



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 纤维二糖可控释放提升纤维素水解效率研究
作者: 李铭心, 陈浩, 马翠华, 晏嵩华, 周丽, 田康明
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250026
收稿日期: 2025-02-22
网络首发日期: 2025-07-29
引用格式: 李铭心, 陈浩, 马翠华, 晏嵩华, 周丽, 田康明. 纤维二糖可控释放提升纤维素水解效率研究[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250026>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250026

纤维二糖可控释放提升纤维素水解效率研究

李铭心¹, 陈浩², 马翠华³, 晏嵩华¹, 周丽⁴, 田康明^{*1}

(1.天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457; 2.青岛高能合诚生物科技有限公司, 青岛 266114;

3.博兴县综合检验检测中心, 博兴 256500; 4.江南大学生物工程学院, 无锡 214122)

摘要: 纤维质原料作为一种可持续的资源, 其酶解产物作为生物发酵原料的需求增长显著。本研究系统评价了纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶关键酶分子酶活抑制情况, 优化纤维素酶解生成纤维二糖的工艺。通过重叠 PCR 将来源于黑曲霉的内切葡聚糖酶编码基因 *eglA* 和外切葡聚糖酶编码基因 *cbhC* 拼接后, 克隆入表达载体 pND-113, 获得重组大肠杆菌 B0013-*eglA-cbhC*。以重组菌 B0013-*eglA-cbhC* 为基础, 将来源于黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶编码基因 *bgA* 与来源于多糖降解菌的纤维二糖磷酸化酶编码基因 *CepA* 分别克隆入 *cbhC* 基因下游, 获得重组大肠杆菌 B0013-*eglA-cbhC-bgA* 和 B0013-*eglA-cbhC-cepA*。以最优酶解条件下制得的纤维素酶解液为碳源, 以 3 种重组菌株进行发酵实验系统考察其纤维素分解能力和效率。重组大肠杆菌 B0013-*eglA-cbhC*、B0013-*eglA-cbhC-bgA* 和 B0013-*eglA-cbhC-cepA* 分别将纤维素的酶解效率提高了 15.14%、24.90% 和 51.66%。重组菌在降低商品酶用量的前提下完成对纤维素的水解, 有效解决了用酶量大和成本高等问题。

关键词: 纤维素; 可控释放; 纤维二糖; 水解效率; 重组大肠杆菌

中图分类号: Q936

文献标识码: A

Study on Improving the Hydrolysis Efficiency of Cellulose by the Controllable Releasing of Cellulose

LI Mingxin¹, CHEN Hao², MA Cuihua³, YAN Songhua¹, ZHOU Li⁴, TIAN Kangming^{*1}

(1.Tianjin University of Science and Technology, College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin 300457,

China; 2.Qingdao Gao Neng He Cheng Biotechnology Co., Ltd, Qingdao 266114, China;

3.Boxing County Comprehensive Inspection and Testing Center, Binzhou 256500, China;

4.Jiangnan University, School of Biotechnology, Wuxi 214122, China)

Abstract: As a sustainable resource, the demand for fibrous raw materials' enzymatic hydrolysis products as raw materials for bio-fermentation has grown significantly. The study systematically evaluates the inhibitory effects of cellobiose and glucose on the enzymatic activity of key cellulase molecules, and optimized the process of enzymatic hydrolysis of cellulose to produce cellobiose. By overlapping PCR, the endoglucanase gene *eglA* and exoglucanase gene *cbhC* from *Aspergillus niger* were spliced and cloned into the expression vector pND-113, resulting in the recombinant *Escherichia coli* strain B0013-*eglA-cbhC*. Based on B0013-*eglA-cbhC*, the β -glucosidase gene *bgA* from *Aspergillus niger* and the cellobiose phosphorylase gene *CepA* from a polysaccharide-degrading bacterium were separately cloned to the downstream of *cbhC*. This yielded the recombinant strains B0013-*eglA-cbhC-bgA* and B0013-*eglA-cbhC-cepA*. Using cellulase hydrolysate produced under optimal enzymatic hydrolysis conditions as the carbon source, fermentation experiments systematically examined the cellulose degradation capability and efficiency of the three recombinant strains. Recombinant *E.coli* B0013-*eglA-cbhC*, B0013-*eglA-cbhC-bgA*, and B0013-*eglA-cbhC-cepA* increase the enzymatic hydrolysis efficiencies of cellulose by 15.14%, 24.90%, and 51.66% respectively. These strains hydrolyze the cellulose while reducing the amount of

收稿日期: 2025-02-22; 修回日期: 2025-05-19

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA24206048); 天津市科技计划项目(19YFZCSN00560)

作者简介: 李铭心(2000—), 女(汉族), 河南信阳人, 硕士研究生; 通信作者: 田康明, 副教授, jinantkm@163.com

commercial enzymes, thereby lowering enzyme usage.

Key words: cellulose; controllable releasing; cellobiose; hydrolysis efficiency; recombinant *Escherichia coli*

作为地球上最充裕的再生自然聚合物, 纤维质原料拥有巨大的经济价值^[1]。木质纤维素生物精炼的发展旨在将这种丰富而可持续的原料转化为广泛的高附加值生物燃料和化学品, 为可持续和循环的生物经济做出贡献, 生物质经济已逐步成为全球研究重点^[2-3]。纤维素酶介导的酶水解是提高生物精炼效率的关键过程, 但其应用受限于高昂成本(占生物精炼总成本 30%)、稳定性差及不可回收性^[4]。纤维素酶解产物纤维二糖和葡萄糖通过反馈抑制显著降低水解速率, 迫使酶用量增加并阻碍工艺经济性^[5-6]。因此, 解决酶解产物抑制问题是降低酶成本、实现纤维素高效转化的关键。

近年来, 重组菌株在纤维素酶解领域的应用呈现多元化发展趋势。研究者通过异源表达枯草芽孢杆菌纤维素酶基因, 探索大肠杆菌体系中重组纤维素酶的可溶性表达路径^[7]。同时, 生孢噬纤维细菌来源的非模块化内切葡聚糖酶 SmCel5A (GH5 家族) 的异源表达研究, 为纤维素糖化效率提升提供了新思路^[8]。然而, 现有研究更多关注单一酶系的功能强化或代谢通量优化, 对多策略协同机制及产物抑制动态平衡的系统性研究仍需深入探索。

纤维二糖与葡萄糖对纤维素水解的抑制效应已被广泛证实, 其不仅显著降低水解速率, 还会降低产物产率^[9-10]。因此, 消除二者对纤维素酶的抑制作用成为实现高效水解的关键。目前, 主流策略主要有两种途径: (1)底物浓度调控: 通过将纤维二糖和葡萄糖维持在有效的低浓度或添加 β -葡萄糖苷酶加速纤维二糖分解^[11]; (2)酶工程改造: 基于分子对接分析, 对纤维素酶活性位点进行理性设计^[12-13]。例如, 针对里氏木霉 Cel7A (TrCel7A) 的 R251 和 R394 残基进行定点突变, 可降低纤维二糖结合能, 降低抑制率^[14]。Becker 等^[15]研究了五重 TrCel7A 突变体 (E223S/A224H/L225V/T226A/D262G), 用于改变最佳 pH, 结果表明能减轻纤维二糖和葡萄糖的抑制作用。

基于上述分析, 本研究在系统评价了纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶关键酶分子酶活抑制情况的基础上, 将纤维二糖作为主发酵糖, 降低酶解过程中纤维二糖和葡萄糖含量, 减少纤维素酶活抑制作用, 降低用酶成本。选育 3 种差异化重组大肠杆菌: (1)分泌内切/外切葡聚糖酶释放纤维二糖; (2)表达 β -葡萄糖苷酶生成葡萄糖; (3)整合纤维二糖转运系统与

代谢通路实现同步糖化同步消耗。通过对比 3 种菌株在同步糖化发酵中的性能, 旨在初步阐明纤维二糖代谢对酶解抑制的解除效率, 为多模块协同的生物精炼系统构建提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 JM109 感受态、GS115-bgA、GS115-cbhC、GS115-eglA、pND-113、pND-eglA、pND-cbhC、pND-bgA、pMD-PTldhA 由本实验室保藏。pUC-cepA 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 试剂与仪器

限制性核酸内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA 连接酶、DNA ladder marker, 赛默飞世尔科技(上海)有限公司; 酵母提取物、蛋白胨, Oxoid 公司; 质粒提取试剂盒, 广州飞扬生物工程有限公司; 卡那霉素(Kan), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 商品木聚糖酶 (290 000 U/g)、商品纤维素酶 (500 000 U/g), 江苏锐阳生物科技有限公司; 刚果红、纤维二糖、羧甲基纤维素钠, 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯试剂。

TC-/G/H(b)C 型基因扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司; WMC-9005A 型 5 L 磁力搅拌发酵罐, 上海万木春生物工程有限公司; UV-1200 型紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; SBA-40C 型生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; ECM 399 型电击转化仪, 美国 BTX 公司。

1.3 培养基

LB 培养基^[16]: 0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨、1% NaCl, 固体培养基需另外补加 1.8%的琼脂粉;

发酵培养基: 11.5 g/L 酵母粉、19.5 g/L 蛋白胨、4.0 g/L (NH₄)₂SO₄、18 g/L K₂HPO₄·3H₂O、3.0 g/L KH₂PO₄、10.0 g/L 葡萄糖、1.2 g/L MgSO₄。葡萄糖和 MgSO₄单独灭菌使用前添加。

流加培养基: 500 g/L 葡萄糖。

1.4 重组质粒的构建

1.4.1 引物序列

引物(表 1)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物
Tab. 1 Primers

引物名称	序列 (5'-3')	酶切位点
<i>eglA-F</i>	CGC gga tcCATTACTTCTTCGACACCCTCG	<i>Bam</i> HI
<i>eglA-R</i>	GGGTTTGCTGGTATAACCTCCTTAAGTCTTCGCACGTATCCG	
<i>cbhC-F</i>	CTTAAGGAGGTTATACCAGCAAACCCCTTGGGGAC	
<i>cbhC-R</i>	TTCATCGATCTGCCTCCTGAAAGCTGGATTGGCGTTGGTGAG	
<i>bglA-F</i>	TTTCAGGAGGCAGATCGATGAATTGGCCTACTCCCC	
<i>bglA-R</i>	TTAGTGAACAGTAGGCAGAGACGC	
<i>cepA-F</i>	GCC gga tcCATGAAATTCGGTCACTTCGACG	<i>Bam</i> HI
<i>cepA-R</i>	CCG ga ttcTTAACCCAGGGTAACTTCAACGTTG	<i>Eco</i> RI
<i>PldhA-F</i>	GGA aga tctTTGTCATCAGCAGCGTCAAC	<i>Bgl</i> II
<i>TldhA-R</i>	AAGCTTGCTGCCGGAAAT	
<i>pND-F</i>	TATACCGAATATGCAGCAAGAGC	
<i>pND-R</i>	GGA aga tctGACACATTTGCTTTCTTTGCTACA	<i>Bgl</i> II

注: 斜体+下划线表示序列中的酶切位点。

1.4.2 重组质粒构建

以 pND-*eglA* 和 pND-*cbhC* 质粒为模版, 分别以 *eglA-F* 和 *eglA-R*、*cbhC-F* 和 *cbhC-R* 为引物, 进行 PCR 扩增。得到的基因片段纯化后, 以 *eglA-R* 和 *cbhC-F* 为引物, 进行重叠 PCR 得到 *eglA-cbhC* 基因片段。纯化后与 pND-113 质粒分别用 *Bam*HI 和 *Sma*I 进行酶切, 灭酶后加入 T4 DNA 连接酶, 然后热激转化至感受态 *E. coli* JM109 中, 涂布培养后进行质粒提取及酶切验证, 纯化正确的重组质粒完成 pND-*eglA-cbhC* 构建。以上述相同方法获得重组质粒 pND-*eglA-cbhC-bglA*。

以 pUC-*cepA* 为模版, 以 *cepA-F* 和 *cepA-R* 为引物, 进行 PCR 扩增。纯化后片段用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切, 质粒 pMD19-*PTldhA* 用 *Bgl*II 和 *Eco*RI 酶切, 灭酶后加入 T4 DNA 连接酶, 然后热激转化至感受态 *E. coli* JM109 中, 涂布培养后进行菌落 PCR 鉴定, 纯化正确的重组质粒完成 pMD-*cepA* 的构建。以 pMD-*cepA* 为模版, 以 *PldhA-F* 和 *TldhA-R* 为引物, 扩增出启动子到终止子片段 *PldhA-cepA-TldhA*。以 pND-*eglA-cbhC* 为模版, 以 *pND-F* 和 *pND-R* 为引物, 反向扩增出片段 pND-*eglA-cbhC*。纯化后两片段用 *Bgl*II 酶切, 灭酶后加入 T4 DNA 连接酶, 然后热激转化至感受态 *E. coli* JM109 中, 涂布培养后进行质粒提取并酶切验证, 纯化正确的重组质粒完成 pND-*eglA-cbhC-cepA* 的构建。

1.5 发酵实验

从甘油保藏管划线于 LB 无抗固体平板, 37 °C 培养 12 h; 选取单菌落, 接种至 LB 无抗液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 9~12 h, 作为一级种子液;

取 1 mL 一级种子液放入 5 个 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 作为二级种子液添加到发酵罐中。将二级种子液以火焰接种的方式加入 5 L 发酵罐中, 初始体积为 2 L, 600 nm 处初始吸光度 (A_{600}) 为 0.3, 初始糖质量浓度为 10 g/L。

好氧生长阶段: 发酵条件控制在 37 °C、3 L/min、200 r/min 下开始好氧发酵, 依次调整空气通量和搅拌转速, 最大空气通量为 7 L/min, 最大转速为 900 r/min, 溶氧控制在 55% 左右; 使用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 维持 pH=7.0; 控制罐体内葡萄糖含量 5 g/L; 当菌体 $A_{600} > 25$ 时, 停止补糖, 升温至 42 °C, 残糖量在 1 g/L 结束好氧发酵。

厌氧发酵阶段: 停止氨水补加, 空气通量调为 0 L/min, 发酵温度 42 °C, 补加预处理后的甘蔗渣溶液, 转速控制为 400 r/min, 流加 25% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 维持 pH=7.0, 期间检测纤维二糖或葡萄糖含量。

1.6 生理功能验证

1.6.1 刚果红平板验证

利用刚果红染色法^[17]确定重组质粒的生理作用。采用羧甲基纤维素钠作为唯一的碳源, 制备 M9 固态培养基。重组菌和野生菌株发酵液离心后, 取上清液置于点样孔中。50 °C 保持 24 h 后均匀加入 0.2% 刚果红染料。经过 40 min 的染色后, 使用 1 mol/L NaCl 溶液冲洗, 观察透明圈形成情况。

1.6.2 唯一碳源平板验证

以纤维二糖为唯一碳源加入到 M9 固体培养基中^[18], 将重组菌密集划线到筛选平板上, 37 °C 恒温培养 3 d, 观察重组菌在筛选平板上的生长情况。

1.7 酶活力的测定

内切葡聚糖酶的酶活力测定按照参考文献方法进行^[19]。酶活力定义：当条件为 50 °C 和 pH 5.0 时反应 30 min，1 mL 酶液在一定时间内分解 1 mg 羧甲基纤维素钠，此时定义为 1 个酶活力单位 (U) ^[19]。

外切葡聚糖酶的酶活力测定按照文献方法进行^[20]。酶活力定义：在 50 °C 和 pH 5.0 条件下，1 min 内水解羧甲基纤维素钠产生 1 μmol 纤维二糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U) ^[20]。

β-葡萄糖苷酶的酶活力测定按照参考文献方法进行^[14]。酶活力定义：在 50 °C、pH 5.0 条件下反应 30 min，1 mL 酶液在单位时间内水解纤维二糖释放 1 μmol 葡萄糖为 1 个酶活力单位 (U) ^[14]。

纤维二糖磷酸化酶的酶活力测定：取适当稀释酶液 100 μL 与 100 μL 15 mmol/L 纤维二糖溶液混合，50 °C 反应 30 min，然后立即于沸水中反应 2 min 使酶失活，测定葡萄糖含量。酶活定义：在 50 °C、pH 5.0 条件下反应 30 min，1 mL 酶液 1 min 产生 1 μmol 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位 (U)。

1.8 同步糖化同步发酵实施策略

从纤维素预处理、预糖化和同步糖化同步发酵 3 个步骤进行以纤维二糖为主发酵糖的同步糖化同步发酵。

1.8.1 纤维素预处理

将甘蔗渣进行超微粉碎(粒径<100 μm，可过 200 目筛)，得到纤维素原料。将超微粉碎后的甘蔗渣，与 15 g/L NaOH 按照固液比 1 : 10 混合，115 °C 反应 60 min，冷却至室温后用盐酸调节 pH=5.0，定容至 30 mL^[18]。

1.8.2 纤维素预糖化

预处理后的纤维素原料添加 1000 U/g 的商品酶，加酶混合后置于 50 °C 水浴锅酶解 8 h，取样分析糖的含量。

1.8.3 同步糖化同步发酵

如图 1 所示为大肠杆菌利用纤维素的 3 条途径，本研究以 3 种不同组合表达方式，探究其在同步糖化同步发酵中纤维素水解效率的不同。

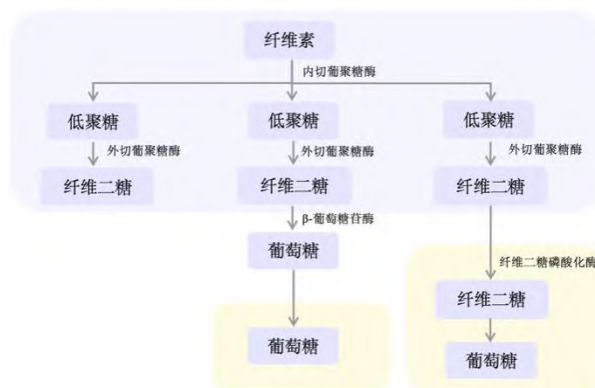


图 1 大肠杆菌纤维素利用途径

Fig. 1 Cellulose utilization pathway in *E. coli*

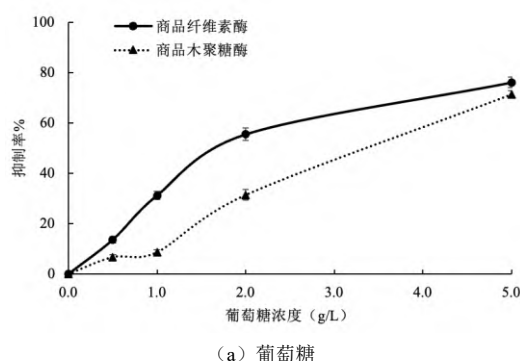
1.9 数据处理

在酶活力测定及水解率测定实验中，每个样品分别进行 3 组平行实验，使用 Excel 软件进行变化趋势分析，实验数据均采用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖与纤维二糖对商品纤维素酶和商品木聚糖酶的抑制

为验证产物的抑制情况，以预处理后的甘蔗渣为底物分别在酶解体系中添加不同含量葡萄糖/纤维二糖。葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶解关键酶的抑制结果如图 2 所示。当向酶解体系中额外添加葡萄糖或纤维二糖时，酶解液的抑制率呈上升趋势，说明酶解体系中葡萄糖及纤维二糖的质量浓度对酶解有一定的抑制作用，且浓度越高酶解反应的抑制作用越明显。



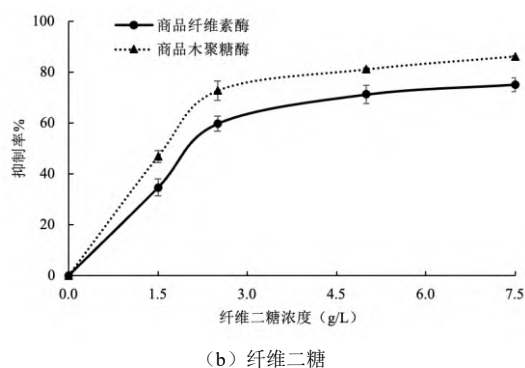


图2 葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶解关键酶的抑制

Fig. 2 Inhibition of key cellulase enzymes by glucose and cellobiose

2.2 葡萄糖与纤维二糖对纤维素酶中各单一酶分子的抑制

由于商品纤维素酶及商品木聚糖酶都为复合酶, 为探究纤维二糖和葡萄糖对不同酶解步骤的酶解效果, 研究纤维二糖和葡萄糖浓度对内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活抑制情况。利用甲醇毕赤酵母重组菌 GS115-*eglA*、GS115-*cbhC*、GS115-*bgA* 进行发酵, 制得内切葡聚糖、外切葡聚糖及 β -葡萄糖苷酶酶液, 用于酶活抑制研究。

2.2.1 葡萄糖对纤维素酶中各单一酶分子的抑制

葡萄糖对纤维素酶单一酶分子的抑制结果如图3所示。在葡萄糖浓度为 1.0 g/L 时对 β -葡萄糖苷酶抑制率最高, 达到 21%, 其次是外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶。葡萄糖浓度对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用最为明显, 可以通过降低葡萄糖浓度来减轻产物抑制。因此, 在保证纤维素部分水解为纤维二糖, 且产生的纤维二糖及葡萄糖对后续酶解的抑制作用尽量较小的前提下, 将同步糖化同步发酵体系中的葡萄糖控制在 1.0 g/L 以下。

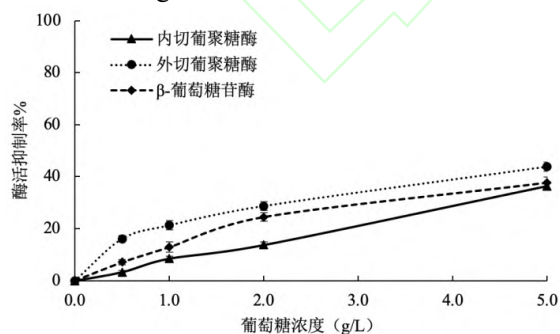


图3 葡萄糖对纤维素酶单一酶分子的抑制

Fig. 3 Inhibition of glucose on a single enzyme molecule of cellulase

2.2.2 纤维二糖对纤维素酶中各单一酶分子的抑制

纤维二糖对纤维素酶单一酶分子的抑制结果如图4所示。纤维二糖浓度对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用

用最为明显, 在纤维二糖浓度为 1.5 g/L 时抑制率达到 24.3%, 其次是外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶。因此, 在保证纤维素部分水解为纤维二糖, 且产生的纤维二糖及葡萄糖对后续酶解的抑制作用尽量较小的前提下, 将同步糖化同步发酵体系中的纤维二糖控制在 1.5 g/L 以下。

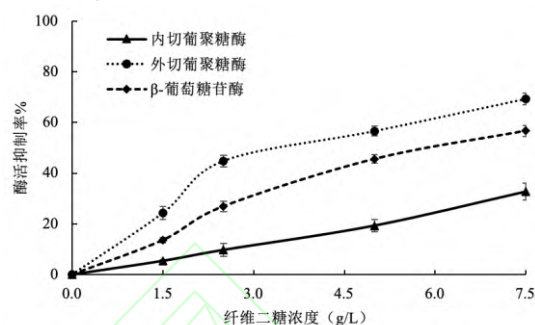


图4 纤维二糖对纤维素酶单一酶分子的抑制

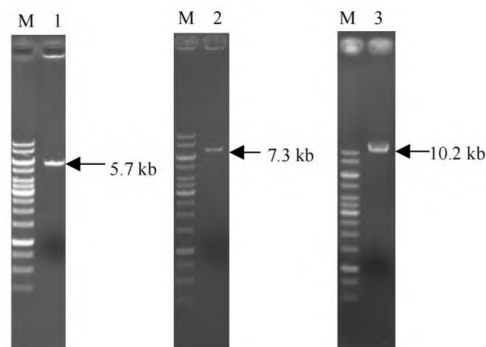
Fig. 4 Inhibition of cellobiose on a single enzyme molecule of cellulase

通过与 2.1 节结果进行比较可以得出, 单一表达的酶分子对高浓度的葡萄糖和纤维二糖表现出比现有商品酶更好的耐受效果, 所以可将这 3 种酶用于后续同步糖化同步发酵中。

2.3 具备纤维素水解能力的重组大肠杆菌构建

重组质粒酶切验证如图5所示。重组质粒 pND-*eglA-cbhC*、pND-*eglA-cbhC-bgA* 和 pND-*eglA-cbhC-cepA* 大小分别为 7.3 kbp、9.8 kbp 和 10.2 kbp, 将构建成功的重组质粒分别电转化入出发菌株 B0013, 得到重组大肠杆菌 B0013-*eglA-cbhC*、B0013-*eglA-cbhC-bgA* 和 B0013-*eglA-cbhC-cepA*。

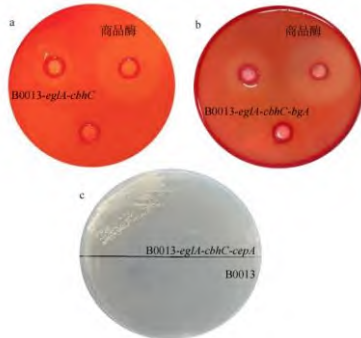
功能验证平板结果如图6所示。重组菌 B0013-*eglA-cbhC* 和 B0013-*eglA-cbhC-bgA* 的发酵产物在样品点附近产生了明显的透明区域, 而对照组的 B0013 却未能产生此类现象。这表明重组质粒已经成功表达, 并具备降解纤维素的能力。重组菌 B0013-*eglA-cbhC-cepA* 在仅含有纤维二糖作为碳源的培养基上能够正常生长。因此, 重组质粒能游离表达, 具有分解纤维二糖的能力。



1. 重组质粒 pND-*eglA-cbhC*; 2. 重组质粒 pND-*eglA-cbhC-bgA*; 3. 重组质粒 pND-*eglA-cbhC-cepA*; M. 1 kb DNA Ladder Marker

图 5 重组质粒酶切验证

Fig. 5 Recombinant plasmid enzyme digestion validation



a. 重组菌 B0013-*eglA-cbhC* 刚果红验证平板; b. 重组菌 B0013-*eglA-cbhC-bgA* 刚果红验证平板; c. 重组菌 B0013-*eglA-cbhC-cepA* 纤维二糖唯一碳源验证平板

图 6 功能验证平板

Fig. 6 Functional validation plate

2.4 不同策略获得的纤维素利用型重组大肠杆菌代谢纤维二糖能力

重组菌厌氧发酵时糖含量变化结果如图 7 所示。好氧阶段重组菌 B0013-*eglA-cbhC* 不断生长产酶，厌氧发酵开始时，取样留沉淀测定纤维素水解率为 38.13%。重组菌具有内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活力，厌氧发酵后纤维二糖由 1.40 g/L 不断积累至 1.96 g/L，纤维素水解率为 53.26%，提高了 15.14%。

重组菌 B0013-*eglA-cbhC-bgA* 在好氧阶段不断生长产酶，厌氧发酵开始时，取样留沉淀测定纤维素水解率为 41.30%。重组菌具有内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶活力，厌氧发酵开始后酶解液中的纤维二糖不断被分解为葡萄糖。纤维二糖含量逐渐减少，由 1.56 g/L 降到 0.89 g/L；但葡萄糖由 0.90 g/L 积累到 2.30 g/L，发酵结束时纤维素水解率为 66.20%，提升了 24.90%。

重组菌 B0013-*eglA-cbhC-cepA* 好氧阶段菌体不断生长产酶，厌氧发酵开始时，取样留沉淀测定纤维素水解率为 43.30%。厌氧发酵开始后酶解液中的纤维二糖不断被分解为 1-磷酸-葡萄糖和葡萄糖。纤维二糖磷酸化酶(*CepA*)为胞内酶，产生的 1-磷酸-葡萄糖在胞内磷酸葡萄糖变位酶的作用下转化为 6-磷酸-葡萄糖，随着糖酵解途径被细胞代谢利用，葡萄糖含量由 1.30 g/L 下降到 0.35 g/L，纤维二糖含量由 1.62 g/L 下降到 0.75 g/L。厌氧发酵结束后取样留沉淀测定纤维素水解率为 94.96%，纤维素水解率提高了 51.66%。

相较于重组菌 B0013-*eglA-cbhC-bgA* 中 β -葡萄糖苷酶(*bgA*)的水解途径，将纤维二糖全部分解葡萄糖，葡萄糖再经过磷酸葡萄糖激酶催化为 6-磷酸-葡萄糖，进入糖酵解途径被细胞利用，共产生 4 分子 ATP。重组菌 B0013-*eglA-cbhC-cepA* 中的纤维二糖磷酸化酶(*CepA*)以 1-磷酸-葡萄糖为中间体进入糖酵解途径，共产生 5 分子 ATP，较 *bgA* 水解途径少消耗 1 分子 ATP，更利于菌株代谢，因此水解效率更高。

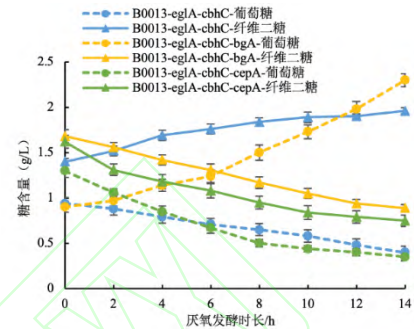


图 7 重组菌厌氧发酵时糖含量变化

Fig. 7 Changes in sugar content during anaerobic fermentation of recombinant bacterium

3 结论

本研究确认了纤维二糖和葡萄糖对纤维素水解关键酶分子的抑制作用，以调控同步糖化同步发酵过程中纤维二糖和葡萄糖残余水平为工艺参数，搭建发酵体系。在同步糖化同步发酵工艺中，纤维二糖和葡萄糖残余量的调控水平为：控制葡萄糖的残余量在 1.0 g/L 以下、纤维二糖的残余量在 1.5 g/L 以下。采用 3 种不同策略，开展纤维素同步糖化同步发酵型重组大肠杆菌的选育，系统评价了新菌种纤维素水解效率差异性。实验结果表明，在同步糖化同步发酵工艺中通过表达纤维素水解关键酶分子，使纤维二糖和葡萄糖浓度处于较低水平可以有效降低纤维二糖和葡萄糖的抑制作用，并提高纤维素的水解效率。其中，表达内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和纤维二糖磷酸化酶的大肠杆菌 B0013-*eglA-cbhC-cepA*，在同步糖化同步发酵中对纤维素水解率的提高作用最佳，提高 51.66%。

本研究为高效率低成本资源化利用纤维质原料提供了新思路。然而，重组菌表达能力有限，酶活性表达没有达到预期水平，进而影响酶解效率。这可能因为多基因共表达导致宿主 ATP 及前体代谢物供给失衡或启动子驱动力不足导致关键酶基因(*eglA/cbhC/bgA/CepA*)转录翻译受到限制，在未来的研究中，可以通过删除供能关键抑制基因或添加强

启动子来提升其表达水平和酶活性。

参考文献:

- [1] ROZZI E, MINUTO D F, LANZINI A, et al. Green synthetic fuels:renewable routes for the conversion of non-fossil feedstocks into gaseous fuels and their end uses[J]. *Energies*, 2020, 13(2):5226-5234.
- [2] SANNINO F, COSTANTINI A, RUFFO F, et al. covalent immobilization of β -glucosidase into mesoporous silica nanoparticles from anhydrous acetone enhances its catalytic performance[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(1):108-118.
- [3] SINGH N, SINGHANIA R, NIGAM P, et al. Global status of lignocellulosic biorefinery: challenges and perspectives[J]. *Bioresource technology*, 2022, 344(B):126415-126422.
- [4] MAO G, HUANG N, CHEN L, et al. Research on biomass energy and environment from the past to the future:A bibliometric analysis[J]. *Science of the total environment*, 2018, 635(2018):1081-1090.
- [5] WOO W X, TAN J P, WU T Y, et al. An overview on the factors affecting enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass into fermentable sugars[J]. *Reviews in chemical engineering*, 2024, 40(2): 279-303.
- [6] GUO H, ZHAO Y, CHANG J, et al. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass:a mini-review[J]. *Bioresource technology*, 2023, 367(5):128252-128261.
- [7] VADALA S, DESHPANDE S, APTE A. Soluble expression of recombinant active cellulase in *E. coli* using *B. subtilis* (natto strain) cellulase gene[J]. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 2021, 19(1):7-15.
- [8] CHEN X, GAO Z, WANG S, et al. Processivity and enzymatic mechanism of a non-modular family 5 endoglucanase from *Sporocytophaga* sp. CX11 with potential applications in cellulose saccharification[J]. *Enzyme and microbial technology*, 2025, 185(1):110609-110620.
- [9] NARGOTRA P, SHARMA V, LEE YC, et al. Microbial lignocellulolytic enzymes for the effective valorization of lignocellulosic biomass:a review[J]. *Catalysts*, 2023, 13(1):83-101.
- [10] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, MISHRA K, et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production:advances and limitations[J]. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2018, 82(1):2379-2386.
- [11] AZEVEDO S, SANTANA H, SEUS R. Development of a β -glucosidase improved for glucose retroinhibition for cellulosic ethanol production: an integrated bioinformatics and genetic engineering approach[J]. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 2025, 18(1):44-60.
- [12] HOSSAIN M, DODDA R, DAS S, et al. Catalytic tunnel engineering of thermostable endoglucanase of GH7 family (W356C) from *Aspergillus fumigatus* gains catalytic rate[J]. *Enzyme and microbial technology*, 2025, 187(2025):110632-10655.
- [13] SILVEIRA L, SKAF S. Molecular Dynamics simulations of family 7 cellobiohydrolase mutants aimed at reducing product inhibition[J]. *Journal of physical chemistry B*, 2015, 119(29):9295-9303.
- [14] HANSON R, STEGE T, CHENG C, et al. Variant CBH I polypeptides with reduced product inhibition: U. S. Patent Application 1434925. 3[P]. 2014-09-25.
- [15] BECKER D, BRAET C, BRUMER H, et al. Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant[J]. *Biochemical journal*, 2001, 356(1): 19-30.
- [16] 诸葛健. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994:72-73.
- [17] RAHMAN M S, FERNANDO S, ROSS B, et al. Endoglucanase (EG) activity assays[J]. *Methods in molecular biology*, 2018, 1796:169-183.
- [18] 夏玉林. β -葡萄糖苷酶基因的筛选及性质分析[D]. 广州:广东药科大学, 2016.
- [19] 佟新新, 金鹏, 李伟国, 等. 黑曲霉内切葡聚糖酶系的基本酶学特征解析[J]. *天津科技大学学报*, 2018, 33(5): 25-35.
- [20] 侯庆宇. 甘蔗渣高效酶解工艺的建立与优化及初步应用[D]. 天津:天津科技大学, 2023.