融合糖苷水解酶在生物质转化中的研究进展

李娜, 夏欢, 江燕斌*

华南理工大学化学与化工学院, 广州 510640

*通讯作者, E-mail: cebjiang@scut.edu.cn

收稿日期: 2021-01-27; 接受日期: 2021-03-02; 网络版发表日期: 2021-04-27

国家自然科学基金(编号: 21776102)资助项目

摘要 自然界中丰富的生物质多糖可被降解为低聚寡糖或单糖。利用这些小分子糖可生产乙醇、医药制品和其他化工原料。生物质多糖的结构非常复杂, 它的降解涉及多种糖苷水解酶的协同催化作用。这些糖苷水解酶有木聚糖酶、葡聚糖酶和纤维素酶等。与单个酶或简单混合酶相比, 通过共价结合的融合糖苷水解酶对多糖底物的降解效率更高, 选择合适的融合酶构建策略还能提高酶的表达量、活性和稳定性。这种融合酶在利用生物质生产能源物质和其他化工原料时可达到过程集成的效果, 从而简化生产步骤、节约成本, 所以融合糖苷水解酶能有效解决生物质利用中的瓶颈问题。本文综述了采用融合技术对糖苷水解酶进行融合改造的研究进展, 包括融合酶构建策略、融合酶的性能和优势以及融合糖苷水解酶的应用。最后对该领域的基础研究和应用前景进行了展望, 为融合糖苷水解酶的进一步开发和利用提供参考。

关键词 生物质, 生物能源, 水解, 糖苷水解酶, 融合酶, 应用

1 引言

生物质中的纤维素和木质素是地球上含量最多的有机含碳化合物。利用植物生物质生产生物乙醇是一种很有前景的领域, 可避免大量化石燃料燃烧产生的温室气体^[1]。另外, 生物质被降解的终产物主要是单糖, 单糖可被进一步转化为其他化学产品^[2-4]。当利用生物质生产化学品和燃料时, 首先需要对植物细胞壁的多糖成分进行降解, 传统的化学处理过程将产生很高的费用^[5]。利用糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)降解这些多糖可弥补以上不足。糖苷水解酶是一类水解糖苷键的酶, 它们具有高度的底物专一性, 不同的底物具有不同的糖苷键和结构。根据水解的底物

不同可将其分为190余种, 如 β -葡聚糖酶、 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶。能水解同一底物中糖苷键的水解酶可能具有很大的结构差异, 根据糖苷水解酶的结构差异又可将其具体分为170个家族^[6], 即GH1~GH170, 它们都被记录在CAZy数据库中。每个GH家族内部的成员之间具有很高的结构相似度, 该分类法可有效地反映酶的进化特征和功能相似性。例如, 在CAZy数据库中, 水解木聚糖中 β -1,4-木糖苷键的 β -木糖苷酶被划分在GH1、GH3、GH39、GH43和GH120等10余个家族中, 每个家族中的 β -木糖苷酶具有相似的结构和功能。

复杂的细胞壁多糖需要一系列糖苷水解酶的协同催化作用才能被降解为低聚寡糖和单糖, 因此, 亟需能够解决生产过程中木质纤维素降解问题的多功能生物

引用格式: Li N, Xia H, Jiang Y. Research progress of fusion glycoside hydrolase in biomass conversion. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 831–843, doi: 10.1360/SSC-2021-0020

催化剂。自然界中的很多微生物可利用自身的酶系统顺序作用于植物细胞壁, 从而有效地分解植物生物质^[1,7~10]。例如, 微生物来源的一些 β -木糖苷酶有2个结构域: 一个是起催化作用的主要结构域, 另一个是具有底物结合或其他糖苷水解酶活性的辅助结构域, 它们的多功能特性能有效地实现异质木聚糖的降解^[11,12]。微生物降解生物质是自然界物质循环的重要环节, 这些微生物具有多种糖苷水解酶的编码基因^[13,14], 而具有多功能特性的糖苷水解酶是自然进化的高级形式。随着生物技术的发展, 人们模仿生命系统的酶协同或级联催化作用, 构建了许多人工多酶体系或融合酶。融合酶是通过蛋白质工程将2个或多个生物酶连接起来形成的多功能酶, 它们表现出更好的催化性能和更广阔的应用前景^[15,16]。生物质降解的酶系包括糖苷水解酶, 将2个或多个糖苷水解酶连接起来, 可形成融合糖苷水解酶。

化学催化在精细化学品的合成中占据主导地位。若以生物质为原料生产精细化学品, 可结合生物催化和化学催化以达到过程集成的效果, 但是天然糖苷水解酶难以适应化学催化条件, 需采取一些提高生物催化和化学催化相容性的策略^[17~19]。性能改善的融合糖苷水解酶能促进生物催化和化学催化的结合, 然而, 目前还没有构建融合酶的通用技术。这个复杂的过程涉及被融合酶的结构和性质、构建融合酶的方向以及连接肽的长度和成分^[20]。所以, 构建融合糖苷水解酶的过程中, 在理性设计的基础上, 还需要尝试多种策略才能得到理想的融合酶。本文主要综述了融合糖苷水解酶的构建策略、性质和应用, 可为高效利用生物质的研究和应用提供一种途径。

2 构建融合糖苷水解酶的策略

融合糖苷水解酶通常采用顺序融合的方法, 即在酶的N或C末端直接或通过连接肽连接另一个酶或碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBM)^[21]。直接融合主要是考虑融合顺序, 而通过连接肽的顺序融合还需对连接肽进行合理的设计。图1是直接融合和连接肽连接的融合示意图。通过设计引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、酶切和连接将不同模块的基因一同连接到质粒上, 将质粒转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)或酵母菌(*Pichia pastoris*、*Yarrowia lipolytica*或*Lipomyces starkeyi*)中进行异源表达。融合顺序、连接肽、酶分子结构和表达宿主都会影响融合酶的表达和催化性能。融合糖苷水解酶及其性质见表1^[22~40]。

2.1 直接顺序融合

连接2个编码基因的传统方法是通过限制性内切酶的切割, 切割后产生的黏性末端相互结合, 但是这种方法会删除蛋白的C或N端氨基酸, 使蛋白的结构甚至功能发生改变^[41,42]。随着分子生物技术的发展, 已经产生了很多更好的基因克隆方法, 如重叠延伸聚合酶链反应(OE-PCR), 其能精确地实现融合酶的构建^[43~46]。现已可人工合成基因, 甚至在实验室就能从基因水平模拟自然界的进化, 创造和异源表达新的基因^[47]。

目前, 一般通过设计引物进行OE-PCR实现蛋白的直接顺序融合。首先, 要尽可能地了解被融合的单酶的结构特点和酶学性质, 再根据目的选择相互匹配的2个或多个酶进行融合^[21]。直接融合后的基因在宿主中

图1 直接融合(a)和连接肽连接的融合(b)(网络版彩图)

Figure 1 Direct fusion (a) and fusion with a linker (b) (color online).

表达得到融合蛋白, 该融合蛋白中的一个蛋白模块的C或N末端直接连接另一个蛋白模块的N或C末端(图1(a)). 虽然融合顺序会较大程度地影响融合酶的性质, 但是目前还没有能精确预测有效融合顺序的方法, 所以只能通过试错的方法来优化融合顺序^[28,29]. Tajwar等^[28]对来源于*Thermotoga maritima*的木聚糖酶(XynB)和CBM进行了不同方向的融合, 探究了融合顺序对融合酶的影响. 他们发现, XynB-B6C没有活性, 而XynB-CB22的活性升高. 结合热稳定性数据和分子建模分析推测其可能的机理为: XynB-B6C的底物结合位点被包埋, XynB-CB22的催化位点的氨基酸与底物结合位点的氨基酸相互靠近, 并通过圆二色谱分析验证了他们的推测.

2.2 连接肽连接的融合

在被融合蛋白或结构域间引入一段多肽, 可有效地避免融合体在表达和催化过程中的相互干扰^[48]. 如图1(b)所示, 在2个被融合酶的基因序列中间引入一条肽链编码基因(L), 翻译后的2个蛋白模块由连接肽(L)连接. 连接肽的成分、排列顺序和大小都会影响融合酶的结构和功能, 因此, 在直接融合的基础上还需要选择合适的连接肽^[49,50].

2.2.1 连接肽对融合酶的影响

很多融合糖苷水解酶的研究探索了不同长度和成分的连接肽对融合酶的影响^[30,51]. Lu等^[30]用不同长度(5~15个氨基酸)的肽链去连接来源于*Bacillus amyloliquefaciens*的葡聚糖酶和来源于*B. subtilis*的木聚糖酶, 发现了能使2个酶产生有利相互作用的连接肽, 结果证明(GGGGS)₂和(EAAAK)₃都能增强葡聚糖酶和木聚糖酶的催化性能. 通过连接肽连接的融合技术已广泛应用于生物检测、造纸、纺织、食品和生物医药等领域^[52~56]. 融合糖苷水解酶的构建策略也可借鉴其他应用领域的经验进行融合蛋白设计.

与蛋白质结构和功能的多样性相似, 氨基酸种类、数量、排列顺序和长度造成了连接肽结构和性质的多样性. 根据其性质大体可分为柔性连接肽、刚性连接肽和抗蛋白酶连接肽^[57]. Li等^[58]用模拟的方法建立了一个包含系列柔性到刚性连接肽的数据库, 并用荧光能量共振转移(Forster resonance energy transfer, FRET)验证了该模拟的准确性, 该工作为控制连接肽

的灵活性提供了指导. van Rosmalen等^[59]探索了甘氨酸比例和多肽链长度对连接肽柔性的影响, 发现低比例的甘氨酸会导致低频率的FRET, 说明被融合的2个酶单元之间的相互作用减弱. 通过计算模拟和连接肽数据库的使用, 可更合理地对连接肽进行针对性设计, 但连接肽不仅仅是一个简单的连接器, 它还会影响融合体的微环境和方向性, 这在实际应用中很难控制, 即使到现在也很难针对2个蛋白设计出完美的连接肽^[60~62]. 融合糖苷水解酶的构建过程还需进一步了解, 不管连接肽的长度和氨基酸比例如何变化, 富含甘氨酸的连接肽仍是常用的、成功率比较高的连接肽(表1).

2.2.2 酶单元对融合酶的影响

虽然连接肽的理性设计能减少构建融合酶的盲目性, 但被融合的蛋白有各自不同的N和C末端、高级结构和动力学等特性, 不同连接肽和不同被融合单元都导致设计和构建融合蛋白的随机性. Kim等^[32]采用同一个连接肽在木聚糖酶(来源于*Clostridium thermocellum*)的C端分别连接木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶, 发现与简单混合的2个酶相比, 融合后的木聚糖酶-阿拉伯糖苷酶对天然底物的降解能力更强, 降解阿拉伯木聚糖释放的还原糖量增加了30%, 并推测该融合酶的空间结构发生了改变, 使底物的传递效率增大, 而木聚糖酶-木糖苷酶未发生此类改变. Chen等^[31]较为系统地探索了融合方向、连接肽对融合酶催化性能的影响. 他们采用同一个连接肽分别在葡聚糖酶(来源于*Teleogryllus emma*)的N端和C端连接同一个木聚糖酶(来源于*Thermomyces lanuginosus*), 分别得到了葡聚糖酶-木聚糖酶和木聚糖酶-葡聚糖酶, 前者的温度稳定性和活性提高, 而后的活性下降; 用另外一个连接肽连接得到的木聚糖酶-葡聚糖酶的活性也降低, 这可能是因为融合方向对融合酶的影响较大, 而根本原因是融合单元间产生的相互作用. 在葡聚糖酶的N端连接木聚糖酶的融合方向会使各个单元产生相互干扰. 因此, 可再设计不同的连接肽在葡聚糖酶的N端连接木聚糖酶, 并解析融合酶的结构及性质来探索这种融合方向造成活性下降的机理. 直接顺序融合中描述到的融合方向对融合酶的影响, 以及以上两个例子充分说明被融合的各个酶单元间会产生相互作用, 这种相互作用是否有利于融合取决于各单元的结构和性质.

表 1 融合糖苷水解酶及其性质^{a)}

Table 1 Fusion glycoside hydrolase and its properties^{a)}

融合酶	连接肽	宿主	性质变化	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mL}$)	参考文献
无连接肽的直接融合					
葡聚糖酶→木聚糖酶	无	<i>E. coli</i>	葡聚糖酶的底物亲和性增强, 催化效率提高	6492; 903	[22]
纤维素酶→葡萄糖苷酶	无	<i>E. coli</i>	温度稳定性升高	396; 357	[23]
纤维素酶→木聚糖酶	无	<i>E. coli</i>	温度稳定性升高		[24]
葡聚糖酶→CBM	无	<i>E. coli</i>	活性升高(+)	6540	[25]
葡聚糖酶→CBM→酯酶	无	<i>E. coli</i>	活性升高(++)	7500	[25]
木聚糖酶→CBM→葡聚糖酶	无	<i>E. coli</i>	活性升高(+++)	26100; 17136	[25]
甘露聚糖酶→CBM	无	<i>P. pastoris</i>	温度、pH稳定性升高, 底物亲和性增强		[26]
CBM→半乳糖苷酶	无	<i>E. coli</i>	一步纯化和固定化, 催化效率和重复使用性提高		[27]
木聚糖酶→CBM	无	<i>E. coli</i>	活性升高		[28]
木聚糖酶→CBM	无	<i>E. coli</i>	活性升高		[29]
连接肽连接的顺序融合					
葡聚糖酶→木聚糖酶	(GGGGS) ₂ 和(EAAAK) ₃	<i>E. coli</i>	活性升高	6658; 1875	[30]
葡聚糖酶→木聚糖酶	EFPDLGTGGGSGS	<i>Y. lipolytica</i>	温度稳定性、活性升高	3280; 38797	[31]
木聚糖酶→葡聚糖酶	EFPDLGTGGGSGS	<i>Y. lipolytica</i>	活性降低		[31]
木聚糖酶→葡聚糖酶	AGSGSGSGS	<i>Y. lipolytica</i>	活性降低		[31]
木聚糖酶→葡聚糖酶	(GGGGS) ₂	<i>P. pastoris</i>	活性升高	81626; 8543	[32]
葡聚糖内切酶→葡聚糖外切酶	GSGGGS	<i>E. coli</i>	较宽的温度、pH适应范围		[33]
木聚糖酶→木糖苷酶	GGGGGADQLAIGP-MYNQVVYQYPN	<i>E. coli</i>	活性升高		[34]
木聚糖酶→阿拉伯糖苷酶	GGGGGADQLAIGP-MYNQVVYQYPN	<i>E. coli</i>	活性升高	16494	[34]
木糖苷酶→木聚糖酶	SAGSSAAGSGSG	<i>E. coli</i>	温度、pH稳定性升高, 活性升高	1174; 1033	[35,36]
葡聚糖酶→CBM	(GGGGS) ₃ 和(EAAAK) ₃	<i>P. pastoris</i>	温度稳定性和活性升高		[37]
CBM→木聚糖酶→CBM	天然连接肽	<i>E. coli</i>	温度稳定性和活性升高		[38]
葡聚糖酶→纤维二糖水解酶	天然连接肽	<i>L. starkeyi</i>	表达量和活性升高		[39]
葡萄糖苷酶→CBM	GSAGSA	<i>E. coli</i>	催化效率、乙醇稳定性和重复使用性提高	77741	[40]

a) “→”表示融合顺序, 即前者的C端与后者的N端结合; $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 是根据米氏方程计算得到的动力学参数, 该数值与催化效率成正比, 2个数值中的第一个表示N端模块的酶活性, 第二个表示C端模块的酶活性

3 融合酶的优势

生物质多糖的降解过程中存在一些极端条件, 如高温、高盐、酸性或碱性环境等. 为了实现生物质的有效降解和利用, 需要能够适应这些极端环境的糖苷水解酶. 因此, 研究人员根据需要从不同生境中筛选微生物酶资源, 如从高盐环境中筛选得到*Sphingomo-*

nas sp.和*Bacillus* sp. HJ14^[63,64], 它们分别具有编码木糖苷酶JB13GH39和HJ14GH43的基因, 这两种酶都具有盐抗性和乙醇稳定性. 但是大多数微生物来源的糖苷水解酶稳定性较差, 难以实现工业化应用. 于是可基于理性设计对酶进行突变来改善酶学性质, 但是该方法具有随机性^[65,66], 难以快速获得有利的突变体. 近年来, 通过融合技术构建出的融合酶表现出理想的

催化性能, 成为酶工程中的一种有效方法. 在糖苷水解酶的改造过程中, 构建融合酶的目的或优势可分为: 提高酶对生物质多糖的转化效率、提高酶的稳定性和重复使用率、实现酶的一步固定化和纯化.

3.1 提高酶的有效表达

自然界中生物质多糖成分的结构复杂, 只有多酶系统才能将其彻底转化为小分子糖或其他有机物. 受此启发, 最初构建融合酶的目的就是构建多功能酶, 但是像其他蛋白的异源表达一样, 并不是表达连接的两个或多个酶的基因就能得到共价键结合的融合多功能酶, 它们可能会出现不易表达或过量表达形成包涵体的现象, 从而导致可利用的酶量减少、转化效率降低, 增加生产成本. 一般地, 可在易表达酶的C端融合较难表达的酶, 前者可带动后者的表达, 从而提高表达量和催化效率^[39]. 这在其他异源蛋白的表达中被广泛应用, 例如, 与荧光蛋白或多肽融合的目的蛋白在宿主中的可溶性表达被提高^[67-69]. 但一些构建融合酶的实验忽略了这一点, 或者为优先达到其他目的而必须舍弃这个原则, 最终导致融合酶不易表达的问题. 要解决这个问题还需要优化构建策略, 如仍遵循N端为易表达酶的策略, 或者在融合酶的N端再融合一个易表达的酶.

3.2 提高酶的活性或催化效率

提高生物物质的高值化利用, 首先要实现糖苷水解酶对生物质多糖的高效转化, 很多研究都致力于构建融合酶来提高糖苷水解酶的活性或催化效率^[27-32,34-40]. 表1中列举了部分融合糖苷水解酶的 k_{cat}/K_m 值. 这些融合酶都能高效降解多糖底物, 与相同摩尔量的原酶混合物相比, 它们对预处理的天然底物(稻草、玉米秸秆和小麦秆等)的转化率也明显提高, 如Fan等^[34]构建了Xyln-Ara, 其转化小麦阿拉伯木聚糖生成木糖的产率提高了30%; 木糖苷酶与木聚糖酶的融合酶Xar-L1-XynA对玉米芯木聚糖的转化率为31.5%^[36]. 为进一步提高生物质多糖的转化率, 可利用融合糖苷水解酶与其他酶的协同催化作用, 如Chen等^[31]用融合酶EG-M-Xyn与商业水解酶Ctec2共同降解预处理后的稻秆, 其转化率高达89.5%.

与单个酶的催化性能相比, 融合酶具有多功能特性, 可降低产物抑制, 实现协同催化. 如图2(a, b)所示, 与简单混合的多酶协同催化体系相比, 融合多功能酶的协同催化还具有形成中间产物通道的特点, 一个酶的产物可从通道扩散进入另一个酶的催化位点, 从而避免中间产物在传递过程中被降解或浓度降低^[70,71]. 另外, 融合酶各单元之间的相互作用会改变酶的结构, 从而改善酶的催化活性. 一些研究发现许多短肽或蛋

图 2 融合酶转化底物的高效性. 融合酶形成中间产物传递通道, 避免中间产物的降解和扩散(a); 中间产物在简单混合的多酶协同催化体系中会随机扩散(b); 与CBM融合的糖苷水解酶与底物高效结合(c); 未与CBM融合的糖苷水解酶与底物结合能力差(d) (网络版彩图)

Figure 2 High efficiency of fusion enzyme to convert substrates. The channel formed in the fusion enzyme could avoid the degradation and diffusion of intermediates (a); intermediates would diffuse randomly in a simple mixed multi enzyme system (b); The glycoside hydrolase fused with CBM could efficiently interact with the substrates (c); The glycoside hydrolase without CBM module interact with the substrates poorly (d) (color online).

白序列融入到酶的N或C端能提高酶的催化活性, 例如, Bretagne等^[72]在 β -木糖苷酶*DtXyl*的N端连接了6个组氨酸标签, 使*DtXyl*在低温和高温下具有更高的催化活性. 这种活性的提高可能是由酶的N或C端与短肽或蛋白序列间的相互作用造成的^[73,74]. Han等^[75]将自组装肽(来源于*E. coli*)融合到环糊精葡萄糖转移酶(CGTase, 来源于*Paenibacillus macerans*)中, 提高了CGTase对可溶性淀粉供体的转化活性. 融合的SAP6-CGTase催化2-O-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸的产量提高了3.36倍. 通过分析底物与酶的结合位点发现底物糖基和氨基酸残基Y154之间有2个氢键, 其加强了底物和CGTase之间的结合.

微生物来源的CBMs具有很强大的功能, 其中一部分CBMs是天然糖苷水解酶的底物结合域, 它们主要通过加强底物与酶的结合能力来提高催化活性^[76]. 然而, 还有许多糖苷水解酶缺少CBM, 可将CBM融合进这部分酶中以提高生物质多糖转化率. CBM是独立的模块, 具有独立行使底物结合的功能, 当其被融合到糖苷水解酶中时, 融合酶可更有效地与底物结合, 从而实现底物的高效转化(图2(c)). 而没有CBM模块的糖苷水解酶对底物的结合能力差, 转化效率低下(图2(d)). 木聚糖酶XylC和葡聚糖酶CelC均来源于骆驼瘤胃宏基因组, XylC具有催化域(Xyn)和CBM, 而CelC缺少CBM^[25]. 当从XylC上截去CBM后, 仅剩的Xyn模块对相同底物(燕麦木聚糖)的降解活性降低了88%. 当把XylC上的CBM融合到CelC的C端后, CelC-CBM的活性是CelC的约1.8倍^[25].

3.3 有利于酶的纯化和固定化

在宿主中表达得到的粗酶, 需要被进一步纯化. 实

验室中常采用添加亲和和标签进行亲和层析的方法, 如添加组氨酸标签与亲和柱中的镍离子进行螯合连接. 在糖苷水解酶的实际应用中, 可用CBMs作为融合标签. 将CBM融合到糖苷水解酶中不仅能提高酶的催化活性和稳定性, 还能实现酶的一步纯化和固定化^[27,40]. 以固定化为目的的糖苷水解酶融合改造过程的主要思路是: 将能与纤维素或凝胶多糖紧密结合的CBM融合到酶的N或C端, 使微生物培养液中表达的酶能特异性地结合到不溶性的生物质多糖上, 通过离心得到固载在生物质多糖上的纯酶(图3). Chang等^[40]选择6个不同的CBMs与 β -葡萄糖苷酶(Bgl1A)融合, 发现当在Bgl1A的C端融合CBM₂₄时, Bgl1A不仅能高效地固定到纤维素上, 还能在高浓度乙醇溶液实现异黄酮苷元的转化. 固定化酶具有较高的操作稳定性和重复利用率. 重要原因是载体对酶具有保护作用. Qin等^[77]将 β -1,3-葡聚糖酶(PbBgl64A)N端的CBM56融合到几丁质酶的N端, CBM56能高效地结合到凝胶多糖上, 从而避免酶在固定和纯化过程中的损失和失活. 这也是一个无毒、低成本的过程.

3.4 提高酶的稳定性和重复使用率

在工业化生产中, 提高酶的稳定性和重复使用率能降低酶生产的成本. 近些年有许多通过融合提高酶热稳定性的研究, 都试图将具有热稳定性的蛋白或结构域融合到热稳定性较差的酶的N或C端^[23,38,78]. 例如, Chen等^[23]从嗜热微生物*C. thermocellum*中得到了同时具有纤维素酶和木聚糖酶的多功能酶CtCel5E. 在CtCel5E的C末端直接连接来源于*C. cellulovorans*的 β -葡萄糖苷酶(CcBglA), 该融合酶对底物对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)的热稳定性得到提高, 在45℃下处

图3 表达后的融合酶通过CBMs标签与多糖结合(网络版彩图)

Figure 3 The expressed fusion enzyme binds to polysaccharide via CBMs tag (color online).

理6 h仍有40%的活性, 而单个CcBglA在45℃下处理1 h后活性消失. 这可能是因为具有热稳定性的CtCel5E对CcBglA具有一定的保护作用. 为了提高黑曲霉*Aspergillus niger*来源的GH11木聚糖酶(Xyn)的热稳定性, 在其2端分别连接上一个来源于*Thermotoga maritima*的GH10木聚糖酶的碳水化合物结合模块(C₂), 形成了三明治式的紧密夹层结构(C₂-Xyn-C₂), C₂像手臂一样保护着Xyn, 导致C₂-Xyn-C₂在50℃下的半衰期是Xyn的24.8倍^[38]. 利用融合技术改善糖苷水解酶的其他稳定性(pH、有机试剂、金属离子和盐等)的研究相对较少, 但是在实际应用过程中要求酶能抵抗严酷的生产条件. 受热稳定性改造的启发, 在构建多功能酶的基础上, 可对酶的其他稳定性改善进行深入研究, 从而提高融合酶在生产中的稳定性和重复利用率.

4 融合酶在生物质转化中的应用

4.1 多聚糖的转化

生物质中主要含木质素、纤维素和半纤维素, 葡聚糖和木聚糖分别是纤维素和半纤维素的主要成分,

它们是生产生物乙醇和其他化合物的重要材料. 生物质被预处理后释放出葡聚糖和木聚糖, 经多功能的融合糖苷水解酶降解后形成葡萄糖和木糖. 葡萄糖和木糖等小分子进入微生物的代谢途径, 被进一步转化为乙醇、乙酸和氨基酸等, 也可用化学催化的方法将它们进一步转化为5-羟甲基糠醛、甲酸、乙酰丙酸、糖醇类等化工产品(图4).

具体以木聚糖的转化为例, 图5是其被降解和应用的示意图. 彻底降解木聚糖需要一系列木聚糖酶: 内切木聚糖酶切割木聚糖主链上的β-1,4(3)-木糖苷键生成低聚寡糖, 还需要β-木糖苷酶从非还原性末端切割β-1,4(3)-木糖苷键产生木糖; 木聚糖支链的降解则需要葡萄糖醛酸酶、乙酰酯酶和阿拉伯糖苷酶等; 木聚糖被降解后生成的单糖可被酵母和乳酸菌发酵分别生产乙醇和乳酸, 木糖还可被转化为木糖醇等^[79-81]. 在生物质降解的微生物细胞中存在木聚糖降解酶系, 但是在实际应用中需要人工构建多酶体系^[82], 于是可将酶系中的2个或多个糖苷水解酶进行融合.

融合糖苷水解酶具有非天然的多个蛋白结构域, 适当的融合策略能保证每个结构域的独立性, 使其行使各自的功能, 完成生物质的彻底降解. Chen等^[23]将

图4 多功能融合糖苷水解酶在生物质转化中的应用(网络版彩图)

Figure 4 The application of multifunctional fusion of glycoside hydrolase in biomass conversion (color online).

图5 木聚糖的降解及应用(网络版彩图)

Figure 5 Degradation and application of xylan (color online).

同时具有纤维素酶和木聚糖酶活性的多功能酶CtCel5E与来源于*C. cellulovorans*的 β -葡萄糖苷酶(CcBglA)进行了融合, 可将纤维二糖进一步降解为葡萄糖. 由于减少了中间产物的积累, 提高了对羧甲基纤维素和稻草的降解效率. 融合体CtCel5E-CcBglA能从酵母细胞中分泌出来, 并将稻草降解为葡萄糖供细胞生长. 在实际应用中, 可直接用稻草作为产酶(CtCel5E-CcBglA)酵母菌生长的碳源, 既能满足酵母菌的生长, 又能通过发酵生产乙醇, 直接将农业废弃物一步转化为生物能源. 该过程无毒无害, 充分遵循了大自然物质循环的可持续发展过程. Chen等^[31]对来源于*T. emma*的内切葡聚糖酶(EG)和来源于*T. lanuginosus*的木聚糖酶(Xyn)进行融合形成融合酶EG-M-Xyn, 当将其与商业酶Ctec2结合处理稻草时, 释放的还原糖比Ctec2单独催化时提高了10%~20%. 因此, 在利用农业废弃物生产生物石油和精细化学品的工业中, EG-M-Xyn具有很大的应用潜能.

4.2 寡糖的转化

Porrás-Domínguez等^[83]将分别来源于*B. subtilis*和*B. licheniformis*的果聚糖蔗糖酶SacB和内切果聚糖酶LevB1融合形成新酶(LevB₁SacB). LevB₁SacB同时具有果聚糖蔗糖酶活性和内切果聚糖酶活性, 它能催化

蔗糖合成L型低聚果糖(levan-type fructooligosaccharides, L-FOS). 图6是该催化过程的示意图. LevB₁SacB的果聚糖蔗糖酶活性首先将蔗糖水解为果糖和葡萄糖, 其转移酶活性将生成的果糖依次转移至蔗糖的果糖基上形成果聚糖. LevB₁SacB的内切果聚糖酶活性能作用于果聚糖的 β -2,6-糖苷键, 但不能降解蔗糖和蔗果三糖, 所以最终形成L-FOS. L-FOS是一种新型的益生元, 其能促进人类和动物肠道内有益菌的生长, 抑制有害菌和提高机体免疫力等作用.

糖苷水解酶还可与非糖苷水解酶融合实现低聚寡糖的进一步利用, 例如, Patterson等^[84]融合 β -葡萄糖苷酶(CelB)、半乳糖激酶(GALK)和葡萄糖激酶(GLUK), 在该融合酶的下流连接了支架蛋白(scaffolding protein, SP), 并同时共表达噬菌体P22的外壳蛋白(coat protein, CP) (图7(a)). 单个CelB和GLUK在自然状态下分别是四聚体和二聚体, 在融合状态下, CelB和GLUK模块也倾向于形成多聚体, 通过图7(a)中的第②步形成具有特定空间组织的融合酶; 在共表达的CP作用下, 融合酶经过第③步被进一步封装形成具有特定空间组织的多酶体系. 这个多酶体系中的CelB将乳糖降解为半乳糖和葡萄糖, GALK和GLUK分别将半乳糖和葡萄糖进一步转化为1-磷酸-半乳糖和6-磷酸-葡萄糖, 形成了一个级联反应系统(图7(b)).

图 6 融合酶LevB₁SacB催化蔗糖形成L-FOS (网络版彩图)

Figure 6 The fusion enzyme LevB₁SacB catalyzes the formation of L-FOS from sucrose (color online).

融合酶在生物质转化中的基础研究和应用都还面临着许多挑战。在融合酶的构建过程中,除了融合顺序、连接肽和酶单元结构会影响融合酶的性质外, Xu等^[39]的研究表明宿主也会对融合酶的折叠、分泌和功能造成严重的影响,即使是亲缘关系很近的不同酵母菌宿主。目前,大部分融合糖苷水解酶以*E. coli*为表达宿主,而在实际的生物质转化的整合生物过程(consolidated bioprocessing, CBP)中,需要利用其他宿主通过发酵将生物质分解产生的小分子糖类转化为生物乙醇或其他有机化合物^[85],如常用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)发酵产乙醇,用解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)和利氏酵母(*L. starkeyi*)发酵产脂肪酸或脂质^[86-88]。以后的研究方向应尽可能利用这类微生物作为宿主,它们可异源表达和分泌降解生物质多糖的融合酶,同时利用生成的小分子糖生产有机化合物,形成持续和可循环的绿色CPB。有的融合酶与简单混合酶的催化活性并无差别^[83],而有的融合酶与简单混合酶、天然融合酶相比,都具有较高的活性和催化效率^[31]。在不经CPB的生物质转化过程中,活性没有提高的多功能融合酶也能一步催化合成目标产物,从而降低生产成本。

5 总结与展望

融合技术是在蛋白质工程中逐渐兴起的一门技术,将其应用于融合糖苷水解酶的构建,为实现生物物质的高效降解和利用提供了一种有效的方法。在生物物质降解和利用领域,已有很多研究探索出理想的融合酶,并逐渐形成了一些构建思路和方法,但还存在以下问题: (1) 缺乏对酶结构、功能、作用机理及各个融合单元间相互作用的认知,目前还没能找到快速得到目的融合酶的方法; (2) 采用计算机模拟和高通量筛选的方法构建融合酶还处于初步探索阶段; (3) 融合糖苷水解酶的应用研究多集中在多糖的初步水解上,缺乏对寡糖或单糖的进一步转化。

随着分子生物学技术的发展,有很多研究试图通过突变来改善酶的催化性能。现在已有部分研究结合突变与融合技术来开发有效转化生物物质的酶,例如, Nath等^[89]采用定点突变技术获得葡聚糖酶CtGH5的突变体CtGH5-F194A(CtGH5中第194位的苯丙氨酸突变为丙氨酸),再融合该突变体与相同来源的葡萄糖苷酶CtGH1得到融合酶CtGH1-L1-CtGH5-F194A,该融合酶对高粱秆的降解效率更高。另外,伴随着交叉学科的发

图7 封装 β -葡萄糖苷酶、半乳糖激酶和葡萄糖激酶的融合体(a)及其级联催化反应(b)^[83] (网络版彩图)

Figure 7 Encapsulation (a) and cascade catalytic reaction (b) of fusion enzyme consisting of β -glucosidase, galactokinase and glucokinase^[83] (color online).

展,不断涌现出改善生物酶催化性能的方法,如金属有机框架(metal organic framework, MOF)对酶的固定化和协同催化^[90]. MOF是金属离子或离子簇与有机配体自组装形成的多孔框架结构,金属和配体不同会形成多种多样的MOF,还可根据需要调节孔径的大小和分级.将多个大小不同且具有协同催化的酶分别固定到MOF的不同孔穴中,底物或中间产物可通过更小的孔道扩散传递,从而实现级联催化.

综上所述,对融合糖苷水解酶的构建及应用研究展望如下: (1) 结合突变与融合技术改造酶,提高融合改造的有效性; (2) 结合MOF分级固定化酶和酶融合,当融合酶连接肽的长度和MOF大小孔间的距离相近时,直接将融合酶与MOF混合实现一步固定化.只要

融合酶中的一个模块固定在MOF上,另外一个也将会被稳定地固定到另外一个分级孔中,增加封装效率和重复使用率; (3) 水解生物质多糖产生的寡糖或单糖可被一些其他的酶催化生成新的物质,如部分木糖苷酶可催化木糖基转移到醇类、糖类和酚类等受体上,分别形成烷基木糖、新的寡糖和药效更好的糖基化酚类等.因此,可尝试采用融合技术,将后续转化需要的酶与生物质多糖降解酶融合,把生物质多糖的水解和水解产物的转化整合在一起,实现一锅法合成目标产物.随着生物技术和学科交叉思想的引导,在生物质降解和利用过程中,融合的多功能酶可达到过程集成的效果,还可简化生产步骤、提高生物质转化率,实现绿色可持续发展.

参考文献

- 1 Bornscheuer U, Buchholz K, Seibel J. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10876–10893
- 2 Meier S. *Catal Commun*, 2020, 135: 105894
- 3 Hein NM, Seo Y, Lee SJ, Gagné MR. *Green Chem*, 2019, 21: 2662–2669
- 4 Qian L, Jiang L, Yue Y, Zhao Z. *CIESC J*, 2020, 71: 5376–5387 (in Chinese) [钱乐, 蒋丽群, 岳元茂, 赵增立. 化工学报, 2020, 71: 5376–5387]
- 5 da Costa Sousa L, Chundawat SP, Balan V, Dale BE. *Curr Opin Biotech*, 2009, 20: 339–347
- 6 Henrissat B. *Biochem J*, 1911, 280: 309–316
- 7 Kim IJ, Lee HJ, Choi IG, Kim KH. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 8469–8480
- 8 Kostylev M, Wilson D. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 339–344
- 9 Li J, Zhou P, Liu H, Xiong C, Lin J, Xiao W, Gong Y, Liu Z. *Bioresour Tech*, 2014, 155: 258–265
- 10 Hu J, Arantes V, Pribowo A, Saddler JN. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 112
- 11 Ontañón OM, Ghio S, Marrero Díaz de Villegas R, Piccinni FE, Talia PM, Cerutti ML, Campos E. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 6959–6971
- 12 Moraïs S, Salama-Alber O, Barak Y, Hadar Y, Wilson DB, Lamed R, Shoham Y, Bayer EA. *J Biol Chem*, 2012, 287: 9213–9221
- 13 Chhabra SR, Shockley KR, Ward DE, Kelly RM. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 545–554
- 14 Sermathanaswadi J, Baramée S, Tachaapaikoon C, Pason P, Ratanakhanokchai K, Kosugi A. *Enzyme Microbial Tech*, 2017, 96: 75–84
- 15 Heine T, Tucker K, Okonkwo N, Assefa B, Conrad C, Scholtissek A, Schlömann M, Gassner G, Tischler D. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 181: 1590–1610
- 16 Matthews S, Tee KL, Rattray NJ, McLean KJ, Leys D, Parker DA, Blankley RT, Munro AW. *FEBS Lett*, 2017, 591: 737–750
- 17 Hu MY, He Q, Fan SJ, Wang ZC, Liu LY, Mu YJ, Peng Q, Zhu SF. *Nat Commun*, 2018, 9: 221
- 18 Luan PQ, Zhou DD, Wang XT, Chen R, Gao SQ, Zhao H, Huang C, Liu YT, Gao J, Jiang YJ. *CIESC J*, 2020, 71: 5361–5375 (in Chinese) [栾鹏仟, 周丹丹, 王晓天, 陈冉, 高士耆, 赵浩, 黄琛, 刘云亭, 高静, 姜艳军. 化工学报, 2020, 71: 5361–5375]
- 19 Li YP, Li ZQ, Zhou B, Li ML, Xue XS, Zhu SF, Zhou QL. *ACS Catal*, 2019, 9: 6522–6529
- 20 Aalbers FS, Fraaije MW. *ChemBioChem*, 2019, 20: 20–28
- 21 Rizk M, Antranikian G, Elleuche S. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428: 1–5
- 22 Lu P, Feng MG, Li WF, Hu CX. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 261: 224–230
- 23 Chen CH, Yao JY, Yang B, Lee HL, Yuan SF, Hsieh HY, Liang PH. *Bioresour Tech Rep*, 2019, 5: 170–177
- 24 Hong SY, Lee JS, Cho KM, Math RK, Kim YH, Hong SJ, Cho YU, Kim H, Yun HD. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 1857–1862
- 25 Khalili Ghadikolaei K, Akbari Noghabi K, Shahbani Zahiri H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 6929–6939
- 26 Wang CJ, Li JF, Tang SH, Dong YH, Wu MC. *J Food Sci Biotech*, 2016, 35: 1135–1140 (in Chinese) [王春娟, 李剑芳, 唐诗涵, 董运海, 郭敏辰. 食品与生物技术学报, 2016, 35: 1135–1140]
- 27 Lu L, Xu S, Zhao R, Zhang D, Li Z, Li Y, Xiao M. *Bioresour Tech*, 2012, 116: 327–333
- 28 Tajwar R, Shahid S, Zafar R, Akhtar MW. *Enzyme Microbial Tech*, 2017, 106: 75–82
- 29 Khan MIM, Sajjad M, Sadaf S, Zafar R, Niazi UHK, Akhtar MW. *J Biotech*, 2013, 168: 403–408
- 30 Lu P, Feng MG. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 579–587
- 31 Chen CC, Gao GJ, Kao AL, Tsai ZC. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 722–729
- 32 Kim HM, Jung S, Lee KH, Song Y, Bae HJ. *Int J Biol Macromol*, 2015, 73: 215–221
- 33 Ding K, Qiu JJ, Luo WG, Li W, Li YX, Cao PH, He WL, Zhao LM, Wang YQ, Zhang CJ. *Chin J Animal Nutr*, 2017, 29: 2725–2733 (in Chinese) [丁珂, 邱静静, 罗伟光, 李旺, 李元晓, 曹平华, 何万领, 赵龙妹, 王玉琴, 张春杰. 动物营养学报, 2017, 29: 2725–2733]
- 34 Fan Z, Wagschal K, Lee CC, Kong Q, Shen KA, Maiti IB, Yuan L. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102: 684–692
- 35 Xue Y, Peng J, Wang R, Song X. *Enzyme Microbial Tech*, 2009, 45: 22–27
- 36 Wang R, Xue Y, Wu X, Song X, Peng J. *Enzyme Microbial Tech*, 2010, 47: 194–199
- 37 Wang CJ, Tang SH, Wu MC, Dong YH, HangYL, Li JF. *J Food Sci Biotech*, 2017, 36: 938–943 (in Chinese) [王春娟, 唐诗涵, 郭敏辰, 董运海,

- 杭宜岭, 李剑芳. 食品与生物技术学报, 2017, 36: 938–943]
- 38 Yang A, Cheng J, Liu M, Shangquan Y, Liu L. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 586–591
- 39 Xu Q, Alahuhta M, Wei H, Knoshaug EP, Wang W, Baker JO, Vander Wall T, Himmel ME, Zhang M. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 322
- 40 Chang F, Xue S, Xie X, Fang W, Fang Z, Xiao Y. *J Biosci Bioeng*, 2018, 125: 185–191
- 41 Bülow L, Ljungcrantz P, Mosbach K. *Nat Biotechnol*, 1985, 3: 821–823
- 42 Greenwood JM, Gilkes NR, Kilburn DG, Miller RC, Warren RAJ. *FEBS Lett*, 1989, 244: 127–131
- 43 Buj R, Iglesias N, Planas AM, Santalucía T. *BMC Mol Biol*, 2013, 14: 18
- 44 Lu L, Wang X, Zhang A, Huang F, Yan Y, Li W, Fu W. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71: 224–232
- 45 Joska TM, Mashruwala A, Boyd JM, Belden WJ. *J Microbiol Methods*, 2014, 100: 46–51
- 46 Marquardt T, von der Heyde A, Elleuche S. *J Microbiol Methods*, 2014, 105: 47–50
- 47 Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, Minshull J. *J R Soc Interface*, 2009, 6
- 48 George RA, Heringa J. *Protein Eng Des Sel*, 2002, 15: 871–879
- 49 Ullah J, Chen H, Vastermark A, Jia J, Wu B, Ni Z, Le Y, Wang H. *World J Microbiol Biotech*, 2017, 33: 166
- 50 Caparco AA, Bommarius AS, Champion JA. *AIChE J*, 2018, 64: 2934–2946
- 51 Adlakha N, Sawant S, Anil A, Lali A, Yazdani SS. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 7447–7454
- 52 Algov I, Grushka J, Zarivach R, Alfonta L. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 17217–17220
- 53 Liu HH, Wang C, Lu XY, Huang H, Tian Y, Ji XJ. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 9851–9857
- 54 Peschke T, Skoupi M, Burgahn T, Gallus S, Ahmed I, Rabe KS, Niemeyer CM. *ACS Catal*, 2017, 7: 7866–7872
- 55 Rabeharindranto H, Castaño-Cerezo S, Lautier T, Garcia-Alles LF, Treitz C, Tholey A, Truan G. *Metabolic Eng Commun*, 2019, 8: e00086
- 56 Al-mansoori L, Bashraheel SS, Qahtani ADA, O'Connor CD, Elsinga P, Goda SK. *Oncotarget*, 2020, 11: 619–633
- 57 Chen X, Zaro JL, Shen WC. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65: 1357–1369
- 58 Li G, Huang Z, Zhang C, Dong BJ, Guo RH, Yue HW, Yan LT, Xing XH. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 215–225
- 59 van Rosmalen M, Krom M, Merckx M. *Biochemistry*, 2017, 56: 6565–6574
- 60 Papaleo E, Saladino G, Lambrugh M, Lindorff-Larsen K, Gervasio FL, Nussinov R. *Chem Rev*, 2016, 116: 6391–6423
- 61 Lai YT, Jiang L, Chen W, Yeates TO. *Protein Eng Des Sel*, 2015, 28: 491–500
- 62 Yu K, Liu C, Kim BG, Lee DY. *Biotech Adv*, 2015, 33: 155–164
- 63 Li N, Han X, Xu S, Li C, Wei X, Liu Y, Zhang R, Tang X, Zhou J, Huang Z. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 9465–9472
- 64 Zhang R, Li N, Liu Y, Han X, Tu T, Shen J, Xu S, Wu Q, Zhou J, Huang Z. *Food Chem*, 2019, 301: 125266
- 65 Devlamynck T, te Poele EM, Quataert K, Gerwig GJ, Van de Walle D, Dewettinck K, Kamerling JP, Soetaert W, Dijkhuizen L. *Food Chem*, 2019, 272: 653–662
- 66 Han N, Miao H, Ding J, Li J, Mu Y, Zhou J, Huang Z. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 133
- 67 Kyratsous CA, Panagiotidis CA. *Methods Mol Biol*, 2012, 824: 109–129
- 68 Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. *Front Microbiol*, 2014, 5
- 69 Kang YS, Song JA, Han KY, Lee J. *J Biotech*, 2015, 194: 39–47
- 70 Wheeldon I, Minter SD, Banta S, Barton SC, Atanassov P, Sigman M. *Nat Chem*, 2016, 8: 299–309
- 71 You C, Zhang YHP. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 380–386
- 72 Bretagne D, Pâris A, de Vaumas R, Lafite P, Daniellou R. *Biochimie*, 2020, 181: 34–41
- 73 Chen L, Xiang X, Yang R, Hu X, Cao C, Malik FA, Wu X. *J Virol Methods*, 2013, 194: 185–189
- 74 Mai-Gisondi G, Turunen O, Pastinen O, Pahimanolis N, Master ER. *Enzyme Microbial Tech*, 2015, 79–80: 27–33
- 75 Han RZ, Li JH, Shin H-D, Chen RR, Liu L, Du GC, Chen J. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 4717–4724
- 76 Oliveira C, Carvalho V, Domingues L, Gama FM. *Biotech Adv*, 2015, 33: 358–369
- 77 Qin Z, Lin S, Qiu Y, Chen Q, Zhang Y, Zhou J, Zhao L. *Food Chem*, 2019, 299: 125037
- 78 Liu ZL, Weber SA, Cotta MA, Li SZ. *Bioresour Tech*, 2012, 104: 410–416
- 79 Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros M, Tomás-Pejó E. *Biotechnol Prog*, 2019, 35: e2739
- 80 Tsuyama T, Yamaguchi M, Kamei I. *Bioresour Tech*, 2017, 238: 241–247
- 81 Shah V, Charlton T, Kim JR. *Appl Biochem Biotech*, 2017, 184: 1232–1246

- 82 Xu K, Lv B, Li C. *Sci Sin-Chim*, 2015, 45: 429–437 (in Chinese) [许可, 吕波, 李春. 中国科学: 化学, 2015, 45: 429–437]
- 83 Porras-Domínguez JR, Rodríguez-Alegria ME, Ávila-Fernández Á, Montiel-Salgado S, López-Munguía A. *Carbohydr Polym*, 2017, 177: 40–48
- 84 Patterson DP, Schwarz B, Waters RS, Gedeon T, Douglas T. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 359–365
- 85 Olson DG, McBride JE, Joe Shaw A, Lynd LR. *Curr Opin Biotech*, 2012, 23: 396–405
- 86 Knoshaug EP, Van Wycken S, Singh A, Zhang M. *Biofuel Res J*, 2018, 5: 800–805
- 87 Tsigie YA, Wang CY, Kasim NS, Diem QD, Huynh LH, Ho QP, Truong CT, Ju YH. *J Biomed Biotech*, 2012, 2012: 1–10
- 88 Lin J, Shen H, Tan H, Zhao X, Wu S, Hu C, Zhao ZK. *J Biotech*, 2011, 152: 184–188
- 89 Nath P, Dhillon A, Kumar K, Sharma K, Jamaldheen SB, Moholkar VS, Goyal A. *Bioresour Tech*, 2019, 282: 494–501
- 90 Xia H, Li N, Zhong X, Jiang Y. *Front Bioeng Biotech*, 2020, 8: 695

Research progress of fusion glycoside hydrolase in biomass conversion

Na Li, Huan Xia, Yanbin Jiang*

School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

*Corresponding author (email: cebjiang@scut.edu.cn)

Abstract: The abundant biomass polysaccharides in nature can be degraded into oligo-oligosaccharides or monosaccharides. These sugars with small molecule can be used to produce ethanol, pharmaceutical products and other chemical materials. The structure of plant polysaccharides is very complex, and its degradation involves the synergistic catalysis of various glycoside hydrolases, such as xylanase, glucanase, cellulose. Compared with a single enzyme or simple mixed enzymes, the degradation efficiency of the polysaccharides by the fusion enzyme is higher. The expression level, activity and stability of the enzyme could also be improved by choosing the appropriate strategy to construct fusion enzyme. This fusion enzyme could achieve the process integration when using the biomass to produce energy substances and other chemical materials, which would simplify the production steps and save costs. Therefore, the fusion glycoside hydrolase could effectively solve the bottleneck problem in the utilization of biomass. This article reviews the research progress of glycoside hydrolases modification by fusion technology, including the construction strategies, the capability and application of fusion glycoside hydrolase, the practical applications and prospects for fundamental research in this field. It provides a reference for the further development and utilization of the fusion glycoside hydrolase in the biomass degradation.

Keywords: biomass, bioenergy, hydrolysis, glycoside hydrolase, fusion enzyme, application

doi: [10.1360/SSC-2021-0020](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0020)