 目的杨木粉,通过微波处理 30min 后,当酶解温度为 50.5°C、酶液用量为 27U/g、酶解时间为 20.7h 时,还原糖的平均得率为 32.40%。比在相同的工艺条件下、未经微波处理的还原糖的得率提高了 11.87%。

### 参考文献

- [1] 马立国,牟莉,王娟,等.微波-化学催化耦合条件下植物纤维素的降解[J].纤维素科学与技术,2007,15(3):52-55.
- [2] 李德莹,龚大春.酶法水解木质纤维素预处理工艺进展[J].农产品加工学刊,2008,127(2):55-58.
- [3] 詹怀宇.纤维化学与物理[M].北京:科学出版社,2005:131-196.
- [4] Carvalho F, Duarte L C, Lopes S, et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by Debaryomyces hansenii CCM1 941 [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(3): 1215-1223.
- [5] Canilha L, Silva J, Solenzal A I N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production [J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 1909-1912.
- [6] 赵士举,李鑫,徐翠莲,等.微波法从小麦秸秆中提取木质素的研究[J].科技导报,2008,26(18):66-68.
- [7] Carrard G, Koivula A, Sodrelund Oderlund H, et al. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19): 10342-10347.
- [8] 刘龙飞,宗水珍,邱竹.微波促纤维素水解制备可发酵还



# 谷氨酰胺转胺酶对小麦中 非麦谷蛋白组分的作用

张若愚,侯东丽,师俊玲\*,杨保伟

(西北农林科技大学食品科学与工程系,陕西杨凌 712100)

**摘要:**在分离获得清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白单一组分的基础上,研究了微生物源谷氨酰胺转胺酶(MTG)对这些蛋白组分在单蛋白、双蛋白及三蛋白水平上,分子内及分子间结合的催化作用;通过可溶性蛋白含量和电泳图谱中蛋白条带的变化,从反应速度和分子量的变化探究了 MTG 对除麦谷蛋白以外的其它蛋白组分的作用效果及机制。结果发现,MTG 可以催化小麦中清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白组分的分子内和分子间的作用;对球蛋白的催化作用大于清蛋白,但两者均小于醇溶蛋白;清蛋白对 MTG 催化其它蛋白组分的分子内结合,球蛋白对 MTG 催化醇溶蛋白分子内结合都有一定的抑制作用。

**关键词:**谷氨酰胺转胺酶,小麦,清蛋白,球蛋白,醇溶蛋白

## Effect of transglutaminase on the interaction among the non-glutenin protein compounds in wheat

ZHANG Ruo-yu, HOU Dong-li, SHI Jun-ling\*, YANG Bao-wei

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The effects of transglutaminase on the reaction within wheat albumin, globulin and gliadin when one, two, and three of them appeared were studied, respectively. All the above proteins were isolated from wheat flour and reconstructed again for different experimental designs. Decrease of soluble protein content in the system was tested to express the reaction speed. Compositions before and after the reaction were analyzed by using SDS-PAGE. The results showed that MTG could catalyze the interactions within a same, or between different proteins, including albumin, globulin, and gliadin. The catalyzing speed was faster on globulin than albumin and fastest on gliadin at single protein level. Albumin could reduce the catalyzing effect of MTG on the interaction of globulin and gliadin, while globulin increased the effect on gliadin.

**Key words:** transglutaminase; wheat; albumin; globulin; gliadin

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0206-04

谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase, EC 2.3.2.13, 简称 TGase)是一种催化酰基转移酶<sup>[1]</sup>,广泛存在于动植物和微生物内<sup>[2]</sup>。微生物源 TGase (MTG)适用范围广,催化作用不受  $Ca^{2+}$  限制,已被 FAO/WHO 认可为安全的食品添加剂<sup>[3]</sup>。MTG 以谷氨酰胺残基的  $\gamma$ -甲酰胺基为酰基供体,其酰基受体可以是<sup>[4-5]</sup>赖氨

酸的  $\epsilon$ -氨基、伯胺基及水分子。在缺乏小分子氨时,  $\gamma$ -谷氨酰胺残基和  $\epsilon$ -赖氨酸残基发生交联,生成  $\gamma$ -谷氨酰基- $\epsilon$ -赖氨酸异构肽或  $\epsilon$ -( $\gamma$ -谷氨酰基)赖氨酸共价键<sup>[1]</sup>。通过该反应,可使食品中蛋白质发生分子交联,赋予产品特有的质构特性和粘合性能,同时也可引入赖氨酸<sup>[6-7]</sup>。MTG 在面制品加工方面主要通过催化麦谷蛋白亚基间的交联<sup>[8]</sup>,改变面团的流变学性质<sup>[9]</sup>和面团筋力<sup>[10]</sup>,加工产品如面包、中国面条、意大利面条和糕点<sup>[11-13]</sup>等。有关 MTG 对面制品作用机理的研究大多集中于其对麦谷蛋白和醇溶蛋白的作用<sup>[14]</sup>,而对加工中易流失的清蛋白、球蛋白

收稿日期:2009-07-06 \* 通讯联系人

作者简介:张若愚(1986-),男,本科生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:国家大学生创新性实验计划项目(071071238);西北农林科技大学基金(07ZR03)。

原糖的研究[J].常熟理工学院学报,2008,22(4):77-81.

[9] 赵林果,金耀光,李强,等.白腐菌菌及黑曲霉所产生的纤维素复合酶对稻草秸秆的生物降解[J].中国生物工程杂志,2007,27(3):71-75.

[10] Tanyildizi M S, Özer D, Elibol M. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by bacillus sp. using response surface methodology [J]. Process Biochemistry, 2005, 40 (7): 2291-2296.