



生物质多糖的高效降解与降解酶(系)的精确定制*

张舒¹⁾ 赵越¹⁾ 陈冠军¹⁾ 余俊红²⁾ 吴秀芸^{1)**} 王禄山¹⁾

(¹⁾ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 青岛 266237;

(²⁾ 青岛啤酒股份有限公司啤酒生物发酵工程国家重点实验室, 青岛 266000)

摘要 自然界中多糖类生物质资源十分丰富, 然而其复杂的抗降解屏障限制了生物转化的进程. 近年来, 随着生物质多糖结构的快速解析以及大量多糖降解酶的鉴定研究, 针对不同底物结构或产物需求, 仿制高效微生物多糖代谢途径, 精确定制多糖降解酶系, 促进生物质高效转化已成为可能. 本文分析中性多糖(纤维素和木聚糖)、碱性多糖(几丁质和壳聚糖)以及酸性多糖(褐藻胶)的精细结构组成与基团性质, 总结3类多糖主要降解酶的活性架构特征及其底物精确结合模式. 文章还阐述蛋白质工程设计与定制策略, 针对酶分子不同功能区的分析, 可为酶分子的功能快速设计与改造提供靶点, 以获得适宜于工业应用的高效酶分子, 此外, 根据微生物胞外降解酶系的降解次序与协同关系, 可基于应用需求精确定制复杂多糖降解酶系, 实现生物质的高效与高值降解转化.

关键词 生物质生物转化, 多糖降解酶, 底物结合模式, 蛋白质工程, 定制酶系

中图分类号 Q5, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0214

地球上存在着丰富的生物质资源, 包括陆地的植物和海洋中的藻类物质等等, 它们利用光合作用, 由太阳能驱动二氧化碳和水, 作为生物质碳源和能源. 在生物质资源中, 含量最丰富的是组成植物细胞壁的纤维素和半纤维素多糖^[1]以及海藻细胞壁中的海藻多糖^[2]. 此外, 还有广泛存在于昆虫、甲壳类动物外骨骼以及真菌细胞壁中的几丁质多糖^[3], 它们都是重要的结构成分或者能量存储的媒介. 根据它们的化学性质可分为中性多糖、碱性多糖和酸性多糖, 这些多糖聚合物具有非常复杂的结构组成, 其资源化利用一直是人们关注的重点^[4].

微生物的生长依赖于其所在的环境, 由于环境中多糖底物结构复杂多样, 因此在长期的进化过程中, 微生物能合成或分泌多种多糖降解酶, 从而进化出各种功能的酶分子^[5], 具有强大的多糖降解与转化能力. 因此, 要完成生物质多糖的高效快速降解, 除了了解多糖底物的结构外, 还需要了解酶分子的不同结构域或功能区, 这是实现酶系定制的前提. 不同的酶分子其功能具有差异, 这与它们识

别底物的特定结构模式有关.

近年来, 为提高多糖类生物质的生物转化率, 人们一方面致力于解析生物质多糖的精细结构^[3, 6], 另一方面通过蛋白质工程策略对降解酶进行设计改造^[7]. 微生物为维持自身的生长形成了庞大的降解酶系统, 能够高效降解这些生物质多糖, 因此, 可通过研究多酶系的协同降解, 重构微生物高效多糖代谢途径, 进而人为定制高效降解酶系促进多糖的生物转化.

1 代表性多糖类生物质

1.1 中性多糖——纤维素和木聚糖

纤维素是自然界中最丰富的多糖, 是植物细胞壁的主要结构成分^[8-9]. 纤维素是由单一的葡萄糖单元通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性长链, 没有

* 青岛市博士后应用研究项目, 国家自然科学基金(31770054)和国家重点研发计划(2016YFD0800601)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0532-58631569, E-mail: wuxiuyun3353@163.com

收稿日期: 2020-06-30, 接受日期: 2020-08-07

分支或取代基, 但结构层次多样. 纤维素中的每个葡萄糖单元带有 3 个羟基 (C2、C3 和 C6) (图 1a), 它们参与分子内和分子间氢键的形成, 特别是相邻葡聚糖长链间往往形成 O-6-H...O-3 氢键作用, 从而聚合形成纤维素片层, 片层之间再通过范德华力等疏水作用堆积, 组装形成微纤丝, 微纤丝进一步组装成纤维素纤维的高结晶度结构. 纤维素

的结晶度根据其来源而有所不同^[10]. 有研究提出结晶纤维素的规则六面体结构模型, 微纤丝在不同晶面聚集或朝轴向扭转, 但天然存在的结晶纤维素通常受环境因素的限制难以形成规则的六面体结构, 而形成多样的微纤丝结构^[6]. 此外, 纤维素能够与其他聚合物交联^[9], 形成复合的抗降解屏障, 进一步增加降解难度.

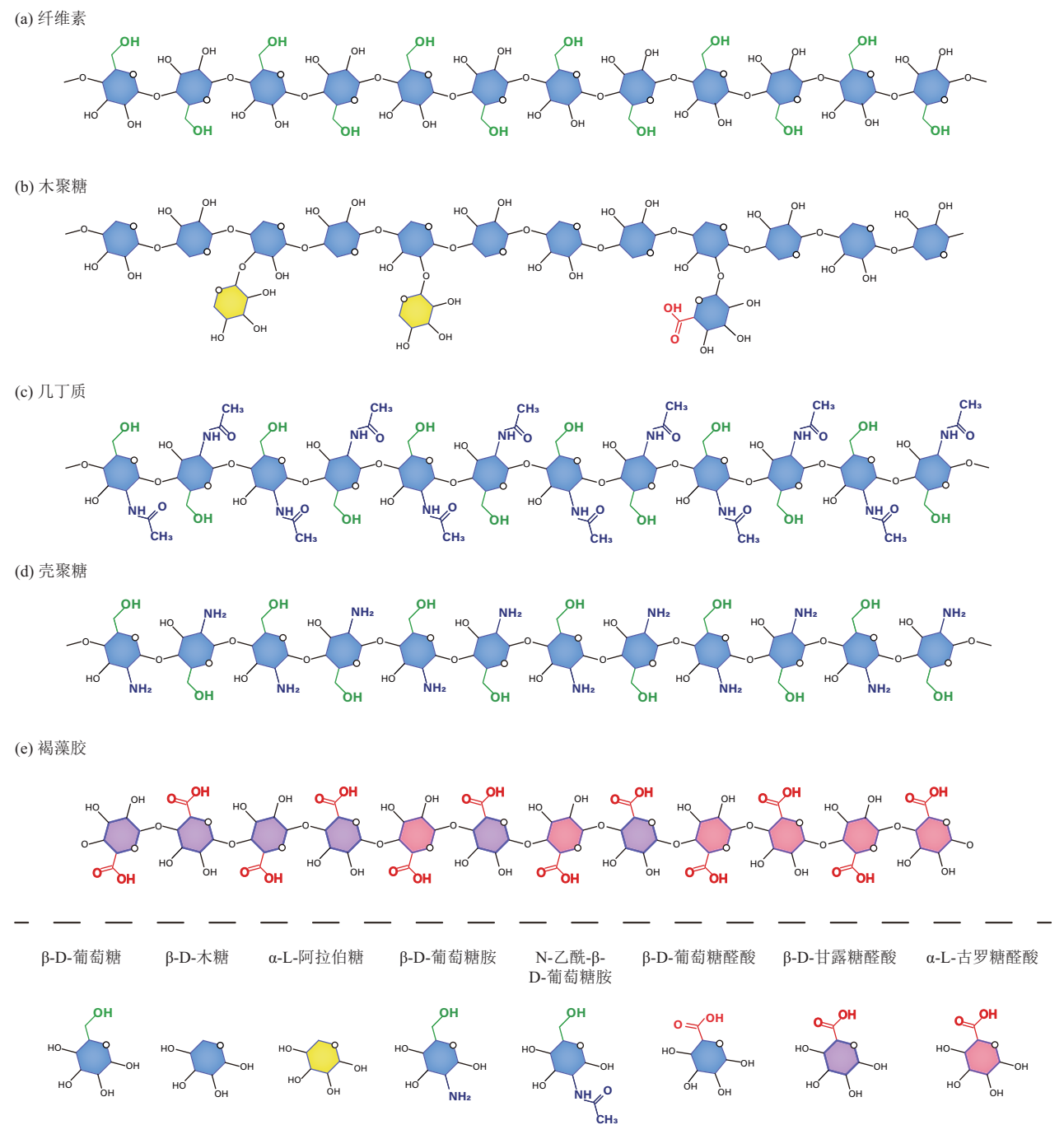


Fig. 1 The structures of polysaccharide polymers and their monomers

图1 多糖聚合物及其单体的结构

(a) 纤维素; (b) 木聚糖; (c) 几丁质; (d) 壳聚糖; (e) 褐藻胶.

半纤维素的主链通常是由木糖（木聚糖）、甘露糖（甘露聚糖）、葡萄糖（ β -1,3-1,4-葡聚糖、木葡聚糖）等组成，主链骨架上有多样的侧链分支取代^[11]。木聚糖是含量最丰富的半纤维素多糖，它在高尔基体中合成，形成基质网络直接或间接地与表面纤维素相连^[12]，与纤维素和木质素共同形成植物细胞壁的抗降解屏障，帮助抵御外界微生物或酶的降解。木聚糖与纤维素的区别在于其单体C5无取代基，因此只能在C2与C3的羟基上形成氢键（图1b）。此外，其主链骨架上还具有侧链分支，由不同的残基取代，包括乙酰基、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖和阿魏酸等，并且不同物种来源或预处理的木聚糖中侧链取代基和取代度都会有所不同^[13-14]。

1.2 碱性多糖——几丁质与壳聚糖

几丁质（chitin）是仅次于纤维素的第二大天然多糖，是昆虫、甲壳类动物（如螃蟹和虾）的外骨骼以及真菌细胞壁的结构元素。几丁质由N-乙酰-D-葡萄糖胺通过 β -1,4-糖苷键连接而成，是纤维素的同系物，与纤维素的区别在于几丁质单糖的C2位被一个乙酰氨基所取代^[15]（图1c），带有正电荷，能够增加相邻聚合物之间的氢键作用，因此能够形成不易降解的结晶结构^[15-16]。

壳聚糖（chitosan）是几丁质的衍生物，它是通过在碱性条件下使几丁质进行部分脱乙酰化，或在几丁质脱乙酰基酶存在下进行酶促水解而获得的^[17]（图1d）。由于几丁质的半结晶形态，通过固态反应获得的壳聚糖具有不均匀分布的乙酰基。因此，壳聚糖是 β -1,4-D-葡糖胺（脱乙酰单元）和N-乙酰基-D-葡糖胺（乙酰化单元）连接组成的，是自然界唯一的真正带阳离子的碱性多糖聚合物，壳聚糖的羟基和氨基参与形成分子内和分子间氢键，使其难溶于水和其他常见的有机溶剂^[18]。几丁质和壳聚糖在酸性条件下都会发生部分水解，得到具有生物活性的寡糖，在医药、化工等领域具有重要应用前景^[17-18]。

1.3 酸性多糖——褐藻胶

海洋藻类具有丰富的海藻多糖，这些海藻多糖能够作为海藻细胞壁的重要组成成分或者能量存储的媒介。褐藻胶是酸性阴离子多糖，在褐藻中含量丰富，约占干重的40%^[19]。褐藻胶由 β -D-甘露糖醛酸（M）及其C5位差向异构体 α -L-古罗糖醛酸（G）两种糖单元通过1,4-糖苷键交替或随机连接构成杂多糖^[20]，通常有3种存在形式，分别为连续M（poly M）、连续G（poly G）或连续M与G

交替（polyM/G）（图1e）。尽管M与G是差向异构体，仅在C5处不同，但它们具有不同的构象。在polyM中，所有M均为¹C1构象，并通过 β -1,4-糖苷键连接，显示出线性和柔性构象；而在polyG中，所有G均为¹C4构象，并通过 α -1,4-糖苷键连接，分子间进行交联形成褐藻胶凝胶，因此polyG赋予多糖链刚性^[21]。

褐藻胶通过褐藻胶裂解酶或物理化学方法解聚后得到的褐藻寡糖具有多种生物活性，具有很大的药用潜力^[2, 22]，这引起了越来越多的关注。

2 代表性多糖聚合物的降解酶及结合模式

参与多糖降解的酶主要是糖苷水解酶（GH）、多糖裂解酶（PL），它们的活性部位由催化氨基酸和结合氨基酸组成。活性部位中催化底物糖苷键断裂位置定义为0亚位点，断键位置往还原端方向为+N，往非还原端方向为-N，催化反应发生在-1和+1亚位点之间^[23]。

糖苷水解酶（下文的纤维素酶、木聚糖酶、几丁质酶等）是通过保留型或反转型的酸碱催化来完成的，催化残基为两个带羧基侧链的氨基酸（谷氨酸或天冬氨酸）残基，一个作为质子供体，另一个作为亲核试剂；多糖裂解酶（褐藻胶裂解酶）的催化通过 β -消除反应来完成。除了催化位点外，多糖降解酶中还具有一些负责结合的亚位点，由结合残基以非共价的方式与底物形成相互作用，包括氢键、盐桥和范德华力（下文中的相互作用主要指酶分子活性部位中保守氨基酸与糖环羟基氧原子、氨基氮原子或羧基氧原子存在的氢键相互作用及与吡喃糖环存在的CH- π 相互作用），从而促进酶和底物的结合以及促进催化氨基酸进行催化作用^[24]。

纤维素酶、木聚糖酶、几丁质酶和褐藻胶裂解酶等，它们是降解某一类多糖底物（纤维素、木聚糖、几丁质、褐藻胶等）并生成寡糖或单糖的酶系总称。以纤维素酶为例，它是水解纤维素生成短链葡聚糖、寡糖或葡萄糖的一组酶系，根据催化反应功能的不同分为内切纤维素酶、外切纤维素酶和糖苷二糖水解酶等^[25]。

2.1 纤维素酶和木聚糖酶

在CAZy数据库中，主要的纤维素酶家族包括GH5、GH6、GH7、GH9和GH12。对这些酶的结构与功能分析表明，酶活性部位的-2到+1位是主要的底物结合亚位点。GH5只在-1亚位点存在两个相互作用，说明GH5家族酶学功能丰富，具有底物

多样性, 与GH5家族具有多种纤维素酶和甘露聚糖酶活性的现象一致^[26]; GH7家族的相互作用数最多, 说明其特异识别结合纤维素; GH6与GH9识别羟基的位置恰好互补, 说明二者在纤维素的降解中存在协同效应(图2a)。

主要的木聚糖酶家族包括GH10和GH11, 主要的底物结合亚位点也是-2到+1位^[27]。与纤维素酶相比, 木聚糖酶的活性位点上极性氨基酸较少, 而芳香族氨基酸的比例高, 这也与结合的底物结构, 即木糖缺少C6羟基有关。Xiong等^[28]基于关键木聚糖结合位点, 对木聚糖酶GH10-xyn的-2亚位点进行定点突变, 突变体GH10-N86Q对木三糖(X3)的水解能力减弱, 表明GH10-xyn的-2位点残基与X3的结合是必需的。此外, 分析表明GH10的+1位点没有保守氨基酸(图2a), 允许木聚糖在这个位点拥有侧链, 而据报道GH11木聚糖酶降解底物需要至少3个连续未取代的木糖基, 并且不能

在取代基处裂解糖苷键^[29], 因此两个家族的酶可协同完成复杂的木聚糖降解^[30]。

2.2 几丁质酶与壳聚糖酶

几丁质类降解酶主要为几丁质酶和壳聚糖酶。由于几丁质类底物的阳离子性质, 静电相互作用被认为是底物与几丁质类降解酶结合的最可能方式之一, 有研究表明-2亚位点Asp为*sp.* N174来源的壳聚糖酶中底物结合的重要残基^[31]。统计分析发现, 碱性多糖几丁质(或壳聚糖)降解酶的活性中心酸性氨基酸Glu的频率明显升高, 与底物氨基官能团带电性互补^[32]。几丁质类降解酶与底物C2取代基和O6的相互作用数较多, 与O3、O4、O5相互作用数较少。主要壳聚糖酶家族中的底物主要结合亚位点从-2到+2(GH8)或-3到+1(GH46), 识别C2的取代基时能同时结合底物亚氨基氮和乙酰氧; 主要几丁质酶家族(GH18、GH19)中的底物主要结合亚位点从-2到+2^[32], 主要结合氨基氮。GH46

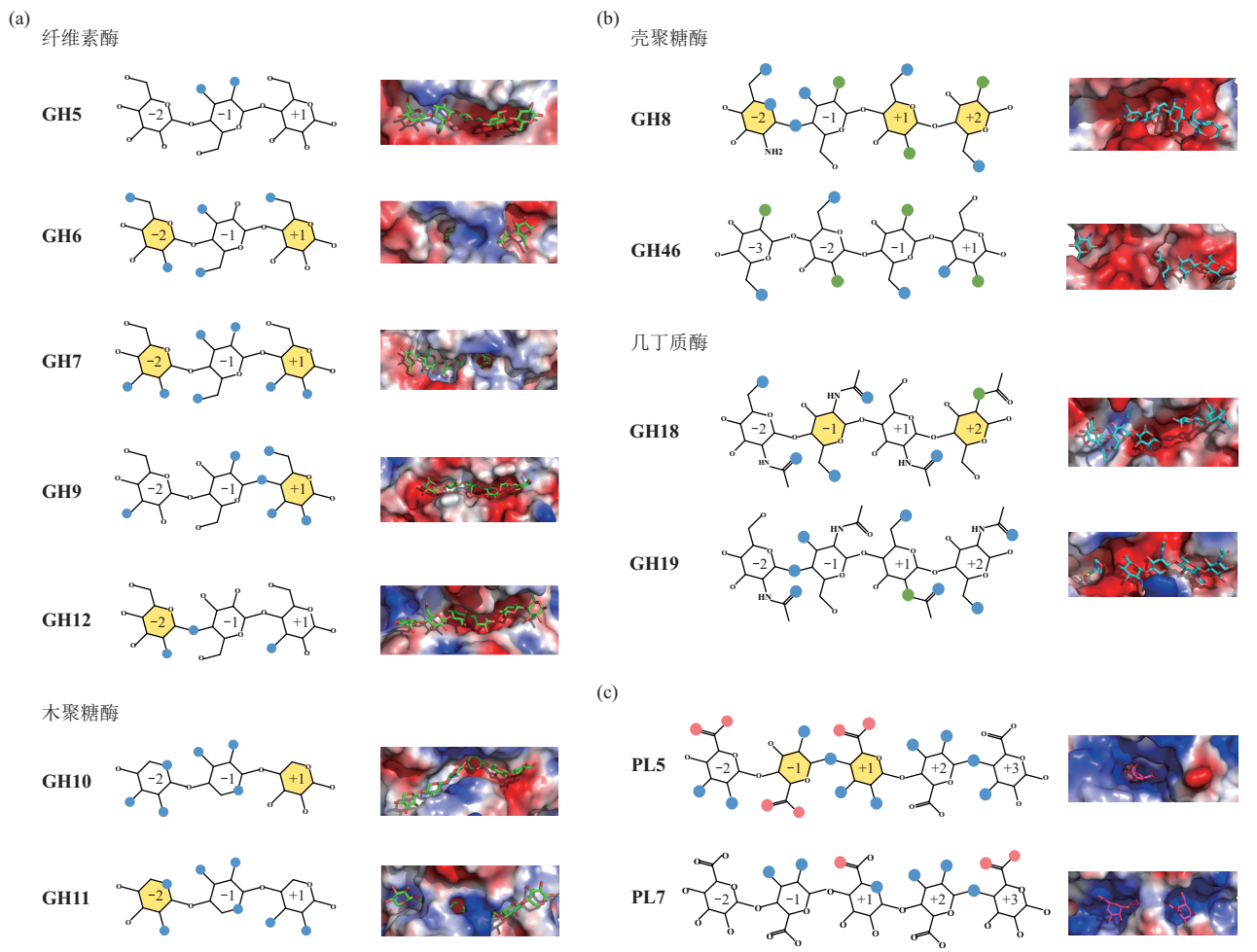


Fig. 2 Specific modes of interaction of conserved amino acid residues with ligands^[27, 32-33]

图2 多糖降解酶保守氨基酸残基与底物相互作用的模式^[27, 32-33]

(a) 纤维素酶与木聚糖酶家族; (b) 壳聚糖酶与几丁质酶家族; (c) 褐藻胶裂解酶家族。

家族壳聚糖酶较 GH8 表现出更强的底物特异性; GH19 在不同亚位点与底物具有显著的相互作用, 对 N 或 O 没有明显的偏好; 而 GH18 表现出与 O 更多的相互作用和 CH- π 相互作用 (图 2b)。

2.3 褐藻胶裂解酶

羧基的存在使得褐藻胶成为一种酸性阴离子多糖, 因此使得褐藻胶裂解酶的活性中心对带正电的 Arg 有着显著偏好^[33]。主要褐藻胶裂解酶为 PL5 和 PL7 家族, 与底物的主要结合位点是 -2 到 +3。PL5 与底物的相互作用位点数多于 PL7, PL5 主要与 -2 和 +1 亚位点的 O 相互作用, 主要识别底物非还原端内外两侧的基团; 而 PL7 则主要在 +1 和 +3 亚位点, 主要识别底物还原端的内侧 (图 2c)^[33]。有研究发现, 将多糖裂解酶 Smlt1473 中 221 位组氨酸突变为苯丙氨酸后, 会导致与 -1 糖环 O3 形成的氢键丧失, 但聚甘露糖醛酸酶活性和底物亲和力均增加, 这是由于苯丙氨酸较大的六碳糖环会使该残基和 -1 糖环之间的表面积增加一倍, 形成更强的 CH- π 相互作用, 因此增加了底物的结合力^[34]。

彩色圆形为与保守氨基酸残基有相互作用的原子, 蓝色为羟基氧、绿色为氨基氮或亚氨基氮、红色为羧基氧; 黄色吡喃环代表与底物有 CH- π 相互作用的糖单元。(GH5: PDB 2CKR; GH6: PDB 4B4F; GH7: PDB 7CEL; GH9: PDB 4TF4; GH10: PDB 4PRW; GH11: PDB 4HK8; GH18: PDB 4MNK; GH19: PDB 4DYG; PL5: PDB 3EVL; PL7: PDB 2CWS)

3 理性设计提高单一酶的催化性能

3.1 设计提高蛋白质活性

酶是能够进行高效催化反应的生物大分子, 因此提高酶活性是生物转化过程的首要目标。酶在执行催化功能时主要涉及结合底物、催化断键 (或新键合成) 和释放产物等过程, 而与底物的结合是影响酶活性的关键步骤。目前可以提高多糖降解酶与底物结合力的方式有: 增加活性中心远端残基与底物的相互作用^[35]、增加 (多个) CBM 结构域^[36] (图 3)。

通常酶家族中活性中心远端的不保守氨基酸数较催化位点附近多, 研究证明活性中心远端可能是提高结合力的改造方向。Zhang 等^[37]将里氏木霉来源的 *Tr*Cel12A 活性中心远端 -4 亚位点定点突变 (W7Y), 结果显示酶与底物的结合力升高, 随之使得酶活升高 38%, 因此活性中心远端可能是提高

酶与底物结合力的一个重要设计靶点。这一点在 GH11 家族的酶中也得到证实, Wu 等^[35]将中温酶 *AnXynB* 的远端 -3 亚位点中与底物相互作用少的非极性氨基酸, 突变为极性带电氨基酸 (S41N/T43E) 后, 导致远端结合力增加, 从而使酶更好地结合大分子寡糖, 因此远端亚位点亲和力的增强, 可以获得更高的催化效率。

碳水化合物结合模块 (CBM) 与碳水化合物降解酶和底物的结合密切相关。虽然 CBM 不具有催化活性, 但经证明 CBM 在纤维素^[38]、木聚糖^[39]、几丁质^[40]和褐藻胶^[41]等多糖降解酶结合底物的过程中起到关键作用。因此构建催化结构域+CBM 的杂合酶, 或在原有的基础上增加 CBM 个数都是提高酶结合转化底物的有效策略 (表 1)。Duan 等^[42]将纤维素酶 *UmCe19A* 与 6 种来自不同家族 (CBM1、CBM2、CBM3、CBM4、CBM10 和 CBM72) 的 CBM 融合构建杂合体蛋白, 与野生型酶相比, 融合了 CBM 的杂合酶对不溶性纤维素的催化活性和催化效率均有明显地提升, 其中 CBM4-*Umcel9A* 较野生型对微晶纤维素的酶活提高 6.6 倍。将褐藻胶裂解酶 *AlyL2-FL* 通过与 CBM13 进行融合表达提高了其与可溶性褐藻酸盐的结合能力, 从而提高了单催化模块 (*AlyL2-CM*) 的催化效率^[41]。来自嗜热纤维梭菌的内切纤维素酶 *CcCel9A* 由一个 GH9 催化结构域和 C 端 5 个 CBM 组成, 通过对 *CcCel9A* 的 CBM 截短实验及结构分析, 证明 C 端 CBM3b 和 3 个 CBMx2 使得该酶拥有了对纤维素的高效吸附能力, 而 GH9 附近的 CBM3c 能与 11 个葡萄糖环紧密结合, 从而将该酶的底物结合位点延伸到 17 个亚位点, 大大增加了酶解效率^[36]。

3.2 设计提高蛋白质稳定性

酶的稳定性是指它在环境中维持其结构和功能的能力, 也是其对恶劣环境的一种抵抗能力。但稳定性和催化活性之间可能存在某种负相关关系^[43], 因此在不改变活性的前提下实现稳定性的提高是一个研究重点。

多糖降解酶的 N 端通常与热稳定性密切相关。许多研究者已经通过生物化学方法对纤维素酶、木聚糖酶等 N 端进行改造提高其热稳定性, 包括 N 端替换^[44]、氨基酸定点突变^[45]等 (表 2)。研究表明, GH46 壳聚糖酶 *CsnA* N 端 7 个氨基酸的寡肽形成了无规卷曲, N 端氨基酸缺失后不影响与底物的结合, 却使 pH 稳定性和热稳定性显著降低, 首次

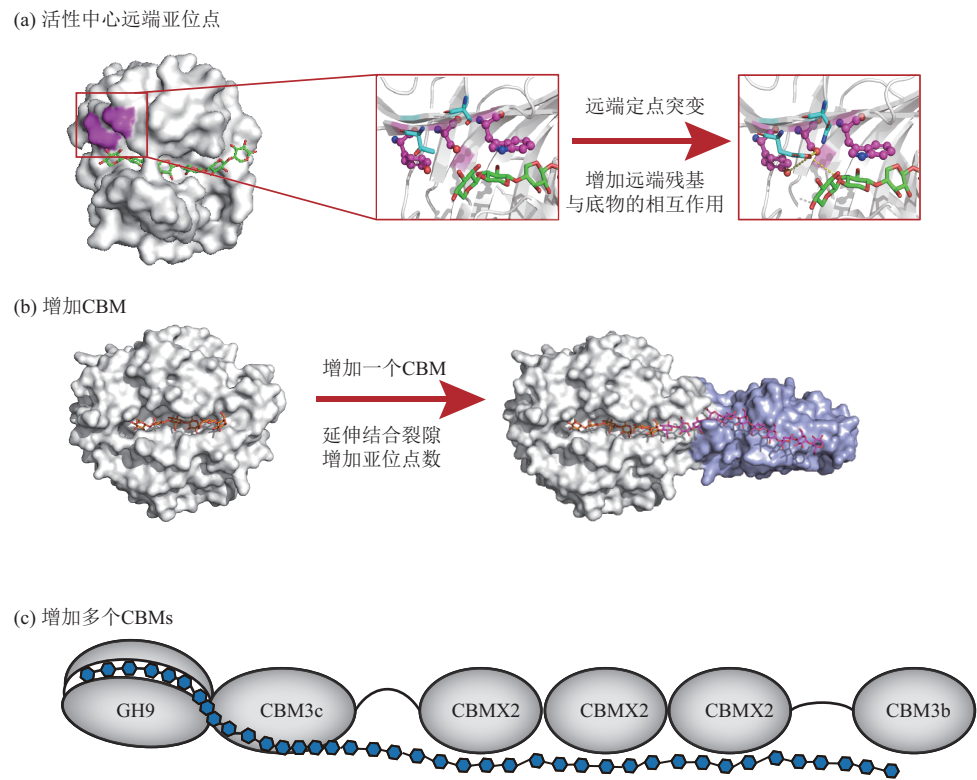


Fig. 3 The strategy of increasing the binding affinity [35–36]

图3 增加酶与底物结合力的策略 [35–36]

(a) 增加酶分子活性中心远端残基与底物的相互作用数 (*AnXynB* -3亚位点S41N/T42E定点突变)。(b) 添加CBM以延伸酶分子结合裂隙, 增加亚位点数 (*CcCel9A*添加的CBM结构域可以结合11个葡萄糖环, 从而将结合裂隙延伸到17个亚位点)。(c) 添加多个CBMs可能会增加更多的结合位点。

Table 1 Recent progress in engineering activity of polysaccharide-degrading enzymes

表1 多糖降解酶活性改造的实例

改造区域 (或策略)	酶 (类型)	突变体	酶活性	文献
-3 亚位点 (N末端)	XynB (GH11 木聚糖酶)	S41N/T43E	提高72% (底物玉米芯木聚糖) ¹⁾	[35]
添加一个CBM	Umcel9A (GH9 纤维素酶)	(1) CBM4-Umcel9A (2) Umcel9A-CBM1	(1) 提高6.6倍 (Avicel)、4.2倍 (PASC) (2) 提高5.5倍 (Avicel)、1.7倍 (PASC) ¹⁾	[42]
删除一个CBM	AlyL2-FL (PL13 褐藻胶裂解酶)	AlyL2-CM	降低2倍 (底物褐藻酸盐) ²⁾	[41]
添加多个CBMs	CcCel9A (GH9 纤维素酶)	(1) GH9-CBM3c-CBMX2-CBMX2 (2) GH9-CBM3c-CBMX2-CBM3b (3) GH9-CBM3c-CBMX2-CBMX2-CBM3b	(1) 提高1.44倍 (2) 提高5.33倍 (3) 提高4.11倍 (底物Avicel) ²⁾	[36]

1) 在最适条件下测定的各酶分子突变前后的比酶活。2) 在最适条件下测定的各酶分子突变前后的催化效率。

证明壳聚糖酶N端区域有助于维持酶结构稳定^[46]。通过将GH11嗜温木聚糖酶*AoXyn11*的N端片段用耐热GH11木聚糖酶*EvXyn11*进行取代, 使其热稳定性显著增强^[44]。Jiang等^[47]对GH12家族5个热稳定性不同的酶分子进行计算模拟, 发现环境温度升高, 酶分子N端柔性显著增加, 证明N端也是

GH12的热敏感区域, 为GH12家族纤维素酶热稳定性的设计提供改造方向。

通过在蛋白质结构中引入二硫键稳定蛋白质构象, 是提高酶热稳定性的另一主要手段。但有报道指出蛋白质N端附近二硫键对酶的热稳定性有负面影响^[48], 因此选择合适的二硫键对于提高酶的热

稳定性至关重要. 在褐藻胶裂解酶 cAlyM 中引入二硫键, 与野生型相比, 突变体 D102C-A300C 和 G103C-T113C 在 45°C 的半衰期中分别增加了 2.25 和 1.16 h; 对这些突变体的结构进一步分析可知, D102C-A300C 中的氢键发生了变化, G103C-T113C 中的疏水相互作用增加, 这种非共价键的次级作用力变化可能是两个突变体除形成二硫键外导致热稳定性提高的另一个原因^[49].

此外, Han 等^[50] 通过 B 因子分析和多序列比对预测改造位点, 获得的 4 个单突变体均显示出比野生型木聚糖酶 XynCDBFV 更高的热稳定性, 4 个

单突变体在最佳温度下孵育 60 h, 残余酶活高于 50%, 而相同条件下 XynCDBFV 的活性仅为 20.94%.

Wu 等^[51] 分析了 GH11 家族木聚糖酶表面带电残基与酶的酸碱耐受性的关系, 酸性酶含有较少的正电氨基酸, 而碱性酶含有较少的负电氨基酸, 对天然耐热木聚糖酶 TTXynA 进行改造, 通过表面残基的定点突变, 提高了其 pH 耐受性, 这一结果再次说明, 增加酶分子表面氨基酸残基的负/正比可以增强酶的耐酸性, 而降低表面氨基酸残基的负/正比可提高耐碱性.

Table 2 Recent progress in engineering stability of polysaccharide-degrading enzymes

表2 提高多糖降解酶稳定性的实例

改造策略	酶 (种类)	突变体	稳定性	文献
N末端定点突变	SoxB (木聚糖酶)	N32G/S33P	T_m : 提高25.6°C	[45]
N末端替换	AoXyn11 (木聚糖酶)	AEx11A	$T_{1/2}$ (70°C): 提高197倍	[44]
删除N末端氨基酸	CsnA (壳聚糖酶)	CsnAΔN	最适温度: 降低15°C; 热稳定性: 40°C残余酶活20% (WT: 80%); T_m : 降低4.3°C	[46]
B-因子分析	XynCDBFV (木聚糖酶)	N88G, S90T, S89H, Q87R	热稳定性: 60 h残余酶活50% (WT: 20.940%)	[50]
定点突变引入二硫键	cAlyM (褐藻胶裂解酶)	(1) D102C-A300C (2) G103C-T113C	$T_{1/2}$ (45°C): (1) 增加2.25 h; (2) 增加1.16 h	[49]
表面残基定点突变	TTXynA (木聚糖酶)	N1, N2, N3, N4	pH 9.0, 分别保留86%, 78%, 77%, 66% 残余酶活	[51]

4 多糖降解酶系的协同与重构定制

通过蛋白质工程定制的单酶分子可以获得更高的催化效率、更优的稳定性, 但对于复杂的生物质而言, 单酶分子仍具有非常有限的水解活性, 使用一种酶难以完成生物质的彻底降解. 因此, 若要实现生物质多糖的高效降解转化, 一是要基于底物和产物的需求定制新型酶混合物进行协同催化, 二是利用微生物降解能力的高效性重构其胞外代谢途径.

4.1 不同亚家族、不同家族、不同种类酶的协同作用

草酸青霉来源的内切纤维素酶 rCel12A、rCel12B 和 rCel12C 分别属于 GH12 的 1、2、3 亚家族, 虽然它们都可以降解磷酸溶胀的纤维素 (PASC), 但是水解产物却不同, 且 rCel12A 和 rCel12B 对 PASC 具有协同降解作用^[52], 暗示不同

亚家族酶分子的协同在底物降解中的潜在应用. 在纤维素的降解中, 需要内切纤维素酶、外切纤维素酶 (还原端/非还原端)、 β -葡萄糖苷酶的共同作用 (图 4a), 然而在不同结晶度的纤维素底物下它们的协同作用有所差异^[53]. 另外, 在褐藻酸盐为底物的降解中, 褐藻胶内切裂解酶 AlyPB1 和外切裂解酶 AlyPB2 表现出强大的协同作用 (图 4c), 与单独 AlyPB2 相比, 转化率约提高 7 倍^[54].

与纤维素和褐藻的降解相比, 木聚糖的降解通常需要不同家族的水解酶共同作用来完成. 由于 GH10 的木聚糖酶在结合亚位点保守型氨基酸少^[27], 有研究证明在 -3、-2、+1 亚位点分别能容忍阿拉伯糖基, 允许木聚糖在这些位点拥有侧链, 因此和 GH11 家族的底物特异性不同^[29, 55-57], 两个家族可协同完成不同位置侧链取代的主链木聚糖降解; 此外, 分支木聚糖的降解还需要一系列侧链降解酶如葡萄糖醛酸酶、阿拉伯呋喃糖苷酶的共同作用

(图4a) .

裂解多糖单加氧酶 (LPMO) 在难降解多糖 (如几丁质和纤维素) 的酶促转化中具有重要的辅助作用 [58-59] . LPMO 与纤维素酶的协同效应主要作用于纤维素结晶区, 氧化断裂纤维素表面的纤维素链, 从而为外切纤维素酶提供了新的结合位点, 如 *MtLPMO9L* 能显著提高纤维二糖水解酶 (CBHII) 的催化效率 [60] . *Streptomyces sp.* F-3 能分泌多种几丁质降解相关酶, 其中 *SsChi18A*、*SsChi18B*、*SsChi18C* 分别属于 3 个亚家族, 具有不同的降解模式, 除亚家族之间具有协同作用外, *SsLPMO10A* 作为辅助几丁质降解的氧化酶, 对 *SsChi18A* 和 *SsChi18B* 也有明显的促进作用 [61] (图4b) .

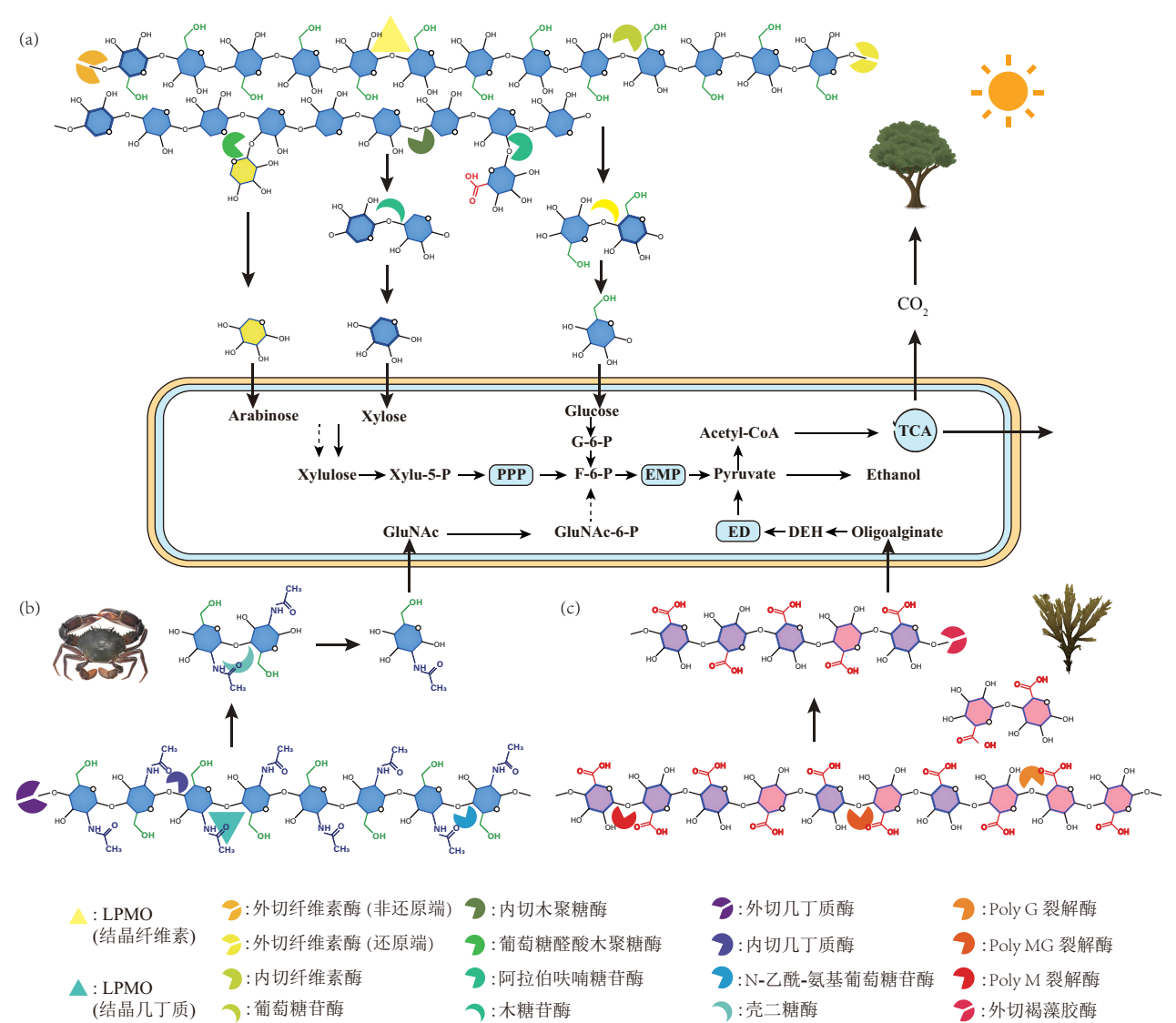


Fig. 4 Schematic diagram of multi-enzyme synergistic degradation and the metabolic pathway of microbial polysaccharides [62-64]

图4 多酶协同降解及微生物多糖代谢的示意图 [62-64]

(a) 纤维素在内切纤维素酶、外切纤维素酶 (还原端及非还原端)、葡萄糖苷酶的共同作用下降解为葡萄糖, 在微生物内通过EMP途径进行代谢; 葡萄糖醛酸阿拉伯木聚糖降解为单糖需要的最小酶组合为: 内切木聚糖酶、葡萄糖醛酸酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、木糖苷酶, 单糖在微生物体内首先进入磷酸戊糖途径 (PPP), 然后进入糖酵解。 (b) 几丁质降解为N-乙酰葡萄糖胺涉及到GH18、GH19和GH20等不同家族的几丁质降解酶协同作用, 在微生物体内进入糖酵解途径。 (c) 褐藻胶的胞外降解涉及到内切褐藻胶酶 (Poly G裂解酶、PolyM裂解酶、PolyMG裂解酶) 和外切褐藻胶酶的协同作用, 产物褐藻寡糖在微生物体内首先裂解为单糖后进入ED途径, 然后进入糖酵解。 Arabinose: 阿拉伯糖, Xylose: 木糖, Glucose: 葡萄糖, G-6-P: 葡萄糖-6-磷酸, Acetyl-CoA: 乙酰辅酶A, TCA: 三羧酸循环, Xylu-5-P: 木酮糖-5-磷酸, PPP: 戊糖磷酸途径, F-6-P: 果糖-6-磷酸, EMP: 糖酵解, Pyruvate: 丙酮酸, Ethanol: 乙醇, GluNAc: N-乙酰葡萄糖胺, GluNAc-6-P: N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸酯, ED: ED途径 (Entner-Doudoroff pathway), DEH: 4-脱氧-L-赤型-5-己糖醛糖醛酸, Oligoalginate: 褐藻寡糖。

4.2 重构微生物多糖代谢途径定制酶系

由于不同来源的生物质具有结构异质性,并且底物的组成和物理性质会随预处理方法而有所不同,因此若实现生物质最大效率的降解,需要根据底物结构异质性,就添加降解酶的种类、次序、浓度和比例进行不同的组合.微生物的生长依赖于其所在的环境,因此在长期的进化过程中,能合成或分泌多种降解酶,具有强大的降解与转化能力.因此,利用天然环境中优势微生物的胞外酶系进行降解可能是更理想的策略,Lu等^[65]证明,与从热纤梭菌中纯化的纤维素酶相比,培养的热纤梭菌对纤维素的水解速率显著增强(约2.7~4.7倍).因此,体外重构微生物代谢途径,精细定制降解酶系,能够加速多糖类生物质的生物转化进程.

现在,越来越多微生物胞外代谢途径的阐明为多糖底物的快速高效降解奠定了良好的理论基础.丝状真菌的基因组展示出强大的降解潜力,而其分泌组能显示出不同底物依赖性,在不同碳源下生长的真菌可以产生不同的多糖降解同工酶,这些同工酶即使作用于相同的底物,也能表现出不同的降解模式^[66].在堆肥中的优势菌株 *Streptomyces sp.* F-3 分泌几丁质降解酶系在真菌菌渣的降解过程中发挥了重要作用^[61]; *Sphingomonas* sp. A1 来源的内切和外切褐藻胶裂解酶对褐藻酸进行切割,得到褐藻寡糖或单糖^[67],由多糖降解酶对多糖降解产生的这些单糖或寡糖进入胞内再进一步代谢(图4).

混合物设计模型的使用可以帮助预测天然多糖降解的最佳酶系组合,Karnaouri等^[68]利用二次式和全立方方式两种模型模拟了不同比例酶组合对4种不同来源的生物质降解的作用,希望以此进一步提高水解产量,并进行了实验验证.研究结果表明,针对特定生物质定制的酶系能够提高单糖产量.Laothanachareon等^[69]开发了一种协同酶系统,包括核心纤维素酶、辅助半纤维素酶和果胶酶,利用全立方模型和软件预测不同酶的比例,在水解碱预处理的稻草时,与单独使用商业里氏木霉纤维素酶相比,葡萄糖产量提高了47.3%.Kim等^[70]在水解酸或碱预处理的甘蔗渣时,使用设计统计模型定制纤维素酶系,与商业纤维素酶混合物的水解性能相比,定制的纤维素酶系对酸处理的甘蔗渣水解作用与商业纤维素酶相似,但水解碱处理的甘蔗渣,则其效果要好于商业纤维素酶.因此,根据不同酶组合之间不同程度的协同作用,开发定制微生物胞外酶系对提高多糖降解至关重要.此外,遗传操作技

术的进步,实现了微生物的工程化改造,从而根据需求更有效地表达降解酶,使得微生物多糖降解酶的定制具有更大发展潜力.

5 展 望

随着深度测序和结构数据的迅速发展、计算模拟以及结构预测的进步,加上众多数据信息的开放和共享,根据特定底物的结构精准定制多糖降解酶已成为可能.但还需要开发新的方法,例如使用宏基因组学工具,筛选到微生物更多天然的优良酶系;或结合深度学习和现有的大数据资源预测蛋白质结构,了解更多酶的降解机制,并探索从头设计新型蛋白质;另外,生物质多糖精细结构的不断阐明,可为探究酶与底物之间的关系提供帮助.此外,由于目前酶分子有限的结构信息,很难获得所有状态下酶与底物结合的结构,因此需要进一步提高建模结构的准确性,结合计算技术的动力学研究仍然任重道远.要完成多糖底物彻底降解转化还需要对更多多糖降解酶进行酶系组合的研究,当然除了对本文提到的这些多糖类生物质底物外,也可以应用到其他具有潜力的底物降解中,从而使更多的生物质资源的转化成为可能,或获得更有价值的产品.

参 考 文 献

- [1] Isikgor F H, Becer C R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 2015, **6**(25): 4497-4559
- [2] Popper Z A, Michel G, Hervé C, *et al.* Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, **62**(1): 567-590
- [3] Zargar V, Asghari M, Dashti A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chembioeng Reviews*, 2015, **2**(3): 204-226
- [4] Torres F G, Troncoso O P, Pisani A, *et al.* Natural polysaccharide nanomaterials: an overview of their immunological properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(20): 5092-5113
- [5] Segato F, Damásio A R L, De Lucas R C, *et al.* Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, **78**(4): 588-613
- [6] 陈玉,张怀强,赵越,等.天然结晶纤维素的生物合成及其去晶化途径. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(8): 747-757
Chen Y, Zhang H Q, Zhao Y, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016, **43**(8): 747-757
- [7] Ribeiro L F, Amarelle V, Alves L D F, *et al.* Genetically engineered proteins to improve biomass conversion: new advances and

- challenges for tailoring biocatalysts. *Molecules*, 2019, **24**(16): 2879-2903
- [8] Zhang L, Peng X, Zhong L, *et al.* Lignocellulosic biomass derived functional materials: synthesis and applications in biomedical engineering. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, **26**(14): 2456-2474
- [9] Van De Vyver S, Geboers J, Jacobs P A, *et al.* Recent advances in the catalytic conversion of cellulose. *Chemcatchem*, 2011, **3**(1): 82-94
- [10] Kulasinski K, Keten S, Churakov S V, *et al.* A comparative molecular dynamics study of crystalline, paracrystalline and amorphous states of cellulose. *Cellulose*, 2014, **21**(3): 1103-1116
- [11] Scheller H V, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, **61**(1): 263-289
- [12] Rennie E A, Scheller H V. Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, **26**: 100-107
- [13] Moreira L R S, Filho E X F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, **100**(12): 5205-5214
- [14] Smith P J, Wang H-T, York W S, *et al.* Designer biomass for next-generation biorefineries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, **10**(1): 286-299
- [15] Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 2006, **8**(3): 203-226
- [16] Sahoo D, Sahoo S, Mohanty P, *et al.* Chitosan: a new versatile biopolymer for various applications. *Designed Monomers and Polymers*, 2009, **12**(5): 377-404
- [17] Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, *et al.* Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—a short review. *Carbohydrate Polymers*, 2010, **82**(2): 227-232
- [18] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar P T, *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, **29**(3): 322-337
- [19] Limoli D H, Jones C J, Wozniak D J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 2015, **3**(3): 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014
- [20] Zhu B, Yin H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered*, 2015, **6**(3): 125-131
- [21] Xing M, Cao Q, Wang Y, *et al.* Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides. *Marine Drugs*, 2020, **18**(3): 144-169
- [22] Venkatesan J, Lowe B, Anil S, *et al.* Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. *Starch-starke*, 2015, **67**(5-6): 381-390
- [23] Davies G J, Wilson K S, Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1997, **321**: 557-559
- [24] Miron C E, Petitjean A. Sugar recognition: designing artificial receptors for applications in biological diagnostics and imaging. *Chembiochem*, 2015, **16**(3): 365-379
- [25] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 506-577
- [26] Chen Z, Friedland G D, Pereira J H, *et al.* Tracing determinants of dual substrate specificity in glycoside hydrolase family 5. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(30): 25335-25343
- [27] Tian L, Liu S, Wang S, *et al.* Ligand-binding specificity and promiscuity of the main lignocellulolytic enzyme families as revealed by active-site architecture analysis. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1): 23605-23615
- [28] Xiong K, Xiong S, Gao S, *et al.* Improving hydrolysis characteristics of xylanases by site-directed mutagenesis in binding-site subsites from *Streptomyces* L10608. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(3): 834-852
- [29] Gong W, Zhang H, Tian L, *et al.* Determination of the modes of action and synergies of xylanases by analysis of xylooligosaccharide profiles over time using fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis*, 2016, **37**(12): 1640-1650
- [30] Falck P, Aronsson A, Grey C, *et al.* Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. *Bioresource Technology*, 2014, **174**: 118-125
- [31] Tremblay H, Yamaguchi T, Fukamizo T, *et al.* Mechanism of chitosanase-oligosaccharide interaction: subsite structure of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase and the role of Asp57 carboxylate. *The Journal of Biochemistry*, 2001, **130**(5): 679-686
- [32] Liu S, Shao S, Li L, *et al.* Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis. *Carbohydrate Research*, 2015, **418**: 50-56
- [33] 张恒曦. 主要海藻多糖降解酶活性架构及其降解模式分析[D]. 威海: 山东大学, 2017
- Zhang H X. Analysis on active site architectures of degrading enzymes for main seaweed polysaccharides and their degradation patterns[D]. Weihai: Shandong University, 2017
- [34] Macdonald L C, Berger B W. Insight into the role of substrate-binding residues in conferring substrate specificity for the multifunctional polysaccharide lyase Smlt1473. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(26): 18022-18032
- [35] Wu X, Tian Z, Jiang X, *et al.* Enhancement in catalytic activity of *Aspergillus niger* XynB by selective site-directed mutagenesis of active site amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, **102**(1): 249-260
- [36] Zhang K D, Li W, Wang Y F, *et al.* Processive degradation of crystalline cellulose by a multimodular endoglucanase via a wirewalking mode. *Biomacromolecules*, 2018, **19**(5): 1686-1696
- [37] Zhang X, Wang S, Wu X, *et al.* Subsite-specific contributions of different aromatic residues in the active site architecture of glycoside hydrolase family 12. *Scientific Reports*, 2015, **5**(1): 18357-18368
- [38] Tang Z Z, Chen H, Chen L J, *et al.* Improving endoglucanase activity by adding the carbohydrate-binding module from

- Corticium rolsfii*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, **24**(4): 440-446
- [39] Ali M K, Hayashi H, Karita S, *et al*. Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercoarium* Xyn10B to xylan hydrolysis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, **65**(1): 41-47
- [40] Uni F, Lee S, Yatsunami R, *et al*. Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of an alkaline chitinase from *Bacillus* sp. J813. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2012, **76**(3): 530-535
- [41] Li S, Yang X, Bao M, *et al*. Family 13 carbohydrate-binding module of alginate lyase from *Agarivorans* sp. L11 enhances its catalytic efficiency and thermostability, and alters its substrate preference and product distribution. FEMS Microbiology Letters, 2015, **362**(10): fmv054
- [42] Duan C J, Huang M Y, Pang H, *et al*. Characterization of a novel theme C glycoside hydrolase family 9 cellulase and its CBM-chimeric enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, **101**(14): 5723-5737
- [43] Finch A J, Kim J R. Thermophilic proteins as versatile scaffolds for protein engineering. Microorganisms, 2018, **6**(4): 97-109
- [44] Yin X, Li J F, Wang J Q, *et al*. Enhanced thermostability of a mesophilic xylanase by N-terminal replacement designed by molecular dynamics simulation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, **93**(12): 3016-3023
- [45] Zhang S, He Y, Yu H, *et al*. Seven N-terminal residues of a thermophilic xylanase are sufficient to confer hyperthermostability on its mesophilic counterpart. Plos One, 2014, **9**(1): e87632
- [46] Han Y, Gao P, Yu W, *et al*. N-Terminal seven-amino-acid extension simultaneously improves the pH stability, optimal temperature, thermostability and catalytic efficiency of chitosanase CsnA. Biotechnology Letters, 2018, **40**(1): 75-82
- [47] Jiang X, Chen G, Wang L. Structural and dynamic evolution of the amphipathic N-terminus diversifies enzyme thermostability in the glycoside hydrolase family 12. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016, **18**(31): 21340-21350
- [48] Niu C, Zhu L, Xu X, *et al*. Rational design of disulfide bonds increases thermostability of a mesophilic 1, 3-1, 4- β -Glucanase from *Bacillus terquilensis*. Plos One, 2016, **11**(4): e0154036
- [49] Yang M, Yang S X, Liu Z M, *et al*. Rational design of alginate lyase from *Microbulbifer* sp. Q7 to improve thermal stability. Marine Drugs, 2019, **17**(6): 378
- [50] Han N, Ma Y, Mu Y, *et al*. Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment. Enzyme and Microbial Technology, 2019, **131**: 109422-109430
- [51] Wu X, Zhang Q, Zhang L, *et al*. Insights into the role of exposed surface charged residues in the alkali-tolerance of GH11 xylanase. Frontiers in Microbiology, 2020, **11**: 872
- [52] Zhu Z, Qu J, Yu L, *et al*. Three glycoside hydrolase family 12 enzymes display diversity in substrate specificities and synergistic action between each other. Molecular Biology Reports, 2019, **46**(5): 5443-5454
- [53] Van Dyk J S, Pletschke B I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnology Advances, 2012, **30**(6): 1458-1480
- [54] Lu D, Zhang Q, Wang S, *et al*. Biochemical characteristics and synergistic effect of two novel alginate lyases from *Photobacterium* sp. FC615. Biotechnology for Biofuels, 2019, **12**(1): 260-276
- [55] Beaugrand J, Chambat G, Wong V W K, *et al*. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. Carbohydrate Research, 2004, **339**(15): 2529-2540
- [56] Pell G, Taylor E J, Gloster T M, *et al*. The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates Journal of Biological Chemistry, 2004, **279**(10): 9597-9605
- [57] Fujimoto Z, Kaneko S, Kuno A, *et al*. Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. Journal of Biological Chemistry, 2004, **279**(10): 9606-9614
- [58] Eijssink V G H, Petrovic D, Forsberg Z, *et al*. On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). Biotechnology for Biofuels, 2019, **12**(1): 58-73
- [59] 李欣, 张丽丽, 田莉, 等. 裂解多糖单加氧酶高效催化的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2016, **43**(10): 970-979
- Li X, Zhang L L, Tian L, *et al*. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016, **43**(10): 970-979
- [60] Zhou H, Li T, Yu Z, *et al*. A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, **139**: 570-576
- [61] Sun X, Li Y, Tian Z, *et al*. A novel thermostable chitinolytic machinery of *Streptomyces* sp. F-3 consisting of chitinases with different action modes. Biotechnology for Biofuels, 2019, **12**(1): 136-147
- [62] Wargacki A J, Leonard E, Win M N, *et al*. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. Science, 2012, **335**(6066): 308-313
- [63] Prasad R K, Chatterjee S, Mazumder P B, *et al*. Bioethanol production from waste lignocelluloses: a review on microbial degradation potential. Chemosphere, 2019, **231**: 588-606
- [64] Hirano T, Okubo M, Tsuda H, *et al*. Chitin heterodisaccharide, released from chitin by chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase, enhances the chitin-metabolizing ability of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology, 2019, **201**(20): e00270-00219
- [65] Lu Y, Zhang Y-H P, Lynd L R. Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **103**(44): 16165-16169
- [66] Liao H, Zheng H, Li S, *et al*. Functional diversity and properties of

- multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. Scientific Reports, 2015, **5**(1): 12631-12644
- [67] Takeda H, Yoneyama F, Kawai S, *et al.* Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. Energy & Environmental Science, 2011, **4**(7): 2575-2581
- [68] Karnaouri A, Matsakas L, Topakas E, *et al.* Development of thermophilic tailor-made enzyme mixtures for the bioconversion of agricultural and forest residues. Frontiers in Microbiology, 2016, **7**:177
- [69] Laothanachareon T, Bunterngrsook B, Suwannarangsee S, *et al.* Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. Bioresource Technology, 2015, **198**: 682-690
- [70] Kim I J, Lee H J, Kim K H. Pure enzyme cocktails tailored for the saccharification of sugarcane bagasse pretreated by using different methods. Process Biochemistry, 2017, **57**: 167-174

High Efficient Degradation of Biomass Polysaccharides and Precise Customization of Degrading Enzymes*

ZHANG Shu¹⁾, ZHAO Yue¹⁾, CHEN Guan-Jun¹⁾, YU Jun-Hong²⁾,
WU Xiu-Yun^{1)**}, WANG Lu-Shan¹⁾

¹⁾The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China;

²⁾State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer, Tsingtao Brewery Company Limited, Qingdao 266000, China)

Abstract Polysaccharide is abundant in nature, but its complex anti-degradation structure limits the process of bioconversion. In recent years, with the rapid analysis of biomass polysaccharide structure and the identification of polysaccharide degrading enzyme, on the basis of different structure of substrate or product requirement, it is possible to imitate the efficient metabolic pathway of microbial polysaccharides, tailor polysaccharides degrading enzyme system, and promote the efficient conversion of biomass. In this paper, the structure composition of neutral polysaccharide (cellulose and xylan), alkaline polysaccharide (chitin and chitosan) and acidic polysaccharide (alginate) were analyzed. Then the structural characteristics and substrate binding patterns of the major degrading enzymes targeted at the three kinds of polysaccharides were summarized. Protein engineering design and customization strategies are also described. The analysis of different functional areas of enzyme molecules can provide targets for further design and modification to obtain high efficiency enzymes in industrial applications. In addition, in terms of the order of microbial extracellular degrading enzymes and their synergistic relationship, complex polysaccharides degrading enzymes can be precisely tailored based on the needs to achieve efficient and high-value degradation transformation of the biomass.

Key words biomass bioconversion, polysaccharides degrading enzyme, substrate binding mode, protein engineering, customized enzyme system

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0214

* This work was supported by grants from Qingdao Post-doctoral Applied Research Program, The National Natural Science Foundation of China (31770054) and National Key Research and Development Program of China (2016YFD0800601).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-58631569, E-mail: wuxiuyun3353@163.com

Received: June 30, 2020 Accepted: August 7, 2020