

外切纤维素酶的研究与应用进展

张清翠, 石雅丽*, 刘安礼, 胡建华, 李永丽, 孙亚超, 何可欣, 夏婷, 鲍彦彬

内蒙古工业大学化工学院食品与生物工程系, 呼和浩特 010051

摘要: 纤维素酶主要包括三大类: 外切纤维素酶、内切纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶。其中, 外切纤维素酶因具有活性高、耐受性好、来源广等特点而被广泛应用于各种工业生产中。基于此, 主要阐述了外切纤维素酶的分类、来源以及生化特性, 介绍了外切纤维素酶的筛选及其水解产物分析的相关新技术, 并综述了其在造纸业、食品加工业、制药业、纺织业、能源再生等工业领域中的应用进展, 以期推动外切纤维素酶的深入研究及工业化应用。

关键词: 外切纤维素酶; 生化特性; 工业应用

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2020.0064

Research and Application Progress of Exocellulase

ZHANG Qingcui, SHI Yali*, LIU Anli, HU Jianhua, LI Yongli, SUN Yachao, HE Kexin, XIA Ting, BAO Yanbin

Department of Food and Bioengineering, School of Chemical Engineering and Technology, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot 010051, China

Abstract: Cellulases mainly include three categories: exocellulase, endocellulase and β -glucosidase. Among them, exocellulase is widely used in various industrial production because of its high activity, good tolerance and wide sources. Based on this, the classification, sources and biochemical characteristics of exocellulase were mainly expounded, and the new technologies related to the screening of exocellulase and the analysis of its hydrolysate were introduced. The application progress of exocellulases in paper industry, food processing industry, pharmaceutical industry, textile industry, energy regeneration and other industrial fields was summarized, in order to promote the further study and industrial application of exocellulases.

Key words: exocellulases; biochemical characteristics; industrial applications

木质纤维素是世界上含量最丰富的可再生生物物质资源, 用纤维素生产酒精燃料和化学材料, 有助于解决当下的能源危机和环境污染问题^[1]。降解纤维素的常规方法主要有化学法和生物发酵法^[2]。化学法降解纤维素产生的副产物种类较多, 使得目的产物的产率较低; 而生物发酵法具有处理条件温和、产物种类少且产率高等优势, 因此, 工业上首选生物发酵法降解纤维素, 其中主要是利用纤维素酶降解纤维素^[3]。

天然纤维素由数千至数万个葡萄糖分子经

β -1,4-糖苷键连接而成^[4], 而纤维素酶主要作用于反应底物的糖苷键, 属于糖苷水解酶家族。纤维素酶主要包含 3 大类: 外切纤维素酶、内切纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶^[5]。其中, 外切纤维素酶是降解纤维素的主要成分, 可以将纤维素的晶体结构打开, 使其降解为无定型纤维素, 释放的主要产物为纤维二糖和纤维四糖, 二者最终被 β -葡萄糖苷酶水解成单糖和二糖^[6]。外切纤维素酶因具有活性高、耐受性好、来源广等特点而被广泛应用^[7]。基于此, 本文主要阐述了外切纤维素酶的

收稿日期: 2020-05-12; 接受日期: 2020-07-29

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2020MS03030); 内蒙古自治区级创新创业训练计划项目 (201910128009); 内蒙古工业大学科学研究项目 (ZD201703); 内蒙古工业大学科研启动金项目 (105-841042); 内蒙古工业大学校级大学生创新实验计划项目 (2019053010)。

联系方式: 张清翠 E-mail: 1961323295@qq.com; * 通信作者 石雅丽 E-mail: shiyali2005@126.com

分类、来源以及生化特性,介绍了外切纤维素酶的筛选及其水解产物分析的相关新技术,并综述了其在造纸业、食品加工业、能源再生等工业领域中的应用进展,以期推动外切纤维素酶的深入研究及工业化应用。

1 外切纤维素酶的分类

外切纤维素酶是一种于纤维素线状分子尾部发挥功能的酶,能够水解 β -1,4 糖苷键,其每次接触纤维素线状分子尾端就水解出 1 个纤维二糖分子,由此也被称为纤维二糖水解酶 (cellulose biohydrolase, CBH) [8]。

外切纤维素酶包括 1,4- β -D-葡聚糖水解酶和 1,4- β -D-葡聚糖纤维二糖水解酶,现在常用 EC 法、CAZy 法和 mycoCLAP 法等来命名外切纤维素酶 [9]。在国际命名 EC 法中,外切纤维素酶有 2 个编号:EC3.2.1.91 和 EC3.2.1.176。其中,编号为 EC3.2.1.91 的外切纤维素酶从纤维素链非还原末端起始催化,即 CBH I ;编号为 EC3.2.1.176

的外切纤维素酶从纤维素链还原末端起始催化,即 CHB II [10]。CAZY 数据库 (<http://www.cazy.org/>) 将现在已知的糖苷水解酶 (glycoside hydrolase, GH) 按照氨基酸序列的差别划分成 132 个不同的序列家族,其中至少有 17 个家族被认为是含有纤维素酶的,但是在这 17 个家族中只有 GH5、GH6、GH7、GH9 和 GH48 这 5 个家族中含有外切纤维素酶 [11]。GH 家族与酶的国际系统分类编号的对应关系是:EC3.2.1.91/CBH I 对应 GH5、GH6、GH9; EC3. 2. 1. 176/CHB II 对应 GH7、GH9、GH48。此外,根据催化结构域氨基酸序列的相似性,可将真菌来源的外切纤维素酶归入 GH6、GH7 这 2 个家族;细菌来源的外切纤维素酶归入 GH5、GH6、GH9 和 GH48 这 4 个家族 (表 1) [12-13]。而由 mycoCLAP 数据库 (<http://mycoclapp.fungalgenomics.ca>) 给出的命名法可以看出酶的功能特性、糖苷水解酶家族归类和来源微生物的各种种属关系 [4],如名称为 CBH6A _ COPCI 的酶是指来自灰盖鬼伞菌 (*Coprinopsis cinerea*)、属于 GH6 家族的纤维二糖水解酶。

表 1 CAZy 数据库中含有外切纤维素酶的 GH 家族的统计信息 [4]

Table 1 The statistical information of GH family included exocellulase in CAZy database [4]

家族	GenBank 序列数	Uniprot 序列数	PBD 结构数	条目总数			3D 条目数
				古菌	细菌	真核生物	
GH5	4 950	1 919	120	38	2 556	1 078	39
GH6	483	239	44	0	272	141	10
GH7	10 379	527	45	0	0	4 945	9
GH9	2 136	676	28	2	529	785	11
GH48	191	113	13	0	142	22	4

2 外切纤维素酶的来源以及生化特性

2.1 外切纤维素酶的来源

纤维素酶主要来源于真菌和细菌 (好氧或厌氧) 以及部分动植物。其中,木霉、青霉和黑曲霉是外切纤维素酶的主要来源 [2]。真菌所产的外切纤维素酶简称 CBH [9];细菌所产的外切纤维素酶简称 Cex [14]。

2.1.1 真菌 目前,被普遍用于外切纤维素酶生产的菌株主要是丝状真菌,包括木霉属 (*Trichoderma*) [15]、青霉属 (*Pencillium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) [16] 等。全球前沿的酶制剂生产集

团,诺维信 (Novozymes) 和杰能科 (Genencor) 等,都使用里氏木霉作为外切纤维素酶的生产菌株 [17]。里氏木霉表达分泌外切纤维素酶的能力较强,其在生物质降解中的应用较广。绿色木霉作为另一种能够产外切纤维素酶的真菌,可以将作物中的纤维素转化为糖,这样不仅可以对废弃物再次利用,还可以避免污染环境,有助于缓解当下所面临的节能减排问题 [18]。青霉属中能够分泌降解木质纤维素的酶的种类很多 [19],其中以草酸青霉为代表,其他青霉 (如微紫青霉和蝇状青霉等) 的产酶效率也很高 [20]。青霉的生长速度较快,且在酶解糖化的最适温度 (50 $^{\circ}$ C) 下可保持较好的活力稳定性,同时,青霉所产外切纤维素酶的

酶系较木霉更全,这些性状让青霉在纤维素酒精的生产中具有特定的优势^[19]。与里氏木霉相比,灰白青霉所产的外切纤维素酶含量不高,酶活力也不具有显著优势,但是非常稳定,在 50 ℃、pH 4.5 条件下培育 3 h 活力几乎不变^[21]。因此,从长时间水解山杨木的反应过程来看,灰白青霉产生的外切纤维素酶的催化效能高于里氏木霉^[21]。

2.1.2 其他来源 放线菌和细菌可分泌表达水解效率很高的外切纤维素酶。如嗜热放线菌释放的外切纤维素酶在稳定作用时比活力可达 7.9^[22];链霉菌所产的 2 种外切纤维素酶中,M23 的活力和里氏木霉所产的酶的活力非常相似,而 M7a 的活力是里氏木霉的 7 倍之多^[6]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)等细菌也能够产生活性好、耐热、稳定性好、产量高的外切纤维素酶^[23]。

一些以木材为食物来源的昆虫也可以分泌纤维素酶(主要是外切纤维素酶)来水解纤维素物质。如白蚁可通过分泌多种外切纤维素酶来促进消化木质纤维素^[5]。但不同饮食和生境中的白蚁所分泌的外切纤维素酶种类有差别。在巴基斯

坦小白蚁(*Microtermes pakistanicus*)后肠中,GH9 家族的外切纤维素酶是表达最多的(占 90%), β -葡萄糖苷酶表达较少(占 10%)^[5];暗黄白蚁(*Macrotermes gilvus*)的后肠文库显示,GH7 家族的外切纤维素酶是表达最丰富的(占 64%),其次是 GH5 家族的外切纤维素酶(占 27%),其他家族的外切纤维素酶仅占 9%^[24]。除白蚁外,白色斑天牛能够分泌一种被命名为 AmCel-5B 的外切纤维素酶,该酶在 50 ℃、pH 4 时酶活力最高,其还能够表现出 β -葡聚糖酶的活性^[1]。然而,由于外切纤维素酶无法识别低聚糖,造成了天牛只能消化一些刚性长纤维^[1]。

植物很少产生纤维素酶,但是有些植物能通过分泌外切纤维素酶来促进自身生长。如玉米幼苗就可以分泌外切纤维素酶来水解细胞壁中的 β -D-葡聚糖,以促进自身更好地生长发育^[25]。

2.2 外切纤维素酶的生化特性

由于外切纤维素酶的来源不同,其生化特性也不同。以表 2 中的外切纤维素酶为例,大部分外切纤维素酶的最适 pH 在 5.0~7.0 之间,最适温度在 50 ℃左右;其他经过菌种克隆改良或者来自极端环境的作物或菌株能够产生耐酸、耐碱及耐热的外切纤维素酶。如从长期堆放富含纤维素物

表 2 不同来源的外切纤维素酶的性质
Table 2 Properties of exocellulases from different sources

来源	分子量/kD	最适 pH	最适温度/℃	参考文献
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>) 3.316	—	6.0	50	[8]
黑曲霉(<i>A. niger</i>) Asp524	57	5.0	50	[26]
土曲霉(<i>A. terreus</i>) M11	—	2.0	60	[27]
哈茨木霉(<i>Trichoderma harzianum</i>) T88	40	5.0	50	[28]
草酸青霉(<i>Penicillium oxalicum</i>) M	57	6.0	55	[29]
特异腐质霉(<i>Humicola insolens</i>)	63	5.0	50	[30]
烟曲霉(<i>A. fumigatus</i>) LY1	58	5.0	60	[31]
嗜热毁丝菌(<i>Myceliophthora thermophila</i>)	72	5.0	50	[32]
嗜热毛壳菌(<i>Chaetomium thermophilum</i>) CT2	67	5.0	65	[33]
极端嗜热厌氧木质纤维素降解菌解糖热解纤维素菌(<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>)	153	4.5	80	[34]
地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>) ATCC14580	79	9.0	50	[35]
短小芽孢杆菌(<i>B. pumilus</i>) AC-4	78	9.5	50	[36]
芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.) UV-NTG-10	29	7.0	50	[37]

注:—表示无此项。

质的垃圾堆肥中筛选到一株嗜热嗜酸的土曲霉 (*Aspergillus terreus*) M11,其所产的外切纤维素酶于 100 °C 温育 30 min 仍保持 30%左右的酶活力,在 50 °C、pH 2.0 条件下温育 1 h 后酶活力不变,说明此酶具有较强的耐热性、耐酸性^[27]。自化纤厂的土样中筛选获得一株短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) AC-4,其所产的外切纤维素酶在 50 °C、pH 9.5 条件下温育 30 min 酶活力最高,说明其具有较强的耐碱性^[36]。对极端嗜热厌氧木质纤维素降解菌解糖热解纤维素菌 (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) 来源的单催化域外切纤维素酶进行双催化域重构,获得了具有降解天然木质纤维素的双催化域、耐热的外切纤维素酶^[34]。

研究发现, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 能够降低外切纤维素酶活性,且酶活性与离子浓度成负反馈变化^[38];重金属离子 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 对外切纤维素酶活性具有不可逆的抑制作用^[39];各种价态的阴离子和 Li^+ 、 K^+ 、 Na^+ 几乎不能对外切纤维素酶活性造成影响^[42-43]; Fe^{2+} 和表面活性剂可提高外切纤维素酶活性^[40]。值得注意的是, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对某些来自动物体内的外切纤维素酶具有激活作用^[39]。

3 外切纤维素酶的筛选、水解产物分析的相关技术

木质素是目前世界上可利用资源中数量较大的一种物质,其在外切纤维素酶等的作用下进行生物质转化变成可利用资源,可以极大地减少资源浪费和环境污染^[41]。然而,目前纤维素类生物质的降解利用率偏低,高效地获得酶活性较高的外切纤维素酶并分析其水解产物的构成是目前的首要任务。因此,技术的革新对于提高产外切纤维素酶菌株的筛选效率、加快水解产物成分的分析具有重要意义。

3.1 产外切纤维素酶菌株的筛选

微生物既能产生外切纤维素酶又能高效的降解作物秸秆^[41],所以分离、筛选能够高产外切纤维素酶的菌株是目前获得外切纤维素酶的最有效的方法。随着技术的发展,分子生物学手段、分析化学技术逐渐被应用于产酶菌株的筛选中。常规方法为:对菌株进行发酵培养,诱导其产生外切纤维素酶,再结合羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活的

测定筛选纤维素降解优势菌株。当下可通过细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 同源序列比对确定菌株种属,有助于快速确定其产酶条件,进而筛选优质的产外切纤维素酶的菌株^[42]。此外,还可运用纳米级液相-电喷雾-串联质谱 (nano LC-ESI-MS/MS analysis) 技术,对菌株发酵所产的外切纤维素酶蛋白进行分析,快速确定产酶菌株^[31]。

还有一种被称为 HTS 的新系统可以有效地分析各种新型酶,这种设备首次利用自动的高通量系统直接筛出了具有催化功能的外切纤维素酶^[22]。具体操作为:在 37 °C 条件下对微生物进行持续搅拌,通过 11~14 h 以上的光密度监测,得出 96 孔板中细胞的生长情况,再用 VICTOR3 型微板阅读器测定了 4-甲基-基板阅读纤维二糖释放的荧光。这个新的 HTS 系统每天能够对超过 10^4 个克隆进行验证。其从甘薯田土壤微生物和瘤胃液制备的 29 006 个中间组分的克隆中得到了 4 个产外切纤维素酶的克隆物 (CelEx-SF301, CelEx-SF309, CelEx-BR12, CelEx-BR15)^[22]。

3.2 外切纤维素酶的水解产物分析

对酶的水解产物成分进行有效地分析,对于促进资源的二次利用具有重要意义。研究表明,可利用薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 技术对反应混合物的水解产物进行分析检测^[43]。Sanchez 等^[43] 在分析类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.) BP-23 所产的外切纤维素酶 Cel48C 的水解产物时,将氯仿、乙酸、水 (6:7:1, 体积分数) 混合物作为长链多糖和纤维糊精的洗脱剂,产物分离后,通过新制备的乙醇/浓硫酸混合物 (95:5, 体积分数) 喷涂硅胶板进行糖检测可以得到葡萄糖、纤维二糖、果糖的含量,进而得到不同产物的水解产率。

4 外切纤维素酶的工业应用

外切纤维素酶已经被生物技术领域广泛使用,越来越多的工业应用材料以生物原料为基础,且已经进入大规模生产阶段^[22]。

4.1 造纸业

外切纤维素酶可以在较宽的 pH 范围内发挥作用,并且具有良好的热稳定性,适合进行生物质的转化。研究表明,外切纤维素酶适用于造纸工业的高温偏碱环境,其在纸浆纤维的精练过程中

具有较高的效率,可以降低纸浆粘度,同时提高纸浆的利用率(65%~80%)^[44]。加入外切纤维素酶的纸张的光滑度较一般的纸张好^[45]。利用外切纤维素酶进行纸张脱墨是另一个新兴的用途^[46]。废纸回收利用中最重要的一个过程就是脱墨工艺,外切纤维素酶制成的脱墨剂能够使油墨和纤维素的结合力降低,使油墨乳化分散与纤维脱离,其传统的纸张脱墨相比具有高效、污染少、成本低、性能好等优点^[47]。

4.2 食品加工业

随着生活品质的不断提高,人们对食物在健康、营养价值和风味等方面的要求越来越高。而外切纤维素酶在食品工业中的应用恰好满足了人们的要求。外切纤维素酶应用于果实和蔬菜加工过程中,既可以避免果蔬香味和维生素的流失,还可以使植物组织软化蓬松,提高口感、促进消化^[48]。在酒、醋、酱油的酿造过程中加入外切纤维素酶,不但可以增加产率、降低成本、减少污染,还能提高口感、增加风味^[49-50]。在油料作物^[51]和豆腐^[52]的加工过程中加入外切纤维素酶可以极大地提高出油率和营养价值,节约资源。在利用外切纤维素酶浸取苦丁茶的工艺中,提高酶浓度,苦丁茶中氨基酸、水溶性糖、水浸出物的含量升高,纤维素含量下降,其浸出率更好^[53]。

4.3 制药业

目前,中药的需求量日益增长,且在制药行业占有重要的地位。中药的制作过程中最重要的就是从植物中提取有效成分^[54],但是由于植物组织中含有大量的细胞壁,难以被水解,使得其提取效率较低。而在提取过程中加入外切纤维素酶可以充分降解植物细胞壁,使其内部成分释放出来用于制作中药,从而提高中药的产量和品质,且具有较高的安全性^[55]。

4.4 纺织业

纺织品的加工和处理广泛使用外切纤维素酶,其可以在不影响产品质量的条件下高效去除纤维素丝毛,增加产品的柔软度、弹性和悬垂感^[56]。如在牛仔服的制作中加入外切纤维素酶进行石磨水洗,从而去除表面的纤维以及纤维表面的靛蓝等染料,此方法较传统的石磨水洗处理能够缩小成本、降低对人体的危害、减少污染,同时保持更好的质感^[50]。纯棉质衣服由于其吸汗、

透气的特性受到人们的喜爱,但是纯棉质衣服表面含有大量绒毛使其过于粗糙,既影响美观又对皮肤有损,而在制作过程中加入来自里氏木霉的酸性纤维素酶,利用生物抛光技术降解表面的绒毛,提升纯棉质衣服的外表光滑度和光泽,赋予其新的色彩亮度^[13,57]。

4.5 饲料工业

外切纤维素酶的加入可以改善植物性饲料的养分,促进动物内源酶的分泌,从而提高养分消化率、促进动物生长发育,进而提升饲养效率、降低饲养成本^[46]。如利用外切纤维素酶降低酿醋产生的有机废物醋糟的粗纤维含量,将其转变为非结晶纤维,从而开发成动物饲料,提高其营养价值^[58]。研究显示,利用加入纤维素复合酶的饲料喂养的羊崽体重日均增加了4.22%^[57];喂养的肉鸡体重增加了2.78%,饲料消耗量下降了16.15%^[57];喂养的鱼类日增重提高,饵料系数下降,摄取的基本营养成分增加,而体成分没有变化^[59]。

4.6 新型材料合成

外切纤维素酶还普遍应用在新型材料的生产中。如利用外切纤维素酶处理马尾松纤维以制作纳米纤维材料^[60];利用外切纤维素酶处理棉花以制备棉花纤维素纳米纤维薄膜^[61]。其中,纳米纤维薄膜可用作软包装复合材料的强度层和阻隔层,还将在绿色高性能包装材料领域得到使用^[62]。

4.7 能源再生和环境保护

随着不可再生能源(石油、天然气和煤炭)的不断消耗,世界上的能源储量正面临着枯竭,因而急需寻找新能源。将生物质转化为液体燃料是目前被广泛认同的方法,而应用最多的就是开发和利用外切纤维素酶等将各种生物质资源转化成可再生资源。

在能源再生方面,将纤维素在外切纤维素酶和其他酶的辅助下转化成乙醇和生物柴油等已广泛应用^[53]。人们除了利用已有的纤维素原料生产乙醇燃料,还对废弃物进行了二度利用,将制浆造纸工业产生的固体废弃物(如纸浆污泥)在外切纤维素酶的作用下转化成乙醇燃料,这不仅拓宽了乙醇燃料的生产途径,还减少了纸浆污泥对环境的污染^[63]。而将生物乙醇添加到汽油中可以提高燃油品质,从而减少废气和碳排放^[64]。利

用外切纤维素酶发酵木薯渣可以产氢,使氢能源的应用更加普遍,该生产已经实现了反应器水平上的放大化发酵产氢^[65]。这为不少农产品加工企业解决了加工后废弃物的重复利用问题和环境污染问题,极大地降低了企业生产成本,避免了对粮食作物的大量损耗。在油井压裂上,向低温井中经常加入外切纤维素酶做破胶剂,比化学破胶剂液化更可靠、安全,现已在油田应用,起到显著的增产效果^[66]。

在环境保护方面,外切纤维素酶可将纤维废渣降解转化成葡萄糖等物质,增加资源利用率。将外切纤维酶加入到城市生活垃圾的处理中,将垃圾快速、高效地降解为绿色无污染的有机肥,极大改善了城市生活垃圾难以处理的问题^[67]。外切纤维素酶还可以用来降解天然植物,如利用外切纤维素酶可以提高水稻秸秆的降解效率,在减少农作物材料浪费的同时,环境也得到了很大的改善^[68]。

5 展望

随着分子生物学技术的快速发展以及对外切纤维素酶的深入研究,外切纤维素酶的使用范围越来越广,尤其是在生物质能源方面,有效地降解纤维素并获得可利用的产物,既可以防止环境污染,又可以利用纤维素原料为社会带来巨大价值和收益^[69]。因此,外切纤维素酶是一种具有巨大应用潜力的纤维素酶。

由于微生物原始来源的外切纤维素酶的催化效果有限,在大规模工业化生产中成本高,限制了外切纤维素酶在工业化生产中的发展速度,通过对外切纤维素酶的生产菌株进行遗传改良提高其表达水平,以及对外切纤维素酶进行定点突变来提高其催化活性,是目前研究的热点^[69-70]。本课题组针对内蒙古地区丰富的玉米秸秆和沙柳等纤维素废弃原料,着力研究高效的外切纤维素酶,可以将秸秆中的纤维素基质转化为乙醇和有机酸等生物材料(数据未发表),这样既解决了当地的环境污染问题和废弃农作物堆放问题,也为内蒙古地区的生物质资源化利用的发展做出贡献。

参 考 文 献

[1] CHANG C, WU C P, LU S, *et al.*. A novel exo-cellulase from

white spotted longhorn beetle (*Anoplophora malasiaca*) [J]. *Insect Biochem. Molec.*, 2012, 42(9): 629-636.

[2] KO C, TSAI C, LIN P, *et al.*. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli* [J]. *Bioresource Technol.*, 2010, 101(20): 7882-7888.

[3] SHANMUGHAPRIYA S, KIRAN G S, SELVIN J, *et al.*. Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032 [J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2010, 162(3): 625-640.

[4] 段晓云. 代表性纤维素酶家族活性架构的功能位点分析 [D]. 济南: 山东大学, 硕士学位论文, 2013.

[5] YOON K A, KIM J H, HWANG C E, *et al.*. Cellulase gene expression profiles in termites according to habitat and diet [J]. *J. Asia Pac. Entomol.*, 2015, 18(3): 369-375.

[6] SEMEDO L T, GOMES R C, BON E P, *et al.*. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil [J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2000, 84(1): 267-276.

[7] 苏少锋, 萨初拉, 刘红葵, 等. 葡聚糖外切酶和葡聚糖内切酶基因密码子的优化及表达 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(3): 1-8.

[8] 张海娟, 李军, 朱凤妹. 耐热黑曲霉 3.316 产外切葡聚糖苷酶培养基优化及酶学性质研究 [J/OL]. *食品工业科技*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200513.1623.004.html>, 2020-5-13.

[9] 袁茂翼, 叶发根, 雷琳, 等. 纤维二糖水解酶的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(10): 248-251.

[10] 张小梅, 李单单, 王禄山, 等. 纤维素酶家族及其催化结构域分子改造的新进展 [J]. *生物工程学报*, 2013(4): 422-433.

[11] 王帅, 陈冠军, 张怀强, 等. 碳水化合物活性酶数据库 (CAZy) 及其研究趋势 [J]. *生物加工过程*, 2014(1): 102-108.

[12] CHUKEATIROTE E, MAHARACHCHIKUMBURA S S, WONGKHAM S, *et al.*. Cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I genes from some basidiomycetes [J]. *Mycobiology*, 2012, 40(2): 107-110.

[13] JUTURU V, WU J C. Microbial cellulases: engineering, production and applications [J]. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2014, 33(6): 188-203.

[14] 高凤菊, 李春香. 真菌与细菌纤维素酶研究进展 [J]. *唐山师范学院学报*, 2005(2): 7-10.

[15] DU J, ZHANG X, LI X, *et al.*. The cellulose binding region in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I has a higher capacity in improving crystalline cellulose degradation than that of *Penicillium oxalicum* [J]. *Bioresource Technol.*, 2018(266): 19-25.

[16] AHMAD R, KHARE S K. Immobilization of *Aspergillus niger* cellulase on multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis. [J]. *Bioresource Technol.*, 2018(252): 72-75.

[17] BISCHOF R, RAMONI J, SEIBOTH B, *et al.*. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei* [J]. *Microb. Cell Fact.*, 2016, 15(1): 106-118.

[18] 刘华, 李崇高, 黄建初. 响应面法对绿色木霉产纤维素酶

- 固态发酵条件优化[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(6): 980-985.
- [19] 曲音波. 木质纤维素酶降解酶与生物炼制[M]. 北京:化学工业出版社, 2011.
- [20] FANG X, SHEN Y, ZHAO J, *et al.*. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China[J]. *Bioresource Technol.*, 2010, 101(13): 4814-4819.
- [21] VOLKOV P V, ROZHKOVA A M, GUSAKOV A V, *et al.*. Homologous cloning, purification and characterization of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium canescens* [J]. *Protein Express. Purif.*, 2014(103): 1-7.
- [22] KO K, HAN Y, CHEONG D, *et al.*. Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system [J]. *J. Microbiol. Meth.*, 2013, 94(3): 311-316.
- [23] 王智伟. 白蚁体内产纤维素酶细菌的分离鉴定及其相关基因的载体构建与原核表达[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2018.
- [24] 石玉. 两种木食性白蚁肠道微生物源糖苷水解酶多样性和酶学特性研究[D]. 武汉:华中师范大学, 博士学位论文, 2015.
- [25] HUBER D J, NEVINS D J. Exoglucanases from *Zea mays* L. seedlings: their role in β -D-glucan hydrolysis and their potential role in extension growth[J]. *Planta*, 1982, 155(6): 467-472.
- [26] 唐自钟, 刘姗, 韩学易, 等. 产外切葡聚糖酶真菌的筛选鉴定及毕赤酵母中的表达[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(4): 629-635.
- [27] 高建民, 翁海波, 席宇, 等. 一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 715-718.
- [28] 王志超. 哈茨木霉 *cbhl* 基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 硕士学位论文, 2014.
- [29] 赵莹, 顿宝庆, 顾金刚, 等. 草酸青霉外切葡聚糖酶基因(*cbhI*)克隆及其在毕赤酵母中的表达和重组外切葡聚糖酶特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6): 1127-1135.
- [30] 林国滢, 蔡少丽, 黄平, 等. 中性纤维素酶外切葡聚糖酶CBH II的异源表达[J]. *微生物学杂志*, 2011(6): 88-91.
- [31] 龙悦. 产耐热纤维素酶烟曲霉的筛选及酶学特性与应用评价[D]. 南昌:江西农业大学, 硕士学位论文, 2018.
- [32] 杨志芹, 高金鹏, 郭秀娜, 等. 嗜热毁丝菌外切葡聚糖酶CBH I环状结构对酶活性及热稳定性的影响[J]. *菌物研究*, 2018, 16(2): 95-101.
- [33] 李亚玲, 李多川, 滕芳超. 嗜热毛壳菌外切葡聚糖纤维二糖水解酶的纯化和部分性质研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 143-146.
- [34] 夏继林. 双催化域耐热纤维素酶的重构研究[D]. 江苏淮安:淮阴工学院, 硕士学位论文, 2019.
- [35] 郎立新. 地衣芽孢杆菌GH48家族外切纤维素酶CeLA的异源表达和功能研究[D]. 长春:东北师范大学, 硕士学位论文, 2019.
- [36] 赵楠. 短小芽孢杆菌外切葡聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 硕士学位论文, 2015.
- [37] 柴秀娟. 高产纤维素酶菌株的筛选、酶学性质及发酵工艺的研究[D]. 新疆维吾尔自治区石河子市:石河子大学, 硕士学位论文, 2015.
- [38] 程旺开. 金属离子对纤维素酶活性影响的研究[J]. *安徽农学通报*, 2011, 17(5): 27-28, 30.
- [39] 安刚, 陶毅明, 龙敏南, 等. 金属离子对白蚁纤维素酶活力的影响[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(S2): 107-109.
- [40] 张洪鑫, 陈小泉, 蒋玲玲. 金属离子对纤维素酶内切酶和外切酶活性的影响[J]. *纤维素科学与技术*, 2011, 19(4): 6-13.
- [41] 孙以新. 产纤维素酶菌株的筛选及其降解秸秆的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 硕士学位论文, 2019.
- [42] 李佳腾. 纤维素降解优势菌株的筛选与杏鲍菇菌糠混菌发酵条件的优化[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2019.
- [43] SANCHEZ M, PASTOR F I, DIAZ P, *et al.*. Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among *Bacillales* [J]. *FEBS J.*, 2003, 270(13): 2913-2919.
- [44] WANG Q, LIU S, YANG G, *et al.*. Recycling cellulase towards industrial application of enzyme treatment on hardwood kraft-based dissolving pulp [J]. *Bioresource Technol.*, 2016, 212: 160-163.
- [45] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. *微生物学杂志*, 2008(1): 83-87.
- [46] 严鸿林, 唐彩琰, SANGRILA S, 等. 细菌产生的纤维素酶(综述)[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2018(9): 51-54.
- [47] 张明, 叶建平, 杨仁党. 生物基高效脱墨剂的制备及应用研究[J]. *生物质化学工程*, 2017, 51(3): 27-32.
- [48] 王伟, 王永花. 纤维素酶基因的研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2019, 40(2): 60-63.
- [49] SOARES J F, PR V D, KEMPKA A P, *et al.*. Cellulases for food applications[M]// *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2016: 201-208.
- [50] 高伦江, 董全, 唐春红. 纤维素酶的研究进展及前景展望[J]. *江苏食品与发酵*, 2007, 131(4): 14-17.
- [51] 陈路劫, 刘斌, 林白雪, 等. 降解纤维素嗜热菌的分离及纤维素酶性质分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2010, 39(1): 67-72.
- [52] 申春莉. 灵芝菌丝体固态发酵转化豆渣的研究[D]. 山东泰安:山东农业大学, 硕士学位论文, 2019.
- [53] 杨友坤, 朱凤香, 王卫平, 等. 纤维素酶及其应用现状[J]. *安徽农学通报*, 2009, 15(13): 59-62.
- [54] SHARMA A, TEWARI R, RANA S S, *et al.*. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications[J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2016, 179(8): 1346-1380.
- [55] 赵琪, 李亚兰, 陈子欣, 等. 纤维素酶应用研究的最新进展[J]. *广州化工*, 2014, 42(6): 21-23.
- [56] 赵婷婷. 产中性纤维素酶真菌的筛选鉴定发酵条件优化及其在纺织业中的应用研究[D]. 上海:华东理工大学, 硕士学位论文, 2012.
- [57] 梁敏, 邹东恢, 王少艳. 纤维素酶的研究进展与前景展望

- [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 202-204.
- [58] 宋曾廷, 董晓芳, 佟建明, 等. 醋糟的营养价值及其在饲料生产中的应用[J]. 中国畜牧杂志, 2011(9): 73-76.
- [59] 高春生, 范光丽, 李建华, 等. 纤维素酶对草鱼生长性能和饲料消化率及体成分的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(10): 473-475.
- [60] 朱晶航. 酶预处理对马尾松纤维细胞壁结构及微纤丝制备的影响研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 硕士学位论文, 2017.
- [61] 彭良才, 丰胜求, 谢国生, 等. 利用外切葡聚糖酶提高水稻秸秆降解转化效率的方法: CN106755014B[P]. 2020-04-10.
- [62] 周可可, 唐亚丽, 卢立新, 等. 氧化纳米纤维素增强再生纤维素全纤维素复合薄膜的制备及性能[J]. 复合材料学报, 2020(7): 1657-1666.
- [63] 吕健. 纸浆污泥纤维素酶水解糖化与增效工艺及机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 博士学位论文, 2010.
- [64] 李英. 外源纤维素酶和4-香豆酸辅酶A连接酶影响木质纤维素结构与酶解分子机理的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 博士学位论文, 2018.
- [65] 张麓岩. 纤维素降解产氢菌种选育及木薯渣产氢工艺研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 博士学位论文, 2019.
- [66] 姜凯. 微生物生产纤维素酶的生产技术及应用前景[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2017, 47(3): 53-55.
- [67] 陈耀宁. 城市生活垃圾堆肥复合菌剂的前期开发研究[D]. 长沙: 湖南大学, 硕士学位论文, 2004.
- [68] 叶泗洪, 邓小楠, 闫晓明, 等. 一种棉花纤维素纳米纤丝薄膜的制备方法: CN110924238A[P]. 2020-03-27.
- [69] RIEDEL K, BRONNENMEIER K. Intramolecular synergism in an engineered exo-endo-1,4-beta-glucanase fusion protein [J]. Mol. Microbiol., 2002, 28(4): 767-775.
- [70] 韦小敏. 斜卧青霉胞外蛋白质组学分析与纤维素酶合成调控机制研究[D]. 济南: 山东大学, 博士学位论文, 2011.