

文章编号: 1000-5862(2015)04-0425-05

纤维素酶蛋白质工程的新进展

赵喜华¹ 涂宗财^{1*} 魏东芝² 王 玮² 唐平平¹

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022;

2. 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 鲁华生物技术研究所, 上海 200237)

摘要: 原始纤维素酶通常存在催化活性低下、末端产物抑制、热稳定性不高、持续催化能力弱等问题, 因此, 改善它的酶学性质是很有意义的工作。目前, 采用体外进化技术是改进纤维素酶酶学性质的一种有效途径。从纤维酶的催化域、结合域和连接区等不同区域出发, 综述了纤维素酶蛋白质工程的新进展。提出了系统组装3个已改造功能结构域的思想, 这有助于提高纤维素酶催化活性、持续催化能力、耐高浓度产物、热稳定性等特性, 将促进纤维素酶在能源、工业、农业、食品等领域的高效应用。

关键词: 纤维素酶; 蛋白质工程; 新进展

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.04.18

0 引言

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 广泛存在于地球中, 每年植物光合作用可产生约 5×10^9 t 纤维素。另外, 人类生产活动产生的废弃物也包含大量纤维素, 例如稻草、膳食纤维、玉米秸秆、小麦麸等^[1], 因此, 怎样利用好如此丰富的纤维素是现今研究最热门的课题之一。基于绿色环保、反应温和等原因, 纤维素的酶法降解实现了纤维素的有效利用, 但通常存在纤维素酶催化活性低下、持续催化能力较弱、热稳定性不高、末端产物抑制等问题, 导致生产成本过高以致于影响了其实际应用, 而采用蛋白质工程技术对纤维素酶进行分子改造是避免上述问题的一种有效方式^[2]。本文从纤维素酶的催化域(CD)、结合域(CBM)和连接区等不同区域出发, 根据纤维素存在的上述问题, 综述了纤维素蛋白质工程的新进展, 如图1所示^[4]。与纤维素酶蛋白质工程所提到的定点突变和定向进化相关的技术本文不再重复, 可参考张小梅等^[3]研究综述。

1 催化域的改造

1.1 减弱产物抑制

纤维素水解产物对纤维素酶具有反馈抑制作用

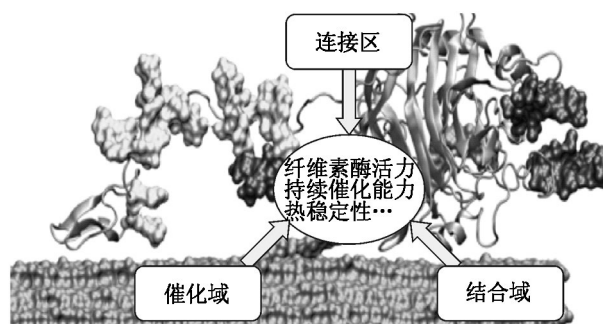


图1 纤维素酶蛋白质工程

用葡萄糖直接抑制 β -葡萄糖苷酶(BGL), 纤维二糖能直接抑制纤维素外切酶(CBH)和纤维素内切酶(EG), 此外, 葡萄糖间接抑制CBH和EG^[5]。为了减弱末端产物对纤维素酶的抑制, 某些位点的改造是有效的, 如将BGL催化活性位点外部通道处的氨基酸残基突变为大侧链氨基酸残基, 突变酶更易与活性位点发生作用, 提高了突变酶与底物的亲和力, 从而减少葡萄糖竞争性抑制^[6]; 再如去除CBH II与离去基团相互作用的关键区域的疏水残基, 可以使氢键延长, 降低了纤维素酶与离去基团之间的结合自由能, 减少了末端产物抑制^[7]。而某些位点的改造是没有意义的, 如将带正电氨基酸突变为芳香基氨基酸, 导致结合位点的特定构象发生改变, 降低了BGL与产物的亲和力, 但同时也降低了BGL与底物的亲和力, 因此, 在这里, 正电氨基酸突变为芳香基

收稿日期: 2015-04-11

基金项目: 国家自然科学基金(31360217), 江西省教育厅自然科学基金(GJJ11071)和江西师范大学博士科研启动基金(5451)资助项目。

通信作者: 涂宗财(1965-), 男, 江西靖安人, 教授, 博士生导师, 主要从事食物资源开发与高效利用方面的研究。

氨基酸的实验结果,无法解释葡萄糖的竞争性抑制机制^[8].由于基于现代计算机技术的结构生物学还在不断完善中,采用定点突变方法来获得耐末端产物的纤维素酶,有可能会得到不满意的结果.而采用定向进化方法可以不需要知道纤维素酶的3维结构,获得大量的突变体本身酶的酶库,再结合高通量筛选技术,就有可能获得耐高浓度末端产物的纤维素酶.

1.2 N型糖基化修饰

N型糖基化结构对纤维素酶活性有很大影响.N型糖基化结构与连接区及CBM发生相互作用导致了纤维素酶与纤维素的非生产性结合,降低了纤维素酶的催化活性,还有可能就是N型糖基化结构与纤维素表面相互作用,这干扰了纤维素酶与纤维素的结合,影响了纤维素酶的催化功能^[9].也有研究认为N型糖基化结构可以影响纤维素酶的活性,但不是纤维素酶活性较低的主要原因^[10].纤维素酶的活性通道的入口处的N型糖基化结构提高了纤维素酶活性,而处于其它位点的N型糖基化位点对纤维素酶具有不同程度的抑制^[11].有研究表明N型糖基化位点对纤维素酶活性没有显著差别,但是,N型糖基化位点对纤维素酶的热稳定性有很大影响,N型糖基化可以维持纤维素酶的二级结构和提高酶的热稳定性^[12-13].总之,不同位点的N型糖基化对纤维素酶的活性有不同的影响,主要表现为3种形式:1)提高活性;2)降低活性;3)不改变活性但改变其它酶学特性.

1.3 持续催化能力

CBH在纤维素的酶降解中扮演着重要角色,CBH区别于BGL和多数EG的一个重要特性是具有持续催化能力,因此,要高效水解底物结晶纤维素的主要策略是提高CBH的持续催化能力^[14].CBH活性部位独特的凸环结构对持续催化过程具有重要作用,对凸环结构进行定点突变,突变体对微晶纤维素和滤纸表现出更低活性,同时减弱了可持续催化能力^[7].CBH催化域为多个凸环结构形成的一个较长的活性部位通道,其中包含4个色氨酸残基,分别位于通道入口(Trp40)、通道中心(Trp38)和催化位点处(Trp367和Trp376),它们与纤维素葡萄糖基单位形成疏水堆积作用力,而这种疏水堆积作用力与结晶纤维素的持续高效水解相关.进一步研究表明,催化通道入口Trp40对结晶纤维素的持续催化能力起到至关重要作用,具体地,Trp40参与吸附纤维素链的还原端进入活性位点通道,引发纤维素的

持续水解作用^[15].EG一般不具有持续催化能力,它随机作用于非结晶区的纤维素产生新的还原端,协助CBH高效水解纤维素,但有些细菌和真菌的EG也具有持续催化能力.具有持续催化能力的大多数EG属于糖苷水解酶第9家族(GH9),此外,GH5家族的某些EG也具有持续催化能力^[16-18].

纤维素酶的持续催化能力和协同作用对不溶性底物水解都有重要影响,但有关持续催化能力与协同作用之间的关系还不清楚,直到T. V. Vuong等^[18]研究了*Thermobifida fusca* Cel6B持续催化能力及其与*T. fusca* Cel5A(属于EG)协同作用,才发现持续催化能力与协同作用之间并不具有相关性,对Cel6B活性部位通道的2个氨基酸残基进行了突变,虽然突变酶有较高的持续催化水解能力,但协同作用却极低.因此,提高CBH的持续催化能力不一定能改进CBH与EG的协同作用,即二者之间不具有相关性^[19].

1.4 热稳定性

高热稳定性纤维素酶可以延长生物催化剂反应时间,减少末端产物对纤维素酶的抑制作用,降低纤维素酶的使用成本.热稳定纤维素酶在生物质转化过程中除了上述优点之外,还可以抑制微生物生长、增加传质速率和提高柔韧性^[20].如前所述,通过引入糖基化位点可以提高纤维素酶热稳定性^[13].另外,二硫键与纤维素酶的热稳定性一般呈正相关,主要原因是二硫键增加了酶的构象刚性^[13, 21].对热稳定性有贡献的二硫键具有累积效应,因此,对热稳定性有积极作用的不同位点二硫键可以在同一个突变体中体现,这显著提高了纤维素酶热稳定性^[13].纤维素酶某些特定氨基酸与热稳定性密切相关,比如,甘氨酸、脯氨酸等,这些氨基酸使突变体位于一个表面环上,推测表面环与纤维素酶的热稳定性相关^[22].多个位点突变的纤维素酶导致多个弱相互作用力增加,这显著提高了突变体的热稳定性^[23].脯氨酸增加了疏水作用和限制了环的构象,氢键数量的增加使纤维素酶构象更坚固,提高了纤维素酶的热稳定性^[24-25].

总之,纤维素酶热稳定性的主要影响因素是糖基化修饰、二硫键、一些特定氨基酸组成等所造成的氢键、疏水作用、环和酶的空间构象的进化.近年来也出现了针对蛋白质结构优化的理性设计算法,其中比较常见的是SCHEMA、ProSAR和Rosetta^[26].以超二级结构为单元进行重组装,采用线性回归模型-打分系统计算每个超二级结构单元对嵌合体热稳定性的贡献,发现热稳定性最高的嵌合体比热稳定性

最高的亲本还要高7℃^[27-28]。

2 连接肽的改造

纤维素酶连接区的主要作用是柔性连接催化域和结合域,多数由脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸等组成,极易被蛋白水解酶攻击,但经糖基化修饰后可以很好地防止蛋白水解酶的攻击^[29]。目前,连接区在氨基酸含量和长度方面形成的多样性导致其功能不清晰,为了深入研究其功能,尽可能地提高纤维素酶的活性,对连接区的改造研究主要体现在连接区长度、氨基酸含量和糖基化修饰方面,因为这些因素与连接区的柔性、结构和与底物的相互作用有关^[30]。细菌和真核生物纤维素酶连接区序列分析表明,结构域之间连接区的长度可根据糖苷水解酶催化域和结合域的类型进行优化,因此,连接区的长度可能对纤维素酶的活性是极其重要的,此外,细菌纤维素酶连接区脯氨酸含量比真核生物纤维素酶连接区高出2倍^[31]。具有甘氨酸丰富的柔性连接区和具有刚性的螺旋的连接区,通过合理距离连接2个不同功能的催化域,可以更好发挥融合酶的2个作用,促进水解效率的提高^[32]。

3 结合域的改造

3.1 亲和性和热稳定性

基于蛋白质序列和空间结构的相似性,将CBM分为67个家族,根据CBM对底物的结合特异性进一步细分为1、2、3类型,1类型结合在结晶多糖的表面,2类型识别和结合内部多糖链(又称为内切型),3类型结合在多糖链端(又称外切型)^[33]。CBM不具有催化水解功能,对固相纤维素表现出疏水性和亲水性,主要起到结合结晶纤维素和不定形区纤维素的作用,提高底物附近纤维素酶浓度,促进催化域对纤维素的快速分解和破坏结晶纤维素非共价键作用力氢键,导致结晶纤维素松散并裸露出纤维素分子,促进催化域水解纤维素^[34-35]。

CBM可以影响纤维素酶的热稳定性,通过添加或去除CBM可以改变配体结合能力,提高纤维素酶的水解活性,如一些只有单一模块的纤维素酶附着异源CBM时,具有更高的催化活性和热稳定性^[36-37]。将具有一定个数的二硫键的CBM融合到纤维素酶中,可以提高纤维素酶的热稳定性和活性^[21]。含有C端截断CBM的突变体,其最适反应温度一般不会发生改变,但是去除CBM的突变体导致

有限变性,造成重新折叠和部分极性表面增大,这提高了纤维素酶与水形成的氢键密度,导致纤维素酶热稳定性提高^[38]。

3.2 持续催化能力

前面已提到,持续催化能力主要与纤维素酶CD有关,而CBM在纤维素酶的持续催化机制中的作用并不是十分清晰,但是,依然有人提出CBM在持续催化能力中扮演重要角色。研究表明,通过CD、CBM-CBM-CD和CBM-CD-CBM的构建,发现仅有CD的纤维素酶持续催化能力显著降低,表明糖苷水解酶第5家族EG的CBM具有持续催化的作用,但是添加CBM的2个突变体的持续催化能力也不如野生型EG,这可能因为额外的CBM对EG产生位阻效应,导致持续催化能力下降^[39]。类似地发现,第9家族纤维素酶CBM也具有持续催化作用^[40]。因此,虽然众多研究表明持续催化能力主要受催化活性中心的结合控制,但是CBM对某些纤维素酶的持续催化能力有一定贡献,特别是具有CBM的第5和第9家族纤维素酶,可以通过优化CBM来提高纤维素酶的活性。

4 结论和展望

综上所述,蛋白质工程改善纤维素酶酶学性质是一种非常有效的手段。目前,纤维素酶的分子改造存在的主要问题仍是理性设计往往不能满足实验要求,若采用非理性设计分别对纤维素酶的3个结构域进行分子改造,结合高通量筛选方法,再系统组装3个已改造的功能结构域,可得到具有累积效应的高活性、高热稳定性、高持续催化能力、耐高浓度产物的纤维素酶,将促进纤维素酶在能源、工业、农业、食品等领域的更高效利用。

5 参考文献

- [1] Chandel A K, Singh O V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of "Biofuel" [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, 89(5): 1289-1303.
- [2] Wilson D B. Cellulases and biofuels [J]. *Current Opinion in Biotechnology* 2009, 20(3): 295-299.
- [3] 张小梅,李单单,王禄山,等. 纤维素酶家族及其催化结构域分子改造的新进展 [J]. *生物工程学报* 2013, 29(4): 422-433.
- [4] Bommarius A S, Sohn M, Kang Y, et al. Protein engineering of cellulases [J]. *Current Opinion in Biotechnology*,

- 2014 29(4): 139-145.
- [5] Andrić P, Meyer A S, Jensen P A, et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes [J]. *Biotechnology Advances* 2010 28(3): 308-324.
- [6] Lee H L, Chang C K, Jeng W Y, et al. Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability [J]. *Protein Engineering Design and Selection* 2012 25(11): 733-740.
- [7] Qu Yinbo. Lignocellulose degrading enzymes and biorefinery [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 121-154.
- [8] Liu Juanjuan, Zhang Xuecheng, Fang Zemin, et al. The 184th residue of β -glucosidase Bgl1B plays an important role in glucose tolerance [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011 112(5): 447-450.
- [9] Jeoh T, Michener W, Himmel M E, et al. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion [J]. *Biotechnol Biofuels* 2008 1(10): 1-12.
- [10] Wu Guochao, Wei Liangguo, Liu Weifeng, et al. Asn64-glycosylation affects *Hypocrea jecorina* (syn. *Trichoderma reesei*) cellobiohydrolase Cel7A activity expressed in *Pichia pastoris* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010 26(2): 323-328.
- [11] Gao Le, Gao Feng, Wang Lushan, et al. N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and synergism of nonhydrolytic glycoform in cellulose degradation [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2012 287(19): 15906-15915.
- [12] Qi Feifei, Zhang Weixin, Zhang Fengjie, 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] 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 and Selection* 2010 23(2): 69-79.
- [14] Kurašin M, Våljamäe P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2011 286(1): 169-177.
- [15] Nakamura A, Tsukada T, Auer S, et al. The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2013 288(19): 13503-13510.
- [16] Watson B J, Zhang Haitao, Longmire A G, et al. Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by *Saccharophagus degradans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2009 191(18): 5697-5705.
- [17] Zheng Fei, Ding Shaojun. Processivity and enzymatic mode of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Volvariella volvacea* [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2013 79(3): 989-996.
- [18] Zhang Xiaozhou, Sathitsuksanoh N, Zhang Y-H P. Glycoside hydrolase family 9 processive endoglucanase from *Clostridium phytofermentans*: Heterologous expression, characterization and synergy with family 48 cellobiohydrolase [J]. *Bioresource Technology* 2010 101(14): 5534-5538.
- [19] Vuong T V, Wilson D B. Processivity, synergism and substrate specificity of *Thermobifida fusca* Cel6B [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2009 75(21): 6655-6661.
- [20] Anbar M, Bayer E A. Approaches for improving thermostability characteristics in cellulases [J]. *Methods Enzymol*, 2012 510: 261-271.
- [21] Voutilainen S P, Boer H, Alapuranen M, et al. Improving the thermostability and activity of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009 83(2): 261-272.
- [22] Anbar M, Lamed R, Bayer E A. Thermostability enhancement of *Clostridium thermocellum* cellulosomal endoglucanase Cel8A by a single glycine substitution [J]. *Chem Cat Chem* 2010 2(8): 997-1003.
- [23] Yi Zuolin, Pei Xiaoqiong, Wu Zhongliu. Introduction of glycine and proline residues onto protein surface increases the thermostability of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum* [J]. *Bioresource Technology* 2011 102(3): 3636-3638.
- [24] 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.
- [25] Pei Xiaoqiong, Yi Zhanglin, Tang Chuangen, et al. Three amino acid changes contribute markedly to the thermostability of β -glucosidase BglC from *Thermobifida fusca* [J]. *Bioresource Technology* 2011 102(3): 3337-3342.
- [26] Bommarius A S, Blum J K, Abrahamson M J. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst [J]. *Current Opinion in Chemical Biology* 2011 15(2): 194-200.
- [27] Heinzelman P, Snow C D, Wu I, et al. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009 106(14): 5610-5615.
- [28] Heinzelman P, Snow C D, Smith M A, et al. SCHEMA recombination of a fungal cellulase uncovers a single mutation that contributes markedly to stability [J]. *Journal of*

- Biological Chemistry 2009 284(39): 26229-26233.
- [29] Beckham G T ,Bomble Y J ,Matthews J F ,et al. The o-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* family 7 cellulase is a flexible ,disordered protein [J]. Biophysical Journal 2010 99(11) : 3773-3781.
- [30] Sonan G ,Receveur-Brechot V ,Duez C ,et al. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an *Antarctic bacterium* [J]. Biochem J 2007 , 407: 293-302.
- [31] Sammond D W ,Payne C M ,Brunecky R ,et al. Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: Insights from sequence analysis ,biophysical measurements and molecular simulation [J]. PloS One 2012 ,7 (11) : 1-14.
- [32] Lu Ping ,Feng Mingguang. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2008 ,79(4) : 579-587.
- [33] Bornscheuer U ,Buchholz K ,Seibel J. Enzymatic degradation of (Ligno) cellulose [J]. Angewandte Chemie International Edition 2014 53(41) : 10876-10893.
- [34] Guillén D ,Sánchez S ,Rodríguez-Sanoja R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2010 85(5) : 1241-1249.
- [35] Thongekkaew J ,Ikeda H ,Masaki K ,et al. Fusion of cellulose binding domain from *Trichoderma reesei* CBHI to *Cryptococcus* sp. S-2 cellulase enhances its binding affinity and its cellulolytic activity to insoluble cellulosic substrates [J]. Enzyme and Microbial Technology 2013 ,52 (4) : 241-246.
- [36] Wang Wei ,Meng Fanju ,Liu Pei ,et al. Construction of a promoter collection for genes co-expression in filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2014 41(11) : 1709-1718.
- [37] Pham T A ,Berrin J G ,Record E ,et al. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus mannanase*: Role of a carbohydrate-binding module [J]. Journal of Biotechnology 2010 ,148 (4) : 163-170.
- [38] Wang Yujuan ,Yuan Hang ,Wang Jun ,et al. Truncation of the cellulose binding domain improved thermal stability of endo- β -1 ,4-glucanase from *Bacillus subtilis* JA18 [J]. Bioresource Technology 2009 ,100(1) : 345-349.
- [39] Zheng Fei ,Ding Shaojun. Processivity and enzymatic mode of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Volvariella volvacea* [J]. Applied and Environmental Microbiology 2013 ,79(3) : 989-996.
- [40] Li Yongchao ,Irwin D C ,Wilson D B. Increased crystalline cellulose activity via combinations of amino acid changes in the family 9 catalytic domain and family 3c cellulose binding module of *Thermobifida fusca* Cel9A [J]. Applied and Environmental Microbiology 2010 ,76 (8) : 2582-2588.

The Recent Advances in Protein Engineering of Cellulases

ZHAO Xihua¹ ,TU Zongcai^{1*} ,WEI Dongzhi² ,WANG Wei² ,TANG Pingping¹

(1. College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China;

2. State Key Lab of Bioreactor Engineering ,Newworld Institute of Biotechnology ,East China University of Science and Technology ,Shanghai 200237 ,China)

Abstract: Parent cellulases exist in some defects of a low catalytic activity ,inhibition of end products ,weak thermostability and poor processivity and therefore improving enzymatic properties of cellulases is a very meaningful job. To date ,on the basis of the technology of evolution in vitro ,it is an effective way to develop enzymatic properties of cellulases. Recent advances in protein engineering about three different regions of cellulases which consist of catalytic domains ,binding domains and linker regions are reviewed in the paper. The idea about systematically assembling functional structure domains which have been engineered was put forward to in the paper ,which will help to improve the enzymatic properties such as catalytic activity ,the ability of processive hydrolysis ,resistance to high concentration of product ,and thermal stability ,and to promote high-efficient application in energy ,industry ,agriculture , food and so on.

Key words: cellulase; protein engineering; recent advances

(责任编辑: 刘显亮)