

耐热纤维素酶的研究进展

彭静静 (泰山学院生物与酿酒工程学院, 山东泰安 271021)

摘要 纤维素酶是糖苷水解酶的一种, 它可以将纤维素物质水解成简单糖, 通过菌株发酵得到乙醇, 可以解决农业、再生能源以及环境污染等问题。由于普通纤维素酶的低效率及高成本, 很难将其大规模工业化应用。耐热纤维素酶由于其耐热性、高效率而成为现在纤维素酶研究的热点。从耐热纤维素酶的来源、耐热机制、提高纤维素酶耐热性的方法以及现在工业化应用情况等方面进行了讨论, 并对耐热纤维素酶进一步的研究、发展潜力进行了展望。

关键词 耐热纤维素酶; 耐热机制; 酶的来源; 提高耐热性; 工业应用

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)01-00336-03

纤维素是自然界中分布最广和含量最多的一种结构多糖。植物每年通过光合作用能产生大量的纤维素类物质, 各种植物残体中都含有大量的纤维素, 目前大部分用于燃烧或者废弃, 不但污染环境而且造成了很大的资源浪费。而与之相矛盾的却是人类所面临的能源问题越来越严重, 因此纤维素的开发与转化在这种情况下应运而生。而纤维素物质可水解成单糖进而发酵生成乙醇、氢气等可再生资源。纤维素酶作为纤维素降解与转化的关键, 得到了人们的关注。耐热性纤维素酶因其耐热特性而具有减少杂菌的污染、加快反应速度、简化生产过程等优点, 人们对耐热纤维素酶的各个方面进行了广泛深入的研究, 且一直致力于开发应用, 成为如今纤维素资源转化、降解纤维素的重点内容^[1]。

1 耐热纤维素酶的开发潜力

耐热性纤维素酶因其耐热性在生产中具有实用价值, 可简化生产过程, 减少杂菌的污染, 高温下可加快降解速度, 减少生产成本等^[1-2], 目前对其的应用已初具规模。随着经济的发展, 纤维素酶必将在食品、饲料、环境保护、工业生产等方面挖掘出更大的潜力。目前人们更加关注的是耐热纤维素酶在纤维素转化为乙醇方面的开发, 因为人类急需达到可再生资源乙醇代替石油这一愿望。木质纤维的降解利用过程中, 结晶态纤维素的水解是主要瓶颈。纤维素酶的研究在国内外已经有大量的成果积累。纤维素发酵获得生物乙醇的研究受到了世界各国政府和研究机构的一直以来的高度关注, 有着无可比拟的市场和工业潜力。

2 耐热纤维素酶的工业化应用现状

2.1 食品发酵工业 食品发酵工业是耐热纤维素酶现阶段应用最广泛的一个领域^[3]。在进行酒精发酵时添加适合的耐热纤维素酶可显著提高酒精的出酒率及原料的利用率, 源自于纤维素酶的 β -1,3和 β -1,4能帮助大麦发芽, 缩短发酵时间, 而且酒的口感醇香^[4]。在淀粉制造时, 加入的纤维素酶可起到协同作用, 缩短生产时间, 增加产率; 用大豆生产蛋白质时加入纤维素酶, 因消化细胞壁可促使脱去豆衣, 加快浸泡效率, 增加蛋白质的得率; 在果汁加工和橄榄油的提取

中, 可促进汁液的获得和澄清; 在罐头生产中加入纤维素酶可提高透明度, 且风味好; 在酱油的酿造中, 纤维素酶可促进大豆的细胞壁水解、细胞膜膨胀软化, 使包藏在细胞中的蛋白质等营养物质释放, 明显提高了酱油质量、缩短了生产周期^[5]。诸如此类的优点使耐热纤维素酶的应用早已扩展到医药、日用化工、烟草、废水处理等行业。

2.2 原料生产中的应用 农副产品和城市废料中的纤维素, 通过纤维素酶转化为葡萄糖和单细胞蛋白, 对人类有着很大的利用价值。耐热纤维素酶在罐头生产、茶叶加工、海藻中提取琼脂中作为原料加入, 明显提高了产品的品质^[6]。

2.3 饲料工业 制备低纤维饲料时, 耐热纤维素酶能转化粗饲料如麦秸、残木、麦糠、稻草、玉米芯等, 把其中一部分粗纤维素转化为单体糖、小分子蛋白、低脂肪等, 降低饲料中粗纤维含量, 把大分子降解为更易消化的小分子物质; 其次, 在制取饲料酶制剂、植物纤维原料降解中的作用也不容忽视。

2.4 其他用途 纤维素酶最成功、量最大的应用是在工业(首属纺织业)上, 诸如牛仔布的水洗整理(抛光处理)应用当属典型。在医药方面, 纤维素酶与淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶有一样的功效, 可作为消化剂使用(因人类每天有大量的纤维素摄入), 有报道称某些发达国家已有含纤维素酶的消化剂出售。在遗传工程方面, 纤维素酶可用来去除植物、微生物的细胞壁, 进行不同物种间细胞融合以达到农作物、微生物杂交育种的目的, 解决了远源杂交不亲和的难题。在环保方面, 纤维素酶可加速日常生活产生的污物降解, 或把纤维素酶添加入清洗剂(如餐洗净、洗衣粉)中, 亦可增加清洗剂的效果。在造纸业方面, 用耐热纤维素酶处理热纸浆, 进行毛边处理, 可提高纸的品质。其他很多方面的应用还有很多, 不再一一列举。

3 耐热纤维素酶的研究现状

3.1 耐热纤维素酶的产生菌 至今, 研究者们对耐高温纤维素酶产生菌进行了广泛研究, 实验用菌大多来源于研究者的自然筛选, 如从温泉、活火山口附近。或者经过人工选择, 将自然突变的耐高温菌从自然界中选择出来。人们对耐高温纤维素酶产生菌进行了广泛研究, 纯化的耐热纤维素酶的微生物有: 多节闪烁杆菌(*Fervidobacterium nodosum*)^[7], 克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)^[8], 极端嗜热球古菌(*Pyrococcus horikoshii*)^[9], 解纤维热酸菌(*Acidothermus cellulolyti-*

基金项目 泰安市科技发展计划(201340629); 泰山学院博士科研启动金项目(Y-01-2013001)。

作者简介 彭静静(1983-), 女, 山东泰安人, 讲师, 博士, 从事微生物基因工程和代谢工程研究, E-mail: zjingjing1983@163.com。

收稿日期 2013-12-03

cus)^[10], 热纤维素梭菌 (*Clostridium thermocellum*)^[11], 海洋嗜热盐菌 (*Rhodothermus marinus*)^[12], 酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)^[13], 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[14], 海栖热袍菌 (*Thermotoga maritime*)^[15], 新阿波罗栖热袍菌 (*Thermotoga neapolitana*)^[16], 强烈炽热球菌 (*Pyrococcus furiosus*)^[17], 嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)^[18], 超嗜热菌 (*Aquifex aeolicus*)^[19] 等。

3.2 耐热纤维素酶的特性 不同的酶各有其不同的生理结构和酶活性、条件,即使是同一种酶在不同的条件下也可能有不同的特性,至今被研究者们研究的酶很多,如极端嗜热古菌产生的纤维素酶对 CMC 底物有活性,105 °C 和 3.0 分别是其最适反应温度和 pH。云南师范大学的课题组曾在 2009 年从云南大马尖山土壤中筛选到一株耐热纤维素酶产生菌 D-9,该菌适合在 pH 6.0、70 °C 的条件下发酵,产生的纤维素酶最适反应温度和 pH 分别为 70 °C 和 6.0,在 65 °C 保温 1.1 h 后残余酶活力为 96%。来源枯草杆菌的纤维素酶在 75 °C 条件下保温 30 min 残存的酶活性还可以达到 70%。从隐球酵母中纯化的胞外纤维素酶主要是对 CMC 底物的水解作用,对不溶性底物如结晶纤维素的降解能力低于对 CMC 底物的降解。常州工学院的贺芸从高温堆肥中分离得到一株嗜热脂肪芽孢杆菌,它能产生胞外纤维素酶,酶的最适反应温度和 pH 分别是 66 °C 和 7.0;而云南大学微生物研究所课题组同样从西双版纳温泉水样中分离到了嗜热脂肪芽孢杆菌的 CC22 菌株产生的酶最适反应温度和 pH 分别是 75 °C 和 7.2。来源嗜热菌 (*Pyrococcus horikoshii*) 的内切葡聚糖酶具有很强的水解结晶纤维素的能力^[1]。表 1 列举了部分微生物来源的耐热纤维素酶特性。

表 1 耐热纤维素酶特性

纤维素酶	来源	最适温度/°C	分子量/kDa
CelG	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	65	56.2
CelDR	<i>Bacillus subtilis</i>	50	55.0
CelA	<i>Thermotoga maritime</i>	90	30.0
CelA	<i>Thermotoga neapolitana</i>	95	29.0
CelB	<i>Thermotoga neapolitana</i>	106	30.0
EglA	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	35.9
内切葡聚糖酶	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	70~80	34.0
Cel8Y	<i>Aquifex aeolicus</i>	80	36.7

3.3 环境因素对嗜热酶热稳定性的影响 大多数耐热纤维素酶有其固有的热稳定性,而一些产耐热纤维素酶菌胞内酶则通过细胞内环境(盐离子浓度、底物、分子伴侣、压力、辅酶)来提高酶的耐热性。①离子影响。与其他离子相比,钾离子、钙离子、硫酸根离子、铵根离子、磷酸氢根离子通过影响水分子作用,和相邻残基形成离子键、配位键起到类似二硫键的桥接作用,从而稳定酶分子的三维结构。其中钙离子的总用是最明显的,也是研究最多的:在钙离子存在的条件下,几乎一半以上的碱性蛋白酶能在 65 °C 的条件下维持 15 min。耐高温中性蛋白酶的热稳定性更加依赖于钙离子。有

位学者曾经的研究:从云南西双版纳分离筛选的菌号为 HY-69 的耐热菌株产生的含钙蛋白酶特别耐热,最适活性温度为 87 °C,且 81 °C 保温 3.1 h 仍保持 64% 的活性。如用透析法完全除去该酶中的钙离子,81 °C 保温 11 min 就完全丧失活性。②底物分子总用。某些底物分子也可以通过稳定酶分子的活性位点来使其适应高温环境。③分子伴侣。当环境温度接近胞内酶的变性温度时,分子伴侣通过重新折叠来保护耐热纤维素酶的活性。④此外,应用超高压(50 MPa 以上)也可使酶结构紧凑,疏水作用更稳定;辅酶和某些热稳定因子(甘油、乙二醇、环多磷酸盐等)也是不可缺少的因素。热稳定因子的作用很大,最常见的如甘油、蔗糖及乙二醇溶液。不同的纤维素酶耐热机制不同,存在明显的复杂性,对某一特定的酶而言,不同的耐热机制所起的作用也不同,有的耐热机制单一,有的则是几种因素共同作用的结果。这些因素也为增加纤维素酶的耐热性提供了参考。

3.4 耐热纤维素酶酶活测定方法

3.4.1 传统纤维素酶测定方法。纤维素酶是由多种酶组成的,因各自的底物专一性及降解产物不同,故检测方法也是视具体情况而定。大多数时候,应用较多的是测定纤维素酶系总的糖化能力,如挑选某高产菌株,此菌株能产生纤维素酶系,完全有能力独自彻底降解纤维素。可以利用的方法有滤纸酶活测定方法、荧光法。原理都是测定纤维素降解生成的小分子糖的量来表征活性。在科学试验中,研究者们只会专门研究有一种酶活性的纤维素酶,故其酶活测定方法也是特定的方法,如发展起来的内切葡萄糖苷酶测定方法有羧甲基纤维素-Na 并结合 DNS 法显色,测定还原糖的量来表征酶活。再如外切葡萄糖苷酶活的测定用的较多的是微晶纤维素酶活测定方法和棉花糖化法,也要结合 DNS 显色法。而葡萄糖苷酶活测定却是以水杨苷作底物,用 4-氨基安替比林显色,结合分光光度法测定,也可用荧光法(利用荧光物质与降解底物结合后在测荧光度)。当然还有其他的方法,但都是利用化学反应而进行间接的估量,误差是绝对的,还有待更先进的、直接、方便的方法研发出来^[20]。

3.4.2 传感器检测方法。生物传感器是综合了生命科学、信息科学、电子技术的交叉学科,生物传感器诞生于 1962 年,全面展开是在 20 世纪 80 年代。30 多年来,生物传感器的类型与应用也越来越多,压电生物传感器(piezoelectric biosensors)是个典型。它主要是利用压电石英谐振器对质量的敏感性,通过监测谐振器吸附待测物后频率的变化来检测待测物。其次,电化学酶传感器也应用较多,主要由 2 部分组成:固定化酶膜和电极。固定化酶膜可以选择性“识别”被检测的物质,并且催化被“识别”出的物质发生化学反应,电极则把这一催化反应中底物或产物的变量转换成电信号,进而通过仪表显示出来。传感器方便、快捷,但技术很不成熟,仍需继续研发。

4 小结与展望

纤维素酶具有非常广泛的应用前景,纤维素酶不但在食品、发酵、纺织、饲料等工业方面有很大的应用潜力,还可应

用于造纸、医药保健、石油开采、新型能源、环保以及用于洗涤剂等行业,耐热纤维素酶由于其无可比拟的优势更受到人们的关注。目前只有少数发达国家拥有纤维素酶的生产及应用技术,产品的垄断造成市场价格居高不下。国内生产厂家少、生产规模小,应用技术尚需进一步攻关,产品供应以进口为主,供需矛盾较大。通过传统的筛选人工突变或自然突变的耐热纤维素酶产生菌和基因工程技术改造基因可以较大幅度地提高纤维素酶的耐热性,还可以通过发酵条件的优化和发酵过程工艺,如采用固体发酵来增加纤维素酶高温下的稳定性。这些方法虽取得了一定成效,但仍达不到工业要求。彻底地解决问题还需深入研究纤维素酶的结构与功能发挥的关系以及作用方式,进而对其进行有效改造,从根源上解决问题;或者通过筛选新的产极高温纤维素酶菌种,发现具有开发潜力的新酶源,因其天然性稳定性会更高。总之,纤维素酶是目前多糖水解酶类中少数几个尚有大量亟待解决问题的酶,却是有着无可比拟的市场和工业潜力的酶。下一步的重点会在分子水平上进一步阐明纤维素酶的结构与功能,研究耐热纤维素酶的基因表达与调控的关系;针对不同工业需要研制各自适用的耐热纤维素酶;扩大现有耐热纤维素酶的耐热限度。同时,加大科学研究成果的实际应用也是必不可少的。

参考文献

- [1] 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.
- [2] DEMAIN A L,NEWCOMB M,WU J H D. Cellulase,Clostridia,and Ethanol[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2005,69:124-154.
- [3] 王顺民. 嗜热酶的研究及其在食品等相关工业的应用[J]. 山西食品工业,2004,13(3):2-4.
- [4] 谷海先,李迅. 耐热纤维素酶的研究及在酒精生产中的应用[J]. 酿酒,1998,12(6):16-19.
- [5] 张智,刘复军. 纤维素酶在酱油酿造上的应用研究[J]. 中国调味品,1997,8(9):15-19.
- [6] WONG K Y,TAN U L,SADDLER J N,et al. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications [J]. Microbiol Rev,1988,52(7):305-317.
- [7] ZHENG B S,YANG W,WANG Y G,et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic cellulase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun,2009,65:219-222.
- [8] HONG J,WANG Y,KUMAGAI H,et al. Construction of thermotolerant

- yeast expressing thermostable cellulase genes[J]. J Biotechnol,2007,130:114-123.
- [9] KANG H J,UEGAKI K,FUKADA H,et al. Improvement of the enzymatic activity of the hyperthermophilic cellulase from *Pyrococcus horikoshii*[J]. Extremophiles,2007,11:251-256.
- [10] JIN RG,RICHTER S,ZHONG R,et al. Expression and import of an active cellulase from a thermophilic bacterium into the chloroplast both in vitro and in vivo[J]. Plant Molecular Biology,2003,51:493-507.
- [11] ABDEEV R M,GOLDENKOVA I V,MUSIYCHUK K A,et al. Exploring the properties of thermostable *Clostridium thermocellum* cellulase CelE for the purpose of its expression in plants[J]. Biochemistry (Moscow),2001,66:808-813.
- [12] CRENNELL S J,HREGGVIDSSON G O,KARLSSON E N. The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 angstrom resolution[J]. J Mol Biol,2002,320:883-897.
- [13] MORANA A,ESPOSITO A,MAURELLI L,et al. A novel thermoacidophilic cellulase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*[J]. Protein and Peptide Letters,2008,15:1017-1021.
- [14] LI W,ZHANG W W,YANG M M,et al. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*[J]. Molecular Biotechnology,2008,40:195-201.
- [15] LIEBL W. Cellulolytic enzymes from *Thermotoga* species [J]. Methods Enzymol,2001,330:290-300.
- [16] BOK J D,YERNOOL D A,EVELEIGH D E. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*[J]. Appl Envir Microbiol,1998,64:4774-4781.
- [17] BAUER M W,DRISKILL L E,CALLEN W,et al. An endoglucanase, Eg1A, from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* hydrolyzes β -1,4 bonds in mixed-Linkage (1-3),(1-4)- β -D-Glucans and Cellulose [J]. J Bacteriol,1999,181:284-290.
- [18] PARRY N J,BEEVER D E,OWEN E,et al. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermosacus aurantiacus*[J]. Arch Biochem Biophys,2002,404:243-253.
- [19] KIM J O,PARK S R,LIM W J,et al. Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2000,279:420-426.
- [20] 高培基. 纤维素酶活力测定方法研究进展[J]. 工业微生物,1985,6(5):5-8.
- [21] 肖浚,李俊,谢伟国,等. 不同条件对木霉生长和纤维素酶酶活的影响[J]. 湖南农业科学,2013(3):19-21,25.
- [22] QÜ E J,XIE Z,MA M X,et al. Screening for a novel *Trichoderma vridae* strain highly producing *Cellulase* via ultraviolet mutagenesis[J]. Agricultural Science & Technology,2011,12(10):1410-1412,1416.
- [23] 杨丽娜,杨明明,龚月生. 产耐热性纤维素酶菌株的分离·鉴定及其酶学性质研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(14):8103-8105.

(上接第192页)

(2)规范二噁英监测市场,确保监测质量。我国应尽快划定二噁英监测的准入门槛,明确二噁英实验室运行的软硬件条件,并对市场上的各种监测机构的监测资质和能力进行严格的审查和筛选,杜绝市场不良行为对监测结果的影响。

(3)对国家级二噁英试验室运行经费予以统筹规划。为保证国家环境二噁英监测中心的正常运行,国家应持续统一划拨7家分中心运行经费,在确保实验室工作正常开展的同时,保证数据的准确性和可靠性,从而为我国的二噁英防治工作提供坚实可靠的科学依据。

参考文献

- [1] 环境保护部. 环发[2010]123号关于加强二噁英污染防治的指导意见[Z]. 2010.
- [2] 吕亚辉,黄俊,余刚,等. 中国二噁英排放清单的国际比较研究[J]. 环境污染与防治,2008,30(6):71-74.
- [3] 刘静,汤乃军. 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英所致皮肤损害的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006(4):250-252.
- [4] 李国刚. 空气和土壤中持久性有机污染物监测分析方法[M]. 北京:中国环境出版社,2008:78-126.
- [5] 赵淑莉,谭培功. 空气中有机物的监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2005:75-76.
- [6] 李莎莎,李翠枝. 二噁英污染事件初步文献调查[J]. 畜牧与饲料科学,2011,32(4):23-28.