

植物细胞壁酶水解过程的数学模拟

冯

J. SCHWARTZENTRUBER

(无锡轻工大学化学工程系, 无锡, 214036)

(法国巴黎高等矿业学校)

摘要 以实测的甜菜块根细胞壁酶水解的动力学曲线为基础, 提出一个 4 参数数学模型。编制了计算程序求取参数。讨论了该模型的应用。

关键词 模型; 细胞壁; 酶; 水解; 甜菜

中图分类号 TQ353.2

0 前 言

生物质的利用一直是生物技术研究中的一个活跃课题。70 年代在酶制剂的生产方面有了突破性进展, 推动了生物质利用的研究。80 年代初, 荷兰 Wageningen 农业大学的一个研究小组进行了用酶水解甜菜废粕的小试^[1]。此后, 丹麦 NOVO 公司和法国 ARD 公司合作开发了酶水解块根的工业流程^[8]。与此同时, 有关酶水解动力学的研究也十分活跃。

对酶水解生物质的研究始于将纤维素轻化为可发酵糖。不少人对纤维素酶水解的动力学进行了研究^[5~7]。目前对纤维素水解的机制已了解得较清楚。但对水解机理的认识越透彻, 所得到的模型就越复杂, 从而越难以应用于工业过程。

目前, 用酶将纤维素转化为可发酵糖的工艺仍未达到可工业应用的程度。人们的研究方向转向利用甜菜废粕这样的废料^[2~4], 或将酶水解生物质作为从原料中提取有用物质的一种方法, 以提高整个工艺流程的经济性。这样, 生物质的利用问题实际上已转为植物细胞壁的水解, 或称液化问题。由于细胞壁组成和结构的复杂性, 已不可能把所有的反应均用反应方程式描述, 并在此基础上建立数学模型。

然而, 如能建立实用的模型, 即使是经验的或半经验的, 对实验室研究和工业应用均将具有重要的意义。作者在这方面作了初步的尝试, 从实验数据出发归纳出一个数学模型, 并讨论其应用。

1 实 验

1.1 材料和分析

1.1.1 块根 饲用甜菜块根, 含糖 16%, 含不可溶固形物 3.5%。

收稿日期: 1996-08-30

第一作者: 冯 男, 1953 年 9 月出生, 法国博士, 高级工程师

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.1.2 酶制剂 由 NOVO 公司提供

1.1.3 不可溶固形物测定 将样品加大量水,在 85°C 下萃取 30min ,过滤后在 105°C 下烘 24h 并称重

1.1.4 还原糖的测定 用 BOEHRINGER 公司生产的酶法测定试剂测定。

1.2 水解实验

将饲用甜菜块根洗净,不加水蒸煮,然后在一打浆机内打碎 放入酶后,在 $\text{pH}5$, 50°C 下水解 5h ,这一步骤称预水解 然后取一部分物料放入一容积为 2L 的反应器内继续水解至 72h .这一过程称主水解 此水解实验的数据用于建立数学模型。

另一方法是将块根在食品加工机内打碎,然后蒸煮,再放入一带夹套的玻璃反应器 (容积 1L) 内水解。夹套内通以 50°C 水。反应器装有可调速的搅拌器 此实验用于考察各参数的影响,酶的失活,及测定物料组成等。

1.3 计算用程序和设备

计算中用到的四阶龙格-库塔法解微分方程组和参数最优化计算模块来自 HARWELL & IMSL 数学程序库。程序用 FORTRAN 语言编写。在 VAX 小型机上运算 用 PC 微机作为其终端设备。

2 结果和讨论

2.1 动力学曲线及其特征

动力学曲线指某一物理量随时间变化的曲线 实验中曾尝试用粘度、还原糖含量及不可溶固形物 (IDS) 含量来衡量水解程度。结果发现粘度与果胶质的水解有较强的关联,但与纤维素和半纤维素的水解关联较小;还原糖含量也不能准确反映水解效果。故最终确定以 IDS 含量作为衡量水解程度的标志,它反映细胞壁中不可溶分子被切割成可溶性分子 (一般为 10 个单糖残基以下) 的程度,比较符合细胞壁水解或“液化”这一术语的含义。

图 1 为 IDS 含量随水解时间的变化曲线即动力学曲线 图中的 3 条曲线分别对应 3 种不同的酶用量。从图可见:

- 1) 最初的几小时内水解很快,随后液化速度大为降低
- 2) 反应初速度随酶的用量增加而增加,但并不成正比
- 3) 水解时间很长时 IDS 含量趋于一定值。

由于水解时间较长,酶的热失活必须予以考虑。为此作以下实验:在一个 1L 反应器内用大剂量的酶进行水解。然后定时取出一定量的物料 (包括酶),与新鲜底物混合,在另一个反应器内水解 2h ,将此时间内 IDS 下降的速度作为反应的初速度。它与酶在第一个反应器内停留的时间即所谓“年龄”之间的关系见图 2。从图可见,在最初的 24h 内活力降低很小,随后酶活力显著下降。本实验中将酶放在带底物的反应器内而不是简单地放在恒温水浴内,是由于固形物的存在能显著提高酶的稳定性。因此图 2 的热失活曲线比一般的实验室研究所得曲线更接近实际。

以上诸实验构成了数学模拟的基础

2.2 数学模型的建立

根据以上观察,结合现有的对细胞壁化学组成的认识,用如下方法作若干简化和假设,建立数学模型。

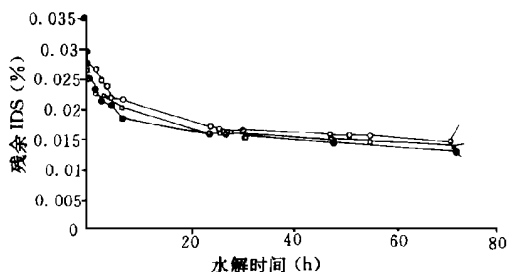


图 1 甜菜块根水解的动力学曲线

1 剂量 0.25 2 剂量 0.45 3 剂量 0.7

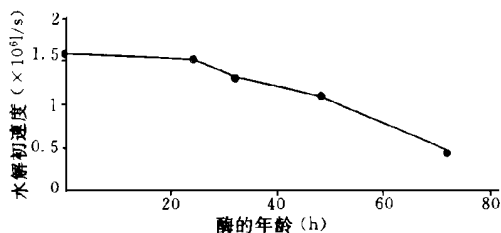


图 2 酶的年龄与反应初速度间的关系

- 1) 将水解过程表为不可溶固形物在酶的催化下被转化为可溶固形物 (SDS) 的反应
- 2) 酶的热失活为一不可逆过程,可用一个一阶微分方程描述
- 3) 在组成细胞壁的 IDS 中有一部分是不能被水解的。真正的水解反应底物是原料的 IDS 中可以水解的部分。

4) 可水解的 IDS 又可分为两部分。一部分很容易水解,记为 S_1 ; 另一部分的水解则慢得多,记为 S_2 。在预水解阶段,主要是 S_1 被迅速水解,导致 IDS 含量很快下降。在主水解阶段, S_2 的缓慢水解成为决定反应总速度的因素。

5) 这两种底物的水解各可用一带双曲型校正项的一阶微分方程表示

在以上诸假设中,假设 1) 是对水解反应的抽象和简化,是建立模型的基础。假设 2) 已为一般研究者接受且有实验依据。由此可推论,真正有效的是有活力酶 E_a 的浓度而非酶的总浓度。假设 3) 是从细胞壁的化学组成出发作的简化。在构成植物细胞壁的多糖中,木质素加上少量的结晶纤维素和不可溶蛋白质构成了不可水解的固形物。假设 4) 的基础为细胞壁的构成和观察到的动力学曲线。在构成细胞壁的多糖中,主要是位于胞间液和初级壁内的果胶物质最先被水解。只有在水解了果胶质后,半纤维素酶和纤维素酶才可能接触各自的底物。而且,果胶质因不具有微晶束结构而较易被水解。一旦果胶质被水解,细胞壁即破碎而使胞内液流出。果胶分子被切断又使粘度迅速降低。在宏观上即表现为体系的迅速液化。另一方面,即使是较难水解的纤维素,也有一部分的水解速度远高于另一部分^[8]。因此,有理由相信构成 S_1 的主要是果胶质和部分易水解的半纤维素再加上一小部分易水解的纤维素;而构成 S_2 的则为其余的半纤维素和大部分纤维素。

实际动力学曲线并非一阶微分方程。实际上,对纤维素水解导出的动力学模型大多具有双曲函数的形式。因此在模型中加入一双曲校正项。这样,最后的数学模型为:

$$-\frac{d[S]}{dt} = v_1 - v_2 \quad (1)$$

$$v_1 = k_1 [S_1] \frac{[E_a]}{k_e + [E_a]} \quad (2)$$

$$v_2 = k_2 [S_2] \frac{[E_a]}{k_e + [E_a]} \quad (3)$$

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_d [E_a] \quad (4)$$

其中 v 表示速度, $[S]$ 为可水解的 IDS 浓度, $[S_1]$ 和 $[S_2]$ 分别为 S_1 和 S_2 的浓度, t 为水解时间, $[E_a]$ 为活性酶浓度, 而 k_1, k_2, k_e 和 k_d 为模型参数

2.3 模拟方程的求解及结果

上述微分方程组的求解, 主要是 4 个参数的最优化问题。为此编写的 FORTRAN 程序由 7 个源程序文件、一个输入数据文件和一个输出文件组合而成。整个程序的计算框图见图 3。

先读入实验数据 分两类, 一类是 IDS 浓度与时间的关系, 称 $[IDS]-t$ 型; 另一类是反应初速度与酶年龄的关系, 称 $v-age$ 型。同时还读入参数的初值和其他参数值。

分别处理两种数据 对 $[IDS]-t$ 型数据, 用四阶龙格库塔法解微分方程组。对于 $v-age$ 型数据, 可直接求出反应速度。然后构造目标函数, 即计算值与实验值之差的平方和。它作为一个外部过程被调用。最后调用 ZXSSQ 程序, 求目标函数的最小值。根据目标函数的值确定下一个参数向量值, 直到相邻两次的参数值相当接近, 同时目标函数达到最小值为止。

计算在 VAX 小型机上进行。多次计算后发现, 计算可以分两步进行。第一步用 $v-age$ 数据求取 k_e 和 k_d 的值, 此时 k_1, k_2 与 $[S_1]$

和 $[S_2]$ 一起合为一个常数。第二步用所有的数据并代入已求得的 k_e 和 k_d 值求取 k_1 和 k_2 。这样可大大缩短计算时间。就计算结果而言, 两种方法得到的值十分相近。它们是:

$$\begin{aligned} k_1 &= 2.505 \times 10^{-4} s^{-1} & k_2 &= 1.010 \times 10^{-5} s^{-1} \\ k_e &= 0.0129 & k_d &= 1.666 \times 10^{-5} s^{-1} \end{aligned}$$

将以上数据代入模型, 比较计算值与实测值, 结果见图 4 和图 5。图中连续线为计算值, 离散点为实测值。图 4 只绘出了酶剂量为 0.45 L/t 时的结果, 其他剂量下的结果与图 4 相似。3 种剂量下所有数据点的平均相对误差分别为 3.40%, 3.43% 和 4.20%, 而 $v-age$ 型数据的平均相对误差为 4.63%。从实用观点看, 这样的精度能满足要求。

2.4 对模拟结果的讨论

饲用甜菜中 IDS 含量为 3.5%, 而糖用甜菜则为 5%; 而不可水解固形物含量, 两者均为 1.1% 左右。一般认为糖用甜菜 IDS 中果胶、半纤维素、纤维素和木质素含量大致在 20%~30%, 与这一结果吻合。饲用甜菜中不可水解部分含量相对高一些, 达 32.6%。由图 1 的数据估算, S_1 和 S_2 的初浓度之比大致为 1:1, 这些都是可调参数。

参数 k_1 和 k_2 分别表征了两类底物的水解性能。 S_1 的水解速度约为 S_2 的 25 倍。这一信

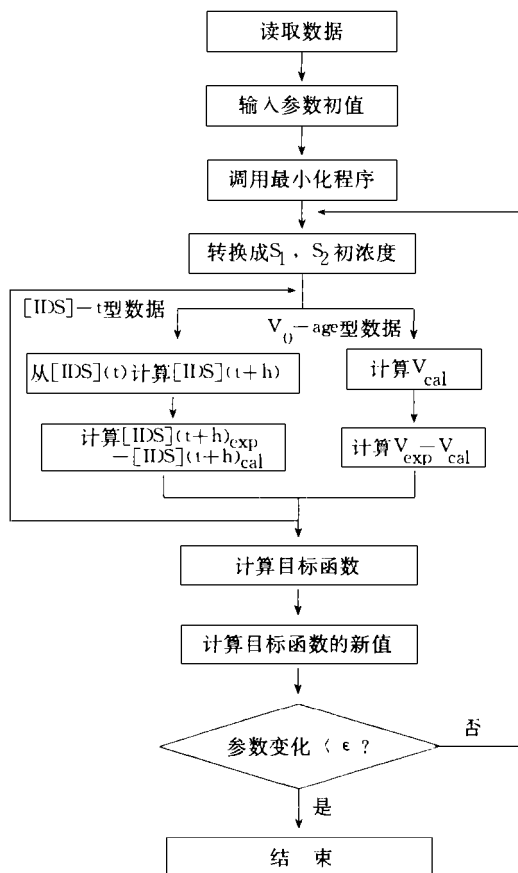


图 3 模型求解的计算框图

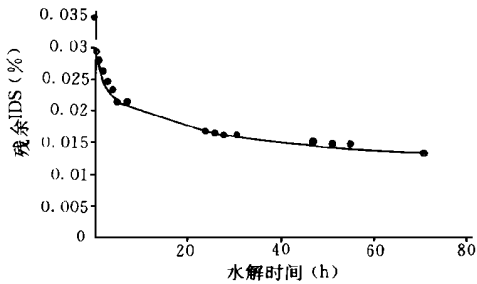


图 4 数学模拟结果 (一): 0.45l/t 剂量下水解动力学

▲ 实验值 — 计算值

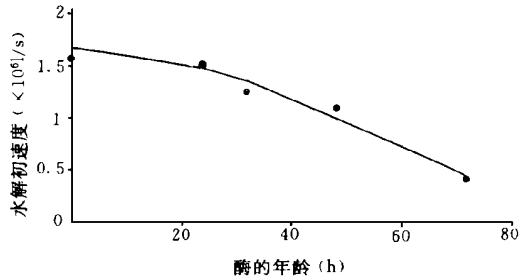


图 5 数学模拟结果 (二): 酶水解初速度与酶年龄间关系

息对酶制剂的配比有指导作用。根据这一结果,适当减少果胶酶的含量,增加纤维素酶的含量,可在不影响总水解速度的前提下减少酶用量。

k_d 反映了酶的热稳定性。当时间较长时酶活力下降很快。这一事实从技术上否定了将酶循环使用的可能性。

由以上数据可算出,饲用甜菜总的水解率不会大于 68%。对一工业流程而言,将 IDS 残留量降到 1.5% 以下是较合理的。过分追求高水解率势必大大延长水解时间,不仅使设备容积大为增加,而且大大增加了微生物污染的机会。通过模型可以计算出达到这一目标约需 30h 以上,再增加酶用量也不会明显缩短这一时间,这一结论对酶剂量的优化有重要的指导意义。

2.5 数学模型在中试工厂的应用

为检验数学模型的有效性,将中试工厂(处理能力 1t/h)试验的数据与该模型的计算结果作比较。中试过程与实验过程相似,不同之处在于:中试时用蒸汽通入块根粒子加热,相当于加入了少量的水;中试预水解时间仅为 0.5h,以节约搅拌耗能。试验采取了两种方式。

2.5.1 间歇操作 中试以间歇操作方式进行时,实际测得的 IDS 残余浓度比由模型计算出的值高 5%~7%。原因主要有二:一是预水解时间减少;二是粒子的停留时间不均匀。

预水解时间对水解的影响实际上是搅拌的影响。强烈的搅拌在水解初期是十分重要的。但它耗费大量能量。容积为 1m^3 的打浆机,电机功率即达 33kW。因此预水解时间越短越好。但迄今为止人们对糊状介质的搅拌认识还不足以提供定量的放大方法,难以将此因素包含在模型中。

中试工厂的大反应器容积为 10m^3 ,要在打浆机内重复多次操作才能填满。这样,大反应器内的粒子水解时间不完全相同,这也是造成实测 IDS 残留浓度高于计算值的原因。

尽管如此,还是可以认为该模型在间歇操作时的误差对于工业流程而言是可接受的。

2.5.2 连续操作 在中试工厂进行了连续水解试验。将打浆机视作一反应器,后面再串联 2 个反应器,构成串联操作。如果把这 3 个反应器均视作全混流,应能对上述模型积分。例如对酶活力,可积得:

$$[E_a]_3 = \frac{[E_a]}{(1 + k_d t_1)(1 + k_d t_2)(1 + k_d t_3)} \quad (5)$$

式中 t_1 , t_2 和 t_3 分别为物料在 3 个反应器内的停留时间,下标表示反应器标号。代入数据

后计得第三个反应器出口处物料的残余有效酶活力为初始活力的 17.8%, 而实际测出残余酶活力仅为初始值的 11.7%. 两者之间有显著误差

残余 IDS 浓度的计算由于方程的非线性而比较复杂但仍可求得分析解. 结果显示计算值比实测值高许多. 其原因可能是:

- 1) 实验室和中试用反应器在流体力学条件上不相似, 尤其是搅拌的作用相差很大
- 2) 两种反应器几何尺寸相差太大且不相似
- 3) 反应器远非全混流
- 4) 预水解后的物料在进入主反应器时被液化程度较高的物料所稀释, 有利于水解

由此可知, 该模型不能用于连续操作. 不过在实际的工业化生产中, 尽管连续操作有很多优点, 但出于操作灵活性和防止微生物污染等方面的考虑, 仍以间歇操作为宜

3 结 论

本研究中提出了一个用于块根直接水解的模型, 其最大特点是将块根内的不可溶固形物分为可水解的和不可水解的两大类, 前者又可根据水解性能的不同分为两类. 这一简化未涉及多糖分子的化学结构, 但从动力学曲线和植物细胞壁的结构看有一定根据

用计算机对模型参数优化得到的模型与实验数据接近

将中试结果与模型计算所得的值作比较, 间歇操作时两者接近; 而连续操作时模型不适用.

该模型的计算结果可为科研和工业生产起指导作用. 若能将诸如搅拌这样的因素考虑在内, 当可使模型更完善.

参 考 文 献

- 1 BELDMAN G, et al. 欧盟协议者会议论文集. 1982
- 2 BORCHERTA, BUCHHOLZ K. Process Biochem, December, 1987. 173~ 180
- 3 CAMINAL G, et al. Biotechnol. Bioeng. 1985, 27: 1282~ 1290
- 4 CONTRERAS L et al. Biotechnol. Letters, 1982, 4(1): 51~ 56
- 5 GUSAKOV O, SINITSYN A P. Engyne and Minob. Technol 1 1985, 7: 346~ 352
- 6 KAZUO O, et al. Biotechnol. Bioeng. 1983, 25: 2041~ 2053
- 7 LEE Y H, et al. 第四届能源生产和贮存的技术国际会议论文集. 1982. 121~ 138
- 8 国际专利 PCT/FR87/00265

Simulation on Enzymatic Hydrolysis of Plant Cell Walls

Feng Biao (Chen Eng. Depant Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

J. SCHWARTZEN TRUBER (Ecole de Mine de Panis, France)

Abstract Based on experimental kinetics of the enzymatic hydrolysis of cell walls of beet roots, a model with four parameters was proposed. A computational program was compiled for calculating the parameters. Application of the model was discussed.

Key-words model; cell wall; enzyme; hydrolysis; beet

(责任编辑: 秦和平)