

# 纤维素酶的回收

宋桂经 孙彩云 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南)

本文讨论了纤维素酶的吸附作用, 并根据酶在不同条件下的吸附, 采用丹宁回收纤维素酶的方法, 进行了酶的全组分回收。用丹宁法从糖化清液中回收游离酶, 回收率为66.7%; 而用同样的方法, 从糖化终了液中回收全组分纤维素酶, 则回收率可提高到78.8%。

**关键词** 纤维素酶; 吸附; 回收

酶法糖化纤维素类物质的研究, 已有不少报道<sup>[1-3]</sup>。由于纤维素酶的比活性较低, 使用量较大, 仅生产酶所耗成本, 占整个糖化工程的一半以上<sup>[4]</sup>。近年来, 纤维素酶的应用, 迅速地由农副产品的加工扩大到通过生物量转化生产酒精、单细胞蛋白等新能源方面来了<sup>[5-7]</sup>。纤维素酶的使用量俱增, 对昂贵的酶进行回收利用, 已经逐渐引起人们的重视。

关于纤维素酶回收方面的研究, 已有一些报告, 如超过滤法(UF法)<sup>[8-10]</sup>及Wilke的改良法<sup>[11]</sup>等。这些方法都是把糖化终了液离心, 从糖化清液中回收游离的酶。虽然回收了清液中酶的90%; 但是, 只相当于回收了最初用酶量的34.5—45.0%<sup>[4,11]</sup>。

纤维素酶反应和一般酶反应不同, 其明显区别在于纤维素酶系是多组分酶, 底物结构极为复杂。由于底物的水不溶性, 纤维素酶的吸附作用代替了酶与底物形成[E·S]复合物的过程<sup>[12,13]</sup>。

纤维素酶首先特异地吸附在底物纤维素上, 然后在几种组分的协同作用下分解成葡萄糖。随着糖化作用的进行, 被吸附的酶逐渐游离于糖化液中, 但仍有部分酶被牢牢地吸附在未被分解的底物残渣上。

为了有效地回收纤维素酶, 本文讨论了酶的吸附作用及酶的全组分回收。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 纤维素酶: 绿色木霉纤维素酶A<sub>2</sub>由陕西省微生物研究所纤维素酶基地提供; 纤维素酶R-10、TCI由日本进口; 黑曲霉纤维素酶C-40是美国进口。

2. 底物: 木浆, 其成分为: 纤维素93.8%, 木质素2.9%, 灰分3.2%, 结晶度82.8%。

3. 试剂: 丹宁为江西遵义第二化工厂生产; 聚乙二醇6000为上海合成洗涤剂二厂生产。

### (二) 方法:

1. 酶浓度测定: 用Lowry-Folin法<sup>[16]</sup>测定蛋白质浓度, 以牛血清蛋白质作标准蛋白质。

2. 酶的纸浆糖化活力测定: 以2%木浆作底物, 40℃糖化24h, 用DNS法<sup>[17]</sup>测定生成的还原糖, 以葡萄糖溶液作标准溶液。

本文于1987年1月19日收到。

纤维分解率以失重率表示之。

3. 酶的吸附与吸附酶、非吸附酶的制备: 2% 木浆加入一定量纤维素酶, 在 30℃ 吸附 10min, 用玻璃沙芯漏斗 (G3) 抽滤, 测定滤液中酶浓度 (非吸附酶) 根据下列公式求出酶的吸附率。

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{\text{原酶用量} - \text{滤液中酶量}}{\text{原酶用量}} \times 100\%$$

4. 纤维素的测定: 参照文献[18]。

5. 木质素的测定: 参照文献[19]。

6. 结晶度的测定: 参照文献[20]。

7. 清液中游离酶的回收: (1) 丹宁法: 2% 木浆加 0.5% 的纤维素酶, 30℃ 糖化 24h 的糖化终了液, 经 3500rpm 离心 15min, 取上清液, 加与酶量比为 1.0—1.1 倍的丹宁。酶与丹宁结合形成酶-丹宁复合物, 再经 5000rpm 离心 15min, 将上清糖液倒出, 沉淀物里再加入相当于丹宁用量的 0.8—1.0 倍的聚乙二醇, 后者与酶-丹宁复合物中的丹宁结合, 形成丹宁-聚乙二醇复合物沉淀, 从而使酶从酶-丹宁复合物中游离出来, 再次离心后, 上清液即从糖化清液中回收的游离酶。

(2) 超过滤法 (UF 法): 上述离心后的糖化清液, 用 10PM43mm 的超过滤膜, 在 3.5kg/cm<sup>2</sup> 下压滤, 滤膜上为回收的酶即为糖化清液中的游离酶。

8. 酶的全组分回收方式: (1) 残渣和游离酶并用法 (R-TA 法): 糖化终了液经离心后得到的残渣和从清液中回收的游离酶并用。(2) 残渣浸液和游离酶并用法 (I-TA 法): 用 10 倍量的醋酸缓冲液 (0.1M pH4.5), 将吸附在残渣上的酶浸提下来, 浸提酶液和上述清液中回收的游离酶并用。(3) 糖化终了液直接回收法 (O-TA 法): 糖化终了液, 直接加丹宁 (用量同上), 离心后得的上清液 (糖液) 和沉淀 (含丹宁与游离酶、吸附

酶所形成的复合物及底物残渣)。再向沉淀物中加聚乙二醇 (加量同上), 充分搅拌后, 离心, 上清液即回收的全组分酶液。

## 结果与讨论

### (一) 丹宁法回收纤维素酶

1. 丹宁用量: 根据糖化液中酶浓度的不同而不同。如图 1 所示。在一定范围内, 酶浓度越大, 丹宁的相对用量越少。酶浓度在 0.5mg/ml 以下时, 丹宁用量为酶的 3 倍; 而当浓度为 1.5mg/ml 以上时, 添加相当于酶浓度的一倍左右。所以在进行大量回收时, 把糖化液适当浓缩, 可大大减少丹宁用量。丹宁用量多些, 酶沉淀的快而完全, 但用量过多, 会影响酶的收

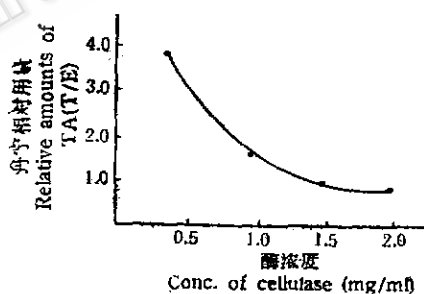


图 1 丹宁用量与酶浓度的关系

Fig. 1 Correlation of added amount of TA and concentration of cellulase

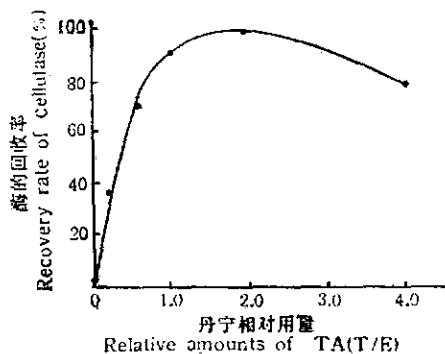


图 2 丹宁量对酶回收的影响

Fig. 2 Effect of amount of TA on the recovery of cellulase

率，如图 2 所示。这可能是由于过多的丹宁与酶结合，从而影响了酶从复合物中游离出来。降低了酶的回收率。

2. 聚乙二醇用量：聚乙二醇用量对酶的回收率影响较大，如图 3。当聚乙二醇与丹宁用量比小于 0.75 时，酶不能从丹宁-酶复合物中完全游离出来，影响了酶的回收率。根据实验结果表明，应为丹宁的 0.8—1.0 倍。实际上，由于添加的丹宁稍有过量，与酶结合的丹宁量少于最初添加的丹宁量，而且，丹宁用量与酶浓度有关，所以，聚乙二醇用量，应根据酶浓度和丹宁用量来确定。

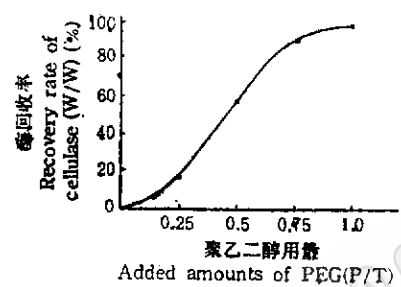


图 3 聚乙二醇用量对酶回收的影响  
Fig. 3 Effect of PEG<sub>2</sub> on the recovery of cellulase

3. 糖化液的 pH 对酶回收的影响：pH 对酶回收影响较大，如表 1 所示。在 pH 3.6—4.6 时，酶沉淀较完全。纤维素酶糖化的最适 pH 范围一般为 4.0—5.0。所以，用丹宁回收纤维素酶，糖化液的 pH 基本不用调节，直接加丹宁即可。同时，由表 1 也可以看出，丹宁、聚乙二醇复合物的形成，随 pH 升高，而增多。换言之，pH 越高，酶游离的越完全，在 pH 5—6 以上，酶的回收率最高。因此，酶-丹宁复合物，可直接用水悬浮，然后添加适量的聚乙二醇溶液。

4. 酶的回收率及回收酶的活性：按上述最适条件，在纤维素酶 A<sub>2</sub> 的水溶液中回收酶，酶的回收率及回收酶的活性如

表 2 所示。

表 1 pH 对丹宁回收纤维素酶的影响  
Table 1 Effect of pH on the recovery of cellulase by TA

pH	6.8	5.6	4.6	3.6	2.5
酶-丹宁浑浊度 Turbidity of E-T	0.303	0.450	0.510	0.565	0.438
丹宁-聚乙二醇 沉淀反应 Precipitation reaction of T-P	++++	++++	+++	++	+

表 2 丹宁法和超过滤法的比较  
Table 2 Comparison of recovery of cellulase by TA and UF

方法 Methods	MCC 活性 MCCase activity (%)	CMC 活性 CMCase activity (%)	β-糖苷酶活性 β-GCase (%)	酶回收率 Recovery of cellulase (%)
超过滤 UF	70	90	93	88
丹宁法 TA	95	77	90	97.5

对照 (Control)：纤维素酶 A<sub>2</sub> (Cellulase A<sub>2</sub>) 100%

结果表明，丹宁法回收纤维素酶是一种较好的回收方法。回收率高达 97.5%，回收酶的活性，除 CMC 活性下降较大外，其它活性均相当于原纤维素酶的 90% 以上。

### (二) 纤维素酶的吸附

1. 吸附酶与非吸附酶对底物作用效果的比较：相同浓度的吸附酶和非吸附酶，在同样条件下进行木浆的糖化，并以原纤维素酶作对照。三者在糖化过程中的吸附表现，以及对底物的作用效果明显不同，如表 3。吸附酶在糖化时，虽然不能被底物全部吸附，但是，84.7% 的酶吸附在底物上。而非吸附酶只被底物吸附了 21.7%。两者的纸浆糖化活力，虽然比较接近，分别为原纤维素酶的 68.0% 和 60.2%。而纤维分解率，吸附酶较非吸附酶高一倍多。这可能是由于吸附酶把高分

子纤维素长链，只分解成小分子的纤维寡糖所致。说明了吸附酶和非吸附酶很可能是组分不同的纤维素酶。因而对纤维素的分解起着不同的作用。

表 3 吸附酶和非吸附酶对纤维素分解的比较

Table 3 Comparison of adsorbed protein and nonadsorbed protein on decomposition of cellulase

酶 Enzymes	吸附率 Adsorbed protein (%)	糖化率 Saccharification (%)	纤维分解率 Decomposition of cellulase (%)
吸附酶 Adsorbed protein	84.7	68.0	84.8
非吸附酶 Nonadsorbed protein	21.7	60.2	40.2
对照 (纤维素酶 A <sub>2</sub> ) Control (Cellulase A <sub>2</sub> )	42.3	100	100

酶浓度 Enzyme concentration : 2.85mg/ml

反应条件 Reaction condition : 30℃ 24h

2. 吸附对酶回收率及回收酶活性的影响：纤维素酶A<sub>2</sub>、TCI、R-10的木浆糖化清液中的游离酶，用丹宁法和超过滤法进行回收，酶的吸附率对酶的回收率及回收酶的纸浆糖化活力的影响如图4。由图

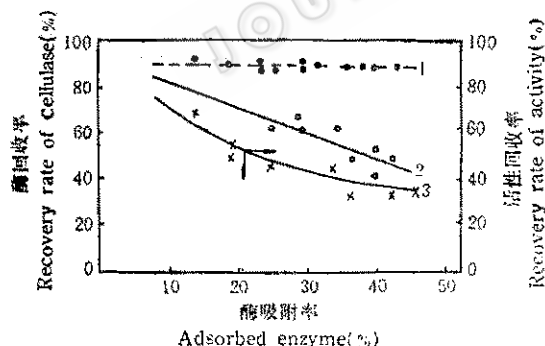


图 4 吸附率对酶的回收率及回收酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of adsorption on the recovery rate activity of cellulase

1. 游离酶 Free enzyme
2. 纤维素酶A<sub>2</sub> (丹宁法) Cellulase A<sub>2</sub> (TA)
3. 酶活性回收率 Recovery degree of activity of cellulase

4 可见，尽管糖化清液中的游离酶回收了88—92%，但由于吸附在残渣上的酶没有被回收，使回收率及回收酶的活性下降。吸附的越多，则影响越大。

### (三) 不同回收方式对酶回收率及底物作用效果的影响

按上述三种全组分回收方式 (R-TA法、1-TA法、O-TA法)，在糖化终了液回收全组分酶。酶的回收率及回收酶活性如表4所示。可见将残渣和从清液中回收的游离酶并用，回收酶的活性由53.2%提高到78.0%。但是，由于残渣体积大，连续使用有一定困难，生产上难以应用。然而糖化终了液不除残渣，直接用丹宁法，把游离于糖化液中的和吸附在残渣上的酶同时进行全组分回收 (O-TA法)，虽然，回收率及回收酶的糖化活力比 R-TA法略低些。但是工艺简单，而且比通常的仅从糖化清液中回收游离酶，回收率由66.7% 提高到 78.8%，回收酶的活性由53.2%提高到69.4%。

表 4 不同的回收方式的比较

Table 4 Comparison of different recovery methods of cellulase complex

方 法 Methods	酶的回收率 Recovery degree of cellulase (%)	糖化活性回收率 Recovery of saccharification activity (%)
全组分回收方式 Recovery of Cellulase complex		
R-TA	—	78.0
I-TA	86.6	70.0
O-TA	78.8	69.4
游离酶的回收方式 Recovery of cellulase in solution		
TA	66.7	53.0
UF	61.6	48.0

## 参 考 文 献

- [1] 铃木信一, 发酵と工业, 41(7):588—594, 1983.  
[2] 外山信男, 黄研, 1(7): 1—8, 1981.  
[3] 上田诚之助, 化学工学, 45(5):297—300, 1981.  
[4] 藤崎 静, 他: 木材学会誌, 30(7):560—568, 1984.  
[5] 外山信男, 发酵と工业, 44(7):711, 1986.  
[6] 岡田严太郎, 化学と生物, 23(1):19—21, 1985.  
[7] 陈惠忠等, 食品与发酵工业, (4):18—24, 1986.  
[8] Toyama, N. et al.: "Symp on Biosynthesis and Biodegradation of Cell Wall Component", ACS/CST Chemical Congress, Honolulu, Hawaii, 1978.  
[9] Herr, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22:1601, 1980.  
[10] Lee, S. B. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 24:2137, 1982.  
[11] Castanon, M., Wilke, C. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 1365—1372, 1981.  
[12] 大崎 寛, 他: 化学工场, 27(10):93—105.  
[13] 上久保正, 松野隆一, 化学工学, 47(5):291—296, 1983.  
[14] 西沢一俊, セルウーゼ, 南江堂, 东京, pp.92—100, 1974.  
[15] 原纳叔郎, 化学机械技术, 35, 58, 1983.  
[16] Lowry, O. M., et al.: *J. Biol. Chem.* 193—265, 1951.  
[17] 福井作藏, 還元糖の定量法, 学会センター, p. 19, 1969.  
[18] Tanaka, M. et al.: *Microbiol. Biotechnol.*, 22, 13—18, 1985.  
[19] 中野准三, リグニンの化学, ユニ广报株式会社, p. 50—64, '978.  
[20] 田中三男, 发工., 58(3):145—155, 1980.

## RECOVERY OF CELLULASE BY TANNIC ACID METHOD

Song Guijing Sun Caiyun Wang Zunong

(Institute of microbiology, Shandong university Jinan)

This paper discussed the adsorption of cellulases. Based on the adsorption of cellulases at different conditions, we proceed the recovery of cellulases with the tannic acid method. The recovery rate is only 66.7%, when the recovery is carried out with the supernatant of saccharified solution, but the recovery rate may be augmented to 78.8%, even if the same method is used, if the recovery is carried out with the whole saccharified solution.

## Key words

Cellulases; adsorption; recovery