



纤维素酶的糖基化

马亚楠, 王明钰*, 徐海

山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

摘要: 木质纤维素价格低廉, 供应充足, 且未得到充分开发利用。把纤维素降解成葡萄糖, 进而生产纤维素乙醇的技术已经进入商业应用阶段。提高纤维素酶的活性, 有利于充分利用自然界中大量存在的木质纤维素, 开发生物质资源, 以缓解能源危机。糖基化修饰对纤维素酶的活性、稳定性以及其他性质有着重要的影响。因此, 对纤维素酶糖基化的了解, 以及合理地改善糖基化修饰, 可以极大地提高木质纤维素降解速率, 有利于工业上液体燃料的生产。

关键词: 木质纤维素, 纤维素酶, 糖基化

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^[1]。把木质纤维素降解为液体燃料和大宗化学品, 既可以缓解石油等不可再生资源消耗, 又可以保护生态环境和减缓温室效应^[2]。在这项工程中, 纤维素酶的作用至关重要。纤维素酶不是一个单种酶, 而是参与纤维素降解的多组分酶的总称。在整个纤维素酶系的共同作用下, 才能完成天然纤维素的降解^[3]。为了提高纤维素转化为葡萄糖的效率, 需要了解纤维素酶活性的具体相关知识, 包括反应机制、有助于稳定性和活性的结构基序以及能够改变其功能的翻译后修饰。其中, 最常见但研究最少的翻译后修饰是真菌纤维素酶的糖基化。

1 纤维素酶的催化类别、糖基化类型及存在部位

目前, 用于生产纤维素酶的微生物菌种大多都是丝状真菌, 其中产酶活力较强的菌种为木霉属 (*Trichoderma*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*), 特别是里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 及其近缘菌株较为典型。纤维素酶是高度糖基化的, 主要包括三类: (1) 内切葡聚糖酶 (EG), 该酶在纤维素多糖链上的无定形部分的内部随机地切断糖苷键, 产生新的糖链末端, 或长度不一的纤维寡糖。(2) 外切葡聚糖酶, 包括纤维二糖水解酶 (CBH) 和 1,4- β -D-葡聚糖-葡萄糖水解酶等。外切纤

基金项目: 国家科技支撑计划(2014BAD02B07); 山东省重点研发计划(2016GSF121040)

*通信作者。Tel: +86-531-88362362; E-mail: wangmingyu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-12; 修回日期: 2017-03-21; 网络出版日期: 2017-03-29

纤维素酶在纤维素糖链的还原端或者非还原端以渐进的方式切割，释放出纤维二糖或葡萄糖。该酶在作用于微晶纤维素时，很可能从微晶纤维素中剥离出纤维素链并水解之。(3) β -葡萄糖苷酶(BGL)， β -葡萄糖苷酶水解可溶性的纤维糊精或纤维二糖生成葡萄糖。其中外切葡聚糖酶中的纤维二糖水解酶(CBHI)占纤维素酶分泌量的50%–60%。CBHI是1个多模块结构，包括催化结构域(CD)、碳水化合物结合结构域(CBM)，两者之间由柔性肽(linker)连接^[4]。

真核生物中50%的蛋白质都存在糖基化作用，它在丝状真菌分泌纤维素酶中起着重要的作用。糖基化是在蛋白质上以生化的方式附加上糖基的过程，在真菌中分为两大类：*N*-连接糖基化和*O*-连接糖基化^[5]。在真核细胞中，*N*-糖基化已经被很好地研究，它涉及到1个保守机制：在内质网上，GlcMan₉GlcNAc₂-多帖醇磷酸被转移到新生多肽的Asn-X-Ser/Thr保守序列的天冬酰胺残基上(X可以是除脯氨酸以外的任意氨基酸)^[6]。内质网和高尔基体的各种酶将进一步修改这些糖链使之形成不同的结构。*N*-连接糖基化发生在CD结构域。

不像*N*-连接糖基化，*O*-连接糖基化没有基本

的核心结构和通用的基序。真菌的*O*-连接糖基化通常开始于单个的 α -甘露糖基并作用于丝氨酸或者苏氨酸的 β -羟基，然后在高尔基体上进行结构延伸^[7]。*O*-连接糖基化主要发生在CBM结构域和linker结构域。

2 *N*-连接糖基化

2.1 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)

2.1.1 里氏木霉纤维二糖水解酶 TrCBHI 的 *N*-糖基化：里氏木霉不仅是重要的纤维素酶工业高产菌株，而且是一种生产纤维素酶的模式菌株。里氏木霉的优点在于其纤维素酶活力高，并且能产生大量的胞外蛋白。它的酶系中60%以上都是纤维二糖水解酶(CBHI)，其对结晶性纤维素有很强的降解能力。

催化结构域的*N*-连接糖基化随着生长条件的不同，结构会有很大的差异。其中，糖切酶对不同*N*-糖链结构起着重要的作用^[6]。如图1所示，TrCBHI的催化区域(CD)中有4个Asn-X-Ser/Thr基序，其中Asn45、Asn270、Asn384被认为是3种天然的糖基化位点^[8]。*N*-糖基化对TrCBHI的活性以及一些其他的性质有着重要的影响。

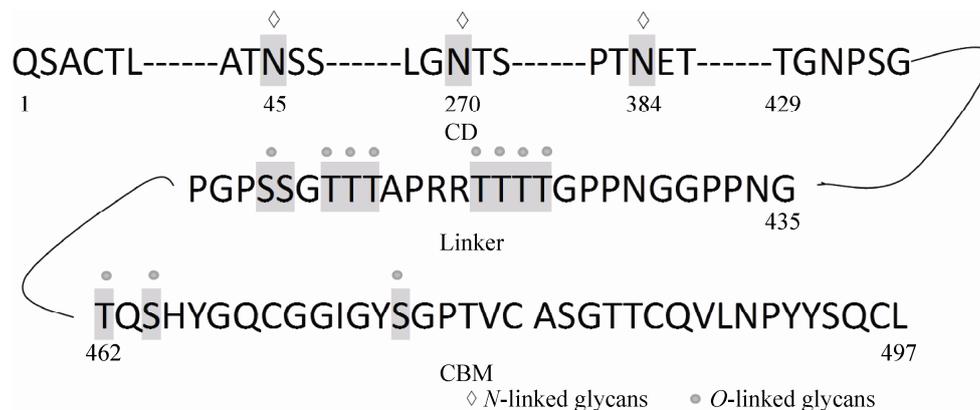


图1. TrCBHI的氨基酸序列及其糖基化位点^[8]

Figure 1. Amino acid sequence of TrCBHI and locations of glycosylation sites. Shaded characters represent the locations of glycosylation sites^[8].

N-糖基化对 TrCBHI 的催化活性有着重要的影响, 并随着糖基化的位点不同、数目不同和糖链的结构不同, 其催化活性有显著的差异。糖基化既可以促进 TrCBHI 的催化活性, 又可以阻碍其催化活性^[9-13]。如 William 等^[9]把 TrCBHI 的 N384 突变后, 发现突变体对纤维素的水解活性提升了 70%, 而其他糖基化位点的突变体都有一定程度的降低。由此说明, 不同糖基化位点及糖链大小会影响酶的催化活性。N384 由于其糖链较大, 在催化域和纤维素表面形成不必要的空间而阻碍了 TrCBHI 的催化效率。另外, 还有一些推测认为 *N*-糖链中的电荷也会影响酶的活性, 但是还没有进一步的证实。

纤维素酶的热稳定性是一个重要的性质, 因为酶在高温条件下的稳定性能够保证生物工艺更快更容易地进行^[14]。William 等^[9]对糖基化位点定点突变后, 发现 Asn384 的糖基化对 TrCBHI 的热稳定性有重要影响。这个论点被最近的研究证实, Feifei Qi 等^[11]对 *N*-糖基化位点分别进行单点突变 (M45, M270, M384)、两点突变 (M45M270, 称为 MD1; M45M384, 称为 MD2)、三点突变 (MT), 发现只有 M384、MD2、MT 的热转变温度比 WT CBHI 低大约 2 °C。

另外, *N*-糖基化还会影响 CBHI 的完整性及其分泌。有研究表明^[11], Asn384 会影响 CBHI 的二级结构完整性, 当消除 3 个糖基化位点, 会引导未折叠蛋白反应 (UPR), 并且钙连接蛋白基因缺陷菌株中分泌的 CBHI 变体受到严重损害。

2.1.2 里氏木霉内切葡聚糖酶 TrEGI 的 *N*-糖基化: 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中对 EGI 的糖基化研究较少。在 *T. reesei* 的纤维素酶系中, EG 占分泌量的 10%–15%, 而 EGI 在 EG 中占主要部分。Garcia 等^[15]用荧光辅助碳水化合物电泳 (FACE) 和

ES/MS 结合的方法研究并初步确定了 TrEGI 中的 *N*-糖基化符合 $\text{Man}_{7-9}\text{-PO}_3\text{H-GlcNAc}_2$ 的结构形式。但并未对糖基化的作用和性质进行进一步研究。

2.2 斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) 纤维二糖水解酶 I (CBHI) 的 *N*-连接糖基化

青霉属丝状真菌, 不仅能分泌比较全的降解木质纤维素的酶系, 而且青霉的生长速度较木霉快, 其纤维素酶在 50 °C 下具有比木霉更好的热稳定性。这些特性使得青霉在纤维素乙醇工业应用中具有一定的优势。

山东大学微生物技术国家重点实验室曲音波等^[16]研究了 CBHI 中 *N*-糖基化的位点、糖链长度以及对酶性质的影响。在此项研究中, 发现了一个有趣的现象, 在 Asn-137 位点有 4 个不同的糖型, 它们共享 1 个多肽核心, 并且其糖链符合 $(\text{Hex})_x+(\text{HexNAc})_y(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ 的结构形式。更有趣的是 4 个糖型中的 CBHI-A 对羧甲基纤维素、*p*NPC (对硝基苯纤维二糖) 和水杨苷均没有水解活性, 但是能使商业化的纤维素酶增效, 使葡萄糖释放量提高 60%, 这也为纤维素酶工程提供了新视角。

2.3 疣孢青霉 (*Penicillium verruculosum*)

2.3.1 疣孢青霉纤维二糖水解酶 PvCBHI 的 *N*-糖基化: 有研究^[17]表明疣孢青霉分泌的纤维素酶混合物中, CBHI 占其分泌总量的 35%。并且相对于 TrCBHI, PvCBHI 水解微晶纤维素的活性更高。

PvCBHI 的 *N*-连接糖链有着可变的高甘露糖寡糖链, 符合 $(\text{Man})_{0-13}(\text{GlcNAc})_2$ 或者是单个 GlcNAc 残基的结构形式。其 *N*-糖基化对酶活的最适 pH 和酶的热稳定性均没有显著的影响, 但是影响对微晶纤维素的吸附能力以及对天然或合成底物的活性。不仅如此, *N*-糖基化还会显著影响

酶对微晶纤维素和磨山杨木的水解速率^[4]。另外, Dotsenko 等^[4]通过模拟 PvCBHI 催化结构域的 3D 结构, 详细阐明了 N-连接糖链的空间位阻效应对酶活和其他性质的影响。

2.3.2 疣孢青霉内切葡聚糖酶 PvEGII 的 N-糖基化: PvEGII 具有 3 个潜在的糖基化位点: Asn19、Asn42 和 Asn194。MALDI-TOF 质谱肽指纹图谱表明, Asn42 和 Asn194 的 N-糖链有着可变的寡糖结构, 并符合 $(\text{Man})_{1-9}(\text{GlcNAc})_2$ 的结构形式^[18]。并且其 N-糖基化对酶的热稳定性没有显著影响, 但能轻微地改变酶活的最适 pH, 并且对羟甲基纤维素和 β -糖链的水解有显著影响。

3 O-连接糖基化

3.1 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)

3.1.1 O-连接糖基化对 TrCBHI 碳水化合物结合区域(CBM)的影响: TrCBHI 的 CBM 是纤维素的吸附区域, 也是保证纤维素酶能最大程度发挥其效率的关键。如图 2 所示, CBM 是肽链折叠成的 1 个半胱氨酸节的结构, 在其平面上暴露出 3 个酪氨酸残基, 并且含有 2 条反向平行的

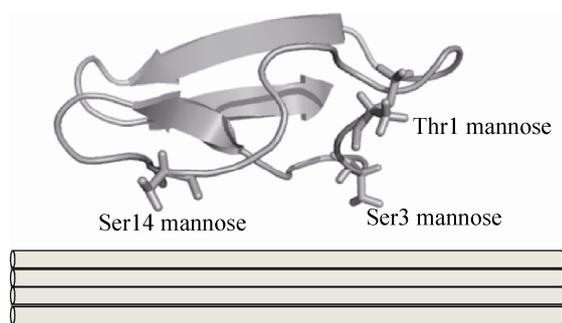


图 2. TrCel7A CBM 结合到结晶纤维素上的 O-糖基化视图

Figure 2. Visualization of O-glycosylation of the TrCel7A CBM bound to crystalline cellulose.

β -sheets^[19]。糖链距离 CBM 结合表面的远近可能会影响其与纤维素的作用。Taylor 等^[20]研究表明在 CBM 和纤维素结合的表面中确实有 2 个氨基酸被 O-糖基化(Thr-1 和 Ser-3), 糖链包含 1-3 个甘露糖残基。但是, Ser-14 是一个高度保守的苏氨酸/丝氨酸残基, 它也接近 CBM 的结合界面。由此推测它可能也被糖基化, 尽管还没有实验数据证实。

为了研究 O-糖基化对 CBM 吸附活性的影响, 在 Thr1、Ser3、Ser14 上各添加 1 个甘露糖残基, 发现 Thr1 对 CBM 的吸附活性无显著影响, 而 Ser3 和 Ser14 的影响较显著^[20]。为了进一步研究糖链的数目及密度对 CBM 性质的影响, Tan 等^[21]用 9-芴甲氧羰基-多肽固相合成法(SPPS)法化学合成了 20 种 TrCBHI CBM 的糖型, 结果表明在 3 个潜在的糖基化位点上通过与单个甘露糖共价结合的糖型, 能最大程度地提高吸附活性。同时也发现 Ser3 对吸附性的影响最显著, 其次是 Ser14, 最后是 Thr1; 另外, 随着糖链密度的增加, 其抗蛋白酶水解能力也会增强; 最后, Tan 等的结果还表明, Ser3 的糖基化对 CBM 热稳定性的提高有着重要的影响, 在 Ser3 位点上添加 2 个甘露糖残基, 使其熔化温度提高 11 °C。因此, 在特定的糖基化位点上大小合适的糖链会使 TrCBHI CBM 的吸附活性提高, 并对稳定性及其他性质有益。

3.1.2 O-连接糖基化对 TrCBHI 柔性连接肽(Linker)的影响: TrCBHI 的 CD 结构域和 CBM 结构域之间连接着 1 个柔性肽, 柔性肽区域有重要功能。它不仅可以作为 CD 和 CBM 区域的隔离, 而且还是 CBM 吸附纤维素性能的延伸, 并且也有助于热稳定性的提高^[22]。TrCBHI 的连接肽富含丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸和脯氨酸, 丝氨酸/苏氨酸残基通常是高度 O-糖基化的, 而柔性连接肽区域

缺少 Asn-X-Ser/Thr 基序, 至今也没有关于包含 *N*-连接糖链的报道^[6]。另外, 由于连接肽缺少芳香性和疏水性残基, 因此能防止疏水性蛋白质折叠^[23]。有研究^[24]表明 Linker 的 *O*-糖基化会改变柔性肽的刚性, 占用更多的空间, 防止形成二级结构。而连接肽刚性的改变也会影响纤维素酶的水解速率^[25]。虽然柔性连接肽糖基化的研究报道较少, 但是连接肽的糖基化在提高纤维素酶活性上也有着重要的作用。

3.2 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)纤维二糖水解酶 I(CBHI)的 *O*-连接糖基化

丝状真菌粗糙脉孢菌作为生化遗传学和生物学的模式生物, 被研究超过 90 年。它已有 1 个近乎完整的基因敲除库, 可作为广泛使用的遗传工具。因此, 研究该菌的 *O*-糖基化非常有价值。通过胰蛋白酶水解, 提取肽段后用 LC-MS 进行 *O*-糖链结构分析, 发现粗糙脉孢菌 CBHI 的 *O*-糖链有二糖、三糖和四糖。并且 *O*-糖链有 6 种线型, 其中有 3 种分支型, 包含大约相等的甘露糖和半乳糖。除此之外, 在粗糙脉孢菌 CBHI 中还鉴定出了半乳糖还原末端, 由此确定了蛋白-*O*-半乳糖基转移酶的存在^[7]。

4 糖基化的研究方法

随着科学技术的发展和仪器设备的更新, 对纤维素酶糖基化的研究方法也在不断进步。以前研究纤维素酶 *N*-糖基化主要是用肽 *N*-糖苷酶 F(PNGase)处理释放的糖链, 再用荧光辅助碳水化合物电泳(FACE)和 NH₂-HPLC 分析碎片, 最后用相对迁移率进行寡糖成分分配。并结合 ES/MS 鉴别蛋白质片段中糖基化的分布和不同糖型的相对数量^[15]。

现在对蛋白质进行分析和研究, 多采用“自下而上”研究策略。对于 *N*-糖基化位点的确定, 先用蛋白酶降解糖蛋白, 产生糖蛋白肽质量指纹谱; 再用肽-聚糖酶 F 对糖链切除, 使含肽片分子量发生变化。在 MALDI-TOF-MS 上, 含糖肽段会发生位移, 证明其肽段含有糖基化位点, 该位点还可采用串联质谱测序来确定; 对于糖链分子量的测定, 可以通过切除糖链前后糖蛋白的分子差来确定; 最后, 通过负离子方式的串联质谱测定切除下来的糖链的碎片离子峰, 并结合辅助分析软件(如 Micromass 的 Glyco Tool)可以测定糖链的结构(糖链序列)^[3]。

5 小结和展望

纤维素酶的糖基化随着异源表达^[10]、环境条件^[26]的不同, 吸附能力和活性也会发生改变。常用的表达寄主有: 变灰青霉(*Penicillium canescens* PCA10 (*niaD*-) strain)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等。迄今为止, 由于 *N*-糖基化有核心的结构和通用的基序, 因此对纤维素酶的 *N*-糖基化研究较多, 且主要研究分泌量较多且较为重要的外切葡聚糖酶(CBHI)。从近些年的研究表明, *N*-糖链不是具有高分支的甘露糖就是单个 GlcNAc 残基, 而 *O*-糖链并不确定, 一般是 1-3 个甘露糖残基^[8]。但最新的研究^[27]表明 TrCBHI 的 *O*-糖链中含有葡萄糖醛酸, 这也是第一次报道 *O*-糖链中含有酸性糖。另外, 对于 *O*-糖基化, CBM 上的 *O*-糖基化研究较多, 而连接肽上糖基化研究较少。

从研究方法上来看, 在研究 *N*-糖基化对纤维素酶的影响时, 主要是通过加糖基化或去糖基化的方式。去糖基化主要有两种途径: 其一, 主要

是把天冬酰胺突变成丙氨酸、天冬氨酸、谷酰胺；其二,用糖类内切酶H或者肽N-糖苷酶F(PNGase)处理移除N-糖基化。而加糖基化时,主要是通过创造识别基序Asn-X-Ser/Thr来完成。但是从整体上来看,大多数的研究方法都遵循“不是就是”的原则,而忽略了加糖基化和去糖基化引起的结构变化对酶功能的影响。另外,由于CBM表面的糖基化能显著影响酶的吸附性,我们可以尝试在CBM的结合界面进行糖基化的有益修饰。本实验室在研究蛋白质组学时,发现里氏木霉CBHII上存在糖基化修饰。我们将会利用串联质谱进一步研究主要纤维素酶的糖基化位点及糖链形式。

近些年对纤维素酶糖基化的研究发现,糖基化修饰对纤维素酶的活性和一些其他的性质(如稳定性等)有着重要的作用。目前,为了有效地利用生物质资源,科学家们已在木质纤维素原料的预处理以及木质纤维素降解酶系合成的调节和控制上做出了很大努力,而通过改善纤维素酶的糖基化来提高降解转化速率无疑是一个新思路。此外,糖蛋白组学作为一门新兴学科,不仅是蛋白质组学的延伸,而且为蛋白质功能的多样性以及糖的生物学功能的研究拓宽了视野。因此,只要我们对纤维素酶的糖基化作合理的修饰,就有可能极大地改善纤维素酶的活性,从而提高纤维素酶对木质纤维素的水解效率,进而生产纤维素乙醇等可再生的液体燃料,实现能源的可持续发展。

参考文献

- [1] Jouzani GS, Taherzadeh MJ. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2015, 2(1): 152–195.
- [2] Gusakov AV. Cellulases and hemicellulases in the 21st century race for cellulosic ethanol. *Biofuels*, 2013, 4(6): 567–569.
- [3] Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 33: 188–203.
- [4] Dotsenko AS, Gusakov AV, Volkov PV, Rozhkova AM, Sinitsyn AP. N-linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(2): 283–291.
- [5] Hadden JA. Understanding the role of glycosylation in the thermostability of CEL7A. *Biophysical Journal*, 2015, 108(2): 520a–521a.
- [6] Greene ER, Himmel ME, Beckham GT, Tan ZP. Glycosylation of cellulases: Engineering better enzymes for biofuels. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2015, 72: 63–112.
- [7] Tang SL, Bubner P, Bauer S, Somerville CR. O-Glycan analysis of cellobiohydrolase I from *Neurospora crassa*. *Glycobiology*, 2016, 26(6): 670–677.
- [8] Harrison MJ, Nouwens AS, Jardine DR, Zachara NE, Gooley AA, Nevalainen H, Packer NH. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 256(1): 119–127.
- [9] Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou YC, Baker JO, Michener W, Brunecky R, Himmel ME. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose*, 2009, 16(4): 699–709.
- [10] Jeoh T, Michener W, Himmel ME, Decker SR, Adney WS. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnology for Biofuels*, 2008, 1(1): 10.
- [11] Qi FF, Zhang WX, Zhang FJ, Chen GJ, Liu WF. Deciphering the effect of the different N-glycosylation sites on the secretion, activity, and stability of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(13): 3962–3971.
- [12] Wu GC, Wei LG, Liu WF, Lin JQ, Wang LS, Qu YB, Zhuang GQ. Asn64-glycosylation affects *Hypocrea jecorina* (syn. *Trichoderma reesei*) cellobiohydrolase Cel7A activity expressed in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(2): 323–328.
- [13] Siadat SOR, Mollasalehi H, Heydarzadeh N. Substrate affinity and catalytic efficiency are improved by decreasing

- glycosylation sites in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 483–488.
- [14] Trudeau DL, Lee TM, Arnold FH. Engineered thermostable fungal cellulases exhibit efficient synergistic cellulose hydrolysis at elevated temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(12): 2390–2397.
- [15] García R, Cremata JA, Quintero O, Montesino R, Benkestock K, Ståhlberg J. Characterization of protein glycoforms with N-linked neutral and phosphorylated oligosaccharides: studies on the glycosylation of endoglucanase 1 (Cel7B) from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2001, 33(2): 141–152.
- [16] Gao L, Gao F, Wang LS, Geng CL, Chi LL, Zhao J, Qu YB. N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and synergism of nonhydrolytic glycoform in cellulose degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15906–15915.
- [17] Morozova VV, Gusakov AV, Andrianov RM, Pravilnikov AG, Osipov DO, Sinitsyn AP. Cellulases of *Penicillium verrucosum*. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(8): 871–880.
- [18] Dotsenko AS, Gusakov AV, Rozhkova AM, Sinitsyna OA, Nemashkalov VA, Sinitsyn AP. Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verrucosum*. *Protein Engineering Design & Selection*, 2016, 29(11): 495–502.
- [19] Kraulis PJ, Clore GM, Nilges M, Jones TA, Pettersson G, Knowles J, Gronenborn AM. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 1989, 28(18): 7241–7257.
- [20] Taylor CB, Talib MF, McCabe C, Bu LT, Adney WS, Himmel ME, Crowley MF, Beckham GT. Computational investigation of glycosylation effects on a family 1 carbohydrate-binding module. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(5): 3147–3155.
- [21] Chen L, Drake MR, Resch MG, Himmel ME, Chaffey PK, Beckham GT, Tan Z. Specificity of O-glycosylation in enhancing the stability and cellulose binding affinity of Family 1 carbohydrate-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21): 7612–7617.
- [22] Zhao XC, Rignall TR, McCabe C, Adney WS, Himmel ME. Molecular simulation evidence for processive motion of *Trichoderma reesei* Cel7A during cellulose depolymerization. *Chemical Physics Letters*, 2008, 460(1/3): 284–288.
- [23] Sammond DW, Payne CM, Brunecky R, Himmel ME, Crowley MF, Beckham GT. Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: insights from sequence analysis, biophysical measurements, and molecular simulation. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48615.
- [24] Beckham GT, Bomble YJ, Matthews JF, Taylor CB, Resch MG, Yarbrough JM, Decker SR, Bu LT, Zhao XC, McCabe C, Wohler J, Bergenstråhle M, Brady JW, Adney WS, Himmel ME, Crowley MF. The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. *Biophysical Journal*, 2010, 99(11): 3773–3781.
- [25] Ting CL, Makarov DE, Wang ZG. A kinetic model for the enzymatic action of cellulase. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(14): 4970–4977.
- [26] Stals I, Sandra K, Devreese B, Van Beeumen J, Claeysens M. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. II: N-glycosylation of Cel7A core protein isolated from different strains. *Glycobiology*, 2004, 14(8): 725–737.
- [27] Ashwood C, Abrahams JL, Nevalainen H, Packer NH. Enhancing structural characterisation of glucuronidated O-linked glycans using negative mode ion trap-HCD mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017, DOI: 10.1002/rcm.7851.

Progress in cellulase glycosylation

Yanan Ma, Mingyu Wang^{*}, Hai Xu

State Key Laboratory for Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

Abstract: Lignocellulose is a cheap, abundant and underutilized bioresource. Cellulases can break down cellulose into glucose that could further be fermented to bioethanol, thus has commercial potentials. The improvement of cellulase production helps the use of the abundantly available lignocellulose, benefits the further exploration of the potential of bioenergy, and assists the relief of the energy crisis. However, glycosylation has an important influence on catalytic activity, thermal stability and other properties. Therefore, the detailed knowledge on cellulase glycosylation is required. Reasonably manipulating cellulase glycosylation modifications can accelerate the hydrolysis of lignocellulose, and contribute to produce liquid biofuels.

Keywords: lignocellulose, cellulase, glycosylation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Technology Research and Development Program of China (2014BAD02B07) and by the Shandong Province Key Research and Development Program (2016GSF121040)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-531-88362362; E-mail: wangmingyu@sdu.edu.cn

Received: 12 December 2016; Revised: 21 March 2017; Published online: 29 March 2017