

# 用于生物质酶解过程的纤维素酶研究进展

何敏超, 许敬亮, 陈小燕, 孔晓英, 袁振宏\*,  
张宇, 余强, 刘云云, 王闻

(中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源重点实验室, 广州 510640)

**摘要:** 纤维素酶解效率是木质纤维素经济、高效生化转化的限制瓶颈。该文讨论了影响纤维素酶酶解经济性与高效性的多个要素, 如: 高滤纸酶活菌株的选育、发酵、酶解机理、酶解影响因素及酶解混合体系的优化等。该文研究表明, 纤维二糖水解酶可能是决定发酵体系中滤纸酶活高低的关键单酶组分, 同时, 该酶可能也是预处理后生物质酶解体系中决定滤纸酶活效率的关键单酶组分。酶解过程中关键限速反应的认识及关键限制因素形成机制的揭示将成为纤维素酶生化转化研究的重点, 这些机理机制的建立可为构建高比活力纤维素酶提供理论依据。

**关键词:** 生物质; 酶; 纤维; 滤纸酶活; 纤维素酶; AA9 裂解酶; 生化转化

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.z1.040

中图分类号: Q556; Q557

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-Supp.1-0290-07

何敏超, 许敬亮, 陈小燕, 孔晓英, 袁振宏, 张宇, 余强, 刘云云, 王闻. 用于生物质酶解过程的纤维素酶研究进展[J]. 农业工程学报, 2016, 32(增刊 1): 290-296. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.z1.040 http://www.tcsae.org  
He Minchao, Xu Jingliang, Chen Xiaoyan, Kong Xiaoying, Yuan Zhenhong, Zhang Yu, Yu Qiang, Liu Yunyun, Wang Wen. Progress of cellulase that using for biomass hydrolysis process[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(Supp.1): 290-296. (in Chinese with English abstract)  
doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.z1.040 http://www.tcsae.org

## 0 引言

石油、煤炭、天然气等不可再生资源是当前最主要的能源物质与化工原料, 也是日益枯竭的不可再生资源<sup>[1-2]</sup>。因此, 积极寻找可再生的替代能源与化工原料, 已成为迫切需要解决的问题。将数量巨大的纤维原料降解转化为液体燃料及高值化学品具有重大的意义<sup>[3-4]</sup>。但是, 一些限制因素阻碍了木质纤维素生化转化的经济性与高效性。其中, 纤维素酶应用成本过高是制约纤维乙醇及高值化学品商业化的瓶颈因素<sup>[5]</sup>。

纤维乙醇是大宗低价产品, 这决定了该领域的纤维素酶价格必须最大限度的低廉。纤维素酶酶解的经济性与高效性不仅决定于菌的发酵性能及生产成本, 也取决于纤维素的酶解体系。因此, 本文围绕纤维素酶的生产与酶解, 讨论了影响纤维素酶用酶成本的多个要素, 并针对目前研究中的问题, 预测了该领域的研究方向。

## 1 高滤纸酶活菌株的筛选、选育及工程菌构建

高活力纤维素酶菌株的发酵性能对于最终的酶解成本具有重要的决定作用。研究人员一般通过自然筛选、诱变及工程菌构建来获得高滤纸酶活的菌株。

### 1.1 产纤维素酶微生物的种类

纤维素酶高产菌株主要分布于少数的几个种属, 如木霉属、曲霉属、青霉属, 其它多个种属的产纤维素酶菌株也有报道<sup>[3,6]</sup>。不过, 其滤纸酶活与上述几个种属存在明显的差距。自然界筛选的菌株是诱变选育及工程构建的基础, 因此, 积极筛选高活力纤维素酶菌株依然具有重要的应用价值。

### 1.2 高滤纸酶菌株的筛选

自然界中, 能够产纤维素酶的微生物种类繁多, 不过, 能够高水平产酶的微生物种类极少<sup>[7]</sup>。可超高水平产滤纸酶活(FPA, filter paper activity)的菌株则更为稀有。从自然界筛选高活力纤维素酶的菌株, 具有较大的盲目性、偶然性与随机性。从自然界筛选高活力菌株, 正确的筛选方法很关键。不过, 正确的筛选方法只是增大了高活力菌株不被漏选的机率。更重要的则是对高活力菌株在自然界分布规律的认识。采集的样品从根本上决定了该批次的筛选是否可以获得高活力菌株。揭示高活力菌株在自然界的分布规律具有较大的难度。不过, Ettema C H 及 Sun B 等指出, 正是由于土壤的异质性与多变性, 使得分布其中的微生物具有可预测性及可指示性<sup>[8-9]</sup>。因而, 以少数几种土壤学性质构建一个简便、高效的指示乃至预测体系来表征高活力菌株在自然界的分布规律是可行的。

收稿日期: 2015-05-09 修订日期: 2015-10-18

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划(2012AA101802 和 2013AA065803), 国家自然科学基金(21306196), 广东省科技攻关项目-工业高新技术领域科技计划项目(2013B010403021)广州市科技攻关项目(2013J4300026)

作者简介: 何敏超, 男, 陕西合阳人, 中国科学院广州能源研究所助理研究员, 硕士, 主要从事纤维素酶工程方面的研究。广州 中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源重点实验室, 510640。

Email: hemc@ms.giec.ac.cn

※通信作者: 袁振宏, 男, 研究员, 博士生导师, 从事生物质生化转化技术开发和管理。广州 中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源重点实验室, 510640。Email: yuanzh@ms.giec.ac.cn

迄今为止，从自然界筛选的滤纸酶活菌株，其液态发酵酶活范围为：0.02~5.00 FPIU/mL<sup>[10]</sup>。绝大多数自然筛选菌株，其酶活很难高于 5.00 FPIU/mL。*Trichoderma reesei* QM6a 的滤纸酶活为 0.50~5.00 FPIU/mL，斜卧青霉 *Penicillium decumbens* JU-A10 的诱变出发菌株 *P. decumbens* 114-2 从自然界获得时，其酶活为 0.35 FPIU/mL<sup>[11]</sup>。Menon V 从自然界筛选到超高滤纸酶活菌株，其 FPA 高达 200.00 FPIU/g<sup>[12]</sup>，不过，未见该菌的商业化报道。

### 1.3 高滤纸酶菌株的选育

中国纤维乙醇领域应用最广泛的纤维素酶依然是来自于里氏木霉 *Trichoderma reesei* Rutgers C-30 与斜卧青霉 *Penicillium decumbens* JU-A10。里氏木霉 *T. reesei* RUC-30 的液态发酵酶活在 12.20~57.00 FPIU/mL<sup>[10,13]</sup>，*Penicillium decumbens* JU-A10 的发酵酶活在 18.90 FPIU/mL<sup>[14]</sup>，FPA 产率为 160.00 FPIU/L·h。而 Belghith H<sup>[15]</sup> 利用一株诱变的青霉进行发酵，其酶活力高达 23.00 FPIU/mL。

这些诱变菌都借助了紫外线、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 的诱变，且经历了漫长的优势积累过程。当前，常用的高效的诱变方法是紫外线、硫酸二乙酯、NTG 和亚硝基甲基脲 (NMU)<sup>[16]</sup>。其中，NTG 与 NMU 因为具有优异的诱变效果而被誉超诱变剂。利用多种诱变方法在较短的时间 (1~2 a) 获得突破性的进展具有较大的难度。不过，采用正确的诱变技术在较短的时间里获得阶段性的成果则是有可能的。

*T. reesei* RUC-30 与 *Penicillium decumbens* JU-A10 已成为高滤纸酶活菌株选育史上的里程碑。其中，*Penicillium decumbens* JU-A10 这项科技成果获得国家科技进步二等奖。遗憾的是，*T. reesei* RUC-30 仍不符合纤维乙醇的用酶要求。因此，超越这座技术高山，依然是一项既迫切又艰巨的任务。抗代谢阻碍特性的菌株是获得高活力滤纸酶活诱变菌株的重要途径。

当生物质转化率为 75% 时，纤维素酶的用酶量为 10~15 FPIU/g 葡聚糖或者 20~30 mg 蛋白/g 葡聚糖<sup>[17]</sup>。2014 年，李静波<sup>[18]</sup>利用 7.5 FPIU/g 葡聚糖的酶解量时，纤维素的酶解率高达 82%。也有以每加仑多少美元表征酶的应用成本。2006 年，纤维素酶应用成本降低到 20~30 美分/加仑乙醇。然而，纤维素酶的用酶成本还需进一步降低至 3~4 美分/加仑乙醇<sup>[19]</sup>。

降低纤维乙醇制造成本是一个系统的工作。不同因素所占的比重不同。如预处理的成本是 0.3 美元/加仑纤维乙醇<sup>[20]</sup>，而纤维素酶的用酶成本是 0.15~0.30 美元/加仑纤维乙醇<sup>[21]</sup>。多个因素相互影响，因此，降低纤维乙醇生产成本需要多个环节的相互协调，以更有效地降低纤维乙醇的制造成本。

### 1.4 高滤纸酶工程菌的构建

高滤纸酶活菌株的诱变选育往往需要跨越十几年乃至几十年的漫长岁月。因此，诱变选育技术已经越来越多地被基因工程、合成生物学、系统生物学等日新月异

的技术所替代。

一般而言，将纤维素酶系中的某个单酶基因成功表达后，其酶活是出发菌株的几倍乃至数百倍。但是，该重组菌滤纸酶活的提高幅度往往不大<sup>[22]</sup>。因此，需要将各个单酶基因分别进行高效表达后再进行复配优化以有效地提升滤纸酶活的酶解效率。

## 2 高滤纸酶活菌株的发酵

菌株最终的发酵酶活首先取决于菌株自身的特性，此外，发酵方式、发酵工艺、培养基成分也能够显著地影响最终的酶活。如：利用 RUT C-30 进行液态发酵，其滤纸酶活范围为 0.78~57.00 FPIU/mL<sup>[10]</sup>，最高酶活是最低酶活的 73.08 倍。

### 2.1 高滤纸酶活菌株的发酵方式

不同种类的菌，其最佳的发酵方式因微生物的种类而异。里氏木霉的液态批处理补加模式明显优于分批发酵方式。RUT C-30 在液态批处理发酵方式下，其酶活为 4.95~18.00 FPIU/mL<sup>[10,23]</sup>。在液态分批补料发酵方式下，其滤纸酶活、酶活产率、每克干物质滤纸酶活分别为：30~57 FPIU/mL，201 FPIU/L·h 和 226 FPIU/g 发酵碳源<sup>[10,24]</sup>。因此，里氏木霉 RUT C-30 最佳的发酵方式是液态分批补料发酵，而不是固态发酵。黑曲霉的最佳发酵方式则是固态发酵。具体的原因则需进一步的研究。

此外，Fang X 等<sup>[25]</sup>在采用诱变菌株 *Acremonium cellulolyticus* strain C-1 进行液态批处理发酵时，其滤纸酶活、酶活产率、每克干物质滤纸酶活分别为：18.00 FPIU/mL、150.00 FPIU/L·h 和 360.00 FPIU/g 发酵碳源。而在使用液态分批补料发酵条件下，该菌的滤纸酶活、酶活产率、每克干物质滤纸酶活分别为：34.60 FPIU/mL、240.30 FPIU/L·h 和 346.00 FPIU/g 发酵碳源。滤纸酶活及酶活产率增幅分别为 92.22% 与 60.20%。

### 2.2 高滤纸酶活菌株发酵原料的预处理

发酵原料的预处理方法对于最终的发酵酶活也具有重要的影响。

Xin F 等<sup>[26]</sup>利用饱和蒸汽处理后的原料进行发酵，其酶活是 1%、3% 氢氧化钠处理方法酶活的 3 倍。而 Madamwar D 等<sup>[27]</sup>利用 *Aspergillus niger* 菌株进行固态发酵，甘蔗渣、玉米芯与锯末预处理后的酶活是未处理酶活的 3 倍左右。该研究中，不同的发酵原料皆以 5M NaOH 处理的效果最好。Beatriz M P P 使用 *P. echinulatum* 9A02SI 进行摇瓶发酵，预处理后的滤纸酶活是未处理酶活的 6 倍<sup>[28]</sup>。因此，选择一种适宜的预处理方法对发酵原料进行预处理，可以数倍地提高滤纸酶活。

### 2.3 在发酵体系中决定滤纸酶活高低的纤维素单酶成分

在纤维素酶酶解木质纤维素的体系中添加  $\beta$ -葡萄糖苷酶可以显著提升纤维素酶的酶解率<sup>[29]</sup>。因此， $\beta$ -葡萄糖苷酶被广泛地认为是纤维素酶酶解时最关键的纤维素单酶<sup>[30]</sup>。此外，该酶也被认为是里氏木霉发酵体系中制约滤纸酶活高低的限制酶。

在 Madamwar D 等研究结果<sup>[27]</sup>的表 1 中, 分别以外切纤维素酶 (CBH)、内切纤维素酶 (EG) 及  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (BGL) 与 FPA 进行回归分析时发现, 3 种酶的决定系数在液态和固态条件下分别是: 0.8505、0.6953、0.9416 和 0.9205、0.9182、0.9708; 其回归方程在液态与固态条件下分别是:  $y=0.8807x-1.0707$ 、 $y=0.4739x-3.2611$ 、 $y=0.7103x-1.3327$  及  $y=0.7237x-1.5135$ 、 $y=0.5942x-5.3486$ 、 $y=0.7199x-1.0722$ 。在固态及液态发酵条件下, BGL 的决定系数都最大。这在一定程度上说明了 BGL 与 FPA 的关系最为密切。不过, 在液态发酵及相同的酶活增量下, CBH 对于 FPA 的贡献要大于 BGL 与 EG。而在固态发酵及相同的酶活增量下, CBH 对于 FPA 的贡献要小于 BGL。因此, 较难得出究竟是哪种单酶才是决定发酵体系中 FPA 高低的关键酶。

在对 CBH、EG、BGL 及 FPA 之间的关系进行大范围地分析与归纳时, 单酶对于 FPU 的相对重要性存在争议。在对大量文献中各个单酶的超高酶活进行归纳与概括时, 可以看到: EG、BGL、FPA 及 CBH 的超高酶活分别为 2 358 IU/mL<sup>[31]</sup>, 1 400 IU/mL<sup>[32]</sup>, 57 IU/mL<sup>[24]</sup> 及 23 IU/mL<sup>[33]</sup>。CBH 的超高酶活远小于其它 3 种酶的超高酶活。因此, 作者认为 CBH 才是现阶段决定滤纸酶活高低的关键酶。Cochet N<sup>[34]</sup>也指出, FPA 酶活高低与 BGL 酶活无关, 而是与 CBH 有关。

作者对筛选分离到的数百株纤维素酶菌进行多个时间点的酶活检测, 以滤纸或羧甲基纤维素钠为底物反应后进行沸水浴, 可观察到刻度试管中反应体系颜色深度的明显增加。在以微晶纤维素为底物反应后进行沸水浴, 肉眼几乎观察不到颜色深度的增加。这或许在一定程度上可以解释为什么 CBH 是限制 FPA 酶活高低的关键单酶因子。CBH 成为制约 FPA 酶活高低的原因可能在于其对微晶纤维素酶解的效能较低。Cruys-Bagger N, Fox JM 和 Kurasin M 等指出: CBH I 在沿着纤维链前进时, 常常会因某些障碍而停止其前移的进程<sup>[35-37]</sup>。

可见, CBH 是限制菌株滤纸酶活高低的关键酶组分。FPA 是纤维素酶在生物质生化转化领域最主要的应用指标, 因此, CBH 可能是生物质生物化学转化过程中最关键的限制性单酶因子。

### 3 纤维素酶的酶解机理及生物质原料的酶解影响因素

纤维素酶解机理与纤维原料预处理后酶解机制的认识不仅有利于降低纤维素酶的用酶成本, 而且对于纤维素酶高产菌株的筛选、选育、构建及纤维素酶蛋白质工程优化都具有积极的指导意义。

#### 3.1 纤维素酶的酶解机理

当前, 普遍接受的酶解机理是 CBH、EG 与 BGL 协同作用降解微晶纤维素。已有研究人员对多个纤维素酶的协同作用开展了深入的研究。Igarashi 采用原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 技术来研究 CBHI 与 CBHII 之间的协同作用, 发现同时加入 2 种酶所产生的纤

维二糖总量要高于 2 种酶分子各自产糖量的简单加合<sup>[38]</sup>。Wang 等利用 AFM 技术研究 CBHI、CBHII 和 EGI 三种酶不同的加入顺序, 其协同程度因加入顺序而异<sup>[39]</sup>。

现在, CBHI 酶解结晶纤维素的过程被假设为 6 步, 具体为<sup>[36,40-41]</sup>: a) CBHI 通过 CBM 吸附于微晶纤维素表面, b) CBHI 在纤维表面扩散、通过催化中心发现并识别纤维素链末端, 而后形成酶-微晶纤维素复合物, c) 纤维素链穿线于活性位点通道并形成生产型的酶-底物复合物, d) 糖苷键的水解, e) 释放纤维二糖, f) 下一个纤维二糖单位的穿入并再次形成生产型复合物。步骤 d 与 f 不断循环直到复合物的解聚或者遇到阻碍物。

借助于蛋白纯化、基因突变、Hs-AFM 等技术手段, 已经就酶解机理与酶解过程展开了分子水平上的研究<sup>[42]</sup>。如: 活性通道与起始反应有关的关键氨基酸<sup>[43]</sup>、纤维素结合通道对于纤维素链末端的起始反应<sup>[44]</sup>、预稳态<sup>[35]</sup>以及该酶解起始反应与可持续性反应的限速因子<sup>[36]</sup>。深入研究酶解过程中的限速反应及该限速反应的形成机制, 可以为高比活力 CBH 蛋白质工程优化指明方向, 也可为酶解体系优化, 降低纤维素酶用酶成本提供理论依据。

#### 3.2 木质纤维素酶解效率的影响因素

生物质酶解效率不仅仅取决于酶的可及性与高效性, 也与生物质的结构特征密不可分。生物质的结构特征可分为化学的与物理的。化学特征指的是纤维素、半纤维素、木质素及结合于半纤维素之上的乙酰基团。物理特征指的是表面积、可及性、结晶度、生物基质中木质素的分布、聚合度、孔容积与粒径。一种结构特性的变化会导致其它结构特性的变化。此外, 生物质的异质性与酶的多样性使得充分理解酶与底物的相互作用显得比较困难。因此, 在确定生物质预处理后限速反应的关键影响因子时存在较大的难度<sup>[45]</sup>。限速反应的关键影响因素可能是几个生物质结构特征的综合<sup>[46]</sup>。

##### 3.2.1 微晶纤维素酶解过程中的关键纤维素酶组分

Wang 等利用 *Trichoderma pseudokoningii* S-38 的纤维素酶来酶解经过除蜡去脂处理的棉纤维<sup>[47]</sup>。研究者观察到 CBHs 的酶活在第 2 天及第 4 天时分别下降为起始酶活的 50% 和 15%。在相同的酶解体系中, EG 在 10d 之后才降为起始酶活的 50%, 此后该酶以缓慢的速率持续降低。FPA 与 BGL 的酶活降低趋势与 EG 相似, 不过, FPA 在后期酶活降低的速度比 EG 和 BGL 更快。在其图 1 该文中可以看到, 只有 CBH 的相对酶活总是低于 FPA 的相对酶活。因此, Wang 认为, FPA 活力的降低主要归因于 CBHs 酶活力的降低。由于 FPA 代表着纤维素酶的糖化力, 因此, CBHs 酶活力的降低才是纤维素酶解速率降低的主要因素。不过, 该研究采用的是棉纤维, 因此, 预处理后生物质酶解过程中的关键纤维素酶组分依然需要采用生物质来检测。

##### 3.2.2 纤维素结晶度、晶型对于纤维素酶解的影响

生物质预处理后, 纤维素结晶体的聚集状态 (晶型) 会发生变化。纤维素晶型的变化可能是生物质可酶解性提升的主要因素。

2006 年, Igarashi 采用来源于里氏木霉的 Cel7A (CBH I) 酶解不同晶型的纤维素, 该酶对晶型 Ia 的酶解活性是晶型 Ib 的 2 倍<sup>[48]</sup>。采用水热处理将 Ia 转化为 Ib 后, Cel7A 对其酶解活力与天然纤维素的 Ib 相似。这即就是说, 吸附态 Cel7A 的酶解活力决定于微晶纤维素的晶型。表面强度与特异活性清楚地表明, Ia 更高的降解度主要是由于 Ia 具有更高的酶特异活性而不是由于更大的表面积。更深层次的原因可能是由于 Ia 与 Ib 对于 Cel7A 的 CBD 或 CD 存在着空间位阻的差异。

2007 年, Igarashi 在利用来源于里氏木霉的 Cel7A 进行酶解时, 尽管吸附于纤维素 I 上的纤维素酶量是纤维素 III 酶量的 2 倍多, 而纤维素 III 酶解后纤维二糖的产量是纤维素 I 的 5 倍多, 并且纤维素 III 上的 Cel7A 特异活性 3 倍多地高于纤维素 I<sup>[49]</sup>。采用水热处理将纤维素 III 转化为 Ib 后, 纤维二糖的产量显著下降。这表明, 纤维素 III 提高的酶解率与纤维素晶型结构有关。

纤维素的起始结晶度在酶解反应中发挥着主要的限速作用。不过, 很难得出结晶度是酶解速率的关键决定因素。随着结晶度的增加, 结晶度与起始酶解率的相关性持续下降。在较高的结晶度下, 纤维素样品的酶解活性更低, 酶解可及性更小。纤维素的结晶度与可及性紧密相关<sup>[50]</sup>。广泛认可的是, 相较于无定型纤维素, 高度结晶化的纤维素, 其可及性更低。因此, 结晶度与酶解效率负相关<sup>[45]</sup>。

不过, Kim 的结论与之相反<sup>[51]</sup>。去木质素后, 纤维素结晶度从 43% 增加到 60%, 然而, 增加的结晶度并没有降低酶解第 3 天的糖产量。大量地去除木质素后可以得到高的降解度。而该降解度与乙酰基团以及结晶度无关。因此, 结晶度可以显著的影响起始的酶解速率, 对于最终糖产量的作用较小。

### 3.2.3 木质素对于纤维素酶解的影响

木质素被认为是酶蛋白攻击纤维素的主要空间阻碍物, 因为木质素与纤维素微纤丝紧密相连而降低木质纤维素酶的可及性。通过去除木质素可以提高生物质的可降解性。去除木质素后, 可以促进生物质的溶胀、促使木质纤维素结构的断裂, 增加内部的接触面与孔容积, 降低木质素对于纤维素酶的不可逆吸附, 增大纤维素的酶解可及度<sup>[45]</sup>。

Kumar 的研究结果表明, 在纤维素酶较低的蛋白添加量 (5 FPA/g cellulose) 下, 木质素成分能够显著地影响纤维素的溶胀程度与可及度, 在此情况下, 仅有 16% 的纤维素被酶解。该底物进一步去除木质素后, 纤维素则几乎完全酶解<sup>[52]</sup>。在较低的纤维素酶添加量下, 木质素降低糖产量主要是因为限制酶的可及性与非生产型结合。不过, 当木质素未限制纤维素的膨胀与和酶的可及性时, 纤维素酶在木质素上的吸附作用对于酶解的影响作用降低。在纤维素的可及度提高后, 即使在高浓度的木质素下, 依然能够得到良好的酶解效率。

### 3.3 添加非纤维素酶的多酶体系的优化

添加非纤维素酶组分的酶蛋白, 如非水解酶蛋白

AA9 (auxiliary activity family 9)、木聚糖酶等, 可以显著地促进纤维素的酶解率, 从而大幅度地降低用酶成本。

#### 3.3.1 非水解蛋白对于纤维原料酶解的促进作用

AA9 现在被认为是具有木质纤维素酶活力的酶蛋白<sup>[53]</sup>。AA9 之前被命名为蛋白 GH61。AA9 蛋白可以 7 倍之巨地降低玉米秸秆预处理后纤维素酶的用酶成本<sup>[54]</sup>。由此可见, 积极探索新的非水解蛋白具有重要的意义。研究人员已围绕 AA9 蛋白的多样性、反应机理、结构与功能的关系及该蛋白的基因表达展开了研究。该酶的酶解机理不同于纤维素酶及半纤维素酶的水解活性, 而是一种裂解活性。AA9 酶基因几乎存在于所有的产纤维素酶真菌, 并与纤维素酶、半纤维素酶及其它辅酶共处于同一个调节系统。此外, 扩张蛋白 (Expansins) 及膨胀素 (Swollenin) 也能够增强纤维素酶的酶解<sup>[55]</sup>。其机理可能是扩张蛋白能够打断氢键而降低了纤维素的结晶度并最终增加了纤维素的可及性。

#### 3.3.2 纤维素酶与木聚糖酶之间的酶系优化

木聚糖在纤维素酶作用于纤维素时形成了一定的空间位阻效应<sup>[56]</sup>, 而木寡糖对于纤维素酶具有一定程度的抑制作用<sup>[57-59]</sup>。因此, 木聚糖和木寡糖能够抑制 EGII, CBHI 和 CBHII 并最终显著地降低葡萄糖的产率<sup>[57,59]</sup>。

Hu J 等<sup>[60]</sup>以木聚糖酶的补加方式及部分替代方式来研究该酶对于纤维素酶酶解效果的影响。在补加方式中, 35 mg 的纤维素酶+60 mg 的木聚糖酶获得最高的纤维素及木聚糖水解释率, 分别为 87.1% 与 100%, 2 种酶的协同系数为 1.02。在部分替代方式中, 5 mg 的纤维素酶+30 mg 的木聚糖酶获得最佳的纤维素及木聚糖水解释率, 分别为 82.3% 与 98.6%。此时, 木聚糖酶替代纤维素酶的蛋白量高达 86%, 2 种酶的协同系数为 1.62。由此可见, 采取适当的添加方式与适宜的木聚糖酶添加量, 可以大幅度地降低纤维素酶的用量。

Li J 等<sup>[18]</sup>以氢氧化钠、硫酸、双氧水及蒸汽爆破的方法对甘蔗渣进行预处理, 然后以纤维素酶与木聚糖酶进行混合酶解。在保持纤维素酶与木聚糖酶蛋白总量不变的情况下酶解氢氧化钠预处理原料, 4 份纤维素酶+1 份木聚糖酶所产的葡萄糖量远高于全纤维素酶的葡萄糖产量, 即木聚糖酶可以替代 20% 的纤维素酶。该研究还指出, 木聚糖酶与纤维素酶的协同程度与木聚糖含量、酶解时间有关。而且, 预处理方法可以显著影响 2 种酶的协同作用。

## 4 总 结

1) 外切纤维素酶 (circumscribed cellulose, CBH) 可能是发酵体系中决定滤纸酶活 (filter paper activity, FPA) 高低的关键因子, 同时, 也可能是酶解预处理后木质纤维素体系中决定 FPA 效率的关键因子。纤维乙醇领域中, FPA 是纤维素酶最重要的应用指标, 因此, CBH 可能是决定生物质生化转化领域纤维素酶解效率经济性与高效性最关键的限制酶。CBH 之所以成为限制 FPA 高低的关键因子, 仍需在分子水平上对于酶解机理进行深入的研究。

2) 当前, 中国的研究人员在纤维素酶的基因表达、表达载体的改造及优良宿主菌的构建方面已经取得一定的进展, 但尚未获得商业化的成果。国外公司如诺维信等生产的混合纤维素酶依然不能够满足生物质生化转化领域的用酶要求。

3) 需要借助 Hf-AFM 技术来进一步研究分子水平的木质纤维素酶解机理、酶解过程中的限速反应以及该限速反应的形成机制。揭示限速反应的形成机制和限速反应的关键因素, 可以为高比活力纤维素酶的蛋白质工程优化提供理论支撑。

4) 利用多种手段来揭示自然界木质纤维素腐解的限速反应也具有重要的理论意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] 孙永明, 袁振宏, 孙振钧. 中国生物质能源与生物质利用现状与展望[J]. 可再生能源, 2006, 162(2): 78—82.  
Sun Yongmin, Yuan Zhenhong, Sun Zhenjun. The status and future of bioenergy and biomass utilization in China[J]. Renewable energy, 2006, 126(2): 78—82. (in Chinese with English abstract)
- [2] Wilson D B. Cellulases and biofuels[J]. Current opinion in biotechnology, 2009, 20(3): 295—299.
- [3] Gusakov A V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production[J]. Trends in biotechnology, 2011, 29(9): 419—425.
- [4] 曲音波. 纤维素乙醇产业化[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1098—1108.  
Qu Yinbo. Industrialization of Cellulosic Ethanol[J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(7/8): 1098—1108. (in Chinese with English abstract)
- [5] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels[J]. Nature, 2008, 454(7206): 841—845.
- [6] 曲音波. 木质纤维素降解酶与生物炼制[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 50—61.
- [7] Wang M, Li Z, Fang X, et al. Cellulolytic Enzyme Production and Enzymatic Hydrolysis for Second-Generation Bioethanol Production[J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 2012, 131(128): 1—24.
- [8] Ettema C H, Wardle D A. Spatial soil ecology[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2002, 17(4): 177—183.
- [9] Sun B, Wang X, Wang F, et al. Assessing the relative effects of geographic location and soil type on microbial communities associated with straw decomposition[J]. Applied and environmental microbiology, 2013, 79(11): 3327—3335.
- [10] Montenecourt B S. *Trichoderma reesei* cellulases[J]. Trends in biotechnology, 1983, 1(5): 156—161.
- [11] 曲音波. 木质纤维素降解酶系的基础和技术研究进展[J]. 山东大学学报: 理学版, 2011, 46(10): 160—170.  
Qu Yinbo. Progress in basic and technological research of enzyme system for lignocellulosics biodegradation[J]. Journal of Shandong University: Natural Science, 2011, 46(10): 160—170. (in Chinese with English abstract)
- [12] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38(4): 522—550.
- [13] Mclean D D, Abear K, Podrutzny M F. Fed-batch production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rutgers C-30[J]. The canadian journal of chemical engineering, 1986, 64(8): 588—597.
- [14] 方翎, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 864—969.  
Fang Xu, Qin Yuqi, Li Xuezi, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(7): 864—869. (in Chinese with English abstract)
- [15] Belghith H, Ellouz-Chaabouni S, Gargouri A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 89(2/3): 257—262.
- [16] 杨汝德. 现代工业微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 257—259.
- [17] Blanch H W. Bioprocessing for biofuels[J]. Current opinion in biotechnology, 2012, 23(3): 390—395.
- [18] Li J, Zhou P, Liu H, et al. Ethanol production from xylan-removed sugarcane bagasse using low loading of commercial cellulase[J]. Bioresource technology, 2014, 163(7): 390—394.
- [19] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production[J]. Science, 2007, 315(5813): 801—804.
- [20] Balat M, Balat H, Öz C. Progress in bioethanol processing[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2008, 34(5): 551—573.
- [21] Chapple C, Ladisch M, Meilan R. Loosening lignin's grip on biofuel production[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(7): 746—748.
- [22] 何敏超, 许敬亮, 袁振宏, 等. 纤维素酶基因表达研究进展[J]. 林产化学与工业, 2014, 34(5): 169—174.  
He Minchao, Xu Jingliang, Yuan Zhenhong, et al. Research progress in the expression of cellulase[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2014, 34(5): 169—174. (in Chinese with English abstract)
- [23] Mandels M, Weber J, Parizek R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*[J]. Applied Microbiology, 1971, 21(1): 152—154.
- [24] Hendy N A, Wilke C R, Blanch H W. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30[J]. Enzyme and microbiological Technology, 1984, 6(2): 73—77.
- [25] Fang X, Yano S, Inoue H, et al. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulose production by mutation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(3): 256—261.
- [26] Xin F, Geng A. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2010, 162(1): 295—306.
- [27] Madamwar D, Patel S, Parikh H. Solid State Fermentation for Cellulases and  $\beta$ -Glucosidase Production by *Aspergillus*

- niger[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1989, 67(6): 424–426.
- [28] Pereira B P P, Thabata M A, Priscila S D, et al. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *penicillium echinulatum*[J]. *Bioenergy Research*, 2013, 6(3): 1052–1062.
- [29] Harnpicharnchai P, Champreda V, Sornlake W, et al. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars[J]. *Protein expression and purification*, 2009, 67(2): 61–69.
- [30] Singhanian R R, Patel A K, Sukumaran R K, et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J]. *Bioresource technology*, 2013, 127(1): 500–507.
- [31] Akbarzadeh A, Siadat S O R, Motallebi M, et al. Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2014, 172 (4): 2253–2265.
- [32] Singhanian R R, Sukumaran R K, Rajasree K P, et al. Properties of a major  $\beta$ -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(7): 1521–1524.
- [33] Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(11): 3519–3525.
- [34] Cochet N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile[J]. *Enzyme and Microbiol Technology*, 1991, 13(2): 104–409.
- [35] Cruys-Bagger N, Elmerdahl J, Praestgaard E, et al. Pre-steady-state kinetics for hydrolysis of insoluble cellulose by cellobiohydrolase Cel7A[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(22): 18451–18458.
- [36] Fox J M, Levine S E, Clark D S, et al. Initial-and processive-cut products reveal cellobiohydrolase rate limitations and the role of companion enzymes[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(1): 442–452.
- [37] Kurasin M, Valjamae P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(1): 169–177.
- [38] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, et al. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1279–1282.
- [39] Wang J, Quirk A, Lipkowski J, et al. Direct in situ observation of synergism between cellulolytic enzymes during the biodegradation of crystalline cellulose fibers[J]. *Langmuir*, 2013, 29(48): 14997–15005.
- [40] Jalak J, Kurasin M, Teugjas H, et al. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287(34): 28802–28815.
- [41] Payne C M, Knott B C, Mayes H B, et al. Fungal cellulases[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(3): 1308–1448.
- [42] 孟凡辉, 蒋绪恺, 刘琳, 等. 纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(3): 201–210.
- Meng Fanhui, Jiang Xukai, Liu Lin, et al. The Visual Representation for Cellulase Degradation Velocity and The Analysis for Limiting Factor[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015, 42(3): 201–210. (in Chinese with English abstract)
- [43] Nakamura A, Tsukada T, Auer S, et al. The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2013, 288(19): 13503–13510.
- [44] Ghattyvenkatakrishna P K, Alekozai E M, Beckham G T, et al. Initial recognition of a cellodextrin chain in the cellulose-binding tunnel may affect cellobiohydrolase directional specificity[J]. *Biophysical journal*, 2013, 104(4): 904–912.
- [45] Zhu L, O'Dwyer J P, Chang V S, et al. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 3817–3828.
- [46] Griggs A J, Stickel J J, Lischeske J J. A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics II: cooperative enzyme action, solution kinetics, and product inhibition[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(3): 676–685.
- [47] Wang L, Zhang Y, Gao P, et al. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 90(3): 443–456.
- [48] Igarashi K, Wada M, Hori R, et al. Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses. A critical parameter to evaluate enzymatic kinetics at a solid-liquid interface[J]. *The FEBS journal*, 2006, 273(13): 2869–2878.
- [49] Igarashi K, Wada M, Samejima M. Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase[J]. *FEBS Journal*, 2007, 274(7): 1785–1792.
- [50] Hall M, Bansal P, Lee J H, et al. Cellulose crystallinity—a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate[J]. *FEBS J*, 2010, 277(6): 1571–1582.
- [51] Kim S, Holtzaple M T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(4): 583–591.
- [52] Kumar L, Arantes V, Chandra R, et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 103(1): 201–208.
- [53] Harris P V, Xu F, Kreel N E, et al. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production[J]. *Current opinion in chemical biology*, 2014, 19(4): 162–170.
- [54] Rosgaard L, Pedersen S, Cherry J R, et al. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(2): 493–498.
- [55] Gourlay K, Hu J, Arantes V, et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass[J]. *Bioresource technology*, 2013, 142(4): 498–503.

- [56] Zhang J, Tang M, Viikari L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases[J]. *Bioresource technology*, 2012, 121(2): 8–12.
- [57] Zhang J, Viikari L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Bioresource technology*, 2012, 117(4) 286–291.
- [58] Qing Q, Yang B, Wyman C E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes[J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(24): 9624–9630.
- [59] Shi J, Mirvat A, Ebrik, et al. Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments[J]. *Bioreso-rece technology*, 2011, 102(12): 11080–11088.
- [60] Hu J, Arantes V, Saddler JN. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2011, 4(60): 36.

## Progress of cellulase that using for biomass hydrolysis process

He Minchao, Xu Jingliang, Chen Xiaoyan, Kong Xiaoying, Yuan Zhenhong<sup>\*</sup>,

Zhang Yu, Yu Qiang, Liu Yunyun, Wang Wen

(Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion,  
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effectiveness of enzymatic hydrolysis of cellulose is a key limiting factor for the economical and efficient bioconversion of lignocellulosic materials into fermentable sugars. A group of important factors which could influence the economic and efficiency of the cellulase catalytic reaction was deeply discussed, such as, screening and isolation of strain with a high level of cellulase collected from agricultural field soil or forestry land soil, breeding a hyper cellulase producer after a series of mutation process with a variety of mutation strategies, an engineering singular componet cellulase producing strain constructed by the gene manipulation, factors influencing the cellulase activity in the liquid states fermentation system, the enzymatic hydrolysis mechanism of cellulase especially the important and widely accepted presumption of cellobiohydrolase(CBH) catalytic hydrolysis procedure, the influenza of enzymatic catalytic hydrolysis of lignocellulose after a pretreatment as well as the optimization of the enzymatic hydrolysis mixture. Particularly, both the critical limiting factor of the filter paper cellulase activity in the liquid state fermentation system and the vital limiting single cellulase component in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials after a pretreatment were all deeply discussed from a novel perspective. Comparision and analysis the hyper enzymatic activity of CBH, EG(endo-gluconase), BGL( $\beta$ -glucosidase) as well as FPA(filter paper activity) from a large number of related literatures, it could be presumed that CBH just was the critical enzymatic component which could determine the enzymatic activity of filter paper in the overall fermentation system in the presence of hyper activity of BGL. Furthermore, analyzing the decline rate and the residual activity of CBH、EG、BGL as well as FPA in the enzymatic hydrolysis system, it was assumed that the CBH could also determine the FPA and hence it could be the crucial enzymatic component in the cellulosic materials depolymerizing system. In other words, CBH was not only the critical enzymatic component which plays a crucial part on the enzymatic activity value of FPA but also exerts a critical effect on the enzymatic hydrolysis efficiency in the cellulosic materials after a pretreatment. It is worth mentioning that there is a possibility to demonstrate the spatial distribution of microorganism with a high-level of cellulase in nature. Moreover, it is credible that the FPA value of microorganism isolated from the nature without any mutation ranged from 0.02-5.00 FPIU/mL. In addition, it should be mentioned that the credible FPA value of those hyper producers such as the *Trichoderma reesei* Rut-30 and the *Penicillium decumbens* JU-A10 as well as other notable cellulase producing strains isolated from the nature. To be specific, the filter paper activity (57.00 FPIU/mL) maybe the highest value among a great number of reports throughout the world. Finally, it was highly stressed that the revelation of rate-limiting reaction step of enzymatic hydrolysis procedure and the demonstration of the forming mechanism for the critical limiting factors could be the major focus in the field of biomass bioconversion associated with cellulase catalytic hydrolysis. And hence, the foundation of the mechanisms relevant to the vital limiting reaction step will provide a theoretical guidance for the protein engineering improvement of CBH's catalysis efficiency and specific activity.

**Keywords:** biomass; enzymes; fibers; cellobiohydrolases; cellulase; AA9 lyase; bioconversion