

纤维素酶及其在酒精工业中的应用

陆筑凤¹, 郭坤亮¹, 李 超², 秦广利¹, 陈 岩¹

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 华润雪花啤酒(天津)有限公司, 天津 300400)

摘 要: 纤维素酶应用于发酵酒精工业可提高燃料酒精和白酒的出酒率、原料的利用率、缩短发酵时间。对纤维质原料制酒精的研究主要有酿酒酵母的合理运用和性能改良、发酵过程优化、提高利用率, 降低成本等。克隆或原生质体融合技术可改良发酵菌株的纤维素酶基因, 构建工程发酵酵母, 提高纤维素的利用率, 对产酒精具有广阔的发展前景。

关键词: 微生物; 纤维素酶; 酒精工业; 基因改良; 酵母

中图分类号: TS262.2; TS261.4; Q814; Q93- 3 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2008) 01- 0098- 04

Overview of Cellulase and Its Utilization in Alcohol Industry

LU Zhu-Feng¹, GUO Kun-liang¹, LI Chao², QIN Guang-li¹ and CHEN Yan¹

(1. Life Science College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Huarun (Tianjin) Snow Brewery Co. Ltd., Tianjin 300400, China)

Abstract: The utilization of cellulase in alcohol fermentation industry could evidently increase liquor yield and fuel alcohol yield, enhance the use rate of raw materials, and shorten fermentation time. The research on alcohol production by cellulose mainly covered the following aspects: proper use and property transformation of *S. cerevisiae*, the optimization of fermentation process, and the approaches to reduce production cost and to increase utilization rate etc. The techniques including clone and protoplast fusion could improve cellulase genes of fermented strains, construct engineering *S. cerevisiae*, and increase the use rate of cellulase, which had a promising prospect in alcohol production.

Key words: microbe; cellulase; alcohol industry; genetic improvement; yeast

纤维素酶是指能水解纤维素 β -1, 4 葡萄糖苷键, 使纤维素变成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称, 它不是单一酶, 而是起协同作用的多组分酶系。是由葡聚糖内切酶(EC3.2.1.4, 也称 Cx- 酶, CMC 酶或 EG)、葡聚糖外切酶(EC3.2.1.91, 也称 C1- 酶, 纤维二糖水解酶或 BH)、 β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21, 也称纤维二糖酶或 CB)3 个主要成分组成的诱导型复合酶系^[1]。一般地, 外切酶作用于不溶性纤维表面, 使形成结晶结构的纤维素长分子链开裂, 长链分子末端部分发生游离易于水化; 内切酶则作用于经外切酶活化的纤维素, 分其 β -1, 4 键, 产生纤维二糖、三糖等短链低聚糖; 而 β -葡萄糖苷酶再将纤维二糖、三糖等分解成葡萄糖, 完成协同反应全过程^[2]。当然协同作用顺序不是绝对的, 各酶的功能也不是这样简单、固定的。

纤维素酶分子普遍具有类似的结构, 由球状纤维素催化结构 (Catalytic Domains, CD), 纤维素结合结构域 (Cellulose-Binding Domains, CBD) 和连接桥(Linker)3 部分组成^[2]。纤维素酶中最大的功能区是催化区, 它体现酶

的催化活性及对特定水溶性底物的特异性, 不同来源的纤维素酶分子大小差别很大, 但它们的催化区的大小却基本一致; 纤维素酶的结合结构域 CBD 主要维持酶分子的构象稳定性, 调节酶对可溶性和非可溶性底物的结合专一性; 连接桥 Linker 可保持 CD 和 CBD 之间的距离, 有助于不同酶分子间形成较为稳定的聚集体。

1 纤维素酶制备

1.1 产酶菌

纤维素酶的产酶菌很多, 主要有细菌、放线菌和丝状真菌。其中丝状真菌具有产酶的诸多优点: 产生的纤维素酶为胞外酶, 便于酶的分离和提取; 产酶效率高, 且产生的纤维素酶酶系结构较为合理; 同时可产生许多半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等。从纤维素酶的工业化制备及其应用的角度, 研究和采用丝状真菌产酶具有更大的意义。从目前的研究进展来看, 由于里氏木霉 Rut C30 和 QM 9414 同时具有较为稳定的性状、优质高产纤维素酶的能力和较好的“抗代谢阻遏”能力, 因此, 它们被

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字 2006) 102 号]。

收稿日期: 2007- 08- 17

作者简介: 陆筑凤(1984-), 女, 浙江嘉兴人, 硕士研究生。

通讯作者: 郭坤亮, 教授。

1.2 发酵制备纤维素酶的方法

1.3 分离提纯方法

2 纤维素酶在酒精工业的应用

2.1 酿酒工业

2.2 生产燃料酒精

工艺流程如下:



酶的作用方式为:

C1- Cx β - 葡萄糖苷酶 酵母

↓ ↓ ↓
纤维素 → 纤维二糖 → 葡萄糖 → 酒精

其中水解是关键, 此过程中纤维二糖对 C1- Cx 有抑制作用, 将其快速水解成葡萄糖对降低此影响有利。水解方法有酸水解和酶水解两种方法: 酸水解过程要求容器是耐腐蚀、耐酸、耐压的, 容器体积也较大。另外, 酸解常会伴随生成有毒产物乳糖醛、酚类等物质, 需要改善工艺, 减少这些物质的产生; 酶水解产率高, 而且副产物很少, 所以对于进一步的乙醇发酵减轻了提纯的工作量。但是, 纤维素的酶解需要大量的酶, 而且酶的成本很高。因此工业化生产还需寻求廉价多酶高效资源^[9]。

3 纤维素酶研究的技术进展

3.1 产酶菌株的选育及诱变育种

利用物理、化学诱变剂单独或复合处理微生物细胞或孢子是选育高产突变种行之有效的方法, 至今仍是育种的有效方法之一。崔福绵等从生霉棉布上分离出的康氏木霉 CP88105 经加热和亚硝基胍处理后, 获得一株高产突变株 CP88329。在固体培养基上 28℃ 培养 72 h, 所产纤维素酶复合物具有高的酶活力, 以羧甲基纤维素钠为底物时酶活力为 4880 IU/g, 以脱脂棉为底物时酶活力为 480 IU/g, 产酶活力水平均为出发菌株的 3 倍^[9]。在用纤维素类原料发酵酒精方面, 韩如等利用纤维素粘附厌氧滚管的方法得到了直接转化纤维素产乙醇的菌株 *Clostridium* sp. EVA4, 用 1% 纤维素滤纸培养 120 h, 该菌株产乙醇浓度为 1123 mg/L, 纤维素降解率为 59%; Atiyeh 等筛选的酿酒酵母突变株 ATCC 36858, 在蔗糖浓度高于 81 g/L 的培养基中产酒精能力相当于发酵蔗糖理论产量的 85%, 其在蔗糖含量为 216 g/L 的培养基中, 酒精产量为 2.23 g/L·h^[9]。

3.2 重组 DNA 技术

用基因工程技术构建含纤维素酶基因的克隆菌株, 表达具有较高酶活力的纤维素酶。如 Kondo 等将带有葡萄糖糖化酶基因的表达式质粒 pGA11 导入酵母菌宿主 YF207 中, 得到的菌株 YF207 /pGA11 可在超过 300 h 的条件下连续高产酒精且浓度达 150 g/L; 能快速有效利用纤维二糖高产酒精的重组菌 (*Klebsiella oxytoca* P2), 在利用 10% 葡萄糖和 10% 纤维二糖发酵产乙醇时, 乙醇得率达到理论得率的 96% 以上; 通过基因工程手段将相应的水解酶基因转移到 *Z.mobilis* 中, 使得该菌株能够利用木糖、甘露糖、乳糖甚至淀粉、纤维素等多种碳源^[9]; 早在 1986 年, Pina, Calderon 通过原生质体融合法, 将发酵结合酵母菌株与酿酒酵母进行属间融合, 前

者有可利用纤维质物质, 耐高温的特性, 融合子具有双亲特性, 可利用乳酸与纤维质原料做碳源制酒, 性能稳定^[9]; 庞小燕等通过单亲灭活原生质体融合技术, 构建了直接发酵淀粉产生酒精的酵母融合株 F21、F25, 其酒精产量分别可达 8.8% 和 11.5%^[9]。在酿酒行业中, 还必须培育出耐高糖、高渗而又有较高发酵能力的酵母用于生产。

4 发展前景

4.1 进一步选育高产复合酶系菌株

由于纤维素酶是复合酶系, 目前发现主要以上述 3 种成分为主, 但是实际应用中对纤维素的分解仍然不彻底, 尤其是对天然纤维素原料。再则由于自然界中的菌株产酶性能不高、各菌株酶组分活性各异、且存在某种特定组分酶活性较低的缺陷, 所以目前资料中报道的所选育出来的菌种应用于生产还不是很理想, 有待进一步筛选出产酶更高、更全面的菌株。通过把握不同菌种采用不同诱变光的强度、照射时间等处理条件, 发现更好的、更理想的方法来实现提高菌株产酶。

4.2 进一步深入研究纤维素酶的作用机制

纤维素酶是由具有高协同性的几种酶组成的, 在纤维素酶发生作用时虽然对各个酶的作用有一定的了解, 但是由于酶催化反应的底物比较复杂, 不同菌株的纤维素酶的组分又有很大差别, 如 C1 酶的吸附能力随酶本身和底物的不同而有很大的差异等^[10]。为了更有效地发挥各组分酶的协同作用, 今后一定会对酶的作用机制、每个组分对底物的特异性做出更深入、透彻的研究。

4.3 纤维素酶分子水平研究得到突破

基因工程技术已用来克隆、表达具有较高 CMC 酶活的纤维素酶。由于纤维素水解需要多种酶成分的协同作用, 而目前基因工程纤维素酶功能单薄, 不足以彻底降解纤维素。因此, 以后的基因工程纤维素酶既要克服木质素、木聚糖的障碍, 又能克服反馈抑制作用^[11]。利用酿酒酵母具有把葡萄糖转化为酒精的能力, 若将 3 类主要纤维素酶基因导入酿酒酵母, 实现纤维素直接转化生产酒精, 还可生产 SCP、多糖等产品; 但是, 要获取具有全纤维素酶的高产菌株, 原生质体融合技术是理想的育种途径。它可打破物种间细胞不能相互融合的障碍, 通过细胞融合, 曾获得了既能分解纤维素, 又能分解木质素的稳定的梭菌杂种菌株, 构建具有纤维素分解能力的酿酒酵母菌也势在必行^[12]。

4.4 工程菌技术条件的进一步成熟

含纤维素原料的酶解糖化与酒精发酵在同一反应器中连续进行时, 除了消除葡萄糖因浓度高对纤维素酶的反馈抑制, 还要协调酶水解与酵母发酵的最适温度、

pH 值、发酵特性等指标^[13]。同时以后成熟的工程菌会有 3 个显著特性: 一是能提高酒精对糖的收率, 以降低酒精生产的原料消耗; 二是具有一定的耐温性, 以提高发酵温度, 降低大型发酵装置夏季高温季节的冷却费用; 三是具有很强的耐酒精性能, 以提高发酵终点发酵醪中的酒精浓度^[8]。

5 展望

生物多样性与人类生存密切相关已为人们所共识。由于微生物的多样性、传代生长速度快、培养可控性、生产成本低、易进行基因突变、克隆重组及高效表达等优点, 使人类能很快获得优良的基因工程菌, 微生物酶源无疑将会发挥更大的作用和潜力。相信在不久的将来极有可能直接以纤维素为原料制取酒精, 从而从根本上变革传统的酒精生产工艺。尽管纤维素作为直接碳源进行的研究还处于初级阶段, 但从目前的研究结果和发展趋势来看, 纤维素酒精发酵对我们已不遥远。

参考文献:

- [1] 刘春芬, 贺稚非, 蒲海燕, 等. 纤维素酶及应用现状[J]. 粮食与油脂, 2004, (1): 15-17.
- [2] 王巧兰, 郭刚, 林范学. 纤维素酶研究综述[J]. 湖北农业科学, 2004, (3): 14-18.

- [3] 彭宇辉. 纤维素酶的制备及其在食品工业中的应用[J]. 企业技术开发, 2000, (11): 11-12.
- [4] 刘颖, 林亲录. 纤维素酶制取与应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2006, (4): 33-35.
- [5] 何隽菁. 纤维素酶的研究应用新进展[J]. 科技资讯, 2006, (32): 7.
- [6] 肖春玲, 徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 33-35.
- [7] 王丽, 陈卫平. 纤维质原料制燃料酒精的研究进展[J]. 酿酒科技, 2005, (3): 57-60.
- [8] 王健, 袁永俊, 张弛松. 纤维素发酵产酒精研究进展[J]. 中国酿造, 2006, (6): 9-13.
- [9] 徐惠娟, 王世锋, 龙敏南. 燃料酒精生产的研究进展[J]. 厦门大学学报, 2006, 45(增刊): 37-42.
- [10] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2000.
- [11] 农向, 伍红, 秦天莺. 纤维素酶的研究进展[J]. 西南民族大学学报, 2005, (增刊): 29-33.
- [12] 李瑞芳, 徐怡. 纤维素酶生产方法的研究现状及分析[J]. 纤维素科学与技术, 2006, 14(3): 67-70.
- [13] 冀全林, 陈刚. 纤维素酶的研究进展及应用前景[J]. 畜牧与饲料科学, 2006, (5): 58-61.
- [14] 宋贤良, 温其标, 朱江. 纤维素酶法水解的研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(4): 67-71.

(上接第 97 页)

消毒的酒瓶中密封, 贴标签, 阴凉处存放, 即为成品, 可直接饮用或上市出售。

3 质量标准

3.1 感官指标

颜色为黄绿色, 清亮透明; 香气有茶的清香和酒的韵香; 口感柔和醇香, 兼具有茶和酒特殊的风味。

3.2 理化指标

酒度含量 8 ± 2 %vol; 总糖含量(以葡萄糖计) ≤ 3.0 g/L; 总酸含量(以乙酸计) ≤ 3 g/L。

3.3 卫生指标

细菌总数 < 10 个单菌落/mL, 大肠杆菌 < 30 个单菌落/mL, 致病菌未检出。符合 GB2757-81《蒸馏酒及配制酒卫生标准》。

4 讨论

4.1 由于云南大叶种绿茶茶多酚的含量较高, 本实验茶样茶多酚含量为 35%, 而商丘地区的水质硬度较大, 导致茶叶中的多酚类物质与水中的金属离子络合生成沉淀, 影响浸提液的色泽和口味, 故用纯净水来发酵酿造茶酒形成沉淀少, 但口感有些欠佳。这与刘素纯的研

究结果^[4]相一致。这还需进一步的研究。

4.2 由于茶多酚具有抑制有害细菌繁殖的作用, 在成品酒中分离不出致病菌, 细菌和大肠杆菌的数量较少, 符合食品行业的卫生标准。和非茶酒类的酒类相比, 卫生达标相对好控制。

4.3 在混合发酵过程中, 尤其是保温、热燥、密封等环节是关键阶段。在发酵快要结束时, 发酵的适度很重要, 要依发酵可控条件而灵活掌握。

4.4 用绿茶水、玉米和酿酒酵母混合发酵生产的绿茶酒, 兼有绿茶的清香和玉米酒的醇香, 二者融为一体, 形成独特的风味特征。这样的绿茶酒既提升了玉米的经济价值, 又充分降低了酒精度和增加了营养保健价值, 具有良好的市场前景。

参考文献:

- [1] 高飞. 绿茶酒的研制[J]. 酿酒科技, 2004, (2): 105-106.
- [2] 李宗义, 刘国生. 微生物学实验技术(第一版)[M]. 北京: 气象出版社, 1997. 320-330.
- [3] 任永新. 绿茶啤酒的生产工艺研究[J]. 四川食品与发酵, 2006, (3): 23-25.
- [4] 刘素纯, 胡茂丰, 廖兴华, 等. 乌龙茶酒的研制[J]. FOOD & MACHINERY, 2004, (5): 42.