

鼠李糖脂二糖脂强化酶解木质纤维素

赵佳佳, 袁兴中, 曾光明, 梁运珊, 陈 玲, 胡晨璐

(湖南大学环境科学与工程学院, 湖南 长沙 410082)

摘 要:将经过纯化的鼠李糖脂二糖脂添加于纤维素酶水解试验中,以稻草、竹叶为底物,分析水解过程中纤维素酶酶活(以FPA计)及还原糖浓度的变化特征,探讨和分析鼠李糖脂二糖脂对稻草和竹叶中木质纤维素水解产还原糖能力、纤维素酶活的稳定性、发酵液表面张力和pH值的影响作用。结果表明,添加鼠李糖脂二糖脂对木质纤维素类底物酶水解过程中还原糖浓度的增加、酶活稳定性的提高有明显的促进作用,并且其促进作用随着表面活性剂添加量的适量增加而增强,当添加量为0.24%时,稻草和竹叶还原糖的产量分别提高了17.19%和27.68%。此外,水解反应结束后,加入鼠李糖脂二糖脂的水解液表面张力值显著降低,且随着添加量的增高而降低,当添加量为0.24%时,可分别降至63.4和60.8 mN·m⁻¹左右,而pH值的变化微小。

关键词:鼠李糖脂二糖脂;木质纤维素;酶水解

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)10-2180-05

Dirhamnolipid Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose

ZHAO Jia-jia, YUAN Xing-zhong, ZENG Guang-ming, LIANG Yun-shan, CHEN Ling, HU Chen-lu

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

Abstract: Rice straw and bamboo leaves were used as substrates to study the effects of dirhamnolipid on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Reducing sugar yield during the enzymatic hydrolysis was quantified to evaluate the efficiency of dirhamnolipid addition. And the stability of cellulase activities determined in terms of FPA was influenced with different concentrations of surfactant. The surface tension and pH value analysis was conducted to investigate the physical characteristics of the supernatant after hydrolysis with surfactant. The results indicated that dirhamnolipid at different concentrations was able to increase the production of reducing sugar and improve the cellulase stability. Reducing sugar yield was increased by 17.19% and 27.68% which converted from straw and bamboo leaves in the present of dirhamnolipid at 0.24%. In addition, the surface tension of liquid medium was significantly decreased depending on dirhamnolipid concentration. Dirhamnolipid at 0.24% reduced the surface tension to 63.4 mN·m⁻¹ and 60.8 mN·m⁻¹ in straw and bamboo hydrolysis samples, respectively. The neglected changes of pH value across the hydrolysis process revealed that the surfactant addition did not take any negative reactions to the pH systems of hydrolysis.

Keywords: dirhamnolipid; lignocellulosic; enzymatic hydrolysis

我国是一个农业大国,纤维素原料非常丰富,玉米、小麦和稻草秸秆是我国的3大秸秆^[1],毛竹占我国竹林总面积的64.1%,是我国南方主要的经济竹种之一^[2]。现阶段多依靠秸秆和林副产品作燃料或将秸秆在田间直接焚烧,不仅污染了环境,而且能量利用率低,造成了资源的严重浪费。

随着环境污染问题及能源问题的突出,秸秆酶水解产生还原糖,添加相应微生物发酵成乙醇、乳酸等物质^[3]制备生物乙醇并混合成汽油成为一种新的能源开发方式。酶水解就是利用纤维素酶将固体纤维转变为可溶性糖的反应,成本低于酸解和碱解^[4]。

生物表面活性剂具有的可生物降解性及与环境生物相容性吸引了人们的关注。在酶水解过程中添加生物表面活性剂能提高纤维素酶的活性、促进酶的循环利用。鼠李糖脂是由铜绿假单胞菌产生的一种阴离子表面活性剂,其物化性质和生物特性等都得到了深入的研究^[5-6]。鼠李糖脂二糖脂(dirhamnolipid)作为铜

收稿日期:2009-02-26

基金项目:国家自然科学基金项目(50678062)

作者简介:赵佳佳(1987—),女,硕士研究生,主要研究方向为生物表面活性剂促进堆肥中木质纤维素的降解。

E-mail:zhaojjajiajoe@yahoo.com.cn

通讯联系人:袁兴中 E-mail:yxz@hnu.cn

绿假单胞菌的代谢产物鼠李糖脂的成分之一,更高纯度的鼠李糖脂二糖脂将在降低液体表面张力或改善液-固界面性质的作用上发挥更大的优势^[7]。本研究将鼠李糖脂二糖脂应用于木质纤维素类基质的酶水解中,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、改善纤维素酶附着在纤维素上的不可逆吸附作用及减少资源浪费和环境污染具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

稻草购自湖南长沙,竹叶采集于湖南长沙岳麓山;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);鼠李糖脂二糖脂(本实验室制得,CMC浓度 $70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,临界胶束浓度为 $36.1\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$);纤维素酶(上海贝塔生物技术有限公司生产,酶活 $538.69\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)。种子培养基:牛肉膏 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,蛋白胨 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,NaCl $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值7.0。发酵培养液^[8]:葡萄糖 $18.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,NaNO₃ $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,KH₂PO₄ $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,Na₂HPO₄ $12\text{H}_2\text{O}$ $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,MgSO₄ $7\text{H}_2\text{O}$ $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,FeSO₄ $7\text{H}_2\text{O}$ $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值6.5。

1.2 试验设计

1.2.1 材料预处理

纤维原料需经适当预处理后才能使用。其预处理方法可分为物理法^[9-10]、化学法^[11-14]和生物方法^[15]。本试验采用物理和化学法进行联合预处理。

物理预处理:采取机械粉碎处理方法,将稻草秸秆及竹叶粉碎后过筛,选取直径 $0.4\sim 0.9\text{ mm}$ 的稻草秸秆样进行试验分析,待用。

化学预处理:采取碱处理水解方法。稻草经 2% NaOH在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 碱处理 2 h 后脱去木质素,用自来水反复冲洗至中性, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。竹叶在甲苯与乙醇($2:1,V/V$)索氏抽提 6 h 脱蜡,用自来水冲洗后在 2% 的NaOH $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 碱处理 2 h 脱去木质素,用自来水反复冲洗至中性, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。

1.2.2 鼠李糖脂二糖脂的制备

从斜面接种铜绿假单胞菌到种子培养基, 24 h 后接入发酵培养液,细菌的生长条件是 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,pH 6.5。 48 h 后,发酵培养液经离心($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min)后去除细菌细胞,发酵液用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调pH值接近2.0,再用氯仿和甲醇萃取(发酵液:氯仿:甲醇 $=3:2:1,V/V$)旋转蒸发提纯得到鼠李糖脂^[7],经分离提纯后得到试验所用的鼠李糖脂二糖脂。

1.2.3 酶水解

酶解反应条件:固液比(秸秆:柠檬酸缓冲液) 2% (秸秆添加量为 0.8 g ,柠檬酸缓冲液添加量为 40 mL),反应温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,pH 4.8,培养箱转速 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在锥形瓶中加入底物,以不加表面活性剂的样品为对照,4个样品分别加入不同添加量的鼠李糖脂二糖脂及适量柠檬酸缓冲溶液,均匀混合,每组样品设2个平行样,最后加入纤维素酶($5\text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ 底物)。定时取发酵上清液利用DNS法进行还原糖及滤纸酶活测试^[16-17]。

以在上述条件下每分钟由底物产生 $1.0\text{ }\mu\text{mol}$ 的还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位,用 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示。

1.3 仪器设备

721分光光度计及JYW-200A自动界面张力仪分别购自上海精密科学仪器有限公司和承德试验机设备厂。

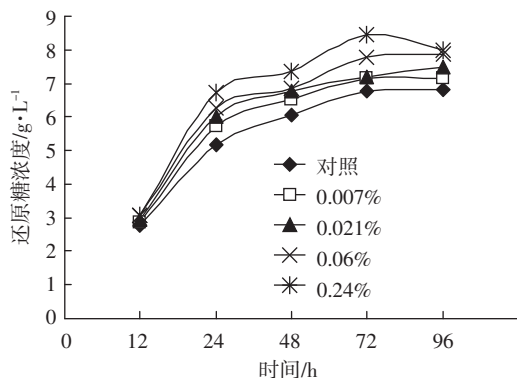
2 结果与讨论

2.1 鼠李糖脂二糖脂对产还原糖的影响

添加不同浓度的鼠李糖脂二糖脂,考察对稻草和竹叶两种底物纤维素酶解得到的还原糖产量的影响,分别如1(a)和(b)所示。

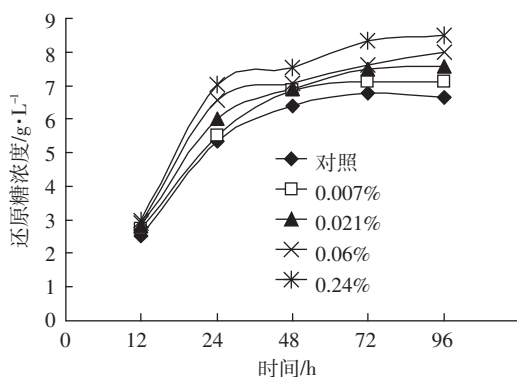
从曲线的趋势可以看出,产糖量随着时间的延长而增加。在试验初期,加入鼠李糖脂二糖脂对稻草和竹叶产还原糖均没有明显的促进作用,产糖量仅略高于对照,呈近似线性增长;进入试验中期,添加了鼠李糖脂二糖脂样品的糖产量大幅度高于对照,优势持续到反应的末期。所有样品的产糖量在 72 h 达到最高值,延长酶解至 96 h 产糖量基本保持不变。这是因为酶解产物积累到一定程度时,反过来又抑制了酶的活性^[18]。而且此酶解反应属于固液反应,液相中的酶分子首先吸附到纤维表面上,再进一步反应生成还原糖,所以在一定的固液比条件下,纤维素分子和酶分子结合点的数量是有限的。当酶浓度达到一定值时,纤维素表面酶的吸附量达到最大值,反应速率也达到最大值^[19]。

在两组底物中,添加 0.007% 鼠李糖脂二糖脂的样品得到最高糖产量分别达到 7.166 及 $7.091\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,分别比对照组增加了 5.12% 及 6.79% ;而加入 0.24% 鼠李糖脂二糖脂的样品使底物糖产量分别提高了 17.19% 及 27.68% 。结果表明,酶解反应产糖与底物的种类及所添加表面活性剂的浓度有关,在整个试验的



(a) 稻草为底物发酵液中还原糖的变化

(a) Variations in reducing sugar with dirhamnolipid, straw as the substrate



(b) 竹叶为底物不同酶用量下发酵液中还原糖的变化

(b) Variations in reducing sugar with dirhamnolipid, bamboo

leaves as the substrate

图 1 鼠李糖脂二糖脂浓度对木质纤维素底物产还原糖的影响

Figure 1 Effects of dirhamnolipid on reducing sugar yeild

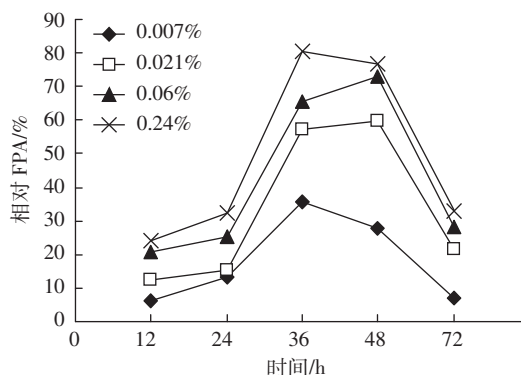
过程中竹叶底物的糖产量均持续高于稻草,而适宜的表面活性剂浓度能够最大程度地提高产量。在本试验中,添加量为 0.24% 的鼠李糖脂二糖脂对酶解的促进效果最好。

有研究发现^[7],在酶水解中加入鼠李糖脂不仅可以增加还原糖的产量,还可以明显缩短发酵的时间,从而有效降低生产成本。酶解反应在一定程度上受酶用量的影响,增加酶用量可以使更多的纤维素分解,提高发酵液中还原糖浓度。由图 1(a)(b)可见,0.24% 的鼠李糖脂二糖脂对产还原糖促进作用最为明显,随着酶用量的增加,还原糖浓度也随之增加。这可能与鼠李糖脂二糖脂具有较好的界面活性有关。由于 0.24% 浓度的鼠李糖脂二糖脂使得发酵液的表面张力远远低于空白,而纤维素是大分子聚合物,表面具有憎水性,更高的表面活性可以提高其表面的亲水性,从而使纤维素酶更容易和纤维素表面接触,分解纤维素产生更多的多糖和单糖,达到提高纤维素水解率的目的。但是酶用量并非越多越好,否则会造成不必要

的浪费,增加成本。

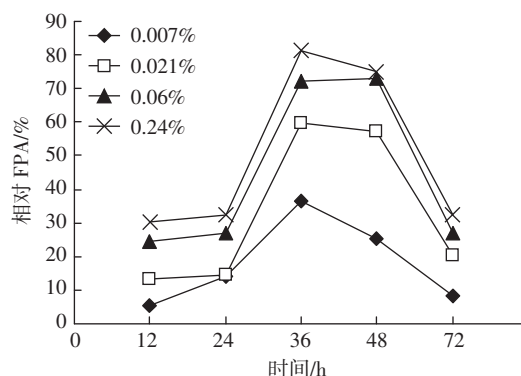
2.2 鼠李糖脂二糖脂对纤维素酶活的影响

考察不同添加浓度鼠李糖脂二糖脂对稻草和竹叶酶水解过程中 FPA 的变化情况,以不添加鼠李糖脂二糖脂的对照样品为基准作相对酶活曲线,结果如 2(a)和(b)所示。



(a) 稻草为底物鼠李糖脂二糖脂对 FPA 的影响

(a) Effects of dirhamnolipid on FPA, straw as the substrate



(b) 竹叶为底物鼠李糖脂二糖脂对 FPA 的影响

(b) Effects of dirhamnolipid on FPA, bamboo leaves as the substrate

图 2 鼠李糖脂二糖脂对 FPA 的影响

Figure 2 Effects of dirhamnolipid on FPA

鼠李糖脂二糖脂在酶解的各阶段能够不同程度地起到保持纤维素酶活的作用^[8]。由图 2(a)(b)看出,在反应最初 12 h,添加鼠李糖脂二糖脂样品的酶活较对照变化微小,此后到反应进行 36 h,FPA 酶活平稳上升,且随着鼠李糖脂二糖脂浓度的增加与对照组的增幅加大,随后变化趋于平缓稳定,然后 FPA 酶活陡然下降,至反应结束。在两种底物中,添加 0.24% 鼠李糖脂二糖脂样品的酶活在整个反应过程中均高于添加其他低浓度样品。反应进行到 36 h 时稻草和竹叶组与对照相比达到最大值,分别提高了 80.35% 和 81.09%,而添加 0.007% 鼠李糖脂二糖脂的相对 FPA

达35.85%和36.32%。添加0.24%鼠李糖脂二糖脂的样品比添加0.007%鼠李糖脂二糖脂更有利于提高酶活的稳定性,随着添加浓度的增加,鼠李糖脂二糖脂对酶活的促进作用越明显。

结果表明,在试验初期,加入的表面活性剂对酶活的稳定性都没有明显的促进作用,进入试验中期酶活和空白样相比大幅提高。说明鼠李糖脂二糖脂可以在整个发酵过程中发挥作用,降低了由于部分纤维素酶残留附着在纤维素上的不可逆吸附作用,保持了纤维素酶活的活力,从而提高了酶水解的效率。但是FPA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。比较分别加入不同浓度的鼠李糖脂二糖脂的所起的效果,从图中可以看出,0.24%的鼠李糖脂二糖脂对纤维素酶活的稳定性保持作用最大。

2.3 鼠李糖脂二糖脂对酶水解发酵液 pH 及表面张力的影响

反应96 h后离心取上清液,测定各组pH,发现在整个反应过程中pH值与对照组的变化几乎是一致的,都保持在4.5~4.8之间。说明不同浓度的鼠李糖脂二糖脂对各发酵液的pH值改变无显著影响。

酶水解反应中加入了鼠李糖脂二糖脂后发酵液的表面张力发生了变化。在反应进行到96 h之后提取发酵液对其表面张力进行了测定,结果如图3所示。

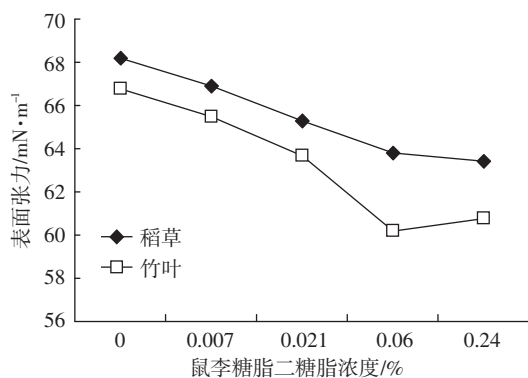


图3 鼠李糖脂二糖脂浓度对水解液表面张力的影响
Figure 3 Variations in surface tension with dirhamnolipid

水解反应结束后,不含表面活性剂的稻草和竹叶组发酵液的表面张力分别达到了68.2和66.8 mN·m⁻¹。加入鼠李糖脂二糖脂后,稻草和竹叶组发酵液的表面张力随着二糖脂浓度的增高而降低,最低可分别降至63.4和60.8 mN·m⁻¹左右。这是由于表面活性剂本身具有降低表面张力的性质,随着活性剂浓度的增加,

发酵液表面张力的降低效果反而越好,从而使纤维素酶更容易和纤维素表面接触,提高了酶水解率。

3 结论

本试验研究了生物表面活性剂鼠李糖脂二糖脂对液态发酵过程中纤维素酶水解底物中的木质纤维素产生还原糖及对纤维素酶酶活的影响。

(1)液态发酵过程中添加鼠李糖脂二糖脂能够有效促进纤维素酶酶解反应。并且当鼠李糖脂二糖脂的添加量为0.24%时促进效果最好,分别使稻草和竹叶两种底物中还原糖提高了17.19%、27.68%。

(2)鼠李糖脂二糖脂有利于保持纤维素酶的稳定性,能不同程度地提高反应过程的FPA,而且随着添加浓度的增加,鼠李糖脂二糖脂对酶活的促进作用越明显。

(3)随着鼠李糖脂二糖脂添加量的增高,酶解发酵液的表面张力显著降低,添加量为0.24%时分别降至63.4和60.8 mN·m⁻¹左右。表面张力的降低使得纤维素酶更容易和纤维素表面接触,提高了酶的水解率。

参考文献:

- [1] 马赞华. 酒精高效清洁生产新工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 91-98.
MA Zan-hua. Efficient new technology in Alcohol cleaning production[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 91-98.
- [2] 陈建华, 毛丹, 马宗艳, 等. 毛竹叶片的生理特性[J]. 中南林学院学报, 2006, 26(6): 76-80.
CHEN Jian-hua, MAO Dan, MA Zong-yan et al. Physiological characteristics of leaves of bamboo phyllostachys pubescens[J]. Journal of Central South Forestry University, 2006, 26(6): 76-80.
- [3] Lee A W C, Chen G, Tainter F H. Comparative treatability of Moso bamboo and Southern pine with CCA preservative using a commercial schedule[J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 87-88.
- [4] Tsuda M, Aoyama M, Cho N S. Catalyzed steaming as pretreatment for the enzymatic hydrolysis of bamboo grass culms [J]. Bioresource Technology, 1998, 64: 241-243.
- [5] 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): 62-66.
LIU Jia, YUAN Xing-zhong, ZENG Guang-ming, et al. Experimental study on the effects of surfactants on cellulase from *Trichoderma viride* [J]. China Biotechnology, 2006, 26(8): 62-66.
- [6] 钟华, 曾光明, 黄国和, 等. 鼠李糖脂对铜绿假单胞菌降解颗粒有机质的影响[J]. 中国环境科学, 2006, 6(2): 201-205.
ZHONG Hua, ZENG Guang-ming, HUANG Guo-he, et al. Effects of rhamnolipid on degradation of granule organics by a *Pseudomonas Aeruginosa* strain[J]. China Environmental Science, 2006, 26(2): 201-205.

- [7] ZHANG Qiu-zhuo, CAI Wei-min, WANG Juan, et al. Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20: 975-980.
- [8] Liu J, Yuan X Z, Zeng G M. Effect of bioanfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrat fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 2347-2351.
- [9] Hendriks A T W M, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10-18.
- [10] Thomsen M H, Ygesena T H, Thomsen A B. Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4221-4228.
- [11] Kim Y, Hendrickson R, Mosier N S, et al. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(12): 5206-5215.
- [12] Esteghlal Ian A, Hashimoto A G, Fenske J, et al. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover poplar and switch grass[J]. *Bioresource Technology*, 1997, 59: 129-136.
- [13] Toku Yasu K, Tabuse M, Miyamoto M, et al. Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl_2 increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification[J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(7): 1232-1236.
- [14] Chia-Hung Kuo, Cheng-Kang Lee. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments[J]. *Carbohydrate Polymers* (In Press), 2008 <http://www.sciencedirect.com>.
- [15] Ying Wang, Yulin Zhao, Yulin Deng. Effect of enzymatic treatment on cotton fiber dissolution in NaOH/urea solution at cold temperature[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72: 178-184.
- [16] Fubao Sun, Hongzhang Chen. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6156-6161.
- [17] Mata G, Savoie J M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14: 513-519.
- [18] Ming Chen, Jing Zhao, Liming Xia. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71: 411-415.
- [19] 徐龙君, 刘钟骏, 徐宏亮, 等. 稻草秸秆同时糖化法制燃料酒精工艺条件[J]. 重庆大学学报, 2008, 31: 698-705.
- XU Long-jun, LIU Zhong-jun, XU Hong-liang, et al. Fuel ethanol preparation from straw stalks using simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Journal of Chongqing University*, 2008, 31: 698-705.