DOI:10.12441/spyswjs.20230301002 [文章编号] 1673-1689(2025)03-0075-07

糖基化修饰对CBM与纤维素及木质素结合的影响

赖子健[1,2,3] 巩金媛[2] 李 鑫[2] 刘文强[2] 李耀豪[2] 陈保权[2] 秦春君[1,3] 马 博[2]
谭忠平[2] 尹 健[1,3,4*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所,北京 100050; 3. 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 4. 江南大学生命科学与健康工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】探索糖基化修饰是否会对碳水化合物结合模块(CBM)与纤维素及木质素的结合产生差异性影响。**【方法】**通过化学合成在3个糖基化位点(Thr1、Ser3和Ser14)上制备了4种具有不同糖基化模式的糖基化异型体——CBM000、CBM010、CBM002、CBM122,并比较它们在4、35、45、60、70 ℃与纤维素及木质素结合能力的差异。**【结果】**不同温度下,糖基化对CBM与纤维素及木质素结合的影响不同。CBM000在45 ℃对纤维素具有更好的结合选择性,CBM010在4 ℃和45 ℃对纤维素具有更好的结合选择性,CBM002在60 ℃对纤维素具有更好的结合选择性,CBM122在45 ℃对纤维素具有更好的结合选择性。**【结论】**升高温度可提升CBM的底物结合选择性,表明通过糖基化修饰能够增强CBM在高温下与底物结合的能力。

关键词:碳水化合物结合模块;糖基化;纤维素;木质素

Effects of Glycosylation on the Binding of CBM to Cellulose and Lignin

LAI Zijian[1,2,3] *GONG Jinyuan*[2] *LI Xin*[2] *LIU Wenqiang*[2] *LI Yaohao*[2] *CHEN Baoquan*[2]
QIN Chunjun[1,3] *MA Bo*[2] *TAN Zhongping*[2] *YIN Jian*[1,3,4*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Jiangnan University), Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 4. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to explore whether glycosylation affects the binding of the carbohydrate-binding module (CBM) to cellulose and lignin or not. [**Method**] Four CBM glycoforms CBM000, CBM010, CBM002, and CBM122 were prepared by chemical synthesis at three glycosylation sites Thr1, Ser3, and Ser14. Their binding abilities to cellulose and lignin at 4, 35, 45, 60, and 70 ℃ were compared. [**Result**] Glycosylation had different effects on the binding of CBM to cellulose and lignin at different temperatures. CBM000, CBM010, CBM002 and CBM122 have better selectivity for binding to cellulose at 45 ℃, 4 ℃/45 ℃, 60 ℃, and 45 ℃, respectively. [**Conclusion**] Rising the temperature can improve the substrate-binding selectivity of CBM. Glycosylation enhances the substrate-binding ability of CBM at high temperatures.

Keywords: carbohydrate-binding module; glycosylation; cellulose; lignin

来自里氏木霉的家族7纤维二糖水解酶 (*Tr*Cel7A)是木质纤维素生物降解用商业酶制剂

基金项目:国家自然科学基金项目(22077052,22277042);科技部国家重点研发计划专项项目(2020YFA0908304/004);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-026);科技部政府间国际科技创新合作重点专项项目(2018YFE0111400)。

通信作者:尹健(1979—),男,博士,教授,主要从事糖科学研究。E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-03-01 **修回日期:**2023-04-20

的主要成分之一[1]。*Tr*Cel7A 是一种外切纤维素酶，其结构包括一个 CBM、一个催化结构域（CD）以及一个将两者连接在一起的连接区（Linker）[2]，见图 1。其中 CD 的主要功能是催化纤维素中 *β*-*D*-1，4-糖苷键断裂，将其切割成含有 2~4 个葡萄糖单元的寡糖分子；而 CBM 则通过 3 个酪氨酸形成的平面与纤维素结合，将 CD 固定在底物上，从而提高纤维素的降解效率[3-4]。

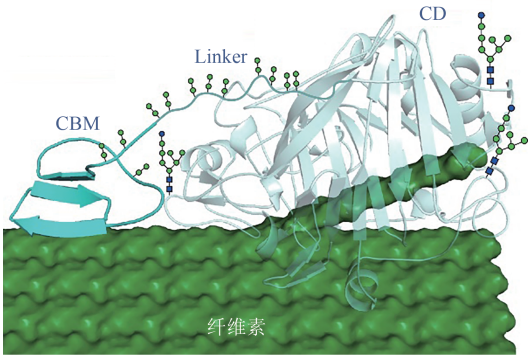


图 1　附着在纤维素上的 *Tr*Cel7A 结构

Fig. 1　Structure of *Tr*Cel7A binding to cellulose

为进一步提高 *Tr*Cel7A 的降解效率并降低以木质纤维素为原料制造生物乙醇的成本，近年来研究者开始尝试提升酶解反应温度[5-8]。在更高温度下进行酶促反应，不但可以缩短反应时间，还可减少酶用量，进而降低生物乙醇成本[9]。但若要提高 *Tr*Cel7A 的使用温度，首要任务是增强其在高温环境下的稳定性。

近年来，众多研究者尝试通过改变氨基酸序列来提高 *Tr*Cel7A 的稳定性[7,10-11]。除了突变能够改变蛋白质性质外，糖基化修饰也能有效改善蛋白质特性[12-13]。*Tr*Cel7A 的 CD、Linker 和 CBM 上均存在糖基化修饰位点：CD 上有 3 个 N 连接的糖基化修饰位点，Linker 上有 9 个 O 连接的糖基化修饰位点，CBM 上有 3 个 O 连接的糖基化修饰位点[13-14]。基于前期研究推测，对这些糖基化结构进行改造，或许能筛选出在高温下既稳定又具备活性的分子[14-17]。然而，由于难以制备糖基化结构均一的酶分子，相关验证研究进展较为缓慢。

作者所在课题组前期通过优化化学合成方法，成功制备出结构均一的糖基化 CBM 分子[18]，并发现 CBM 上的 O-甘露糖基化修饰不仅可以增强其热稳定性[18]，还可以改变其对不同底物（主要是纤维素和木质素）的结合能力[19]。为了验证 O-甘露糖基化修饰能否使 CBM 在更高温度下保持与底物（主要是纤维素）的结合能力，及高温下糖基化修饰是否能增强 CBM 在纤维素和木质素同时存在时对纤维素的结合选择性，作者制备了野生型及 3 种带有不同糖基化修饰的 CBM 分子，测定并比较了其在不同温度下与纤维素及木质素的结合特性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试剂

色谱级 N，N-二甲基甲酰胺（DMF）、色谱级乙腈、三氟乙酸、醋酸、三异丙基硅烷（TIPS）、N，N-二异丙基乙胺（DIEA）、4-甲基哌啶、氯化钠、醋酸钠、甲醇：北京伊诺凯科技有限公司；二氯甲烷、乙醚：北京通广精细化工公司；树脂、2-（7-偶氮苯并三氮唑）-N，N，N’，N’-四甲基脲六氟磷酸酯（HATU）、二肽 Fmoc-Ala-Ser（$\psi^{Me,\,Me}$pro）-OH、用 Fmoc 保护的各种氨基酸：吉尔生化（上海）有限公司；糖基化氨基酸：杭州先益生物有限公司；微晶纤维素、木质素、*α*-氰基-4-羟基肉桂酸（CHCA）：美国 Sigma 公司；糖基化异型体 CBM000、CBM010、CBM002、CBM122：作者所在实验室合成。

1.1.2　仪器与设备

多肽合成仪：Liberty Lite 型，美国 CEM 公司；液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）：Acquity™ UPLC-SQD2 型，美国沃特世公司；质谱仪：4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer 型，美国应用生物系统公司；高压液相分离纯化系统：NU3000-NP7000 型，江苏汉邦科技公司；高压液相色谱柱：C18 柱（10 mm×250 mm×5 μm），上海月旭公司；冷冻干燥机：VirTis BenchTop Pro 型，英国 Genevac 公司；恒温振荡仪：HH-100 型，杭州佑宁公司。

1.2　方法

1.2.1　CBM 糖基化异型体的设计

CBM 结构域含有天然 O-甘露糖基化修饰。为了评估糖基化对其与底物结合能力的影响，选择甘露单糖和甘露二糖这 2 种糖型对其 O-糖基化位点 Thr1、Ser3、Ser14 进行修饰，并从修饰后的分子中选出 4 种具有代表性的糖基化异型体 CBM000、CBM010、CBM002 和 CBM122 进行研究，见图 2。CBM000 表示没有糖基化，CBM010

表示Ser3位上带有一个甘露单糖，CBM002表示Ser14位上带有一个甘露二糖，CBM122表示在Thr1、Ser3和Ser14位上分别带有甘露单糖、甘露二糖、甘露二糖。

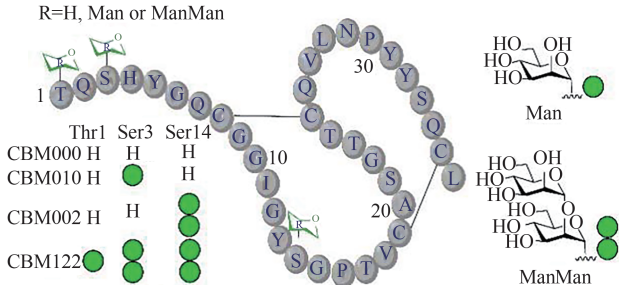


图2　4种CBM糖基化异型体的化学结构

Fig. 2　Chemical structures of four CBM glycoforms

选择这几个分子是由于制备方法相对简单，且各自具有不同的热稳定性[18]。前期研究发现，CBM000、CBM010、CBM002和CBM122的熔化温度（T_m）分别为62.2、70.1、65.5、76.0 ℃。这些分子的T_m差异较大，可在高温条件下探究CBM与底物的结合能力是否受自身T_m的影响。

1.2.2　CBM糖基化异型体的合成

1）多肽合成：CBM糖基化异型体使用CEM Liberty Lite多肽合成仪合成。首先将0.05 mmol的Fmoc-Leu-Novasyn® TGT树脂加入反应器，再加入10 mL的DMF溶胀5 min，随后加入3 mL的4-甲基哌啶与DMF溶液（体积比2∶8），在50 ℃下微波加热5 min，以脱除Fmoc保护基。加入Fmoc保护的氨基酸/糖氨基酸（0.25 mmol）、HATU（0.225 mmol）和DIEA（0.5 mmol），先在室温下反应2 min，再于50 ℃微波加热8 min进行偶联反应。对于具有β侧链分叉的氨基酸（如缬氨酸、苏氨酸、异亮氨酸）、脯氨酸以及具有大位阻侧链保护基的氨基酸（精氨酸）之后连接的氨基酸需进行二次偶联反应。另外，需使用二肽替换第20位和21位的氨基酸，以确保反应完全。不断重复脱保护-偶联循环，直到合成CBM的完整序列。

2）粗肽制备：完成固相合成后，将树脂转移到多肽合成反应管中，依次用DMF和DCM洗涤。随后加入3.5 mL的TFA/TIPS/H_2O裂解液（体积比为95∶2.5∶2.5），于25 ℃搅拌45 min。用50 mL离心管收集裂解液，接着添加40 mL、4 ℃的甲基叔丁基醚沉淀多肽，于4 ℃、8 400 g离心5 min，弃去上清液。将沉淀溶于15 mL体积分数20%的MeCN水溶液（体积比2∶8），经冷冻干燥获得白色粉末状粗肽。

3）折叠：取10 mg糖基化的CBM粗肽置于50 mL离心管中，加入0.5 mL体积分数5%的肼水溶液，搅拌30 min进行脱乙酰基反应。加入1.0 mL体积分数5%的AcOH水溶液中和，最后加入18.5 mL的折叠缓冲液（0.200 mol/L Tris醋酸盐、0.326 mmol/L氧化型谷胱甘肽、2.600 mmol/L还原型谷胱甘肽，pH 8.2），在25 ℃下搅拌过夜。对于不带糖基化的CBM，无需进行脱乙酰基步骤，可直接进行折叠操作。

4）纯化：折叠后的溶液使用高效液相色谱仪（C18柱，10 mm×250 mm×5 μm）进行纯化。流动相A为MeCN（含体积分数0.05%的TFA），流动相B为H_2O（含体积分数0.05%的TFA），在0~40 min时，流动相B的体积分数从20%升至40%。纯化过程中产物采用214 nm和275 nm双波长进行检测，使用LC-MS对产物进行鉴定，见图3。CBM000的理论相对分子质量为3 738.587，实际观测到的质荷比包括$[M+3H]^{3+}$=1 247.557、$[M+4H]^{4+}$=935.962；CBM002的理论相对分子质量为4 062.692，实际观测到的质荷比包括$[M+3H]^{3+}$=1 355.685、$[M+4H]^{4+}$=1 016.480；CBM010的理论相对分子质量为3 900.640，实际观测到的质荷比包括$[M+3H]^{3+}$=1 301.583、$[M+4H]^{4+}$=976.335；CBM122的理论相对分子质量为4 548.851，实际观测到的质荷比包括$[M+3H]^{3+}$=1 517.663、$[M+4H]^{4+}$=1 138.862。收集洗脱液并冷冻干燥，得到高纯度的CBM分子。

1.2.3　CBM糖基化异型体标准曲线绘制

1）采用2种内标对CBM进行定量，CBM002用于CBM000、CBM010和CBM122定量，CBM010用于CBM002定量。内标选择的标准为：内标与待测蛋白质在MALDI-TOF质谱上的质荷比差值$\Delta(m/z)\geq 162$。

2）用缓冲液（50 mmol/L醋酸钠、50 mmol/L NaCl，pH 5.0）分别为4个CBM异型体配制10种不同浓度（0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0、20.0 μmol/L）的溶液，每种浓度的溶液配制10 μL。向各溶液中加入3 μL 150 pmol/L的内标。

3）将CHCA基质溶解在甲醇-乙腈-水（体积比

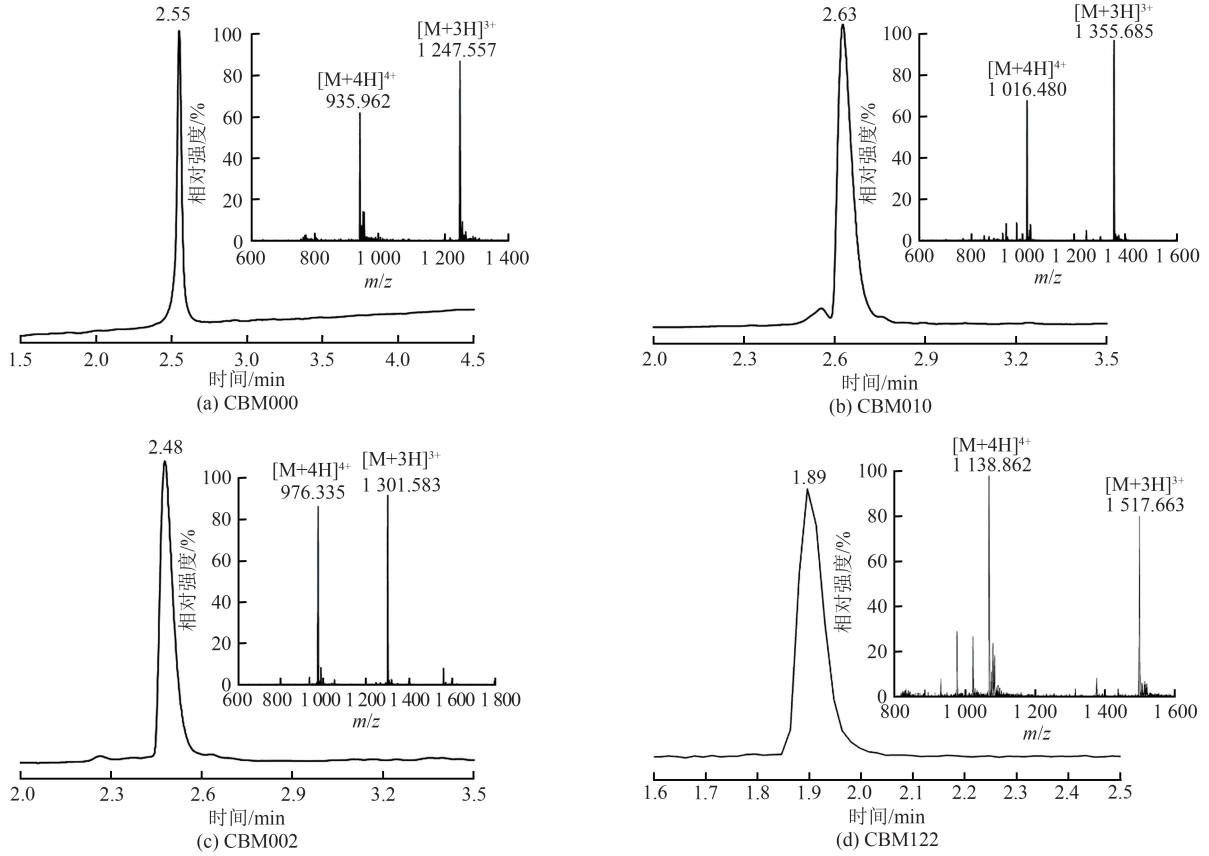


图 3　4 种 CBM 糖基化异型体的 LC-MS 鉴定图

Fig. 3　Characterization of four CBM glycoforms by LC-MS

36∶56∶8）溶液中，配制成 6.2 mg/mL 的基质溶液。往 MALDI-TOF 靶板加样孔中加入 1.2 μL 基质溶液，再加入 0.5 μL CBM 溶液，两者混合后干燥 5 min，使用 MALDI-TOF 质谱仪对样品进行检测。

4）以待测 CBM 浓度为纵坐标，待测 CBM 与内标的离子强度比值为横坐标，绘制各 CBM 分子的线性标准曲线。

1.2.4　CBM 糖基化异型体结合能力的测定

1）通过比较吸附常数（K_{ads}）和最大结合容量（B_{max}）确定 CBM 与底物的结合能力。这 2 个值是将测得的 CBM 糖基化异型体与底物的结合浓度带入 Langmuir 等温吸附方程拟合得到[19]。

2）从 10 种不同浓度的溶液各取 50 μL 分别放入离心管中。向每个离心管中加入 50 μL 微晶纤维素的悬浊液（终质量浓度为 2.4 mg/mL），并放入一个 5 mm 的磁力搅拌子。将离心管分别置于不同温度的恒温振荡器中，以 1 500 r/min 振荡 2 h，使 CBM 与底物达到结合平衡。

3）结合试验完成后，将结合混合物置于离心机中，以 14 000 *g* 离心 10 min。取 20 μL 上清液，转移至新的离心管中，加入 3 μL 150 pmol/L 的内标。使用 MALDI-TOF 对待测 CBM 样品进行检测。

4）将获得的待测 CBM 样品与内标的离子强度比值代入标准曲线，得到待测 CBM 样品浓度，即游离蛋白质的浓度。与纤维素结合的 CBM 质量摩尔浓度按式（1）计算。

$$C_{bound}=\frac{(C_{initial}-C_{free})\times V}{m_{substrate}} \quad (1)$$

式中：

C_{bound}——与纤维素结合的 CBM 质量摩尔浓度，μmol/g；

$C_{initial}$——结合混合物中 CBM 的初始浓度，μmol/L；

C_{free}——游离蛋白质的浓度，μmol/L；

$m_{substrate}$——混合物中纤维素的质量，g；

V——最终混合物的体积，L。

将 C_{bound} 代入单点朗缪尔方程进行非线性拟合，见式（2），即可确定 K_{ads} 和 B_{max}。

$$C_{bound}=\frac{B_{max}\times C_{free}}{1/K_{ads}+C_{free}} \quad (2)$$

式中：

C_{bound}——与纤维素结合的CBM质量摩尔浓度，μmol/g；

B_{max}——最大结合容量，μmol/g；

C_{free}——游离蛋白质的浓度，μmol/L；

K_{ads}——吸附常数，$(\mu mol/L)^{-1}$。

CBM与木质素的结合能力采用相同方法测定。

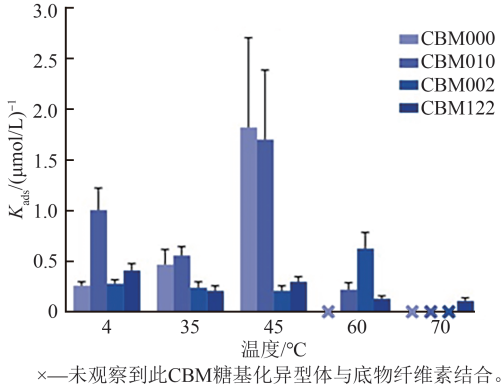
1.3　数据处理

所有试验均进行至少5次平行，结果以平均值±标准误差的形式表示。使用Excel、Graphpad和Origin软件对试验结果进行分析。

2　结果与讨论

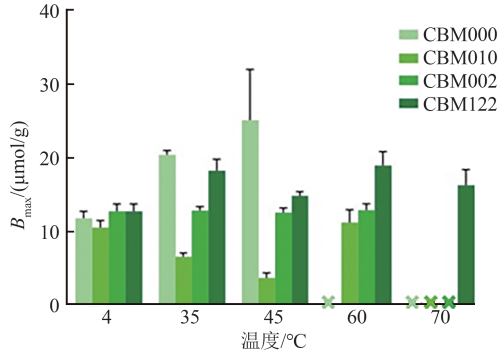
2.1　CBM糖基化异型体与纤维素结合结果

4种CBM糖基化异型体在不同温度下与纤维素结合的K_{ads}和B_{max}结果见图4。CBM000与纤维素的结合力随温度升高呈先升高后降低的趋势，在45 ℃时结合力最强；当温度升至60 ℃以上时，可能是由于蛋白质熔化失活，CBM000不再与纤维素结合。在4 ℃时，Ser3位带有甘露单糖的CBM010与纤维素的结合力是CBM000的4倍；在35 ℃和45 ℃时，与CBM000相近；但在60 ℃时，CBM010依然能与纤维素结合。表明糖基化修饰可通过提高CBM的T_m使其在较高温度下保持对纤维素的结合力。在Ser14位上带有甘露二糖的CBM002，在4、35、45 ℃与纤维素的结合力均不高；但是在60 ℃时，其与纤维素的结合力有所提高，是其他温度的2~3倍。CBM002在70 ℃时失去对纤维素的结合力，这可能与其T_m为65.5 ℃直接相关。在Thr1、Ser3和Ser14位均带有甘露糖的CBM122，在所有测试温度下均能与纤维素结合，这与其具有最高的T_m一致；然而，在5种温度下，CBM122与纤维素的结合力均较低。综上，温度能提高CBM与纤维素的结合力，CBM000、CBM010和CBM002分别在45、45、60 ℃与纤维素具有最高结合力，而CBM122具有最强的抗高温能力。



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物纤维素结合。

(a) K_{ads}



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物纤维素结合。

(b) B_{max}

图4　CBM糖基化异型体在不同温度下与纤维素结合时的K_{ads}和B_{max}

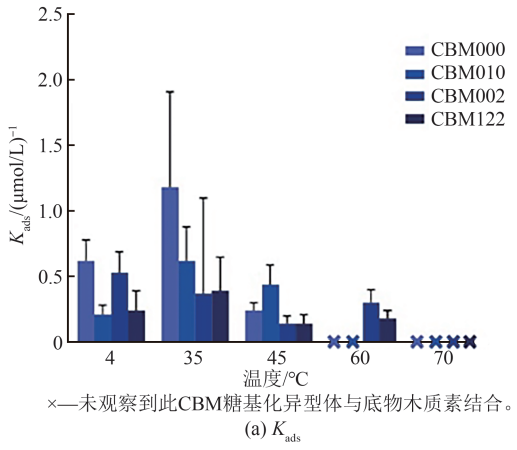
Fig. 4　K_{ads} and B_{max} of CBM glycoforms binding to cellulose at different temperatures

CBM000与纤维素的B_{max}随温度变化规律与结合力的变化规律相似，均随温度的升高而升高。CBM010的B_{max}变化规律同样与结合力变化规律相似，但其最高B_{max}的温度是60 ℃，而非45 ℃。CBM002和CBM122在所有能实现结合的温度下，B_{max}均相对较高，且变化幅度较小。总体而言，温度对各CBM糖基化异型体B_{max}的影响较结合力的影响小。

2.2　CBM糖基化异型体与木质素结合结果

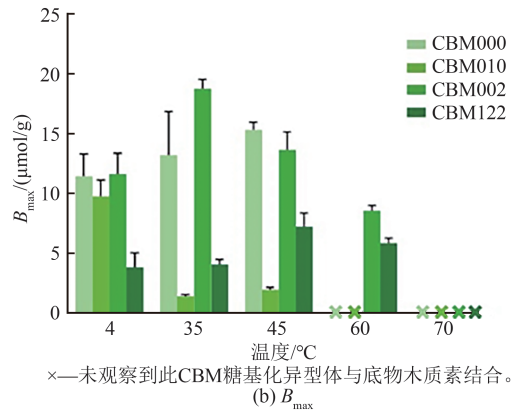
4种CBM糖基化异型体在不同温度下与木质素结合的K_{ads}和B_{max}结果见图5。CBM000和CBM010与木质素的结合力均随温度的升高呈现先升高后降低的趋势。在35 ℃时，两者的结合力均最高；当温度升至60 ℃时，虽然还未达到CBM000和CBM010的T_m，但是它们已无法与木质素结合。CBM002在4 ℃时与木质素的结合力最强；CBM122在35 ℃时与木质素的结合力最强；两者在60 ℃时均能与木质素结合，但在70 ℃时均无法与木质素结合，尽管该温度未达到CBM122的T_m。总体而言，温度高于35 ℃不利于各CBM糖基化异型体与木质素结合，且T_m与其在高温时结合力之间的关联不如与纤维素结合时紧密。

CBM000与木质素的B_{max}随温度变化的规律与结合力的变化规律不同。CBM000、CBM002和



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物木质素结合。

(a) K_{ads}



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物木质素结合。

(b) B_{max}

图 5 CBM 糖基化异型体在不同温度下与木质素结合时的 K_{ads} 和 B_{max}

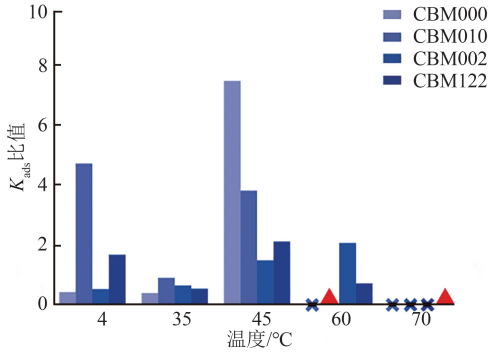
Fig. 5 K_{ads} and B_{max} of CBM glycoforms binding to lignin at different temperatures

CBM122 的 B_{max} 均随温度的升高呈现先升高后降低的趋势。CBM000 和 CBM122 的 B_{max} 最高点出现在 45 ℃，而 CBM002 的 B_{max} 最高点出现在 35 ℃。CBM010 的 B_{max} 在 4 ℃时最高，且随着温度的升高迅速降低。总体来看，温度对各 CBM 糖基化异型体 B_{max} 的影响较大。

2.3 温度对 CBM 糖基化异形体与纤维素及木质素结合的影响

CBM 糖基化异型体在不同温度下与纤维素及木质素结合的 K_{ads} 比值及 B_{max} 比值结果见图 6。结果显示，不同 CBM 糖基化异型体对纤维素和木质素的结合选择性与温度相关。CBM000 在 45 ℃时对纤维素具有最佳的结合选择性，其与纤维素的 K_{ads} 约是与木质素 K_{ads} 的 7 倍；在 4 ℃和 35 ℃时，该比值均小于 1。CBM010 在 4 ℃和 45 ℃时的 K_{ads} 比值约为 4；在 35 ℃和 60 ℃时，该比值小于 1。CBM122 的 K_{ads} 比值变化和 CBM010 类似，但其比值最高仅约为 2。CBM002 在较高温度（45、60 ℃）时 B_{max} 比值大于 1；在 4 ℃和 35 ℃时，该比值小于 1。总体而言，当温度为 45 ℃时，CBM 糖基化异型体对纤维素具有较高的结合选择性。

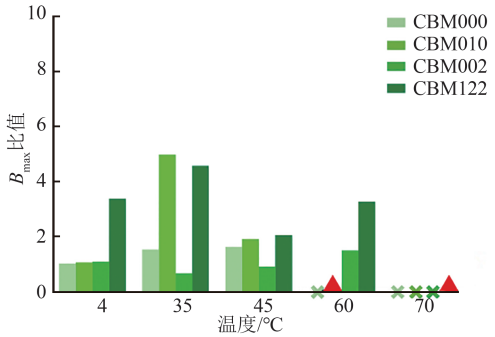
CBM000、CBM010 和 CBM122 的 B_{max} 比值均随温度升高呈现先升高后降低的趋势，但变化幅度差异较大。CBM000 的 B_{max} 比值在不同温度下均为 1 左右；CBM010 和 CBM122 的 B_{max} 比值在 35 ℃可超过 4。CBM002 的 B_{max} 比值随温度的升高呈先降低后升高的趋势，但变化幅度较小，比值也都在 1 左右。总体而言，当温度为 35 ℃时，不同 CBM 糖基化异型体的 B_{max} 比值差异较大。



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物结合；

▲—仅观察到此CBM糖基化异型体与纤维素结合。

(a) K_{ads}



×—未观察到此CBM糖基化异型体与底物结合；

▲—仅观察到此CBM糖基化异型体与纤维素结合。

(b) B_{max}

图 6 CBM 糖基化异型体在不同温度下与纤维素和木质素结合的 K_{ads} 比值及 B_{max} 比值

Fig. 6 K_{ads} and B_{max} ratios of CBM glycoforms binding to cellulose and lignin at different temperatures

3 结论

作者通过糖基化修饰制备了 4 种 CBM 糖基化异型体，并在不同温度下比较了其与纤维素及木质素的结合选择性。结果表明，温度能够改变 CBM 糖基化异型体对不同底物的结合选择性。在较高温度下，由于糖基化修饰能够提高 CBM 的 T_m，糖基

化异型体分子可在这些温度下保持与底物的结合力。该研究对蛋白质糖基化的基础研究和糖基化的应用研究具有指导意义。

参考文献

[1] LYND L R，WEIMER P J，VAN ZYL W H，et al. Microbial cellulose utilization：fundamentals and biotechnology [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews，2002，66(3)：506-577.

[2] PAYNE C M，KNOTT B C，MAYES H B，et al. Fungal cellulases[J]. Chemical Reviews，2015，115(3)：1308-1448.

[3] 袁风娇，王春娟，李雪晴，等. CBM融合位置对AuMan5A酶学性质的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(4)：1-7.
YUAN F J，WANG C J，LI X Q，et al. Effect of fusion position of carbohydrate-binding module on the enzymatic properties of AuMan5A[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(4)：1-7.(in Chinese)

[4] 王春娟，李剑芳，唐诗涵，等. 融合β-甘露聚糖酶基因的构建、表达及酶学性质的分析[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(11)：1135-1141.
WANG C J，LI J F，TANG S H，et al. Expression and enzymatic properties analysis of a fusion β-mannanase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2016，35(11)：1135-1141.(in Chinese)

[5] VIIKARI L，ALAPURANEN M，PURANEN T，et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis [J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology，2007，108：121-145.

[6] SØRENSEN T H，CRUYS-BAGGER N，WINDAHL M S，et al. Temperature effects on kinetic parameters and substrate affinity of Cel7A cellobiohydrolases[J]. Journal of Biological Chemistry，2015，290(36)：22193-22202.

[7] KOMOR R S，ROMERO P A，XIE C B，et al. Highly thermostable fungal cellobiohydrolase I (Cel7A) engineered using predictive methods [J]. Protein Engineering，Design & Selection，2012，25(12)：827-833.

[8] 朱双杰，潘见，杨俊杰，等. 超高压处理对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(1)：62-67.
ZHU S J，PAN J，YANG J J，et al. Effect of ultrahigh pressure processing on the activities of cellulosein *C. militaris* juice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2015，34(1)：62-67.(in Chinese)

[9] WU I，ARNOLD F H. Engineered thermostable fungal Cel6A and Cel7A cellobiohydrolases hydrolyze cellulose efficiently at elevated temperatures[J]. Biotechnology and Bioengineering，2013，110(7)：1874-1883.

[10] GOEDEGEBUUR F，DANKMEYER L，GUALFETTI P，et al. Improving the thermal stability of cellobiohydrolase Cel7A from Hypocrea jecorina by directed evolution[J]. Journal of Biological Chemistry，2017，292(42)：17418-17430.

[11] VOUTILAINEN S P，MURRAY P G，TUOHY M G，et al. Expression of Talaromyces emersonii cellobiohydrolase Cel7A in Saccharomyces cerevisiae and rational mutagenesis to improve its thermostability and activity [J]. Protein Engineering，Design & Selection，2010，23(2)：69-79.

[12] QI F F，ZHANG W X，ZHANG F J，et al. Deciphering the effect of the different N-glycosylation sites on the secretion，activity，and stability of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei[J]. Applied and Environmental Microbiology，2014，80(13)：3962-3971.

[13] GREENE E R，HIMMEL M E，BECKHAM G T，et al. Chapter three-glycosylation of cellulases：engineering better enzymes for biofuels [J]. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry，2015，72：63-112.

[14] KOŁACZKOWSKI B M，SCHALLER K S，SØRENSEN T H，et al. Removal of N-linked glycans in cellobiohydrolase Cel7A from Trichoderma reesei reveals higher activity and binding affinity on crystalline cellulose[J]. Biotechnology for Biofuels，2020，13：136.

[15] AMORE A，KNOTT B C，SUPEKAR N T，et al. Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2017，114(52)：13667-13672.

[16] JEOH T，MICHENER W，HIMMEL M E，et al. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion [J]. Biotechnology for Biofuels，2008，1(1)：10.

[17] ADNEY W S，JEOH T，BECKHAM G T，et al. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis [J]. Cellulose，2009，16(4)：699-709.

[18] CHEN L Q，DRAKE M R，RESCH M G，et al. Specificity of O-glycosylation in enhancing the stability and cellulose binding affinity of Family 1 carbohydrate-binding modules [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2014，111(21)：7612-7617.

[19] LI Y H，GUAN X Y，CHAFFEY P K，et al. Carbohydrate-binding module O-mannosylation alters binding selectivity to cellulose and lignin[J]. Chemical Science，2020，11(34)：9262-9271.

（责任编辑：刘冬梅）