

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0073-05

纤维二糖诱导阻遏真菌合成纤维素酶 的特异性基础^{*}

艾云灿¹, 孟繁梅¹, 高培基², Christian P KUBICEK³

(1. 中山大学生物化学系, 广东 广州 510275;

2. 山东大学微生物研究所; 3. 维也纳理工大学)

摘 要: 定量比较研究黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AMS11 和里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) QM9414 细胞内、细胞外及细胞质膜结合态 β -葡萄糖苷酶 (β GLase, EC 3.2.1.21) 同工酶对 17.5 mmol/L D (+)-纤维二糖 ($[\alpha]_D^{20} + 35^\circ$) 转化作用, 旨在揭示多亚细胞定位 β GLase 功能差异及物种特异性基础. 结果发现两菌株中胞内和胞外 β GLase 都只能水解之产生葡萄糖, 而质膜结合态 β GLase 则按一定比例同时将其水解生成葡萄糖和转糖基生成龙胆二糖, 且菌株 AMS11 的转化能力都比 QM9414 的强. 观察到“葡萄糖亏损”现象, 暗示该转化过程存在基于葡萄糖耗损的代谢过程偶联. 提出由多亚细胞定位的 β GLase 同工酶介导诱导物形成与转化的“亚调控网络”模型, 解释同一浓度纤维二糖对不同物种具有诱导或阻遏效应差异的生理学基础.

关键词: β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21); 亚细胞定位; 调控网络; 黑曲霉 (*Aspergillus niger*); 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)

中图分类号: Q93.1 文献标识码: A

早期生理学研究发现黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 两类典型代表菌株在含纤维素培养基上均能大量诱导合成纤维素酶. 纤维二糖是纤维素降解的主要中间产物, 但一般只有在较低浓度 (< 10 mmol/L) 时可以诱导菌株产纤维素酶, 而较高浓度 (> 20 mmol/L) 时有阻遏作用^[1], 这种诱导与阻遏效应转换的临界浓度值随物种差异极大. 前文^[2,3]已报导 *A. niger* AMS11 和 *T. reesei* QM9414 中 β -葡萄糖苷酶 (β GLase, EC 3.2.1.21) 同工酶都具有细胞内、细胞外和细胞质膜结合态等 3 类不同亚细胞定位, 对纤维二糖有水解和转糖基化作用. 本文进一步定量比较研究 2 菌株对中等浓度 (17.5 mmol/L) 纤维二糖的相对转化能力差异, 阐明同一浓度纤维二糖对不同物种具有诱导或阻遏效应差异的生理学基础, 为进一步指导研究纤维素酶系诱导合成中 β GLase 网络化调控作用分子机制提供实验依据.

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39400002; 39670008); 广东省自然科学基金资助项目 (96074)

收稿日期: 1999-06-14; 作者简介: 艾云灿 (1963~), 男, 副教授.

1 材料和方法

1.1 材料

各试剂和 *A. niger* AMS11 和 *T. reesei* QM9414 菌株来源和特征同前文^[2]。

1.2 βGLase 同工酶无细胞抽提物制备和转化试验

参考文献 [2] 方法培养菌丝和诱导产酶及制备胞外、胞内和细胞质膜结合态 βGLase 同工酶。菌株 QM9414 质膜结合态 βGLase 与该菌株 βGLase 同工酶中 76 000 (pI 8.4) 组分单克隆抗体交叉反应^[3]，可作微量免疫印迹检测。按前文^[2]方法和参数分别将两菌株 3 类同工酶加入用 10 mL 10 mmol/L, pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液配制的标准品 D(+)-纤维二糖 ([α]_D²⁰+35°) 溶液（使终浓度为 17.5 mmol/L），进行转化反应，转化产物作三甲基硅醚衍生化和 GC-MS 检测分析，表征特征组分峰积分面积，实验重复 3 次。Finnigan MAT-SSQ7100 色谱质谱联用仪器软件、试剂及状态参数值等均同文献 [2]。

2 结果

2.1 比较 AMS11 和 QM9414 的 3 类 βGLase 同工酶特征酶活性

表 1 结果显示 2 菌株 3 类 βGLase 同工酶制备物特征酶原始活性差异较大，3 次实验结果重现性好。将它们的活性调整约为 0.5 μmol/(min·mL) 后用于比较转化实验。

表 1 AMS11 和 QM9414 菌株 3 类 βGLase 同工酶特征酶活性¹⁾

Tab 1 Activity of intra-, extra- and plasma-membrane-bound β-glucosidase from AMS11 and QM9414

同工酶组分	<i>A. niger</i> AMS11	<i>T. reesei</i> QM9414
胞外 βGLase	2.15±0.06	1.80±0.02
质膜结合态 βGLase	0.67±0.02	0.59±0.01
胞内 βGLase	0.87±0.05	0.49±0.02

1) 酶活性的单位为 μmol/(min·mL)

2.2 比较 AMS11 和 QM9414 的胞内和胞外 βGLase 同工酶对纤维二糖的水解能力

表 2 结果以终产物中积累葡萄糖（合并考虑 α-, β-差向异构体）含量作为基准，度量水解解除纤维二糖积累的相对能力差异。两菌株都没有龙胆二糖产物生成，只有水解作用，且 AMS11 比 QM9414 的水解力强得多。胞内 βGLase 的差异更突出，在相同实验条件下 AMS11 完全水解 17.5 mmol/L 纤维二糖，而 QM9414 菌株却只能水解约 28.08%，前者积累葡萄糖量约为后者的 2.04 倍。*T. reesei* QM9414 菌株内胞内与胞外 βGLase 水解能力差异也极大，与该菌株的 2 类 βGLase 免疫无关事实^[3]相呼印。表明 βGLase 同工酶水解活性受

表 2 两菌株胞外和胞内 βGLase 转化纤维二糖后特征产物组分峰积分面积 (×10⁸) 统计¹⁾

Tab 2 Comparison on specific peaks of products transformed by intra- and extra βGLase from AMS11 and QM9414

同工酶组分		(α,β)-葡萄糖	(α,β)-纤维二糖	(β)-龙胆二糖
胞内 βGLase	AMS11	14.87±0.47 (100)	0.0±0.02 (0)	0 (0)
	QM9414	7.30±0.32 (100)	5.25±0.14 (71.92)	0 (0)
胞外 βGLase	AMS11	13.75±0.41 (100)	0.42±0.25 (3.05)	0 (0)
	QM9414	9.24±0.33 (100)	2.55±0.27 (27.59)	0 (0)

1) 括号中数字表示以同一菌株在同一处理下的葡萄糖含量为基准的百分比

葡萄糖终产物的反馈抑制，因而相应存在对纤维二糖的水解极限，且极限值在不同菌株之间及不同亚细胞定位 β GLase 同工酶组分之间都不相同。

2.3 比较 AMS11 和 QM9414 的质膜结合态 β GLase 对纤维二糖的水解和转糖基作用能力

表 3 指出相同条件下水解纤维二糖和转糖基生成 β -龙胆二糖（强诱导物）^[3] 两方面 AMS11 和 QM9414 质膜结合态 β GLase 的相对转化能力差异显著：从转化终产物中纤维二糖残余量看，两者比值为 1 : 1. 91；就生成龙胆二糖量看，两者比值为 1. 05 : 1，表明 AMS11 比 QM9414 水解纤维二糖和将其转化生成强诱导物的能力都强。理论推算水解 1 分子纤维二糖可生成 2 分子葡萄糖，产物中纤维二糖减少量与葡萄糖生成量应该正向关联，但表 3 显示 AMS11 较之于 QM9414 而言，虽然 (α, β) 纤维二糖残余量显著减少（两者比值为 1 : 1. 91），但所积累 (α, β) 葡萄糖量却没有随之增加，反而是减少了（两者比值为 1 : 1. 13）。对此我们称之为“葡萄糖亏损”现象，机制还不明了，可能暗示基于葡萄糖耗损的能量代谢和基质传递事件与转糖基反应过程相偶联发生，看来相关酶类在质膜上的有序结构状态及能量活化方式，都是保证生理学条件下进行转糖基反应的必要物质基础^[4]。

表 3 比较 AMS11 和 QM9414 质膜结合态 β GLase 对纤维二糖的水解和转糖基作用能力
Tab 3 Comparison on activity of transglycosylation and hydrolysis of plasma-membrane-bound β GLase

特征组分峰积分面积		AMS11	QM9414	AMS11 : QM9414
1	α -Glucose	$4. 02 \pm 0. 26 \times 10^8$	$4. 13 \pm 0. 27 \times 10^8$	1 : 1. 13
2	β -Glucose	$4. 75 \pm 0. 21 \times 10^8$	$5. 79 \pm 0. 32 \times 10^8$	
3	α -Cellobiose	$1. 09 \pm 0. 19 \times 10^8$	$2. 49 \pm 0. 24 \times 10^8$	1 : 1. 91
4	β -Cellobiose	$1. 05 \pm 0. 23 \times 10^8$	$1. 59 \pm 0. 34 \times 10^8$	
5	β -Gentiobiose	$5. 55 \pm 0. 30 \times 10^6$	$5. 27 \pm 0. 26 \times 10^6$	1. 05 : 1

3 讨 论

文献 [1] 认为不溶性纤维素基质胁迫诱导菌丝体内纤维素酶系基因组表达是复杂的全局网络调控。接种孢子早期萌发过程中表面束缚水解酶类微弱降解纤维素基质积累中间产物——纤维二糖，启动早期诱导信号传导^[1, 3]。我们已阐述优秀重组子中由 β GLase 介导的酶系诱导合成和酶系水解活性“双重协同增效”作用^[5, 6]，证实质膜结合态 β GLase 参与龙胆二糖等诱导物的形成和转化作用^[1, 2]，基因中断研究^[7]证明胞外 β GLase 不是唯一参与诱导物转化的同工酶组分，本文进一步揭示多亚细胞定位^[3] β GLase 功能区域化构成及生理学功能差异。综合系列研究结果^[1~3, 5~7]，借鉴细菌合成纤维素过程中质膜上有关酶类有序结构状态及能量活化方式的相关假说^[4]，归纳提出如图 1 所示“亚调控网络”模型，来理解多亚细胞定位 β GLase 同工酶参与诱导物形成与转化的基本过程。

就诱导性论，纤维二糖必须被胞外和胞内 β GLase 水解成为葡萄糖，部分被代谢产生能量（如 GTP，ATP，UTP 等），生成活化态 UDP-葡萄糖单体，并激活质膜结合态 β GLase 实施转糖基反应，生成有更强诱导力的葡二糖衍生物（如龙胆二糖）^[2, 4]；就解除纤维二糖胞内局部积累所产生阻遏效应来看，胞外和胞内 β GLase 水解作用为粗调，质膜结合态 β GLase 主宰水解与转糖基化反应之间的竞争取向是有力细调。即由多亚细胞定位 β GLase 同工酶构成“亚调控网络”，可以精细调节细胞对纤维二糖耐受量及进一步代谢产生能量

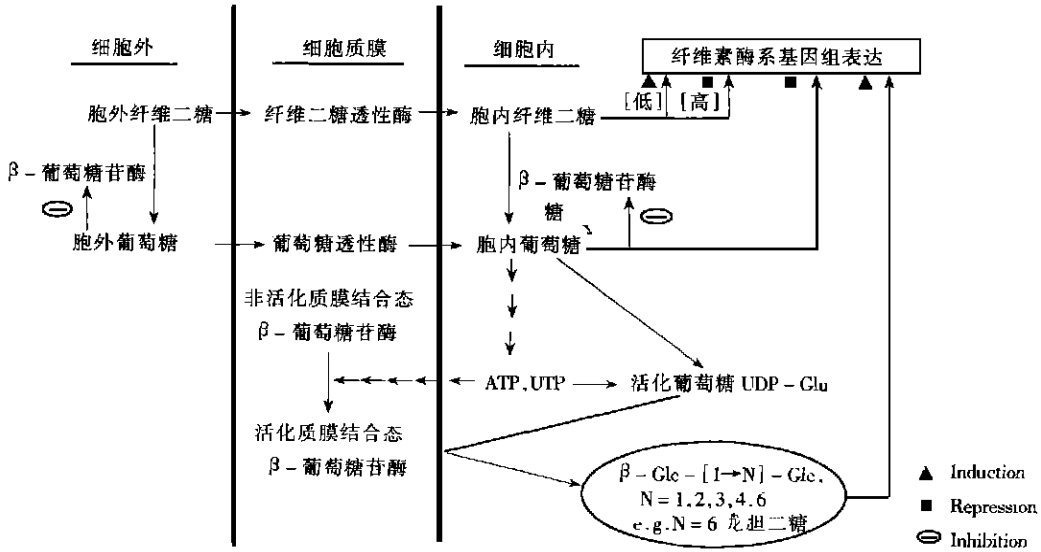


图 1 多亚细胞定位的βGLase 调节纤维二糖代谢及诱导物形成的“亚调控网络”假定模型

Fig. 1 A proposed model of sub-network composed of intracellular, extracellular, plasma-membrane-bound β-glucosidase for the regulation of cellobiose metabolism and inducer fomation

与转糖基化生成强诱导物的反应方向、速率和程度的临界阈值，物种βGLase 同工酶差异决定同一浓度纤维二糖对不同物种纤维素酶系合成的诱导或阻遏效应的程度差异。菌株 QM9414 质膜结合态βGLase 转化纤维二糖生成强诱导物（如龙胆二糖）能力较弱（表 3），显著受外加槐糖和龙胆二糖等强诱导；而菌株 AMS11 转糖基能力较强，可转化纤维二糖生成龙胆二糖等强诱导物，表现出两种二糖诱导程度差异较小；菌株 AMS11 比 QM9414 耐受较高浓度纤维二糖累积，源于胞外和胞内βGLase 水解能力较强（表 1, 2），及相应βGLase 同工酶耐受葡萄糖反馈抑制的临界浓度（或 K_i 值）普遍较高^[8]。这些结果提供有益线索，可指导我们进一步采用基因中断^[7]系统阐述各亚细胞定位βGLase 同工酶参与网络化调控作用的分子机制和基因工程育种。

参考文献:

[1] [1] KUBICEK C P, MESSNER R, GRUBER F, et al. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory organism[J]. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 90 ~ 99.

[2] AI Y C, GAO P J, KUBICEK C P, et al. Major transglycosylation products of β-glucosidase and their induction effects on cellulase fomation[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 70 ~ 74.

[3] HOFER F, WEISSINGER E, KUBICEK C P, et al. A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β-glucosidase from *Trochoderma reesei*; reactivity with other *Trichoderma* β-glucosidases [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 992: 298 ~ 306.

[4] ROSS P, MAYER R, BENZIMAN M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria[J]. Micro Rev, 1991, 1: 35 ~ 58.

[5] 艾云灿, 藤如君, 高培基, 等. 真菌纤维素酶系基因组的属间遗传表达相容性[J]. 微生物学报, 1998 (3): 186 ~ 192.

[6] AI Y C, MENG F M, XU Y C. Hybridization dominance of kinetics of cellulase in excellent recombinants ATH-

1376 J]. Chin J Biotechnol, 1997, 3: 161 ~ 168.

- [7] MACH R L, SEIBOTH B, KUBICEK C P, et al. The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible β -glucosidase involved in cellulase induction by sophorose[J]. Mol Microb, 1995, 16: 687 ~ 697.
- [8] ENARI T M. Fungal Cellulase. In: Fogarty W M ed. Microbial Enzymes and Biotechnology[M]. London and New York: Applied Science Publishers, 1983. 194 ~ 210.

Basis of Specificity of Induction and Repression by Cellobiose on Cellulase Biosynthesis in Fungi

AI Yun-can^{*}, MENG Fan-mei, GAO Pei-ji, KUBICEK Christian P

Abstract: The transformation of authentic *D*(+)-cellobiose ($[\alpha]_D^{20} + 35^\circ$) of 17.5 mmol/L was investigated by intracellular, extracellular and plasma-membrane-bound β -glucosidase (β GLase, EC 3.2.1.21) from *Aspergillus niger* AMS11 and *Trichoderma reesei* QM9414, respectively. Only glucose could be accumulated from the hydrolysis of cellobiose by intra- and extracellular β GLases whereas gentiobiose besides glucose could be formed with a certain ratio from the transglycosylation and hydrolysis of cellobiose simultaneously by plasma-membrane-bound β GLase. Strain AMS11 possessed dominant all abilities of these transformations over strain QM9414. A phenomenon of so-called “glucose-erosion” was observed indicating the essential fact that the transglycosylation process catalyzed by the plasma-membrane-bound β GLase should be coupled with the glucose-consumption metabolism. A sub-network composed by the isozymes of β GLases with multiple cellular locations was thereby proposed for explaining the regulation of inducer transformation from cellobiose and demonstrating the physiological basis for the specificity of different effects of cellobiose with the same concentration, by which induce or repress cellulase biosynthesis in fungi.

Keywords: β -glucosidase (EC 3.2.1.21); subcellular location; network for regulation; *Aspergillus niger*; *Trichoderma reesei*

^{*} Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China