



降解木质纤维素放线菌的功能组学分析及工业应用前景

孙晓萌, 公维丽, 李欣, 王禄山, 张怀强*

山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

* 联系人, E-mail: zhq@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-16; 接受日期: 2017-01-26; 网络版发表日期: 2017-02-16

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0800601)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2013CM038)和山东大学基本科研经费项目(批准号: 2015YQ004)资助

摘要 放线菌是一种高GC含量的革兰氏阳性细菌, 在陆生、高温的木质纤维素降解生境中占据十分重要的地位. 降解木质纤维素菌株的功能基因组分析发现降解纤维素的酶种类和数目相对较多, 而降解半纤维素以及果胶成分的酶相对真菌较少. 其中, 降解纤维素的酶类主要以GH6家族外切酶为主, 部分含有GH9和GH48家族的纤维素酶, 基因组中还含有AA10家族的多糖裂解氧化酶, 因此放线菌可通过持续性水解与氧化双重机制高效降解结晶纤维素. 放线菌可通过双精氨酸转运系统快速将已正确折叠的降解酶类分泌至胞外, 这些酶分子常具有多个功能结构域, 具有耐高温、耐碱性以及高活力等特征. 放线菌在木质纤维素降解及次级代谢产物等方面的特点与优势使得其具有巨大的工业应用前景.

关键词 放线菌, 纤维素降解, 多结构域组合, 持续性酶, 氧化酶系统, Tat转运系统

木质纤维素是植物生物质的的重要组成部分, 主要由纤维素、半纤维素及木质素3部分组成, 是重要的绿色可再生资源^[1]. 然而植物细胞壁在进化中形成了抵抗微生物及相关酶系降解的“抗降解屏障”^[2,3], 使得木质纤维素的生物转化利用效率相对较低. 因此, 寻找高效降解的微生物及其高效降解酶系一直是人们研究的热点.

放线菌是一类高GC含量、营腐生生活的革兰氏阳性细菌, 主要在陆生、好氧生境中广泛分布. 已有研究表明放线菌在复杂、难降解生物高聚物的降解过程中发挥了重要作用^[4], 特别是在富含木质纤维素

的生境中, 放线菌可以高效分泌大量的胞外酶组来完成木质纤维素的降解转化, 从而促进生物圈碳元素的循环利用^[5]. 由于放线菌基因组高GC含量以及细胞壁厚的特点, 使其能够适应多种极端生境^[6,7], 特别是在秸秆堆肥的高温环境中, 放线菌始终维持着一个相对优势的数量, 在所有细菌中占比高达80%; 同时用蛋白质组学方法还检测到了大量由放线菌分泌的木质纤维素降解相关酶类, 这表明放线菌在秸秆等木质纤维素堆肥生境中发挥了主导作用^[8-10].

放线菌降解木质纤维素的研究多集中于重要菌株功能与性质的相关研究, 例如, 喜热裂孢菌属

引用格式: 孙晓萌, 公维丽, 李欣, 等. 降解木质纤维素放线菌的功能组学分析及工业应用前景. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 201-210
Sun X M, Gong W L, Li X, et al. Omics analysis and industrial application prospects of lignocellulose-degrading actinomycetes. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 201-210, doi: [10.1360/N052016-00365](https://doi.org/10.1360/N052016-00365)

(*Thermobifida*)^[11]、小单孢菌属(*Micromonospora*)^[12]及链霉菌属(*Streptomyces*)^[13]等高效木质纤维素降解菌株及其相关酶类性质等方面。随着组学方法的快速推进,整合多种组学等系统生物学方法逐渐被应用于相关微生物功能的研究中。整合组学方法可从多个层次,全面深入对放线菌进行分析与评价,这对于深入挖掘放线菌木质纤维素降解酶的应用潜力以及分析其工业应用前景具有重要意义。因此,本文以放线菌的功能基因组学分析为基础,从编码酶的基因的种类、蛋白结构域组成、酶分子的结构域特征、分泌机制以及酶制剂的应用等方面分析并综述相关进展。

1 降解木质纤维素放线菌及其功能基因组分析

大部分木质纤维素降解放线菌是中、高温菌,大多数来自与土壤和堆肥生境,它们能够降解植物秸秆中的纤维素、半纤维素及木质素等^[14]。不同放线菌对木质纤维素成分降解偏好性有所不同。例如,拟诺卡氏菌属、喜热裂孢菌属主要降解的是纤维素;诺卡氏菌属、小单孢菌属主要降解的是木质素;双歧杆菌属、高温单孢菌属主要降解的是半纤维素;而链霉菌属、高温放线菌属的酶系较为齐全,能够降解全部3种木质纤维素类底物^[15]。

放线菌主要通过分泌纤维素酶、半纤维素酶以及果胶酶等糖苷水解酶来完成植物生物物质多糖的降解转化。基因组分析表明能降解木质纤维素的放线菌,其基因组中应含有大量的糖苷水解酶基因^[14]。选取了19株已完成基因组测序并有明确功能分析的木质纤维素降解放线菌,统计了其基因组中碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy; 相关酶的信息均从CAZy数据库获得)相关酶类的数量和比例(图1和网络版附表1),分析放线菌降解酶系统的特点与偏好性。

纤维素主要是由葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的超大分子复合物^[16],是木质纤维素的主要组成成分。放线菌主要是通过分泌纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, CBH; 又称外切葡聚糖酶)、 β -1,4-内切葡聚糖酶(β -1,4-endoglucanase, EGL)以及 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL)等^[17]来完成对纤维素类物质的降解转化。放线菌分泌的纤维素酶含有多种同工酶,放线菌基因组中的纤维素降解酶基因都在30个以

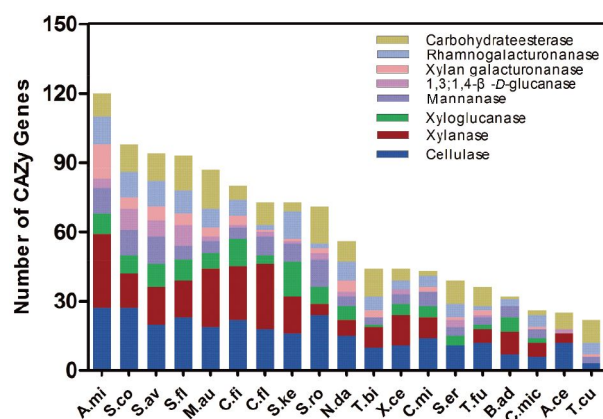


图1 放线菌中基因组中纤维素酶、半纤维素酶及果胶酶基因数量统计

图1代表的是19种放线菌基因组中降解纤维素、半纤维素(木聚糖、木葡聚糖、甘露聚糖以及1,3; 1,4- β -D-葡聚糖)及果胶(木聚乳糖醛酸、鼠李聚半乳糖醛酸、碳水化合物酯酶)的酶基因的数目统计,数据主要来自于CAZy数据库。碳水化合物活性酶数据库(CAZy)是关于能够合成或者分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类的一个数据库,其基于蛋白质结构域中的氨基酸序列相似性,将碳水化合物活性酶类归入不同蛋白质家族,碳水化合物酶类按功能分类主要包括糖苷水解酶类-GHs(EC 3.2.1.-)、糖基转移酶类-GTs(EC 2.4.-.-)、多糖裂解酶类-PLs(EC 4.2.2.-)、碳水化合物酯酶-CEs(EC 3.1.1.-),以及辅助酶类-AAs等(EC 1.-.-.-)^[23]。图中横坐标中的菌名简写分别代表的是: A.mi-*Actinosynnema mirum* DSM 43827; S.co-*Streptomyces coelicolor* A3(2); S.av-*Streptomyces avermitilis* MA-4680; S.fl-*Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331; M.au-*Micromonospora aurantiaca* ATCC27029; C.fi-*Cellulomonas fimi* ATCC 484; C.fl-*Cellulomonas flavigena* DSM 20109; S.ke-*Sanguibacter keddii* DSM 10542; S.ro-*Streptosporangium roseum* DSM 43021; N.da-*Nocardopsis dassonvillei* DSM43111; T.bi-*Thermobispora bispora* DSM43833; X.ce-*Xylanimonas cellulolytica* DSM 15894; C.mi-*Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis* NCPPB 382; S.er-*Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338; T.fu-*Thermobifida fusca* YX; B.ad-*Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703; C.mic-*Clavibacter michiganensis subsp.sepedonicus* ATCC 33113; A.ce-*Acidothermus cellulolyticus* 11B ATCC 43068; T.cu-*Thermomonospora curvata* DSM 43183; 纵坐标代表的是基因组中CAZy酶基因的数量

下(图1和网络版附表1),这要少于丝状真菌^[18-20]。

半纤维素不同于化学组成单一的纤维素,它具有复杂的骨架结构单元与侧链分支,因而这类物质的降解不仅需要大量骨架降解酶类,还需要多种侧链降解酶类^[18]。这就意味着微生物基因组中半纤维素酶基因数量和种类的多寡,会直接影响半纤维素的降解程度与降解效率。除木聚糖外,放线菌基因组中降解木

葡聚糖、甘露聚糖、(1,3; 1,4)- β -D-葡聚糖等半纤维素主链成分的酶基因的种类和数目要明显少于丝状真菌^[18-20]. 此外, 多数放线菌的基因组中还缺乏 α -葡萄糖醛酸酶、 α -呋喃糖苷酶、 α -1,4-甘露糖苷酶、阿魏酸酯酶等半纤维素支链降解酶(网络版附表1), 这些半纤维素骨架和支链酶的缺乏将会明显限制放线菌对于半纤维素的降解效率. 例如, 阿魏酸酯酶的缺乏会导致木素和半纤维素之间的连接不能有效降解打断, 这将会影响半纤维素类底物的可及性与降解效率^[21].

果胶是植物细胞壁中结构最为复杂的多糖, 多糖种类与化学键型多样, 主要包括聚半乳糖醛酸(homogalacturonan, HG)、木糖聚半乳糖醛酸(xylogalacturonan, XG)、鼠李聚半乳糖醛酸(rhamnogalacturonan, RG) 3种类型^[3]. 放线菌分泌的果胶酶主要是果胶裂解酶, 以及少量的果胶酯酶, 常常缺乏聚半乳糖醛酸酶和聚半乳糖醛酸甲酯水解酶等^[22]. 因此, 相关放线菌对于富含果胶和木葡聚糖的双子叶类植物的降解能

力应该较弱^[21].

从基因数目来看, 放线菌基因组中CAZy功能酶基因的数目相对真核丝状真菌要少; 同时, 纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶的种类和数目也要少于丝状真菌(网络版附图1). 放线菌如何在CAZy酶类较少的情况下高效降解木质纤维素? 其降解的特殊机制是什么? 这是目前相关领域的研究热点之一.

2 高效的多结构域游离酶系统

放线菌分泌的木质纤维素降解酶不同于厌氧细菌分泌纤维小体系统, 其胞外酶多为游离酶系. 基因组的分析表明, 这些游离酶中有相当一部分具有两个或两个以上的结构域^[24]. 在本文列出的19株菌中, 13株菌的胞外酶系统中多结构域酶的比例占到了45%以上(表1), 而其他6株均在20%以下. 分析这种多结构域的组成与特点, 对于深入解析放线菌的高效降解机制

表 1 放线菌木质纤维素降解酶类的多结构域基因信息统计^{a)}

种类	基因组中GH 因总数	基因数(个)			多结构域酶的 百分数(%)
		纤维素酶	LPMOs	木聚糖酶	
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B ATCC 43068	40	11/12	0	1/2	85.71
<i>Thermobispora bispora</i> DSM43833	47	7/9	0/1	3/3	76.92
<i>Xylanimonas cellulosilytica</i> DSM 15894	67	6/9	2/2	4/5	75.00
<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC27029	108	10/14	4/5	5/7	73.08
<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM 20109	89	11/14	4/4	12/19	72.97
<i>Thermobifida fusca</i> YX	39	7/10	1/2	1/3	60.00
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> DSM43111	67	8/13	2/4	2/4	57.14
<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC 484	110	10/21	1/1	4/6	53.57
<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827	128	11/22	2/5	4/5	53.13
<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	121	8/20	4/4	1/1	52.00
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	150	9/20	3/7	3/4	48.39
<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	123	9/18	2/5	2/4	48.15
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	152	8/16	1/4	1/2	45.45
<i>Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis</i> NCPPB 382	59	2/14	0	1/3	17.65
<i>Clavibacter michiganensis subsp.sepedonicus</i> ATCC 33113	41	2/6	0	0/10	11.76
<i>Sanguibacter keddiei</i> DSM 10542	91	0/15	1/1	0/2	5.88
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	82	0/9	0/2	0/0	0.00
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	58	0/7	0	0/10	0.00
<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	32	0/2	0/1	0/0	0.00

a) 纤维素酶、氧化酶及木聚糖酶基因的数目统计是以x/y的形式来表示的, 其中x代表的是在酶基因中多结构域酶基因的数目, 而y代表的是基因组中降解酶基因的总数目; 以*Acidothermus cellulolyticus* 11B ATCC 43068的纤维素酶为例, “11/12”代表的是这株菌共含有12种纤维素酶基因, 其中有11种是多结构域的相关基因; LPMOs: lytic polysaccharide monooxygenases, 多糖裂解单加氧酶.

具有重要意义。

在木质纤维素降解放线菌中, 纤维单胞菌(*Cel-loulomonas fimi*)和褐色喜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)是研究时间最长、基因结构最为清楚的两种模式菌株^[11,25]; 以这两株菌为代表, 分析比较多结构域的特征(图2), 多数基因编码产物都具有一个催化结构域(catalytic domain, CD)以及多个碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding module, CBM)。CD是酶分子发挥断键功能的关键结构域, 酶分子催化功能的差异主要是由CD区决定的。木质纤维素多为水不溶性大分子, CD高效定位于不溶性底物是其高效催化的前提, 而这与CBM的存在种类与数量有直接关系^[26,27]。放线菌功能基因组中CBM类型主要有3类, 这与真菌类似, 但是CBM家族的类型却具有明显的偏好性, 主要是A型CBM的CBM2和CBM3, 这类结构域主要与高度结晶的纤维素或几丁质结晶表面结合; B型CBM的CBM4和CBM22, 这种结构域含有开放式的凹槽或裂隙, 主要负责结合游离的纤维素链等; C型CBM的CBM9, 主要结合低聚寡糖的末端^[28]。木质纤维素降解酶类中含有多种CBM, 说明其中的酶分子可结合底物种类多样; 在耐高温相关酶分子中会含有多个CBM, 说明在特殊环境中这种结构域组合可高效结合不溶性木质纤维素类底物^[26,29]。在CBM家族中, CBM2是放线菌多结构域体系中最常见的结构单元, 而真菌的相关催化结构域主要与CBM1组合^[30], CBM2的结构较CBM1更为复杂, 结合的底物也更加

多样, 不仅能够识别纤维素面, 还能够识别并结合木聚糖等其他多糖表面^[26,31]。

除CD与CBM外, 放线菌胞外游离酶中还含有FN3, Ig等辅助结构域, 一般位于CD与CBM之间, 也协助识别底物、细胞吸附以及维持CD等结构域的稳定作用^[32]。FN3较为特殊, 其在不同菌株中的存在形式有所差异: 在褐色喜热裂孢菌中, FN3是单个存在的; 而在纤维单胞菌中, FN3却是以两个或三个一组的形式存在。相关辅助结构域对催化的影响仍需要深入研究。除以上几种结构域外, 纤维单胞菌的胞外木聚糖酶中还存在另外一种结构域-CE4, 这是一种乙酰木聚糖酯酶, 可完成木聚糖侧链酯键的降解。多结构域组合模式是放线菌分泌胞外酶高效催化的重要原因, 这种组合模式也为酶分子的进一步优化改造提供了新的思路。

3 高效结晶纤维素降解酶的结构与功能特性

基因组分析表明, 放线菌对于半纤维素以及果胶的降解并不具有优势, 因而放线菌对于木质纤维素降解的高效性主要体现在对于纤维素底物的降解上。放线菌能够分泌多种分布在不同家族的纤维素水解酶, 且其GH家族的种类要多于丝状真菌(表2), 这意味着放线菌分泌的纤维素酶可结合不同结晶或非晶状态的纤维素。

放线菌分泌的纤维素酶不仅种类多, 而且多具有

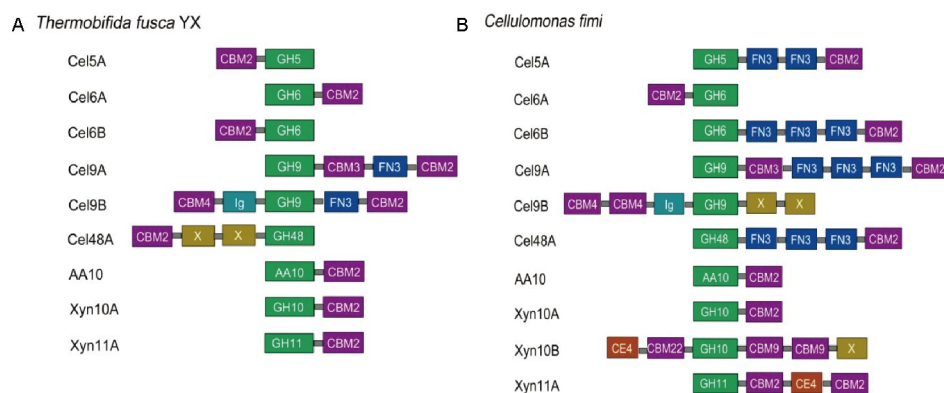


图2 褐色喜热裂孢菌和纤维单胞菌的木质纤维素降解酶类的模块化示意图(改绘自文献^[24])

A: 褐色喜热裂孢菌的9种木质纤维素降解酶; B: 纤维单胞菌的10种主要的木质纤维素降解酶。图中酶分子各个模块的排列从左到右对应的是肽链的N端到C端; 其中模块主要包括7种类型结构域: GH糖苷水解酶(如纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶)模块、AA氧化酶模块、CBM碳水化合物结合模块、CE碳水化合物酯酶模块、FN3纤连蛋白-3结构域模块、Ig免疫球蛋白样结构域模块和X未知功能结构域模块

表 2 放线菌与丝状真菌基因组中主要木质纤维素降解酶家族分布

	CBH	EGL	BGL	LPMOs
<i>Actinomycete</i>	GH6, GH9, GH48	GH5, GH6, GH9, GH12, GH48, GH74	GH1, GH3, GH5	AA10
<i>Filamentous fungi</i>	GH6, GH7	GH5, GH7, GH12, GH45	GH1, GH3	AA9

较高的持续性. 纤维素酶对于结晶纤维素的水解作用主要是由可高效持续性作用的CBH来完成^[33], 酶分子的持续性催化能力会影响整个结晶纤维素降解过程的降解速率^[34,35]. 放线菌分泌的CBH主要分布在GH6家族, 还有部分分布在GH9和GH48家族. 与GH9和GH48家族的外切纤维素酶不同, GH6家族的外切纤维素酶对于结晶纤维素链的降解是从非还原端开始的. 同时, 与丝状真菌分泌的GH6家族CBH(图3A)相比, 放线菌GH6家族CBH可结合更多的底物亚单元(即可结合更长的底物链, 图3B), 因而具有更高的持续性.

另外, 放线菌分泌的内切葡聚糖酶也同样具有较高的持续性. 例如, 由褐色喜热裂孢菌分泌的Cel9A, 这是一种典型的持续性内切酶, 其主要结构域包括: GH9、连接肽以及一个CBM3. 这种酶的持续性主要是由CBM3来提供的, CBM3的缺失, 会使相关酶活显著降低^[36]. 即CBM3作用的发挥不仅表现在底物结合方面, 还能够影响酶分子的活性以及持续性.

除了糖苷水解酶外, 氧化酶对于结晶纤维素的高效降解也发挥了重要的作用. 放线菌分泌的纤维素氧化酶又叫LPMOs. 在大部分木质纤维素降解放线菌都有分布, 都属于AA10家族(表2). LPMOs作用的发挥需要电子供体, 电子递体(Cu^{2+})以及电子受体(底物或是 O_2). 电子供体的存在及其持续供给效率对于LPMOs功能的发挥具有重要影响^[37]. 有关AA10家族LPMOs的电子供体和反应机制现在仍不清楚, 有研究表明木质素的含量越高, LPMOs与纤维素酶的协同作用越明显, 这暗示着木质素的降解产物可能是LPMOs的电子供体^[38-40].

有关放线菌分泌木素氧化酶的文献报道有很多, 例如, 绿袍链霉菌(*Streptomyces viridosporus* T7A)^[41]、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和红球菌属(*Rhodococcus*)都能分泌胞外过氧化物酶, 降解木素生成低分子量的酚醛类物质. 木质素氧化酶提高了纤维素酶对多糖类底物的可及性, 其降解产物既可以作为电子供体增加LPMO对多糖底物的氧化效果, 又可以作为原始材料

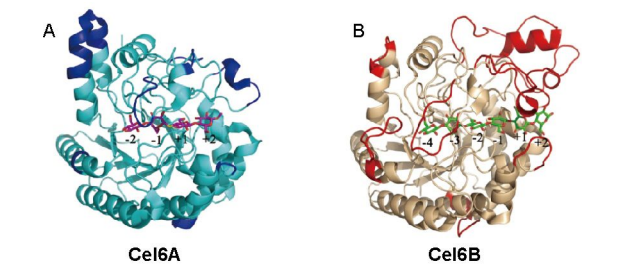


图 3 放线菌与丝状真菌GH6家族纤维素酶的结构差异^[43]

里氏木霉和褐色喜热裂孢菌分泌的Cel6A(PDB ID: 1QK2)(A)和Cel6B(PDB ID: 4B4F)(B)的结构图, 图中结构颜色加深的部分表示这两种酶在结构上的主要差异; 图中还给出了两种蛋白结合的糖链的长度, 数字代表的是酶分子与糖基结合的亚位点数, 以酶切位点作为0点, “-”表示糖链的非还原端, “+”表示糖链的还原端^[44]

用于化工或制药等行业^[42].

4 放线菌胞外组分的高效分泌系统

放线菌与真菌类似, 具有明显的顶端生长现象, 但放线菌胞外蛋白质的分泌过程却与细菌更为相似, 主要是通过信号肽的导向作用, 定向结合细胞膜上的通道蛋白, 而后由通道蛋白分泌至胞外. 对于放线菌来说, 根据蛋白N末端信号肽的差异, 可将其胞外酶的分泌途径分为两类^[45]: Sec途径和Tat途径(图4). Sec途径即普通分泌途径(general secretory pathway), 这种系统在细菌、古菌和真菌普遍存在, 大部分放线菌蛋白都通过此转运系统分泌, Sec系统主要转运的是未折叠的蛋白前体^[46]. 其次是Tat途径(two-arginine translocation), 因分泌蛋白的信号肽上有两个保守的精氨酸而得名, Tat系统存在于80%的细菌和部分古菌中, 其独特之处在于它可以转运正确折叠的蛋白质甚至是多亚基酶复合物^[47]. 与Sec途径相比, Tat系统转运的蛋白分子量且多变(直径25~70 Å); 无论是含辅因子的蛋白, 金属离子结合蛋白, 还是异构体低聚物蛋白都能通过Tat转运蛋白完整的分泌到胞外^[47], 这种特点对于多结构域功能性木质纤维素降解酶的释放具有重要意义. 另外Tat系统可转运胞内正确折叠的金属离子依赖性蛋

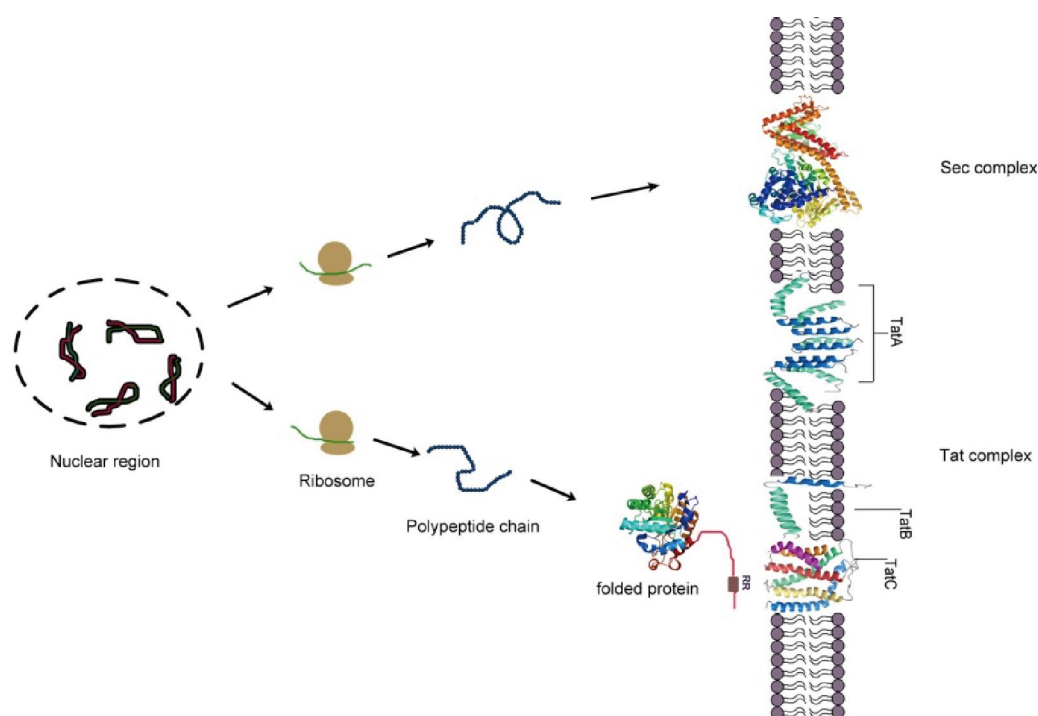


图4 放线菌的胞外蛋白分泌途径^[47]

放线菌胞外蛋白的两种主要分泌途径, 包括Sec途径和Tat途径; 其中Sec(模板PDB ID: 1NL3)途径主要转运未折叠的蛋白前体, 而Tat途径主要转运的是折叠后的蛋白质。图中给出的Tat途径中的3个跨膜蛋白(以*Thermobifida fusca* YX的相应蛋白为对象, 同源建模后获得), 其中TatA(模板PDB ID: 2LZS)是通道转运蛋白, TatB(模板PDB ID: 2MI2)和TatC(模板PDB ID: 4B4A)形成复合物, 负责双精氨酸信号肽的识别。Tat途径转运过程是以*Thermobifida fusca* YX的内切纤维素酶E5(PDB ID: 2CKS)为例, 它含有潜在的Tat信号肽^[11], 转运过程可以分为以下4个步骤, 即双精氨酸信号肽与TatBC复合物的识别与结合, TatA通道蛋白构象与位置发生变化, 通道蛋白打开, 目的蛋白转运到胞外后信号肽被切除

白, 这可以避免周质空间中其他金属离子的竞争作用^[48], 因而其在转运金属离子依赖性的氧化酶(如LPMO)方面可能具有特殊优势。

Tat系统在放线菌纤维素酶, 特别是多结构域纤维素酶的分泌过程中发挥了重要作用。Lykidis等人^[49]分析了一株土壤纤维素降解放线菌*Thermobifida fusca* YX的全基因组, 发现9种多结构域纤维素酶中有7种含有潜在的Tat信号肽。同时, Adav等人^[11]对*Thermobifida fusca* YX的蛋白质组分析结果表明, 负责蛋白分泌的两个系统中, Tat系统的相关蛋白在纤维素降解利用过程中出现了明显的表达上调现象, 而Sec系统却没有太大变化, 因此推测Tat系统是*Thermobifida fusca* YX纤维素酶的主要分泌系统。不仅如此, Tat系统在其他放线菌木质纤维素降解酶的转运过程中也发挥了重要作用。Faury等人^[50]报道, Tat转运系统能够介导变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)木聚糖酶的分泌。而最近的研究也表明, Tat系统是天蓝色链霉菌(*Streptomyces*

coelicolor)蛋白质的主要运出途径^[51]。

5 放线菌木质纤维素降解酶的特性及其工业应用潜力

放线菌多生活中温环境下的土壤中, 但部分放线菌能够适应高温、碱性的极端环境, 如喜热裂孢菌、高温单孢菌等, 因而其分泌的酶分子比其他来源的酶分子应具有更高的工业价值, 除了其具有较高的稳定性和独特的底物特异性之外, 还因为这些纤维素酶具有嗜热、耐碱的特征(表3)^[52-64]。这些特征使得放线菌分泌的木质纤维素降解酶类能在造纸、污水处理等工业上发挥重要的作用^[52]。

链霉菌属微生物分泌的纤维素酶与木聚糖酶的pH耐受性和温度稳定性最好(表3), 这些酶在碱性、高温环境中仍然具有较高酶活。因而, 链霉菌分泌的糖苷水解酶常被应用于纸浆漂白工业及食品工业^[56]。此

表 3 放线菌分泌的木质纤维素降解酶类及其特点^[52-64]

酶	生产菌株	pH耐受性	温度稳定性(℃)	底物特异性	参考文献
纤维素酶	链霉菌属	5.0~12.0	40~50	CMC	[53]
	高温单孢菌属	7.0~10.0	50	CMC	[54]
木聚糖酶	马杜拉放线菌属	4	70	木聚糖	[55]
	链霉菌属	6.0~11.0	40~80	木聚糖	[56]
	链霉菌属	8.0~11.0	45~60	木聚糖	[57]
木素氧化酶	链霉菌属	5.0~11.1	—	木素	[58]
	链霉菌属	4.5	20~70	木素	[59]
淀粉酶	拟诺卡氏菌属	8.6	70~80	淀粉	[60]
	褐色喜热烈胞菌	5.0~7.0	60	淀粉	[61]
果胶酶	利迪链霉菌	4.0~7.0	45	多聚半乳糖醛酸	[62]
几丁质酶	拟诺卡氏菌属	7.0	50~60	胶体几丁质	[63]
	小双孢菌属	3.0~11.0	30~50	胶体几丁质	[64]

外, 木素氧化酶能实现木素的高效降解, 减少预处理成本; 目前大部分的木素氧化酶都来源于真菌; 但由于这些酶的稳定性较差, 工业应用范围就受到了限制, 因此从其他微生物中寻找高效稳定的木素氧化酶以满足工业生产的迫切需要是目前的主要任务. 已有报道发现天蓝色链霉菌存在一种双结构域的漆酶, 这是一种耐碱的氧化酶, 并且由于其较高的氧化能力、pH 耐受能力以及热稳定性, 已经被广泛应用于纸浆和造纸工业上的染料脱色技术^[65].

6 展望

放线菌是一种丝状好氧的细菌, 可耐受高温缺水的陆地环境. 放线菌在植物生物质转化过程中发挥了重要作用, 能够在CAZy酶较少的条件下高效降解木质纤维素, 这与其高效的木质纤维素酶系结构特征与分泌机制有很大关系; 其中多结构域酶分子中吸附结构域的存在不仅能够增加酶与底物的结合力, 还可增加酶分子的持续催化能力, 进而提高酶分子的降解效率. 放线菌可高效降解结晶纤维素, 这可能与它具有

水解与氧化两种机制相关, GH6家族的外切纤维素酶以及GH9家族的内切纤维素酶, 都具有较高的持续性; 而AA10家族多糖裂解氧化酶也可高效降解结晶纤维素, 并且在有效降低纤维素结晶度的同时, 还为外切纤维素酶提供新的作用位点, 这些特点使得放线菌可能在降解结晶纤维素方面更具优势. 同时, 放线菌具有高效的氧化降解酶系统, 可以将木素降解成小分子的酚类物质, 使得木素成为一种新的可再生资源, 用于生产芳香族或酚类生物产品, 以及精细化学品及材料的生物合成^[66].

放线菌(特别是链霉菌等)除分泌木质纤维素降解酶外, 还分泌一系列的次级代谢产物, 因此以低值的秸秆类生物质为原料, 利用放线菌来生产高效降解结晶纤维素的工业酶制剂或抗生素等功能组分, 可以提升生物质的低值化利用过程. 这不仅可实现农业废弃物秸秆的再利用形成菌剂、酶制剂等产品, 还可以促使相关放线菌的应用由土壤微生物转向工业生物技术, 相关系统生物学的分析可为相关过程的实现奠定了理论与技术的基础.

参考文献

1 Sanderson K. Lignocellulose: a chewy problem. *Nature*, 2011, 474: S12–S14
2 曲音波, 王禄山. 生物质的抗降解性及其生物炼制中的科学问题. *中国基础科学*, 2009, 11: 55–58
3 Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315: 804–807

- 4 Sykes G, Skinner F A. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. New York: Academic Press, 1973, 111: 1220–1221
- 5 Raut M P, Prince William S P M, Bhattacharyya J K, et al. Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste—A compost maturity analysis perspective. *Bioresource Tech*, 2008, 99: 6512–6519
- 6 Maki M, Leung K T, Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*, 2009, 5: 500–516
- 7 Ulrich A, Klimke G, Wirth S. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. *Microb Ecol*, 2008, 55: 512–522
- 8 Zhang L, Jia Y, Zhang X, et al. Wheat straw: an inefficient substrate for rapid natural lignocellulosic composting. *Bioresource Tech*, 2016, 209: 402–406
- 9 Zhang L, Ma H, Zhang H, et al. *Thermomyces lanuginosus* is the dominant fungus in maize straw composts. *Bioresource Tech*, 2015, 197: 266–275
- 10 Zhang L, Zhang H, Wang Z, et al. Dynamic changes of the dominant functioning microbial community in the compost of a 90-m³ aerobic solid state fermentor revealed by integrated meta-omics. *Bioresource Tech*, 2016, 203: 1–10
- 11 Adav S S, Ng C S, Sze S K. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Thermobifida fusca* reveals metabolic pathways of cellulose utilization. *J Proteomics*, 2011, 74: 2112–2122
- 12 Hirsch A M, Valdés M. Micromonospora: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42: 536–542
- 13 Godden B, Legon T, Helvenstein P, et al. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. *J Gen Microbiol*, 1989, 135: 285–292
- 14 Koeck D E, Pechtl A, Zverlov V V, et al. Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotech*, 2014, 29: 171–183
- 15 邓辉, 王成, 吕豪豪, 等. 堆肥过程放线菌演替及其木质纤维素降解研究进展. *应用与环境生物学报*, 2013, 19: 581–586
- 16 Sweeney M D, Xu F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. *Catalysts*, 2012, 2: 244–263
- 17 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: 422–433
- 18 公维丽, 王禄山, 张怀强. 植物细胞壁多糖合成酶系及真菌降解酶系. *生物技术通报*, 2015, 31: 149–165
- 19 Kubicek C P, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol*, 2011, 12: R40
- 20 Martens-Uzunova E S, Schaap P J. Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46: S170–S179
- 21 King B C, Waxman K D, Nenni N V, et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4: 4
- 22 Brühlmann F, Kim K S, Zimmerman W, et al. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 2107–2112
- 23 王帅, 陈冠军, 张怀强, 等. 碳水化合物活性酶数据库(CAZy)及其研究趋势. *生物加工过程*, 2014, 12: 102–108
- 24 Bayer E A, Shoham Y, Lamed R. Lignocellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In Balows A, Trüper H G, Dworkin M, et al., eds. *The Prokaryotes*. Berlin Heidelberg: Springer, 2013. 215–266
- 25 Christopherson M R, Suen G, Bramhacharya S, et al. The genome sequences of *Cellulomonas fimi* and “*Cellvibrio gilvus*” reveal the cellulolytic strategies of two facultative anaerobes, transfer of “*Cellvibrio gilvus*” to the genus *Cellulomonas*, and proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. *PLoS ONE*, 2013, 8: e53954
- 26 Gilbert H J, Knox J P, Boraston A B. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23: 669–677
- 27 Guillén D, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1241–1249
- 28 Boraston A B, Bolam D N, Gilbert H J, et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J*, 2004, 382: 769–781
- 29 Pham T A, Berrin J G, Record E, et al. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module. *J Biotech*, 2010, 148: 163–170
- 30 Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D233–D238

- 31 Simpson P J, Xie H, Bolam D N, et al. The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem*, 2000, 275: 41137–41142
- 32 Tskhovrebova L, Trinick J. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 2004, 279: 46351–46354
- 33 Payne C M, Knott B C, Mayes H B, et al. Fungal cellulases. *Chem Rev*, 2015, 115: 1308–1448
- 34 Beckham G T, Ståhlberg J, Knott B C, et al. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. *Curr Opin Biotech*, 2014, 27: 96–106
- 35 Harris P V, Xu F, Kreel N E, et al. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 19: 162–170
- 36 Li Y, 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. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 2582–2588
- 37 Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 8455–8465
- 38 Vicuña R. Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microbial Tech*, 1988, 10: 646–655
- 39 Zimmermann W. Degradation of lignin by bacteria. *J Biotech*, 1990, 13: 119–130
- 40 Ramachandra M, Crawford D L, Hertel G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 3057–3063
- 41 Crawford D L, Pometto A L, Crawford R L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45: 898–904
- 42 Kameshwar A K S, Qin W. Recent developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms. *Int J Biol Sci*, 2016, 12: 156–171
- 43 Sandgren M, Wu M, Karkehabadi S, et al. The structure of a bacterial cellobiohydrolase: the catalytic core of the *Thermobifida fusca* family GH6 cellobiohydrolase Cel6B. *J Mol Biol*, 2013, 425: 622–635
- 44 Davies G J, Wilson K S, Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1997, 321: 557–559
- 45 Palmer T, Hutchings M I. *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Poole: Caister Academic Press, 2011, 4: 87–104
- 46 Schneewind O, Missiakas D. Sec-secretion and sortase-mediated anchoring of proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 1687–1697
- 47 Palmer T, Berks B C. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Micro*, 2012, 10: 483–496
- 48 Tottey S, Waldron K J, Firbank S J, et al. Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature*, 2008, 455: 1138–1142
- 49 Lykidis A, Mavromatis K, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J Bacteriol*, 2007, 189: 2477–2486
- 50 Faury D, Saidane S, Li H, et al. Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1699: 155–162
- 51 Widdick D A, Dilks K, Chandra G, et al. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17927–17932
- 52 Prakash D, Nawani N, Prakash M, et al. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed Res Int*, 2013, 2013: 1–8
- 53 Jones B E, Van Der Kleij W A, Van Solingen P, et al. Cellulase producing actinomycetes, cellulase produced therefrom and method of producing same. USA Patent, 6562612, 2003-05-13
- 54 George S P, Ahmad A, Rao M B. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresour Tech*, 2001, 77: 171–175
- 55 Wilson D B. Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit Rev Biotech*, 1992, 12: 45–63
- 56 Luo L, Cai J, Wang C, et al. Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althoticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. *J Chem Technol Biotechnol*, 2016, 91: 1093–1098
- 57 Priya B S, Stalin T, Selvam K. Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste. *Afr J Biotechnol*, 2012, 11: 14320–14325
- 58 Gunne M, Urlacher V B. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining. *PLoS ONE*, 2012, 7: e52360
- 59 Suzuki T, Endo K, Ito M, et al. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence,

- and expression. [Bioscience Biotech Biochem](#), 2003, 67: 2167–2175
- 60 Stamford T L M, Stamford N P, Coelho L C B B, et al. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. [Bioresource Tech](#), 2001, 76: 137–141
- 61 Yang C H, Liu W H. Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. [Enzyme Microbial Tech](#), 2004, 35: 254–260
- 62 Jacob N, Asha Poorna C, Prema P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. [Bioresource Tech](#), 2008, 99: 6697–6701
- 63 Horikoshi K. *Alkaliphiles*: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 735–750
- 64 Nawani N N, Kapadnis B P, Das A D, et al. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. [J Appl Microbiol](#), 2002, 93: 965–975
- 65 Lu L, Zeng G, Fan C, et al. Diversity of two-domain laccase-like multicopper oxidase genes in *Streptomyces* spp.: identification of genes potentially involved in extracellular activities and lignocellulose degradation during composting of agricultural waste. [Appl Environ Microbiol](#), 2014, 80: 3305–3314
- 66 Bugg T D H, Ahmad M, Hardiman E M, et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. [Curr Opin Biotech](#), 2011, 22: 394–400

Omics analysis and industrial application prospects of lignocellulose-degrading actinomycetes

SUN XiaoMeng, GONG WeiLi, LI Xin, WANG LuShan & ZHANG HuaiQiang

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

Actinomycetes, a group of Gram-positive bacteria with high GC contents, play important roles in hyperthermal lignocellulose degradation in terrestrial habitats. A functional genomics analysis revealed that lignocellulose-degrading actinomycetes have more cellulases than hemicellulases and pectinases. Additionally, the enzymes capable of degrading cellulose were mainly cellobiohydrolases belonging to glycoside hydrolase family 6, with a small number of cellulases belonging to glycoside hydrolase families 9 and 48. In addition to glycoside hydrolases, large numbers of polysaccharide monooxygenases from auxiliary activity family 10 were also identified. Therefore, actinomycetes can efficiently degrade crystalline cellulose by continuous hydrolysis and oxidation mechanisms. Furthermore, some of these enzymes with multiple structural domains can be secreted quickly into the extracellular environment through the twin-arginine translocation system. These lignocellulolytic enzymes have excellent properties, such as high enzyme activity and high temperature and alkali resistance. Therefore, the characteristics and advantages of these actinomycetes in lignocellulose degradation and secondary metabolite production make them well suited for industrial applications.

***Actinomycetes*, cellulose degradation, multiple structural domain, persistent enzymes, oxidase system, Tat transport system**

doi: [10.1360/N052016-00365](https://doi.org/10.1360/N052016-00365)