

木质纤维素酶解的方法及意义

徐文玉

(化工与生化工程系)

摘要 本文讨论了纤维素酶复合物水解木质纤维素的机理, 并叙述了水解糖在发酵工业上的应用。

关键词 纤维素酶复合物, 木质纤维素, 发酵

0 引言

目前发酵工业上利用木质纤维素作为碳源有两条路线: 原料→酸解→发酵路线和原料→预处理→酶解→发酵路线。本文阐述后一路线中酶解和发酵阶段的若干研究进展。

1 纤维素酶及其作用方式

纤维素酶是一种复合酶, 主要由三种成员酶组成, 包括^[1, 2]: (1) 内切- β -(1, 4)-葡聚糖酶, 由几种组分组成, 其中一种主要对结晶纤维素行使功能, 分解 β -1, 4-糖苷键, 为其它酶作用创造游离末端。(2) 外切- β -(1, 4)-葡聚糖酶, 以两种形式存在: (i) β -(1, 4)-葡聚糖纤维二糖水解酶, 由纤维素非还原末端切下纤维二糖单位; (ii) β -(1, 4)-葡聚糖葡萄糖水解酶, 由纤维素链非还原末端切下葡萄糖。(3) 纤维二糖酶 [β -(1, 4)-葡萄糖苷酶], 将纤维二糖或纤维糊精水解成葡萄糖。

纤维素酶各组分对纤维素的酶解呈协同作用, 人们提出了几种酶解模型: (1) Reese模型^[2]: 天然纤维素以两个阶段被水解为可溶糖, 如图1所示。本模型认为, C_1 酶是一种水解因子(氢键酶), 生成改性或活化的纤维素, 便于 C_x 酶进一步分解, x 代表该酶的多组分性质, 纤维二糖酶将可溶性糖水解为葡萄糖。Reese认为, 生长在可溶性纤维素中的微生物

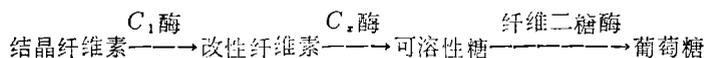


图1 Reese模型

只生成 C_x 酶, 而生长在天然纤维素中的微生物则生成 C_1 酶和 C_x 酶。(2) Pettersson模型^[2]: 本模型的要点是: (i) 内切葡聚糖酶分解纤维素的低结晶区, 创造游离末端; (ii) 外切葡聚糖酶借水解作用由游离末端切下纤维二糖; (iii) β -葡萄糖苷酶将纤维二糖水解为葡萄糖

本文1989-09-29收到。

糖。纤维素复合物的顺序酶促作用示于图2。这个模型与 Reese模型有着很大的区别。(3) Reese改进模型^[2]：根据研究进展，Reese对早期提出的 C_1-C_x 假说作了修改，如图3所示。这个概念保留了原先 C_1 酶破坏氢键的观点，而现在略有修改，认为 C_1 酶引起结晶区发生共价键分裂，并伴随着氢键分裂。这样 C_1 酶便成为内切葡聚糖酶 (C_x 酶) 的一个成员酶。但是它具有一些多数内切葡聚糖酶所不具有的性质，如对结晶纤维素有活性、破坏氢键、对羧甲基纤维素无作用、不能分解自身生成的产物等等。(4) Klyosov 模型^[3]：如图4所示。本模型的特点是：纤维素水解过程同以上各个模型基本相同，但各成员酶的酶促功能有着较大的差别。

纤维素酶的生物合成和酶促作用都受到严紧的调控作用。

纤维素酶的合成受到降解物阻遏和诱导作用的调控。

各种水溶性碳源如葡萄糖、纤维二糖、蔗糖、丙酮酸、甘油、2-脱氧葡萄糖等可减弱纤维分解菌的纤维素酶生成。

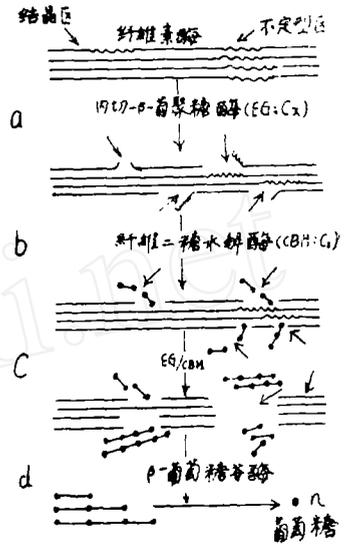


图2 纤维素酶各成员酶对纤维素酶解协同作用图解

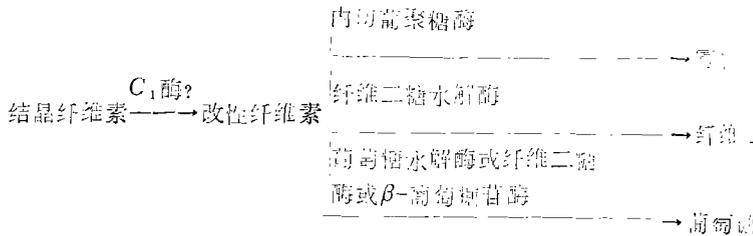


图3 Reese的修正模型

纤维素酶各成员酶受不同阻遏物的阻遏。例如^[2]，总纤维素酶复合物受5%甘油、内切葡聚糖酶受5%甘油或5%葡萄糖的降解物阻遏，β-葡萄糖苷酶受5%葡萄糖、0.2% 2-脱氧葡萄糖、5%甘油的阻遏。又如^[4]，羧甲基纤维素酶、β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶的合成受葡萄糖的阻遏。再如^[5]，*Trichoderma reesei* 的纤维素酶受淀粉、甘油、纤维二糖的阻遏，*Trichoderma SP.* 的 C_1 酶受葡萄糖和蔗糖的阻遏等等。

纤维素酶是一种诱导性酶，生物合成要求诱导物存在。诱导物包括纤维素、纤维二糖、

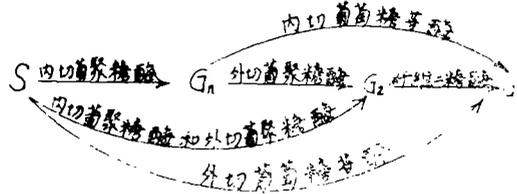


图4 纤维素酶促水解作用
S一起始物质；G₁—纤维二糖；G₂—纤维二糖；G—葡萄糖

槐糖、龙胆二糖、乳糖等。含 β -1, 4-糖苷键的纤维素不能进入细胞内, 它的诱导效应在于它被水解成可溶性的纤维二糖^[5]。乳糖(β -1, 4-半乳糖苷)和槐糖(β -1, 2-葡萄糖苷)是已知不含 β -1, 4-糖苷键的唯一纤维素酶诱导物。槐糖只诱导*T. reesei*生成纤维素酶。尽管槐糖是一种强有力的诱导物(它的诱导力是纤维二糖的2500倍), 但它诱生纤维素酶的水平不如纤维素作用的水平^[5]。诱导物的诱导作用同其浓度紧密相关。例如^[2], 纤维二糖处于低浓度(0.1%)时起纤维素酶生成的诱导作用, 处于高浓度(0.5—1.0%)时则阻遏酶的生成。另外它还可能是纤维素酶的抑制物。再如^[4], 槐糖诱导真菌纤维素酶生成的最佳浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{mol}$, 在高浓度时因分解而起降解物阻遏作用, 它刺激羧甲基纤维素酶生成受 10^{-2}mol^{-1} 葡萄糖和甘油的竞争性抑制作用。

纤维素酶的催化功能受其酶促终产物的反馈抑制。纤维二糖可抑制*T. reesei*的内切和外切葡聚糖酶, 导致纤维素酶解率的降低。各种纤维素酶的活性受葡萄糖的反馈抑制, 这就成为纤维素大量水解的限制因子。在纤维素酶解工艺中, 纤维素酶解是个关键阶段, 因酶受其酶促终产物的反馈抑制, 所以不可能获得高浓度的葡萄糖液。为使纤维素最大限度地水解, 必须将酶解液中生成的葡萄糖不断地移去。人们用超滤膜法或混合菌发酵法解决了这一问题。

2 木质纤维素复合物的酶解方法

木质纤维素酶解以两个阶段(原料预处理和预处理原料酶解)进行, 不可违反。

2.1 原料预处理的必要性

纤维素酶对天然纤维素酶解产糖率不高, 而对于处理过的纤维素酶解则产糖率较高。因此, 木质纤维素在酶解前的预处理是必不可少的。实验证明, 经过预处理和未经预处理的木质纤维在相同条件下酶解产生明显不同的效果。例如^[6], 混合硬木(90%槭树和10%白桦)用1% H_2SO_4 溶液预处理(220°C9s), 然后进行酶解, 得到的糖产率(溶出的葡聚糖/可溶出的潜在葡聚糖的百分数)为97.8%, 而未经处理的试样酶促水解只产生10.1%的产糖率。预处理提高酶解率的原因是: 或者是解除了纤维素的包被鞘—木素和半纤维素鞘, 以使纤维素酶接近纤维素的糖苷键; 或者是破坏纤维素分子结晶区的内-和外-氢键, 使其溶于水。由于木质纤维素酶解前需经预处理, 所以增加了酶解工艺的成本。

2.2 几种木质纤维素预处理和继后的酶解作用

介绍几种木质纤维素预处理和继后酶解的成功方法。

木质纤维素用氧化剂如臭氧、过醋酸、过氧化氢等处理后, 可有效地降解木素, 有利于纤维素酶解。Could报告^[7], 小麦秆和玉米秸用1%过氧化氢(pH11.5)在25°C下保温18—24h可使木素溶解度增加约1倍, 并溶出大部分半纤维素, 得到的纤维素经酶解几乎以100%效率产生葡萄糖(按原料中纤维素含量计算)。

蒸暴预处理被认为在发酵工业上应用是有前途的。有实验指出^[8], 蔗渣经200°C4min蒸暴处理后可溶出90%半纤维素, 获得的固形物用*T. reesei* C-30纤维素酶在50°C、pH5.0时水解24h, 糖化率为50%, 再加*Aspergillus niger* β -葡萄糖苷酶在24h内糖化处理, 糖化率增

加到80%。蒸暴处理和用0.25mol NaOH(70℃2h)预处理的效果一样。

微波辐射可分裂木质纤维素的木素和半纤维素之间的化学键,可促成纤维素酶解。Azuma指出^[9],蔗渣、稻草、稻壳等经微波处理后最大木素去除率依次为72.6%(233℃)、58.7%(226℃)、54.4%(228℃),最大糖化率为83.5%(228℃)、80.1%(224℃)、76.9%(227℃)。

甜高粱秆用1%NaOH在100℃下处理1h以去除木素,可有效地提高酶促糖化率^[10]。当纤维素酶和残渣浓度依次为5.9g/L和6.88g/L时,经反应10h后,总还原糖产率为78%,葡萄糖产率为61%。

⁶⁰Co γ -射线辐射是一种有效的处理方法。Han等指出^[11],蔗渣经 γ -射线处理后增加了对酶促水解的敏感性,用100M拉德辐射处理的样品经酶解后所生成的还原糖比未处理样品多3倍,还原糖约占干样品的30%。

球磨是一种普遍应用的预处理方法,可减小颗粒大小,增加面积,以提高纤维素的酶解率^[12]。Elwyn等在试管中制备50%球磨纤维素淤浆,用*Trichoderma*纤维素酶和*A. niger* β -葡萄糖苷酶酶解,得到30%的葡萄糖溶液。Tarum向1L连续搅拌器中的*T. reesei*培养滤液加入10%球磨纤维素,滞留时间40h,维持50℃和pH4.8,在流出液中测出5%葡萄糖。在膜反应器中,制备30%球磨纤维素淤浆,加入较多量的酶,在半连续流出液中糖浓度达14%。一般认为,要使木材中纤维素多糖的糖化率达70%以上,原料必须粉碎成10—20 μ m大小的颗粒。

3 木质纤维素酶解糖的应用

木质纤维素酶解糖在发酵工业上可用于生产乙醇、丙酮丁醇、2,3-丁二醇、有机酸、微生物多糖、菌体蛋白等^[1]。举例说明如下:

3.1 生产乙醇

*Saccharomyces cerevisiae*可将蔗渣水解糖快速地发酵成乙醇。在5h内,各种发酵方法获得的乙醇浓度为:分批发酵法是12.7%(v/v),连续细胞再循环法为9.5%(v/v),连续细胞再循环并充气法为9.0%(v/v)。某些厌氧菌如*Clostridium thermocellum*可将纤维素直接转化为乙醇和少量乳酸、乙酸^[13]。这种细菌具有纤维素酶和半纤维素酶,可将纤维素和半纤维素水解为纤维二糖、葡萄糖和木二糖、木糖。用适应和诱变法培育的*C. thermocellum*突变体,适合于一步法发酵,具有高乙醇生产能力、耐乙醇、副产极少量有机酸的特征。虽然*C. thermocellum*能有效地降解半纤维素,但不能发酵水解产物——木糖。不过,*C. thermocellum*和*C. thermosaccharolyticum*混合培养物可一步地将木质纤维素全部组成糖转化为乙醇。

3.2 生产柠檬酸

纯纤维素(*Solka Floc BW-300*)经*Trichoderma*纤维素酶—*Aspergillus*纤维二糖酶水解后生成的糖液可被*Candida guilliermondii* NRRLY488(ATCC9058)发酵成柠檬酸^[14]。*Solka Floc BW-300*具有高含纤维素、高溶性、高悬浮性特点,适合于做高基质浓度深层发

酵碳源。此种材料在30℃下用2% NaOH预处理16h和不加处理,对葡萄糖和还原糖最终浓度无多大区别。100g/L Solka Floc BW-300在50℃、pH4.9、0.6%纤维素酶-纤维二糖酶水解时,经过预处理的产生30g/L葡萄糖、35g/L还原糖,而无处理的产生的葡萄糖和还原糖分别为28g/L和33g/L,两者相差不大。500g/L未处理Solka Floc用0.6%纤维素酶-纤维二糖酶,在35℃、pH4.9下,在200ml/L圆锥瓶中水解6天,滤去未溶解纤维素,得水解糖液,培养液含21g/L葡萄糖,氮和葡萄糖之比为 0.45×10^{-2} ,发酵温度为35℃,发酵体积为100ml/500ml圆锥瓶。发酵时间进程见图5。柠檬酸产率为0.30,浓度达6.4g/L,菌体得率为0.25g细胞/g基质。

3.3 生产丙酮丁醇^[15]

研究表明,各种木质纤维材料的酸解和酶解液都可作为丙酮丁醇的发酵基质。蒸暴木材小片经水提取后,半纤维素存在于水相中,不溶性纤维素存在于固相中,两者都可以容易地水解为组成糖。富含半纤维素的水溶性物质可用酸或酶水解为以木糖为主的混合糖,不含抑制物,可被 *Clostridium acetobutylicum* 发酵为丙酮丁醇。还有报告指出,酸水解的和蒸暴的木材片中的半纤维素和纤维素可以直接被发酵,不必进行分离。

C. acetobutylicum 可在这样混合糖中生成9g/L丁醇,接近于理论产率(0.26g丁醇/g糖)。蔗渣和稻草是最适宜的溶剂生产基质,这是因为它们的水解液除了含有已糖之外,还含有纤维二糖、纤维糊精和戊糖,这些糖可全部地被溶剂产生菌所利用。蔗渣和稻草用纤维分解菌(*T. reesei*和*A. wentii*)混合滤液水解后获得的可发酵糖,除去不需要物质后,经*C. acetobutylicum*发酵后可生成16g/L丁醇。碱处理的小麦秆用*T. reesei*酶制剂水解产生的水解糖,经*C. acetobutylicum*发酵36h后,可生成溶剂17.3g/L,溶剂产率为18.3%。

3.4 生产菌体蛋白

近年来人们利用各种木质纤维素酶解液来生产菌体蛋白,略举几例:

Nishio等用*A. niger*的浸出酶水解柑桔皮,制备发酵液^[16]。在30℃下,四种酵母在发酵罐中分批培养,获得的酵母菌体产率为:*S. cerevisiae*($Y=0.51$)、*C. utilis*($Y=0.48$)、*Debaromyces hansenii*($Y=0.69$)、*Rhodotorula*($Y=0.70$)。后两种酵母生成较高的产率可能是利用化学分析法测不出来的其它糖类。柑桔皮的酸水解液(1.6mol H₂SO₄, 120℃, 水解15min)也实验过,但还原糖产率不如酶解液的高,酵母得率也低。

Costa将四种酵母培养在经预处理的桉树(*Eucalyptus globulus*)酶解液中,*C. utilis*不利用培养基中木糖,*C. maltosa*不利用纤维二糖,*Hansenula holstii*不利用纤维二糖和木糖,*C. tropicalis*可利用全部的糖,生成最好的菌体产率($Y=0.62$)。

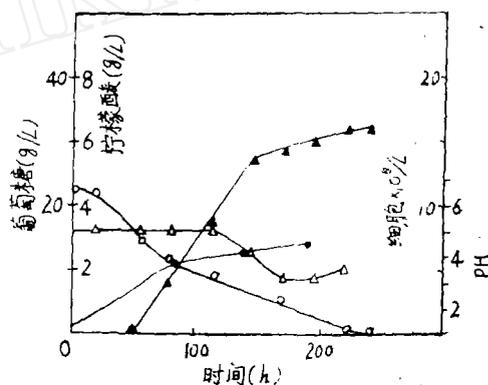


图5 *C. guilliermondii*在Solka Floc水解物中生长并生成柠檬酸的进程
▲—柠檬酸(g/L); ●—细胞 $\times 10^6$ (g/L);
○—葡萄糖(g/L); △—pH值

Yoon等^[17]利用预处理后草酶解液作为 *Rhodotorula* 菌体生长和脂肪生成的基质, 在培养液最初C/N=43.6时, 获得2g·L含54%脂肪的菌体, 脂肪产率为10.3g/100g碳源。

木质纤维素酶解液培养出的酵母的营养价值是优质的, 可以同传统的饲料酵母、大豆蛋白浓缩物、FAO资料相比拟。

参 考 文 献

- [1] Kosarik, N. et al., *Biotechnology* (eds. Rehm, H., -J. et al.), 3 (1983), 257
- [2] Bisaria, V.S. et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 3 (1981), 90.
- [3] Klyosov, A.A. et al., *Enzyme Engineering, Future Directions*, Plenum Press, New York, London, (1983), 83.
- [4] Duong, T.-V.C. et al., *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Wiseman/Ellis Horwood Limited, 7, (1983), 156.
- [5] Böing, J.T.P., *Prescott and Dunn's Microbiology* (eds. C. Reed), 4th edition, (1982), 634.
- [6] Lynd, L.R. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1 (1987), 92.
- [7] Takagi, M., *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 2 (1987), 165.
- [8] Dekker, R.F.H. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 12 (1983), 3027.
- [9] Azuma, J.-I. et al., *J. Ferment. Technol.*, 62, 4 (1984), 377.
- [10] Furusaki, S. et al., *J. Ferment. Technol.*, 63, 6 (1985), 523.
- [11] Han, Y.W. et al., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12 (1982), 73.
- [12] Reese, E.F. et al., *Annual Reports on Fermentation Process*, 7, (1984), 1.
- [13] Ghose, T.K. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 21 (1979), 1387.
- [14] Asenjo, J.A. et al., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12 (1982), 111.
- [15] Johns, D.T. et al., *Microbiological Review*, Dec., (1986), 484.
- [16] Nishio, N. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11 (1981), 156.
- [17] Taniguchi, M. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17 (1982), 74.

Zymohydrology of Ligno-Cellulose: Method and Significance

Xu Wenyu

(Department of Chemical and Biochemical Engineering)

Abstract The author deals with the mechanism of the hydrolysis of lignocellulosic material by cellulase complex. The discussion covers also the application of hydrolyzed products in fermentation industry.

Key words cellulase complex, lignocellulosic material, fermentation