

植物/微生物源活性蛋白协同纤维素酶水解木质纤维素的研究进展

孙付保^{1,2}, 毛忠贵^{1,2}, 张建华^{1,2}, 唐 蕾^{1,2}, 张宏建^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122;
2. 江南大学生物工程学院发酵与生态工学研究室, 江苏 无锡 214122)

摘要:综述了微生物源活性蛋白(水解酶和酶促因子)和植物源活性蛋白(水解酶和酶促因子)分别应用于木质纤维素-糖平台的研究进展,总结了植物/微生物源活性蛋白协同纤维素酶水解木质纤维素的作用机制,并对由植物/微生物源活性蛋白组合构建经济高效的纤维素酶水解体系进行了展望。

关键词:植物/微生物内源性;木质纤维素;水解酶;酶促因子;协同酶解

中图分类号:TQ351.36

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2010)11-0023-06

Progress in enzymatic hydrolysis of lignocellulose with cellulase in synergism with plant or/and microbe originated active protein

SUN Fu-bao^{1,2}, MAO Zhong-gui^{1,2}, ZHANG Jian-hua^{1,2}, TANG Lei^{1,2}, ZHANG Hong-jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China; 2. 江南大学生物工程学院发酵与生态工学研究室, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the advances in microbe-originated active protein (including hydrolytic enzyme and enzymatic activator) and plant-based active protein (including hydrolytic enzyme and enzymatic activator) applied in the lignocellulose-to-sugar platform are reviewed respectively. The synergetic mechanism between plant/microbe originated active protein and cellulases during enzymatic hydrolysis of lignocellulose is concluded. The future application of plant and microbe originated active protein in assisting cellulases to construct an economic-efficient lignocellulose-to-sugar platform is outlooked.

Key words: plant/microbe origination; lignocellulose; hydrolytic enzyme; enzymatic activator; synergetic enzymatic hydrolysis

在当今社会,以可再生生物质资源作为原料,利用生物炼制技术大规模生产生物能源和生物基产品(生物燃料、生物基化学品和生物基材料)已成为国际上研究热点,以生物质资源为基本原料的生物炼制已渐渐凸显其优势,一个全球性的产业革命正在朝着以碳水化合物为基础的经济发展^[1-3]。然而,由于木质纤维素复杂的理化组成和多级结构的致密不均一性,致使当前在推进纤维质生物炼制工业化过程中面临一系列问题^[4-6]。其中木质纤维素酶水解问题,包括产酶成本、酶用量和单位酶比活力等,是目前仅次于预处理问题(组分分离技术的经济性、高效性和环境友好)的瓶颈性难题^[7-9]。

为了减少纤维素酶用量和提高酶解效率,国内外许多研究者开展了纤维素酶协同水解方面的研究,但主要集中在2方面^[10-11]:①纤维素酶各组分之间协同作用^[12-14];②外加木聚糖酶和 β -葡萄糖

苷酶等水解酶与纤维素酶的协同作用^[15-18]。尽管已经注意到不同来源和不同种类的水解酶相复合在木质纤维素酶解产糖过程中具有积极的影响,但对水解酶来源和种类方面的认识还很有限,比如:尚未关注微生物源 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、普鲁兰酶、酸/中性蛋白酶、酯酶和脂肪酶在辅助纤维素酶水解木质纤维素的积极作用以及植物内源性水解蛋白(水解酶和酶促因子)在木质纤维素水解方面的积极作用等。

基于此,本文分别就目前微生物源活性蛋白和植物源活性蛋白在纤维素酶酶解过程中已表现出的协同作用进行综述,并就它们与纤维素酶相协同作用的有关机理进行总结。在此基础上,对构建纤维素酶主导的复合酶体系(植物源活性蛋白+微生物源活性蛋白)在木质纤维素-糖平台方面的应用前景进行了展望。

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(20906041);国家高技术研究发展计划("863")资助项目(2008AA10Z338)

作者简介:孙付保(1975-),男,博士,副教授,从事纤维质可再生资源生物炼制生物能源和生物产品的研究工作, fubaosun@jiangnan.edu.cn。

1 微生物源纤维素酶主导的活性蛋白协同木质纤维素水解

1.1 纤维素酶自身组分的协同作用

纤维素酶一般含有 3 个组分:①外切 β -1,4-葡聚糖酶或纤维二糖水解酶(CBH),它沿着纤维素链行进,从还原端或非还原端水解结晶纤维素,释放纤维二糖;②内切 β -1,4-葡聚糖酶(EG),它作用于纤维素链上的 β -1,4-葡聚糖苷键,随机水解无定形纤维素,释放纤维寡糖形成新的还原端;③ β -1,4-葡萄糖苷酶(BGL)或纤维二糖酶(CB),主要水解纤维二糖、纤维寡糖和其他低聚糖,产生葡萄糖。酶解过程中,这些纤维素酶组分通过互相提供新可及部位、除去障碍和消除产物抑制等多种方式协同作用于纤维素底物,从而提高酶解转化率。

纤维素酶协同机制非常复杂,目前在纤维素水解过程中已发现的纤维素酶协同作用方式有:①内切-外切的协同作用,发生在内切葡聚糖酶与外切葡聚糖酶之间;②外切-外切的协同作用,发生在分别作用于纤维素链还原端与非还原端的外切葡聚糖酶之间;③内切-内切的协同作用,发生在不同内切葡聚糖酶之间;④内切或外切酶与 β -葡萄糖苷酶的协同作用,即消除内、外切酶终产物纤维二糖反馈抑制的影响;⑤催化结构域-结合结构域的协同或 2 个催化结构域之间的分子内部协同;⑥纤维素-酶-微生物的协同;⑦近距离协同作用,由形成的纤维素酶复合物产生。

通过不同纤维酶之间的协同作用,在提高糖化效率的同时还可以减少反应中间产物的抑制作用^[19],目前已有许多研究者在纤维素酶自身各组分协同作用方面进行着卓有成效的研究^[12,14,20-21]。

1.2 纤维素酶与其他水解酶的协同性

一些研究者在关注木质纤维素-糖平台酶解问题的过程中,逐步认识到不同来源纤维素酶系的

同酶种类及各组分间的协同能力差异^[12,14]。于是通过外加木聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、果胶酶和阿魏酸酯酶等水解酶作为纤维素酶的辅助酶,对木质纤维素的复合酶水解进行了初步探索^[22-26]。

Yu 等^[22]研究了阿魏酸酯酶(*Aspergillus Ferulic Acid Esterase*)和木聚糖酶(*Trichoderma Xylanase*)对纤维素酶水解燕麦壳产糖的影响。结果发现,阿魏酸酯酶单独存在时,仅能使燕麦壳释放出少量阿魏酸(碱粗抽提阿魏酸的 0.8%),但不能使纤维质水解产生还原糖;但添加适量木聚糖酶时,同样的阿魏酸酯酶明显增加了阿魏酸产量(分别为碱粗抽提阿魏酸的 3.8% 和 15.0%)。同时添加阿魏酸酯酶和木聚糖酶时发现,添加木聚糖和阿魏酸酯酶对不同用量的纤维素酶酶解燕麦壳产糖均有显著的促进作用,其中同时添加木聚糖酶和阿魏酸酯酶时,使纤维素酶水解燕麦壳的还原糖产率由独自水解的 38.6% 增加到 73.4%。另外,Tabka 等^[23]通过用纤维素酶、木聚糖酶、阿魏酸酯酶和氧化还原酶(*laccases from Pycnoporus cinnabarinus*)对汽爆预处理麦草酶解糖化进行研究,发现木聚糖酶和阿魏酸酯酶均能促进纤维素酶酶解麦草,二者共同作用时能使纤维素酶酶解率提高 40% 以上;但添加漆酶反而对纤维素酶酶解起抑制作用,原因可能是漆酶水解麦草释放出的抑制性酚基化合物降低了纤维素酶等水解酶酶活力,替代办法是采用顺次处理法避免漆酶水解物的抑制作用,即首先用漆酶处理,水洗后再添加其他辅助酶来促进纤维素酶酶解。Wilkins 等^[24]在纤维素酶中补充 β -葡萄糖苷酶和果胶酶,比较了这几种酶在不同剂量下对废弃果皮的酶解效率,并优化了酶载量,发现 1 g 干料添加 2 mg 纤维素酶、5 mg 果胶酶和 2.1 mg β -葡萄糖苷酶可得到较高的酶解效率。

Berlin 等^[25]评估了源于 2 种真菌(*Trichoderma* and *Penicillium* spp)的 7 个纤维素酶制剂对蒸汽汽爆

(上接第 22 页)

- [24] Zhang J M, Zhang S J, Dong K, et al. Supported absorption of CO₂ by tetrabutylphosphonium amino acid ionic liquids[J]. Chem Eur J, 2006, 12: 4021 - 4026.
- [25] Gurkan B E, Schneider W F, Brennecke J F, et al. Equimolar CO₂ absorption by anion-functionalized ionic liquids[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132: 2116 - 2117.
- [26] Baltus R E, Culbertson B H, DePaoli D W, et al. Low-pressure solubility of carbon dioxide in room-temperature ionic liquids measured with a quartz crystal microbalance[J]. J Phys Chem B, 2004, 108:

721 - 727.

- [27] Raveendran P, Wallen S L. Exploring CO₂-philicity: Effects of step-wise fluorination[J]. J Phys Chem B, 2003, 107: 1473 - 1477.
- [28] Bara J E, Carlisle T K, Noble R D, et al. Enhanced CO₂ separation selectivity in oligo(ethylene glycol) functionalized room-temperature ionic liquids[J]. Ind Eng Chem Res, 2007, 46: 5380 - 5386.
- [29] Carlisle T K, Bara J E, Noble R D, et al. Interpretation of CO₂ solubility and selectivity in Nitrile-functionalized room-temperature ionic liquids using a group contribution approach[J]. Ind Eng Chem Res, 2008, 47: 7005 - 7012. ■

或有机溶剂预处理木质纤维素的水解能力。发现纤维素酶的一些辅助酶类(果胶酶、半乳甘露聚糖酶、木聚糖、 β -葡萄糖苷酶和 β -葡聚糖酶),尤其木聚糖和 β -葡萄糖苷酶,对纤维素酶水解具有明显的协同作用,原因初步推断是 β -葡萄糖苷酶减少了水解液中纤维二糖的产物抑制,木聚糖酶通过水解木质纤维素中相对应的半纤维素而提高了纤维素的酶可及性。在此基础上,他们又对水解木质纤维素的复合酶进行系统优化^[26]。结果表明,补加木聚糖酶、果胶酶和 β -葡萄糖苷酶均显著提高了纤维素酶对玉米秸纤维素和半纤维素的水解能力;在葡聚糖和木聚糖水解率分别达到99%和88%时,复合酶的添加使总蛋白用量减少到原来的1/2左右,这是复合酶能提高酶解和降低木质纤维素水解工艺成本的有力证据。尽管许多证据显示添加 β -葡萄糖苷酶减缓了纤维二糖的抑制,从而有助于维持纤维素酶活,但还有一部分原因的确是辅助酶水解了木质纤维素中的非纤维素多糖,木聚糖酶和果胶酶等辅助酶通过水解覆盖在纤维素上的非纤维素多糖而促进纤维素水解。可见,除了各种纤维素酶之间存在协同作用之外,纤维素酶与半纤维素酶、果胶酶等进行复配也能提高木质纤维素水解糖化效率。

因此,许多学者通过添加半纤维素酶和果胶酶等辅助酶来促进木质纤维素的纤维素酶水解作用,多酶复配已成为提高水解效率的重要途径之一^[27]。在国内,曾薇等^[28]利用阿魏酸酯酶水解天然木质纤维素原料中半纤维素与木质素之间的阿魏酸酯键,从破坏两者共价键连接的角度探索阿魏酸酯酶促进纤维素酶水解汽爆稻草中纤维素的可行性。结果显示,当阿魏酸酯酶加入量为240 mu/g(底物)和水解72 h时,汽爆稻草纤维素的酶解率较不加阿魏酸酯酶增加了32.00%,不溶性底物失重率增加了32.77%。

目前,笔者也开始了纤维素酶主导的复合酶协同水解木质纤维素的探索,该工作已取得了初步进展。探索性实验发现,淀粉酶、果胶酶、糖化酶、磷脂酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶6种水解酶类均可协同纤维素酶促进木质纤维素水解,其中淀粉酶、果胶酶、糖化酶和中性蛋白酶4种水解酶复合后显著提高了纤维素酶水解能力,4种水解酶同时与纤维素酶相复合使木质纤维素酶解率比不添加辅助酶时提高20%以上。

总之,近5年来陆续出现外加一些水解酶作辅助酶促进纤维素酶水解木质纤维素产糖的报道。相

关研究均表明,外加一些水解酶类能显著降低酶解过程活性蛋白负载量,最高可降低50%以上,而且酶解效率明显提高,这为木质纤维素类物质通过微生物酶解方式生物炼制生物能源和生物基产品时降低生产成本带来了希望。

1.3 纤维素酶有关的酶促因子

纤维素酶解时,除了上述纤维素酶主要组分(C_1 、 C_x 和 β -葡萄糖苷酶)以及纤维素酶与其他水解酶(辅助酶)之间的协同作用外,还有一些自身没有纤维素酶活力的活性蛋白,它们也能够促进纤维素的酶解,称之为纤维素酶酶促因子。

Saloheimo等^[29]首先在丝状真菌瑞氏木霉中发现了一种对植物细胞壁具有膨松作用的蛋白质,具有使滤纸强度降低和使棉花纤维膨胀的能力,基于它对棉纤维等纤维素材料的松弛活力,命名为Swollenin,它可能是真菌降解植物生物质所需酶系的一个组分,但分泌量比大部分纤维素酶的分泌水平低得多。尽管Swollenin蛋白可以破坏纤维素底物的结构,但没有还原糖生成,他们推测Swollenin可能像纤维素酶一样存在多种有膨胀活性的类似物质,并且它们在纤维素降解真菌中普遍存在,其作用模式虽有某些变化但都能协同纤维素酶作用,有效水解植物多糖。目前对于Swollenin研究还处于起步阶段,相关研究还比较少^[29-30]。

此外,研究者还发现了一些其他纤维素酶酶促因子。山东大学高培基教授所在实验室于1996年首次发现木霉等纤维降解真菌能产生一种低分子量短肽,该短肽可使纤维素发生氧化降解形成短纤维,从而有利于纤维素酶的水解作用。后来他们从褐腐真菌——密黏褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)胞外酶液中也分离纯化到一类似的活性多肽组分,此组分能在 O_2 和 Fe^{2+} 存在时产生羟基自由基 HO^{\cdot} ;通过用于纤维素降解发现,该小分子多肽是以 HO^{\cdot} 氧化途径作用于纤维素,导致氢键断裂,降低纤维素的结晶度,使其暴露出更多的末端,从而有利于纤维素的进一步降解^[31-32]。在此基础上,他们又观察到白腐菌、褐腐菌和软腐菌三大类34种共57株纤维分解真菌的胞外培养液中,都含有这种相对分子质量低于5000且形成羟基自由基的短肽,这些短肽和纤维素酶协同作用时可明显提高秸秆、木材等天然纤维材料水解产糖的产率^[33]。

总之,目前关于纤维素酶酶促因子的研究初步表明,纤维素酶产生菌的培养液中除含有复杂的纤维素酶组分外,还含有许多与纤维素酶高效水解

有关的酶促因子。

2 植物源活性蛋白促进木质纤维素的水解

2.1 植物水解酶类

在高等植物初生壁中富含多种酶类,有的以离子键结合于壁中,有的以共价键结合于壁中。迄今为止,研究者已在细胞壁中发现数十种酶,如纤维素酶、磷酸酶、苹果酸脱氢酶、过氧化物酶、木葡聚糖内转葡萄糖基酶等^[34-35]。另外,植物种子(如谷物等)发芽过程中分泌出种类更多、数量更大的植物内源性水解酶类,如淀粉酶、蛋白酶、果胶酶、植酸酶、纤维素酶、半纤维素酶和氧化还原酶等^[36],以及发芽大麦中淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、阿魏酸酯酶、多酚氧化酶、过氧化物酶和氧化还原酶等,这些丰富的水解酶类使传统的啤酒酿造行业不需外源微生物或酶,仅依靠麦芽自身所含酶系即可实现麦芽和辅料(大麦或小麦等)中大分子物质(淀粉、蛋白质、脂类、纤维素、半纤维素和木质素等)溶胀水解^[37-39]。

最近一些研究者初步推测,在木质纤维素类生物质酶解过程中,植物内源性酶也会对酶解具有促进作用^[17,40]。他们认为植物源纤维素酶除能够降解纤维素以外,还能够与微生物纤维素酶产生协同作用,如果胶酶、蛋白酶、半纤维素酶和氧化还原酶,提高酶解效率^[35]。

2.2 植物源水解酶促因子

目前已有研究表明,在植物源水解酶发生水解作用时除了水解酶外,还存在一些对植物水解起辅助作用的酶促因子,如扩张蛋白(Expansins)、 β -半乳糖苷酶、内切木葡聚糖转糖基酶(XET)等^[35-41]。

Cosgrove 等科学家首先发现了 Expansin 的存在,先后从植物代谢旺盛组织和成熟阶段的果实中发现多个 Expansin 家族。在玉米的胚芽鞘和花粉中也发现了 Expansin 的存在,迄今已经从玉米中得到了至少 5 种 α -Expansin 和 9 种 β -Expansin; 活性分析表明,Expansin 没有糖苷水解酶活性,但在植物生长过程中能够使植物细胞壁中的纤维发生滑动并促进细胞壁的延伸;机理研究发现,Expansin 通过破坏纤维素纤维之间或者纤维素与其他细胞壁成分之间的氢键,从而促进了细胞壁的延伸;在滤纸酶解中,Expansin 与纤维素酶也具有协同作用,纤维素酶活力能够提高 50%^[36]。

中国科学院过程工程研究所陈洪章研究员的团队发现,在木质纤维素水解过程中秸秆细胞壁蛋白与微生物源性纤维素酶之间存在一定程度的协同作

用,他们认为植物细胞壁蛋白是天然纤维素酶解研究不可忽视的影响因素^[40,42]。Han 等^[16]从新鲜玉米秸秆中分离出一种纤维素酶协同蛋白,命名为 Zea h,该蛋白由单一亚基组成,相对分子质量大约为 55.78×10^3 ,自身没有纤维素酶活力,但与 *T. reesei* 纤维素酶混合作用时,使滤纸水解速度和水解量均明显提高,酶解速度是只用纤维素酶时的 2 倍,酶解结束时葡萄糖产量是只用纤维素酶的 3 倍,这表明植物源非纤维素水解性蛋白 Zea h 对微生物源纤维素酶具有明显的促进作用。进一步用汽爆玉米秸作底物,同样证明该蛋白具有提高纤维素酶酶解的能力,使酶解初速度提高了 103.8%,葡萄糖产量提高了 18.6%。在此基础上,他们又从新鲜玉米秸秆中得到了多种与木质素具有强吸附作用的蛋白,蛋白相对分子质量在 $(15 \sim 35) \times 10^3$; 这些疏水蛋白不能吸附到微晶纤维素上,对微晶纤维素酶解没有帮助,但能吸附到木质素基团上,对纤维素酶酶解汽爆麦草酶解具有显著的协同作用^[16]。

因此,在新鲜植物、种子或种子萌发过程中的确存在一些植物源非纤维素溶解性蛋白,它们作为植物内源性酶促因子,与微生物源纤维素酶具有相协同作用,对于较低纤维素酶负载量的条件下实现木质纤维素经济高效酶解具有潜在价值。

3 植物/微生物源性复合酶协同水解作用机制

尽管微生物源纤维素酶、半纤维素酶(木聚糖酶、甘露聚糖酶、阿拉伯聚糖酶和半乳聚糖酶)、淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶、果胶酶和阿魏酸酯酶等水解酶复配后,在制浆造纸、饲料行业、食品加工、纺织工业、中草药等许多领域里已得到广泛应用,但确切的协同水解机理尚没有统一的认识。

曾薇和陈洪章^[28]通过比较不同酶法处理后汽爆稻草的可及度和红外光谱图发现,当阿魏酸酯酶和纤维素酶同时作用时,阿魏酸酯酶对纤维素酶解的促进作用并不是 2 种酶单独作用效果的简单加和,而是二者在酶解过程中相互促进的协同作用;阿魏酸酯酶先将原料中木质素与阿魏酸之间的酯键打开,在一定程度上破坏半纤维素和木质素之间的连接,然后被木质素和半纤维素包裹的纤维素就显露出来,提高天然木质纤维素原料的可及度,使更多的纤维素酶进入原料内部,吸附在纤维素成分上,发生水解作用,从而提高纤维素酶的酶解效率。Yu 等^[22]发现,燕麦壳的纤维素酶水解明显受到阿魏酸

酯酶和木聚糖酶的促进作用,推测原因可能是阿魏酸酯酶和木聚糖酶的协同作用释放出燕麦壳内的阿魏酸多糖,打开了细胞壁的复杂结构,使剩余多糖更有助于酶攻击,有助于细胞壁上高分子聚合多醣体主链靠近纤维素酶。这些协同作用扩大了细胞壁水解,最终释得到高还原糖产量。韩业君等^[35]认为,植物源纤维素酶除能够降解纤维素以外,还能够与微生物纤维素酶产生协同作用;果胶酶可以降解细胞间质的果胶,改变细胞壁的结构,提高底物的可及性;木聚糖酶不仅可以酶解木聚糖产生木糖,也可能改变底物的机构,提高纤维素酶在底物上的结合位点;当蛋白酶作用于植物细胞壁时,可能通过水解结构蛋白,使细胞壁变得疏松,进而增加木质纤维素酶解时纤维素酶和半纤维素酶等在底物上的结合位点,提高酶解效率。

总之,微生物和植物源淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、蛋白酶和脂肪酶等水解酶及其酶促因子相复合后对木质纤维素水解协同作用的确切机制,目前尚不清楚,有待于继续深入研究。根据目前的研究进展,协同作用机制可初步归纳为:这些水解类及其酶促因子在木质纤维素水解过程中,分别作用于各自相应的底物,进而改变了细胞壁的理化结构,比如:使细胞壁疏松、出现空穴或破裂,相互增加了各自底物的比表面积,提高各种酶在相应底物上的结合位点,最终提高了复合酶解效率。

4 结语

从以上微生物源性活性蛋白和植物源活性蛋白应用于木质纤维素水解的研究进展可以看出,近年来陆续出现了纤维素酶主导的活性蛋白协同作用于木质纤维素以实现其经济高效水解的报道,其中大多是关于微生物源性复合酶的研究文献,植物/微生物源水解酶酶促因子与纤维素酶协同作用及植物和微生物源水解酶相复合的文献资料不多,尚未见诸单独使用植物源水解酶水解木质纤维素的研究报道。为了达到木质纤维素酶解过程的经济性,今后应该充分认识不同来源和不同种类水解酶和酶促因子相复合协同水解木质纤维素的重要性,以下几方面可能是未来研究中值得关注的思路:

(1) 微生物源水解酶种类广泛,充分利用现有的比较经济、已商业化的水解酶类。在对果胶酶和阿魏酸酯酶现有研究的基础上,探索其他水解酶类与纤维素酶可能的协同性,如 α -淀粉酶、 β -葡萄糖苷酶、普鲁兰酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶和磷脂

酶等。

(2) 广泛开展植物源水解酶类和微生物源水解酶相复合的研究。既然绿色植物、新鲜果实和发芽种子中含有许多种类的水解酶类和酶促因子,它们都可能与微生物源性纤维素酶相协同水解木质纤维素的能力。今后应该重视它们在木质纤维素水解中的作用,开展植物源/微生物源水解酶相复合,以纤维素酶为主导,协同水解木质纤维素方面的研究工作。

(3) 重视植物/微生物源水解酶酶促因子的作用。既然植物源细胞(壁)蛋白和微生物源水解酶液中都存在一些水解酶酶促因子(Expansins、Zea h和疏水蛋白等;Swollenin和小分子短肽等),今后构建以纤维素酶为主导的多酶复合体系时应该尽可能使用粗酶液,少用或不用已纯化的水解酶类,这样也有助于降低水解酶的生产成本。

总之,木质纤维素类生物质原料复杂的化学组成和多级结构的致密不均一性决定了仅靠纤维素酶很难实现木质纤维素-糖的经济高效转化,不同来源和不同种属水解酶组成的复合酶在这方面有广泛实用价值和很好的应用前景。充分重视植物/微生物中不同种类水解酶和酶促因子与纤维素酶的协同作用,构建纤维素酶为主的植物/微生物源水解酶复合体系以促进木质纤维素经济高效的水解,将是木质纤维素-糖平台的一个很有潜力的发展方向。

参考文献

- [1] 董平,邵伟. 国外纤维素燃料乙醇研究动态[J]. 现代化工, 2008,28(10):84-86.
- [2] 杜风光,冯文生. 秸秆生产乙醇示范工程进展[J]. 现代化工, 2009,29(1):16-19.
- [3] 夏黎明. 植物纤维素原料的生物转化与利用[J]. 现代化工, 2010,30(1):11-15.
- [4] Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. Science, 2007,315:804-807.
- [5] Sun F B, Chen H Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2008,99:6156-6161.
- [6] Sun F B, Chen H Z. Comparison of atmospheric aqueous glycerol and steam explosion pretreatments of wheat straw for enhanced enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008,83:707-714.
- [7] 靳胜英,张福琴,张礼安. 木质纤维原料制乙醇原料预处理技术[J]. 现代化工, 2008,10(11):82-88.
- [8] 黎先发,张颖,罗学刚. 利用木质纤维素生产燃料酒精研究进展[J]. 现代化工, 2009,29(1):20-26.

- [9] 宋金涛,梁日忠. 纤维素类生物质炼制燃料乙醇的多产品共生模式研究[J]. 现代化工,2009,29(7):80-84.
- [10] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation[J]. Bioresource Technology,2010,101:4744-4753.
- [11] Gao D, Chundawat S P S, Krishnan C, et al. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover[J]. Bioresource Technology,2010,101:2770-2781.
- [12] Wang L S, Zhang Y Z, Yang H, et al. Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers[J]. Carbohydrate Research,2004,339:819-824.
- [13] 刘娜,石淑兰. 木质纤维素转化为燃料乙醇的研究进展[J]. 现代化工,2005,25(3):19-23.
- [14] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances,2006,24:452-481.
- [15] Murashima K, Kosugi A, Doi R H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation[J]. Journal of Bacteriology,2003,185(5):1518-1524.
- [16] Han Y, Chen H. Synergism between corn stover protein and cellulase[J]. Enzyme Microb Technol,2007,41:638-645.
- [17] Han Y J, Chen H Z. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation[J]. Bioresource Technology,2008,99:6081-6087.
- [18] Kumar R, Wyman C E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies[J]. AIChE & Biotechnol Prog,2009,25(2):302-314.
- [19] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems[J]. Biotechnology and Bioengineering,2004,88(7):797-824.
- [20] Jeoh T, Wilson D B, Walker L P. Cooperative and competitive binding in synergistic mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Ce15A, Ce16B, and Ce19A[J]. Biotechnology Progress,2002,18(4):760-769.
- [21] Zhou J, Wang Y H, Chu J, et al. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments[J]. Bioresource Technology,2009,100(2):819-825.
- [22] Yu P, Mckinnon J J, Maenz D D, et al. Enzymic release of reducing sugars from oat hulls by cellulase, as influenced by *Aspergillus ferulic acid esterase* and *Trichoderma xylanase*[J]. J Agric Food Chem,2003,51:218-223.
- [23] Tabka M G, Herpoël-Gimbert I, Monod F, et al. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment[J]. Enzyme and Microbial Technology,2006,39:897-902.
- [24] Wilkins M R, Widmer W W, Grohmann K, et al. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes[J]. Bioresource Technology,2007,98:1596-1601.
- [25] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes[J]. Enzyme Microb Technol,2005,37(32):175-184.
- [26] Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioengineering,2007,97(2):287-296.
- [27] 张名佳,苏荣欣,齐崑,等. 木质纤维素酶解糖化[J]. 化学进展,2009,21(5):1070-1074.
- [28] 曾薇,陈洪章. 阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用[J]. 生物工程学报,2009,25(1):49-54.
- [29] Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansin, exhibits disruption activity on cellulosic materials[J]. Eur J Biochem,2002,269:4202-4211.
- [30] Lévassieur A, Saloheimo M, Navarro D, et al. Production of a chimeric enzyme tool associating the *Trichoderma reesei* swollenin with the *Aspergillus niger* feruloyl esterase A for release of ferulic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2006,73(4):872-880.
- [31] 王蔚,高培基. 密粘褶菌胞外低分子量多肽在纤维素降解中作用的研究[J]. 微生物学报,2002,42(2):220-225.
- [32] Wang W, Liu J, Chen G, et al. Function of a low molecular weight peptide from *Trichoderma pseudokoningii* S38 during cellulose biodegradation[J]. Current Microbiology,2003,46(5):0371-0379.
- [33] 杨炜华,刘洁,张颖舒,等. 真菌产生的短肽对天然纤维材料的降解作用[J]. 自然科学进展,2004,14(11):1230-1235.
- [34] Jamet E, Canut H, Boudart G, et al. Cell wall proteins: A new insight through proteomics[J]. Trends in Plant Science,2006,11(1):33-39.
- [35] 韩业君,陈洪章. 植物细胞壁蛋白与木质纤维素酶解[J]. 化学进展,2007,19:1153-1158.
- [36] 韩业君. 植物内源性纤维素酶及其协同因子的研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2008:7.
- [37] Rimsten L, Haraldsson A K, Andersson R, et al. Effects of malting on β -glucanase and phytase activity in barley grain[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2002,82:904-912.
- [38] 张春玲,赵长新,董亮. 关于添加金属离子对国产大麦芽酶系酶活力影响的研究[J]. 食品科学,2006,27(11):195-199.
- [39] 王芝梅,窦少华,郭继强,等. 小麦和酿酒大麦发芽过程中主要酶活的比较研究[J]. 酿酒科技,2008,11(173):20-22.
- [40] 卢迪,陈洪章,马润宇. 秸秆质外体蛋白对纤维素酶活力的影响[J]. 生物工程学报,2006,22(2):257-262.
- [41] Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins[J]. Nature,2000,407:321-326.
- [42] Han Y, Chen H. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis[J]. Biochemical Engineering Journal,2010,48(2):218-224. ■