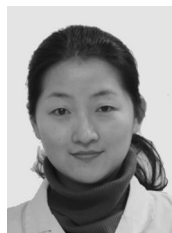


doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2013.03.012

固定化 β -葡萄糖苷酶填充床反应器的研究



WEI Ce

韦策^{1,2,3}, 陆青山^{1,2}, 勇强^{1,2}, 余世袁^{1,2*}

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏南京 210037; 2. 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室, 江苏南京 210037; 3. 南京工业大学制药与生物工程学院, 江苏南京 211816)

摘要: 以多孔陶瓷球为载体, 戊二醛为交联剂, 制备了固定化 β -葡萄糖苷酶, 将固定化酶装填于填充床反应器中处理纤维二糖-葡萄糖混合糖液, 考察固定化酶连续酶解纤维二糖的条件和使用稳定性。实验结果表明: 反应器酶解混合糖液的最适 pH 值 4.8、温度 60 °C; 随着底物进料流速的增加, 转化率逐渐下降, 而体积生产效率不断提高; 当进料流速在 5.47 mL/min 时, 反应器转化率为 91.7%, 体积生产效率为 8.98 g/(L·h), 在此流速下, 反应器连续酶解 10 d, 流速稳定, 转化率始终维持在 90% 以上, 平均转化率为 90.7%。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 固定化; 多孔陶瓷; 填充床反应器

中图分类号: TQ351; Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2013)03-0064-05

Studies on the Packed-bed Reactor of Immobilized β -Glucosidase

WEI Ce^{1,2,3}, LU Qing-shan^{1,2}, YONG Qiang^{1,2}, YU Shi-yuan^{1,2}

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Jiangsu Key Lab of Biomass-based Green Fuels and Chemicals, Nanjing 210037, China; 3. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China)

Abstract: The β -glucosidase was immobilized on the carrier of porous ceramic balls with glutaraldehyde by crosslinking reaction. The solution composed by a certain concentration of cellulose and glucose was continuously treated by immobilized β -glucosidase loaded on a packed bed reactor. The operation condition and stability of this immobilized enzyme during enzymatic hydrolysis were investigated. The results indicated that the optimum operation pH value and temperature were 4.8 and 60 °C, respectively, in the continuous hydrolysis process. Furthermore, the conversion declined and the production efficiency on volume increased with the rise of flow rate. The conversion rate was 91.7% as the substrate flow rate and production efficiency on volume were 5.47 mL/min and 8.98 g/(L·h), respectively. The mixed cellulose and glucose solution was continuously enzymatic hydrolyzed for 10 days under this stable flow rate at 5.47 mL/min. The conversion rate of cellulose could be maintained at a constant level higher than 90%, and the mean conversion rate was 90.7% in present study.

Key words: β -glucosidase; immobilization; porous ceramic ball; packed-bed reactor

第二代生物燃料乙醇是指以农林作物废料等木质纤维素原料生产的乙醇, 通常采用纤维素酶法降解木质纤维素原料的生产工艺具有可发酵性单糖得率高、反应温度低、能耗低和不污染环境等优点^[1-2]。纤维素酶是一种多组分的复合酶系^[3], 其主要组分为内切型葡聚糖水解酶、外切型葡聚糖水解酶、 β -葡萄糖苷酶, 在降解木质纤维原料的过程中, 必须依靠这 3 种组分的协同作用才能完成^[4]。目前广泛使用的里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 纤维素酶制剂中, 内切型及外切型葡聚糖水解酶活力较高, 而 β -葡萄糖苷酶的活力很低, 在纤维素酶解过程中容易造成纤维二糖的累积, 对反应形成反馈抑制。因此, 在木质纤维原料的酶解过程中, 加入适量外源性的 β -葡萄糖苷酶, 是提高酶解得率和葡萄糖产量的

收稿日期: 2012-09-25

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(201004001); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(无编号); 江苏高校科技创新团队资助项目(无编号)

作者简介: 韦策(1977-), 女, 江苏淮安人, 工程师, 博士生, 主要从事酶固定化的研究工作

* 通讯作者: 余世袁, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源生物降解与转化的研究; E-mail: syu@njfu.edu.cn.

有效措施之一^[5]。杨静^[6]对木质纤维原料分段酶水解技术进行研究,通过固液分离技术解除了酶水解反应过程中的产物抑制影响,把纤维素酶一段水解反应转化为三段(9 h + 9 h + 12 h)水解反应,大大提高了酶水解得率和缩短了酶水解时间,收集三段酶水解的上清液(其中纤维二糖和葡萄糖分别为 26.93 和 16.88 g/L),向其加入 1 U/mL 的 β -葡萄糖苷酶,水解一定时间后,纤维二糖降解率达到 90% 以上。本研究以价廉易得,化学稳定性好,且机械强度高的多孔陶瓷球为载体,进行 β -葡萄糖苷酶的固定化操作,对该固定化酶连续酶解纤维二糖-葡萄糖混合糖液(模拟木质纤维原料分段酶水解产物中的糖组成^[6])的工艺进行研究,旨在建立高活性、高稳定性、可反复利用的固定化酶解模式,以期为辅助木质纤维原料酶解的应用方面提供依据。

1 实验

1.1 材料和设备

多孔陶瓷球(球径约 1 mm),江西萍乡中天化工填料有限公司; β -葡萄糖苷酶(Novozyme[®] 188)、对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷(pNPG),美国 Sigma 公司;纤维二糖。UV-752 紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Ultimate 3000 高效液相色谱,美国戴安公司。

1.2 β -葡萄糖苷酶的固定

5 g 洗净干燥的多孔陶瓷球,与 3 mL 酶液在 4 °C 摇床中振荡交联反应 2 h,低温干燥,用含有 0.3 g 丙烯酸树脂油性胶黏剂的溶液(丙酮溶解)对固定化酶进行封装操作;酶液中 β -葡萄糖苷酶 36.5 U/mL,缓冲液为 pH 值 4.8、50 mmol/L 柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液,戊二醛体积分数 0.5%。用缓冲液清洗固定化酶 3~4 次直至洗液测不出酶活为止。

1.3 酶活力的测定

一个 β -葡萄糖苷酶的酶活力单位定义为每分钟水解生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。测定方法如下^[7]:0.1 mL 适当稀释的酶液或适量固定化酶与 0.9 mL 浓度为 5 mmol/L pNPG 溶液混合后,于 50 °C 水浴摇床振荡反应 10 min。立即加入 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液 2 mL 终止反应,加入 10 mL 的蒸馏水,摇匀。以 0.1 mL 蒸馏水代替酶液作空白对照,在 400 nm 下测定吸光度。根据对硝基苯酚的标准曲线求得反应所生成的对硝基苯酚的量。

1.4 糖分析方法

纤维二糖和葡萄糖采用戴安 3000 高效液相色谱仪(HPLC)分析,HPX-87H 柱(7.8 \times 300 mm, Bio-Rad),流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸,流速为 0.6 mL/min^[8]。

1.5 连续酶解实验

在一夹套柱状玻璃反应器(内径 3 cm,高度 50 cm)中装填湿质量为 400 g 的陶瓷球固定化 β -葡萄糖苷酶,总酶活约为 700 U,用排水法测定床层空隙体积或有效体积(V)约为 127 mL。反应底物为纤维二糖-葡萄糖混合糖液(模拟木质纤维原料分段酶水解产物中的糖组成^[6]),其中纤维二糖和葡萄糖的质量浓度分别为 27、17 g/L;混合糖液自下而上流入固定化酶填充床反应器,在出口处定时取样,样液迅速煮沸灭酶活分析纤维二糖和葡萄糖浓度。计算方法参见公式(1)、(2)。

$$\text{转化率} = \frac{\text{进口纤维二糖浓度} - \text{出口纤维二糖浓度}}{\text{进口纤维二糖浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{体积生产效率}(\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})) = \frac{1\text{L 流出液中葡萄糖质量} - 1\text{L 底物中葡萄糖质量}}{\text{收集 1L 流出液的时间}} \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 底物 pH 值对反应器转化率的影响

底物 pH 值分别为 4.0、4.8、5.4 的混合糖液,以 4.27 mL/min 的流速连续进入反应器,工作温度为 60 °C,对进料 2~10 h 间的产物进行分析,计算转化率,结果如图 1 所示。

由图1可知,底物 pH 值 4.8 时,填充床反应器的转化率明显高于 pH 值 4.0、5.4 的结果。底物 pH 值为 4.0 时,填充床反应器在 2~10 h 间的平均转化率为 88.6%; pH 值 4.8 时,平均转化率为 93.9%; pH 值 5.4 时,平均转化率为 88.1%。酶固定化后,对底物作用的最适 pH 值常常和游离酶不同,主要影响因素有两个:一个是扩散效应,另一个是载体的带电性质。在该酶反应器中,底物 pH 值对固定化酶填充床反应器转化率的影响较为显著,选择 pH 值 4.8 作为底物 pH 值条件。

2.2 温度对反应器转化率的影响

pH 值 4.8 的混合糖液底物以 4.27 mL/min 的流速连续进入反应器,考察夹套水浴温度分别为 50、60、70 °C 时,填充床反应器在 2~10 h 间的转化率,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,反应温度越高,反应器的转化率越大。当夹套水浴温度在 50 °C 时,填充床反应器在 2~10 h 间的平均转化率在 85% 左右;温度在 60 和 70 °C 时,平均转化率都在 94% 以上且非常接近。温度主要从两个方面影响酶的催化性能,一方面,升高温度将增加底物分子的热能,提高底物与酶分子之间接触的几率,从而加快催化反应速率;另一方面,温度的升高容易造成酶分子的变性失活。而固定化酶的热稳定性往往比游离酶好,因此可以在较高温度下催化反应,获得较高的酶反应速度,其潜在的应用就更加广泛。综合考虑转化率、避免酶热失活和生产能耗等多方面的因素,选择 60 °C 为固定化酶填充床反应器的工作温度。

2.3 底物进料流速对反应器转化率的影响

在固定化酶填充床反应器中,底物在床层中的保留时间是一个重要影响因素,可以通过改变底物进料流速来改变其在床层中的保留时间。pH 值 4.8 的混合糖液底物以不同进料流速连续进入反应器,反应器工作温度 60 °C,当反应器转化率达到稳定时,分析流出液中纤维二糖和葡萄糖浓度,得到不同进料流速下填充床反应器体积生产效率和转化率,结果列于表 1 中。

表 1 不同底物流速对填充床反应器生产效率的影响

Table 1 Effect of the substrate flow rate on the production efficiency of packed-bed reactor

| 进料流速/ (mL·min ⁻¹) flow rate | 保留时间/min retention time | 纤维二糖质量分数/ (g·L ⁻¹) cellulose concn. | 葡萄糖质量分数/ (g·L ⁻¹) glucose concn. | 葡萄糖产量/ (g·L ⁻¹) glucose yield | 体积生产效率/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹) production efficiency on volume | 转化率/% conversion rate |
|---|----------------------------|---|--|---|--|--------------------------|
| 3.53 | 35.98 | 0.69 | 46.70 | 29.72 | 6.29 | 97.5 |
| 4.27 | 29.74 | 1.44 | 45.12 | 28.14 | 7.21 | 94.7 |
| 5.47 | 23.22 | 2.35 | 44.35 | 27.37 | 8.98 | 91.7 |
| 6.10 | 20.82 | 3.17 | 43.08 | 26.10 | 9.55 | 88.2 |
| 6.96 | 18.25 | 3.69 | 42.53 | 25.55 | 10.67 | 86.3 |
| 8.03 | 15.82 | 4.70 | 41.47 | 24.49 | 11.80 | 83.7 |
| 9.27 | 13.70 | 4.39 | 40.81 | 23.83 | 13.25 | 82.1 |
| 11.20 | 11.34 | 4.85 | 40.23 | 23.25 | 15.62 | 81.4 |

由表 1 可知,随着底物进料流速的增加,固定化酶填充床反应器的转化率逐渐下降,而体积生产效率不断提高。流速为 3.53 mL/min 时,葡萄糖产量为 29.72 g/L,转化率可达 97.5%;而当流速增大到 11.20 mL/min 时,葡萄糖产量为 23.25 g/L,转化率仅为 81.4%。那是因为流速越低,反应液在床层中的保留时间相对延长,酶解反应就越充分。而流速太慢会使反应耗时较长,致使体积生产效率低下;如流速为 3.53 mL/min 时,反应器体积生产效率仅为 6.29 g/(L·h),流速增大到 11.2 mL/min 时,反应器体积生产效率可达 15.62 g/(L·h)。在实际生产过程中,需要综合考虑转化率、反应能耗、体积生产效

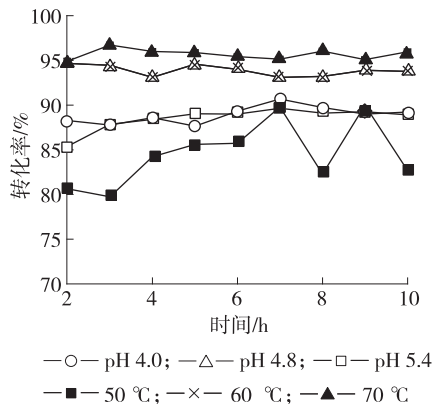


图 1 底物 pH 值和温度对填充床反应器转化率的影响

Fig. 1 Effects of pH value and temperature on the conversion rate of the packed-bed reactor

率等多方面因素,选择合适的底物进料流速。

2.4 填充床反应器的酶解历程

以转化率达到 90 % 的进料流速 5.47 mL/min,使 pH 值 4.8 的混合糖液底物连续进入反应器,反应器工作温度 60 °C,多次取样分析流出液中纤维二糖和葡萄糖的质量浓度,得到填充床反应器的酶解历程,结果如图 2 所示。考虑到底物进料前,反应器中储存了体积约为 127 mL 酶缓冲液,所以除去这部分体积的数据。

由图 2 可知,在反应器操作 23~60 min 的过程中,转化率随着酶解时间的延长逐渐增大,当进料 60 min 后,转化率稳定在 90 % 以上,流出液中纤维二糖和葡萄糖趋于稳定;在 60~240 min 内,纤维二糖的平均质量浓度为 2.34 g/L,葡萄糖 44.23 g/L。在木质纤维原料分段酶水解产物中的葡萄糖含量较低,纤维二糖含量较高,显示出反应体系中 β -葡萄糖苷酶的不足^[6, 9-10]。将上述水解液用固定化 β -葡萄糖苷酶处理后,纤维二糖的含量迅速下降,能够有效消除因纤维二糖积累而造成的反馈抑制,设想将木质纤维原料酶水解和固定化 β -葡萄糖苷酶偶联,木质纤维原料水解液中葡萄糖比例会得到明显提高。

2.5 填充床反应器的连续酶解稳定性

将 pH 值 4.8 的混合糖液底物以 5.47 mL/min 的流速连续进入反应器,反应器工作温度 60 °C,在连续酶解 10 d 的历程中,每天定时取样分析流出液中纤维二糖和葡萄糖的质量浓度,计算反应器的转化率,结果如表 2。

由表 2 可知,连续反应的 10 d 内,反应器的流速稳定,转化率始终维持在 90 % 以上,平均转化率为 90.7 %。表 2 中列出连续酶解 10 d 中,每天对流出液中的纤维二糖和葡萄糖的分析结果,可以看出纤维二糖和葡萄糖质量浓度非

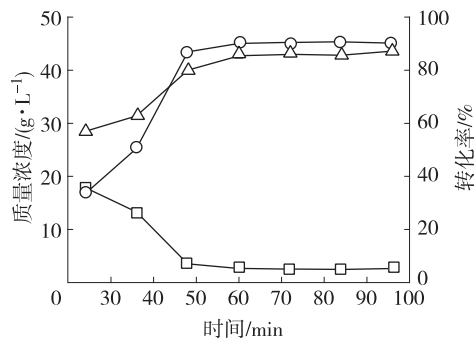
非常稳定,平均为 2.51 g/L 和 44.49 g/L。可见,填充床反应器连续酶解的稳定性很好,具有工业化应用的潜力;我国农作物秸秆等木质纤维原料产量丰富,且价格低廉,将分段酶解操作和固定化 β -葡萄糖苷酶反应器偶联,能够有效缩短酶解时间和提高水解液中葡萄糖比例,可进一步发酵生产酒精、有机酸、单细胞蛋白等工业产品^[11],其社会效益和经济效益都将是十分显著的。

3 结论

3.1 陶瓷球固定化酶填充床反应器酶解混合糖液的最适 pH 值 4.8、温度 60 °C。

3.2 随着底物进料流速的增加,陶瓷球固定化酶填充床反应器的转化率逐渐下降,而体积生产效率不断提高。流速为 3.53 mL/min 时,反应器的转化率可达 97.5 %,但体积生产效率仅为 6.29 g/(L·h);而当流速增大到 11.2 mL/min 时,转化率仅为 81.4 %,而体积生产效率高达 15.62 g/(L·h)。

3.3 底物进料速度为 5.47 mL/min 时,填充床反应器连续酶解 60 min 以后,对纤维二糖的转化率达到平衡,稳定在 90 % 以上;反应器连续酶解 10 d,流速稳定,平均转化率为 90.7 %;说明陶瓷球固定化酶填充床反应器连续酶解的稳定性很好,可用于辅助木质纤维原料的水解。



质量浓度 mass concn.:

—△— 葡萄糖 glucose; —□— 纤维二糖 cellulbiose;
—○— 转化率 conversion

图 2 填充床反应器的酶解历程

Fig. 2 The enzymolysis course of the packed-bed reactor


表 2 填充床反应器连续酶解 10 d 的反应历程中纤维二糖和葡萄糖

Table 2 The enzymolysis course of the packed-bed reactor for 10 d

| 时间/d time | 纤维二糖/(g·L ⁻¹) cellulbiose concn. | 葡萄糖/(g·L ⁻¹) glucose concn. | 转化率/% conversion rate |
|--------------|---|--|--------------------------|
| 1 | 2.40 | 45.41 | 91.1 |
| 2 | 2.58 | 43.87 | 90.4 |
| 3 | 2.58 | 44.02 | 90.4 |
| 4 | 2.51 | 44.53 | 90.7 |
| 5 | 2.53 | 45.21 | 90.6 |
| 6 | 2.51 | 44.63 | 90.7 |
| 7 | 2.60 | 43.42 | 90.4 |
| 8 | 2.27 | 45.35 | 91.6 |
| 9 | 2.56 | 43.82 | 90.5 |
| 10 | 2.54 | 44.68 | 90.6 |

参考文献:

- [1]姚国欣,王建国.第二代和第三代生物燃料发展现状及启示[J].中外能源,2010,15(9):23-36.
- [2]WOCKEN C,AULICH T,PANSGRAU P. Renewable hydroprocessing technology and refinery integration options[C]//NPRA Annual Meeting. USA:[s. n.],2010.
- [3]高培基,曲音波,王祖农.纤维素酶解过程的分析和测定[J].生物工程学报,1988,4(4):321-326.
- [4]HAN S T,YOO Y J,KANG H S. Characteristics of a bifunctional cellulose and its structural gene[J]. J Biol Chem,1995,270(43):26012-26019.
- [5]ABDEL-FATTAH A F,OSMAN M Y,ABDEL-NABY M A. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20[J]. Chemical Engineering Journal,1997,68:189-196.
- [6]杨静.木质纤维原料分段酶水解技术的研究[D].南京:南京林业大学博士学位论文,2010.
- [7]GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure Appl Chem,1987,59(2):257-268.
- [8]KOROTKOVA O G,SEMENOVA M V,MOROZOVA V V, et al. Isolation and properties of fungal β -glucosidases[J]. Biochem,2009,74(5):569-577.
- [9]YANG J,ZHANG X P,YONG Q, et al. Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover[J]. Bioresource Tech,2010,101(13):4930-4935.
- [10]YANG J,ZHANG X P,YONG Q, et al. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration[J]. Bioresource Tech,2011,102(7):4905-4908.
- [11]SHEN X L,XIA L. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07 [J]. Process Biochem,2004,39(11):1363-1367.



本刊信息

《林产化学与工业》再次被美国《工程索引》(EI) 数据库收录

接 S & T Information Ltd. Elsevier 二次文献数据部(EI 中国办事处)通知,美国《工程索引》(Engineering Index, EI)数据库自 2013 年起将《林产化学与工业》杂志作为收录源期刊。

Elsevier 二次文献数据部主要工作是为 Elsevier 二次文献数据库(包括 Scopus、Ei Compendex、Geobase、Embase 等)处理中国期刊的二次文献数据(文章的题目,作者信息,摘要和参考文献)。《工程索引》数据库,创建于 1884 年,是目前全球最著名的三大文摘类检索数据库(SCI、EI、INSPPC)之一。目前 EI 收录的中国期刊 238 种,其中大陆 204 种,台湾 29 种,香港 5 种。

《林产化学与工业》1981 年创刊,由中国林业科学研究院林产化学工业研究所和中国林学会林产化学化工分会共同主办。期刊坚持规范学术出版工作的流程,捍卫科技论文的科学性,坚持踏实办优质刊物的理念,努力提高期刊的学术影响力。期刊入选科技部“中国精品科技期刊”、北大《中文核心期刊要目总览》、“中国科学引文数据库(CSCD)”,是 RCCSE 核心期刊、美国化学文摘(CA)的核心期刊。

《林产化学与工业》再次被工程索引(Engineering Index, EI)收录,标志着该刊的质量得到了认可,正逐渐成为国际上有影响力的学术期刊;有利于国内林产化工科技工作者加强与国际林业化工研究领域的学者的学术交流。