

Cellulosome

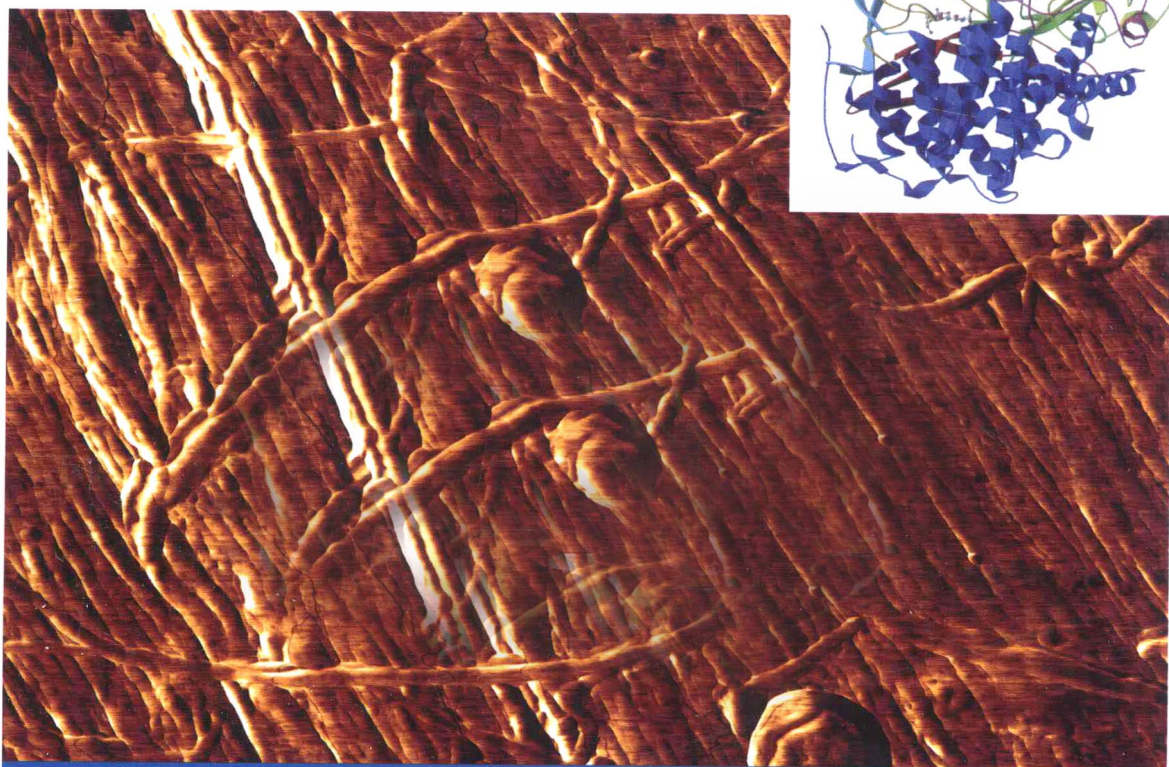
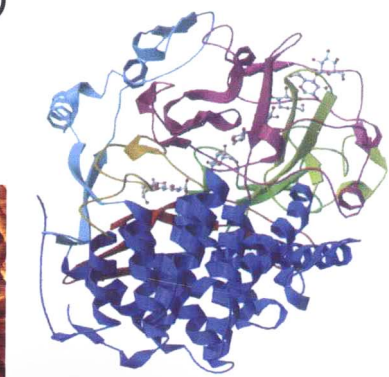
纤维素降解的超分子机器

—— 纤维小体

[美] V. 乌弗斯凯 (Vladimir Uversky)
I. A. 卡塔耶瓦 (Irina A. Kataeva)

编

王禄山 张正 等译
曲音波 校



化学工业出版社

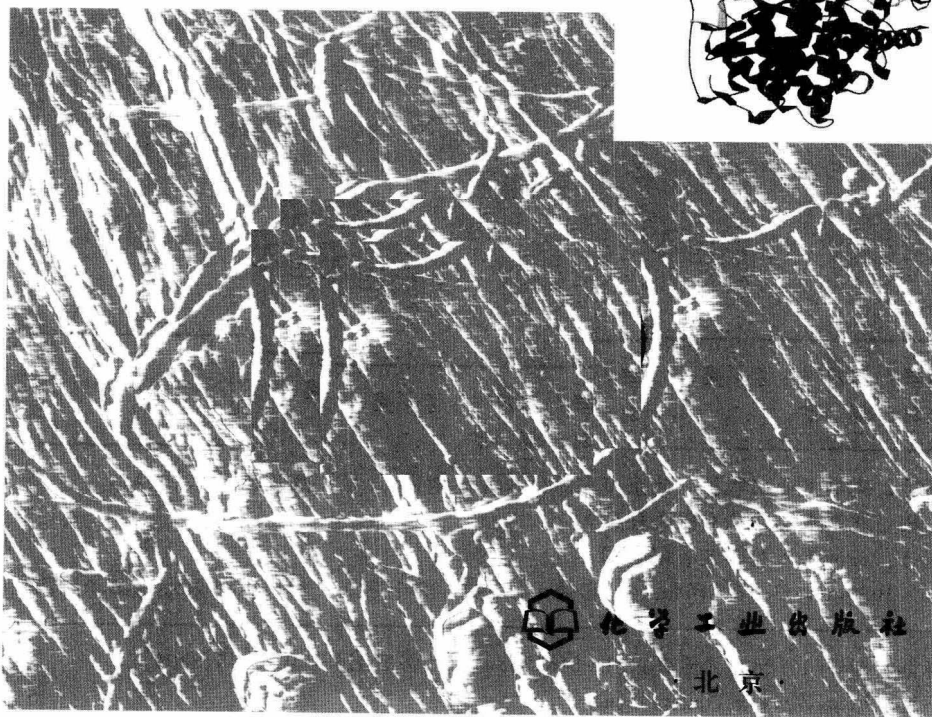
Cellulosome

纤维素降解的超分子机器

—— 纤维小体

[美] V. 乌弗斯凯 (Vladimir Uversky) 编
I. A. 卡塔耶瓦 (Irina A. Kataeva)

王禄山 张正 等译
曲音波 校



化学工业出版社
北京

图书在版编目 (CIP) 数据

纤维素降解的超分子机器——纤维小体/[美] 乌弗斯凯 (Uversky, V.), [美] 卡塔耶瓦 (Kataeva, I. A.) 编; 王禄山, 张正等译. —北京: 化学工业出版社, 2011. 1
ISBN 978-7-122-09802-3

I. 纤… II. ①乌…②卡…③王…④张… III. 超分子结构-纤维素酶-研究 IV. Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 210858 号

Cellulosome, by Vladimir Uversky, Irina A. Kataeva
ISBN 1-59454-950-8

This simplified Chinese edition is translated and published by arrangement with
Nova Science Publishers, Inc.

Copyright©2006 by Nova Science Publishers, Inc.

All rights Reserved.

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2010-3614

责任编辑: 傅四周 孟 嘉
责任校对: 蒋 宇

文字编辑: 向 东
装帧设计: 韩 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 14 彩插 1 字数 402 千字 2011 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 79.00 元

版权所有 违者必究

译者序

进入 21 世纪以来,越来越多的人认识到,石油等关键矿产资源将在本世纪中后期逐步接近枯竭。同时,化石燃料的燃烧导致二氧化碳排放量不断增加,造成全球气候变暖。能源、资源、环境问题已经成为制约新世纪社会经济可持续发展的主要瓶颈,引起了人们的广泛关注。现有的工业发展模式已经难以为继,开发新的可持续的绿色替代资源已成为世界各国的首要任务。

生物质是地球上唯一可大规模再生、足以支撑人类生存发展的能源和实物性资源。其中非粮的木质纤维素部分价格低廉、供应充足,且未得到充分开发利用。利用现代生物技术,大规模开发和利用可再生性的非粮木质纤维素类生物质资源,将其降解转化为液体燃料和大宗化学品,既可以减缓石油等不可再生资源的消耗,降低我国对原油的过度依赖,有效地缓解能源资源紧缺,保证国家能源安全,维持国家经济的有效运转,又能够在保护生态环境和减缓温室效应的同时,开拓新的经济增长点,加快经济发展方式转变,促进全球经济的可持续发展。同时,对农业生产延伸、农村经济发展、农民就业增收,以及维护社会的和谐与稳定也将产生积极的促进作用。对于我们这样一个人口众多、能源和资源紧张的国家来说,具有特别重要的战略意义和现实意义。

然而,作为支撑和保护组织,植物细胞壁在长期的自然进化中形成了木质纤维素复杂的化学成分和结构,成为其抗微生物和酶攻击的天然屏障,使生物质难以被降解。当前,已有的木质纤维素的生物转化过程多半都还是不经济的。只有加强相关的基础研究,实现技术进步,开发出新一代生物炼制技术,才能实现生物燃料和化学品的可持续性供给,并在价格上具有优势。生物降解转化的核心技术是如何将复杂的生物质高聚物高效降解为单糖及其中的特殊单糖如何高效转化为生物基产品。人们在相关的结构基础及材料预处理、酶法水解等方面已经开展了大量的研究工作,获得了一些进展。但当前生物质转化相关技术的建立主要还是依靠经验的方法,基于对生物质生物学或化学属性很有限的理解与知识,还很不深入,还有待于深入研究。

近年来飞跃发展的分子生物学和系统生物学,特别是最近对植物发育、碳水化合物化学、细胞壁超微结构、微生物降解机理等方面的研究,为我们提供了生物质转化研究的新视角,为认识和改造植物和微生物提供了近乎无限的机遇和可能。纵观国内外近几年的科研工作,围绕生物质转化的三个核心性的关键科学问题:纤维素类生物质是如何抗生物降解的,微生物是如何攻击植物的抗降解屏障的,破解抗性屏障和提高转化效率的可能途径。国外相关专家相继出版了《Biomass recalcitrance》(生物质抗降解屏障)、《Cellulosome》(纤维素降解的超分子机器——纤维小体)、《Biofuels》(生物燃料)等专著,针对生物质转化过程,从不同视角、不同层次上分析了相关科学问题、技术难点及可能高效的解决方案,山东大学微生物技术国家重点实验室组织相关研究人员将这三本图书译成了中文,推荐给中国的读者。另外,微生物技术国家重点实验室的一线科研工作者根据国内生物质转化技术的发展现状,以及我们长期从事相关研究的一些经验与体会,还在编写一本《木质纤维素降解酶与生物炼制》的专著,希望能够推动国内相关研究的深入开展,也真诚地希望通过我们的共同努力,最终可以实现生物质原料的全部高效利用。

纤维小体是某些厌氧菌产生的由多个亚基共同组装而成的大分子机器,是致力于组织、协调多种酶组分协同高效催化降解木质纤维素的胞外蛋白复合体。Cellulosome 直译为“纤维小体”,但是该词专业较强,并有歧义,非本专业人员很难将纤维小体与纤维素降解的超分子复合酶系联系在一起,所以为了更加准确与易懂,书名译为“纤维素降解的超分子机器——纤维小体”,这一点也得到国内部分专家的认同(参见:降解纤维素的“超分子机器”研究进展,生物化学与生物物理学研

究进展, 2010)。

本书汇集了几十年以来细菌纤维素酶方面的主要研究进展, 特别是近年来的研究进展, 深入分析厌氧微生物破解生物质抗性屏障、提高其转化效率的重要途径, 这是近十年来纤维素酶相关领域的主要进展之一。本书着重介绍了纤维小体这一超分子复合物从发现、认识到阐明其多酶复合物的基因结构、蛋白质超分子结构及其组装、复杂功能的实现过程等方面的研究进展与技术方法, 这为生物炼制领域中统合生物工艺的提出和发展奠定了基础, 该工艺将会以低成本、高效率的方法解决纤维素生物质降解过程中遇到的抗降解性难题, 从而推动生物技术应用的更快发展。

现在模块 (module) 的定义已经明确, 当多个不同的蛋白质中都存在一个相同或相近的结构域时, 该结构域就称之为模块 (Bourne P E, Weissig H. Structural Bioinformatics. Hoboken: Wiley-Lissinc, 2003: 365)。现有研究表明纤维小体包括一组多模块的蛋白, 其中一部分是其构建超分子结构所必需的模块, 另一部分是其含有的各种酶组分模块。为了形式上的统一我们将纤维小体中关键的非催化亚基 scaffoldin 译成脚手架蛋白, 而将 cohesins 译为粘连蛋白, dockerin 译为对接蛋白。现在看来, 将 cohesins 译为“粘连模块”、dockerin 译为“对接模块”可能更合适更为确切, 最近几年的英文文献中也开始明确, cohesins 与 dockerin 是蛋白模块。专业术语的翻译一直都存在争论, 但统一词汇表述有利于学术的交流, 在此后记, 请各位同行提出宝贵意见。

本书的翻译得到山东大学微生物技术国家重点实验室的高培基教授、陈冠军教授的帮助, 山东大学晶体材料研究所赵显教授对本书的翻译也非常关心, 在此表示衷心感谢。本书的出版得到国家重点基础研究发展计划 (2011CB707400)、中国博士后科学基金 (20090451326) 及山东省博士后科学基金 (200903050) 的资助, 在此一并表示感谢。由于受限于知识水平, 翻译中难免会出现一些纰漏、不足或者不准确的地方, 非常期望专家与读者的批评指正。

王禄山 曲音波
2010年11月

人们通过生物化学、生物物理学、免疫化学、超微技术以及分子生物学技术发现了纤维小体，明确了相关概念，组合型多酶组分复合物从此诞生。如今，人们已在多种纤维素分解细菌中确证存在纤维小体，但并不是所有细菌中都存在。纤维小体的组成及结构在不同细菌中展示出丰富的多样性。

梭状芽胞杆菌的共培养体系具有充分利用生物质资源生产乙醇等液体燃料的潜能。通过嗜热厌氧微生物〔水解纤维素的菌株，如热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*)，及糖化菌株，如热解糖梭菌 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)〕的共培养体系来产生乙醇，将会具有以下优势：①嗜热菌是稳定的，含热稳定性的酶类；②厌氧菌细胞生长量较低，因此可将底物转化成更多的乙醇；③高温发酵不至于受到污染等不利因素的影响；④在较高温度下生长，有利于分离和回收乙醇等挥发性的产品。更重要的优势还有原位产生纤维素酶，纤维素和半纤维素的代谢水平较高。高温乙醇发酵工艺是非常简单的，仅涉及一个高温发酵罐，不再需要冷却装置及搅拌/曝气通风反应器等，在一个反应器中完成乙醇产生的4个生物学相关过程（纤维素酶和半纤维素酶的合成、纤维素和半纤维素的水解、己糖发酵以及戊糖发酵）。实现共培养体系的关键是利用纤维小体多酶复合物，用其来组织、协调、协作从而发挥高效催化能力。本书将对纤维小体的研究历程、其粘连蛋白和对接蛋白的相互作用、相关催化结构以及其基因组等一一介绍。

纤维小体的发现是一种巧合，是想象、坚持、突破传统的传奇。第2章的作者最初要寻找的是厌氧嗜热细菌——热纤梭菌细胞表面的“纤维素结合因子”，推测该因子在细菌降解不溶纤维素底物时起到高效结合底物的作用。之后使用一种非常规方法，作者意外分离到一种超大分子量的多亚基复合物。当时他们就意识到，要用实验进一步跟踪这个新发现，而不是丢弃这种不请自来的物质。所以，结合生物化学、生物物理、免疫化学和超微结构技术以及后来的分子生物学发现了纤维小体，赋予其定义，并验证相应概念。虽然与最初目标相距甚远，多酶纤维小体复合物的提法还是确定下来了。现在，人们认识到纤维小体广泛存在，但不是所有降解纤维素的细菌都产生。而不同细菌产生的纤维小体，其组成与结构具有丰富的多样性。

纤维小体的构造由粘连蛋白模块与对接蛋白模块的相互作用确定。通常这两类蛋白间具有极高的亲和性。其中二类蛋白的序列变化还能反映产纤维小体微生物的种内及种间的系统发生关系。

I型粘连蛋白模块的晶体结构为一长圆锥形分子，该分子中存在九片层 β 三明治构成的广泛的芳香族核心。II型粘连蛋白的结构最近也已测定，其拓扑结构为似果冻卷形，并附有三个二级结构，包括一个 α 螺旋和两个与正常 β 链结构不同的“ β 瓣”结构。而对接蛋白模块则由两条各具有约22个氨基酸的重复序列组成。这两条序列由一个连接片段连接，为两种蛋白结合所必需。通过对热纤梭菌 Cel48S 中 I 型对接蛋白（由70个氨基酸残基组成）的溶液结构分析显示，该结构具有一对钙结合的环-螺旋模体，二者相对于一个折叠的轴心膺对称分布。钙离子促使蛋白质折叠，稳定其三级结构，并且是粘连蛋白-对接蛋白的相互作用所必需的。

最近测定的 I 型粘连蛋白-对接蛋白复合物的三维结构表明，在对接过程中粘连蛋白模块的总体结构基本不变，而对接蛋白则会变成一种由3条 α 螺旋形成的结构。这种结构由环-螺旋模体紧接螺旋-环-螺旋模体组成。相比自由状态下的对接蛋白的结构，形成复合物后对接蛋白的螺旋1与3相距更近。粘连蛋白与对接蛋白中第三个 α 螺旋的相互作用比与第一个 α 螺旋的相互作用更为显著。粘连蛋白与对接蛋白间的主要作用是疏水作用，辅以少量的分子间氢键。

通过对热纤梭菌和解纤梭菌 (*C. cellulolyticum*) 间粘连蛋白与对接蛋白结合的分析比较,发现种间(两种蛋白的)结合是非选择性的,而种内(两种蛋白的)相互作用却是专一性的。对接蛋白两条重复序列中的第 10、11、18、22 位氨基酸残基均可能决定上述专一性作用,而粘连蛋白中仅 Ala36、Asn37、Glu131 三个残基表现出与种内(蛋白结合的)专一性作用过程具有相关性。这说明在粘连蛋白与对接蛋白紧密接触的 16 个氨基酸残基中仅有 3 个参与了二者间的相互作用。

迄今为止,人们对不同物种的粘连蛋白和对接蛋白的序列、结构及相互作用仍知之甚少。当前基因测序的进展以及结构测定的快速进步可为认识粘连蛋白-对接蛋白相互作用的多样性提供重要信息。

基于热纤梭菌接近完整的基因组序列 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/cloth.home.html),人们发现该菌的大约 70 个基因编码含有一种对接蛋白结构域的多肽,因而,它们可能包括在纤维小体的四级结构中。多数情况下,这些多肽包含了易于识别的模块,如催化结构域和碳水化合物结合模块。大多数结构域分属于不同的蛋白家族,结构与功能各异,可以系统地研究。在第 4 章中,作者综述了纤维小体组分中研究最深入的催化结构域与碳水化合物结合模块的结构与功能机制。有趣的是,降解不同底物的糖苷水解酶往往具有相同的结构与催化机制。

为了全面认识天然生境中纤维素的降解能力,充分发挥基于微生物转化的生物技术工艺潜力,不能仅将纤维素降解视为酶学现象,还应该从微生物角度对其全面分析。现在,越来越多的迹象表明,微生物在纤维素降解过程中的作用远不止于仅提供纤维素酶。第 5 章研究了嗜热厌氧菌热纤梭菌对纤维素的降解利用问题,包括该微生物的生理生态学、纤维素水解机理、生物能学、纤维素酶合成的调控与黏附机制。此外,作者认为将生物膜领域的研究方法与技术应用于微生物对纤维素降解利用过程中可能会大有前景。纤维素的降解可被视为是一种生物膜反应。纤维素为异养生长提供了固体基质与碳源。最后,第 5 章作者综述了老问题的最新研究进展,以及当前遇到的新问题。

热纤梭菌是一种极为高效的纤维素降解细菌,可以降解木质纤维素物质中的多种聚糖。因此,其在生物质降解过程的工业应用中得到越来越多的关注。这种细菌仅发酵来源于纤维素的糖类,其胞外与细胞结合的多酶复合体(纤维小体)中包含有 13 种主要的酶组分及其他未知数量的催化组分,这些组分通过蛋白质相互作用结合到结构蛋白上。纤维小体的主要酶组分不仅包含纤维素酶 Cel48S、Cel8A、Cel9R、Cel9K、Cbh9A、Cel9N 以及 Cel5G,还包括木聚糖酶 Xyn10C、Xyn10D 以及 Xyn10Z,同时还有木葡聚糖酶 Xgh74A、几丁质酶 Chi18A。热纤梭菌还具有一定数目的非纤维多糖降解酶组分,如果胶酯酶和多聚半乳糖醛酸酶等。这些潜在的几丁质酯酶和木聚糖酯酶与水解模块相连,像 β -木糖苷酶、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶、葡萄糖醛酸苷酶等去分支酶一样,将木聚糖降解。因此,热纤梭菌在腐生生境中,通过降解半纤维素和其他非纤维素聚糖为其他微生物的生长提供能量。人们最近新发现了一些酶组分,并在基因组水平上结合实验新发现的结果进行了讨论。除了与细胞结合的纤维小体酶组分外,热纤梭菌系统还拥有非纤维小体(游离,可溶性)纤维素酶组分。在第 6 章中还讨论了纤维小体的潜在应用。

噬纤梭菌 (*Clostridium cellulovorans*) 纤维小体是一种可以有效降解植物细胞壁成分的复杂胞外酶系,由一种没有酶活性的脚手架蛋白 CbpA 和多种可以降解纤维素、半纤维素和果胶质的纤维素小体糖苷水解酶组成。CbpA 的分子量为 189000,在 N-末端存在一个纤维素结合结构域(CBD),4 个保守的亲水性区域(HLDs)中两个靠近 N-末端,两个靠近 C-末端,以及 9 个同源的粘连蛋白(Coh)结构域。CBD 能够与结晶纤维素结合,纤维小体的酶组分通过它们的对接蛋白结构域与粘连蛋白结合。目前的研究表明,HLD 既结合底物也同时结合细胞表面。纤维小体的酶与 CbpA 之间有协同作用,自身之间也有协同作用,与非纤维小体的糖苷水解酶也有协同作用,从而可以高效降解含不同组成成分的细胞壁。纤维小体酶 EngE 不仅与 CbpA 连接,还通过其细胞表层同源(SLH)结构域与细胞表面连接,EngE 将纤维小体紧密地连接到细胞表面上,使得细胞能够有效地吸收水解产物。现在已发现了由多种纤维小体基因组成的基因簇,也有多种以非簇方式存在的纤维小体相关基因。该复合物的相关研究将促进植物细胞壁降解的基础研究,使得人们可以构建和表达人为设计的纤维小体,将非降解纤维素的微生物转变成纤维素降解菌,从而为将生物质转化

成目标产物的生物技术奠定基础。第7章对噬纤维梭菌进行了讨论。

约氏梭菌 (*Clostridium josui*) 的催化组分与已经深入研究过的解纤维梭菌的纤维小体的组分非常相似, 只是前者较后者的脚手架蛋白要小得多, 故其形成的纤维小体也相对较小。16S rDNA 序列分析发现二者亲缘关系较近, 约氏梭菌的最适生长温度 (45°C) 比解纤维素梭菌的最适生长温度 (33~35°C) 要高, 显示二者纤维小体的特性可能是不一样的。通过研究约氏梭菌与热纤维梭菌粘连-对接蛋白的相互作用, 发现其存在种属专一性。第8章作者构建了一套对接-粘连蛋白的亲纯化体系, 用于杆状病毒表达系统中重组蛋白的分离纯化。

第8章还介绍了从白色瘤胃球菌 (*Ruminococcus albus*) F-40 培养物的上清液中分离到的胞外复合物, 对其组分进行 SDS-PAGE 和酶谱分析, 发现其内包含 15 种蛋白, 其中 8 种具内切纤维素酶活性, 9 种具木聚糖酶活性。利用 Cel5D 对接蛋白的抗血清进行免疫分析表明, 白色瘤胃球菌纤维小体的组装是通过对接-粘连蛋白的相互作用完成的。

第9章介绍纤维小体嵌合体。纤维小体嵌合体是指由微型脚手架蛋白构成的微型纤维小体杂合体, 微型脚手架蛋白中包括两个 (或多个) 具有不同特性的粘连蛋白, 它们与相应对接蛋白结合, 从而将与对接蛋白相连的两个 (或多个) 经人工改造的纤维素酶组分嵌合在一起。构建这种微型复合物是基于两个重要的观察结果: 第一, 当细菌的粘连蛋白和对接蛋白单独存在或是移植到异源蛋白质上, 都能继续保持其自身生物学特性; 第二, 在部分产纤维小体细菌中, 粘连蛋白与对接蛋白间的高亲和力相互作用具有物种专一性。与天然纤维小体相比, 纤维小体嵌合体有三个主要的不同之处: 含有的酶组分数量有限, 组分同源, 每一酶组分在微型脚手架蛋白上的位置受到控制。这些特征使得纤维小体嵌合体成为剖析天然小体功能的重要工具, 并已被用于研究解纤维梭菌产生的纤维小体。对已有深入研究的解纤维梭菌酶组分, 通过有机组合, 形成纤维小体嵌合体, 增强了其对难降解纤维素的降解作用。这既归功于酶组分形成复合物的邻近效应, 促进了组分的协同作用; 又归功于脚手架蛋白上的纤维素结合模块, 将整个复合物锚定在底物表面。然而, 即使效率最高的微型纤维小体, 对结晶纤维素的作用也比天然纤维小体的活性低很多。为此, 未来应构建新的杂合脚手架蛋白, 使之能够将三个或多个不同的酶结合到特定位点上。除了基础性研究外, 纤维小体的嵌合体也可以进一步开发为可应用于不同领域的生物技术。

黄色瘤胃球菌 (*Ruminococcus flavefaciens*) 是一种分解纤维素的厌氧菌, 存在于食草类哺乳动物的消化道内, 尤其在瘤胃中最多, 是降解植物细胞壁的主要菌群之一。该菌中降解植物细胞壁的酶组分形成一种精细的组织形式: 纤维小体组织, 其中包括至少 4 种不同的对接蛋白-粘连蛋白专一性复合体。三种含有粘连蛋白的结构蛋白 (ScaA、B、C) 在 *sca* 基因簇内连锁编码。主要脚手架蛋白 ScaA 与一类在结构蛋白 ScaC 和多种酶组分中都有发现的对接蛋白相结合。ScaC 最显著的作用是作为接头蛋白, 因为它的不同寻常的粘连蛋白可结合一组完全不同的多肽。ScaA 复合物通过结合更大的 ScaB 蛋白实现其与细胞表面的连接, ScaB 与细菌细胞壁特定成分相连。然而并非所有对接蛋白都与 ScaA 或 ScaC 相结合, 这表明可能存在其他相互作用及其他脚手架蛋白。ScaA 缺少特定的纤维素结合模块, 而纤维素结合模块存在于大量的纤维小体酶组分中, 并至少存在于一种特定结合蛋白中。由黄色瘤胃球菌的名字来看, 菌体与纤维素的结合可能涉及黄色亲和物质。最近人们在相关黄色瘤胃球菌株 FDI 中检测到 ScaA 和 ScaB 同源物。目前正在进行 FDI 基因组的测序, 可以预期, 不久我们将会对该菌产生的纤维小体复合物有更深入的了解, 第10章对相关进展进行了讨论。

第11章介绍解纤维梭菌的催化酶系, 解纤维梭菌水解植物细胞壁多糖的催化系统包括纤维小体多酶复合物和非纤维小体组分。每个纤维小体含有最多可以结合 8 个酶分子的脚手架蛋白 CipC, CipC 的 N-端是纤维素结合模块、接着是一个亲水性 X2 模块、7 个高度同源的粘连模块、第二个 X2 模块和最后一个粘连模块。单个纤维小体的分子量在 600000~700000 之间。纤维素培养物上产生的纤维小体有三个主要部分, 分别是 CipC、持续性纤维素内切酶 Cel48F、纤维二糖水解酶 Cel9E, 另外还有多种分子量在 30~100000 之间的其他组分。复合物的所有酶组分都含有一个特殊的对接模块 (叫做对接蛋白), 它能特定地与 CipC 粘连蛋白结合。解纤维梭菌合成至少 22 种不同

的连接对接蛋白的组分，复合物组分组成可能会存在较多变化，这种组成变化受到接合于复合物上的酶组分数量的调节，通过结构基因及调节基因在体内的表达来高效完成。编码 CipC 蛋白的基因是一个高达 26kb 大基因簇的第一个基因，其后紧跟着 *cel48F*，接着是编码 9 个其他基因的序列 (*cel8C-cel9G-cel9E-orfX-cel9H-cel9J-man5K-cel9M-rgl11Y-cel5N*)：编码了 7 种纤维素酶、一种甘露聚糖酶和一种果胶酶。这些组分都是纤维小体组分。这个基因簇中基因编码的纤维素酶对纤维小体高效降解微晶纤维素是必需的。解纤维梭菌在纤维素和纤维二糖培养基中的代谢研究表明，菌株可较好地适应培养基，甚至受到低碳源限制时，菌体可在其天然底物纤维素上生长，这是其生长特征。该菌不能调控可溶性糖的摄入及糖酵解过程的碳通量。在这种情况下，营养成分或其代谢产物在胞内就可积累到有毒性的水平。有人在其中异源表达可消除过量丙酮酸的人工操纵子，获得了野生型的改良菌株。

热纤梭菌产生的纤维素酶系统由一个巨大的蛋白质复合物组成，称为纤维小体。纤维小体包含了大量亚基，其中多数是糖基水解酶。纤维小体的核心是 CipA，一个 250000 的非催化亚基，为结合催化亚基的脚手架蛋白。CipA 中含有 9 个高度同源的结构域，称为粘连蛋白结构域，是催化亚基的受体。结合粘连蛋白的结构域是由一个 22 个氨基酸残基高度同源的重复序列组成，称为对接蛋白，发现其多数位于每一纤维小体催化亚基的 C-末端。CipA 还包含了纤维素结合域 (CBD)，帮助催化成分锚定于纤维素表面。除纤维小体外，热纤梭菌还产生多种游离的、非纤维小体的糖基水解酶。

目前针对热纤梭菌纤维素酶系统的研究多集中在分子克隆、糖基水解酶的鉴定以及纤维小体和非纤维小体成分的结构功能关系上。这些蛋白质的生物合成是如何调控的，人们知之甚少，大量相关基因和蛋白的存在明显地阻碍了相关工作的进展。纤维小体组分可以分成三类：①脚手架蛋白 (CipA)；②含对接蛋白的催化亚基；③脚手架-锚定蛋白，将纤维小体或单个酶锚定在细胞表面的亚基 (如 OlpA、OlpB、SdbA 和 Orf2p)。热纤梭菌基因组序列草图的分析表明，仅第 2 类组分就至少含有 72 个不同基因，另外细菌中还有多种非纤维小体的酶组分，这使得相关研究变得复杂。细菌如何协调如此大量的生物质降解酶的生物合成？这是一个值得研究的科学问题。调控机制的阐明不仅对研究纤维素酶生物学，对工程干预的超级纤维素降解菌株研究也是非常重要的。热纤梭菌复合物已成为广泛研究的重点，获得的知识将为其他微生物纤维小体的研究提供模式。

作者已经将热纤梭菌基因组 DNA 提交给美国能源部联合基因组研究所 (JGI) 进行测序，目前已得到一套基因组序列草图 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/cloth/cloth.home.html)，这就为在基因组水平上研究其调控机制提供了前所未有的机遇。第 12 章简要回顾了最近的进展，重点介绍由基因组测序带来的新的研究结果。

第 13 章介绍了 Orpin 发现的厌氧真菌 (J Gen. Microbiol. 1975, 91: 270) 及其酶系，厌氧真菌在食草动物瘤胃及盲肠中与细菌及其他微生物密切接触，生活在一起，而瘤胃与盲肠是食草动物消化其摄取的植物材料的地方。根据形态学上的差异，厌氧真菌被分成属于 5 个属的 17 个种，存在于 50 种不同的食草动物中。厌氧真菌可高效降解木质纤维素和水解植物碳水化合物，能产生降解纤维素与半纤维素所必需的相关酶类。这些酶类大多是胞外酶，多为游离存在或是连接到纤维小体及多聚纤维小体复合物上。纤维小体复合物上存在的酶组分，包括：内切/外切纤维素酶、 β -葡糖苷酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、昆布多糖酶、甘露聚糖酶、 α -甲基葡糖醛酸酶、乙酰基木聚糖酯酶和阿魏酸酯酶。厌氧真菌纤维小体相关的酶组分都是通过模块组合在一起的，催化模块都连有对接模块，这与厌氧细菌纤维小体的酶组分结构相似。脚手架蛋白在厌氧真菌中也存在，但到目前为止，仅有一种脚手架蛋白获得了分离。丝氨酸蛋白酶抑制蛋白与纤维小体相连。非催化的对接蛋白结构域 (NCDD) 虽与细菌纤维小体的对接蛋白具有相似的功能，但是它们在序列上没有任何的同源性。对厌氧真菌纤维小体中各种酶组分的序列分析表明，它们看起来有不同的起源，包括厌氧和好氧细菌，以及好氧真菌。厌氧真菌之间的基因转移似乎与基因重复一样普遍。

目 录

Contents

第 1 章	1
参考文献	5
第 2 章	7
2.1 引言	7
2.2 发现过程	8
2.3 后续研究	11
2.4 证据	14
2.5 未来方向	21
2.6 结论	22
参考文献	22
第 3 章	33
3.1 引言	34
3.2 粘连蛋白与对接蛋白的系统发生多样性	34
3.3 粘连蛋白模块	34
3.4 对接蛋白模块	37
3.5 粘连蛋白-对接蛋白复合物的结构	37
3.6 结合的专一性	39
3.7 粘连蛋白-对接蛋白相互作用及纤维小体复合体	41
3.8 结论	41
参考文献	42
第 4 章	49
4.1 纤维小体:超分子复合体	49
4.2 结构模式	50
4.3 结论	58
参考文献	59
第 5 章	67
5.1 引言	67
5.2 热纤梭菌的生理生态学	68
5.3 纤维素水解机理	68
5.4 生物能学	69
5.5 纤维素酶合成的调控	70

5.6 黏附机制	72
5.7 生物膜反应	73
5.8 最新前沿	75
参考文献	77

第6章 热纤梭菌纤维小体的新组分及基因组序列分析 82

6.1 引言	82
6.2 热纤梭菌降解纤维素过程	83
6.3 热纤梭菌基因组中的纤维小体基因	88
6.4 基因组中潜在的纤维小体纤维素酶基因	89
6.5 基因组中组成纤维小体的半纤维素酶基因	90
6.6 基因组中的糖苷酶基因	91
6.7 完整的果胶酶系统	92
6.8 基因组中的其他水解酶与酯酶基因	92
6.9 纤维小体中非催化组分的基因	93
6.10 碳水化合物结合结构模块的功能	93
6.11 纤维小体蛋白的模块组装-多功能酶	93
6.12 在纤维素上培养时实际存在的纤维小体组分	95
6.13 纤维素水解中未确定功能组分 Cel8A 的可能作用	96
6.14 纤维小体组成随底物的变化	96
6.15 非纤维小体纤维素酶系的增补作用	96
6.16 哪些纤维糊精是纤维素水解的产物	97
6.17 结论	99
参考文献	99

第7章 嗜纤维梭菌纤维小体 106

7.1 引言	106
7.2 嗜纤维梭菌纤维小体的组成和结构	107
7.3 纤维小体基因的组装	109
7.4 纤维小体异质性的亚基组成	109
7.5 纤维小体基因的转录和表达调节	110
7.6 纤维小体的设计	110
7.7 利用小型纤维小体研究协同作用	111
7.8 DNA 重排方法改进纤维小体酶的特性	111
7.9 纤维小体基因的异源表达	112
7.10 CBD 的应用	112
7.11 结论与注释	112
参考文献	113

第8章 约氏梭菌与白色瘤胃球菌的纤维小体 117

8.1 约氏梭菌的纤维小体	117
8.2 白色瘤胃球菌的纤维素降解系统	125
参考文献	127

第 9 章 纤维小体嵌合体: 研究纤维小体功能及其潜在生物技术应用的有效工具	131
9.1 引言	131
9.2 纤维小体嵌合体的概念	133
9.3 利用纤维小体嵌合体来研究解纤维素梭菌产生的纤维小体	135
9.4 未来前景	139
9.5 未来生物技术的应用	140
9.6 结论	141
参考文献	141
第 10 章 黄色瘤胃球菌纤维小体的组织结构	144
10.1 引言	144
10.2 黄色瘤胃球菌中纤维小体的组织架构	145
10.3 黄色瘤胃球菌降解植物细胞壁的其他特征	152
10.4 结论	153
参考文献	154
第 11 章 解纤维梭菌: 纤维小体及其纤维素水解	158
11.1 引言	158
11.2 纤维小体的酶组分	159
11.3 纤维小体脚手架蛋白	164
11.4 纤维小体	166
11.5 非纤维小体的蛋白质	168
11.6 纤维素降解	168
11.7 结论	171
参考文献	172
第 12 章 热纤梭菌纤维素酶生物合成调控	179
12.1 碳源调控	179
12.2 单个纤维素酶组分的调节	180
12.3 生长速率的影响	180
12.4 纤维素酶基因簇	181
12.5 负调节	182
12.6 结论	183
参考文献	183
第 13 章 厌氧真菌的纤维小体	185
13.1 引言	185
13.2 厌氧真菌纤维小体的酶组分	190
13.3 非催化的对接蛋白结构域(NCDD)和脚手架蛋白	197
13.4 厌氧真菌中纤维素降解酶的基因组结构	199
13.5 结论	199
参考文献	200
索引	209

导论：生物乙醇的重要性与厌氧细菌及其纤维小体的贡献

Arnold L. Demain^①

摘要

梭状芽胞杆菌的共培养体系具有充分利用生物质资源生产乙醇等液体燃料的潜能。通过嗜热厌氧微生物[水解纤维素的菌株,如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)及糖化菌株,如热解糖梭菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)]的共培养体系来产生乙醇,将会具有以下优势:①嗜热菌是稳定的,含热稳定性的酶类;②厌氧菌细胞生长量较低,因此可将底物转化成更多的乙醇;③高温发酵不至于受到污染等不利因素的影响;④在较高温度下生长,有利于分离和回收乙醇等挥发性的产品。更重要的优势还有原位产生纤维素酶,纤维素和半纤维素的代谢水平较高。高温乙醇发酵工艺是非常简单的,仅涉及一个高温发酵罐,不再需要冷却装置及搅拌/曝气通风反应器等,在一个反应器中完成乙醇产生的4个生物学相关过程(纤维素酶和半纤维素酶的合成、纤维素和半纤维素的水解、己糖发酵以及戊糖发酵)。实现共培养体系的关键是利用纤维小体多酶复合体,用其来组织、协调、协作从而发挥高效催化能力。本书将对纤维小体的研究历程、其粘连蛋白和对接蛋白的相互作用、相关催化结构以及其基因组等一一介绍。

关键词: 纤维素酶, 半纤维素酶, 梭状芽胞杆菌, 厌氧菌, 乙醇, 纤维小体, 粘连蛋白, 对接蛋白, 能源, 嗜热菌

当今世界能源问题已经越来越突出,过去几年石油价格飞涨,从20美元一桶升到现在的几乎70美元一桶。这么看来,生产乙醇至少可能部分解决能源问题。乙醇作为运输燃料,因其具有汽油所没有的一些性质,而有明显的优越性。纯乙醇(未混合的)燃烧起来更清洁,并且效率更高,具有更高的辛烷值,产生臭氧的前体较少,因此可以减少城市空气污染。此外,它燃烧释放到大气中的净二氧化碳较少。虽然在发酵过程和乙醇燃料使用中会产生二氧化碳,但这些二氧化碳会被植物循环利用,因而不会加重大气中二氧化碳的积累和温室效应。

乙醇对人体的毒性要比汽油小,其高汽化热、高辛烷值和低火焰温度会使发动机的性能更好发挥。此外,乙醇能帮助西方国家平衡贸易、增强能源安全、缓解主要农作物生产压力、改善农业经济低迷现状。巴西每年利用糖分生产38亿加仑^②乙醇^[25]。该国90%的新汽车用的都是纯乙醇,其余使用25%乙醇与汽油的混合物。该国所有车中应用的汽车燃料有40%是乙醇。而美国1987年就有3.4亿蒲式耳(860万吨^③)玉米用于产出8.5亿加仑的无水乙醇,以10%的比例和汽油混合使

① Research Institute for Scientists Emeriti (R. I. S. E.), Drew University, Madison, NJ.

Correspondence concerning this article should be addressed to Arnold L. Demain, Drew University, R. I. S. E., HS-330, Madison, NJ 07940, U. S. A.; ademain@drew.edu.

② 1加仑(美国)=3.78541dm³.

③ 原著为8.6metric tons(8.6公吨),疑有误。——译者注

用。美国总汽油使用量中有 8% 是混合燃料,这个数字虽然小,但是从 1981 年不足 1% 中增长而来的。2004 年美国利用玉米及其他高淀粉含量的谷物进行酵母发酵,生产了 35 亿加仑的乙醇,满足了美国 1% 的机动车需求^[6]。今年(指 2006 年)将达到 40 亿加仑,根据最近美国能源立法该数字将很快增加到 70 亿加仑(L. R. Lynd, 私人通信)。目前美国玉米乙醇与汽油混合作为燃料,并取代四乙基铅来提高辛烷值。同时乙醇可用作增氧剂(oxygenate)以减少汽车尾气的排放。在美国的多个州,即将逐步淘汰以甲基叔丁基醚(MTBE)作为增氧剂,而乙醇正好填补了这一新增氧剂的空白。1990 年,美国消耗了 1120 亿加仑的汽油,而 2004 年用于运输和工业的石油有 62% 是进口的^[6],每年该花费超过 1000 亿美元,到 2005 年这个数字增至 1400 亿美元,71% 来自进口(L. R. Lynd, 私人通信)。石油进口已成为美国贸易赤字最大的单宗物品。而更加严重的问题是,现在世界还没有足够的玉米可用来解救人们对石油这一能量资源的依赖。

单从转化成燃料的可能性来看,木质纤维素廉价、量大、可持续供给,是最丰富的天然可持续转化为燃料的物质。每年从农业和其他方面获得的纤维素原料约有 1.8 亿吨(原文如此,明显有误——译者注)。20 世纪 80 年代早期纤维素干生物质的价格在 20~30 美元/吨,要比干玉米每吨 110 美元便宜很多,但纤维素水解产糖还不能与淀粉产糖相竞争。问题包括纤维素的结晶性和木质素的存在,需要昂贵的预处理过程。此外,玉米还可提供玉米油及蛋白等副产品,这些产品的价值也要大大高于木质素。2003 年纤维素材料价值为 44 美元/吨(干重),按质量计相当于石油价格为每桶在 6~7 美元,而按能量含量计相当于每桶石油 12~13 美元^[34]。今天纤维质原料价格为 40 美元/吨(干重)^[21],而石油价格却在迅猛攀升。如果纤维质乙醇的加工成本可以继续降低的话,就可与汽油竞争了。另外,城市与工业废弃物中也可得大量其他纤维素类物质。而且,纤维素乙醇技术也可以缓解今天我们所要面对的污染问题。因此,纤维素类生物质作为一种可持续性的资源,经降解产生糖分进而转化成液体燃料,经济与社会效益巨大。

生物质资源可由农业产生,也可来自随处可见的城市和工业纤维素废弃物。因此无论是从经济角度分析,还是从环保角度看,开发新一代纤维素类能源都是非常具有前途的。垃圾填埋区已经越来越小,费用也越来越高。因而纤维素乙醇可用量要远远大于玉米乙醇的产量。相比玉米转化乙醇,纤维素转化乙醇的过程对温室效应具有较小影响,或根本没有影响,并且还可能存在净能量平衡(高出至少 5 倍)。生物质包含木质素、纤维素以及半纤维素,通过化学预处理,可以分离出木质素,用作锅炉燃料来提供热能与电能。

生物质转化为燃料的过程中,其限速步骤是纤维素的水解,特别是高度有序结晶的不溶性纤维素降解的初始阶段。纤维素降解产物为寡糖和单糖,可被产乙醇细胞直接吸收。现在,各国都投入大量的人力物力从事纤维素到单糖转化的相关研究。多数工作着重于生物化学、遗传学及工艺过程开发,主要应用产纤维素酶的真菌(特别是瑞氏木霉)联合酵母菌(酿酒酵母)或是重组细菌[大肠杆菌、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)或是运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)]将多糖转化成乙醇。然而,另一新解决方法也已经出现,利用厌氧细菌,特别是嗜热物种,包括梭菌属(*Clostridium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)的菌株,共培养水解纤维素菌株与分解糖分菌株等厌氧生物,可以降解纤维素与半纤维素,并将寡糖和单糖最终转化为乙醇,该过程现在称为统合生物加工(consolidated bioprocessing, CBP)工艺。

在 1990 年,人们利用瑞氏木霉纤维素酶加上酵母菌,完成同步糖化发酵过程(SSF),将纤维素转化成乙醇,其成本已接近在无补贴条件下玉米乙醇(通过酵母菌)的水平。然而在 20 世纪 90 年代早期^[11,26],人们利用嗜热厌氧生物通过 CBP 过程将混合阔叶木粉连续发酵转化成乙醇,要比利用木霉纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和酿酒酵母的 SSF 过程好 2.5 倍,此外转化速率要高 4 倍之多。有人计算,由于 CBP 过程组合了纤维素酶生产、水解及发酵过程于单一生物反应器中,相比最先进的 SSF 工艺,CBP 工艺可每加仑节省 50 美分。在 1997~2000 年间,SSF 工艺利用木霉纤维素酶降解与发酵之前,还需要酸处理生物质,该项花费估计在每加仑 0.43~1.29 美分之间^[23]。虽然过去几年中真菌纤维素酶生产价格明显下降,并且 SSF 工艺也处于示范阶段,但 CBP 工艺看起来更具潜力。当前 SSF 工艺大规模生产生物乙醇估计为每加仑 0.87 美元,而 CBP 过程生产的生物乙醇每

加仑 0.63 美元^[21]。多年的研究发现，SSF 工艺并不是唯一具有潜力的解决方案。CBP 工艺中酶的花费非常少，因为这些酶是乙醇发酵过程中由发酵生物体产生的。因此，厌氧细菌直接转化的优势就在于明显降低酶的生产成本与资金投入，大大降低底物到酶的能量转移，整合产酶与发酵两个系统。

既然细菌能够利用木质纤维素废料生产乙醇，而这种特性在生物中并不多见，所以近几年人们对细菌代谢纤维素产生了极大的兴趣。事实上细菌纤维素酶系统可以水解含有木质素的生物质（如稀酸预处理的阔叶木材），以及不含木质素的模式底物。厌氧乙醇发酵的原理非常简单，通过 5 个生物学过程发酵生成乙醇：①纤维素酶和半纤维素酶的合成；②纤维素和半纤维素的酶水解；③单糖与寡糖的摄入；④己糖发酵；⑤戊糖发酵。所有过程都统合在一步发酵过程中。该厌氧工艺的优势在于可降低产酶发酵反应器搅拌/通气的成本。另外由于厌氧菌普遍具有低生物量，因此底物可以更多地转化为乙醇，并且就地产生纤维素酶比添加纤维素酶制剂更节约成本。虽然该工艺可用嗜温厌氧菌完成，但人们更愿意利用厌氧嗜热菌作为“产乙醇细菌（ethanologens）”。主要原因是①嗜热菌是稳定的，含热稳定性的酶类；②嗜热菌发酵在 60℃ 运行，可以免受染菌等不利影响；③在较高温度下生长可以方便分离回收挥发性产物，如乙醇；④纤维素酶和半纤维素酶的代谢效率高；⑤降低冷却发酵罐的动力花费。

厌氧细菌降解纤维素产生的主要产物是纤维糊精和纤维二糖。纤维糊精和纤维二糖可被有机体利用，而其中纤维糊精要比纤维二糖更容易为热纤梭菌所吸收利用，其终产物是乙醇、乙酸、乳酸、氢气和二氧化碳。经济上主要的障碍是代谢产生了乙酸和乳酸，这降低了生产转化的得率。人们已结合重组 DNA 技术和代谢工程研究了消除该瓶颈的方法，在厌氧菌^[28]和乙醇耐受菌株中^[27]已经可以利用电转化基因转移系统。选择性问题已经解决，在共培养体系中可同时失活产乙酸和乳酸的编码基因。Lynd 及其同事在此方面已经取得重大进展^[8,21]。

厌氧菌水解纤维素的主力是纤维小体。早在 1983 年，Eric Johnson^[13]在麻省理工学院（M. I. T.）做博士生时，就认识到热纤梭菌纤维素酶的活性是巨大结构的一部分，该结构分子量在 1.5×10^6 以上。同年，Bayer 和 Lamed 及其同事^[2,19]在以色列从培养液上清中纯化出一种多亚基复合物，他们称这个复合物为纤维小体^[17]。在破坏和利用结晶纤维素方面，纤维小体起到至关重要的作用。纤维小体是一个大分子机器（多亚基酶组分的复合物），类似核糖体，是一个高效组织、协调和协同催化的细胞器结构。纤维小体的独特之处在于迄今为止还没有报道过像这样大小、这么复杂的胞外蛋白复合物。它们的分子量在 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ ，其直径大约 18nm，包含 14~50 个多肽，多肽的分子量约在 $37 \times 10^3 \sim 210 \times 10^3$ ，95% 以上的热纤梭菌内切葡聚糖酶活性都与纤维小体联系在一起。

纤维小体高度有序排列使得其结构极为稳定，但这给其单蛋白组分的分离造成了极大的困难。现在，这些水解纤维素聚集体中所有组分的蛋白都已分离纯化^[32,33]。利用粉状微晶纤维素（结晶纤维素）降解的浊度变化作为检测真纤维素酶活性的方法，利用羧甲基纤维素（CMC）的水解作为检测内切葡聚糖酶的方法，从这个聚集体至少发现了 4 种不同分子量的内切纤维素酶活性，同时伴有真纤维素酶活性。通过温和的十二烷基磺酸钠（SDS）加 EDTA 和 DTT 处理，分离的各组分只显示出了内切纤维素酶活性，而真纤维素酶活性却丢失了。组合其中两个重要组分 S_s ($M_r = 82000$) 和 S_L ($M_r = 250000$)，真纤维素酶活性可得以重构。单一 S_s 可对 CMC 起作用，而 S_L 单独作用时几乎没有酶活性^[18,33]。 S_s 的 CMC 酶活性没有由于 S_L 的存在而增强，但后者可吸附到结晶纤维素上^[33]。所以有人猜想，协同降解结晶纤维素要涉及 S_s （及其他可能的纤维素酶）、 S_L 和不溶性底物三者之间的互相协作配合。 S_L （锚定亚基）可把 S_s （及复合物中其他催化蛋白）绑定到纤维素表面上，从而在一定程度上协助水解^[31,32]。 S_L 基因（*cipA*）DNA 序列分析显示 S_L 的确含有一个纤维素结合结构域（CBD）及多种酶组分受体结构域，这与“锚定酶（anchor-enzyme）”假说一致^[10]，利用 S_s 和 S_L 重组蛋白进一步确认了锚定酶模型^[15]。了解 S_L 锚定功能是当前认识纤维小体结构的基础，而另一个让人感兴趣的问题是 S_s 基因编码序列的功能^[30]。

S_L 蛋白与 Lamed 等人^[18]报道的组分 S1 相似，现在称为纤维小体整合蛋白（CipA）——脚手架蛋白（scaffoldin）^[3]。它含有约 1850 个氨基酸残基，是纤维小体中最重要的蛋白。除了具有自身可

结合纤维素复合物其他组分的功能外，它还可以结合到纤维素上^[6]。由其核苷酸序列可以推出该蛋白大小约为 196800，具有一个纤维素结合结构域 (CBD)^[4] 和 9 个结构域。9 个结构域中每个各含 150~166 个氨基酸残基。这 9 个重复序列，Bayer 等人^[3] 称其为“粘连蛋白 (cohesin)”。它们彼此十分相似，具有 60%~100% 的序列一致性，其中有 6 个序列一致性至少有 90%。它们作为受体可结合各自的纤维素酶、木聚糖酶和其他酶到 Cip A 上。

S_s 蛋白是一个外切葡聚糖酶，也被称为 CelS^[30]，是纤维小体的一个主要的催化亚基，与以色列科研团队发现的 S8 相似^[24]。CelS 测序发现其含一个 2241bp 的开放读码框，编码 741 个氨基酸残基，预测其分子量为 80670^[29,30]。序列分析显示 CelS 属于新的纤维素酶家族^[30]，后来将其分类为第 48 糖苷水解酶家族的组分。虽然是纤维小体中最丰富的催化结构单元，但它几乎没有或只具有很低的 CMC 酶活性，对其他人工合成底物的活性也很低。这也从另一方面解释了为什么它的基因克隆难以检验的部分原因。第 48 家族的酶组分几乎都是在细菌纤维素酶系统中发现的，目前认为是细菌分解纤维素类材料的关键组分^[12]。CelS 中含有一段 24 个氨基酸残基重复序列的对接蛋白结构，可以结合到脚手架蛋白上。同纤维小体一样，CelS 重组蛋白受到纤维二糖竞争性的抑制，而葡萄糖抑制较弱^[14]。由此可见，纤维小体聚合体是由催化亚基相互组合在一起形成的，从而可以优化水解水不溶性聚合物及其可溶性寡糖。

佐治亚大学的研究员^[9,11] 后来发现了更大的聚集体，分子量在 108×10^6 (“多聚纤维小体”)。众多的(多聚)纤维小体形成突起，覆盖在细胞的表面，每个突起包含有数百个纤维小体^[16]。当细胞在纤维二糖中生长时，纤维小体复合物就被排列成分散的胞外结构。当在纤维素上生长时，胞外结构经过重构形成多聚的纤维小体细胞器(突起直径在 60~200nm)^[1]，黏附到不溶性底物上，并且这些含纤维小体的突起还会迅速集结成“接触通道”将底物与细菌细胞表面相互连接，组成纤维小体的蛋白形成高度有序的链状排列^[22]。结合到纤维素上的纤维小体簇应是纤维素酶发挥活性的位点，其产物将沿着纤维状结构运入细胞中。

纤维小体中最重要的是非酶的脚手架蛋白，具有特有的脚手架蛋白亚基，可以结合纤维素酶及其他酶组分。催化亚基则包含了不同结构单元(对接蛋白)，这些蛋白负责将酶组分连接到脚手架蛋白上。它们之间的重要相互作用有：①脚手架蛋白具有粘连蛋白结构域；②酶组分连有对接蛋白结构域；③脚手架上存在一个 CBD，可将复合物结合到纤维素上。现在多种细菌中发现纤维小体和脚手架蛋白，如嗜纤维梭菌、解纤维素梭菌、约氏梭菌、丙酮丁醇梭菌、解纤维素醋弧菌、溶纤维素拟杆菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、弧菌类，以及厌氧真菌类 *Neocallimastix*、*Pirromyces* 及 *Orpinomyces*。

本书接下来会涉及梭状芽胞杆菌的纤维小体以及相关的瘤胃球菌属微生物等，介绍它们的生活史、粘连蛋白和对接蛋白之间的相互作用、催化蛋白的结构以及它们的基因组。厌氧嗜热菌和厌氧嗜温菌都有讨论，还有一章关于纤维小体嵌合体的介绍。本书还涉及梭状芽胞杆菌的纤维素酶、其代谢调控、水解纤维素的能力以及所有与之相关的重要生物技术。最后，你还能了解到有关厌氧真菌纤维小体研究的相关进展。

致 谢

感谢达特茅斯大学塞耶工程学院的 Lee R. Lynd 教授细致阅读了我的手稿，并对生物乙醇工艺提出建议。

(郭翰林 王禄山 张正 译)

参考文献

- Bayer, E. A., and Lamed, R. 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J. Bacteriol.* 167:828-836.
- Bayer, E. A., Kenig, R., and Lamed, R. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* 163:552-559.
- Bayer, E. A., Morag, E., and Lamed, R. 1994. The cellulosome--a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12:379-386.
- Beguín, P., and Aubert, J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Beguín, P., Millet, J., and Aubert, J.-P. 1992. Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: From manure to molecular biology. *FEMS Microbiol. Lett.* 100:523-528.
- Bothast, R.J. and Schlicher, M. A. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:19-25.
- Demain, A. L., Newcomb, M., and Wu, J. H. D. 2005. Cellulase, clostridia and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:124-154.
- Desai, S. G., Guerinot, M. L. and Lynd, L. R. 2004. Cloning of the L-lactate dehydrogenase gene and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:600-605.
- Felix, C. R., and Ljungdahl, L. G. 1993. The cellulosome: the extracellular organelle of *Clostridium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:791-819.
- Gerngross, U. T., Romaniec, M. P. M., Huskisson, N. S. and Demain, A. L. 1993. Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal S_L-protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol. Microbiol.* 8:325-334.
- Hon-nami, K., Coughlan, M. P., Hon-nami, H., and Ljungdahl, L. G. 1986. Separation and characterization of the complexes constituting the cellulolytic enzyme system of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 145:13-19.
- Irwin, D. C., Zhang, S., and Wilson, D. B. 2000. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* 267:4988-4997.
- Johnson, E. A. 1983. Regulation of cellulase activity and synthesis in *Clostridium thermocellum*. Ph.D. thesis. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.
- Kruus, K., Andreacchi, A., Wang, W. K., and Wu, J. H. D. 1995. Product inhibition of the recombinant CelS, an exoglucanase component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:399-404.
- Kruus, K., Lua, A. C., Demain, A. L., and Wu, J. H. D. 1995. The anchorage function of CipA (CelL), a scaffolding protein of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9254-9258.
- Lamed, R., and Bayer, E. A. 1986. Contact and cellulolysis in *Clostridium thermocellum* via extensile surface organelles. *Experientia* 42:72-73.
- Lamed, R., and Bayer, E. A. 1988. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Adv. Appl. Microbiol.* 33:1-46.
- Lamed, R., Setter, E., and Bayer, E. A. 1983. Characterization of a cellulose-binding, cellulase containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 156:828-836.
- Lamed, R., Setter, E., Kenig, R., and Bayer, E. A. 1983. The cellulosome-a discrete cell