



# 读书报告

汇报人：赵卓丽 汇报日期：2018-10-14



## Functional metagenomics reveals abundant polysaccharide-degrading gene clusters and cellobiose utilization pathways within gut microbiota of a wood-feeding higher termite

Ning Liu<sup>1,2,3</sup> · Hongjie Li<sup>4,5</sup> · Marc G. Chevrette <sup>5,6</sup> · Lei Zhang<sup>2</sup> · Lin Cao<sup>1</sup> · Haokui Zhou<sup>7</sup> · Xuguo Zhou <sup>8</sup> · Zihua Zhou<sup>2</sup> · Phillip B. Pope <sup>9</sup> · Cameron R. Currie<sup>4,5</sup> · Yongping Huang<sup>1</sup> · Qian Wang<sup>1,10</sup>

Received: 27 March 2018 / Revised: 16 July 2018 / Accepted: 20 July 2018

© The Author(s) 2018. This article is published with open access

功能宏基因组学揭示木材喂养的高等白蚁的肠道微生物群内丰富的多糖降解基因簇和纤维二糖利用途径



# CONTENTS

- 1. Introduction**
- 2. Materials and methods**
- 3. Results and discussion**
- 4. Conclusion**

01

# Introduction

# Introduction



白蚁在降解顽固性木质生物量方面非常有效。它们通过共生的肠道微生物菌群每小时消化**74-99%**的膳食纤维素，从而对亚热带森林的碳循环产生重大影响。

termite gut “**omics**” studies —— 丰富的**碳水化合物活性酶**参与植物生物量解构

## 木材颗粒消化

wood-feeding “**lower**” termites 双重纤维素分解系统-纤维素分解性鞭毛虫和细菌

“**higher**” wood-feeding termites (family Termitidae)

无肠道鞭毛虫、依靠肠道**原核微生物**

**肠道微生物菌群功能?**

# Introduction

**植物细胞壁多糖**是自然界中最丰富但顽固的有机碳源。存在于草食性双翅目消化道中的微生物在将多糖解聚成可发酵糖方面特别有效。

“**higher**” wood-feeding termites (family Termitidae)

**肠道微生物高效利用多糖的机制?**

**纤维溶解基因组织和酶学?**

**尚未在肠道生态系统中发现用于快速木质纤维素解构的降解策略**

牛瘤胃、袋鼠、人类远端肠道、海洋环境...普遍存在编码多酶复合物的纤维溶解基因簇即纤维小体系统和多糖利用基因座系统(PULs), 是**有效的植物生物量降解系统**。



# Introduction

**大规模功能筛选**

**焦磷酸测序**

**酶学**

**研究对象:** *Globitermes brachycerastes* (family: Termitidae subfamily: Termitinae)

**探索肠道微生物菌群中的多种聚糖降解酶相关的生物化学活性和模块化结构**

- i) 将白蚁肠道宏基因组DNA克隆到fosmid载体, 进行50000个fosmid克隆功能筛选;
- ii) 对检索到的总共464个具有木质纤维素分解活性的阳性克隆进行测序;
- iii) 通过计算机分析鉴定出推定的CAZyme基因;
- iv) 发现了丰富的多糖降解基因簇和纤维二糖利用途径;
- v) 功能性分析木聚糖酶簇;
- vi) 多种纤维二糖降解酶功能验证。

02

## Materials and methods



# Materials and methods



*Globitermes brachycerastes*:

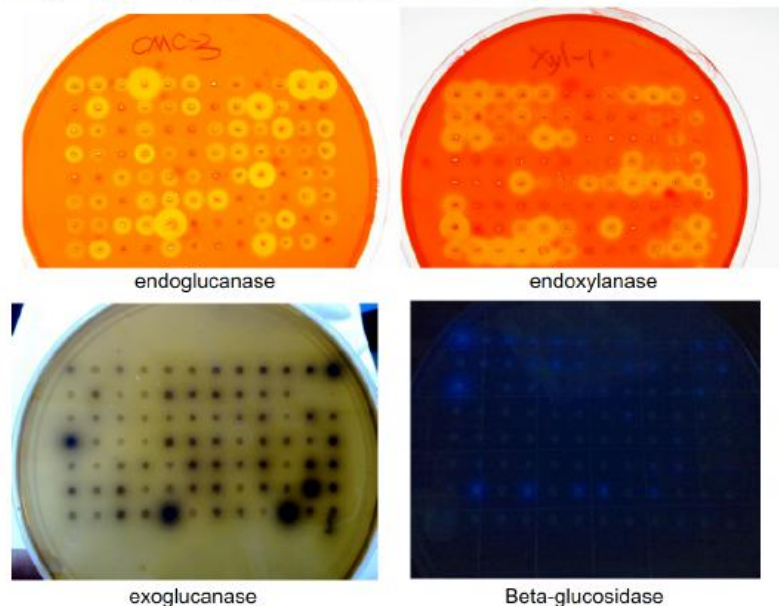
中国云南省西双版纳一个森林地区 全肠样品

细菌群落组成分析 16S V3区

CopyControl™ pCC2FOS™ fosmid library production kit (Epicentre, USA)

含有约50000个Fosmid克隆，保存在130个384孔微量滴定板中，-80°C保存。

Figure S1. Functional screen of fosmid clones for the four major hydrolases activities including endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase and endoxylanase.



四种主要水解酶活性的功能筛选：

内切葡聚糖酶-68个

外切葡聚糖酶-15个

$\beta$ -葡萄糖苷酶-40个

木聚糖内切酶-50个

454焦磷酸测序、功能基因分析

# Materials and methods

Contig00057

1个典型木聚糖酶基因簇-GH10  
3个纤维二糖代谢基因-GH1、GH4、GH94

异源表达-原核

PCR扩增目的基因—纯化PCR产物—双限制酶消化—连接到用相同的限制酶处理的pET-28a(+)或pET-22a(+)中—重组质粒转化到E.coli BL21 —37°C, LB-抗生素平板生长—诱导、纯化和定量重组蛋白—咪唑洗脱蛋白

酶学性质测定

核苷酸登录号

03

## Results and discussion



# Results and discussion

## Bacterial diversity

**Table 1** Community composition of *G. brachycerastes* revealed by V3 region of 16S rRNA genes

Phylum	Reads of V3	Percentage
Spirochaetes 螺旋菌门	970	77.23
Firmicutes 厚壁菌门	54	4.30
Fibrobacteres 纤维杆菌门	50	3.98
Bacteroidetes 拟杆菌门	33	2.63
Candidate_phylum_TG3	29	2.31
Proteobacteria	13	1.04
Chlorobi	10	0.80
Synergistetes	5	0.40
Acidobacteria	4	0.32
Candidate_phylum_SR1	1	0.08
unclassified	87	6.93
	1256	100

在门水平上，Spirochaetes和Fibrobacteres的丰度较高，这样的细菌群落结构与 *Nasutitermes* termites (higher wood-feeding termites) 相似，而 Firmicutes 的高丰度是与常见的以真菌、腐殖质、土壤为食的摄食者的情况存在差异的。

在Spirochaetes水平下，*G. brachycerastes*与 *Nasutitermes* spp. 的优势类群（属水平）也存在很大的差异。（Table S1）

研究结果表明，肠道细菌群落不仅构成了宿主的饮食专业化，而且在相同饮食习惯中发现细菌的属级谱系方面也存在很大差异。

# Results and discussion

## Function-based screening and pyrosequencing revealing the adaptation of woody diet in the *Globitermes* termite gut metagenome

50000 fosmid clones

464个阳性克隆，包括267个内切葡聚糖酶阳性克隆，24个外切葡聚糖酶阳性克隆，72个 $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆和101个内切木聚糖酶阳性克隆。

功能筛选底物：羧甲基纤维素，4-甲基伞形基-b-D-纤维二糖苷（4-MUC），七叶苷水合物，柠檬酸铁铵和桦木木聚糖

173个具有双酶特异性或变异活性水平的阳性 fosmid 克隆

内切葡聚糖酶-68个  
外切葡聚糖酶-15个  
 $\beta$ -葡萄糖苷酶-40个  
木聚糖内切酶-50个

454焦磷酸测序—组装—注释后，获得包含4.67Mbp数据的611个contig，其包括154个编码预测的CAZymes的contig。



# Results and discussion

## *G. Brachycerastes* 肠道微生物数据集中鉴定了来自30个不同CAZy家族的219个推定CAZyme基因

**Table 2** Statistics of putative plant fibrolytic genes from 173 sequenced fosmids

CAZy family	Known activity	Gene No.	CAZy family	Known activity	Gene No.																																								
<b>Cellulases family</b>																																													
Cellulases family	GH1	beta-glucosidase, 6-phospho-beta-glucosidase	GH1	beta-glucosidase, beta-D-xylosidase, beta-N-acetylhexosaminidase	31																																								
						GH4	6-phospho-beta-glucosidase	GH4	endoglucanase	65																																			
											GH9	endoglucanase	GH9	endoglucanase	7																														
																GH44	endoglucanase	GH44	endoglucanase	1																									
																					GH45	endoglucanase	GH45	endoglucanase	2																				
																										GH94	cellobiose phosphorylase, chitobiose phosphorylase	GH94	cellobiose phosphorylase, chitobiose phosphorylase	12															
																															GH2	beta-mannosidase	GH2	beta-mannosidase	2										
																																				GH8	endo-1,4-beta-xylanase	GH8	endo-1,4-beta-xylanase	4					
																																									GH10	endo-1,4-beta-xylanase	GH10	endo-1,4-beta-xylanase	24
GH26	beta-mannanase	GH26	beta-mannanase	3																																									
					GH29	alpha-L-fucosidase	GH29	alpha-L-fucosidase	1																																				
										GH30	glucuronarabinoxylan endo-1,4-beta-xylanase	GH30	glucuronarabinoxylan endo-1,4-beta-xylanase	3																															
															GH31	alpha-xylosidase	GH31	alpha-xylosidase	2																										
																				GH39	xylan 1,4-beta-xylosidase	GH39	xylan 1,4-beta-xylosidase	2																					
																									GH43	alpha-N-arabinofuranosidase	GH43	alpha-N-arabinofuranosidase	6																
																														GH51	alpha-L-arabinofuranosidase	GH51	alpha-L-arabinofuranosidase	1											
																																			GH53	arabinogalactan Endo-1,4-beta-galactosidase	GH53	arabinogalactan Endo-1,4-beta-galactosidase	2						
																																								GH67	alpha-glucuronidase	GH67	alpha-glucuronidase	1	
																																													GH74
GH95	alpha-L-fucosidase	GH95	alpha-L-fucosidase	3																																									
					GH115	xylan alpha-1,2-glucuronidase	GH115	xylan alpha-1,2-glucuronidase	1																																				
										CE1	acetyl xylan esterase	CE1	acetyl xylan esterase	4																															
															CE4	acetyl xylan esterase	CE4	acetyl xylan esterase	1																										
																				CE6	acetyl xylan esterase	CE6	acetyl xylan esterase	1																					
																									<b>Pectinase family</b>																				
																									GH105	unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase	GH105	unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase	GH105	unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase	2														
																																PL1	pectate lyase	PL1	pectate lyase	PL1	pectate lyase	3							
																																							PL11	rhamnogalacturonan endolyase	PL11	rhamnogalacturonan endolyase	PL11	rhamnogalacturonan endolyase	

研究结果表明富含糖苷水解酶，攻击*G. brachycerastes*中纤维素和半纤维素的骨架，包括来自GH3, GH5, GH10和GH11的成员，这些成分大部分类似于*Nasutitermes* spp.

而CAZyme剖面与真菌喂养的*Odontotermes yunnanensis*与*Macrotermes natalensis*，粪便喂养的*Amitermes wheeleri*的微生物菌群观察到的差别很大，后者倾向于参与纤维寡糖的分解和半纤维素的短链和侧链。

白蚁肠道微生物群落的功能特征可能与饲养方式有关

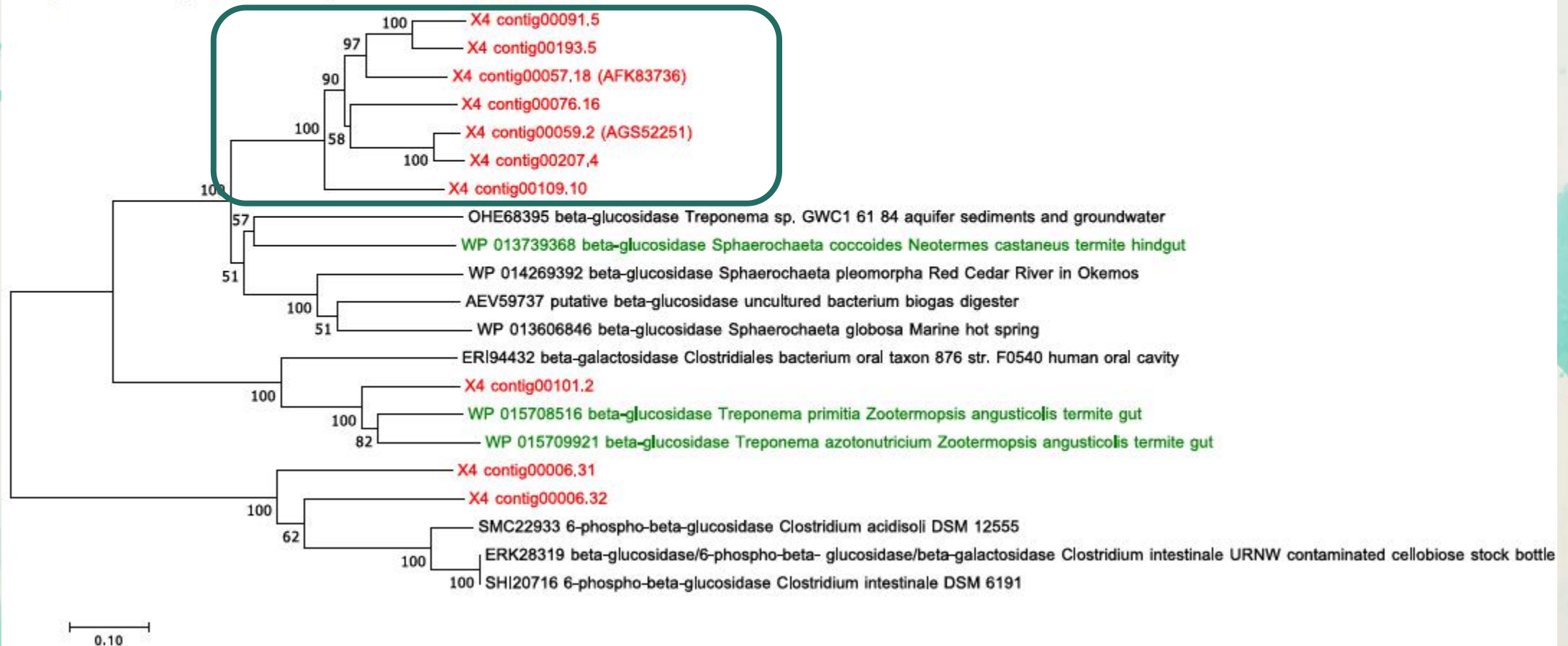


# Results and discussion

**Figure S2.** Phylogenetic analysis of main GH families including GH1, GH3, GH5, GH9, GH10, GH11 and GH94 diversity. Multiple sequence alignments were performed with MAFFT against full length of members of GH1, GH3, GH5, GH9, GH10, GH11 and GH94 with each of their top 2 to 6 best hits in the NCBI-nr database. Then an unrooted phylogenetic tree was established in MEGA 5 by the neighbor-joining method with bootstrap values for 1,000 resamplings shown at major nodes. Sequences from the present termite gut metagenome are colored in red, from other termite gut in green and from other various sources in black. Database accession numbers and organisms are showed for each sequence.

红色-来自本研究白蚁 绿色-来自其他白蚁 黑色-其他来源

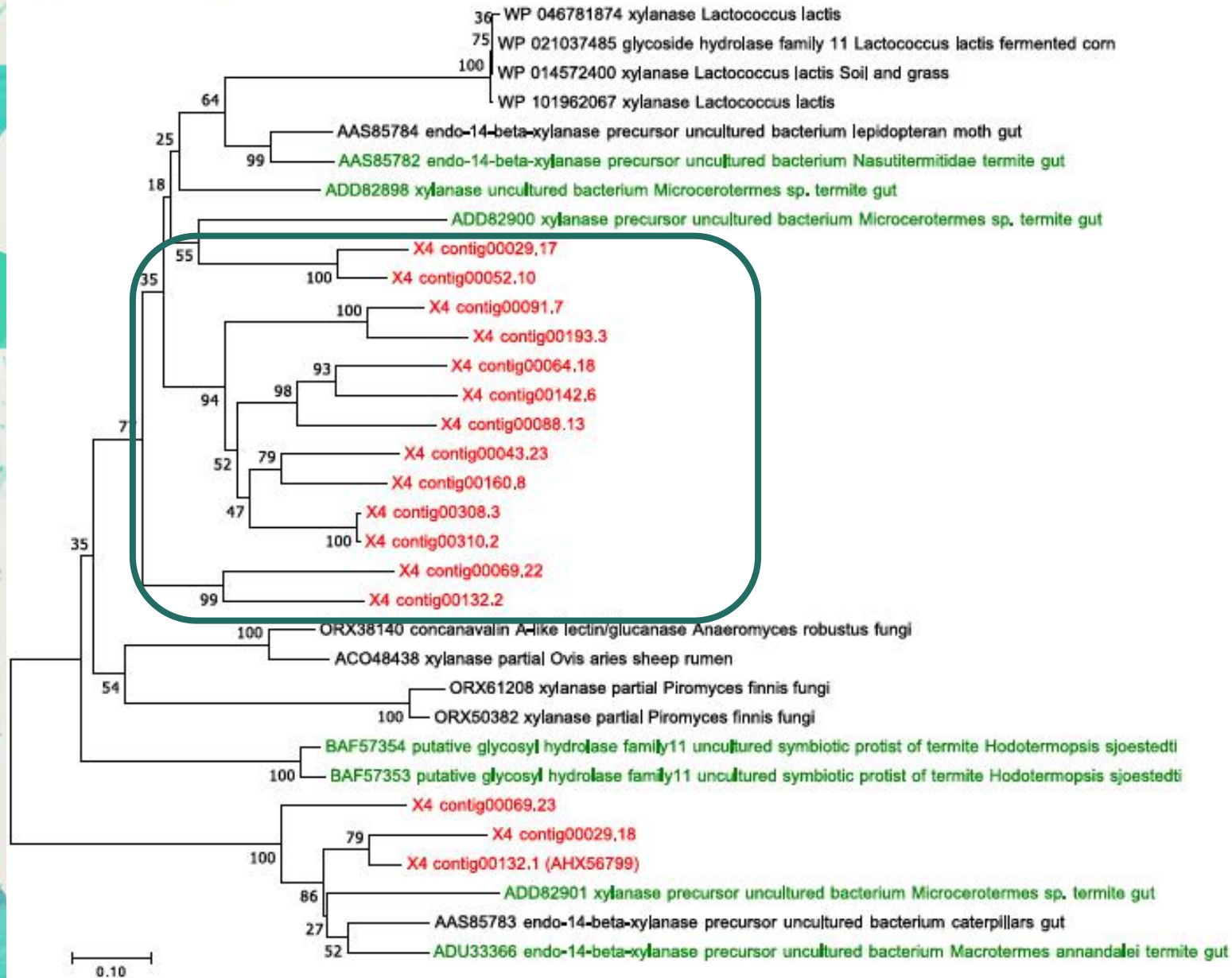
**Figure S2A.** Phylogenetic analysis of GH1 diversity.



GH家族系统发育树

# Results and discussion

Figure S2F. Phylogenetic analysis of GH11 diversity.



*Globitermes brachycerastes* 的所有推定的CAZymes在进化上远离当前NCBI nr数据库中的代表（同一性从29.5%到89%）。

新型CAZymes和独特的微生物谱系支持了这样的假设：细菌微生物菌群与高等白蚁谱系存在强烈的系统发育关系。



# Results and discussion

## Discovery of abundant lignocellulose-degrading gene clusters in the sequenced fosmid clones

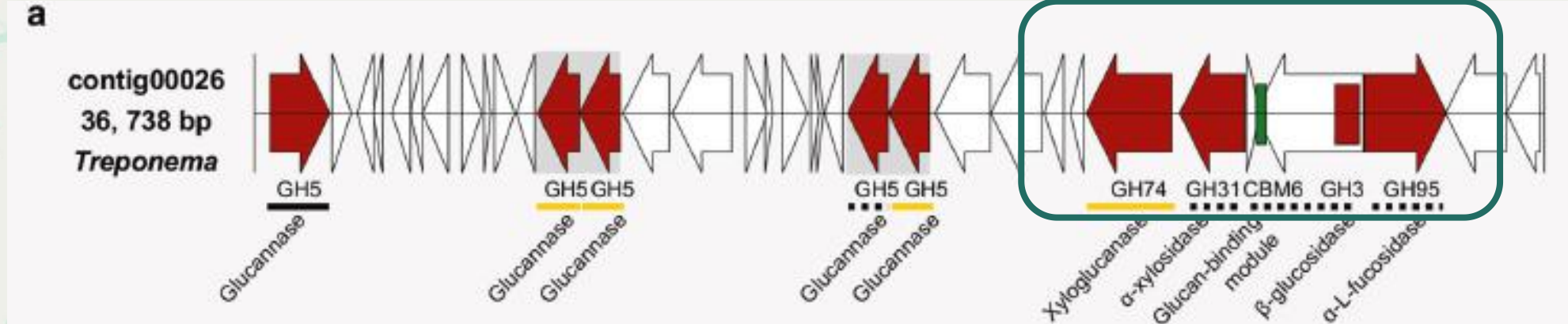
Contig	No. of contig	Gene	Operon coverage	Domain architecture
Contigs with 9 CAZy genes	1	X4_contig00026.1	ORF1-2	GH5
		X4_contig00026.12	ORF11-15	GH5
		X4_contig00026.13		GH5
		X4_contig00026.22	ORF22-23	GH5
		X4_contig00026.23		GH5
		X4_contig00026.28	ORF27-28	GH74-GH74-GH74-GH74
		X4_contig00026.29	ORF29	GH31
		X4_contig00026.31	ORF31	GH3-CBM6
		X4_contig00026.32	ORF32	GH95
Contigs with 7 CAZy genes	1	X4_contig00057.7	ORF7	GH10
		X4_contig00057.18	ORF18	GH1
		X4_contig00057.19	ORF19-21	GH10
		X4_contig00057.20		GH10
		X4_contig00057.21		GH10
		X4_contig00057.25	ORF25-27	GH94
		X4_contig00057.26		GH94

对测序得到的具有编码推定的CAZymes的基因的154个contig（平均长度20.557Kb）的生物信息学分析显示，其中68个具有多个水解酶基因。



## Results and discussion

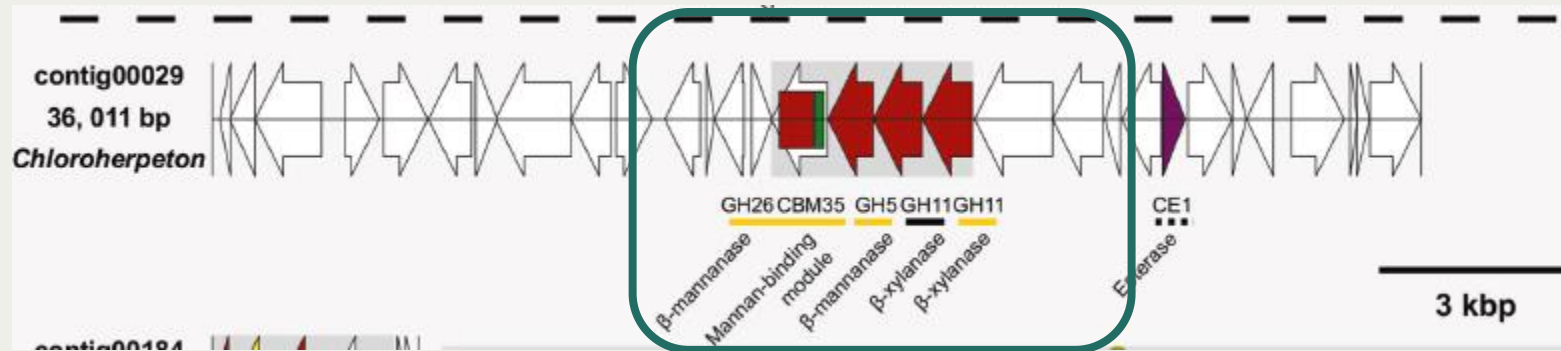
### Discovery of abundant lignocellulose-degrading gene clusters in the sequenced fosmid clones



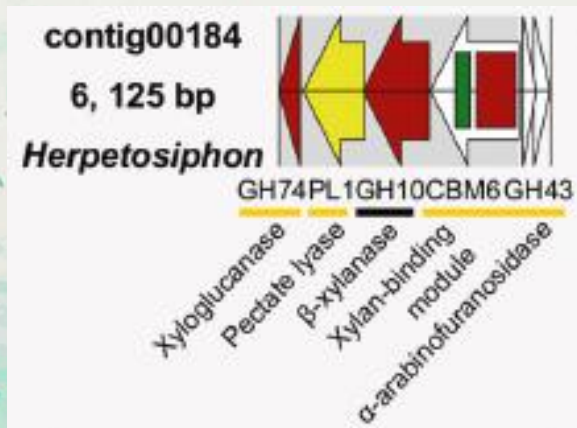
contig00026串联编码参与木葡聚糖降解的基因，包括GH74-木葡聚糖酶，GH31- $\alpha$ -木糖苷酶和GH95- $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶。

# Results and discussion

## Discovery of abundant lignocellulose-degrading gene clusters in the sequenced fosmid clones



contig00029编码木聚糖和甘露聚糖分解操纵子，其包括GH26 $\beta$ -甘露聚糖酶，其附加于假定的甘露聚糖结合CBM35，GH5 $\beta$ -甘露聚糖酶，CE1酯酶和两种GH11 $\beta$ -木聚糖酶。



contig00184编码了操纵子，其包括GH10 $\beta$ -木聚糖酶和GH74木葡聚糖酶，它们都被怀疑切割骨架连接。还注意到脱支CAZymes，例如GH43 $\alpha$ -阿拉伯呋喃糖苷酶，其附加于推定的结合木聚糖的CBM6，以及PL1果胶酸裂合酶。

## Results and discussion

### Discovery of abundant lignocellulose-degrading gene clusters in the sequenced fosmid clones

早期的研究报导了许多木材喂养的低等或高等白蚁中的纤维蛋白基因，但是赋予这种纤维分解方式的基因排列基本上是未知的。

本研究表明，在木材饮食适应的白蚁肠道微生物组中，靶向特定植物细胞壁多糖的功能相关基因倾向于聚集或形成推定的操纵子。类似于多糖利用基因位点系统（PULs）的作用。

在人体肠道细菌共生体中，已经发现复合寡糖提供激活PUL操纵子的调节信号，并且每个PUL操纵子对于确定的植物细胞壁聚合物具有高度特异性，这意味着细菌共生体通过以下方式适应不同的碳水化合物生态位：不断发展的基因，针对可用多糖的独特套件。

据推测，在白蚁肠道微生物组中可以采用类似的机制，其中复杂细胞壁多糖的摄入是触发固有基因簇表达的可能的调节信号。



# Results and discussion

## Discovery of abundant lignocellulose-degrading gene clusters in the sequenced fosmid clones

Taxonomic origin predicted by the PhyloPythiaS
Treponema
Synergistetes
Firmicutes

为了评估哪些微生物群在给定的木材喂养白蚁生态系统中为木质纤维素降解提供功能性酶，PhyloPythiaS 预测了携带CAZyme基因的154个contig的分类学起源。Spirochaetes (*Treponema*) 和Firmicutes每个携带CAZy基因的重叠群占20.1%，其次是Synergistetes (19.5%) 和Proteobacteria (16.2%)。

# Results and discussion

## Recovery of novel CAZyme diversity and distribution in a single *Treponema* sp.

			Treponema_I_unclassifie	48.726
			Treponema_Ia	1.990
			Treponema_Ic	2.548
			Treponema>If	1.672
			Treponema_Ih	0.159
			Uncultured_3	0.080
			<b>Spirochaetaceae</b>	<b>55.175</b>
			unclassified	14.252
			<b>Spirochaetales_unclassified</b>	<b>14.252</b>
		<b>Spirochaetales</b>		<b>69.427</b>
			unclassified	5.494
			<b>CW-1_termite_group_unclassified</b>	<b>5.494</b>
		<b>CW-1_termite_group</b>		<b>5.494</b>
			unclassified	2.309
			<b>unclassified</b>	<b>2.309</b>
		<b>Spirochaetia_unclassified</b>		<b>2.309</b>
	<b>Spirochaetia</b>			<b>77.229</b>
<b>Spirochaetes</b>				<b>77.229</b>

关于大多数未培养的*Treponema*属在白蚁中的功能作用的推测是有问题的，因为该谱系的成员具有高度多样性和代谢多样性。

## Results and discussion

### Recovery of novel CAZyme diversity and distribution in a single *Treponema* sp.

#### “lower” termites

*T. Azotonutricium* 发酵葡萄糖和纤维糊精;

*T. primitia* 从H<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>进行还原性乙酸发生;

*T. Primitia* 固氮, 裂解芳香环。

#### “higher” termites

*Nasutitermes* sp. 糖苷水解酶的丰度与Spirochaetes相关  
与木材颗粒相关, 表明Spirochaetes也可能有助于  
白蚁肠道中的纤维消化

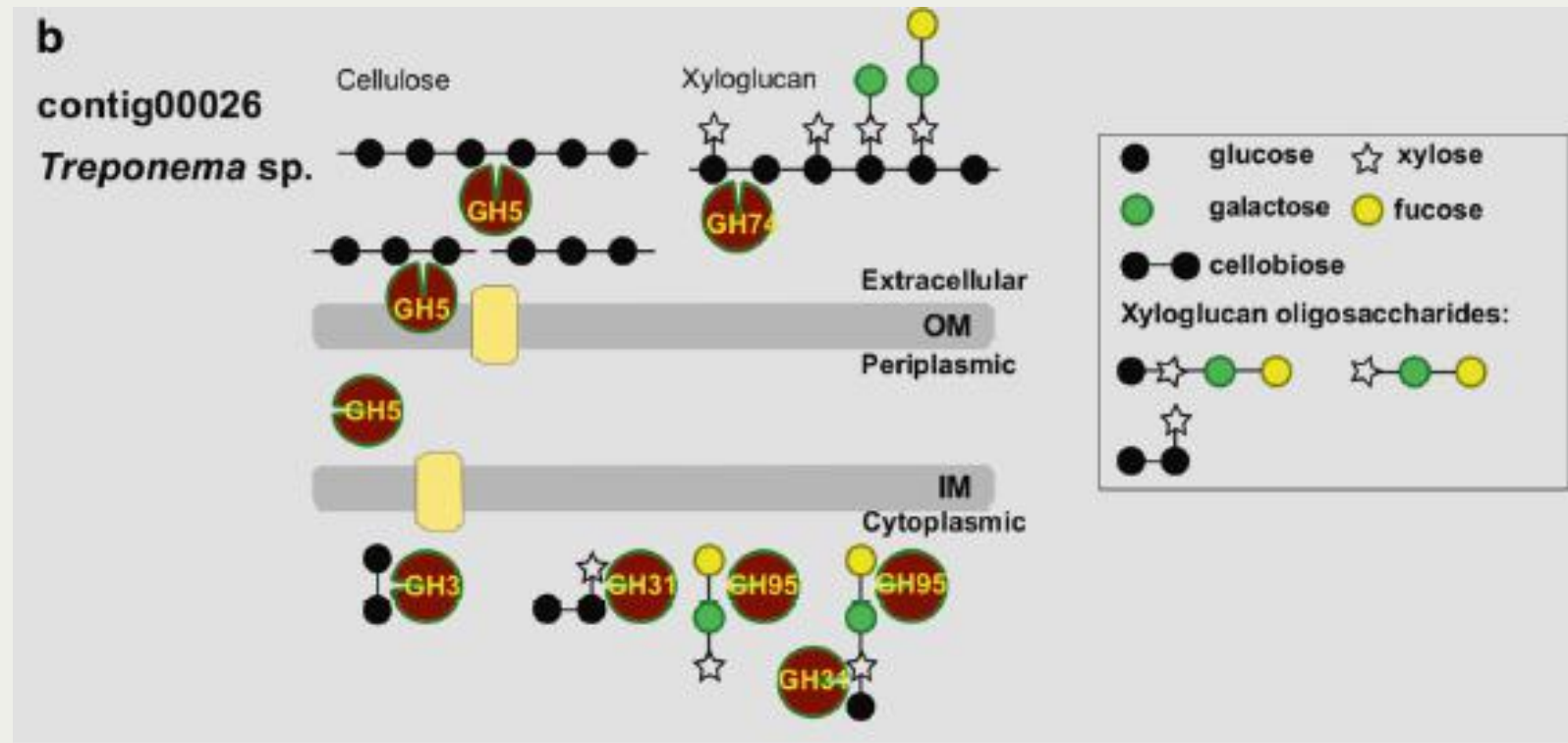
木葡聚糖是植物原代细胞壁中的主要半纤维素成分 (木质细胞壁的10%) 并且能够与纤维素微纤维交联并导致木质生物质中纤维素-木葡聚糖复合物的形成。

本研究中观察到的木葡聚糖/纤维素降解簇及其辅助白蚁后肠中木质碎片解聚的能力表明, *Treponema* 相关物种能够在去除木葡聚糖的物理结构保护, 降解β-1,4-葡聚糖键, 这可能揭示了白蚁肠道中的木材降解过程。



# Results and discussion

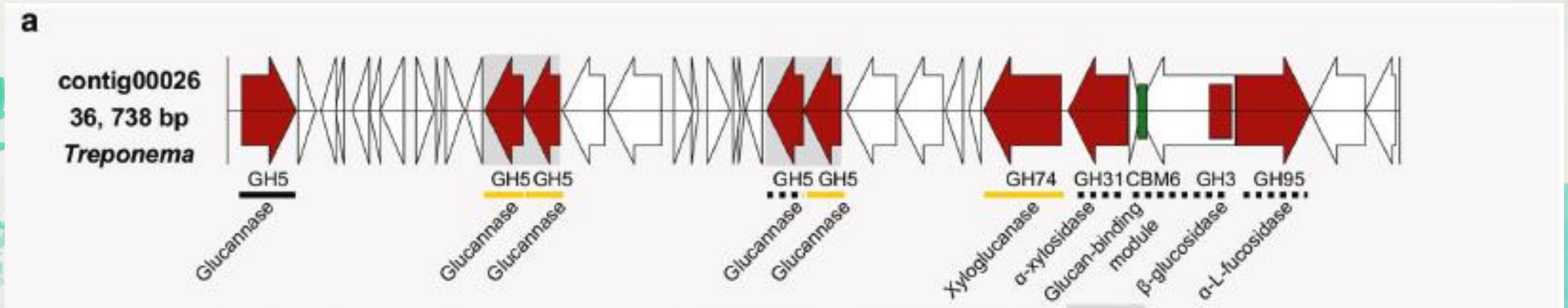
## Recovery of novel CAZyme diversity and distribution in a single *Treponema* sp.



定位代表完整切割途径的*Treponema*附属基因簇，其推定靶蛋白-木葡聚糖复合物，其存在于植物细胞壁中（GH5s，GH3和CBM6用于纤维素，GH74，GH31和GH95用于半纤维素）。

## Results and discussion

### Recovery of novel CAZyme diversity and distribution in a single *Treponema* sp.

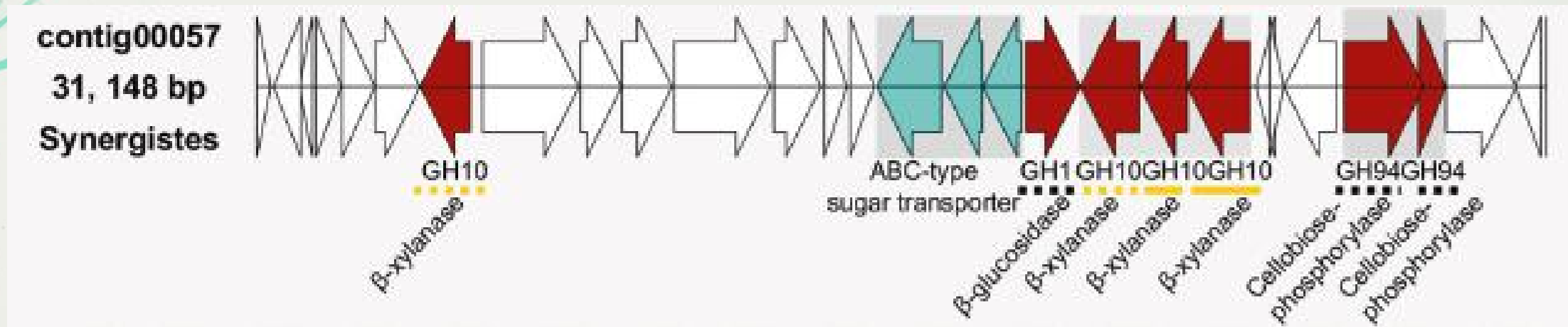


为了进一步研究序列相似性和基因簇结构保守性，将contig00026与数据库中的*Treponema*基因组（n=181）进行了比较，包括来自白蚁肠道的三种菌株：*T. primitia* ZAS-1, *T. primita* ZAS-2和*T. azotonutricium* ZAS-9。

在contig00026和基因组之间未发现保守的同线性，并且大多数blastp命中具有<45% 的同一性，表明contig00026中编码的操纵子构成了属于尚未报导的*Treponema*谱系的基因组片段。

## Results and discussion

### Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns



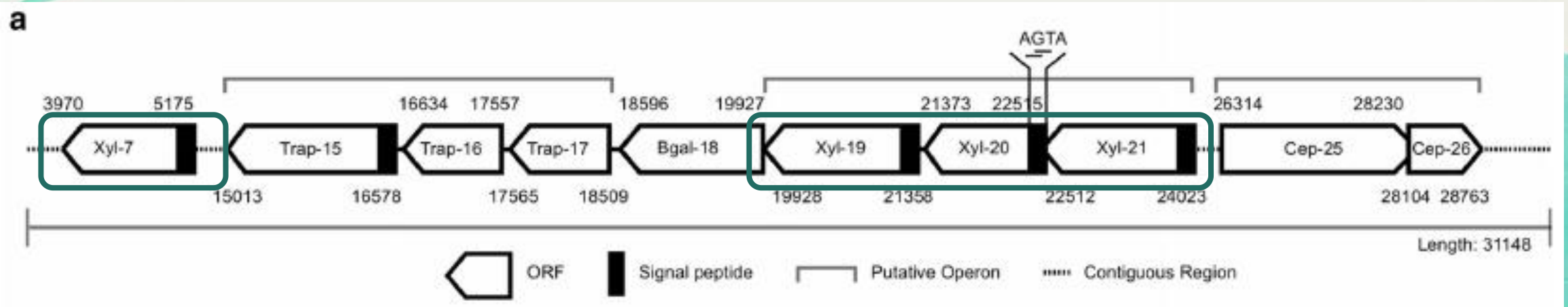
同源性检索表明，Contig00057起源于NCBI中现有的已测序细菌基因组，由PhyloPythiaS预测为Synergistes起源。



## Results and discussion

### Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns

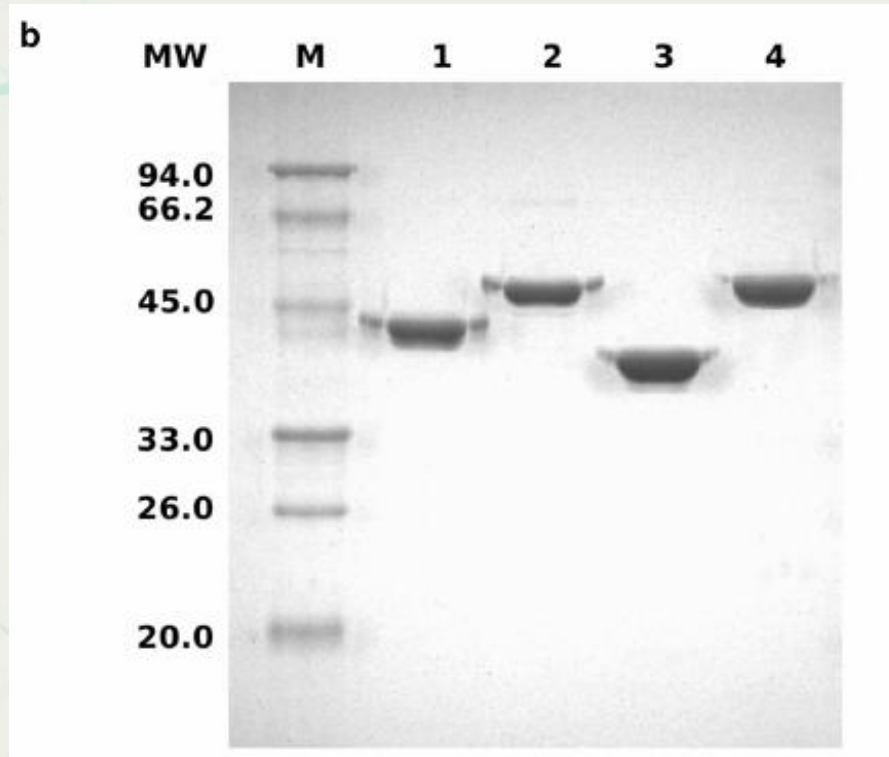
对所有四种成簇GH10木聚糖酶（Xyl-ORF7, Xyl-ORF19, Xyl-ORF20和Xyl-ORF21）进行了生化鉴定，以深入了解它们在木聚糖降解中的作用



在这些大的fosmid插入物中，31Kb片段（JN903693）表现出高密度的编码纤维蛋白相关酶的基因，包括一种 $\beta$ -葡萄糖苷酶，两种纤维二糖磷酸化酶，三种糖ABC转运蛋白和四种木聚糖酶。

## Results and discussion

### Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns

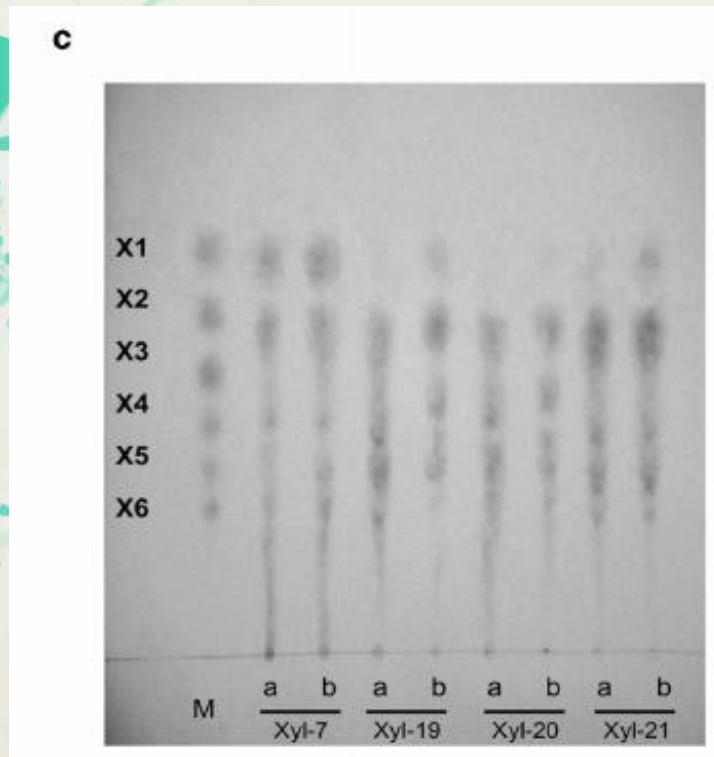


四种重组蛋白在Ni-NTA柱 (Qiagen) 上纯化, 使用N末端6 \* His-标签, 然后进行SDS-PAGE分析, 证明分子量与预测一致。

# Results and discussion

## Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns

### 四种木聚糖酶对桦木木聚糖的水解产物的薄层色谱 (TLC) 分析

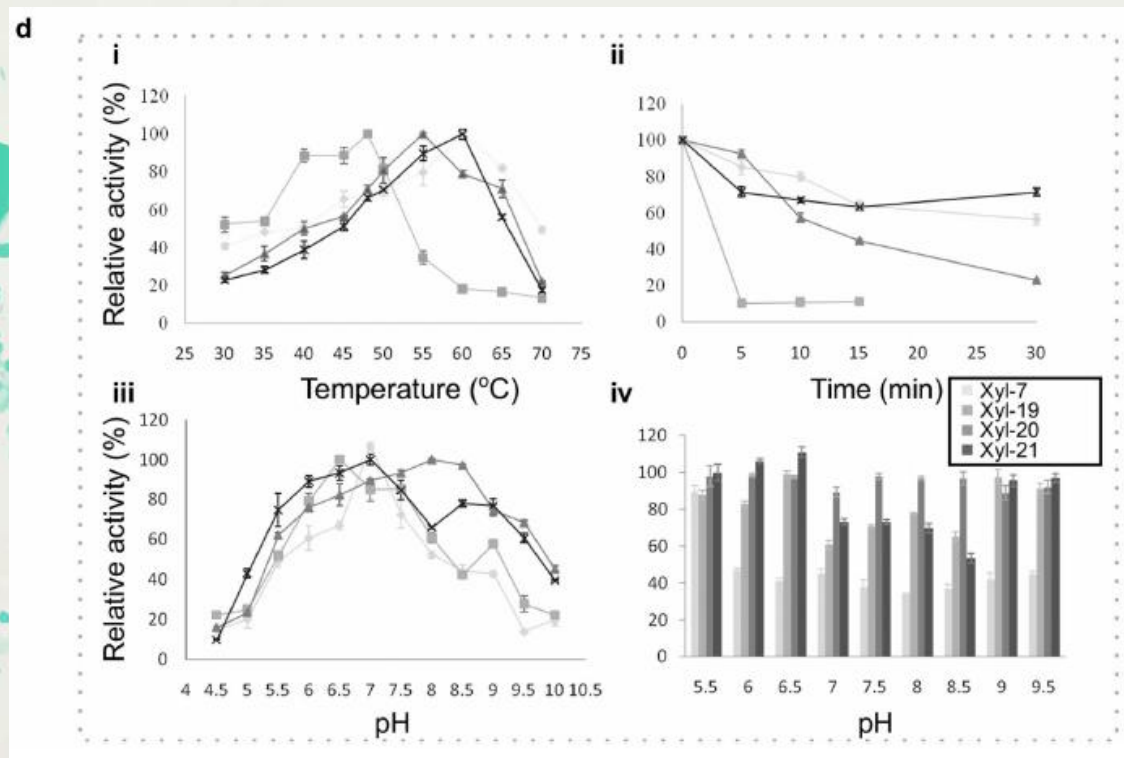


三种聚集的木聚糖酶 (Xyl-ORF19, Xyl-ORF20和 Xyl-ORF21) 主要释放低聚木糖, 而Xyl-ORF7能够释放木糖单体作为除了低聚木糖之外的主要水解产物之一。



# Results and discussion

## Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns



i/最适温度 60,48,55,60°C

保留80%活性 55-65,38-50,50-60,52-62°C

ii/50°C孵育5min

热稳定性 50%,0%,20%,70%

iii/最适pH 7,6.5,8,7

保留60%活性 6-7.8, 5.7-8, 5.5-9.5,5.5-9.5

iv/pH5.5-9.5 4°C温育5天

pH稳定性: xyl-ORF7仅在pH5.5时稳定; xyl-ORF19和Xyl-ORF21在双侧区域比中性区域更稳定;

xyl-ORF20可以在5.5-9.5的宽pH范围内保持稳定。

## Results and discussion

### Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns

Xylanase	Optimal pH	Optimal temperature (°C)	Saturate substrate concentration (%)	Km (mg/ml)	Activity (U/mg protein)
Xyl-ORF7	7.0	60	1.8	24.4	264.7 ± 7.4
Xyl-ORF19	6.5	48	1.0	16.2	113.8 ± 3.8
Xyl-ORF20	8.0	55	0.4	7.4	112.8 ± 1.0
Xyl-ORF21	7.0	60	0.3	1.7	548.7 ± 28.4

#### 所有最适条件下测酶活

动力学分析显示它们对桦木木聚糖的 $K_m$ 值分别为24.4,16.2,7.4和1.7mg/ml, 表明各自对底物的亲和力增加。饱和浓度分别为1.8%, 1%, 0.4%和0.3%桦木木聚糖。

**四种GH10木聚糖酶在酶活性, pH和温度曲线, 底物亲和力和水解模式方面彼此不同。**

## Results and discussion

### Biochemical characterization of a xylanase cluster on Contig00057 reveals distinct physicochemical properties and hydrolysis patterns

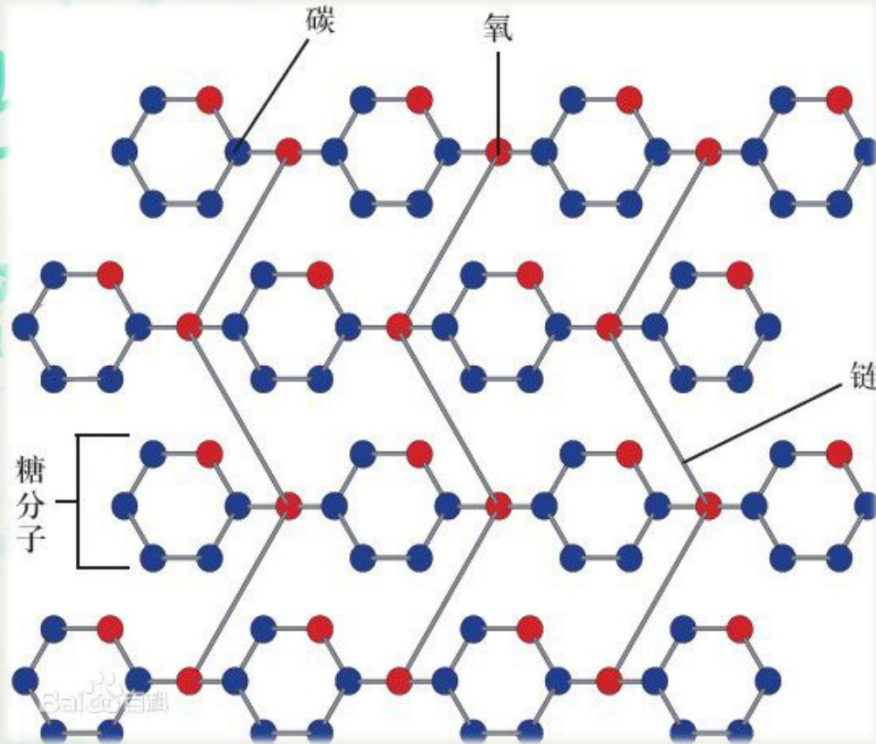
#### 小结

木聚糖是木材中最丰富的组分之一（干木材的10-30%），其中微纤维是无定形的（即非结晶的）区域中与纤维素微纤维紧密相互作用。特别是，它在保护纤维素和防止水解过程中纤维网络逐渐破坏方面发挥作用。

本文中，在该研究中观察到的不同的与Synergistes相关的木聚糖酶被假设为**有助于去除白蚁肠中的木聚糖以帮助纤维素酶获得微纤维。**



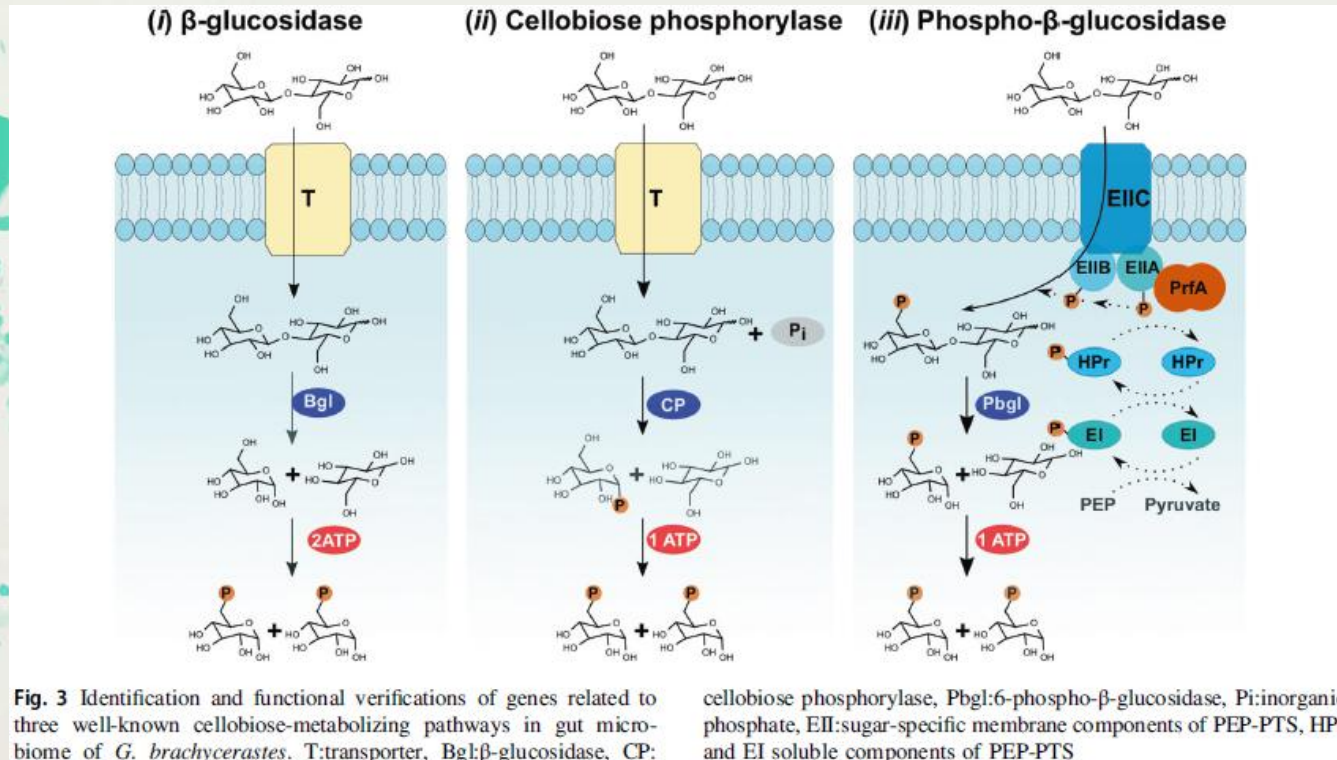
## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes



纤维素的酶促降解涉及上游内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶以及下游糖化酶的协同作用。在纤维素水解过程中，纤维二糖是最常见的中间体之一，其积累可抑制上游纤维素酶。因此，**及时去除纤维二糖**可以有效地改善整个纤维素分解过程。纤维二糖代谢主要涉及三种途径。

# Results and discussion

## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes



### 途径i

$\beta$ -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21) 介导的水解过程将切割 $\beta$ -1,4键, 产生两个葡萄糖单元。

### 途径ii

纤维二糖磷酸化酶 (EC 2.4.1.20) 将介导无机磷酸盐依赖性磷酸化过程, 其通过使用无机磷酸盐将细胞内纤维二糖切割成葡萄糖和葡萄糖-1-磷酸 (G1P) (然后G1P可转化为葡萄糖-6-磷酸葡萄糖苷酶, 不需要ATP)。

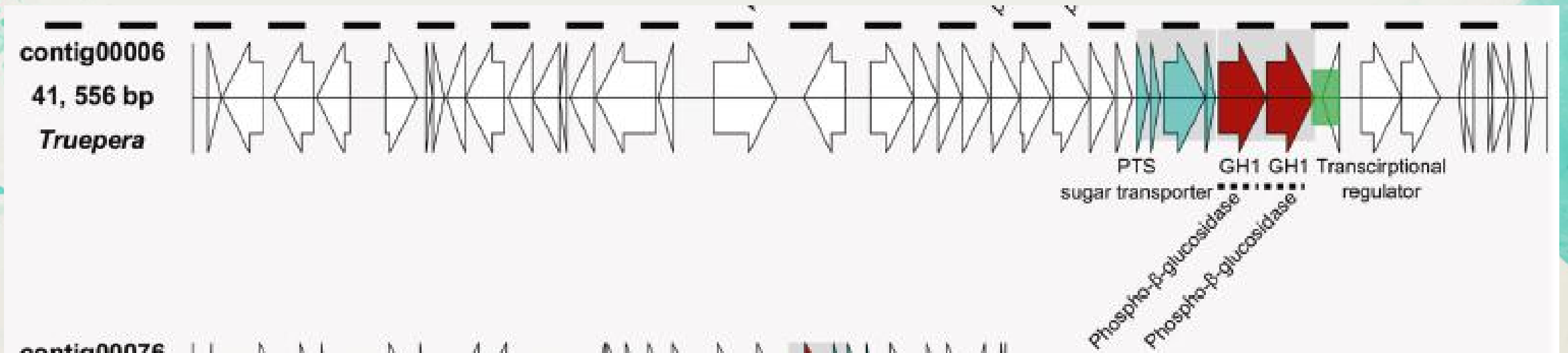
### 途径iii

6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.86) 有ATP介导依赖性水解过程, 能够同时转运和纤维二糖的磷酸化。

# Results and discussion

## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes

宏基因组数据：水解酶 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因（11 GH1和32 GH3），  
两个非典型的纤维二糖降解基因家族，包括GH94纤维二糖磷酸化酶（n=12）和  
推定的6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶（2GH1和1个GH4）



磷酸烯醇式丙酮酸依赖性磷酸转移酶系统（PEP-PTS）-白蚁中6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶



# Results and discussion

## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes

Putative cellobiose-metabolizing enzymes	GH Family	Expression	Activity
$\beta$ -glucosidase			
X4_contig000059.2	GH1		+ <sup>a</sup>
Cellobiose phosphorylase			
X4_contig000023.7	GH94	Supernatant/Percipitation	-
X4_contig000057.25	GH94	Supernatant/Percipitation	+
X4_contig000057.26	GH94	Supernatant/Percipitation	+
X4_contig000064.26	GH94	Supernatant/Percipitation	+
X4_contig000064.27	GH94	No expression	-
X4_contig000068.19	GH94	Supernatant/Percipitation	-
X4_contig000091.11	GH94	Supernatant/Percipitation	+
Phospho- $\beta$ -glucosidase			
X4_contig000006.31	GH1	Supernatant/Percipitation	+
X4_contig000006.32	GH1	Supernatant/Percipitation	+
X4_contig000064.30	GH4	Supernatant/Percipitation	+

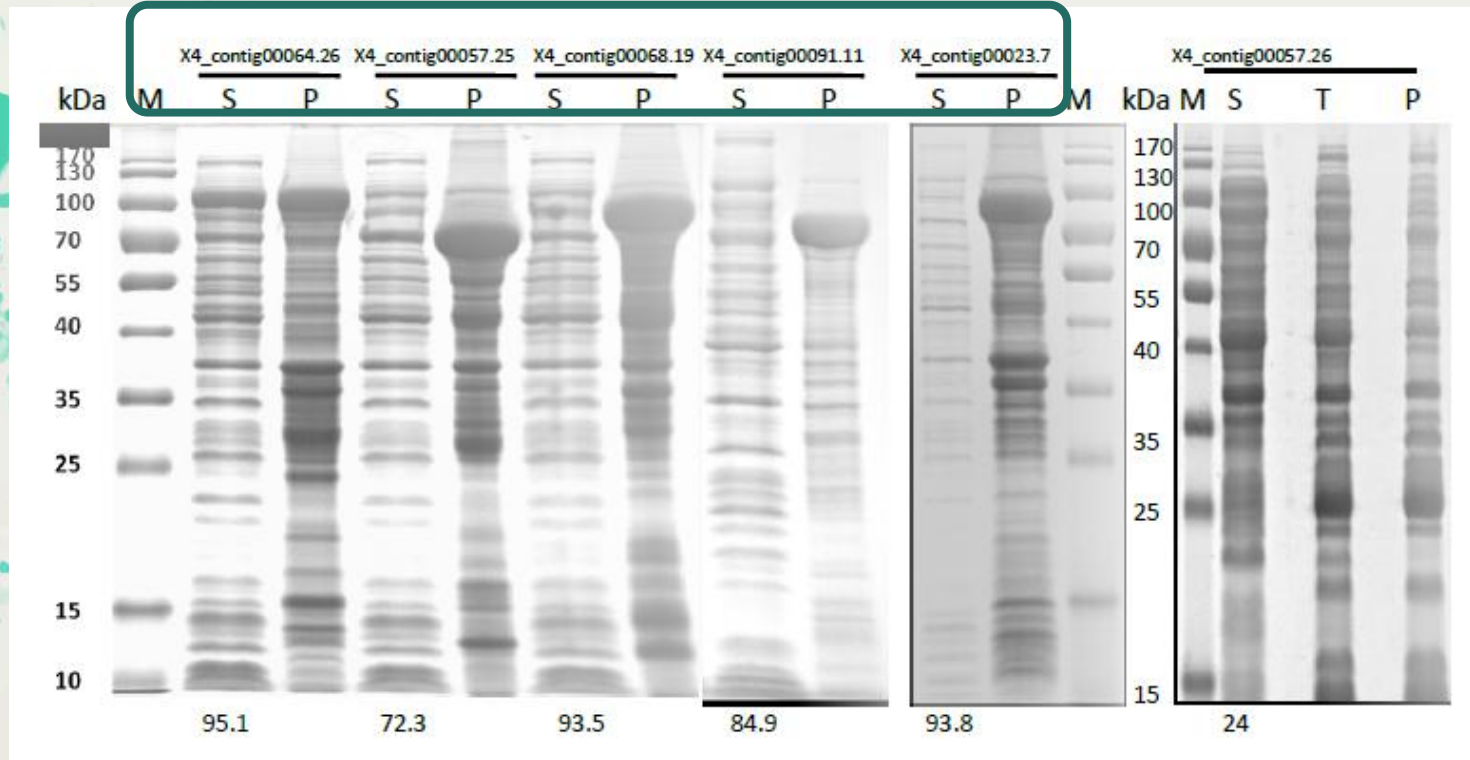
<sup>a</sup>Data from our previous study by Wang et al. [37].

对推定的酶进行功能验证以测试其异源蛋白质的纤维二糖代谢能力  
6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶和部分推定的纤维二糖磷酸化酶基因

# Results and discussion

## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes

### 粗酶液检测到葡萄糖

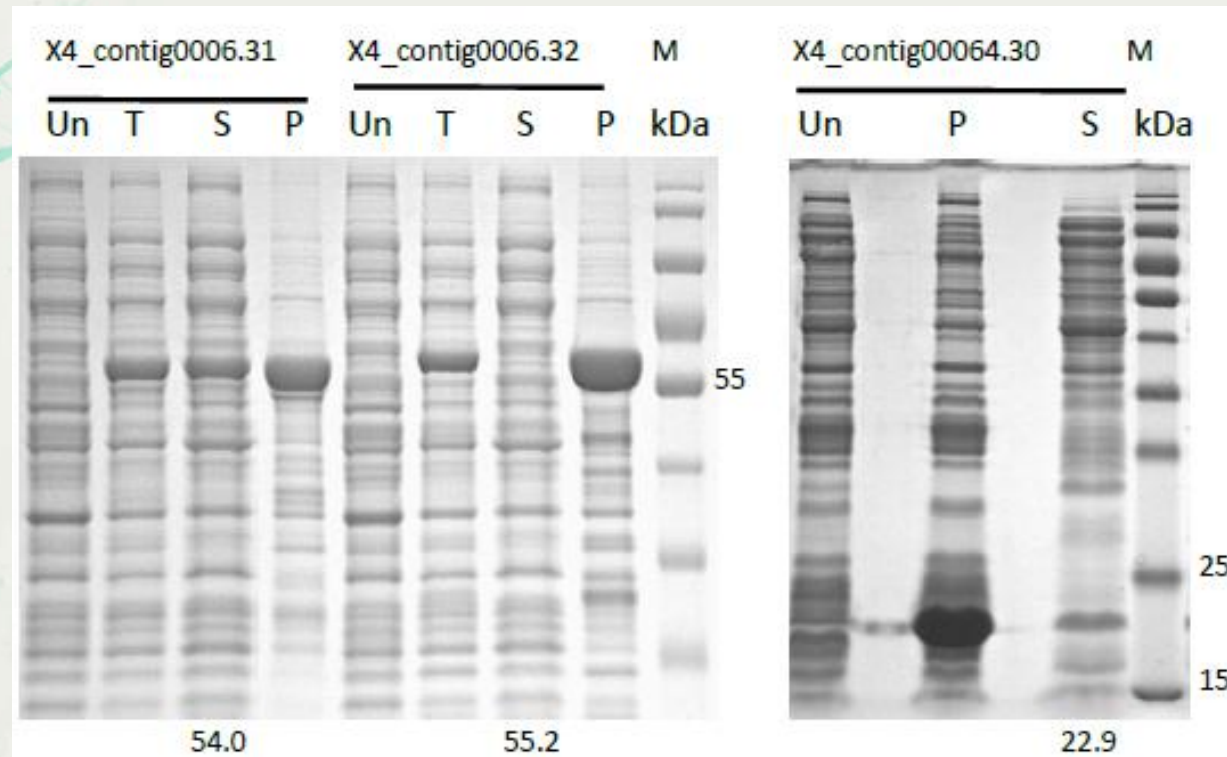


M: 染色的蛋白质分子量标记;  
S: 诱导细胞裂解的上清液中的可溶性蛋白质级分;  
P: 诱导细胞裂解沉淀中的不溶性蛋白质级分;  
T: 诱导细胞裂解中的总蛋白质。

7个推定的GH94纤维二糖磷酸化酶基因的异源表达-SDS-PAGE  
IPTG诱导后, 所有成员 (除了X4\_contig00064.27) 都能成功表达

# Results and discussion

## Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes



M: 染色的蛋白质分子量标记;

S: 诱导细胞裂解的上清液中的可溶性蛋白质级分;

P: 诱导细胞裂解沉淀中的不溶性蛋白质级分;

T: 诱导细胞裂解中的总蛋白质。

**3个推定的三个推定的6-磷酸-β-葡萄糖苷酶基因的异源表达-SDS-PAGE  
IPTG诱导后, 所有成员都能成功表达, 粗酶液均可检测到葡萄糖**



## Results and discussion

### Recovery and functional verification of diverse cellobiose metabolic enzymes

在对 *Globitermes brachycerastes* 白蚁肠道微生物组中纤维二糖代谢酶的功能验证表明，白蚁肠道微生物采用不同的纤维二糖代谢途径，以有效和快速地消除纤维二糖，从而最小化其对这种微小肠道生态位中的上游纤维素酶的抑制。

04

# Conclusion

# Conclusion

白蚁是能够消耗木质生物质作为其主要食物来源的少数生物之一，它们的生态成功源于它们迅速解构其摄入饮食的惊人能力。在这项研究中，我们对肠道宏基因组的综合分析和生物化学探索证明了木材喂养高等白蚁 *Globitermes brachycerastes* 中未开发的多糖利用的机制。

白蚁肠道细菌共生体中存在高度丰富和多样的纤维溶解基因簇，并且这些簇似乎表现出互补的生化特征。在 *Treponema* 属中鉴定含有完整纤维素和半纤维素裂解途径的基因簇，在多糖裂解后预测纤维二糖产物经受一系列纤维二糖代谢途径，其作用是使葡萄糖流向中心代谢并减轻水解酶的抑制。

白蚁肠道是世界上最小但效率最高的生物反应器之一，可能会导致新型酶混合物的开发，从而使其更有效地利用植物细胞壁。





敬请批评指正！