

DOI: 10.13376/j.cbls/2021083

文章编号: 1004-0374(2021)06-0773-08

β -木糖苷酶及其在纤维素乙醇生产中的应用研究进展

叶延欣^{1,2}, 宁艳春³, 李雪芝^{1*}, 岳军³, 刘国栋¹, 赵建^{1*}

(1 山东大学微生物技术国家重点实验室, 青岛 266237; 2 河南城建学院生命科学与工程
学院, 平顶山 467000; 3 中国石油吉林石化公司研究院, 吉林 132021)

摘要: 将木质纤维素类生物质生物转化生产液体燃料, 如纤维素乙醇和大宗化学品, 对缓解当前人类社会面临的能源和资源危机以及保护环境具有重要意义。半纤维素是木质纤维素类生物质的主要组成成分之一, 它的生物降解转化对实现木质纤维素生物炼制意义重大。由于半纤维素糖种类的多样性和半纤维素结构的复杂性, 需要一个复杂的半纤维素酶系才能完成对半纤维素的有效降解。除了木聚糖酶等以外, β -木糖苷酶也是半纤维素酶系的主要组分。在半纤维素降解过程中, β -木糖苷酶将木聚糖酶的水解产物木寡糖和木二糖水解为木糖, 不仅在木聚糖的彻底降解过程中起着重要作用, 而且可以缓解木寡糖对木聚糖酶和纤维素酶的抑制作用。该文综述了目前在 β -木糖苷酶方面的研究进展, 包括 β -木糖苷酶的分类、酶学性质、酶结构及其催化机制、基因的克隆与表达等, 并对 β -木糖苷酶在纤维素乙醇生产中的应用情况进行了简述。

关键词: 木质纤维素; β -木糖苷酶; 生物转化; 纤维素乙醇; 研究进展

中图分类号: Q55; TQ35 文献标志码: A

Research progress of β -xylosidase and its application in cellulosic ethanol production

YE Yan-Xin^{1,2}, NING Yan-Chun³, LI Xue-Zhi^{1*}, YUE Jun³, LIU Guo-Dong¹, ZHAO Jian^{1*}

(1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China; 2 School of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467000, China; 3 Research Institute of Jilin Petrochemical Company of PetroChina Company Limited, Jilin City 132021, China)

Abstract: Bioconversion of lignocellulose into fuel ethanol and bulk chemicals is of great significance for alleviating the shortage of energy and resources, and environmental pollution. Hemicellulose is a main component of lignocellulose, and bioconversion of hemicellulose is important for the total utilization of lignocellulose biomass. Due to the diversity of hemicellulose sugars and the complexity of hemicellulose structure, a complex hemicellulase system is needed to complete the effective degradation of hemicellulose. Besides xylanase, β -xylosidase is one of the main components of hemicellulase system. β -xylosidase hydrolyzes xylooligosaccharide and xylobiose derived from enzymatic hydrolysis of xylan by xylanase into xylose, which not only plays a key role in the complete degradation of xylan, but also relieves the inhibition of xylooligosaccharide on xylanase and cellulase during the hydrolysis of lignocellulose. In this paper, the research progress of β -xylosidase is reviewed, including the classification, enzymatic properties, enzyme structure and catalytic mechanism, gene cloning and expression, as well as the application of β -xylosidase in the production of cellulosic ethanol.

Key words: lignocellulose; β -xylosidase; bioconversion; cellulosic ethanol; research progress

收稿日期: 2020-12-06; 修回日期: 2021-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870562); 山东省重点研发计划项目(2019GSF107009); 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020223); 中石油科学研究与技术开发项目(2017A-4807)

*通信作者: E-mail: lixz@sdu.edu.cn (李雪芝); zhaojian@sdu.edu.cn (赵建)

随着全球经济的飞速发展, 能源和资源需求量迅猛增长, 导致石油、煤炭等不可再生化石资源日益减少并引发气候变暖等一系列问题。为了满足资源和能源的大量需求以及解决化石燃料对全球气候变化的影响, 寻求可再生、环保的资源和能源, 以替代化石资源和化石燃料是目前全球亟待解决的问题。木质纤维素类生物质资源具有来源丰富、价格低廉、可再生等优点。利用丰富的木质纤维素类生物质资源, 如农业、林业或工业废弃物等, 通过生物转化生产出人类社会所需要的能源和大宗化学品, 以部分替代石油等化石资源和能源, 对促进人类社会的可持续发展具有重要意义, 并集中体现了可持续发展的理念, 发展潜力巨大。

木质纤维素主要包括纤维素、半纤维素和木质素三种主要组成成分。在木质纤维素的生物转化过程中, 最重要的一步是将碳水化合物(纤维素和半纤维素)转化为可发酵糖, 进而发酵产生液体燃料, 如纤维素乙醇和大宗化学品。由于木质纤维素原料的组成及结构的复杂性, 纤维素和半纤维素的完全降解需要一系列的纤维素酶、半纤维素酶系及其他辅助蛋白共同完成。其中, 半纤维素是木质纤维素中含量仅次于纤维素的杂多聚糖, 它的降解转化对于提高木质纤维素利用效率、增加燃料乙醇等产品产率具有重要意义。半纤维素主要由木聚糖、甘露聚糖、半乳聚糖和阿拉伯聚糖等组成, 在结构和组成上都比纤维素复杂。木聚糖是半纤维素的主要组成部分, 是由木糖单元以 β -1,4-糖苷键组成主链并带有不同支链残基(如阿拉伯糖基、乙酰基、葡萄糖醛酸基等)修饰的异质多聚糖, 其支链的种类及其含量根据原料的性质和来源而不同。由于半纤维素的组成和结构复杂, 其被彻底降解也需要一个复杂的酶系, 包括内切 β -1,4-木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰木聚糖酯酶、 α -葡萄糖醛酸酶及阿魏酸酯酶等。其中, 内切木聚糖酶作用于木聚糖的主链产生木寡糖, 而 β -木糖苷酶则水解木寡糖释放木糖, 在木聚糖的彻底降解过程中起着关键作用。同时, β -木糖苷酶的存在还有利于缓解木寡糖在木质纤维素水解过程中对木聚糖酶和纤维素酶的抑制作用^[1-2], 是半纤维素酶系的重要组成部分之一。

1 β -木糖苷酶的研究进展

1.1 木糖苷酶的分类

根据在细胞中分布位置的差异, 木糖苷酶大概

分为三种类型, 即胞内木糖苷酶、胞外木糖苷酶和膜结合型木糖苷酶。依据水解的糖苷键不同, 木糖苷酶可分为 β -木糖苷酶和 α -木糖苷酶两种类型。依据氨基酸序列相似性, 在CAZy数据库中 α -木糖苷酶(EC 3.2.1.177)被划分为GH 31家族, 该类酶相关的报道极少且目前只报道了两个, 分别是来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)的 α -木糖苷酶^[3-4]。而 β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)相对被报道得较多。 β -木糖苷酶主要来源于真菌和细菌, 且被归类于糖苷水解酶(GH) 3、30、39、43、52、54和120家族。因此, 目前狭义的木糖苷酶一般指的是 β -木糖苷酶。细菌, 如芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和梭状芽孢杆菌属(*Clostridium* sp.)等来源的 β -木糖苷酶大部分都属于GH39和GH43家族, 而丝状真菌来源的 β -木糖苷酶主要分布于GH3、GH43和GH54家族^[5]。

1.2 β -木糖苷酶的酶学性质

目前酶学功能研究较多的 β -木糖苷酶都属于GH3和GH43家族, 其中大部分都属于GH3家族, 不仅具有催化活性, 还具有转糖苷活性, 能够利用单糖合成低聚糖, 在食品、畜牧饲料等行业中具有重要的应用价值^[6]。

如表1所示, 已报道的大部分GH3和GH43家族 β -木糖苷酶的最适反应温度范围一般在40℃~70℃之间。GH3家族的 β -木糖苷酶的最适反应pH范围在3.0~6.0之间, 且对木糖的耐受性较低, 其 K_i 值在2~30 mmol/L范围内^[7]。与GH3家族的 β -木糖苷酶相比, 大多数GH43家族的 β -木糖苷酶都是由细菌产生的, 而丝状真菌来源的GH43 β -木糖苷酶的报道依然甚少, 且主要来源于*H. insolens*、*T. lanuginosus*、*P. thermophile*等^[8]。而这些被报道的GH43 β -木糖苷酶, 大部分的最适pH范围在6.0~8.0之间, 且具有较高的木糖耐受性, 其 K_i 值在28.9~292 mmol/L范围内。最重要的是, GH 43家族的 β -木糖苷酶具有较高的催化活性, 但在较高的单糖浓度条件下不具有转糖苷作用^[6], 可有效协同木聚糖酶彻底地水解木聚糖为单糖, 且不产生逆反应生成寡聚糖, 反馈抑制木聚糖酶活性^[2]。因此, 它们被认为是木聚糖彻底水解的最佳候选者, 在生物质能源、造纸、饲料等行业中的应用潜力较大。

1.3 β -木糖苷酶的结构与催化机制

1.3.1 β -木糖苷酶的结构

许多不同来源的 β -木糖苷酶晶体结构已相继被解析, 为 β -木糖苷酶的分子改造及功能研究提供

表1 不同来源 β -木糖苷酶的酶学性质

菌株	糖苷水解酶家族	相对分子质量(kDa)	最适pH	最适温度(°C)	比活力(IU/mg)	Ki (mmol/L)	参考文献
<i>Humicola insolens</i> Y1	43	37.0 ^b /62.0 ^b	6.5/7.0	50/50	20.5/1.7	79/292	[7]
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	43	39.31 ^a	7.0	60	0.26	-	[8]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	43	51.6 ^b	6.5	55	45.4	63	[8]
<i>Paecilomyces thermophila</i>	43	52.3 ^b	7.0	55	45.4	139	[8]
<i>Thermogemmatipora</i> sp.	5	54 ^b	5.0	65	889.5	-	[9]
<i>Bacteroides ovatus</i>	43	37.1 ^b	7.0	35	-	-	[10]
<i>Thermotoga petrophila</i>	3	86.7 ^b	6.0	90	6.81	-	[11]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3	74.5 ^b	4.5	75	150.25	-	[12]
<i>Aspergillus japonicus</i>	3	113.2 ^a	4.0	70	1.88	-	[13]
<i>Aspergillus nidulans</i>	3	78.6 ^a	5.0	60	9.55	-	[14]
<i>Neurospora crassa</i>	3	81.8 ^a	5.0	50	-	1.72	[15]
<i>Humicola insolens</i> Y1	3	83.2 ^a	6.0	60	11.6	29.0	[16]
<i>Penicillium oxalicum</i> 114-2	43	45 ^a /62 ^a	7.0/6.0	50/45	4.96/0.48	28.9/35.77	[8, 17]

^a毕赤酵母表达; ^b大肠杆菌表达

了理论基础。目前, 关于 GH43 β -木糖苷酶的晶体结构报道相对较多, 如 *B. pumilus*、*B. halodurans*、*Geobacillus stearothermophilus* T-6、*Butyrivibrio fibrisolvens* 和 *C. acetobutylicum* 等来源的 β -木糖苷酶已被解析^[5]。大部分 GH43 家族 β -木糖苷酶的三级结构是由 N-端五片桨叶组成的 β -螺旋桨结构域和 C-端的 α/β 三明治结构域的两个结构域组成^[18-19], 其中五片桨叶组成的 β -螺旋桨催化结构域是 GH43 家族的糖苷水解酶晶体结构的共同特征^[20]。酶的催化活性中心主要是由 β -螺旋桨叶结构域的氨基酸残基组成口袋拓扑结构, 且在一侧被 β -三明治结构域的氨基酸残基封闭成环状结构, 该环状结构限制了可以进入活性中心的木糖数量, 这与其他糖苷酶的外切作用方式相一致^[21]。GH39 家族 β -木糖苷酶的第一种晶体结构在 2004 年被 Yang 等^[22]报道的, 它是由催化结构域、 β/α -三明治结构域和一个小的 α -螺旋结构域组成的多结构域蛋白, 而催化结构域是具有规则的 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶结构, 其中酶的催化活性中心位于 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶结构的顶端, 外部近似一个口袋形状, 催化位点位于类似口袋形状的活性区域内部, 能够专一性地识别糖类的非还原性末端。尽管目前报道的大部分 β -木糖苷酶都属于 GH3 家族, 但是暂时还没有报道来自该家族的 β -木糖苷酶晶体结构。

1.3.2 催化机制

随着对 β -木糖苷酶研究的深入, 其催化作用机制已经相对比较清楚。目前, β -木糖苷酶的催化

机制主要分为保留型和反向型两种类型。反向型是 β -木糖苷酶的两个羧基分别作为一般的碱和酸进行一步直接置换的催化反应; 而保留型采用的是两步双重置换机制, 主要通过糖基化和去糖基化两个步骤来完成催化反应。糖基化反应是酶分子的一个羧基侧链提供质子供体催化糖苷键的断裂, 另一个羧基侧链发起亲核攻击, 产生了糖基-酶中间复合物。去糖基化反应是通过酸碱催化作用引起催化活性中心内部的水分子去质子化, 然后攻击糖基-酶中间复合体的异头碳原子, 从而使糖基被替代, 发生水解反应, 糖基-酶复合物被水解。不同家族的 β -木糖苷酶催化机制也有所差异, 其中 GH3、39、52、54 家族的 β -木糖苷酶采用保留型催化机制, 而采用反向型催化机制的只有 GH43 家族 β -木糖苷酶^[23]。与通过两种过渡态进行催化水解的保留型 β -木糖苷酶相比, 反向型 β -木糖苷酶不需要形成中间体就可以直接进行催化水解, 具有催化效率更高的优势。

1.4 真菌来源 β -木糖苷酶基因的克隆表达

利用真菌生产工业化用酶已有近 50 年的历史, 但如果直接利用真菌生产并从分泌的胞外蛋白混合物中分离所需要的酶, 往往需要复杂的步骤, 造成生产成本增加^[24]。因此, 目前一般使用重组 DNA 技术, 将相关酶大规模地在不同表达宿主中同源或者异源表达^[25]。 β -木糖苷酶在生物质能源、造纸、饲料、食品等行业中已经得到了广泛应用, 为了满足商业上对该酶的大量需求, 许多 β -木糖苷酶基因已经被克隆和表达^[23]。目前, β -木糖苷酶的表达

系统主要有大肠杆菌表达系统、酵母表达系统以及丝状真菌表达系统。

1.4.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌表达系统是比较成熟的重组蛋白表达系统。尽管大肠杆菌表达系统具有操作技术简单、能够在廉价培养基上快速生长、表达的蛋白质容易分离和纯化等优点,但是其内在的分泌机制限制以及不能翻译后修饰,如二硫键形成和糖基化修饰等,造成大部分蛋白质在大肠杆菌中无法功能性表达或者不能分泌到细胞外^[26]。目前,已有一些 β -木糖苷酶在 *E. coli* DE3 中成功表达(胞内酶),例如 *H. insolens* 来源的 β -木糖苷酶 Xyl43B^[7]、*Thermogemmatispora* sp. 来源的 β -木糖苷酶^[9]、*Bacteroides ovatus* 来源的 β -木糖苷酶^[110]。但也有例外,少数无信号肽的 β -木糖苷酶在 *E. coli* DE3 中表达后,部分重组蛋白也能够分泌到培养基中,如 *H. insolens* 来源的 β -木糖苷酶 Xyl43A^[7]、*T. petrophila* 来源的 β -木糖苷酶^[11]、*A. fumigatus* 来源的 β -木糖苷酶^[12]等。

1.4.2 酵母表达系统

与大肠杆菌表达系统相比,在酵母表达系统中表达外源蛋白更具有优势,例如真核生物翻译后修饰、高细胞密度发酵以及蛋白质可分泌到发酵培养基中等。此外,酵母菌没有毒素,它们已经在食品工业应用中得到了 GRAS 认证。通常用于异源蛋白表达的为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*P. pastoris*)^[27]。

Wakiyama 等^[13]报道将 *A. japonicus* 来源的 GH3 家族 β -木糖苷酶基因 (*xylA*) 在 *P. pastoris* 中表达,5 天后发酵液中 β -木糖苷酶活性可达到 0.33 IU/mL。*P. thermophila* 来源的 GH3 β -木糖苷酶^[14],以及 *N. crassa* 来源的 GH3 β -木糖苷酶^[15]在 *P. pastoris* 中也被成功表达,其胞外分泌蛋白量分别为 0.22 mg/L 和 32 mg/L,而 *P. pastoris* 异源表达 *A. oryzae* 和 *H. insolens* Y1 来源的 GH3 β -木糖苷酶,胞外分

泌蛋白量较高,均达到约 100 mg/L^[15-16]。与胞内酶相比,胞外酶在工业生产上具有更多的优势,如容易大规模生产、不需细胞破碎等。

1.4.3 丝状真菌表达系统

利用真菌表达系统表达和生产糖苷水解酶在工业上有着悠久的历史。与细菌和酵母表达系统相比,丝状真菌表达系统在表达重组蛋白方面具有一定优势,如较强的胞外蛋白分泌能力、具有内在的 β -木糖苷酶表达机制以及能够对真核生物来源的蛋白进行翻译后修饰,特别是在糖基化修饰方面更优于酵母表达系统。丝状真菌中 β -木糖苷酶诱导表达往往伴随着纤维素酶和木聚糖酶的表达,很容易受到碳分解代谢物阻遏(CCR)的影响,因此,利用组成型启动子代替诱导型启动子可以有效避免 CCR,更利于 β -木糖苷酶的表达。Amaro-Reyes 等^[28]已克隆 *A. niger* GS1 来源的 β -木糖苷酶基因 (*xlnD*),并利用 *A. nidulans* 来源的组成型启动子 *gpdA* 成功地实现同源表达,重组蛋白的相对分子质量约为 90 kDa,比酶活约为 4 280 IU/mg。 β -木糖苷酶 *xlnD* 也成功地在 *A. awamori* 菌株中得到异源表达并被分离纯化^[29]。另外,青霉属 (*Penicillium* sp.) 已被认为是 β -木糖苷酶最适的生产宿主^[30]。本实验室的郑小菊^[31]通过利用组成型启动子 *gpdA*,成功地将 *Penicillium* sp. 来源的 β -木糖苷酶进行了同源重组表达,与出发菌株相比,转化子中 β -木糖苷酶的酶活力提高了 4.5 倍,达到了 67.7 IU/mL,显示了较好的工业化应用潜力。表 2 给出了利用丝状真菌表达系统同源或异源表达 β -木糖苷酶的部分研究进展情况。

1.5 β -木糖苷酶的生产现状

通常情况下,大部分细菌及酵母来源的 β -木糖苷酶都是胞内酶,而一些真菌可以将 β -木糖苷酶分泌到培养基中,但是已经报道的微生物(包括重组菌株)的 β -木糖苷酶产量都较低^[10]。目前,

表2 利用丝状真菌表达系统同源或异源表达 β -木糖苷酶的效果

母本菌株	工程表达策略	效果	参考文献
<i>Aspergillus niger</i> GS1	同源表达 β -木糖苷酶	β -木糖苷酶的比活力增加	[28]
<i>Aspergillus awamori</i>	异源表达 β -木糖苷酶	异源表达成功	[29]
<i>Penicillium oxalicum</i> 114-2	利用组成型启动子 <i>gpdA</i> 同源表达 β -木糖苷酶	β -木糖苷酶比活力提高4.5倍	[31]
<i>Penicillium oxalicum</i>	毕赤酵母异源表达 β -木糖苷酶	β -木糖苷酶分泌量和酶活力增加	[17]
<i>Aspergillus cellulolyticus</i>	利用诱导型启动子 <i>cbh1</i> 同源表达 β -木糖苷酶	β -木糖苷酶比活力提高150倍	[32]
<i>Penicillium oxalicum</i> M12	过表达 <i>xlnR</i> ^{A871V}	β -木糖苷酶产量增加(大于2.5 IU/mL)	[33]
<i>Penicillium oxalicum</i> RE-10	多拷贝表达 β -木糖苷酶	β -木糖苷酶比活力提高29倍	[17]

丝状真菌是 β -木糖苷酶的主要来源, 但已报道的不同菌产生的 β -木糖苷酶的酶活差异较大, 大部分在 0.009~56 IU/mL 范围内, 其中曲霉属菌株的酶活力最高, 如 *A. terricola* 和 *A. ochraceus* 的 β -木糖苷酶酶活力可分别达到 30 IU/mL 和 56 IU/mL^[34]。而大部分青霉属、木霉属的菌株所产的 β -木糖苷酶酶活力都较低, 如青霉属菌株 *P. janczewskii* 和 *Penicillium sp.* AHT-1 的胞外 β -木糖苷酶酶活分别为 0.16 IU/mL 和 0.18 IU/mL^[35-36], 而用于商业化生产纤维素酶的菌株 *Trichoderma reesei* SG2 分泌到胞外的 β -木糖苷酶酶活也较低, 仅仅为 7.63 IU/mL^[37]。本实验室的叶延欣^[17]利用毕赤酵母异源表达来源于草酸青霉的 β -木糖苷酶基因 *Xyl43B* 和 *Abf43D*, 并对得到的阳性转化子进行多次筛选, 分别获得了高产 β -木糖苷酶 *Xyl43B* 和 *Abf43D* 的重组菌株, 在没有优化发酵条件的情况下重组菌株的胞外分泌液的 β -木糖苷酶酶活力分别约为 16.42 IU/mL 和 8.60 IU/mL, 远远高于已报道的酵母表达 GH43 β -木糖苷酶的产量。

由于丝状真菌中 β -木糖苷酶的诱导表达受到转录因子 CreA 的负调控^[6], 如黑曲霉 β -木糖苷酶的基因 (*xlnD*) 在葡萄糖存在条件下被抑制表达, 且在其基因的非编码区上游发现 CreA 的结合位点, 表明了上游序列与 CreA 结合可直接控制 *xlnD* 转录, 从而使 β -木糖苷酶基因的表达容易受到抑制, 影响 β -木糖苷酶的产量。为了提高纤维素酶菌株表达 β -木糖苷酶的能力, 一些经过遗传改造的菌株已被报道。例如, 利用强诱导型启动子 *cbh1* 同源表达 β -木糖苷酶基因, 使 *A. cellulolyticus* 的 β -木糖苷酶酶活由 0.02 IU/mL 提高到 3.3 IU/mL^[32]。另外, 丝状真菌中纤维素酶和 β -木糖苷酶的诱导表达都受到转录因子 XlnR 的正调控, 本实验室通过对转录调控因子 XlnR 定点突变 (*XlnR^{A871V}*) 并在草酸青霉中过表达, 使 β -木糖苷酶的酶活提高到了 2.5 IU/mL^[33]。但从纤维素酶系的整体角度而言, 目前所报道的高产纤维素酶菌株分泌的 β -木糖苷酶在整个酶系中所占比例仍然相对较低, 导致不能有效地协同木聚糖酶将木聚糖彻底水解为可发酵木糖, 引起木寡糖大量积累, 从而抑制了纤维素酶和木聚糖酶的催化效率。为了解决上述问题, 本实验室利用构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 来源的组成型启动子 *gpdA* 和本源的诱导型启动子, 在高产纤维素酶菌株草酸青霉 RE-10 中过表达 β -木糖苷酶 *Xyl3A*, 获得的重组菌株 *RXyl*、*RGXyl-1* 和 *RGXyl-2* 显著地

提高了 β -木糖苷酶的产量; 特别是利用组成型启动子 *gpdA* 表达 *Xyl3A* 的菌株 *RGXyl-1*, 其分泌的纤维素酶系中 β -木糖苷酶活力可达到 (15.05 \pm 1.79) IU/mL, 约是出发菌株的 29 倍。除了 β -木糖苷酶的酶活性得到有效提高以外, 重组菌株 *RGXyl-1*、*RGXyl-2* 和 *RXyl* 胞外分泌酶液的滤纸酶活力 (FPA) 也比出发菌株 RE-10 分别提高了 20.01%、8.43% 和 18.57%, 木聚糖酶酶活性也分别提高了 16.12%、15.54% 和 16.83%, 这种现象可能是由于 β -木糖苷酶基因 *xyl3A* 表达盒随机插入到基因组 DNA 的不同位置, 干扰或破坏了其他基因表达造成的^[17]。

2 β -木糖苷酶在纤维素乙醇生产中的应用

当前, 纤维素乙醇的大规模工业化生产主要受限于纤维素酶系成本高和单位原料的乙醇产率较低^[38-39]。木质纤维素原料经过 NaOH、氨气爆破、碱性亚硫酸盐等碱性条件预处理后, 木质素被部分脱除, 但预处理后固体物料中仍残留较高含量的半纤维素组分^[40]。这些半纤维素组分的存在会影响纤维素酶对纤维素的可及度, 并且它的水解中间产物木寡糖会强烈抑制纤维素酶活力, 其抑制程度远大于葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶活性的抑制, 降低了纤维素酶的水解效率, 因此增加了纤维素酶的用量和乙醇生产成本^[2,8,35]。此外, 木聚糖是木质纤维素类生物质原料中半纤维素的主要成分, 如甘蔗渣、玉米秸秆和稻草中的半纤维素水解后 80%~92% 的产物为木糖^[41-43], 含量仅次于葡萄糖。若将半纤维素降解产生的木糖和纤维素降解生成的葡萄糖共同发酵利用, 则不仅可以提高乙醇的理论产率, 还可以降低纤维素乙醇的生产成本^[44]。例如, Nigam^[45]报道利用木糖与葡萄糖共发酵生产乙醇, 使乙醇产量在原来基础上增加了约 25%。然而, 目前在酶水解过程使用的纤维素酶系仍然存在着组分及比例不合理等问题, 若要高效彻底地水解木质纤维素中的纤维素和半纤维素以获得高浓度的可发酵糖类 (葡萄糖和木糖), 纤维素酶系还需要进行进一步优化以最大限度地提高酶的水解效率。

越来越多的研究表明, β -木糖苷酶在木质纤维素降解过程中起着重要作用。在木质纤维素水解过程中, β -木糖苷酶将木聚糖酶的水解产物木寡糖和木二糖进一步水解为木糖, 不仅在木聚糖的彻底降解过程中起着关键作用, 同时还能缓解木寡糖对木聚糖酶和纤维素酶的抑制作用^[2,8,35,46]。因此, β -木糖苷酶已被认为是纤维素酶制剂中的核心酶之一^[45]。

目前,里氏木霉(*T. reesei*)是商业纤维素酶系生产最常使用的真菌菌株,已有报道指出,大部分的商业纤维素酶、木聚糖酶或者 β -葡萄糖苷酶(如Novozyme 188)中, β -木糖苷酶的活性是不足的^[47]。为弥补这些商业酶系中 β -木糖苷酶活力的不足,最直接有效的方法是在商业酶制剂中额外补加 β -木糖苷酶,如在商业纤维素酶Spezyme® CP(批号301-05330-205)中通过加入 β -木糖苷酶,可以使氨气爆破和稀酸预处理的玉米秸秆中葡聚糖转化率分别提高27%和8%^[47]。诺维信商业纤维素酶CTec2与半纤维素酶系HTec2以一定比例混合或者额外添加 β -木糖苷酶后,可以促进木聚糖和葡聚糖转化为木糖和葡萄糖,提高乙醇的产量^[48-49]。本实验室在纤维素酶生产菌株草酸青霉RE-10的粗酶液中添加毕赤酵母异源表达的 β -木糖苷酶Xyl3A,发现可以促进纤维素酶RE-10对碱预处理玉米秸秆中纤维素和半纤维素的降解^[17,50]。虽然在纤维素酶制剂中补加 β -木糖苷酶可使可发酵糖类的总产量最大化,有效地水解木寡糖以增强纤维素酶水解能力^[2,17,50],但对于大规模工业化应用来说,采用额外补加 β -木糖苷酶的方法导致了酶的成本增加,且没有从根本上解决问题。

通过在纤维素酶生产菌株中对 β -木糖苷酶进行过表达,以提高纤维素酶系中 β -木糖苷酶的含量,可以达到弥补纤维素酶系中 β -木糖苷酶的不足,避免外源添加,提高纤维素酶的糖化效率的目的,从而有利于降低生物乙醇生产过程中的酶用量及成本。本实验室在草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)RE-10中过表达了 β -木糖苷酶Xyl3A,利用获得的 β -木糖苷酶产量提高的重组菌株RGXyl-1生产的粗酶液酶解NaOH预处理的玉米秸秆和碱性亚硫酸盐预处理的玉米秸秆,结果发现与亲本菌株RE-10生产的纤维素酶粗酶液相比,工程菌株RGXyl-1生产的纤维素酶液在半同步糖化发酵过程中可以显著降低木二糖的含量,使其浓度一直小于1 mg/mL,且纤维二糖的产量及降解速率也得到了提高,促进了两种不同碱预处理玉米秸秆降解生成葡萄糖和木糖,在发酵完成时,乙醇产量分别提高了26.27%和31.91%^[35,50]。

另外,也有较少的文献报道了通过在木糖和葡萄糖共发酵酿酒酵母菌株中成功地表达 β -木糖苷酶,弥补同步糖化共发酵生产乙醇过程中 β -木糖苷酶量的不足,从而促进木寡糖降解为木糖,提高乙醇的产量。例如,Niu等^[51]通过在木糖和葡萄糖

共发酵菌株*S. cerevisiae* BSPX042中表达青霉来源的 β -木糖苷酶基因*xyl3A*,在糖化共发酵过程中有效地促进了木寡糖转化为木糖,在48 h时乙醇浓度达到19.4 g/L,乙醇产率达0.473 g/g糖(木糖和葡萄糖共存)。Saitoh等^[52]通过在共发酵酿酒酵母菌株中共表达 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶,使得乙醇的产量提高了2.5倍。然而,利用这种在酵母中表达 β -木糖苷酶的方式,在糖化发酵过程中酿酒酵母需要消耗单糖生长后才能表达 β -木糖苷酶,在酶解过程中不能及时弥补 β -木糖苷酶的不足,并且也会减少乙醇产量,目前相关研究仍处于初期阶段。

3 结论与展望

近年来,随着对半纤维素降解酶系研究的深入,关于 β -木糖苷酶资源的挖掘及其在纤维素乙醇生产中的应用研究已取得较大进展。目前进行的大多数研究主要集中在 β -木糖苷酶的克隆与表达、酶理化性质的表征,以及通过额外添加 β -木糖苷酶以弥补纤维素酶系中的不足、在高产纤维素酶菌株中过表达 β -木糖苷酶或在酿酒酵母菌株中表达 β -木糖苷酶等以提高纤维素酶的水解效率和乙醇产量。由于 β -木糖苷酶在工业上的广泛应用,使其必须具有更高的产量和酶活力,以及更优良的理化性能,如比酶活高、热稳定性好、较好的pH稳定性等。因此,需进一步通过深入研究,利用基因工程和分子生物学方法改良 β -木糖苷酶的理化特性,探究 β -木糖苷酶生化特性与其结构之间的关系,提高其热稳定性和(或)pH稳定性及其比酶活力等,使其更好地应用于工业生产中。

其次,大部分 β -木糖苷酶还具有转糖苷活性,能够利用单糖合成低聚糖,从而抑制纤维素酶和半纤维素酶的酶活性,提高木质纤维素生物转化乙醇过程中的酶用量。因此,通过筛选新型的不具有转糖苷活性的 β -木糖苷酶或通过分子改造消除其转糖苷活性,也是亟待解决的问题之一。

最后,由于半纤维素的糖组成及结构的非均质性,其降解需要一个半纤维素水解酶系统,如 β -1,4-内切木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 α -D-葡萄糖醛酸酶及阿魏酸酯酶等,通过这一系列酶的协同作用才能够将其彻底水解。目前大部分科研者关注较多的是 β -1,4-内切木聚糖酶和 β -木糖苷酶的协同作用,或二者与纤维素酶之间的相互协同作用。随着对半纤维素降解酶系的深入挖掘和

研究, 许多对两种或者多种底物具有催化活性的酶被相继报道, 即多(双)功能酶, 打破了酶具有底物高度特异性的传统认知。例如, 本实验室利用毕赤酵母异源表达了来源于 *P.oxalicum* 的 β -木糖苷酶基因 *Abf43D*, 该木糖酶同时具有 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性^[34]。因此, 对具有两种或多种酶活性的 β -木糖苷酶的进一步资源挖掘及其分子催化原理的深入探究, 将为后续利用多功能酶代替多种单功能酶应用于纤维素乙醇生产中, 降低酶的生产成本和纤维素乙醇生产用酶成本奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Malgas S, Mafa MS, Mkabayi L, et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35: 187
- [2] Wang C, Lu XQ, Gao J, et al. Xylo-oligosaccharides inhibit enzymatic hydrolysis by influencing enzymatic activity of cellulase from *Penicillium oxalicum*. *Energ Fuel*, 2018, 32: 9427-37
- [3] Kitamura M, Ose T, Okuyama M, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of α -xylosidase from *Escherichia coli*. *Struct Biol Cryst Commun*, 2005, 61: 178-9
- [4] Scott-Craig JS, Borrusch MS, Banerjee G, et al. Biochemical and molecular characterization of secreted α -xylosidase from *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*, 2011, 286: 42848-54
- [5] Kousar S, Mustafa G, Jamil A. Microbial xylosidases: production and biochemical characterization. *Pak J Life Soc Sci*, 2013, 11: 85-95
- [6] Knob A, Terrasan C, Carmona E. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26: 389-407
- [7] Yang X, Shi P, Huang H, et al. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Hemicolletia insolens* and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chem*, 2014, 148: 381-7
- [8] Ye Y, Li X, Zhao J. Production and characteristics of a novel xylose- and alkali-tolerant GH 43 β -xylosidase from *Penicillium oxalicum* for promoting hemicellulose degradation. *Sci Rep*, 2017, 7: 11600
- [9] Tomazini A, Higasi P, Manzi LR, et al. A novel thermostable GH5 β -xylosidase from *Thermogemmatipora* sp. T81. *N Biotechnol*, 2019, 53: 57-64
- [10] Zhou A D, Hu Y B, Li J J, et al. Characterization of a recombinant β -xylosidase of GH43 family from *Bacteroides ovatus* strain ATCC 8483. *Biocatal Biotransfor*, 2020, 38: 46-52
- [11] Zhang S, Xie J, Zhao L, et al. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermotoga petrophila* and cooperated transformation of ginsenoside extract to ginsenoside 20(S)-Rg3 with a β -glucosidase. *Bioorg Chem*, 2019, 85: 159-67
- [12] Jin XC, Song J N, Ma J S, et al. Thermostable β -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production. *Renew Energ*, 2020, 155: 1425-31
- [13] Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, et al. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106: 398-404
- [14] Rubio M V, Terrasan C R F, Contesini F J, et al. Redesigning N-glycosylation sites in a GH3 β -xylosidase improves the enzymatic efficiency. *Biotechnol Biofuel*, 2019, 12: 269
- [15] Kirikyali N, Connerton IF. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa* β -xylosidase in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2014, 57: 63-8
- [16] Xia W, Shi P, Xu X, et al. High level expression of a novel family 3 neutral β -xylosidase from *Hemicolletia insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose. *PLoS One*, 2015, 10: e0117578
- [17] 叶延欣. 草酸青霉 β -木糖苷酶及其促进纤维底物糖化研究[D]. 济南: 山东大学, 2018
- [18] Rohman A, Dijkstra BW, Puspaningsih NNT. β -Xylosidases: structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5524
- [19] Ontaon OM, Ghio S, Villegas RMD, et al. EcXyl43 β -xylosidase: molecular modeling, activity on natural and artificial substrates, and synergism with endoxylanases for lignocellulose deconstruction. *Appl Microb Biotechnol*, 2018, 102: 6959-71
- [20] Jordan DB, Braker JD. Inhibition of the two-subsite β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* by sugars: competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 465: 231-46
- [21] Barker IJ, Petersen L, Reilly PJ. Mechanism of xylobiose hydrolysis by GH43 β -xylosidase. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 15389-93
- [22] Yang JK, Yoon HJ, Ahn HJ, et al. Crystal structure of β -D-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a family 39 glycoside hydrolase. *J Mol Biol*, 2004, 335: 155-65
- [23] Bosetto A, Justo PI, Zanardi B, et al. Research progress concerning fungal and bacterial β -xylosidases. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178: 766-95
- [24] Dos Santos BV, Rodrigues PO, Albuquerque CJB, et al. Use of an (hemi) cellulolytic enzymatic extract produced by *Aspergilli* species consortium in the saccharification of biomass sorghum. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189: 37-48
- [25] Korona B, Korona D, Bielecki S. Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39: 683-9
- [26] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and

- biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 211-22
- [27] Buckholz RG, Gleeson MAG. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9: 1067-72
- [28] Amaro-Reyes A, Garcia-Almendarez BE, Vazquez-Mandujano DG, et al. Homologue expression of a β -xylosidase from native *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38: 1311-19
- [29] Selig MJ, Knoshaug EP, Decker SR, et al. Heterologous expression of *Aspergillus niger* β -D-xylosidase (XlnD): characterization on lignocellulosic substrates. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 146: 57-68
- [30] Liao H, Xu C, Tan S, et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresour Technol*, 2012, 123: 117-124
- [31] 郑小菊. 草酸青霉高产 β -木糖苷酶基因工程菌株的构建及应用[D]. 济南: 山东大学, 2016
- [32] Kanna M, Yano S, Inoue H, et al. Enhancement of β -xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticum*. *Amb Express*, 2011, 1: 15
- [33] Gao L, Li Z, Xia C, et al. Combining manipulation of transcription factors and overexpression of the target genes to enhance lignocellulolytic enzyme production in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 100
- [34] Michelin M, Polizeli Mde L, Ruzene DS, et al. Production of xylanase and β -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35: 1185-92
- [35] Rahman AK, Sugitani N, Hatsu M, et al. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. *Can J Microbiol*, 2003, 49: 58-64
- [36] Terrasan CR, Temer B, Duarte MC, et al. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 4139-43
- [37] Nanjundaswamy A, Okeke BC. Comprehensive optimization of culture conditions for production of biomass-hydrolyzing enzymes of *Trichoderma* SG2 in submerged and solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191: 444-62
- [38] Du J, Song WX, Zhang X, et al. Differential reinforcement of enzymatic hydrolysis by adding chemicals and accessory proteins to high solid loading substrates with different pretreatments. *Bioproc Biosyst Eng*, 2018, 41: 1153-63
- [39] Du J, Zhang X, Li XZ, 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*. *Bioresour Technol*, 2018, 266: 19-25
- [40] Guo FF, Sun W, Li XZ, et al. Pretreatment of ramie and kenaf stalk for bioethanol production. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2014, 30: 774-83
- [41] Kaur J, Chugh P, Soni R, et al. A low-cost approach for the generation of enhanced sugars and ethanol from rice straw using in-house produced cellulase-hemicellulase consortium from *A. niger* P-19. *Bioresour Technol Rep*, 2020, 11: 100469
- [42] Moremi ME, Rensburg ELJV, Grange DL. The improvement of bioethanol production by pentose-fermenting yeasts isolated from herbal preparations, the gut of dung beetles, and marula wine. *Int J Microb*, 2020, 2020: 5670936
- [43] Alvarez C, Saez F, Gonzalez A, et al. Production of xylooligosaccharides and cellulosic ethanol from steam-exploded barley straw. *Holzforschung*, 2019, 73: 35-44
- [44] Fernández-Sandoval MT, Galindez-Mayer J, Bolivar F, et al. Xylose-glucose co-fermentation to ethanol by *Escherichia coli* strain MS04 using single- and two-stage continuous cultures under micro-aerated conditions. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 145
- [45] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *J Appl Microbiol*, 2001, 90: 208-15
- [46] Martins MP, Ventorim RZ, Coura RR, et al. The β -xylosidase from *Ceratocystis fimbriata* RM35 improves the saccharification of sugarcane bagasse. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2018, 13: 291-8
- [47] Qing Q, Wyman CE. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4: 18
- [48] Park SH, Pham TTH, Kim TH. Effects of additional xylanase on saccharification and ethanol fermentation of ammonia-pretreated corn stover and rice straw. *Energies*, 2020, 13: 4574
- [49] Holwerda EK, Worthen RS, Kothari N, et al. Multiple levers for overcoming the recalcitrance of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuel*, 2019, 12: 15
- [50] Ye YX, Li XZ, Gao Y, et al. A β -xylosidase hyper-production *Penicillium oxalicum* mutant enhanced ethanol production from alkali-pretreated corn stover. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 734-42
- [51] Niu Y, Wu L, Shen Y, et al. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose*, 2019, 26: 7923-37
- [52] Saitoh S, Tanaka T, Kondo A. Co-fermentation of cellulose/xylan using engineered industrial yeast strain OC-2 displaying both β -glucosidase and β -xylosidase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 1553-9