

纤维素酶荧光探针的制备及应用

朱辉^{1,2},徐宋瑶¹,党雅茹²,章燕³,鲁彦⁴,苑琳²,李冠华^{2*}

(1.内蒙古医科大学基础医学院,内蒙古呼和浩特010110;

2.内蒙古大学生命科学学院,牧草与特色作物生物技术教育部重点实验室,内蒙古呼和浩特010070;

3.辽宁省疾病预防控制中心,辽宁沈阳110016;4.汉阳大学土木与环境工程系,韩国首尔04763)

摘要:表征酶与底物有效吸附是认识纤维素酶促水解反应过程、揭示预处理作用机制的重要手段之一。成功构建了纤维素外切酶(Cel7A)、纤维素内切酶(Cel5A)和葡萄糖苷酶(Bgl I)荧光探针,优化吸附条件,并考察其对细胞壁的吸附。结果表明,Cel7A、Cel5A、Bgl I基因N端分别连接至荧光蛋白基因mCherry、eGFP、eBFP C端,依次连入pPICZ α 载体,成功在毕赤酵母(X33)菌株表达;mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A和eBFP-Bgl I荧光探针的最佳激发波长分别为573、469 nm和385 nm,最佳发射波长分别为613、511 nm和447 nm;以滤纸为底物,测定最佳吸附浓度分别为0.058、0.19 U/mL和1.93 U/mL,最佳吸附时间分别为7、7 min和6 min,最佳观察时间分别为<2 min、<12 s和<12 s。纤维素酶荧光探针能够结合生物质样品,并反应出不同底物与纤维素酶亲和力的差异。上述工作为生物质抗降解屏障、生物质预处理、纤维素高效酶促水解等研究提供了技术支持。

关键词:异源表达;纤维素酶;荧光探针;细胞壁;酶吸附

中图分类号:Q7

文献标志码:B

文章编号:0253-4320(2024)S1-0269-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2024.S1.049

Preparation and application of cellulase fluorescent probe

ZHU Hui^{1,2}, XU Song-yao¹, DANG Ya-ru², ZHANG Yan³, LU Yan⁴, YUANG Lin², LI Guan-hua^{2*}

(1.Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2.Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China; 3.Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110016, China; 4.Department of Civil and Environmental Engineering, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea)

Abstract: Characterization of the valid adsorption between enzyme and substrate is one of the most important strategies to understand the process of cellulase catalyzing hydrolysis reaction and reveal the mechanism of pretreatment. In this research, cellulose exoenzyme (Cel7A), cellulose endonuclease (Cel5A) and glucosidase (Bgl I) fluorescent probes are successfully constructed. The adsorption conditions are optimized and their adsorption on cell wall are also observed. Results show that N-terminal of Cel7A, Cel5A and Bgl I genes are connected to C-terminal of mCherry, eGFP and eBFP fluorescent protein genes, respectively, and successfully expressed in *Pichia pastoris* (X33). The optimal excitation wavelengths of mCherry-Cel7A, eGFP-Cel5A and eBFP-Bgl I fluorescent probes are 573 nm, 469 nm and 385 nm, respectively and their optimal emission wavelengths are 613 nm, 511 nm and 447 nm, respectively. Using filter paper as substrate, the optimal adsorption concentrations are 0.058 U · mL⁻¹, 0.19 U · mL⁻¹ and 1.93 U · mL⁻¹, respectively for these probes, the optimal adsorption time is 7 min, 7 min and 6 min, and the optimal observation time is <2 min, <12 s and <12 s, respectively. Fluorescent probes can bind to biomass samples, reflecting the adsorption affinity between cellulase and substrates. This work provides technical support for biomass anti-degradation barrier, biomass pretreatment and cellulase catalyzing hydrolysis reaction.

Key words: heterologous expression; cellulase; fluorescent probe; cell wall; enzyme adsorption

传统化石能源储量有限,人类不断开采会使其日益枯竭。木质纤维素类生物质是世界上分布最广、产量最大的可再生资源,是当前纤维素乙醇、生物沼气等新能源开发的重要原料^[1-2]。现阶段,受国际油价波动、收集成本偏高、政策的不确定性、加工技术不成熟等因素的影响,纤维素燃料乙醇发展并未达到理想高度。然而,作为地球上储量最多的可利用糖平台原料,纤维素经酶促水解反应转化制备可发酵糖,对于粮食安全、养殖业发展、环境保护

和能源开发都具有重要的现实意义^[3]。纤维素是一种由D-葡萄糖残基通过 β -1,4糖苷键连接而成的线性多糖^[4],分子内和分子间通过复杂的氢键相互连接^[5],进一步与半纤维素和木质素相互作用,使得纤维素酶促水解反应效率较低^[6-8]。解析抑制纤维素酶促水解反应的关键顽抗因子,揭示其特殊性以及在预处理过程中的变化规律,是高效制备纤维素可发酵糖的首要基础科学问题。

纤维素酶促水解是发生在细胞壁界面的由表及

收稿日期:2024-02-26;修回日期:2024-06-06

作者简介:朱辉(1999-),女,硕士生,研究方向为生物学,15647411551, zhuhui6922@163.com;李冠华(1984-),男,博士,副教授,研究方向为微生物酶工程及生物质新能源开发,通讯联系人,15389818385, liguanhua1984@126.com。

里的逐层反应,是纤维素酶对细胞壁的降解,表现为纤维素以单糖或低聚糖形式的释放^[9]。纤维素酶与细胞壁界面作用是一个单分子层的物理性吸附,这种有效吸附“代替”了酶-底物复合物的形成,是整个反应的决定步骤与限速步骤,影响着纤维素酶促水解反应效率^[10-11]。表征底物对酶的可及性是研究纤维素酶促水解反应抑制因子的重要方面。传统研究方法包括 X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱和扫描电镜^[12]等,这些方法需要前处理样品,且主要表征生物质的化学组成以及纤维素的物理性质;保水法和比表面积法虽然可以通过分析比表面积和孔径大小间接反应底物对酶的可及性,但水和氮气分子直径远小于纤维素酶;Simons' 法通过染料的竞争吸附来评价底物对酶的可及性,但只能进行半定量测定,且准确性易受孔形状的影响^[13-14]。也有文献报道利用纤维素酶碳水化合物结合模块(CBMs)构建荧光探针,表征底物与酶的可及性^[15-16],但是围绕外切 β -1,4-葡聚糖酶(Cel7A, EC 3.2.1.91)、内切 β -1,4-葡聚糖酶(Cel5A, EC 3.2.1.4)和 β -葡萄糖苷酶(Bgl I, EC 3.2.1.21)的研究还有待深入。

随着基因工程技术的不断发展,外源表达也不断受到重视。大肠杆菌表达系统是最常用的,但与之相比在表达真核生物的蛋白时,酵母系统具有将蛋白分泌到胞外^[17]且可以对表达蛋白进行加工、修饰和折叠,不易形成包涵体,使得表达的蛋白具有活性等优势^[18]。

本论文将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的 Cel7A、Cel5A 和 Bgl I 基因序列分别与红色(mCherry)、绿色(eGFP)和蓝色荧光蛋白(eBFP)融合构建重组质粒,在毕赤酵母 X33 异源表达,获得 3 种纤维素酶荧光探针;优化荧光探针的吸附条件,并考察纤维素酶荧光探针对不同底物的吸附情况,以期对纤维素底物可及性的表征提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

Cel7A (GenBank: NW-006711176.1)、Cel5A (GenBank: NW-006711150.1) 和 Bgl I (GI: 3293367) 序列,生工生物工程(上海)股份有限公司合成;mCherry 质粒、eGFP 质粒、eBFP 质粒、毕赤酵母 X33 菌株、大肠杆菌 DH5 α , 本实验室收藏;pPICZ α 约 3.6 kb, 优宝生物,具有 zeocin 抗性

基因^[19]。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性核酸内切酶 EcoR I、Not I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、蛋白 Marker、DNA Loading Buffer、Protein Loading Buffer 和 EasyPure Quick Gel Extraction Kit, 购自北京全式金生物技术有限公司;Pme I 购自 New England Biolabs;质粒小提试剂盒(DP103)和酵母基因组提取试剂盒(DP307)购自天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂为国产分析纯以上。

1.1.3 培养基和培养条件

LB 固体培养基(1 L): 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 15 g, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

YPD 固体培养基(1 L): 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 115 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min。

BMGY 液体培养基(1 L): 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 10 \times YNB(无氨基酵母氮源) 100 mL, 10 \times 甘油 100 mL, 500 \times 生物素 2 mL; 无菌水 700 mL, 1 mol/L 磷酸盐缓冲液 100 mL, 115 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min。

BMMY 液体培养基(1 L): 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 10 \times YNB 100 mL, 500 \times 生物素 2 mL; 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0) 100 mL, 甲醇 5 mL, 无菌水 800 mL, 115 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min。

1.1.4 菌株构建所需引物

引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
mCherry-Cel7A-F	5'-TCGAGCTCAAGCTTCGAATTCATGCACCAT-3'
mCherry-Cel7A-R	5'-GATCTAGAGTCGCGGCCGCTACTTGTACAG-3'
eGFP-Cel5A-F	5'-AGCTCAAGCTTCGAATTCATGCACCATCAC-3'
eGFP-Cel5A-R	5'-TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACTTGTACAG-3'
eBFP-BglI-F	5'-AGCTCAAGCTTCGAATTCATGCACCATCAC-3'
eBFP-BglI-R	5'-TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACTTGTACAG-3'
5'AOX	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
3'AOX	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

1.2 方法

1.2.1 纤维素酶重组质粒的构建

对合成的基因进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,并回收产物将 Cel7A、Cel5A、Bgl I 分别克隆到 mCherry、eGFP 和 eBFP 载体上,构建 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A、eBFP-Bgl I 重组克隆载体,热激转化至 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞中,筛选阳性克

隆进行 PCR 鉴定以及测序验证。

1.2.2 表达载体质粒的构建

利用设计合成的引物从克隆成功的重组荧光质粒中进行 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A 和 eBFP-Bgl I 的 PCR 扩增,胶内回收扩增的目的片段,利用 EcoR I 和 Not I 进行双酶切以产生粘性末端。提取载体质粒 pPICZ α A 同样也进行双酶切处理,产生和目的片段相同的粘性末端。双酶切完成后对目的片段和空载体都用琼脂糖凝胶电泳鉴定和胶回收纯化,在 16℃ 条件下利用 T4 连接酶进行连接。最后将连接产物 pPICZ α A-Cel7A-mCherry、pPICZ α A-Cel5A-eGFP、pPICZ α A-Bgl I-eBFP 转化到 *E. coli* 感受态细胞中。筛选阳性克隆进行质粒抽提、双酶切验证及 PCR 鉴定。DNA 测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2.3 酵母的转化及重组子的筛选

用质粒小提试剂盒从含有 pPICZ α A-Cel7A-mCherry、pPICZ α A-Cel5A-eGFP、pPICZ α A-Bgl I-eBFP 质粒的 *E. coli* DH5 α 中提取质粒。用 Pme I 酶切获得线性化质粒,并电转入毕赤酵母感受态,涂布于含博来霉素的 YPD 平板,30℃ 下静置培养 3~4 d。在平板上筛选重组转化子,在液体培养基中扩大培养,用试剂盒提取酵母基因组为模板,进行 PCR 鉴定。

1.2.4 重组转化子的诱导表达

将构建成功的三株重组菌株及空载体质粒菌株过夜活化。按 1% 的接种量接到含 50 mL BMGY 培养基的 500 mL 锥形瓶中,30℃、250 r/min 震荡培养 24 h 后离心收集菌体。用 1 mol 的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)洗涤菌体,然后全部转移至 100 mL BMMY 培养基中,30℃、250 r/min 震荡培养 8 d;每间隔 24 h 补加 1 次甲醇使其终浓度为 1%,并取一次样,共取样 8 次,用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

1.2.5 纤维素酶荧光探针吸附的条件优化

本实验使用 SPARK 多模式微孔板酶标仪测定不同波长的荧光强度,并绘制荧光发射光谱图。滤纸制成 8 μ m 厚的冷冻切片,滴加 3 μ L 酶液,避光吸附 8 min 后少量蒸馏水冲洗 2 遍,待水完全蒸干,使用荧光显微镜从不同吸附时间、不同吸附浓度以及荧光的猝灭时间(每个实验条件下设置 3 个平行)三个角度确定观察的最优条件。

1.2.6 纤维素酶荧光探针针对不同预处理样品的吸附表征

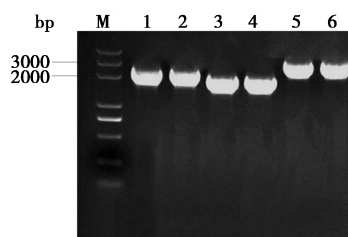
选取冰草、羊草、羊茅、西瓜茎和甜菜根制成

8 μ m 厚的冷冻切片作实验材料,测定纤维素酶荧光探针对不同植物的吸附表征。20 μ L 纤维素酶荧光探针滴到切片上,避光吸附 1 h 后蒸馏水轻冲 2 遍。待切片完全晾干,相同条件下使用激光共聚焦显微镜拍摄,观察荧光探针对同种植物不同组织以及不同植物相同组织的吸附情况。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增及重组表达载体的构建

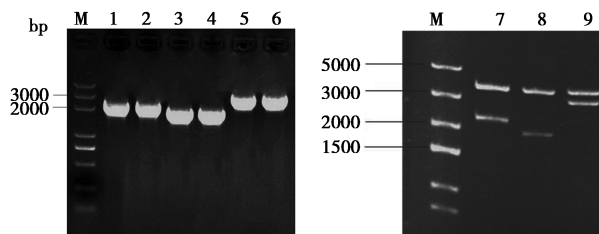
以 *E. coli* DH5 α 质粒为模板,使用相应引物扩增 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A、eBFP-Bgl I 基因,扩增产物检测结果如图 1 所示,可知 mCherry-Cel7A 长度约为 2 300 bp, eGFP-Cel5A 长度约为 2 000 bp, eBFP-Bgl I 长度约为 3 000 bp,与理论值相符^[20]。



M—DNA 分子量标准;1、2—pPICZ α A-Cel7A-mCherry;
3、4—pPICZ α A-Cel5A-eGFP;5、6—pPICZ α A-Bgl I-eBFP

图 1 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A、
eBFP-Bgl I 的 PCR 鉴定

利用引物扩增的 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A、eBFP-Bgl I 分别和 pPICZ α A 表达载体连接得到重组表达载体,转入大肠杆菌后使用载体通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行菌落 PCR 验证,结果如图 2(a) 所示, mCherry-Cel7A 和 eGFP-Cel5A 在近 2 000 bp 处有明显条带, eBFP-Bgl I 在近 3 000 bp 处有明显



(a) PCR 电泳图

(b) 双酶切电泳图

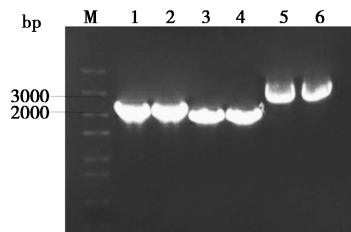
M—DNA 分子量标准;1、2、7—pPICZ α A-Cel7A-mCherry;
3、4、8—pPICZ α A-Cel5A-eGFP;5、6、9—pPICZ α A-Bgl I-eBFP

图 2 pPICZ α A-Cel7A-mCherry、
pPICZ α A-Cel5A-eGFP、pPICZ α A-Bgl I-eBFP 的
PCR 和双酶切鉴定

条带,与理论值相符;进一步使用 Not I 和 EcoR I 对 pPICZαA - Cel7A - mCherry、pPICZαA - Cel5A - eGFP、pPICZαA - Bgl I - eBFP 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳[图 2(b)]显示双酶切有两条带,且条带大小与预期分子量相符。

2.2 重组毕赤酵母菌株的筛选及目的蛋白的诱导表达

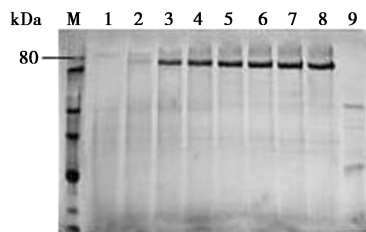
经含博来霉素抗性的 YPD 平板筛选的酵母转化子,提取重组酵母基因组 DNA,使用 5' AOX 和 3' AOX 引物进行 PCR 鉴定,结果如图 3 所示,在 2 000~3 000 bp 之间有明显条带,分别与 mCherry - Cel7A 预期分子量 2 230 bp、eGFP - Cel5A 预期分子量 1 938 bp、eBFP - Bgl I 预期分子量 2 976 bp 相符。



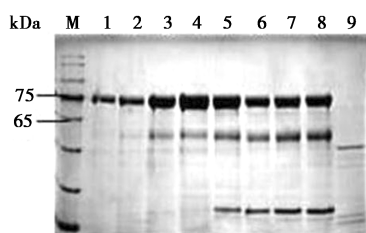
M—DNA 分子量标准;1,2—mCherry-Cel7A;
3,4—eGFP-Cel5A;5,6—eBFP-Bgl I

图 3 X33/pPICZαA-Cel7A-mCherry、
X33/pPICZαA-Cel5A-eGFP、X33/pPICZαA-
Bgl I -eBFP 的 PCR 鉴定

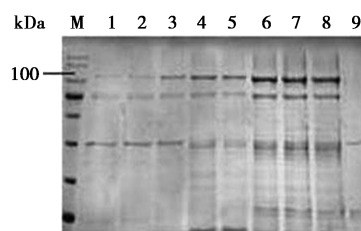
选择此 3 种菌株进行诱导表达,条件为:30℃、250 r/min、1.0%甲醇,表达 8 d。将诱导表达上清液进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示,Cel7A、Cel5A 和 Bgl I 分别在 80、70、106 kDa 处出现条带,并且诱导时间越长,条带越粗。所有条带均符合预期,表明重组菌株构建成功且表达成功。



(a) pPICZαA-Cel7A-M



(b) pPICZαA-Cel5A-eGFP



(c) pPICZαA-Bgl I -eBFP

横坐标:M—蛋白分子量标准;1~8—不同诱导时间/d;
9—对照(pPICZαA)
纵坐标:分子量/kDa

图 4 不同重组菌株诱导表达情况

2.3 纤维素酶荧光探针吸附条件的优化

实验测定了 3 种荧光探针的激发波长和发射波长,由图 5(a)可知,红色荧光探针 mCherry - Cel7A 的最佳激发波长为 573 nm,最佳荧光发射波长为 613 nm;绿色荧光探针 eGFP - Cel5A 的最佳激发波长为 469 nm,最佳发射波长为 511 nm;蓝色荧光探针 eBFP - Bgl I 的最佳激发波长为 385 nm,最佳发射波长为 447 nm。同时探究吸附浓度、吸附时间和猝灭时间对荧光强度的影响,结果如图 5(b)~图 5(d)所示,随着纤维素酶荧光探针浓度的增大,荧光强度逐步增加[图 5(b)],mCherry - Cel7A 最佳吸附浓度为 0.058 U/mL,eGFP - Cel5A 最佳吸附浓度为 0.193 U/mL,eBFP - Bgl I 最佳吸附浓度为 0.193 U/mL。吸附底物的分析值随着吸附时间的延长而加强[图 5(c)],吸附时间在 7 min 和 8 min 时,mCherry - Cel7A 和 eGFP - Cel5A 荧光值无明显变化;吸附时间在 6 min 和 7 min 时,eBFP - Bgl I 荧光值无明显变化。用最佳吸附时间和最佳吸附浓度对滤纸底物进行吸附,观察吸附后荧光的猝灭。荧光随着激发光照射时间的延长而逐渐猝灭,分析荧光强度值随着激发光照射时间的延长而逐渐减小[图 5(d)]。从图中可以看出 mCherry - Cel7A 的最佳观察时间在 2 min 以内,eGFP - Cel5A 和 eBFP - Bgl I 的最佳观察时间均在 12 s 以内。综上所述,mCherry - Cel7A 的最佳吸附浓度为 0.058 U/mL,最佳吸附时间为 7 min,最佳观察时间在 2 min 以内;eGFP - Cel5A 的最佳吸附浓度为 0.193 U/mL,最佳吸附时间为 7 min,最佳观察时间在 12 s 以内;eBFP - Bgl I 的最佳吸附浓度为 0.193 U/mL,最佳吸附时间为 6 min,最佳观察时间在 12 s 以内。

2.4 纤维素酶荧光探针对于不同植物的吸附表征

样品选用冰草、甜菜根、西瓜茎、羊草和羊茅,将其制成 8 μm 厚的冷冻切片,使用纤维素酶荧光探

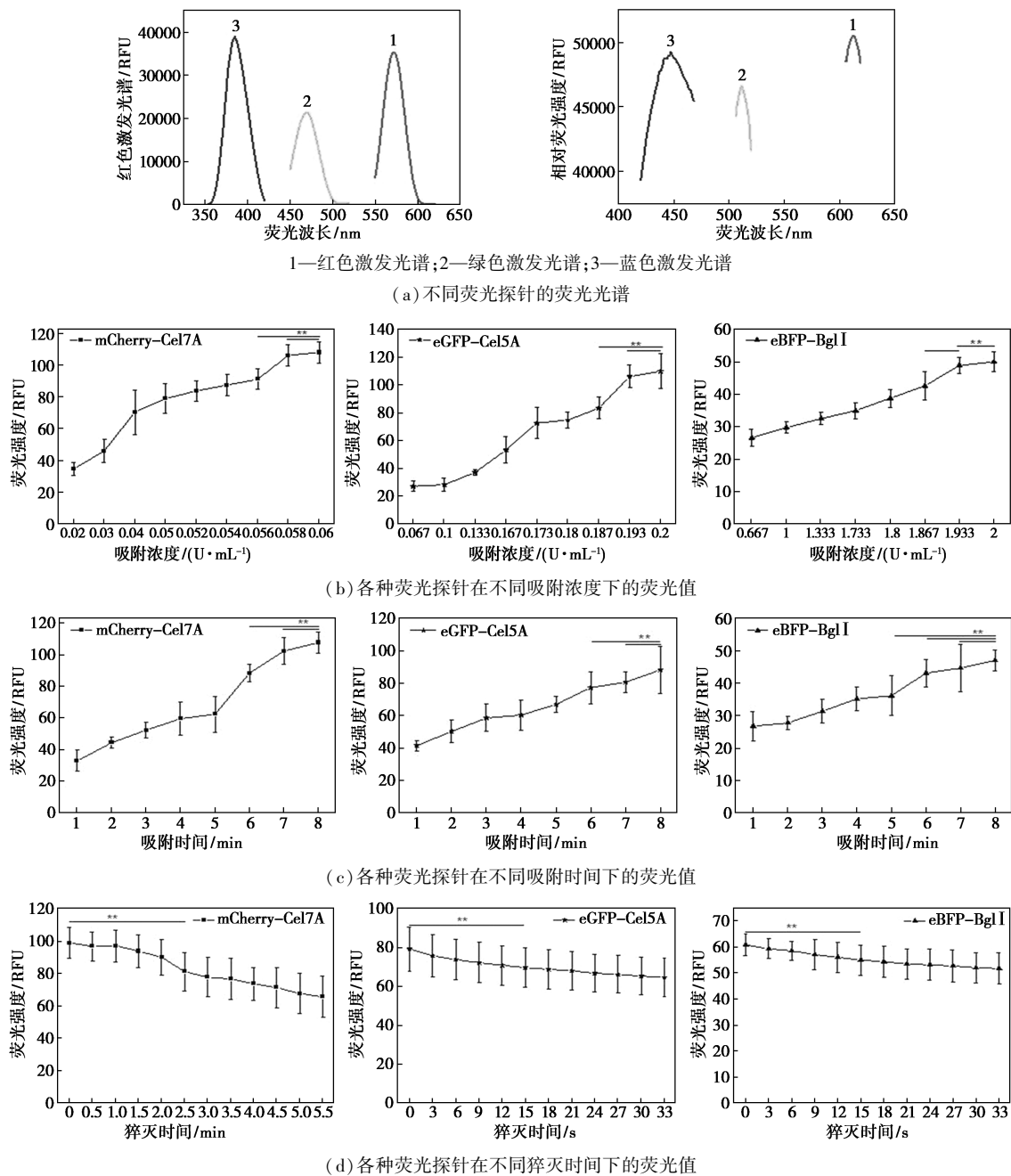


图5 不同荧光探针的吸附条件

针进行避光吸附 1 h,使用激光共聚焦显微镜拍摄观察,在有厚壁组织(ST)的冰草和羊草中, mCherry-Cel7A 和 eGFP-Cel5A 对其荧光值均为厚壁组织(ST) > 维管束(VT) > 薄壁组织(PT), mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A、eBFP-Bgl I 对 4 种植物的荧光强度均为 VT > PT。

3 结论

生物质资源取代日益枯竭的化石资源成为一个必然趋势,但是在利用生物质时,需要将生物质进行预处理,才可以高效降解成糖^[21]。我们建立了基于

纤维素酶的荧光分析方法表征预处理效果,优化预处理工艺。研究表明,纤维素的结合域 CBM 可以构建探针分子表征纤维素^[22],但是外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶的 CBM 具有高度保守性,无法判断不同纤维素酶组分对底物的吸附特点,以及不同酶组分间的协同机制^[23]。针对这一难题,我们通过基因工程的方法构建了 pPICZ α A-Cel7A-mCherry、pPICZ α A-Cel5A-eGFP、pPICZ α A-Bgl I-eBFP 重组表达载体,在毕赤酵母中表达了 mCherry-Cel7A、eGFP-Cel5A 和 eBFP-Bgl I 纤维素酶荧光探针。通过考察 3 种纤维素酶荧光探针在不同吸附浓度、不

同吸附时间及猝灭时间下荧光强度的变化,确定了其最佳吸附条件。将构建成功的纤维素酶荧光探针应用于几种常见的植物,比较不同组织的荧光强度推测纤维素酶可及性,用 3 种纤维素酶荧光探针吸附不同样品,荧光强度大小与纤维素酶的吸附量相关,利于直接反应纤维酶的吸附特点^[24-25]。比较不同组织的荧光强度推测纤维素酶可及性,结果发现厚壁组织(ST)比其他组织荧光值更高。构建的纤维素酶荧光探针吸附于不同预处理样品,结果发现荧光强度随着预处理程度加强逐渐变亮,这是因为细胞壁被破坏,纤维素中木质素和半纤维素的含量逐渐降低,使纤维素暴露在表面,从而结合更多的纤维素酶。

本研究利用酵母表达系统构建 3 种纤维素酶荧光探针,通过作用于不同底物确定 3 种纤维素酶针对不同组织的吸附程度,并且通过荧光观察使结果可视化,为研究生物质抗降解屏障、优化预处理工艺、揭示酶促水解反应机制提供了技术支持。

参考文献

- [1] Saravanan A, Yaashikaa P R, Kumar P S, *et al.* Techno-economic and environmental sustainability prospects on biochemical conversion of agricultural and algal biomass to biofuels[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 414: 137749.
- [2] Carafa R N, Foucher D A, Sacripante G G. Biobased polymers from lignocellulosic sources[J]. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 2023, 16(1): 2153087.
- [3] Velvizhi G, Jacqueline P J, Shetti N P, *et al.* Emerging trends and advances in valorization of lignocellulosic biomass to biofuels[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 345, 345: 118527.
- [4] Seidl P R, Goulart A K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts[J]. *Current Opinion in Green & Sustainable Chemistry*, 2016, 17: 48-53.
- [5] Østby H, Vármai A. Hemicellulolytic enzymes in lignocellulose processing[J]. *Essays in Biochemistry*, 2023, 67(3): 533-550.
- [6] Ojo A O. An overview of lignocellulose and its biotechnological importance in high-value product production[J]. *Fermentation*, 2023, 9(11): 990.
- [7] Xiao W D, Sun R, Hu S H, *et al.* Recent advances and future perspective on lignocellulose-based materials as adsorbents in diverse water treatment applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(P3): 126984.
- [8] Sethi S, Datta A, Gupta B L, *et al.* Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil[J]. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 13: 1076-1082.
- [9] Wang Y F, Xu X Y, Xue H T, *et al.* Physical-chemical properties of cell wall interface significantly correlated to the complex recalcitrance of corn straw[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 196.
- [10] 钱倩倩, 杜宇明, 吴晗, 等. 甜菜细胞壁界面特征显著影响纤维素酶解效率[J]. *农业工程学报*, 2022, 38(12): 325-331.
- [11] Qian Q Q, Yuan L, Chen Y F, *et al.* Physical and chemical evolution of sugar beet pulp during aqueous ammonia pretreatment and its impacts on the recalcitrance of cellulose[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2023, 168: 106678.
- [12] Cai J L, Wang Y, Liu J, *et al.* Pretreatment enhanced structural disruption, enzymatic hydrolysis, fermentative hydrogen production from rice straw[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(23): 11778-11786.
- [13] Wu J, Dong Y T, Zhang H Y, *et al.* Reduced cellulose accessibility slows down enzyme-mediated hydrolysis of cellulose[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 371: 128647.
- [14] Thomsen S T, Weiss N D, Zhang H, *et al.* Water retention value predicts biomass recalcitrance for pretreated biomass: Biomass water interactions vary based on pretreatment chemistry and reflect composition[J]. *Cellulose*, 2021, 28(1): 317-330.
- [15] Yogesh B C, Aniko V, Morten S, *et al.* Engineering cellulases for conversion of lignocellulosic biomass[J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 2023, 36(36): 2.
- [16] Khatri V, Meddeb-Mouelhi F, Beaugard M. New insights into the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polymers by using fluorescent tagged carbohydrate-binding modules[J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2018, 2(2): 479-491.
- [17] Li T, Liu N, Ou X J, *et al.* Visualizing cellulase adsorption and quantitatively determining cellulose accessibility with an updated fungal cellulose-binding module-based fluorescent probe protein[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 1-14.
- [18] Karbalaeei M, Rezaee S A, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [19] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5301-5317.
- [20] Vallet-Courbin A, Larivière M, Hocquet A, *et al.* A recombinant human anti-platelet SCFV antibody produced in *Pichia pastoris* for atheroma targeting[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): 170305.
- [21] Deng W, Feng Y, Fu J, *et al.* Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels[J]. *Green Energy & Environment*, 2023, 8(1): 10-114.
- [22] Davison S A, Den H R, Van Z W H. Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8241-8254.
- [23] Mboowa D, Khatri V, Saddler J N. The use of fluorescent protein-tagged carbohydrate-binding modules to evaluate the influence of drying on cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(45): 27152-27160.
- [24] Hackl M, Contrada E V, AsH J E, *et al.* Acoustic force spectroscopy reveals subtle differences in cellulose unbinding behavior of carbohydrate-binding modules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119(42): e2117467119.
- [25] Lin Y, He J, Xu J L, *et al.* A novel method to prepare water-soluble cellulose-based fluorescent probes for highly sensitive and selective detection and removal of Hg²⁺/Hg₂²⁺ ions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 247: 125764. ■