

·成果简介·

天然纤维素在生物降解过程中 超分子结构的变化

高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

庞世瑾

(中国科学院真空物理实验室, 北京 100080)

[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原料,对防治环境污染和建立良性生态系统也会发挥重要作用。

作为植物的结构性材料,由 β -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 α -1, 4-糖苷键联结葡萄糖苷组成的淀粉相比,纤维素酶的分子转化率要较淀粉酶低约两个数量级。但是,由 β -1, 4-糖苷键构成的纤维素寡糖,却较由 α -1, 4-糖苷键构成的麦芽寡糖更易被水解;而纤维素无定形区的酶解速率与淀粉相近。这些表明,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——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。我们针对此问题开展了研究,取得的阶段性成果表明,氢键断裂所致纤维素超分子结构的破坏是纤维素降解过程中普遍存在的机制,是天然纤维素生物降解的限速阶段。主要结果有:

1. 纤维素是由吡喃葡萄糖残基通过 β -1, 4-糖苷键联结成的线性大分子,分子链平行有序排列的为结晶区,松弛不规则聚集的为无定形区,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高级结构,以及结晶区晶胞的结构如何,仍存在很大分歧。

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2nm—4nm的基元原纤,和由其聚集排列成直径为10nm—25nm的微原纤和由微原纤聚集成成的原纤(图1)。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域;有序区是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2)。对微晶纤

本文于1997年4月22日收到。

纤维素进行隧道扫描观察,也取得了与此一致的结果。上述研究为在动态过程中进行纤维素降解机制研究以及在纺织、造纸工业和棉花品种选育等方面的应用提供了有力支持。

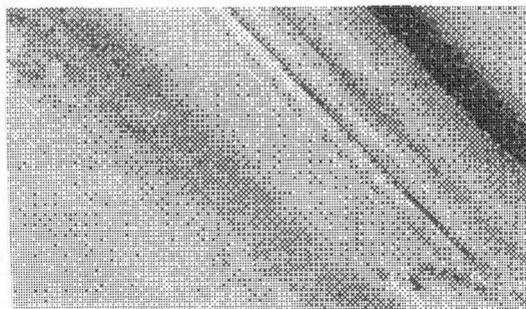


图1 棉花纤维的 STM 图像

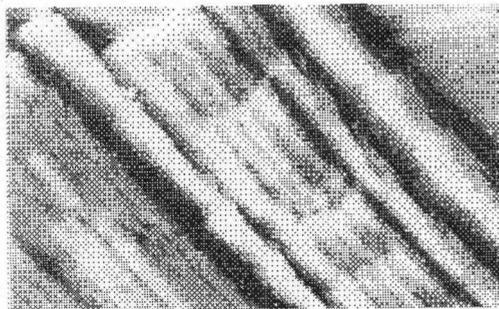


图2 天然纤维素的结晶区与无定形区结构

2. 每个葡萄糖残基中都含有三个醇羟基,羟基中的氢原子与相邻的氧原子间距离小于 0.28nm — 0.30nm 时都可能形成氢键。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。植物最初合成的纤维素分子链是呈高度水合状态,后逐渐失水,藉氢键的形成造成螺旋状和聚集成基元原纤。结晶区内的氢键属于结合性强的不可逆类型。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。上述关于氢键作用的认识主要来自于结构化学的理论分析。在纤维素酶解研究的早期,Rees 即曾提出应存在使氢键断裂的酶,但半个世纪以来尚未能找到这个组分。80年代以来此问题又引起重视。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,而未涉及纤维素的超分子结构,对氢键的作用也只能是推测,在纤维素降解研究中尚未见关于氢键变化的直接测定。我们应用 STM 观察到棉花纤维的超分子结构之后,又在降解过程中对其进行红外光谱、X-光衍射、结晶程度、微量热活性和聚合度的测定及末端基分析等,得到了一系列结果:(1)酶解过程中纤维尺寸显著变小,特别是宽度变窄,微纤完全解离,呈小角度螺旋状存在,称其为短纤维。由于已知微纤之间只存在氢键的联结,显然这是氢键断裂所致。(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($< 5000\text{ D}$)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。由拟康氏木霉培养物经 Sephadex LH20, Sephadex DEAE-25 和 HPLC 等色谱方法分离纯化,得到了这一“短纤维形成因子”。它是分子量约为 2400 D 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°C 和 pH 6.0,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,造成氢键断裂,并导致糖苷键断裂。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 SP 分离到的分子量 9.2 kD 的内切酶和由担子菌

分离到的纤维二糖脱氢酶等，作用于棉纤维和滤纸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。这表明，短纤维的形成是微生物酶解纤维素过程中普遍存在的一种机制，可由酶或非酶多肽所催化，是一种氧化性降解，与已知纤维素酶类水解糖苷键的作用机制明显不同。

4. 纤维素酶分子呈蝌蚪状，难以形成结晶，由 X-光衍射只得到了其球状催化区的图像，全酶分子的图像是综合生物化学、生物物理学等多方面研究后提出的。我们应用 STM 技术直接观察到外切葡聚糖纤维二糖水解酶 (CBH) 的全酶分子构象，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，提供了有力支持。

现有的关于天然纤维素的酶解机制的分析，均以丝状真菌如木霉等的纤维素酶系中的三类组分——内切葡聚糖酶 (EG)，外切纤维二糖水解酶 (CBH) 和 β -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)，造成的短纤维形成，为三类糖苷酶的协同作用提供了基础，是天然纤维素生物降解的初始和限速阶段。据此，我们提出了天然纤维素生物降解机制模式图 (图 3)。

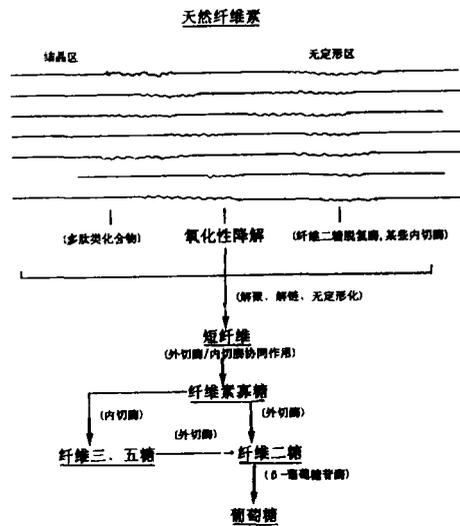


图 3 天然纤维素生物降解机制模式

CHANGES IN THE SUPERMOLECULAR STRUCTURE OF NATIVE CELLULOSE DURING BIODEGRADATION

Gao Peiji

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

Pang Shijin

(Lab. of Vacuum-Physics, CAS, Beijing 100080)

Key words cellulose, cellulase, hydrogen bond