

基于二级酶失活模型的纤维素酶反应动力学*

张宇, 许敬亮, 余强, 袁振宏, 刘云云, 亓伟
(中国科学院广州能源研究所//中国科学院可再生能源与
天然气水合物重点实验室, 广东广州510640)

摘要: 酶催化、失活机制的模糊以及影响异相体系因素的大量存在, 使得纤维素水解的酶催化过程高度复杂, 很难为之建立机理模型。假定纤维素酶失活模型为二级反应, 由准稳态理论推导出最终产物葡萄糖浓度与时间, 初始酶浓度关系的半经验半理论模型。该模型只含两个参数, 能对试验数据很好的拟合, 相关系数 R^2 均在 0.98 以上。用 Bailey 改进的米氏方程进一步拟合不同初始酶浓度下的初速度关系, 相关系数 $R^2 = 0.9773$, 求得最大反应速度为 $2.7425 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$, 半饱和常数为 $3.0106 \text{ g}/\text{L}$ 。该模型还表明酶失活速率常数随着初始酶浓度的增加而减小, 呈线性关系。失活速度随着初始酶浓度的增加而增加。

关键词: 准稳态理论; 纤维素酶失活; 异相催化; 数学模型; 动力学

中图分类号: TK6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2011)06-0062-05

Kinetics of Cellulase Based on the Model of Second-order Enzymatic Deactivation

ZHANG Yu, XU Jingliang, YU Qiang, LIU Yun, YUAN Zhenhong, QI Wei

(Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate // Guangzhou Institute of Energy Conversion,
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Enzymatic hydrolysis of cellulose was extremely complex because of the unclear enzymatic hydrolysis, deactivation mechanisms and many factors that affect the heterogeneous system. Therefore, it is difficult to build a mechanistic model to study cellulose hydrolysis by cellulase. Under some assumed conditions such as the second-order cellulase deactivation and quasi-steady state theory, a semi mechanistic and empirical model describing the relationship between product concentration and time, the initial enzyme concentration was deduced. The mathematic model was a simple mathematic function that contained only two parameters. The experimental result was in accordance with the deduced mathematic model, where the correlation coefficients (R^2) were above 0.98. The relationship between initial enzyme concentration and initial hydrolysis rate calculated from the mathematic model showed good agreement with another type of Henri-Michaelis-Menten equation proposed by Bailey, where the R^2 was 0.9773. The maximum hydrolysis rate and half saturation constant was $2.7424 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ and $3.0130 \text{ g}/\text{L}$, respectively. It was shown from the model that the rate constant of cellulase deactivation decreased when initial enzyme concentration increased under the certain substrate concentration, and the relationship between them was linear. The cellulase deactivation speed increased with the increase of enzyme concentration.

Key words: quasi-steady-state theory; cellulase deactivation; heterogeneous catalytic; mathematical model; kinetics

* 收稿日期: 2011-06-22

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2011BAD22B01); 中国科学院知识创新工程重大资助项目(KSCX1-YW-11-A3)

作者简介: 张宇(1982年生), 男, 博士, 助理研究员; 通讯作者: 袁振宏; E-mail: yuazh@ms.giec.ac.cn

纤维素在葡聚糖内、外切酶和 β -葡萄糖苷酶等三种纤维素酶主要组分的协同作用下可被水解成葡萄糖等还原性糖,这在生物质能、造纸与制浆、食品、饲料和纺织等领域具有巨大的潜在价值。能否高效利用纤维素酶直接关系到它在各领域应用的经济性。

研究纤维素酶促反应动力学,预测催化反应规律,不仅能为纤维素酶的结构与功能之间的关系以及作用原理等研究提供试验依据,而且对于纤维素酶在实际应用中最大限度发挥催化效率也具有重大意义^[1]。过去几十年里,研究者提出了大量的动力学模型,包括经验模型与机理模型^[1-3]。经验模型如人工神经网络和响应面分析等统计模型比较容易建立,而且能很好地模拟与预测酶催化反应,但其通常描述的是一个数学函数关系,一般不能在超过模型建立的条件范围内很好应用,且不能对催化过程的机理做任何探索^[4-8]。机理模型虽能在一定程度上有助于酶促反应的机理研究,但由于方程往往偏多,参数还难以确定,使得模型的建立较困难,且模型往往还过于复杂^[2-3,9-11]。

本文基于准稳态理论和酶失活模型建立了一个简单的纤维素酶反应模型,并对试验数据进行了模拟与预测。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

纤维素酶购自宁夏和氏璧生物技术有限公司,桉木取自广东江门市的木材加工厂,40~80目过筛后,在200℃,4.0MPa,固液比1:20条件下用高温液态水处理10min,再热水充分洗涤干燥备用。

1.2 纤维素酶水解

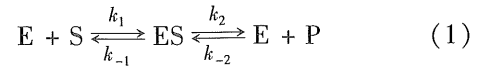
将0.314~1.256g纤维素酶粉(购自宁夏和氏璧生物技术有限公司)、5.0g桉木渣以及pH5.0的0.2mol/L醋酸缓冲液100mL混匀,于50℃,100r/min的条件下反应12h,每隔1h取样测定葡萄糖浓度。

1.3 HPLC分析

葡萄糖由Waters 600E型高效液相色谱测定,该系统由Shodex SP-0810糖柱,Waters 410示差折光仪以及Waters 717自动进样器组成。流动相为双蒸水,流速为0.6mL/min,柱温为80℃;标准样品和待测样品都经0.45 μ m水相膜过滤,进样体积为10 μ L。

1.4 模型建立

将纤维素酶E(g/L)的3组分对不溶性纤维底物S(g/L)的作用看成单一酶作用,反应的最终产物为葡萄糖P(g/L),催化过程可描述成



假定纤维底物内外表面是均相的,根据质量作用定律有复合体ES(g/L)的生成速率为

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-2}[E][P] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (2)$$

其中, k_1 和 k_{-1} 分别为纤维素酶的吸附与脱附常数,单位分别为L/(h·g),h⁻¹; k_2 和 k_{-2} 分别产物葡萄糖的生成与分解速率常数,单位分别为h⁻¹,L/(h·g)^[15]。

忽略整个反应过程中溶液体积的变化,物料平衡式可表达为

$$[S_0] = [S] + [P] + [ES] \quad (3)$$

其中 $[S_0]$ (g/L)为初始底物浓度。与底物生成速率相比,底物的分解速率往往较小,可以忽略不计($k_2 > k_{-2}$)。

当整个酶反应体系处于动态平衡(假定纤维素酶与底物的反应能快速达到该平衡),ES的生成速度与分解速度相等。将方程(3)代入方程(2)有

$$[ES] = \frac{([S_0] - [P])[E]}{K_e + [E]} \quad (4)$$

$$K_e = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

其中 K_e (g/L)为平衡常数。此时,底物葡萄糖的生成速率可表示为

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2([S_0] - [P])[E]}{K_e + [E]} \quad (5)$$

对上式积分有

$$[P] = [S_0] \left[1 - \exp\left(-k_2 \int_0^t \frac{[E]}{K_e + [E]} dt\right) \right] \quad (6)$$

式(6)描述了葡萄糖与时间,酶活的关系式。要推导出上式的详细表达式,必须要知道不同时间的酶活,即酶的失活规律。

本研究中,我们假定纤维素酶在反应过程中的失活为二级模型,即

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{de}[E]^2 \quad (7)$$

其中 k_{de} 为纤维素酶的失活常数,单位为L/(h·g)。将上式积分,并将边界条件($[E] = [E_0]$,当 $t = 0$ 时)代入有

$$[E] = \frac{[E_0]}{[E_0]k_{de}t + 1} \quad (8)$$

将方程 (8) 代入方程 (6), 并积分, 将边界条件 ($[P] = 0$, 当 $t = 0$ 时) 代入, 得到葡萄糖浓度与时间的表达式为

$$[P] = [S_0][1 - (1 + At)^{-B}] \quad (9)$$

$$A = \frac{K_e k_{de} [E_0]}{K_e + [E_0]}, B = \frac{k_2}{K_e k_{de}}$$

其中参数 A 的单位为 h^{-1} , B 为一个无量纲量。该方程描述了产物浓度与时间的一种幂函数关系, 表明产物浓度随着时间的增长而增长, 当 $t \rightarrow \infty$, $[P] = [S_0]$ 。Shen 和 Agblevor^[12] 在类似前提下也推导出一个数学模型, 表明产物浓度随着时间的增长而无限度的增加。显然超过一定时间范围, 模型将会变得不适用, 因为最大产物浓度不可能超过 $[S_0]$ 。本文中提出的模型将不遭受这一限制, 有着更广的实用范围。方程 (9) 是一个只含两个参数的数学模型, 非常直接描述了产物浓度与初始酶浓度, 时间的关系, 与大多其他研究者建立的模型相比, 它具有简单和参数易确定等优点, 对纤维素酶在实际应用中有着非常重要的指导意义。

2 结果与讨论

在不同加酶量的条件下, 葡萄糖的生成量与时间的关系如图 1 所示。由图可以看出, 产物葡萄糖的浓度随着初始酶浓度的增加而增加, 而葡萄糖的生成速率随着时间的增加而降低, 这主要是受酶失活, 产物积聚和底物浓度降低等因素所致^[13-14]。根据方程 (9) 对每个初始酶浓度下的试验数据进行一元非线性拟合, 结果如图 1 所示, 试验点大多非常靠近模拟线, 特别是初始酶浓度为 3.14 和 6.28 g/L 时。当初始酶浓度为 9.42 和 12.56 g/L 时, 有个别试验点与模拟线之间发生了一定偏移。在反应的开始一段时间 (约 10 h) 内, 葡萄糖与时间近似呈线性, 葡萄糖的生成速率基本保持不变, 该速率的大小主要受制于前期的预处理效果而非产物抑制和扩散限制^[3]。

模拟出的参数如表 1 所示。参数 A 值无明显变化规律, B 值随着初始酶浓度的增加而增加, 每个初始酶浓度下拟合的相关系数 R^2 均在 0.98 以上, 说明了该数学模型有较高的准确性, 完全可以用来模拟本试验范围内纤维素酶催化反应。

由方程 (5) 和 (9) 分别可以得到酶促反应的初速度 v_0 ($g / (L \cdot h)$) 为

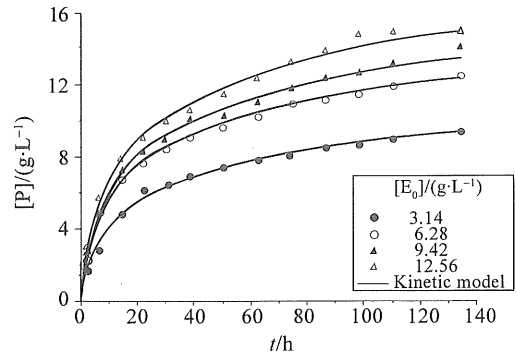


图 1 时间对葡萄糖生成量的影响

Fig. 1 Effect of time on glucose production

表 1 模型的参数

Table 1 Parameters of model

$[E_0] / (g/L)$	$A / (1/h)$	B	R^2
3.14	0.465 2	0.050 4	0.985 7
6.28	0.565 3	0.064 6	0.989 6
9.42	0.453 8	0.075 8	0.984 9
12.56	0.426 1	0.087 5	0.985 5

$$v_0 = \frac{k_2 [S_0] [E_0]}{K_e + [E_0]} \quad (10)$$

$$v_0 = [S_0] AB \quad (11)$$

根据表 1 中的参数值, 由方程 (11) 可以计算出不同酶浓度条件下的反应初速度, 将其代入方程 (5) 进行拟合, 求得 $k_2 = 0.054 9 h^{-1}$, $K_e = 3.010 6 g/L$, 相关系数 R^2 为 0.977 3, 相关性较好, 如图 2 所示。

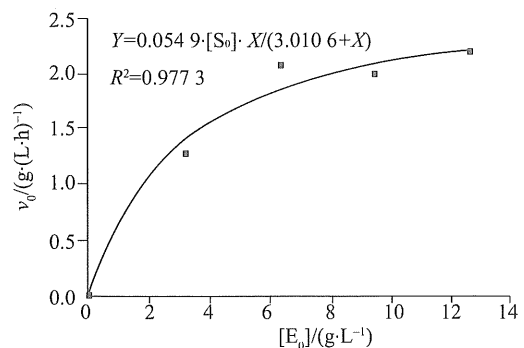


图 2 初始酶浓度对最初产物生成速率的影响

Fig. 2 Effect of initial enzyme concentration on the initial enzymatic hydrolysis rate

另一方面, Bailey^[15] 于 1989 年提出一个纤维素酶催化的动力学模型, 为

$$v_0 = \frac{v_{max} [E_0]}{K_m + [E_0]} \quad (12)$$

其中 v_{\max} ($\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$) 为最大反应初速度, K_m (g/L) 为半饱和常数。比较方程 (5) 和 (10), 可以认为 $v_{\max} = k_2 [S_0] = 2.7425 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$, $K_m = K_e = 3.0106 \text{ g}/\text{L}$, 即最大反应初速度与底物浓度成正比。式 (12) 与常规的米氏方程不同, 此处 Bailey 将 K_m 看成是一种底物的特征常数, 用来衡量底物与酶的结合力, 与底物浓度和种类有关, 与酶无关。底物浓度越高, 反应(初)速度也就越快, K_m 值越小。

另由方程 (9) 可求得酶失活常数表达式为

$$k_{\text{de}} = \frac{k_2}{K_e B} \quad (13)$$

$$k_{\text{de}} = A \frac{K_e + [E_0]}{K_e [E_0]} \quad (14)$$

将 k_2 , K_e 及 B 的值代入, 用上述两式分别计算出酶的 k_{de} , 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 纤维素酶的失活常数随着初始酶浓度的增加而减小。由图 3 还可以发现, 在本试验范围内纤维素酶 k_{de} 与初始酶浓度成线性关系 ($k_{\text{de}} = -C[E_0] + D$)。 D 值无物理意义, C 为衡量失活速率常数直线的坡度(斜率)参数, 与温度、pH、离子强度、搅拌方式与速率等因素有关。一般来说, 温度越高, 搅拌带来的剪切力越大, C 值越大。纤维素酶都有着其最佳作用的 pH 值和离子强度。在朝着最佳作用的 pH 值和离子强度上升时, C 值变小; 在背离最佳作用的 pH 值和离子强度上升时, C 值变大。

表 2 不同表达式计算的纤维素酶失活常数

Table 2 Rate constants of cellulase deactivation determined from different equations

$[E_0] /$ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$k_{\text{de}} / (\text{L} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1})$		
	Equation (13)	Equation (14)	Average
3.14	0.3609	0.3026	0.3318
6.28	0.2820	0.2778	0.2799
9.42	0.2403	0.1989	0.2196
12.56	0.2083	0.1755	0.1919

根据方程 (8) 式, 绘出不同初始酶浓度下纤维素酶活力变化曲线, 如图 4 所示。由图可以看出, 初始酶浓度越高, 酶失活的速度越快。这与其他研究者报道的未参与反应时纤维素酶的失活规律截然相反^[16-18]。研究中, 他们认为纤维素酶的表面失活是随着酶浓度的增加而减少的, 因为酶浓度越高, 处于剪切域的酶所占比例越小^[17]。反应中的与未反应的纤维素酶失活规律差异是由于造成失活的因素不同所致。纤维素酶在反应中所遭受的失

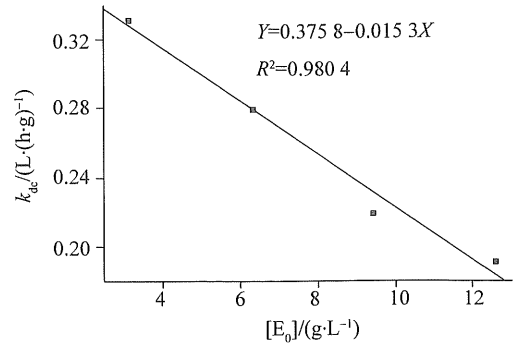


图 3 不同初始酶浓度下的酶失活速率常数

Fig. 3 Rate constants of cellulase deactivation at different initial enzyme concentrations

活因素要比未参与反应时多。未参与反应的纤维素酶失活主要受剪切、温度、pH 和离子强度等所致, 而参与反应的纤维素酶除受这些因素外, 还遭受底物抑制以及吸附失效等因素造成的反应失活, 往往这些因素还占主导地位^[1, 19]。初始酶浓度越高, 生成的产物以及没有吸附在底物上的酶量就越多, 酶表现出的活力也就越低。

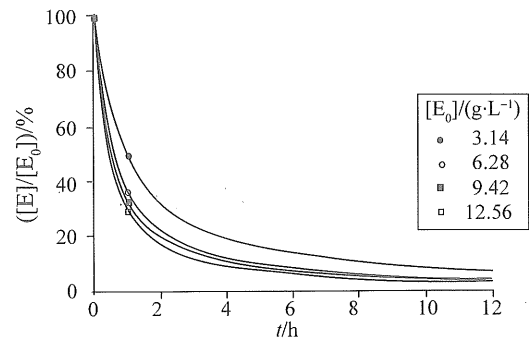


图 4 纤维素酶在反应过程中的活力变化

Fig. 4 Cellulase activity variation during the enzymatic hydrolysis process

3 结论

受温度、pH、离子强度、搅拌(剪切力)和酶-底物间的吸附/脱附等因素的影响, 纤维素酶在反应过程中不可避免地会失活。准确描述酶失活过程对于描述纤维素酶催化动力学十分重要。此外酶催化机制的模糊以及影响异相体系因素的大量存在, 也使得纤维素水解的酶催化过程高度复杂, 很难为之建立合适的动力学模型。本研究推导出数学模型只含有两个参数, 十分简单, 并能对试验数据进行准确地模拟与预测, 对于纤维素酶的动力学研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] BANSAL P, HALL M, REALFF M J, et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 833 - 848.
- [2] XU F, DING H S. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: Contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2007, 317(1): 70 - 81.
- [3] PERI S, KARRA S, LEE Y Y, et al. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis [J]. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(3): 626 - 637.
- [4] SHEN J, AGBLEVOR F A. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 41(3): 241 - 250.
- [5] MUSSATTO S I, DRAGONE G, FERNANDES M, et al. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain [J]. *Cellulose*, 2008, 15(5): 711 - 721.
- [6] KIM J K, OH B R, SHIN H J, et al. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(11): 1308 - 1312.
- [7] ZHOU J, WANG Y H, CHU J, et al. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 819 - 825.
- [8] ZHANG Y, XU J L, YUAN Z H, et al. Kinetic model study on enzymatic hydrolysis of cellulose using artificial neural networks [J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2009, 30(4): 355 - 358.
- [9] ZHENG Y, PAN Z L, ZHANG R H, et al. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(6): 1558 - 1569.
- [10] TING C L, MAKAROV D E, WANG Z G. A kinetic model for the enzymatic action of cellulase [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(14): 4970 - 4977.
- [11] ZHANG Y H P, LYND L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88(7): 797 - 824.
- [12] SHEN J, AGBLEVOR F A. Kinetics of enzymatic hydrolysis of steam-exploded cotton gin waste [J]. *Chemical Engineering Communications*, 2008, 195(9): 1107 - 1121.
- [13] CARRILLO F, LIS M J, COLOM X, et al. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(10): 3360 - 3364.
- [14] BEZERRA R M F, DIAS A A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis-Inhibition by ethanol and cellobiose [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 126(1): 49 - 59.
- [15] BAILEY C. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis [J]. *Biochemical Journal*, 1989, 262(3): 1001.
- [16] GANESH K, JOSHI J B, SAWANT S B. Cellulase deactivation in a stirred reactor [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 4(2): 137 - 141.
- [17] KAYA F, HEITMANN J A, JOYCE T W. Deactivation of cellulase and hemicellulase in high shear fields [J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 1996, 30(1-2): 49 - 56.
- [18] KIM M H, LEE S B, RYU D D Y, et al. Surface deactivation of cellulase and its prevention [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1982, 4(2): 99 - 103.
- [19] GAN Q, ALLEN S J, TAYLOR G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(7): 1003 - 1018.