

微生物降解纤维素的新机制

杨腾腾 周宏 王霞 张伟欣 陈冠军 刘巍峰*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要: 自然界中能够降解纤维素的微生物分布广泛, 纤维素降解的方式也呈现很高的多样性。*Cytophaga hutchinsonii* 属于拟杆菌门, 具有很强的结晶纤维素降解能力, 但是其降解机制既异于已经发现的游离纤维素酶降解体系, 也不同于纤维小体的降解模式, 推测其存在第3种细胞结合型纤维素降解模式。本文简要阐述以 *C. hutchinsonii* 为代表的一种新的纤维素降解策略。

关键词: 纤维素, 纤维素降解, *Cytophaga hutchinsonii*

A new microbial strategy for cellulose degradation

YANG Teng-Teng ZHOU Hong WANG Xia ZHANG Wei-Xin CHEN Guan-Jun
LIU Wei-Feng*

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

Abstract: Microorganisms capable of degrading cellulose are widely distributed in nature and diverse strategies are thus employed to achieve the efficient depolymerization of lignocellulose. *Cytophaga hutchinsonii* belonging to the phylum Bacteroidetes has a strong ability to hydrolyze cellulose, but the involved mechanism seems to be different either from the known extracellular noncomplexed cellulase system or from cellulosome system. It is speculated that it possesses a third mode of cellulose utilization with the degradation system tightly associated with cells. The present review will briefly introduce the potentially novel strategy employed by *C. hutchinsonii* to assimilate cellulose.

Keywords: Cellulose, Cellulose degradation, *Cytophaga hutchinsonii*

植物细胞壁来源的木质纤维素(Lignocellulose)是生物质资源的重要组成部分, 是地球上最丰富的可再生有机资源。纤维素是 D-葡萄糖以 β -1,4 糖苷键联结而成的线形大分子多糖, 大约 30 个糖链合成一个小纤维(纤丝, 原纤丝)单元, 然后再聚集成微纤维, 最后聚集成纤维^[1]。纤维素由结晶区和非结晶区相交错形成, 其致密的晶体结构严重阻碍了

化学试剂或者生物酶与纤维素表面的有效接触和作用, 这也正是天然纤维素难于被水解的重要结构屏障。自然界中的许多微生物具有纤维素降解能力, 目前大家较为熟知的是以瑞氏木霉为代表的某些好氧真菌通过胞外游离纤维素酶组分作用的降解模式, 以及以热丝梭菌为代表的某些厌氧细菌利用复合纤维小体(Cellulosome)策略的降解模式^[2]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170762)

*通讯作者: ✉: weifliu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-29; 接受日期: 2015-02-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-03

近年来,人们发现某些好氧噬纤维菌如 *Cytophaga hutchinsonii* 同样具有很强的结晶纤维素降解能力^[3-4]。该菌对纤维素的降解需要菌体与纤维素底物直接接触,但是该菌基因组中并无编码外切纤维素酶的基因,而且其内切纤维素酶缺少纤维素结合结构域,因此推测该菌可能具有不同于瑞氏木霉及热梭菌的第3种纤维素降解模式。本文主要对目前已知的纤维素降解模式进行简单阐述,并重点以 *C. hutchinsonii* 为例介绍第3种可能的纤维素降解新机制。

1 已知的纤维素降解模式

不溶性的纤维素大分子底物由于无法运输至胞内,大多数的好氧细菌和真菌通过分泌大量游离的胞外纤维素酶来实现纤维素的有效水解。这些纤维素酶和其他非酶因子之间协同作用(图1),将纤维素分子降解成可溶性的葡萄糖、纤维二糖或纤维寡糖分子后运输到胞内进行利用^[2,5]。

丝状真菌是自然界中以游离纤维素酶系降解木质纤维素的主要微生物类别,其中以红褐肉座菌 *Hypocrea jecorina* 的无性型——瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 为典型代表^[6]。瑞氏木霉的纤维素酶系主要包括3类不同的纤维素酶组分,其中包括5种葡聚糖内切酶(Endoglucanase, EG I-EG V),两种葡聚糖外切酶(Exoglucanase, CBH I和CBH II)以及两种 β -葡糖苷酶(BGL I和BGL II)^[7-8]。其中外切葡聚糖酶CBH I占瑞氏木霉分泌纤维素酶系的60%,其次为CBH II和EG V。CBH

I和CBH II能够分别从结晶纤维素的还原端或非还原端持续催化释放纤维二糖从而高效降解结晶纤维素^[9]。

除真菌以外,一些好氧细菌也采用游离酶系模式降解纤维素,研究较多的包括纤维菌属 (*Cellomonas*)和嗜热放线菌属 (*Thermobifida*)细菌^[10-11]。

很多纤维素降解厌氧细菌存在一种特殊的纤维素酶复合体结构——纤维小体(Cellulosome)^[12]。纤维小体最早是由Lamed等在可降解纤维素的热梭菌(*Clostridium thermocellum*)培养物中分离纯化得到^[13]。纤维小体是由多种纤维素酶、半纤维素酶依靠“锚定-粘附”(Cohesin-dockerin)机制形成的一种结构化的多酶复合体结构^[14],它可以通过细胞粘附蛋白附着在细胞膜上,呈封闭状态。当其接触纤维素底物时封闭结构打开,将菌体固定在底物上,催化结构域与纤维素充分接触,从而高效彻底地降解纤维素,水解产生的可溶性糖被细胞吸收。纤维小体结构在各种不同菌中虽然成分有所差异,但整体结构相似^[15]。

2 新型纤维素降解模式

基因组信息学分析发现,以哈氏噬纤维细菌 (*Cytophaga hutchinsonii*)为代表的好氧菌和以产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)为代表的厌氧菌可能具有独特的纤维素降解策略,它们对纤维素的降解可能依赖于与细胞表面相关联的非游离纤维素酶组分^[16-18]。

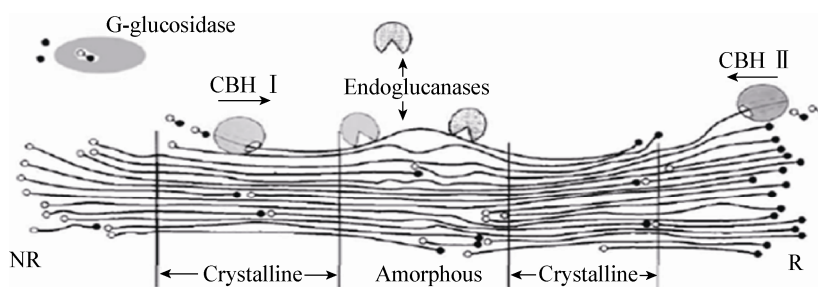


图1 游离纤维素酶系结晶纤维素降解策略示意图^[2]

Figure 1 Schematic diagram of crystalline cellulose degradation by noncomplexed cellulase system^[2]

C. hutchinsonii 于 1938 年由 Walker 和 Warren 从土壤中分离得到^[4], 属于拟杆菌门(Bacteroidetes), 具有高效降解结晶纤维素的能力。Stanier 研究发现 *C. hutchinsonii* 菌体在降解纤维素时可以沿纤维素表面滑动, 但不能在液体中泳动^[17]。该菌只能够利用不溶性纤维素及葡萄糖、纤维二糖或纤维寡糖等可溶性碳源为底物^[18-19]。对包括细胞分级分离、纤维素酶纯化、酶活测定及异源表达等方面的研究发现其不能分泌胞外游离的纤维素酶, 同时也检测不到还原糖的累积。虽然在其细胞膜上和周质空间中检测到可水解羧甲基纤维素钠(CMC)和降低其粘度的内切纤维素酶活性, 但没有检测到外切纤维素酶活性^[16]。

2005 年, *C. hutchinsonii* 的全基因组测序完成。Xie 等对 *C. hutchinsonii* 基因组数据进行了详细的分析, 结果显示 *C. hutchinsonii* 基因组大小为 4.43 Mb, 包含 3 790 个蛋白编码基因, 对其中 1 986 个基因功能进行了注释, 通过扫描电镜观察到了 *C. hutchinsonii* 在滤纸表面的形态与分布(图 2), 证实了该菌对于结晶纤维素底物的接触依赖性降解^[3]。

2.1 *C. hutchinsonii* 中纤维素酶编码蛋白

对 *C. hutchinsonii* 基因组分析结果表明, 该菌缺少明显的外切葡聚糖酶和持续性催化内切酶的

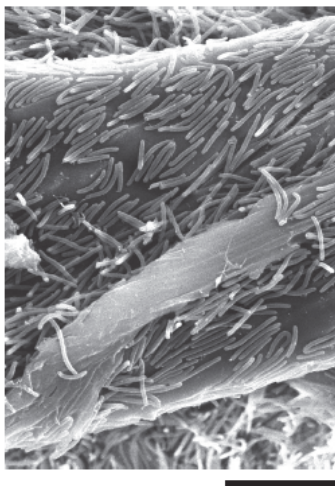


图 2 扫描电镜下降解滤纸的 *C. hutchinsonii* 形态^[3]
Figure 2 Scanning electron micrograph of *C. hutchinsonii* cells digesting cellulose filter paper^[3]

编码基因(如糖苷水解酶第 6、7、48 家族^[3,20])。可能的参与纤维素降解的糖苷水解酶主要属于第 3、5 和 9 家族(表 1), 并且大部分内切酶基因中都没有编码 CBM 的序列^[21], 也没有编码锚定蛋白结构域的基因。通过 HPLC 实验分析以纤维素或纤维寡糖为底物的水解产物, 我们发现 *C. hutchinsonii* 的发酵液中并非不含有还原糖产物, 只是不会大量积累, 或许与外切酶的缺失以及 β -葡萄糖苷酶的脂蛋白定位等原因有关^[22]。包括纤维素酶基因在内, 整个基因组中均没有发现与纤维素结合有关的 A 型 CBM 序列, 可能正是由于该类序列的缺失才使菌体在纤维素表面的滑动得以顺利进行。

本实验室从 *C. hutchinsonii* 细胞外膜中分离纯化得到 3 种纤维素酶包括 CHU_1107、CHU_1075 和 CHU_3384, 对其催化性质进行分析发现 3 种酶都可以降解 CMC、地衣多糖和木聚糖^[23]。其中 CHU_1107 除对再生无定型纤维素(RAC)有降解活力外, 对结晶纤维素也有一定的吸附作用。属于糖苷水解酶第五家族的 CHU_1107 编码基因的插入失活导致细胞外膜的 CMCase 和 RACase 活力降低, 利用纤维素的能力也略有下降^[18]。周宏^[22]、毕言琳^[24]将编码糖苷水解酶第九家族的 *chu_1280*、*chu_1335* 和 *chu_1665* 基因分别失活后, 突变株性状与 *chu_1107* 基因插入失活突变株类似, 但仍然可以在纤维素底物上正常生长。转录组数据显示上述纤维素酶基因的转录并非纤维素特异性诱导^[22]。由此推测, 单一纤维素酶的缺失并不会严重影响 *C. hutchinsonii* 对纤维素的利用, 这可能是由于该菌不存在某个关键性的纤维素内切酶或细胞表面众多纤维素酶之间存在补偿效应。

另外, *C. hutchinsonii* 中不仅含有参与纤维素利用的纤维素酶编码基因, 也具有编码在半纤维素降解过程中发挥作用的糖苷水解酶类、果胶裂解酶、多糖酯酶等。*C. hutchinsonii* 虽然不能利用木聚糖或果胶作为单一碳源, 但或许在降解天然植物底物的过程中, 可以利用上述酶类穿过半纤维素糖层, 从而实现纤维素的高效降解。

表 1 *C. hutchinsonii* 糖苷水解酶特性分析^[3]
 Table 1 Characteristics analysis of *C. hutchinsonii* predicted glycohydrolases^[3]

基因 Gene	基因功能注释 Predicted function	预测定位 Predicted localization	分子质量 Mol mass (kD)	分子结构 Modular structure
CHU_0778	Related to endo- β -1,4-glucanase	Unknown	81.7	CelD_N-GH9
CHU_1107	Candidate endo- β -1,4-glucanase	Extracellular	135.2	GH5-X1-PKD-PKD-FN3
CHU_1280	Candidate endo- β -1,4-glucanase	Unknown	66.2	CelD_N-GH9
CHU_1335	Related to endo- β -1,4-glucanase	Extracellular/outer membrane	207.3	GH9-PKD-PKD-PKDBIG-BIG-BIG-BIG-BIG-BIG-BIG-BIG-D5
CHU_1336	Related to endo- β -1,4-glucanase	Extracellular	105.3	GH9-PKD-PKD-PKD
CHU_1655	Candidate endo- β -1,4-glucanase	Extracellular/outer membrane	92.6	CelD_N-GH9
CHU_1727	Related to endo- β -1,4-glucanase	Unknown	67.9	GH5
CHU_2103	Candidate endo- β -1,4-glucanase	Extracellular	38.8	GH5
CHU_2235	Distantly related to endo- β -1,4-glucanase	Unknown	64.2	GH9
CHU_2268	Candidate β -glucosidase	Periplasmic lipoprotein	83.7	GH3
CHU_2273	Candidate β -glucosidase	Periplasmic lipoprotein	89.7	GH3
CHU_3577	Candidate β -glucosidase	Periplasmic lipoprotein	83.2	GH3
CHU_3784	Candidate β -glucosidase	Periplasmic	81.8	GH3

2.2 *C. hutchinsonii* 中的糖转运蛋白

C. hutchinsonii 降解纤维素底物时, 发酵液中并没有大量还原糖积累, 那么纤维素水解产物转运至胞内的过程就变得尤为重要, 这些水解过程中剥离释放的纤维寡糖或葡萄糖分子可能需要借助细胞膜上的特定转运蛋白穿过外膜和质膜两道屏障到达胞质中。*C. hutchinsonii* 基因组中并没有编码 PTS 糖转运系统的相关基因, 有 6 个编码可能属于 MFS 超家族(Major facilitator superfamily)的糖转运透性酶, 这些蛋白经预测具有与其他菌中转运果糖、葡萄糖、半乳糖等单糖的转运蛋白相似的特征^[3]。由于所编码的 4 个 β -葡萄糖苷酶可能都是位于周质空间的脂蛋白, 所以我们推测 *C. hutchinsonii* 中可能不含有位于内膜的纤维二糖转运蛋白, 纤维素降解产生的纤维二糖在经过周质空间时就已经被 β -葡萄糖苷酶完全降解成葡萄糖, 之后再经过内膜转运至胞质并进入 TCA 循环。

对拟杆菌门 *Bacteroides thetaiotaomicron* 的研

究表明, 其细胞表面存在一种细胞结合型非复合体酶系, 用于淀粉底物的降解。通过对其淀粉结合蛋白与水解酶等, 如 Sus C、Sus D、Sus E、Sus F 和 SusG 等进行的系统研究^[25-27], 提出了 Sus 系统模型(Starch utilization system)。该系统由 PUL (Polysaccharide utilization locus)基因簇编码, 包括 8 个基因 *susRABCDEFG*, 其编码产物中 SusCDEFG 均位于外膜上, 该系统使得菌体能够结合并降解淀粉底物^[28]。其中 SusC 属于 TonB 依赖的受体家族成员, 是一种 β -barrel 结构的外膜跨膜蛋白, 通过接收来自于质子动力及 TonB-ExbBD 系统的能量, 参与一些可溶物及大分子的转运。SusD 单体的 3D 结构显示其含有一个寡糖结合口袋, 可以与聚糖中 3 个以上的葡萄糖单位相互作用。SusR 位于内膜上, 既是感应蛋白又是调节蛋白, 当以淀粉为底物时, 它就可以激活下游 7 个 *sus* 基因的转录。在 Sus 系统中, SusC 和 SusD 对于淀粉结合到细胞表面是必需的, 并且二者之间存在相互作用。

C. hutchinsonii 并不能降解利用淀粉, 已知的唯一可被其利用的多聚糖底物是纤维素。Xie 等对 *C. hutchinsonii* 基因组分析发现其含有 2 个 *susC-like* 基因(CHU_0546, CHU_0553)和 2 个 *susD-like* 基因(CHU_0547, CHU_0554), 此外还预测到 1 个编码 ExbB、ExbD, 4 个编码 TonB-like proteins 及 15 个编码 TonB 依赖的外膜受体蛋白基因^[3]。结合以上信息, 我们推测 *C. hutchinsonii* 中可能存在位于外膜的 Sus-like 系统, 利用类似降解淀粉的机制来实现纤维素的降解及寡糖的转运。

根据 *B. thetaiotaomicron* 中 Sus 系统的基因簇排列规律, 我们在哈氏菌中找到类似的基因簇序列, 编码第九家族糖苷水解酶的基因 *chu_1280* 上游 4 个基因(*chu_1276*–*chu_1279*)与其转录方向一致且基因间隔区序列很短, 在 KEGG 网站上, *chu_1276* 及 *chu_1277* 的直系同源基因(Ortholog)多为 TonB-dependent receptor, *chu_1277* 的横向同源基因(Paralog)也多为已注释的 TonB-dependent receptor。由此, 我们猜测 *chu_1276*–*1280* 所在的基因簇所编码的蛋白产物可能在纤维素降解过程中起到解淀粉拟杆菌中 Sus 系统的作用。CHU_1276 缺失突变株表现出纤维素利用能力的丧失, 同时对于纤维二糖的水解能力降低, 而且其对低浓度葡萄糖的吸收转运能力与野生型菌株相比也有明显的降低。我们推测 CHU_1276 可能是位于外膜上的寡糖转运蛋白, 且其对低浓度葡萄糖有较高的亲和力^[22]。与 CHU_1276 缺失突变株表型类似, CHU_1277 失活突变株($\Delta I277$)表现出纤维素利用缺陷以及纤维寡糖利用能力的降低, 说明 CHU_1277 是影响 *C. hutchinsonii* 纤维素类底物利用的关键基因。 $\Delta I277$ 的内切纤维素酶酶活与野生菌株相比没有明显变化, 菌体表面 β -葡萄糖苷酶酶活下降 30%。HPLC 分析菌体对纤维二糖的水解发现 $\Delta I277$ 菌体的纤维二糖水解能力明显低于野生菌株, 与 $\Delta I277$ 利用纤维二糖的生长很弱相吻合。然而提取的 $\Delta I277$ 的外膜蛋白却表现出与野生菌株相似的 β -葡萄糖苷酶酶活和纤维二糖水解能力。这表明突变株细胞表面

的 β -葡萄糖苷酶并没有减少, 只是活力没有充分展现出来。因此, CHU_1277 对位于细胞表面的 β -葡萄糖苷酶的酶活充分发挥可能是必需的^[29]。

2.3 *C. hutchinsonii* 中运动相关蛋白

近年来在拟杆菌门(Bacteroidetes)中发现了一种新型的蛋白分泌系统, 命名为 IX 型分泌系统(T9SS), 该系统在其他门的菌中还未被发现^[30]。由 T9SS 分泌的蛋白 N 端均具有 Sec 依赖的 I 型信号肽, C 端含有保守结构域(CTDs), 使其可以被识别从而分泌至外膜上^[31]。对不运动的牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* 和运动菌 *Flavobacterium johnsoniae* 的 T9SS 研究发现, 该系统参与 *P. gingivalis* 中牙龈蛋白酶和其他毒力因子, 以及 *F. johnsoniae* 中细胞表面运动粘附素 SprB、RemA 和几丁质酶的分泌^[32]。*F. johnsoniae* 中的 T9SS 是由一些参与其滑动的 Gld 和 Spr 蛋白组成的。通过比较拟杆菌门 37 种菌的基因组发现, 滑动相关基因和 T9SS 相关基因是普遍存在的, 与其他菌分泌系统的各基因相似性不高。在 *F. johnsoniae* 中, GldK、GldL、GldM、GldN、SprA、SprE、SprF、SprT 分别对应于 *P. gingivalis* 的 PorK、PorL、PorM、PorN、PorW、PorP、PorT、Sov^[33]。编码 T9SS 组分的基因是滑动相关基因的子集, 暗示了分泌系统可能在运动中发挥作用, 例如 *sprT* 和 *sprA* 的缺失不仅影响 *F. johnsoniae* 的滑动性, 还影响 SprB 蛋白的定位以及菌体降解几丁质的能力^[32,34]。该系统的具体作用机制尚不清楚。

C. hutchinsonii 几乎含有 *F. johnsoniae* 中所有 Gld 和 Spr 蛋白编码基因的同源基因(表 2)^[34], 且 *C. hutchinsonii* 的运动及扩散表型与 *F. johnsoniae* 有很大的相似性, 所以推测两者可能具有类似的运动机制。此外, *C. hutchinsonii* 除运动系统外, 可能也存在一套类似的 T9SS 分泌系统, 并且该系统可能控制着纤维素酶及其他相关蛋白的分泌, 最终影响纤维素的降解。

C. hutchinsonii 中 *sprP* (CHU_0170)与 *P. gingivalis* 的 IX 型分泌系统(T9SS)中组分 PorP 有

表 2 拟杆菌门细菌中 *gld*、*spr* 和 *por* 基因的分布^[34]
 Table 2 The distribution of *gld*, *spr* and *por* genes in Bacteroidetes bacteria^[34]

	<i>F. joh</i>	<i>F. psy</i>	<i>C. hut</i>	<i>P. gin</i>	<i>P. int</i>	<i>P. dis</i>	<i>B. fra</i>	<i>B. the</i>
<i>gldA</i>	Fjoh_1516	FP0252	CHU_1545	PGN_1004	PIN_A1093	BDI_1335	BF2629	BT_0562
<i>gldB</i>	Fjoh_1793	FP2069	CHU_3691	PGN_1061	PIN_A1414	BDI_1780	BF0973	BT_4189
<i>gldC</i>	Fjoh_1794	FP2068	CHU_0945					
<i>gldD</i>	Fjoh_1540	FP1663	CHU_3683			BDI_1991		
<i>gldF</i>	Fjoh_2722	FP1089	CHU_1546					
<i>gldG</i>	Fjoh_2721	FP1090	CHU_1547					
<i>gldH</i>	Fjoh_0890	FP0024	CHU_0291	PGN_1566		BDI_1879	BF4095	BT_3818
<i>gldI</i>	Fjoh_2369	FP1892	CHU_3665	PGN_0743				
<i>gldJ</i>	Fjoh_1557	FP1389	CHU_3494	PGN_1676	PIN_A0879	BDI_3324	BF2407	
<i>gldK</i> (porK)	Fjoh_1853	FP1973	CHU_0171	PGN_1676	PIN_A0879	BDI_3324	BF2407	
<i>gldL</i> (porL)	Fjoh_1854	FP1972	CHU_0172	PGN_1675	PIN_A0878	BDI_3323	BF2931	
<i>gldM</i> (porM)	Fjoh_1855	FP1971	CHU_0173	PGN_1674	PIN_A0877	BDI_3322	BF2932	
<i>gldN</i> (porN)	Fjoh_1856	FP1970	CHU_2610	PGN_1673	PIN_A0876	BDI_3321		
<i>sprA</i> (sov)	Fjoh_1653	FP2121	CHU_0029	PGN_0832	PIN_A1146	BDI_2659		
<i>sprB</i>	Fjoh_0979	FP0016	CHU_2225	PGN_1317	PIN_A1872			
<i>sprE</i> (porW)	Fjoh_1051	FP2467	CHU_0177	PGN_1877	PIN_A2099	BDI_3149		
<i>porP</i>	Fjoh_3477	FP2412	CHU_0170	PGN_1677	PIN_A0880	BDI_3325		
<i>porQ</i>	Fjoh_2755	FP1713	CHU_2991	PGN_0645	PIN_0248	BDI_3738		
<i>port</i> (sprT)	Fjoh_1466	FP0326	CHU_2709	PGN_0778	PIN_A1079	BDI_1856		
<i>porU</i>	Fjoh_1556	FP1388	CHU_3237	PGN_0022	PIN_A0180	BDI_2576		
<i>porX</i>	Fjoh_2906	FP1066	CHU_1040	PGN_1019	PIN_A2097	BDI_3342	BF2968	BT_0818
<i>porY</i>	Fjoh_1592	FP2349	CHU_0334	PGN_2001	PIN_A0086	BDI_2438	BF0583	BT_1470

26%的序列一致性, 暗示其可能与哈氏菌的蛋白分泌有关。研究表明, *chu_0170* 缺失突变株在纤维素利用和滑动能力方面均出现缺陷, 而且胞外蛋白 CHU_3105 的分泌量有一定程度降低, 这也就说明了 SprP 可能在蛋白分泌的过程中行使功能^[35]。哈氏菌 T9SS 的另一组分 CHU_3237 (PorU)与 *P. gingivalis* 中鉴定的一种 C 端信号肽酶同源, *P. gingivalis* 中, 该肽酶负责降解 T9SS 底物的 C 端结构域(CTD)^[36]。敲除 *chu_3237* 后突变株在纤维素利用、运动和蛋白分泌方面均出现一定缺陷。因此, CHU_3237 是哈氏菌 T9SS 的重要组分, 而 T9SS 对

于哈氏菌纤维素利用和运动起重要作用^[37]。2012 年 Ji 等发现一个 *chu_0134* 基因(编码硫醇-二硫物异构酶)的转座插入失活突变株其菌体在琼脂表面的扩散及滑动性受到影响, 同时其纤维素吸附能力与野生型相比降低 50%, 发酵液以及全菌体内切葡聚糖酶活降低 40%^[38]。此外, *chu_1719* 编码 β 折叠类未知功能蛋白, 其结构相似性蛋白中包含 BamA 等一类与外膜蛋白装配相关的通道蛋白。该基因的插入失活可以导致其在滤纸或者球磨纤维素固体平板上生长状况弱于野生型, 但是其于可溶性碳源或者不溶性碳源的液体培养基上的生长不受影响。提

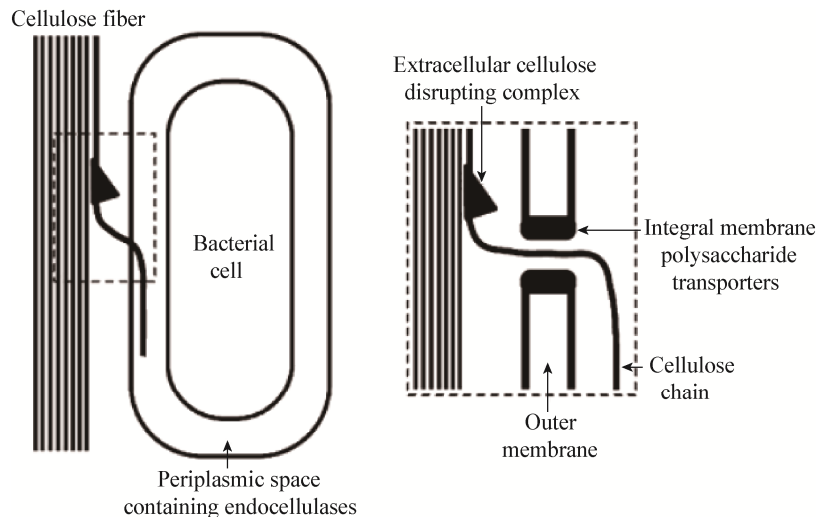


图3 *C. hutchinsonii* 中可能的纤维素降解机制^[5]

Figure 3 The predicted cellulose degradation strategy of *C. hutchinsonii*^[5]

取其外膜蛋白吸附纤维素后发现包括 GldJ 和 GldN 等滑动相关同源蛋白和 CHU_3434 存在缺失, 而 GldJ 和 GldN 在 *F. johnsoniae* 中被认为是 T9SS 分泌系统的重要组分, 说明 *chu_1719* 的缺失引起了其他 β -折叠类外膜蛋白的数量或者排列的变化^[39]。

虽然上述结果显示 *C. hutchinsonii* 的纤维素利用能力与其滑动能力可能存在某种联系, 但到目前为止还缺少足够的证据。我们通过转座突变筛选得到一系列纤维素利用缺陷型菌株, 这些菌株的转座插入基因功能上具有多样性, 而且大多数为未知功能的蛋白。通过对这些突变株进行滑动性分析发现, 有部分突变株丧失了滑动性, 但是大部分突变株仍可以在固体介质表面正常滑动。

2.4 *C. hutchinsonii* 降解纤维素的模式及展望

近年来, 随着 *C. hutchinsonii* 基因组测序工作的完成以及遗传学操作技术体系的建立完善^[35,37,40], 已有的实验结果暗示 *C. hutchinsonii* 可能存在独特的纤维素降解模式。2009 年 Wilson 等^[40]提出了第 3 种纤维素降解机制——细胞结合型非复合体纤维素降解酶系, 推测 *C. hutchinsonii* 细胞外膜上存在一个可以将纤维素链从纤维素的纤维中剥离出来的蛋白复合物, 在该复合物和细胞外膜通道蛋白的协同作用下将纤维素链运输到周质空间中, 最后通

过内切酶的作用将其降解(图 3)^[5,41]。这个模型的提出为我们对 *C. hutchinsonii* 的纤维素降解机制有了更直观的认识, 但机制模型中的一些细节需要进一步阐明, 如外膜上的蛋白复合物是一种什么样的组织架构? 这种架构如何实现纤维素链从结晶纤维素表面的有效剥离? 与降解相偶联的通道蛋白是如何发挥作用的? *C. hutchinsonii* 中是否存在 T9SS 系统? 相信对这些问题的回答不但可以丰富已有的纤维素降解理论机制, 而且可以为高效利用纤维素、加快纤维素的转化提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] Chandel AK, da Silva SS. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass Techniques, Applications and Commercialization[M]. Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher, 2013: 121-122
- [2] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [3] Xie G, Bruce DC, Challacombe JF, et al. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3536-3546
- [4] Walker E, Warren FL. Decomposition of cellulose by *Cytophaga*[J]. Biochemical Journal, 1938, 32(1): 31-43
- [5] Wilson DB. Three microbial strategies for plant cell wall degradation[J]. Annals of the New York Academy Sciences, 2008, 1125: 289-297
- [6] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(15): 7755-7760

- [7] Beguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(1): 25-58
- [8] Bhat S, Hutson RA, Owen E, et al. Determination of immunological homology between cellulosome subunits and cloned endoglucanases and xylanase of *Clostridium thermocellum*[J]. Anaerobe, 1997, 3(5): 347-352
- [9] Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives[J]. International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(6): 578-595
- [10] Maki M, Leung KT, Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(5): 500-516
- [11] Gomez del Pulgar EM, Saadeddin A. The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*[J]. Critical Review in Microbiology, 2013, 40(3): 236-247
- [12] Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, et al. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 521-554
- [13] Lamed R, Setter E, Bayer EA. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 156(2): 828-836
- [14] Bayer EA, Shimon LJ, Shoham Y, et al. Cellulosomes-structure and ultrastructure[J]. Journal of Structural Biology, 1998, 124(2/3): 221-234
- [15] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 2002, 66(3): 506-577
- [16] Chang WT, Thayer DW. The cellulase system of a *Cytophaga* species[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1977, 23(9): 1285-1292
- [17] Stanier RY. The *Cytophaga* group: a contribution to the biology of *Myxobacteria*[J]. Bacteriological Reviews, 1942, 6(3): 143-196
- [18] Zhu Y, Li H, Zhou H, et al. Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(16): 6432-6437
- [19] Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989: 32010-32138
- [20] Morrison M, Pope PB, Denman SE, et al. Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new?[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 358-363
- [21] Zverlov VV, Schwarz WH. Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems — *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125: 298-307
- [22] Zhou H. Study on the relevant genes in cellulose utilization and gliding motility of *Cytophaga hutchinsonii*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2014 (in Chinese)
周宏. *Cytophaga hutchinsonii* 纤维素利用及运动相关基因的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2014
- [23] Zhu YT. Study on the mechanism of cellulose utilization by *Cytophaga hutchinsonii*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2011 (in Chinese)
朱永涛. *Cytophaga hutchinsonii* 纤维素降解机制的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2011
- [24] Bi YL. Development of genetic manipulation system and screening mutants deficient in cellulose utilization in *Cytophaga hutchinsonii*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2013 (in Chinese)
毕言琳. *Cytophaga hutchinsonii* 遗传操作体系的构建及纤维素利用缺陷菌的筛选与鉴定[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2013
- [25] Anderson KL, Salyers AA. Biochemical evidence that starch breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* involves outer membrane starch-binding sites and periplasmic starch-degrading enzymes[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(6): 3192-3198
- [26] Anderson KL, Salyers AA. Genetic evidence that outer membrane binding of starch is required for starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(6): 3199-3204
- [27] Shipman JA, Berleman JE, Salyers AA. Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(19): 5365-5372
- [28] Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, et al. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(37): 24673-24677
- [29] Ji X, Wang Y, Zhang C, et al. A novel outer membrane protein involved in cellulose and cellobiosaccharide degradation by *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4511-4518
- [30] McBride MJ, Zhu Y. Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(2): 270-278
- [31] Shoji M, Sato K, Yukitake H, et al. Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21372
- [32] Nelson SS, Glocka PP, Agarwal S, et al. *Flavobacterium johnsoniae* SprA is a cell surface protein involved in gliding motility[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(19): 7145-7150
- [33] Shrivastava A, Johnston JJ, van Baaren JM, et al. *Flavobacterium johnsoniae* GldK, GldL, GldM, and SprA are required for secretion of the cell surface gliding motility adhesins SprB and RemA[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(14): 3201-3212
- [34] Sato K, Naito M, Yukitake H, et al. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(1): 276-281
- [35] Zhu Y, McBride MJ. Deletion of the *Cytophaga hutchinsonii* type IX secretion system gene sprP results in defects in gliding motility and cellulose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2): 763-775
- [36] Glew MD, Veith PD, Peng B, et al. PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(29): 24605-24617
- [37] Wang Y, Wang Z, Cao J, et al. FLP-FRT-Based method to obtain unmarked deletions of CHU_3237 (porU) and large genomic fragments of *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2014, 80(19): 6037-6045
- [38] Ji X, Xu Y, Zhang C, et al. A new locus affects cell motility, cellulose binding, and degradation by *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(1): 161-170
- [39] Zhou H, Wang X, Yang T, et al. Identification and characterization of a novel locus in *Cytophaga hutchinsonii* involved in colony spreading and cellulose digestion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6412-9
- [40] Xu Y, Ji X, Chen N, et al. Development of replicative oriC plasmids and their versatile use in genetic manipulation of *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 697-705
- [41] Wilson DB. The first evidence that a single cellulase can be essential for cellulose degradation in a cellulolytic microorganism[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(6): 1287-1288