

固定化纤维二糖酶的研究

沈雪亮 夏黎明*

(浙江大学材料与化工学院,化学工程与生物工程系,杭州 310027)

摘 要 黑曲霉(*Aspergillus niger* LORRE 012)的孢子中富含纤维二糖酶,将这些孢子用海藻酸钙凝胶包埋后,可以方便有效地固定纤维二糖酶。固定化后的纤维二糖酶性能稳定,半衰期为 38 d,耐热性和适宜的 pH 范围均比固定化前有所增加,其 K_m 和 V_{max} 值分别为 6.01 mmol/L 和 7.06 mmol/(min·L)。利用固定化纤维二糖酶重复分批酶解 10 g/L 的纤维二糖,连续 10 批的酶解得率均可保持在 97% 以上;采用连续酶解工艺,当稀释率为 0.4 h⁻¹,酶解得率可达 98.5%。玉米芯经稀酸预处理后,其纤维残渣用里氏木霉(*Trichoderma reesei*)纤维素酶降解,酶解得率为 69.5%。通过固定化纤维二糖酶的进一步作用,上述水解液中因纤维二糖积累所造成的反馈抑制作用得以消除,酶解得率提高到 84.2%,还原糖中葡萄糖的比例由 53.6% 升至 89.5%。该研究结果在纤维原料酶水解工艺中具有有良好的应用前景。

关键词 固定化纤维二糖酶 纤维素酶 玉米芯 纤维二糖 酶水解

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0236-04

纤维素酶是一种多组分的复合酶,它包括内切型- β -葡聚糖酶(EC3.2.1.4)、外切型- β -葡聚糖酶(EC3.2.1.91)和纤维二糖酶(EC3.2.1.21,也称 β -葡萄糖苷酶)等 3 种主要组分。在将天然纤维素降解成葡萄糖的过程中,必须依靠 3 种组分的协同作用才能完成^[1,2]。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- β -葡聚糖酶活力较高,但由于纤维二糖酶的活力很低,在纤维素酶解过程中易于造成纤维二糖的累积,而纤维二糖又会对纤维素酶的催化作用形成强烈的反馈抑制。因此,采用固定化酶技术,增强反应体系中纤维二糖酶的活力,是提高纤维素水解得率和葡萄糖产量的有效措施之一^[3]。目前一般都是采用纯化的纤维二糖酶,通过吸附或包埋法固定纤维二糖酶,操作复杂,成本很高,而且酶的失活及渗漏现象比较严重。作者在前期研究工作中已发现黑曲霉菌株(*Aspergillus niger* LORRE 012)的孢子中富含纤维二糖酶,这些孢子在纤维素的酶解过程中具有明显的促进作用。本研究采用海藻酸钙凝胶包埋黑曲霉的孢子,从而实现纤维二糖酶的固定化。对这种新型的固定化酶技术进行深入研究,在学术上及可再生纤维资源转化利用方面都具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger* LORRE 012)纤维二糖酶高产菌

株,由美国 Purdue 大学可再生资源工程实验室提供。

里氏木霉(*Trichoderma reesei* ATCC 56764)纤维素酶高产菌株,来自美国菌种保存中心(ATCC)。

上述菌种在马铃薯-葡萄糖-琼脂斜面上培养 5~7 d,待孢子形成后,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 酶制剂

纤维二糖酶按文献[4]所述方法在固态发酵条件下生产,每克干酶曲含纤维二糖酶活力 432 国际单位(IU);纤维素酶按文献[5]方法制备,每克干酶曲含滤纸酶活力 144 IU,纤维二糖酶活力 10 IU。

1.3 纤维原料及预处理

将玉米芯(河北产)风干、粉碎至颗粒直径 3 mm 左右,按固液比 1:8 加入 1% 的 H₂SO₄,于 110℃ 下反应 3 h,滤干后加水清洗数次,直至 pH 5.0 左右。玉米芯纤维残渣的成分为:纤维素 57.82%,半纤维素 5.01%,木质素 21.20%,其他 15.97%。

1.4 纤维二糖酶的固定化

将固态发酵的纤维二糖酶曲用适量无菌水浸泡,仔细收集孢子悬浮液,加入海藻酸钠至终浓度为 3%,充分搅拌均匀后,用注射器滴加到 1% 的 CaCl₂ 溶液中,于 4℃ 下静置固化 10 h,形成直径为 2~3 mm 的海藻酸钙凝胶珠,每粒凝胶珠平均包埋孢子数 6.8×10^6 个,相当于 1.6×10^8 个/mL 凝胶珠,平均纤维二糖酶活力 3.4 IU/mL 凝胶珠。

收稿日期 2002-11-04,修回日期 2002-12-23。

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 29876036)。

* 通讯作者。Tel: 86-571-87951840; Fax: 86-571-87972872; E-mail: xialm@cmsce.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.5 固定化酶催化反应

1.5.1 重复分批酶解工艺 (Repeated-batch processes): 在 150 mL 玻璃反应器中加入 50 mL 酶解底物和一定量的固定化凝胶珠, 在 pH 4.8、50 °C 条件下反应一定时间后, 倾出反应液, 加入新鲜底物继续进行下一批酶解反应, 如此重复多批。

1.5.2 连续酶解工艺 (Continuous process): 在 250 mL 柱式反应器(内径 2.8 cm, 内高 40 cm) 中装填凝胶珠, 填充率为 70%, 反应器在蠕动泵作用下由底部进料, 顶部出料。在 pH 4.8、50 °C 及特定稀释率下, 定时取样测定出口处的葡萄糖浓度并计算酶解得率。

1.6 分析测定方法

滤纸酶活力和纤维二糖酶活力按照 IUPAC 推荐的国际标准方法测定^[6]。一个滤纸酶活力国际单位(FPIU)等于酶促反应中生成 1.0 μmol 葡萄糖(以还原糖表示)的酶量; 一个纤维二糖酶活力国际单位(CBIU)等于标准反应条件下每分钟生成 2.0 μmol 葡萄糖的酶量(以纤维二糖为酶解底物)。

还原糖含量采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定, 葡萄糖含量采用葡萄糖氧化酶法测定^[6]; 纤维二糖和木糖含量采用 Waters 高效液相色谱分析(HPX-87P 糖柱); 总还原糖含量减去葡萄糖、纤维二糖和木糖的含量即为其他纤维寡糖的含量。酶解得率按下式计算:

酶解得率(%) = (葡萄糖量 × 0.9 × 100) / 底物中碳水化合物总量

2 结果和讨论

2.1 纤维二糖酶的固定化

将黑曲霉(*Aspergillus niger* LORRE 012) 的孢子浸泡在 pH 4.8、0.05 mol/L 的醋酸缓冲液中, 12 h 后在浸出液中可测出纤维二糖酶活力, 更换新的缓冲液继续浸泡 12 h 并进行测定, 如此重复 10 批后仍能在浸出液中测出纤维二糖酶活力。由此可知, *A. niger* LORRE 012 的孢子中富含纤维二糖酶, 因而采用海藻酸钙包埋孢子的方法取代直接包埋纤维二糖酶是行之有效的。包埋后的孢子在酶解温度(50 °C)下不会萌发, 但可以在凝胶珠内缓慢地释放出纤维二糖酶。由于纤维二糖酶的分子较大, 易于被海藻酸钙凝胶网格所滞留, 而纤维二糖、葡萄糖等小分子在凝胶珠内的活动则比较方便, 这与固定化酶的效果相当, 而且用海藻酸钙固定孢子比直接固定酶蛋白更为方便, 对酶活的影响也相对较小。

将游离孢子和固定化凝胶珠分别保持在 pH 4.8、50 °C 的环境中, 每隔一定时间测定其剩余活力, 以初始酶活力为 100%。结果游离孢子的纤维二糖酶在 24 h 就只剩下初始活力的 32%, 而固定化凝胶珠中纤维二糖酶的半衰期为 38 d (图 1), 显示了良好的稳定性。

2.2 酶的耐热性

将游离孢子和固定化凝胶珠先在不同温度下(30 ~ 90 °C)保温 1 h, 然后分别在 pH 4.8、50 °C 条件下测定剩余酶活力, 以各自的最高酶活力为 100%。结果表明(图 2), 固定化凝胶珠中纤维二糖酶的热稳定性有较大的提高, 在 70 °C 以

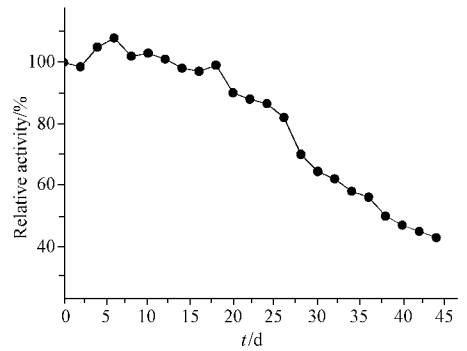


图 1 固定化凝胶珠中纤维二糖酶的稳定性

Fig.1 Stability of cellulase in the immobilized beads

下均较为稳定, 而游离孢子的纤维二糖酶在温度大于 50 °C 时稳定性迅速下降。

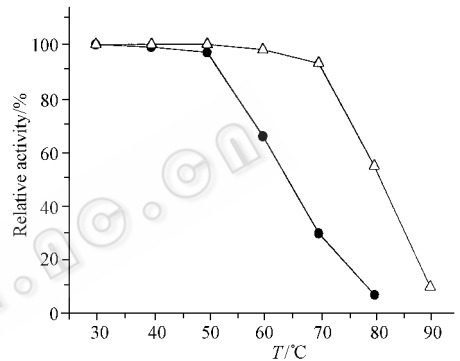


图 2 纤维二糖酶的耐热性

Fig.2 Thermal stability of cellulase

● Cellulase of free spores; △ Cellulase in the immobilized beads

2.3 酶反应的适宜 pH 值

在 50 °C 条件下, 将游离孢子和固定化凝胶珠分别置于不同 pH 值的缓冲液中测定活力, 两者均以各自的最高酶活力为 100%。结果表明(图 3), 两种反应体系中纤维二糖酶的最适反应 pH 值都为 4.8, 但固定化凝胶珠中酶的适宜 pH 值范围较大, 在 pH 3.0 ~ 5.0 内, 酶活力均可保持在较高水平, 这一特性在利用纤维原料同步糖化发酵生产有机酸类的工艺中将具有良好的应用前景。

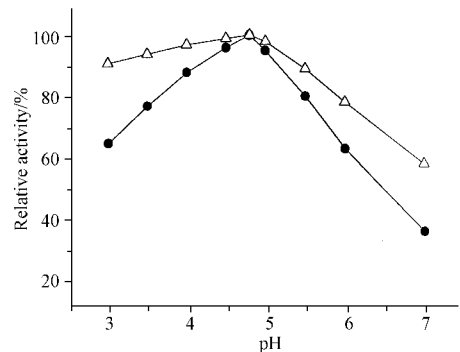


图 3 pH 对纤维二糖酶活力的影响

Fig.3 Effects of pH value on cellulase activity

● Cellulase of free spores; △ Cellulase in the immobilized beads

2.4 酶反应动力学常数

底物浓度对游离孢子和固定化凝胶珠中纤维二糖酶催化速率的影响程度不同,当底物浓度大于 10 mmol/L 时,游离孢子中的纤维二糖酶出现了底物抑制现象,而固定化凝胶珠中的纤维二糖酶在此浓度下未受到抑制(图 4)。用 Lineweaver-Burk 作图法,得到游离孢子和固定化凝胶珠中纤维二糖酶的 K_m 值分别为 2.46 mmol/L 和 6.01 mmol/L, V_{max} 值分别为 8.82 mmol/(min·L) 和 7.06 mmol/(min·L)。与游离孢子反应体系中的纤维二糖酶相比,固定化凝胶珠中酶的传质阻力较大,所以其 K_m 值较高而 V_{max} 值有所下降,这一结果与 A. F. Abdel-Fattah 等人的报道是一致的^[3]。

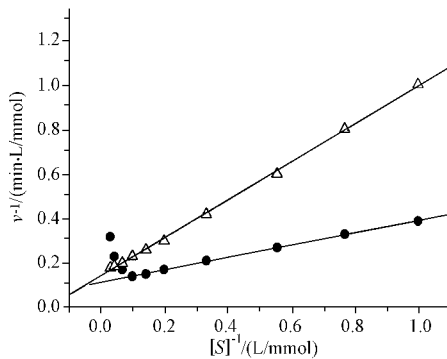


图 4 纤维二糖酶的 Lineweaver-Burk 图($1/v-1/[S]$)

Fig.4 Lineweaver-Burk plots for cellobiase

● Cellobiase of free spores; △ Cellobiase in the immobilized beads

2.5 重复分批酶解试验

以 10 g/L 的纤维二糖为底物进行重复分批酶解试验,结果表明(图 5)固定化凝胶珠中纤维二糖酶的催化性能相当稳定,且催化效率较高,重复利用 10 批仍能保持 97% 以上的酶解得率,这一结果对于提高酶的利用率,简化工艺流程,降低酶解成本等具有重要意义。

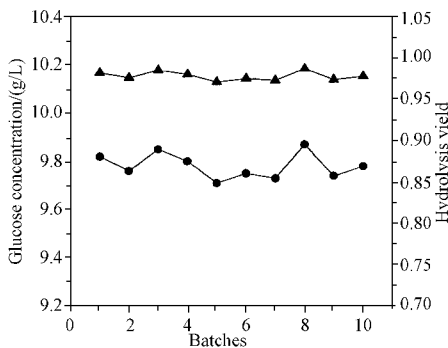


图 5 固定化纤维二糖酶重复分批酶解 10 g/L 纤维二糖

Fig.5 Repeated batch hydrolysis processes on 10 g/L cellobiase by immobilized cellobiase

● Concentration of glucose (g/L); ▲ Yield of enzymatic hydrolysis

2.6 连续酶解试验

以 10 g/L 纤维二糖为底物,比较了不同稀释率下固定化纤维二糖酶的反应效率。图 6 为反应体系达到稳态时出口处的测得值,结果表明,随着稀释率的减小,出口葡萄糖浓度

逐步增加,酶解得率也依次提高。当稀释率为 0.4 h⁻¹ 时,酶解得率可达 98% 以上,继续降低稀释率,对提高酶解得率的效果不大,而且会延长酶解时间,增加反应能耗,故以 0.4 h⁻¹ 的稀释率较为适宜。

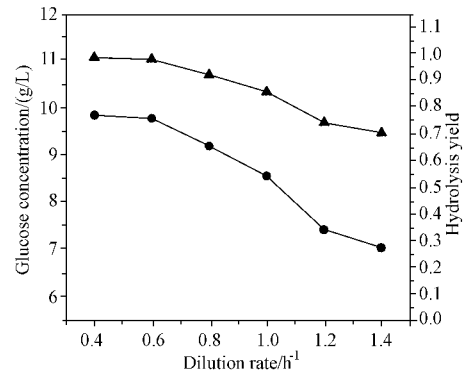


图 6 不同稀释率下固定化纤维二糖酶连续酶解 10 g/L 纤维二糖

Fig.6 Continuous hydrolysis process on 10 g/L cellobiase by immobilized cellobiase at different dilution rates

● Concentration of glucose (g/L); ▲ Yield of enzymatic hydrolysis

2.7 固定化纤维二糖酶在纤维原料酶水解中的应用

采用经稀酸预处理后的玉米芯纤维残渣(100 g/L)为酶解底物, *T. reesei* 纤维素酶用量为 15 FPIU/g 底物,在 50 ℃、pH 4.8 条件下降解 48 h,去除残渣,取水解液进一步用固定化纤维二糖酶进行糖化处理,结果如表 1 所示。

表 1 固定化纤维二糖酶对玉米芯水解液的糖化作用

Table 1 Saccharification of the corn cob hydrolysate by the immobilized cellobiase

Immobilized cellobiase reaction time/h	Reducing sugar/(g/L)	Composition of sugars/%			
		Glucose	Cellobiose	Xylose	Others
0	48.50	53.6	19.3	7.4	19.7
12	53.27	72.7	9.2	7.8	10.3
24	56.13	82.8	1.6	8.1	7.5
36	58.36	88.6	0	8.3	3.1
48	58.78	89.5	0	8.3	2.2

试验结果表明,玉米芯纤维残渣在 *T. reesei* 纤维素酶的作用下,水解液中还原糖浓度仅为 48.50 g/L(酶解得率为 69.5%),其中木糖含量占 7.4%,表明 *T. reesei* 酶曲中含有一定的木聚糖酶活力,水解液中葡萄糖的比例偏低,纤维二糖和其他纤维寡糖的含量较高,显现出反应体系中纤维二糖酶的不足。当上述玉米芯水解液用固定化凝胶珠进一步处理后,纤维二糖的含量迅速下降,因纤维二糖积累所造成的反馈抑制作用得以消除。在固定化纤维二糖酶和玉米芯水解液中剩余 *T. reesei* 纤维素酶的共同作用下,其他纤维寡糖也大多被降解为单糖,水解液中葡萄糖比例和还原糖浓度在 24 h 内均得到了明显增加。到 48 h 时,玉米芯纤维残渣的酶解得率提高到 84.2%,酶解所得的还原糖中葡萄糖比例升至 89.5%。玉米芯等纤维原料是廉价的可再生资源,利用 *T. reesei* 纤维素酶和固定化纤维二糖酶的协同作用,将纤维

原料转化为单糖,可进一步发酵生产酒精、有机酸、单细胞蛋白等工业产品,其社会效益和经济效益都将是十分显著的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Tolan J S, Foody B. Cellulase from submerged fermentation. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1999, **65**: 41 - 67
- [2] Esterbauer H, Steiner W, Labudova I *et al.* Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. *Bioresources Technology*, 1991, **36**: 51 - 65
- [3] Abdel-Fattah A F, Osman M Y, Abdel-Naby M A. Production and

immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. *Chemical Engineering Journal*, 1997, **68**: 189 - 196

- [4] XIA L M (夏黎明). Cellobiase Production by a Selected *Aspergillus niger* Strain in Solid State Fermentation. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 1999, **25**(2): 1 - 5
- [5] Xia L M, Cen P L. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 1999, **34**: 909 - 912
- [6] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257 - 268

Studies on Immobilized Cellobiase

SHEN Xue-Liang XIA Li-Ming*

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Cellulosic material is the most abundant renewable carbon source in the world. Cellulose may be hydrolyzed using cellulase to produce glucose, which can be used for production of ethanol, organic acids, and other chemicals. Cellulase is a complex enzyme containing endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) and cellobiase (EC 3.2.1.21). The hydrolysis of natural cellulose to glucose depends on the synergism of these three components. The mostly used cellulase produced by *Trichoderma reesei* has high activity of endoglucanase and exoglucanase, but the activity of cellobiase is relatively low. Therefore, improving the activity of cellobiase in cellulase reaction system is the key to enhance the sacchrification yield of cellulosic resources. *Aspergillus niger* LORRE 012 was a high productivity strain for cellobiase production. It was found that the spores of this strain were rich in cellobiase. In this work, the cellobiase was immobilized efficiently by simply entrapping the spores into calcium alginate gels instead of immobilizing the pure cellobiase proteins. The immobilized cellobiase was quite stable, and its half-life was 38 days under pH 4.8, 50°C. The thermal stability of the immobilized cellobiase was improved, and it was stable below 70°C. The suitable pH range of the immobilized cellobiase was pH 3.0 ~ 5.0, with the optimal pH value 4.8. The K_m and V_{max} value of the immobilized cellobiase were 6.01 mmol/L and 7.06 mmol/min·L, respectively. In repeated batch hydrolysis processes, 50 mL of substrate (10 g/L cellobiose) and 10 mL of immobilized beads containing cellobiase were added into a 150 ml flask. After reacting at pH 4.8, 50°C for several hours, the hydrolysate was harvested for assay, and the immobilized beads were used for the next batch hydrolysis with the fresh substrate. This process was repeated, and the yield of enzymatic hydrolysis kept higher than 97% during 10 batches. The continuous hydrolysis process was carried out in a column reactor (inside diameter 2.8 cm, inside height 40 cm) packed with the immobilized beads. Using 10 g/L cellobiose as substrate, the hydrolysis yield reached 98% under 0.4 h⁻¹ dilution rate and pH 4.8, 50°C. After corncob was treated by 1% dilute acid, the cellulosic residue (100 g/L) was used as substrate, and hydrolyzed by the cellulase (15 IFPU/g substrate) from *Trichoderma reesei*, at pH 4.8, 50°C for 48 h. The concentration of reducing sugar in the hydrolysate was only 48.50 g/L (hydrolysis yield 69.5%). When the hydrolysate was further treated by the immobilized cellobiase, the cellobiose was hydrolyzed into glucose, and the feedback inhibition caused by the cellobiose accumulation disappeared sharply. By the synergism of immobilized cellobiase and the cellulase from *T. reesei* left in the hydrolysate, other oligosaccharides were mostly converted to monosaccharides. At 48 h, the reducing sugar concentration was increased to 58.78 g/L, the hydrolysis yield of the corncob residue was improved to 84.2%, and the ratio of the glucose in the total reducing sugar was increased from 53.6% to 89.5%. The reducing sugars converted from corncob could be used further in the fermentation of valuable industrial products. This research results were meaningful in the conversion and utilization of renewable biomass.

Key words immobilized cellobiase, cellulase, corncob, cellobiose, enzymatic hydrolysis

Received: 11-04-2002

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China (No.29876036).

* Corresponding author. Tel: 86-571-87951840; Fax: 86-571-87972872; E-mail: xialm@cmsce.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn