纤维二糖抑制外切纤维素酶水解作用机理的分析*

赵 越 武 彬 阎伯旭 高培基**
(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 纤维二糖是纤维素分子的结构单元, 也是纤维素酶水解纤维素时的主要产物. 它能强烈抑制纤维素酶的水解作用, 但并不影响酶对纤维素的吸附. 红外、荧光、圆二色谱分析表明, 纤维二糖可结合在外切纤维素酶活性部位附近的色氨酸残基上形成"位阻效应", 从而阻止纤维素分子链进入活性中心. 同时, 结合纤维二糖后, 外切纤维素酶分子构象发生了较大变化, 致使吸附纤维素后不能导致微纤维的分离, 为"无效吸附".

关键词 外切纤维素酶 纤维二糖 抑制

外切纤维素酶(葡聚糖纤维二糖水解酶, cellobiohydrolase Ⅰ, CBH Ⅰ)是微生物纤维素降解酶系的主要组分, 也是水解天然纤维素的必需组分, 它水解纤维素分子链的产物是纤维二糖[1]. 纤维二糖也是内切纤维素酶(endoglucanase, EG)水解纤维素的主要产物[1,2]. 纤维二糖是纤维素酶水解作用的强抑制剂, 其抑制作用远较葡萄糖强[3,4], 解除其抑制是实现纤维性材料完全酶解的重要条件. 纤维素酶吸附于纤维素表面是其发生水解的必需条件, 但纤维二糖并不影响纤维素酶的吸附. 由于纤维性材料的不溶性和结构异质性以及纤维素的酶水解过程首先为纤维素酶在纤维表面的吸附, 所以传统的研究酶抑制作用机理的方法难以沿用, 而用水溶性的纤维寡糖为底物时又不能反映其真实情况. 因此, 尽管对 CBH Ⅰ的三维结构已有清楚的了解[5], 但对纤维二糖抑制机理的认识仍停留在经验性的表观水解过程上[3]. 我们在研究了 CBH Ⅰ结合纤维二糖后, 酶分子构象发生的变化及其吸附结晶纤维素时对纤维素三维结构影响的基础上, 提出了 CBH Ⅰ结合纤维二糖后, 对纤维素的吸附是无效吸附, 以及纤维二糖结合于活性中心附近形成位阻效应, 抑制了水解作用进行的机理.

1 实验条件

1.1 纤维素酶

外切纤维素酶Ⅰ(CBH Ⅰ)、内切纤维素酶Ⅰ(EG Ⅰ)的纯组分均来自拟康氏木霉 S-38 的培养液. 对其分离纯化和理化性质的研究本室已有一系列的报告[6~12].

2002-08-19 收稿, 2002-12-30 收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39430020)
** 联系人, E-mail: Gaopj@sdu.edu.cn

1.2　纤维二糖对纤维素酶水解的抑制作用

由于 CBHⅠ只有在 EGⅠ协同作用下才能有效地水解结晶纤维素[1~4], 因此, 实验是在两种酶均为 2 mmol/L 下水解微晶纤维素(2%, *w*/*v*), 纤维二糖的加入量为 1%(*w*/*v*). DNS 法[7]测还原糖生成量.

1.3　CBHⅠ在微晶纤维素(PH101, Sigma)上的吸附

基本仿照 Palomen 等人[13]的方法. CBHⅠ起始浓度为 250 nmol/L ~ 2 μmol/L, PH101 纤维素浓度为 2 g/L, 悬浮于 20 mmol/L NaAc pH 5.0 缓冲液中, 4℃吸附 12 h 后, 10000×*g* 离心 15 min, 用对硝基酚纤维二糖(PNPC)为底物测上清液中残存的 CBHⅠ[6], 吸附数据拟合等温吸附曲线.

1.4　酶构象变化的测定

使用日立 850 型荧光分光光度计, 测定 CBHⅠ结合纤维二糖前后的激发和发射光峰值, J-500 圆二色谱仪测 CD 谱, 与研究 EG 时用的方法相同[11].

用 FT-IR710 型红外光谱仪(Nicolet, 520 USA), KBr 片法测红外光谱, 以 2900 cm^{-1}(CH 振动)为内标估计各谱带相对吸收强度[14], 用 OMNIC 软件包进行差谱和二阶导数法比较 3600 ~ 3200 cm^{-1} 间谱带(OH 振动)的变化[15], 光谱分辨率为 4 cm^{-1}.

1.5　纤维超微结构的扫描隧道显微观察

在室温大气条件下, 使用中国科学院化学研究所研制的 CSPM9100 扫描隧道电子显微镜, 高定向石墨片, 方法同前期工作[8,16]

2　结果和讨论

2.1　纤维二糖对纤维素酶水解的抑制作用

由图 1 的表观反应速率图可看出加入纤维二糖后, 对纤维素酶水解微晶纤维素的显著抑制作用, 这与 Lee 等人[3]的结果相近. 由于纤维素的不溶性和结构异质性, 难以准确测定反应的初速度, 因此无法沿用 Lineweaver-Buck 或 Dixon 等做图方法区分抑制动力学类型[3,17,18]. 把酶解 12 h 的酶解物用截留分子量为 1000 的聚砜超滤膜(p1000, Amicon)超滤去除纤维二糖后, 再重复进行酶解, 抑制作用可消除(图 1), 表明纤维二糖属可逆性同位抑制剂[18,19].

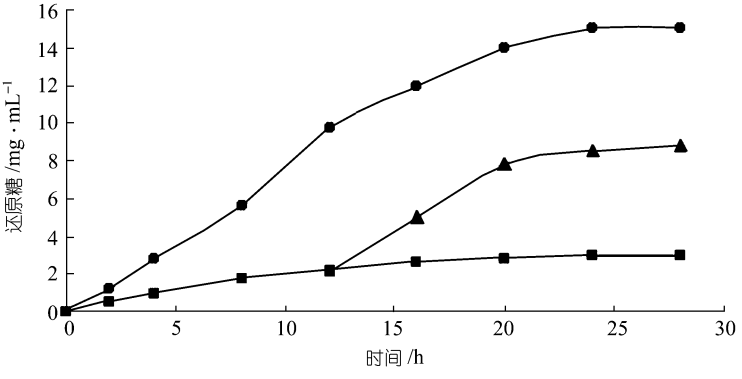

图 1　纤维二糖对纤维素酶水解微晶纤维素的抑制作用

—●— 示无纤维二糖; —■—示加入纤维二糖; —▲— 示透析去除纤维二糖

2.2 纤维二糖对 CBHⅠ吸附的影响

在纤维二糖加入量接近 90%抑制纤维素酶水解的条件下(1%, *w*/*v*, 纤维素浓度为 2 g/L), 它对纤维素酶吸附的影响也很少, 仅约可减少 10%吸附量(图略). 这是一个值得深入探索的问题, 因为通常都认为纤维素酶在纤维表面上的吸附, 是其催化水解不溶性纤维素的先决和必要条件[1,2,4], 而且一般是水解速率正比于吸附量[3,17]. 近年来人们陆续发现纤维二糖对纤维素酶吸附的影响表现了与以上传统认识完全不同的现象. Palomen 等人[13]观察到 1.5 mmol 的纤维二糖可使 CBHⅠ催化结构域的吸附量倍增但不影响对全 CBHⅠ酶分子的吸附. Herner 等人[17]则得到了纤维二糖既可增加 CBHⅠ催化结构域又可增加全酶分子吸附的结果. 这表明, 用通常的表观水解动力学过程和吸附过程的分析, 是难以阐明其机理的.

2.3 微晶纤维素结合 CBHⅠ后分子构象的变化

CBHⅠ吸附微晶纤维素时, 红外差光谱图显示在 3600 ~ 3200 cm^{-1}(羟基振动区), 表现为分子间氢键强度的减弱(图 2). CBHⅠ的吸附并未影响天然纤维素的指纹区 966 ~ 1180 cm^{-1} 各谱带形状、位置和强度的变化, 表明吸附只涉及纤维的表面而未影响 C—C, C—O 等纤维素分子骨架的结构, 但它可导致微纤维束和基元纤维的分离, 这是分子链间氢键结合力减弱的结果, 可为水解作用的进行提供条件(图 2), 扫描隧道电子显微镜观察吸附前后棉花纤维表面的变化(图 3), 可以看到微纤维束由吸附前的平行、有序变为吸附后出现微纤维的松散、分离的情况, 这与我们对 CBHⅠ的吸附结构域和 EGⅢ的吸附结构域的研究结果相同[20,21]. 但是 CBHⅠ与纤维二糖结合后, 再吸附微晶纤维素时, 却导致了与上完全不同的变化, 纤维素 3600 ~ 3200 cm^{-1} 氢键区的吸收强度反而增强(图 4). 扫描隧道电子显微镜观察也未看到微纤维束松散、分离的情况. 而游离的基元纤维(纤维素分子链)的存在是纤维素酶完成催化水解作用的必需条件[19,20]. 我们分析这是纤维二糖发生抑制作用的又一机理.

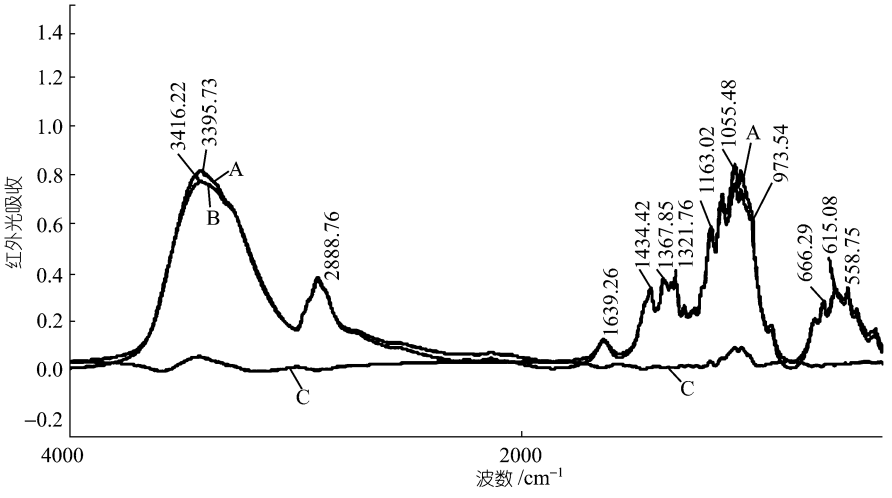

图 2 CBHⅠ吸附微晶纤维素后纤维红外差光谱

A 示天然纤维; B 示吸附 CBHⅠ后的纤维; C 示 B ~ A 的红外差谱

2.4 CBHⅠ结合纤维二糖后酶分子的构象变化

图 5 为 CBHⅠ和 CBHⅠ与纤维二糖近等物质的量混合后红外光谱的比较(二阶导数差谱略).

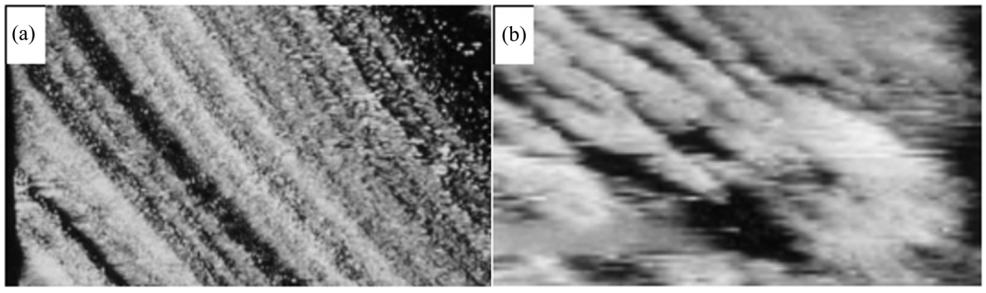

图 3　扫描隧道电子显微镜图: CBH Ⅰ吸附纤维二糖后超微结构的变化

(a)吸附前, Iref = 0.28 nm Vbias = 420 mV, 扫描区段 32 × 18 nm; (b)吸附后, Iref = 0.10 nA Vbias = 266 mV, 扫描区段 24 × 14 nm

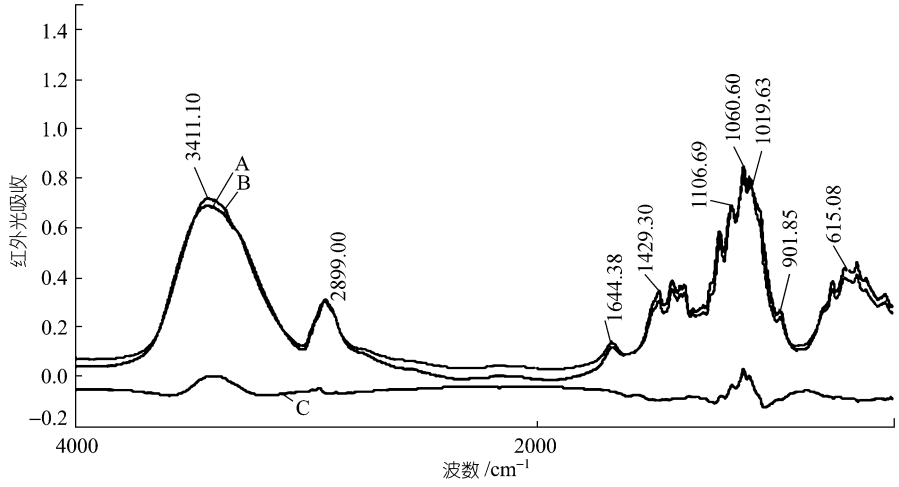

图 4　CBH Ⅰ结合纤维二糖后再吸附时所致红外差谱

A 示天然纤维; B 示吸附 CBH Ⅰ(结合纤维二糖)后; C 示 B ~ A 的红外差谱

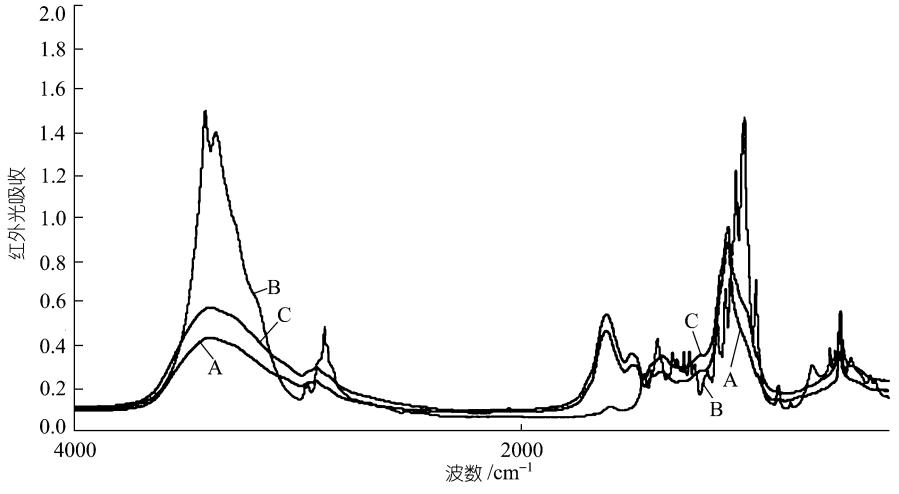

图 5　CBH Ⅰ(A)与结合纤维二糖后(B)的红外差谱(C)

结果显示: 结合纤维二糖后的 CBH Ⅰ 3600 ~ 3200 cm^{-1} 的氢键区的吸附强度显著增加,

1700 cm^{-1}附近的酰胺谱带Ⅰ, C—O 伸缩峰, 吸收强度有增强. 1600 ~ 1400 cm^{-1}和 1300 cm^{-1}区域的酰胺Ⅱ,Ⅲ带, N-H 伸展振动和 N-N 弯曲振动强度改变不大.

而纤维二糖分子用微量 CBHⅠ微扰后(纤维二糖与 CBHⅠ物质的量比为 100∶1), 红外光谱图也会发生显著变化. 3600 ~ 3200 cm^{-1} 的氢键区 O—H 伸缩率吸收强度显著减弱, 而且 3431 和 3370 cm^{-1}两个峰减弱为一个宽峰. 1400 ~ 1200 cm^{-1}, O—H 弯曲峰, 1300 ~ 1000 cm^{-1}, C—O 伸缩峰, 1000 ~ 900 cm^{-1}, “指纹区”, C 骨架震动峰等吸收强度都发生了变化, 而且产生了由振动耦合形成的多重分裂峰, 峰形变化很大(图略). 这说明纤维二糖可进入 CBHⅠ内部, 它的羟基与酶分子的酰胺基有极强的分子相互作用力, 使酶分子构象发生了较大的变化.

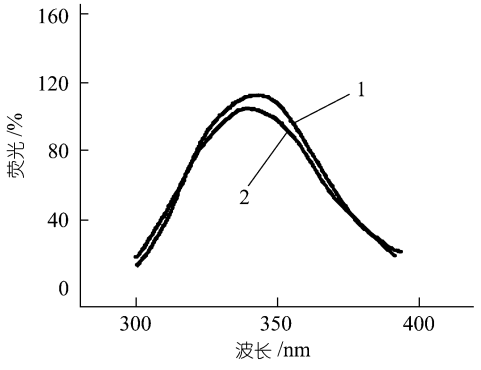

图 6 CBHⅠ(1)结合纤维二糖后(2)荧光色谱

2.5 CBHⅠ结合纤维二糖后荧光的变化(图 6)

CBHⅠ的荧光激发谱和发射谱数据(表 1)表明 CBHⅠ的内源荧光主要来自色氨酸.

CBHⅠ的内源荧光主要来自色氨酸, 而纤维二糖(8 mmol/L)加入后, 酶荧光强度下降了 5% ~ 6%, 发射峰红移了 2 nm, 表明酶与纤维二糖结合使荧光发生了变化.

根据 CBHⅠ结合纤维二糖后对酶荧光强度的影响(图略)进行分析[19]可求得到酶与纤维二糖的解离常数(Ks)为 2.04 mmol/L, 标准自由能变化 $\Delta G^0 = -RT\ln(Ks)^{-1} = -3.67$ kcal/mol.

表 1 CBHⅠ的荧光激发谱和发射谱数据

酶	激发谱		发射谱	
	λ_{ex}	发射	激发	λ_{cm}
天然 CBHⅠ	283	310	280	343
	282	360	295	343
盐酸胍	279	310	280	360
变性 CBHⅠ	281	360	295	360

CBHⅠ结合纤维二糖后, 再用 N-溴代琥珀酰亚胺(N-bromosaccinimide, NBS)进行氧化(当 NBS∶CBHⅠ为 25∶1), 酶活力可保存 92.1%, 而对照酶活力则接近全部丧失. 纤维二糖的结合可使 NBS 修饰的色氨酸数由 7.2 降至 6.4(图 7)

2.6 圆二色谱测定

CBHⅠ的圆二色谱呈现一典型的β-结构特征, NBS 的氧化也未使 CBHⅠ酶分子构象发生明显变化, 所以表明被修饰的色氨酸中很可能有一个位于或接近酶的活性位点(图 8).

综合上述实验结果, 可得出纤维二糖抑制 CBHⅠ水解催化活力是通过以下两条途径实现的: (ⅰ) CBHⅠ结合纤维二糖后导致无效吸附, 不能像纤维素酶正常吸附时那样提供水解底物——基元纤维(纤维素分子链). CBHⅠ的活性中心呈狭长的隧道状深陷于催化结构域内部, 因此, 它只能接受单根纤维素分子链进入[21]. 而结晶纤维素的表面并无游离纤维素分子链的存在, 因此, 在水解作用发生前, 必需有单根纤维素分子链由纤维表面分离出来[22,23]. 研究表明, 这一过程是纤维素酶分子吸附结构域吸附纤维素表面后实现的[20,21]. 而 CBHⅠ结合纤维二糖

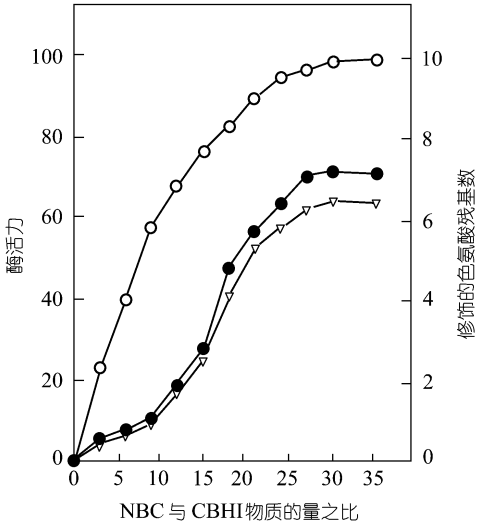

图 7　CBHⅠ结合纤维二糖后对 NBS 氧化色氨酸的影响

○—○示含纤维二糖时 NBS 对 CBHⅠ的影响; ●—●示无纤维二糖时 NBS 对 CBHⅠ的影响; ▽—▽示修饰的色氨酸残基数

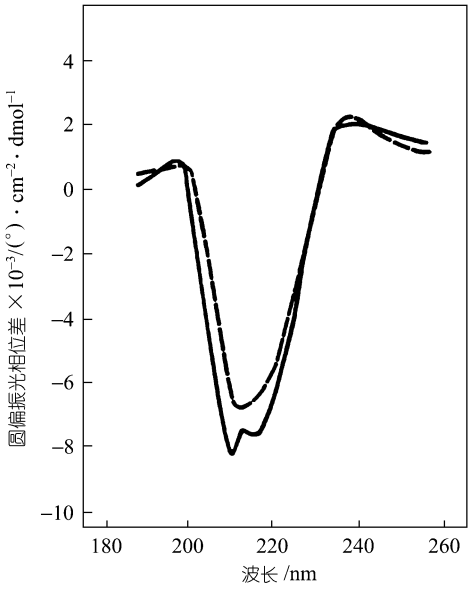

图 8　NBS 氧化修饰对 CBHⅠ构象的影响(圆二色谱)

后，虽然仍可吸附，但由于酶分子构象已发生较大变化，因而并未能造成纤维氢键结合力的降低和微纤维束的分离，是一无效吸附[24]，使水解作用因缺少底物而不能发生. (ⅱ) 纤维二糖在活性中心附近与色氨酸的结合，发生了“空间位阻”[24]效应，阻塞了狭窄的活性中心隧道，即使有单根纤维素分子链的存在也难以进入，使得水解作用难以进行. 但这种抑制是可逆的，图 1 的透析实验即表明透析去除纤维二糖后，水解作用仍可恢复. Lee 等人[25]近来研究纤维二糖对β-葡萄糖苷酶等水解含有纤维二糖单元的寡糖同系物时，动力学分析表明纤维二糖的抑制作用是强竞争性抑制，纤维素分子链的结构单元为纤维二糖. 由此看来，它对 CBHⅠ水解的抑制作用也应属竞争性抑制. 相应的一些应用研究表明，加入β-葡萄糖苷酶使纤维二糖水解为葡萄糖，可大大减低抑制效应[17,26]，而结合固定化酶(细胞)技术进一步转化葡萄糖为其他产物，则可望实现纤维素水解的持续进行.

参　考　文　献

1　Beguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13: 25 ~ 58

2　Ven Tilbeurgh H, Loontiene F G, Engelborgs Y, et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei*. QM 94014. Eur J Biochem, 1989, 184(3): 553 ~ 559

3　Lee Y H, Fan L T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis insoluble cellulose(Ⅱ). Biotech & Bioeng, 1983, 25: 959 ~ 966

4　Tomme P, Warren R A, Gillkes N. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv Microb Physiol, 1995, 37: 1 ~ 8

5　Divne C, Stahlberg J, Reinikaimen T, et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase Ⅰ from *Trichoderma reesei*. Science, 1994, 65: 524 ~ 528

6　阎伯旭，高培基. 外切葡聚糖纤维二糖水解酶的纯化和性质研究. 生物化学杂志, 1997, 13: 362 ~ 364

7　阎伯旭，高培基. 内切葡聚糖酶的纯化和性质研究. 生物化学杂志, 1997, 13: 580 ~ 585

8 Zhang Y X, Liu Jie, Gao P J, et al. Structure investigation of cellobiohydrolase Ⅰ from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 with a scanning tunneling microscopy. Applied Physics A, 1998, 67: 483 ~ 485

9 Yan B X, Sun Y Q. Domain structure and conformation of a cellobiohydrolase from *Trichoderma pseudokoningii*. J Protein Chem, 1997, 16: 59 ~ 66

10 Yan B X, Sun Y S, Gao P J. Intrisic fluorescece of endoglucanase and cellobiohydrplase from *Trichoderma pseudokiningii* S-38. J Protein Chem, 1997, 7: 681 ~ 688

11 阎伯旭, 高培基. 色氨酸在内切葡聚糖酶分子中的作用. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14: 181 ~ 185

12 Wang D, Qu Y B, Gao P J. Transglycosylation of extracellular glucosidase of *T. pseudokoningii* s38 and its fuction in cellulase biosynthesis. J Gen Appl Microbiol, 1996, 42: 363 ~ 369

13 Palomen H, Tenkanen M, Linder M. Dymanic Interaction of trichoderma reesei cellobiohydrolases cella and Ce17 A and cellulose at eqilibrium and during hydrolysis. Appl Envr Microbiol, 1999, 65: 5229 ~ 5233

14 Bikales N M, Segel L. Cellulose and cellulose derivatives. New York: Wiley Inter Science, 1986. 305 ~ 320

15 Michell A J. Second-derivative FT-IR spectra of native cellulose. Carbohydrate Research, 1990, 197, 53 ~ 60

16 张玉忠, 陈秀兰, 刘 洁, 等. 棉花纤维超微结构的扫描隧道电镜观察. 生物化学生物物理学报, 2000, 31: 521 ~ 523

17 Herner M L, Melnick M S, Rabinovich M L. Enhancement of the affinity of cellobiohydrolase Ⅰ and its catalytic domain to cellulose in the presence of the reaction product-cellobiose. Biochemistry (Mosc), 1999, 64: 1012 ~ 1029

18 陈惠黎, 李文杰. 分子酶学. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 233 ~ 278

19 Fersht A. Stereochemistry of enzymatic reaction. In: Enzyme Structure and Mechanism. 2nd. New York: Freeman W and Company, 1985. 221

20 Gao P J, Chen G J, Wang T H, et al. Non-hydrolytic disruption of crystalline stucture of cellulose by cellulose-binding domain and linker sequence of cellobiohydrolase Ⅰ from *Penicillium janthinellum*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2001, 33: 13 ~ 18

21 Xiao Z H, Gao P J, Qu Y B, et al. Cellulose-binding domain of endoglucanase Ⅲ from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. Biotech Letter, 2001, 23: 711 ~ 715

22 Teeri T T, koivula A, Linder M, et al. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase: why so efficient on crystalline cellulose? Biochemical Society Transactions, 1998, 26: 173~178

23 Sinnott M L. The cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei*: a review of indirect and direct evidence that their function is not just glycoside bond hydrolysis. Biochem Soc Trans, 1998, 26: 160 ~ 164

24 VäLJamäe D, Sild V, Pettersson G, et al. The intial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolase Ⅰ and Ⅱ consistent with a cellulose surface-erosion model. Eur J Biochem, 1998, 253: 469 ~ 495

25 Lee S B, Park K H, Robyt J F. Inhibition of β-glycosidases by a carbose analogues containing cellbiose and lactose structures. Carbohydrate Research, 2001, 331: 13 ~ 18

26 Medve J, Stahlberg J, Tjerneld F. Isotherim for adsorption of cellobiohydrolase Ⅰ and Ⅱ from *Trichodema reesei* on microcrystalline cellulose. Appl Biochem Biotech, 1997, 66: 39 ~ 56