

文章编号:1001-5132(2007)01-0078-05

纤维素酶降解纤维素机理的研究进展

余兴莲, 王 丽, 徐伟民

(宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 综述了近年来纤维素酶降解纤维素机理的研究, 新的理论认为纤维素难以被降解的主要原因可能是忽略了纤维素酶的超分子结构. 概述了温度、pH 值、酶促反应时间、抑制剂及激活剂等因素对纤维素酶降解纤维素效率影响的研究状况, 提出了纤维素酶降解纤维素中存在的问题, 并指出了未来研究的方向.

关键词: 纤维素; 纤维素酶; 降解机理

中图分类号: Q556⁺²; Q539⁺³ **文献标识码:** A

纤维素是地球上最丰富的多糖化合物, 广泛存在于如树杆等植物中, 有资料表明, 全世界每年生产纤维素及半纤维素的总量为 850 亿吨^[1]. 但大部分还是以焚烧的形式被处理掉, 这不仅造成大量资源的浪费还造成环境污染. 近几年来, 随着人口增长、粮食短缺、石油危机等的出现, 将纤维素水解为小分子单糖, 单糖再通过微生物发酵生产各种有用的产品显得尤为重要.

纤维素生产乙醇及其他化工产品的关键是把纤维素水解为葡萄糖, 即纤维素的糖化过程. 目前, 对纤维素的糖化过程研究较多的是酸水解法、酶水解法^[2-5]. 酸水解法中, 稀酸水解所得糖化率低, 高浓度强酸可有效水解纤维素, 但其腐蚀性对人体有害, 且所需工艺条件苛刻. 而用纤维素酶来水解纤维素, 在常温、常压条件下就可以. 因此, 用纤维素酶降解纤维素是目前纤维素利用研究中的热点. 但是由于天然纤维素的结晶状、不溶性的刚性结构, 以及纤维素酶对纤维素的降解机制研究

尚不清楚, 使得目前纤维素酶对天然纤维素降解效率较低, 从而使纤维素酶降解纤维素的工业化应用无法实现规模化. 因此, 进一步了解纤维素酶降解纤维素的机理有助于提高纤维素的酶解效率, 是更加有效地利用纤维素资源的重要途径.

1 纤维素酶降解纤维素的作用机理

1.1 纤维素的分子结构

纤维素(Cellulose)是由D-吡喃型葡萄糖基经 β -1,4糖苷键联结而成的直链多糖^[6,7]. 直链状大分子纤维素折迭起来, 形成具有高结晶的基本构成单位, 由这种基本构成单位集中起来构成微小的结构单位, 再由很多的微小单位构成纤维素^[8].

纤维素分子量为 $1.5 \times 10^6 \sim 1.84 \times 10^6$, 相当于 11 300 个葡萄糖残基, 这些纤维素分子以氢键构成平行的微晶束, 约 60 个为 1 束^[1]. 20 世纪 40 年代 Hermans 提出了纤维素的弯曲模型^[9], 如图 1 所示.

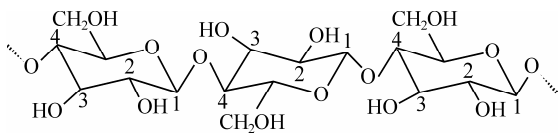


图 1 Hermans 式纤维素的椅式结构

1.2 纤维素酶的组成及分子结构

纤维素酶是将纤维素水解成纤维二糖和葡萄糖的一组复杂酶系的总称, 又称纤维素酶系^[10,11].

纤维素酶系根据其中各酶功能的差异, 主要被分为 3 大类: 内切葡聚糖酶(1,4-β-D-glucan glucohydrolase 或 endo-1,4-β-D-glucanase, E. C. 3. 2. 1. 4, 来自真菌简称 EG); 外切葡聚糖酶(1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase 或 exo-1,4-β-D-glucanase, E. C. 3. 2. 1. 91, 来自真菌简称 CBH; 来自细菌简称 Cex). β-葡萄糖苷酶(β-1,4-glucosidase, E. C. 3. 2. 1. 21, 简称 BG).

Tilbeugh 等人^[12]对纤维素酶拆分研究发现, 降解纤维素的纤维素酶是由约 56 kD 球状的催化(水解)活力的核心蛋白催化区域(CD 或 CP)、连接区(linker)和没有催化作用但具有纤维素吸附能力的纤维素结合区域(CBD) 3 部分组成. 后经许多研究证实, T. reesei 酶的外切葡聚糖酶 CBH II、内切葡聚糖酶 EG I, EG II 和粪类碱纤维单孢菌、热纤维梭菌的多个纤维素酶分子也具有类似的结构, 即一个催化活性的头部(CD)和楔形的尾部(CBD)组成的蝌蚪状分子. 如图 2 所示.

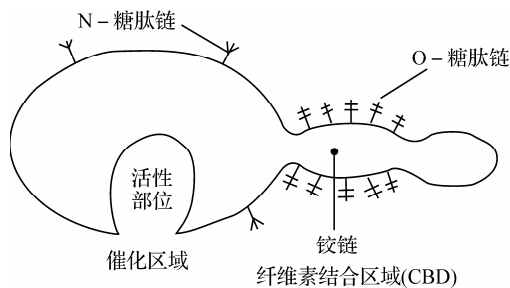


图 2 酶的蝌蚪状分子模型^[13]

1.3 纤维素酶降解纤维素的机理

天然纤维素酶解过程可分 3 个阶段. 首先是纤维素对纤维素酶的可接触性; 其次是纤维素酶的被吸附与扩散过程; 最后是由 CBH-CMCase 和 βGase 自组织复合体(C₁)协同作用降解纤维素的结晶区,

同时由 CBH-CMCase 和 βGase 随机作用纤维素的无定形区. 1950 年, Reese 等人^[13]阐明没有一种纤维素酶生产菌能生产出分解棉花中的天然纤维素的酶, 但发现有的菌株生产的酶能分解膨润的纤维素或纤维素诱导体等非晶性纤维素, 因而提出了由于天然纤维素的特异性而必须以不同的酶协同作用才能分解的 C₁-C_x 假说. 这个假说认为: 当纤维素酶作用时, C₁ 酶(内切葡聚糖酶)首先作用于纤维素结晶区, 使其转变成可被 C_x 酶(外切葡聚糖酶)作用的非结晶形式, C_x 酶随机水解非结晶纤维素, 然后 β-1,4 葡萄糖苷酶将纤维二糖水解开成葡萄糖, 如图 3 所示.

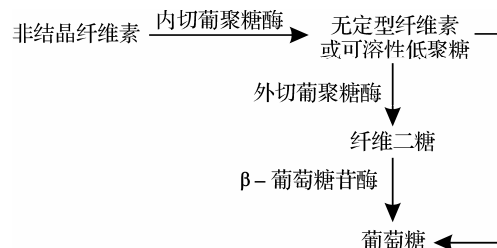


图 3 C₁-C_x 假说的酶解机理^[14]

但 Wood^[14]在研究木霉(Trichoderma reesei)、青霉(Penicillium funiculosum)的纤维素酶水解纤维素时, 发现培养液中 2 种外切酶在液化微晶纤维素和棉纤维时具有协同作用. Thonart^[15]也发现 2 种外切酶(CHI I 和 CBH II)具有协同作用. Kanda 等人^[16]还发现了只是对可溶性纤维素进攻方式不同的 2 种内切葡聚糖酶在结晶纤维素的水解过程中也具有协同作用. 目前认为纤维素酶水解纤维素的协同作用为: EG(C)酶随机水解切断无定形区的纤维素分子链, 使结晶纤维素出现更多的纤维素分子端基, 为 CBH(C_x)酶水解纤维素创造了条件. CBH 酶与 EG 酶再共同作用得水解产物纤维二糖, 由 BG 酶水解成葡萄糖. 因而纤维素酶水解结晶纤维素的过程可以简单表示为: EG→CBH→BG, 如图 4 所示. 这种协同作用顺序与传统的 C₁-C_x 假说相类似, 都说明了纤维素的降解是纤维素酶的 3 种成分共同作用的结果^[17].

现在更新的理论认为, 天然纤维素首先在一种

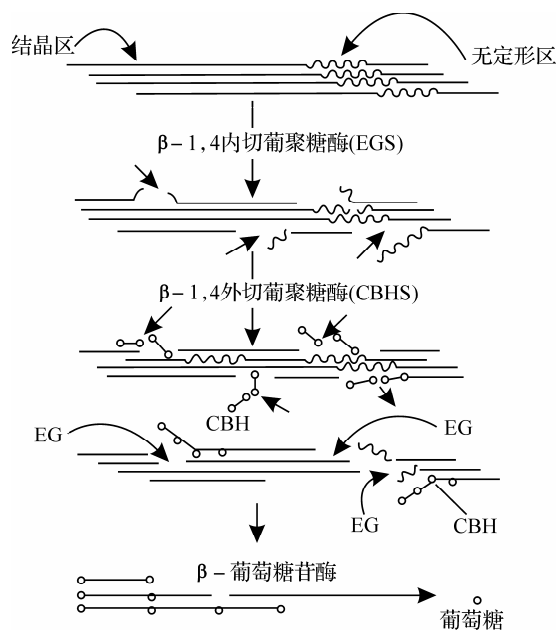


图4 纤维素酶各组分的协同作用

非水解性质的解链因子或解氢键酶作用下,使纤维素链间和链内氢键打开,形成无序的非结晶纤维素,然后在3种酶的协同作用下水解为纤维糊精和葡萄糖^[18,19]。

虽然目前对纤维素酶作用结晶纤维素的机理已经有了比较一致的认识,但新的现象不断被发现。如方靖等人^[20]在实验中发现裂褶菌纤维二糖脱氢酶(CDH)在降解棉花纤维素时与纤维二糖水解酶或内切纤维素酶没有表现出协同效应,但若棉花事先在纤维二糖存在下用CDH预处理,则变得易于被水解,水解效率提高。但至今人们还没有完全搞清楚它的真正的生物学功能。由于纤维素酶的复杂组分,其作用的机理有何不同,至今仍不清楚。高培基^[19]在研究中又提出了新的观点,认为结晶纤维素难以被降解的主要原因可能是忽略了纤维素酶的超分子结构,即聚集态结构对降解的影响,但具体的影响机理尚不清楚。纤维素酶的CBD在催化水解纤维素过程中的具体功能还不是特别清楚,Helena Azevedo^[21]认为CBD并不是纤维素酶活性部位的结合位置,若去除纤维素酶的CBD纤维素酶仍然表现出催化活性。因此,目前对纤维素酶的降

解机理还需深入研究。

2 影响纤维素酶降解纤维素效率的因素

2.1 温度

温度是影响纤维素酶解的重要因素,用DNS法测定纤维素酶活时,发现不同的厂家和单位采用的酶促反应温度差别很大,如有的采用50℃,有的采用45℃,还有的采用40℃。王林等人^[22]在利用河南省生物工程中心提供的木霉纤维素酶样品实验中,纤维素酶活随温度变化情况是当温度大于58℃时相对酶活不再升高。多数研究表明纤维素酶作用底物的最适温度在45~65℃之间^[23-24]。

2.2 pH值及酶促反应时间

大部分纤维素酶的活性受pH值的影响较大。在最适pH值下,酶反应具有最大速度。不同种类的纤维素酶及同类纤维素酶的不同亚组分对应的最适pH也不一样。一般认为纤维素酶的最适pH值在4.0~5.5之间。

酶促反应时间过长或过短都不能准确反映样品的酶活力大小。较多资料表明:能较准确地反映酶的活力大小的酶促反应时间、显色时间在用DNS法测定酶活时以酶促反应时间30min、显色时间5min为宜^[22-25]。

2.3 抑制剂及激活剂

纤维素酶可由酶促反应的产物和类似底物的某些物质引起竞争性抑制,比如纤维二糖、葡萄糖和甲基纤维素通常是纤维素酶的竞争性抑制剂;植物体内的某些酚、单宁和花色素也是其天然的抑制剂;卤化物、重金属、去垢剂和染料等也能使其失活。其中在酶解过程中产生的纤维二糖和葡萄糖是抑制剂、使得酶解效率不高的主要因素,为了消除这种反馈抑制,国内外展开了大量研究,提出了在培养物中添加诱导物激活剂,如槐糖、乳糖、龙胆二糖、醋酸酯及一些表面活性剂等。另外,加金

属离子也是一种研究较多且普遍使用的提高酶活力起激活剂作用的新方法。

在Chunzhi Zhang 等^[26]的研究中,阐述了Cu²⁺等对纤维素酶起抑制作用,Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺对纤维素酶的活性影响不大;Crispen^[27]的研究也表明:Co²⁺对酶有激活作用。赵玉蓉等^[28]在金属离子对纤维素酶及木聚糖酶活性影响的研究中也表明Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺等离子对纤维素酶活性起激活作用,而Cu²⁺起抑制作用。在张丽萍等^[29]的研究中也认为Cu²⁺、Mn²⁺、Co²⁺等离子在一定浓度范围内对绿色木霉所产纤维素酶活力有激活作用,Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺则有抑制作用;单谷等^[30]也阐述了金属离子在纤维素酶生产过程中,金属元素(Fe、Mn、Zn、Co等)与纤维素酶的活力密切相关,可作为酶的活性基成分,也可作为酶的激活剂。徐伟民等^[31]的最新研究中表明:稀土离子La³⁺、Nd³⁺在浓度为10⁻⁸或10⁻⁹g·L⁻¹时对纤维素酶水解滤纸、羧甲基纤维素钠、纤维二糖的活性均有最大的激活作用。

提高纤维素酶降解纤维素效率的研究主要包括:(1)通过筛选产酶菌种和培养条件,寻找高活性纤维素酶;(2)采用各种方法处理纤维素,使其更易于分解,如:物理法(爆破法、机械法)、化学法(酸或碱处理法)、生物法等^[32];(3)筛选酶解工艺条件:温度、pH值,酶促反应时间,激活剂等。

3 结论

对纤维素酶降解纤维素的研究已有很多报道,但由于纤维素的结晶状、不溶性的刚性结构使纤维素的酶解效率较低,致使纤维素酶解生成葡萄糖的利用成本高,难于实现规模产业化。因此,进一步探索提高纤维素酶活性,以及深入研究纤维素酶降解纤维素的作用机理,以提高纤维素酶降解纤维素的效率是有效利用廉价、丰富、无毒的纤维素来弥补资源的不足迫在眉睫的事情。

参考文献:

- [1] 汪维云,朱金华,吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3):20-26.
- [2] 刘远洋,申德超,徐冲. 关于纤维素原料生产燃料酒精预处理工艺的一些探讨[J]. 酿酒, 2005, 532(3):41-42.
- [3] 苏茂尧,张力田. 纤维素的酶水解糖化[J]. 纤维素科学与技术, 1995, 3(1):11-15.
- [4] 方颖虎. 影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 2000, 16(1):31-35.
- [5] 王超,章超桦. 酶解纤维素类物质生产燃料酒精的研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2003, 11(4):52-59.
- [6] J C小阿瑟. 纤维素化学与工艺学[M]. 北京:轻工业出版社, 1983.
- [7] 张力田. 碳水化合物化学[M]. 北京:轻工业出版社, 1988.
- [8] 高洁,汤烈贵. 纤维素科学[M]. 北京:科学出版社, 1996.
- [9] Hermans P H. The hydrates of cellulose[J]. Journal of Colloid Science, 1946, 1(2):185-193.
- [10] Coughlan M P, Ljungdahl L G. In biochemistry and genetics of cellulose degradation[M]. London: Academic Press, 1988.
- [11] Manning K, Wood D A. Production and regulation of extracellular endocellulase by *Agaricus bisporus*[J]. Microbiol, 1983, 129(6):1 839-1 847.
- [12] Tilbeugh H V, Tomme P, Claeysens M, et al. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase from *T. reesei*[J]. FEBS Lett, 1986, 204(2):223-227.
- [13] Reese E T. Enzymatic hydrolysis of the walls of yeasts cells and germinated fungal spores[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1977, 499(1):10-23.
- [14] Wood T M. Breakdown of crystalline cellulose by synergistic action between cellulase components from *Clostridium thermocellum* and *Trichoderma koningii*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1988, 50(2/3):247-252.
- [15] Thonart P, Paquot M, Mottet A. Hydrolysis of paper pulps: influence of mechanical treatments[J]. Holzforschung, 1979, 33(6):197-202.
- [16] Kanda T, Michihiko O, Nobu A, et al. Hexokinase of *Angiostrongylus cantonensis*: presence of a glucokinase [J]. Biochemistry and Molecular Biology, 1979, 63(3): 335-340.

- [17] 周文龙. 酶在纺织中的应用[M]. 北京: 中国纺织工业出版社, 2002.
- [18] Sianott M L. The cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei*: a review of indirect and direct evidence that their function is not just gly-cosidic bond hydrolysis[J]. *Biochemical Society Transaction*, 1998, 26:160-164.
- [19] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. *自然科学进展*, 2003, 13(1):21-29.
- [20] 方靖, 高培基. 纤维二糖脱氧氢酶在纤维素降解中的作用研究[J]. *微生物学通报*, 2000, 26(1):15-19.
- [21] Helena Azevedo, David Bishop, Artur C, et al. Effects of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*)[J]. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, 5(27):325-329.
- [22] 王琳, 刘国生, 王林嵩, 等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. *河南师范大学学报*, 1998, 26(3):66-69.
- [23] 周建, 罗学刚, 苏林. 纤维素酶法水解的研究现状及展望[J]. *化工科技*, 2006, 14(2):51-56.
- [24] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [25] 夏服宝, 邱雁临, 孙宪迅. 纤维素酶活力测定条件研究[J]. *酶技术*, 2005, 26(16):23-26.
- [26] Chunzhi Zhang, Dai Li, Hongshan Yu, et al. Purification and characterization of piceid-b-D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Process Biochemistry*, 2006(7):83-88.
- [27] Crispin Mawadza, Rajni Hatti Kual, Remigiv Zvamy, et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83(3):177-187.
- [28] 赵玉蓉, 金宏, 陈清华, 等. 金属离子对纤维素酶及木聚糖酶活性影响的研究[J]. *饲料博览*, 2005(1):1-3.
- [29] 张丽萍, 董超, 王迎春, 等. 几种离子对纤维素酶活力的影响[J]. *河北省科学院学报*, 2000, 17(4):235-238.
- [30] 单谷, 罗康, 于世袁. 金属离子在纤维素酶生产过程中的影响[J]. *林产化学与工业*, 1999, 18(3):59-63.
- [31] 徐伟民, 王丽, 王律峰, 等. 镧、钕柠檬酸配合物对纤维素酶活性的影响及机制的探讨[J]. *中国稀土学报*, 2006, 6(3):1-5.
- [32] 陈洪章, 李佐虎. 影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究[J]. *化学反应工程与工艺*, 2000, 16(1):30-35.

Progress in the Studies of Cellulose Degradation by Cellulase

YU Xing-lian, WANG Li, XU Wei-min

(Faculty of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this paper, recent research progress on the mechanism of cellulose degradation by cellulase is studied. The new theory points out that overlooking of cellulose's sup-molecular structure may be the main reason for difficulties in degrading cellulose. The paper briefly describes the research progress on the factors that would influence cellulose degradation by cellulases, such as temperature, pH, time of enzyme reaction and inhibitor, activator. Also, the paper identifies the problems existing in the degradation of cellulose by cellulase and suggests its research direction for the future work.

Key words: cellulose; cellulase; degrade mechanism

CLC number: Q556⁺2; Q539⁺3 **Document code:** A

(责任编辑 史小丽)