

纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析*

孟凡辉 蒋绪恺 刘琳 张怀强 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 纤维素酶解效率是木质纤维素高效生物转化的限制瓶颈, 利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)可以在水相中原位可视化表征纤维素酶分子运动行为, 分析单个酶分子的运动速度及其影响因素. 研究发现, 高效降解结晶纤维素酶分子仅结合于特定结晶表面上的特定位点上, 通过单方向运动完成逐层降解, 过量酶分子结合于特定表面上会导致持续性运动“塞车”现象. 结晶微纤维的降解不仅取决于酶分子运动速度及其糖苷键断裂效率, 更取决于酶分子可及底物的晶面大小及其晶面氢键解聚程度. 以新结合模式、新运动模式或新组织模式的纤维素酶系或复合体应是纤维素酶研究的重点方向.

关键词 木质纤维素, 纤维素酶, 原子力显微镜, 降解效率, 限制因素

学科分类号 Q6-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0220

木质纤维素占绿色植物干重的 35%~50%^[1], 它是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物, 同时又是自然界中数量最大的可再生性资源^[2], 其合成与降解过程是自然界碳素循环的中心环节. 通过酶学技术可以将木质纤维素降解转化形成可溶性糖及生物化学产品, 因此这对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要的意义^[3]. 但天然木质纤维素酶解转化的效率较低, 限制其生物转化的大规模推广与应用.

木质纤维素主要存在于绿色植物的细胞壁中, 它是陆生植物离开水生环境后形成的支持与保护屏障, 这是长期进化过程形成的, 人们现将植物抵抗微生物及酶降解的各种特性通称为“生物质的抗降解屏障(biomass recalcitrance)”^[4]. 它由不同解剖层次、不同组织结构、不同微纤维超分子结构层次及其不同聚合物中不同化学结构单元等组成. 多种化学成分和多层次超分子复杂结构的形成, 导致了化学反应的不均一性和纤维素酶种类的多样性及酶解反应过程的复杂性^[5-6]. 细胞壁的化学组成和超微结构研究的深入开展, 将可帮助热化学或生物转化技术提供新的思路与策略.

由于木质纤维素结构的异质性与复杂性, 特别是对固液非均相反应系统, 酶反应动力学研究只能

针对整个反应系统的均值进行处理. 单从酶反应动力学的研究, 难以提供酶解过程的全部动态信息^[7], 这样就难以认识木质纤维素降解低效的真正原因是由于酶量的不足, 还是酶与底物的不匹配, 或者是两者因素都存在而导致的. 先进的超微可视化技术可以在纳米尺度上观察单个酶分子的运动, 表征其在纤维素底物表面上的运动行为及相关属性, 这就为人们打开了新的视野, 开拓了新的研究方向; 超微可视化技术中成像可行性、酶分子动态行为持续跟踪观察等技术研究已经突破, 这样利用超微可视化技术手段就可以分析纤维素酶分子的降解行为及影响速率的限定性因素^[8].

在高时空分辨率下实时观察生物大分子的分子动态行为, 需要显微分析技术满足以下条件: a. 不需要任何标记, 在液相中直接成像观察; b. 降低对样品的损坏; c. 高空间分辨率; d. 高时间分辨率. 从而还原生物大分子反应过程的真实性^[9]. 相对于其他可视化技术手段, 原子力显微镜

* 国家自然科学基金(31370111, 31070063)和山东省国际科技合作项目计划(鲁科合字[2011]176号第6项)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2014-12-24, 接受日期: 2015-01-12

(atomic force microscope, AFM)技术可以在液相中成像, 该技术可直接在室温水环境中, 在分子水平上对纤维素酶降解过程进行静态、动态观察. 另外, AFM 扫描过程中轻敲模式对样品表面施加的压力要远小于接触模式, 所以生物样品可以在特有的轻敲模式进行观察、分析^[10]. 传统 AFM 扫描范围在 X、Y 轴平面小于 100 μm , 在 Z 轴上小于 10 μm , 由于工作原理及反馈控制等因素影响, 扫描区域越大, AFM 扫描成像速率越慢, 这样限制了人们在纳米尺度上对分子动态行为的研究^[11]. 随着技术进步, 将扫描速度优化提升, 使得扫描速度达到 10 帧 / 秒以上, 结合特定探针的制备、AFM 成像步骤的优化等, 形成了新一代高速原子力显微镜 (high-speed atomic force microscope, high-speed AFM) 技术, 可以对单个酶分子及其运动过程成像, 这使得纳米动态可视化分析技术成为可能^[12]. 借助于 high-speed AFM 可以在生理环境下对生物大分子动态过程、底物结构动态变化进行实时观察, 从而可以观测纤维素酶解速度及其运动的限制因素.

1 模式底物的制备与天然木质纤维素超分子结构观测

利用 AFM 等扫描探针显微镜对酶解速度的可

视化表征需要特定条件^[13]: a. 天然环境, 如酶分子反应一般在液相中发生; b. 合适 AFM 分析的底物; c. 高分辨的成像方法. 因此, 利用 AFM 分析纤维素酶酶解过程时, 首先要选择制备合适的底物. 棉纤维是植物合成高度结晶态的纯纤维素材料, 本课题组对其微纤丝的超分子聚集结构分析, 大气条件下直接观测了棉纤维微纤丝及其基元纤维丝、结晶区与非结晶区、观测到微纤中分叉结构及其降解变化^[14-17]. Imai 等^[18-19]采用 *Valonia ventricosa* 和 *Cladophora* 等含高结晶度纤维素的藻类, 制备出单根结晶微纤丝, 并通过透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 分析技术得到其相关晶体材料属性. 其中 *Valonia* 结晶的表面结构高效有序, 通过对比晶体结构模型, 发现微纤丝表面结构存在明显重构现象^[20].

Ding 等^[21]利用 AFM 观察玉米髓薄壁细胞初生壁上的纤维素微纤丝结构, 结合纤维素合成酶系的末端复合体 (terminal complex, TC) 模型, 提出微纤丝最小结构单元——由 36 根葡萄糖组成——基元纤维丝 (cellulose elementary fibrils, CEF) 结构模型. CEFs 结构中 1.04 nm 的纤维二糖单元分子通过 β -1, 4 糖苷键形成分子链 (图 1a), 糖链的聚合度 (DP) 从几十到几万不等^[22], 这是 CEFs 的一级结

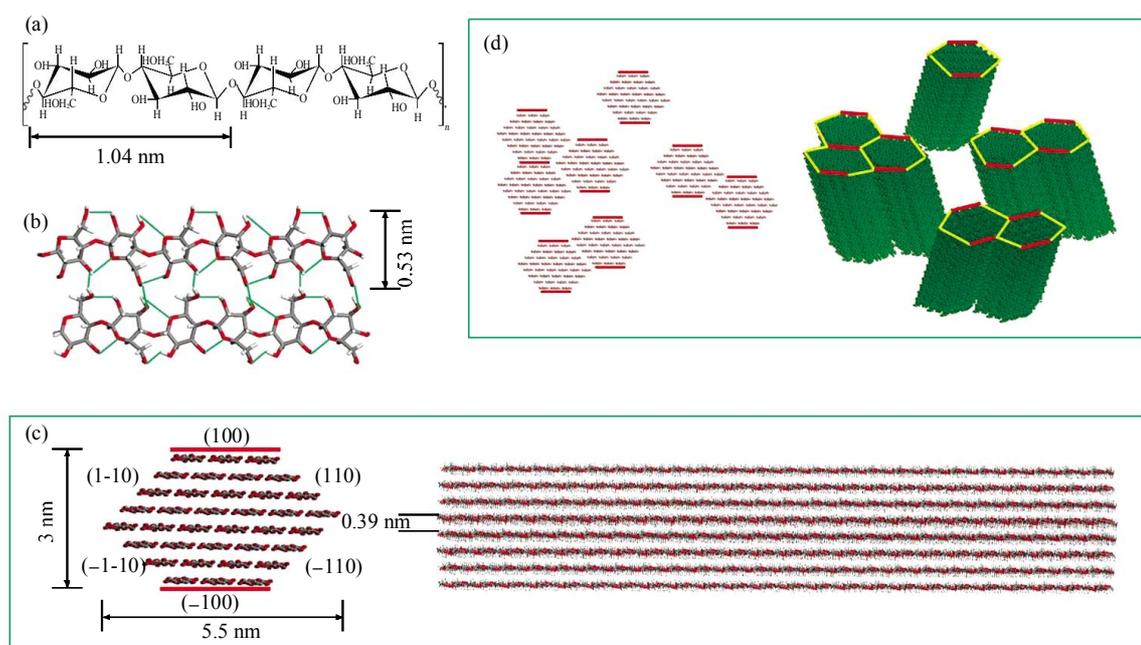


Fig. 1 The multi-level structure of microfibrils

图 1 微纤丝的多层次结构模型

(a) 纤维二糖通过 β -1, 4 糖苷键形成分子链, 这是一级结构. (b) 糖链通过氢键形成纤维分子链片层结构. (c) 结晶纤维素 I_{β} 分为 6 个界面, 其中只有 100 面及其补面为疏水面, 纤维素片层结构通过范德华力进行堆积形成致密的 36 根糖链 CEFs, 其中片层之间距离约为 0.39 nm. (d) 植物细胞壁中 CEF 还会进一步进行聚集, 形成微纤丝, 在聚集分布过程中其排列方向有所差异.

构。葡萄糖分子链间平行排列, 通过分子间氢键构成纤维素片层, 一个二糖重复单元平均形成 4 个分子间氢键, 4 个分子内氢键, 这种纤维素片层结构可以称为 CEF 的二级结构(图 1b)。不同纤维素片层之间通过疏水作用以及范德华力致密堆积, 形成 CEF 三级结构单元, 其中片层与片层之间距离为 0.39 nm, 36 根葡萄糖链一般由 8 层片段堆积, 形成 3 nm×5.5 nm 的 CEFs(图 1c)。CEF 空间结构呈现为不规则的六面体结构, 其中结晶纤维素 I_β 6 个晶面中只有 2 个面为疏水面(100 面及其对称面), 多数纤维素酶的结合与降解发生在疏水面上^[23], 研究中发现 CEFs 结晶可以扭转, CEFs 疏水面可以水平或垂直方位存在。不同 CEFs 在植物细胞壁中会形成尺寸更大微纤丝 (microfibril), 直径可达 20 nm 左右。天然玉米秸秆中不同细胞壁具有不同的微纤丝间堆积方式^[24], 细胞壁中不同组织层次 CEFs 的堆积聚集程度不同, 其中微纤丝的 CEF 数量从 1~5 根不等, 并且不同的 CEFs 在细胞壁中排列方向也不尽相同(图 1d)。其他植物的微纤丝也具有类似结构, 但不同植物微纤丝直径差别较大^[25]。

随着 AFM 超分子结构分析的深入, 天然底物由于表面起伏大, 异质性强, 不利于 AFM 等扫描探针显微镜的分析, 因此制备模式样品就成为 AFM 观测、分析的前提。人工制备的样品首先要求化学成分上要有保真性, 其次跟踪分析纤维素的降解过程需要一个均质、纳米层次上的平坦底物界面^[26]。对于纤维素酶协同作用研究, 底物的制备还需确保不同纤维素酶组分能够拥有各自特定纤维素底物^[27]。2012 年, Bubner 等^[26]首次制备出结晶 - 无定型纤维素模式底物 (amorphous- crystalline cellulosic model substrate, MACS), 相关底物性质接近天然底物, 并且在纳米层次上平坦的成分是均一的, 这样才可基于 AFM 定量分析提出底物降解过程的经验模型。

2 AFM 对纤维素酶解速度的可视化分析

2.1 单一酶分子降解结晶纤维素的酶解动力学过程定量分析

随着 AFM 技术的发展, 在纳米尺度上观察纤维素底物已经不是难题, 然而传统 AFM 需要 1~100 min 才能获得较高质量的图像, 不能实时观测酶分子动态学过程^[9]。酶分子的运动实时分析要求达到毫秒时间分辨率与纳米空间分辨率^[28], 而限制

AFM 扫描成像速率的因素主要在于显微镜运转过程中运动部件的反应速度, 如探针和扫描器, 运动部件的反应速度与其质量均方根成反比函数关系 ($V \sim 1/\sqrt{m}$)。因此, 如果要增加 AFM 扫描速率, 就需要选择更轻便的探针和扫描器, 当然相关控制电路与光线检测系统也需相应改进^[29]。high-speed AFM 论文发表在 23 年前^[30], 通过对 AFM 不断改进, 到 2006 年 Hansma 等^[9]发现从微悬臂、扫描器以及反馈控制系统等方面进行改进, 可以很大程度上提高 AFM 扫描速度与分辨率。现在 AFM 可清楚地观察到生物单分子, 并可跟踪其动力过程。

2009 年 Igarashi 等^[31]利用 high-speed AFM 对瑞典木霉外切纤维素酶 (*Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I, CBH I, 又称 TrCel7A, EC.3.2.1.176) 在结晶纤维素表面的降解过程进行了观察分析, 通过 AFM 的 Z 轴高度分析确定酶分子在纤维素表面的存在, 再通过跟踪单个酶分子运动过程, 发现酶分子在结晶纤维素表面上仅能单方向运动, 其运动平均速度大约在 3.5 nm/s 左右, 这说明酶分子的解离率是不高的。2011 年 Ding 等^[32]的结果再次验证相关运动效率, 并清楚地分辨出酶分子的催化结构域 (catalytic domain, CD)、碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding domain, CBM) 及其运动过程。

结晶纤维素的微纤丝是有多个结晶表面(图 1c), 纤维素酶分子结合并降解结晶纤维素的特定表面也一直是人们研究的热点。早在 2003 年 Lehtiö 等^[23]通过 TEM 证明热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 纤维小体支架蛋白 CipA 中第 1、3 家族的 CBMs 结合于 *Valonia* 结晶纤维素 I_α 的两个对称疏水面上 (110 面)。Xu 等^[33-34]也分别在 2008、2009 年通过借助于半导体量子点 (semiconductor quantum dots, ZnS QDs) 标记的单分子跟踪技术发现第 2、3a 家族 CBMs 结合于 *Valonia* 结晶纤维素 110 疏水面上, 并在结晶纤维素表面呈线性分布。然而微纤丝的疏水面相对于其亲水面是非常小的, 那么含有 CBM 与 CD 的整个酶分子仅仅结合于结晶纤维素疏水面并对其进行降解吗? 针对这一问题, Liu 等^[32]设计了一个巧妙实验, 通过处理云母片使结晶微纤丝 I_α 的亲水面 (100 面) 定向固定于云母片上, 暴露出疏水面 (110 面), 利用 AFM 实时跟踪 CBH I 降解过程中微纤丝同一位置的高度、宽度变化, 发现在降解过程中高度没有发生明显变化, 宽度却明显减

小, 基于 CEFs 结构模式, 该实验直接可视化证实了酶解过程只能发生在有限的疏水面上, 结合模式如图 2a 所示. 加入过量的相关酶分子, 由于受限于有限疏水面积, 多个酶分子会共同作用于同一疏水面上不同的糖链, 由于降解持续效率的差异, 将会导致酶分子持续性运动上的“堵车”(traffic jam)现象^[35]. 而加入瑞氏木霉外切纤维素酶 (*Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II, 简称 CBH II, 又称 *T_rCel6A.EC.3.2.1.91*) 降解效率明显提升, 并且出现协同效应^[35]. Igarashi 等^[36]利用超临界氨处理结晶纤维素 I 形成结晶纤维素 III₁ 类型, 使得晶体纤维素可及疏水面积增加, 利用酶解处理产生纤维二糖的效率比结晶纤维素 I 提高 5 倍以上. 这些证据就说明疏水面的可及性限制了 CBH I 等酶分子的降解效率.

外切纤维素酶具有持续性单方向降解纤维素的特征, 有的是从还原端, 有的是从非还原端单向降解的. Imai 等^[18]通过 TEM 发现 CBH I 是单向结合降解结晶纤维素的还原端, 并从还原端开始降解形成锐化末端, 模式图见图 2b, c, 这与 Zhang 等^[37]利用 AFM 观察的结果一致, CBH I 不仅是单向而且是从还原端开始降解结晶纤维素. 2011 年 Liu 等^[32]通过 AFM 动态观察进一步证实 CBH I 是从还原端处

进行逐层降解形成微纤丝锐化末端. CBH II 是从结晶微纤丝的非还原端开始降解(图 2d), 形成的结构与 CBH I 类似但末端不同.

瑞氏木霉分泌的外切纤维素酶 II (CBH II) 可以从非还原端开始降解结晶纤维素, 可以引起结晶微纤丝末端的锐化^[38], 除此之外生化数据表明 CBH II 还具有内切纤维素酶活性, 可以有效降解无定型纤维素^[39]. 生化数据表明内切纤维素酶 (endoglucanase, EG.EC.3.2.1.4) 主要降解无定型纤维素, 对结晶纤维素降解活性较低. Wang 等^[40]通过 AFM 清楚地观察到 EG 可有效地降解无定型纤维素, 而内切纤维素酶 EG 同样降解结晶纤维素, 在结晶纤维素上形成新的还原末端与非还原末端, 这样就与外切纤维素酶 CBH I、CBH II 形成很好的协同降解作用(图 2d). 使其底物表面的粗糙度 (surface roughness) 明显增加. EG 的功能除有效降解微纤丝的无定型纤维素外, 还可以导致结晶纤维素的润胀 (swelling): 即 EG 有效降解结晶纤维素的前期微纤丝直径变小, 实验中发现微纤丝直径在 50~60 min 内达到最小值, 结晶纤维素底物的体积也降低至 60%, 但至 185 min 时, 后续降解中微纤丝直径却增大, 体积也增加到了最初的 93%.

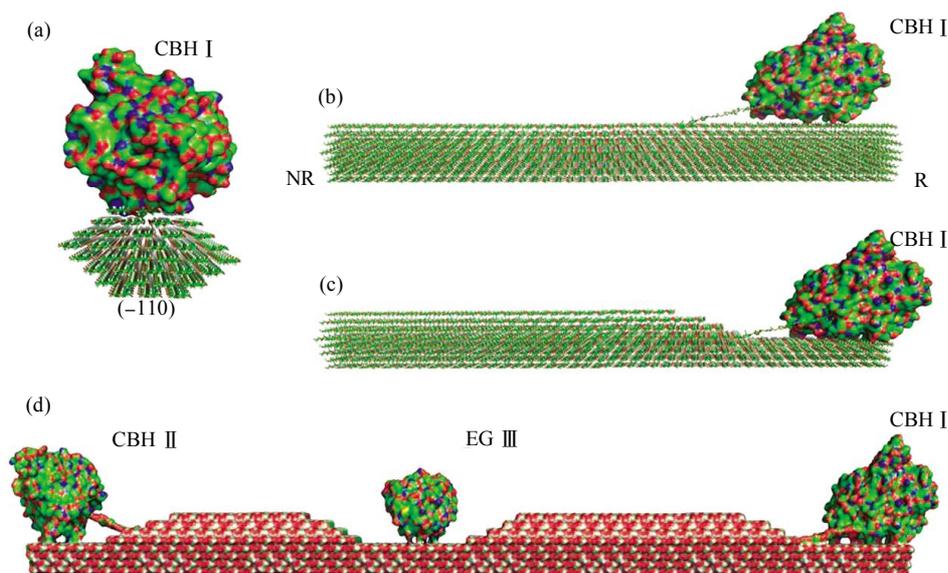


Fig. 2 The graphic modes of the degradation of crystalline cellulose by CBH I and the synergistic effect by CBH I、CBH II and EG III

图 2 CBH I 降解结晶纤维素以及 CBH I、CBH II 和 EG III 之间协同作用模式图

(a) CBH I 结合结晶纤维素 I_a 疏水面 110 面及其补面. (b,c) 在降解过程中从还原端向非还原端运动(b), 并且能够引起还原端锐化(c). (d) CBH II 是从非还原末端向还原末端运动, EG 能通过内切纤维素酶活性形成新的还原末端与非还原末端, 与 CBH I 以及 CBH II 形成很好的协同作用.

2.2 多酶组分协同降解机制的 AFM 研究

结晶纤维素降解效率是纤维素降解的瓶颈, CBH 可以完成对结晶纤维素的降解, 而 CBH 对结晶微纤丝的降解是特定表面上特定末端结合、特定单方向运动, 这限制了酶解效率的提升. 早在 1972 年, Wood 等^[41]就从生化分析得出结论, 纤维素酶组分之间存在内外协同作用, 然而该过程一直未获得直接的超微结构可视化证明. Igarashi 等^[35]利用 AFM 分析了 CBH I、CBH II 的高效协同降解结晶微纤丝的动态学行为, 在反应体系中同时加入 CBH I、CBH II, 其产生纤维二糖总量要多于单独加入两种酶分子降解产生量的简单加和, 同时运用 high-speed AFM 观测到了结晶纤维素消失速率比两者单独加入时的降解速率要更快, 初步推测是 CBH II 活性位点处两个 loops 打开, 具有了内切纤维素酶的性质, 在结晶纤维素表面形成新链的断

口, 增加了 CBH I 新的结合位点.

2013 年 Bubner 等^[27]研究 CBH I、CBH II 以及一种 EG 之间的协同降解作用, 在整个反应过程中发现 CBH I 主要降解细小结晶纤维素(直径 < 15 nm), 仅 CBH I 降解时底物转化量只有 14% (图 3a). 体系中加入 CBH II 或 EG 时, 可以观测到结晶纤维素附近的无定型纤维素降解, 这使得样品表面粗糙度明显增加(图 3b, c). 在无定型-结晶混合纤维素底物中, 无定型纤维素的降解使得结晶纤维素暴露, 这样 CBH I 对细小结晶纤维素的降解效率就可提高, 表现出明显的协同降解作用, 这使得转化率达到 90%(图 3d). 人为控制酶组分的加入顺序, 先加入 CBH II 以及 EG 降解无定型纤维素, 之后再加入 CBH I, 可以重现了混合酶系降解天然底物的复杂过程.

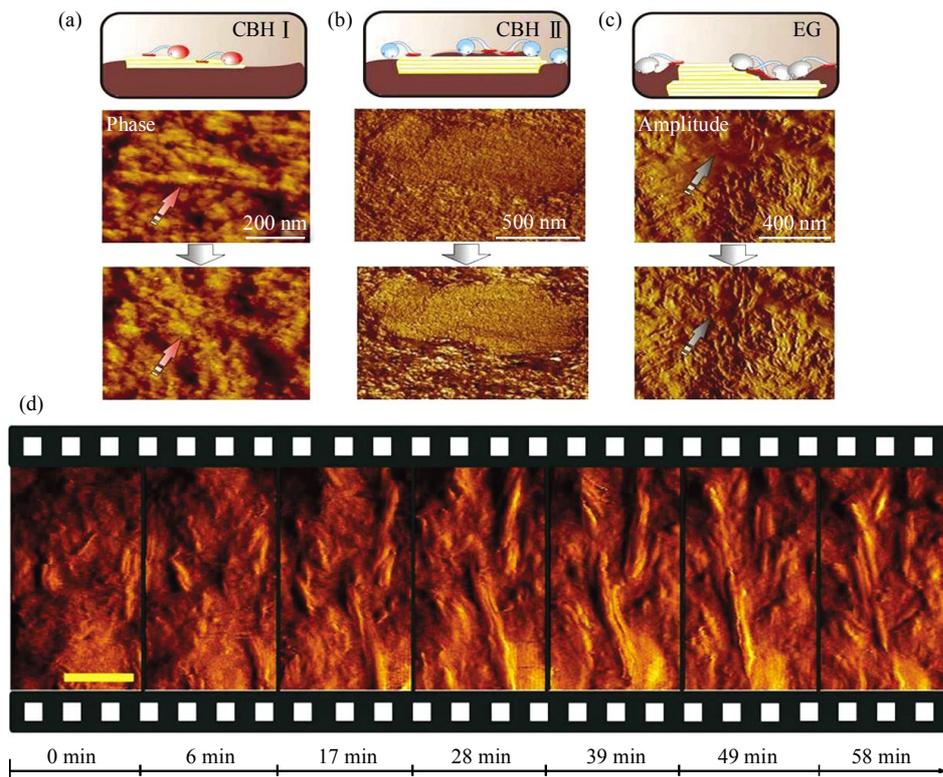


Fig. 3 Dissecting and reconstructing synergism of single enzymes and synergism degradation by the complete cellulase system of *T. reesei*^[27]

图 3 纤维素底物的单一酶系、总酶系降解以及协同作用重现^[27]

(a)单一 CBH I 酶系能够降解暴露在外的细小结晶纤维素。(b)单一 CBH II 在“聚簇”效应下通过降解无定型纤维素对大型结晶结构进行“刨光”。(c)单一 EG 酶系能够降解无定型纤维素使得表面结晶结构更为明显。(d)酶系在降解过程中, 0~17 min 无定型纤维素得到明显降解, 在 28 min 最初被覆盖的结晶结构暴露于表面, 之后的反应过程中, 结晶微纤丝从原始末端以及新形成断口处被高效降解。(d)标尺为 100 nm.

Wang 等^[42]利用 AFM 等技术对协同作用进行了系统研究, 区分了外切 - 内切纤维素酶(exo-endo)、内切 - 外切纤维素酶(endo-exo)以及内切 - 外切 - 外切纤维素酶(endo-exo-exo)等不同类型协同的降解过程分析, 发现加入纤维素酶顺序不同, 产生协同降解效果也明显不同, 先加入内切纤维素酶(EG I)对纤维素进行无定型纤维素降解、润张, 使得结晶纤维素暴露, 再加入外切纤维素酶(CBH I)的协同作用要比相反顺序加入作用明显. 也进一步确认 CBH II 具有内切酶活性, 可以在纤维素链上产生新的切口, 从而使得外切酶 CBH I 具有更高的降解效率, 当然三种纤维素酶共同降解纤维素底物时具有最显著的协同作用.

纤维素酶系的协同降解可以使底物表面积明显增大, 纤维素表面粗糙度明显变大, 但是长时间酶解过程中酶分子的比活力却随之降低^[43]. 通过对 MACS 及结晶纤维素的动力学分析发现, 随着底物降解, 纤维素酶分子运动受到区域局限, 不能及时转移到最佳活性(optimally active)的底物区域内, 从而造成了后续降解效率的降低^[44]. 这也就是说纤维素酶对于可降解纤维素成分的可及性受到了明显的限制.

厌氧细菌对结晶纤维素的高效降解是通过纤维小体这一“超分子机器”来完成对结晶纤维素的高效降解^[45]. 催化结构域(CD)通过黏连模块(cohesin)、对接模块(dockerin)的相互作用形成超分子复合物, 在纤维小体超分子复合物中不同的 CD 通过协同作用完成对结晶纤维素的高效降解. 其中纤维小体中纤维素酶类主要来源于 GH5、GH9 以及 GH48, 内切葡糖苷酶 *celA* 属于 GH8, 未发现存在 GH6 和 GH7 的纤维素酶^[46]. 与其他梭菌一样, 热纤梭菌纤维小体中黏连模块与对接模块之间存在两种相互作用^[47], Gilbert^[48]在 2007 年发现 I 型对接 - 黏连模块普遍是通过双重结合模式结合在一起的, 这种模式方式使得纤维小体超分子结构紧凑, 并具有柔性. García-Alvarez 等^[49]在 2011 年借助于分辨率 35Å 的冷冻电子显微镜(cryo-electron microscopy)发现热纤梭菌微型纤维小体(mini-cellulosome) 3 个黏连模块相连的结构, 黏连模块间的连接肽(linker)的柔性可以使得小体由紧凑构象转换成多变灵活构象, 柔性开放型构象可以使得纤维小体在降解非可溶性底物过程中能够延伸构象, 从而使其能够有效降解的可及性区域进一步扩大. 纤维小体在降解纤维素底物方面之所以具有很大优

势不仅因为其自身是支架蛋白聚集的多酶复合体, 该复合体还会发生动态聚合. 早在 1998 年 Bayer 等^[50]就通过 TEM 发现在用非溶性纤维素培养产生的纤维小体能够聚合成直径为 60~200 nm 的多聚纤维小体(polycellulosomal organelles). 在形成多聚纤维小体的同时两个不同的纤维小体能够形成二聚体, 该团队分析纤维小体结晶结构发现, 纤维小体能够通过其支架蛋白 CipA 的 I 型黏连蛋白与其他纤维小体支架蛋白 CipA 的 X 模块相互作用形成二聚体复合物(heterodimeric)^[51], 基于以上实验证据人们提出了纤维小体是通过支架蛋白间相互作用完成其动态聚合. 这样一来, 纤维小体不管是从催化效率还是降解区域的可及性都存在很大的优势.

纤维小体能够通过对接模块与黏连模块之间的相互作用将多个 CD 催化结构域聚集到支架蛋白上, 那么纤维小体在降解非溶性纤维素时有什么优势呢? Ding 等^[24]在 2012 年通过比较纤维小体与游离真菌纤维素酶的降解, 发现纤维小体能够通过多酶组分之间的协同作用将微纤丝从纤维束表面剥离, 并且以多根糖链同时切断的方式降解整根微纤丝(图 4a). 而游离真菌纤维素酶仅能采取我们前面所论述的从微纤丝一段进行定向、逐层降解(图 4b), 使得微纤丝发生锐化, 而非整根断裂. 利用 TEM 对 2 种酶作用于细胞壁内部结构分析, 发现微纤丝表面降解行为与 AFM 分析结果一致, 但细胞壁内部的降解行为却明显不同^[52]. Hyeon 等^[53]报道, 解纤维梭菌(*Clostridium cellulovorans*)纤维小体在降解不溶性纤维素底物时可以一次性对多根糖链进行降解, 这样纤维小体可以对纤维素表面局部范围形成明显的降解特征, 如 Resch 等^[54]通过 SEM 发现纤维小体在底物表面能够形成分散形口袋结构(discrete pockets), 纤维小体内内切葡糖苷酶 *CelA* 等不同催化结构域通过 CBM3 吸附到纤维素表面^[55], 在局部集中降解也会形成孔洞结构^[56].

当纤维小体与游离的真菌纤维素酶共同作用底物时, 通过对葡聚糖转化率的测定发现两者可以产生高效的协同作用, 借助于可视化手段对从底物表面形貌特征进行观察, 两者产生的形貌特征往往会同时出现^[54], 这种表面的作用结果就能够帮助人们理解纤维小体能够对纤维束中微纤丝进行剥离, 并且底物表面形成口袋、孔洞等形貌结构, 这一系列的作用效果无非能够使得游离的纤维素酶更充分地接触、降解纤维素底物, 形成很好的协同作用(图 4c).

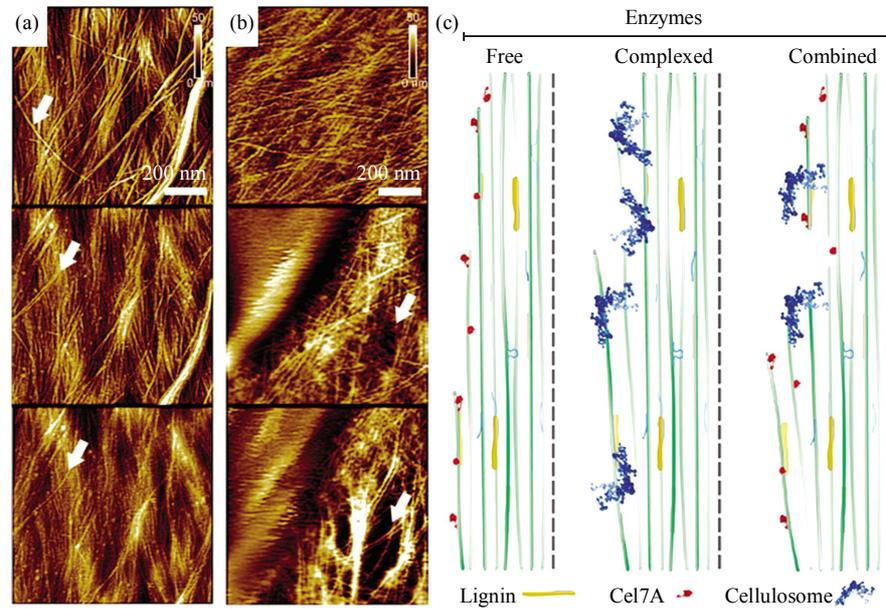


Fig. 4 AFM imaging of a single pSW by cellulosomes, fungal cellulases^[24]; Illustration of the mechanisms by which free enzymes and cellulosomes differ in their action on cellulose microfibril bundles and actsynergistically to degrade cellulose^[56]

图 4 纤维小体、真菌纤维素酶降解微纤维的 AFM 成像^[24]; 真菌纤维素酶系、纤维小体及其两者协同降解微纤维模式图^[56]
 (a) AFM 分析发现纤维小体通过剥离、降解微纤维的形式对底物进行降解。(b) AFM 分析发现真菌纤维素酶系能够对纤维素底物形成腐蚀降解。(c) 真菌纤维素酶从一端定向降解微纤维, 纤维小体剥离单根微纤维并且集中降解微纤维, 两者协同降解纤维小体能剥离微纤维, 并在底物表面形成孔洞, 有助于 CBH I 吸附。

3 总结与展望

原子力显微镜以及高速原子力显微镜等可视化技术手段可以在水相、室温以及常规大气压下观测, 不需要对观察样品或者是酶分子进行修饰或复染, 可以直接表征单个酶分子运动速度与分子动态行为, 了解其催化过程中的限性因素, 这区别于传统酶反应动力学相关研究。该技术将会推动不溶性底物界面上的酶解动力学过程及其影响因素等相关研究, 这为全面深入酶系中各酶组分的催化动态行为提供了全新视角, 将会为不同纤维素酶分子, 特别是不同作用模式下的纤维素酶深入研究奠定技术基础, 将会大大推动纤维素酶系统中各酶组分协同机制的深入研究。

超微可视化技术的进展将会推动天然木质纤维素复杂超分子结构特征的深入研究, 将会阐明不同植物中木质纤维素微纤维及其聚集方式与层次, 使得人们可以认识木质纤维素细胞壁的动态可及性、酶解过程中酶分子运动效率、酶分子间的协同效率

等一系列的限制因素, 这对特定降解酶系的选择与复配至关重要。特别是复杂酶系或多亚基超大分子的纤维小体, 直观降解过程与动态机制, 利用原子力显微镜等可视化手段可以分析微观局部的特有降解形貌结构与动态行为, 从而为构建高效解聚结晶纤维素的结合模式、运动模式以及不同组织模式的多酶体系或纤维小体体系奠定坚实的技术基础, 这将是新的研究方向与研究重点。

参 考 文 献

- [1] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506-577
- [2] Lynd L R, Wyman C E, Gerngross T U. Biocommodity engineering. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(5): 777-793
- [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. *生物工程学报*, 2013, **29**(4): 422-433
Zhang X N, Li D D, Wang L S, *et al.* *Chin J Biotechnol*, 2013, **29**(4): 422-433
- [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] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展. 自然科学进展, 2003, **13**(1): 21–29
Gao P J. Nat Sci Dev, 2003, **13**(1): 21–29
- [6] Bayer E A, Chanzy H, Lamed R, *et al.* Cellulose, cellulases and cellulosomes. Curr Opin Struct Biol, 1998, **8**(5): 548–557
- [7] Kraut D A, Carroll K S, Herschlag D. Challenges in enzyme mechanism and energetics. Annu Rev Biochem, 2003, **72**(1): 517–571
- [8] Bubner P, Plank H, Nidetzky B. Visualizing cellulase activity. Biotechnol Bioeng, 2013, **110**(6): 1529–1549
- [9] Hansma P K, Schitter G, Fantner G E, *et al.* High-speed atomic force microscopy. Science, 2006, **314**(5799): 601–602
- [10] García R. Amplitude modulation atomic force microscopy. John Wiley & Sons, 2010
- [11] Allison D P, Mortensen N P, Sullivan C J, *et al.* Atomic force microscopy of biological samples. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2010, **2**(6): 618–634
- [12] Uchihashi T, Kodera N, Ando T. Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. Nat Protoc, 2012, **7**(6): 1193–1206
- [13] Ding S Y, Xu Q, Crowley M, *et al.* A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. Curr Opin Biotechnol, 2008, **19**(3): 218–227
- [14] Zhang Y Z, Chen X L, Liu J, *et al.* Size and arrangement of elementary fibrils in crystalline cellulose studied with scanning tunneling microscopy. J Vacuum Sci Technol B, 1997, **15**(4): 1502–1505
- [15] Zhang Y Z, Liu J, Gao P J, *et al.* Structure investigation of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma pseudokoningii* S38 with a scanning tunneling microscope. Applied Physics A: Materials Science & Processing, 1998, **67**(4): 483–485
- [16] Wang L S, Liu J, Zhang Y Z, *et al.* Comparison of domains function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by limited proteolysis. J Mol Catalysis B: Enzymatic, 2003, **24**: 27–38
- [17] Wang L S, Zhang Y Z, Gao P J. A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, **51**(7): 620–629
- [18] Imai T, Boisset C, Samejima M, *et al.* Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on *Valonia* cellulose microcrystals. FEBS Letters, 1998, **432**(3): 113–116
- [19] Imai T, Putaux J L, Sugiyama J. Geometric phase analysis of lattice images from algal cellulose microfibrils. Polymer, 2003, **44**(6): 1871–1879
- [20] Baker A A, Helbert W, Sugiyama J, *et al.* New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the I α crystal phase at near-atomic resolution. Biophys J, 2000, **79**(2): 1139–1145
- [21] Ding S Y, Himmel M E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. J Agric Food Chem, 2006, **54**(3): 597–606
- [22] Zhang Y H P, Lynd L R. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. Biomacromolecules, 2005, **6**(3): 1510–1515
- [23] Lehtio J, Sugiyama J, Gustavsson M, *et al.* The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(2): 484–489
- [24] Ding S Y, Liu Y S, Zeng Y, *et al.* How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?. Science, 2012, **338**(6110): 1055–1060
- [25] Šturcová A, His I, Apperley D C, *et al.* Structural details of crystalline cellulose from higher plants. Biomacromolecules, 2004, **5**(4): 1333–1339
- [26] Bubner P, Dohr J, Plank H, *et al.* Cellulases dig deep: *in situ* observation of the mesoscopic structural dynamics of enzymatic cellulose degradation. J Biol Chem, 2012, **287**(4): 2759–2765
- [27] Ganner T, Bubner P, Eibinger M, *et al.* Dissecting and reconstructing synergism *in situ* visualization of cooperativity among cellulases. J Biol Chem, 2012, **287**(52): 43215–43222
- [28] Ando T, Uchihashi T, Kodera N, *et al.* High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008, **456**(1): 211–225
- [29] Casuso I, Kodera N, Le Grimellec C, *et al.* Contact-mode high-resolution high-speed atomic force microscopy movies of the purple membrane. Biophys J, 2009, **97**(5): 1354–1361
- [30] Barrett R C, Quate C F. High-speed, large-scale imaging with the atomic force microscope. J Vac Sci Technol B, 1991, **9**(2): 302–306
- [31] Igarashi K, Koivula A, Wada M, *et al.* High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. J Biol Chem, 2009, **284**(52): 36186–36190
- [32] Liu Y S, Baker J O, Zeng Y, *et al.* Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. J Biol Chem, 2011, **286**(13): 11195–11201
- [33] Xu Q, Tucker M P, Arenkiel P, *et al.* Labeling the planar face of crystalline cellulose using quantum dots directed by type- I carbohydrate-binding modules. Cellulose, 2009, **16**(1): 19–26
- [34] Liu Y S, Zeng Y, Luo Y, *et al.* Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface?. Cellulose, 2009, **16**(4): 587–597
- [35] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, *et al.* Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. Science, 2011, **333**(6047): 1279–1282
- [36] Igarashi K, Wada M, Samejima M. Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase. Febs Journal, 2007, **274**(7): 1785–1792
- [37] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnol Bioeng, 2004, **88**(7): 797–824
- [38] Jalak J, Kurašin M, Teugjas H, *et al.* Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. J Biol Chem, 2012, **287**(34): 28802–28815

- [39] Koivula A, Kinnari T, Harjunpää V, *et al.* Tryptophan 272: an essential determinant of crystalline cellulose degradation by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel6A. *FEBS Letters*, 1998, **429**(3): 341–346
- [40] Wang J, Quirk A, Lipkowski J, *et al.* Real-time observation of the swelling and hydrolysis of a single crystalline cellulose fiber catalyzed by cellulase 7B from *Trichoderma reesei*. *Langmuir*, 2012, **28**(25): 9664–9672
- [41] Wood T M, McCrae S I. The purification and properties of the ccomponent of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem J*, 1972, **128**: 1183–1192
- [42] Wang J, Quirk A, Lipkowski J, *et al.* Direct *in situ* observation of synergism between cellulolytic enzymes during the biodegradation of crystalline cellulose fibers. *Langmuir*, 2013, **29** (48): 14997–15005
- [43] Wang L, Zhang Y, Gao P, *et al.* Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(3): 443–456
- [44] Eibinger M, Bubner P, Ganner T, *et al.* Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. *FEBS Journal*, 2014, **281**(1): 275–290
- [45] 王金兰, 王禄山, 刘巍峰, 等. 降解纤维素的“超分子机器”研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(1): 28–35
Wang J L, Wang L S, Liu W F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(1): 28–35
- [46] 陈林, 王禄山, 张怀强. 热纤梭菌高效降解木质纤维素过程的组学研究进展. *微生物学报*, 2014, **54**(2): 121–128
Chen L, Wang L S, Zhang H Q. *Acta Microbiol Sin*, 2014, **54**(2): 121–128
- [47] Fan L H, Zhang Z J, Yu X Y, *et al.* Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(33): 13260–13265
- [48] Gilbert H J. Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. *Mol Microbiol*, 2007, **63** (6): 1568–1576
- [49] García-Alvarez B, Melero R, Dias F, *et al.* Molecular architecture and structural transitions of a *Clostridium thermocellum* mini-cellulosome. *J Mol Biol*, 2011, **407**(4): 571–580
- [50] Bayer E A, Shimon L J W, Shoham Y, *et al.* Cellulosomes—structure and ultrastructure. *J Struct Biol*, 1998, **124**(2): 221–234
- [51] Adams J J, Currie M A, Ali S, *et al.* Insights into higher-order organization of the cellulosome revealed by a dissect-and-build approach: crystal structure of interacting *Clostridium thermocellum* multimodular components. *J Mol Biol*, 2010, **396**(4): 833–839
- [52] Resch M G, Donohoe B S, Baker J O, *et al.* Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy & Environmental Science*, 2013, **6**(6): 1858–1867
- [53] Hyeon J E, Jeon S D, Han S O. Cellulosome-based, *Clostridium*-derived multi-functional enzyme complexes for advanced biotechnology tool development: advances and applications. *Biotechnol Adv*, 2013, **31**(6): 936–944
- [54] Resch M G, Donohoe B S, Baker J O, *et al.* Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy & Environmental Science*, 2013, **6**(6): 1858–1867
- [55] Berlin A. No barriers to cellulose breakdown. *Science*, 2013, **342**(6165): 1454–1456
- [56] Brunecky R, Alahuhta M, Xu Q, *et al.* Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. *Science*, 2013, **342**(6165): 1513–1516

The Visual Representation for Cellulase Degradation Velocity and The Analysis for Limiting Factor*

MENG Fan-Hui, JIANG Xu-Kai, LIU Lin, ZHANG Huai-Qiang, GAO Pei-Ji, WANG Lu-Shan**

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

Abstract The efficient bioconversion of lignocelluloses is limited by the enzymatic hydrolysis efficiency, atomic force microscope (AFM) enables us to represent the Real-time motion behavior of the cellulase in the aqueous solution, to analysis the moving velocity and limiting factors. Cellobiohydrolase (CBH) is demonstrated to combine to specific site of the crystal face, to move unidirectionally and accomplish the degradation layer by layer. Over-dose cellobiohydrolase which combine to special face results in the "traffic jam" phenomenon. The degradation efficiency of crystal cellulose not only depends on the moving velocity of the enzyme molecule and the cleavage of glycosidic bond, but also lies on the crystal surface area of accessible substrate and the breakdown of hydrogen bonds on the crystal face. The novel cellulase complex or system with different combining mode, different movement mode or composition mode should be an important research aspect in the future.

Key words lignocellulose, cellulase, atomic force microscope (AFM), degradation efficiency, limiting factor

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0220

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation (31370111, 31070063) and Shandong International Science and Technology Cooperation Project (LuKeHeZi [2011] no. 176 in item 6).

**Corresponding author.

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

Received: December 24, 2014 Accepted: January 12, 2015