

林产资源的生物转化与利用^{*}

余世袁

(南京林业大学 南京 210037)

摘 要 林产资源包括纤维素、半纤维素、木质素、萜类化合物、酚类化合物等树木的主要化学组成。利用现代生物技术对林产资源进行生物降解和生物转化,可以制备能源、食品、工业用酶和其他高附加值产品。20 世纪已经在这一领域取得了重要进展,尤其是纤维素酶和半纤维素酶的制备和利用技术已日臻成熟。21 世纪人类社会的可持续发展要求在基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程和分离提纯技术等方面有较大突破,使林产资源生物转化技术的大规模、产业化成为现实。

关键词 林产资源; 生物技术; 纤维素酶; 半纤维素酶

中图分类号 O141.4

文献标识码 A

文章编号 1000- 2006(2000)02- 0001- 05

Bioconversion and Utilization of Forest Resources

Yu Shiyuan

(Nanjing Forestry University Nanjing 210037)

Abstract Forest resources include the main chemical components of wood, namely cellulose, hemicellulose, lignin, terpenoids and phenolics. Biotechnology plays an important role in the conversion and utilization of forest resources, and the development of this industry could provide us with new products with potential benefits of considerable magnitude. Cellulase, hemicellulose enzymes and their application have been extensively examined in the 20th century. It could be expected that substantial expansion of this new technology, in scientific research and in large-scale industrial application during the 21st century, would be realized with the development of gene engineering and related biotechnology.

Key words Forest resources; Biotechnology; Cellulase; Hemicellulose enzymes

林产资源的生物利用是运用现代生物技术对可再生的林产资源进行加工利用。随着全球性能源危机、粮食危机和环境危机的到来,人们对林产资源的利用更加重视,尤其是可再生的植物纤维资源的深度加工利用,已引起国内外的普遍关注。林产资源的生物利用在 21 世纪的林产化学工业中将扮演十分重要的角色。目前,林产资源生物利用领域的研究,主要包括可再生的植物纤维资源生产清洁能源和蛋白饲料、纤维素酶和半纤维素酶的应用、功能性糖醇和低聚糖的开发、香料化合物生物合成、萜类化合物的生物转化等。

1 纤维素酶与酶水解

植物纤维资源是自然界中最丰富、最廉价而又可再生的资源,地球上每年光合作用合成的植物纤维资源总量约为 1 000 亿 t。纤维素是植物纤维原料细胞壁的主要组成,其含量约为 35% ~ 55%。利用纤

^{*} 收稿日期 2000- 02- 28

第一作者简介: 余世袁(1949-),男,福建人,林产化工教授,博士生导师。

纤维素酶将可再生的植物纤维资源中的纤维素转化成单糖,继而制取酒精、食品、单细胞蛋白、医药品及其它化学化工原料,将成为人类未来粮食、能源和化学品供应的重要途径之一。

纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一类酶的总称。它不是单一组分的酶,而是多组分的复合酶系。纤维素酶主要包括3种组分:内切型葡萄聚糖酶(EC 3.2.1.4, EG),外切型葡萄聚糖酶(EC 3.2.1.91, CBH),纤维素二糖酶(EC 3.2.1.21, CB, 或称 β -葡萄糖苷酶, β -G),每一组分又由若干亚组分组成。纤维素水解生成葡萄糖的过程必须依靠这3种组分的协同作用才能完成。许多细菌、放线菌和真菌都能产生纤维素酶。目前应用于纤维素酶生产的菌种主要是木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、镰孢菌属(*Fusarium*)的菌种,其中最重要的是木霉属中的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。近几年来,采用原生质体融合技术来改良纤维素酶生产菌株的研究日益增多。美国Cetus公司用基因工程技术构建产纤维素酶的“工程酵母菌”获得了成功,该公司将里氏木霉的产酶基因移入酵母细胞中,通过这种“工程酵母”可由纤维素直接发酵获得乙醇和甘油。据报道,纤维单孢菌的纤维素酶基因也已被克隆到大肠杆菌中,这种大肠杆菌可以产生纤维素酶,但羧甲基纤维素酶活力低。不久遗传工程技术将会给产酶菌种的选育带来突破性进展。

无论用什么菌种制备纤维素酶,酶的得率和酶系的组成与产酶条件有十分重要的关系。碳源的性质和类型是决定纤维素酶制备成败的关键之一。制备纤维素酶最好的诱导物是纯纤维素,以纯纤维素为碳源时,纤维素酶的产量和质量都比其它为碳源要高。然而,从经济角度考虑,使用纯纤维素大规模生产纤维素酶是不适宜的。采用经过适当预处理的植物纤维材料代替纯纤维素,可以明显降低产酶成本,这方面的研究工作已经相当广泛深入。由于固体的不溶性碳源对生化反应器中的搅拌、氧气输送、物质扩散和传递等均会产生较大的阻力,加上自动添料的难度较大,在大规模生产中尚存在一系列技术上的问题。

纤维素酶水解的主要产物是单糖,水解反应通常又称为糖化反应。植物细胞壁中,微纤丝被半纤维素和木质素通过物理和化学作用所包裹,不利于纤维素酶对纤维素的进攻。未经预处理的植物纤维原料的天然结构存在许多物理和化学的屏障作用,纤维素酶水解得率低,仅为10%~20%。因此,植物纤维原料在酶水解前必须经过预处理,达到细胞壁结构破坏(包括破坏纤维素-木质素-半纤维素之间的连接、降低纤维素的结晶度和除去半纤维素)、增加纤维素比表面积的目的,以便适合于纤维素酶的作用。植物纤维原料预处理的方法很多,包括物理法、化学法、生物化学法以及几种方法的联合作用。物理法预处理需要较多能量,预处理成本高,而且水解得率低;化学法预处理后的原料在产酶或酶解前需用酸或碱中和,同时产酶时间较长;利用白腐菌预处理在除去木质素的同时会分解消耗部分纤维素和半纤维素。因此,物理法、化学法和生物法都不适合作为工业化生产的预处理方法。在各种预处理方法中,蒸汽爆破法比较适合于植物纤维原料的预处理。在蒸汽爆破过程中,物理和化学的作用使半纤维素水解成单糖和低聚糖,部分木质素溶解而提高了纤维素对酶的可及性,使得原料适合于纤维素酶的作用。

迄今为止,全世界已有几十套植物纤维原料经纤维素酶水解成单糖的中试生产线或试生产线,大部分是以酒精为最终主产品。这些试验或试生产机构包括美国陆军Natick研究发展中心,美国加州大学劳伦斯伯克莱实验室,美国阿肯色大学生物量研究中心,美国宾夕伐尼亚大学,加拿大Iotech公司,加拿大Forintek公司,法国石油研究院,日本石油替代品发展研究协会,瑞典林产品研究实验室,瑞典隆德大学,奥地利格拉兹大学,芬兰技术研究中心,印度理工学院等。

2 半纤维素酶

半纤维素是比纤维素更为复杂的一类非均一聚糖,常带有一定的支链。由于半纤维素结构的复杂性,它的完全降解需要多种酶的作用。半纤维素酶是一组复合酶系的总称,酶系结构极为复杂。从目前的研究来看,主要包括主链高聚糖降解酶、低聚糖降解酶及支链取代基降解酶三大类。

许多细菌、放线菌、真菌和酵母菌均可产生半纤维素酶。由于丝状真菌具有产生的胞外酶便于分离

和提取、产酶能力一般比酵母菌和细菌都高、可以同时产生降解半纤维素支链所必需的多种辅助酶等优点, 便于工业化推广应用, 因此人们对丝状真菌的产酶研究较多, 尤其是对木霉属和曲霉属的研究, 同时, 对这两种菌属产生的木聚糖酶的基本性质和降解产物特点也研究得较为透彻。用于选择性降解半纤维素的半纤维素酶如纸浆漂白用酶, 要求不含纤维素酶或纤维素酶活力很低。尽管自然界中的半纤维素酶总是伴随着纤维素而存在, 但的确存在专一地产生半纤维素酶的微生物, 因此从自然界中筛选是获得无(低)纤维素酶活半纤维素酶产生菌的重要途径之一。里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)具有稳定的生理性状和高产半纤维素酶的能力, 但由于同时含有纤维素酶基因, 生长在含有纤维素的培养基中会同时产生较多的纤维素酶。从它们的突变株中筛选获取纤维素酶基因缺陷型的半纤维素酶菌株的工作迄今尚未获得成功。有报道说, 已分离出纤维素酶基因和半纤维素酶基因都缺陷的里氏木霉孢子, 将半纤维素酶基因导入到这种基因缺陷型宿主体中, 有可能获得专一地产生半纤维素酶的里氏木霉菌株。采用基因拼接、基因克隆技术可以获得纤维素酶基因缺陷型半纤维素酶高产菌, 这是一项长期的工作, 离实际应用还有相当长的距离。

半纤维素酶除可应用于植物资源的生物转化和利用外, 还可以广泛应用于食品加工、饲料加工、果蔬加工、天然产物提取及淀粉等行业。用半纤维素酶处理谷物可以生产食品增稠剂或烘烤食品的基料。半纤维素酶和纤维素酶一起加到草类饲料中可增强反刍动物的瘤胃消化功能。它和果胶酶一起加到水果汁中可加速其澄清, 改善其品味。此外, 半纤维素酶和纤维素酶、果胶酶一起还可用于速溶茶的提取, 大豆、玉米脱皮, 桔子脱囊衣等。

不含纤维素酶或纤维素酶含量很低的半纤维素酶还可以应用于纺织工业和制浆造纸工业。其在制浆造纸工业中的广泛用途和巨大的应用潜力早已被人们发现和重视, 主要应用于树木脱皮处理、打浆处理、废纸脱墨处理、二次纤维改性、可溶性纤维浆生产及纸浆漂白。酶法脱皮不但可以降低机械脱皮过程中的能耗, 而且可以减少木材纤维的损失。在打浆工序中, 漂白浆通过酶处理可以缩短打浆或精磨时间, 降低能耗, 促进外部纤维化, 同时可以改善纤维的滤水性能。废纸二次纤维利用的第一步是油墨脱除, 通常使用一些化学药剂在一定的温度及机械作用下使油墨与纤维分离。90年代初期的研究发现, 用纤维素酶及半纤维素酶处理废纸可以促进油墨脱除, 近年来此项研究的成果已在工厂规模试验中取得成功。二次纤维回用的技术关键还在于其抄纸性能的恢复。人们发现废纸二次纤维的强度、柔软度及滤水性能等均有下降。用半纤维素酶处理后可以显著地提高二次纤维的滤水性能, 并改善其纤维的物理性能。可溶性纤维浆主要用来生产纤维性材料如醋酸纤维、玻璃纸和人造纤维。这些纤维性材料实际上是高纯度纤维素的衍生物。如果在纤维素中含有半纤维素将导致在加工过程中产生颜色、混浊或不溶现象。去除纸浆中的半纤维素的传统方法是在高碱浓度下进行蒸煮处理, 同时要求纸浆是亚硫酸盐浆或经酸预处理的硫酸盐浆。采用半纤维素酶纯化纤维素可以降低半纤维素抽提过程中碱的用量和温度, 并拓宽原料纸浆的种类。生物漂白是利用微生物或微生物酶(主要是半纤维素酶和木质素降解酶)对纸浆进行漂白。近年来, 随着无氯漂白的大力提倡, 半纤维素酶广泛应用于与各种氧化漂白剂, 如氧、臭氧、过氧化氢、过氧酸配合形成无氯漂序。大量的研究表明, 采用半纤维素酶处理均可以促进纸浆中残余木质素的降解和溶解性木质素的抽除, 从而减少后续漂序化学剂的用量, 提高纸浆的白度, 保持良好的纤维性能。鉴于半纤维素酶处理工艺要求简单, 可利用原有传统的漂白设备, 上马快、投资少, 很容易为工厂接受。随着该技术的进一步成熟, 半纤维素酶漂白技术必将得到迅速的推广和应用。

3 植物纤维原料制取酒精

酒精是一种重要的化工产品。目前生产酒精的原料根据生产工艺不同主要包括石油化工原料和粮食两大类, 随着国民经济各部门对酒精需求量的增加, 尤其是近年来以酒精作为未来清洁替代能源的兴起, 现有的酒精生产原料受到一定的限制, 利用可再生的植物纤维资源生产酒精是进一步开拓酒精生产原料有效而又合理的途径之一。

木糖是植物半纤维素戊糖的主要成分。自20世纪80年代初国际上掀起戊糖发酵的研究热潮以来,戊糖发酵的研究主要集中在木糖发酵菌种的选育和木糖发酵机理的探讨上。木糖通过细胞膜运载系统进入细胞后,在木糖还原酶和木糖醇脱氢酶作用下首先转化成木酮糖。木酮糖磷酸化后进入磷酸戊糖循环,生成3-磷酸甘油醛。3-磷酸甘油醛通过糖酵解途径形成丙酮酸,一方面,丙酮酸在丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶作用下生成乙醇,另一方面,丙酮酸进入三羧酸循环被彻底氧化成二氧化碳和水。自然界中能发酵木糖的微生物包括细菌、酵母和真菌,迄今已发现一百多种微生物能代谢木糖。细菌能发酵的糖类物质较多,除了单糖外还能发酵纤维素、生物高聚糖等,但细菌发酵的缺点是副产物多,酒精得率低,同时,高pH条件下的细菌发酵容易引起杂菌污染。与细菌一样,真菌不仅能发酵单糖,还能发酵二糖、纤维素和木聚糖等,真菌的这种特性特别适合于植物纤维原料的同步糖化发酵。在具有戊糖发酵能力的微生物中,酵母的发酵能力最强,目前研究最多且最有工业应用前景的酵母菌有3种:休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)。

植物纤维原料制取酒精包括纤维素和半纤维素糖化、糖液发酵和酒精蒸馏3个过程。由于戊聚糖占植物纤维原料干重的10%~40%植物纤维原料水解液中含有戊糖和己糖,其中戊糖(主要是木糖)占30%左右,因此,戊糖、己糖同步转化成酒精是决定植物纤维原料制取酒精经济可行的关键。

利用可再生的植物纤维资源制取酒精目前存在的主要问题是成本偏高。选择性能优良的纤维素酶生产菌株和戊糖发酵菌种,以及进一步完善工艺达到降低成本的目的是未来该领域努力的方向。固定化细胞发酵技术是当前生物技术的前沿领域,该技术因具有发酵速率快、产率高和无需制备种母或微生物的回收复用等优点而成为发酵领域未来发展的趋势。固定化细胞戊糖、己糖同步发酵技术的应用,对完善戊糖、己糖发酵工艺,提高酒精得率和产率,降低生产成本十分重要。高糖发酵也是降低生产成本的重要途径之一,水解糖液中糖的浓度是发酵生产成本的决定因素之一,但糖液浓缩导致水解液中抑制物浓度同时增加,高浓度的抑制物严重影响了糖液发酵甚至停止发酵。同时,水解液中高浓度的糖将对微生物产生严重的“代谢物阻遏”效应以及高浓度产物乙醇对微生物的抑制作用。因此,水解液的浓缩有一定的限度。

4 其它生物转化产品

除了纤维素酶、半纤维素酶和酒精外,其它农林资源生物转化产品还包括功能性低聚糖、单细胞蛋白、蛋白饲料、糖醇、香料化合物和萜类化合物等。

低聚糖又称寡糖(*Oligosaccharide*),是由2~10个单糖通过糖苷键连接形成的具有直链或支链的低度聚合糖类的总称,分子量约300~2000,分为功能性低聚糖和普通低聚糖两大类。蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖、环糊精及麦芽低聚糖等属于普通低聚糖,它们可被机体消化吸收,产生能量,不是肠道有益菌双歧杆菌的增殖因子。功能性低聚糖,是指具有特殊的生物学功能,特别是能促进肠道内双歧杆菌的增殖,有益于人体健康的一类低聚糖,即所谓的双歧因子。功能性低聚糖包括水苏糖、棉子糖、异麦芽酮糖、乳酮糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、低聚乳糖、低聚异麦芽糖、低聚异麦芽酮糖和低聚龙胆糖等。其中,低聚木糖由于具有对双歧杆菌高选择性增殖效果,很难被人体消化酶系统所分解及独特的酸稳定性和难发酵性等优点而倍受人们的青睐。低聚木糖的制备方法包括酸水解法和生物降解法两种,由于酸水解法存在各种问题,工业上多采用生物降解法。研究发现,自然界中许多细菌、真菌都能产生可使木聚糖降解成低聚木糖的木聚糖酶。工业上一般以富含木聚糖的植物纤维资源如玉米芯、甘蔗渣、棉子壳、麸皮、稻草、花生壳等为原料,通过木聚糖酶的降解作用及分离纯化而制得低聚木糖。

单细胞蛋白是通过单细胞微生物的增殖培养而获得的菌体蛋白。单细胞蛋白主要用作动物饲料,直接作为人类的蛋白食品,目前在一些国家已开始进入商品化生产。生产单细胞蛋白的微生物包括细菌、酵母、真菌和单细胞藻类。细菌蛋白质含量高,生长速度快,且能在范围较广的基质中生长,但细菌体小,回收困难,菌体中核酸含量较酵母和真菌高;丝状真菌的优点是便于回收,质地良好,其不足之

处是生长速度慢, 蛋白质含量低; 酵母菌是最早为人类作为蛋白质资源开发的微生物, 其优点是菌体较大, 容易回收, 核酸含量低, 赖氨酸含量高, 能在酸性条件下生长, 可利用的碳源较广, 能以农林副产品、石油产品及食品、发酵等工业下脚料为原料, 因此, 单细胞蛋白的研究和生产主要以酵母为主。单细胞蛋白生产对于酵母菌种的要求主要有以下几点: 能充分利用己糖和各种戊糖、有机酸等为碳源, 能以各种工农业副产物为原料; 能在较高浓度的还原物中繁殖, 并且对还原物的利用率高; 繁殖能力强, 抗抑制物能力强; 蛋白质和维生素含量高。用于单细胞蛋白生产的酵母菌种主要有假丝酵母属(*Candida*), 球拟酵母属(*Torulopsis*), 圆酵母属(*Torula*) 和丝孢酵母属(*Trichosporon*) 等菌种。生产饲料用单细胞蛋白的原料来源较广, 一般可采用农林副产物、亚硫酸盐制浆废液、酒糟、废糖蜜、烷烃、淀粉厂和豆制品厂废液等。生产药用酵母还可采用淀粉质原料, 如大麦、玉米、薯干等。

木糖醇是林产化工的重要产品之一, 其甜度与蔗糖一样, 能量值仅为 11.7~12.1 kJ/g, 比蔗糖低。木糖醇由于其特殊的生理功能而被人们广泛地接受, 尤其是近年来糖尿病人的增多, 木糖醇在特殊人群的食品制造行业中的应用日益增多。木糖醇不会引起血糖水平的波动, 可作为非肠道营养的能量来源和防龋齿功能, 因此, 木糖醇作为一种功能性甜味剂主要用于防龋齿性糖果(口香糖、糖果、巧克力和软糖等) 和糖尿病人的专用食品, 也用于医药品和洁齿品。生产木糖醇的原料主要有富含戊聚糖的阔叶材、玉米芯、甘蔗渣等农林废弃物。利用农林废弃物化学法生产木糖醇的工艺已经十分成熟, 主要包括水解、分离、氢化和结晶4步, 但存在得率低、设备要求高、投资大、成本高等缺点。因此, 近年来利用微生物生物转化制取木糖醇得到深入的研究。

世界上每年香料贸易总额达几十亿美元。目前大部分香料是通过化学法合成制得, 少量昂贵的香料从植物中提取。由于香料化合物在结构上的高度特异性, 使化学合成遇到了很多困难和限制。利用生物技术合成香料, 可以解决此类问题, 产品质量和产量也能得到保障。目前香茅醇、牻牛儿醇、沉香醇、橙花醇、薄荷醇等香料化合物的生物合成得到了广泛的研究。萜类化合物是林化工业最主要的产品之一, 萜类化合物的深度加工利用是未来林产化工的重要方向, 随着生物技术的发展, 萜类化合物的生物转化逐渐受到人们的重视。采用酶法可以进行萜类化合物的所有生物化学转化, 包括氧化、还原、水解、缩合、异构等。酶法转化具有反应专一、区域专一、立体专一、反应温和等特点。目前研究得比较多的萜类化合物生物转化产品有马鞭草醇、马鞭草酮、水合蒎醇、月桂烯醇、 α -品烯酸、香叶酸、香芹酮、香芹醇、二氢香芹酮、紫苏醇、紫苏酮、紫苏酸、 α -萜品醇、异龙脑、樟脑、类胡萝卜素等。

参 考 文 献

- [1] Esterbauer H. [J]. *Bioresource Technology*, 1991, 36: 51~65
- [2] Hahr Hagerdal B. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16(11): 933~943
- [3] Jeffries T W, Kurtzman C P. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16(11): 922~931
- [4] Johnson K G, Ross N W. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1990, 12: 96~964
- [5] Olsson L. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 312~331
- [6] Persson I. [J]. *Process Biochemistry*, 1991, 26: 65~74
- [7] du Preez J C. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16(11): 944~956
- [8] Saddler J N. *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*[M]. Wallingford, UK: C. A. B. International, 1993. 110~125
- [9] Senior D, Hamilton K. [J]. *Journal Pulp and Paper*, 1992, 66(9): 111~115
- [10] Wong K K, Saddler J N. [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1992, 12(5): 413~435
- [11] Zhang M. [J]. *Science*, 1995, 267(1): 240~243

(责任编辑 李燕文)