

逆胶束体系中纤维素酶解特性研究

王伟伟^{1,2}, 袁兴中^{1,2*}, 曾光明^{1,2}, 梁运珊^{1,2}, 晁阳^{1,2}

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 2. 湖南大学环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082)

摘要:通过采用几种不同属性类型的表面活性剂构建逆胶束体系,以羧甲基纤维素为底物,研究了纤维素酶解的特性.通过电导率的测量,确定由CTAB、SDS、Tween-80和鼠李糖脂构造的逆胶束体系的最大增溶水量 W_0 ($W_0 = [H_2O]/[SA]$)分别为15.2、20.1、2.3和40.3.在此条件下,考察了不同表面活性剂浓度和不同纤维素酶用量对逆胶束体系酶解行为的影响,并与水溶液体系的酶解反应进行对比.结果表明,单位底物条件下,纤维素酶用量为0.15 FPU/g,CTAB、SDS、Tween-80和鼠李糖脂浓度均为1 cmc时,逆胶束体系酶解产量最高,其中鼠李糖脂体系产量可达198.03 mg,分别比CTAB、SDS和Tween-80体系高了10.89%、31.09%和45.30%.CTAB、SDS、Tween-80和鼠李糖脂浓度为1 cmc时,其逆胶束体系酶解产量比水溶液体系分别高了34.36%、21.24%、11.44%和34.62%.在最佳表面活性剂浓度条件下单位底物酶用量为5 FPU时,逆胶束体系酶解反应从经济和糖产量方面考虑均为最适合.生物表面活性剂鼠李糖脂体系的产量高于3种化学表面活性剂体系,说明生物表面活性剂在构建逆胶束体系及增强逆胶束稳定性上具有特殊的潜力.

关键词:逆胶束; 酶解; 纤维素酶; 表面活性剂; 鼠李糖脂

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2202-06

Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Reverse Micelles

WANG Wei-wei^{1,2}, YUAN Xing-zhong^{1,2}, ZENG Guang-ming^{1,2}, LIANG Yun-shan^{1,2}, CHAO Yang^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control, Ministry of Education, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Several types of surfactants were adopted to construct reverse micelles, in order to investigate the characteristics of cellulose hydrolysis, we used the carboxymethyl cellulose as substrate. The electrical conductivity was measured to determine the maximum water solubilization W_0 ($W_0 = [H_2O]/[SA]$) of CTAB, SDS, Tween-80 and rhamnolipid reverse micellar systems were 15.2, 20.1, 2.3 and 40.3. In this condition we studied the effects of surfactants concentrations and cellulose dosage on the enzymatic hydrolysis of reverse micelle, and compared with aqueous systems. It was shown by the results that when the cellulose dosage was 0.15 FPU/g substrate, the maximum yield of reducing sugar in reverse micelles was obtained at 1 cmc of CTAB, SDS, Tween-80 and rhamnolipid, in which the rhamnolipid yield was the highest of 198.03 mg substrate. When the concentrations of CTAB, SDS, Tween-80 and rhamnolipid were 1 cmc, the productions of reverse micelles systems were higher than that of aqueous systems of 34.36%, 21.24%, 11.44% and 34.62%. In the optimum conditions of the surfactant concentration, taking the saving cost and sugar yield into consideration, the cellulose dosage of 5 FPU substrate was the most suitable. The reducing sugar's yield of biosurfactant rhamnolipid reverse micellar system was higher than those of three chemical surfactant systems, it was shown that the adoption of biosurfactant has technologically promising prospect in constructing reverse micelles and enhancing the stability of reverse micelles.

Key words: reverse micelle; enzymatic hydrolysis; cellulase; surfactant; rhamnolipid

逆胶束(又称反胶束或反胶团)是表面活性剂在非极性有机溶剂中超过临界胶团浓度(critical micelle concentration, cmc)时自组装形成的纳米尺寸的聚集体,具有良好的热力学稳定性^[1].逆胶束有一个由两亲分子的烃链组成的外壳,疏水尾指向有机溶剂,极性头指向聚集体内部形成极性腔,纳米尺寸的水溶解在极性腔中形成“小水池”.逆胶束极性内核中的水与常态水物理性质不同,它的黏度较高,而酸度与极性比常态水低.所以“水池”中的水可溶解某些原本不溶的物质^[2].此外,表面活性剂分子膜的存在可以避免酶与周围的有机溶剂接触,保护酶的活性部位,使其不因与有机溶剂接触而失

活,从而提高酶的催化性能.逆胶束作为酶反应的介质有很多优点^[3~5],从而使得逆胶束在酶催化反应中的应用也十分广泛^[3,5],因此在逆胶束体系中研究酶的催化反应即胶束酶学成为当今研究的热点.近年来,通过加入表面活性剂来提高纤维素酶水解效率的研究得到越来越多的重视.

目前已有的研究中,大多使用化学表面活性剂来构建逆胶束体系进行研究,与其相比,生物表面活

收稿日期: 2009-11-27; 修订日期: 2010-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(50978087)

作者简介: 王伟伟(1986~),女,硕士研究生,主要研究方向为固体废物废弃物的处理与处置, E-mail: fw19861111@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: yxz@hnu.cn

性剂(biosurfactant,BS)作为一种环境友好型的天然表面活性剂,产生于微生物、动物或植物的代谢过程中,其有低毒性、可降解性、生态相容性和高效性等优势,必将为逆胶束体系的构建和应用提供具有“环境可持续”意义的选择^[6].生物表面活性剂在环境污染修复、促进微生物产酶和催化生化转化过程等领域的应用卓有成效^[7,8].然而,对于采用生物表面活性剂构建逆胶束反应系统的研究,目前在国内外仍少有涉及.基于生物表面活性剂逆胶束体系的构建及在此环境中进行酶降解反应的研究鲜有报道.

本研究采用生物表面活性剂鼠李糖脂制备逆胶束体系,并考察在该体系中羧甲基纤维素酶解过程特征.在相同条件下,通过与阳离子表面活性剂CTAB、阴离子表面活性剂SDS和非离子表面活性剂Tween-80所形成的逆胶束体系中纤维素的酶解行为做对比,探讨了鼠李糖脂逆胶束酶解体系的特性,以期为进一步明确逆胶束体系中纤维素的酶解机制提供理论依据,为实现生物表面活性剂在逆胶束体系中的应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

实验试剂:CTAB(上海山浦化工有限公司);SDS、蒽酮(天津市科密欧化学试剂有限公司);Tween-80(天津市博迪化工有限公司),鼠李糖脂(本实验室自制);异辛烷、正己醇(天津市巴斯夫化工有限公司,分析纯);氯仿、硫酸(长沙湘科精细化工厂);纤维素酶(上海贝塔生物制品有限公司);羧甲基纤维素(天津市福晨化学试剂厂);0.01 mol/L KCl 溶液.

主要仪器:DDSJ-307 型电导率仪;721 分光光度计;TDA-8002 电热恒温水浴锅;HZQ-C 空气浴振荡培养箱;TGL-16G 型离心机;超声波振荡器.

1.2 实验方法

1.2.1 逆胶束电导率分析

按异辛烷:正己醇:表面活性剂:水=10 mL:10 mL:2g: $V_{\text{水}}$ (根据 $V_{\text{水}}$ 的值不同)配制成一系列混合液,经超声波振荡直至表面活性剂全部溶解,然后测定其电导率,得出电导率随含水率 W_0 ($W_0=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{SA}]$)的变化曲线图,确定各种表面活性剂逆胶束体系的最大增溶水量 W_0 .

1.2.2 逆胶束体系纤维素酶解试验

在最大增溶水量条件下,异辛烷和正己醇各取

10 mL,分别制备CTAB、SDS、Tween-80和鼠李糖脂浓度为0.5、0.8、1.0、2.0、4.0 cmc的有机混合溶液,此有机混合溶液的pH值均在4.8~5.0之间.实验过程中分别设计了3组平行样进行反应.当表面活性剂浓度大于临界胶束浓度1.0 cmc时即可形成逆胶束体系,低于临界胶束浓度时形成微乳体系.底物为羧甲基纤维素(3.33 mg/mL),将纤维素酶液(0.15 FPU/g)加入混合体系,旋涡混合仪充分振荡混合,然后在振荡培养箱中35℃,150 r/min反应12 h,每隔2 h取样,于5 000 r/min条件下离心5 min,然后采用等体积的氯仿对液相产物进行萃取,再经8 000 r/min条件下离心5 min,使溶液分层,取上清液即为纤维素酶解产物还原糖溶液,然后用蒽酮分析法在620 nm处测定其 D 值^[9].水溶液体系在上述相同条件下进行纤维素酶解反应,将其结果与逆胶束体系进行对比.

根据结果确定各有机混合体系酶解反应中表面活性剂最佳浓度,构建最佳浓度条件下的逆胶束体系,并在此体系中考察不同纤维素酶用量对还原糖产量的影响.

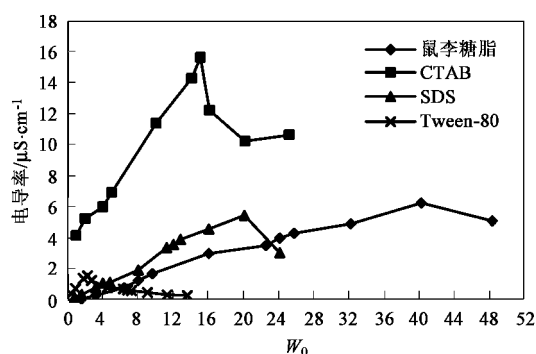
2 结果与讨论

2.1 逆胶束体系电导行为分析

含水率对电导率的影响如图1所示,随含水率的不同,由异辛烷、正己醇、表面活性剂和水混合形成的微乳液从澄清变为混浊,说明微乳液开始变为两相,溶液开始混浊时水相的加入量则是W/O型微乳体系在某一配比的 W_0 的最大增溶水量^[10].

随着含水量的增加,溶液开始混浊时,粘度增大,阻碍了导电离子的运动,电导率下降. CTAB在 $W_0=15.2$ 时其电导率有最大值,SDS和鼠李糖脂则是在 W_0 为20.1和40.3时电导率有最大值,Tween-80的最大电导率则是在 $W_0=2.3$ 时达到.不同种类表面活性剂逆胶束体系的最大增溶水量相差较大,其中阴离子表面活性剂SDS和鼠李糖脂逆胶束体系的最大增溶水量在相同条件下均高于阳离子表面活性剂CTAB和非离子表面活性剂Tween-80逆胶束体系,这与郭晓歌等^[11]得出的结论一致.

由于逆胶束体系中的水含量是影响酶活性的关键因素.水含量大小以水与表面活性剂摩尔比 W_0 表示. W_0 较小时,反应体系中水含量低,“水池”中的水大部分或几乎全部与表面活性剂极性端结合,满足酶的必需水和自由水很少,因而酶的活力不高,所以酶解反应产量较低,随着 W_0 的增大,自由水增

图1 W_0 对电导率的影响Fig. 1 Influences of W_0 on the electrical conductivity

多,酶的活性增大,但 W_0 大于最大增溶水量时,逆胶束体系被破坏,酶分子会发生变性,酶活性降低,反而抑制酶解反应的进行^[12]. 只有在最适水量时蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间达到最佳平衡点,酶表现出最大活力^[13].

本实验通过测量电导率确定最大增溶水量,在最大增溶水量条件下制备稳定的逆胶束体系,在此体系中进行酶解反应,从而最大限度增加酶的催化活性,使酶解反应产量得到提高.

2.2 逆胶束体系酶解行为分析

各种浓度表面活性剂逆胶束体系的纤维素酶水

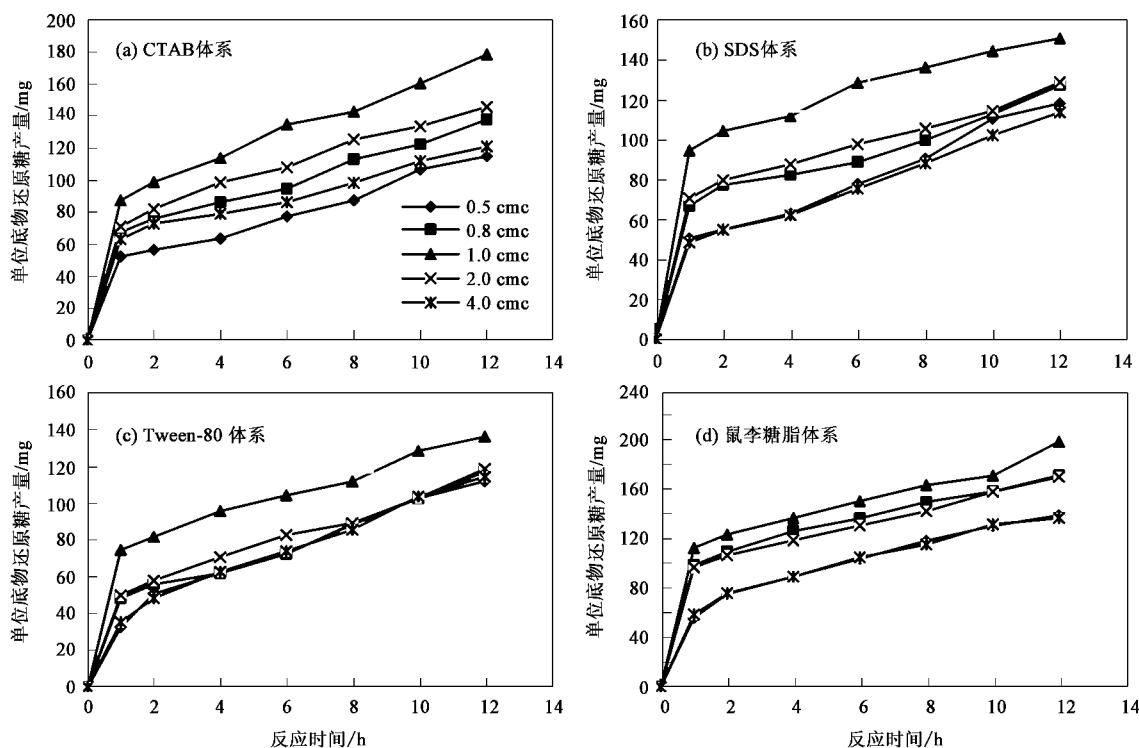


图2 不同逆胶束体系对纤维素酶解的影响

Fig. 2 Influences of different reverse micelles systems on the enzymatic hydrolysis of cellulase

解产物还原糖产量随时间变化如图2所示,图2(a)中,CTAB逆胶束体系在反应周期(12 h)内各浓度体系酶解反应速率都较快,当浓度为0.8 cmc时,单位底物糖产量为137.91 mg. 当浓度为1 cmc时糖产量高于其他非临界胶束浓度时的产量,可达178.57 mg.

由图2(b)可知,在SDS逆胶束体系中,0.5 cmc和0.8 cmc浓度时形成的微乳体系的底物还原糖产量都较低,在12 h反应结束时,产量分别为118.31和127.44 mg,而2 cmc和4 cmc浓度时虽形成了逆胶束体系,但产量没有明显提高,4 cmc时产量还略低于0.8 cmc时的产量,但1 cmc浓度时形成的逆胶束体系产量明显高于其余4种浓度体系,反应12 h时单位底物糖产量达到了151.06 mg.

图2(c)为Tween-80逆胶束体系的酶解反应还原糖产量变化,在12 h反应过程中,0.5 cmc、0.8 cmc的微乳体系和2 cmc、4 cmc的逆胶束体系的还原糖产量相差不大,12 h时每g底物产生的还原糖量分别为112.14、117.51、118.85和114.55 mg,但1 cmc浓度时构建的逆胶束体系的酶解产量明显高于其余4种浓度体系的产量,12 h还原糖产量为136.29 mg.

由图2(d)可知,鼠李糖脂体系在整个反应过程

中不同浓度体系还原糖产量相差较明显,反应一开始,0.5 cmc 和 4 cmc 构建的体系还原糖产量相当,均处于最低,1 cmc 浓度时逆胶束体系的还原糖产量明显高于其余各浓度体系产量,0.8 cmc 和 2 cmc 体系的产量在 12 h 的反应过程中相差甚小.当反应达到 12 h 时 0.5 cmc 微乳体系酶解产量为 138.71 mg/g,而在 1 cmc 浓度条件下构建的逆胶束体系单位底物产生的还原糖量达到了 198.03 mg,与其余浓度体系相比有了明显的提高.并且高于 CTAB、SDS 和 Tween-80 在 1 cmc 浓度时构建的逆胶束体系的酶解产量.

由结果可知,当表面活性剂浓度低于临界胶束浓度时,由于还未形成逆胶束体系,表面活性剂分子与纤维素酶分子不能紧密结合,酶活力不能得到有效提高,糖产量较低.当浓度高于临界胶束浓度时形成逆胶束体系,表面活性剂分子极性头与酶分子结合紧密,因而使酶分子在有机相中分散,提高酶分子和底物间的碰撞几率,使得酶解产量得到提高.由图 2 还可知,并非表面活性剂浓度越高其对酶解反应的促进效果越好,在反应过程中表面活性剂有一个最佳浓度.酶解反应结束时,各种表面活性剂均在 1 cmc 浓度时其逆胶束体系酶解反应的还原糖产量达到最大值,鼠李糖脂体系的糖产量分别比 CTAB 体系、SDS 体系和 Tween-80 体系高了 10.89%、

31.09% 和 45.30%.

由图 2 实验结果可知,在相同的反应条件下,生物表面活性剂鼠李糖脂构建的逆胶束体系在各浓度时的酶解反应产量均高于 CTAB、SDS 和 Tween-80 这 3 种化学表面活性剂逆胶束体系.

图 3 是各表面活性剂在水溶液条件下的纤维素酶解反应.由图 3 可知,在水溶液条件下各表面活性剂浓度均在 1 cmc 时酶解产量最高,且鼠李糖脂水溶液体系的产量高于其余 3 种表面活性剂产量,为 147.1 mg.但与逆胶束体系的酶解产量相比可知,1 cmc 浓度时,CTAB 水溶液体系的酶解产量比逆胶束体系的产量低了 34.36%,SDS 水溶液体系比逆胶束体系产量低了 21.24%,Tween-80 水溶液体系的产量比逆胶束体系低了 11.44%,鼠李糖脂水溶液体系的产量比其逆胶束体系的产量低了 34.62%.此实验结果是采用了 3 组平行试验的平均值,实验结果的标准误差均小于 4%.由此可知,逆胶束体系的纤维素酶解反应较水溶液体系相比具有一定的优势.这是由于在逆胶束体系中酶与外界的有机溶剂被表面活性剂分子隔离,可以在较长时间保持催化活性,具有较高的热稳定性,这也是逆胶束体系中酶学研究的特点.

本实验中,在单位底物酶用量为 0.15 FPU 条件下,添加 1 cmc 浓度的 CTAB、SDS、Tween-80 和鼠李

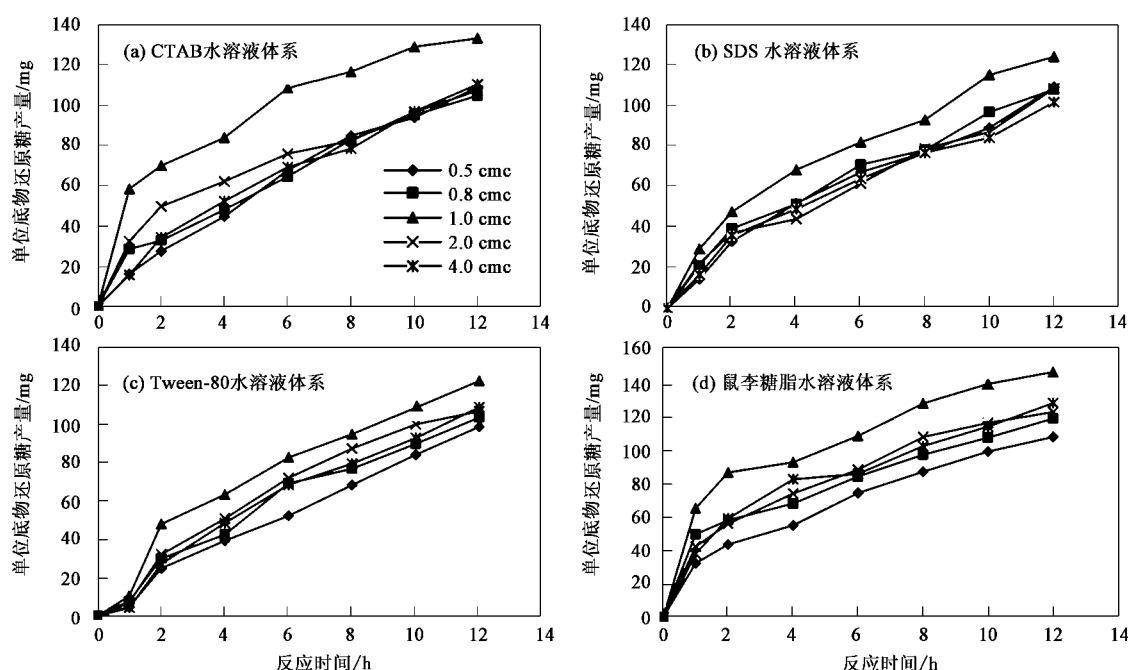


图 3 不同水溶液体系对纤维素酶解的影响

Fig. 3 Influences of different aqueous systems on the enzymatic hydrolysis of cellulase

糖脂逆胶束体系的糖产量均高于其非临界胶束浓度条件下溶液体系的酶解产量. 即 1 cmc 浓度体系条件下构建的逆胶束体系对纤维素酶解的促进效果最好. 并且无论是水溶液体系或逆胶束体系中, 鼠李糖脂体系的酶解产量均高于其他 3 种化学表面活性剂体系的产量. 和 Tween-80 相比, 鼠李糖脂和纤维素酶分子之间有更强的作用力^[14]. 鼠李糖脂不仅具有活性高、环境友好、易于生物降解等优点^[15], 它的表面活性还表现在能增强酶与底物的吸附作用, 以及能稳定油-水乳化体系^[16], 这些特性使其在构建逆胶束体系及增强逆胶束稳定性能上具有着特殊的潜力^[17]. 根据王元鸿^[13]的结论可知, 这是由于在适宜的表面活性剂浓度条件下表面活性剂分子极性头与酶分子结合紧密, 因而使酶分子在有机相中分散, 提高酶分子和底物间的碰撞几率, 并且表面活性剂分子的疏水尾部在有机相中能很好地吸引疏水性底物使疏水性底物很容易接近酶. 从而使酶分子表现出较好的活性. Martinek 等^[18]也认为造成这种超活性的原因是在反胶束中底物、酶浓度与本体水中浓度相同时, 反胶束体系浓缩了水池中的反应物浓度, 加速了反应进程, 从而提高了纤维素酶反应的产量.

2.3 酶用量对逆胶束体系酶解行为的影响

在最大增溶水量条件下构建表面活性剂浓度为 1 cmc 的逆胶束体系, 在底物浓度为 3.33 mg/mL 时, 取不同的酶量, 在 $t = 35^{\circ}\text{C}$ 时, 酶解 12 h, 取样测量.

由图 4 可以看出, 还原糖产量随着纤维素酶用量增加而增大. 添加了 CTAB、SDS、Tween-80 和鼠李糖脂的逆胶束体系, 单位底物纤维素酶用量为 5 FPU/g 时, 均出现突变点, 在酶用量低于 5 FPU/g 时, 随酶用量增加还原糖产量明显增加, 还原糖产量接近于呈线性关系递增, 在图 4 中, 当酶用量高于 5 FPU/g 时, 曲线变得较平坦, 继续增加纤维素酶用

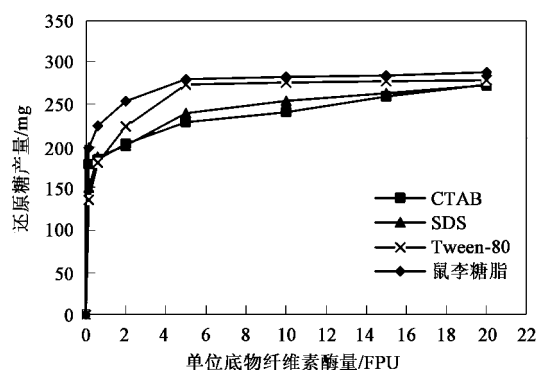


图 4 纤维素酶用量对还原糖产量的影响

Fig. 4 Influences on the production of reducing sugar with different cellulase dosages

量, 还原糖的产量增加. 在 5 FPU/g 时鼠李糖脂体系的糖产量比 CTAB 体系、SDS 体系和 Tween-80 体系高了 22.27%、16.78% 和 2.31%. 考虑到单位底物酶用量 > 5 FPU 时产生的还原糖增加很小, 从经济因素考虑, 纤维素酶价格昂贵, 使用量越大成本越高, 综合考虑酶用量为 5 FPU/g 时最佳.

3 结论

(1) 不同种类表面活性剂逆胶束体系的最大增溶水量相差较大, 其中阴离子表面活性剂 SDS 和鼠李糖脂逆胶束体系的最大增溶水量高于阳离子表面活性剂 CTAB 和非离子表面活性剂 Tween-80 逆胶束体系.

(2) 在最大增溶水量条件下制备逆胶束体系. 各表面活性剂在 1 cmc 浓度时对逆胶束体系酶解促进效果最好, 并且优于同等条件下水溶液体系的酶解产量. 生物表面活性剂鼠李糖脂构建的逆胶束体系在各浓度时的酶解反应产量均高于 CTAB、SDS 和 Tween-80 这 3 种化学表面活性剂逆胶束体系的产量.

(3) 构建表面活性剂浓度为 1 cmc 的逆胶束体系, 单位底物纤维素酶用量为 5 FPU 时鼠李糖脂体系的糖产量最高, 比 CTAB 体系、SDS 体系和 Tween-80 体系分别高了 22.27%、16.78% 和 2.31%. 从纤维素酶产量和经济因素综合考虑, 底物中纤维素酶用量为 5 FPU 时最佳.

参考文献:

- [1] Melo E P, Aires-Barros M R, Cabral J M S. Reverse micelles and protein biotechnology [J]. *Biotechnol Annu Rev*, 2001, 7: 87-129.
- [2] 金宇. 反胶束中酶催化反应研究进展 [J]. *化学工程师*, 2008, 6: 52-53.
- [3] 夏仕文, 俞耀庭, 童明容. 反胶束中的酶催化研究进展 [J]. *化学通报*, 1998, 2: 8-13.
- [4] 朱浩, 施鼎, 范映辛, 等. 反胶束体系中的酶学研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(3): 204-210.
- [5] 艾俊哲, 梅平. 非水介质中的酶催化反应 [J]. *化学通报*, 2002, 11: 752-756.
- [6] Mulligan C N. Environmental applications for biosurfactants [J]. *Environ Pollut*, 2005, 133: 183-198.
- [7] Chávez F P, Gordillo F, Jerez C A. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls [J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24: 309-320.
- [8] Singh A, Van Hamme J D, Ward O P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects [J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 99-121.

- [9] Chen N, Fan J B, Xiang J. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in reverse micelles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1764**:1029-1035.
- [10] 黄森森. 反相微乳液的电导研究及其在氧化铝纳米颗粒制备上的应用[D]. 郑州:郑州大学, 2007.
- [11] 郭晓歌, 赵俊廷. 不同反胶束体系增溶水的 η [J]. *精细石油化工进展*, 2008, **9**(2):22-24.
- [12] 高静, 李伟杰, 檀文礼, 等. CTAB 逆胶束体系中 Lipex 脂肪酶催化合成油酸乙酯 [J]. *化工学报*, 2007, **58**(12): 3064-3071.
- [13] 王元鸿. 反胶束中脂肪酶催化合成异丁酸异戊酯 [D]. 长春: 东北师范大学, 2003.
- [14] 刘佳. 表面活性剂在废木质纤维素制酒精中的应用基础研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2008.
- [15] 吕玮丽, 阎庆华, 杨建军, 等. 内燃机曲柄滑动轴承润滑特性的数值研究 [A]. 见: 摩擦学工程科技论坛—— 润滑应用技术论文集 [C]. 上海: 中国工程院, 2002. 299-306.
- [16] 陈桂秋, 曾光明, 黄国和, 等. 鼠李糖脂的表面化学和生物合成及其在垃圾堆肥中的应用展望 [J]. *中国生物工程杂志*, 2005, **25**(B04):125-130.
- [17] Xie Y W, Ye R Q, Liu H L. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant [J]. *Colloid Surface A*, 2006, **279**:175-17.
- [18] Martinek K, Levashov A N, Klyachko N L, *et al.* Colloidal solution of water in organic solvents: A microheterogeneous medium for enzymatic [J]. *Science*, 1982, **218**(4575):889-891.

《环境科学》再获“百种中国杰出学术期刊”称号

2009 年 11 月 27 日, 中国科学技术信息研究所在中国科技论文统计结果发布会上公布了 2008 年“百种中国杰出学术期刊”评选结果.《环境科学》再次荣获“百种中国杰出学术期刊”的称号, 这也是自首次评选以来连续 8 次获此殊荣.

“百种中国杰出学术期刊”是根据中国科技学术期刊综合评价指标体系进行评定. 该体系利用总被引频次、影响因子、基金论文比、他引总引比等多个文献计量学指标进行统计分析, 对期刊分学科进行评比, 其评价结果客观公正, 为我国科技界公认, 并具有广泛影响.