

结晶纤维素降解酶的研究进展

吴窈画, 彭惠, 邵蔚蓝* (南京师范大学微生物工程重点实验室, 江苏南京 210097)

摘要 纤维素的结晶区是纤维素酶降解纤维素效率不高的制约因素。在纤维素生物降解的基础上, 从产结晶纤维素酶的微生物, 酶的作用机理, 酶的基因工程与蛋白工程, 以及结晶纤维素酶的研究前景等方面对结晶纤维素的降解作了综合评述。

关键词 结晶纤维素; 降解酶; 纤维小体

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02532-03

Study on the Crystalline Cellulose-degrading Enzyme

WU Yao-hua et al (The Key Laboratory of Microbiology Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097)

Abstract Despite its simple chemical composition, cellulose exists in a number of crystalline and amorphous topologies. Its insolubility and heterogeneity makes native cellulose a recalcitrant substrate for enzymatic hydrolysis. On the basis of the hydrolysis of cellulosic biomass, in this review the basic research on crystalline cellulose-degrading enzyme was concerned. Main cellulase-producing organisms were described. A characteristic model for the action of enzyme complexes on the surface of insoluble substrates, some opportunities of cellulase improvement by means of gene and protein engineering and its biotechnological perspectives were discussed.

Key words Crystalline cellulose; Cellulytic enzyme; Cellulosome

纤维素是地球上产量巨大、可再生的一种自然资源, 利用其进行生物转化提供有益物质, 对于当前人类解决能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有极其重要的意义^[1]。微生物及其产生的纤维素酶能够降解纤维素, 一直是纤维素酶及其应用研究领域的主要热点^[2]。

天然纤维素的彻底降解至少需要4种组分的参与: 纤维素结合结构域与底物的吸附与解吸附; 内切葡聚糖酶作用于纤维素的非结晶区, 将长链纤维素分子截断, 产生大量带非还原性末端的小分子; 外切葡聚糖酶作用于纤维素线状分子末端, 水解-1,4糖苷键, 产生纤维二糖分子; -葡糖苷酶将纤维二糖分子水解成葡萄糖。由于天然纤维素链倾向于缠绕在一起, 形成结晶状不溶性的刚性结构, 导致生物降解的天然抗性^[3]。目前大部分纤维素酶的研究常用底物是高水溶性的羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 这在一定程度上削弱了纤维素酶“分解纤维素”的意义。

近年来, 国内外关于纤维素结构、纤维素酶作用于结晶纤维素表面的模式和降解纤维素的多酶复合体结构的研究有了很大进展。笔者在纤维素生物降解的基础上, 对结晶纤维素降解的产酶微生物、酶的作用机理、酶的基因工程与蛋白工程, 及其研究进展进行综述。

1 纤维素的结晶结构及其分解菌

1.1 纤维素的结晶结构 纤维素是以纤维二糖为基本单位, 由许多葡萄糖残基以-1,4糖苷键连接而成的线性高分子结构, 分子聚合度变化大, 一般为8000~10000个葡萄糖残基。纤维素链通过氢键的缔合作用形成纤维束, 分子密度大的区域成平行排列形成结晶区, 分子密度小的区域分子间隙小, 定向差, 形成无定形区。无定形区易被单一的内切葡聚糖酶降解, 而结晶区则需要多个酶组分之间的共同作用。

1.2 结晶纤维素分解菌及其产生酶 能够利用和分解纤维素的物种多, 如微生物、植物及昆虫等。真菌、细菌、放线菌等在一定条件下均可产生纤维素酶, 但结晶纤维素降解的研

究多集中在一些嗜热菌和极端嗜热菌的高温转化上^[4-5]。

结晶纤维素分解菌对结晶纤维素的降解可分为好氧降解和厌氧降解2大途径。好氧性细菌如纤维单胞菌(*Cellulomonas*)、褐色高温单胞菌(*Thermomonospora*)、欧文氏菌(*Eiwinia*)和假单胞菌(*Beuchmonas*)。有氧菌产单一酶系与好氧真菌产酶相似。酶系统研究最多的是*C. fimi*和*T. fusca*, 其产生的胞外酶对结晶纤维素的作用远小于对CMC-Na的作用^[6]。厌氧性细菌如芽孢梭菌属(*Clostridium*)和瘤胃球菌(*Ruminococcus*), 对极端环境的耐受性好, 可以产生高比活力的降解酶, 这些酶常聚集形成多酶复合体的结构称为纤维小体(*cellulosome*), 这种稳定的复杂酶系能较迅速地降解结晶纤维素^[7-8]。在这方面对厌氧嗜热纤维素分解菌的研究最多。

2 纤维素降解酶的作用机理

2.1 降解酶分子的结构 大多数纤维素酶分子都具有类似结构即球状催化结构域(Catalytic Domain, CD), 连接桥(Linker)和没有催化作用的纤维素结合域(Cellulose Binding Domain, CBD)3部分。CD主要体现酶的催化活性及对底物的特异性。内切葡聚糖酶的活性位点位于一个开放的裂口中, 允许整条纤维素链进入, 随机水解糖苷键; 外切葡聚糖酶的活性中心位于一个环状通道中, 只允许纤维素的末端逐步进入并将其水解。所有纤维素酶的CD都很大, 占整个蛋白分子的70%, 根据酶的序列分析发现CD是高度可变的^[1]。

CBD又称为纤维素结合模块(Cellulose Binding Module, CBM), 通过结晶学和核磁共振等技术对各家族来源的CBD结构研究表明, 其功能是将相邻的CD呈递到纤维素底物上。*C. fimi*的CenA或CenX单独的CBD不具备对底物的水解活力, 但能破坏棉纤维形成短纤维, 具有疏解结晶纤维素的能力, 因此CBD对酶的催化活力是必需的, 具有调节酶对可溶性和非可溶性底物专一性活力的作用^[9]。

Linker是一段富含脯氨酸和羟基氨基酸, 高度糖基化的连接肽, 其作用可能是保持CD和CBD之间的距离; 有助于同酶分子间形成较为稳定的聚集体。

2.2 降解机制 天然纤维素的微生物降解机制被普遍接受的是协同理论(Synergism)。目前已报道的有4种协同机制: 内切—外切协同, 存在于内、外切葡聚糖酶之间; 外切—外

基金项目 江苏省高技术研究项目(BG20050326)。

作者简介 吴窈画(1981-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-11-29

切协同,存在于从还原端和非还原端切割的外切葡聚糖之间;外切葡聚糖酶和-葡萄糖苷酶的协同;酶分子内的CD和CBD之间的协同。

好氧性细菌同真菌类似产生大量丰富的胞外酶,游离酶组分在CBM的作用下组装成多酶复合体的形式对纤维素实施有效降解。高纤维素降解菌 *T.fusca* 的酶系统相对简单,由6个均有CBD的组分组成,目前这6个酶组分的基因已被克隆出来,并进行了生理生化性质的研究,结果表明,单一酶组分不能降解结晶纤维素,多种酶组分一起作用可以较为迅速地降解纤维素^[6,10]。这种复合体活性远远大于单个组分活力之和,体现出很强的协同作用: Cel5A、Cel6和Cel9B——内切葡聚糖酶可以随机切割纤维素链; Cel9A是个“progressive”内切葡聚糖酶,能降解纤维素释放纤维四糖单位^[11]; Cel6B和Cel48A——外切葡聚糖酶分别作用于纤维素的非还原端和还原端释放纤维二糖^[12]。

厌氧性细菌纤维素酶则是以形成多酶复合体的结构而起作用,其中纤维小体是研究最多的多酶复合体,它能高效降解结晶纤维素。有关纤维小体的结构组成和高效催化机制是天然纤维素降解中令人感兴趣的内容。通过纤维素的亲和层析和凝胶过滤的方法很容易将纤维小体从培养物中分离出来,研究发现它是由很多不同的蛋白组成,其中大多数为有活性的酶^[13]。人们试图通过变性的方法纯化单个组分和构建重组体,但进展都不大^[14-15]。目前对纤维小体的研究主要集中在基因工程方面。在很多厌氧性细菌中都发现了纤维小体,以嗜热厌氧菌 *C.thermocellum* 为代表的纤维小体里多个亚蛋白基因已被克隆,最大的一个整合蛋白GpA,分子量约为210~250 kDa,主要负责多个其他酶亚单元的协同降解作用,并将各个亚单元进行装配。

3 纤维素降解酶的基因工程和蛋白质工程

细菌产生的纤维素酶相对真菌而言,虽然有较高的比活力,但总产酶活低,不利于分离纯化。基因工程和蛋白质工程为纤维素酶的研究开拓了新前景。

酶基因克隆等手段有助于深入探索纤维素酶的生物合成和作用机制及构建高效纤维素分解菌,国内外在这方面开展了大量的研究。目前的研究主要集中在产酸性纤维素酶的真菌。丝状真菌木霉属能产生大量酶系完全的胞外纤维素酶,而且对结晶纤维素有较好的酶活性。里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的CBH、CBH、EG、EG、EG、EG和BG基因均已被克隆而且在大肠杆菌(*E. coli*)中得到表达。由于酶的耐热性在生产中具有实用意义,耐热细菌也成为研究的热点。早在1993年G.P.Hazelwood等就对 *C.thermocellum* 的纤维素酶基因 cel 进行过克隆表达和定性。迄今为止, *C.thermocellum* 中纤维素酶基因和与其相关的20多个不同的纤维小体得到成功测序^[16]。

采用蛋白质工程的方法构建具有完全降解结晶纤维素的纤维素酶分子是酶走向工业化应用的重要途径。纤维素酶蛋白质工程主要包括以下几方面:通过定点诱变技术改变组成蛋白质的1个或数个氨基酸残基,以确定催化过程中的功能性氨基酸。根据实际应用需要,原位修饰或增删酶分子结构。如:去除覆盖外切酶活性位点的loop环,改变酶

与特异性底物之间的作用模式;在缺乏CBD的酶分子结构中添加CBD,作为一种亲和标记纯化酶;删除大分子酶中不影响活性的部分如纤维素结合素结构域,使蛋白变小更容易进入底物内部实施降解。研究酶的稳定性。通过融合细菌中的热稳定性组块(如TST)提高酶的稳定性;改变酶3级结构中分子之间作用力,研究二硫键在纤维素酶稳定中所起的作用^[5]。

4 结晶纤维素降解酶的研究展望

纤维素酶的酶解效率影响纤维素酶的工业化生产和广泛应用。微生物降解纤维素,尤其是极端耐受菌种的研究给这一难关带来突破性的进展^[17-18]。从自然界中筛选出具有相对较高活性的结晶纤维素降解酶类,进行产酶条件优化或运用分子工程手段构建新菌种,有望获得具有更高热稳定性和催化活性的酶。

Clostridium 和 *Ruminococci* 发展形成了优化的多酶复合体——纤维小体。随着基因工程技术的发展,特别是重组DNA技术的引入,细菌的这种纤维小体在纤维素类物质降解的生物技术应用上日益显示出其潜在的发展优势。从细菌中提取纤维素酶将可能以其高效性而成为提取纤维素酶的一个重要发展方向。此外,对纤维小体的酶解作用机制的研究,可以为纤维素类物质降解提供很多有价值的基础理论。采用蛋白质工程方法构建具有能完全降解结晶纤维素的纤维素酶以提高酶生物催化活性的效率,是纤维素酶得以应用的重要途径。

参考文献

- [1] BHAT MK, BHAT S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. *Biotechnology Advances*, 1997, 15(3/4): 583-620.
- [2] LEE RL, PAUL J. Microbial cellulase utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002(7): 506-577.
- [3] RABINOVICH ML, MELNIK MS, BOLOBOVA A V. Microbial cellulases (Review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, 38(4): 355-373.
- [4] DENG Y, ZHANG H, HUG Q, et al. Effect of peel off crude oil by high temperature anaerobic cellulolytic bacterium[J]. *Sichuan Univ*, 2002, 39(1): 167-169.
- [5] TAYA M, HNOH H, YAG T, et al. Isolation and characterization of an extremely thermophilic cellulolytic, anaerobic bacterium[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 29: 474-479.
- [6] JUNG H, WILSON D B, WALKER L P. Binding and reversibility of Cel5A, Cel6B and Cel48A and their respective catalytic domains to bacterial microcrystalline cellulose[J]. *Biotech Bioeng*, 2003, 84: 151-159.
- [7] BELAICH P, TARDIF C, BELAICH A, et al. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*[J]. *J Biotechnol*, 1997, 57: 3-14.
- [8] BISSET C, CHANZY H, HENRISSAT B, et al. Digestion of crystalline cellulose substrate by the cellulosome: structural and morphological aspects[J]. *Biotechnol J*, 1999, 340: 829-835.
- [9] CARRARD G, KOVULA A, SODERLUND H, et al. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10342-10347.
- [10] IRWIND C, ZHANG S, WILSON D B. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermomonospora fusca*[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 4988-4997.
- [11] WILSON D B, IRWIND C, SAKONJ, et al. *Thermomonospora fusca* cellulase E4 a progressive endocellulase[C]// CLAEYSSENS M, NERINCKX W, HENS K. Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. London: The Royal Society of Chemistry, 1998: 39-65.
- [12] SAKONJ, IRWIND C, WILSON D B, et al. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermobifida fusca*[J]. *Nat Struct Biol*, 1997, 4: 14381-14394.
- [13] LAMED R, BAYER E A. Cellulosomes from *Clostridium thermocellum*[J]. *Methods Enzymol*, 1988, 160: 4472-4481.
- [14] BHAT S, GOODENOUGH P W, BHAT MK, et al. Isolation of four major subunits from *Clostridium thermocellum* Cellulosome and their synergism in the hydrolysis of crystalline cellulose[J]. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16: 335-342.

- [15] CHO S K, LJUNGDAHL L G. Structural role of calcium for the organization of the cellulosome of *Clostridium thermocellum* [J] . *Biochemistry*, 1996, 35: 4906 - 4910.
- [16] SCHWARZ W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria [J] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 634 - 649.
- [17] RACHEL GLAD, LARISA RAHNOMCH, SIMA YARON, et al. Cellulose degradation by a novel cellulose family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose [J] . *Bacteriology*, 2003, 185(2) : 391 - 398.
- [18] NEHAUS F, BERTOLDO C, KAHLER M, et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications [J] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 711 - 729.