

Tween 80 和鼠李糖脂对稻草酶解的影响

莫丹, 袁兴中*, 曾光明, 刘佳

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 采用纤维素酶促水解的方法, 以稻草为底物, 探讨了添加化学表面活性剂 Tween 80 和生物表面活性剂鼠李糖脂对酶解过程的糖产率、酶稳定性、纤维素转化率的作用以及对酶动力学特征和酶在纤维素上吸附的影响. 结果表明, 不同浓度的 Tween 80 和鼠李糖脂对稻草酶解有不同程度的促进, 添加 0.016% 和 0.048% Tween 80 使糖产率分别提高 18.07% 和 11.98%, 而添加 0.01% 和 0.03% 鼠李糖脂使糖产率分别增加了 23.01% 和 22.16%, 相比较鼠李糖脂的效果更好. 表面活性剂能有效增强酶的稳定性, 添加高浓度表面活性剂的酶稳定性优于添加低浓度表面活性剂, 添加浓度为 0.048% 的 Tween 80 得到最高相对 CMCA(羧甲基纤维素酶活) 108.06% 和最高相对 FPA(滤纸酶活) 80.26%. 表面活性剂能提高酶解反应的纤维素转化率, 而且添加鼠李糖脂的转化率明显高于 Tween 80. 表面活性剂不仅能够提高最大反应速度并使米氏常数变大, 而且显著地降低了纤维素酶在纤维素上的吸附.

关键词: 酶水解; 鼠李糖脂; Tween 80; 酶稳定性; 纤维素

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)07-1998-07

Effect of Tween 80 and Rhamnolipid on Enzymatic Hydrolysis of Straw

MO Dan, YUAN Xing-zhong, ZENG Guang-ming, LIU Jia

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The method of enzymatic hydrolysis was adopted and straw was used as substrate to study the effects of reducing sugar yield, enzyme stability and conversion rate of cellulose during the course of enzymatic hydrolysis as well as the impacts of enzyme kinetic characteristics and adsorption of cellulase on cellulose by addition of chemical-surfactant Tween 80 and biosurfactant rhamnolipid. The results indicated that Tween 80 and rhamnolipid at different concentrations enhanced the production of reducing sugar. Tween 80 at 0.016% and 0.048% increased reducing sugar yield by 18.07% and 11.98%, while rhamnolipid at 0.01% and 0.03% increased reducing sugar yield by 23.01% and 22.16%, respectively. It can be seen from the experimental results that surfactants improved enzyme stability availably. Surfactants at high concentrations were superior to those at low concentrations in enzyme stability. Tween 80 at 0.048% obtained maximal relative carboxymethylcellulose activity (CMCA) 108.06% and maximal relative filter paper activity (FPA) 80.26%. Surfactants also enhanced conversion rate of cellulose, and that in the present of rhamnolipid, the percent conversion of cellulose was higher than those with Tween 80 distinctly. Moreover, surfactants not only promoted maximal velocity of enzymatic reaction and largened Michaelis constant but also reduced adsorption of cellulase on cellulose remarkably.

Key words: enzymatic hydrolysis; rhamnolipid; Tween 80; enzyme stability; cellulose

随着世界人口的增长和工业化国家的大量出现, 能源消耗从上世纪开始持续增加, 利用木质纤维素生产酒精, 是替代有限原油且令人满意的可再生能源的来源, 对缓解能源危机起着重要作用. 木质纤维素制取酒精包括木质纤维素水解生产还原糖和发酵还原糖生产酒精 2 个过程, 其成本在目前技术水平上相对较高, 主要是由于水解过程的高消耗和低产出^[1]. 酶促水解是其中的一种重要方法, 该法是在较低温下利用高度专一的纤维素酶对纤维素进行水解, 通过酶将固体纤维转变为可溶性糖, 成本低于酸解和碱解. 然而, 高的纤维素转化率要求高的酶负荷, 使得生产过程不够经济^[2]. 为了降低生产成本, 需要对纤维素酶水解法作深入研究. 目前, 纤维素酶水解法有 2 个重要的研究热点: 提高酶的活性及水解率^[2].

近年来, 通过加入表面活性剂来改善纤维素酶水解的研究得到越来越多的重视. 据报道, 添加表面活性剂有利于酶解反应, 不仅能提高水解率还能降低酶负荷^[2-6]. 表面活性剂是能够降低溶剂表面张力的物质, 其分子结构一般由极性和非极性基团构成. 非离子型表面活性剂与离子型表面活性剂相比, 具有稳定性高、相容性好和溶解性强等优点. 而生物表面活性剂是一种由微生物产生的表面活性物质, 在许多方面优于化学合成的表面活性剂, 如无毒、具有可降解性、来自于可再生资源、在极端条件下可以起作用等, 使其在很多方面可以逐渐代替化学合成

收稿日期: 2007-07-16; 修订日期: 2007-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50678062)

作者简介: 莫丹 (1981 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为木质纤维素制取燃料酒精, E-mail: modan522@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: yxz@hnu.cn

的表面活性剂,有着广阔的应用前景^[7]。

目前,国内外的研究主要集中在化学表面活性剂的应用,而对生物表面活性剂的应用还比较少。本研究采用酶促水解稻草的方法,选取了非离子表面活性剂 Tween 80 和生物表面活性剂鼠李糖脂添加到反应中进行对比实验,通过分析表面活性剂对还原糖产率、酶活、纤维素转化率、酶动力学特征、吸附性等方面的影响,以期为进一步探讨表面活性剂的应用和作用机制提供更多依据,对于提高稻草等废弃木质纤维素的利用率以及减少生产过程对环境的污染具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:经稀酸预处理后的稻草^[8];菌株:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) AB93066,购于武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC);Tween 80(化学公司购得);鼠李糖脂(本实验室制得);纤维素酶(上海贝塔生物技术有限公司生产);种子培养基^[9];发酵培养液^[9]。

仪器:纤维素测定仪(Fibertec 2010,福斯公司生产)。

1.2 鼠李糖脂的制备

鼠李糖脂通过 *P. aeruginosa* 在含有 2 L 矿盐的 3 L 发酵罐中生产,从斜面接种铜绿假单胞菌到种子培养基,培养 24 h 后接入发酵培养液,细菌的生长条件是 37℃,pH 6.5,搅拌速度 550 r/min,通风速率为 2.21 min⁻¹。发酵 48 h 后,细菌细胞通过离心(10 000 r/min,20 min)从发酵液中去除,然后发酵液用 1 mol/L HCl 调 pH 值接近 2.0,再用氯仿和甲醇萃取。发酵液:氯仿:甲醇的比例 = 3:2:1(体积比)。将溶液层用旋转蒸发仪在真空条件下沉淀和浓缩可获得粗制鼠李糖脂^[9]。

1.3 表面活性剂对稻草酶解的影响

酶解反应条件为:固液比 2%,50℃,pH 4.8,100 r/min。在锥形瓶中加入稻草,组成 5 个样品,以不加表面活性剂的样品为对照,其余 4 个样品分别加入不同浓度的 Tween 80 和鼠李糖脂及适量柠檬酸缓冲溶液,均匀混合后预热,每组样品设 1 个平行样;最后加入纤维素酶(5 FPU/g 底物)。定时取样,测定还原糖量^[10]、FPA^[11]和 CMCA^[11],收集残渣待测定纤维素含量。

1.4 表面活性剂对稻草中纤维素含量的影响

根据 Goering 等^[12]的方法测定稻草中纤维素的含量。用纤维素测定仪,依次经中性洗涤液、酸性洗涤液和 72% 硫酸溶液浸洗,并称重,最后在马弗炉中 550℃ 条件下焚烧灰化。半纤维素含量为中性洗涤纤维(NDF)与酸性洗涤纤维(ADF)重量的差值,纤维素含量为酸性洗涤纤维与其经 72% 浓硫酸浸洗后重量之差;木质素可以由焚烧灰化前后的重量差值得出,而灰分含量为焚烧后的重量减去坍塌重量。

1.5 表面活性剂对米氏常数和最大反应速度的影响

反应条件同 1.3。实验分为 6 组,每组称取稻草 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 g 分别放进锥形瓶中,加入柠檬酸缓冲溶液,预热后添加不同浓度的表面活性剂并且平衡 1 h,最后加入纤维素酶(5 FPU/g 底物)。计时取样,移出液经沸水浴后离心,取上层清液,用 DNS 法^[10]分析还原糖含量。

1.6 表面活性剂对酶在稻草上吸附的影响

酶解反应条件为:固液比 2%,0℃,pH 4.8,100 r/min。首先在锥形瓶中加入稻草、柠檬酸缓冲溶液和表面活性剂,接着放置于 0℃ 冰水摇床中稳定后加入酶液(5 FPU/g 底物)。计时取样,取上层清液测 FPA^[11]。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂对还原糖产率的影响

通过添加不同浓度的 Tween 80 和鼠李糖脂,考察了 2 种表面活性剂对纤维素酶解所得还原糖产率的影响,如图 1 所示。

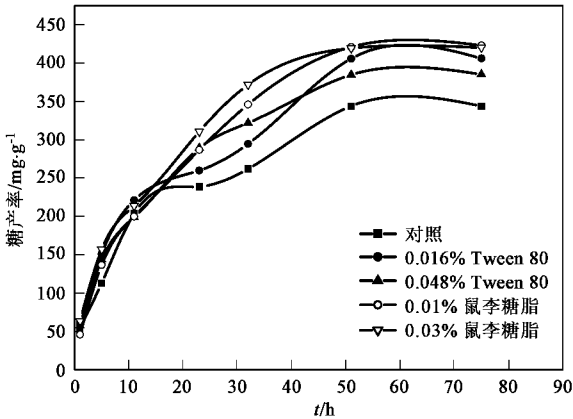


图 1 表面活性剂对糖产率的影响

Fig.1 Effects of surfactants on sugar yield

从曲线的趋势可以看出,糖产率随着酶解的进行而增加。加入表面活性剂 Tween 80 和鼠李糖脂的样品,糖产率在反应初期略高于对照,且呈近似线性

增长;从反应中期开始,添加了表面活性剂样品的糖产率大幅度高于对照,并将优势保持到反应结束.所有样品的糖产率在 51 h 接近最高值,延长酶解至 75 h 糖产率基本维持不变.添加 0.016% 和 0.048% Tween 80 的样品,糖产率与对照相比分别提高了 18.07% 和 11.98%;添加 0.01% 鼠李糖脂的样品得到最高糖产率 $423.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,比对照增加 23.01%,而加入 0.03% 鼠李糖脂的样品使糖产率提高 22.16%.结果表明,酶解反应产率与所添加表面活性剂的种类及浓度有关,添加鼠李糖脂的糖产率高于添加 Tween 80;对于同种表面活性剂,添加适宜的浓度能够最大程度地提高产率,在本实验中,添加 0.016% Tween 80 和 0.01% 鼠李糖脂对酶解的促进效果最好.

2.2 表面活性剂对酶活的影响

考察酶解过程中 CMCA 和 FPA 的变化情况,以不添加表面活性剂的对照样品为基准作相对酶活曲线,结果如图 2 和图 3 所示.

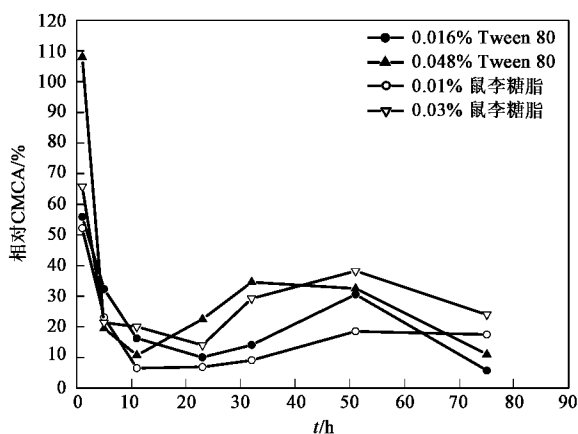


图 2 表面活性剂对 CMCA 的影响

Fig.2 Effects of surfactants on CMCA

表面活性剂在酶解的各阶段能够不同程度地促进 CMCA.在反应最初 1 h,添加表面活性剂样品的 CMCA 较对照增幅最大,其中添加浓度为 0.048% Tween 80 的样品较对照提高 108%,而添加 0.03% 鼠李糖脂的相对 CMCA 达 65.82%.此后到反应进行 11 h 期间,相对 CMCA 陡然下降,随后变化趋于平缓稳定,有小幅波动.在反应的中后期,添加 0.048% Tween 80 样品的相对 CMCA 持续高于添加 0.016% Tween 80 的样品.而添加 0.03% 鼠李糖脂样品的相对 CMCA 在整个反应过程中均高于添加 0.01% 鼠李糖脂的样品.

图 3 反映了表面活性剂对酶解过程中 FPA 的

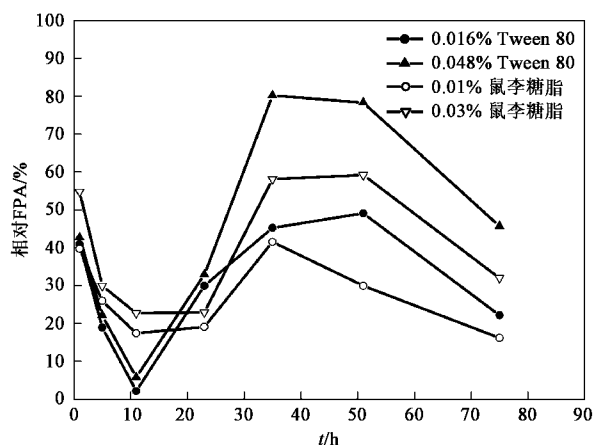


图 3 表面活性剂对 FPA 的影响

Fig.3 Effects of surfactants on FPA

影响.

与 CMCA 相似的是,表面活性剂同样能提高酶解过程的 FPA,各样品的相对 FPA 先降后升,高低交替.在添加 Tween 80 的样品中,0.048% Tween 80 的相对 FPA 高于 0.016% Tween 80,其最高值 80.25% 出现在 35 h.添加 0.03% 鼠李糖脂的样品比添加 0.01% 鼠李糖脂更有利于提高酶活的稳定性,其相对 FPA 在 51 h 处达到 59.19% 的极大值.随着添加浓度的增加,Tween 80 和鼠李糖脂对酶活的促进作用越明显.

结合图 2 和图 3 可知,FPA 和 CMCA 的相对酶活曲线呈现不同程度的波动,说明表面活性剂对酶稳定性的提高在反应的各个时期并不相同.综合整个酶解过程,相对 FPA 处于较高数值的时间明显多于相对 CMCA,说明表面活性剂对 FPA 的促进效果比 CMCA 更显著.

2.3 表面活性剂对酶解反应纤维素转化率的影响

用纤维素测定仪测定反应结束后剩余残渣的纤维素含量,以考察表面活性剂对酶解反应中纤维素转化率的作用,结果如图 4 所示.

由图 4 可知,对照、添加 0.016% Tween 80、0.048% Tween 80、0.01% 鼠李糖脂和 0.03% 鼠李糖脂样品的纤维素转化率分别为 12.1%、13.0%、14.2%、18.2%、18.6%.由此可见,添加表面活性剂样品的纤维素转化率高于对照组样品,说明表面活性剂能有效提高纤维素转化率.添加 Tween 80 样品的纤维素转化率略高于对照;而添加鼠李糖脂样品的纤维素转化率明显高于对照和添加 Tween 80 的样品,表明鼠李糖脂能够最有效地增加纤维素转化率.对于同类表面活性剂,添加浓度越大纤维素转化

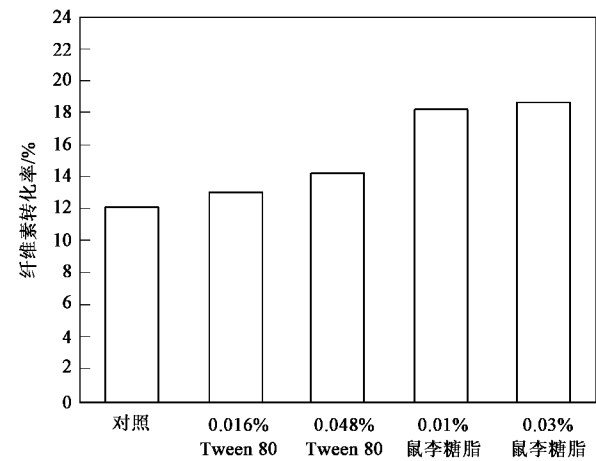


图 4 表面活性剂对纤维素转化率的影响

Fig.4 Effects of surfactants on conversion rate of cellulose

率越高,但差异并不明显.

2.4 表面活性剂对酶动力学特征的影响

酶促反应动力学研究了影响酶催化反应的速度及影响反应速度的各种因素,其中 Michaelis-Menten 动力方程运用最为广泛.利用 Lineweaver-Burk 法作

图,取 Michaelis-Menten 的倒数式,如下:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

式中, V_{max} 为酶促反应的最大速度, K_m 为米氏常数, $[S]$ 为底物浓度.

用 Lineweaver-Burk 法作图可得图 5,由其测定出的米氏方程及计算所得到的 K_m 和 V_{max} 如表 1 所示.

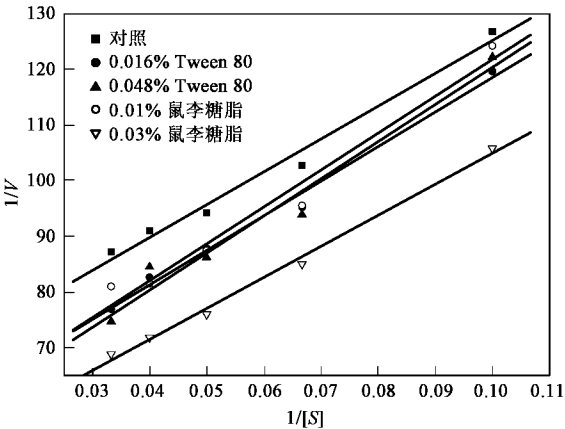


图 5 L-B 双倒数图

Fig.5 Lineweaver-Burk plot

表 1 表面活性剂对酶动力学特征的影响

Table 1 Effects of surfactants on enzyme kinetic characteristics				
样品	米氏方程	$V_{max}/g \cdot (L \cdot min)^{-1}$	$K_m/g \cdot L^{-1}$	R^2
对照	$y = 590.05x + 66.157$	0.015 116	8.918 935	0.984 0
添加 0.016% Tween 80	$y = 662.68x + 55.505$	0.018 016	11.939 10	0.971 5
添加 0.048% Tween 80	$y = 557.51x + 49.162$	0.020 341	11.340 26	0.994 4
添加 0.01% 鼠李糖脂	$y = 629.4x + 55.784$	0.017 938	11.290 09	0.990 1
添加 0.03% 鼠李糖脂	$y = 686.69x + 52.493$	0.019 050	13.08 155	0.974 4

由表 1 可知,添加表面活性剂可以提高最大反应速度和米氏常数.高浓度的同种表面活性剂相比低浓度对反应最大速度的影响更为明显,其中添加 0.048% Tween 80 和 0.03% 鼠李糖脂的样品使最大速度分别增加了 34.57% 和 26.03%.此外,添加表面活性剂的 K_m 大于对照,因为 K_m 值和达到最大反应速度一半所需要的底物浓度成正比,所以 K_m 值和酶与底物的亲和力成反比,即表面活性剂能减小酶与底物的亲和力.

2.5 表面活性剂对纤维素酶在纤维素上吸附的影响

选取对照、添加 0.048% Tween 80 和 0.03% 鼠李糖脂的样品为代表,研究表面活性剂对酶在纤维素上吸附的作用,结果如图 6 所示.

3 个样品的酶吸附率由高到低为: 对照 >

0.03% 鼠李糖脂 > 0.048% Tween 80,而且所有样品均呈现周期性的吸附和解吸.其中,对照、添加

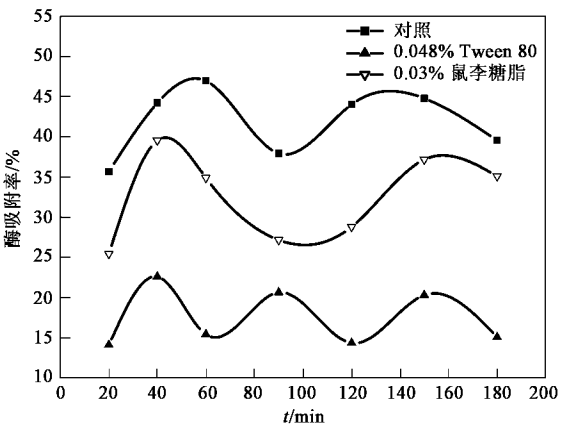


图 6 表面活性剂对纤维素酶在纤维素上吸附的影响

Fig.6 Effects of surfactants on adsorption of cellulase on cellulose

0.048% Tween 80 和 0.03% 鼠李糖脂的最大酶吸附率分别为 46.96%、22.61%、39.57%，用 t 检验法对平均吸附率进行显著性检验，结果表明，添加 0.048% Tween 80 和 0.03% 鼠李糖脂的样品与对照差异显著， t 值分别为 -11.787 9 和 -3.594 9 ($t_{0.05} = 2.178 8$)，即能显著降低吸附率。各样品的吸附-解吸平衡周期不同，对照、添加 0.048% Tween 80 和添加 0.03% 鼠李糖脂样品的周期分别约为 80 min、60 min 和 120 min。

3 讨论

3.1 表面活性剂对糖产率的影响

根据图 1 可知，添加表面活性剂能增加酶解反应的糖产率。其原因可能是表面活性剂改变了反应系统的表面和界面特征，降低了液气平衡相中的表面张力和自由能，因此影响了水解中固体底物和反应液中的酶及可溶性糖的运输^[13]，有利于反应的进行。Helle 等^[13]认为，表面活性剂降低了表面张力，并通过影响酶结构的憎水部分阻止纤维素酶的表面失活从而提高反应效率。另有研究发现，酶解产率的增加可能是由于加入的非离子表面活性剂降低了水解过程中液-固界面的纤维素酶的变性作用^[5]。还有报道认为，表面活性剂可以提高反应部位的有效性以促进酶解^[6]。

此外，结果还表明，添加 0.016% Tween 80 和 0.01% 鼠李糖脂的样品得到的糖产率最高，2 个浓度均为临界胶束浓度，说明该浓度对反应的促进效果最好。在临界胶束浓度下，气液相交界面的表面活性剂饱和，再继续加入表面活性剂会使表面活性剂聚合成为胶束，表面张力不能进一步下降^[13]。Womack 等^[14]认为，超过临界胶束浓度的表面活性剂可能与酶蛋白结合在一起，因此对酶活有不利的影响。Mizutani 等^[15]研究得出表面活性剂发挥最大效果的浓度和该表面活性剂临界胶束浓度几乎一致的结论。

3.2 表面活性剂对酶活的影响

一般认为表面活性剂能使酶的稳定性增加从而提高产量。本实验的相对酶活曲线显示，酶解过程中表面活性剂存在下样品的酶活高于对照。分析其原因，Reese^[16]认为表面活性剂可能通过干扰酶的憎水性蛋白阻止酶的失活。

CMCA 反映的是葡聚糖内切酶酶活，FPA 表示总纤维素酶活，反映纤维素酶各组分的复合效应。本实验对 CMCA 和 FPA 的研究表明，表面活性剂对

CMCA 的促进作用较小，而使 FPA 明显提高，说明表面活性剂虽然不能有效提高葡聚糖内切酶酶活，但有助于几种酶相互间的协调综合作用，从而提高了酶的稳定性或者减少了反应过程中酶的变性和失活。此外，葡聚糖内切酶的作用主要是攻击纤维素纤维的低结晶区，产生游离的链末端基，CMCA 的提高促进了协同作用的第一步，因而有利于酶解。Henrissat^[17]认为，在内-外协同的纤维素降解过程中，生产还原糖的有限的酶是外切酶，少量的内切酶可以提供大量的链条状末端以浸透存在的外切酶，因此只需要少量的内切酶活就能产生大量的还原糖。值得注意的是，酶活最高的样品与酶解率最大的样品并非完全一致，可能除酶活以外，还有其他影响因素。

由图 2 和图 3 可以看出，反应初期的相对 CMCA 和 FPA 均出现大幅下降再上升，后较平稳波动的趋势。起初相对酶活较高可能是因为酶解反应的第一步是溶液中的纤维素酶吸附到纤维素底物的表面^[13]，表面活性剂使纤维素迅速被润湿并与纤维素酶紧密结合，Park 等^[2]发现反应开始 1 h 内酶会非常迅速地吸附在底物上面。由于酶首先吸附在纤维素官能团上没有解吸，阻止了纤维素与游离酶的进一步反应，造成酶失活，而表面活性剂制造了一个亲水性的环境，对酶从纤维素的官能团上解吸起到重要作用^[2]。有研究发现，表面活性剂通过在酶失活前使其便于解吸来阻止酶的失活^[13]。酶的吸附和解吸维持着一定的平衡，在反应初始阶段表面活性剂的促解吸作用因酶的大量吸附而较为强烈，后随着游离酶的增多解吸相对减缓。反应过程中相对酶活的变动与酶吸附-解吸平衡的周期性变化有关，酶的吸附率对酶活有重要影响。

3.3 表面活性剂对纤维素转化率的影响

从图 4 可以看出，表面活性剂能够促进纤维素的转化，加大了酶解程度，从而得到更多产物。Eriksson 等^[6]认为，表面活性剂对酶和底物的相互作用有积极影响，使得纤维素的转化率提高。表面活性剂与木质素的吸附阻止了酶与木质素的无效联结^[6]。还有报道认为，表面活性剂可以通过提高纤维素表面的有效性或者去除抑制的木质素来改变底物的性质从而增加纤维素转化率^[13]。

3.4 表面活性剂对酶动力学特征参数的影响

由图 5 得出的酶动力学方程可知，添加表面活性剂的样品提高了最大反应速度，米氏常数大于对照，但两者与表面活性剂的添加浓度和最终酶解率

无比例关系,反应速度最大和米氏常数最小的样品糖产率并非最高,可能是由于影响反应的因素众多,不仅与最大速度有关,还和酶解的平均速度相关;米氏常数增大说明降低了酶与底物的亲和力,虽然亲和力减小较不容易达到最大反应速度,但可以阻止酶与纤维素的无效接触,提高整体反应程度;同时由于米氏常数变大,使酶表现为相对过剩,在用酶量相同的情况下,提高了酶解率,这也是表面活性剂的作用之一。

3.5 表面活性剂对酶在纤维素上吸附的影响

酶解反应包括酶吸附到底物上形成酶-底物综合体。本实验的酶吸附率曲线表明,添加 0.048% Tween 80 和 0.03% 鼠李糖脂样品的吸附率均低于对照,添加鼠李糖脂样品的吸附率高于 Tween 80。相比较三者的酶活,得出的规律是吸附率和酶活成反比,吸附率高则酶活低。该结论也有相关报道,当表面活性剂存在的时候,水解过程中酶对纤维素的吸附降低了^[13]。Gusakov 等^[18]认为,纤维素酶在水解中明显失活是由于酶紧密地吸附在纤维素的表面。Mizutani 等^[15]发现,表面活性剂的存在降低了溶液中表面活性剂的张力,阻止了葡聚糖内切酶与纤维素表面的无效吸附,允许糖化中的葡聚糖外切酶大量且更深入地接触纤维素链条末端,从而促进糖的生成。因此可以推测,表面活性剂通过减少葡聚糖内切酶的无效吸附,使得游离的葡聚糖内切酶产生更多的游离链末端基,促进了纤维二糖水解酶将纤维二糖单元从游离的链末端基中脱除,以进一步降解纤维素,这与本实验发现的表面活性剂提高了 CMCA 和 FPA 相符。

此外,酶吸附率曲线呈波浪式的周期性变化,维持着吸附-脱附的动态平衡。陈洪章等^[19]的吸附实验也得出类似的结果。吸附平衡对于葡聚糖内、外切酶的协同作用很重要^[4]。Mandels 等^[20]等陈述说吸附的葡聚糖外切酶和葡聚糖内切酶综合体是有活性的,但是在综合体的反复解吸和吸附过程中,大量的两种成分的酶将会各自以失活的状态吸附。Lee 等^[21]认为,纤维素酶的水解只有在纤维素酶成分的有效吸附发生最有利的条件下能够被促进。由此,再次验证了表面活性剂有利于纤维素酶解过程中各种酶之间的协同作用,体现出来是整体的酶吸附率的降低以及酶吸附率的周期性变化。分析表面活性剂减少酶吸附率的原因,Eriksson 等^[6]认为,表面活性剂链条上的憎水部分通过憎水相互作用与木质纤维素纤维上的木质素联结,表面活性剂上的亲水端基团阻

止了纤维素酶在木质素上的无效吸附。

4 结论

(1)表面活性剂能有效促进纤维素酶解反应,对于同种表面活性剂,临界胶束浓度下的表面活性剂效果最好,添加 0.016% Tween 80 和 0.01% 鼠李糖脂的糖产率最高。2 种表面活性剂相比较,鼠李糖脂的促进作用更明显,而且生物表面活性剂的良好效果和对环境的友好性值得在以后的研究中进一步关注。

(2)表面活性剂有利于增强酶的稳定性,能不同程度地提高反应过程的 CMCA 和 FPA,而且对 FPA 的作用效果更好,说明少量 CMCA 的增加对各酶综合效应影响较大。

(3)表面活性剂提高了纤维素转化率,使更多的纤维素参与反应,促进了酶解,其中添加鼠李糖脂的效果明显优于 Tween 80。

(4)加入表面活性剂能提高酶促反应的最大速度,使米氏常数变大,降低了酶与底物的亲和力,提高了纤维素酶的利用效率。

(5)表面活性剂能显著减少酶在纤维素上的吸附,从而降低无效吸附酶的数量,增加游离酶与纤维素反应,同时也使纤维素酶更易于回收。

参考文献:

- [1] Sun Y, Cheng J J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, **83**: 1-8.
- [2] Park J W, Takahata Y, Kajiuchi T, *et al.* Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper[J]. *Biotech Bioeng*, 1992, **39**(1): 117-120.
- [3] Wu J, Ju L K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition[J]. *Biotech Prog*, 1998, **14**: 649-652.
- [4] Ooshima H, Sakata M, Harano Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfatant[J]. *Biotech Bioeng*, 1986, **23**: 1727-1734.
- [5] Castanon M, Wike C R. Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper[J]. *Biotech Bioeng*, 1981, **23**: 1365-1372.
- [6] Eriksson T, Brjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31**: 353-364.
- [7] 刘佳,袁兴中,曾光明,等.表面活性剂对绿色木霉产纤维素酶影响的实验研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(8): 62-64.
- [8] Sun Y, Cheng J J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2005, **96**: 1599-1606.
- [9] Liu J, Yuan X Z, Zeng G M. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2006, **41**: 2347-2351.

- [10] Miller G L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem, 1959, **31**: 426-428.
- [11] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure Appl Chem, 1987, **59**: 257-268.
- [12] Goering H K, Van Soest P J. Agricultural handbook No. 379 Forage fiber analyses: apparatus, reagentes procedures and some applications [M]. Washington: USDA, 1970. 20.
- [13] Helle S S, Duff S J B, Cooper D G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis[J]. Biotech Bioeng, 1993, **42**(5): 611-617.
- [14] Womack M D, Kendall D A, MacDonald R C. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes[J]. Biochim Biophys Acta, 1983, **733**: 210-215.
- [15] Mizutani C, Sethumadhavan K, Howley P, *et al.* Effect of a nonionic surfactant on *Trichoderma* cellulose treatments of regenerated cellulose and cotton yarns[J]. Cellulose, 2002, **9**: 83-89.
- [16] Reese E T. Inactivation of cellulose by shaking and its prevention by surfactants[J]. Appl Biochem, 1990, **2**: 36-39.
- [17] Henrissat B. Cellulases and their interactions with cellulose [J]. Cellulose, 1994, **1**: 169-196.
- [18] Gusakov A V, Sinitsyn A P, Klyosov A A. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 2. A mathematical model for the process in a plug-flow column reactor[J]. Enzyme Microb Technol, 1985, **7**: 383-388.
- [19] 陈洪章, 李佐虎. 影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 2000, **16**(1): 33-34.
- [20] Mandels M, Medeiros J E, Androtti R E, *et al.* Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulose culture filtrates under use condition [J]. Biotech Bioeng, 1981, **23**: 2009-2023.
- [21] Lee S B, Shin H S, Ryu D D Y, *et al.* Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis[J]. Biotech Bioeng, 1982, **24**: 2137-2153.