

交联酶聚集体转化葡萄糖制备 葡萄糖酸的研究

魏胜华^{1,2}, 钱伟¹, 朱必玉¹, 王卫军¹, 李世文¹

(1. 安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000;

2. 微生物发酵安徽省工程研究中心, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 共交联葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶具有较好的耐酸性, 可以直接转化葡萄糖制备葡萄糖酸。利用正交实验优化其转化条件: 反应温度为 31℃, 转速为 150 r/min, 加酶质量分数为 2.0%, 底物质量浓度为 150 g/L。发酵罐放大实验显示其转化率可以达到 97.2%, 并且交联酶的稳定性较好, 可以有有效的连续使用 3 个批次, 平均转化率为 93.8%。利用葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共交联聚集体制备葡萄糖酸是一种简便、高效的方法。

关键词: 葡萄糖酸; 交联酶聚集体; 葡萄糖氧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)07-0131-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2016.07.032

Bioconversion of glucose to glucose acid by cross-linked enzyme aggregates

WEI Sheng-hua^{1,2}, QIAN Wei¹, ZHU Bi-yu¹, WANG Wei-jun¹, LI Shi-wen¹

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2. Anhui Engineering Technology Research Center of Microbial Fermentation, Wuhu 241000, China)

Abstract: The combination of crosslinked glucose oxidase and catalase aggregates has characteristic of good acid resistance, which can directly convert glucose to glucose acid. The optimal conversion conditions are obtained as follows by using orthogonal experiment: 31℃ of the reaction temperature, 2% of the amount of enzyme, 150 r/min of the speed and 150 g/L of the concentration of the substrate. Under the optimal conditions, the conversion of amplification experiment in fermentor is 97.2%. The cross-linked enzyme is stable, which could be used for three consecutive cycles with the average conversion of 93.8%. It is a simple and effective method to prepare glucose acid by combining cross-linked glucose oxidase with catalase aggregates.

Key words: glucose acid; cross-linked enzyme aggregates; glucose oxidase; catalase

葡萄糖酸及其衍生物是一类重要的生化产品, 在医药、食品以及化妆品等领域有着广泛的应用^[1]。目前, 葡萄糖酸的主要制备工艺是通过黑曲霉发酵, 该工艺存在菌体培养过程复杂, 发酵周期长, 副产物多以及底物抑制等问题^[2-3]。同时在发酵过程中由于葡萄糖酸的不断产生而造成发酵液的 pH 不断下降, 为了维持 pH 的恒定, 必须添加碱液中和, 所以最终发酵产品是以盐的形式存在。因此, 需经过离子交换树脂处理才能得到葡萄糖酸, 使过程复杂, 成本增加^[4-5]。

酶法制备与发酵法相比具有反应成分明确, 过程简单, 产品容易分离提纯等优点^[6]。利用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的联合作用可以将葡萄糖转化为葡萄糖酸^[7]。但是在酶法转化的过程中, 依然存

在低 pH 对酶活性的抑制。为了解除这种抑制作用, Nidetzky 等^[8]采用超滤膜反应器移除不断产生的葡萄糖酸; Hestekin 和 Godjevargova 等^[9]采用含有阴离子交换膜的生物反应器将葡萄糖转化为葡萄糖酸, 本课题组也曾采用含有阴离子交换树脂的原位分离系统进行转化^[10]。以上措施都是从反应器的角度出发进行改进, 但是存在着反应器结构复杂, 膜易受到污染及产物浓度较低等不足。

交联酶聚集体(CLEAs)是一种没有载体的固定化酶, 与常用的有载体的固定化酶相比具有催化剂的比表面积更大, 催化效率更高; 对底物的抑制能力提高; 交联过后三维结构更加稳定, 抗逆性提高^[11]。因此, 笔者以共交联葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶聚集体为催化剂, 研究了其酸的耐受性, 优化了其转化

葡萄糖制备葡萄糖酸的过程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄糖氧化酶(300 U/g),江苏瑞阳生物科技有限公司生产;过氧化氢酶(1×10^4 U/mL),山东杰诺生物工程有限公司生产;其他试剂购自国药集团上海试剂公司,除液相分析试剂为色谱纯外,其余均为 AR。

1.2 仪器与设备

数显恒温摇床,HYG-3 型,金坛市杰瑞尔电器有限公司生产;发酵罐,3BG-7000A 型,上海保兴生物设备工程有限公司生产;高效液相色谱仪,P1201 型,大连依利特分析仪器有限公司生产;扫描电子显微镜,S-4800 型,日本日立公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共交联聚集体的制备

在 1 000 mL 三角瓶中加入 15 g 葡萄糖氧化酶的粉末、150 μ L 的过氧化氢酶液和 1.0 g PEG2000,然后加入 100 mL 0.2 mol/L 的 pH 6.0 的 PBS 缓冲液,充分溶解后在烧杯中加入 1.5 倍体积无水乙醇,4 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min 后加入戊二醛 2.5% (体积分数),交联 2 h 后离心取沉淀,PBS 缓冲液冲洗离心后取沉淀,制备的交联酶聚集体保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.2 酶转化过程

单因素实验反应的初始条件为:在 250 mL 摇瓶中加入 50 mL 的 100 g/L 葡萄糖溶液,温度为 31 $^{\circ}$ C,摇床转速为 180 r/min,加酶量为 1.5% (W/V)。然后采用正交试验进行优化,反应过程中,定时取样测定反应液中葡萄糖酸和葡萄糖的质量浓度。

发酵罐转化:配制一定浓度的葡萄糖溶液放入 3 L 发酵罐中,加入一定量的固定化酶,设定合适的转速、通气量和温度,开始转化,定时记录发酵罐数据并取样测定反应液中葡萄糖酸和葡萄糖的质量浓度。

1.4 分析方法

葡萄糖质量浓度的测定采用 DNS 法^[12];葡萄糖酸质量浓度的测定采用高效液相色谱法^[13];葡萄糖氧化酶酶活的测定方法参考文献[10]。

交联酶聚集体的表征:将制备的 CLEAs 放入冰箱冷冻 24 h,然后用冷冻干燥机真空冷冻干燥 12 h,电压为 5.0 kV,喷金后采用扫描电镜观测其微观结构。

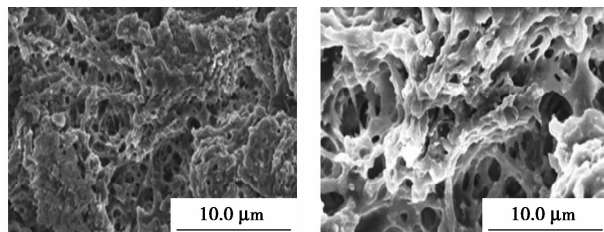
1.5 统计分析

所有实验均重复 3 次,并利用 Origin8.6 软件进行统计处理,实验的结果为 3 次测试平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共交联聚集体的制备

葡萄糖氧化酶能够专一地氧化葡萄糖生成葡萄糖酸,并且产生 H_2O_2 ,由于 H_2O_2 对酶有损伤,通过添加过氧化氢酶可以使其进一步分解为 H_2O 和 O_2 ,从而使反应不断地持续下去。通过双酶的共同固定化可以简化反应步骤,提高反应效率。制备得到的交联酶聚集体外观形貌如图 1 所示。由图 1 可以看出,其孔隙有序,结构较为致密,为一步法制备葡萄糖酸提供了可能。



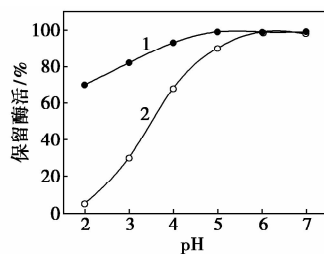
(a)5 000 倍

(b)13 000 倍

图 1 交联酶聚集体的扫描电镜图

2.2 交联酶聚集体的 pH 稳定性

在葡萄糖转化生成葡萄糖酸的过程中,其 pH 一直呈下降的趋势,只有所制得的交联酶聚集体具有较好的耐酸性,才能在转化过程中不需要添加碱液进行中和。交联酶聚集体在不同 pH 条件下的稳定性如图 2 所示。由图 2 可以看出,游离酶和交联酶聚集体在不同 pH 溶液中放置 6 h 后,游离酶在 pH 3.0 环境中酶活保留率不到 30%,而交联酶聚集体酶活保留 70% 以上,耐酸性明显增强,完全具备了一步法制备葡萄糖酸的能力。



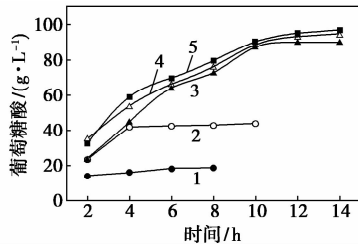
1—交联酶;2—游离酶

图 2 交联酶聚集体在不同 pH 下催化活力的稳定性

2.3 酶转化过程的优化

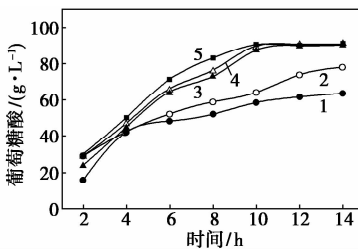
2.3.1 单因素实验

酶转化葡萄糖制备葡萄糖酸的过程主要受到底物浓度、加酶量、温度和溶氧的影响,因此在摇瓶转化的水平上,重点考察了这几个因素对转化的影响,结果如图3所示。由图3可知,单因素实验的最佳反应条件是:底物质量浓度为120 g/L,加酶量为1.5%,反应温度为34℃,摇床转速为180 r/min。



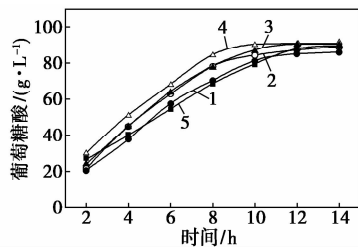
1—20 g/L; 2—50 g/L; 3—100 g/L; 4—120 g/L; 5—150 g/L

(a) 底物浓度对转化的影响



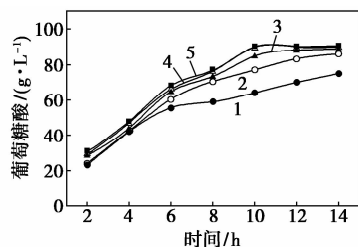
1—0.5%; 2—1.0%; 3—1.5%; 4—2.0%; 5—2.5%

(b) 加酶量对转化的影响



1—25℃; 2—28℃; 3—31℃; 4—34℃; 5—37℃

(c) 温度对转化的影响



1—90 r/min; 2—120 r/min; 3—150 r/min;

4—180 r/min; 5—210 r/min

(d) 摇床转速对转化的影响

图3 各因素对交联酶聚集体转化葡萄糖制备葡萄糖酸的影响

2.3.2 正交实验优化

根据单因素实验结果,对影响交联酶聚集体氧化葡萄糖制备葡萄糖酸的催化温度(A)、转速(B)、加酶量(C)和底物浓度(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,因素水平表及正交实验结果分别如表1、表2所示。

表1 正交实验因素水平表

	温度/ ℃	转速/ ($r \cdot \min^{-1}$)	加酶量/ %	底物质量浓度/ ($g \cdot L^{-1}$)
水平1	31	150	1.0	100
水平2	34	180	1.5	120
水平3	37	210	2.0	150

表2 实验结果分析表

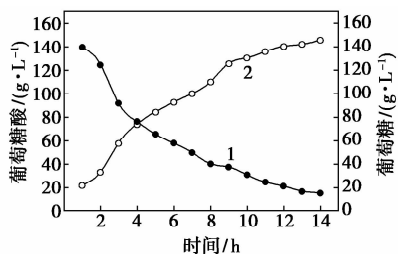
因素	温度/ ℃	转速/ ($r \cdot \min^{-1}$)	加酶量/ %	底物质 量浓度/ ($g \cdot L^{-1}$)	葡萄糖酸 质量浓度/ ($g \cdot L^{-1}$)
实验1	1	1	1	1	88.1
实验2	1	2	2	2	101.2
实验3	1	3	3	3	122.4
实验4	2	1	2	3	113.2
实验5	2	2	3	1	91.1
实验6	2	3	1	2	89.2
实验7	3	1	3	2	104.4
实验8	3	2	1	3	98.7
实验9	3	3	2	1	92.5
均值1	103.90	101.90	92.00	90.57	
均值2	97.83	97.00	102.30	98.27	
均值3	98.53	101.37	105.97	111.43	
极差R	6.07	4.90	13.97	20.87	

从表2可以看出,极差结果为 $R_D > R_C > R_A > R_B$,即4个单因素对制备葡萄糖酸的影响大小为:底物浓度>加酶量>温度>转速。其中底物质量浓度和加酶量对于酶法制备葡萄糖酸影响较大,在实验范围内,得到的最佳组合为: $A_1 B_1 C_3 D_3$,即反应温度为31℃,转速为150 r/min,加酶量为2.0%,底物质量浓度为150 g/L。在此条件下进行3组平行摇瓶验证实验,最终葡萄糖酸平均质量浓度为124.7 g/L,转化率为83.1%。

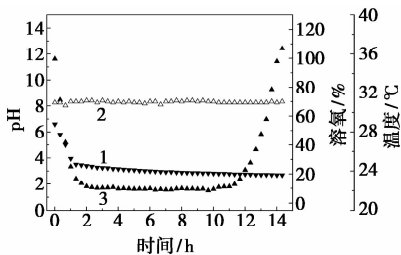
2.4 发酵罐放大实验

在摇瓶转化的基础上,在发酵罐上进行了放大实验,3.0 L发酵罐中装入2.5 L质量浓度为150 g/L的葡萄糖溶液,加酶量为2.0%,搅拌转速为150 r/min,通气量为6.0 L/min,实验结果如图4所示。由图4可以看出,在反应进行到2 h,罐内反应液的pH由中性下降至3左右,此后直至反应结束都维持在pH 3.0左右。在反应进行到11 h时,

反应体系的溶氧开始上升,从图 4(a)中可以看出,葡萄糖酸的质量浓度上升缓慢,说明酶催化反应接近终点。经过 14 h 的酶氧化反应,溶氧达到 100%,反应结束。最终葡萄糖酸质量浓度为 145.8 g/L,转化率达到 97.2%,高于摇瓶的 124.7 g/L。主要原因是酶法氧化葡萄糖制备葡萄糖酸是好氧反应,压缩空气通入发酵罐,经搅拌叶片桨扩散到反应液,使溶氧更加均匀充分,溶氧传递效果优于摇瓶,能够满足酶催化的高耗氧需求,所以最终葡萄糖酸质量浓度高于摇瓶制备结果。



1—葡萄糖质量浓度;2—葡萄糖酸质量浓度
(a) 发酵罐葡萄糖和葡萄糖酸质量浓度变化



1—pH;2—温度;3—溶氧
(b) 发酵罐参数的变化

图 4 发酵罐转化葡萄糖制备葡萄糖酸的过程

2.5 交联酶的稳定性

固定化酶的主要优势就是可重复利用,反应结束后,将交联酶聚集体滤出,加入新的葡萄糖溶液开始转化反应,考察其重复使用性能,实验结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,随着反应的进行,葡萄糖酸的生成量都有所下降,从第 4 批转化率开始明显下降,到第 5 批时转化率只有 70.2%,这是由于固定化颗粒在低 pH 环境中时间较长,对酶的损伤较大以及随着反应的进行,聚集体的破裂而造成酶在离心过程中的损失。但是,前 3 批的转化率还是较高,平均转化率可以达到 93.8%,葡萄糖酸的产量平均为 140.7 g/L,具有实际应用的价值。

表 3 CLEAs 操作稳定性

操作次数	1	2	3	4	5
葡萄糖酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	145.8	141.4	135.0	125.2	105.3
转化率/%	97.2	94.3	90.0	83.5	70.2

3 结论

由于葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共交联聚集体具有耐低 pH 的特性,因此可以利用其一步法转化葡萄糖制备葡萄糖酸。通过正交实验表明,其转化的最佳条件为:反应温度为 31℃,转速为 150 r/min,加酶量为 2.0%,底物质量浓度为 150 g/L,转化率最终可以达到 83.1%。发酵罐放大实验转化率达到 97.2%,可以有效连续使用 3 个批次,平均转化率为 93.8%。利用葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共交联聚集体制备葡萄糖酸是一种简便、高效的方法。

参考文献

- [1] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, *et al.* Gluconic acid: Properties, applications and microbial production [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44(2): 185-195.
- [2] Znad H, Markoš J, Balaš V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: Growth and non-growth conditions [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(11): 1341-1345.
- [3] 张静. 黑曲霉发酵生产葡萄糖酸钠的研究 [D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [4] 杨冰, 许颖, 季君晖, 等. 琥珀酸发酵过程中的产物抑制特征及树脂吸附原位分离的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(4): 12-16.
- [5] 郭凤华, 刘昌俊. 葡萄糖酸合成方法研究进展 [J]. *化学工业与工程*, 2007, 24(2): 173-177.
- [6] 张芳, 张霞, 刘春美, 等. 生物催化及其在手性技术中的应用 [J]. *现代化工*, 2011, 31(12): 7-11.
- [7] Zhu L, Yang R, Zhai J, *et al.* Bienzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23(4): 528-535.
- [8] Nidetzky B, Neuhauser W, Haltrich D, *et al.* Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 52(3): 387-396.
- [9] Godjevargova T, Dayal R, Turmanova S. Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2004, 4(10): 950-956.
- [10] 魏胜华, 王卫军, 王宏, 等. 酶法原位分离技术制备葡萄糖酸 [J]. *精细化工*, 2015, 32(11): 1217-1221.
- [11] Schoevaert R, Wolbers M W, Golubovic M, *et al.* Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(6): 754-762.
- [12] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 138-141.
- [13] Feng L, Zhang H, Zhang L. The research on determination of glyconate by HPLC [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 1997, 16(1): 68-71. ■