

## 微球载体固定化纤维素酶的反应动力学模型研究

# Kinetics Model of Spherical Immobilized Cellulase

周建芹<sup>1</sup>, 陈实公<sup>2</sup>, 朱忠奎<sup>3\*</sup>

ZHOU Jian-Qin<sup>1</sup>, CHEN Shi-Gong<sup>2</sup> and ZHU Zhong-Kui<sup>3\*</sup>

1. 苏州大学药学院, 苏州 215007

2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

3. 苏州大学机电工程学院, 苏州 215021

1. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215007, China

2. School of Food and Biology Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

3. School of Mechatronics, Soochow University, Suzhou 215021, China

**摘 要** 建立了固定化纤维素酶的反应动力学模型, 该模型以米氏方程为基础并考虑了产物竞争性抑制的影响。在此模型的基础上进行模拟, 系统研究了产物竞争性抑制、内扩散限制、溶液中的宏观底物浓度、载体大小等因素对球形载体内部的底物、产物浓度分布和效率因子的影响。产物竞争性抑制的存在将增加载体颗粒内的底物浓度, 对效率因子的影响较小。底物内扩散系数或者反应体系中底物浓度增大时, 载体颗粒内的底物浓度和效率因子都将增大。载体粒径增大, 载体颗粒内的底物浓度和效率因子均减小。

**关键词** 固定化纤维素酶, 动力学模型, 内扩散限制, 效率因子

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0799-05

**Abstract** A kinetics model was developed for predicting and simulating immobilized cellulase performance, which follows Michaelis-Menten kinetics with competitive product inhibition. Taking into account the effects of competitive product inhibition, inner diffusional limitation, substrate concentration and carrier size, the substrate distribution and the product distribution in carriers were investigated, and the effectiveness factors were also calculated over a wide range of parameters. The effects of competitive product inhibition are shown to increase the substrate concentration in the carrier, and, additionally, to increase the effectiveness factors slightly. With the increase of inner diffusion coefficient, both the effectiveness factors and the substrate concentration in the carrier increase. As the carrier size increases, on the other hand, these values decrease. The effectiveness factors and the substrate concentration in the carrier are found to increase when substrate concentration in the reaction system increases.

**Key words** immobilized cellulase, kinetics model, inner diffusional limitation, effectiveness factor

纤维素酶是一组协同水解纤维素的多酶复合体<sup>[1]</sup>, 由于降解纤维素的酶解效率比较低, 导致生产成本比较高, 限制了它的应用。固定化纤维素酶与

溶液酶相比具有许多突出的优点, 能回收、易分离、可以反复多次使用<sup>[2]</sup>, 固定化纤维素酶的使用效率提高。但是纤维素酶被固定于微球载体后, 反应体

Received: March 28, 2005; Accepted: July 7, 2005.

This work was supported by a grant from The Youth Foundation of Soochow University (No. Q3132531).

\* Corresponding author. Tel: 86-512-66225712; E-mail: zkzhu@ustc.edu

苏州大学青年基金资助项目(No. Q3132531)

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

系变为多相体系,受到底物扩散限制、产物扩散限制和产物吸附等各种作用的影响<sup>[3,4]</sup>,酶促反应动力学特性发生显著变化。而固定化纤维素酶的动力学特性,对固定化生物催化剂的设计和操作简单。模拟多孔载体内底物的扩散过程和固定化酶的反应,可以分析固定化酶的动力学特性,评价固定化酶系统性能的优劣。

本文在固定化纤维素酶反应动力学模型的基础上,采用 Matlab 软件进行求解,模拟了固定化酶载体内部的底物分布规律,并计算了效率因子以定量表示底物扩散限制对固定化纤维素酶促反应的影响。

1 数学模型的建立与求解

假设分布在微球载体上的固定化纤维素酶符合下列条件<sup>[5,6]</sup> (1)多孔微球载体颗粒中固定化酶的分布是均匀的 (2)底物(羧甲基纤维素钠)和产物(葡萄糖)在多孔载体内的扩散作用可用 Fick 定律表示,并且底物和产物各自的扩散系数在整个载体中恒定 (3)反应是等温的,颗粒内的压力梯度可忽略不计 (4)在载体内部和外部之间不存在屏蔽效应,忽略载体对催化反应的微扰效应。

内扩散过程和酶促反应过程是同时进行的,底物(羧甲基纤维素钠)在转移过程中被逐渐消耗,因此单位载体体积内底物浓度的改变速度由底物在载体内的扩散速度与酶促反应速度共同决定。纤维素酶和固定化纤维素酶的酶促反应动力学能够用米氏方程描述<sup>[1]</sup>,根据扩散定率和米氏方程(考虑产物竞争性抑制)有:

∂s/∂t = D\_s(∂²s/∂r²) - (v\_m · s) / (K\_m(1 + p/K\_p) + s) (1)

固定化酶催化反应产生的产物(葡萄糖)同时也在由内向外扩散,因此单位载体体积内产物浓度的改变速度由产物在载体内的扩散速度与酶促反应速度共同决定:

∂p/∂t = (v\_m · s) / (K\_m(1 + p/K\_p) + s) - D\_p(∂²p/∂r²) (2)

反应体系处于恒态时, ∂s/∂t = 0, ∂p/∂t = 0, 所以

(1)(2)式分别转化为

(D\_s/r²) d/dr(r² ds/dr) = (v\_m · s) / (K\_m(1 + p/K\_p) + s) (3)

(D\_p/r²) d/dr(r² dp/dr) = (v\_m · s) / (K\_m(1 + p/K\_p) + s) (4)

其中(3)式满足边界条件:

r = 0 ds/dr = 0 (5)

r = r\_0, s = s\_0 (6)

(4)式满足边界条件:

r = r\_0, dp/dr = 0 (7)

s = 0.1, r = r\_0(待求), p = p\_0 (8)

底物浓度 s 的取值,不影响产物浓度的分布趋势,只影响产物浓度分布曲线的位置。s 太低时,酶促反应速率低、产物少,可以忽略。s = 0.1 是任意取值,此时底物浓度足够高,酶促反应可以进行。

引入下列无因次参数,把上述(3)~(8)式转化为无因次形式:

x = r/r\_0, y = s/s\_0, z = p/p\_0, α = 1 + (p\_0/K\_p), β = s\_0/K\_m

(3)式化为无因次形式为:

(1/x²) d/dx(x² dy/dx) = Φ² f(y) (9)

(4)式化为无因次形式为:

(1/x²) d/dx(x² dz/dx) = (s\_0/p\_0) · (r\_0² v\_m / (K\_m D\_p)) f(y) (10)

其中, Φ² = (r\_0² v\_m / (K\_m D\_s)) f(y) = (y / (α + β y)) · (s\_0 / p\_0) = 80

(9)式边界条件为:

x = 0, dy/dx = 0 (11)

x = 1, y = 1 (12)

(10)式边界条件为:

x = 1, dz/dx = 0 (13)

y = 0.1/s\_0, x = x\_0(待求), z = 1 (14)

固定化纤维素酶构成的反应系统中,底物(羧甲基纤维素钠)必须从宏观体系向酶活性部位运转,即存在着内扩散限制,因此实际的反应速度 v' 要低于理论预期反应速度 v,二者之比称为效率因子<sup>[2,7,8]</sup>,可以定量表示扩散限制的影响。微球载体固定化纤维素酶的扩散效率因子为:

η = v'/v = (3 ∫₀¹ x² (v\_m s\_0 y) / (α K\_m + s\_0 y) dx) / ((v\_m s\_0) / (α K\_m + s\_0)) = 3 ∫₀¹ x² ((α + β) y) / (α + β y) dx (15)

应用 Matlab 软件对上述数学模型的常微分方程(ODE)进行求解,模拟固定化纤维素酶载体内部的底物分布规律,同时根据底物浓度计算各因素对效率因子的影响。

2 结果与讨论

2.1 产物竞争性抑制对底物和产物在载体内分布的影响

图1表示了微球载体半径 r\_0 为 0.00045m,底

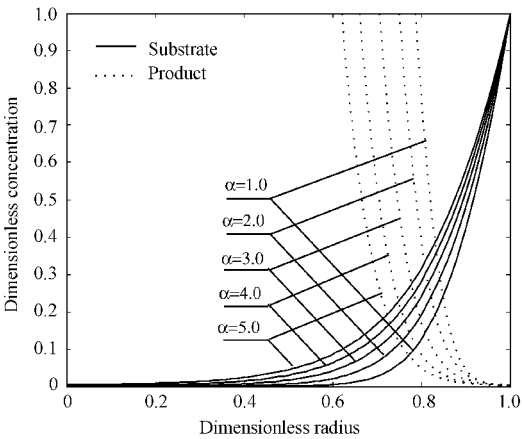


图 1 产物竞争性抑制对底物和产物浓度分布的影响  
Fig.1 Effects of competitive product inhibition on substrate and product concentration distribution

物内扩散系数  $D_s$  为  $0.2 \times 10^{-10}(\text{m}^2/\text{s})$ , 宏观底物浓度  $s_0$  为  $1.0\text{g/L}$  的情况下, 不同  $\alpha$  取值下的底物浓度和产物浓度在球体径向的分布情况。由于内扩散过程和酶反应过程是同时进行的, 底物在由外向内转移的过程中逐渐被消耗, 所以底物浓度随颗粒表面到内部的径向距离的增大而在载体内部呈现非线性降低的分布趋势。产物在载体内的浓度分布曲线与底物浓度分布曲线是对应的, 它也是一种非线性梯度分布, 但与底物的浓度分布趋势相反。

图 1 显示, 底物浓度在球形载体内的分布曲线可以分为三个区域: 载体外层区域, 底物浓度随径向距离的增大而迅速降低, 且表现出线性减少的规律; 在载体中心附近, 底物浓度在径向上缓慢降低, 直至在载体内的某个位置处接近零; 介于二者间的区域, 是混合区, 表现出分数级减少的趋势。从载体中心至底物浓度接近零的球形区域内, 底物浓度极低甚至无底物分布, 所以此区域内的固定化纤维素酶不参与酶促反应, 这个区域称为反应死区。

参数  $\alpha$  值的大小可以直接反映产物竞争性抑制对酶促反应的影响。当  $\alpha = 1$  时, 表示无产物竞争性抑制发生; 当  $\alpha > 1$  时, 说明存在产物竞争性抑制, 并且  $\alpha$  值越大, 产物竞争性抑制越强。从图 1 可以看出, 产物竞争性抑制发生时, 底物浓度分布曲线升高, 产物分布曲线也相应向颗粒中心方向移动, 即底物在载体内的浓度增大, 反应的死区减小。产物竞争性抑制的存在使酶促反应速率减小, 造成载体内底物的消耗减少, 结果是在同一径向位置上的底物浓度增加, 底物向载体内的扩散增强, 所以反应的死区减小, 载体内的有效反应区域增大。

在载体的不同区域, 产物竞争性抑制对底物浓

度分布的影响略有差别。在载体的外层区域, 随着产物竞争性抑制的增大, 底物浓度的增大幅度比较小。在这个范围内, 底物浓度相对比较充足, 所以产物的竞争性抑制可以减轻。在载体的内部, 产物的竞争性抑制引起底物浓度的增大幅度比较大。这是因为底物浓度比较低时, 产物的竞争性抑制表现明显。

2.2 内扩散系数对底物和产物在载体内分布的影响

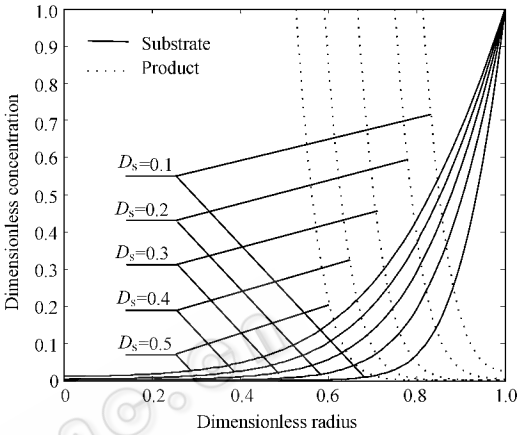


图 2  $D_s$  对底物和产物浓度分布的影响  
Fig.2 Effects of  $D_s$  on substrate and product concentration distribution

图 2 表示了在微球载体半径  $r_0$  为  $0.00045\text{m}$ ,  $\alpha$  值取 2, 宏观底物浓度  $s_0$  为  $1.0\text{g/L}$  的情况下, 不同内扩散系数  $D_s$  下的底物浓度和产物浓度在球体径向的分布曲线。从图 2 中可以看出,  $D_s$  对底物和产物在载体内的浓度分布有显著的影响。 $D_s$  值减小,  $\phi$  值增大, 底物在载体内的扩散限制效应增强, 载体内的底物浓度降低速度加快, 死区范围加大。载体颗粒内有效反应区域减小, 靠近颗粒中心部分的固定化酶起不到催化底物转化为产物的作用, 产物分布曲线也相应向载体外层方向移动。由此看出, 要增大有效反应区域, 就必须增加底物在载体内的扩散系数, 减小内扩散限制效应, 使底物在载体颗粒内部更容易扩散, 这可以通过改变载体的结构来实现。但是底物内扩散系数与底物基础物性和状态有关, 从图中也可以看出随着  $D_s$  值的增大, 底物在载体内的浓度增加幅度变小, 所以通过改变载体结构来增大  $D_s$  值进而促使底物向载体内扩散是有极限的。

2.3 载体半径对底物和产物在载体内分布的影响

图 3 表示了底物内扩散系数  $D_s$  为  $0.2 \times 10^{-10}(\text{m}^2/\text{s})$ ,  $\alpha$  值取 2, 宏观底物浓度  $s_0$  为  $1.0\text{g/L}$

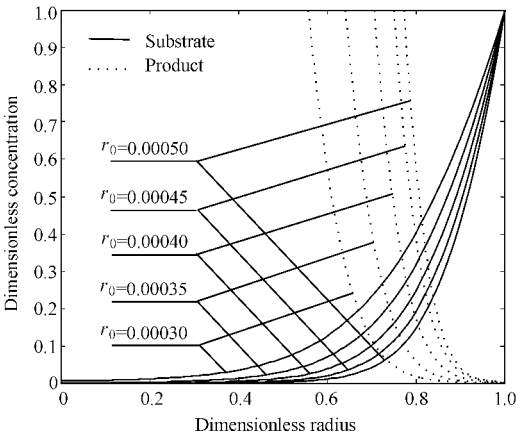


图3 粒径  $r_0$  对底物和产物浓度分布的影响

Fig. 3 Effects of carrier size  $r_0$  on substrate and product concentration distribution

的情况下,不同微球载体半径  $r_0$  下的底物浓度和产物浓度在球体径向的分布曲线。选取不同粒径的载体固定化酶,可以得到一系列粒径的固定化酶颗粒。如图3所示,随着载体粒径  $r_0$  的增大,载体内的底物浓度降低加快,并且死区范围加大,产物分布曲线趋向靠近载体外层。这是因为粒径越大,底物进入颗粒内部进行反应所经过的距离就越长, $\phi$  值就越大,所受到的内扩散限制影响就越严重。

2.4 宏观底物浓度对底物和产物在载体内分布的影响

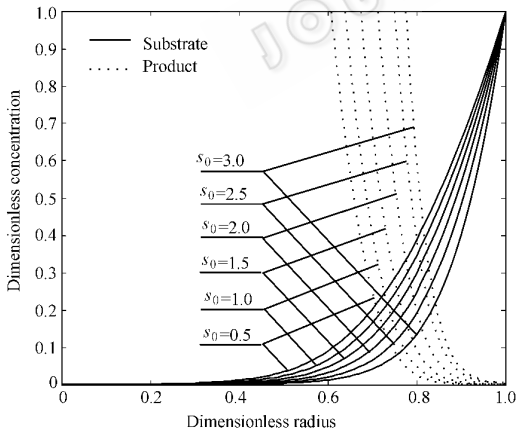


图4 宏观底物浓度  $s_0$  对底物和产物浓度分布的影响

Fig. 4 Effects of substrate concentration in the reaction system on substrate and product concentration distribution

图4表示了底物内扩散系数  $D_s$  为  $0.2 \times 10^{-10}$  ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $\alpha$  值取2,微球载体半径  $r_0$  为  $0.00045\text{m}$  的情况下,取不同宏观底物浓度  $s_0$  时载体内底物浓度和产物浓度在球体径向的分布曲线。从图4中可以看出,随着宏观底物浓度的提高,即底

物数量的增加,进入载体颗粒内部的底物相应增加。底物在颗粒内部的浓度提高,发生催化反应的有效区域增大,产物分布曲线向载体中心方向移动。在合理经济的底物浓度范围中,尽量选择高浓度的底物溶液,可以更大限度的利用固定化酶颗粒,取得更好的酶催化效果。

2.5 各因素对效率因子的影响

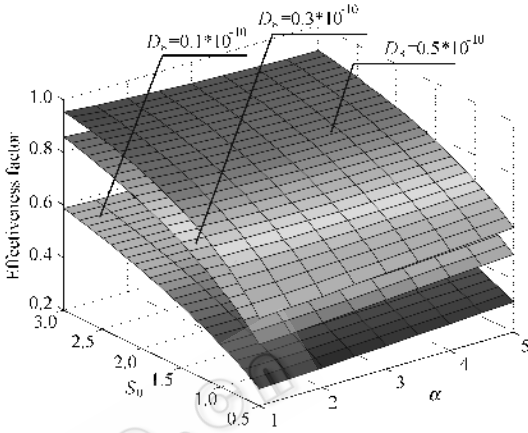


图5 不同  $D_s$  下  $s_0$ 、 $\alpha$  对效率因子的影响

Fig. 5 Effects of  $s_0$  and  $\alpha$  on the effectiveness factor for varying  $D_s$

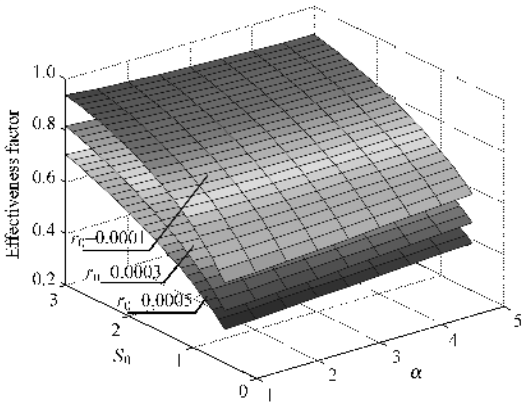


图6 不同  $r_0$  下  $s_0$ 、 $\alpha$  对效率因子的影响

Fig. 6 Effects of  $s_0$  and  $\alpha$  on the effectiveness factor for varying  $r_0$

从图5、图6中可以看出,载体中底物内扩散系数  $D_s$  增大时,效率因子  $\eta$  升高,内扩散系数增大能显著提高效率因子。内扩散系数增大,底物扩散限制减小,有利于底物向颗粒内部的扩散,提高了载体内的底物浓度,同时增大了有效反应区域,催化效率提高。

微球载体半径  $r_0$  较小时,效率因子  $\eta$  较高,载体半径增大,固定化酶的效率因子将降低。这是因为随着粒径半径  $r_0$  的增大,底物在颗粒中扩散距离

变长,受到扩散限制效应的影响变大,底物在载体内的浓度迅速降低,在颗粒内部的死区范围加大,既减少了有效的反应区域,又降低了有效反应区域内的酶促反应速率。为了降低内扩散效应的影响,在保持固定化酶性质稳定的基础上,适当降低载体粒径将有助于提高固定化酶的催化效率。

存在产物竞争性抑制( $\alpha > 1$ )时的效率因子与无产物竞争性抑制( $\alpha = 1$ )时的效率因子相比略有升高,并且随着产物竞争性抑制的增强, $\eta$ 值缓慢增加。产物竞争性抑制对酶促反应的影响有两个方面,一方面是抑制了载体内的酶促反应速率,降低了效率因子;另一方面却使载体内的底物浓度增加,死区减小,即减弱了内扩散限制的影响,使效率因子提高,并且此影响要略大。因此,产物竞争性抑制的增强,对效率因子的影响比较小,效率因子略有增加。

将固定化酶颗粒置于不同的宏观底物浓度中,可以使得同种类型固定化酶表现出不同的催化效率。宏观底物浓度 $s_0$ 升高, $\eta$ 值也相应增大,这是因为溶液中底物浓度增大,更多的底物进入载体内与酶接触进行反应,使得载体内底物浓度增大,有效反应区域增大。

### 3 结 论

1)产物竞争性抑制发生时,底物浓度分布曲线升高,反应的死区减小,产物分布曲线也相应向颗粒中心方向移动。产物竞争性抑制增强,效率因子略有增加。

2)底物在载体内的扩散系数对底物和产物在载体内的浓度分布有显著的影响。扩散系数增大,载体内的底物浓度增大,死区范围减小,效率因子显著增大。

3)载体粒径增大,载体内的底物浓度降低,并且死区范围加大,产物分布曲线趋向载体外层,效率因子降低。

4)宏观体系底物浓度提高,底物在载体颗粒内部的浓度也提高,发生催化反应的有效区域增大,产物分布曲线向载体中心方向移动,效率因子也相应增大。

综合以上研究结论可知,适当降低微球载体粒径、提高反应体系中底物溶液浓度、改变载体的结构使底物在载体内部容易扩散等措施可以降低底物扩

散限制对固定化纤维素酶促反应的影响。

#### 符号说明:

- $s$  - 与  $r$  相对应的底物(羧甲基纤维素钠)浓度,单位为  $g/L$ ;
- $s_0$  - 宏观反应体系底物浓度,单位为  $g/L$ ;
- $p$  - 与  $r$  相对应的产物(葡萄糖)浓度,单位为  $g/L$ ;
- $K_m$  - 固定化纤维素酶本征米氏常数,其值为  $0.135g/L$ ;
- $K_p$  - 产物竞争性抑制常数,单位为  $g/L$ ;
- $v_m$  - 单位体积固定化纤维素酶的最大反应速度,其值为  $0.0025g/L$ ;
- $D_s$  - 底物内扩散系数,单位为  $m^2/s$ ;
- $D_p$  - 产物内扩散系数,单位为  $m^2/s$ ,本文取值为  $4.0 \times 10^{-10} m^2/s$ ;
- $r$  - 微球载体径向位置,单位为  $m$ ;
- $r_0$  - 微球载体半径,单位为  $m$ 。

#### REFERENCES(参考文献)

- [1] Yuan X Y, Shen N X, Sheng J, Wei X. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Membrane Science*, 1999, **155**:101 - 106
- [2] Chen TX(陈昉生), Ju NH(居乃琰), Chen SQ(陈石根). Theory and Application of Immobilized Enzyme(固定化酶理论与应用). 1<sup>st</sup> ed, Beijing: Light Industry Press, 1987
- [3] Zhang TZ, Yang LR, Zhu ZQ. Determination of internal diffusion limitation and its macroscopic kinetics of the transesterification of CPB alcohol catalyzed by immobilized lipase in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, **36**:203 - 209
- [4] Ahmet RO, Deniz T, Ismail HB. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**:27 - 36
- [5] Xiu GH(修国华), Wang R(王蓉), Liu HZ(刘会洲) et al. Simulation of catalytic reaction process of immobilized enzyme in batch reactor. *Journal of Chemical Industry and Engineering(化工学报)*, 1999, **50**(6):838 - 844
- [6] Ali EA, Ibrahim MA. Effects of external mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Eng Life Sci*, 2004, **4**(4):326 - 340
- [7] Ali EA, Ibrahim MA. Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, **23**:139 - 153
- [8] Gloria Villora Cano, Antonio Lopez Cabanes. A generalized analysis of internal diffusion of immobilized enzyme in multi-enzyme reactions. *The Chemical Engineering Journal*, 1994, **56**:B61 - B67