

纤维乙醇用纤维素酶的研究进展

冀春雪,杜风光,史吉平,徐志剑,韩素芳,董青山

(上海天之冠可再生能源有限公司,上海 201203)

摘要: 纤维生物质是自然界最广泛的可再生能源,用纤维素酶水解处理后生产的燃料乙醇可部分替代石油,而纤维素酶成本的降低及效率的提高是生产纤维乙醇的关键。介绍了纤维乙醇用纤维素酶的研究进展,存在问题及展望。

关键词: 燃料乙醇; 纤维素酶; 纤维素

中图分类号:TQ 925;Q 55;TS262.2 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2007)07-0118-04

Research Advance in the Use of Cellulase to Produce Fibrous Ethanol

Ji Chun-xue, Du Feng-guang, Shi Ji-ping, Xu Zhi-jian, Han Su-fang and Dong Qing-shan

(Shanghai Tianzhiguan Renewable Energy Co.Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: Cellulose is a renewable resource widely distributed in the nature, fuel ethanol used to replace oil partly could be produced by the hydrolysis of cellulose, and the key factors to produce fibrous ethanol cover the reduce of production cost and the increase of production efficiency. The latest research advance in the use of cellulase to produce fibrous ethanol, the existed problems and its development prospect were introduced in this paper.

Key words: fuel ethanol; cellulase; cellulose

纤维素是地球上最丰富的可再生性资源之一,占地球总生物量的 40%,但由于降解较难,这些资源目前绝大部分没有得到很好利用,造成巨大的浪费。如何更为有效地转化和利用这一丰富资源,已成为世界上许多国家十分关注的重要领域之一。研究发现纤维素原料可以用来生产乙醇,是一种能替代有限石油资源的能源,其转化过程主要有 2 部分:纤维生物质中的纤维素被纤维素酶降解生成还原糖和用还原糖的发酵来生产酒精。而目前的纤维素酶由于其活性和稳定性水平使得其制造成本过高而阻碍着对生物质的水解应用,制约其产业化的实现。因此大多数研究集中在开发高效,高热稳定性的纤维素酶^[1]。

1 纤维素酶来源及分类

1.1 纤维素酶的来源

纤维素酶的来源极为广泛,对纤维素能进行有效降解的生物包括细菌、丝状真菌、放线菌、软体动物、原生动物和昆虫在内的多种生物。产生纤维素酶的细菌有纤维粘菌和纤维杆菌等,真菌有黑曲霉、根霉、绿色木霉、里氏木霉、康氏木霉、斜卧青霉等,放线菌有玫瑰色放线

菌和纤维放线菌等^[2]。

丝状真菌是研究最多的纤维素降解菌群^[3]。对纤维素作用较强的菌株多是木霉属、曲霉属和青霉属菌株,一般采用的工业发酵菌种多是这些产酶能力较强的菌种,特别是以作用突出的木霉属菌种居多,目前研究最清楚的是里氏木霉^[4,5]。

另外,酵母也产生纤维素酶。一般而言,厌氧菌所产酶系较有氧菌丰富,厌氧菌产多酶体系,而有氧菌多产单一酶系^[6]。

实际上,自然界产生纤维素酶的菌株远不限于文献已报道的已知种属,这与自然界存在丰富的纤维素资源是相适应的。

1.2 纤维素酶的分类

纤维素结构的复杂性决定了任何单一种酶都难以有效地降解它,需要一个复杂的酶体系共同作用。早在 1950 年,Reese 等人就提出了 C1-Cx 概念,经过 30 多年来的研究,特别是近年来蛋白质分离及纯化技术的不断改进,分离得到的纤维素酶越来越多,每种酶作用的机理越来越明确。现已确认纤维素酶主要分为 3 大类^[7]:

收稿日期:2006-03-30

作者简介:冀春雪(1980-)女,河南南阳人,硕士,从事可再生能源领域的研究。

内切 -1,4 葡聚糖酶,即 endoglucanase,EC 3.2.1.4,简称内切酶,又称 Cx 酶,来自真菌中的简称 EG,来自细菌的简称 Cen;外切 -1,4 葡聚糖水解酶,即 exo-1,4-D-glucanase,EC 3.2.1.91,即外切型葡聚糖酶,也称 C1 酶、外切酶,来自真菌的简称 CBH,来自细菌的简称 Cex;-葡萄糖苷酶,即 1,4-glucosidase,EC 3.2.1.21,简称 G,也称纤维二糖酶。

纤维素酶属于糖基水解酶,根据氨基酸序列的相似性可将糖基水解酶分为 82 个族,纤维素酶占其中的 13 个族^[8]。

2 纤维素酶作用机制

虽然对纤维素酶的作用机制没有完全搞清,但就目前研究所得其大致过程为:Cx 作用于纤维素的非还原多聚体末端,水解 -1,4-糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子,将天然纤维素分解为直链纤维素,使其转变成水合非结晶纤维素,形成 C1 需要的新的游离末端;C1 作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 1,4-糖苷键,将直链纤维素内部切断,产生大量带非还原性末端的小分子纤维素;-G 将纤维二糖水解释成 2 个葡萄糖分子^[9,10]。

纤维素酶水解纤维素需要多种酶成分的协同作用,而且各种酶之间的比例也要协调^[11,12]。对某些 -G 酶活很低的纤维素酶,水解产物纤维二糖会强烈抑制酶的水解活性,不能彻底水解纤维素。木质素、木聚糖也会影响纤维素酶水解纤维素。

3 纤维素酶的调控

要提高纤维素酶的生成量,必须研究纤维素酶产生菌合成酶的调控机制。许多研究表明,纤维素酶的生物合成主要受诱导和降解阻遏两方面的调节^[13]。

N isizawa 发现纤维素、纤维二糖、槐糖、纤维素衍生物等都能诱导 *T. reesei* 和 *T. viride* 产生纤维素酶。其中纤维二糖的作用比较特殊,在较低浓度时,纤维二糖诱导纤维素酶的产生;但在较高浓度下,则阻遏纤维素酶形成。低分子糖类对纤维素酶的诱导作用随菌种不同而异。燕红等通过测定各种酶活性研究了不同碳源对 2 株芽孢杆菌产纤维素酶的诱导作用,发现它们不能由纤维材料作单一碳源诱导产纤维素酶,而仅由带有还原集团的单糖或双糖诱导产酶,且纤维素酶系各组分的合成表达是协同发生的。作者推测芽孢杆菌不能像真菌那样仅由纤维素作为单一碳源就可诱导产酶,但它的产酶诱导谱较真菌广泛。

纤维素酶产生的另一种生化调控方式是降解物阻遏。纤维素酶的合成更容易受到易于代谢的基质如葡萄糖、甘油等的阻遏,只要培养基中含有一定量的阻遏物,

菌株的代谢就不再进行酶的合成。这类阻遏作用被认为是发生在合成的转译或转译后的水平上。

4 纤维素酶的生产方法

纤维素酶占纤维乙醇生产成本的 50% ~ 60%,所以要想将纤维素酶真正应用于工业生产,就要降低其成本。美国 Novozymes 公司和美国国家再生能源实验室(NREL)合作开发的生物基乙醇燃料项目获重大进展,将生产 1 加仑燃料级乙醇所需纤维素酶的成本从最初超过 5 美元的水平大幅减少至当前的低于 50 美分。据称,Novozymes 公司和 NREL 下一步将努力降低纤维素酶的生产成本,目标是在未来的两年中把生产 1 加仑燃料级乙醇所需纤维素酶的成本降低至 10 美分。从 2000 年起,杰能科国际生物公司与 NREL 合作开发低成本的纤维素酶,在以下两个方面取得了重大的进步:纤维素酶生产的经济性(每克酶减少的成本);纤维素酶的性能(所需纤维素酶减少的克数)。2003 年,由于研究开发了一套生产强效的纤维素复合酶系统的工艺,酶的成本降低 20 倍。最近,酶的成本又进一步降低至原来的 30 倍,当然值得指出的是,这个酶成本的降低是以美国能源部所提供的预处理底物为基准的,对其他底物的处理效果可能会不同^[14]。

目前,国内外研究主要集中在以下几方面: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;通过分子演化和设计(蛋白质工程)来提高酶的功能性;通过强化的低成本发酵来生产酶制剂。

4.1 常规理化诱变

利用物理、化学诱变剂单独或复合处理微生物孢子或细胞是选育纤维素酶高产菌种的有效方法。诱变产纤维素酶的细菌和真菌,其变异株可分泌产生多纤维素酶复合体,多纤维素酶复合体是由一支架蛋白连接起来的多条活性多肽复合物,每条多肽具有 1~2 种纤维素酶功能,在水解纤维素的过程中协同发挥功能。以 *Clostridium thermocellum* 的多纤维素酶体为例,其纤维素酶体由 26 条多肽构成,26 条多肽中具有内切葡聚糖酶活性的有 15 条(其中有几条同时具有外切葡聚糖酶活性),具有木聚糖酶活性的有 13 条,2 种酶活性兼有的有 8 条,有 1 条是支架蛋白,有 2 条有催化功能。这些变异菌株还能产生纤维素结合因子,使多纤维素酶复合体能水解晶态纤维素^[15-17]。

4.2 基因工程

纤维素酶基因工程技术始于 20 世纪 70 年代末,最初以得到纤维素酶过量生产为主要目的进行基因克隆研究^[18,19],为构建高活性的菌株奠定了良好基础。目前采用基因工程手段来使酶高产和改进酶系组成,山东大学

克隆了瑞氏木霉 CBHI 基因的启动子和终止子序列,构建了瑞氏木霉的表达整合型载体和遗传转化系统。新系统可用于提高所需的纤维素酶组分在菌体所产纤维素酶总量中所占比例及产量,对瑞氏木霉产纤维素酶酶系组分进行理性设计、降低或去除不需要的组分、不同微生物来源的最佳酶组分人工重组等^[20]。

最初对纤维素酶基因重组的研究主要集中在细菌纤维素酶,而且研究受体菌多选择 *E. coli*。在 *E. coli* 中表达纤维素酶基因,存在着两个主要问题:一是很少分泌蛋白质,提取存在很大困难;二是表达水平低,一般在 10% 以下。因此近年的研究转移到了木霉、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母等,目前研究较多的是木霉及酵母表达系统。木霉是优良的外源基因表达系统之一,具有十分成熟的批量发酵技术,还具有较强的蛋白质胞外分泌能力,所以将高效的纤维素酶基因克隆到木霉中将是十分具有商业诱惑力的课题之一^[21]。酵母表达产物高度糖基化,经正确加工修饰后可直接分泌至培养基,表达水平高。

用基因克隆重组技术表达的纤维素酶产物,发现有些单组分 CM C 酶活力比所属的多纤维素酶复合体高的多。X inliang Li 等报道其得到的多纤维素酶复合体有 7 个具有内切葡聚糖酶活性的组分,通过测定 CM C 酶活性发现比该多纤维素酶复合体高 1 倍^[22]。

基因工程技术的局限性导致无法实现出发菌株纤维素酶的全部表达,因此所获得的酶一般为纤维素酶复合体的单个多肽组分,具有 1~2 种纤维素酶功能,不足以彻底降解纤维素。由于缺乏纤维素结合因子,基因工程纤维素酶不能水解结晶状态的纤维素。另外,基因工程纤维素酶也不能克服木质素、木聚糖的障碍。因此,利用基因工程技术生产有效降解纤维素的纤维素酶还需要做大量的研究工作。

4.3 蛋白质工程

早期的蛋白质工程是尝试确认很相近的纤维素酶是如何表现出不同的特性的,如催化活性的最适 pH,有的酶是在碱性范围内,而有的酶却是在酸性范围内。现在蛋白质工程作为研究纤维素酶催化机制和提高酶活的工具,其具体手段是用酶蛋白分子定向进化技术、酶分子的定点诱变和结构域杂交方法。它通常是利用基因定位突变技术对纤维素酶家族序列不变残基的确认和三维构象的确认,通过设计新的三维复合体来对酶进行修整探索,在基因水平上改变活性部位氨基酸残基的密码子,进而改变纤维素酶的活性,并对定点突变酶进行动力学的分析^[9]。迄今为止,纤维素酶已有 10 个家族被克隆出来,其中第 5,6,7,8,9,45 家族已经用蛋白质工程来进行了研究。

最早对 *T. reesei* 基因的定位突变研究始于 1987 年

chen 的工作,目前该技术被系统地应用于许多纤维素酶的改造中,并已有提高纤维素酶热稳定性的多篇成功报道,但仅有少部分提高了纤维素酶的活性。就现状而言,在对纤维素酶三维结构及催化机理尚缺乏完全了解的情况下,往往改变假想活性部位的几个氨基酸残基比仅改变一个氨基酸残基效果要理想,这一领域尚需大量研究工作。

4.4 优化发酵工艺

涂漩等^[23]的报道表明,多元混菌发酵可提高各组分分泌的纤维素酶活性。因此,选育能够分泌多种纤维素酶成分的木霉或黑曲霉^[24,25],将具有纤维素酶活性的菌株、产木质素酶的菌株(如白腐菌等)、产木聚糖酶的菌株和产 α -葡萄糖苷酶的菌株(如黑曲霉等)等进行混合培养,根据纤维素水解活性和葡萄糖生产率进行判定、优化组合,利用现代发酵工艺,生产有多种酶成分的混合物,有望成为纤维素酶工业化生产的又一方案。

4.5 细胞融合技术

通过细胞工程提高纤维素酶活性的工作始自日本外山等学者^[6],他们利用原生质体融合技术研究 *T. reesei* 的遗传,得到的融合子其稳定的 CM C 活性比亲本高 1 倍,后来工作进一步扩大到不同种木霉之间的融合。国内近年也在原生质的制备、再生以及融合方面进行了研究探索。总体来看,世界范围内除少数外,通过融合技术能稳定地大幅度提高纤维素酶活性的报道不是很多。

5 研究展望

纤维乙醇工业化生产需要进一步选育纤维素酶高产菌株,基因重组及定位突变技术无疑是最有效的途径。目前对纤维素酶基因的研究主要集中在产纤维素酶的高产真菌及耐热细菌上,其外分泌性及耐热性在酶工业生产中具有实用意义,所以这些菌种的基因克隆仍是纤维素酶研究的一个热点。木霉转化表达系统的构建日趋成熟,已有将克隆基因进一步转化里氏木霉而提高了其纤维素酶活力的报道,这方面的研究是目前纤维素酶分子生物学研究的又一热点。纤维素酶基因在酵母中的表达是纤维素酶基因工程向应用发展的一个重要途径,酿酒酵母具有将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,可望使纤维素-葡萄糖-酒精-燃料生产实现工艺化,前景极为诱人。存在的问题是酵母表达外源纤维素酶基因的水平仍然有限,故提高酵母表达纤维素酶的产量将是一个重要的研究课题。目前对一些纤维素酶的基本结构和活性部位已基本弄清,利用定位突变方法对酶蛋白分子进行改造和设计,进行蛋白质工程方面的研究也是热点之一。

现在纤维素酶的作用机理还没有完全搞清楚,虽然对纤维素分子链 α -1,4 糖苷键作用的底物特异性、水解

机制已基本了解,但想有效而充分地发挥各组分的作用,通过彼此间的协同作用使纤维素得以充分水解,就必须透彻地研究每个组分的底物特异性。由于底物的复杂性和酶本身的多组分,需要研究的问题还有很多。如CBD是如何吸附到纤维素表面,吸附后CBD是如何与催化区相互作用降解纤维素,目前尚不能作出合理解释,据推测涉及到纤维素聚合物解链、解聚等超分子结构的变化。

对酶基因内部的结构及调控以及酶的空间结构的研究将越来越深入,空间结构的阐明将使酶的作用机理明朗化。过去人们对纤维素酶的诱导调节机制的研究多集中于木霉等少数菌株,虽发现了几种诱导物,但难以用一普遍意义上的诱导机理来解释种种诱导现象。近年来,随着生物化学和分子生物学的发展,再加上纤维素酶在新领域的广泛应用,纤维素酶合成的调节机制再成为研究的一个焦点。

另外,至今仍没有统一的测定纤维素酶的方法,这是影响纤维素酶研究的瓶颈。在酶活的定义方面,不同研究者甚至同一研究者在不同的研究中存在明显的分歧,测定结果也相当不稳定,难以进行横向比较,急需要统一规范,包括规定标准菌株、标准测活方法、标准底物。

参考文献:

- [1] 段钢,孙长平.酶在生物质转化为燃料酒精中的应用[J].食品与发酵工业,2005,31(5):73-75.
- [2] ELENA S,LYMAR,BINLI,etal.Purification and characterization of a cellulose-binding α -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, (8): 2976-2980.
- [3] 孟雷,陈冠军,王怡,等.纤维素酶的多型性[J].纤维素科学与技术,2002,10(2):47-55.
- [4] 张启先.纤维素和纤维素酶[J].微生物学通报,1976,3(2):31-34.
- [5] NINA A, MARJA I, ANUS, et al. ACE1 of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 56-65.
- [6] KOICHIROM, AKHIKOKROYHD, Synergistic effects crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans* [J]. *J Bact*, 2002, 184(18): 5088-5095.
- [7] LiX, Gao P. CM C-liquefying enzyme, a low responsible for fragmentation from *Streptomyces sp. LX* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, (83): 59-66.
- [8] Protein engineering of cellulases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, (1543): 252-293.
- [9] 阎伯旭,齐飞,张颖舒,等.纤维素酶分子结构和功能研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1999,26(3):233-237.
- [10] 李宪臻,黄云战,徐德贵,等.天然纤维素的微生物降解机理研究进展[J].食品与发酵工业,1996,(2):74-78.
- [11] Tomme P, Warren R A, Gilkes N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi [J]. *Advanced Microbiology and Physiology*, 1995, 37(1): 1-81.
- [12] Yoshitoko A, Takahisa K. New insights into cellulose degradation by cellulases and related enzymes [J]. *Trends in Glycoscience and Glycochemistry*, 2002, (14): 27-34.
- [13] 刘家建,陆怡.纤维素酶的研究及应用综述[J].林产化工通讯,1995,(1):6-10.
- [14] Knauf M, Moniruzzaman M. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass [R]. *Proceedings of Pacific Ethanol and Biodiesel Conf. Bangkok, Dec. 2, 2004.*
- [15] Bayer EA, Morag E, Lamend R. The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology [J]. *Trends Biotechnology*, 1994, (12): 379-386.
- [16] Kohring S, Wiegelt J, Mayer F. Subunit composition and glycosidic activities of the cellulose complex from *Clostridium thermocellum* JW 20 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(12): 3798-3804.
- [17] Barichevich E M, Calza R E. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(1): 43-48.
- [18] Srivastava K K, Vema P K, Srivastava R. A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulase [J]. *Biotechnology Letters*, 1999, (21): 293-297.
- [19] Kataeva I, Li X L, Chen H Z, et al. Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*, evidence for gene duplication and recombination [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(17): 5288-5295.
- [20] 胡敏,何昌义.我国秸秆生物转化燃料酒精研究现状[J].氨基酸和生物资源,2006,28(3):36-40.
- [21] 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):14-19.
- [22] Li X L, Calza R E. Fractionation of cellulases from the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(11): 3331-3336.
- [23] 涂璇,薛泉宏,司美茹,等.多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响[J].工业微生物,2004,34(1):30-35.
- [24] 戴四发,贺淹才,谢德辅.黑曲霉液体发酵分泌纤维素酶系特性的研究[J].饲料技术,2004,12(2):36-39.
- [25] 吴石金,罗锡平,夏一峰.里氏木霉产纤维素酶系各组分泌特性[J].浙江林学院学报,2003,20(2):146-150.

《酿酒科技》全国中文核心期刊