

密粘褶菌胞外低分子量多肽在纤维素降解中作用的研究*

王 蔚 高培基**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要: 从褐腐真菌中能强烈降解纤维素的代表菌株密粘褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)的胞外酶液中首次分离纯化得到一低分子量的活性多肽组分(称作 Gt 因子),此组分能在有 O₂ 和 Fe³⁺ 存在时产生羟基自由基 HO·,对纤维素降解的研究表明,Gt 因子不同于纤维素酶对纤维素的 β-1,4-糖苷键的水解作用,而以 HO· 氧化的途径作用于纤维素,导致纤维素中氢键的断裂,降低纤维素的结晶度,使其暴露出更多的末端,从而有利于纤维素的进一步降解。

关键词: 褐腐真菌,纤维素,氧化降解,羟基自由基 HO·

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)02-0220-06

天然木质纤维素中由于木素的包被作用,在木素未被降解时,纤维素不能被酶解,这是木质纤维素材料难以被有效利用的主要原因。而褐腐菌却可在木素未降解的条件下有效地降解纤维素。褐腐菌降解纤维素方式的这一独特性正日益受到关注,但其降解机制却一直未阐明。尽管褐腐菌降解纤维素能力极强,但却不具有对水解纤维素结晶区至关重要的外切纤维素酶^[1]。自 60 年代,Halliwell 提出 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 反应生成的羟基自由基 HO· 可能氧化降解纤维素的假说后^[2],研究者一直推测褐腐菌可能存在一种独特的、非酶的小分子物质在纤维素降解的初期起作用。虽然研究发现植物细胞壁上孔径的大小不足以让酶分子进入^[3],但却一直未能分离到这一小分子活性物质,对它的作用一直是推测和类比分析,还没有直接的证据证明 HO· 氧化降解纤维素机制的确凿性。90 年代初,Enoki 等曾报道得到一部分纯化的多肽类物质^[4],能产生 HO·,但近十年来,一直未再有详细的纯化工作及其在纤维素降解中作用的研究报道;最近,又有学者提出密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 胞外培养液中分得的醌类化合物是在褐腐菌纤维素降解中起着重要作用的小分子物质^[5],但醌类物质为木素降解产物,褐腐菌在降解木质纤维素的初期基本不降解木素,所以醌类物质为降解初期的小分子活性物质的可能性不大。近年来,关于褐腐菌以 HO· 途径氧化降解机制的争论较多^[6],焦点问题之一是尚未得到这一活性小分子物质,其二是缺少直接的证据表明小分子物质与纤维素降解之间的联系,因此 HO· 氧化降解机制一直未能正式确立。

本文在广泛研究多株褐腐菌降解纤维素特性的基础上^[7],于密粘褶菌 *G. trabeum* 的胞外培养液中首次分离纯化得到一低分子量的活性多肽纯组分,证实其确能形成 HO· 并研究了此多肽在纤维素降解中的作用,结果证实此小分子多肽在褐腐菌降解纤维素的初

* 国家自然科学基金资助项目(39970004,29906005)

** 通讯联系人:Tel:0531-8563756;E-mail:gaopj@sdu.edu.cn

作者简介:王蔚(1970-),女,河北盐山人,讲师,现为山东大学生命学院在读博士,主要从事生物化学和纤维素降解方面的研究。

收稿日期:2001-05-31,修回日期:2001-10-10 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

期起着重要的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株

密粘褶菌 (*Gloeophyllum trabeum*) 7047 由中国林业科学院林业科学研究所提供。

1.2 试剂

Sephadex G-10 购自 Pharmacia 公司, 2-酮-4-硫甲基丁酸 (KTBA)、2-脱氧-D-核糖、纤维二糖、硫代巴比妥酸钠 (TBA)、 Fe^{2+} 指示剂 ferrozine、铬天青 (CAS) 和十六烷基三甲基溴化铵 (HDTMA) 均为 Sigma 产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养方法及胞外酶液的制备^[7]

1.4 低分子活性组分的分离与纯化

将制备的胞外酶液经截留分子量 5kD 的膜 (Amicon) 超滤, 滤过液浓缩后上 Sephadex G-10 柱 ($\phi 1.6 \times 100\text{cm}$) 进行初步分离, 再经 HPLC 反相 C18 柱 ($4.4 \times 50\text{mm}$, 粒径 $5\mu\text{m}$) 两次分离纯化得到一低分子量的活性组份。分离纯化步骤详见文献 [8]。

1.5 CMC-Na 粘度实验

将样品溶液 ($2\mu\text{g}$ 蛋白/mL) 与等体积的 2% CMC-Na 溶液混合, 50°C 保温一定时间后通过测定溶液流经奥氏粘度计的时间的变化来相对地测定 CMC-Na 溶液粘度的变化和表征其解聚的发生。

1.6 $\text{HO}\cdot$ 的生成测定

1.6.1 KTBA 法: 依照文献 [9], 于样品中加入 10^{-5}mol KTBA, 通入 O_2 后上部取气, 通过气相色谱检测 KTBA 被 $\text{HO}\cdot$ 氧化生成的乙烯来判定 $\text{HO}\cdot$ 的产生, 所用仪器为 Shimadzu 公司的 GC-8A 气相色谱仪。

1.6.2 TBA 法^[10]: 1mL 含 2-D-脱氧核糖 (4mmol/L)、纤维二糖 (0.8mmol/L)、 FeCl_2 (0.1mmol/L) 的柠檬酸缓冲液 (0.05mmol, pH5.5) 与 1mL 样品混合, 30°C 振荡反应 1h, 加入 1mL 硫代巴比妥酸 (TBA, 1%, 用 0.05mmol/L NaOH 溶液配制) 和 1mL 三氯乙酸 (2.8%), 100°C 加热反应 15min, 冷却后于 532nm 测光吸收。

1.7 浊度的测定

采用 HF Scientific 公司的 DRT-15CE 型浊度仪进行测定。

1.8 滤纸聚合度的测定

采用铜乙二胺溶液测定法测定^[11]。

1.9 铁氰化钾对纤维素底物还原力的检测^[12]

向棉花纤维素粉加入 3mL 蒸馏水, 再加 1mL 氰化物-碳酸盐溶液 (0.064% 氰化钾与 0.52% 碳酸钠) 和 1mL 0.05% 铁氰化钾溶液, 沸水浴 15min, 冷却 5min, 加入 2mL 铁铝-磷酸试剂显色, 600nm 下测定光吸收。

1.10 红外光谱检测

纤维素材料与溴化钾混合压片, 用 710FT-IR Spectrometer 测试。

1.11 X-光衍射光谱检测

采用 D/max-rB X-光衍射仪测试纤维素材料的结晶度。

1.12 花纤维的扫描电镜观察

将棉花纤维粉末置于云母片上,喷金,用 KYKY 2000 电子扫描显微镜观察。

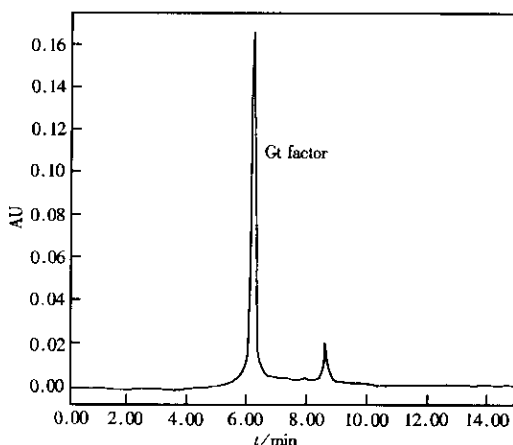


图 1 Gt 因子的第二次 HPLC 柱层析

Fig.1 Second chromatography of Gt factor on HPLC

2 结果和讨论

2.1 低分子活性多肽的分离纯化

G. trabeum 的胞外酶液经多步分离纯化,最后在 HPLC 反相 C18 柱上分离得到一具有活性的单峰,如图 1,改变流动相的极性或换用不同类型的其他分析柱分离图 1 中所得的活力峰,发现仍为一单峰,故判断为一纯组分,此组分能使 1% CMC-Na 溶液流经粘度计的时间由 110s 降为 64s;且不具有任何纤维素酶活性,凝胶层析测其分子量在 4kD 左右。由于此活性物质由密粘褶菌获得,故称为 Gt 因子。Gt 因子在 280nm 处有明显的吸收峰,双缩脲反应呈阳性,且经氨基酸组成分析证明为一多肽。

肽。

2.2 Gt 因子生成 HO[·] 的生成实验

2.2.1 KTBA 实验:在 O₂ 存在时,Gt 因子可氧化 KTBA 生成乙烯,乙烯生成量为 0.2×10^{-8} mol/h,表明 Gt 因子可通过单电子氧化途径形成 HO[·]。

2.2.2 TBA 实验:TBA 反应是常用的 HO[·] 的测定方法,2-脱氧-D-核糖被 HO[·] 氧化生成丙二醛,丙二醛与 TBA 反应生成的产物在 532nm 处有特征吸收,光吸收值与羟基自由基 HO[·] 的量在一定范围内有线形关系,反应具有很强的专一性^[10]。1mL 的 Gt 因子(2μg/mL)经 TBA 反应后, A₅₃₂ = 0.204,加大 Gt 因子的量,光吸收值亦增加;加入甘露醇、硫脲等 HO[·] 的清除剂,532nm 处的吸收明显下降,最高抑制率可达 40%,此实验进一步证实 Gt 因子能在 Fe³⁺、O₂ 存在时形成 HO[·]。

2.3 Gt 因子在纤维素降解中的作用

以下的 Gt 因子与纤维素底物的作用体系中均添加了 10^{-4} mol/L Fe³⁺。

2.3.1 对 CMC-Na 溶液粘度的影响:50℃ 保温 30min 后,Gt 因子可使 CMC-Na 溶液的粘度明显降低,流经粘度计的时间由 110s 降为 64s。由于 CMC-Na 是与天然纤维素不同的水溶性的纤维素,通常以其糖苷键的水解造成的粘度降低来表征内切纤维素酶的内切水解作用。Gt 因子所致的 CMC-Na 溶液粘度的降低也反映了它对糖苷键的断裂作用,但明显

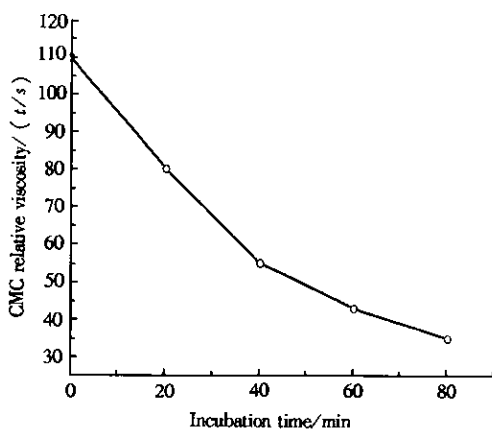


图 2 Gt 因子作用于 CMC-Na 溶液后粘度的变化

Fig.2 The time course of viscosity of CMC treated with Gt factor

不同于内切纤维素酶对 CMC 的水解,Gt 因子是藉 HO[·]氧化途径来导致糖苷键断裂的。随着保温时间的延长,CMC-Na 溶液的粘度将继续降低,但趋于平缓,如图 2 所示。

2.3.2 反应体系浊度的变化:以脱脂棉粉为底物与 20ml Gt 因子(2μg/mL)溶液 45℃ 振荡保温 6d 后,反应体系的浊度有明显的变化,作用后纤维棉粉悬浊液的沉降速率明显减慢,如图 3 所示,这是棉纤维解聚、短小纤维形成的结果。

2.3.3 滤纸聚合度的变化:5mL Gt 因子(2μg/ml)与 40mg 滤纸 45℃ 振荡保温 6d,滤纸的聚合度下降 2% 左右,肉眼可见有细小的纤维悬浮于溶液中。聚合度代表了纤维素分子链的平均长度,Gt 因子对滤纸中糖苷键断裂的作用不及对 CMC 的断裂,推测是由于 CMC 与滤纸结构的差异。CMC 仅一个糖苷键的断裂即可造成粘度的显著下降,而不溶性的滤纸由于包含结晶区和非结晶区,较水溶性的 CMC 在结构上复杂,只有大量糖苷键的断裂始可表现出粘度下降;另外,缺少连续的电子供体条件下,OH[·]不能循环生成,造成 HO[·]量较少也是一个重要原因,如上述体系中添加 1% H₂O₂,6d 后滤纸的聚合度下降可达 30%。

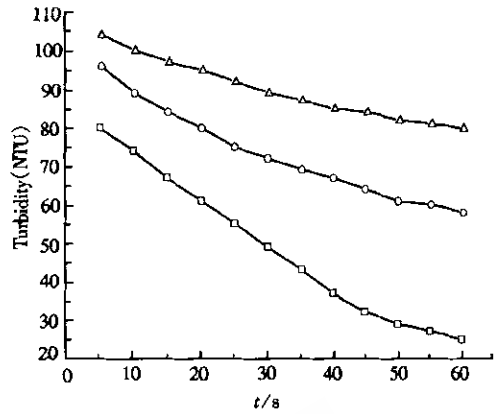


图 3 棉粉经 Gt 因子作用后浊度随时间的变化
Fig.3 The time course of decreasing turbidity of cotton powder
—□—Control;—○—3 days later;—△—5 days later.

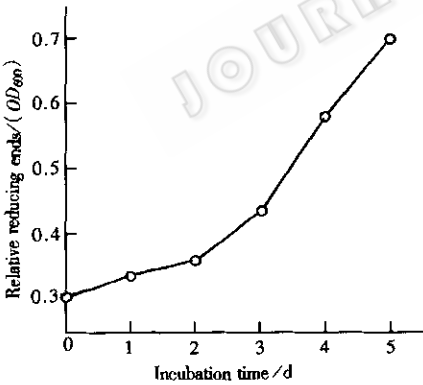


图 4 棉花纤维经 Gt 因子作用后还原力的变化
Fig.4 Change of reducing ends of cotton fiber after treated by Gt factor

2.3.4 纤维素底物还原力的变化:铁氰化钾法可检测不溶性的纤维素材料的还原末端,非常灵敏。2mL Gt 因子(2μg/ml)与 20mg 脱脂棉粉在 45℃ 下振荡作用后,棉粉的还原力逐步增加,如图 4,表明纤维素的还原末端增多。若反应体系中加入 HO[·]特异性的消除剂硫脲,则经 Gt 因子作用 5d 后,OD₆₀₀ = 0.458,而不加硫脲的反应体系 OD₆₀₀ = 0.694,此实验证实是 Gt 因子产生的 HO[·]导致棉纤维还原力的增加。棉纤维还原性的增加可能来自于纤维素链中葡萄糖环上羟基被氧化为羰基以及由此导致的氢键的破坏和糖苷键的断裂^[13]。Gt 因子产生的 HO[·]可能先破坏纤维素链内或链间的氢键,继而断裂纤维素的糖苷键,造成聚合度下降,使其暴露出更多的还原性末端或非还原性末端,为纤维素的进一步降解提供条件。

2.3.5 作用前后纤维素底物的红外光谱的比较(图略):红外谱图中 3550~3200cm⁻¹ 处为 -OH 特征吸收,1165cm⁻¹ 处为 C-O-C 的吸收。为了便于准确比较作用前后纤维素红外吸收的变化,以 1165cm⁻¹ 处的吸收为参比,3420cm⁻¹ 处的吸收与 1165cm⁻¹ 处吸收的比值

可反映-OH 吸收的变化。棉粉经 Gt 因子(2mL, 2 μ g/mL)45 $^{\circ}$ C 作用 3d 后,经计算,3420 cm^{-1} 处与 1165 cm^{-1} 处吸收强度的比值下降了 9.2%,表明 Gt 因子的作用确实涉及到氢键的变化,氢键的断裂使得其吸收强度降低。

2.3.6 作用前后纤维素底物结晶度的比较:根据 X-衍射图谱(图略)和公式结晶度(%) = 结晶区的峰面积/结晶区峰面积 + 非结晶区峰面积,近似计算样品的结晶度,发现棉花纤维素粉经 Gt 因子(2mL, 2 μ g/mL)45 $^{\circ}$ C 作用 3d 后,结晶度由 57% 降为 49.8%。

2.3.7 作用前后棉花纤维的扫描电镜观察:图 5(a)为棉花纤维的扫描电镜照片,图 5(b)为棉花纤维经 Gt 因子(2mL, 2 μ g/mL)45 $^{\circ}$ C 作用 3d 后的扫描电镜照片,可见作用前棉花纤维是比较光滑的,作用后明显看到棉花纤维似乎起了“皱褶”,纤维变得疏松。

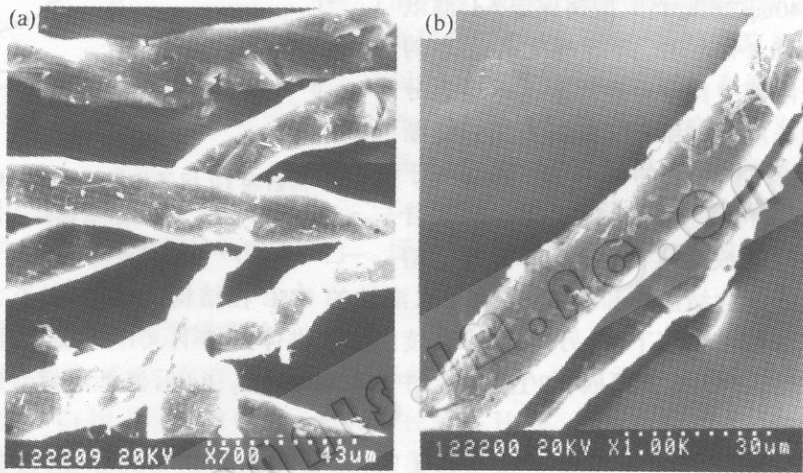


图 5 棉花纤维 Gt 因子作用前(a)后(b)的扫描电镜图象

Fig. 5 SEM photo of cotton fiber before(a) and after (b) treated with Gt factor

在影响天然结晶纤维素生物降解效率的因素中,纤维素的结晶度与氢键是两个重要的因素。根据纤维素超分子结构的研究,纤维素分子间与分子内存在着大量的氢键。尽管氢键的破坏只涉及纤维素三维结构的变化,而不涉及 C-O-C 糖苷键的断裂,但应是纤维素链解聚断裂的一个前提^[14],但是一直未能找到“氢键酶”。我们最近的工作表明外切纤维素酶 CBH 在对纤维素降解时,其吸附结构域在吸附纤维素的同时,还具有打开纤维素的氢键,破坏结晶区,降低结晶度的作用^[15]。褐腐真菌不具有外切纤维素酶,从实验结果看,由 *G. trabeum* 中分得的 Gt 因子在纤维素降解中具有类似 CBH I 吸附结构域的作用。Gt 因子可还原 Fe^{3+} , 产生 HO^{\cdot} , 红外、X-衍射的结果表明, Gt 因子可破坏纤维素的氢键,降低结晶度;同时还可造成纤维素糖苷键的断裂使其“暴露”出更多的末端,浊度实验尤其是还原力实验更是证明了这一点,同时证明了是 Gt 因子产生的 HO^{\cdot} 造成了纤维素底物还原力的增加。实验结果表明, Gt 因子是不同于丝状真菌的纤维素酶的,其对纤维素的降解是一种 HO^{\cdot} 氧化机制在起作用, HO^{\cdot} 具有很强的氧化性,可夺取纤维素的葡萄糖单体上的羟基-OH 的电子,使其氧化为羰基,从而导致纤维素链内和链间氢键的断裂^[16],使纤维素的结构疏松,为进一步的酶水解作用提供条件。Gt 因子与酶系中的其他组分可能在 C-O-C 糖苷键的断裂中具有协同作用的研究将会全面阐明褐腐真菌的纤维素降解机制,此项

研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Highley T L. *Holzforchung* ,1988 **A2** 211 ~ 215.
- [2] Halliwell G. *Biochemical Journal* ,1965 **95** 35 ~ 40.
- [3] Srebotnik E ,Messner K. *Holzforchung* ,1991 **A5** 95 ~ 101.
- [4] Enoki A ,Hirano T ,Tanaka H. *Mater Org* ,1992 **27** 247 ~ 261.
- [5] Zohar K ,Kenneth A J ,Kenneth E H. *FEBS Lett* ,1999 **A46** 49 ~ 54.
- [6] Green III ,Highley T L. *Journal of Biotechnology* ,1997 **39** :113 ~ 124.
- [7] 王 蔚 ,卢雪梅 ,高培基 . 菌物系统 ,1997 **16** :40 ~ 45.
- [8] 王 蔚 ,胡 玮 ,高培基 . 中国生物化学与分子生物学报 ,2002 **18** (2) :202 ~ 208.
- [9] Chandhoke V ,Goodell B ,Jellison J ,et al . *FEMS Microbiol Lett* ,1992 **90** :236 ~ 266.
- [10] Halliwell B ,Getteridge J M C . Green-wald R A ,Handbook of methods for oxygen radical research . Britain :Boca Raton CRC Press ,1985 .177 ~ 180.
- [11] 北京造纸工业研究所 . 造纸工业的化学分析 . 北京 :轻工出版社 ,1981 .39 ~ 42.
- [12] Halliwell G. *Biochem J* ,1961 **79** :185 ~ 192.
- [13] 高 洁 ,汤烈贵 . 纤维素科学 . 北京 :科学出版社 ,1996 :67 ~ 68.
- [14] Simmott M L. *Biochem Soc Trans* ,1988 **26** (2) :160 ~ 164.
- [15] 高培基 ,陈冠军 ,汪天虹 ,等 . 生物化学与生物物理学报 ,2001 **33** :13 ~ 18.
- [16] Kremer S M ,Wood P M. *Eur J Biochem* ,1992 **208** :807 ~ 814.

A Possible Role of a Low-molecular-weight Peptide from *Gloeophyllum trabeum* in Cellulose Degradation *

Wang Wei Gao Peiji

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

Abstract : A low-molecular-weight peptide (named Gt factor) was first isolated and purified from the extracellular culture of a brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* . It could produce hydroxyl radical HO \cdot in presence of O $_2$ and Fe $^{3+}$, might destroy hydrogen bonds of cellulose by HO \cdot -involved oxidative mechanism ,which was quite different from hydrolysis mechanism of cellulase in filamentous fungi . Gt factor might attack crystalline region of cellulose ,bring about more reducing ends and non-reducing ends exposed ,thus making cellulose accessible to further degradation .

Key words : Brown-rot fungi , Cellulose , Oxidative degradation , Hydroxyl radical HO \cdot

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39970004 and 29906005)