

超声波强化木质纤维素酶解的研究进展

胡芳^{1, 2} 董旭¹ 史长伟¹ 吴学栋¹

(1. 齐齐哈尔大学轻工与纺织学院, 齐齐哈尔 161006; 2. 亚麻加工技术教育部工程研究中心, 齐齐哈尔 161006)

摘要: 超声波处理强化木质纤维素生物酶解过程, 可提高酶解速率和可发酵糖以及生物乙醇产量。综述了木质纤维素酶解过程和限制酶解的因素, 以及超声波强化在酶-底物预处理、糖化、同步糖化发酵工艺、产酶过程中的应用进展。超声波以多种方式促进木质纤维素的生物转化, 对酶促反应提供明显的强化效果。对超声波强化酶解的机理进行了分析, 超声波促进非均相系统的扩散和传质, 同时增大酶/底物的亲和力、提高酶/底物复合物转化为产物的速度, 酶分子构象发生柔性变化, 易于定位于底物, 破坏酶分子聚集体, 使得酶活性位点更易于进行反应; 增加纤维素底物的可及性; 改变酶蛋白空间结构, 在不改变酶的结构完整性的情况下使蛋白质分子发生有利的构象变化, 使酶的活性部位暴露得更加充分, 提高酶活性。对超声波处理是否会导致纤维素酶活性下降, 超声波反应器的类型、参数设置对研究结果的重要影响, 以及超声波强化木质纤维素酶解的经济效益评价进行了讨论。在超声波强化与其他酶解改进措施的协同作用、机理的深入研究和操作参数的综合优化等方面提出了进一步深入研究的方向。

关键词: 木质纤维素; 酶解; 纤维素酶; 超声波

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0116

Progress in Ultrasound Intensification for Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose

HU Fang^{1, 2} DONG Xu¹ SHI Chang-wei¹ WU Xue-dong¹

(1. College of Light Industry & Textile Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006; 2. Engineering Research Center of Flax Processing Technology Ministry of Education, Qiqihar 161006)

Abstract: Ultrasonic treatment can intensify enzymatic hydrolysis process of lignocellulosic biomass, which is beneficial to improving the enzymatic hydrolysis rate and the production of fermentable sugar and bioethanol. This paper reviews enzymatic hydrolysis process of lignocellulose and factors limiting enzymatic hydrolysis, as well as the applications of ultrasound on pretreatment of enzyme-substrate systems, saccharification, simultaneous saccharification and fermentation, and cellulase production. Ultrasonic treatment enhances the bioconversion of lignocellulosic in many ways and provides obvious reinforcement effect on enzymatic reactions. The mechanisms of ultrasonic intensification on enzymatic hydrolysis were analyzed. Ultrasonic treatment improves the process of mass transfer and diffusion of heterogeneous system, increases the enzyme/substrate affinity, enhances the conversion of enzyme/substrate complex into product, changes the conformation of enzyme molecules flexibly to locate on the substrate easily, breaks enzymatic molecular aggregates, and makes the enzyme active sites easier to react. Moreover, it increases the accessibility of cellulose substrates. Ultrasonic waves alters the spatial structure of the enzyme protein, causing favorable conformation changes to the enzyme without destroying its structural integrity, so that the active sites of the enzyme can be more fully exposed and the enzyme activity can be improved. The paper discusses whether or not cellulase activity decreases by ultrasonic treatment, the important influence of ultrasonic reactor type and parameter setting on the research results, and the economic benefit evaluation of ultrasonic intensified enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Finally the paper puts forward the further research direction in the aspects of the synergistic effect of ultrasonic enhancement and other enzymatic improvement measures, the in-depth study of mechanism and the comprehensive optimization of operation parameters.

Key words: lignocellulose; enzymatic hydrolysis; cellulase; ultrasound

收稿日期: 2021-01-28

基金项目: 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费专项类项目(135409707)

作者简介: 胡芳, 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物质资源利用; E-mail: fangh16@163.com; 胡芳同时为本文通讯作者

能源需求不断增加,而化石燃料储量日益减少,使得可再生能源越来越受到关注。生物乙醇是世界上使用最多的生物燃料^[1],可与汽油、柴油等原油衍生液体运输燃料混合使用。作为能源安全和气候变化问题的共同解决方案,是近年来非常活跃的研究领域。木质纤维素生物质,如农林业废弃物和部分城市固体废物,是可再生的、丰富的、廉价的第二代生物乙醇生产原料。第二代生物乙醇的生产涉及4个步骤,包括木质纤维素的预处理、纤维素酶解成可发酵糖、可发酵糖经发酵转化为乙醇和蒸馏。虽然原料的收购价格比化石燃料具有竞争力,但利用现有技术将木质纤维素转化为生物乙醇的成本仍然很高。酶法糖化路线约占过程总成本的20%,这一步骤具有创新和降低成本的潜力^[2]。近年来,超声波在酶催化生物转化中得到了广泛的应用,具有短时间内强化反应过程、提高产率、降低能耗、更好地利用原料和催化剂等显著优点^[3]。很多研究人员提出利用超声波强化的策略,有大量文献报道,超声波强化的木质纤维素酶解提高了可发酵糖及生物乙醇的产率,并对强化机理进行了不同侧面的探索。本文综述了超声波强化木质纤维素酶解的应用进展,并着重对超声波强化酶解的机理进行了分析,旨在为该领域的深入研究提供参考。

1 木质纤维素酶解过程及限制酶解的因素

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素组成,纤维素是葡萄糖单元通过 β -1,4糖苷键连接的线型高分子量聚合物。纤维素中存在的羟基形成分子间和分子内氢键,其超分子结构由结晶区和无定形区组成,结晶区分子排列规则且紧密,多糖链稳定性强,难于降解;而无定形区分子排列无规则且疏松,反应性能较高。半纤维素是高度分支的、由多种糖基构成的不均一聚合物,是无定形的。木质素是高度支化的芳香族聚合物,具有疏水性,由苯丙烷结构单元组成,与半纤维素共价交联结合,紧密地嵌入纤维素纤维。

1.1 酶解过程

酶催化纤维素水解过程涉及3类酶:内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(CBH I, EC 3.2.1.176; CBH II, EC 3.2.1.91)和 β -D-葡萄糖苷酶

(或称纤维二糖酶)(EC 3.2.1.21),它们以相互作用的方式对纤维素进行水解^[4-5]。纤维素酶解为多步非均相反应,不溶性纤维素最初通过内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的协同作用在固液界面分解。内切葡聚糖酶启动纤维素水解过程,破坏纤维素链无定形区域的内部糖苷键,增加纤维素链末端数量;然后两种类型的外切葡聚糖酶从纤维素链的还原性末端或非还原性末端分离出纤维二糖。以上过程伴随着可溶性中间产物的进一步液相水解。最后,纤维二糖酶将纤维二糖转化为可由酵母菌或细菌发酵成乙醇的D-葡萄糖。

除了以上3种主要的纤维素酶以外,还有许多辅助酶攻击半纤维素^[6],如木聚糖酶切割木聚糖的主链; α -阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -葡萄糖醛酸酶分别去除阿拉伯糖和4-O-甲基葡萄糖醛酸取代基;阿魏酰基酯酶攻击阿拉伯糖取代基和阿魏酸之间的酯键。提高酶用量,可以获得较高的糖产量,但同时导致成本增加,为了避免这一点,可以利用纤维素酶与其他酶之间的协同作用^[7-8]。

1.2 限制酶解的因素

木质纤维素不易被纤维素酶水解的主要原因是:(1)与纤维素共存的木质素和半纤维素也是木质纤维素生物质酶解中的屏障,限制酶对纤维素的可及性^[6,9];(2)微晶纤维素的可及性低,阻碍了纤维素酶的有效作用^[6,9];(3)非均相反应中的传质阻力^[10-11];(4)产物抑制作用^[6,12]。

木质纤维素转化为生物乙醇的第一个步骤:预处理,采用机械粉碎、稀酸预处理、碱预处理、水热法、氧化法、氨爆破、蒸汽爆破、有机溶剂预处理、离子液体预处理和生物法等^[13],可提高底物比表面积、降低纤维素结晶度、破坏木质素和半纤维素的屏障,从而促进纤维素的水解反应^[14]。虽然预处理去除了部分木质素和半纤维素,但为了提高酶解的总糖收率,总会有部分木质素和半纤维素保留在原料中,并影响酶解过程^[15-16]。木质纤维素生物质的酶转化涉及从液体介质向固体底物表面的传质,由于这种传质是由扩散控制的,所以酶解的总反应速率由酶大分子的扩散速率控制。一般来说,大型三维酶分子的扩散速率很低,这大大阻碍了水解反应

的整体速率。使用纤维素酶的一个重要限制是,可溶性产物(纤维二糖和葡萄糖)的抑制作用降低了反应速率。减少产物抑制作用的措施,包括水解过程中补充 β -D-葡萄糖苷酶、添加纤维二糖脱氢酶、或采用同步糖化发酵(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)工艺^[6]。

2 超声波强化木质纤维素酶解的应用

超声波强化木质纤维素酶解,主要由以下几个途径实现:超声波预处理酶-底物、超声波强化糖化、超声波强化SSF、超声波强化产酶过程,其中文献报道最多的是超声波强化糖化过程,如表1所示。

Silvello等^[1]利用超声波对酶-底物进行预处理,然后在50℃、300 r/min条件下水解24 h。超声波预处理的最佳条件为150.7 W/cm²、20 kHz、330 s和25℃,纤维素酶活性提高了42.35%,还原糖浓度达到对照样的1.9倍。Subhedar等^[17]利用废报纸酶解生产可发酵糖,并与常规酶解进行了比较。在相同的底物浓度下,常规酶解的条件为:酶用量0.14% (W/V)、水解72 h,还原糖得率11.569 g/L;以超声波辅助酶解,酶用量0.08% (W/V)、水解6.5 h、还原糖产量27.6 g/L。超声波强化使酶解时间大大缩短,酶用量显著减少,还原糖的释放浓度达到对照样的2.4倍。Subhedar等^[18]以花生壳、椰子壳和开心果壳3种木质纤维素生物质为原料,超声波辅助碱预处理后进行常规酶解和超声波辅助酶解,得到了相似的结果。Borah等^[23]利用超声波促进杂草酶解过程,超声波代替机械搅拌可以使水解动力学提高近10倍,机械搅拌120 h与超声处理10 h获得了相同的糖产量。Gasparotto等^[27]研究了固态发酵产纤维素酶在直接和间接超声波作用下对未经处理蔗渣的酶解,认为间接超声波是更有前途的辅助酶反应技术。

研究者们还进行了超声波强化SSF工艺^[26, 29-30]和超声波强化微生物生产纤维素酶^[26]的研究。SSF工艺具有操作条件温和、发酵罐单一、水解和发酵两步结合的优点。在SSF过程中,发酵微生物消耗生物质中纤维素酶解释放的己糖,降低糖化产物对酶的抑制作用,也降低了侵入性微生物污染的可能性。与传统的两步法相比,SSF工艺更加节能。然

而,SSF工艺的一个主要问题是酶解的最佳温度(50-55℃)与发酵的最佳温度(30-35℃)之间的不同,因此SSF过程的主要限制是两个独立过程的最佳条件的折衷。Ofori-Boateng等^[30]以棕榈叶为原料,在超声波-有机溶剂预处理后,在200 W、37 kHz、培养时间5 h、40℃、pH值5、酵母浓度15 g/L、固体负荷10% (W/V)条件下进行SSF工艺,得到最大乙醇浓度18.2 g/L,产率57%。在相同的条件下,进行无超声波处理SSF工艺,生物乙醇浓度(3.1 g/L)和产率(14.0%)较低,常规SSF工艺需要超过24 h才能获得高生物乙醇产量,而超声波辅助SSF工艺在短时间和高固体负载下可显著提高生物乙醇的产量。Singh等^[29]在超声波辅助下,利用银胶菊,采用SSF生产生物乙醇,研究发现,在30℃下,发酵时间18.3 h后,乙醇浓度提高到15.62 g/L,乙醇产率为0.4 g/g预处理生物质;无超声波SSF实验在发酵54 h后,乙醇浓度最高为10.57 g/L,乙醇产量为0.27 g/g预处理生物质。超声波处理对SSF过程最显著的影响是缩短了发酵时间。Velmurugan等^[26]研究了超声波对甘蔗渣培养里氏木霉产纤维素酶、酶解及SSF生产乙醇的影响。甘蔗渣培养里氏木霉分生孢子的萌发强度明显提高,超声波处理通过增强细胞分裂来增加分生孢子数量。超声波强化酶解的葡萄糖浓度为23.5 g/L,而常规酶解为19.7 g/L。240 W超声下,水解液中乙酸和糠醛的最大浓度分别为399 mg/L和109 mg/L,远低于抑制水平。在SSF实验中,测定了超声波辅助水解条件与酿酒酵母生长的相容性,在400 W下,超声波刺穿了细胞;而240 W的超声波不会使细胞破裂,从而提供了超声波对发酵的积极作用。超声波-SSF发酵速率比常规SSF高,且大部分糖在发酵30 h后转化为乙醇,最大浓度为11 g/L。另一方面,没有超声波的SSF实验显示,即使在发酵36 h后,乙醇浓度仍逐渐增加,获得的最大浓度为9 g/L。Silvana等^[31]采用超声波强化球孢白僵菌产 β -1,3-葡聚糖酶,在24 h的发酵过程中,以195 W、24 kHz、50%占空比处理5 min,使 β -1,3-葡聚糖酶的产量增加了46%。在扫描电子显微镜(SEM)照片中观察到菌丝体的破碎,证实了酶更好地释放到细胞外。Shaheen等^[32]以80 mW/cm²、1.5 MHz、占空比20%的超声波强化里氏

表 1 超声波强化木质纤维素酶解的应用

强化途径	原料	超声波参数	主要影响	文献
Intensification approach	Materials	Ultrasonic parameters	Main effects	Reference
超声波预处理酶-底物 Ultrasound pretreatment of enzyme-substrate	甘蔗渣	150.7 W/cm ² 、20 kHz	还原糖浓度达到对照样的 1.9 倍	[1]
	Sugarcane bagasse		Concentration of reducing sugar was 1.9 times of the control	
超声波强化糖化 Ultrasound intensification of saccharification	旧报纸 Old newspaper	60 W、20 kHz、占空比 70% 60 W、20 kHz、70% duty cycle	还原糖浓度达到对照样的 2.4 倍 Concentration of reducing sugar was 2.4 times of the control	[17]
	花生壳、椰子壳和开心果壳	80 W、20 kHz、占空比 70%	还原糖产量达到对照样的 2 倍	[18]
	Groundnut shells, coconut coir and pistachio shells	80 W、20kHz、70% duty cycle	Concentration of reducing sugar was double of the control	
	玉米芯 Corncob	280 W 和 500 W、20 kHz、占空比 50%、 280 W and 500 W、20 kHz、50% duty cycle	葡聚糖消化率分别提高 75.6% 和 58.9% Glucan digestibilities were increased 75.6% and 58.9%, respectively	[19]
	稻草 Rice straw	300 W、40 kHz	总还原糖产率增加 19.5% Yield of total reducing sugar with ultrasound increased by 19.5%	[20]
	银胶菊 <i>Parthenium hysterophorus</i>	35 W、35 kHz、占空比 10% 35 W、35 kHz、10% duty cycle	酶解动力学提高 6 倍，总还原糖产量增加约 20% Kinetics of hydrolysis showed a marked 6× increase with sonication, while total reducing sugar yield showed rise of 20%	[21]
	银胶菊 <i>Parthenium hysterophorus</i>	35 W、35 kHz、占空比 50% 35 W、35 kHz、50% duty cycle	酶解动力学提高 18 倍，酶解时间从 72 h 减少到仅 4 h 18-fold increase in the kinetics of enzymatic hydrolysis was seen with ultrasound, and the hydrolysis time reduced from 72 h to just 4 h	[22]
	甜根子草、薇甘菊、马缨丹和凤眼莲 <i>Saccharum spontaneum</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Lantana camara</i> and <i>Eichhornia crassipes</i>)	35 W、35 kHz、占空比为 10% 35 W、35 kHz、10% duty cycle	酶解动力学提高近 10 倍 Kinetics of enzymatic hydrolysis increased by 10-fold	[23]
	玉米秸秆 Corn stover	80 W、20 kHz	催化效率提高约 70% Catalytic efficiency of cellulase increased by 70%	[24]
	甘蔗渣 Sugarcane bagasse	132 W、40 kHz	提高葡萄糖产量 Yield of glucose increased	[25]
甘蔗渣 Sugarcane bagasse		240 W、24 kHz、30 min/30 s 超声波处理 240 W、24 kHz、30 s ultrasound irradiation for every 30 min of incubation	提高葡萄糖和乙醇产量 Improved the sugars and ethanol yield	[26]

表 1 续表 Continued

强化途径	原料	超声波参数	主要影响	文献
Intensification approach	Materials	Ultrasonic parameters	Main effects	Reference
	甘蔗渣 Sugarcane bagasse	60 W/cm ² 、24 kHz	在直接和间接超声作用下，水解产物的最高产率分别为 31.3 g/kg 和 60.6 g/kg Maximum yield of hydrolysis were 31.3 g/kg and 60.6 g/kg respectively under direct and indirect sonication, respectively	[27]
	木屑 Sawdust	50 W、20 kHz、占空比 70% 50 W、20 kHz、70% duty cycle	1 h 超声波强化酶解，与常规搅拌 3h 的还原糖产率相当 Ultrasound intensified enzymatic hydrolysis within 1 h resulted in approximately same yield of reducing sugars within 3 h with conventional stirring	[28]
	银胶菊 <i>Parthenium hysterophorus</i>	240 W、24 KH、每 30 min 进行 30 s 超声波处理 240 W、24 kHz, 30 s ultrasound irradiation for every 30 min of incubation	提高发酵速率 Increased the rate of fermentation was higher	[26]
超声波强化SSF Ultrasound intensification of SSF	甘蔗渣 Sugarcane bagasse	240 W、24 kHz、每 30 min 进行 30 s 超声波处理 240 W、24 kHz, 30 s ultrasound irradiation for every 30 min of incubation	提高发酵速率 Increased the rate of fermentation was higher	[26]
	银胶菊 <i>Parthenium hysterophorus</i>	35 W、35 kHz、占空比为 10% 35 W、35 kHz、10% duty cycle	加速发酵和酶解 Fermentation and enzymatic hydrolysis were enhanced	[29]
	棕榈叶 Oil palm fronds	200 W、37 kHz	最大乙醇浓度 18.2 g/L，产率 57% Maximal bioethanol concentration was 18.2 g/L and yield was 57.0%	[30]
超声波强化产酶 Ultrasound intensification of cellulase production	甘蔗渣 Sugarcane bagasse	240 W、24 kHz，每 6 h 进行 30 s 超声波处理 240 W、24 kHz, 30 s ultrasound irradiation for every 6 h of incubation	增加分生孢子数量；蛋白质浓度提高 1.4 倍 Produced conidia showed higher intensity, the protein concentration increased 1.4 fold	[26]

木霉产纤维素酶过程，超声波辐照每天 12 次、每次 5 min、发酵 6 d，纤维素酶活性提高 22%。未接受超声波处理的样品，菌丝壁圆而光滑；而超声波处理后的里氏木霉，菌丝收缩、菌丝壁上有许多裂纹和开口，这些裂缝和开口可能促进纤维素酶的释放。

3 超声波强化木质纤维素酶解的机理

基于不同的实验方法和侧重点，关于超声波强化木质纤维素酶解机理，研究者们提出了多种解释，现归纳如下。

3.1 促进非均相系统的扩散和传质

在非均相系统中，空化泡发生非对称坍塌，当气泡在固体表面附近破裂时，会产生高压/高速液体射流，这些射流可以清洁固体表面，并通过中间体的脱附而活化固体催化剂，还可以通过扰动界面边界层来增加传质。固体表面的不对称坍塌也会

导致底物碎片和表面粗糙^[33]。因此，超声波可以增加底物比表面积、微观/分子水平的混合，从而增加传质。

Yachmenev 等^[11]和 Easson 等^[34]认为木质纤维素酶促反应可以总结为以下 4 个阶段（图 1），其中 2 个阶段（1 和 4）涉及酶大分子和酶反应产物到达和离开固体底物表面的运输，这两个阶段都受扩散控制，因此酶水解的总反应速率由酶大分子的扩散速率控制。但酶蛋白大分子的扩散速率很低，大大阻碍了水解反应的整体速率。非均相系统（如酶溶液-木质纤维素生物质）中空化泡的溃灭与均相系统不同，由于表面对液体流动提供阻力，表面上或表面附近的空化泡是非对称的。其结果是大量液体从气泡的另一侧（远离底物表面）涌出，形成强大的液体射流（约 500 m/s）并作用于表面。同样重

要的是，空化泡的快速溃灭在气泡周围的液体中产生显著的剪切力，并因此产生强烈的机械搅拌效应。在非均相系统中，空化效应比均相系统中的大几百倍。这种理想的搅拌机制，发生在固液界面的紧密边界层，大大提高了酶大分子对底物表面的供应。由于酶促反应的特殊性，超声波在促进扩散和传质的同时，还发挥与之相关的以下积极影响：

（1）超声波不仅增大酶 / 底物的亲和力，而且提高了酶 / 底物复合物转化为产物的速度。酶 / 底物的亲和力增大是运输更快和酶与底物的相互作用增强的结果，这归因于反应混合物中由超声波空化产生的微湍流和强烈的混合作用。Nadar 等^[3]、Sulaiman 等^[10] 和 Subheder 等^[35] 利用 Michaelis-Menten 方程变换，绘制了 Lineweaver-Burk 曲线，得到 Michaelis 常数 (K_m) 和当酶被底物饱和时的最大反应速率 (v_{max})。结果表明，与未处理酶相比，超声波处理后纤维素酶 K_m 降低，而 v_{max} 增加。Silvell 等^[36] 得到了相似的结果，在超声波处理下， K_m 比对照组降低 23%， v_{max} 提高了 21%。 K_m 表示酶与底物之间的亲和力，超声波处理下 K_m 的降低，是由于更快的传质和酶与底物相互作用增加。 v_{max} 的增加表明，在超声波场下，反应物向酶活性部位大量转移，酶 - 底物复合物快速裂解^[23, 34]。（2）促进可溶性产物，即纤维二糖和葡萄糖，从纤维素表面被带走并在介质中被稀释，降低与酶活性位点结合的可能性，从而降低产物抑制程度。Borah 等^[23] 和 Singh 等^[29] 采用 Holtzapled 等^[37] 提出的一级产物抑制模型（又称 HCH-1 酶解纤维素模型），研究了超声波对银胶菊和 4 种杂草的酶解强化过程，由实验结果得到 HCH-1 模型参数值，其中产物结合常数降低，证实了超声波强化减少了酶解过程中的产物抑制作用。（3）酶大分子通常不是完全刚性的，而是在溶液中具有某种构象柔性，因此，由超声波作用引起的固液界面边界层的剧烈搅拌，将有助于酶大分子更容易“合适”地定位在底物上^[11]。（4）微湍流破坏酶分子聚集体，使得酶活性位点更易于进行反应，从而提高活力^[3, 36]。

3.2 增加纤维素底物的可及性

微气泡的快速崩解产生剪切力，有助于将木质

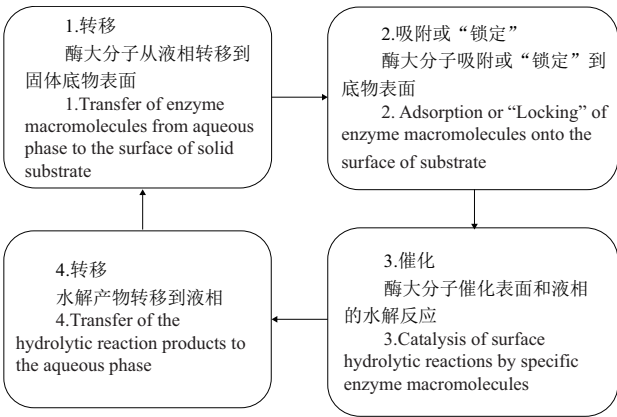


图 1 固体底物酶促反应阶段

Fig. 1 Schematic diagram of the general stages of an enzymatic reaction on a solid substrate

纤维素材料分解成更细小的颗粒，从而显著增加酶攻击的表面积。由空化气泡的崩溃所产生的机械冲击，为酶促作用打开了固体底物的表面^[9, 25, 38]。

Adewuyi 等^[9] 利用 BET 比表面积测定法和 XRD (X-ray diffraction, X 射线衍射) 技术对天然和处理后的纤维素进行表征，结果表明，天然纤维素的比表面积为 2.18 m²/g，但在仅酶存在的水解反应后增加到 2.68 m²/g，在超声波 / 酶存在下增加到 4.32 m²/g，分别增加了 23% 和近 100%。经过酶和（或）超声波处理后，纤维素结晶度有显著变化，从天然纤维素的 75% 降低到酶处理纤维素的 70.37%、超声波 - 酶处理纤维素的 66.15%。因此，在超声波存在下纤维素比表面积增加，同时纤维素粉末结晶度略有降低，酶和超声波的协同作用使纤维素的微观结构发生了变化，促进了纤维素水解。

3.3 影响酶蛋白空间结构，提高酶活性

酶蛋白的空间结构对其催化效率有至关重要的作用，研究者们利用内源荧光光谱法和圆二色 (circular dichroism, CD) 光谱法分析了超声波对酶分子空间结构的影响。

内源性荧光主要与芳香族氨基酸残基有关，特别是色氨酸残基。Borah 等^[23] 发现，机械搅拌和超声处理均能使荧光强度降低，但超声波的作用更明显，最佳荧光发射波长 (348 nm) 没有发生任何红移或蓝移。这种变化是由于空化产生的强烈微对流使得蛋白质分子间疏水相互作用被破坏，导致蛋白

质分子去折叠,纤维素酶分子疏水性氨基酸基团和酶分子内部结构暴露,导致活性增强。Subhedar 等^[35]得出了相同的结论。Wang 等^[2]发现,纤维素酶分子的内源荧光强度随着超声波功率、超声波频率和超声波处理时间的增加而降低。

利用 CD 光谱法可以分析酶蛋白二级结构的变化,Wang 等^[2]发现,24 kHz、15 W、10 min 的超声波处理使纤维素酶的构象发生变化,部分 α -螺旋发生变形,而无规卷曲含量增加,相应地,酶活力提高到 59.58 μmL ;而在 29 kHz、50 W、30 min 条件下,纤维素酶 α -螺旋含量增加且无规卷曲含量减少,纤维素酶的酶活力下降到 31.62 μmL 。Subhedar 等^[35]研究发现,在最佳超声条件下,与未处理酶相比, α -螺旋含量下降了 12.4%,无规卷曲增加了 29.6%。Fan 等^[39]研究了超声波处理对 β -D-葡萄糖苷酶二级结构的影响,得到了相同的结论。还有研究者发现,超声波对蛋白质构象的影响同样适用于固定化酶^[2, 40],Ladole 等^[40]将纤维素酶固定在磁性纳米粒子上,在 24 kHz、6 W、6 min 条件下,酶催化活性提高近 3.6 倍。CD 光谱分析表明,超声波处理使 β -片层和无规卷曲分别增加了 6.23% 和 0.69%,而 α -螺旋和 β -转角的含量则减少了 1.8% 和 2.11%。CD 光谱研究证实,超声波处理使得酶蛋白的有序结构减少,而无序结构增加,有利于暴露酶蛋白内部的催化位点,纤维素酶显示出更大的灵活性,使得纤维素酶易于与底物相结合,有助于提高催化效率。

但超声波处理对酶活性也存在负面影响,超声波空化产生高活性中间体,如 $\text{H}\cdot$ 、 $\text{OH}\cdot$ 、 H_2O_2 、 HO_2 和 H_2 ,可能与底物结合域或催化域的氨基酸残基发生反应^[41]。有研究者提出^[6],活性中间体与蛋白质骨架作用,会导致酶的聚集,从而阻碍活性位点,同时也降低蛋白质的稳定性。此外,超声波处理产生的剪切力在酶失活中也有相当大的作用^[37, 41]。但 Nguyen 等^[41]和 Sun 等^[42]的研究证实,超声波并没有引起纤维素酶分子的剧烈损伤,其一级结构没有降解或改变。

超声波处理使纤维素酶活性增加或降低,与超声波参数设置密切相关。总的来说,低强度超声波将酶分子聚集体分解成更小的碎片,暴露更多的

活性位点,有助于酶活性的增加;同时,高强度超声波结合长时间处理导致自由基反应,可使酶失活^[43-45]。但不同的文献中,引起酶活性下降的超声波参数是不同的,这与超声波发生器的类型、底物的性质、其他参数的设定等有关。Su 等^[19]的研究发现,在高强度(>120 W)下,纤维素酶活性在 50℃时明显下降;然而,在所有输出功率(0-500 W)下,37℃时的纤维素酶活性都是稳定的。Szabó 等^[43]发现,在 40% 振幅(40 kHz,最大功率 500 W)下,酶活性在 65 min 内损失了 12%。当振幅增加到 60% 和 80% 时,酶活性下降更为显著,65 min 后酶的活性分别只有原来的 80% 和 75%。Silva 等^[46]发现,在 20 kHz 和 50 W/cm² 的超声波条件下, β -D-葡萄糖苷酶活性提高 1.5 倍。Chen 等^[47]发现,在 968 W/cm² 和 10 min 时, β -D-葡萄糖苷酶活性下降了 84.71%。Sun 等^[42]发现低温度(20-45℃)、低超声波强度(<181.53 W/cm²)和短处理时间(<15 min)导致了 β -D-葡萄糖苷酶的激活,而高温(45-60℃)、高超声波强度(>181.53 W/cm²)和长处理时间(>15 min)导致其抑制。

4 关于超声波强化木质纤维素酶解的不同观点

4.1 超声波处理是否会导致纤维素酶活性下降

如前所述,很多文献报道了适当条件下的超声波处理改变纤维素酶的空间结构,使纤维素酶活性提高,但高强度超声波会导致纤维素酶失活,对此,有研究者提出了不同的观点。Adewuyi 等^[9]在 611 khz、104 w、50℃和 pH 5.2 条件下得到最佳的纤维素水解,葡萄糖产率为 41.4%,延长时间(40-50 h)可获得高达 70% 的葡萄糖产率。在大约 30 h 后观察到水解速率降低,可能是由于除了产物、底物和吸附抑制之外,易水解的非晶纤维素的减少。Adewuyi 等^[9]提出,高活性中间产物的形成,特别是在高超声波频率下的形成,对溶解酶大分子的长期催化/活性没有任何显著影响。一个可能解释是,在通常的低酶浓度下,酶相对于大量溶剂分子(如水)的比率极低,酶大分子被滞留在空化气泡中并遇到由溃灭的气泡所产生的高活性中间产物的可能性很低,因此大多数酶对超声波的抵抗力非常高,以至于产

生广泛酶活性恶化所需的超声波强度可能太高而无法达到。Yachmenev 等^[11]也支持了这一观点。但在这些报道中,并没有测定纤维素酶的活性,研究者认为,利用超声波和酶对纤维素水解的改善归因于超声波作用下纤维素的表面积增加和结晶度降低。另有研究者发现^[19, 43],虽然高强度/长时间超声波处理仍然使酶催化水解效率提高,但经测定发现纤维素酶活性确实下降了,其原因是超声波对非均相纤维素-纤维素酶反应的积极影响能够克服其对酶活性的负面影响。因此超声波强化木质纤维素酶解各种机理的相对贡献,以及在酶解过程不同阶段的差异,有待于进一步研究。

4.2 超声波反应器的类型和参数设置对研究结果有重要影响

超声波强化木质纤维素酶解的实验室研究中,常常采用槽式或变幅杆式超声波反应器,个别研究中采用了新型多频超声反应器^[9]和可提供均匀可控超声波的六边形超声波反应器^[11, 34],对于变幅杆式超声波反应器,变幅杆的位置和直径是影响超声波作用的重要参数,不同类型超声波反应器和同种类型不同参数设置的超声波反应器,其研究结果难以比较。Gasparotto 等^[27]提出间接超声波是最有前途的辅助酶反应技术,在实验中,直接超声波和间接超声波均由变幅杆式超声波反应器提供,但另有文献^[3]中提出的直接超声波和间接超声波被分别定义为由槽式和变幅杆式超声波反应器提供。利用理论和实验的方法,对超声波反应器空化行为进行定量描述和评价,是对超声波反应器类型和参数设置进行对比的有效途径。超声波反应器的设计不仅对实验室研究结果有重要影响,更是决定超声波强化木质纤维素酶解研究放大和实现工业化的关键因素。

5 超声波强化木质纤维素酶解的经济效益评价

木质纤维素生物质的酶解成本高、效率低,是阻碍第二代生物乙醇成本竞争性生产的主要原因。尽管近年来纤维素酶的生产成本大幅度降低,但木质纤维素糖化过程仍然是一个昂贵而缓慢的步骤。超声波强化木质纤维素酶解可缩短反应时间、减少纤维素酶的用量,但同时必须考虑设备的投资和维

护,以及超声波处理是一个能量密集过程这一现实。对这一过程进行技术经济分析是重要的研究课题,但仅有个别文献进行了报道^[47],以旧报纸、办公废纸为原料的超声波辅助酶解,附加的超声波能量为 5.2–10.4 MJ,总产糖量增加,额外能量输出为 15–160 kJ,超声波辅助酶解对总成本有消极的影响。利用现有的超声波技术,对纤维素生物质进行预处理和热化学/生物化学反应进行强化,额外的超声波处理消耗的能量大得多,而由于糖产量提高而增加的能量输出仅为消耗能量的一小部分,在超声波辅助糖化的初期,酶效率的提高可能并不显著,原因在于木质细胞结构非常顽固,同时,悬浮状态下的微米/纳米级木质纤维素颗粒的高体积密度,导致超声波能量严重衰减。为此,需要进一步研究超声波反应器的结构和设计、超声波参数和操作对特定反应的适应性;超声波与其他强化处理方法结合,特别是大规模处理高固体浓度的生物质原料;进行超声辅助反应的动力学和机理研究,应分析不同反应所需的活化能水平,以找到超声波强化与化学活化的最佳组合。

6 总结与展望

仅用酶法进行木质纤维素生物质水解是相当缓慢的,超声波可参与酶-底物预处理、糖化、SSF 工艺和产酶过程,以多种方式强化木质纤维素的生物转化,对酶促反应提供明显的强化效果,可提高可发酵糖以及生物乙醇产量、增大酶解速率、减少酶解反应时间和降低酶用量。本文总结了促进非均相系统的扩散和传质,增加纤维素底物的可及性,改变酶蛋白空间结构、提高酶活性等超声波强化酶解的机理,但超声波强化木质纤维素酶解这一课题仍有很大的深入研究的空间,包括:

(1) 超声波强化与其他酶解改进措施的协同作用。为了提高木质纤维素酶解效率,可采用多种措施,如在酶解体系中加入适量的水溶性木质素、非离子表面活性剂,可有效减少底物木质素对纤维素酶的无效吸附^[48–49];添加纤维二糖脱氢酶、扩展蛋白和膨胀素,可显著提高纤维素糖化效率^[50]; Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 和阿魏酸、对香豆酸等对纤维素酶具有激活作用^[4]。超声波强化与以上酶解改进措施的协同

作用的研究将为木质纤维素生物乙醇的生产提供更多的机遇。

(2) 超声波空化的物理/化学与酶解的生物化学之间的确切联系尚未建立。有必要研究在不同实验条件下的超声波效应, 建立数学模型, 量化可变参数对超声波整体效应的贡献, 从而预测过程效率的变化。需要了解酶结构变化与超声波处理的关系, 了解酶反应表观动力学变化与酶活性位点的数量和分布之间的联系。

(3) 超声波强化木质纤维素酶解操作参数的综合优化。关键参数包括包超声波发生器的结构、功率、频率、处理时间, 以及酶解的一般参数, 如温度、酶用量、酶-底物比率等。此外, 还应考虑其他因素, 如静压、充气操作和溶剂特性。在分析实际强化机理的基础上, 对超声波强化木质纤维素酶解操作参数进行优化。

参考文献

- [1] Silvello MA, Martínez J, Goldbeck R. Increase of reducing sugars release by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse intensified by ultrasonic treatment [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2019, 122: 481-489.
- [2] Wang Z, Lin X, Li P, et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment [J]. *Bioresour Technology*, 2012, 117: 222-227.
- [3] Nadar S S, Rathod V K. Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33: 170-181.
- [4] 张俊, 许超, 张宇, 等. 纤维素酶降解机理的研究进展 [J]. *华南理工大学学报*, 2019, 47 (9): 121-130.
- Zhang J, Xu C, Zhang Y, et al. Research progress on cellulase biodegradation mechanism [J]. *Journal of South China University of Technology*, 2019, 47 (9): 121-130.
- [5] 徐晓, 程驰, 袁凯, 等. 里氏木霉产纤维素酶的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41 (1): 52-61.
- Xu X, Cheng C, Yu K, et al. Research progress of cellulase production in *Trichoderma reesei* [J]. *China Biotechnology*, 2021, 41 (1): 52-61.
- [6] Subhedar PB, Gogate PR. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: A review [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52 (34): 11816-11828.
- [7] 曹长海, 张全, 关浩, 等. 提高木质纤维素酶解糖化效率的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35 (8): 126-136.
- Cao CH, Zhang Q, Guan H, et al. Research progress of enhancing enzymatic saccharification efficiency of lignocellulose [J]. *China Biotechnology*, 2015, 35 (8): 126-136.
- [8] 沈丽君, 苏瑛杰, 于潇潇, 等. 木质纤维素诱导里氏木霉产纤维素酶及酶解增效作用研究进展 [J]. *吉林农业大学学报*, 2019, 41 (6): 681-685.
- Shen LJ, Su YJ, YU XX, et al. Advances in researches on cellulase production by lignocellulose and its synergism with enzymatic hydrolysis of *Trichoderma reesei* [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2019, 41 (6): 681-685.
- [9] Adewuyi YG, Deshmene VG. Intensification of enzymatic hydrolysis of cellulose using high-frequency ultrasound: an investigation of the effects of process parameters on glucose yield [J]. *Energy Fuels*, 2015, 29 (8): 4998-5006.
- [10] Sulaiman AZ, Ajit A, Chisti Y. Ultrasound mediated enzymatic hydrolysis of cellulose and carboxymethyl cellulose [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29 (6): 1448-1457.
- [11] Yachmenev V, Condon BD, Klasson KT, et al. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound [J]. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2009, 3 (1): 25-31.
- [12] 魏薇, 常福祥, 孙建中, 等. 木质纤维“一锅法”制备生物乙醇的研究进展 [J]. *生物质化学工程*, 2018, 52 (1): 53-59.
- Wei W, Chang FX, Sun JZ, et al. Recent advances in “One-pot” bioethanol production from lignocellulose [J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2018, 52 (1): 53-59.
- [13] Kumar, AK, Sharma, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feed stocks: a review [J]. *Bioresour. Bioprocess*, 2017, 4 (1): 7-26.
- [14] 曹运齐, 解先利, 郭振强, 等. 木质纤维素预处理技术研究进展 [J]. *化工进展*, 2020, 39 (2): 489-495.
- Cao YQ, Xie XL, Guo ZQ, et al. Research progress on lignocellulose pretreatment technology [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2020, 39 (2): 489-495.
- [15] 王锐, 辛东林, 张军华. 木质素降解产物对纤维素酶和木聚糖酶水解的抑制 [J]. *林业工程学报*, 2019, 4 (4): 78-84.

- Wang R, Xin DL, Zhang JH. Inhibitory effects of vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde and syringaldehyde on cellulases and xylanases [J] . Journal of Forestry Engineering, 2019, 4 (4) : 78-84.
- [16] Trache D, Hazwan HM, Mohamad H, et al. Recent progress in cellulose nanocrystals : sources and production [J] . Nanoscale, 2017, 9 (5) : 1763-1786.
- [17] Subhedar PB, Babu NR, Gogate PR. Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production [J] . Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 22 : 326-332.
- [18] Subhedar PB, Babu NR, Gogate PR. Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation [J] . Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 40 (Pt B) : 140-150.
- [19] Su RX, Yang RJ, Jifeng Y, et al. Oscillating cellulase adsorption and enhanced lignocellulose hydrolysis upon ultrasound treatment [J] . Transactions of Tianjin University, 2017, 23 (1) : 11-19.
- [20] Yang CY, Fang TJ. Combination of ultrasonic irradiation with ionic liquid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw [J] . Bioresource Technology, 2014, 164 : 198-202.
- [21] Singh S, Agarwa M, Bhatt A, et al. Ultrasound enhanced enzymatic hydrolysis of *Parthenium hysterophorus* : A mechanistic investigation [J] . Bioresource Technology, 2015, 192 : 636-645.
- [22] Bharadwaja STP, Singh S, Moholkar VS. Design and optimization of a sono-hybrid process for bioethanol production from *Parthenium hysterophorus* [J] . Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2015, 51 : 71-78.
- [23] Borah AJ, Agarwal M, Poudyal M, et al. Mechanistic investigation in ultrasound induced enhancement of enzymatic hydrolysis of invasive biomass species [J] . Bioresource Technology, 2016, 213 : 342-349.
- [24] Zhang YQ, Fu EH, Liang JH, et al. Effect of ultrasonic waves on the saccharification processes of lignocellulose [J] . Chemical Engineering Technology, 2008, 31 (10) : 1510-1515.
- [25] Gasparotto JM, Werle LB, Foletto EL. Production of cellulolytic enzymes and application of crude enzymatic extract for saccharification of lignocellulosic biomass [J] . Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175 (1) : 560-572.
- [26] Velmurugan R, Incharoensakdi A. Proper ultrasound treatment increases ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse [J] . RSC Advance, 2016, 6 (94) : 91409-91419.
- [27] Gasparotto JM, Werle LB, Mainardi MA, et al. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication [J] . Process Biochemistry, 2015, 4 (4) : 480-485.
- [28] Patil RS, Joshi SM, Gogate PR. Intensification of delignification of sawdust and subsequent enzymatic hydrolysis using ultrasound [J] . Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 58 : 104656-104565.
- [29] Singh S, Agarwal M, Sarma S, et al. Mechanistic insight into ultrasound induced enhancement of simultaneous saccharification and fermentation of *Parthenium hysterophorus* for ethanol production [J] . Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 26 : 249-256.
- [30] Ofori-Boateng C, Lee KT. Ultrasonic-assisted simultaneous saccharification and fermentation of pretreated oil palm fronds for sustainable bioethanol production [J] . Fuel, 2014, 119 : 285-291.
- [31] Silvana S, Bruno CA, Eliana AA, et al. Ultrasound-assisted fermentation for production of β -1, 3-glucanase and chitinase by *Beauveria bassiana* [J] . Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2021, 96 (1) : 88-98.
- [32] Shaheen M, Choi M, Ang W, et al. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bioethanol production [J] . Renewable Energy, 2013, 57 : 462-468.
- [33] Holkar CR, Jadhav AJ, Pinjari DV, et al. Cavitationally driven transformations : a technique of process intensification [J] . Industrial & Engineering Chemistry Research, 2019, 58 (15) : 5797-5819.
- [34] Easson MW, Condon B, Dien BS, et al. The application of ultrasound in the enzymatic hydrolysis of switchgrass [J] . Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165 (5-6) : 1322-1331.
- [35] Subhedar PB, Gogate PR. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations [J] . Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic, 2014, 101 : 108-114.
- [36] Silvell MA, Martínez J, Goldbeck R. Low-frequency ultrasound

- with short application time improves cellulase activity and reducing sugars release [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191 : 1042-1055.
- [37] Holtzaple MT, Caram HS, Humphrey AE. The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26 (7) : 775-780.
- [38] Delgado-Povedano M, Luque de Castro MD. A review on enzyme and ultrasound : a controversial but fruitful relationship [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 889 : 1-21.
- [39] Fan XH, Zhang XY, Zhang QA, et al. Optimization of Ultrasound Parameters and its Effect on the Properties of the Activity of beta-Glucosidase in Apricot Kernels [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 52 : 468-476.
- [40] Ladole MR, Mevada JS, Pandit AB. Ultrasonic hyperactivation of cellulase immobilized on magnetic nanoparticles [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239 : 117-126.
- [41] Nguyen TTT, Le VVM. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex [J]. *International Food Research Journal*, 2013, 20 : 557-563.
- [42] Sun YJ, Zeng L, Xue YZ, et al. Effects of power ultrasound on the activity and structure of β -D-glucosidase with potentially aroma-enhancing capability [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7 (3) : 2043-2049.
- [43] Szabó OE, Csiszár E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98 (2) : 1483-1489.
- [44] Luzzi SC, Artifon W, Piovesan B, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass using ultrasound aiming at obtaining fermentable sugar [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2017, 35 (3) : 1-10.
- [45] Dalagnol LMG, Silveira VCC, Silva HB, et al. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound : effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 61 : 80-87.
- [46] Silva MBR, Falco HG, Kurozawa LE, et al. ltrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk [J]. *Journal of Food Bioactives*, 2019, 6 : 140-147.
- [47] Chen LY, Bi XF, Cao XM, et al. Effects of high power ultrasound on microflora, enzymes and some quality attributes of a strawberry drink [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98 (14) : 5378-5385.
- [48] 金永灿, 陈慧, 吴文娟, 等. 水溶性木质素对纤维原料酶水解的影响研究进展 [J]. *林业工程学报*, 2020, 5 (4) : 12-19.
- Jin YC, Chen H, Wu WJ, et al. Investigations of the effect of water-soluble lignin on enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2020, 5 (4) : 12-19.
- [49] 刘南, 祁峰, 李力, 等. 纤维素降解辅助蛋白及其作用机理研究进展 [J]. *化工进展*, 2018, 37 (3) : 1118-1129.
- Liu N, Qi F, Li L, et al. Auxiliary proteins for boosting enzymatic hydrolysis of cellulose and the action mechanisms [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2018, 37 (3) : 1118-1129.
- [50] Luo J, Fang Z, Smith RL. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2014, 40 (1) : 400-421.

(责任编辑 狄艳红)