

杂色云芝分泌的具有螯合铁离子活性的低分子量成分在木素生物降解中作用机制的研究

王璐^①, 闫文超^①, 陈嘉川^②, 黄峰^{①②*}, 高培基^{①*}

① 山东大学生命科学院 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100;

② 山东轻工业学院 制浆造纸科学与技术省部共建教育部重点实验室, 济南 250100

* 联系人, E-mail: fhuang@sdu.edu.cn, gaopj@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-11-13; 接受日期: 2007-11-29

国家自然科学基金(批准号: 30170027 和 30371136)资助项目

摘要 从杂色云芝(*Coriolus versicolor*)培养基中分离到一类低分子量组分, 该组分具有螯合 Fe^{3+} 的能力, 并能够将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 推测该组分可能是 Fenton 反应中的一类电子传递体. 将此组分与酶分离木素(cellulolytic enzyme lignin, CEL)作用, 并用 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 离子差光谱及碱性硝基苯氧化方法对作用后 CEL 的结构变化进行了表征. 结果表明, 该组分能够破坏非酚型木素中的 $\beta\text{-O-4}$ 结构, 并且能够在非酚型木素结构中添加酚羟基, 从而导致木素中形成新的酚型亚结构, 使木素更易于被漆酶和锰过氧化物酶降解. 因此, 该组分可以加速木素降解酶对木素的降解.

关键词

杂色云芝

(*Coriolus versicolor*)

木素的生物降解

Fe^{3+} 螯合物

木素是自然界中含量最为丰富的可再生性有机资源. 真菌中的白腐菌能够通过非特异性的氧化作用将木素彻底矿化成为 CO_2 和 H_2O ^[1]. 杂色云芝(*Coriolus versicolor*)是一类能够高效降解木材的白腐真菌, 可以引起木素、纤维素和半纤维素的同时降解. 该菌能够产生大量的胞外漆酶(laccase)和锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP), 然而无论是漆酶还是锰过氧化物酶都无法直接降解木素中含量最多(80%~90%)的非酚型结构^[2]. 木素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)能够降解木素中的非酚型结构, 但是许多木素的有效降解菌株并不分泌 LiP^[3]. 漆酶在合适的介体存在的条件下也能够降解非酚型木素^[4], 但是迄今为止漆酶的天然介体只有一种被发现, 因此在白腐真菌中可能还存在其他的木素氧化降解机制. 尽管白腐真菌能够通过产生大量的氧化还原酶和水解酶来降解木质纤维素, 但是实验表明, 这些酶类无

法进入完整无损的木材结构内部^[5]. 电子显微镜观察的结果则更加证实了在木素降解的起始阶段, 大分子的酶蛋白无法穿过完整木材的微孔结构进入细胞壁内^[6], 因此木腐真菌在木素降解的初期可能通过一些更小的物质对木素进行破坏. Goodell 等人^[7]发现密黏褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)产生的一类酚型化合物能够还原 Fe^{3+} ; Enoki 研究小组^[8,9,10]的实验结果也证实木腐真菌分泌的具有螯合 Fe^{2+} 功能的糖肽类物质参与了生物体系中的 Fenton 反应. 本实验室发现纤维素降解真菌能够产生一种低分子量肽类物质(命名为短纤维形成因子, SFGF), SFGF 通过氧化还原反应将纤维素降解成为短纤维, 使其更容易被纤维素酶水解^[11,12]; 从密黏褶菌中纯化到的短肽能够螯合 Fe^{3+} , 将 Fe^{3+} 还原成为 Fe^{2+} , 并通过 Fenton 反应产生羟基自由基, 产生的羟基自由基可以对纤维素和木素进行非特异性氧化^[13,14]; 从黄胞原毛平革菌

(*Phanerochaete chrysosporium*)发酵液中也纯化到了一类新的具有酚氧化活力的低分子组分(PC因子), 推测PC因子在氧化还原体系中可能执行电子传递体的功能^[15]。尽管木素生物降解的研究已开展 40 多年, 但是木素的生物降解机制仍未获得清楚的揭示, 需要更多的工作去证实这些推测。

我们从杂色云芝培养基中分离到了一类具有螯合 Fe^{3+} 性质的低分子量有机化合物, 并对这一组分在 Fe^{3+} 存在的条件下对酶分离木素(CEL)的氧化作用等进行了研究, 以期能够对木素生物降解中非酶组分的作用机制进行更为深入的认识。

1 材料与方法

1.1 具有螯合 Fe^{3+} 活力的低分子量组分的分离

杂色云芝(AS5.161)购自中国微生物菌种保藏中心。每升溶液中含有葡萄糖 1 g, NH_4NO_3 0.125 g, 酒石酸铵 0.125 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 0.25 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CoSO_4 0.1 g, ZnSO_4 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 10 mg, H_3BO_3 10 mg, NaMoO_3 10 mg和 VB_1 1 mg, 用 1 L 双蒸水溶解。6 g 杨木粉加入 18 mL 上述溶液, 混匀, 装入 300 mL 三角瓶中。木粉用苯醇溶液(1:2, V/V)提 24 h, 风干后使用。将菌丝块接种到上述培养基中, 28℃ 培养 20 天后, 加入 50 mL 双蒸水浸泡 4 h, 并于 4℃ 下 13000×g 离心 20 min。上清液经过截留分子量为 1 kD 的膜(Amicon 8200)超滤, 滤过液(400 mL)用等体积的乙酸乙酯抽提 24 h^[16]。有机相经减压蒸干(<50℃)后, 残留物用 20 mL 甲醇溶解。取 3 mL 溶液上 Sephadex LH-20 柱(1.6×30 cm)进行初步分离, 柱子用 90% 的甲醇和 10% 的双蒸水平衡, 用 95% 的甲醇和 5% 的双蒸水洗脱, 流速为 4.5 mL/h, 检测 280 nm 处的吸光值, 每管收集液检测螯合 Fe^{3+} 的活力。收集活性成分并真空冻干, 合并后溶于 10 mL 双蒸水中。

1.2 螯合 Fe^{3+} 和还原 Fe^{3+} 能力的测定

螯合 Fe^{3+} 能力的测定参照 Schwyn 等人^[17]的方法: 每管收集液取 1.5 mL 与 1.5 mL 铬天青 S(chrome azurol S, CAS)溶液混合。测定与混合时刻(0 h)相比, 5 h 后 630 nm 处吸光值的降低值(ΔA_{630})。630 nm 处吸光值的降低表明样品具有螯合 Fe^{3+} 的能力。

$$\Delta A_{630} = A_{630}(0 \text{ h}) - A_{630}(5 \text{ h}).$$

用 Ferrozine 作为还原 Fe^{3+} 能力的指示剂^[18]: 2 mL 样品溶液和 0.5 mL Ferrozine (15 mmol/L) 溶液和 0.5 mL 新配制的 FeCl_3 溶液(1.2 mmol/L)混合, 测定不同时间后在 562 nm 处的吸光值。562 nm 处吸光值的升高表明样品具有将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 的能力。相同条件下, 使用双蒸水代替样品溶液作为实验的对照。

1.3 杨木酶分离木素(CEL)的制备

绝干的杨木粉(用五氧化二磷干燥)用苯醇溶液(2:1, V/V)抽提 24 h, 室温下挥发掉苯和乙醇。用双蒸水将处理后的木粉煮至无色。干燥后, 将木粉用 Lampén 磨球磨 48 h。500 mL 三角瓶, 加绝干重 20 g 处理过木粉, 加入相当于 3 g 酶粉的配制酶液(0.7 IU/mg), 加缓冲液至总体积为 400 mL, 于水浴摇床 45℃ 连续酶解 48 h。离心弃上清, 沉淀中再加入相当于 3 g 酶粉的配制酶液, 用缓冲溶液调整体积, 于水浴摇床 45℃ 进行第 2 次 48 h 酶解。第 3 次和第 4 次分别加入相当于 3 和 4 g 酶粉的配制酶液, 其余操作相同。后几次酶解将几个瓶中的试样合并处理。4 次酶解后离心沉淀物用 pH 2.5 的盐酸溶液洗涤数次, 于真空冷冻干燥机冻干得到 CEL 粗提物。CEL 粗提物按照 1% 浓度溶解于 1 mol/L 氢氧化钠, 室温氮气保护下磁力搅拌器搅动 2 h, 离心去沉淀, 上清液搅动下滴加浓盐酸至 pH 2.5, 沉淀出木素, 离心后沉淀再溶解于 2 mol/L 氢氧化钠中, 氮气保护下 70℃ 水浴中搅动 48 h, 然后在搅动下滴加浓盐酸至 pH 2.5。离心弃上清, 沉淀用 pH 2.5 的盐酸洗涤数次, 离心后沉淀于真空冷冻干燥机冻干, 即得纯化 CEL。

1.4 处理后酶分离木素酚羟基含量的变化

100 mg CEL 加入 10 mL 样品溶液(含有 20 mmol/L 三氯化铁), 30℃ 下振荡反应 72 h。将上述悬浮液 10000×g 离心 20 min, 沉淀真空冷冻干燥。相同条件下, 10 mL 双蒸水取代样品溶液作为本实验的对照。

5 mg CEL 样品用二氧六环:水(6:1, V/V)溶液定容至 10 mL, 取 1 mL 于容量瓶, 加 1 mL 1 mol/L NaOH, 用上述二氧六环:水溶液定容至 10 mL 配成碱性溶液, 另取 1 mL 加 1 mL 蒸馏水, 用上述二氧六环:水溶液定容至 10 mL 配成中性溶液作为参比, 进

行离子化差示紫外光谱测定, 记录 254, 296 和 365 nm 3 处波段附近最大差示吸收值 $\Delta A_{\max}$, 按下式计算酚羟基的含量.

差示吸光系数 $\Delta \varepsilon_{\max} = (\Delta A_{\max}) / (\text{CEL 样品浓度}(\text{g/L}) \times \text{比色皿厚度}(\text{cm})) (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$,

酚羟基% = $17 \Delta \varepsilon_{\max} / E \times 100$

E : 对应以上波长下木素模型化合物的平均摩尔吸光度 $(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$

254 nm 处: $E=9000$

296 nm 处: $E=4100$

365 nm 处: $E=25000$

1.5 处理后酶分离木素的 ^{13}C -NMR 分析

反应体系的建立参照 1.4 小节进行. 取 30 mg 处理后的 CEL 溶解于 0.5 mL 氘代二甲亚砜中, 溶液在 45°C 下振荡加速溶解. 使用 INOVA 400(Bruker, Germany)核磁共振仪进行检测, 信号采集时间为 22 h.

1.6 处理后酶分离木素的 ^1H -NMR 分析

乙酰化 CEL 的制备: 100 mg CEL 100 mg 加入乙酸酐:吡啶(2:1, V/V)溶液溶解, 室温振荡反应 48 h. 滴加乙醚 100 mL, 转入离心管中, 10000×g 离心 10 min. 沉淀用乙醚洗涤数次并干燥.

50 mg 乙酰化 CEL 加入 5 mL 样品溶液(含有 20 mmol/L 三氯化铁), 30°C 振荡反应 72 h. 相同条件下, 5 mL 双蒸水取代样品溶液作为本实验的对照. 离心并干燥后, 20 mg 乙酰化 CEL 溶解于 0.5 mL 的氘代氯仿中, 使用 INOVA 400(Bruker, Germany)核磁共振仪进行测定.

1.7 处理后 CEL 酚型结构单元含量的测定

CEL 硝基苯氧化方法 [19]: 将 100 mg 处理后的 CEL, 14 mL 2 mol/L 的氢氧化钠溶液和 0.8 mL 新配制的硝基苯溶液置于 20 mL 的不锈钢罐中, 密封并在 170°C 油浴中加热 2.5 h. 加热完成后将不锈钢罐移至冰浴中迅速冷却. 将混合物转移到液液萃取器中, 用三氯甲烷抽提 4 h 以除去硝基苯还原产物和过量的硝基苯. 氧化产物用盐酸调至 pH 3, 然后再用三氯甲烷抽提 48 h. 将第 2 次三氯甲烷抽提的组分减压蒸干得到硝基苯氧化产物.

80 mg 硝基苯氧化产物用 1 mL 丙酮溶解. 取 1 μL

进行 GC-MS(Shimadzu-2010)分析, 分析条件: DB-1 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm ; m); 柱箱升温曲线: 60°C(1 min), 180~250°C(3°C/min); GC 进样口温度: 250°C; 载气为氦气, 流速为 2 mL/min; 分流比 10:1; 离子化电压 70 eV; 扫描速率为 50~60 次/min.

2 结果

2.1 螯合 Fe^{3+} 和还原 Fe^{3+} 的能力

Coriolus versicolor AS5.161 培养基浸出液小于 1 kD 的有机相组分经 Sephadex LH-20 柱进行分离, 其分离图谱(280 nm 吸光值曲线)见图 1. 图 1 中 630 nm 吸光值曲线是螯合 Fe^{3+} 的活力曲线.

峰 1 处的收集液与 CAS 反应液混合后, 与混合时刻(0 h)相比, 5 h 后反应体系在 630 nm 处的吸光值明显下降, 说明峰 1 的组分具有螯合 Fe^{3+} 的能力. 通常木材中 Fe^{3+} 的含量是非常低的, *Coriolus versicolor* 通过产生具有螯合 Fe^{3+} 能力的物质来富集 Fe^{3+} , 说明该活性成分与 Fe^{3+} 的反应对该菌的生长具有重要的生理功能. CAS 活性的组分几乎全部存在于超滤后的滤过液(<1 kD)中, 这个分子量范围可以排除酶及其他蛋白质的干扰. 由于样品可以溶解在乙酸乙酯中, 并且在 280 nm 处有吸收, 因此推断这类具有螯合 Fe^{3+} 能力的低分子量物质是一类芳香族化合物.

还原 Fe^{3+} 能力的结果如图 2. 由图可知, 当 Ferrozine 试剂加入到含有 FeCl_3 的溶液中时, 随着反应时间的延长, 反应体系在 562 nm 处的吸光值逐渐升高, 说明此类物质具有还原 Fe^{3+} 的能力. 反应生成的 Fe^{2+} 具有多种反应特性, 如可以与 H_2O_2 通过 Fenton 反应产生羟基自由基. 羟基自由基能够与非酚型木素模型化合物反应, 导致其脱去甲氧基, 并且引入酚型的结构位点 [20], 可以使其更容易被降解.

2.2 处理后酶分离木素酚羟基含量的变化

经过低分子量物质作用后 CEL 酚羟基含量的变化与对照木素酚羟基含量的变化见表 1. 表中 254 nm 处的吸收由共轭体系和非共轭体系中的酚氧离子产生, 相对酚羟基含量最多, 处理后酚羟基增加也最明显. 365 nm 处的吸收由共轭体系中的酚氧离子产生, 相对酚羟基含量少于共轭体系和非共轭体系中酚羟基的总含量, 因此处理后 365 nm 处的最大差示吸收

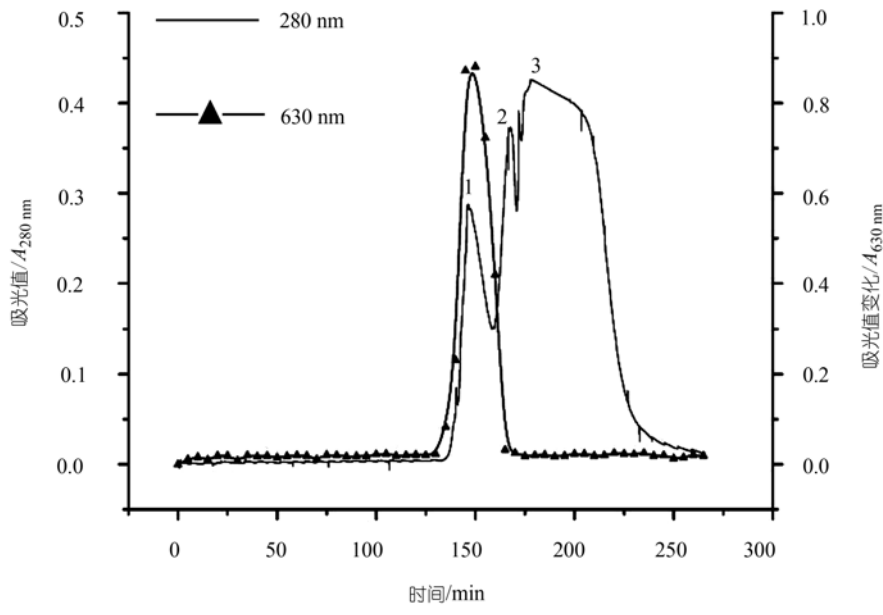


图1 超滤滤过液(<1 kD)在 Sephadex LH-20 柱上的分离图谱(280 nm)和 CAS 活性测定曲线(630 nm)

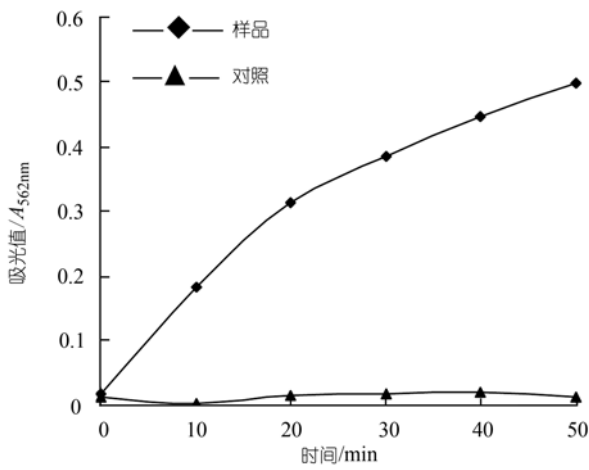


图2 具有还原 Fe^{3+} 能力的低分子量物质对 Fe^{3+} 的还原作用

值小于 254 nm 处的最大差示吸收值. 296 nm 处的吸收主要是由非共轭体系酚氧离子产生的, 与酚氧离

子共轭的羰基也会产生吸收, 因此比较复杂, 处理后增加最少. 通过表 1 可知, CEL 经过具有螯合 Fe^{3+} 能力的低分子量物质处理后, 3 个波段处的酚羟基含量都有所增加. 酚羟基含量的增加可以为酚型氧化酶提供合适的底物, 有利于木素大分子的降解. 有研究者提出木素的降解存在由非酚型底物转变成酚型底物, 再由酚型氧化酶进行氧化降解这一假说, 但缺少证据, 本实验可以为这一假说提供实验上的证明.

2.3 处理后酶分离木素的 ^{13}C -NMR 分析

CEL 经过具有螯合 Fe^{3+} 能力的低分子量物质作用后重要的基团变化见表 2. 有关木素 ^{13}C -NMR 信号的归属都是从木素模型化合物的检测数据中得到的. 从表 2 可以看出, 与对照相比, 经低分子量物质作用后, CEL 结构中对羟基苯基结构单元和愈创木基结构单元中的 C-4 键信号消失, 表明这一结构被活性成分完

表 1 酶分离木素(CEL)经过低分子量活性成分处理后酚羟基含量变化

CEL	差示吸光值 ΔA_{max}			差示吸光系数 $\Delta \epsilon_{\text{max}}$			酚羟基含量/%		
	254	296	365	254	296	365	254	296	365/nm
对照	1.56	1.52	1.26	31.2	30.4	25.2	5.89	12.60	1.71
样品	1.71	1.53	1.51	34.2	30.6	30.2	6.46	12.68	2.05

$E_{254} = 9000$; $E_{296} = 4100$; $E_{365} = 25000$

表 2 CEL 样品经过低分子活性成分处理后 ¹³C-NMR 分析^{a)}

化学位移($\times 10^{-6}$)	碳原子归属	信号积分(对照)	信号积分(样品)
152.6	肉桂醛中的 C- α	11.317	17.717
152.1	醚化的丁香基单元 β -O-4 结构中的 C-3/C-5	18.076	16.242
149.1	醚化的愈创木基单元中的 C-4	2.578	-
146.9	非醚化的愈创木基单元中的 C-3	3.283	-
138	醚化的丁香基单元 β -O-4 结构中的 C-1	1.131	3.327
135.3	醚化的愈创木基单元 β -O-4 结构中的 C-1	4.291	-
134	醚化的丁香基单元 β -O-4 结构中的 C-4	8.277	5.057
114.6	H 安息香酸盐单元中的 C-3/C-5	10.415	-
104.5~106.8	总丁香基中的 C-2/C-6	14.316	13.743
86	赤氏结构的丁香基单元 β -O-4 中的 C- β	5.038	0.495
85.3	β - β 结构中的 C- α	1.652	-
80~82	β -O-4/ α -O-4 结构中的 C- β 和 C- α	1.268	-
72.5	赤氏结构的愈创木基单元和丁香基单元 β -O-4 结构中的 C- α	16.391	14.418
71.8	苏氏结构的愈创木基单元和丁香基单元 β -O-4 结构中的 C- α	14.221	10.276
71.4	苏氏结构的愈创木基单元和丁香基单元 β -O-4 结构中的 C- α	11.488	10.985
63.0	β -5 和 β -O-4 中 α -C=O 的 C- γ	10.723	8.966
60.2	苏氏结构和苏氏结构的愈创木基单元和丁香基单元 β -O-4 结构中的 C- α 和 C- γ	5.342	4.628
55.7~55.9	愈创木基单元和丁香基单元芳香环上的甲氧基	94.463	71.828
20~40	饱和脂肪链上的-CH ₃ 和 CH ₂	22.748	21.437

a) 内标物为四甲基硅烷

全破坏;同时,CEL β -O-4 结构中的 C- α , C- β 和 C- γ 的信号也明显降低,但是芳环和脂肪链上碳原子的变化并不明显.因此根据实验结果可以推测,此类低分子量活性成分更易于进攻木素结构中的 β -O-4 结构.¹³C-NMR 是一种研究木素结构的非常灵敏的方法,可以进行定量检测并且能够提供包括木素亚结构中几乎所有碳原子详细的信息.

2.4 处理后酶分离木素的 ¹H-NMR 分析

乙酰化CEL经过活性组分处理后 ¹H-NMR的结果见表3,将谱图分为8个区域对质子信号归属进行分析^[21].从表3分析结果可见,与对照相比,经过活性组分处理后CEL图谱中 5.75~6.28($\times 10^{-6}$)和 4.48~4.95 ($\times 10^{-6}$)这两个区间的质子积分有了明显的降低,而这两个区间的信号是由木素 β -O-4 结构中的质子产生的,因此推测低分子量活性物质的处理破坏了CEL中的 β -O-4 结构.同时,紫丁香基单元、愈创木基单元和对羟苯基单元中的质子数量也有所减少.然而,与芳香环上质

子减少不同,脂肪链上的质子数量却有所增加.结合离子差光谱的检测结果,表明活性组分的处理使CEL中酚羟基的含量有所增加,酚羟基是取代了芳香环上的氢原子,所以芳香环上的质子数量有所减少.而¹³C-NMR的结果则证实了低分子量物质的处理可以导致芳香环上包括 β -O-4 键在内的C-C键的断裂,芳香环上脱脂酰基的反应则可能使脂肪族侧链上的氢原子数量有所增加,与¹H-NMR的结果相符.

2.5 处理后 CEL 酚型结构单元含量的定量测定

经活性成分作用后 CEL 硝基苯氧化分析结果见表4.硝基苯氧化是测定木素组成单元相对含量的常用方法,常用 GC-MS 来定性和定量.硝基苯能够将酚型的木素底物氧化成醛类,而不能将非酚型的底物氧化成醛类,因此可以定量地检测 CEL 中酚型结构单元的含量.经低分子量活性成分处理后,CEL 样品中的愈创木基结构单元和紫丁香基结构单元的相对含量有所增加,而对羟苯基结构单元的相对含量

表 3 CEL 样品经过低分子活性成分处理后的 ¹H-NMR 分析

化学位移(×10 ⁻⁶)	质子类型	质子百分比/% (对照)	质子百分比/% (样品)
8.00~11.5	羧基和醛基上的质子	—	—
7.3~7.8	对羟基苯基芳核上的质子	1.367	1.249
6.78~7.25	愈创木基芳核上的质子	2.562	2.507
6.28~6.78	紫丁香基芳核上的质子	2.884	2.769
5.75~6.28	β-O-4 和β-1 结构中的质子	1.919	1.623
5.19~5.75	β-5 结构中的 H _α	2.129	1.330
4.95~5.19	糖类组分中的质子	1.754	1.425
4.48~4.95	β-O-4 结构中的 H _β 和 H _γ	3.848	3.183
4.15~4.48	几种结构中的质子	4.333	3.814
3.00~4.15	甲氧基中的质子	27.466	27.013
2.52~3.00	几种结构中的质子	2.661	1.565
2.18~2.52	芳乙酰基上的质子	7.570	1.947
1.6~2.18	脂肪族乙酰基上的质子	15.919	16.934
0.38~1.6	脂肪族中甲基和亚甲基上的质子	4.248	7.186

表 4 CEL 经低分子量活性成分作用后硝基苯氧化和 GC-MS 分析

保留时间/min	化合物名称	含量/% (对照)	面积/% (样品)
2.340	对羟基苯甲醛	0.78	0.50
2.518	香草醛	22.58	23.64
4.163	紫丁香醛	32.32	37.01

则有所减少, 而且经过处理后紫丁香醛含量/香草醛含量的数值变大, 表明愈创木基结构更容易被活性成分攻击. 其次, CEL 中总酚羟基的含量也有明显的增加, 结果可与离子差示光谱的结果对应. 因此表明该低分子量物质能够增加 CEL 中酚羟基的含量.

3 讨论

本实验最重要的结论是证实了一类能够螯合 Fe³⁺的低分子量物质对木素的作用, 其主要功能是破坏非酚型木素结构单元中的β-O-4 结构. 如前所述, 由于酶分子尺寸的原因, 在木材降解的起始阶段, 木腐真菌可能通过一些小的具有扩散性的氧化性物质在离菌丝较远的地方对木质纤维素进行攻击 [22]. 在生物体系中, 真菌可以通过Fenton反应产生羟基自由基, 羟基自由基能够通过木材中的微孔结构对细胞壁内的木素和纤维素进行氧化性的降解. 有研究表明木腐真菌可以通过纤维二糖脱氢酶 [23]和一些低分子量的组分 [8~14]产生羟基自由基, 但是反应机制仍不

清楚. 本实验证实, 这类能够螯合Fe³⁺的低分子量物质能够在没有酶分子催化的条件下通过Fenton反应产生羟基自由基, 并能够在木素大分子上添加酚羟基. 漆酶在介体存在时虽然能够氧化非酚型木素, 但是迄今为止只有一种漆酶的天然介体紫尿酸(3-HAA)被发现 [24], 因此在木腐真菌中必定还有其他的机制降解非酚型木素结构, 特别是β-O-4 结构. 实验中分离到的低分子量物质介导的反应可以在非酚型木素结构中增加酚羟基, 使漆酶和锰过氧化物酶能够直接进行降解, 这一反应可能是缺少木素过氧化物酶 (LiP)的真菌降解木素的作用机制之一.

木素的生物降解是一类长程氧化还原反应, 许多组分在反应中执行电子传递体的功能, 本实验中分离到的活性成分的性质表明它也具有传递电子的能力, 因此该物质可能是木素氧化降解体系中一类电子传递体. 对这类低分子量物质作用机制的研究能够加深对白腐真菌木素降解中非酶组分作用机制的认识.

参考文献

- 1 Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 465—505 [\[DOI\]](#)
- 2 Shingo K, Masanori A, Noriko O, et al. Degradation of a non-phenolic β -O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEMS Lett*, 1999, 170(1): 51—57
- 3 Enoki A, Tanaka H, Fuse G. Relationship between degradation of wood and production of H_2O_2 -producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. *Wood Sci Technol*, 1989, 23: 1—12 [\[DOI\]](#)
- 4 Rimko T H, Pauline J M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by White-Rot Fungi. *Chem Rev*, 2001, 101: 3397—3413 [\[DOI\]](#)
- 5 Hammel K E, Kapich A N, Jensen K A, et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 30(4): 445—453 [\[DOI\]](#)
- 6 Srebotnik E, Messner K, Foisner R. Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54 (11): 2608—2614
- 7 Goodell B, Jellison J, Liu J, et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J Biotechnol*, 1997, 53: 133—162 [\[DOI\]](#)
- 8 Tanaka H, Itakura S, Enoki A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *J Biotechnol*, 1999, 75 (1): 57—70 [\[DOI\]](#)
- 9 Tanaka H, Itakura S, Enoki A. Phenol oxidase activity and one-electron oxidation activity in wood degradation by soft-rot deuteromycetes. *Holzforschung*, 2000, 54(5): 463—468 [\[DOI\]](#)
- 10 Hirano T, Tanaka H, Enoki A. Relationship between hydroxyl radicals and degradation of wood by the brown-rot fungus, *Tyromyces palustris*. *Holzforschung*, 1996, 50: 541—548
- 11 Liu J, Shen X Y, Gao P J. Short fibre formation during cellulose degradation by cellulolytic fungi. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(11): 1235—1240 [\[DOI\]](#)
- 12 Yang W H, Liu J, Gao P J, et al. Function of a low molecular peptide generated by cellulolytic fungi for the degradation of native cellulose. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 1799—1802 [\[DOI\]](#)
- 13 Wang W, Gao P J. A peptide-mediated and hydroxyl radical $HO\cdot$ -involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. *Biodegradation*, 2002, 13: 383—394 [\[DOI\]](#)
- 14 Wang W, Huang F, Gao P J. Lignin degradation by a novel peptide, Gt factor, from brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Biotechnol J*, 2006, 1: 447—453 [\[DOI\]](#)
- 15 胡明, 卢雪梅, 高培基, 等. 黄孢原毛平革菌产生的具有氧化性活力低分子肽类物质的分离纯化与性质鉴定. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2006, 36(1): 43—50
- 16 黄峰, 陈嘉翔, 高培基. 应用循环式液-液萃取法分离及鉴定木素生物降解物质. *中国科学 E 辑: 技术科学*, 2000, 30(1): 91—96
- 17 Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160: 47—56 [\[DOI\]](#)
- 18 Gibbs C R. Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Anal Chem*, 1976, 48: 1197—1201
- 19 Chen C L. *Methods in Lignin Chemistry*. Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1992
- 20 Arantes V, Milagres A M. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin-model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. *J Hazard Mater*, 2007, 141(1), 273—279 [\[DOI\]](#)
- 21 黄峰, 方靖, 卢雪梅, 等. 纤维二糖脱氢酶对锰过氧化物酶降解木素的促进作用. *科学通报*, 2001, 46(18): 1523—1528
- 22 Kenneth A, Carl J, Kenneth E. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2705—2711 [\[DOI\]](#)
- 23 Fang J, Huang F, Gao P J. Optimization of cellobiose dehydrogenase production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Process Biochem*, 1999, 34 (9): 957—961 [\[DOI\]](#)
- 24 Eggert C, Temp U, Dean J F D, et al. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEMS Lett*, 1995, 376(3): 202—206