

# **基于 QCM-D 分析纤维素酶吸附与水解研究**

## **Analysis of adsorption and hydrolysis of cellulase based on QCM-D**

工程领域： 化学工程

作者姓名： 陈眯眯

指导教师： 苏荣欣 教授

企业导师： 刘朝辉 高级工程师

天津大学化工学院

二零一七年五月



## 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 天津大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名: 签字日期: 年 月 日

# 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津大学 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 天津大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

(保密的学位论文在解密后适用本授权说明)

学位论文作者签名: 导师签名:

签字日期:        年        月        日        签字日期:        年        月        日



# 摘要

木质纤维素是自然界含量最丰富的生物质可再生资源。利用基于酶催化的生物精炼技术，将木质纤维素中的糖单元释放出来，进一步合成液体燃料和生物基化学品，对发展绿色、可循环经济具有重要的意义。本文利用耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 研究了两种纤维素酶在纤维素薄膜上的吸附与水解行为，并构建了两种酶吸附动力学模型，为新型酶制剂复配体系的设计提供有益的参考和数据积累。主要结论如下：

1. **pH 与酶解抑制剂调控纤维素酶吸附行为研究：**在不加酶解抑制剂时，外切纤维素酶 (Cel7A)、内切纤维素酶 (Cel7B) 均会逐渐水解纤维素薄膜，在 QCM-D 测试过程表现为频率值  $F$  先下降再上升的趋势。由于两种纤维素酶的作用机制不同，酶解引起薄膜的粘弹性变化也不同。在 Cel7A 的作用下，纤维素薄膜耗散值  $D$  持续上升，而 Cel7B 的酶解则使耗散值先增加再减小。加入酶解抑制剂，可明显抑制纤维素酶对薄膜的降解反应，有利于考察酶的吸附规律。综合考虑酶解抑制效果和经济成本，优选 6000 ppm 葡萄糖作为 Cel7A 的酶解抑制剂，而选择 3000 ppm 纤维二糖作为 Cel7B 的酶解抑制剂。不同 pH 下纤维素酶的吸附行为呈现明显差异。对于 Cel7A，酸性 pH ( $\leq 4.8$ ) 更有利于吸附，而碱性 pH (特别是 pH = 9 和 10) 更有利于脱附。和 Cel7A 相同，pH  $\leq 4.8$  更有利于 Cel7B 在微晶纤维素薄膜上的吸附，碱性 pH 更有利于脱附。

2. **纤维素酶吸附动力学研究：**纤维素酶在纤维素薄膜表面的吸附量先增加，之后维持不变。酶浓度越高，在纤维素薄膜表面上的吸附量也越多。超过一定浓度后，薄膜上可吸附位点全部被占据，吸附量不再增加。通入缓冲溶液，不能将所有的酶洗脱下来，仍有一部分酶不可逆吸附在纤维素上。吸附时间越长，在纤维素薄膜表面吸附的酶量越多。洗脱时间越晚，不可逆吸附在纤维素表面的酶量越多。构建了 Langmuir 吸附动力学模型，求出了两种酶的吸附、脱附、不可逆吸附速率常数。与 Cel7B 相比，Cel7A 的 Langmuir 平衡常数更大 (吸附速率常数较大，脱附速率常数较小)，与纤维素薄膜有更强的亲和力。Cel7A 的不可逆吸附速率常数更小，可能是由于 Cel7A 在纤维素薄膜表面变性较少。

**关键词：**木质纤维素，纤维素酶，QCM-D，抑制剂，吸附，水解，动力学



# ABSTRACT

Lignocellulose is the largest and most abundant untapped biomass resources reserved in nature. It is especially significant for developing circular economy and green economy to release sugar moiety from lignocellulose using the enzymatic based biological refining technology and then synthesize liquid fuel and bio-based chemicals. In this study, we investigated the adsorption and hydrolysis behavior of two kinds of cellulase on the cellulose thin film by QCM-D, and built an adsorption kinetic model of the enzymes to provide useful reference and accumulate data for the design of a new-type compounded cellulose system for lignocellulose hydrolysis. The main conclusions were as follows.

**1. Research about regulation of cellulase behavior by changing pH and using cellulase inhibitors:** Cel7A and Cel7B would hydrolyze cellulose thin film gradually in absence of inhibitors, showing the variation tendency of frequency shift to decrease and then rise up. However, the viscoelastic properties of the thin films caused by the hydrolysis of the two cellulases were different. The energy dissipation of the films continued to rise under the hydrolysis of Cel7A, nevertheless, Cel7B hydrolysis led the energy dissipation of the cellulose films to increase first and then decrease. This phenomenon was caused by the different mechanisms of the two enzyme. The catalysis of cellulase was inhibited significantly in the presence of glucose and cellobiose, which was beneficial for investigation of cellulase adsorption. Taking the effect of enzymatic inhibition and economic cost into account, we chose 6000ppm glucose as the hydrolysis inhibitor of Cel7A and 3000ppm cellobiose as the hydrolysis inhibitor of Cel7B. The adsorption behavior of the two cellulases rendered the obvious differences under various pH. It was beneficial for Cel7A to adsorb under the condition of acidic pH ( $\leq 4.8$ ), while was conducive to desorb under alkaline pH (especially under pH of 9 and 10). The condition of  $\text{pH} \leq 4.8$  benefited the adsorption of Cel7B on Avicel and alkaline pH benefited desorption of Cel7B, just the same as Cel7A.

**2. Research about adsorption dynamics of cellulase:** The adsorption of cellulase on the cellulose thin film increased first and then remained constant. The higher the cellulase concentration was, the larger adsorbing capacity on the cellulose film surface became; but when it exceeded a certain concentration, all the adsorption sites were occupied and the adsorbing capacity would not increase anymore. Passing through

buffer solution could not elute all the enzymes. There was still a fraction of enzymes adsorbed on the cellulose films irreversibly. The longer the adsorption time was, the larger amount of enzymes on the cellulose film surface adsorbed. The later the elution time started, the larger amount of the cellulase with irreversible adsorption on the cellulose surface would be. Adsorption, desorption, and irreversible rate constant were characterized using Langmuir sorption kinetic model. Compared to Cel7B, Cel7A had a larger Langmuir Equilibrium constant, by adsorbing more quickly and desorbing more slowly, and exhibited a higher affinity to cellulose films. The irreversible adsorption rate constant of Cel7A was smaller, maybe due to the less denaturation on the cellulose films.

**KEY WORDS:** Lignocellulose, Cellulase, Quartz crystal microbalance with dissipation, Inhibitor, Adsorption, Hydrolysis, Dynamics



# 目 录

第一章 文献综述.....	1
1.1 纤维素乙醇.....	1
1.1.1 木质纤维素简介.....	1
1.1.2 纤维素酶简介.....	4
1.2 耗散型石英晶体微天平简介.....	7
1.2.1 发展简史.....	7
1.2.2 基本原理.....	8
1.3 木质纤维素薄膜的制备.....	10
1.3.1 纤维素薄膜的制备.....	11
1.3.2 木质素薄膜的制备.....	12
1.3.3 木质纤维素薄膜的制备.....	12
1.4 纤维素酶吸附行为分析.....	13
1.4.1 纤维素酶在纤维素薄膜上吸附分析.....	13
1.4.2 纤维素酶在木质素薄膜上吸附分析.....	14
1.4.3 纤维素酶在木质纤维素薄膜上吸附分析.....	14
1.5 纤维素酶酶解行为分析.....	15
1.6 本文研究内容.....	16
第二章 pH 与酶解抑制剂调控纤维素酶吸附行为研究.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.2 实验方法.....	18
2.2.1 芯片清洗与修饰.....	18
2.2.2 纤维素薄膜制备.....	19
2.2.3 静态接触角测试.....	19
2.2.4 纤维素薄膜表面形貌表征.....	20
2.2.5 QCM-D 检测酶解抑制剂对纤维素酶吸附的影响.....	20
2.2.6 QCM-D 检测 pH 值对酶吸附/脱附的影响.....	21
2.2.7 起始吸附速率的计算.....	21
2.3 结论与分析.....	22
2.3.1 纤维素薄膜表面亲疏水性质和形貌表征.....	22

2.3.2 QCM-D 频率与耗散值变化 .....	25
2.3.3 酶解抑制剂调控 Cel7A 吸附过程 .....	26
2.3.4 纤维素酶抑制剂调控 Cel7B 吸附 .....	28
2.3.5 pH 调控纤维素酶在纤维素薄膜上的行为 .....	30
2.4 本章小结 .....	32
第三章 纤维素酶吸附行为动力学研究 .....	33
3.1 实验仪器及试剂 .....	33
3.2 实验方法 .....	34
3.2.1 芯片清洗与修饰 .....	34
3.2.2 纤维素薄膜制备 .....	35
3.2.3 不同浓度的纤维素酶在纤维素薄膜上吸附/脱附行为 .....	35
3.2.4 不同吸附时间纤维素酶在纤维素薄膜上吸附/脱附行为 .....	35
3.2.5 起始吸附速率的计算 .....	36
3.3 实验结果与分析 .....	36
3.3.1 不同浓度的纤维素酶在纤维素上的吸附/脱附历程 .....	36
3.3.2 不同洗脱时间下纤维素酶的吸附/脱附历程 .....	39
3.3.3 起始吸附速率计算 .....	41
3.3.4 吸附动力学模型的构建 .....	42
3.3.5 动力学参数求解 .....	43
3.3.6 动力学模型分析 .....	45
3.4 本章小结 .....	46
第四章 结论与展望 .....	49
4.1 结论 .....	49
4.1.1 pH 和酶解抑制剂调控纤维素酶吸附行为研究 .....	49
4.1.2 纤维素酶吸附动力学研究 .....	50
4.2 展望 .....	50
参考文献 .....	51
发表论文和参加科研情况说明 .....	61
致 谢 .....	63

## 第一章 文献综述

### 1.1 纤维素乙醇

当今世界，随着全球经济的飞速发展，化石资源供应形势日渐严峻，由化石燃料燃烧引起的环境问题也日趋严重，如何将人类经济社会由高度依赖化石能源逐渐转变为循环开发可再生能源，已成为建设可持续性绿色经济社会和减少全球温室气体排放的中心议题<sup>[1]</sup>。二次世界大战后，人类加快了对新型能源的开发利用，比如核能、水利能、太阳能、风能、生物质能。其中，通过生物质转化，可获得液体燃料和化学品，在各种新型可再生能源中独具特色。生物质是由绿色植物通过光合作用把太阳能固定于地球上的有机物，具有洁净、来源广泛、可再生、可储存、可运输、成本低廉的特点，已成为世界重大热门课题之一<sup>[2, 3]</sup>。

利用基于酶催化的生物精炼技术将生物质降解为可发酵还原糖后，再利用微生物代谢工程将其发酵得到乙醇溶液，经精馏、脱水等一系列工艺处理后转化为可供利用的液体燃料，即为燃料乙醇。作为新型、绿色环保的燃料替代品，燃料乙醇可以作为燃油的增氧剂，使汽油充分燃烧，减少对化石能源的消耗以及对环境的污染。乙醇作为绿色、可再生能源，可直接作为液体燃料使用，也可以与汽油混合使用。添加一定比例的乙醇到汽油中可改善汽油的抗爆性能，提高车辆的安全系数。以生物质为原料的第二代燃料乙醇不存在与人争夺粮食的危机，有利于缓解全球液体燃料严重短缺和人类日益增长的需求量间的矛盾，对构建多元化的能源体系和提高能源安全具有极其重要的战略意义。

除此之外，还可以将木质纤维素高效、低能耗地转化为生物基产品，满足人们日益增长的物质需求，降低目前普遍存在的化学产品对石油的依赖，为建立不依赖于石油炼制的可持续发展的新型工业生产模式提供新的探索途径。与石油基产品相比，生物基产品在生产和消费过程中还能有效减少温室气体和氮氧化物、硫化物的排放，具有绿色环保、可持续发展的优势，对解决目前日益变暖的全球气候、我国大部地区严重雾霾天气等环境问题具有积极意义<sup>[4-6]</sup>。

#### 1.1.1 木质纤维素简介

木质纤维素是自然界含量最丰富的生物质可再生资源，但是由于其生物顽抗性未得到充分的开发利用。通常，木质纤维素结构复杂，其组成成分和各成分含

量因来源不同而不同，通常由纤维素（40-50%）、半纤维素（25-30%）、木质素（15-20%）和少量的蛋白质、抽提物和灰分等成分组成<sup>[7]</sup>。纤维素、半纤维素和木质素这三种长链高分子在木质纤维素中相互交联缠绕在一起形成一种“类钢筋混凝土”复杂结构<sup>[8,9]</sup>。这种顽抗、紧致的结构进一步要求：只有多种纤维素酶协同作用，逐步酶解各种长链高分子，才能实现木质纤维素的高效转化<sup>[10,11]</sup>。

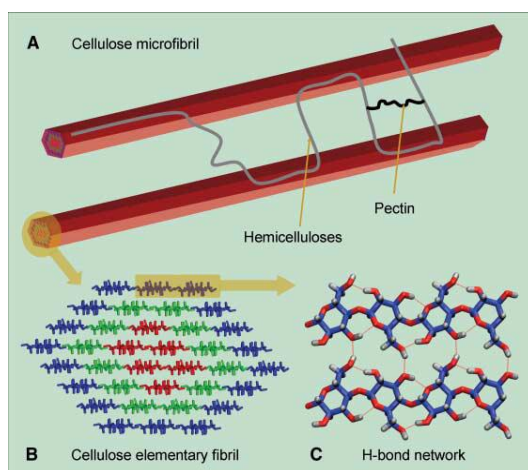


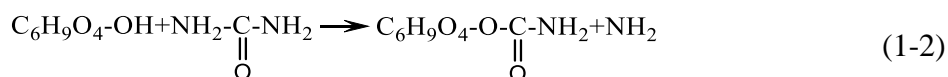
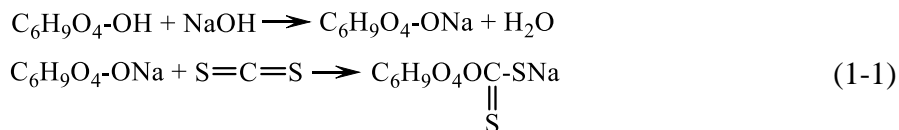
图1-1 (A) 细胞壁中主要多糖间相互关联结构模型；(B) 纤维素微纤丝的纤维 36 链模型；(C) 纤维素 I $\beta$  中分子内及分子间氢键结构<sup>[12]</sup>

Fig. 1-1 (A) A simplified model showing the interaction of the major polysaccharides in the cell wall. (B) The 36-chain model of the cellulose elementary fibril. (C) The intra- and interchain hydrogen-bond network in cellulose I $\beta$ . <sup>[12]</sup>

纤维素是一种大分子同多糖，是由 D-吡喃葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接形成的链状线型高分子聚合物，化学式为  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ，因其来源的不同，聚合度一般可达几千甚至上万。纤维素是细胞壁中的结构支撑物，通常以 36 根葡聚糖链通过氢键相连构成的微纤丝的形式存在<sup>[13]</sup>（图 1-1B）。自然界中，构成纤维素大分子的葡萄糖单元呈椅式构象，如图 1-1C 所示，相邻的葡萄糖残基反转  $180^\circ$  形成纤维二糖，并以纤维二糖为重复单元形成了扁平的带状结构。单一的长链线性结构使得其可以与自身或者相邻的纤维素链形成大量的分子内和分子间氢键，分子间氢键使得纤维素酶难以接近结晶纤维素的催化位点，给酶解过程带来了极大的挑战。此外，纤维素分子的这种氢键网络结构与范德华力还赋予了纤维素极大的强度和难溶性。

近年来，人们尝试了多种方法来溶解纤维素，目前根据溶解机理的不同，纤维素的溶剂体系可分为衍生化溶剂体系和非衍生化溶剂体系。使纤维素发生衍生化反应而溶解的溶剂称为衍生化溶剂，比如氢氧化钠/二硫化碳体系、氨基甲酸酯

体系<sup>[14,15]</sup>、多聚甲醛/二甲基亚砷体系<sup>[16]</sup>等，主要的化学反应方程式如（1-1）和（1-2）所示。



非衍生化溶剂是一类溶解时不会生成纤维素衍生物的溶剂。例如 *N*-甲基吗啡-*N*-氧化物（NMMO），NMMO 有极强的极性，结构式如图 1-2。NMMO 中强极性基团上的氧原子有两对孤对电子，是强的给电子体，与纤维素大分子中的羟基（尤其是-CH<sub>2</sub>OH）上的氢结合形成氢键，形成纤维素-NMMO 络合物，从而切断纤维素分子链间的氢键，继而破坏纤维素的聚集态结构，因而纤维素物理溶解。溶解后的纤维素晶型发生改变，由结晶型变为无定型。但是当含水量超过 17% 后，水分子占据 NMMO 中可形成氢键的位置，因此不能使纤维素分子溶解<sup>[17]</sup>。NMMO 具有绿色环保，毒性极低的特点，是目前运用最广泛的纤维素有机溶剂之一。武汉大学张俐娜教授课题组开发了以 NaOH/尿素、NaOH/硫脲、LiOH/尿素等为代表的非衍生化水溶液体系<sup>[18-20]</sup>溶解纤维素。将一定比例的 NaOH/尿素、NaOH/硫脲混合溶液在 -10 °C 下冷冻处理，低温下的溶液能快速溶解纤维素，形成以尿素为主体，包含纤维素-NaOH 客体的蠕虫状包含物，尿素处于包含物的最外层，阻止纤维素链的聚集，因而这种包含物在低温状态下处于高度稳定状态<sup>[21-23]</sup>。此外，另一种非衍生化溶剂体系氯化锂/二甲基乙酰胺（LiCl/DMAc）体系中，DMAc 的羰基氧与 Li<sup>+</sup>缔合，形成离子-偶极络合物，Cl<sup>-</sup>与纤维素分子的羟基络合，打开氢键网络结构，纤维素晶格中的氢键受到膨胀效应和电荷排斥效应而不断破坏，最终溶解<sup>[24, 25]</sup>。

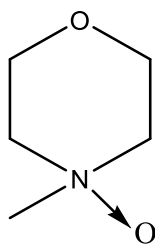


图 1-2 NMMO 结构式

Fig. 1-2 Chemical formula of NMMO

半纤维素是植物细胞壁中存在的一种多糖。在植物细胞壁中，半纤维素将纤维素基原纤丝捆绑在一起，形成细胞壁的微纤丝网络（图 1-1A）。在细胞壁的最

外层, 还有木质素与半纤维素共价相连, 这种高度规则的结构造成了生物质的顽抗性。组成半纤维素的多聚物主要有木葡聚糖、木聚糖、甘露聚糖、葡甘露聚糖和混合糖苷键葡聚糖等。一般而言, 半纤维素较晶体纤维素而言更容易被降解, 但由于其复杂的分支结构中的乙酰化部分, 某些特定的寡聚结构会不易降解<sup>[26]</sup>; 又由于半纤维素的介入增加了纤维素的顽抗性。因此, 半纤维素去乙酰化可能会提高纤维素的降解性, 且通过去除半纤维素以及多糖体系之间的交联键也可提高纤维素的降解效率。虽然, 目前工业上使用的复合酶中均含有一定量的半纤维素酶, 但就以上结论仍未统一观点<sup>[27]</sup>。此外, 在同一体系中酶解半纤维素会将不易发酵的戊糖(主要是木糖)带入了产物葡萄糖体系中, 对后续工序造成了负面影响<sup>[28]</sup>。

木质素是木质纤维素中含量最大的非多糖物质, 也是自然界中储量仅次于纤维素的天然聚合物, 其储量占全球总有机碳储量的 30% 左右。依据单体不同, 木质素被分为以下 3 类: 紫丁香基木质素(syringyl lignin, S-木质素)、愈创木基木质素(guaiacyl lignin, G-木质素)和对-羟基苯基木质素(para-hydroxy-phenyl lignin, H-木质素)。它们分别对应紫丁香基丙烷结构单体聚合而成、愈创木基丙烷结构单体聚合而成和对-羟基苯基丙烷结构单体聚合而成。木质素由三种木质单体醇(松柏醇、芥子醇和对香豆醇)通过烷基-芳基、烷基-烷基和芳基-芳基醚之间的化学键结合, 是具有三维网络结构的聚酚类天然高分子物质, 因而具有高度的疏水性, 使得其难于溶解和处理。

在生物质酶解糖化中, 木质素是造成酶解率低下的的重要原因之一。纤维素酶可以与木质素发生非特异性吸附, 因此大量纤维素酶并未与纤维素发生特异性吸附以起到催化作用, 导致了酶解效率的下降。为此, 去除木质素成为提高酶解效率的重要途径之一<sup>[29-31]</sup>。使用生物酶降解木质素较为复杂。目前在生物质转化过程中, 通常用碱性溶液预处理破坏木质素内部的氢键和其他共价键以达到去除木质素的目的<sup>[32]</sup>。此外, 用表面活性剂预处理木质纤维素可以有效改变底物结构<sup>[33]</sup>、提高木质素溶解性除去木质素, 减弱纤维素酶在木质纤维素上的无效吸附<sup>[34, 35]</sup>。非离子型表面活性剂还可作为酶稳定剂, 防止水解时酶在液固界面失活, 从而在体系中保留更多游离酶以提高酶解效率。高纯木质素的有效提取和产业化应用对于开发高价值木质素类产品具有非常重要的意义, 并有助于降低纤维素乙醇的生产成本。

### 1.1.2 纤维素酶简介

纤维素酶是催化降解纤维素中  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的一类酶的总称。商业纤维素酶主要产自里氏木霉(*Trichoderma reesei*), 主要以两种胞外分泌的纤维二糖

水解酶(*TrCel7A*, *TrCel6A*)为主, 小部分如  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要产自黑曲霉(*Aspergillus niger*)<sup>[36, 37]</sup>。木质纤维素结构复杂, 具有较强的生物质顽抗性结构, 需要多种酶形成一个酶体系, 共同作用完成其高效降解。根据催化反应方式和作用功能的差异, 纤维素酶体系可以分为如下三类<sup>[38]</sup>:

(1) 外切葡聚糖酶(Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases), 又称纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolases, CBH) (EC 3.2.1.91)。来自真菌的称 CBH, 来自细菌的称 Cex。该酶主要进攻纤维素链的还原端或者非还原端, 破坏纤维素的结晶区, 之后沿着纤维素链行进, 从其末端切断纤维二糖单元。它是目前研究最多的纤维素酶, 也是纤维素酶中含量最大的组分。

(2) 内切葡聚糖酶(Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, EG) (EC 3.2.1.4)。主要作用于纤维素内部的无定型区域, 随机水解  $\beta$ -1,4-糖苷键, 将长链纤维素分子截短, 释放纤维寡糖形成新的还原端。

(3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶(1,4- $\beta$ -D-glucosidases, BGL) (EC 3.2.1.21), 又称纤维二糖酶(Cellubiase, CB)。主要将纤维二糖或可溶性纤维糊精(低聚纤维寡糖)水解, 释放葡萄糖分子。

纤维素酶的酶解反应会因酶促反应的产物(例如纤维二糖、葡萄糖等)和类似底物的某些物质(如甲基纤维素)受到竞争性抑制。木质纤维素的水解需要上述三种酶的协同作用, 其“三段式”水解机理如图 1-3。

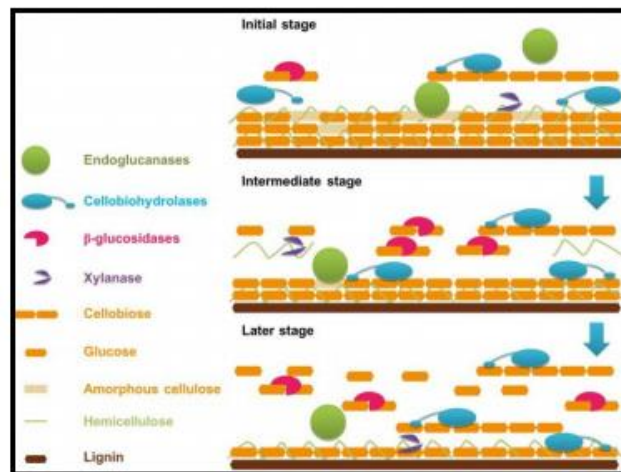


图 1-3 纤维素酶水解木质纤维素底物的机理

Fig. 1-3 Mechanism model of lignocellulosic substrates hydrolysis by cellulase complex

Tilbeugh 等<sup>[39]</sup>对纤维素酶拆分研究发现, 大部分降解纤维素的酶具有双结构域结构, 即吸附结构域(Carbohydrate-Binding Domains, CBD)和球状的催化结构



域(Catalytic Domain, CD), 两个结构域通过连接肽(Linker)连接。目前发现纤维素酶组分 CBHI、CBHII 和 EGI 均为该结构模式<sup>[40,41]</sup>, 如图 1-4。其中, 吸附结构域属于碳水化合物结合模型的I类, 具有楔形结构, 能插入和分开纤维素的结晶区, 具有疏散纤维素链的作用。CBD 使得酶分子吸附在纤维素上, 有效的提高了底物表面的酶浓度。然而通过 AFM (Atomic Force Microscope) 观察, 酶在纤维素底物上的吸附运动造成的“交通堵塞”会阻碍酶水解<sup>[42]</sup>, 降低酶解反应速率。催化结构域的重要功能是催化糖苷键的断裂, 破坏纤维素链, 将其降解为低聚物多糖, 是酶解反应进行的关键。外切纤维素酶与内切纤维素酶的 CD 在拓扑学上完全不同: 外切纤维素酶拥有环索(loop)和隧道(tunnel)结构, 而内切纤维素酶则只是一道裂隙(cleft)<sup>[43,44]</sup>。尽管 CBH-I 与 CBH-II 同为外切纤维素酶, 它们催化域的隧道结构也拥有完全不同的三维构象<sup>[45,46]</sup>。Linker 的作用则可能是使 CBD 和 CD 之间保持一定的距离。

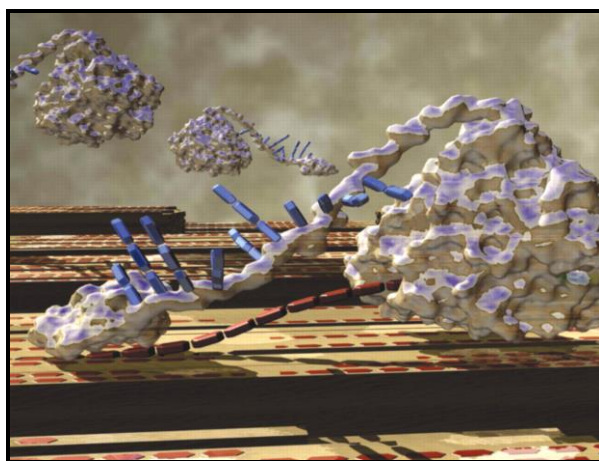


图 1-4 外切纤维素酶催化水解结晶纤维素的模型图<sup>[12]</sup>

Fig. 1-4 Artistic concept of an exoglucanase (*T. reesei* cellobiohydrolase I) acting on crystalline cellulose<sup>[12]</sup>.

研究发现, 纤维素酶催化纤维素水解的机制是“酸/碱催化”双置换。纤维素酶分子吸附结构域中芳香族氨基酸上的苯环或吡咯环与构成纤维素的葡萄糖环形成堆积力, 可吸附到纤维素上。单个葡萄糖链从纤维素表面脱附是由 CBD 上氢键形成的残基与相邻的葡萄糖链形成的氢键驱使。在细菌、真菌的内切纤维素酶、外切纤维素酶、葡萄糖苷酶的催化域中, 位于活性位点的谷氨酸在异头碳原子位, 以酶分子中两个保守的羧基氨基酸残基作为亲核基团或质子供体, 通过构型的保留或转化完成催化作用, 脱去纤维素链上的葡萄糖残基<sup>[47]</sup>。此外,  $\beta$ -葡萄



糖苷酶仅有催化域，不包含吸附域 CBD<sup>[48, 49]</sup>，因而其不能与纤维素底物发生特异性吸附。

近年来，研究人员发现一种与纤维素酶结构类似的蛋白：膨胀素。膨胀素是在植物细胞生长期间分泌的一种 pH 依赖的，能引起细胞壁“膨胀”的细胞壁蛋白。膨胀素也由两个明显的结构域组成，一个是位于 N-端的催化结构域 (Domain 1)，一个是位于 C-端的富含色氨酸的假定多糖结合域 (Domain 2)，两个结构域通过一个短的多肽链 Linker 连接。膨胀素的催化结构域缺少糖苷水解酶 GH 45 家族酶水解糖苷键必须的氨基酸，因此膨胀素不具有水解活性。膨胀素与纤维素酶协同作用，可以提高纤维素的酶解效率。Wang<sup>[50]</sup>等从瑞式木霉 (*Trichoderma reesei*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中提取出膨胀素基因，并在在酵母细胞中成功表达，提取纯化了膨胀素蛋白 TrSwo1 和 BsEXLX1，并将其与内切纤维素酶协同水解滤纸纤维素，发现当膨胀素的加入量为 1 mg/g 滤纸时，重组的 TrSwo1 和 BsEXLX1 与内切纤维素酶协同作用达到了最大水平，能将还原糖的释放量提高到原来的 2.0 倍和 2.5 倍。

## 1.2 耗散型石英晶体微天平简介

耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 是基于石英晶体的逆压电效应对其电极表面质量变化进行检测的仪器，是最高效的在线表界面过程分析工具，且具有纳克级的灵敏度，可用于研究界面高分子构象<sup>[51-53]</sup>、吸附动力学<sup>[54-57]</sup>、降解动力学<sup>[58]</sup>、聚电解质层层自组装<sup>[59-61]</sup>等。

石英晶体在没有受到外力作用时，每个晶格呈六边形，晶体表面不带电。当在晶体的两侧施加机械应力时，晶格的电荷中心发生偏移，在晶体的两个相对表面上产生正负相反的极化电荷而产生电场，当外力撤去后，又会恢复到不带电的状态，但外力的方向改变时，电荷的极性也随之改变，这种现象称为正压电效应。相反，在石英晶体的极化方向施加电场，晶体形变，电场去掉，晶体的形变也随着消失，这种现象称为逆压电效应<sup>[62]</sup>。

### 1.2.1 发展简史

QCM 技术的发明要追溯到 1880 年。当时，法国科学家 Jacques Curie 和 Pierre Curie<sup>[63]</sup>兄弟在研究 Rochelle 盐时发现了压电效应。1882 年，他们把 Rochelle 盐晶体放到电场中，发现了逆压电效应。然而，直到第一次世界大战期间，法国科学家 Langevin 分别利用压电效应和逆压电效应驱动石英晶体发射和接收声波，从而探测潜水艇后，才引起人们对压电效应的兴趣。

到二十世纪初，压电效应的研究有了迅速的发展。1918 年，贝尔实验室的 Nicholson 发明了晶体振荡器，并获得了专利。1921 年，Cady 制造出了世界上第一个 X 切型石英晶体振荡器，但是由于该切型的石英晶体受温度影响太大，而未被广泛应用<sup>[64]</sup>。1934 年，第一个 AT 切型的石英晶体被用来制造振荡器，在室温附近，该切型晶体的频率受温度的影响可以忽略不计，因而受到广泛推广<sup>[65]</sup>。

起初，人们只定性地知道石英晶体表面有铅笔划过时，频率会上升；有橡皮擦过时，频率会下降。直到 1959 年，Sauerbrey 构建了 Sauerbrey 方程<sup>[66]</sup>，确立了晶体表面质量变化和频率变化的定量关系。但是该方程只适用于空气或真空中的薄膜检测。

1982 年，Nomura<sup>[67]</sup>和 Konash<sup>[68]</sup>等通过让溶液与晶体的单面接触，第一次实现了溶液中晶体的稳定振动。1985 年，Kanazawa<sup>[69]</sup>和 Gordon<sup>[70]</sup>通过解边界条件约束下剪切波在石英晶体和牛顿流体间的传播方程，提出液相中石英晶体振荡频率和牛顿流体密度和黏度的关系。1996 年，Rodahl<sup>[71, 72]</sup>推导出了耗散因子变化与溶液性质间的方程，定量地指出溶液中石英晶体振动引起能量耗散的大小。从此，QCM 的引用拓展到了固液界面。

### 1.2.2 基本原理

QCM-D 作为一种检测精度可达纳克级别的表界面分析仪器，可通过测量石英压电振子（具有压电效应的石英晶体）在外加电场下振动频率的变化考察晶片表面上的质量变化，测量耗散因子的变化推测表面坚硬度的变化。

如图 1-5 所示，QCM-D 利用的是石英晶体的逆压电效应原理。QCM-D 的核心部件是石英晶体传感器。当传感器两端施加电压时，石英晶体会在共振频率出引发一个小的剪切振动。如果在晶体表面上吸附一层薄膜，晶体的振动就会减弱，且振动幅度或频率与薄膜的厚度和密度息息相关。

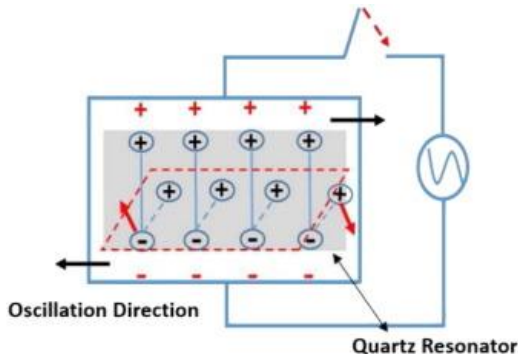


图 1-5 QCM-D 的压电效应原理：石英压电振子在交变电压的作用下变形和振荡<sup>[73]</sup>

Fig. 1-5 QCM-D utilizes a converse piezoelectric effect: the quartz crystal deforms and oscillates under the alternating electric potential<sup>[73]</sup>.

20 世纪 60 年代, Sauerbrey 给出了石英晶体表面吸附层质量变化与其频率变化的定量关系, 他认为, 对于石英晶体表面微小的质量变化, 附加物的质量变化 ( $\Delta M_f$ ) 近似等于晶体自身质量 ( $\Delta M_q$ ) 的变化, 即忽略外加物质与石英的密度差异, 且推导出如下公式:

$$\Delta m_f = -\frac{\rho_q h_q}{n f_0} \Delta f = -C \Delta f \quad (1.1)$$

方程 (1.1) 即 Sauerbrey 方程<sup>[66]</sup>。式中,  $\Delta m_f = \Delta M_f / A_q$  为单位面积的质量变化, 即面密度变化;  $A_q$  为石英晶体表面面积;  $\rho_q$  为石英晶体的密度;  $h_q$  为石英晶体厚度;  $n$  为倍频;  $f_0$  为基频;  $\Delta f$  为频率变化;  $C = \rho_q h_q / n f_0$ , 当石英晶体的厚度确定时,  $C$  为常数。

方程 (1.1) 仅适用于足够薄 (相对于石英晶体)、铺展均匀且刚性足够大的吸附层。对于柔软或刚性低、粘弹性大的吸附层, 由于不能完全耦合谐振的石英晶体, 根据 Sauerbrey 方程得到的测量值由于部分能量耗散会明显低于实际质量, 且无法提供粘弹性膜的特性。因此, 定义了耗散因子  $D$ , 用于表示吸附在传感器表面的吸附膜层粘弹特性, 即:

$$D = \frac{E_{dissipated}}{2\pi E_{stored}} \quad (1.2)$$

式中,  $E_{dissipated}$  是一个周期的能量耗散;  $E_{stored}$  是震荡时储存的能量。  $D$  值越大, 表明晶体上的薄膜刚性越低, 吸附层越柔软, 粘弹性越大, 即能量耗散  $D$  越高说明膜的弹性模量和黏度系数越低<sup>[74]</sup>。

QCM 一般由电气驱动系统、石英压电振子系统和信号分析检测系统组成。以瑞典百欧林公司 QCM-D 为例: 接通继电器后, 石英晶体在交变电压的驱动下, 在一定谐振频率下稳定工作; 断开继电器后, 驱动力将突然消失, 石英晶体在阻尼作用下, 振幅会按照式 (1.3) 逐渐衰减。

$$A(t) = A_0 e^{-t/\tau} \sin(2\pi f t + \varphi) + C \quad (t \geq 0) \quad (1.3)$$

式中,  $A(t)$  为  $t$  时刻的振幅;  $A_0$  为  $t=0$  时的振幅;  $t$  为时间;  $\tau$  为衰减时间常数, 可通过关闭驱动电压时谐振器振幅的指数衰减振荡或者阻尼振荡确定;  $f$  为输出频率;  $\varphi$  为相位;  $C$  为常数。通过拟合振子振幅衰减曲线, 可以得到  $f$ 。

耗散因子  $D$  可通过式 (1.4) 求出:

$$D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad (1.4)$$

在 QCM-D 传感芯片表面制备纤维素、木质素、木质纤维素薄膜, 通入纤维素酶溶液或其他添加剂, 通过观察频率值  $f$  和耗散因子  $D$  的变化, 可分析酶在薄膜表面的吸附、水解、脱附等行为。此外还可运用 Sauerbrey 方程定量计算薄膜表面上酶的吸附量和纤维素水解量。

### 1.3 木质纤维素薄膜的制备

利用 QCM-D 分析木质纤维素表面酶吸附与水解行为，首先必须在 QCM 传感器表面制备一层厚度极薄（<几百纳米）、表面光滑、吸附牢固且均匀覆盖基底的木质纤维素薄膜。由于木质纤维素是一类由纤维素、半纤维素和木质素三种长链高分子相互交织在一起的复杂大分子，许多学者通过旋转涂膜法、自组装单分子层法、化学连接法等制备纤维素薄膜、木质素薄膜、木质纤维素薄膜或者混合膜（表 1-1），并分析了这些薄膜的结构特点。

表 1-1 木质纤维素薄膜制备与分析

Tab. 1-1 Preparation and Characterization of Lignocellulosic Thin Films

底物	来源	制备方法	薄膜特征	参考文献
纤维素	微晶纤维素	旋转涂膜	纤维素薄膜的质量为 69.5 $\mu\text{g}$ ，厚度为 $42.9 \pm 1.6 \text{ nm}$	[75]
	微晶纤维素	自组装法	薄膜的水接触角（WCA）为 $61.7 \pm 8.5^\circ$	[76]
	TMSC	旋转涂膜	薄膜的静态接触角（SCA）是 $33 \pm 1^\circ$ ，厚度为 $21.0 \pm 0.3 \text{ nm}$	[77]
	TMSC	Langmuir-Schaeffer 沉积	薄膜结晶度，厚度，粗糙度分别为 53.5%，17.8 nm, 0.5 nm	[78]
	纤维素纳米纤丝	旋转涂膜	薄膜厚度和粗糙度分别是 $6.5 \pm 0.2$ ， $3.5 \pm 0.2 \text{ nm}$	[79]
	纳米微晶纤维素、半结晶纤维素、无定型纤维素	旋转涂膜	纳米微晶纤维素，半结晶纤维素、无定型纤维素薄膜厚度分别为 $20 \pm 3$ ， $15 \pm 4$ ， $40 \pm 5 \text{ nm}$	[80]
木质素	有机溶剂型木质素	旋转涂膜	薄膜光滑平整，粗糙度为 0.47 nm，WCA 约为 $65^\circ$	[81]
	酸析木质素	旋转涂膜	薄膜厚度为 20 nm，粗糙度是 1.1 nm，在溶液中稳定存在	[82, 83]
	蔗糖渣	LB 膜法	运用丙酮-氧、苏打、乙醇-水、丙酮/水/硫酸四种方法提出的木质素	[84] 5

底物	来源	制备方法	薄膜特征	参考文献
木质纤维素	热压水预处理的木粉	旋转涂膜	层LB薄膜粗糙度分别为0.30、1.25、0.24、3.80 nm	[85, 86]
			芯片表面纤维分散良好，所有薄膜形态相似、粗糙度相同	
			SCA 大约为 40°；平均膜厚约为 40 nm	
			薄膜中木质素含量越高，WCA 和膜粗糙度越大	
			木质素含量增加，薄膜粗糙度下降，WCA 增大	

其中，旋转涂膜法具有操作简单，能快速制备均匀、牢固的薄膜等优点，且能高度重复，因而应用最为广泛。自组装法是利用长链有机分子活性末端与基底的化学键作用、成膜分子链间的范德华力、以及分子链上特殊官能团间的相互作用等，自发形成热力学稳定、能量最低、均匀一致的单分子层膜。LB (Langmuir-Blodgett) 膜法的优点是制得的薄膜能够完全覆盖基底，能在分子水平上组装因而具有最小的粗糙度，膜厚可通过涂布层数精确调控，但缺点是需要精密的仪器，且需要多次试验选择合适的溶剂相和面下相，耗时长，不便于大批量生产。科研中，研究人员普遍采用旋转涂膜法制备厚度低于 100 nm 的薄膜用于检测。

### 1.3.1 纤维素薄膜的制备

将纤维素溶于 *N*-甲基氧化吗啡 (NMMO) [75,80]、离子液体[80,90]等非衍生化溶剂中，通过旋转涂膜的方式，可获得均匀的纤维素薄膜。此外，Tham 等[76]在 QCM-D 传感芯片表面先修饰聚乙烯亚胺 (PEI)，再通入微晶纤维素悬浮液，制得牢固的自组装纤维素薄膜。Orelma 等[78]则先在芯片表面旋涂一层聚苯乙烯，运用水平方向 Langmuir-Schaeffer 沉积技术在芯片表面修饰 TMSC (三甲基硅烷基纤维素)，去甲硅基后得到纤维素薄膜。此外，还可以用 LB 膜法制备纤维素薄膜，芯片浸泡在 1-硫代-D-葡萄糖的甲醇溶液中过夜，然后用甲醇和超纯水冲洗，芯片表面形成硫代葡萄糖的单分子层自组装，随后用 LB 技术使得纤维素沉积在自组装层表面[91, 92]。

不同来源的纤维素均可通过旋转涂膜法制备用于 QCM-D 检测的薄膜, 纤维素薄膜厚度因原料不同, 分布在 5-50 nm。在旋转涂膜之前, 在芯片表面修饰阳离子聚电解质, 利用静电相互作用可制得稳定、牢固的纤维素薄膜。

### 1.3.2 木质素薄膜的制备

木质素薄膜的表面性质与木质素来源、木质素的提取方法、溶解木质素的溶剂和制膜方法有关。

将木质素溶于氨水<sup>[29, 82, 83]</sup>, 1,4-二恶烷<sup>[29, 81, 93, 94]</sup>等溶剂中, 形成均一的溶液, 取一定量木质素溶液置于 QCM-D 传感芯片表面, 溶剂在高速离心力下连续蒸发并径向流动, 最终在芯片表面形成均一、固态的木质素薄膜。根据旋转涂膜法制备的薄膜, 与基底有很强的黏附力, 膜厚因木质素提取方法不同而有明显差异<sup>[93]</sup>。

采用 LB 膜法可把木质素一层一层地涂布到指定衬底上。Pasquini 等<sup>[84]</sup>以从甘蔗渣中提取的木质素为原料, 将木质素溶于 DMA (二甲基乙酰胺) 和氯仿的混合溶液中, 制得的 LB 膜因木质素提取方法不同而表现出不同的特性。用丙酮-氧、苏打、乙醇-水、丙酮/水/硫酸提出的木质素 LB 薄膜粗糙度分别为 0.30、1.25、0.24、3.80 nm。

### 1.3.3 木质纤维素薄膜的制备

木质纤维素薄膜主要通过旋转涂膜的方式制得。近年来, 许多学者通过在 QCM-D 传感器表面修饰一层 PEI<sup>[76, 85, 86, 95]</sup>, 利用其提供的阳离子环境, 增加 QCM-D 传感芯片的亲水性, 再采用亚氯酸钠<sup>[95]</sup>、加压热水<sup>[85]</sup>、蒸汽爆破<sup>[86]</sup>等处理不同来源的木质纤维素, 采用旋转涂膜法制得的木质纤维素薄膜厚度可达 10 nm 左右<sup>[85, 86, 95]</sup>。

此外, 为了尽可能模拟自然界中木质纤维素的实际存在形式, 研究人员通过混配的方式制备了不同组成的混合膜。将纤维素、半纤维素、木质素衍生化, 把其中的两种或多种成分溶于同一种溶液, 旋转涂膜, 之后脱去甲硅基、乙酰基等衍生化基团, 形成不同组成和比例含量的木质纤维素混合膜。

Strasser 等<sup>[87]</sup>将木质素棕榈酸酯 (LP) 与 TMSC 按不同比例溶于三氯甲烷溶液, 旋转涂膜, 在 HCl 蒸汽中去甲硅基, 制备不同组分含量的 LP/纤维素混合膜。结果表明: 降低 TMSC 含量、脱甲硅基后, 混合膜厚均减小; 混合膜中纤维素的含量对静态接触角 (SCA) 影响很小 (约为 40°), 但脱甲硅基后, SCA 减小。这可能是因为去甲硅基后, 纤维素部分解聚, 链流动性增加重排而形成更为致密的结构<sup>[96]</sup>。

Hoeger 等<sup>[88]</sup>将乙酰化木质素 (AcL) 和 TMSC 溶于氯仿, 旋涂, 分别在 HCl 和氨气中脱甲硅基和乙酰基, 得到纤维素/木质素混合膜。脱乙酰基后, 薄膜粗糙度增加; 薄膜中木质素含量越高, 水接触角和粗糙度越大, 当木质素含量占 50% 时, 水接触角和粗糙度分别可达  $55 \pm 1^\circ$ 、 $4.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ 。

Martin-Sampedro 等<sup>[89]</sup>用三醋酸纤维素 (CTA) 代替 TMSC, 与 AcL 溶于氯仿, 旋转涂膜, 室温下在氨气氛围中脱乙酰基, CTA 转化为纤维素, AcL 转化为木质素, 最终形成纤维素/木质素混合膜。随着木质素含量的增加, 膜粗糙度增加, 水接触角增大; 脱乙酰基后, 混合膜粗糙度也增加。用 CTA 代替 TMSC, 旋转涂膜后, 只需一步脱去乙酰基即可, 操作更简便。

Kumagai 等<sup>[95]</sup>结合亚氯酸钠处理 (SCT) 和机械颤动处理日本扁柏软木粉, 通过旋转涂膜制得半纤维素和木质素含量较高的木质纤维素 (LCNF) 薄膜。结果表明, 经过 8 h 的 SCT, LCNF 薄膜厚度可降到  $10.6 \pm 0.8 \text{ nm}$ , 粗糙度降到  $3.34 \pm 0.13 \text{ nm}$ 。

## 1.4 纤维素酶吸附行为分析

### 1.4.1 纤维素酶在纤维素薄膜上吸附分析

美国加州大学伯克利分校 Maurer 等<sup>[75]</sup>采用 QCM-D 分析了外切纤维素酶 (Cel7A) 和内切纤维素酶 (Cel7B) 在纤维素表面的竞争性吸附行为。发现: 在一定的浓度范围内, Cel7A 和 Cel7B 酶浓度越高, 用 QCM-D 观察到的频率下降越多, 酶在纤维素表面吸附量越大。在相同浓度下, Cel7A 在纤维素表面吸附引起频率下降更多, 说明 Cel7A 与纤维素之间具有更强的亲和力。

此外, 研究发现: 不同来源的纤维素酶在纤维素表面表现出不同的吸附-反应特性。包含 CBM 的内切酶会穿透纤维素薄膜作用, 使得薄膜粗糙度增加<sup>[97,98]</sup>; 纤维素表面吸附表面活性剂后, 不会影响 CBH-I 在其表面的水解<sup>[93]</sup>。

Maurer 等<sup>[75]</sup>根据一级反应动力学方程, 做出合理的假设, 再用龙格-库塔算法在有限范围内迭代, 求出 Cel7A 和 Cel7B 的吸附、脱附、不可逆吸附速率常数 ( $k_A$ 、 $k_D$ 、 $k_I$ ), 并以此为基础构建了 Langmuir 吸附动力学模型, 与实验结果拟合很好。两种酶  $k_I$  相似, 考虑到 Cel7A 和 Cel7B 有相似的结合位点, 这可能是由于与纤维素羟基结合的 CBD 区氨基酸残基不同导致的; Cel7A 熵值大于 Cel7B, 解释了 Cel7A 有更高的 Langmuir 平衡常数、与纤维素有更强的亲和力。

另外, Cel7A、Cel7B 混合酶在纤维素表面的动力学模型也被建立<sup>[99]</sup>。该模型包括两种酶竞争性吸附、不可逆结合、络合、协同作用。对 Cel7A 和 Cel7B 来



说，限速步骤分别是络合和吸附；在 25 °C 下，Cel7A 与 Cel7B 浓度比为 2:1 时，纤维素膜降解速率最大。

### 1.4.2 纤维素酶在木质素薄膜上吸附分析

蛋白质主要通过疏水相互作用非特异性吸附在木质素薄膜上<sup>[93, 94]</sup>。Rahikainen 等<sup>[29]</sup>指出：外切纤维素酶 Cel7A 在木质素表面的吸附经历两个过程，先快速吸附、再缓慢连接，频率值先快速增加之后逐渐减小，最终下降值约为 18 Hz；而 Cel7A 催化域则只有一个缓慢吸附的过程，该吸附引起频率值变化约为 7 Hz。因此，Cel7A 在木质素上起始的快速吸附主要由于其吸附域（CBD）发生作用。研究发现 CBD 的三个芳香族酪氨酸残基可通过疏水相互作用与木质素连接<sup>[29]</sup>。此外，木质素的组成和结构不同，与酶的亲和力也不同。蒸汽爆破（SE）处理使得木质素中酚羟基增加，酶吸附增多<sup>[29]</sup>；羧基增加使得木质素更亲水，因此酶吸附量减小<sup>[100, 101]</sup>；木质素中紫丁香/愈创木单体比例越少，纤维素酶在木质素上吸附越多<sup>[102]</sup>；降低木质素表面的粗糙度，增加润湿性，酶吸附变少<sup>[93]</sup>；木质素上离子化基团可使酶吸附量随着 pH 值增大而下降<sup>[103]</sup>。

木质素是化学多相聚合物，因此不同位点上的结合行为也不同。Cel7B 在木质素表面的吸附更符合两点转换模型<sup>[104]</sup>，即：内切酶以两个不同的速率吸附在木质素薄膜上多个不同的位点，之后蛋白会脱附或者不可逆结合在木质素表面，示意如图 1-6 所示。

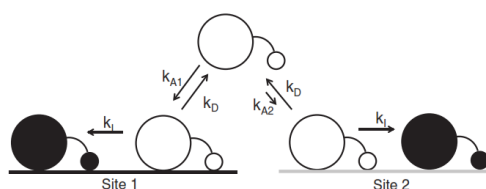


图 1-6 内切纤维素酶 Cel7B 的两点转换模型<sup>[99]</sup>。Cel7B 能通过不同吸附速率可逆吸附到两个位点。

Fig. 1-6 Two-site transition model of Cel7B. It can adsorb reversibly with two different adsorption rates to two distinct surface sites. <sup>[99]</sup>

### 1.4.3 纤维素酶在木质纤维素薄膜上吸附分析

在木质纤维素薄膜中，当纤维素含量越高，外切纤维素酶吸附量就越多<sup>[89]</sup>。而内切纤维素酶则对木质素有更强的亲和力，因此，当木质纤维素薄膜中木质素含量增加，内切纤维素酶的吸附量也增加<sup>[89]</sup>。



1.5 纤维素酶酶解行为分析

QCM-D 可用于研究纤维素酶在木质纤维素膜上的催化过程，实时监测纤维素酶在木质纤维素膜上的吸附和纤维素的酶解，并可进一步研究纤维素酶解动力学。表 1-2 总结了近年来应用 QCM-D 分析木质纤维素酶解行为的研究进展。

表 1-2 纤维素酶的吸附与水解行为分析

Tab. 1-2 Analysis of Adsorption and Hydrolysis of Cellulases			
酶-底物	过程	主要结论	参考文献
CBH-I-纤维素	吸附和脱附	Cel7A 浓度越大，在纤维素表面吸附量越多。洗脱后，相当大一部分酶保持不可逆结合。	[75]
CBH-I-纤维素	水解	首先，酶在表面快速水解，随后渗透到薄膜内部酶解。	[89]
EG-纤维素	吸附和脱附	Cel7B 浓度越高，在纤维素表面吸附越多。缓冲溶液只能洗脱部分酶。	[75]
EG-纤维素	水解	EG 在纤维素薄膜表面酶解，不会渗透到膜内部。	[89]
CBH-I-木质素	吸附和脱附	Cel7A 在木质素薄膜上的吸附经历了两个阶段，起始快速吸附，之后缓慢连接。	[29]
EG-木质素	吸附	Cel7B 以两个不同的速度吸附到木质素表面的两个不同位点，之后脱附或者不可逆吸附。	[104]
CBH-I-木质纤维素	吸附	CBH-I 在纤维素含量高的木质纤维素薄膜上吸附更多	[89]
CBH-I-纤维素	水解	薄膜中木质素含量越高，水解程度越小	[89]
EG-木质纤维素	吸附和水解	薄膜中木质素含量越高，EG 吸附越多，水解效率越低。	[89]

Martin-Sampedro 等<sup>[89]</sup>指出，在纤维素薄膜表面，外切纤维素酶首先进行吸附，使其薄膜粘弹性增加，再开始水解薄膜，使薄膜逐渐变薄。随后，外切纤维素酶进一步扩散到薄膜内部，QCM-D 耗散值增加到最大值。随着外切纤维素酶的进一步作用，使纤维素链长缩短，膜变致密，耗散值开始下降。与外切纤维素酶不同，内切纤维素酶作用初期主要以水解为主，随后才逐渐表现为吸附<sup>[89, 105]</sup>。

在木质素薄膜表面,外切与内切纤维素酶主要通过疏水相互作用进行不可逆吸附。与外切纤维素酶具有隧道形的活性位点相比,内切纤维素酶含有更开放的结合位点,因此表现出对木质素具有更强的亲和力<sup>[106]</sup>。

在木质纤维素薄膜表面,当纤维素含量越高,外切纤维素酶吸附量越多,并在吸附过程中伴随着水解。内切纤维素酶作用于纤维素链内部产生纤维糊精,而外切纤维素酶则作用于还原性末端,从链端切纤维二糖单元,两者协同水解纤维素。但是由于木质素的存在,纤维素酶无效吸附,因此水解效率下降<sup>[89]</sup>。

## 1.6 本文研究内容

偏高的纤维素酶成本和乙醇浓缩成本是阻碍纤维素乙醇商业应用的主要原因。为了制定纤维素酶的有效回收策略,指导强化酶解效率的复配酶制剂的设计,本文利用 QCM-D 考察纤维素与纤维素酶之间的吸附、水解、脱附行为。主要内容如下:

1. 利用旋涂法制备纤维素薄膜,并利用表面角接触仪、原子力显微镜对膜结构进行表征;
2. 利用 QCM-D 研究了两种纤维素酶 Cel7A、Cel7B 在各种情况下(不加酶解抑制剂、加入不同浓度的酶解抑制剂)在纤维素薄膜上的吸附与水解行为;
3. 研究 pH 对纤维素酶 Cel7A、Cel7B 在纯纤维素底物上的吸/脱附行为的影响规律;
4. 采用 QCM-D 研究了两种单组份的纤维素酶浓度改变时以及不同的吸附时间下,它们在纤维素薄膜表面上可逆吸附、不可逆吸附、脱附历程;同时,构建两种单组份酶在纤维素薄膜上吸附的动力学模型。

## 第二章 pH 与酶解抑制剂调控纤维素酶吸附行为研究

木质纤维素高效酶解的一个重要前提是纤维素酶有效吸附<sup>[107, 108]</sup>。因此，明确纤维素酶吸附与反应的调控途径，制定有效的酶回收策略对降低纤维素酶使用成本至关重要。QCM-D 提供了一种实时定量的表征方法，通过改变各种反应条件，在界面上实时跟踪纤维素酶的吸附与反应行为变化规律，将使我们深入认识酶与底物之间相互作用的机制，从而实现对非均相酶解工艺和酶吸附回收的有效调控。

酶的吸附与催化反应需要适宜的 pH、温度等条件。不同的 pH 值可能会改变酶的构象，从而影响酶在底物上的吸附与催化行为。目前，已经有研究人员借助传统的分析方法，通过测定反应后液相游离酶的含量，得出结论：酸性 pH (< 4.8) 有利于纤维素酶的吸附，中性和碱性 pH 有利于脱附<sup>[109]</sup>。然而，纤维素酶解界面的微观吸附反应机制仍有待研究。

纤维素酶在底物上的吸附、反应、脱附行为同时进行。为了研究纤维素酶在纤维素薄膜上的吸附动力学，需要排除纤维素酶与底物络合、反应的行为。研究发现纤维素酶会因酶促反应的产物和类似底物的某些物质引起竞争性抑制，常见的竞争性抑制剂有纤维二糖、葡萄糖和甲基纤维素。这些抑制剂的使用不会影响纤维素酶在纤维素薄膜上的吸附行为。

本章考察了不同种类、浓度的纤维素酶抑制剂对酶解反应的抑制行为，旨在选择适宜的抑制剂抑制催化反应，排除酶与底物络合、反应的影响，方便观察酶在底物上的吸附行为。此外，本章借助 QCM-D 定量研究两种单组份纤维素酶纤维素酶 (Cel7A、Cel7B) 在纤维素膜固/液界面的吸附，并实时考察不同 pH 值的缓冲溶液对纤维素酶吸附、脱附的影响规律。

### 2.1 实验材料

本章用到的实验试剂如下：

微晶纤维素 (Avicel PH-101, 作为纤维素酶吸附和水解的纯纤维素底物)、N-甲基吗啉-N-氧化物 (4MMO, 用于溶解纤维素)、聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDADMAC, 20% w/w) 均购自 Sigma 公司 (美国)；

纤维素酶: Cel7A (CBH-I, MW 65000 Da, 浓度为 10000 ppm, CMC 酶活 0.1 U/mg)、Cel7B (E-CELTR, MW 57000 Da, 浓度为 9400 ppm, CMC 酶活 70 U/mg), 两种酶均属于长枝木霉属 (*Trichoderma longibrachiatum*)。购自爱尔兰 Megazyme 公司;

葡萄糖、纤维二糖, 色谱纯, 购自 Sigma 公司;

二甲基亚砷 (DMSO)、氨水、双氧水、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、柠檬酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠, 十二烷基磺酸钠 (SDS) 分析纯, 市售。

本实验过程中常用仪器及耗材如表 2-1 所示。

表 2-1 实验用仪器及耗材

Tab. 2-1 Experimental equipments and materials

仪器名称	型号/规格	出厂单位
紫外臭氧清洗仪	OES-1000D	美国 NOVASCAN
旋涂涂覆仪	Spin150-v3-NPP	瑞典 Biolin 科技有限公司
QCM-D	Q-sense E1	Biolin Scientific AB
超纯水仪	Sartorius Arium comfort I 型	德国 SARTORIUS 公司
磁力搅拌小型恒温水浴槽	DF-101S	山东华鲁电热仪器
油浴	90-1	上海沪西
pH 计	pH 610 台式酸度计	德国 Trans-Wiggens 公司
电子天平	BT125D	德国 SARTORIUS 公司
超声波清洗仪	KQ-250E	昆山市超声仪器有限公司
接触角测量仪	OCA15EC	德国 dataphysics 仪器公司
原子力显微镜	AFM 5500	美国 Agilent 公司
石英晶体芯片	QSX301	Biolin Scientific AB

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 芯片清洗与修饰

石英晶体芯片在紫外臭氧清洗仪中清洗 10 min, 去除表面的有机质。将超纯水、氨水 (25% w/w)、双氧水 (30% w/w) 按体积比 5:1:1 配置成溶液, 并加热混合溶液到 75 °C, 随后将芯片放入溶液中, 氨水促进双氧水释放强氧化作用的

原子态的氧，将芯片表面的有机质氧化降解。5 min 后取出石英晶体芯片，用超纯水反复清洗，之后用氮气流将液体从芯片表面吹走，最后用紫外臭氧清洗仪清洗 10 min，在活性氧原子的作用下彻底清除粘附在芯片表面的有机污染物，同时在芯片上修饰羟基。

将石英晶体芯片置于 PDACMAC (0.5% w/w) 溶液中浸泡 30 min，在芯片表面修饰一层阳离子电解质，使得芯片表面更亲水，便于纤维素粘附在芯片表面，再在超纯水中浸泡 15 min，以去除未修饰的 PDADMAC，用超纯水反复冲洗，氮气吹干，-4 °C 下储存，备用。

### 2.2.2 纤维素薄膜制备

利用 *N*-甲基吗啉-*N*-氧化物的强极性使微晶纤维素溶解，具体操作如下：称取 2.64 g 4MMO，加 0.66 mL 超纯水，在 85 °C 下溶解至形成淡黄色均一透明的溶液。升高温度至 105 °C，加 105 mg 微晶纤维素，搅拌反应 1 h，直至形成棕色均一的溶液。注意实验过程中温度不能超过 120 °C，温度过高，纤维素会降解形成棕黑色溶液。随后降低温度至 80 °C，加 7.5 mL DMSO，并搅拌均匀，降低溶液黏度，防止黏度过高造成旋涂后的纤维素薄膜过厚，影响 QCM-D 检测，一般认为纤维素终浓度为 0.5% (w/w) 时，旋涂后的纤维素薄膜易于检测。将纤维素溶液冷却至室温，备用。

采用旋转涂膜的方式制备纤维素薄膜。打开旋涂仪，抽真空，通氮气作为保护气。取 200  $\mu$ L 纤维素溶液，滴加至修饰有 PDADMAC 的石英晶体芯片正面中心部位，设置转速 5000 rpm 下旋涂 1 min，4000 rpm 干燥 30 s。纤维素溶液在强离心力下径向流动，随着溶剂的蒸发，纤维素沉积在芯片表面，形成均一的薄膜。旋涂好的芯片在超纯水中过夜浸泡，去除未溶解的 4MMO 和 DMSO，用氮气吹干。

### 2.2.3 静态接触角测试

将涂覆有纤维素薄膜的芯片放入 QCM-D 流通模块中，通入含 25 ppm Cel7A 和 6000 ppm 的葡萄糖的磷酸二氢钠缓冲溶液 15 min，再通不含酶的缓冲溶液 30 min，取出芯片，超纯水清洗，氮气吹干，得到 Cel7A 处理后的芯片 (Cel7A-treated)；更换涂覆有纤维素薄膜的芯片，通入含 25 ppm Cel7B 和 3000 ppm 的纤维二糖的磷酸二氢钠缓冲溶液 15 min，再通不含酶的缓冲溶液 30 min，取出芯片，超纯水清洗，氮气吹干，得到 Cel7B 处理后的芯片 (Cel7B-treated)。

将干燥的石英晶体芯片 (Gold-coated)、纤维素涂覆的芯片 (Cellulose-coated)，和上述 Cel7A 和 Cel7B 处理后的四类芯片用超纯水冲洗，氮气吹干。用 OCA15

接触角测量仪，在一个大气压和 50%空气湿度条件下，用微量注射器压出 2  $\mu\text{L}$  超纯水，旋转载物台底座的旋钮使载物台慢慢上升，触碰悬挂在注射器下端的液滴，下降，使液滴留在样品表面。待其在空气中平衡 1 min 左右，选取基线，检测液滴的外形轮廓，由 SCA20 软件程序计算得到接触角。对于每个样品，在 3 个分离点分别读数，并求出接触角的平均值。

#### 2.2.4 纤维素薄膜表面形貌表征

用原子力显微镜表征石英晶体芯片（Gold-coated）、纤维素涂覆的芯片（Cellulose-coated）、Cel7A 和 Cel7B 处理后（Cel7A-treated、Cel7B-treated）的四类芯片的表面微观形貌。其中，探针型号为 PointProbe® Plus。使用轻敲模式，扫描速度为 0.8 nm/s。观察金膜表面及其修饰层的厚度和粗糙度。

#### 2.2.5 QCM-D 检测酶解抑制剂对纤维素酶吸附的影响

用于检测酶解抑制剂对酶吸附影响的流动相和酶溶液：9.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=5.52) 中加葡萄糖、纤维二糖，使得其终浓度为 0、3000、6000、12000 ppm。用上述流动相稀释 Cel7A、Cel7B 至浓度分别为 50 ppm、25 ppm。将流动相与酶溶液超声脱气处理，-4  $^{\circ}\text{C}$  储存，备用。

将有纤维素涂覆的芯片放置于 QCM-D 流通模块的 O 圈上，用镊子夹芯片边缘石英晶体部分，避免破坏纤维素薄膜和芯片上的电极。此外，注意箭型电极的放置与模块中凹槽在一条直线上。打开电源按钮开启电子单元，同时打开 QSoft 操作软件，设置温度稳定至 25  $^{\circ}\text{C}$  时，测芯片在空气中的基频并记录，若第 1 倍频下的频率值  $F_1$  在 4.9-5.0 MHz 之间，且高倍频下频率值如  $F_9$ 、 $F_{11}$ 、 $F_{13}$  能被检测到，说明芯片表面修饰良好，可用于 QCM-D 检测。按流通模块上标示的方向连接进样管、出样管和与实验流动相相容的泵管，注意整个体系的气密性。之后打开蠕动泵，通流动相（流速为 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ），待基线稳定后（30 min 内频率漂移不超过 1 Hz），通入酶溶液，观察酶在纤维素薄膜表面的吸附行为。若基线不稳定，则可能是由于芯片表面薄膜修饰不够牢固，需要重新更换芯片进行试验。30 min 后，关闭蠕动泵，停止纤维素酶的加入，观察酶在纤维素表面的反应行为。实验结束后，通 0.5% SDS 清洗流通模块，残留在流道中的纤维素酶变性与 SDS 结合形成易溶于水的复合物，之后用超纯水冲洗，最后通空气，吹干流通管路，取出芯片，拆下泵管。流通模块带电极的部分不能接触水和其他有机溶剂，除电极的其他部分需要用氮气吹干，或者在 30  $^{\circ}\text{C}$  下真空干燥箱中烘干。

### 2.2.6 QCM-D 检测 pH 值对酶吸附/脱附的影响

用于检测 pH 对酶吸附影响的流动相和酶溶液：配置 10 mM 柠檬酸/柠檬酸钠（pH=3、4、4.8）、磷酸二氢钠/磷酸氢二钠（pH=7、8）、碳酸钠/碳酸氢钠（pH=9、10）的缓冲溶液，加入酶抑制剂。用上述流动相稀释 Cel7A、Cel7B 至浓度分别为 100 ppm、50 ppm。将流动相与酶溶液超声脱气处理，-4 °C 储存，备用。

将有纤维素涂覆的芯片放置于 QCM-D 流通模块中，待温度稳定至 25 °C 时，测芯片在空气中的基频，若芯片修饰适当，则打开蠕动泵，通流动相（流速为 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ），待基线稳定后（30 min 内频率变化不超过 1 Hz），通入酶溶液，观察酶在纤维素薄膜表面的吸附行为。30 min 后，关闭蠕动泵，擦干进样管上的溶液，并将其放入缓冲溶液中，打开蠕动泵，开始检测直至频率 F 不变，此时纤维素薄膜上达到吸附/脱附平衡，D 值也保持稳定。观察酶在纤维素表面的脱附行为。实验结束后清洗整个流通模块和管路。在切换溶液中容易引入气泡，可以使蠕动泵反向流动约 1 s，在进样管口形成一个凸液面。

### 2.2.7 起始吸附速率的计算

纤维素酶刚接触纤维素薄膜表面时，经历了快速吸附的过程，酶的吸附速率远远大于络合、脱附的速率，本文以吸附曲线上  $t < 2\text{min}$  的数据为依据，认为这段时间只进行吸附过程，进行线性拟合（以 Cel7A 在含 6000 ppm 葡萄糖缓冲溶液中起始吸附速率的计算为例，图 2-1），得出的斜率值即为起始吸附速率，如表 2-2。

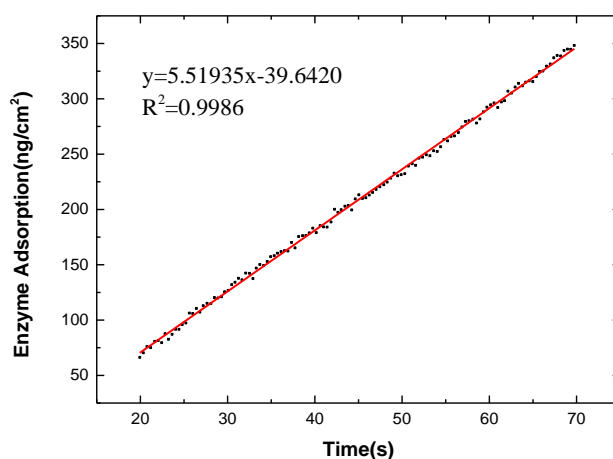


图 2-1 起始吸附速率的计算

Fig. 2-1 Caculation of initial adsorption rate ( $t < 2\text{min}$ ). *T. longibrachiatum* Cel7A with 6000 ppm glucose in aqueous buffer at 25 °C.

表 2-2 起始吸附速率（单位： $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）

Tab. 2-2 Initial adsorption rate of cellulase under different inhibitor

酶种类	葡萄糖浓度/ppm				纤维二糖浓度/ppm			
	0	3000	6000	12000	0	3000	6000	12000
Cel7A	3.821	4.656	5.519	4.450	3.750	5.294	4.889	5.539
Cel7B	5.872	5.853	5.385	4.618	5.794	4.600	3.653	2.732

## 2.3 结论与分析

### 2.3.1 纤维素薄膜表面亲疏水性质和形貌表征

为了表征芯片表面的亲疏水性，我们首先分别测试了 Gold-coated、Cellulose-coated、Cel7A-treated、Cel7B-treated 四类芯片表面在室温下的静态接触角。如图 2-2 所示，由于表面涂覆了一层金膜，未经处理的石英晶体芯片疏水性最强，静态接触角约为  $75^\circ$ 。旋涂纤维素后，表面接触角大大降低，降为  $18^\circ$ （表 2-3），比文献报道要稍小一些<sup>[77]</sup>，说明纤维素的羟基使得薄膜表面亲水性大大加强。用 Cel7A 和 Cel7B 两种纤维素酶处理后，两种薄膜的接触角有所增大，这可能是由于两种酶的吸附使得纤维素链疏解，用缓冲溶液洗脱后，还有部分纤维素酶不可逆吸附在纤维素上，使得薄膜疏水性增强。

表 2-3 Gold-coated、Cellulose-coated、Cel7A-treated、Cel7B-treated 四类芯片静态接触角

Tab. 2-3 Static water contact angles of the Gold-coated, Cellulose-coated、Cel7A-treated、Cel7B-treated surface

测试点	静态接触角 ( $^\circ$ )			
	Gold-coated	Cellulose-coated	Cel7A-treated	Cel7B-treated
1	74.9	18.8	27.2	30.4
2	74.9	18.6	27.2	29.3
3	74.9	18.3	27.5	29.2
平均值	$74.9 \pm 0$	$18.57 \pm 0.25$	$27.3 \pm 0.17$	$29.63 \pm 0.67$



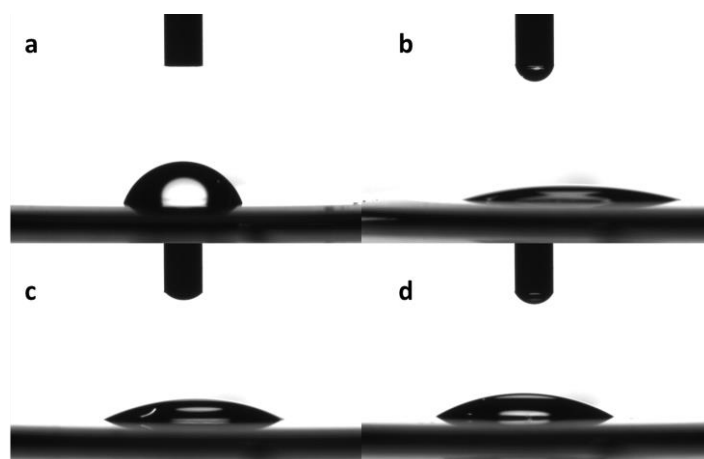


图 2-2 不同芯片的接触角图片：a. Gold-coated; b. Cellulose-coated; c. Cel7A-treated; d. Cel7B-treated

Fig. 2-2 Photographs and contact angles images of the Gold-coated (a), Cellulose-coated (b), Cel7A-treated (c), Cel7B-treated (d) surfaces

此外，用原子力显微镜进一步观察纤维素薄膜的微观形貌，如图 2-3 所示。未处理的石英晶体芯片表面金膜的厚度约为 100 nm，均方根（RMS）粗糙度为 103.1 nm。从图 2-3c 和图 2-3d 可以看出，纤维素薄膜表面有大小均一的突起均匀分布，说明实验条件下，纤维素薄膜涂覆较均匀。这些突起可能是由于氮气吹扫过程中，纤维素分子链因干燥收缩而聚集形成的。应用软件处理得到纤维素涂覆的芯片 RMS 粗糙度为 252.3 nm，高于金膜表面的粗糙度。用 Cel7A 和 Cel7B 处理后的纤维素薄膜，粗糙度均增大，分别为 579.9 nm 和 512.0 nm，纤维素薄膜在纤维素酶的作用下表面形态发生了显著变化。Cel7B 随机作用于糖苷键，在纤维素薄膜表面形成纤维素团簇，因而粗糙度较低，相对于 Cel7A 处理后的薄膜，表面更平整一些。

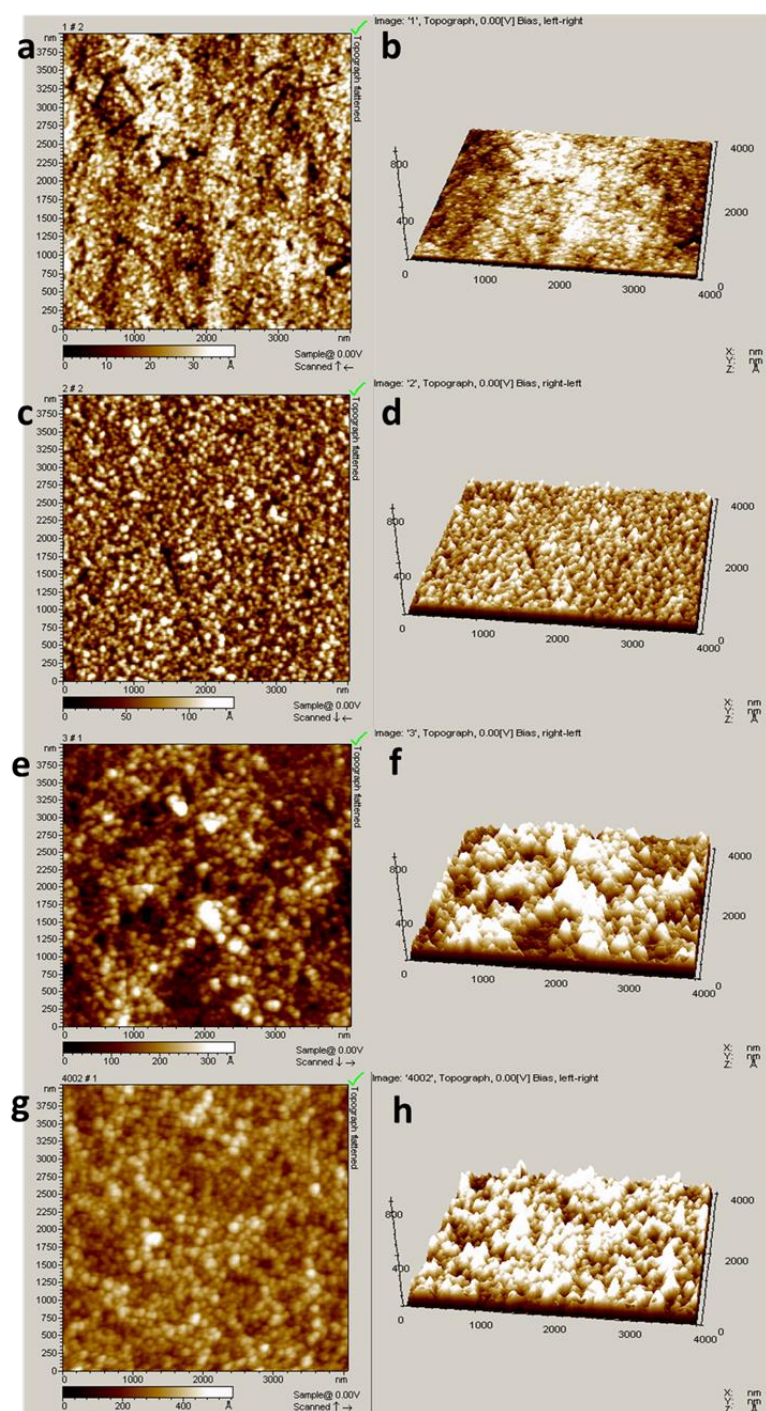


图 2-3 芯片的原子力显微镜二维及对应的三维图

Fig. 2-3 The flattened and topographic AFM images of Gold-coated (a-b) and Cellulose-coated surface in the dry state (c-d) and the Cel7A-treated surface in the dry state (e-f) and Cel7B-treated surface in the dry state.

## 2.3.2 QCM-D 频率与耗散值变化

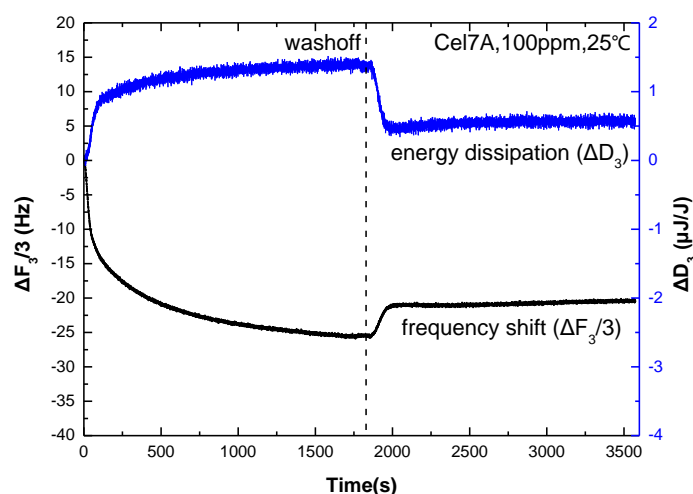


图 2-4 Cel7A 在纤维素薄膜上吸附/脱附曲线

Fig. 2-4 Typical frequency shift ( $\Delta F$ , black line) and dissipation ( $\Delta D$ , blue line) histories for an enzyme loading/washoff experiment. Data were measured for the third overtone of a Q-Sense QCM operating at 5 MHz. The washoff after 30 min is indicated by a vertical dashed line. *T. longibrachiatum* Cel7A (100 ppm) with 6000 ppm glucose in aqueous buffer at 25°C.

图 2-4 是用 QCM-D 检测的纤维素酶 Cel7A (100 ppm) 在纤维素薄膜上吸附/脱附行为引起频率  $F$  和耗散值  $D$  变化的典型曲线, 整个实验在 25 °C 下进行。图中选用了第 3 倍频的频率变化值 ( $\Delta F_3$ ) 和能量耗散变化值 ( $\Delta D_3$ )。倍频  $n$  不同表示芯片上检测位置不同。例如第 1 倍频检测芯片边缘的位置, 因而频率和耗散值漂移比较大, 依此, 高倍频下检测的位置靠近芯片中心。一般认为第三、五、七倍频下检测信号比较稳定。因此, 数据分析中选择  $n = 3, 5, 7$  的频率和耗散值作为计算依据。Cel7A 的吸附导致薄膜上质量增加, 频率值  $F$  下降。30 min 后, 通入含 6000 ppm 葡萄糖的磷酸二氢钠缓冲溶液,  $F$  上升, 表示 Cel7A 被洗脱。能量耗散值  $D$  反映薄膜粘弹性的变化, 吸附阶段由于蛋白的吸附使其粘弹性增加, 因而  $D$  上升, 而洗脱阶段由于蛋白洗脱暴露出坚硬的纤维素薄膜而刚性增加, 因而  $D$  下降。

本文中检测到的  $\Delta D/\Delta F$  均小于 5%, 适用于用 Sauerbrey 方程<sup>[66]</sup>求解质量变化。

$$\Delta m_f = -\frac{\rho_q h_q}{n f_0} \Delta f = -C \Delta f \quad (2.1)$$

式中,  $\Delta m_f = \Delta M_f / A_q$  为单位面积的质量变化, 即面密度变化;  $A_q$  为石英晶体表面积, 本文中芯片的工作面积约为  $0.2 \text{ cm}^2$ ;  $\rho_q$  为石英晶体的密度, 为  $2.648 \text{ g/cm}^3$ ;  $h_q$  为石英晶体厚度;  $n$  为倍频;  $f_0$  为基频;  $\Delta f$  为频率变化;  $C = \rho_q h_q / n f_0$ , 当石英晶体的厚度确定时,  $C$  为常数, 为  $17.7 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ 。因此, 薄膜上质量的变化与频率的变化呈线性关系。

本文中, 使用 Q-sense E1 仪器自带的 QTools v3.0.17 软件, 用第三倍频下的  $F_3$  和  $D_3$  分别计算薄膜上吸附的质量和观察薄膜粘弹性变化。

### 2.3.3 酶解抑制剂调控 Cel7A 吸附过程

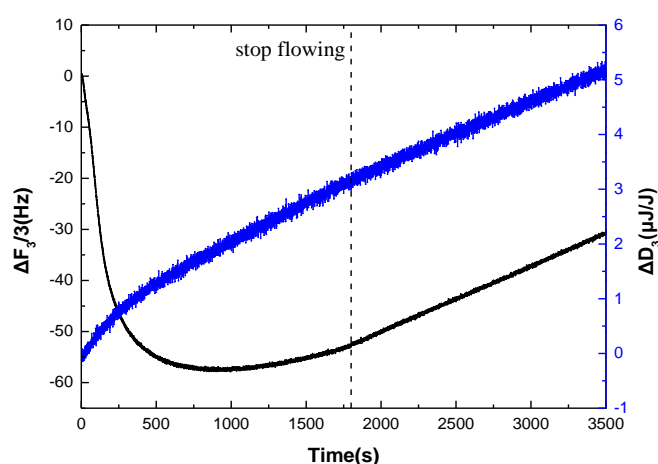


图 2-5 不添加酶解抑制剂时, Cel7A 的频率耗散值变化

Fig. 2-5 The change of frequency shift and dissipation for *T. longibrachiatum* Cel7A, measured in the absence of inhibitor. The enzyme solution was stopped after 30 min, which is indicated by a vertical dashed line.

如图 2-5 所示, 当流动相中不添加纤维素酶抑制剂时, 纤维素酶在纤维素表面将同时进行吸附、水解、脱附的行为。根据 Sauerbrey 方程可知, 薄膜表面质量变化与频率值  $F$  变化呈负相关关系。因而, 纤维素酶在纤维素薄膜表面的吸附使得检测到的质量增加, 引起  $F$  值的下降, 水解和脱附则使  $F$  值上升。在前 800 s,  $F$  值快速下降, 说明薄膜质量迅速增加, 此时纤维素酶主要表现为吸附作用; 随后,  $F$  值缓慢上升, 薄膜质量减小, 水解占主要作用; 1800 s 后, 停止通入酶溶液, 纤维素膜在膜表面留存的 Cel7A 的作用下水解, 薄膜质量减小,  $F$  值增加。耗散值  $D$  反映薄膜粘弹性的变化。800 s 前, 由于蛋白的吸附, 膜的粘弹性增加,  $D$  值快速增加; 800 s 后, Cel7A 从纤维素链还原性末端水解, 引起纤维素链的疏解, 水分子进入链内部使得纤维素吸水溶胀, 因而引起膜的刚性降低,  $D$  值增加。

有文献报道, 如果延长水解时间, 耗散值会到达一个峰值, 之后随着纤维素链水解成为纤维素团簇, 耗散值下降<sup>[51, 98]</sup>。

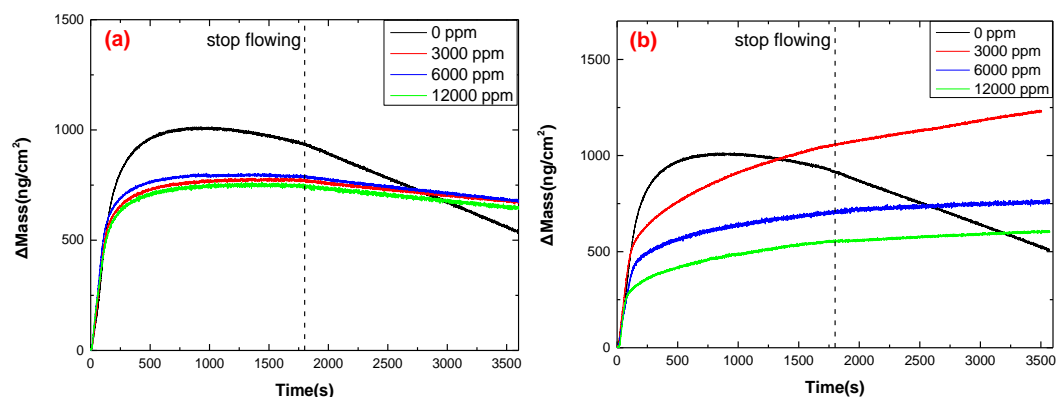


图 2-6 不同浓度酶解抑制剂对 Cel7A 在纤维素薄膜上吸附的影响。(a) 葡萄糖; (b) 纤维二糖

Fig. 2-6 Adsorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7A on a model cellulose film. Cel7A (50 ppm) with glucose (a) or cellobiose (b) of different concentrations in aqueous buffer at 25°C. The enzyme solution was stopped after 30 min, which is indicated by a vertical dashed line.

葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶的抑制机理都属于产物抑制。加入葡萄糖不仅能抑制酶的水解, 而且能抑制酶和纤维素的络合<sup>[110, 111]</sup>。为了排除 QCM-D 检测中水解和络合的影响, 只观察酶在纤维素薄膜上的吸附行为, 本章研究了不同的种类和浓度的纤维素酶抑制剂对酶解的影响。如图 2-6a 所示, 虚线表示在该点停止通入酶溶液。对于 Cel7A, 加入葡萄糖后能明显抑制纤维素酶的水解, 改变葡萄糖浓度对酶吸附量影响不大。甚至在加大葡萄糖浓度到 12000 ppm 后, 纤维素酶的吸附量会微弱下降。30 min 后, 吸附在薄膜上的酶水解引起薄膜质量的轻微下降。纤维二糖对 Cel7A 的酶解抑制效果如图 2-6b 所示, 纤维二糖的浓度从 3000 ppm 变为 12000 ppm 后, 酶吸附量下降, 但是 30 min 后, 薄膜质量并未降低, 反而升高, 说明纤维二糖对酶水解的抑制效果很明显, 30 min 后仍有纤维素酶在吸附, 此时薄膜的粘弹性增加, 引起能量耗散不断增多。主要是由于 Cel7A 作为一种外切纤维素酶, 从纤维素链的还原端切断纤维二糖单元, 纤维二糖是其水解的直接产物, 因此抑制酶解效果更突出。加 6000 ppm 葡萄糖后引起的吸附量的变化与不加抑制剂时的吸附量最相近, 而且考虑到纤维二糖价格昂贵, 综合文献报道<sup>[99, 110]</sup>, 选择 6000 ppm 葡萄糖作为 Cel7A 的酶解抑制剂。



### 2.3.4 纤维素酶抑制剂调控 Cel7B 吸附

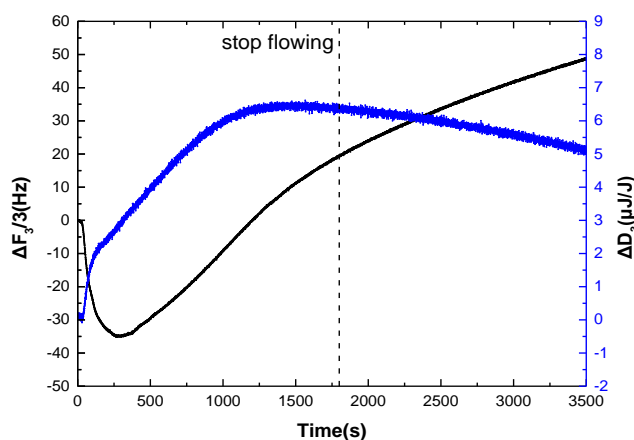


图 2-7 不添加酶解抑制剂时，Cel7B 的频率耗散值变化

Fig. 2-7 The change in frequency and dissipation for *T. longibrachiatum* Cel7B, measured in the absence of inhibitor. The enzyme solution was stopped after 30min, which is indicated by a vertical dashed line.

图 2-7 为流动相中不加酶解抑制剂时，Cel7B 在纤维素薄膜表面作用引起频率和耗散值的变化图。在起始阶段，Cel7B 在纤维素膜表面的吸附占主要作用，薄膜表面质量的增加使得  $F$  下降，蛋白的吸附又会使膜表面粘弹性增加， $D$  上升。也有文献报道，内切酶在纤维素薄膜表面首先表现为水解作用引起  $F$  的上升 [89, 105]，这跟内切纤维素酶浓度有关，浓度很高时，吸附在薄膜上的纤维素酶快速水解使得薄膜质量减小。300 s 后，纤维素被酶解，薄膜质量减小，并逐渐变薄， $D$  值上升速度减慢。值得注意的是，1200 s 时， $F$  为 0，此时  $D$  也开始下降。此时水解的纤维素与吸附的酶质量相等，纤维素薄膜粘弹性达到最大值；1800 s 时，停止通入酶溶液，但纤维素薄膜上仍吸附有 Cel7B，内切酶随机剪切  $\beta$ -1,4-糖苷键，将长链纤维素分子截短，切短的纤维素链仍留在纤维素表面（聚合度大于 7 的纤维素是不溶的），阻止内切酶对内层纤维素分子进一步酶解，薄膜刚性增加，耗散值下降。

Cel7A 在 800 s 时达到吸附最大值，Cel7B 则在 300 s 时快速吸附，说明 Cel7B 在纤维素薄膜上的吸附速率更大，表 2-2 中起始吸附速率的计算也证实了实验现象。这可能是由于 Cel7B 可随机吸附在纤维素链的任意位置，而 Cel7A 则倾向于吸附在纤维素链的两端，再开始水解。这种吸附行为与两种酶 CBD 和整个酶分子的几何结构和形态有关。

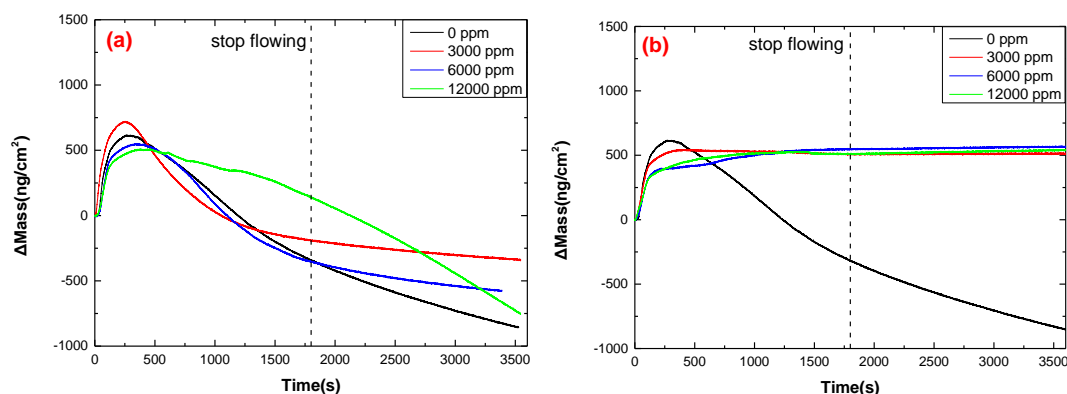


图 2-8 不同浓度的酶解抑制剂对 Cel7B 在纤维素薄膜上吸附的影响。(a) 葡萄糖；(b) 纤维二糖

Fig. 2-8 Adsorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7B on a model cellulose film. Cel7B (25 ppm) with glucose (a) or cellobiose (b) of different concentrations in aqueous buffer at 25 °C. The enzyme solution was stopped after 30 min, which is indicated by a vertical dashed line.

葡萄糖对 Cel7B 的抑制效果如图 2-8a 所示。从图中可以看出，葡萄糖的抑制作用很差，低浓度的葡萄糖（3000、6000 ppm）对 Cel7B 的水解反应几乎无抑制作用，当升高葡萄糖浓度为 12000 ppm 时，能微弱延长吸附时间，但是 30 min 后，纤维素在其上吸附的 Cel7B 的作用下快速水解，表现为薄膜的质量不断下降，用 QCM-D 检测到的 D 值不断下降，薄膜刚性增加。纤维二糖则对 Cel7B 的水解有显著的抑制作用。如图 2-8b，350 s 时，在加入 3000 ppm 的纤维二糖的反应体系中，薄膜上吸附的酶质量约为 540  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ，1 h 后，仍有约 533  $\text{ng}/\text{cm}^2$  的 Cel7B 吸附在薄膜上。6000、12000 ppm 的纤维二糖对酶解抑制效果与 3000 ppm 的抑制效果相似。此外，从表 2-2 可以看出，3000 ppm 的纤维二糖对 Cel7B 的起始吸附速率影响不大，而 6000 ppm、12000 ppm 的纤维二糖则会降低酶的起始吸附速率。不加抑制剂时，Cel7B 的最大吸附量为 612  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ，而 3000 ppm 纤维二糖的存在使得最大吸附量略微下降，为 540  $\text{ng}/\text{cm}^2$ 。综上，选用 3000 ppm 的纤维二糖做 Cel7B 的酶解抑制剂。

表 2-2 说明，抑制剂的加入会影响起始吸附速率，这与文献报道有所区别<sup>[75]</sup>。Cel7B 和 Cel7A 相比，吸附速率更快，可能是由于内切酶的活性中心呈开放的槽状结构，而 CBH-I 的活性中心则呈封闭的隧道状结构<sup>[106]</sup>。这也与内切酶的内切方式和外切酶的外切方式是一样的，外切酶的封闭隧道结构使得酶解只能从两端进行。

## 2.3.5 pH 调控纤维素酶在纤维素薄膜上的行为

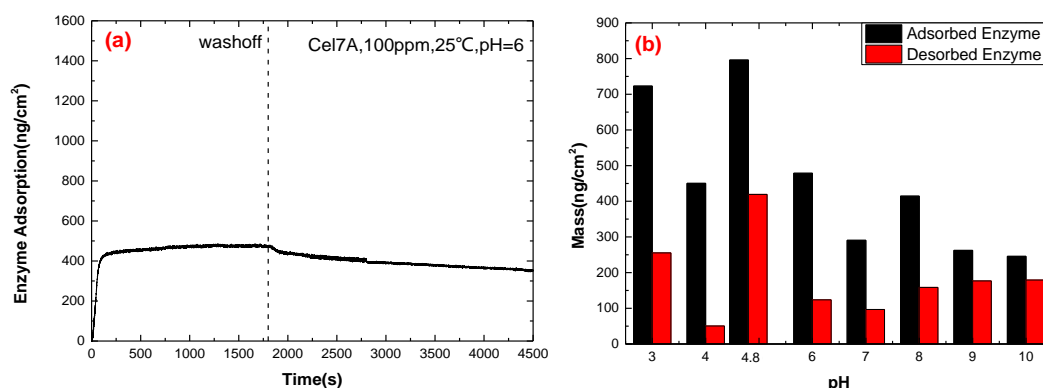


图 2-9 (a) Cel7A 在 pH = 6 的环境中的吸/脱附历程; (b) 不同 pH 值下 Cel7A 的吸附、脱附能力

Fig. 2-9 (a) Loading/washoff histories for *T. longibrachiatum* Cel7A on a model cellulose film. The washoff after 30 min is indicated by a vertical dashed line. Cel7A (100 ppm) with glucose (6000 ppm) in aqueous buffer (pH = 6) at 25 °C; (b) Adsorbed and desorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7A on a model cellulose film with different pH values at 25°C.

不同的 pH 值可能会改变酶的构象, 从而影响酶在底物上的酶解行为。文献报道在两种纤维素底物 (Solka Floc 和 Avicel) 上改变环境 pH, 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 属纤维素酶的吸附行为也会发生改变<sup>[112, 113]</sup>。将 QCM-D 观察测出 25 °C 下 Cel7A 在一定 pH 值的缓冲溶液中频率值随时间变化用 QTools 换算成质量随时间变化曲线 (以 pH = 6 为例, 图 2-9a)。不同 pH 下 Cel7A 的吸附、脱附质量如图 2-9b 所示。在纯纤维素底物 Avicel 上, 当 pH = 4.8 时, 吸附量最大, 为 795.8 ng/cm²。当 pH 降到 3 时, Cel7A 的吸附量略微下降到 723.0 ng/cm²; pH 从 4.8 上升到 10 时, 吸附量出现了大幅的下降, pH = 10 的吸附量仅为 245.8 ng/cm²。因而得出结论 pH ≤ 4.8 更有利于 Cel7A 在 Avicel 上的吸附。pH = 10 时, 有 179.5 ng/cm² 的纤维素酶被洗脱下来, 占吸附纤维素酶总量的 73.0%, pH = 9 时, 也有 67.4% 的纤维素酶脱附。但是, pH 降到 3、4 时, 脱附效果不甚明显, 分别有 64.7%、88.8% 的纤维素酶吸附在纯纤维素表面。纤维素酶的 CBM 区主要通过酪氨酸残基吸附在纤维素底物上<sup>[114, 115]</sup>, 然而, 吸附在纤维素上的蛋白可能会由于部分变性而不可逆连接<sup>[116]</sup>。不同 pH 下纤维素酶的构象不同, 碱性环境下酶的构象可能使得纤维素薄膜上不可逆吸附的酶减少, 脱附的酶量增加。



基于以上分析, 得出结论:  $\text{pH} \leq 4.8$  更有利于 Cel7A 在 Avicel 上的吸附。 $\text{pH} > 4.8$ , 尤其是碱性环境 ( $\text{pH} = 9$  和  $10$ ) 下更有利于脱附。这一结论与之前 Zhu 和 Du 的报道<sup>[109, 117]</sup>基本一致。

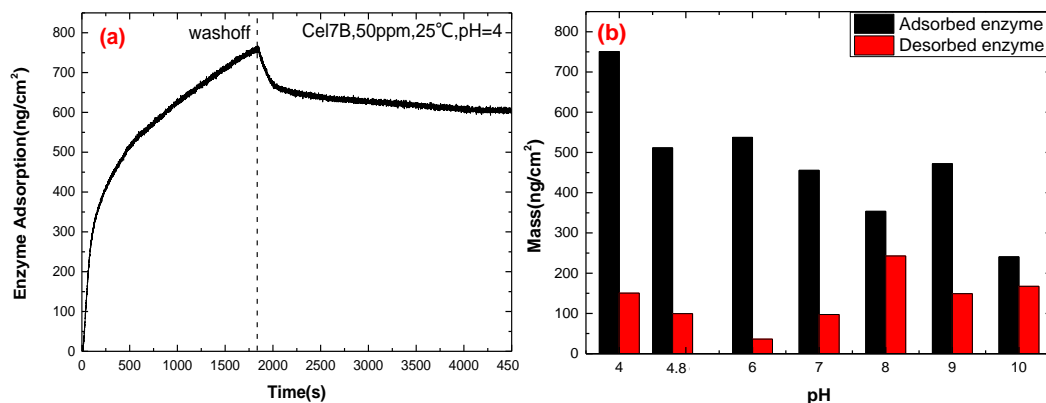


图 2-10 (a) Cel7B 在  $\text{pH} = 4$  的环境中的吸/脱附历程; (b) 不同 pH 值下 Cel7B 的吸附能力

Fig. 2-10 (a) Loding/washoff histories for *T. longibrachiatum* Cel7B on a model cellulose film.

The washoff after 30min is indicated by a vertical dashed line. Cel7B (50 ppm) with cellobiose (3000 ppm) in aqueous buffer ( $\text{pH}=4$ ) at  $25^\circ\text{C}$ ; (b) Adsorbed and desorbed amount for *T.*

*longibrachiatum* Cel7B on a model cellulose film with different pH values at  $25^\circ\text{C}$ .

不同 pH 下, Cel7B 在纯纤维素 Avicel 上的吸附如图 2-10 所示, 将 QCM-D 观察测出  $25^\circ\text{C}$  下 Cel7B 在一定 pH 值的缓冲溶液中频率值随时间变化用 QTools 换算成质量随时间变化曲线 (以  $\text{pH} = 4$  为例, 图 2-10a)。不同 pH 下 Cel7A 的吸附、脱附质量如图 2-10b 所示。在纯纤维素底物上, 当  $\text{pH} = 4, 4.8$  时, 纤维素酶吸附量分别为  $750.7, 511.4 \text{ ng/cm}^2$ 。pH 从 4 升到 10, 酶的吸附量下降到  $240.8 \text{ ng/cm}^2$ 。pH 升高不利于 Cel7B 的吸附, 因此, 和 Cel7A 一样,  $\text{pH} \leq 4.8$  更有利于 Cel7B 在 Avicel 上的吸附。pH 为 4 和 4.8 时, 洗脱下的 Cel7B 占吸附酶总量的百分比约为 20%, 而  $\text{pH} = 8, 10$  时, 分别有 68.7% 和 69.5% 的 Cel7B 被洗脱下来。说明碱性条件下, Cel7B 更易于从纤维素上脱附。如之前讨论,  $\text{pH} = 9, 10$  时, 纤维素底物上 Cel7A 的脱附量分别为 67.4% 和 73.0%, 与 Cel7B 的脱附量相似, 文献报道 Cel7A 与 Cel7B 的 CBD 结构相似<sup>[118]</sup>, 可能是由于碱性环境对两种酶的 CBD 构象的改变也相似, 这还需要通过蛋白拆分等方法分析酶蛋白 CBD 的三维结构进一步研究。

基于以上分析表明, 纤维素酶在纤维素上的吸/脱附可以通过改变环境 pH 来实现调控, 因而可以通过控制 pH 值实现纤维素酶的高效回收再利用。

## 2.4 本章小结

本章制备了纤维素薄膜，检测了薄膜的静态水接触角，并对薄膜表面形貌进行了表征。此外，利用 QCM-D 研究了两种纤维素酶 Cel7A、Cel7B 在不加酶解抑制剂时在纤维素薄膜上的行为，和不同种类、浓度抑制剂对两种酶吸附、酶解行为的影响；通过本章的实验研究证实了 pH 可以调控纤维素酶 Cel7A、Cel7B 在纯纤维素底物上的吸/脱附行为。主要结论如下：

1. 运用旋转涂膜法制备的纤维素薄膜具有很强的亲水性，表面均一平整牢固，适合运用 QCM-D 进行分析检测；
2. 在不加酶解抑制剂时，Cel7A、Cel7B 均会水解纤维素薄膜，表现出频率值  $F$  先下降再上升的趋势，但是由于两种酶作用机制不同，酶解引起薄膜粘弹性变化也不同，在 Cel7A 的作用下，耗散值  $D$  持续上升，而 Cel7B 引起耗散值先增加再减小；
3. 酶解抑制剂的加入会明显抑制纤维素酶的反应。综合考虑酶解抑制效果和经济成本，选择 6000 ppm 葡萄糖做 Cel7A 的酶解抑制剂，3000 ppm 纤维二糖作为 Cel7B 的酶解抑制剂；
4. 不同 pH 下纤维素酶的吸附行为呈现明显差异，对于 Cel7A，酸性 pH ( $\leq 4.8$ ) 更有利于吸附，而碱性 pH (特别是 pH=9 和 10) 更有利于脱附。和 Cel7A 一样，pH  $\leq 4.8$  更有利于 Cel7B 在 Avicel 上的吸附，碱性 pH 有利于脱附。

### 第三章 纤维素酶吸附行为动力学研究

由于纤维素具有结晶区和无定形区等复杂结构,其降解需要多种酶共同作用,形成一个复杂的酶体系。纤维素的水解需要外切纤维素酶、内切纤维素酶和葡萄糖苷酶的协同作用。然而,目前研究主要集中在混合纤维素酶水解过程研究,用于具体生产工艺的优化,而对于单组份纤维素酶的实时定量表征较少。

尽管纤维素酶的吸附与反应机理已得到较多的关注和研究,但大多是通过测试溶液中纤维素酶含量计算吸附的酶量,利用还原糖含量变化规律解析纤维素酶的反应机理,缺乏对固液界面,即固态的纤维素薄膜与液态的纤维素酶之间的实时跟踪的研究。

QCM-D 作为一种在线实时定量分析表界面行为的工具,具有灵敏度高、操作简单方便等优势。本章在 Langmuir 等温吸附方程的基础上,通过合理假设和简化,构建了两种纤维素酶 Cel7A、Cel7B 酶解过程的单酶拟稳态吸附动力学模型。通过改变两种酶浓度、吸附时间,在界面上实时跟踪纤维素酶的吸附与反应行为变化规律,明确两种酶在纤维素表面的吸附动力学,帮助人们深入认识酶与底物之间相互作用的机制,指导设计非均相酶解工艺中两种酶的复配比例、实现酶吸附回收的有效调控。

#### 3.1 实验仪器及试剂

实验材料如下:

微晶纤维素 (Avicel PH-101, 作为纯纤维素底物用于纤维素酶吸附)、*N*-甲基吗啉-*N*-氧化物 (4MMO, 溶解微晶纤维素)、聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDADMAC) 均购自 Sigma 公司 (美国);

纤维素酶: Cel7A (CBH-I, MW 65000 Da, 浓度为 10000 ppm, CMC 酶活 0.1 U/mg)、Cel7B (E-CELTR, MW 57000 Da, 浓度为 9400 ppm, CMC 酶活为 70 U/mg)。两种酶均为长枝木霉属,购自爱尔兰 Megazyme 公司;

葡萄糖、纤维二糖,色谱纯,购自 Sigma 公司;

DMSO、氨水、双氧水、磷酸二氢钠、SDS 分析纯,市售。

本实验过程中常用仪器及耗材如表 3-1 所示。

表 3-1 实验仪器及耗材

Tab. 3-1 Experimental equipments and materials

仪器名称	型号/规格	出厂单位
紫外臭氧清洗仪	OES-1000D	美国 NOVASCAN
旋涂涂覆仪	Spin150-v3-NPP	瑞典 Biolin 科技有限公司
QCM-D	Q-sense E1	瑞典 Biolin 科技有限公司
超纯水仪	Sartorius Arium comfort I 型	德国 SARTORIUS 公司
磁力搅拌小型恒温水浴槽	DF-101S	山东华鲁电热仪器
油浴	90-1	上海沪西
pH 计	pH 610 台式酸度计	德国 Trans-Wiggens 公司
电子天平	BT125D	德国 SARTORIUS 公司
超声波清洗仪	KQ-250E	昆山市超声仪器有限公司
接触角测量仪	OCA15EC	德国 dataphysics 仪器公司
原子力显微镜	AFM 5500	美国 Agilent 公司
石英晶体芯片	QSX301	瑞典 Biolin 科技有限公司

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 芯片清洗与修饰

石英晶体芯片用紫外臭氧清洗仪清洗 10 min，去除表面的有机质。将超纯水、氨水（25% w/w）、双氧水（30% w/w）按体积比 5:1:1 配置成溶液，将混合溶液加热到 75 °C，随后将芯片放入溶液中 5 min，取出芯片，用超纯水清洗，若芯片表面仍有肉眼可观察到的污染物，可以用 75% 的乙醇超声 10 min，用超纯水反复冲洗，氮气吹干，最后用紫外臭氧清洗仪清洗 10 min，去除残余的有机物，同时在芯片表面修饰羟基，是芯片表面更亲水。

将石英晶体芯片置于 PDACMAC（0.5% w/w）溶液中浸泡 30 min，在芯片表面修饰阳离子吸附层，使得芯片表面更亲水，便于旋转涂膜过程中，纤维素溶液的粘附和径向流动，再在超纯水中浸泡 15 min，以去除未修饰的 PDADMAC，用氮气吹干，-4 °C 下储存，备用。

### 3.2.2 纤维素薄膜制备

称取 2.64 g 4MMO，加 0.66 mL 超纯水，在 85 °C 下溶解至形成淡黄色透明溶液。升高温度至 105 °C，加 105 mg 微晶纤维素，磁力搅拌反应 1 h，直至形成棕色溶液。降低温度至 80 °C，加 7.5 mL DMSO，搅拌均匀，降低溶液黏度，冷却至室温，备用。

打开旋涂仪，通氮气，抽真空。取 200  $\mu$ L 纤维素溶液，滴加至芯片正面中心位置，设置转速为 5000 rpm 下旋涂 1 min，4000 rpm 下干燥 30 s，溶剂蒸发，石英芯片表面形成均一的薄膜。将纤维素薄膜涂覆的芯片在超纯水中浸泡过夜，去除未溶解的 4MMO 和 DMSO，用氮气吹干。

### 3.2.3 不同浓度的纤维素酶在纤维素薄膜上吸附/脱附行为

用于检测 pH 对酶吸附影响的流动相和酶溶液：配置 9.5 mM 磷酸二氢钠缓冲溶液(pH=5.52)，分别加入 6000 ppm 葡萄糖、3000 ppm 纤维二糖作为 Cel7A、Cel7B 的酶解抑制剂。用上述流动相稀释 Cel7A、Cel7B。配置好的流动相和酶溶液超声脱气，避免溶液中气泡对检测带来影响。

将有纤维素涂覆的芯片放置于 QCM-D 流通模块中，待温度稳定至 25 °C 时，测芯片在空气中的基频，若芯片修饰良好，则正确连接管路，注意旋紧接头处，保证整个体系的气密性，打开蠕动泵，通流动相（流速为 100  $\mu$ L/min），待基线稳定后（30 min 内频率变化不超过 1 Hz），通入待测酶溶液，实时跟踪检测酶在纤维素薄膜表面的吸附行为。30 min 后，通入缓冲溶液，去除纤维素薄膜上可逆吸附的酶，观察酶在纤维素表面的脱附行为。最后分别用 SDS 和超纯水清洗管路和流通模块。

### 3.2.4 不同吸附时间纤维素酶在纤维素薄膜上吸附/脱附行为

将有纤维素涂覆的芯片放置于 QCM-D 流通模块中，待温度稳定至 25 °C 时，测芯片在空气中的基频，若芯片修饰良好，则打开蠕动泵，通含酶解抑制剂的缓冲溶液，设置流速为 100  $\mu$ L/min，待基线稳定后（30 min 内频率变化不超过 1 Hz），分别通入 25 ppm 的 Cel7A 和 Cel7B，实时跟踪检测酶在纤维素薄膜表面的吸附行为，分别在 5、10、15、30 min 后，通入含酶解抑制剂的缓冲溶液，去除纤维素薄膜上可逆吸附的酶，观察酶在纤维素表面的脱附行为。

### 3.2.5 起始吸附速率的计算

纤维素酶刚接触纤维素薄膜表面时,经历了快速吸附的过程,酶的吸附速率远远大于络合、脱附的速率,本文以吸附曲线上吸附时间  $t < 2 \text{ min}$  的数据为依据,认为这段时间酶只在纤维素薄膜上吸附,进行线性拟合(图 3-1),得出的斜率值即为起始吸附速率,如表 3-2。

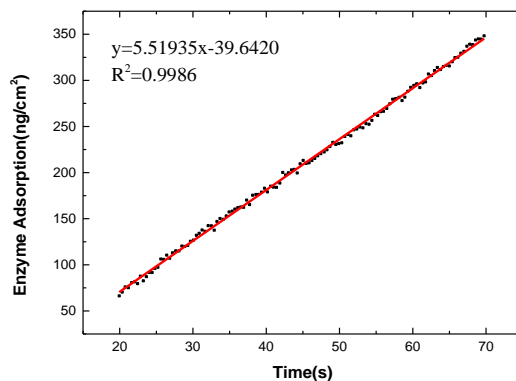


图 3-1 起始吸附速率的计算

Fig. 3-1 Calculation of initial adsorption rate ( $t < 2 \text{ min}$ ). *T. longibrachiatum* Cel7A with 6000ppm glucose in aqueous buffer at 25°C.

## 3.3 实验结果与分析

### 3.3.1 不同浓度的纤维素酶在纤维素上的吸附/脱附历程

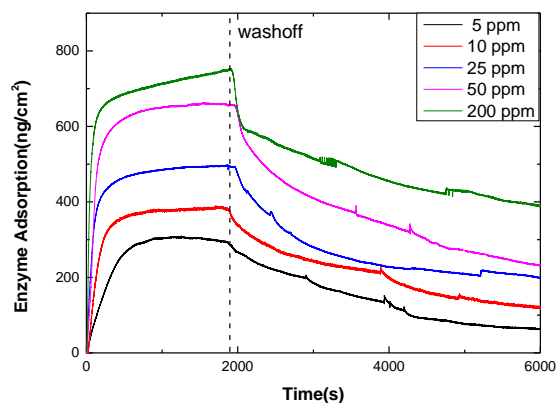


图 3-2 不同浓度的 Cel7A 在纤维素薄膜上的吸附/脱附历程

Fig. 3-2 Loding/washoff histories for *T. longibrachiatum* Cel7A. The adsorbed enzyme was washoff after 30min, which is indicated by a vertical dashed line. Enzyme concentration from bottom to top are 5, 10, 25, 50, 200ppm. Cel7A with 6000ppm glucose in aqueous buffer solution at 25°C.

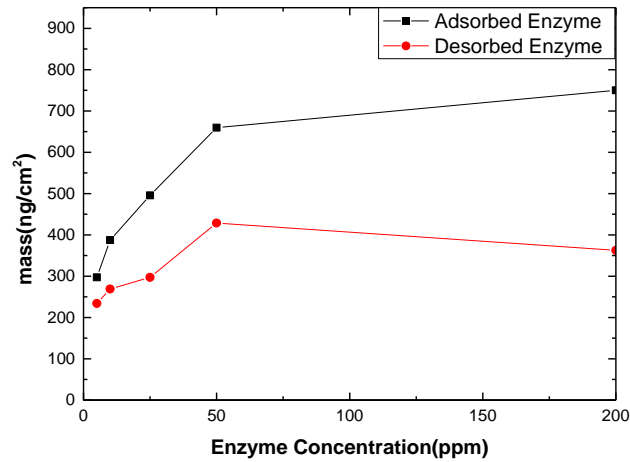


图 3-3 不同浓度 Cel7A 下，纤维素表面吸附和脱附的酶质量

Fig. 3-3 Adsorbed and desorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7A with different concentration. Cel7A with 6000ppm glucose in aqueous buffer at 25°C.

改变纤维素酶 Cel7A 浓度，得到的吸附/脱附历程如图 3-2 所示。不同浓度的纤维素酶在吸附 30 min 后，用含 6000 ppm 葡萄糖的磷酸二氢钠缓冲溶液洗脱。从图中可以看出，纤维素酶浓度越高，30 min 时在纤维素薄膜表面的吸附量越大。图 3-3 反映了不同浓度的纤维素酶在纤维素薄膜表面的吸附和脱附质量。从图中可以看出，Cel7A 浓度从 5 ppm 增加到 50 ppm，纤维素酶的吸附量呈线性快速增加，但是当 Cel7A 浓度为 200 ppm 时，酶吸附量仍增加但是增长速度减小，这是由于纤维素酶薄膜上可供酶吸附的位点是有限的，Cel7A 浓度为 200 ppm 时，酶占据了大部分吸附位点；30 min 后，通入缓冲溶液，纤维素酶没有被完全脱附，仍有部分酶不可逆吸附在纤维素薄膜表面，这可能是由于吸附在纤维素上的蛋白可能由于部分变性而不可逆连接<sup>[116]</sup>。Cel7A 浓度从 5 ppm 增加到 50 ppm 时，脱附的酶质量也增加，但是最终保留在纤维素薄膜上的酶量并不相等，说明纤维素酶浓度不同，变性后不可逆结合在纤维素上的酶量也不相同。

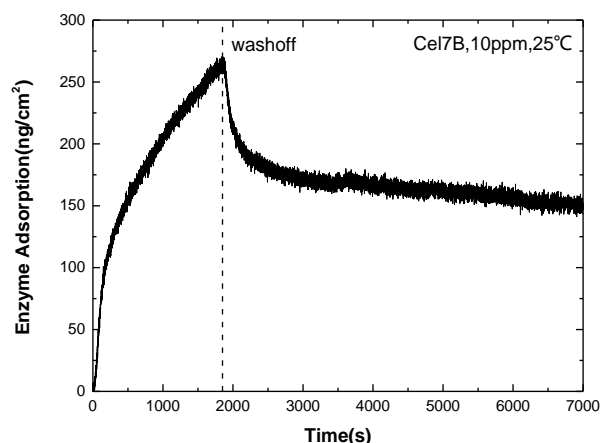


图 3-4 Cel7B 在纤维素薄膜上的吸附/脱附历程

Fig. 3-4 Loding/washoff histories for *T. longibrachiatum* Cel7A. The washoff after 30min is indicated by a vertical dashed line. Cel7B (10ppm) with 3000ppm cellobiose in aqueous buffer solution at 25°C.

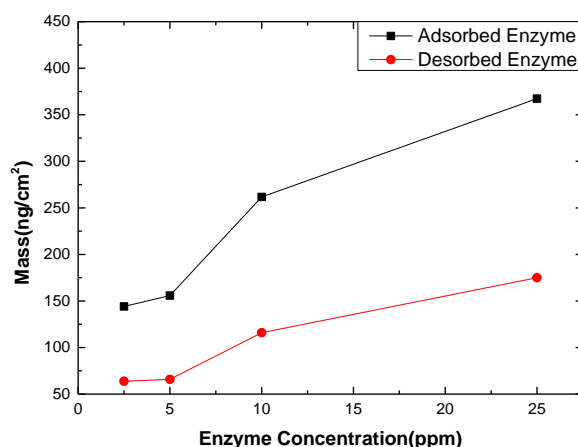


图 3-5 不同浓度 Cel7B 下，纤维素表面吸附和脱附的酶质量

Fig. 3-5 Adsorbed and desorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7A with different concentration. Cel7B with 3000ppm cellobiose in aqueous buffer solution at 25°C.

与 Cel7A 相似，Cel7B 在纤维素薄膜上的吸附量也随着纤维素酶浓度的增加而增加，如图 3-5。但是当 Cel7B 和 Cel7A 浓度都为 25 ppm 时，Cel7A 的吸附量为 495.8 ng/cm<sup>2</sup>，而 Cel7B 的吸附量仅有 367.3 ng/cm<sup>2</sup>。纤维素酶的吸附和脱附不仅与 CBD 有关，还与整个酶的几何形状和形态特性有关<sup>[75]</sup>。Srisodsuk<sup>[118]</sup>将 Cel7B 的 CBD 与 Cel7A 的 CD 相连，发现重组的酶蛋白与 Cel7A 有相同的活性，因而认为 Cel7A 和 Cel7B 的 CBD 区结构相似。然而 Cel7B 和 Cel7A 的分子量不同，催化域结构也不同，Cel7A 的催化域几何尺寸较大，可能拥有更多的催化位点，Cel7B 的催化域则是开放的裂口。综合考虑两种酶的几何结构，可能是由于



Cel7A 在纤维素表面有正确的取向，因而以较快的速率吸附在膜表面。Maurer<sup>[75]</sup>假定两种酶的 CBD 与纤维素薄膜相互作用时，有相同的焓变和熵变，通过吉布斯自由能的计算得出整个酶分子 Cel7A 有比 Cel7B 更高的熵值，因而 Cel7A 有更高的 Langmuir 平衡常数、与纤维素有更强的亲和力。从图 3-5 可以看出，30 min 吸附后，用缓冲溶液洗脱，同样发现 Cel7B 在纤维素薄膜上的脱附量随着纤维素酶浓度的增加而增加，但是吸附的 Cel7B 因部分变性并不会被完全洗脱下来，纤维素酶浓度不同，纤维素薄膜上 Cel7B 变性的质量也不相同。

### 3.3.2 不同洗脱时间下纤维素酶的吸附/脱附历程

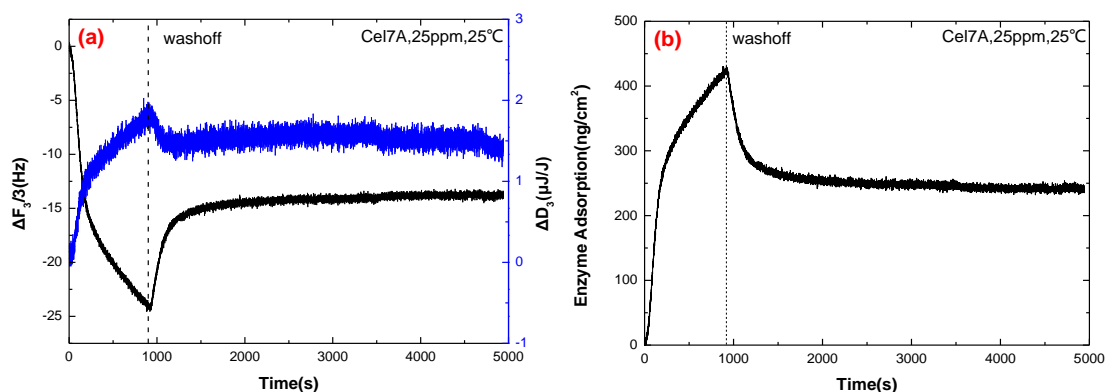


图 3-6 (a) Cel7A 在纤维素上的吸附/脱附历程；(b) 纤维素薄膜上 Cel7A 吸附量的变化

Fig. 3-6 (a) Frequency shift ( $\Delta F$ , black line) and dissipation ( $\Delta D$ , blue line) histories for *T. longibrachiatum* Cel7A loading/washoff experiment; (b) Adsorbed amount for Cel7A. Data were analyzed by QTools. The washoff after 15 min is indicated by a vertical dashed line. Cel7A (25 ppm) with 6000 ppm glucose in aqueous buffer at 25°C.

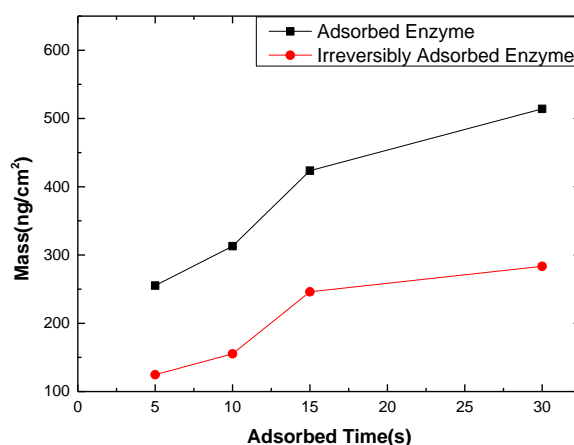


图 3-7 不同吸附时间下 Cel7A 的吸附、不可逆结合酶量

Fig. 3-7 Adsorbed and irreversibly adsorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7A under different adsorbed time. Cel7A (25 ppm) with 6000ppm glucose in aqueous buffer solution at 25°C.

为了阐明 Cel7A 和 Cel7B 的不可逆吸附动力学，实验中检测了不同吸附时间下纤维素酶在薄膜表面的吸附/脱附历程。Cel7A 在纤维素薄膜上经历了一个典型的吸/脱附过程（图 3-6）。首先纤维素酶吸附在纤维素薄膜表面，引起频率值  $F$  的下降，耗散值  $D$  的增加，说明薄膜表面质量增加，薄膜变黏弹。之后通缓冲溶液洗脱，吸附在薄膜上的酶部分洗脱，引起频率值  $F$  的上升，耗散值  $D$  的下降。应用 Q-Sense 自带的 QTools 软件将图中的  $F$  换算成质量变化，不同吸附时间下 Cel7A 在纤维素薄膜表面吸附和不可逆结合的酶量变化如图 3-7 所示，从图中可以看出，5 min 时，薄膜表面共吸附纤维素酶  $255.2 \text{ ng/cm}^2$ ，30 min 时，共吸附 Cel7A  $514.1 \text{ ng/cm}^2$ 。吸附 5 min 后洗脱，约有 48% 的纤维素酶不可逆结合在纤维素表面，而吸附 30 min 后洗脱，约有 55% 的纤维素酶不可逆结合在薄膜表面。以此得出：吸附时间越长，在纤维素薄膜表面吸附的酶量越多；洗脱时间越晚，不可逆吸附在纤维素表面的酶量越多。

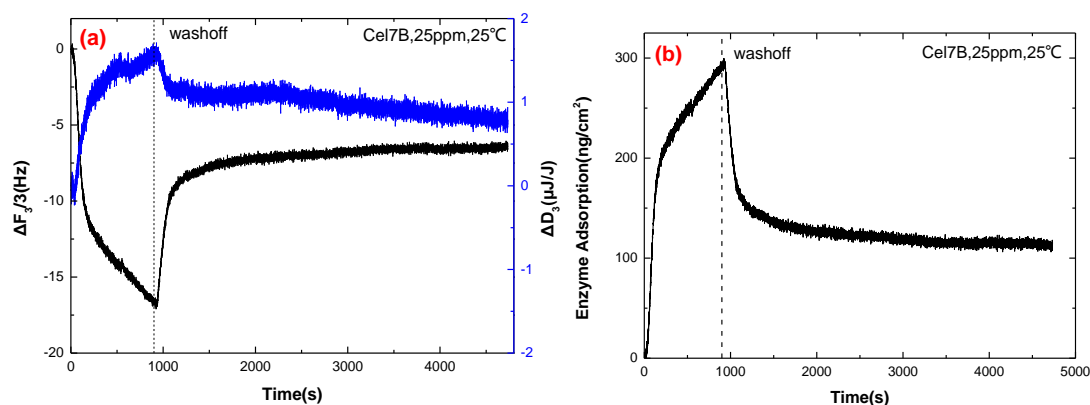


图 3-8 (a) Cel7B 在纤维素上的吸附/脱附历程；(b) 纤维素薄膜上 Cel7B 吸附量的变化

Fig. 3-8 (a) Frequency shift ( $\Delta F$ , black line) and dissipation ( $\Delta D$ , blue line) histories for *T. longibrachiatum* Cel7B loading/washoff experiment; (b) Adsorbed amount for Cel7B on a model cellulose film, Data were analyzed by QTools. The washoff after 15 min is indicated by a vertical dashed line. Cel7B (25 ppm) with 3000 ppm cellobiose in aqueous buffer at 25°C.

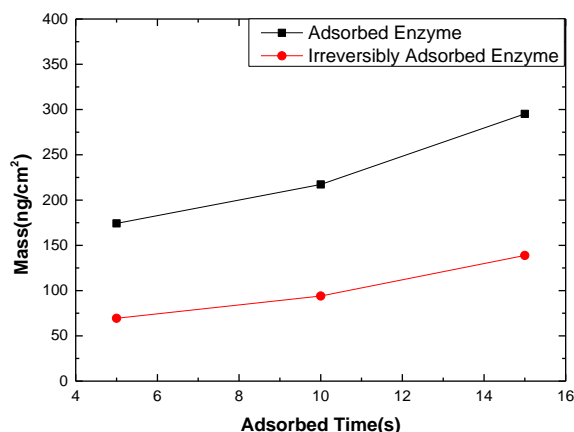


图 3-9 不同吸附时间下 Cel7B 的吸附、不可逆结合酶量

Fig. 3-9 Adsorbed and irreversibly adsorbed amount for *T. longibrachiatum* Cel7B on a model cellulose film under different adsorbed time. Cel7B (25 ppm) with 3000ppm cellobiose in aqueous buffer solution at 25°C.

Cel7B 在纤维素薄膜上也经历了一个典型的吸/脱附过程（图 3-8）。以吸附 15 min 后洗脱为例，纤维素酶在纤维素薄膜表面的吸附和洗脱，引起频率值  $F$  先下降再上升，耗散值  $D$  的先增加后减小。将图中的  $F$  换算成质量变化，不同吸附时间下 Cel7B 在纤维素薄膜表面吸附和不可逆结合的酶量变化如图 3-9 所示。从图中可以得出与 Cel7A 在不同吸附时间下吸附/脱附历程相同的结论，吸附时间越长，在纤维素薄膜表面吸附的酶量越多；洗脱时间越晚，不可逆吸附在纤维素表面的酶量越多。不同的是，在相同的吸附时间下，Cel7A 和 Cel7B 吸附的酶量不同。同样吸附 15 min，纤维素薄膜上 Cel7A 吸附总量为  $423.6 \text{ ng/cm}^2$ ，而 Cel7B 的吸附总量为  $295.1 \text{ ng/cm}^2$ 。15 min 后洗脱，纤维素薄膜上 Cel7A 的不可逆结合率为 55%，而 Cel7B 的不可逆吸附率为 47%。

### 3.3.3 起始吸附速率计算

表 3-2 不同浓度下纤维素酶起始吸附速率（单位： $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）

Tab. 3-2 Initial adsorption rate of cellulase under different concentration

酶种 类	酶浓度/ppm			
	2.5	5	10	25
Cel7A	---	0.831	2.104	4.004
Cel7B	0.127	0.285	0.667	1.302

对于 Cel7A 和 Cel7B，当纤维素酶浓度很低时，起始吸附速率与酶浓度呈正相关<sup>[119]</sup>。对表 3-2 的数据做线性拟合，得到图 3-10，从图中可以看出有很好的

线性相关性，图 3-10 (a)、(b)  $R^2$  分别为 0.97, 0.98。对 Cel7A 拟合，曲线斜率为 0.15974，对 Cel7B 拟合，得到斜率为 0.05248。

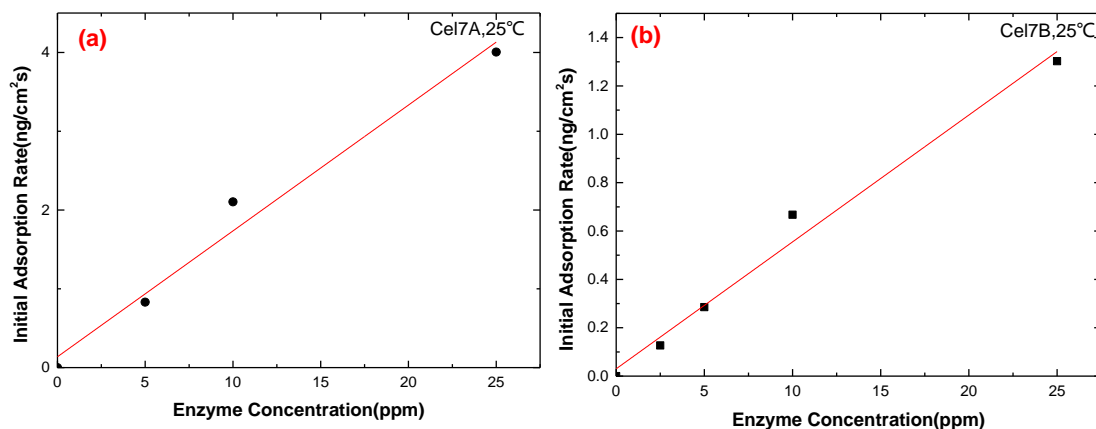


图 3-10 不同浓度下纤维素酶起始吸附速率 (a) Cel7A; (b) Cel7B

Fig. 3-10 Initial cellulose adsorption rate ( $t < 2$  min) on model cellulose films. (a) *T. longibrachiatum* Cel7A with 6000 ppm glucose in aqueous buffer at 25°C; (b) *T. longibrachiatum* Cel7B with 3000 ppm cellobiose in aqueous buffer at 25°C. Lines correspond to linear adsorption kinetics.

### 3.3.4 吸附动力学模型的构建

目前，木质纤维素酶解糖化的研究大多集中在应用层面的工艺开发，少部分涉及催化历程的模型构建与机理分析，对木质纤维素酶解界面的吸附和反应的实时定量表征与调控途径研究较少，其中诸多科学问题尚未解决，造成该非均相催化过程调控难、效率低、成本高，严重制约其规模化生产与应用。

本文依据 Cascão Pereira<sup>[120]</sup>提出的 Langmuir 吸附动力学模型来描述单组份纤维素酶在纯纤维素上的行为。该模型认为，纤维素酶在薄膜上的吸附行为经历了这样一个历程：当纤维素酶接触到纤维素薄膜上的可吸附位点时，通过吸附域 CBD 与纤维素连接，之后吸附的纤维素酶可能会脱附到溶液中形成游离酶，也有可能由于 CBD 的变性而不可逆结合在纤维素链上。根据这样假定，运用速率表达式、相应位点的吸附平衡，建立纤维素薄膜表面可逆和不可逆吸附的酶的质量守恒方程：

$$\frac{d\Gamma_E}{dt} = k_A[E]_{bulk}(\Gamma_{max} - \Gamma_E - \Gamma_I) - k_D\Gamma_E - k_I\Gamma_E \quad (3.1)$$

$$\frac{d\Gamma_I}{dt} = k_I\Gamma_E \quad (3.2)$$

$$\Gamma_{max} = \Gamma_E + \Gamma_I + \Gamma_O \quad (3.3)$$

式中,  $\Gamma_E$ 、 $\Gamma_I$  分别为表面可逆吸附、不可逆结合酶浓度;  $\Gamma_{\max}$  为纤维素薄膜表面吸附酶的最大浓度;  $\Gamma_O$  为吸附在基底表面所有可吸附位点的酶浓度;  $[E]_{bulk}$  为通入流通池的酶浓度;  $k_A$ 、 $k_D$ 、 $k_I$  分别为吸附、脱附、不可逆结合速率常数。(3.1) 等号右边的前两项为 Langmuir 吸附和脱附速率, 在本章中假设不可逆结合的酶是由原来吸附在纤维素薄膜上的酶部分转化, 因而得到 (3.1) 等号右边第三项。不可逆吸附速度也用一级动力学来反映, 如 (3.2) 所示。

### 3.3.5 动力学参数求解

对于单独的 Cel7A 和 Cel7B, 纤维素酶在纤维素表面的吸附发生在接触表面后很短的时间 ( $t < 2 \text{ min}$ ), 此时, 纤维素薄膜上可逆和不可逆吸附的酶量都约等于 0, 即  $\Gamma_E \approx 0$ 、 $\Gamma_I \approx 0$ 。公式 (3.1) 简化为

$$\left. \frac{d\Gamma_E}{dt} \right|_{t=0} = k_A [E]_{bulk} \Gamma_{\max} \quad (3.4)$$

(3.4) 中的  $k_A \Gamma_{\max}$  对应于起始吸附速率曲线图 3-10 的斜率。

实验中观察到, Cel7A 和 Cel7B 在纤维素薄膜上的最大吸附量  $\Gamma_{\max}$  均为  $780 \text{ ng/cm}^2$ 。图 3-10 中对于 Cel7A 和 Cel7B, 曲线斜率分别为  $0.15974 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ ,  $0.05248 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$ 。经计算得到 Cel7A 和 Cel7B 的吸附速率分别为  $k_{A, \text{Cel7A}} = 0.737 \pm 0.016 \text{ h}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ ,  $k_{A, \text{Cel7B}} = 0.242 \pm 0.004 \text{ h}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ 。

$k_D$ 、 $k_I$  分别描述了纤维素酶在纤维素薄膜上的脱附、不可逆吸附速率。两者求解过程如下:

定义  $\Gamma_T$  为纤维素薄膜表面可逆和不可逆吸附的酶总量:

$$\Gamma_T = \Gamma_E + \Gamma_I \quad (3.5)$$

定义  $t_0$  为洗脱开始的时间, 此时 QCM-D 中停止通入酶溶液, 因而认为  $[E]_{bulk}=0$ ,  $\Gamma_{E,0}$ 、 $\Gamma_{I,0}$ 、 $\Gamma_{T,0}$  分别为  $t_0$  时刻可逆吸附、不可逆结合、纤维素表面吸附酶的总浓度。同样,  $\Gamma_{E,\infty}$ 、 $\Gamma_{I,\infty}$ 、 $\Gamma_{T,\infty}$  为洗脱达到平衡 (频率值  $F$  稳定) 时, 纤维素薄膜表面可逆吸附、不可逆结合、吸附酶总浓度, 但是由于缓冲溶液的洗脱带走了纤维素薄膜表面可逆结合的酶, 因此此时纤维素表面只有不可逆结合的酶, 此时  $\Gamma_{T,\infty}=\Gamma_{I,\infty}$ ,  $\Gamma_{E,\infty}=0$ 。上述定义用图 3-11 表示。

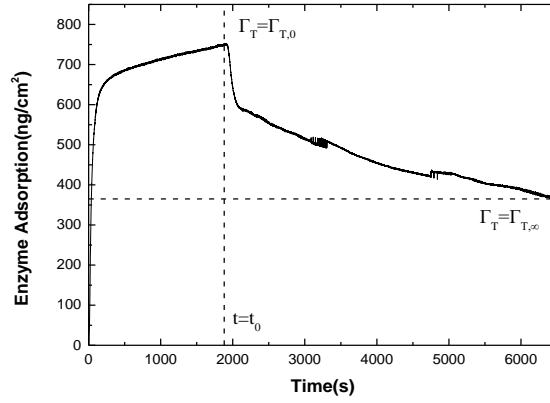

 图 3-11  $t_0$ 、 $\Gamma_{T,0}$ 、 $\Gamma_{T,\infty}$ 定义

 Fig. 3-11 Definitions of  $t_0$ 、 $\Gamma_{T,0}$ 、 $\Gamma_{T,\infty}$  on a typical loading/washoff history.

从刚开始洗脱  $t = t_0$  对 (3.1) 积分得

$$\Gamma_E(t) = \Gamma_{E,0} e^{-(k_D + k_I)(t - t_0)} \quad (3.6)$$

将 (3.6) 带入 (3.2) 得

$$\Gamma_I(t) = \Gamma_{I,0} + \Gamma_{E,0} \frac{k_I}{k_D + k_I} \left[ 1 - e^{-(k_D + k_I)(t - t_0)} \right] \quad (3.7)$$

由 (3.5) 和 (3.7) 求出总吸附量  $\Gamma_T$  为

$$\Gamma_T(t) = \Gamma_{I,0} + \Gamma_{E,0} \frac{k_I}{k_D + k_I} \left[ 1 - e^{-(k_D + k_I)(t - t_0)} \right] + \Gamma_{E,0} e^{-(k_D + k_I)(t - t_0)} \quad (3.8)$$

洗脱达到平衡,  $t = \infty$  时,

$$\Gamma_{T,\infty} = \Gamma_{I,0} + \Gamma_{E,0} \frac{k_I}{k_D + k_I} \quad (3.9)$$

在 (3.9) 中引入时间变化量, 得

$$\frac{\Gamma_T(t) - \Gamma_{T,\infty}}{\Gamma_{T,0} - \Gamma_{T,\infty}} = e^{-(k_D + k_I)(t - t_0)} \quad (3.10)$$

在 (3.10) 中,  $\Gamma_{T,0}$ 、 $\Gamma_{T,\infty}$  可通过实验测得, 用 QCM-D 测得不同吸附时间下的  $\Gamma_T(t)$ , 即可求得  $k_D + k_I$ 。  $k_{D, Cel7A} + k_{I, Cel7A} = 10.42 \pm 0.26 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{D, Cel7B} + k_{I, Cel7B} = 29.79 \pm 0.91 \text{ h}^{-1}$ 。

为了求单独的脱附常数和不可逆吸附常数  $k_D$ 、 $k_I$ , 对 (3.9) 变形

$$\frac{\Gamma_{T,0} - \Gamma_{T,\infty}}{\Gamma_{T,0}} = \frac{\Gamma_{E,0}}{\Gamma_{T,0}} \frac{k_D}{k_D + k_I} \quad (3.11)$$

式(3.11)中, 等号左边代表洗脱阶段, 纤维素薄膜表面脱附的酶占洗脱开始时膜表面可逆和不可逆吸附酶总量的比例, 根据图 3-7 和图 3-9, 这个值在 0.3-0.9 范围内。等号右边, 第一项表示通入缓冲溶液, 洗脱刚开始时, 在纤维素薄膜表面可逆吸附的酶占可逆和不可逆吸附的酶总量的比例, 这个值是个小于等于 1 的

数, 因而确定,  $k_D/(k_D+k_I)$  应该在 0.1-1 范围内。所以, 不可逆吸附常数  $k_D$  是个大于 0 的数。

根据已知的  $k_D/(k_D+k_I)$  的范围, 取  $k_D$  值, 进而推出不可逆吸附常数  $k_I$ 。根据三个速率常数  $k_A$ 、 $k_D$ 、 $k_I$  预测纤维素酶在纤维素薄膜上吸附历程, 与实验所得的不同浓度酶浓度和不同吸附时间下的吸附曲线比较。在小范围内迭代  $k_D$ , 构建出吸附模型与实验所得数据做出的曲线进行拟合, 求出  $k_D$ 、 $k_I$ 。该过程运用 Polymath Professional 6.0 软件采用 Runge-Kutta 四阶五级算法求解。结果如表 3-3 所示。

表 3-3 Cel7A 和 Cel7B 动力学参数

Tab. 3-3 Kinetic parameters for Cel7A and Cel7B

	$k_A$ (ppm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$k_D$ (h <sup>-1</sup> )	$K_L$ (ppm <sup>-1</sup> )	$k_I$ (h <sup>-1</sup> )
Cel7A	$0.737 \pm 0.016$	$9.11 \pm 0.13$	$0.081 \pm 0.002$	$1.31 \pm 0.13$
Cel7B	$0.242 \pm 0.004$	$25.13 \pm 0.46$	$0.011 \pm 0.0006$	$4.66 \pm 0.45$

根据模型参数做出的曲线与实验所得曲线对比如图 3-12。从图中可以看出, 本文建立的模型能够对两种酶在纤维素膜上的吸附良好的拟合。

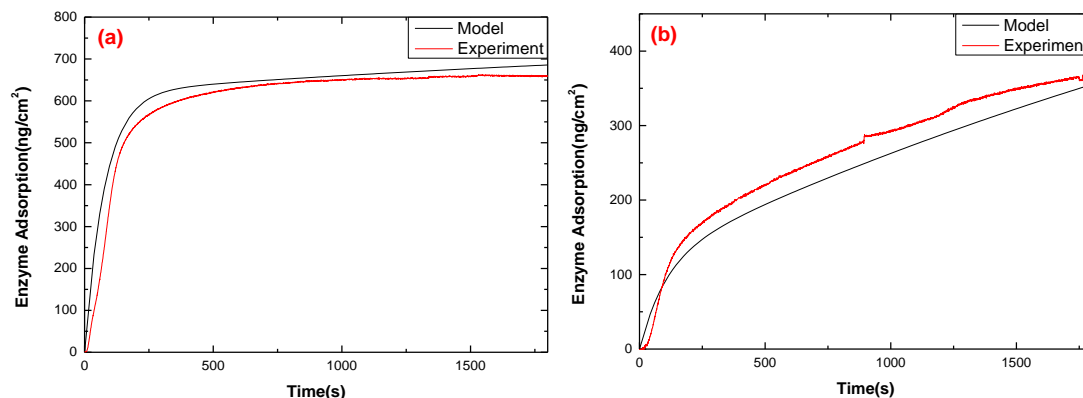


图 3-12 Cel7A (a) 与 Cel7B (b) 吸附曲线实验与模型对比

Fig. 3-12 The resultant curves comparison between experiment and model for (a) *T. longibrachiatum* Cel7A (50ppm) with 6000 ppm glucose in aqueous buffer at 25°C; (b) *T. longibrachiatum* Cel7B (25ppm) with 3000 ppm cellobiose in aqueous buffer at 25°C.

### 3.3.6 动力学模型分析

从表 3-3 可以看出, Cel7A 的吸附速率常数是 Cel7B 的 3 倍, 而 Cel7B 的脱附速率常数是 Cel7A 的 2.5 倍。Langmuir 等温吸附平衡参数  $K_L=k_A/k_D$ , 能够表征酶在底物上的最大吸附值, 也能够表征酶对底物的亲和力。Cel7B 的平衡常数为

0.011, Cel7A 的平衡常数为 0.081, 约为 Cel7B 的 8 倍, 因而, Cel7A 对纤维素有更强的亲和力。

Cel7A 与 Cel7B 的不可逆吸附速率常数  $k_i$  有很大差异, Cel7B 在纤维素薄膜上不可逆吸附更快。这个结论同样可以从图 3-3、3-4 得出, 酶浓度均为 25 ppm 时, Cel7A 的不可逆吸附酶量占总吸附酶量的 40%, 而 Cel7B 的不可逆吸附酶量为 52%。纤维素酶在纤维素表面的吸附主要靠 CBD, Cel7A 与 Cel7B 的 CBD 结构相似<sup>[118]</sup>, 都为楔形。实验过程中, 仍有纤维素酶在纤维素表面发生不可逆吸附。这可能是因为纤维素酶 CBD 的芳香族残基与纤维素表面的自由羟基共价作用, 或者 CBD 形貌发生变化、局部变性等造成酶与底物不可逆结合<sup>[121, 122]</sup>。而导致两者不可逆吸附速率常数不同的主要原因是两种酶 CBD 结构在纤维素薄膜表面发生变性的程度不同。

Cel7A 与 Cel7B 的吸附和脱附速率常数有很大差异。这说明两种酶在纤维素表面的吸附与脱附不仅与 CBD 有关, 还与 CD 有关。纤维素酶的催化域也可能与纤维素相互作用, 提供额外的结合力并且引导 CBD 的吸附<sup>[123]</sup>。Cel7A 具有隧道状的催化域, 可能拥有更多的结合位点, 而 Cel7B 的催化域则是一道裂缝。Cel7A 的 CBD 与 CD 共同作用, 使得 Cel7A 在纤维素薄膜表面有正确的取向, 可发生快速吸附, 表现出吸附速率常数较大而脱附速率常数较小。

### 3.4 本章小结

本章用 QCM-D 研究了两种单组份的纤维素酶浓度改变时以及不同的吸附时间下, 它们在了纤维素薄膜表面上可逆吸附、不可逆吸附、脱附历程; 同时, 构建了酶与纤维素相互作用的动力学模型。得出的结论如下:

1. 纤维素酶浓度越高, 在纤维素薄膜表面吸附量越多, 但是超过一定浓度后, 薄膜上可吸附位点全部占据, 吸附量不再增加;
2. 通入缓冲溶液并不能将所有的酶都洗脱下来, 仍有一部分酶不可逆吸附在纤维素上;
3. 吸附时间越长, 在纤维素薄膜表面吸附的酶量越多; 洗脱时间越晚, 不可逆吸附在纤维素表面的酶量越多;
4. 吸附相同的时间, Cel7A 在纤维素薄膜上吸附总量要高于 Cel7B 的吸附总量;
5. 构建了两种酶吸附动力学模型, 分析得出: 与 Cel7B 相比, Cel7A 与纤维素薄膜有更强的亲和力; Cel7B 在纤维素薄膜表面变性更多, 因而不可逆吸附速



率常数更大；Cel7A 的 CBD 与 CD 共同作用，在纤维素表面的吸附速率常数较大而脱附速率常数较小。

综上，两种纤维素酶在纤维素表面均会有部分不可逆吸附，因而，实际生产中，酶的完全回收利用难以实现。



## 第四章 结论与展望

燃料乙醇被认为是最有发展潜力的可再生替代能源之一，尤其是以木质纤维素为原料的第二代燃料乙醇——纤维素乙醇不存在与人争夺粮食的问题而受到人们的青睐，然而纤维素酶的高成本及酶的无效吸附引起酶解效率的降低阻碍了纤维素乙醇的商业推广。

本文旨在明确两种纤维素酶与纤维素以减低木质纤维素利用过程的经济成本为目的，使用 QCM-D 研究纤维素薄膜上两种单组份纤维素酶 Cel7A、Cel7B 的吸附和脱附历程。明确了纤维素酶酶解抑制剂的选择，通过改变溶液 pH 实现了纤维素表面纤维素酶吸附、脱附的调控。此外，深入研究了纤维素表面两种单组份酶的吸附动力学，明确两种酶的作用机制，构建了两种酶的吸附动力学模型，用于指导实际生产中纤维素酶的复配体系设计。

### 4.1 结论

#### 4.1.1 pH 和酶解抑制剂调控纤维素酶吸附行为研究

1. 在不加酶解抑制剂时，Cel7A、Cel7B 均会水解纤维素薄膜，表现出频率值  $F$  先下降后上升的趋势，但是由于两种酶作用机制不同，酶解引起薄膜粘弹性变化也不同，在 Cel7A 的作用下，耗散值  $D$  持续上升，而 Cel7B 引起耗散值先增加后减小；

2. 酶解抑制剂的加入会明显抑制纤维素酶的反应。综合考虑酶解抑制效果和经济成本，选择 6000 ppm 葡萄糖做 Cel7A 的酶解抑制剂，3000 ppm 纤维二糖作为 Cel7B 的酶解抑制剂；

3. 不同 pH 下纤维素酶的吸附行为呈现明显差异，对于 Cel7A，酸性 pH ( $\leq 4.8$ ) 更有利于吸附，而碱性 pH (特别是 pH=9 和 10) 更有利于脱附。和 Cel7A 一样，pH  $\leq 4.8$  更有利于 Cel7B 在纯纤维素 Avicel 上的吸附，碱性条件利于脱附。pH = 10 时，缓冲溶液对 Cel7A 和 Cel7B 的脱附率可达到 73% 和 69%。

### 4.1.2 纤维素酶吸附动力学研究

1. 纤维素酶在纤维素上的吸附呈现先增加再维持不变的规律。纤维素酶浓度越高，在纤维素薄膜表面吸附量也越多，但是超过一定浓度后，薄膜上可吸附位点全部占据，吸附量不再增加；

2. 通入缓冲溶液并不能将所有的酶都洗脱下来，仍有一部分酶不可逆吸附在纤维素上；

3. 吸附时间越长，在纤维素薄膜表面吸附的酶量越多；洗脱时间越晚，不可逆吸附在纤维素表面的酶量越多；吸附相同的时间，Cel7A 在纤维素薄膜上吸附总量要高于 Cel7B 的吸附总量；

4. 构建了两种酶吸附动力学模型，分析得出：与 Cel7B 相比，Cel7A 与纤维素薄膜有更强的亲和力；Cel7B 不可逆吸附速率常数更大。

### 4.2 展望

木质纤维素作为地球上储量最多的可再生能源，具有清洁环保、来源广、价格低、经济潜力大等优势。随着对其研究的不断深入，木质纤维素将得到不断的推广和利用。但是由于其生物顽抗结构，和纤维素酶的较高的使用成本，增大了木质纤维素生物精炼过程的转化成本。为了优化酶解过程、明确水解效率提高的调控方法，有以下几项工作进行：

1. 考察温度、表面活性剂、膨胀素等对酶在底物表面吸/脱附的影响；剖析机理，指导强化酶解反应添加剂的选择和设计；
2. 结合 SPR 与 QCM 技术，实时监测不同纤维素酶、复配酶在纤维素、木质素、木质纤维素混合样品表面的吸附行为，分析在吸附平衡时不同酶在木质纤维素界面上的分配规律，构建双酶协同复合体系的吸附-反应动力学模型；
3. 根据上述模型中各项因素的权重，讨论纤维素酶水解反应受吸附作用的影响规律，发现并阐明纤维素酶解效率变化的演变规律和关键因素。

随着微生物技术、化学和环境工程的发展进步，基于木质纤维素技术的相关研究将得到大量的知识和技术储备。可以预见，在不久的将来，木质纤维素的利用将会取得重大的发展进步，有望在解决环境问题和能源问题中发挥至关重要的作用。

## 参考文献

- [1] Sheridan C. Big oil turns on biofuels, *Nature Biotechnology*, 2013, 31(10): 870-873
- [2] Tilman D, Hill J, Lehman C. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass, *Science*, 2006, 314(5805): 1598-1600
- [3] Chum H L, Overend R P. Biomass and renewable fuels, *Fuel Processing Technology*, 2001, 71(1-3): 187-195
- [4] Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future, *Science*, 2007, 315(5813): 808-810
- [5] Liao J C, Mi L, Pontrelli S, et al. Fuelling the future: Microbial engineering for the production of sustainable biofuels, *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 288-304
- [6] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, 38(4): 522-550
- [7] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective, *International Sugar Journal*, 2004, 106(1263): 147-150
- [8] Somerville C, Bauer S, Brininstool G, et al. Toward a systems approach to understanding plant-cell walls, *Science*, 2004, 306(5705): 2206-2211
- [9] Zhao X B, Zhang L H, Liu D H. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2012, 6(4): 465-482
- [10] Van Dyk J S, Pletschke B I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1458-1480
- [11] Huang R L, Su R X, Qi W, et al. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: Process intensification and mechanism research, *Bioenergy Research*, 2011, 4(4): 225-245
- [12] Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production, *Science*, 2007, 315(5813): 804-807
- [13] Sticklen M B. Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol, *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(6): 433-443
- [14] Klemm D, Heublein B, Fink H, et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and

- sustainable raw material, *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(22): 3358-3393
- [15] Young R A, Rowell R M. Cellulose: structure, modification and hydrolysis. 1986.
- [16] Hudson S M, Cuculo J A. The solubility of cellulose in liquid ammonia/salt solutions, *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry Edition*, 1980, 18(12): 3469-3481
- [17] Rosenau T, Potthast A, Sixta H, et al. The chemistry of side reactions and byproduct formation in the system NMMO/cellulose (Lyocell process), *Progress in Polymer Science*, 2001, 26(9): 1763-1837
- [18] Cai J, Zhang L, Chang C, et al. Hydrogen-bond-induced inclusion complex in aqueous cellulose/LiOH/urea solution at low temperature, *Chemphyschem A European Journal of Chemical Physics & Physical Chemistry*, 2007, 8(10): 1572
- [19] Cai J, Zhang L, Liu S, et al. Dynamic self-assembly induced rapid dissolution of cellulose at low temperatures, *Macromolecules*, 2008, 41(23): 9345-9351
- [20] Yan L, Chen J, Bangal P R. Dissolving cellulose in a NaOH/thiourea aqueous solution: A topochemical investigation, *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7(9-10): 1139
- [21] Xiong B, Zhao P, Hu K, et al. Dissolution of cellulose in aqueous NaOH/urea solution: Role of urea, *Cellulose*, 2014, 21(3): 1183-1192
- [22] Jiang Z, Fang Y, Xiang J, et al. Intermolecular interactions and 3D structure in cellulose-NaOH-urea aqueous system, *Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118(34): 10250-10257
- [23] Cai J, Z L. Unique gelation behavior of cellulose in NaOH/urea aqueous solution, *Biomacromolecules*, 2006, 7(1): 183-189
- [24] Zhang C, Liu R, Xiang J, et al. Dissolution mechanism of cellulose in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride: Revisiting through molecular interactions, *Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118(31): 9507-9514
- [25] Dawsey T R, McCormick C L. The lithium chloride/dimethylacetamide solvent for cellulose: A literature review, *Polymer Reviews*, 1990, 30(3-4): 405-440
- [26] Agger J, Viksø-Nielsen A, Meyer A S. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: Differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6141-6148
- [27] Yang B, Dai Z, Ding S-Y, et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass, *Biofuels*, 2011, 2(4): 421-450
- [28] Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 45
- [29] Rahikainen J L, Martin-Sampedro R, Heikkinen H, et al. Inhibitory effect of lignin

- during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption, *Bioresource Technology*, 2013, 133(2): 270-278
- [30] Timilsena Y P, Audu I G, Rakshit S K, et al. Impact of the lignin structure of three lignocellulosic feedstocks on their organosolv delignification. Effect of carbonium ion scavengers, *Biomass & Bioenergy*, 2013, 52(3): 151-158
- [31] Kumar L, Arantes V, Chandra R, et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility, *Bioresource Technology*, 2012, 103(1): 201-208
- [32] Selig M J, Vinzant T B, Himmel M E, et al. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 155(1-3): 397-406
- [33] Qing Q, Yang B, Wyman C E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover, *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 5941-5951
- [34] Kim H J, Kim S B, Chang J K. The effects of nonionic surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12(2): 147-151
- [35] Kim S B, Kim H J, Kim C J. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using tween, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 130(1-3): 486-495
- [36] Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, et al. Production of trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale, *Bioresource Technology*, 1991, 36(1): 51-65
- [37] Nieves R A, Ehrman C I, Adney W S, et al. Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998, 14(2): 301-304
- [38] Percival Zhang Y H, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology & Bioengineering*, 2004, 88(7): 797-824
- [39] Tilbeurgh H V, Tomme P, Claeysens M, et al. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* : Separation of functional domains, *Febs Letters*, 1986, 204(2): 223-227
- [40] Lee H J, Brown R M, Lee H J, et al. A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: A high resolution electron microscopy study, *Journal of Biotechnology*, 1997, 57(1-3): 127-136
- [41] Linder M, Teeri T T. The roles and function of cellulose-binding domains, *Journal of Biotechnology*, 1997, 57(1-3): 15-28
- [42] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, et al. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science*, 2011, 333(6047): 1279-1282

- [43] Percival Zhang Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 452-481
- [44] Suurnäkki A, Tenkanen M, Siika-aho M, et al. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp, *Cellulose*, 2000, 7(2): 189-209
- [45] Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*, *Science*, 1994, 265(5171): 524-528
- [46] Divne C, Sinning I, Ståhlberg J, et al. Crystallization and preliminary X-ray studies on the core proteins of cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma reesei*, *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234(3): 905-907
- [47] Sinnott M L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer, *Chemical Reviews*, 1990, 90(7): 1171-1202
- [48] 苏荣欣, 杨仁俊, 齐威, 何志敏. 聚多巴胺辅助磁微球固定  $\beta$ -葡萄糖苷酶的制备与应用, *天津大学学报 (自然科学与工程技术版)*, 2017, doi: 10.11784/tdxb201605046.
- [49] Su R, Yang R, Yang J, et al. Oscillating cellulase adsorption and enhanced lignocellulose hydrolysis upon ultrasound treatment, *Transactions of Tianjin University*, 2016, 23(1): 11-19
- [50] Wang W, Liu C, Ma Y, et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties, *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 84: 16-27
- [51] Cheng H, Liu G, Wang C, et al. Collapse and swelling of poly (N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate) copolymer brushes grafted on a flat SiO<sub>2</sub> surface, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2006, 44(4): 770-778
- [52] Liu G, Zhang G. Collapse and swelling of thermally sensitive poly (N-isopropylacrylamide) brushes monitored with a quartz crystal microbalance, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(2): 743-747
- [53] Zhang G. Study on conformation change of thermally sensitive linear grafted poly (N-isopropylacrylamide) chains by quartz crystal microbalance, *Macromolecules*, 2004, 37(17): 6553-6557
- [54] Liu G, Cheng H, Yan L, et al. Study of the kinetics of the pancake-to-brush transition of poly (N-isopropylacrylamide) chains, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(47): 22603-22607
- [55] Liu G, Yan L, Chen X, et al. Study of the kinetics of mushroom-to-brush transition of charged polymer chains, *Polymer*, 2006, 47(9): 3157-3163



- [56] Wu K, Wu B, Wang P, et al. Adsorption isotherms and dissipation of adsorbed poly (N-isopropylacrylamide) in its swelling and collapsed states, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(30): 8723-8727
- [57] Zhu D M, Wu K, Wu B, et al. Physisorption of poly (N-isopropylacrylamide) in its swollen and collapsed states: effects of molecular conformation and substrate interaction, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111(50): 18679-18686
- [58] Hou Y, Chen J, Sun P, et al. In situ investigations on enzymatic degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone), *Polymer*, 2007, 48(21): 6348-6353
- [59] Bütün V, Armes S P, Billingham N C. Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers, *Polymer*, 2001, 42(14): 5993-6008
- [60] Liu G, Zhao J, Sun Q, et al. Role of chain interpenetration in layer-by-layer deposition of polyelectrolytes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(11): 3333-3338
- [61] Liu G, Zou S, Fu L, et al. Roles of chain conformation and interpenetration in the growth of a polyelectrolyte multilayer, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(14): 4167-4171
- [62] Moheimani S R. A survey of recent innovations in vibration damping and control using shunted piezoelectric transducers, *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, 2003, 11(4): 482-494
- [63] Cooper M A, Singleton V T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions, *Journal of Molecular Recognition*, 2007, 20(3): 154-184
- [64] Bottom V E. Introduction to quartz crystal unit design, Van Nostrand Reinhold, 1982,
- [65] Lack F R, Willard G W, Fair I E. Some improvements in quartz crystal circuit elements, *Bell System Technical Journal*, 1934, 13(3): 453-463
- [66] Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 1959, 155(2): 206-222
- [67] Nomura T, Minemura A. Behavior of a piezoelectric quartz crystal in an aqueous-solution and the application to the determination of minute amount of cyanide, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1980, 10: 1621-1625
- [68] Konash P L, Bastiaans G J. Piezoelectric crystals as detectors in liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 1980, 52(12): 1929-1931
- [69] Fler G J, Cohen Stuart M A; Scheutjens JMHM, et al. *Polymers at interfaces*. Cambridge: Chapman & Hall, 1993, 2

- [70] Ballauff M, Borisov O. Polyelectrolyte brushes, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, 11(6): 316-323
- [71] Alexander S. Polymer adsorption on small spheres. A scaling approach, *Journal de Physique*, 1977, 38(8): 977-981
- [72] Gennes P G D. Scaling theory of polymer adsorption, *Journal de Physique*, 1976, 37(12): 1445-1452
- [73] Chen Q, Xu S, Liu Q, et al. QCM-D study of nanoparticle interactions, *Advances in Colloid Interface Science*, 2016, 233: 94-114
- [74] Voinova M V, Rodahl M, Jonson M, et al. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach, *Physica Scripta*, 1999, 59(5): 391-396
- [75] Maurer S A, Bedbrook C N, Radke C J. Competitive sorption kinetics of inhibited endo- and exoglucanases on a model cellulose substrate, *Langmuir*, 2012, 28(41): 14598-14608
- [76] Tham Y Y, Molino P J, Higgins M J, et al. The study of deposition of wood extractives and model compound colloids onto chromium and cellulose surfaces using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 491: 1-11
- [77] Mohan T, Niegelhell K, Zarth C S, et al. Triggering protein adsorption on tailored cationic cellulose surfaces, *Biomacromolecules*, 2014, 15(11): 3931-3941
- [78] Orelma H, Filpponen I, Johansson L S, et al. Modification of cellulose films by adsorption of CMC and chitosan for controlled attachment of biomolecules, *Biomacromolecules*, 2011, 12(12): 4311-4318
- [79] Zhang Y, Rojas O J. Immunosensors for C-reactive protein based on ultrathin films of carboxylated cellulose nanofibrils, *Biomacromolecules*, 2017
- [80] Benselfelt T, Cranston E D, Ondaral S, et al. Adsorption of xyloglucan onto cellulose surfaces of different morphologies: an entropy-driven process, *Biomacromolecules*, 2016, 17(9): 2801-2811
- [81] Salas C, Rojas O J, Lucia L A, et al. On the surface interactions of proteins with lignin, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2013, 5(1): 199-206
- [82] Norgren M, Notley S M, Majtnerova A, et al. Smooth model surfaces from lignin derivatives. I. preparation and characterization, *Langmuir*, 2006, 22(3): 1209-1214
- [83] Lou H, Wang M, Lai H, et al. Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate, *Bioresource Technology*, 2013, 146: 478-484
- [84] Pasquini D, Balogh D T, Oliveira O N, et al. Lignin molecular arrangements in Langmuir and Langmuir-Blodgett films: the influence of extraction processes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 252(2-

- 3): 193-200
- [85] Kumagai A, Lee S H, Endo T. Evaluation of the effect of hot-compressed water treatment on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic nanofibrils with different lignin content using a quartz crystal microbalance, *Biotechnology & Bioengineering*, 2016, 113(7): 1441-1447
- [86] Kumagai A, Iwamoto S, Lee S H, et al. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of the enzymatic hydrolysis of steam-treated lignocellulosic nanofibrils, *Cellulose*, 2014, 21(4): 2433-2444
- [87] Strasser S, Niegelhell K, Kaschowitz M, et al. Exploring nonspecific protein adsorption on lignocellulosic amphiphilic bicomponent films, *Biomacromolecules*, 2016, 17(3): 1083-1092
- [88] Hoeger I C, Filpponen I, Martin-Sampedro R, et al. Bicomponent lignocellulose thin films to study the role of surface lignin in cellulolytic reactions, *Biomacromolecules*, 2012, 13(10): 3228-3240
- [89] Martin-Sampedro R, Rahikainen J L, Johansson L S, et al. Preferential adsorption and activity of monocomponent cellulases on lignocellulose thin films with varying lignin content, *Biomacromolecules*, 2013, 14(4): 1231-1239
- [90] Zhou S, Li H F, Garlapalli R, et al. Hydrolysis of model cellulose films by cellulosomes: Extension of quartz crystal microbalance technique to multienzymatic complexes, *Journal of Biotechnology*, 2017, 241: 42-49
- [91] Raegen A N, Reiter K, Dion A, et al. Advances in surface plasmon resonance imaging enable quantitative tracking of nanoscale changes in thickness and roughness, *Analytical Chemistry*, 2014, 86(7): 3346-3354
- [92] Quirk A, Lipkowski J, Vandenende C, et al. Direct visualization of the enzymatic digestion of a single fiber of native cellulose in an aqueous environment by atomic force microscopy, *Langmuir*, 2010, 26(7): 5007-5013
- [93] Fritz C, Ferrer A, Salas C, et al. Interactions between cellulolytic enzymes with native, autohydrolysis, and technical lignins and the effect of a polysorbate amphiphile in reducing nonproductive binding, *Biomacromolecules*, 2015, 16(12): 3878-3888
- [94] Sammond D W, Yarbrough J M, Mansfield E, et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity, *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(30): 20960-20969
- [95] Kumagai A, Lee S H, Endo T. Thin film of lignocellulosic nanofibrils with different chemical composition for QCM-D study, *Biomacromolecules*, 2013, 14(7): 2420-2426
- [96] Ehmann H M A, Werzer O, Pachmajer S, et al. Surface-sensitive approach to interpreting supramolecular rearrangements in cellulose by synchrotron grazing

- p>incidence small-angle X-ray scattering, ACS Macro Letters, 2015, 4(7): 713-716
- [97] Cheng G, Datta S, Liu Z, et al. Interactions of endoglucanases with amorphous cellulose films resolved by neutron reflectometry and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, Langmuir, 2012, 28(22): 8348-8358
- [98] Cheng G, Liu Z, Murton J K, et al. Neutron reflectometry and QCM-D study of the interaction of cellulases with films of amorphous cellulose, Biomacromolecules, 2011, 12(6): 2216-2224
- [99] Maurer S A, Brady N W, Fajardo N P, et al. Surface kinetics for cooperative fungal cellulase digestion of cellulose from quartz crystal microgravimetry, Journal of Colloid & Interface Science, 2013, 394: 498-508
- [100] Nakagame S, Chandra R P, Kadla J F, et al. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin, Biotechnology & Bioengineering, 2011, 108(3): 538-548
- [101] Li M, Pu Y, Ragauskas A J. Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance, Frontiers in Chemistry, 2016, 4: 45
- [102] Guo F, Shi W, Sun W, et al. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism, Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 38
- [103] Rahikainen J L, Evans J D, Mikander S, et al. Cellulase-lignin interactions-the role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding, Enzyme & Microbial Technology, 2013, 53(5): 315-321
- [104] Pfeiffer K A, Sorek H, Roche C M, et al. Evaluating endoglucanase Cel7B-lignin interaction mechanisms and kinetics using quartz crystal microgravimetry, Biotechnology & Bioengineering, 2015, 112(11): 2256-2266
- [105] Suchy M, Linder M B, Tammelin T, et al. Quantitative assessment of the enzymatic degradation of amorphous cellulose by using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, Langmuir, 2011, 27(14): 8819-8828
- [106] Palonen H, Tjerneld F, Zacchi G, et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin, Journal of Biotechnology, 2004, 107(1): 65-72
- [107] Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Percival Zhang Y H. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling, Analyst, 2009, 134(11): 2267-2272
- [108] Jäger G, Wu Z, Garschhammer K, et al. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with alpha-cellulose and specification of hydrodynamics, Biotechnology for Biofuels, 2010, 3(1): 1-12
- [109] Du R, Su R, Li X, et al. Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment, Cellulose, 2012, 19(2): 371-380

- [110] Maurer S A, Bedbrook C N, Radke C J. Cellulase adsorption and reactivity on a cellulose surface from flow ellipsometry, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, 51(35): 11389-11400
- [111] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents, *Biotechnology & Bioengineering*, 1990, 36(3): 275-287
- [112] Kyriacou A, Neufeld R J, MacKenzie C R. Effect of physical parameters on the adsorption characteristics of fractionated *Trichoderma reesei* cellulase components, *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, 10(11): 675-681
- [113] Ding H. Adsorption and synergism of cellulases during hydrolysis of cellulosic materials [D]; University of California, Davis, 2000.
- [114] Tavagnacco L, Mason P E, Schnupf U, et al. Sugar-binding sites on the surface of the carbohydrate-binding module of CBH I from *Trichoderma reesei*, *Carbohydrate Research*, 2011, 346(6): 839-846
- [115] Linder M, Mattinen M L, Kontteli M, et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I, *Protein Science*, 1995, 4(6): 1056-1064
- [116] Jung H, Wilson D B, Walker L P. Binding mechanisms for *Thermobifida fusca* Cel5A, Cel6B, and Cel48A cellulose-binding modules on bacterial microcrystalline cellulose, *Biotechnology & Bioengineering*, 2002, 80(4): 380-392
- [117] Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Percival Zhang Y H. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling, *Analyst*, 2009, 134(11): 2267-2272
- [118] Srisodsuk M, Lehtiö J, Linder M, et al. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose, *Journal of Biotechnology*, 1997, 57(1-3): 49-57
- [119] Eriksson J, Malmsten M, Tiberg F, et al. Model cellulose films exposed to H. insolens glucoside hydrolase family 45 endo-cellulase--the effect of the carbohydrate-binding module, *Journal of Colloid & Interface Science*, 2005, 285(1): 94-99
- [120] Cascão Pereira L G, Hickel A, Radke C J, et al. A kinetic model for enzyme interfacial activity and stability: pa-hydroxynitrile lyase at the diisopropyl ether/water interface, *Biotechnology & Bioengineering*, 2002, 78(6): 595-605
- [121] Castells V, Yang S, Van Tassel P R. Surface-induced conformational changes in lattice model proteins by Monte Carlo simulation, *Physical Review E Statistical Nonlinear & Soft Matter Physics*, 2002, 65(3): 031912
- [122] Soderquist M E, Walton A G. Structural changes in proteins adsorbed on polymer

surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1980, 75(2): 386-397

- [123] Lin Y, Silvestre-Ryan J, Himmel M E, et al. Protein allostery at the solid-liquid interface: endoglucanase attachment to cellulose affects glucan clenching in the binding cleft, *Journal of American Chemical Society*, 2011, 133(41): 16617-16624

## 发表论文和参加科研情况说明

### 一、学术论文

- [1] 苏荣欣, 陈眯眯, 黄仁亮, 齐崑, 王梦凡, 何志敏. 木质纤维素薄膜制备与酶解过程的 QCM-D 分析进展. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2017, 接收.
- [2] Yaping Shang, Mimi Chen, Rongxin Su, Renliang Huang, Wei Qi, Zhimin He. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Ethanol-assisted FeCl<sub>3</sub> Pretreatment. *Chemical Engineering Transactions*, 2017, accepted. (EI 收录)
- [3] 郭红, 黄仁亮, 陈眯眯, 苏荣欣, 齐崑, 何志敏. 表面活性剂强化微晶纤维素和玉米芯酶解过程研究. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201601-89>.
- [4] Mimi Chen, Rongxin Su, Renliang Huang, Wei Qi, Zhimin He. Adsorption of Cel7A and Cel7B on cellulose studied by QCM-D: Effects of pH and inhibitors. *Langmuir*, 2017, in preparation.

### 二、参与的科研项目

- 1. 国家自然科学基金“木质纤维素高固酶解过程扩散-吸附-反应的分析与调控”(项目编号: 21276192)
- 2. 教育部新世纪优秀人才项目“纤维素乙醇生产的过程强化与机理分析”(项目编号: NCET-11-0372)
- 3. 化学工程联合国家重点实验室开放课题“高浓度纤维素酶解历程扩散、吸附与反应的相互影响及动力学研究”





## 致 谢

时光飞逝，硕士研究生的学习和生活已经接近尾声，三年来，在老师和同学的帮助下，我收获颇丰。在此论文即将完成之际，谨以此致谢词表达我最真诚的谢意！

首先感谢我敬爱的导师苏荣欣教授。从研究生期间课题的选择到毕业论文的最终完成，苏老师都给予了悉心的指导。苏老师思维敏捷，见解独到，实事求是，待人真诚，三年来，老师认真、严谨、热情、负责的科研态度和谦逊、宽容的人格魅力深深地感染着我，在此，向我的恩师表示深深的感谢！

感谢课题组何志敏教授，在何老师的带领下，酶工程与技术课题组已经历二十余载，培养了一大批优秀的学子。何老师高瞻远瞩、统揽全局的管理能力使得课题组朝气蓬勃、发展日新月异、科研硕果累累。

感谢课题组齐崴教授，齐老师在科研上认真严谨、远见卓识，组会上老师的点拨常常别具一格让人耳目一新，齐老师在工作上兢兢业业、不辞辛苦，为课题组的发展和每位学生的学业尽心竭力。在此，向齐老师表达最诚挚的感谢！

感谢课题组黄仁亮老师不厌其烦地指导。感谢王梦凡老师对我研究工作的引导，她丰硕的研究成果和雄厚的知识储备为我们树立了榜样。感谢王跃飞老师对我学习、科研和生活上的帮助。

感谢课题组同学的无私帮助。刘伯实、叶慧君、杨真真、石瑟、刘明月、夏寅强、尤生萍、张成玉、崔美、屈彦宁、王祥超、孔佳、杨仁俊、霍庆城、孙槐胜等师兄师姐在我实验过程中给出了诸多指导和帮助，以及课题组其他的师弟师妹在此一并谢过。谢谢我的同学刘志强、赵文斌、张艺菲、方洁、岳彦霏、贾佳佳、张培倩，研究生生涯因有你们的陪伴而格外灿烂多姿。

特别感谢我男朋友刘冠华师兄，师兄在 QCM-D 的操作、清洗和维修以及 Polymath 软件的使用中给予了我极大的帮助，尤其谢谢师兄的陪伴和照顾。感谢精馏中心的隋红、郭佳老师，谢谢博士生王君妍和白云，是他们的鼎力帮助使得我的课题得以顺利进行。

最后，感谢我的家人对我的支持和鼓励，祝福他们身体健康，称心如意！

诚挚祝愿酶工程与技术课题组的明天更加辉煌！

**陈眯眯**

2017 年 5 月于天津大学