

白蚁肠腔内纤维素酶概述及在食品发酵中的应用

冯 冲¹, 赵 明¹, 康 静³, 刘艳丽¹, 赵国欣¹, 宋安东²

(1. 中州大学实验管理中心, 河南 郑州 450044; 2. 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002;

3. 新乡医学院生命科学技术系, 河南 新乡 453003)

摘 要: 白蚁纤维素酶的研究与开发已成为近年来的热点。本研究从白蚁肠腔纤维素酶的来源、国内外白蚁纤维素酶的研究状况、白蚁降解木质纤维素的机理及纤维素酶在发酵食品中的应用等方面综述了白蚁纤维素酶的研究现状。

关键词: 白蚁; 纤维素酶; 机理; 应用

中图分类号: TS201.3; Q93-3; TQ35; Q814

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2013)01-0104-04

Review of Intraluminal Cellulase of Termite and Its Application in Food Fermentation

FENG Chong¹, ZHAO Ming¹, KANG Jing³, LIU Yanli¹, ZHAO Guoxin¹ and SONG Andong²

(1. Experimental Management Centre, Zhongzhou University, Zhengzhou, He'nan 450044; 2. College of Life Science, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002; 3. Department of Life Sciences, Xinxiang Medical College, Xinxiang, He'nan 450003, China)

Abstract: The research on and the development of intraluminal cellulase of termite has become the hotspot in recent years. In this paper, the source of intraluminal cellulase of termite, the research status of termite cellulase at home and abroad, the mechanism of the degradation of cellulose, and the application of termite cellulase in food fermentation were reviewed.

Key words: termite; cellulase; mechanism; application

纤维素是主要的生物能源聚合物, 白蚁作为微型的生物反应器, 从咀嚼器官、消化道酶系、微生物群落等方面都为木质纤维素的降解提供了最为高效的机制, 白蚁纤维素酶的开发也被认为是大量转化和利用生物能源的重要途径。白蚁消化系统自身及共生微生物纤维素酶运行机制已成为近年来研究的热点。本研究从国内外白蚁纤维素酶的研究状况、白蚁消化木质纤维素的机理及纤维素酶在发酵食品中的应用等方面阐述白蚁纤维素酶的研究状况。

1 白蚁肠腔纤维素酶的来源

白蚁体内涉及的纤维素酶主要包括内切葡萄糖苷酶、外切葡萄糖苷酶和 β -葡聚糖苷酶等, 这些相关的纤维素酶来源于白蚁自身和肠道微生物^[1]。在纤维素分解过程中, 白蚁除利用自身分泌产生的纤维素酶外, 还利用肠道内丰富的细菌、原生动物分泌产生的纤维素酶及某些高等白蚁巢体上共生真菌所分泌产生的纤维素酶。

1.1 白蚁自身分泌产生的内源性纤维素酶

基金项目 国家自然科学基金项目(批准号 31170350)。

收稿日期: 2012-08-13; 修回日期: 2012-08-13

作者简介 冯冲(1970-), 女, 讲师, 硕士研究生, 研究方向: 生物能源工程, E-mail: chongf2004@163.com。

通讯作者 宋安东(1972-), 男, 教授, 博士(后), 研究领域: 生物能源工程、生物质转化与利用。E-mail: song1666@126.com。

优先数字出版时间 2012-11-21 地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121121.1515.008.html>。

自从在栖北散白蚁中克隆出了白蚁自身分泌的纤维素酶基因——内切 β -1, 4-葡聚糖酶基因以来, 白蚁内源性纤维素酶的研究引起了人们足够的重视。内源性纤维素酶主要由内切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶组成, 而没有外切葡聚糖酶。到目前为止已经从栖北散白蚁、高山象白蚁、达尔文澳白蚁、台湾乳白蚁中检测到了内源性纤维素酶。这些酶主要来源于共生微生物分布很少的中肠上皮细胞和唾液腺中^[2]。2002 年 Tokuda^[1]等人在木食性白蚁恒春新白蚁唾液腺中发现了 β -葡聚糖苷酶活性, 该酶基因全长 1730 bp, 编码 498 个氨基酸, 与 GHFI 家族的糖基水解酶具有约 50% 的相似性。

1.2 白蚁共生鞭毛虫来源的纤维素酶

Trager 曾报道在栖北散白蚁和白蚁 *Termopsis angusticollis* 肠道内共生的鞭毛虫能够分泌产生纤维素酶; Hullgate 认为, 内华达古白蚁和美古白蚁后肠腔是原生动物消化纤维素的主要场所, 纤维素经白蚁粗加工后转移至后肠, 由后肠的原生动物负责降解, 且分解纤维素的量占白蚁总取食量的 2/3 以上^[3]。白蚁 *T. termopsidis* 独自

可以降解羧甲基纤维素,无须胞外或内共生细菌的参与,最终代谢产物为醋酸纤维素和二氧化碳,两者比率为 2:1;随后 Odelson 等也证实 *T. termopsidis* 至少可以分泌产生内切葡聚糖酶和纤维二糖酶;Veivers^[4]等也通过实验证实了鞭毛虫与纤维素降解之间的关系。

1.3 细菌来源的纤维素酶

低等白蚁和高等白蚁消化道中都有大量形态和密度不同的细菌定居,后肠和混合节内的细菌数达 $10^5 \sim 10^{11}$ 个/mL,后肠内的细菌分布在袋肠、结肠和直肠内。前、中肠内也有少量细菌,但没有在唾腺中发现细菌。细菌游离在白蚁的肠液中或者粘附于肠道上皮层的杯状结构。许多细菌与原生动物附着于囊形附器上皮组织细胞的微绒毛之间,呈游离状分布。这些微生物在宿主体内发挥着很好的作用,其中很多细菌具有产纤维素酶能力。高山象白蚁肠道中的细菌可以分解 4 种类型木质素亚组织和脱碱木质素,它对脱碱木质素的降解率为 28%,对木质素二聚体降解效率可以达到 60%~95%^[5]。

1.4 真菌来源的纤维素酶

在高等白蚁中,大白蚁亚科白蚁的蚁巢中存在一种称之为“真菌圃”的结构,其结构类似海绵状,主要由嚼碎但未消化的植物材料构成,上面布满共生鸡纵菌的菌丝和菌丝瘤。白蚁以长满菌丝和菌丝瘤的旧圃为食,同时又不断新建真菌圃^[6]。并且已有大量的实验从表型上证明了该类真菌很大程度上促进了培菌白蚁对木质纤维素的消化。这些小白球组成的担子菌不仅是蚁巢温湿度调节器,还将作为高等白蚁的食物储备库提供大量的营养物质。真菌分泌的纤维素酶主要可以分为 2 类:一类来自白腐真菌和软腐真菌,包括葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶、 β -葡萄糖苷酶的完整纤维素酶系,它们可以将纤维素完全分解为葡萄糖;另一类是不含有葡聚糖外切酶,通过氧化因子与葡聚糖内切酶协同作用来降解纤维素,如褐腐菌分泌的纤维素酶^[7]。

2 国内外白蚁纤维素酶研究概况

Nakashima^[8]等人于 2000 年利用浸提的方法得到了台湾家白蚁的内切 β -1,4-葡聚糖酶,并对其进行了纯化和酶学性质研究。同时于 2002 年克隆到台湾家白蚁的 5 个内源性内切葡聚糖酶基因,分别是 CfEG1a、CfEG1b、CfEG2、CfEG3、CfEG4,它们之间的相似性很高,都只有个别核苷酸的差异。高山象白蚁与台湾家白蚁的内切 β -1,4-葡聚糖酶已经分别在大肠杆菌中得到表达^[9]。

国内对白蚁体内内源性纤维素酶的研究阶段基本上都还是利用生物化学的方法对其进行分离纯化。真正利用蛋白质工程的方法对白蚁纤维素酶进行改造的文献报道很少:主要以 RsEG、NtEG、CfEG、CaEG 4 个直系同源基因为亲本进行基因家族改组,筛选到能在大肠杆菌胞内过量表达,并且酶活比亲本酶提高 20~30 倍的

重组子^[10]。

刘源智^[11]等研究表明,菌圃培养的真菌对黑翅土白蚁巢群的维持具有非常关键的作用。当室内巢因缺乏真菌鸡纵菌而不能形成菌圃时,利用分飞有翅成虫建立的巢群会在 5~9 个月内死亡。

杨天赐^[12]等对黑翅土白蚁的纤维素酶活性研究表明,黑翅土白蚁的肠道的各个部分和头部都有内切 β -1,4-葡聚糖酶,但是绝大部分都集中在前肠和中肠,后肠的活性只占肠腔的 21%左右;对于 β -葡萄糖苷酶而言,绝大部分活性都集中在头部,肠腔的 β -葡萄糖苷酶活性很低。同时,对黑翅土白蚁体内的内切 β -1,4-葡聚糖酶进行了纯化。对纯酶的性质研究表明,黑翅土白蚁内切 β -1,4-葡聚糖酶的分子量为 89 kDa,酶反应的最适 pH 值为 6.2,最适温度为 51℃,酶的 K_m 值和 V_m 值分别为 0.038 mg/mL 和 0.21 mM/min, N-末端前 5 个氨基酸的序列为“HPMLD”。

3 白蚁降解木质纤维素的机理

白蚁的中肠上皮细胞和唾液腺分泌产生葡聚糖内切酶、 β -葡萄糖苷酶。白蚁能高效转化木质纤维素的功能是白蚁自身的酶催化系统与共生微生物催化系统联合协同作用的结果。在传统认识中,动物自身不含纤维素酶,昆虫白蚁等动物能够消化纤维素,是通过它体内共生菌、原生动物分泌的纤维酶发挥作用。

从图 1 可以看出,白蚁的生物系统不但能降解各类生物质中的纤维素(74%~99%),同时又能降解相当比例的木质素(20%~100%)和半纤维素(60%~90%)。研究表明,白蚁生物系统几乎拥有降解木质纤维素所必需的各类关键酶系:纤维素酶、半纤维素酶及木质素酶等。这些酶系通过内在消化系统的协调,能高效连续降解生物质中的木质纤维素^[13]。

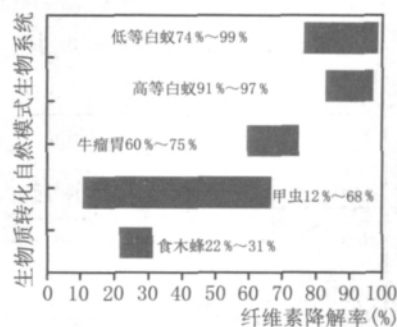
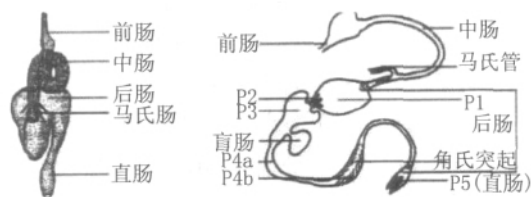


图1 几种不同自然生物系统纤维素降解效率

3.1 白蚁的肠道与肠道共生物的作用

白蚁消化道呈螺旋状,主要由 3 部分组成:前肠、中肠和后肠,见图 2。与一般昆虫相比,白蚁后肠相当发达,约占全部肠道总容积的 4/5。由于大多数白蚁个体较小,肠道内的微环境条件难以准确描述,但可肯定从前肠向后肠推移,逐渐变为无氧态,至充满微生物的后肠部分达

到最低的氧化还原电位 ($-50 \sim 270$ mV, 不同种变化较大), 此处 pH 值近中性 ($6.2 \sim 7.6$), 但食土白蚁的后肠 P1 区 pH 值高达 11.0 以上。低等白蚁的肠道构造很简单, 后肠中存在大量共生微生物, 如原生动物、细菌, 它们与宿主互依互存, 分泌的纤维素酶与宿主的内源性纤维素酶一起对所摄取食物中的纤维素进行有效降解。而高等白蚁的后肠中并不存在共生微生物。某些白蚁则在它们自己精巧的“菌圃”中培养真菌, 以满足自身的需要^[14]。与以往认识不同的是, 白蚁的消化内道并不是简单的无氧发酵罐, 而是由纵向与横向彼此分开的微环境构成, 二者的理化特性明显不同。白蚁膨大的后肠一直被人们假设为一种厌氧反应器, 不过目前的研究结果显示, 从白蚁后肠中分离到的细菌大多数是耐氧或兼性厌氧菌, 还有的甚至是严格好氧菌^[15]。白蚁极度变长的肠道说明它吃的是很难消化的食物, 白蚁的前肠与中肠对纤维素只是粗加工, 后肠才是纤维素降解的主要场所, 大量的共生微生物定居于后肠之中。后肠是白蚁消化系统中微生物栖息的主要场所, 其囊形附器内, 共生着数量众多的细菌、真菌以及鞭毛虫、纤毛虫、变形虫等单细胞原生动物。几乎所有的实验证据表明, 白蚁后肠中共生微生物(包括原生动物)是木质素、纤维素和半纤维素消化的驱动力。白蚁体内涉及纤维素分解的纤维素酶主要包括 C_x 、 C_1 和 BG, 内源性的纤维素酶主要由内切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶组成。白蚁的能量代谢在后肠中完成, 能量代谢途径见图 3^[16]。



A. 低等食土白蚁肠道; B. 高等食土白蚁肠道

图 2 白蚁肠道的解剖示意图

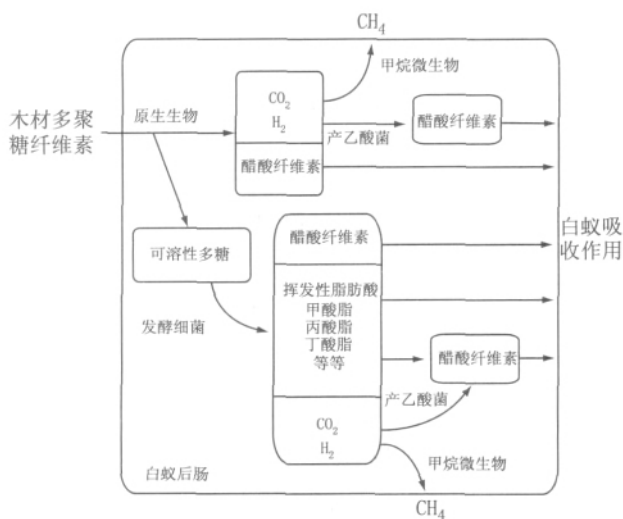


图 3 白蚁降解木质纤维素的代谢途径

3.2 白蚁自身分泌的纤维素酶的作用

由于白蚁的唾液腺、前肠和中肠缺乏微生物, 或者是数量极少, 由这些分泌位点产生的纤维素酶属于内源消化酶。2003 年 Scharf 等研究表明, 内源性白蚁纤维素酶可以在北美散白蚁工蚁和幼蚁体内得到表达。大白蚁亚科的一些种类还可从巢体上的共生真菌处获得外源性纤维素酶; 2002 年 Nakashima^[17]等发现, 台湾乳白蚁工蚁体内有 2 个独立的纤维素消化系统, 一是依赖白蚁自身中肠细胞分泌的纤维素酶, 二是依赖后肠共生微生物分泌的纤维素酶, 这 2 个酶系统共同完成肠腔内纤维素的分解。在栖北散白蚁的唾液腺中, C_x 酶和 BG 酶的含量分别占肠道纤维素酶总量的 77.8 % 和 23.9 %。黄胸散白蚁也可利用唾液腺分泌的 C_x 酶来降解食物中的纤维素, 台湾乳白蚁体内的纤维素酶除存在于唾液腺外, 还存在于中肠内, 且 C_x 酶的活性比黄胸散白蚁的明显要高。

4 纤维素酶在食品发酵工业中的应用

利用纤维素酶处理食品发酵工业的原料, 可改变细胞壁的通透性, 提高细胞内含物(如蛋白质、淀粉、油脂及糖等)的提取率, 改善食品质量, 简化生产工艺。

4.1 白酒酿造

白酒酿造所用原料中纤维素含量较大, 是用纤维素酶后, 可同时将淀粉和纤维素转化为糖, 再经酵母分解全部转化为酒精, 提高出酒率, 而且还易于净化和过滤及改良酒的品质和稳定性。邵学良等研究表明, 大曲酒糟中添加适量纤维素酶后, 在相同工艺条件下发酵 2 d, 每吨含 10 % 淀粉的酒糟可产出 60 % vol 白酒 61 kg, 是常规发酵 20 d 所产酒量(15 kg)的 4 倍, 因此纤维素酶在未来的白酒发酵业中将会有巨大的应用潜力^[18]。

4.2 啤酒酿造

纤维素酶用于啤酒工业的发芽生产中可增加麦粒溶解性, 加快发芽, 减少糖化液中 β -葡萄糖含量, 改善过滤性能, 能够避免沉淀的产生, 使麦汁的透明度明显提高, 显著改善啤酒的品质。在啤酒生产过程中, 使用纤维素酶后, 可同时将淀粉和纤维素转化为糖, 再经酵母分解全部转化为酒精, 使出酒率提高 3 % ~ 5 %, 且淀粉和纤维利用率可高达 90 %^[19]。

4.3 果酒酿造

将纤维素酶应用于葡萄酒酿造, 可以明显提高葡萄汁的发酵效率, 并且能够增加葡萄酒的香味, 提高葡萄酒的质量和稳定性。在黑莓酒酿造过程中, 将黑莓破碎后利用半纤维素酶、纤维素酶和果胶酶等进行生物酶解, 所酿造出的各种黑莓果酒均具有果香浓郁、清澈明亮、营养丰富、口味纯正等特点。加入纤维素酶还可以显著提高出汁率, 缩短酿造周期, 从而提高了设备利用率, 降低了果酒酿造的成本。在木瓜果酒酿造过程中, 加入适当比例的纤维素酶和果胶酶的复合酶液后, 木瓜汁的出汁率明显提

高,营养物质更加丰富,成品酒的酒质澄清透明,无悬浮物和沉淀物等杂质^[20]。

4.4 酱油、食醋酿造中的应用

用纤维素酶作适当处理可使植物细胞壁软化、膨胀或崩溃,从而提高细胞内含物的提取率,简化了食品加工工艺,改善食品品质。纤维素用于固态无盐酱油发酵,能将包裹蛋白质的纤维素分解,使蛋白质呈裸露状态,便于蛋白酶分解蛋白质,提高酱油产率,可改善酱油质量,缩短生产周期,酶制剂用量仅为0.0125%,酱油中的还原糖增加了10.796%,色度提高4.2%,原料利用率分别比纤维素酶提高8.6%和1%^[21]。

在食醋酿造过程中,将纤维素酶与糖化酶混合使用,添加纤维素酶制剂10~50 IU/g主料,产量和主料出品率可分别较对照提高0.25~1.389 kg和5.196%~27.2%,明显提高了原料利用率和出品率^[22]。原因在于纤维素酶破坏了植物细胞壁,便于淀粉、蛋白质、脂肪类物质的释放,加快了发酵速度,提高食醋产量和主料出品率;同时添加了纤维素酶,可使食醋的风味更佳。

4.5 味精生产中的应用

李瑞丰^[23]等在小麦淀粉生产味精中加入纤维素酶后谷朊粉纯蛋白收率由9.70%升到10.16%,淀粉蛋白却由1.75%降到了1.67%,戊聚糖的固含量略有下降,总量大大降低(降幅达21.34%)。另外,由于纤维素酶的作用,淀粉液化时普遍反应加快且蛋白絮凝较好,糖水过滤速度提高20%,所得糖液透光提高35%。

4.6 微生物油脂发酵中的应用

微生物油脂的研究技术将成为新世纪油脂工业的发展方向,使油脂行业的加工范围更加广阔。冯冲^[24]等用纤维素酶处理玉米秸秆水解糖化后,可得菌体生物量和油脂浓度分别为22.6 g/L、10.5 g/L。

李新社^[25]等以大曲丢糟为主要原料,利用纤维素酶为催化剂进行微生物油脂发酵试验,测得皮状丝孢酵母生物量为0.35 g/100 mL,油脂含量为23.89%。

参考文献:

- [1] Tokuda G, Saito H, Watanabe H. A digestive-glucosidase salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of cDNA its precursor by 5'-and 3'-RACE amplifications with degenerate primers[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, (32): 1681-1689.
- [2] Tokuda G, Nathan L, Watanabe H, et al. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage[J]. *Molecular Ecology*, 2004, (13): 3219-3228.
- [3] 余永红, 邓泽元, 范亚革, 等. 一株新型产纤维素酶菌种的分离鉴定[J]. *食品工业科技*, 2006(6): 52-53.
- [4] Breznak JA. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by Termites[J]. *Annual Review of Entomology*, 1994, (39): 453-487.
- [5] Kato K, Kozaki S, Sakuranaga M. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(5): 459-462.
- [6] 江玉姬, 陈汉青, 童金秀, 等. 产纤维素酶菌株 C-的筛选[J]. *福建农业科技*, 2003(3): 45-46.
- [7] 林远声, 列璞怡. 降解纤维素的真菌分离 - 鉴定及其酶活测定[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2004(43): 82-85.
- [8] Azuma J, Nakashima K. Distribution and properties of endo- β -1,4-glucanase from a lower termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki)[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, (64): 1500-1506.
- [9] Nakashima K., Watanabe H., Saitoh H., et al. Dual cellulose digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki)[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, (32): 777-784.
- [10] Martins LE, Kolling D., Camassola M., et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(5): 1417-1424.
- [11] 刘源智, 等. 黑胸散白蚁的研究[J]. *中华卫生杀虫药械*, 2003, 9(4): 8-12.
- [12] 杨天赐, 莫建初, 程家安. 白蚁消化纤维素机理研究进展[J]. *林业科学*, 2006, 42(1): 110-115.
- [13] 孙建中. 白蚁生物系统在实现生物质高效转化中的独特科学价值及应用前景[M]. 北京: 科学出版社. 2010: 207-209.
- [14] INOUE T, MURASHIMA K, AZUMA J I, et al. Cellulose and xylan utilization in the lower termite *Reticulitermes speratus*[J]. *Insect Physiol*, 1997, (43): 235-242.
- [15] 张来丽, 李刚, 毛润乾. 白蚁肠道微生物降解木质素研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2010, 50(3): 434.
- [16] 崔丽丽. 台湾乳白蚁纤维素酶的特性研究[D]. 广州: 中山大学, 2007: 13-14.
- [17] 张大羽, 诸永, 等. 黄胸散白蚁和台湾家白蚁不同品级虫体内纤维素酶的活性[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2001, 27(1): 1-4.
- [18] 邵学良, 刘志伟. 纤维素酶的性质及其在食品工业中的应用[J]. *中国食物与营养*, 2009(8): 34-36.
- [19] 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.
- [20] 赵贵红. 营养型木瓜果酒的酿制技术[J]. *中国酿造*, 2007(1): 73-74.
- [21] 周春晖, 孙加龙. 纤维素酶及其应用[J]. *中国商办工业*, 2002(2): 43-44.
- [22] 杨玉华, 刘德海. 纤维素酶提高食醋产量的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1999, 25(4): 67-68.
- [23] 李瑞丰. 纤维素酶在小麦淀粉生产味精中的应用实验[J]. *发酵科技通讯*, 2008, 37(3): 7-8.
- [24] 冯冲, 王艳颖, 刘艳丽, 等. 纤维质水解液发酵生产生物油脂[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(3): 88-91.
- [25] 李新社, 陆步诗, 曾海波. 皮状丝孢酵母在酶法水解丢糟生产微生物油脂中的应用[J]. *酿酒科技*, 2009(12): 87-92.