

# 天然纤维素在生物降解过程中超分子 结构的变化\*

## ——氢键断裂在纤维素降解中作用的探讨

高培基 刘洁 张玉忠 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

庞世瑾

(中国科学院北京科学仪器厂真空物理实验室, 北京 100080)

**摘要** 应用扫描隧道显微技术(STM), 在纳米级水平上, 直接观察到棉纤维中, 由纤维素分子链沿长轴平行排列组成的直径为 2~4 nm 的基元原纤, 和由其聚集排列成直径为 10~25 nm 的微原纤和由微原纤聚集成原纤及由基元原纤交替排列, 周期性出现的有序和无序区域. 结合对其在酶解过程中, 红外光谱、X 光衍射、结晶程度、微量热活性和聚合度的测定以及末端基分析等表明: 由多肽类组分造成的氢键断裂所致纤维素超分子结构的破坏和短纤维形成是纤维素酶解过程中普遍存在的机制, 是一种氧化性降解, 与纤维素酶类水解糖苷键的作用机制明显不同. 应用 STM 技术还直接观察到外切葡聚糖纤维二糖水解酶的全酶分子图象, 为研究酶分子作用于纤维素时的动态过程提供了有力的支持.

**关键词** 纤维素 纤维素酶 氢键

纤维素是植物光合作用的主要产物, 是地球上最丰富的可再生性能源物质. 微生物对它的降解是自然界碳素循环的主要环节. 对这个过程的有效利用则可望为农业、畜牧业、发酵工业以及化学工业等持续提供廉价的原料. 同时在环境污染的防治、良性生态系统的建立上也会发挥重要作用.

作为植物结构性材料, 由  $\beta$ -1, 4-糖苷键联结葡萄糖苷构成的纤维素, 具有很难被微生物降解的特性, 与由  $\alpha$ -1, 4-糖苷键联结葡萄糖苷组成的淀粉相比, 纤维素酶的分子转换率要较淀粉酶低约 2 个数量级. 但是由  $\beta$ -1, 4-糖苷键构成的纤维素寡糖(cello-oligosaccharides)却较由  $\alpha$ -1, 4-糖苷键构成的麦芽寡糖(malto-oligosaccharides)更易被水解<sup>[1]</sup>; 纤维素无定形区的酶解速率也与淀粉相近<sup>[2]</sup>, 这都表明影响纤维素酶解速率的限制性因素不是糖苷键的构型, 而应是其超分子结构, 特别是结晶区结构. 但是在纤维素酶解机制的研究中, 却主要是以其一级结构

1997-03-05 收稿, 1997-04-21 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 39430020)和博士点基金资助项目

——纤维素分子链的水解过程为依据,在取得相当深入的研究结果之后,对纤维素的酶解机制,特别是结晶区难被降解的原因仍然只能是推测<sup>[3,4]</sup>。我们针对此问题开展了研究,现结合国外动态,对近年来的进展做一评述。

## 1 氢键在维持纤维素超分子结构中的作用

纤维素是由吡喃葡萄糖苷通过 $\beta$ -1,4-糖苷联结成的线性大分子。分子链平行有序排列为结晶区(Crystalline),松弛不规则聚集为无定形区(Amorphous),是一两相共存的体系。这是已为普遍接受的认识。但对分子链怎样聚集为一、二、三级结构,即基元原纤(Elementary fibril),微原纤(Microfibril)和原纤(Fibril)以及结晶区晶胞的结构仍存在很大分歧,提出了多种模型<sup>[5,6]</sup>。由于在扫描电镜下不能区分结晶区和无定形区<sup>[5]</sup>,由X-光衍射得到的结晶度只是一宏观指标,以致有些研究者甚至认为天然纤维素中不存在结晶区<sup>[5]</sup>。原子力显微技术(AFM)曾被用于观察藻类纤维素结构,但未能观察到微原纤的结构,其结晶态是通过图象的傅立叶变换推算而来的<sup>[7]</sup>。最近,我们应用扫描隧道显微镜技术(STM),首次在纳米级水平上,直接观察

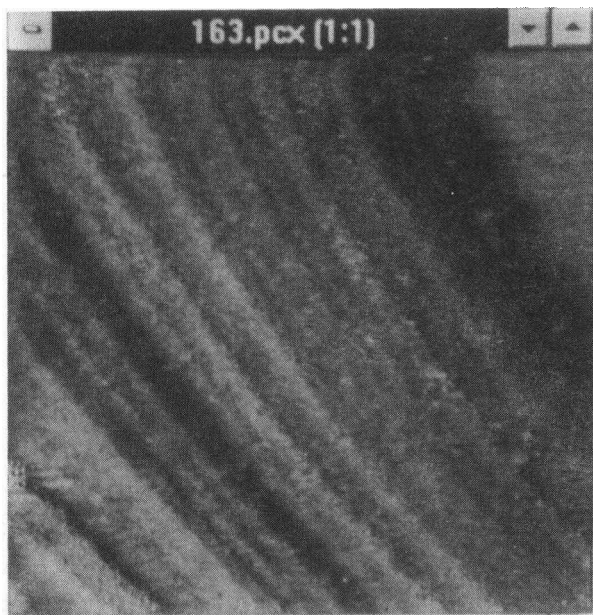


图1 棉花纤维的 STM 图象(扫描范围:30nm×30nm)

观察到棉花纤维中,由纤维素分子链沿长轴平行排列组成的直径为2~4 nm的基元原纤,和由其聚集排列成直径为10~25 nm的微原纤和由微原纤聚集成成的原纤(图1)及其重叠交错形成的叉状结构(图2)。特别是观察到了沿原纤走向基元原纤交替排列,周期性出现的有序和无序区域,可见有序区由晶格化整齐排列的基元原纤组成,有强折光性;无序区不呈现此细微结构,排列杂乱,折光性很低(图3)<sup>[8]</sup>。这与 Hess<sup>[5]</sup>用碘处理纤维素,在透射电镜下观察到的明、暗相间的结果相近,由于分辨率的限制,他未能观察到基元原纤等细微结构。我们对微晶纤维素(Avicel)进行隧道扫描观察也取得了与此一致的结果,虽然其微原纤、原纤的直径与棉花纤维有较大的差别,但

基元原纤的直径却相近<sup>[9]</sup>。上述研究结果为在动态过程中进行纤维素降解机制研究以及在纺织和造纸工业及棉花品种选育等方面的应用都提供了有利的支持。

每个葡萄糖苷中都含有3个醇羟基,羟基中的氢原子与相邻的氧原子间距离小于0.28~0.30 nm时都可能形成氢键<sup>[10,11]</sup>,这样,纤维素分子链内、链间及分子链与表面水分子间都可形成氢键<sup>[5,10,11]</sup>。植物最初合成的纤维素分子链是呈高度水合状态的,后逐渐失水,藉氢键的形成造成螺旋状和聚集成基元原纤<sup>[1]</sup>。结晶区内的氢键属于结合性强的不可逆类型<sup>[12]</sup>。虽然氢键的键能远较糖苷键为低,但由于在由纤维素分子链聚集排列形成的超分子结构中,特别是在结晶区中存在着大量的氢键,是造成纤维素具有坚韧性和水不溶性的主要原因,但上述

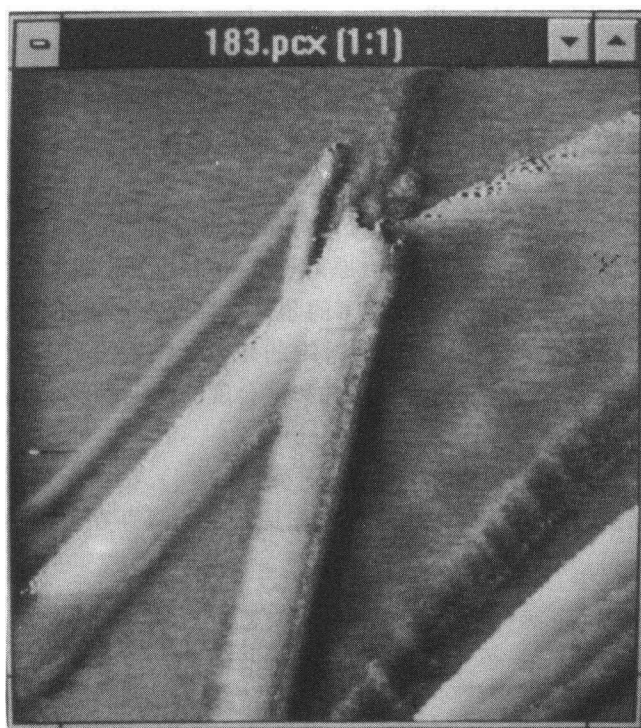


图2 棉花纤维叉状结构的 STM 图象(扫描范围:60 nm×60 nm)

关于氢键作用的认识主要来自于结构化学的理论分析. 在纤维素降解研究中尚未见关于氢键变化的直接测定, 仍然只能是推测其作用.

## 2 纤维素酶解过程中氢键断裂机制的研究

在纤维素酶解研究的早期, Reese<sup>[13]</sup>曾提出应存在使氢键断裂酶的假设, 但半个世纪以来尚未能找到这个组分. Halliwell 等观察到棉纤维酶解初期有短纤维(Short fiber)形成, 并与已知的内切、外切酶无关, 引起了人们的关注<sup>[14]</sup>. 80 年代以来此问题又引起重视. White 认为短纤维形成是一种内切酶的作用<sup>[15]</sup>, Chanzy 等认为是外切酶的作用<sup>[16]</sup>. Griffin 等从 *Trichoderma reesei* 纤维素酶液中分离出能使滤纸形成短纤维的低分子量非

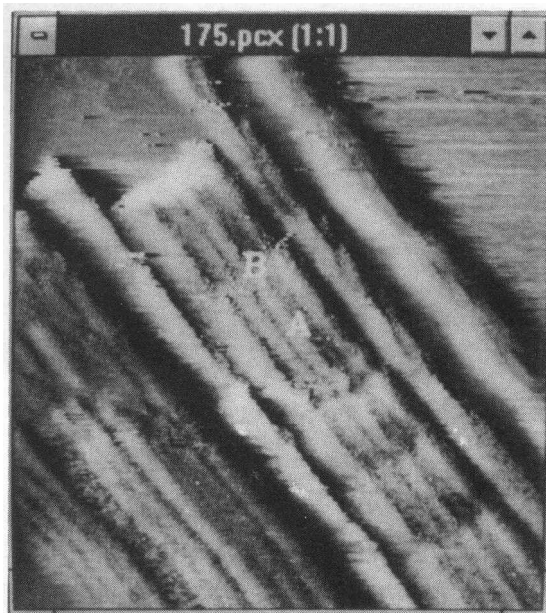


图3 天然纤维素的结晶区与无定形区结构(扫描范围:40 nm×40 nm)

酶组分,称为短纤维形成因子(Microfibril generating factor),它具有螯合  $\text{Fe}^{3+}$  的能力,与  $\text{H}_2\text{O}_2$  有协同降解纤维素的作用<sup>[17]</sup>. Cowling 等<sup>[18]</sup>陆续发现在褐腐真菌降解纤维素的过程中也存在类似现象,并推测此因子通过螯合  $\text{Fe}^{3+}$ ,藉类似 Fenton's 反应的机制,通过形成羟基自由基  $\text{OH}^\cdot$ ,而使纤维素发生氧化性断裂. 近来 Simon 等<sup>[19]</sup>把植物细胞壁的伸长也归之为纤维素分子内氢键的破裂.

由于研究者们只是观察纤维素降解过程中纤维形态的变化,他们用短纤维(short fibre)、纤维碎片(fragment)、亚原纤(subfibrils)、微原纤(Microfibrils)等造纸工业上的习语来形容纤维素酶解初期发生的变化,而未能涉及纤维素的超分子结构,对氢键的作用也只能是推测.

我们在应用扫描隧道显微镜观察到棉花纤维的超分子结构之后,又结合对其在酶解过程中,红外光谱、X-光衍射、结晶程度、微量热活性和聚合度的测定以及末端基分析等得到了一系列结果,表明:

(1)STM 观察可见酶解过程中纤维长度显著变短(图 4),特别是宽度减小,可见微原纤完全解离,呈小角度螺旋状存在(图 5). 由于已知微原纤之间只存在氢键的联结,显然这是氢键断裂所致<sup>[19]</sup>.

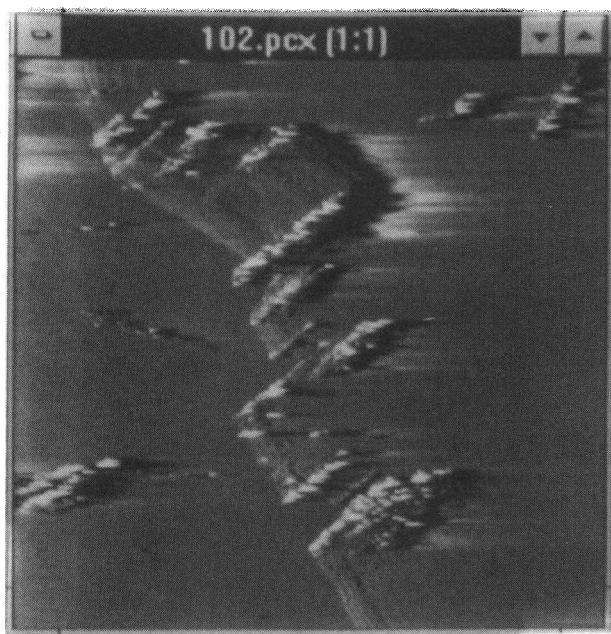


图 4 降解之后棉花纤维的 STM 图象  
(扫描范围:800 nm × 800 nm)

(2)由多肽类组分造成的短纤维形成(由浊度增加所表征,同时无还原糖生成)是真菌酶解纤维素过程中的普遍现象. 由 26 株纤维分解真菌的粗酶液经超滤后得到的低分子量(< 5000D)多肽组分不含有各类纤维素酶活,但都具有使棉花纤维产生短纤维的能力<sup>[20]</sup>. 由于短纤维的形成是一个连续变化的过程,所以对于短纤维的长度和宽度很难确定一个尺度范围.

由拟康氏木霉培养物经 Sephadex LH20、Sephadex DEAE A-25 和 HPLC 等分离纯化,得到了这一“短纤维形成因子”<sup>[21]</sup>,它是分子量约为 2400D 的多肽,具双缩脲反应,酸性氨基酸含量占 53.8%,与纤维素酶类的组成不同. 其最适作用温度和 pH 分别是 45℃ 和 pH6.0,与纤维素酶也有区别. 它对纤维

性材料无吸附能力,与纤维素酶有协同降解棉纤维的作用. 微量热活性测定表明,其作用于纤维素时为一纯吸热过程,从物化角度分析,氢键破坏为吸热过程,而糖苷键的断裂为放热反应,一系列结构分析表明,作用后的棉纤维的氢键特征性谱段减少,结晶程度降低;结合化学分析,表明它是藉单电子氧化途径作用于纤维素的结晶区,造成氢键解体并导致糖苷键断裂<sup>[1]</sup>.

1)刘洁,天然纤维素生物降解机制和外切纤维素合成酶合成机制的研究,山东大学微生物学博士论文,1996年10月



图5 降解之后棉花纤维的 STM 图象(扫描范围:80 nm×80 nm)

分子水平上的反应机理仍在继续研究中。

(3)木霉的纤维二糖水解酶、由放线菌 *Streptomyces SPLX* 分离到的分子量 9.2 ku 的内切酶<sup>[22]</sup>和由担子菌分离到的纤维二糖脱氢酶<sup>[23]</sup>及由褐腐真菌中分离到的多肽类组分<sup>[24]</sup>作用于棉纤维和滤纸的非结晶区时也具有生成短纤维的能力,过程中也均无还原糖的生成,与已知纤维素酶类的作用机制明显不同,也是一种氧化性降解。这表明由酶或非酶多肽所催化短纤维的形成是微生物酶解纤维素过程中一普遍存在的机制。

(4)应用 STM 技术直接观察了外切葡聚糖纤维二糖水解酶(CBH)的全酶分子图象(图6)。纤维素酶分子是蝌蚪状,难以形成结晶,只得到了其球状的催化区的结晶并构建了三维图象,全酶分子的图象是综合生物化学、生物物理学等多方面研究后提出的。在 STM 下呈现的 CBH 全酶分子图象与上述推论结果相近,这为研究其结构与功能,特别是酶分子作用于纤维素时的动态过程提供了有力的支持。

现有的关于天然纤维素的酶解机制,均以丝状真菌如木霉等的纤维素酶系中的 3 类

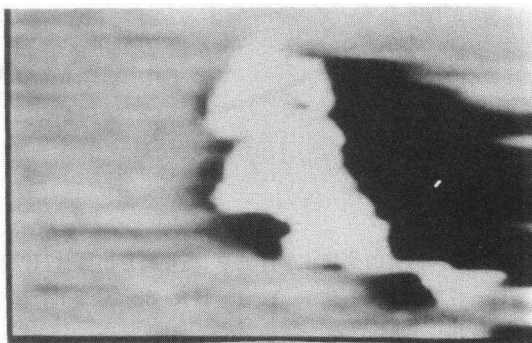
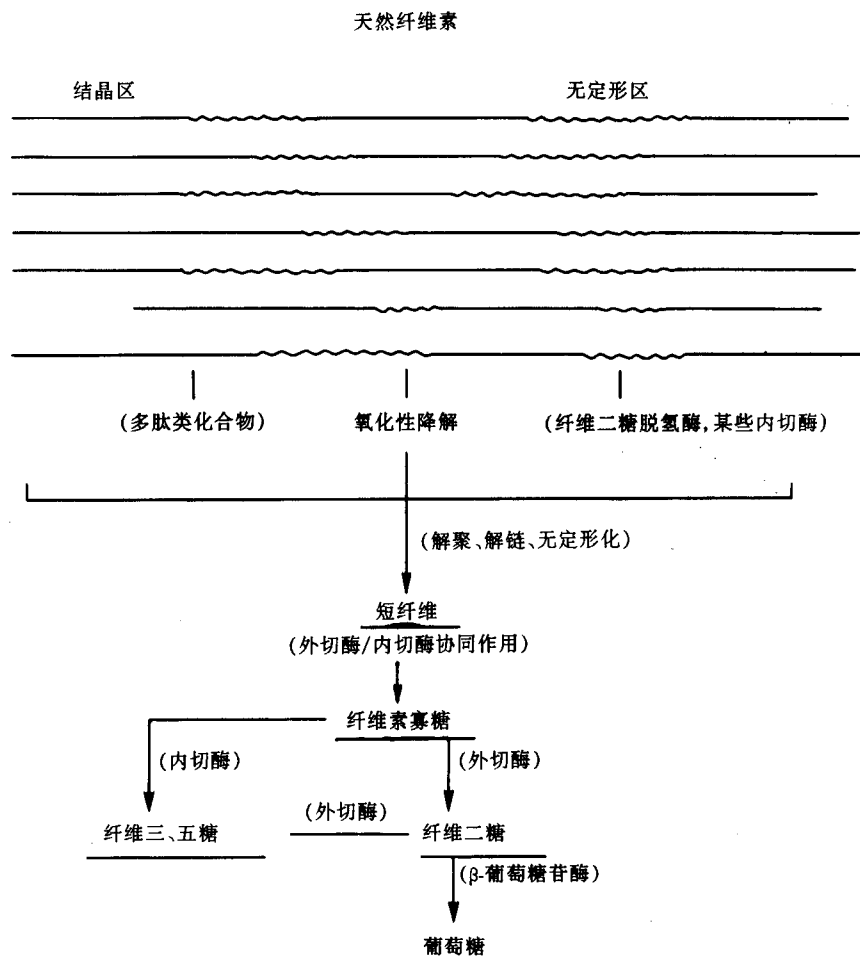


图6 CBH 全酶分子的 STM 图象(扫描范围:22 nm×22 nm)

组分——内切葡聚糖酶(EG),外切纤维二糖水解酶(CBH)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶协同作用于纤维素分子链为依据,从纤维素超分子结构来看,由氢键断裂造成二、三级结构的破坏——断裂、解聚后形成短纤维,为3类糖苷酶的协同作用提供了条件,是纤维素酶解的限速阶段.据此,我们提出了如下的天然纤维素生物降解模型.



### 参 考 文 献

- 1 吴东儒. 糖类的生物化学. 北京:高等教育出版社,1987. 189
- 2 Tsao G T, Ladisch M R, Bungay H R. Biomass refining. In: Sungay H R, ed. Advanced Biochemical Engineering. John & Sons Inc, 1987, 79
- 3 Wood T M, McCrae S I, Bnat K M. The mechanism of fungal cellulase action. Biochem J, 1989, 260: 33
- 4 Klyosov A A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry, 1989, 29: 10 577
- 5 高洁. 纤维素科学. 北京:科学出版社,1996. 51~62
- 6 Atalla R H. The Structure of Cellulose (ACS Symposium Series 340). Washington DC, 1987

- 7 Kuutti L, Peltonen J, Pere J, et al. Identification and surface structure of crystalline cellulose studied by atomic microscopy. *J Microscopy*, 1995, 178: 6
- 8 Zhang Y Z, Chen X L, Liu J, et al. Size and arrangement of elementary fibrils of cellulose studied by scanning tunneling microscope. 4th Inter. Conference on Nanometer Scale Science & Technology, Beijing, Sept. 8-12, 1996, 93
- 9 张玉忠,刘洁,高培基,等. 微晶纤维素超显微结构的扫描隧道显微镜观察. 见:第四届全国扫描隧道显微学术会议论文集,北京,1996年6月. 65~67
- 10 陈国符,邬义明. 植物纤维化学. 北京:轻工业出版社,1986. 155~158
- 11 Jeffrey G A, Saeuga W. *Hydrogen Binding in Biological Structure Second Printing*. Berlin: Springer-Verlag, 1994, 125~138
- 12 Millichovsky M. A new concept of chemistry refining processes. *Tappi J*, 1990, 221
- 13 Reese E T, Siu R G H. Leyinsion, Biological degradation of soluble cellulose derivatives. *J Bact*, 1950, 59: 485
- 14 Halliwell G. Catalytic decomposition of cellulose under biological condition. *Biochem J*, 1965, 95: 35
- 15 White A R, Brown R M. Correlation of chemical and visual evidence of enzymic cellulose degradation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, 1981, 78: 1 047
- 16 Chanzy H, Henrissat B, Vuong R, et al. The action of 1, 4- $\beta$ -D-glucan-cello-biohydrolase on valonia cellulose microcrystals. *FEBS Letters*, 1983, 153: 113
- 17 Griffin M, Dintriz F R, Krull L, et al. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotech. Bioeng*, 1984, 26: 296
- 18 Cowling E B. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignin cellulosic materials. *Biotech Bioeng Symp*. 1975, 5: 163
- 19 Simon M M, Cosgrove D J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymer by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 574
- 20 Liu J, Shen X Y, Gao P J. Study on the generality of short fibre formation during cellulose degradation by cellulolytic fungi. *Biotech Lett*, 1996, 18: 1 235
- 21 Liu J, Gao P J. Investigation of a short fibre generating factor from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *American Chemical Society Symp. Ser.* 655, 1996, 166~174
- 22 李宪臻, 李志贵, 任钢世, 等. 新分离菌 *Streptomyces* 产小分子 CMC 液化酶的研究. *微生物学通报*, 1996, 23: 277
- 23 Jing Fang, Yinbo Qu, Peiji Gao. Wide distribution of cellobiose-oxidizing enzymes indicates an important role in lignocellulosics degradation. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11: 195
- 24 王蔚, 高培基. 褐腐真菌产生的低分子量化合物对纤维素降解机制研究. *菌物系统*, 1997, 16(1): 40~46