

Research Progress and Application on the Cellulase

Yuyu Yan, Jiahui Wen, Hanhan Tan, Hanfeng Cai, Kai Liu, Chunjie Gong*

School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan, China

Email address:

gongcj606@163.com (Chunjie Gong)

*Corresponding author

To cite this article:

Yuyu Yan, Jiahui Wen, Hanhan Tan, Hanfeng Cai, Kai Liu, Chunjie Gong. Research Progress and Application on the Cellulase. *Asia-Pacific Journal of Biology*. Vol. 2, No. 1, 2019, pp. 6-9.

Received: May 7, 2019; Accepted: June 9, 2019; Published: July 2, 2019

Abstract: Cellulose is the most abundant and renewable resource on the earth. Cellulose metabolism is an important component of the biosphere carbon cycle. With the increasing of energy consumption, environmental pollution and population, more attention was paid for the utilization of cellulose. As an important part of the development of energy, food and material, the degradation of cellulose and the research of cellulase showed to be significance. This paper describes the characteristics of cellulose degradation via cellulase and its research progress. The importance of cellulase for energy development, food engineering, environmental engineering, and the application in other fields were discussed.

Keywords: Cellulase, Microorganism, Cellulose, Degradation

纤维素酶研究进展及应用

晏煜煜, 温佳慧, 谭韩涵, 蔡瀚锋, 刘凯, 宫春杰*

湖北工业大学生物工程与食品学院, 武汉, 中国

邮箱

gongcj606@163.com (宫春杰)

摘要: 纤维素物质是地球上的一类最丰富的, 取之不尽、用之不竭的可再生资源。纤维素代谢则是生物圈碳循环的重要组成部分。伴随着能源短缺、环境破坏和人口剧增等世界性问题的日趋严重, 纤维素资源这一领域的开发和利用受到越来越多学者的关注。作为新能源、新食品、新材料开发的一个重要组成部分, 纤维素的降解开发以及纤维素酶的研究, 成为这一领域的重要组成部分, 是未来亟待解决的重大课题之一。本文介绍了纤维素酶在纤维素降解方面的特点及在纤维素降解领域的研究进展。讨论了纤维素酶对能源开发、食品工程、环境工程等领域发展的意义, 并对纤维素酶在今后科研领域的应用进行了探讨。

关键词: 纤维素酶, 微生物, 纤维素, 降解

1. 引言

纤维素是绿色植物合成的植物细胞壁的主要成分之一, 2010年纤维素资源总量就已超过20亿吨[1]。目前, 大

多数天然纤维素都是通过焚烧、自然腐烂处理, 这既造成了极大浪费, 又严重污染环境。随着煤炭、石油等化石能源的日益枯竭, 国际油价不断上涨, 给我国高速发展的经济带来了一定的压力。同时, 生态环境问题也受到各国相

关组织的重视,替代能源的研究和开发逐渐成为各国科研工作的战略重点之一。

纤维素作为自然界中数量最大的可再生资源,它的降解是自然界碳素循环的中心环节。利用纤维素酶对纤维素进行水解,可以使纤维素彻底降解,这是一条无污染且能有效利用纤维素的途径。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葡萄糖,进而发酵生产乙醇、氢气及生物柴油等[2]。纤维素的利用与转化对于解决目前世界环境污染以及能源危机至关重要,对人类社会的可持续发展具有非常重要的意义。

2. 纤维素酶

2.1. 霉菌生产的纤维素酶

在降解纤维素的微生物中,霉菌属于较有成效的微生物类群。20世纪40年代,人们就开始了研究纤维素降解微生物及其产生的纤维素降解酶,并利用它们进行纤维素降解。在自然界中,一些细菌、真菌和放线菌都能有效降解纤维素,人们广泛开展了能降解纤维素的微生物菌株的研究。长期以来,霉菌由于其胞外纤维素酶活性较高,围绕霉菌为主要研究对象的纤维素降解机制一直以来成为科学界的研究热点,如曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和木霉属(*Trichoderma*)等多个菌属的菌株被发现可合成丰富的胞外纤维素酶[3]。人们在研究纤维素降解霉菌的过程中,通过对纤维素酶各组分进行分离纯化及催化性质的分析,协同理论、原初反应假说和碎片假说等纤维素降解机制由此被提出。其中,在实验结果的支持基础上,协同理论和原初反应假说获得了科学家的广泛支持。协同理论认为至少需要三类纤维素酶(内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶)的参与才能够有效降解天然纤维素。1985年Wood[4-5]等人在一次用木霉和青霉的纤维素酶水解纤维素的实验中,发现培养液中两种外切酶在液化微晶纤维时展示出协同性,其原因就是这两种外切酶具有两种不同类型的非还原末端,当一种外切酶作用于一种还原末端并将纤维二糖单位切下一个,导致另一种类型的非还原末端暴露出来,这时在相邻链上的第二种立体特异性的外切酶就会发挥作用,将纤维二糖单位切下。但此学说也不一定说明天然纤维素结晶区的降解机制,因此也成为了天然纤维素降解研究的一大缺憾。

Coughlan[6]等人的原初反应假说就认为完全降解天然纤维素至少需要三类纤维素酶:C1纤维素脱结晶酶、Cx内切葡聚糖酶及外切葡聚糖酶,其中外切葡聚糖酶为 β -葡萄糖苷酶。但另外一些人,像Mandels等则更相信原初反应并不是一个独立的降解过程,而恰恰是由这些酶协同反应所引起的。他们认为降解纤维素的顺序应该是:先由C1酶对纤维素分子进行脱结晶操作,接着由内外切酶和 β -葡萄糖苷酶一起作用于纤维素分子的非结晶区,形成葡萄糖。在此基础之上,相关研究者建立了当前的纤维素酶分析系统,目前,各种霉菌纤维素酶的分析常依照此系统进行。

目前为止,木霉属、青霉属和曲霉属等属的菌株由于分泌降解能力较强的胞外纤维素酶,还能够进行大规模的

固体和液体培养,因此在生产中被广泛应用,形成了潜力巨大的纤维素酶工业。

2.2. 细菌生产的纤维素酶

自然界中,细菌是纤维素降解中一个重要的组成部分。许多细菌种属表现出很强的纤维素降解能力,但由于胞外酶活不高等原因,导致了细菌参与纤维素降解酶的研究进展缓慢。

Neena Din, Howard G等人[7]在研究*Cellulomonas fimi*时提出了一个与reese理论相类似的纤维素酶分子内协同理论。*Cellulomonas fimi*纤维素酶是由一个碳水化合物模块和一个催化域共同组成的复合酶体系,在降解纤维素的过程中,纤维素结合域结合到纤维素上,然后打开结晶区,使得催化域较容易的附着于纤维素之上,使纤维素降解。高培基等人[8]在研究噬纤维菌降解纤维素的过程中发现,氧化性降解酶类存在于噬纤维菌中,且这类降解酶位于细胞膜上。遗憾的是无论哪种理论,都没有对细菌降解纤维素的机制作出完整的解释。

细菌生产的纤维素酶种属间差异较大,且其纤维素酶的性质差异也较大,故还未形成完整的细菌纤维素酶分析体系。至今,通常借用霉菌的纤维素酶分析系统进行细菌纤维素酶的分析与研究。

3. 纤维素酶降解纤维素机制

3.1. 游离的纤维素酶系

游离的纤维素酶系常见于需氧物种,如细菌和真菌[9]。在这种类型的系统中酶由细胞独立分泌并通过其碳水化合物模块和纤维素底物相结合。纤维素酶的协同作用把纤维素链降解成最终产物纤维二糖,由细胞吸收并进一步加工[10]。两种主要类型的纤维素酶是内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶,二者各自催化模块的活性位点拓扑结构不同[11]。内切葡萄糖苷酶的催化位点形成“开放的裂缝”,此类酶可以在纤维素分子内部的非结晶区发生作用,并在任何点结合纤维素链,将长链纤维素分子截短,产生大量带还原性末端的小分子纤维素。而外切葡萄糖苷酶的催化位点形成“封闭的通道”,因此只能结合链端,水解 β -1,4糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子[12]。最后,葡萄糖苷酶水解纤维二糖和水溶性的纤维素寡糖形成葡萄糖。虽然此类酶对纤维素无作用,但是可以去除上述两种酶催化的反应终产物对反应的抑制作用,从而加快反应的进行,因此在纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶具有十分重要的作用。这就是纤维素降解酶系统之间显著的“协同作用”。

3.2. 纤维小体

研究发现,纤维小体普遍存在于厌氧微生物中[13]。因为这些厌氧微生物依靠高度组织化的细胞表面丰富的酶系统来调节细胞的代谢活动,得以实现酶的再循环利用和水解产物的直接同化,用来抵消厌氧发酵产能的不足[14]。纤维小体通常由两部分组成:一是有锚定结构域的多酶亚基,该结构域起催化作用;另一是含有一个或多个黏附结构

域的支架蛋白,该部分起组装作用[15]。纤维素通过锚定结构域与支架蛋白上的黏附结构域特异性结合,组装成纤维素酶多酶复合体,其中支架蛋白上还含有1个纤维素结合域,将底物纤维素结合于纤维素酶多酶复合体上[16]。在支架蛋白存在的情况下,纤维小体通过黏附结构域-锚定结构域互相作用,将一系列与降解纤维素有关的酶结合起来,使得纤维素的降解能有效协调的在有序的空间里发挥作用。

3.3. 拟杆菌中纤维素降解机制

*Cytophaga hutchinsonii*和*Fibrobacter succinogenes*这两类细菌表现出与其它纤维素降解菌不同的降解机制。这两种细菌可能采用类似于*Bacteroides thetaiotaomicron*降解淀粉的机制[17-19]。在这种类似淀粉降解机制中,淀粉与位于细胞外膜的复合物结合,并且各个独立的分子被转运到周质空间中,这些分子在周质空间被淀粉降解酶降解。这种降解机制不产生游离的纤维素酶系,也不生成明显的纤维小体,因为单个纤维素分子很容易被内切葡聚糖酶降解。如果这两类细菌采用这种方式降解纤维素,可以明确利用此信息设计新的纤维素酶或纤维素修饰蛋白,并通过游离纤维素酶提高纤维素降解的速率[20]。

3.4. 多模块降解机制

李福利等在研究纤维素降解菌株*Clostridium*时发现了一个多模块持续性内切纤维素酶。该内切酶与外切酶的区别是从结晶纤维素表面剥离一条纤维素单链以后在上面持续滑动,每滑动一步释放一个纤维四糖,并且该酶含有五个底物结合模块,十三个底物结合亚位点保证底物与酶的吸附效率,通过大分子产物纤维四糖的释放来增强底物和酶的相互作用,从而提高降解效率[21]。

4. 纤维素酶的应用

4.1. 能源领域

我国石油资源较为丰富,目前已经有油田进入了中后期开采。一些油田为了提高石油的开采量,通常采用将带有压力的压滤液泵入地层内,以维持地下裂缝,保持地下达到一定的压力[22]。用纤维素酶制作的一种酶制剂是比较适合的破乳剂。酶制剂制成的破乳剂用于采矿业,不仅专一性强,几乎无副作用,且对地层和环境没有污染[23]。

在地质钻井等工程中,常常可以看到纤维素酶的身影。地质钻井中纤维素酶的洗井用量为0.1-1 kg/m³孔段体积[24],在静压下,这个用量能够使淤塞在深井内的魔芋聚糖催化水解成易溶于水的单糖,从而有效恢复岩层的透水性,提升洗井的质量[25]。

4.2. 食品领域

在食醋酿造过程中,使用糖化酶和纤维素酶混合催化能显著提高原料的利用率和出品率,不仅提高食醋的产量,而且还能使食醋的风味更佳。郝建新等人[26]研究了绿原酸作为评价指标,通过使用葡萄糖和鼓皮灯辅助杜仲叶作为原料进行发酵醋的酿造,结果表明利用纤维素酶得到的

发酵醋色泽澄清,具有独特的香气、口感,完全符合国家酿造食醋感官特性的有关要求,DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯胍)的自由基清除率可以高到97.3%,具有一定程度的体外抗氧化的效果。

4.3. 环境保护

目前,“白色污染”问题仍存在一些难关需要攻克,其中可降解塑料的研究常受到研究者的重视。近些年来,人们曾利用米根霉为发酵菌株生产L-乳酸,但是葡萄糖、淀粉等原料的生产成本一直较高,严重限制了L-乳酸在可降解塑料方面的应用进展。恰好玉米中含有丰富的营养因子,能够供米根霉生长,故可直接以玉米为原料用来生产L-乳酸,利用这些丰富的营养因子来提高原料的利用率。2004年,崔洪斌等[27]成功地利用纤维素酶水解玉米芯获得了L-乳酸,并得到了纤维素酶水解玉米芯的最佳条件。徐忠等[28]利用纤维素酶对大豆秸秆进行水解研究,并获得了一定的成果。

4.4. 洗涤剂

利用纤维素酶去污也是多年来人们生活中经常使用的,纤维素酶去污机理是:首先,内切和外切葡聚糖酶共同作用在纤维素表面。纤维素纤维的无定形区域由内切葡聚糖酶作用,随机水解 β -1,4-糖苷键,截断纤维素大分子,产生新的多糖链末端。而纤维素多糖链的还原或非还原末端由外切葡聚糖酶发生作用,从末端对纤维素进行切割,并产生纤维二糖和葡萄糖。在内切和外切酶的共同作用下,纤维素被降解为可溶性寡聚葡萄糖。随后在 β -葡萄糖苷酶的作用下它们被降解为葡萄糖。纺织物纤维中的空穴和毛细管可被纤维素酶扩大,利于其它酶更好地渗透在棉纤维上。与其它酶表现出更好的协同作用,使得内嵌在纤维内部的顽固污渍更好的祛除。碱性纤维素酶是最早于20世纪70年代由日本科学家Horikoshi等人于两株嗜碱性的芽孢杆菌的培养物中发现的。它能够很大程度的提高洗涤剂的去污能力。经研究表明,将其放入洗衣液中,不仅能显著提高去污能力,而且不会破坏纺织物纤维。由于此类酶中只含有内切葡聚糖酶,而这种酶只作用于无定形区域,并且会释放凝胶结构中的污垢,不仅起到良好的洗涤效果,而且保持了纺织物的色泽及强度。早在20世纪90年代,纤维素酶就成功应用在洗涤行业。酸性纤维素酶对衣物的反染效果特别好,而中性纤维素酶的优点在于去除衣物经过反复穿洗产生的毛球。

5. 结论与展望

综上所述,纤维素酶在能源开采、环境工程、食品工程等领域有着重要的作用。1886年,纤维素生物降解现象就被人们发现,但1950年之后才有系统性文章报道纤维素酶相关的研究,可见纤维素酶研究极其缓慢。细菌产生的纤维素酶是胞内酶且活性低,产量低,种类单一[29],研究价值有限,所以现有天然纤维素降解的报道多集中于真菌纤维素降解的报道。目前,天然产纤维素酶的菌株尽管有很多,但是其酶量低,产酶条件苛刻[30],很难适应于大规模生

产,故对纤维素的降解机制及纤维素酶的特性研究还需要进一步完善,以便于更适应工业化生产,为推动经济发展提供理论支撑。

基金项目

湖北工业大学大学生创新创业训练计划项目
(201810500099)

参考文献

- [1] 刘宇, 史同瑞, 朱丹丹, 等.玉米秸秆利用现状及其生物发酵技术研究进展[J].中国畜牧杂志. 2014, 50(6): 61-64.
- [2] Lanka S, Adivikatla V R, Shaik N, et al. Simultaneous Cellulase Production, Saccharification and Detoxification Using Dilute Acid Hydrolysate of *S. spontaneum* with *Trichoderma reesei* NCIM 992 and *Aspergillus niger*. Indian J Microbiol, 2012, 52(2): 258-262.
- [3] 齐西珍,赵军旗,田朝光等.真菌来源中碱性纤维素酶研究[C].中国酶工程学术研讨会.
- [4] Reese, E. T. et al., The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, J.bacteriol 59:485.
- [5] Caitriona A. Mooney, The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates Enzyme and Microbial Technology 25(8):644-650, 1999.
- [6] Coughlan M. P., Enzyme systems for lignocellulose degradation, Elsevier, Appl. Sci., Essex, 1989.
- [7] Din N, Damude HG, Gilkes NR, Miller RC Jr, Warren RA, Kilburn DG. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase.Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22; 91(24): 11383-7.
- [8] 王蔚, 卢雪梅, 高培基.菌物系统, 1997(16):40-45.
- [9] Bayer E. A, Belaich J. P, Shoham Y, Lamed R. The cellulosomes: multi- enzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 2004, 58: 521-554.
- [10] Caspi J, Irwin D, Lamed R, et al. Conversion of Thermobifida fusca free exoglucanases into cellulosomal components: comparative impact on cellulose-degrading activity. Journal of Biotechnology. 2008, 135(4):351-357.
- [11] Bayer E. A, Shoham Y, Lamed R. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. The Prokaryotes. 578-617.
- [12] Teeri T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends Biotechnol. 1997, 15:160-167.
- [13] Wilson D B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010, 1125(1):289-297.
- [14] Maki M, Leung K , Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass [J]. International journal of biological sciences, 2009, 5(5):500-516.
- [15] Bayer E A, Lamed R, White B A, et al. From cellulosomes to cellulosomes [J]. Chemical Record. 2008, 8(6): 364-377.
- [16] 纤维小体结构及其功能的研究进展[J].朱兆静,潘虎,郭俊等.江苏农业科学.2018, 46(19):12-16.
- [17] IYO A. H. & C. W. FORSBERG. Endoglucanase G from *Fibrobacter succinogenes* S85 belongs to a class of enzymes characterized by a basic C-terminal domain. Can. J. Microbiol. 1996, 42: 934-943.
- [18] MALBURG S. R, L. M. MALBURG JR, T. LIU, et al. Catalytic properties of the cellulose-binding endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63: 2449-2453.
- [19] Jun H S, Qi M, Gong J, et al. Outer Membrane Proteins of *Fibrobacter succinogenes* with Potential Roles in Adhesion to Cellulose and in Cellulose Digestion [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(19):6806-6815.
- [20] Wilson DB. Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008, 1125(1), 289-297.
- [21] Kundi Zhang, Xiaohua Chen, Wolfgang H. Schwarz, Fuli Li. Synergism of Glycoside Hydrolase Secretomes from Two Thermophilic Bacteria Cocultivated on Lignocellulose. Appl Environ Microbiol. 2014, 80(8):2592-601.
- [22] 马威,赵晓军.纤维素酶的生产及应用[J].科技创新导报.2007(33):4-4.
- [23] 王玉芝.纤维素酶的生产和应用[J].湖北化工.1997(3):56-57.
- [24] 曾傲,叶君.纤维素酶水解及其在能源与环境保护中的应用[J].广东化工.2006.33(10):25-28.
- [25] 乞永立,耿月霞,任章启.纤维素酶的生产及应用[J].河北化工.2000(1): 25-26.
- [26] 郝建新,刘奕炜,杨洋等.以绿原酸为目标物优化杜仲叶发酵醋的工艺研究[J].食品工业科技.2013(3):168-172.
- [27] 崔洪斌,金滨铎,徐涛等.纤维素酶水解玉米芯的研究[J].食品与机械.2004.20(3): 9-10.
- [28] 徐忠等.大豆秸秆纤维素酶水解条件的研究[J].食品工业科技.2004.25(3): 58-59.
- [29] 王伟,王永花.纤维素酶基因的研究进展[J].山东畜牧兽医.2019,02.
- [30] Merino ST, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. Advances Biochemical Engineering Biotechnology. 2007 (108): 95-120.