

专论与综述

# 纤维二糖在纤维素生物降解中调控作用的探讨\*

段新源 辛 玮 张为灿 高培基\*\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要:** 对纤维二糖在真菌纤维素酶类合成中的诱导和阻遏作用机制、水解活性的抑制作用等的研究进展做了简要评述。根据对纤维素酶分子的纤维结合结构域的研究结果,提出了外切纤维素酶的主要功能是破坏纤维素的结晶结构,为 $\beta$ -1,4糖苷键的水解提供条件的论点。提出了经济有效转化纤维性材料的新策略。

**关键词:** 纤维素, 纤维素酶, 纤维二糖, 诱导, 阻遏, 抑制

**中图分类号:** Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0094-05

## THE ROLE OF CELLOBIOSE IN CELLULOSE BIOLOGICAL DEGRADATION

DUAN Xin-Yuan XIN Wei ZHANG Wei-Can GAO Pei-Ji

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

**Abstract:** This paper discusses the mechanism of cellobiose in fungal cellulase induction and repression, and its inhibition of cellulase's hydrolytic activity. Depending on the research result of cellulose binding domain, our hypothesis is that the main function of Exo-1,4- $\beta$ -glucanase is to destroy the crystal structure of cellulose to facilitate hydrolyzing of  $\beta$ -1,4 glucosidic bonds. A new strategy for the efficient transformation of cellulose material is advanced at the end.

**Key words:** Cellulase, Cellulose, Cellobiose, Induction, Repression, Inhibition

纤维二糖是纤维素晶胞的结构单元,也是纤维素酶解的主要产物。它可以直接或间接诱导纤维素酶的合成,但在较高浓度下又会阻遏纤维素酶的合成。纤维二糖能显著抑制外切纤维素酶的水解活性,与纤维二糖脱氢酶组成的反应体系还可促进木素的降解。它在纤维素酶的合成和纤维素酶解的调控中发挥着“多面手”的作用。为了获得纤维素酶的过量生产和实现纤维材料的完全水解,从分子水平上了解纤维二糖在上述过程中的作用机制就成为关键所在。

### 1 纤维二糖是纤维素晶胞的结构单元,也是纤维素酶解产物的主要成分

纤维素是由 $\beta$ -1,4-糖苷键联结葡萄糖残基构成的线性高分子,化学组成上的重复单元为葡萄糖。但天然纤维素链聚集形成的结晶单元(晶胞)都是由2个葡萄糖残基二次螺旋组成的纤维二糖,晶胞长轴恰与纤维二糖分子长度相等,所以纤维二糖是纤维素的结构单元(图1)。

通常木霉、青霉等纤维分解真菌可合成2种外切纤维素酶(1,4- $\beta$ -glucan-cellobio-

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20077015)  
Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20077015)

\*\* 联系人

收稿日期: 2002-08-29, 修回日期: 2002-11-25

hydrolase 或 Exo-1, 4- $\beta$ -glucanase, CBH, EC 3.2.1.91) 和 4-5 种内切纤维素酶 (1, 4- $\beta$ -glucanglucanhydrolase 或 Endo-1, 4- $\beta$ -glucanase, EG, EC 3.2.1.4)。内切纤维素酶分子的活性中心是一个“半裂开”(Cleft)的结构, 对纤维性底物有较好的可及性, 它吸附于纤维表面, 可随机水解出比例不等的葡萄糖、纤维二糖和寡糖<sup>[1]</sup>。外切纤维素酶分子的活性中心是由 2 个“环”(Loop)

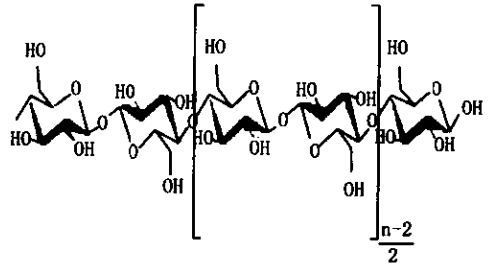


图 1 纤维素的结构单元——纤维二糖

构成的内陷的裂隙。只能容纳单根纤维素分子链的末端(基元纤维)进入, 和水解出纤维二糖。天然纤维素的有效酶解取决于外切纤维素酶和内切纤维素酶的协同作用。

纤维素酶分子通常由催化结构域(catalytic domain, CD)、纤维结合结构域(cellulose binding domain, CBD)及连接它们的连接桥(linker)组成。我们用扫描隧道电镜观察到, 外切纤维素酶分子的结合结构域吸附棉纤维后, 可导致单根基元纤维的分离和断裂<sup>[2]</sup>。目前人们推测<sup>[3,4]</sup>: CBD 可能通过芳香环与葡萄糖环的堆积力吸附到纤维素上, 由 CBD 上其余的氢键形成残基与相邻葡萄糖链形成氢键将单个葡萄糖链从纤维素表面疏解下来, 以利于催化区的水解作用。表明外切酶的吸附所致纤维素结构的破坏为内、外切纤维素酶的协同作用提供了条件, 这也正是天然结晶纤维素得以被有效酶解的关键所在。

我们用化学修饰和荧光淬灭研究, 也表明位于纤维素酶分子活性中心附近的色氨酸为外切酶活性中心, 可结合 2 个纤维二糖分子<sup>[5]</sup>, 用十二烷基磺酸钠为微扰剂使色氨酸所处微环境发生改变后, 则可导致外切纤维素酶表现出一定的内切酶活力, 这些试验结果与 Spezio 提出的解释内、外切纤维素酶底物特异性的假说相一致<sup>[6]</sup>。即都表明内、外切纤维素酶这种底物特异性的差别不取决于酶分子的整体构象, 而在于活性位点附近微细结构的差别。

由于短的单根纤维素分子链是水溶性的, 对各糖苷键, 其化学反应的可及性在理论上都应为同等可及的, 但实际上却表现差异。

水解动力学的研究表明内、外切纤维酶的活性中心存在两个羧基(或一个羧基和一个咪唑基)参加水解催化反应, 与溶菌酶的作用机制相同。而且外切酶活性中心可结合 2 个纤维二糖分子<sup>[5]</sup>, 但是外切纤维素酶并不是逐一水解出葡萄糖, 而是水解出纤维二糖来。这表明经外切纤维素酶吸附后, 纤维素分子链虽然已从晶胞中脱离出来, 但形成晶胞时分子链螺旋排列的影响还存在, 致使晶胞内糖苷键不易水解, 而水解作用只发生于原晶胞外的糖苷键, 于是水解的结果造成纤维二糖的积累。还需要再由  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解为葡萄糖。因此, 用通用的酸/碱催化的水解催化机制, 还难以解释外切酶的这一重要特性。我们推测, 这种差别的原因, 不在于纤维素酶分子的结构, 而在于纤维素晶胞形成和破坏时其结构的变化。与此相关, 用酸水解方法制备微晶纤维素也存在化学反应不均一性, 这在用纤维素制做精细化工产品时, 也是一个难题<sup>[7]</sup>。

葡萄糖在纤维素酶合成中起阻遏作用, 对酶水解活性有抑制作用, 而纤维二糖的作用则复杂得多, 导致一个以纤维二糖为中心, 把纤维素酶类合成和水解催化反应结合起来的,  $\beta$ -葡萄糖苷酶调节纤维二糖代谢及诱导物形成的“亚调控网络”假定模型<sup>[8]</sup>

的提出。

## 2 纤维二糖诱导或阻遏纤维素酶合成的机制

纤维分解菌类只有生长在纤维性基质上时才能大量合成纤维素酶。不溶性底物怎样诱导酶的合成?这一现象引起了广泛注意,并在生物化学和分子生物学领域中得到了深入研究。在丝状真菌如木霉等菌株中,应用 RT-PCR 和凝胶阻滞实验表明,调节发生在转录水平,其机制也近于基本阐明。其主要结果可概括为:菌体组成性合成的少量纤维素酶降解纤维素后,经  $\beta$ -葡萄糖苷酶或某些内切酶的水解和转糖基作用生成的槐糖、龙胆二糖、山梨糖等二糖,是纤维素酶合成的诱导物。而酶水解纤维素的主要产物—纤维二糖,在较低浓度下 (< 10 mmol/L) 可直接诱导外切纤维素酶的合成,或者水解后又可经转糖基作用生成上述做为诱导物的二糖。但在 > 20 mmol/L 时,对纤维素酶的合成即发生阻遏,纤维二糖这种诱导阻遏效应转换的临界浓度又因菌种而变<sup>[9]</sup>。而葡萄糖则是仅能够做为强阻遏剂。

这种糖浓度引起的诱导/阻遏效应的转换,与普通的化学反应动力学过程不同,而类似于“突变”(catastrophe)“开/关”控制。表明菌体内存在着一个与生理状态相关联的调控系统。

在细菌中,葡萄糖对纤维素酶的阻遏作用是由一种阻遏蛋白与靶基因启动子上游一段特异性核苷酸基元序列“motifs”的相互作用进行调控,在黑曲霉和酵母中也有类似发现。已证实: *A. niger*、*A. nidulans* 和 *S. cerevisiae* 中均有葡萄糖阻遏效应的阻遏蛋白,分别为 CREA 和 MIGI<sup>[10,11]</sup>。纤维二糖直接成为诱导剂的机理已证实为它可与阻遏蛋白相结合,从而影响阻遏蛋白与 DNA 的相互作用而解除阻遏<sup>[12]</sup>,在 *Thermomonospora fusca* 中已分离到这一阻遏蛋白“CelR”<sup>[13]</sup>。

在一些木霉菌株中,已克隆到编码阻遏蛋白的基因 *cre1*,启动子上也已找到可与阻遏蛋白 CRE I 相结合的长度为 6 bp 的 motifs<sup>[14]</sup>。去掉这类“motifs”后,木霉菌在葡萄糖上生长时,纤维素酶基因也可表达。我们观测到,拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii*) *cbh1* 中与阻遏蛋白相结合的核苷酸基元序列在其启动子的-302 ~ -18bp 之间<sup>[15]</sup>。

放线菌 *Streptomyces reticuli* 菌丝膜上有特异性吸附纤维二糖的脂蛋白<sup>[16]</sup>可以直接吸收纤维二糖进入细胞。纤维二糖在丝状真菌中主要由  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解为葡萄糖,经转糖基作用生成槐糖、龙胆二糖而发挥阻遏/诱导作用。纤维二糖在高浓度时对纤维素酶合成的阻遏作用,主要是由于它们可被  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解成葡萄糖。这暗示,纤维二糖能否作为诱导物,它的进一步代谢起着关键性的作用。

除  $\beta$ -葡萄糖苷酶外,还有多种酶参与纤维素的降解和纤维二糖的转化:纤维二糖脱氢酶、纤维二糖氧化酶可将纤维二糖氧化为内酯,降低胞内纤维二糖的含量,解除对 CBH 合成或纤维素降解的抑制作用。纤维二糖内酯也可作为纤酶合成的诱导物。纤维二糖脱氢酶在纤维二糖存在下,还可以生成羟基自由基,破坏结晶纤维素<sup>[17]</sup>。一些细菌常含有纤维二糖或纤维糊精磷酸化酶,使纤维二糖或纤维糊精磷酸化并最终被代谢掉。这也是不含  $\beta$ -葡萄糖苷酶的微生物利用纤维素降解产物的一条途径,同时也可以解除纤维素降解产物对酶合成的抑制作用。

虽然纤维二糖的诱导效率低于槐糖,但槐糖的作用仅限于木霉等少数菌株,而纤

维二糖的诱导却具有普遍性,它又容易得到,因此,生产过程中可用流加纤维二糖的方法以促进纤维素酶的持续合成。

1993年 Kubicek 提出了不溶性纤维底物诱导纤维素酶的合成是一复杂的调控网络的假设<sup>[18]</sup>。此后,我们用色质联用等方法检测到拟康氏木霉胞外和细胞膜结合的 $\beta$ -葡萄糖苷酶可实施转糖基作用,生成槐糖、龙胆二糖、山梨糖<sup>[9,19]</sup>。考虑到 $\beta$ -葡萄糖苷酶具有多亚细胞定位的特点,在此基础上共同提出了 $\beta$ -葡萄糖苷酶调节纤维二糖代谢及诱导物形成的“亚调控网络”假定模型<sup>[8]</sup>,以期对纤维二糖的调控机理有全面认识。

关于那些化合物是否能诱导纤维素酶合成的报道,文献中有不少矛盾。我们认为其原因在于,由于单糖、二糖及其类似物进入细胞是需要能量的主动吸收过程,如 $\beta$ -木糖苷,只有在同时供给ATP时,才能进入细胞诱导半纤维素酶的合成。于是在无ATP时,即被误认为无诱导作用。另一方面,丝状真菌基因的转录发生于正在分裂的菌丝体顶端,因此用做实验的菌丝体的生长发育状态,必将显著影响诱导和阻遏作用的结果。

应该指出的是,丝状真菌合成的纤维素酶系中主要是外切纤维素酶CBHI、(占到胞外酶量的40%~50%),纤维二糖的上述调控也是针对着CBHI发挥作用。CBHI由分子链的还原性末端水解出纤维二糖,它又不能降解无定形即非结晶状纤维素。那么,如此大量合成的外切纤维素酶的功能仅仅是为了水解 $\beta$ -1,4糖苷键吗?根据对纤维素酶分子的纤维结合结构域的研究<sup>[2,20]</sup>,我们认为它的主要功能是破坏纤维素的结晶结构,为 $\beta$ -1,4糖苷键的水解提供条件。

### 3 纤维二糖对纤维素酶水解活性的抑制

纤维二糖对不属于纤维素酶的 $\beta$ -葡聚糖苷酶水解活性的抑制,已得到深入研究,其抑制常数在0.1~10 $\mu$ mol/L之间,是非常有效的抑制剂。纤维二糖对纤维素酶的抑制,主要抑制外切纤维素酶的水解活性,用纤维寡糖做底物的试验表明,它是竞争性的,也是可逆的,胞外葡萄糖苷酶对纤维二糖的水解可有效解除它的抑制作用。对纤维性底物,其抑制作用的机理还涉及到它具有阻止纤维素酶吸附的作用<sup>[21]</sup>。而纤维素酶的吸附又是其降解不溶性纤维素的必需阶段。

### 4 经济有效转化纤维性材料的新策略

目前,纤维素酶在植物细胞脱壁,纺织品柔化,废纸脱墨等方面都得到有效应用,但这都是基于内切纤维素酶对纤维的部分降解,而在转化纤维材料为可发酵性糖类生产液体燃料方面,距进入实际应用差距还很大。纤维素作为植物细胞壁的骨架,具有降解难的特点。纤维降解菌类在自然生境中在纤维性基质上生长时,纤维素的解链,脱聚和水解是相继发生,受到严格调控的过程。既无纤维素酶的过量合成,也无纤维二糖、葡萄糖等水解产物的积累。而实际应用中我们又必需达到上述二点,才能实现对秸秆等纤维性材料的有效利用。

纤维二糖和葡萄糖的抑制作用,都可通过使其转化为菌体蛋白或酒精等途径解决,而这也都可以通过混合培养、连续发酵等工艺来实现。相比之下,实现外切纤维素酶的过量生产和天然纤维材料的完全水解则困难复杂的多,这是由纤维素的结晶结构性造成的。纤维素的生物降解,从化学反应过程来看,只涉及 $\beta$ -1,4糖苷键的水解,是

相当简单的化学反应。但是由于纤维素分子链集聚结构即超分子结晶区的形成,使得它的完全降解需要内、外切酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶等三类酶近十余个酶组分的协同作用,涉及酶的吸附、脱吸附、解链、脱聚和随机水解等多种反应,而主要的降解产物纤维二糖对酶的合成和纤维素的水解起着如此复杂和严密的调节控制,这在其它生物聚合物中是少见的。从研究现状来看,外切纤维素酶的分子转换率和纤维素的水解速率,都必须有近一个数量级的增加,才可与淀粉酶的效率相近。显然,沿用常规菌种选育,产酶条件优化或者代谢调控,以及进行酶的修饰等方法是难以实现的。淀粉酶为什么能获得有效应用呢?淀粉做为能量贮藏性物质它具有易被降解的特点。 $\alpha$ -淀粉酶对淀粉的液化(分子链的解聚和切断)在90℃下几乎是瞬间可完成,而继之的糖化酶的完全水解也只需几个小时。借鉴这一过程,我们认为对纤维材料进行物理、化学预处理,使其“无定形”化,即使其“解链”和“无序化”,转变为无定形纤维素如磷酸膨胀纤维素等,从而得以避开对外切纤维素酶的需要。因为已知,“无定形”纤维材料仅在内切纤维素酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶作用下,即可完全水解,水解速率也可与淀粉糖化酶相似。 $\beta$ -内切葡聚糖苷酶可由多种微生物产生,水解抑制作用机理比较简单,在工艺上也易于解决。

已有一些对纤维材料进行物理、化学预处理的研究<sup>[22]</sup>,只是主要用条件实验的酶解效应来衡量处理结果,而很少涉及纤维素超分子集聚状态的变化机理。尚未把使结晶区“无定形”化做为关键问题来考虑。也已有一些经济有效的方法,如中压蒸气爆破技术等已显示出良好的前景。

从生物技术下游工程的要求看,应用物理/化学预处理技术,进行纤维材料预处理,使结晶纤维素无定形化,并与 $\beta$ -内切葡聚糖苷酶的生产和水解转化为菌体蛋白或酒精等途径进一步结合起来,实现经济有效地,转化纤维材料为可发酵性糖类生产液体燃料的目标是不难达到的。

### 参 考 文 献

- [1] Yan B X, Sun Y Q. *J Protein Chem*, 1997, 16 (1): 59 ~ 66.
- [2] 高培基, 刘洁, 张玉忠, 等. 自然科学进展, 1998, 8 (1): 117 ~ 124.
- [3] Linder M, Mattine M L, Konteli M, et al. *Protein Sic*, 1995, 4 (6): 1056 ~ 1064.
- [4] 阎伯旭, 齐飞, 张颖舒, 等. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (3): 233 ~ 237.
- [5] Yan B X, Sun Y S, Gao P J. *J Protein Chem*, 1997, 7 (3): 681 ~ 688.
- [6] Spezio M, Wilson D B, Karplus P A. *Biochemistry*, 1993, 32 (38): 9906 ~ 9916.
- [7] 唐爱民, 陈港, 武书斌. 纤维素科学与技术, 2001, 9 (3): 11 ~ 18.
- [8] 艾云灿, 孟繁梅, 高培基, 等. 中山大学学报, 2000, 39 (3): 73 ~ 77.
- [9] 艾云灿, 高培基, Kubicek C P, 等. 中山大学学报, 1999, 38 (1): 70 ~ 74.
- [10] Trumbly R J. *Mol Microbiol*, 1992, 6 (1): 15 ~ 21.
- [11] Drysdale M R, Kolze S E, Kally J M. *Gene*, 1993, 130 (2): 241 ~ 245.
- [12] Spiridonov N A, Wilson D B. *J Bacteriol*, 2000, 182 (1): 252 ~ 255.
- [13] Nikolay A S, Gao P J, Wilson D B. *J Biol Chem*, 1999, 274 (19): 13127 ~ 13132.
- [14] Takashima S, Nakamura A, Likura H. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 145 (3): 361 ~ 366.
- [15] 王景林, 高培基. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (6): 765 ~ 768.
- [16] Andreas S, Jens J, Karl H, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (6): 2636 ~ 2643.
- [17] 方路, 高培基. 微生物学通报, 2000, 27 (1): 15 ~ 18.
- [18] Kubicek C P, Messner R, Gruber F, et al. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15 (2): 90 ~ 99.
- [19] Wang D, Qu Y B, Gao P J. *J Gen Appl Microbiol*, 1996, 42 (5): 363 ~ 369.
- [20] Xiao Z Z, Gao P J, Qu Y B, et al. *Biotechn Letters*, 2001, 23 (9): 711 ~ 715.
- [21] Lee S B, Park K H, Robyt J F. *Carbohydrate Research*, 2001, 331 (1): 13 ~ 18.
- [22] Mattinen M L, Linder M, Drakenberg T, et al. *Eur J Biochem*, 1998, 256 (2): 279 ~ 286.