# ZIF-8@ 纤维素酶-细胞共固定化体系的构建及强化丁酸合成的应用

王雨薇[1]，尹成泰[2]，刘婷婷[1]，江 凌[*1,3]

（1. 南京工业大学 食品与轻工学院，江苏 南京 211816；2. 南京工业大学 海外教育学院，江苏 南京 211816；3. 南京工业大学 材料化学工程国家重点实验室，江苏 南京 211816）

**摘要：**酶-细胞共固定化作为多酶固定化策略的拓展，因其能分层包埋固定化酶和细胞不同生物分子从而强化系统催化性能，成为现阶段酶工程研究的新热点。为了将这一新技术用来强化丁酸的合成，作者基于仿生矿化法构建沸石咪唑酯骨架（zinc zeolitic imidazolate framework-8，ZIF-8）分隔包覆纤维素酶和酪丁酸梭菌（*Clostridium tyrobutyricum*，Ct），制备 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 共固定化体系。通过 SEM、FT-IR、XRD 等技术表征以及进行酶解、发酵实验的分析验证，该体系具有更优的同步糖化发酵性能。结果表明：在最适条件（40 ℃、pH 4.5）下，底物玉米芯水解率达 56.02%，葡萄糖转化率为 85.61%；进一步置于不同的 pH 和氧气体积分数下，发现有 ZIF-8@ 纤维素酶包覆的细胞具有更高、更稳定的比生长率和相对细胞活力以及较低的相对活性氧水平，丁酸在 32 h 内产量达到 6.74 g/L，比未固定化细胞提高了 12.52%。

**关键词：**纤维素酶；酪丁酸梭菌；沸石咪唑酯骨架；共固定化

**中图分类号：**Q 814.2；TQ 921+.4　**文章编号：**1673-1689(2022)10-0077-10　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.007

# Construction of ZIF-8@Cellulase-Cell Co-Immobilization System and Its Application in Enhancement of Butyric Acid Synthesis

*WANG Yuwei*[1]，*YIN Chengtai*[2]，*LIU Tingting*[1]，*JIANG Ling*[*1,3]

（1. College of Food Science and Light Industry，Nanjing Tech University，Nanjing 211816，China；2. College of Oversea Education，Nanjing Tech University，Nanjing 211816，China；3. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering，Nanjing Tech University，Nanjing 211816，China）

**Abstract：**As an extension of multi-enzyme immobilization strategy，enzyme-cell co-immobilization has become a new hot topic in enzyme engineering research because of its ability to enhance the catalytic performance of the system by hierarchically encapsulating different biomolecules of immobilized enzymes and cells. In order to use this new technology to enhance the synthesis of butyric acid，zinc zeolitic imidazolate framework-8@cellulase-*Clostridium tyrobutyricum*（ZIF-8@cellulase-Ct）co-immobilization system was prepared by constructing ZIF-8 separated with cellulase and Ct based on biomimetic mineralization method. The system was characterized by SEM，FT-IR and XRD techniques and analyzed by enzymatic and fermentation experiments，which showed

**收稿日期：**2022-05-10

**基金项目：**国家重点研发计划项目（2021YFC2102702）；国家自然科学基金山东联合基金重点项目（U2106228）。

* **通信作者：**江　凌（1982—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程和发酵工程研究。E-mail：jiangling@njtech.edu.cn

that the system had better simultaneous saccharification and fermentation performance. 56.02% of corn cobs were hydrolyzed within at 40 ℃ and pH 4.5, and the glucose conversion rate was about 85.61%. Placed under different pH and oxygen concentrations, cells with ZIF-8@cellulase coating were found to have higher and more stable specific growth rate, cell viability and lower relative reactive oxygen levels, and the final concentration of ZIF-8-SSF butyric acid yield reached 6.74 g/L in 32 h, which was 12.52% higher than that of non-immobilized cells.

**Keywords:** cellulase, *Clostridium tyrobutyricum*, zinc zeolitic imidazolate frameworks, co-immobilization

固定化酶技术是将酶用人工方法固定在特定载体上，进行催化生产，具有稳定性好、易于纯化和可连续化反应等优点[1]。该技术是生物催化的核心技术，其较高的重复可利用率减少了多余的下游后续处理和纯化过程[2]，提高了生物催化过程的经济性，已成为酶工程研究的重要方向。

目前，利用金属-有机骨架（metal-organic frameworks，MOFs）作为酶固定化的载体材料[3]受到越来越多的关注，MOFs 作为一种具有周期性骨架结构的新型多孔材料，拥有较好的生物兼容性、易于调节的孔径、巨大的比表面积、易于修饰的金属结构和配体，以及温和的合成条件[4]，这些都为其作为固定化载体材料提供了有力的支持[5]。沸石咪唑酯骨架（zinc zeolitic imidazolate frameworks，ZIFs）作为一种重要的 MOFs 材料也兼具以上特点。研究证明，将酶嵌入 MOFs（ZIFs）中构建固定化酶体系为改善酶固有的脆弱性提供了新的可能，同时也为 MOFs 赋予了新的生物功能[6-7]。目前已有一些利用 MOFs 固定细胞方面的报道，Liang 等设计了一种具有生物活性的多孔合成壳，用 β-半乳糖苷酶包裹酵母，来提高其在贫瘠营养环境中的存活率[8]。Ji 等将 *Morella theracetica* 细胞包裹在均质 MOFs 单层中，以实现对氧化应激的保护[9]。

丁酸（$CH_3CH_2CH_2COOH$）作为一种重要的四碳短链有机酸，被广泛应用于食品[10-11]、医药[12-14]、农业[15]、动物饲料[16]等领域。例如在食品工业中，丁酸能够增强食品中的奶油风味，其酯类因具有水果香气，可作为添加剂用于糖果、饮料、冰淇淋等食品中。酪丁酸梭菌（*Clostridium tyrobutyricum*，Ct）是国内外研究聚焦最多的产丁酸菌株，因其丁酸产量大、得率高、稳定性好，被认为是生物法制备丁酸的最优势菌株[17-18]。但在实际生产过程中，酪丁酸梭菌对小麦秸秆、软木[19]和玉米芯[20]等廉价的生物质原料无法直接利用，且由于环境复杂性导致的胁迫因素的存在，会影响丁酸产量的进一步提升。

作者基于仿生矿化法原位合成 ZIF-8 纳米材料，分隔包覆纤维素酶和酪丁酸梭菌，构建 ZIF-8@纤维素酶-*Clostridium tyrobutyricum*（ZIF-8@纤维素酶-Ct）共固定化体系。其中，利用 ZIF-8@固定纤维素酶用于水解玉米芯制备可发酵性糖，进一步将固定纤维素酶的 ZIF-8 作为保护性外骨骼结晶于细胞表面，形成包覆层以增强细胞稳定性，增强 Ct 抗胁迫性能的同时，提高 Ct 细胞原料利用率，从而开发廉价生物质资源的同步酶解发酵合成丁酸的新工艺路线。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酪丁酸梭菌 *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 于作者所在实验室-80 ℃低温冻藏柜中保藏。

强化梭菌培养基（reinforced clostridium medium，RCM）：1 L 体系中含有 10 g 胰蛋白胨、10 g 牛肉浸粉、3 g 酵母粉、5 g 葡萄糖、1 g 可溶性淀粉、5 g 氯化钠、3 g 无水乙酸钠、0.5 g *L*-半胱氨酸盐酸盐；pH 6.8±0.2；固体培养基需再加入 15 g 琼脂。

发酵中用的 RCM（G-）培养基为不添加葡萄糖的 RCM 培养基。

所用的纤维素酶为 Cellic® CTec2 诺维信纤维素酶，购于诺维信（中国）生物技术有限公司。在 Cellic® CTec2 中，纤维素酶提供了关键酶活性，水解纤维素中的（1，4）-β-*D*-葡萄糖苷键和其他 β-*D*-葡聚糖。其质量浓度近似值为 1.15 g/mL。

### 1.2 酪丁酸梭菌菌种活化及扩大培养

取出保藏的菌种划线于 RCM 琼脂平板表面生长，挑取单菌落，接种于 RCM 培养基中，于 37 ℃恒

温培养箱中静置过夜培养 12~16 h。

### 1.3 Ct 菌泥制备

取 2 mL 菌液离心(12 000 r/min、4 ℃、2 min),加去离子水洗涤 2~3 次,得到菌泥,使用冷冻干燥机对菌泥进行冻干处理为后续 FT-IR、XRD、UV-Vis 表征使用。

在菌泥中加入体积分数 2.5%戊二醛(1 mL)固定,充分混匀,过夜固定后离心(12 000 r/min、4 ℃、2 min),倒去上清液,依次加入不同体积分数的乙醇(10%、30%、50%、70%、100%)洗脱,开盖过夜晾干,用于后续 SEM 表征使用。

### 1.4 ZIF-8@纤维素酶-Ct 共固定化体系的合成与制备

将 Ct 菌液离心(10 000 r/min、4 ℃、3 min),加去离子水洗涤 2~3 次,再依次加入去离子水(30 mL)、0.5 mol/L 硝酸锌溶液(200 μL)、1 mol/L 2-甲基咪唑(1 mL),充分混匀,置于 37 ℃摇床过夜培养 6~8 h。再取 20 mg 包覆 ZIF-8 的 Ct 细胞与 10 mL 纤维素酶溶液(50 mmol/L 乙酸缓冲液、pH 4.8)混合,在 30 ℃、180 r/min 振荡 50 min 后离心(10 000 r/min、4 ℃、3 min),加去离子水洗涤 2 次冲洗掉多余材料。利用 1.3 中的方法得到 ZIF-8@纤维素酶-Ct 菌泥,戊二醛处理以备后续表征使用。

### 1.5 结构表征

**1.5.1 SEM 形态表征** 使用 Sigma HD 扫描电镜观察 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 的形貌和结构。

**1.5.2 傅里叶变化红外光谱(FT-IR)分析** 使用 Nicolet IS 10 傅里叶变换红外光谱仪测定包覆着菌的 ZIF-8@纤维素酶-Ct 样品和纯 ZIF-8 样品的红外光谱。将这两种不同样品分别与固体 KBr 粉末混合,利用研钵研磨细碎同时注意干燥处理,取适量混合物粉末,均匀浅铺一层在压片模具中,在一定压力下制成薄片,进行 FT-IR 分光光度测定。在 500~4 000 $cm^{-1}$ 的波数下记录透射率。

**1.5.3 X 射线粉末衍射(XRD)测定** 使用 X'Pert PRO MPD X 射线粉末衍射仪分析 ZIF-8 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 样品的结晶形态及结晶度。样品烘干利用研钵研磨细碎后加入到玻璃样品架的凹槽中间,利用 X 射线粉末衍射仪在 0~90°(测量角度 2$\theta$)扫描范围内测定。

### 1.6 分析方法

**1.6.1 比生长率测定** 使用全波长酶标仪测定在 600 nm 处的不同 pH 条件下 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 菌液的 OD 值,再除以相应的生长时间得到比生长率。从 10 mL 样品管中各取 100 μL 样品置于 96 孔酶标板中,通过全波长酶标仪测定。

**1.6.2 细胞活力测定** 使用二乙酸荧光素(FDA)检测不同 pH 条件下 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 菌液的细胞活力,该试剂可以代谢活跃的细胞被水解成明亮的荧光素。从 10 mL 样品管中各取 100 μL 置于 96 孔酶标板中,再在每孔加入 2 μL 的 FDA 母液(5 mg FDA 粉末溶于 1 mL 丙酮),置于 30 ℃恒温培养箱内孵育 20 min。使用全波长酶标仪分别在 490 nm 激发波长、526 nm 发射波长下,实时检测两个样品的吸光度。相对细胞活力是以同实验组的最高的吸光度为 100%进行标化,得到各个条件下的相对细胞活力。

**1.6.3 相对活性氧(ROS)水平测定** 使用荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)对不同 pH 条件下 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 进行活性氧检测。DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由地穿过细胞膜,进入细胞内,可被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。细胞内的活性氧可以通过氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF(2',7'-二氯荧光素),检测 DCF 的荧光从而得到细胞内活性氧的水平[21-22]。用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)稀释得到 DCFH-DA(10 μmol/L),取 1 mL 菌液和 1 μL DCFH-DA 于 2 mL 棕色离心管,置于 37 ℃恒温培养箱内孵育 20 min,每隔 3~5 min 颠倒混匀一下,使探针和菌液充分接触。用去离子水洗涤 2~3 次,以充分除去未进入细胞内的 DCFH-DA。使用全波长酶标仪在 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长下,实时检测刺激前后荧光的强弱。

**1.6.4 纤维素酶酶活力测定** 纤维素酶酶活力的测定采用 DNS 法,首先根据试剂盒配制标准葡萄糖溶液制作标准曲线,用于计算水解出的葡萄糖。接着加入 l00 μL 质量浓度为 1 g/L 的待测液和 900 μL DNS 显色液,摇匀后放入 100 ℃沸水浴中,10 min 后立即取出,流水冷却至室温,稀释相应倍数后于 540 nm 处测 OD 值,再从标准曲线中查出对应的葡萄糖的物质的量。酶活力定义为在 50 ℃、pH 7.0 条件下,每分钟催化纤维素水解成 1 μmol 的葡萄糖称为 1 U。

### 1.7 玉米芯水解物的预处理制备

玉米芯的水解液按文献报道的方法制备[23]。首先，使用研磨机将玉米芯研磨成直径小于 5 mm 的生物质细粉，用 0.02 mol/L $H_2SO_4$ 进行预处理，固液质量体积比为 10 g:100 mL，在 121 ℃下处理 30 min。将商品化的纤维素酶 Cellic® CTec2 按照 2%(体积分数)的比例加入到 pH 为 5.5 的稀酸水解液中，在 50 ℃、180 r/min 的条件下水解 3 d。用多层纱布过滤出不溶性固体残留物，剩余溶液用旋转蒸发仪浓缩至总糖质量浓度为 60 g/L。

将获得的玉米芯悬浮液，用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 4.5。此外，在丁酸发酵的对照组中，在预处理后的玉米芯中添加 2%(体积分数)的游离商品纤维素酶，在 50 ℃、180 r/min 的条件下水解纤维素为葡萄糖。

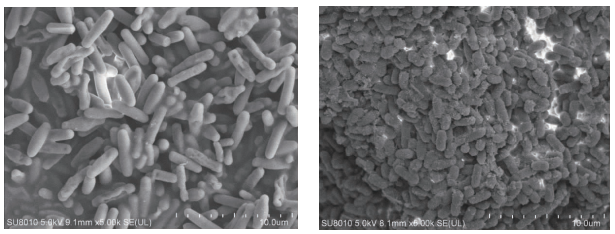
### 1.8 同步糖化发酵法(simultaneous saccharification and fermentation，SSF)生产丁酸

以玉米芯酶解释放的葡萄糖为碳源，对丁酸进行分批发酵。厌氧瓶中培养 6~8 h 的细胞悬浮液接种于预处理的稻草悬浮液中进行 SSF (40 ℃、pH 4.5)，并同时补充 RCM(G-)培养基。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ZIF-8@纤维素酶-Ct 细胞的表征分析

**2.1.1 SEM 分析** Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 的 SEM 分析结果如图 1 所示。从图 1(a)中可以看出，没有 ZIF-8 包覆的细胞表面较为光滑，而图 1(b)中显示，基于仿生矿化的方法成功使硝酸锌和 2-甲基咪唑水溶液合成了 ZIF-8，并包覆在了 Ct 的表面，且颗粒分布均匀。



(a) Ct　　(b) ZIF-8@纤维素酶-Ct

**图 1 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 的 SEM 图**

**Fig. 1 SEM images of Ct and ZIF-8@cellulase-Ct**

**2.1.2 FT-IR 分析** 采用 FT-IR 对 ZIF-8 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 进行了分析，结果如图 2 所示。单一的 ZIF-8 在 2 925.62 $cm^{-1}$ 和 3 137.05 $cm^{-1}$ 处的吸收峰分别归属于其组分 2-甲基咪唑上的不对称脂肪族和芳香族的 C—H 键的伸缩振动。ZIF-8@纤维素酶-Ct 与 ZIF-8 相比除了具有上述位置附近的吸收峰，还在 1 241 $cm^{-1}$ 处有 C=O 伸缩振动吸收峰，表明存在蛋白质[24]，主要归因于添加的纤维素酶；在 1 078 $cm^{-1}$ 处有醚键伸缩振动吸收峰，这些可归因于 Ct。总而言之，这些结果证实了 ZIF-8、纤维素酶和 Ct 成功耦合在一起，且所有峰的位置均未发生明显变化，即 ZIF-8 的结构在包覆的过程中也没有被破坏。

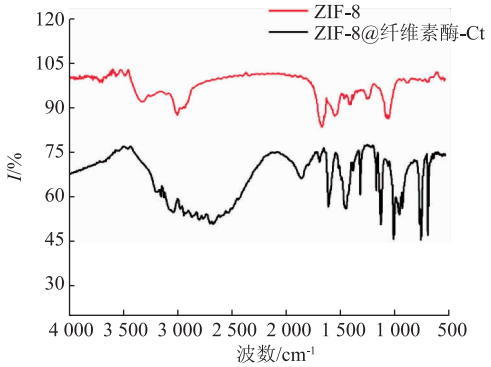



**图 2 ZIF-8 和 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 的 FT-IR 图**

**Fig. 2 FT-IR spectra of ZIF-8 and ZIF-8@cellulase-Ct**

**2.1.3 XRD 分析** 对单一的 ZIF-8 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 进行了 XRD 分析，结果如图 3 所示。对于纯的 ZIF-8 而言，在 2$\theta$ 为 7.02°、10.39°、12.70°、18.14°处有 4 个明显的衍射峰，分别归因(011)、(002)、(112)和(222)空间群[24]，在 XRD 图谱中的对应位置也可以找到响应的特征峰。ZIF-8@纤维素酶-Ct 在相同的散射角下表现出的峰位与纯 ZIF-8 基本一致，表明通过纤维素酶固定化后 ZIF-8 纳米粒子的物化性质不变。

### 2.2 共固定化体系的酶解性能研究

**2.2.1 ZIF-8-SSF 最佳酶解条件的确定** 为了最大限度提高酶活性，对酶解的两个重要参数 pH 和温度进行优化。但最佳酶解条件的确定，还需要在被包覆的 Ct 细胞的存活率和固定化纤维素酶的酶活力之间折中。一般来说，纤维素酶在二氧化硅[25]、(聚)离子液体[26]和磁性纳米粒子[27]等不同载体上的固定化有利于提高其相对活性和稳定性。MOFs 也被证明是一种很好的固定化载体[28]。就酶活力而言，两种情况下游离纤维素酶和固定化纤维素酶的最适温度均为 50 ℃(见表 1)。在较低温度(30~40 ℃)

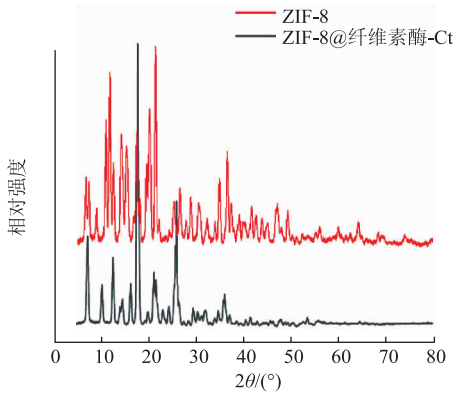



**图 3　ZIF-8 和 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 的 XRD 图**

**Fig. 3　XRD spectra of ZIF-8 and ZIF-8@cellulase-Ct**

下，游离纤维素酶的活力略高于固定化纤维素酶。当温度超过最适温度时，游离纤维素酶的活力急剧下降，在 80 ℃时损失 81.06%，与之前的报道一致[29]。ZIF-8 固定化纤维素酶具有较高的热稳定性，在 80 ℃下仍能保持约 50%的残余酶活力。这种稳定性的提高可能和酶与载体的多点连接从而限制了构象的流动性和灵活性有关[29]。除相同的最适温度外，游离纤维素酶和固定化纤维素酶的最适pH 也均为 4.5(见表 1)。与游离纤维素酶相比，固定化纤维素酶在较宽的 pH 范围内(4.0~7.0)表现出相对较高的活性。在 pH 为 7.0 时，游离纤维素酶的活力仅为最适条件的 36.23%，而固定化纤维素酶的活力仍能保持 59.72%。固定化纤维素酶的 pH 耐受性增强可能是由于其对不利环境引起的构象变化的敏感性减弱所致。

**表 1　不同温度和 pH 下游离纤维素酶和固定化纤维素酶的相对活性**

**Table 1　Relative activity of free cellulase and immobilized cellulase under different temperature and pH**

| | 相对活性/% | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 温度/℃ | | | | | | pH | | | | | | |
| | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 |
| 游离纤维素酶 | 53.28 | 88.15 | 100.00 | 83.64 | 34.31 | 18.94 | 75.16 | 100.00 | 80.69 | 72.03 | 63.11 | 51.89 | 36.23 |
| 固定化纤维素酶 | 51.87 | 79.85 | 100.00 | 88.76 | 57.92 | 49.05 | 79.88 | 100.00 | 91.43 | 81.49 | 77.26 | 71.54 | 59.72 |

注：相对活性分别以游离纤维素酶和固定化纤维素酶在 50 ℃、pH 4.5 下的酶活力为 100%进行标化。

研究了不同 pH 和温度条件下无包覆的和被包覆的 Ct 细胞的活力。如表 2 所示，无包覆的 Ct 细胞对温度变化非常敏感，在 50 ℃时只有 11.73%的细胞活力，在 60 ℃时死亡率为 100%。相比之下，ZIF-8 外骨骼赋予细胞更高的高温耐力，并能够在 50 ℃下保持超过 50%的细胞存活率，这与最近的一项研究结果一致，即可以在微生物细胞上涂上 MOFs 以提高其在热应激下的生存能力[30]。无包覆的和被包覆的 Ct 细胞在 40 ℃下都表现出最佳的存活率。从 pH 4.0 到 7.0，细胞存活率增加(见表 2)。当 pH 设置为 4.5 时，无包覆的 Ct 相较于被包覆的细胞存活率明显下降，仅有 47.15%的荧光被检测到。而 ZIF-8 包覆的 Ct 保持了 76.31%的活力，表明了 ZIF-8 在低 pH 条件下提供了耐酸潜力。然而，当 pH 从 4.5 到 5.0 时，被包覆的 Ct 细胞的存活率仅提高了约 3%，而固定化纤维素酶的活力却有所下降（见表 1）。在此基础上，确定 pH 为 4.5，温度为 40 ℃为 SSF 的最佳条件。

**表 2　不同温度和 pH 条件下无包覆的和被包覆的 Ct 的相对细胞活力**

**Table 2　Relative cell viability of naked Ct and coated Ct under different tempreature and pH**

| Ct | 相对细胞活力/% | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 温度/℃ | | | | pH | | | | | | |
| | 30 | 40 | 50 | 60 | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 |
| 无包覆 | 42.81 | 100.00 | 11.73 | — | 29.14 | 47.15 | 52.48 | 69.05 | 79.19 | 99.16 | 100.00 |
| 被包覆 | 49.72 | 100.00 | 50.47 | 5.16 | 41.39 | 76.31 | 79.43 | 82.29 | 92.26 | 97.34 | 100.00 |

注：分别以被包覆的 Ct 在 40 ℃、pH 7 时的细胞活力为 100%进行细胞活力标化。

**2.2.2 包覆的 Ct 对预处理的玉米芯的水解和转化** 为了评价游离纤维素酶和固定化纤维素酶的性质，研究了在 pH 4.5 时，在不同温度(30、40、50、60 ℃)下纤维素水解率和葡萄糖转化率。将预处理后的玉米芯悬浮液分为游离纤维素酶和无包覆的 Ct 组(对照组)，以及 ZIF-8@ 纤维素酶包覆的 Ct 组（处理组)，预处理后的玉米芯经酶解后，纤维素转化为葡萄糖，在 50 ℃时超过 67%的预处理玉米芯被水解成葡萄糖(见表 3)达到最大转化率。与固定化纤维素酶相比，游离纤维素酶表现出更高的纤维素水解率，这与 Ingle 等报道的结果基本一致[31]。与游离纤维素酶相比，在 40 ℃下固定化纤维素酶的水解率仅略有下降，56.02%的纤维素被水解。同时，温度对无包覆的和被包覆的 Ct 细胞的葡萄糖转化率也有很大影响(见表 3)。在 40 ℃时，葡萄糖转化率最高，二者均可达 85%以上，这与之前获得的最适温度(40 ℃)非常吻合。此外，无包覆的 Ct 细胞在高温下对葡萄糖转化能力显著降低，50 ℃时葡萄糖转化率仅为 34.58%，60 ℃时仅为 2.16%，表明固有敏感的 Ct 细胞对热应激敏感。

**表 3 不同温度下游离纤维素酶和无包覆的 Ct 组（对照组)、ZIF-8@纤维素酶包覆的 Ct 组(处理组)的纤维素水解率和葡萄糖转化率**

**Table 3 Cellulose hydrolysis rates and glucose conversion percentages of free cellulase and naked Ct group (control group), ZIF-8@cellulase coated Ct group(treatment group) at different temperature**

| 温度/℃ | 纤维素水解率/% | | 葡萄糖转化率/% | |
|---|---|---|---|---|
| | 对照组 | 处理组 | 对照组 | 处理组 |
| 30 | 45.06 | 43.10 | 67.95 | 65.02 |
| 40 | 58.67 | 56.02 | 87.07 | 85.61 |
| 50 | 72.48 | 67.53 | 34.58 | 49.23 |
| 60 | 54.91 | 53.64 | 2.16 | 22.14 |

## 2.3 共固定化体系的发酵性能研究

**2.3.1 耐酸性能研究** pH 对微生物的发酵过程有着重要的影响，通过改变发酵培养基的 pH 可以影响细胞内代谢过程中关键酶的活性[32]，从而影响菌体的生长速率和产物合成。在 Ct 中，pH 的高低不仅会影响丁酸和乙酸合成途径中的关键酶的活性，还可以影响到酶的表达水平[33]。因此在微生物发酵过程中，pH 对菌体代谢具有重要影响，是判断 ZIF-8 保护作用的重要指标。

将置于 37 ℃恒温培养箱，在不同 pH 条件(4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0）的 RCM 培养基中生长 8 h 的 Ct 和 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 取出，测定比生长率、相对细胞活力和相对活性氧(ROS)水平，结果如图 4 所示。在较低 pH 时，Ct 的生长受到较大的抑制，pH 为 4.5 时抑制效果最为明显。在 pH 7.0 的条件下，

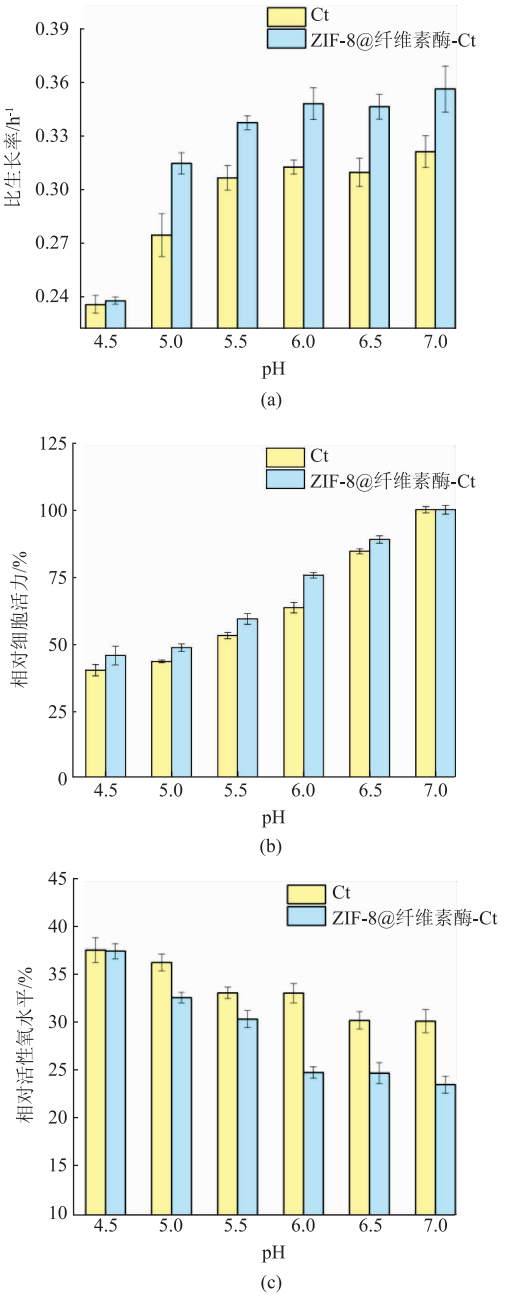



**图 4 不同 pH 条件下 Ct 和 ZIF-8@纤维素酶-Ct 的比生长率、相对细胞活力及相对活性氧水平**

**Fig. 4 Specific growth rate, relative cell viability and relative reactive oxygen levels of Ct and ZIF-8@cellulase-Ct under different pH conditions**

Ct和ZIF-8@纤维素酶-Ct的生长效果最好,可视为生长最适pH,且被包覆的Ct的细胞生长情况均优于无包覆的,其中,在pH 6.0时保护效果最为显著,相较于无包覆的菌株,ZIF-8@纤维素酶-Ct的比生长率提高了11.48%,相对活性氧水平则降低了24.92%,提高了Ct耐酸性。

**2.3.2 耐氧性能研究** Ct作为专性厌氧菌,缺乏好氧菌所具有的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,所以在有氧的环境中会受到超氧根负离子和过氧化氢的毒害,因此只能进行严格的无氧代谢[34]。但是营造严苛的无氧条件较为困难,对于Ct,生长环境中存在氧气会对其正常生长产生一定的影响,因此提高其耐氧水平,对于其生产具有一定的辅助意义。

将置于37 ℃恒温培养箱,在不同氧气体积分数(0、10%、21%)的RCM培养基中生长10 h的Ct和ZIF-8@纤维素酶-Ct取出,测定比生长率、相对细胞活力和相对活性氧(ROS)水平,结果如图5所示。可以看出,在严格厌氧的条件下,即氧气体积分数为0时,Ct和ZIF-8@纤维素酶-Ct的生长效果最好,符合Ct专性厌氧的生长特性,同时在此氧气体积分数条件下可以看出有无包覆对于其生长指标的影响不是特别显著,在氧气体积分数为10%的条件下保护效果能够凸显,有ZIF-8和纤维素酶包覆的Ct的细胞生长情况仍然是总体优于无外骨骼包覆的,但在未除氧的培养基中的Ct和ZIF-8@纤维素酶-Ct生长情况均不佳,说明添加了包覆对细胞的保护作用也在一定的限度范围内。

## 2.4 ZIF-8@纤维素酶-Ct与Ct发酵产丁酸的对比研究

各种木质纤维素原料水解所得的葡萄糖浓度一般不能直接用于丁酸发酵。因此,水解液必须通过蒸发浓缩到所需的葡萄糖浓度[35]。这一耗时耗力的生产过程不利于丁酸工业化发酵的推进。作者提出了一种新的丁酸发酵工艺MOFs(ZIF-8)介导的同步糖化发酵法(ZIF-8-SSF),选择玉米芯作为模式基质。木质纤维素原料水解24 h后,加入营养充足的RCM(G-)培养基加速被释放的葡萄糖的利用。烦琐的蒸发浓缩步骤可以消除,但葡萄糖浓度的降低可能会导致丁酸终浓度的降低。但固定化纤维素酶的pH稳定性、热稳定性增强,表明ZIF-8-SSF工艺可能具有提高丁酸产量的潜力。如表4所示,由于预处理玉米芯释放的葡萄糖可以温和地维持细胞的生长和代谢,所以依然可以在没有RCM(G-)培养基的情况下产生少量的丁酸;加入RCM(G-)培养基后,葡萄糖开始大量消耗,32 h后几乎不再转化为丁酸,被纤维素酶和ZIF-8包覆的Ct细胞产生更多的丁酸,32 h最终质量浓度达到6.74 g/L,比无包覆Ct细胞高12.52%。

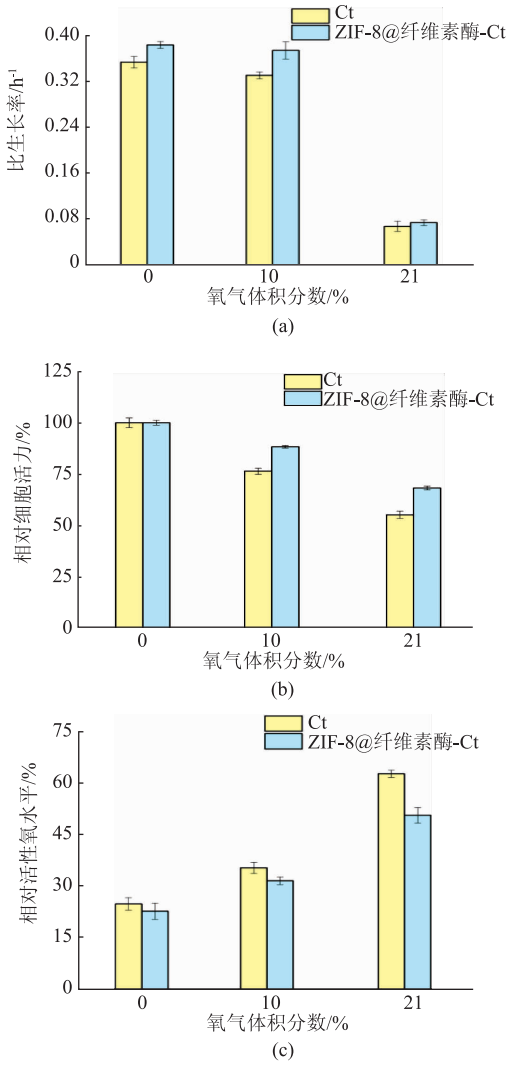



**图5 不同氧气体积分数下Ct和ZIF-8@纤维素酶-Ct的比生长率、相对细胞活力及相对活性氧水平**

**Fig. 5 Specific growth rate, relative cell viability and relative reactive oxygen levels of Ct and ZIF-8@cellulase-Ct under different $O_2$ volume ratio**

## 3 结 语

作者使用仿生矿化的方法将硝酸锌溶液和2-甲基咪唑溶液制备ZIF-8,再分隔包覆纤维素酶和Ct,获得ZIF-8@纤维素酶-Ct共固定化体系。采用

表 4　血清瓶中游离纤维素酶和无包覆的 Ct 与 ZIF-8-SSF 的丁酸发酵情况

Table 4　Butyric acid fermentation of free cellulase and naked Ct versus ZIF-8-SSF in serum bottles

| 时间/h | 丁酸质量浓度/(g/L) | | 乙酸质量浓度/(g/L) | | 葡萄糖质量浓度/(g/L) | | 木糖质量浓度/(g/L) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 游离纤维素酶和无包覆的 Ct | ZIF-8-SSF | 游离纤维素酶和无包覆的 Ct | ZIF-8-SSF | 游离纤维素酶和无包覆的 Ct | ZIF-8-SSF | 游离纤维素酶和无包覆的 Ct | ZIF-8-SSF |
| -24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| -16 | 0.25 | 0.54 | 0.04 | 0.03 | 4.59 | 4.49 | 1.44 | 1.42 |
| -8 | 0.78 | 1.41 | 0.11 | 0.14 | 9.37 | 9.06 | 1.62 | 2.07 |
| 0 | 1.27 | 2.25 | 0.57 | 0.55 | 14.68 | 14.12 | 4.51 | 4.33 |
| 8 | 4.41 | 4.57 | 0.49 | 0.24 | 6.04 | 4.51 | 3.55 | 2.71 |
| 16 | 5.19 | 5.84 | 0.62 | 0.49 | 3.11 | 1.50 | 2.96 | 2.66 |
| 24 | 5.92 | 6.29 | 1.29 | 1.06 | 1.13 | 0.22 | 1.57 | 2.13 |
| 32 | 5.99 | 6.74 | 1.31 | 1.22 | 0.10 | 0.03 | 1.21 | 1.38 |

SEM、FT-IR、XRD 等方式进行表征分析，其中 SEM 结果显示，成功制备出 ZIF-8 颗粒，并均匀包覆在 Ct 细胞表面。FT-IR 结果显示，ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 具有 ZIF-8 和 Ct 两者的吸收峰，且载体包覆细胞并没有改变载体的结构。XRD 结果显示，ZIF-8 和纤维素酶在 Ct 细胞表面附着后物化性质不变。在 SSF 过程中，保持细胞活力和酶活力的最适条件为 40 ℃、pH 4.5。在此优化条件下，玉米芯的水解率可达 56.02%，葡萄糖转化率为 85.61%。通过对比在不同 pH 和氧气体积分数下 Ct 和 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 的生长情况，可以看出 ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 的生长状态总体较无包覆的 Ct 具有更高、更稳定的比生长率、相对细胞活力和较低的相对活性氧水平，相较于其他固定化体系，ZIF-8@ 纤维素酶-Ct 共固定化体系具有操作简易，便于放大过程，且具有良好的保护效果。发酵结果表明，ZIF-8-SSF 丁酸产量 32 h 内最终质量浓度达到 6.74 g/L，比无包覆的 Ct 提高了 12.52%。

## 参考文献：

[1] GUZIK U,HUPERT-KOCUREK K,WOJCIESZYNSKA D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases[J]. **Molecules**,2014,19(7):8995-9018.

[2] DATTA S,CHRISTENA L R,RAJARAM Y R. Enzyme immobilization:an overview on techniques and support materials[J]. **3 Biotech**,2013,3(1):1-9.

[3] LYKOURINOU V,CHEN Y,WANG X S,et al. Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework,MP-11@mesoMOF:a new platform for enzymatic catalysis[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2011,133(27):10382-10385.

[4] ZHANG J,CHENG N,GE B. Characterization of metal-organic frameworks by transmission electron microscopy[J]. **Advances in Physics-X**,2022,7(1):1-35.

[5] LIU L,ZHOU Y,LIU S,et al. The applications of metal-organic frameworks in electrochemical sensors[J]. **Chem Electro Chem**,2018,5(1):6-19.

[6] FENG Y,ZHAO Y,GE J. Impact of the size effect on enzymatic electrochemical detection based on metal-organic frameworks[J]. **Analytica Chimica Acta**,2021,1149:1-7.

[7] CHEN G S,KOU X X,HUANG S M,et al. Modulating the biofunctionality of metal-organic framework-encapsulated enzymes through controllable embedding patterns[J]. **Angewandte Chemie-International Edition**,2020,59(7):2867-2874.

[8] LIANG K,RICHARDSON J J,DOONAN C J,et al. An enzyme-coated metal-organic framework shell for synthetically adaptive cell survival[J]. **Angewandte Chemie-International Edition**,2017,56(29):8510-8515.

[9] JI Z,ZHANG H,LIU H,et al. Cytoprotective metal-organic frameworks for anaerobic bacteria[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2018,115(42):10582-10587.

[10] ZHU W，GAO J，LIU H，et al. Antibiofilm effect of sodium butyrate against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Food Control**，2022，131：1-11.

[11] LI Z，YI C X，KATIRAEI S，et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit[J]. **Gut**，2018，67(7)：1269-1279.

[12] BAI H，YANG P，ZHANG H，et al. Short-chain fatty acid butyrate acid attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice and the underlying mechanism[J]. **Acta Physiologica Sinica**，2021，73(1)：42-50.

[13] CHEN W，ZHANG S，WU J，et al. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis[J]. **Clinica Chimica Acta**，2020，507：236-241.

[14] BEDFORD A，GONG J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production[J]. **Animal Nutrition**，2018，4(2)：151-159.

[15] BROWNING M，WALLACE D B，DAWSON C，et al. Potential of butyric acid for control of soil-borne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries[J]. **Soil Biology and Biochemistry**，2005，38(2)：401-404.

[16] HUDCOVIC T，KOLINSKA J，KLEPETAR J，et al. Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis：differential regulation of tumour necrosis factor-$\alpha$ and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice[J]. **Clinical and Experimental Immunology**，2012，167(2)：356-365.

[17] LIU X，YANG S. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant [J]. **Process Biochemistry**，2006，41(4)：801-808.

[18] LIU S，BISCHOFF K，LEATHERS T，et al. Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by *Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213[J]. **Bioresource Technology**，2013，143：322-329.

[19] KIM M，KIM K Y，LEE K M，et al. Butyric acid production from softwood hydrolysate by acetate-consuming *Clostridium* sp. S1 with high butyric acid yield and selectivity[J]. **Bioresource Technology**，2016，218：1208-1214.

[20] SUO Y K，LIAO Z P，QU C Y，et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from undetoxified corncob acid hydrolysate[J]. **Bioresource Technology**，2019，271：266-273.

[21] MAZYAR Y. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA，DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species *in vitro*[J]. **Toxicology *in Vitro***，2015，30(1)：578-582.

[22] KALYANARAMAN B，DARLEY-USMAR V，DAVIES K J A，et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes：challenges and limitations[J]. **Free Radical Biology and Medicine**，2012，52(1)：1-6.

[23] FU H X，YU L，LIN M，et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from glucose and xylose[J]. **Metabolic Engineering**，2017，40：50-58.

[24] VAIDYA L B，NADAR S S，RATHOD V K. Entrapment of surfactant modified lipase within zeolitic imidazolate framework (ZIF)-8[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**，2020，146：678-686.

[25] GREWAL J，AHMAD R，KHARE S K. Development of cellulase-nanoconjugates with enhanced ionic liquid and thermal stability for in situ lignocellulose saccharification[J]. **Bioresource Technology**，2017，242：236-243.

[26] HOSSEINI S H，HOSSEINI S A，ZOHREH N，et al. Covalent immobilization of cellulase using magnetic poly (ionic liquid) support：improvement of the enzyme activity and stability[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2018，66(4)：789-798.

[27] ABRAHAM R E，VERMA M L，BARROW C J，et al. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass[J]. **Biotechnology for Biofuels**，2014，7：1-12.

[28] ZHOU M，JU X，ZHOU Z，et al. Development of an immobilized cellulase system based on metal-organic frameworks for improving ionic liquid tolerance and in situ saccharification of bagasse[J]. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**，2019，7(23)：19185-19193.

[29] AHMED I N，CHANG R，TSAI W B. Poly (acrylic acid) nanogel as a substrate for cellulase immobilization for hydrolysis of cellulose[J]. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**，2017，152：339-343.

[30] ZHAO Y Q, TANG R K. Improvement of organisms by biomimetic mineralization: a material incorporation strategy for biological modification[J]. **Acta Biomaterialia**, 2021, 120: 57-80.

[31] INGLE A P, RATHOD J, PANDIT R, et al. Comparative evaluation of free and immobilized cellulase for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable bioethanol production[J]. **Cellulose**, 2017, 24(12): 5529-5540.

[32] WU Q, ZHU L Y, XU Q, et al. Tailoring the oxidative stress tolerance of *Clostridium tyrobutyricum* CCTCC W428 by introducing trehalose biosynthetic capability[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017, 65(40): 8892-8901.

[33] 索玉凯. 代谢工程改造酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)强化丁酸生产及木质纤维素利用[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.

[34] 宫利宏. 一种简易厌氧培养装置的初步研究及应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.

[35] SUO Y K, FU H X, REN M M, et al. Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing class I heat shock protein GroESL[J]. **Bioresource Technology**, 2018, 250: 691-698.

## 科　技　信　息

**欧盟通过了关于回收塑料食品接触材料的法规**

2022 年 9 月 15 日, 欧盟委员会正式通过了关于再生塑料材料和与食品接触的物品的新法规。新法规要求欧洲食品安全局(EFSA)评估并在适当情况下授权“能够生产安全塑料”的传统和新型回收工艺, 同时概述了质量控制和执法情况。

为了帮助成员国提高透明度和加强执法, 该法规建立了欧盟回收商的注册、回收过程、回收装置、设施、回收计划和新技术。欧盟在 2021 年 12 月至 2022 年 1 月期间收集了对拟议法规的意见, 并在 2022 年 3 月发布了更新的草案。

该法规于 2022 年 10 月生效。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.欧盟通过了关于回收塑料食品接触材料的法规[EB/OL]. (2022-9-21). http://www.tbtguide.com/c/mypt/gwxw/512410.jhtml