

# 固定化纤维素酶及其对棉纤维的作用

郭陈岑, 张宇, 张永奎, 谢通慧, 杨坤\*

(四川大学 化工学院, 四川 成都 610065)

**摘要:**为实现纤维素酶处理棉织物后重复使用,以 pH 敏感型树脂——聚丙烯酸树脂 IV 为载体,吸附固定纤维素酶。结果表明,纤维素酶成功固定于载体上,酸性条件下溶解,中性条件下析出回收,其酶活固定率与 4 次酶活回收率分别为 45.5% 和 81.4%。与游离纤维素酶相比,固定化纤维素酶热稳定性增强,在酶精练过程中,其催化速率更为稳定可控。表征发现经固定化纤维素酶处理后棉纤维结晶度增大,吸水性、可染性增强,纤维卷曲减少,对纤维损伤程度较小。

**关键词:**纤维素酶; pH 敏感型树脂; 棉纤维; 酶精练

**中图分类号:** TS190.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-0356(2017)05-0001-04

纤维素酶可在温和条件下去除棉纤维表面杂质,提高其可染性与吸湿吸水性,还可以水解棉织物表层的细小纤维素,平滑织物<sup>[1]</sup>。然而,随着催化水解反应的进行,纤维素酶逐渐进入纤维孔隙,侵蚀内部,造成不可逆的纤维损伤和力学性能降低,不利于高档棉织物的生产,且不易回收利用,稳定性较差,生物洗涤成本高<sup>[2]</sup>。

近年来,固定化纤维素酶的研究迅速发展。固定化纤维素酶能有效增大酶分子的体积,将水解作用锁定于棉纤维表面,去除初生胞壁中蜡质、果胶与细小纤维素的同时,减小对棉织物结构的破坏。在水解不溶性纯棉底物时,酶固定于可溶性载体能减小传质阻力,更有效地催化水解,但难以回收;固定于不溶性载体易回收,但难与棉纤维分离。pH 敏感型树脂作为一种可逆载体,通过调节环境 pH 值可实现其溶解性能的转化,兼顾两者的优点<sup>[3]</sup>。聚丙烯酸树脂 IV 为甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸丁酯-甲基丙烯酸二甲胺基乙酯(1:1:2)共聚物,由于分子链中存在叔胺基,能够在 pH 小于 5.0 时溶解,在 pH 大于 5.0 时溶胀。本文以聚丙烯酸树脂 IV 为载体,利用其羧基与纤维素酶中的胺基的静电吸附,制成 pH 敏感型固定化纤维素酶,应用于纯棉处理工艺,探究固定化纤维素酶对棉纤维结构及性能的影响。

## 1 试验部分

### 1.1 材料和仪器

新疆精梳棉(经沸水浴 10 min,用蒸馏水洗涤 3 次

后,晾干梳理后备用)、聚丙烯酸树脂 IV(西安悦来医药科技有限公司)、酸性纤维素酶(上海康地恩生物科技有限公司)。

UV-1800 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、Nicolet 6700 傅里叶红外光谱仪(赛默飞世公司)、RF-6000 荧光分光光度检测仪(岛津企业管理有限公司)、JSM-7500F 场发射扫描电子显微镜(日本电子株式会社)。

### 1.2 纤维素酶的固定与回收

取 2.0 g 聚丙烯酸树脂 IV(R)溶于 pH 3.0 的磷酸溶液中,调节 pH 至 4.0,加入 1 ml 纤维素酶(FC),搅拌固定 1 h。调节 pH 至 5.5,4 000 r/min 离心 10 min,洗涤沉淀。用 pH 3.0 的磷酸溶液溶解沉淀,调节 pH 至 4.0,并定容至 100 ml,制得固定化纤维素酶(IC),4 °C 下储存备用。调节 pH 过程中使用 1 mol/L NaOH 溶液及 2 mol/L 磷酸溶液。

量取 50 ml 固定化纤维素酶(IC),调节 pH 至 5.5,4 000 r/min 离心 10 min。洗涤沉淀后用 pH 3.0 的磷酸溶液溶解,调节 pH 至 4.0,并定容至 50 ml,制得回收固定化纤维素酶。重复上述操作,分别制得回收 1~4 次的固定化纤维素酶。以 pH 4.0 的 0.5% (w/v) CMC 溶液为底物,50 °C,用 CMC 分解法<sup>[4]</sup>分别测定稀释 100 倍的游离纤维素酶、固定化纤维素酶与回收固定化纤维素酶酶活。按公式(1)、(2)计算酶活固定率与回收率:

$$\text{酶活固定率}(\%) = \frac{U_2}{U_1} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{酶活回收率}(\%) = \frac{U_3}{U_2} \times 100 \quad (2)$$

式中,  $U_1$  为游离纤维素酶酶活;  $U_2$  为固定化纤维素酶

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 四川大学大学生创新训练项目(201610611654)

作者简介: 郭陈岑(1992-),女,硕士研究生,研究方向:酶处理棉纤维, E-mail: gcc2016scu@163.com。

\* 通信作者: 杨坤(1978-),男,副教授,博士,研究方向:环境微生物及生物分离, E-mail: cookyoung@scu.edu.cn。

酶活;  $U_3$  为回收固定化纤维素酶酶活。

### 1.3 纤维素酶的最适反应条件

以 pH 2.5—6.5 CMC 溶液为底物, 50 °C 条件下, 分别测定纤维素酶及固定化纤维素酶相对酶活。于 20~80 °C 条件下, 纤维素酶与固定化纤维素酶分别以 pH 4.5、pH 4.0 的 CMC 溶液作为底物, 分别测定相对酶活。以灭活酶为对照, 最大酶活为 100%。

### 1.4 纤维素酶处理棉纤维

经预处理的棉纤维置于含 0.1% JFC 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 4.0, 浴比 1:30) 中, 50 °C 保温 10 min。分别加入 1 ml 具有相同 CMC 酶活的 FC 与 IC, 以沸水浴灭活 20 min 的酶液作为空白, 50 °C, 180 r/min 水解反应 6 h。间隔取样, DNS 分光光度法<sup>[5]</sup>测水解液中还原糖浓度。

### 1.5 测试方法

#### 1.5.1 失重率

将纤维素酶处理后的棉纤维于 50 °C 烘干, 105 °C 烘至恒重, 按公式(3)计算失重率:

$$\text{失重率}(\%) = \frac{\text{原棉干重} - \text{处理棉干重}}{\text{原棉干重}} \times 100 \quad (3)$$

#### 1.5.2 果胶去除率

棉纤维中的果胶用 0.5% (w/v) 的草酸铵溶液提取, 硫酸咔唑比色法检测含量, 并计算果胶去除率。

#### 1.5.3 上染百分率<sup>[6]</sup>

将 0.1 g 棉纤维置于 25 ml, 0.05 g/L 的直接大红溶液中, 100 r/min 进行染色。采用残液法计算上染百分率。

#### 1.5.4 吸水性

吸水量按第 35 版美国药典及《yy0330—2002 医用脱脂棉》中棉吸水量检测法测定。

#### 1.5.5 结晶度

棉纤维剪碎后用 Rigaku D/max-TTRIII X 射线衍射仪检测, Jade 5.0 软件分析。结晶度计算公式为:

$$\text{CrI}(\%) = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100 \quad (4)$$

式中,  $I_{002}$  和  $I_{am}$  分别是 002 衍射晶面  $2\theta = 22.8^\circ$  和  $2\theta = 18.0^\circ$  散射峰的强度。

#### 1.5.6 荧光光谱、红外光谱

纤维素酶、固定化纤维素酶、树脂分别用荧光分光光度仪检测荧光发射光谱, 固定激发光为 280 nm, 扫描接收波长为 300~500 nm; 纤维素酶、固定化纤维素酶及树脂冻干后用傅里叶红外光谱仪测定红外光谱; 经 FC 处理前后棉纤维的表面和截面情况, 采用扫描

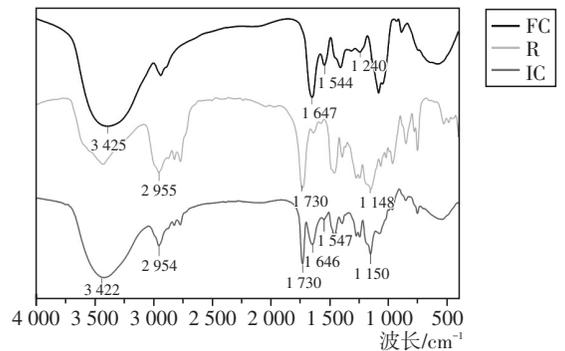
电子显微镜进行观察。

## 2 结果与讨论

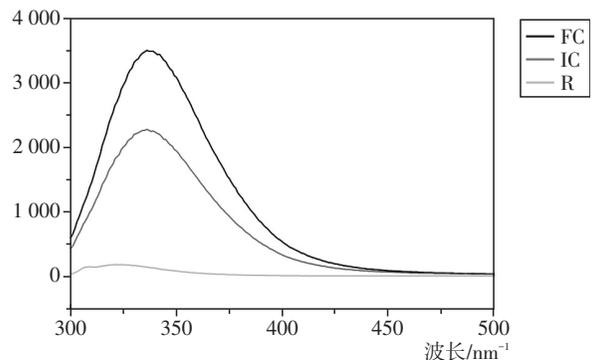
### 2.1 纤维素酶的固定化

聚丙烯酸树脂 IV 粉末 (R)、真空冻干的纤维素酶 (FC) 及固定化纤维素酶 (IC) 的红外图谱如图 1(a) 所示。R 的特征峰为: 甲基伸缩振动的吸收峰 ( $2955 \text{ cm}^{-1}$ ), 叔胺宽而强的多重谱带 ( $2500 \sim 2600 \text{ cm}^{-1}$ ), C=O 的伸缩振动 ( $1730 \text{ cm}^{-1}$ ), 以及 O—C—O 的伸缩振动 ( $1148 \text{ cm}^{-1}$ )。FC 的特征峰为: 酰胺 I 带特征峰, 即 C=O 的伸缩振动 ( $1647 \text{ cm}^{-1}$ ); 酰胺 II 带的特征峰, 即 N—H 的弯曲振动 ( $1544 \text{ cm}^{-1}$ ), 以及氢键与酰胺键缔合形成的 N—H 的伸缩振动峰 ( $3425 \text{ cm}^{-1}$ ), 也有可能是羟基的吸收峰; 最后是酰胺 III 带的特征峰, 即 C—N 键的弯曲振动 ( $1240 \text{ cm}^{-1}$ )。在 IC 中均存在上述两者特征峰, 由此可证明纤维素酶成功与聚丙烯酸树脂 IV 结合。

R、FC 和 IC 在 280 nm 固定激发光下, 300~500 nm 范围内荧光发射谱图如图 1(b) 所示。



(a) 红外光谱图



(b) 荧光光谱图

图1 游离纤维素酶(FC)、固定化纤维素酶(IC)及聚丙烯酸树脂IV(R)光谱图

FC 在 336 nm 处有一较强荧光特征峰; R 在检测

范围内并未出现明显的荧光发射峰,说明聚丙烯酸树脂 IV 作为 IC 的固定载体,对 IC 荧光检测的影响可忽略;IC 于 336 nm 处同样检测到纤维素酶特征荧光发射峰,说明 IC 中已固定纤维素酶,与红外光谱分析结果相同。而在相同浓度、相同稀释倍数下,IC 荧光峰略低于 FC 荧光峰,由此证明固定化过程中有一定酶量损失,部分纤维素酶固定于载体上。

在相同的实验条件(50 °C, pH 4.0)下测定了相同酶量的 FC 与 IC 酶活,得出酶活固定率为 45.5%。由于固定方式为物理吸附,固定化及回收过程中的酶量及酶活损失是固定率降低的重要因素。

在 IC 的回收实验中,随着回收次数的增加,其酶活逐渐减小,回收 4 次后,其活性分别为原 IC 酶活的 94.8%、90.9%、87.0%、81.4%。重复使用时,酶活损失较少,且降低速率较为稳定。造成回收后固定化纤维素酶活性损失的可能因素为回收操作过程中部分纤维素酶从载体上脱落及部分固定化纤维素酶失活。

## 2.2 FC 和 IC 的最适反应条件

不同 pH 条件下 FC 与 IC 的酶活如图 2(a)所示。随着缓冲液 pH 值的增加,FC 与 IC 酶活性均呈现出先升后降的趋势。在 pH 值低于 3.5 时,IC 酶活略高于 FC;而 pH 高于 4.0 时,则相对较低。这是由于聚丙烯酸树脂 IV 是阳离子型载体,含有大量叔胺基,纤维素酶与其结合固定后,反应区域比溶液的整体环境碱性略强,故使得 IC 的最适反应 pH 向酸性偏移。

不同温度条件下,FC 与 IC 的酶活如图 2(b)所示。酶催化反应速率随着环境温度的升高而加快,但高温也使酶蛋白空间结构发生改变,发生热失活。FC 和 IC 的最适反应温度均为 50 °C,在 50~80 °C 范围内,IC 的酶活相比 FC 下降得更为平缓,耐热性提高。这是由于纤维素酶被吸附固定于载体上,阻碍了蛋白质分子链的伸展,空间结构改变更为困难,提高了 IC 的耐热性。

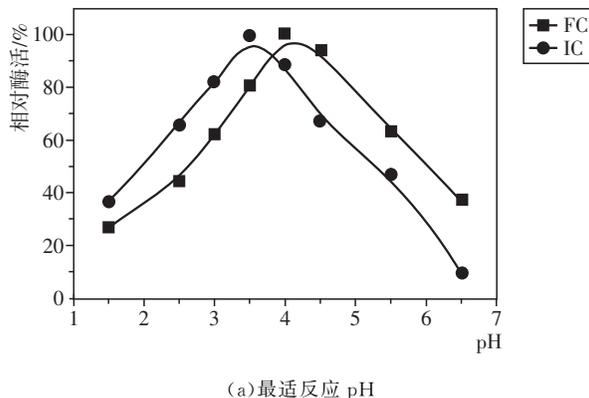
## 2.3 FC 和 IC 处理棉纤维

### 2.3.1 酶解产物

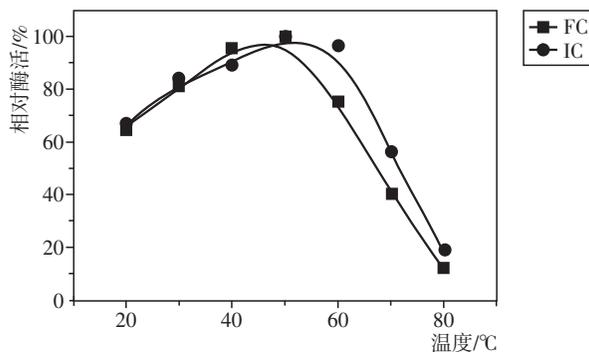
图 3 为相同 CMC 酶活的 FC 与 IC 在相同条件下处理棉纤维时,水解液中还原糖含量变化情况。FC 在前 1 h 还原糖含量增加较快,1 h 后增长逐渐减缓,酶解速率降低。由于反应初期水解液中产物含量比较低,底物抑制作用不明显,FC 可保持较大催化速率;随着反应进行,产物抑制作用增大;且 FC 耐热性较差,出现热失活,使得水解速率逐渐变小。

而 IC 在检测的 4 h 内持续保持一定的水解速率,产物稳定增长。IC 分子体积较大,与棉纤维反应时,

受到的空间阻力大,初始反应速率较低。而催化过程中,底物抑制作用相对较小,热失活不明显,水解速率基本保持稳定,有利于实际生产中的设计与监控。



(a) 最适反应 pH



(b) 最适反应温度

图 2 游离纤维素酶(FC)与固定化纤维素酶(IC)

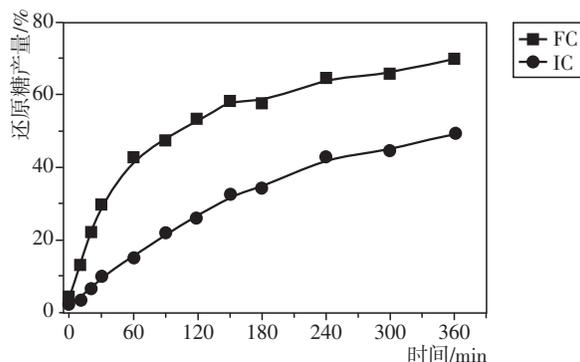


图 3 棉纤维水解液中还原糖量的变化

### 2.3.2 棉纤维结构

图 4 为经 IC 处理前后棉纤维的表面及截面的 SEM 图。原棉纤维带有天然卷曲,内部中空的管状结构(图 a);其表面附有果胶、蜡质等疏水性物质,呈脊状或沟状(图 b);截面卷曲呈“肾形”,可见中空(图 c)。经固定化纤维素酶处理后,其表层纤维素发生剥皮反应。在振荡作用下,初生胞壁随表层纤维素被除去,暴露出纤维束(图 e)。同时,在酶解作用下,中空结构发

生变化(图 f),纤维卷曲减少甚至消失,呈扁平状(图 d)。表面结构的变化及纤维卷曲的减少都有利于棉纤维的可染性及吸水性提升。

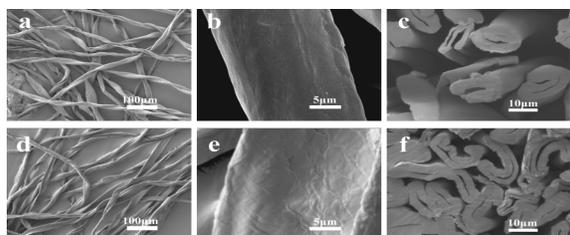


图4 原棉纤维及固定化纤维素酶处理后棉纤维的 SEM 图

### 2.3.3 棉纤维性能

表1为FC与IC处理前后棉纤维的性能变化情况。经酶处理的棉纤维的失重率、果胶去除率、结晶度、可染性及吸水量均高于原棉纤维。这是由于纤维素酶的催化作用,水解去除了纤维表面大量的纤维素,并在搅拌作用下剥离了纤维素表层的果胶等非纤维素杂质。水解作用大量发生在非晶区,结晶区比例增大,使得棉纤维结晶度升高;纤维素、果胶的去除造成了纤维的失重;疏水性杂质的去除使得大量纤维素露出,大大增强了纤维的可染性,一定程度上提高了棉纤维的可染性和吸水性。

表1 处理前后棉纤维的性能

样 品	失重率 /%	果胶去 除率/%	结晶度 /%	上染率 /%	吸水量 /g·g <sup>-1</sup>
未处理的原棉纤维	/	/	73.0	20.5	<0.5
FC处理的棉纤维	4.3	62.3	77.1	90.3	14.7
IC处理的棉纤维	1.0	35.9	80.0	88.8	11.5

注:各数值误差均低于5%。

通过比较发现,经FC处理的棉纤维失重率、果胶去除率、可染性及吸水量均高于IC处理的棉纤维,而结晶度略低。这是由于FC可渗入棉纤维内部,其催化水解作用相对不受控制,使得棉纤维内部的空隙增大,结晶区也发生水解反应,更多杂质被去除,可染性、吸水性增强。同时,纤维结构破坏得更严重,失重率增

加,这也成为纤维强度下降的因素之一。对于IC而言,由于固定后体积增加,难以透过表层的空隙渗入棉纤维内部,催化水解反应主要集中在表层,故IC处理的棉纤维的失重率相对较小,对棉纤维的损伤及其力学性能的影响小;果胶部分去除,可染性也略升高;催化水解反应主要发生在非晶区,结晶度升高。

## 3 结论

(1)以聚丙烯酸树脂IV作为载体,吸附结合纤维素酶,成功制备了固定化纤维素酶,其热稳定性提高,酶活固定率和4次回收率分别为45.5%和81.4%。

(2)制备的pH敏感型固定化纤维素酶能够有效应用于棉纤维处理。由于其空间位阻较大,将水解反应控制在纤维表面,保持较稳定的催化水解速率,实际操作中可控性更强,能有效减少不可逆的纤维损伤。

(3)固定化纤维素酶在处理过程中能部分去除棉纤维表面果胶等杂质,暴露纤维束,提高可染性;改变纤维结构,减少卷曲与扭转,有利于织物吸水性、吸湿性及透气性的提高。

## 参考文献:

- [1] 刘磊,陆必泰.棉织物的酸性纤维素酶抛光工艺[J].印染,2012,38(3):37-39.
- [2] 刘晶晶.新型可回用两水相体系中水溶性固定化纤维素酶降解纤维素[D].上海:华东理工大学,2013:123.
- [3] 陈霞,刘潇,赵光辉,等.智能型高分子载体的设计与制备及其固定化酶的研究进展[J].材料导报,2010,24(23):130-134.
- [4] 孙盈,田永强,赵丽坤.纤维素酶的CMC酶活测定条件的研究[J].食品工业科技,2013,34(2):68-71.
- [5] 李环,陆佳平,王登进.DNS法测定山楂片中还原糖含量的研究[J].食品工业科技,2013,34(18):75-77.
- [6] 晋平平,贺江平,奉先波.棉织物酶前处理工艺及其染色性能研究[J].纺织科技进展,2016,(8):19-23.

## Immobilized Cellulase and Its Effect on Cotton Fibers

GUO Chen-cen, ZHANG Yu, ZHANG Yong-kui, XIE Tong-hui, YANG Kun\*

(School of Chemical Engineering, Sichuan University, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** Polyacrylic resin IV of pH sensitive resin was used as carrier for immobilization of cellulase to ensure biotreatment of cellulose. The results showed that cellulase was immobilized on resin. It was dissolved under acid condition and precipitated under neutral condition. Activity fixed rate and recovery rate were 45.5% and 81.4%, respectively. Compared with free cellulase, immobilized cellulase had higher thermal stability. In scouring process, immobilized cellulase remained stable catalytic rate. The crystallinity index, water adsorption and dyeability of cotton were all increased and fiber crimp was decreased. Cotton treated with immobilized cellulase showed less damage.

**Key words:** cellulase; pH sensitive resin; cotton fiber; enzymatic treatment