

# 纤维素和纤维素酶

张启先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

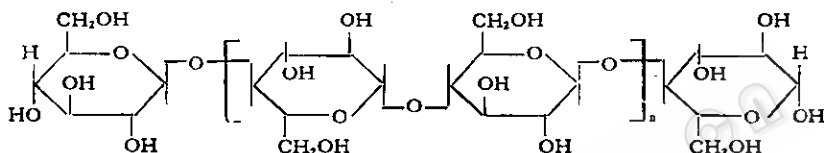
纤维素是高等植物细胞壁的主要成分, 它广泛而大量地存在于自然界。据估计世界上可利用的纤维素资源大约有 1900 亿吨, 但目前已利用的却很少, 这不仅是一个浪费, 而且往往带来公害。因此, 如何综合利用纤维素资源, 这是一个引起世界各国重视的问题。

纤维素的水解有两种途径, 一种是酸法水解, 一种是酶法水解。前者是在高温高压的条件下进行的, 需

要耐酸耐压设备, 工艺较复杂。后者是在常温常压下进行, 设备简单。对于催化这后一反应过程的催化剂——纤维素水解酶, 国内外都进行了大量的研究, 现就有关问题作一概述。

## 一、纤维素的组成和纤维素的结构

纤维素分子是由许多吡喃型的 D-葡萄糖残基以 1,4-β-甙键相联结而成的多糖。它的结构式可表示为:



它的聚合度范围非常宽, 可以从几百直到一万五千左右, 因此, 它是一个高分子化合物。

在纤维素链之间存在着氢键, 通过氢键的缔合作用, 纤维素链形成了纤维素束 (图 1)。在这个纤维素的连续结构中, 分子密度大的地方, 成平行排列, 定向良好, 形成纤维素的结晶性区域。随着致密度的变小, 结合程度变弱, 分子间空隙变大, 定向变差, 形成了纤

维素的无定形区域 (图 2)。在纤维素中, 除了纤维素链之间存在氢键外, 在分子内也存在有氢键 (图 3)。氢键是一种高能键, 这种键的存在给纤维素水解带来很大的困难。纤维素的结晶性程度对纤维素酶的敏感度有极大影响。结晶性程度低, 吸水性大, 毛细孔增大, 易被扭动, 对酶的敏感性也就大。非结晶性纤维素更容易酶解。

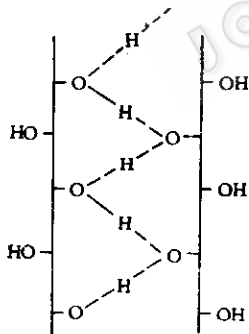


图 1 纤维素链间的氢键

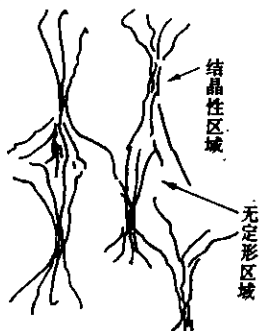


图 2 微纤维中的边缘微胶束结构

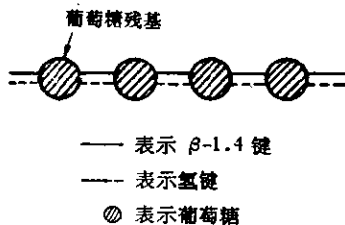


图 3 纤维素链内的键联结

## 二、纤维素酶的来源和生产

纤维素酶的来源非常广泛。真菌、细菌、放线菌等在一定条件下均能产生纤维素酶, 原生动物、软体动物、昆虫等也能产生纤维素酶。但最近报道较多的还是真菌和细菌。有人认为, 细菌产生的纤维素酶一般都存

在于胞内或者吸附在细胞壁上, 不分泌到培养液中。因此, 工业上很少采用细菌作为酶的生产菌种。目前国内外工业上所采用的菌种多半是木霉 (*Trichoderma*)、曲霉 (*Aspergillus*)、青霉 (*Penicillium*)、根霉 (*Rhizopus*), 其中绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 使用最为广泛。

一般从自然界分离筛选的野生型菌株, 所产纤维

素酶的产量和活力都较低。因此,可以在原有基础上通过各种物理化学因子处理,以获得更高活力的突变菌株。例如用高能电子处理绿色木霉可使纤维素酶活性提高几倍;用紫外线、核苷酸、钴<sup>60</sup>、高能电子交替处理木霉也可使纤维素酶活性提高2—3倍。

纤维素酶的生产和其它酶一样,可以采用下列几种方法。

### (一) 液体静止培养法

一般采用浅盘培养,或叫表面培养法。由于菌生长在液体的表面,所以设备利用率低,产量也不大。在大规模的生产中已很少采用。

### (二) 液体深层培养法

这是目前工业上广泛采用的方法。在这种培养中要采用搅拌或通气,因此控制泡沫是一个重要问题。由于不少消泡剂都在一定程度上破坏胞外酶,所以选择适宜的消泡剂是此培养法的关键之一。

### (三) 固体培养法

包括盘子培养、帘子培养、通风培养。现在生产上都采用后两种工艺。在我国大都采用通风培养来生产纤维素酶。

生产纤维素酶的培养基组成也因时因地各有不同。作为碳源,一般都用含纤维素的物质,如稻草、玉米芯、糠醛渣、甘蔗渣、纸浆、青草粉、麸皮等。氮源一般都用铵盐。也有用尿素等有机氮源的。其它无机盐类和微量元素,根据所用的碳源的类型而定。在固体曲培养时,只要不是用纯纤维素作为碳源,一般都可以不加其它无机盐类。在液体培养时,镁、钾、磷等是不可缺少的成分。

## 三、纤维素酶形成的诱导和阻遏

一般认为,纤维素酶是一种诱导酶。因此,在营养源之外添加适当的诱导剂可以促进酶的生成,从而,提高纤维素酶的产量。

据报道,在含有麸皮的基本培养基中,经培养24小时后,添加一定量的滤纸粉或纤维素粉,能诱导纤维素酶的生成,使滤纸崩解活性和糖化活性显著地提高,并能在培养后期延缓纤维素酶活性的下降。

有人认为,在用纤维素作为碳源培养真菌时,纤维素酶的真诱导剂是纤维素的可溶性水解产物,尤其是纤维二糖。但纤维二糖的作用是复杂的(见图4)。它既是纤维素酶的诱导物,又能对纤维素酶的催化起抑制作用。高浓度的(0.5%—1.0%)纤维二糖或其它易被代谢的碳源如葡萄糖、甘油等能强烈地阻遏纤维素酶的形成。在用纤维素为碳源生产纤维素酶时,若把浓度为0.5—1.0%的纤维二糖加到培养基中去,则菌

就失去产生纤维素酶的能力。如果是在培养初期添加,则在糖被消耗后,方能重新出现酶活力。这种阻遏效应是与糖代谢有关。如果采用次于最适条件时的温度、通风,或使无机盐类过量或缺乏等办法来使糖代谢缓慢,则阻遏效应将显著减弱或消失。

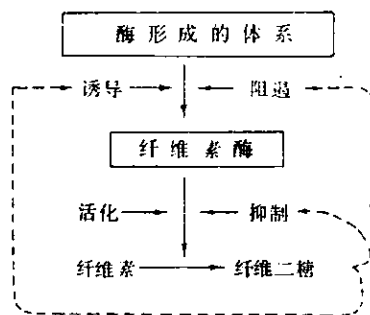


图4 纤维二糖在酶形成体系中的作用

在绿色木霉的纤维素酶形成中,槐糖是目前知道的不含 $\beta$ -1,4-糖甙键的高效诱导物。在培养物中添加 $1 \times 10^{-3}M$ 的槐糖,就能显著地诱导绿色木霉的纤维素酶形成。但是,槐糖的诱导作用又受葡萄糖、甘油、放线菌素D等物质的抑制。然而,这些物质仅仅只抑制槐糖的诱导作用,它并不像上述高浓度的纤维二糖那样,不会使体外的纤维素酶纯化。

在槐糖诱导中,槐糖加在生长前期,其诱导速度要比加在生长后期缓慢。而且,在以甘油为碳源的培养基中,如果减少甘油的量,则可以提高酶形成的量。可见,槐糖诱导取决于碳源的量。这就说明,它的诱导和代谢阻遏有密切的关系。

不过,这些诱导物只是在阐明纤维素酶诱导特性的基本研究中有价值。迄今为止,尚未见到用它来获得大量的纤维素酶的报道。在大规模生产纤维素酶时,一般都是将真菌培养在含纤维素的材料上。

## 四、纤维素酶的激活和抑制

在酶水解反应中,如何减少对酶的抑制作用,使酶充分发挥其应有的活性,这是提高酶利用率的一个重要方面。

对纤维素酶有抑制作用的大致有两种因子,一种是物理因子的抑制,一种是化学因子的抑制。在物理因子的抑制中,特别值得提起的是障碍效应(barrier effect),所谓障碍效应,就是在酶与底物之间存在有某种障碍,从而使酶的作用受到抑制。例如,在纤维素酶水解木屑时,由于木质素的存在而障碍了纤维素酶的作用。因此,采用适当的方法去除木屑中的木质素就可以加速酶解的速度。当然,由于不适当的温度以及激烈的摇动,有时也可以使酶受到抑制,甚至失活。

在化学因子的抑制方面,又分特异性抑制和非特异性抑制。所谓非特异性抑制,就是由于抑制剂的作

用,使酶蛋白发生变性而引起失活;而特异性抑制是指在酶分子起反应的某个特殊位置上,底物可能受到限制或者抑制剂和底物竞争结合位置,而导致的抑制。

竞争性抑制是高度特异性的,它往往是由于酶促反应的产物或类似底物的某种物质,通过与底物争夺酶的活性位置而引起的。这种抑制在实际生产中是经常发生的。常见的有纤维二糖、葡萄糖和甲基纤维素。纤维二糖是纤维素酶作用的产物,当酶作用于不溶性纤维素时,它是大多数纤维素酶的抑制剂。葡萄糖的抑制作用较差,有人证明,浓度为30%的葡萄糖仅仅抑制酶活力的40%。

一般常遇到的纤维素酶抑制剂有重金属离子,如 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{++}$ 、 $\text{Hg}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$ 等;大分子有机化合物,如染料、季铵盐,去垢剂等;某些氧化剂和还原剂,如卤素化合物等。

除此之外,还有一些天然产物抑制剂,如酚、单宁、花色素等。

与抑制相对应的是激活。有些物质在一定条件下是抑制剂,而条件改变时,就可能变为激活剂,例如,纤维二糖在大多数情况下是抑制剂,但在作用于羧甲基纤维素时,有7种纤维素酶被纤维二糖所激活。又如大多数羟基化合物是抑制剂,但有少数几个羟基化合物,如甘油、赤藓糖、 $\alpha$ -甲基葡萄糖甙则对纤维素酶起激活作用。

作为纤维素酶的激活剂还有 $\text{NaF}$ 、 $\text{NH}_4\text{OH}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、中性盐类、土温80等。

## 五、纤维素酶的作用方式

普遍认为,纤维素酶是具有不同底物特异性的酶的复合物。关于它的作用机制,不同的研究者根据不同的微生物的研究结果提出了不同的看法,大致有以下几种(见表)。现在大多数人都倾向于 $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_x$ 和纤维

绿色木霉(*T. viride*)的纤维素水解复合物

受酶作用的底物	天然纤维素 结晶纤维素	非结晶纤维素 纤维寡糖	纤维二糖
目前有关纤维素酶复合物的几种看法	$\text{C}_1$ 酶	$\text{C}_x$ 酶	纤维二糖酶
	$\text{C}_1$ 酶	CMC 酶	纤维二糖酶
	结晶纤维素酶	CMC 酶	纤维二糖酶
	水化纤维素酶	内切式纤维素酶	外切式纤维素酶
	断裂纤维素酶	短纤维分解酶	纤维二糖酶
	纤维素酶 I	纤维素酶 II	
	具有 $\text{C}_1$ 和 $\text{C}_x$ 活性的纤维素酶		纤维二糖酶

二糖酶复合物的这一看法,它的基本水解方式是



对于 $\text{C}_1$ 酶的作用方式还不是很清楚。有人认为, $\text{C}_1$ 酶可能裂解纤维素链之间的氢键,同时还切割纤维素中的少数 $\beta$ -1,4-葡萄糖甙键或相邻纤维素链之间的共价键,从而使天然纤维素发生纵向断裂,最终使纤维素破碎,变成类似于再生纤维素和膨胀纤维素的形式。然后,由 $\text{C}_x$ 酶按随机方式作用,水解成可溶性的纤维素碎片,直至纤维二糖。也有人认为,作为一个酶实体而被分离的 $\text{C}_1$ 组分,它单独存在时表现不出分解纤维素的能力,只有添加CMC酶时它才活化。而纤维二糖酶的存在对棉花的增溶溶解显示出较大的协同效应。

还有人指出,纤维素酶作用于天然纤维素的早期阶段,是由随机性(内切性)纤维素酶组分的混合物来完成的,经过作用后,天然纤维素的横截面断裂,张力强度减弱,聚合度下降,对水和碱的吸收度增加,产生了各种不溶性的碎片,进而,再被与早期不同的纤维素酶水解成还原糖。

然而,由于纤维素纤维的超分子结构和纤维素酶的多组分,加上大多数的纤维素酶受其水解产物的抑制。因此,纤维素酶的作用方式和作用动力学是非常复杂的。这一切都有待进一步研究。

## 六、纤维素酶的应用

纤维素酶的应用非常广泛。根据目前国内外的情况,大致可以归纳为以下几个方面。

### (一) 纤维素废物的利用

自然界和工农业生产中都有大量的含纤维素的废弃物,如木屑、废纸、淀粉渣等,将这些废弃物经适当的前处理后就可以用纤维素酶将其水解而综合利用。例如,用30%的过氧化氢和乙酸酐组成的过乙酸处理木屑,可有效地脱去木素,从而,可用纤维素酶将其降解成可利用的产物。

### (二) 提高酒精和白酒的出酒率

淀粉经糖化发酵后尚有一部分残余淀粉和纤维素难以利用。如果在糖化过程中加入一些纤维素酶,对提高出酒率是有好处的。根据试验,添加纤维素酶可提高出酒率5%左右。若使用野生植物的淀粉作为发酵工业的原料,纤维素酶的添加对原料利用率的提高更明显,佛山酒厂和新宾县食品厂将纤维素酶和糖化酶混合制曲,用于野生淀粉发酵制酒,可提高出酒率10%以上。

### (三) 利用纤维素废料生产单细胞蛋白

研究证明,利用甘蔗渣、糠醛废渣生产单细胞蛋白是完全可以的。例如,甘蔗渣含有75%左右的纤维素,用作燃料不经济。由于渣中有髓,用来造纸工艺上有困难,用来作生产菌体蛋白的原料是可取的,中山糖

厂用纤维素酶水解蔗渣生产酵母,作为饲料,代替部分粮食,很有成效。

#### (四) 提取绿茶成分,制备可溶性茶

茶叶主要由4种有效成分组成,即由氨基酸、糖类形成的脂味成分,由咖啡因、皂角甙形成的苦味成分,由单宁形成的涩味成分以及香味成分。这4种有效成分被以纤维素为主体的细胞壁所包围着,这些细胞又通过果胶原联结成茶叶。因此,用细胞壁分离酶和纤维素酶来抽提茶叶,然后将抽提液浓缩干燥即得可溶性茶。此法与其它方法相比,所制得可溶性茶的色、香、味、体都较好,基本上可保持原有茶叶的风味。目前,国内正在进行这方面的研究。

#### (五) 提高由海藻提取琼脂的收率

用酸处理或长时间的热处理都能使琼脂分解,这对从海藻中提取琼脂是不利的。而用纤维素酶作用于海藻,由于在常温下进行,琼脂不易分解,同时,由于细胞壁破坏,从而,提高了海藻琼脂的回收率。

#### (六) 改善食品

纤维素酶可以用来破坏细胞壁,因此,对于提高植物性食品的消化率或者蛋白质、果汁、香精油等的得率是有好处的。当某些食品如胡萝卜、马铃薯等受纤维素酶作用时,采取缓慢搅拌和振荡,可使食品软化到相当的程度而不破坏它们的表皮,从而,使食品的质量得到改善。

#### (七) 水解纤维素制葡萄糖

有人在单级和四级容器的搅拌罐反应系统内,用纤维素酶连续水解纤维素。在50℃时,以某一稀释速度,可从10%的纤维素底物得到5%的糖液。最近有人用高分子筛的过滤系统使活性酶和未反应的底物留在连续使用的反应系统中,而低分子的葡萄糖和纤维二糖能通过分子筛,从而消除产物的抑制,提高了反应速度。试验表明,在低于50℃的情况下,当纤维素底物浓度为30%时,通过上述过程,可得到浓度为14%

的葡萄糖液。据报道,用这种薄膜高分子筛,用纤维素酶水解纤维素废料来生产葡萄糖,也许是有希望的。

尽管这些试验都是在比较严格的条件下进行,或者要求特殊的技术,但是,用纤维素生产葡萄糖是有可能的,我国纤维素资源相当丰富,进一步加强这方面的研究是值得注意的。

### 七、问题和展望

在我国,纤维素酶研究的历史虽然还很短,但却取得了可喜的进展。然而,纵观国内外的研究现状,我们不得不看到当中所存在的有待进一步探索的问题,概括起来,大致有以下几方面。

1. 进一步选育高产菌株: 目前所选育出来的菌种虽然具有一定的产酶能力,但应用于生产还很不理想,必须进一步提高。研究实践证明,通过适宜的物理、化学因子处理,是能够提高菌种的产酶能力。但是,要想多快好省地达到这个目的,必须找出一种简易高效的筛选育种方法。

2. 提高底物对酶的敏感性: 纤维素本身的胶束(supermolecule-micelle)结构给酶的作用带来了困难,而天然纤维素又往往和木质素、半纤维素、果胶等物质交织在一起,这又给纤维素酶的作用设置了障碍。因此,对含纤维素的底物进行预处理,来提高底物对酶的敏感性,减少底物的抗性,这是纤维素糖化的关键。目前,国外已进行了这方面的研究,并见到了效果。国内也对木屑这样的天然纤维素底物进行各种预处理试验,效果是明显的。这就表明,用物理的、化学的方法来处理底物,对提高纤维素的糖化率是行之有效的。这对纤维素糖化的工业生产也是必不可少的。然而,这一研究还仅仅是开始,还有待于发展和创新。

3. 进一步搞清纤维素酶的作用机制: 由于纤维素酶是一个多组分的复合酶,因此搞清它的作用机制,可以有效而充分发挥各组分的作用,并通过彼此间的协同作用使纤维素得以充分水解。目前国内外都在进行大量的研究工作,但由于底物的复杂性和酶本身的多组分。因此,众说不一,仍然是一个有待进一步探索的问题。