

天然结晶纤维素的生物合成及其去晶化途径*

陈 玉 张怀强 赵 越 高培基 王禄山**

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 纤维素是高等植物细胞壁的结构骨架和重要组成成分, 由细胞质膜上的纤维素合成酶合成. 一个纤维素合成酶亚基合成一根纤维素分子链, 多个亚基聚集在一起形成末端复合体(TC), 可同时合成多根葡聚糖分子糖链, 其在氢键和范德华力作用下快速有序堆积, 形成结构紧密的天然微纤丝结晶结构. 质膜上有序线性排列的超分子 TC 合成结晶纤维素 I α , 而玫瑰花型排列的 TC 合成结晶纤维素 I β . 结晶微纤丝的密切有效堆积是植物抗降解的天然屏障. 高浓度的酸和离子液体可以在微纤丝间有效扩散, 破坏晶体分子链的有序堆积、分子间氢键网络, 甚至打断晶体内部的糖苷键, 完成天然结晶纤维素的去晶化及解聚过程. 酶分子的去晶化过程是发生在微纤丝特定表面上的非均相反应过程, 可在常温常压下固或液表面上快速完成, 但有效可及表面积是其主要限速瓶颈. 因此结合物理、化学方法预处理, 低成本高效打破限制酶分子有效扩散的屏障, 增加酶分子对结晶纤维素特异性结合的效率 and 有效可及面积, 从而实现天然结晶纤维素高效去晶化及绿色快速降解转化.

关键词 纤维素合成酶复合体, 生物质抗降解屏障, 结晶纤维素, 去晶化, 绿色化工

学科分类号 Q6-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0013

植物生物质是地球上含量最丰富的可再生资源之一, 每年产量可达 2 000 亿吨^[1]. 植物细胞壁纤维素的合成与降解也是自然界碳循环的中心环节, 是保障生态链得以持续进行的重要限制因素. 充分利用这些生物质资源, 绿色生产高附加值的生物基原料与化工产品, 不仅可以替代化石燃料减少温室气体的排放, 而且对带动农村经济发展, 保护环境、保障国家资源、能源安全等具有重要意义^[2-3]. 但是植物在长期进化过程中形成了结构复杂、成分多样的细胞壁结构保护植物细胞, 产生降解转化过程的天然抗降解屏障(biomass recalcitrance)^[1]. 其中结晶纤维素构成植物细胞壁主要骨架, 是植物生物质高效转化利用过程的主要限速屏障之一^[4].

1 纤维素合成酶与结晶纤维素合成过程

天然纤维素是葡聚糖链聚集形成的化学成分单一, 但结构层次多样且异质性的化合物, 在其合成过程中, 多根葡聚糖链几乎同时合成、聚集并结晶形成超分子复合物^[5]. 20 世纪 70 年代以前, 研究者普遍认为高等植物细胞壁纤维素的合成发生在细胞质膜表面, 但缺少充分实验证据^[6]. Brown 等^[7]利用冷冻蚀刻技术在电镜下观察到, *Oocystis*

apiculata 细胞壁纤维末端生长点周围的质膜上存在大量颗粒聚集, 形成长 500 nm、宽 30~35 nm 的颗粒复合体. 由于该复合物始终位于纤维末端生长点周围, 故命名为末端复合体(terminal complexes, TCs).

大量研究表明, TCs 就是负责结晶纤维素合成的纤维素合成酶复合体(CelS)^[7-10]. 突变分析和免疫标记显示, 高等绿色植物 CelS 至少存在三种纤维素合成酶(CesA)亚型(α 1, α 2, β)参与细胞壁纤维素的合成^[11]. 每个 CesA 含 985~1 088 个氨基酸, 可合成一条葡聚糖链. 随着物种进化, 质膜上单个 CesA 亚基发生有规律聚集, 其合成的糖链也不再以单根分子链形式存在, 而是发生分子链的有序聚集, 而且这种有序聚集行为是自发的. 在生物进化的早期, 3~10 个 CesA 聚集形成一个 TC(图 1a), 合成 3~10 nm 宽的基元纤丝(element fibre). TC 复

* 国家自然科学基金(31370111), 国家科技重大专项(2013ZX10004217)和山东大学基本科研业务费资助项目自然科学基金专项(2015YQ004)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-17, 接受日期: 2016-07-06

合物的亚基进一步聚集, 形成两种截然不同的 TCs (图 1b): 线性排列的末端复合体(linear TCs)和玫瑰花型排列的末端复合体(rosettes TCs)^[5]. 线性 TCs 主要分布于藻类、低等植物、披囊动物和海鞘的细胞质膜上, Brown 等^[7-8]最先在绿藻 *Oocystis apiculata* 细胞质膜上发现了排列成 3 行的线性 TCs (图 1c), 每行含 30 个直径 7 nm 的 CesaA 颗粒聚集体, 合成宽约 25 nm 的 3 条基元纤丝, 并随即聚合成一条细带状的微纤丝(microfibre). Tsekos 和 Reiss^[12]在红藻 *Erythrocladia subintegra* 中发现了结构形态非常独特的线性 TCs, 它由 30~140 个(平均 50 个)CesaA 颗粒排列成 4 行, 构成一个长 180 nm、宽 35 nm 的线性 TCs, 平均合成含 50 条葡萄糖链的微纤丝, 微纤丝在分子链间氢键作用下进一步聚集组装, 形成微纤丝宽度最大可达 68 nm. 另外在部分褐藻中, 线性 TCs 一般由单行聚集的 CesaA 颗粒构成, 合成极细的微纤丝^[13]. 高等植物细胞壁纤维素主要由玫瑰花型 TCs 合成^[5, 14]. Sleytr 和 Kiermayer^[15]在 *Micrasterias* 中观察到微纤丝末端存在呈六边形排列的玫瑰花型 TC, 合成直径约 5 nm 的微纤丝. Giddings 等^[8]指出, 初生细胞壁合成时仅有单个玫瑰花型 TC 合成单根微纤丝, 在次

生细胞壁合成时玫瑰花型 TC 排列成行(图 1c), 合成单根微纤丝相互交联形成更大的微纤丝. 一般认为, 玫瑰花型 TCs 为大多数植物细胞壁中纤维素合成酶在合成微纤丝时的模型^[16]. 高等植物细胞质膜玫瑰花型 TCs 含 6 个 CelS 亚基, 并且呈中空的玫瑰花型排布, 每个 CelS 亚基由 6 个 CesaA(3 种亚型, $\alpha 1 : \alpha 2 : \beta = 1 : 2 : 3$)组成, 同时合成 36 根糖链^[9]. 这些糖链随后在氢键与范德华力作用下共结晶形成直径约 3 nm 的结晶微纤丝^[9].

CesaA 合成葡聚糖链的过程发生在细胞质膜内侧(图 1d), 底物是 UDP-Glc, CesaA 在膜内含有糖苷转移酶结构域 (glucosyltransferase domain, GT-domain), 一次催化添加 1 个葡萄糖进行糖链的延伸. 葡聚糖链在新的 UDP-Glc 进位后才从活性位点处移位, 向胞外延伸生长. 在通过活性孔道进入到细胞膜外时, 单根葡聚糖链经诱发产生扭转. 通过转移结构域(transfer domain)或相邻的其他糖链辅助使其定向生长, 最终在膜外与相邻糖链自发聚集形成结晶微纤丝结构^[17]. 而相邻葡聚糖链分子间自发进行的有序聚集行为, 目前仍旧缺乏明确的生物学解释.

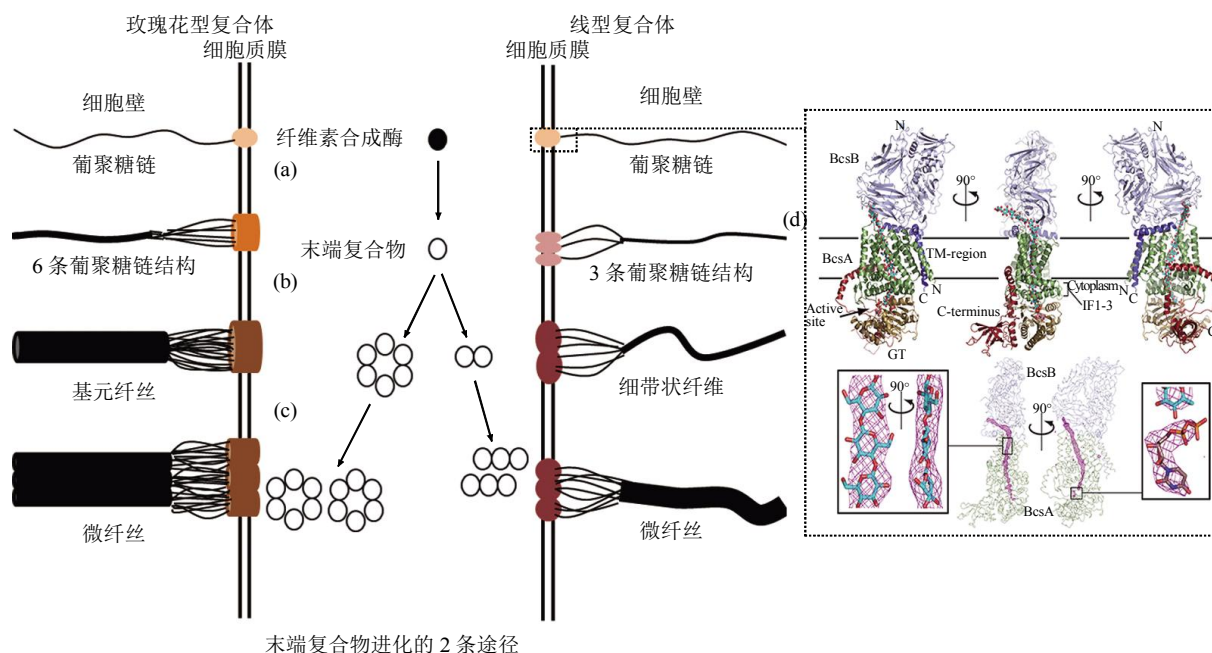


Fig. 1 The evolution of TCs and the structure of CesaA(Modified from ref [5, 17])

图 1 末端复合体进化与纤维素酶合成酶的结构(改绘自参考文献[5, 17])

(a)CesaA 合成 1 根葡聚糖链, 3~10 个 CesaA 聚集成一个 TC, 合成数量不同的糖链. (b) TC 排列成 CelS, 低等藻类和高等植物在此分支, 前者合成纤维横截面呈长方形; 后者合成纤维横截面呈六边形. (c) 2 种 TCs 进一步排列聚合成更复杂的结构, 合成更大规模的纤维, 并在糖链数目、聚合方式、微纤丝结晶结构等方面存在差异. (d) *Rhodobacter sphaeroides* 纤维素合成酶 BcsA-B 含 2 个亚基: BcsA 是合成酶亚基, 包括跨膜螺旋结构域、糖基转移酶结构域(GT-domain)和 1 个 C 端; Bcs-B 是转移亚基, 一部分锚定在细胞膜上, 另一部分位于周质空间. 合成葡聚糖链时, UDP-Glc 进入膜内糖链末端的同时, 葡聚糖链被转运到细胞质膜外.

2 结晶纤维素的超微结构层次

在天然状态下 CesA 合成线性葡聚糖链的聚合度(degree of polymerization, DP, 即聚合物分子链上所含重复单元数目的平均值)可达上万, 即上万个葡萄糖残基通过 β -1, 4-糖苷键相连形成纤维素单链, 无分支结构^[18]. 因此可将其糖链的共价连接结构与蛋白质的一级共价结构类比, 该结构层次可称为纤维素的一级结构(图 2a), 聚合度的测定可利用总糖量除以还原糖量进行估计^[19].

纤维素分子链由于含有大量羟基, 新合成相邻的分子链间可产生大量分子间氢键, 形成有序自组织聚集体, 特别是相邻糖链的 O6-H \cdots O3 链间易于形成氢键, 使纤维素分子间形成稳定的片层结构^[20], 这与蛋白质 β 折叠的结构层次类似, 称为纤维素的二级结构(图 2b). 在糖链片层结构中链间具有多个氢键, 一般平均每个糖残基能够与相邻糖链形成 1 或 2 个(3 位的 O 与相邻链糖环 6 位 OH 间氢键)氢键^[18, 20]. 另外, Nishiyama 等^[21]指出糖链间也具有大量的弱氢键作用. 分子间氢键数量的变化一般利用红外光谱(FTIR)进行定性的表征, 以—CH 基团振动峰($2\ 900\ \text{cm}^{-1}$)为内标, 如—OH 基团的振动峰($3\ 200\sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$)向着高波动移动, 分子间氢键变弱, 向着低波动移动, 分子间氢键变强^[19].

纤维素分子的片层结构在范德华力等疏水力作用下自发有序地紧密堆积, 形成天然结晶纤维素结构, 有序结晶的程度可通过 X 射线粉末衍射(XRD)法测定的结晶度(CrI)来表征^[19]. 高度有序的天然结晶结构可以限制 H_2O 分子甚至是 H^+ 在分子链片层内部的有效扩散, 从而形成结晶纤维素抗酶解及抗酸解的屏障^[3]. 纤维素片层通过范德华力等次级键相互作用形成的有序堆积方式, 可以称为纤维素的三级结构层次(图 2c).

Atalla 和 VanderHart^[22]利用高分辨的 ^{13}C 固态 NMR 谱测定 *Valonia* 结晶纤维素, 发现存在两种晶态的微纤丝, 即含量占优势的 $\text{I}\alpha$ 和含量较少的 $\text{I}\beta$. 进一步的研究表明, 两种晶态具有相似的化学结构, 仅是氢键模式不同^[23]. $\text{I}\alpha$ 结构处于亚稳定状态, 如上文所述主要由某些藻类、披囊动物细胞质膜上线性 TCs 合成, 在碱性溶液中经热处理(约 260°C)或在有机溶剂和氦气中经热处理可以转换为 $\text{I}\beta$ 晶型, $\text{I}\beta$ 晶型主要由高等植物细胞质膜上玫瑰花型 TCs 合成^[24]. $\text{I}\alpha$ 、 $\text{I}\beta$ 可以存在于

同一纤维素样品甚至同一微纤丝中^[25]. 天然纯 $\text{I}\alpha$ (*Glaucocystis*, 约 90%)、 $\text{I}\beta$ (*tunicin*, 约 90%) 结晶纤维素的发现极大地促进了结晶纤维素的研究进程^[26-27]. Nishiyama 及其同事对两种天然纯结晶纤维素进行处理, 利用同步加速器 X 衍射和中子衍射纤维技术给出了迄今为止最为精确的 $\text{I}\alpha$ 、 $\text{I}\beta$ 晶格结构特点^[28](表 1).

Ding 等^[29]基于前人结果提出了天然结晶纤维素的三级结构模型——纤维素基元纤丝(*cellulose elementary fibril*, CEF)模型(图 2c): 36 根糖链聚集形成 8 个糖链片层, 片层经氢键网络和范德华力作用堆积为空间结构呈现相对规则的六面体, 包含中央结晶核心、次结晶和亚结晶区. 中央结晶核心的氢键数目多, 糖链排列紧密不易被外界接触和打破; 次结晶和亚结晶区纤维素糖链排列散乱, 氢键数目少, 易受到外界攻击断键并水解^[30]. 基元纤丝横切面长约 5.3 nm, 宽 3.2 nm, 包括 2 个疏水面(100 面及其对称面-100 面)和 4 个亲水面(110 面及其对称面-1-10 面、-110 面及其对称面 1-10 面)^[29]. 基元纤丝不同结晶表面上暴露葡萄糖残基的功能基团种类、数量及其排列方式明显不同, 这也是不同结晶表面性质不同的分子结构基础, 同时微纤丝还会发生进一步扭曲使自身能态处于最低能态^[31](图 2d).

天然存在的结晶微纤丝极少如规则六面体状基元纤丝模型聚集排列, 常常在合成过程中受环境等因素影响, 限制沿着不同晶面聚集生长或沿着某一轴向扭转, 形成天然多样的微纤丝结构. 微纤丝结构可利用电镜直接观测分析, 微纤丝中晶胞数目不同、晶面聚集方向不一致, 形成了大小不同与形状不同的微纤丝^[32]. 天然存在的微纤丝间并不能够进一步紧密聚集, 这使得微纤丝成为细胞壁中的基本结构单元(图 3), 这种微纤丝的聚集体结构可称为天然结晶纤维素的四级结构(图 2e, 2f). 四级结构微纤丝之间存在一定间隙, 有效距离及孔隙一般小于 10 nm, 可以方便水分子的扩散, 这明显限制了 nm 级酶分子或更大复合物(如纤维小体)的有效自由扩散, 限制了酶分子在特定表面上的结合效率. 这种四级结构层次的限制屏障可以利用纤维素可及度(*accessibility*)进行表征^[19].

Himmel 小组利用 3D 电子断层技术构建了纤维素微纤丝原子模型, 在纳米层次观察到定向排列的微纤丝几何结构的确实会发生螺旋状扭曲(图 2f)而

造成微纤丝宽度的改变，微纤丝的扭曲构象同时也形成了纤维素结晶和非晶两种晶态^[31]。另外，天然

结晶微纤丝合成表面还会黏接部分半纤维素和木质素，形成高等植物细胞壁的主体结构。

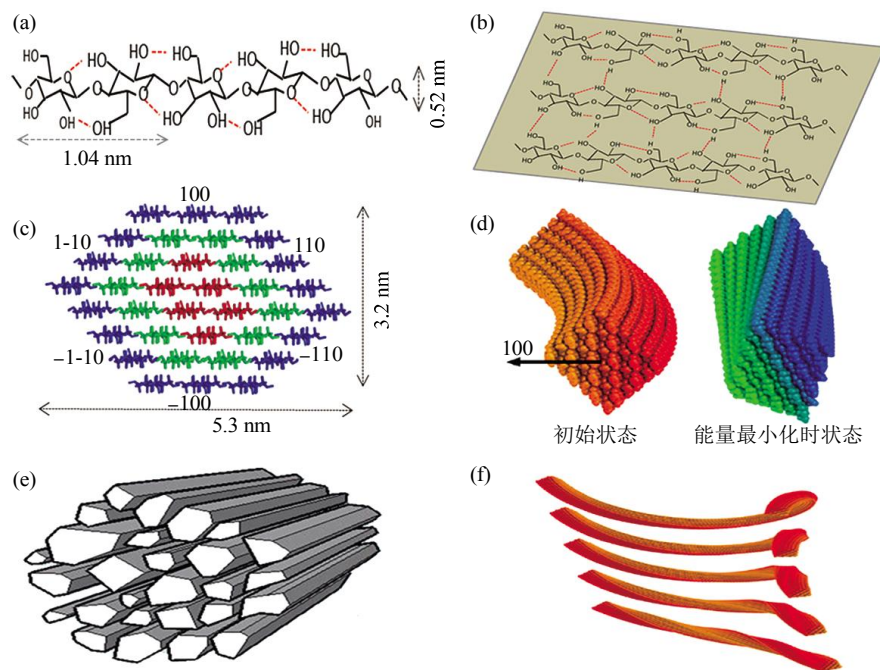


Fig. 2 The schematic representation for crystalline cellulose ultrastructure and microfibre twist (Modified from ref [18, 31, 33])

图 2 结晶纤维素超微结构与微纤丝扭曲模式图 (改绘自参考文献[18, 31, 33])

(a) 纤维二糖以 β -1, 4-糖苷键连接形成纤维素一级结构。(b) 相邻糖链在链间氢键作用下聚集形成二级片层。(c) 36 根糖链形成横截面为六边形的三级单元纤维结构。(d) 微纤丝出现不同的扭曲。(e) 微纤丝聚合形成四级结构。(f) 微纤丝沿长轴发生定向扭曲。

Table 1 The lattice parameters of cellulose I^[28]

表 1 I 型纤维素同质异形体的晶胞参数^[28]

晶型	空间群	糖链数目	单位晶胞参数					
			<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
I α	P1	1	6.72Å	5.96Å	10.4Å	118.08°	114.8°	80.375°
I β	P2 ₁	2	7.78Å	8.20Å	10.38Å	90°	90°	96.5°

3 结晶纤维素的去晶化途径及其效率

当前针对木质纤维素去晶化的预处理过程，已有多种大规模应用的技术方法，主要包括两大类：物理化学法与生物法^[34-35]。物理化学法包括热酸、热水、汽爆、碱处理、离子液体等，主要是利用高温、高压或高离子强度，增加 Å 级大小的分子、离子或更小的 H⁺ 等在微纤丝孔隙内的浓度或运动速度，从而提高其破坏微纤丝晶体氢键网络的几率。物理化学法对木质纤维素原料的来源没有过多的限制，但由于原料、反应、传质过程复杂等原

因，导致反应过程不易控制或设备工艺成本较高。生物法所需的反应条件较物理化学法相对温和^[36-38]，生物法主要是利用酶催化将不溶性木质纤维素去晶化并水解形成可溶性糖。由于木质纤维素致密而复杂的结构层次，纳米尺度上的酶分子并不能够高效扩散至每一根微纤丝的疏水结合面，因此酶反应常常仅发生在细胞壁的外表面，这种非均相的生物降解过程不能够使结晶纤维素的结晶度明显降低。

3.1 酸处理结晶纤维素

大量研究表明，磷酸、浓硫酸能够破坏纤维素、半纤维素和木素间的连接，并进一步破坏结

晶纤维素高度有序的氢键网络使其转变为无定形结构(或非晶结构), 使纤维素易于在温和的条件下水解^[36-37]. H^+ 质子处于 Å 以下水平, 能够在微纤丝间(纤维素四级结构)的空隙内自由扩散, 改变表面有序排列的结晶结构并使其无定型化, 如果进一步提高温度可使得 H^+ 进一步渗入微纤丝片层间, 即进入三级结构内部, 破坏纤维素二级片层间结构, 使有序排列的葡聚糖之间氢键破坏, 使得整根微纤丝的高级结构解聚, 形成无定型化葡聚糖. 提高温度并加大酸的浓度(表 2), H^+ 可以进一步进攻 β -糖苷键的 O 原子, 使其随机断裂, 最终形成可溶性的寡糖或接近理论的单糖量^[3]. 研究表明, 加大酸的浓度或提高反应体系的温度, 可以加快结晶纤维素水解的速率, 因为前者提高了整个环境中 H^+ 的浓度, 后者可以增加 H^+ 攻击氢键和糖苷键的几率. 在酸催化纤维二糖水解糖苷键的分子动力学模拟中, 发现酸解过程分为两步: 首先溶剂中的质子转移给纤维二糖, 糖苷键断裂形成 1 个 β -葡萄糖和 1 个质子化的葡萄糖; 接着质子化葡萄糖解离成 1 个 α -葡萄糖和酸质子. 整个酸解反应式为 $[C_6H_{12}O_6]_n + H_3O^+ = C_6H_{12}O_6 + [C_6H_{12}O_6]_{n-1} + H^+ + H_2O$, 所需的活化能为 136.5 kJ/mol^[39].

浓硫酸、磷酸可作为理想的结晶纤维素去晶化的溶剂, 通过测定酸解产物的聚合度发现前者能够快速水解结晶纤维素产生可溶性寡糖, 后者则主要使结晶纤维素无定型化. 这主要因为硫酸是强酸, H^+ 质子含量较磷酸高, 硫酸所含的大量 H^+ 质子不仅能够打破微纤丝间紧密堆积形成的四级结晶结构, 还能够渗透进入微纤丝内部破坏二级片层间的氢键网络, 同时断裂糖苷键产生接近理论的可溶性糖(表 2), 而磷酸由于 H^+ 质子浓度低, 三级结构形成的屏障降低其渗透效率, 因而主要形成无定型纤维素. 利用酸降解结晶纤维素(如棉花、木材等)不仅具有价格低廉、低温溶解、产量高、耗时短等优点, 还能够生产大量高值的寡糖产品^[40], 但需要回收大量的溶剂、降解废料易对环境造成破坏, 另外进行化学循环的设备价格也十分昂贵. 因此, 在水解过程中减少酸的用量, 并基于 Aspen-plus 加工模型进行相关的经济学分析对解决上述问题是非常有意义的^[36].

3.2 离子液体对结晶纤维素的去晶化过程

离子液体(ionic liquids, ILs)是一种有机盐类物质, 使用过程中一般不会蒸发而散失, 可以取代挥发性有机溶剂, 作为化学反应或分离过程的溶剂,

可以循环使用, 故常被认为是绿色溶剂^[38]. ILs 从源头上根除了化学反应对环境的污染, 这符合当前绿色发展的主题^[41]. ILs 低温下为液态, 但部分 ILs 在室温下也为液态; 其离子大小一般处于 Å 水平, 可以进入微纤丝内部将天然结晶纤维素无定型化, 并与纤维素三级结构的疏水表面发生弱相互作用, 通过强碱性作用破坏纤维素二级片层间的氢键网络. 常见的 ILs 如 Cl^- 能够与纤维素糖环上的一OH 形成氢键, 破坏糖链内链间氢键网络, 咪唑鎓盐可以与纤维素的疏水表面发生弱的疏水相互作用, 其 C-2 位质子也可作为弱的氢键供体与糖环上的羟基发生作用^[38, 42-43].

羧甲基纤维素钠(CMC)是葡萄糖聚合度为 100~2 000 无定型纤维素的衍生物, 是当今世界上使用范围最广、用量最大的纤维素产品^[44]. 工业生产 CMC 时常利用 ILs 作为介质溶剂, 导出碱化、醚化反应过程中产生的热量. 与传统的水媒法相比, 以 ILs 为介质的传热过程更加迅速、稳定, 所得产品均一性、透明度及溶解性能好, 可用于中高档次 CMC 的生产^[45].

基于 ILs 高效溶解结晶纤维素的能力(表 2), 常用其对结晶纤维素进行预处理, 再结合纤维素酶对底物进行水解. 但大多数 ILs 对纤维素酶具毒害作用, 使酶活性丧失^[46-48]. 基于现有条件, 工业化生产中若完全去除 ILs 难度较大, 因为这需要消耗大量的水、反溶剂和相当复杂的循环系统^[49]. 在酶解天然纤维素的过程中, 纤维素的无定型化是其高效转化的基础, 但经 ILs 处理获得的无定型纤维素却不能利用纤维素酶直接进行降解, 因此一些研究者设计了在 ILs 存在下更稳定的纤维素复合酶系, 从而抵抗 ILs 的毒害作用, 获得高的葡萄糖转化量^[50]. 另外, 设计对酶作用较为温和的 ILs 也是未来结晶纤维素降解研究的方向.

3.3 生物酶法水解结晶纤维素

虽然酸、ILs 能够完成结晶纤维素的去晶化, 并且具有快速高效等优点, 但回收利用设备昂贵、副产物多等缺点使其不能满足降解转化生产单糖的要求, 因此目前结晶纤维素降解转化为单糖化合物的绿色工艺, 还是主要采用生物酶法^[36, 46, 48-49]. 不同于酸解和 ILs 降解结晶纤维素生产高值的高聚物, 纤维素降解酶类可以水解低值木质纤维素, 如秸秆等农业废弃物中的木质纤维素等, 绿色生产大宗单糖类制品.

Table 2 The influence of crystalline cellulose conversion under chemical treatments

表 2 化学处理对结晶纤维素转化率的影响

处理	底物	溶剂名称	反应条件	葡萄糖转化率 /%
酸	大麻秆	84%磷酸	50°C; 60 min; 酶解 24 h	96 ^[51]
	麦秸	80%硫酸	常温; 30 min	79 ^[52]
	麦秸	0.75%硫酸	121°C; 1 h	74 ^[53]
	橄榄树	1.4%硫酸	210°C	76.5 ^[54]
	玉米芯	10%硫酸	90°C; 300 min	10 ^[55]
	柳枝稷	70%磷酸+30%硫酸	常温; 24 h	80 ^[55]
	橡木	75%硫酸		34.53 ^[56]
	松木	80%硫酸	80°C; 30 min	29.94 ^[56]
	空果穗	80%硫酸		31.68 ^[56]
离子液体	纤维素类生物质	1- 丁基 -3- 甲基咪唑甲磺酸盐	120°C; 22 h	90 ^[57]
	甘蔗渣	1- 乙基 -3 基咪唑醋酸盐	90°C; 6 h; 酶解 96 h	95.2 ^[58]
	纤维素	1- 丁基 -3- 甲基咪唑氯化盐		100 ^[59]
	微晶纤维素	1- 乙基 -3- 甲基咪唑乙酸盐	90°C; 24 h; 酶解 5 h	90.72 ^[59]
		1- 丁基 -3- 甲基咪唑甲酸盐		88.92 ^[59]
	麦秸	1- 丁基 -3- 甲基咪唑氯化盐	2 min; 酶解 48 h	42.78 ^[60]
	麦秸	N- 烯丙基 -N- 甲基吗啉醋酸盐	10 min; 酶解 48 h	70.37 ^[60]
	麦秸	1- 乙基 -3- 甲基咪唑磷酸二乙酯	130°C; 30 min; 酶解 12 h	54.8 ^[61]
	麦秸	1- 乙基 -3- 甲基咪唑乙酸盐	158°C; 3.6 h	71.4 ^[62]

纤维素酶种类多样, 根据其分子质量分为游离纤维素酶和复合型纤维素酶, 根据作用方式分为外切纤维素酶、内切纤维素酶、持续性降解的内切纤维素酶和 β - 葡萄糖苷酶^[63]. *Trichoderma reesei* 是高效降解结晶纤维素的模式微生物, 其胞外游离纤维素酶系包括 2 种外切纤维素酶(CBHs)、5 种内切纤维素酶(EGs)、1 种 β - 葡萄糖苷酶(BG)^[1]. 研究表明 EGs 水解纤维素非晶区的糖链, 为 CBHs 创造游离的还原端和非还原端位点, CBHs 与糖链两端结合, 持续性地降解纤维素结晶区糖链释放纤维二糖, 导致纤维素酶降解结晶纤维素是一个逐层剥离糖链的表面有限非均相过程^[64-65]. Igarashi 等^[66]利用高速原子力显微镜 (high speed atomic force microscopy, HS-AFM) 观察到 *Trichoderma reesei* CBH I 在单根结晶微纤丝上持续性运动过程, 当加入过量酶分子时在特定晶面上聚集并产生降解效率低下的现象, 称其降解过程在特定晶面上发生了“交通堵塞” (traffic jams). 本课题组的研究发现, 利用木霉胞外酶系完成结晶纤维素的部分降解后, 再添加新酶组分, 降解效率较先前酶解过程会明显降低, 导致了酶解效率低下或酶分子失活^[67-68].

天然存在细胞壁结构都是由成千上万根结晶微

纤丝聚集形成的超分子复合体, 仅研究一根结晶微纤丝的酶解特性并不能完全表征天然纤维素在纤维素酶降解过程中的问题. 本课题组利用 *Trichoderma reesei* 胞外游离复合酶系对天然结晶纤维素 CF11 进行降解研究(图 3a). 酶解后发现, 细胞壁横截面微纤丝间距离由外及里存在很大差异: 靠近外部约 1 μm 内的微纤丝明显被水解(图 3b), 微纤丝排列疏松; 而内部微纤丝未被水解, 依旧紧密排列(图 3c); 该现象说明天然结晶纤维素的四级结构对纤维素酶系有效扩散同样形成了屏障. 测量发现 CF11 横截面微纤丝间距离约 14.3 nm, 对比纤维素酶分子大 2~3 倍, 酶分子可以扩散进入微纤丝之间, 但是扩散效率较低(图 3d). 根据文献报道, 直径为 3 nm 的圆柱体可供进入的分子最大半径为 1.31 nm, 即窄的孔隙空间明显限制了生物大分子的有效扩散^[69]. 因此酶分子在降解结晶纤维素时, 为了逐层逐根从微纤丝上剥离单根糖链并降解, 酶分子在微纤丝间的(四级结构层次上)有效扩散、结合特定晶面、并持续性高效降解是游离纤维素酶高效降解的前提.

与游离酶系相比, 复合纤维素酶, 如纤维小体 (cellulosome), 分子质量可达几百 ku, 直径约几十

个纳米左右; 含有多种糖苷水解酶、粘连对接模块、支架蛋白、碳水化合物结合模块等结构, 具有高效降解结晶纤维素的能力^[70-72]. 根据结晶的超微结构分析, 其降解的相关反应只能发生在胞壁外层微纤丝的表面, Resch^[64]小组在研究纤维小体降解纤维素过程中发现结晶纤维素表面出现了孔洞, 认

为纤维小体能够在结晶纤维素表面一次性断裂多根微纤丝. 近年来的研究表明, 纤维小体含有的多种纤维素酶系、局部高浓度酶量以及纤维素酶系间的协同作用是其克服结晶纤维素四级结构屏障, 有效降解纤维素底物的重要原因^[73].

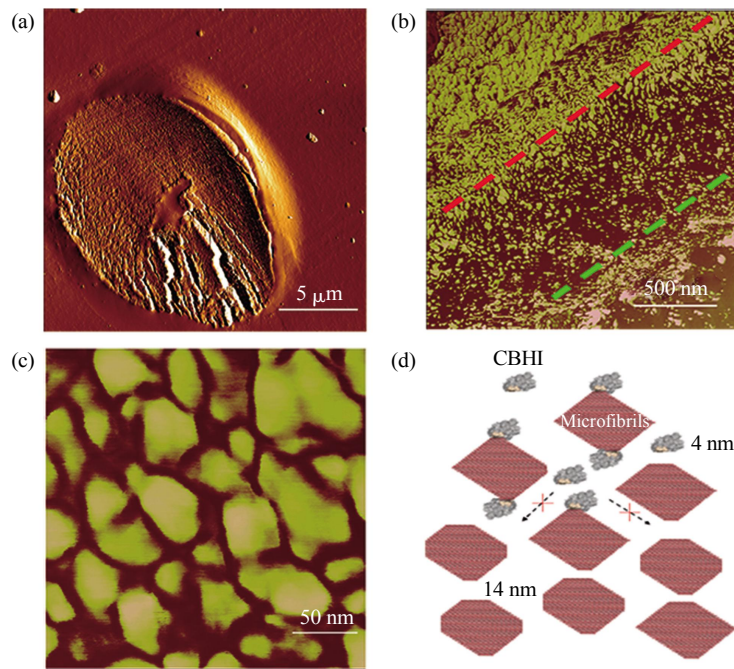


Fig. 3 The cotton fibre space arrangement and the mode of diffusion barrier

图3 棉纤维细胞壁结构中微纤丝空间排布及酶分子扩散屏障模式图

(a) 棉纤维树脂包埋切片 AFM 图像显示纤维细胞横切面. (b) 酶解后的棉纤维细胞壁切面 AFM 图像, 两虚线间是有效酶解区域. (c) 图 b 局部微纤丝放大 AFM 图像, 微纤丝间紧密有序排列. (d) 微纤丝束(四级结构)的有限空隙影响 CBHI 分子有效扩散的示意图. (本课题组数据, 未发表).

4 总结与展望

植物细胞壁在长期进化过程中, 为适应地球环境变化和抵抗外界生物的伤害, 逐渐产生了结构层次复杂的木质纤维素结构. 其中 TC 复合物产生的多根葡聚糖链在合成的同时聚集形成结晶微纤丝, 并构成植物细胞壁的核心“骨架”, “骨架”外侧粘附了化学结构单元复杂、连接键型多样的半纤维素与木质素(图 4a), 最终形成木质纤维素天然的抗降解屏障. 木质纤维素合成酶结构及其催化合成葡聚糖链过程的阐明, 为认识木质纤维素化学组成及结构层次奠定了基础, 也为其绿色、高效降解转化途径的设计指明了方向. 基于不同处理方法的优

势, 综合利用物理化学、生物学等方法就可能设计出绿色、高效的结晶纤维素去晶化工艺. 稀酸或离子液体能够快速在微纤丝间高效扩散并破坏结晶纤维素的一、二、三级结晶结构(图 4b), 从而实现纤维素的快速溶解. 因此稀酸、离子液体等化学去晶化处理可用于纯结晶纤维素生产聚糖衍生物、高分子化工产品、绿色生物基制品等. 当然进一步优化工艺条件、研发新型设备等提高相关原料的绿色高效回收效率、降低生产与环境污染成本将是未来重要的研究方向. 生物酶法处理秸秆类天然结晶纤维素时, 纤维素四级结构形成了纤维素酶高效扩散的瓶颈, 导致游离酶系只能结合于微纤丝的表面, 由表及里逐层剥离糖链(图 4c), 并出现酶解效率降

低、酶分子失活等问题, 纤维小体等复合型纤维素酶系同样受扩散影响, 也只能在细胞壁表面断裂微纤丝(图 4d). 如何利用低成本预处理工艺高效打开酶分子或纤维小体超分子的高效扩散通道、促进生物酶分子甚至相关微生物在纤维素表面高效吸附、催化与降解, 这仍然是一个亟待解决的科学问题. 因此, 系统研究纤维素酶与纤维素表面相互作用、

运动行为及对纤维素酶解效率的影响等进行相关性分析, 探讨单一和复合纤维素酶与纤维素表面之间的相互作用和协同机制等, 发展并完善纤维素酶及酶系的催化水解理论, 将为提高纤维素酶催化水解效率、优化木质纤维素生物质能源的降解与生物基化工产品的生产提供科学依据和理论指导.

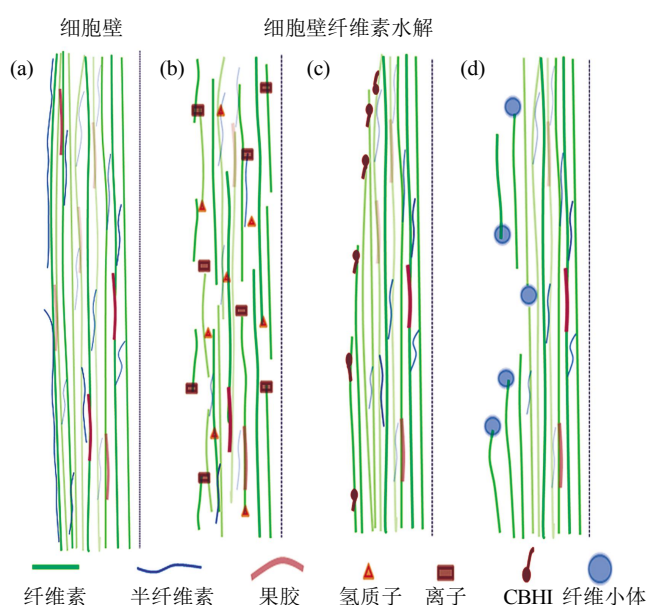


Fig. 4 The schematic representation for cell wall cellulose hydrolyzation under different treatments^[64]

图 4 不同处理下细胞壁纤维素的水解模式图^[64]

(a) 天然植物细胞壁由结晶纤维素构成主骨架, 内部附着非晶半纤维素、果胶等多糖. (b) 质子、离子能够有效扩散进入微纤丝内部降解糖链. (c) CBHI 由表及里剥离糖链降解天然结晶纤维素. (d) 超分子机器纤维小体在结晶纤维素表面断裂整根微纤丝.

参 考 文 献

- [1] 海默尔 M E. 生物质抗降解屏障: 解构植物细胞壁产生物能. 王禄山, 译. 北京: 化学工业出版社, 2010
Himmel M E. Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. Translated by Wang L S. Beijing: Chemical Industry Press, 2010
- [2] Zhang Y H. What is vital (and not vital) to advance economically competitive biofuels production? Process Biochemistry, 2011, **46**(11): 2091-2110
- [3] Lynd L R, Weimer P J, Pretorius I S, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, **66**(3): 506-577
- [4] 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
- [5] Tsekos I. The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes. Journal of Phycology, 1999, **35**(4): 635-655
- [6] Mueller S C, Brown R M, Scott T K. Cellulosic microfibrils: nascent stages of synthesis in a higher plant cell. Science, 1976, **194**(4268): 949-951
- [7] Brown R M, Montezinos D. Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, **73**(1): 143-147
- [8] Giddings T H, Brower D L, Staehelin L A. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. Journal of Cell Biology, 1980, **84**(2): 327-339
- [9] Herth W. Arrays of plasma-membrane "rosettes" involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*. Planta, 1983, **159**: 347-356
- [10] Hotchkiss A T, Malcolm B R. The association of rosette and globule terminal complexes with cellulose microfibril assembly in *Nitella translucens* var. *axillaris* (Charophyceae). Journal of

- Phycology, 1987, **23**(S2): 229-237
- [11] Doblin M S, Kurek I, Jacob-Wilk D, *et al.* Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant and Cell Physiology*, 2002, **43**(12): 1407-1420
- [12] Tsekos I, Reiss H D. Occurrence of the putative microfibril-synthesizing complexes (linear terminal complexes) in the plasma membrane of the epiphytic marine alga *Erythrocladia subintegra*. *Protoplasma*, 1992, **169**(1-2): 57-67
- [13] Peng H B, Jaffe L F. Cell wall formation in *Pelvetia* embryos. *Planta*, 1977, **133**(1): 57-71
- [14] Okuda K, Mizuta S. Diversity and evolution of putative cellulose synthesizing enzyme complexes in green plants. *Japanese Journal of Phycology*, 1993, **41**(2): 151-173
- [15] Kiermayer O, Sleytr U B. Hexagonally ordered "rosettes" of particles in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* Bre'b. and their significance for microfibril formation and orientation. *Protoplasma*, 1979, **101**(1): 133-138
- [16] Brown R. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, **38**(1): 57-67
- [17] Morgan J L W, Joanna S, Jochen Z. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 2013, **493**(7431): 181-186
- [18] Jarvis M. Chemistry: Cellulose stacks up. *Nature*, 2003, **426**(6967): 611-612
- [19] 郭翰林. 纤维素超分子结构及其降解过程的表征分析. 济南: 山东大学微生物技术国家重点实验室, 2012
- Guo H L. Characterization of degradation process of cellulose superstructure. Master Dissertation. Jinan: The State Key Laboratory of Microbial Technology of Shandong University, 2012
- [20] Claudia L, Roberto R, Walter T. The electronic nature of the 1,4- β -glycosidic bond and its chemical environment: DFT Insights into cellulose chemistry. *Chemistry*, 2013, **19**(48): 16282-16294
- [21] Nishiyama Y, Henri C, Paul L. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of The American Chemical Society*, 2002, **124**(31): 9074-9082
- [22] Atalla R H, Vanderhart D L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, 1984, **223**(4633): 283-285
- [23] Atalla R H. Conformation effects in the hydrolysis of cellulose. *Advances in Chemistry*, 1979, **181**(chapter 3): 55-69
- [24] Antoinette C, Sullivan O. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 1997, **4**(3): 173-207
- [25] Sugiyama J, Persson J, Chanzy H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules*, 1991, **24**(9): 2461-2466
- [26] Belton P S, Tanner S F, Cartier N, *et al.* High-resolution solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of tunicin- an animal cellulose. *Macromolecules*, 1989, **22**(4): 1615-1617
- [27] Imai T, Itoh T F, Sugiyama J. Almost pure I α cellulose in the cell wall of *Glaucozystis*. *Journal of Structural Biology*, 1999, **127**(3): 248-257
- [28] Moon R J, Ashlie M, John N, *et al.* Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**(7): 3941-3994
- [29] Ding S Y, Himmel M E. The Maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(3): 597-606
- [30] Abdullah R, Saka S. Hydrolysis behavior of various crystalline celluloses treated by cellulase of *Trichoderma viride*. *Cellulose*, 2014, **21**(6): 4049-4058
- [31] Ciesielski P N, Matthews J F, Tucker M P, *et al.* 3D electron tomography of pretreated biomass informs atomic modeling of cellulose microfibrils. *ACS Nano*, 2013, **7**(9): 8011-8019
- [32] Okuda K, Tsekos L, Brown R M. Cellulose microfibril assembly in *Erythrocladia subintegra* Rosenv: an ideal system for understanding the relationship between synthesizing complexes (TCs) and microfibril crystallization. *Protoplasma*, 1994, **180**(1): 49-58
- [33] Ding S Y, Zhao S, Zeng Y N. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. *Cellulose*, 2014, **21**(2): 863-871
- [34] Mosier N, Wyman C, Ladisch M, *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2005, **96**(6): 673-686
- [35] Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 2009, **27**(2): 185-194
- [36] Moxley G, Zhu Z, Zhang Y H. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(17): 7885-7890
- [37] Janga K K, Hagg M B, Moe S T. Influence of acid concentration, temperature, and time on de-crystallization in two-stage concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and aspenwood: a statistical approach. *Bioresources*, 2012, **7**(1): 391-411
- [38] Noppadon S, Anthe G, Zhang Y P. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, **88**(2): 169-180
- [39] Liang X, Montoya A, Haynes B S. Local site selectivity and conformational structures in the glycosidic bond scission of cellobiose. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, **115**(36): 10682-10691
- [40] Zhang, Y H P. Reviving the carbohydrate economy *via* multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, **35**(5): 367-375
- [41] 李汝雄. 绿色溶剂: 离子液体的合成与应用. 北京: 化学工业出版社, 2004
- Li R X. Green Solvent: Ionic liquids' synthesis and use. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [42] Ge X, Burner D M, Xu J, *et al.* Bioethanol production from dedicated energy crops and residues in Arkansas, USA. *Biotechnology Journal*, 2011, **6**(1): 66-73
- [43] Tang S, Baker G A, Ravula S, *et al.* PEG-functionalized ionic liquids for cellulose dissolution and saccharification. *Green*

- Chemistry, 2012, **14**(10): 2922-2932
- [44] 张丽平, 余晓琴. 羧甲基纤维素钠(CMC)在食品工业应用的情况和研究动态. 中国食品添加剂, 2006(1): 863-871
Zhang L P, Yu X Q. Application of CMC in food industry and its development. China Food Additives, 2006(1): 118-125
- [45] 郭军, 宋晓峰, 李小锋, 等. 羧甲基纤维素反应工艺条件的研究. 中国胶黏剂, 2009, **18**(9): 38-41
Guo J, Song X F, Li X F, et al. China Adhesives, 2009, **18**(9): 38-41
- [46] Docherty K M, Kulpa C F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. Green Chemistry, 2005, **7**(7): 185-189
- [47] Li W, Wang L, Zhou R, et al. Ionic liquid induced inactivation of cellobiohydrolase I from *Trichoderma Reesei*. Green Chemistry, 2014, **17**(3): 1618-1625
- [48] Turner M B, Spear S K, Holbrey J D, et al. Production of bioactive cellulose films reconstituted from ionic liquids. Biomacromolecules, 2004, **5**(4): 1379-1384
- [49] Datta S, Holmes B, Park J I, et al. Ionic liquid tolerant hyperthermophilic cellulases for biomass pretreatment and hydrolysis. Green Chemistry, 2010, **12**(2): 338-345
- [50] Bose S, Barnes C A, Petrich J W. Enhanced stability and activity of cellulase in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, 2012, **109**(2): 434-443
- [51] Sathitsuksanoh Z, Zhu Z, Zhang Y H P. Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl. Cellulose, 2012, **19**(4): 1161-1172
- [52] Hausser N, Marinkovic S, Estrine B. Improved sulfuric acid decrystallization of wheat straw to obtain high yield carbohydrates. Cellulose, 2011, **18**(6): 1521-1525
- [53] Saha B C, Iten L B, Cotta M A, et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biochemistry, 2005, **40**(12): 3693-3700
- [54] Cara C, Ruiz E, Castro E, et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. Bioresource Technology, 2008, **99**(6): 1869-1876
- [55] Harmer M A, Fan A, Kumar R K, et al. A new route to high yield sugars from biomass: phosphoric-sulfuric acid. Chemical Communications, 2009, **21**(43): 6610-6612
- [56] Wijaya Y P, Widyaya V T, Ha J M, et al. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 2014, **164**(7): 221-231
- [57] Brandt A, Ray M J, Welton T, et al. Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid-water mixtures. Green Chemistry, 2011, **13**(9): 2489-2499
- [58] Bian J, Peng F, Sun R C, et al. Effect of [Emim]Ac pretreatment on the structure and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulose. Carbohydrate Polymer, 2014, **100**(2): 211-217
- [59] Xiao W W, Yin W, Ma P S, et al. The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment. Carbohydrate Polymer, 2012, **87**(3): 2019-2023
- [60] Liu L Y, Chen H Z. Enzymatic hydrolysis of cellulose materials treated with ionic liquid [BMIM]Cl. Chinese Science Bulletin, 2006, **51**(20): 2432-2436
- [61] Qiang L, Gao J, Xin X, et al. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. Bioresource Technology, 2009, **100**(14): 3570-3575
- [62] Fu D, Mazza G. Optimization of processing conditions for the pretreatment of wheat straw using aqueous ionic liquid. Bioresource Technology, 2011, **102**(17): 8003-8010
- [63] Wilson D B, Irwin D C. Genetics and properties of cellulases. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology: recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1999
- [64] Resch M G, Donohoe B S, Ciesielski P N, et al. Clean fractionation pretreatment reduces enzyme loadings for biomass saccharification and reveals the mechanism of free and cellulosomal enzyme synergy. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2014, **2**(6): 1377-1387
- [65] 孟凡辉, 蒋绪恺, 王禄山, 等. 纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析. 生物化学与生物物理进展, 2015, **42**(3): 201-210
Meng F H, Jiang X K, Wang L S, et al. Prog Biochem Biophys, 2015, **42**(3): 201-210
- [66] Igrashi K, Awada K. High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. Journal of Biological Chemistry, 2009, **284**(52): 36186-36190
- [67] Wang L, Liu L, Gao P, et al. Comparison of domain function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudoningii* S-38 by limited proteolysis. Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic, 2003, s **24-25**(03): 27-28
- [68] Wang L, Zhang Y, Gao P, et al. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibres during extended enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, 2006, **93**(3): 443-456
- [69] Cui S T. Molecular self-diffusion in nanoscale cylindrical pores and classical Fick's law predictions. Journal of Chemical Physics, 2005, **123**(5): 61-64
- [70] Bayer E A, Lamed R. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. Journal of Bacteriology, 1986, **167**(3): 828-836
- [71] K Hon-Nami, Coughlan M P, Ljungdahl L G, et al. Separation and characterization of the complexes constituting the cellulolytic enzyme system of *Clostridium thermocellum*. Archives of Microbiology, 1986, **145**(1): 13-19
- [72] Hong W, Zhang J, Feng Y G, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons. Biotechnology

for Biofuels, 2014, 7(6): 1-17
[73] Hyeon J E, Sang D J, Han S O. Cellulosome-based, Clostridium-derived multi-functional enzyme complexes for

advanced biotechnology tool development: Advances and applications. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 936-944

Biosynthesis of Natural Crystal Cellulose and Its Decrystallization*

CHEN Yu, ZHANG Huai-Qiang, ZHAO Yue, GAO Pei-Ji, WANG Lu-Shan**

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Crystal cellulose that biosynthesized by the cellulose synthetase (CesA), is the structural framework and the most important components of the cell wall of higher plants. During the process of biological evolution, CesA aggregates on the plasma membrane and forms super-molecular terminal complexes (TCs) which have the two types of arrangement: TCs and rosettes TCs, synthesizing I α and I β crystal cellulose, respectively. Due to the unbranched structure, the adjacent cellulose chains can quickly stack side by side to form microfibre under the hydrogen bonds and Van der Waals' force (VDW). As a result, tightly crystal super-molecular structure of microfibre work as a natural barrier and makes it become an obstacle to the degradation which is known as biomass recalcitrance. However, concentrated acids and ionic liquids can diffuse among the microfibre efficiently and break β -1, 4-glucosidic bonds and hydrogen bonds, and eventually destroy the crystal structure of cellulose. Crystal cellulose can also be degraded by biological enzymes, which is quite different from chemical treatments which both require extremely acting conditions. Cellulases can hydrolysis crystal cellulose at room temperature, but only the certain surface of microfibre can be interacted with cellulases, so the accessibility of cellulose surface further reduce the efficiency of hydrolysis. Therefore, the combination of physical and chemical pretreatments can break the biomass recalcitrance and then cellulases can spread into microfibre which resulting in the specific binding rates of enzyme-substrate increased. Finally, it can realize the degradation and conversion of natural crystal cellulose with low-cost and green high-efficiency.

Key words cellulose-synthesizing enzyme complexes, biomass recalcitrance, crystal cellulose, decrystallization, biochemical industry

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0013

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370111), National Science and Technology Major Project of China (2013ZX10004217) and The Fundamental Research Funds of Shandong University(2015YQ004).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

Received: March 17, 2016 Accepted: July 6, 2016