

# 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<sup>\*</sup>

胡 明 张为灿 卢雪梅<sup>\*\*</sup> 高培基<sup>\*\*</sup>

(山东大学生命科学学院 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要** 从黄孢原毛平革菌(*Phanerochete chrysosporium*)发酵液中分离纯化到一个新的具有酚氧化活力的低分子组分, 命名为Pc因子. 该组分分子量在 600 Da左右, 含Glu, Gly, Val三种氨基酸残基, 其紫外和红外光谱也显示Pc因子含有氨基酸, 氨基酸的C $\alpha$ 信号在<sup>13</sup>C-NMR方法中也可检测到. 该物质对热稳定, 在酸性条件下易失活, 弱碱性条件下保持稳定. 它具有螯合Fe<sup>3+</sup>的能力, 并能够将Fe<sup>3+</sup>还原为Fe<sup>2+</sup>, 但不能产生羟基自由基HO $\cdot$ . 在不需要Mn<sup>2+</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>激活的条件下能够氧化酚型木素模型物 2,6-二甲氧基酚(2,6-dimethoxyphenol, 2,6-DMP), 2,2'-连氮二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfinic acid), ABTS)和丁香醛连氮, 其氧化作用需要金属离子和O<sub>2</sub>的参与, 为木素生物降解过程中的一类新的氧化机制, Pc因子在此氧化还原体系中执行电子传递体的功能.

**关键词** 黄孢原毛平革菌 Pc 因子 分离纯化 酚氧化活性 木素

木素是自然界中含量最丰富的可再生性有机资源, 其生物降解构成自然界碳素循环的限速步骤. 真菌中的白腐菌具有完整的木素降解体系, 是能将木素彻底分解为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O的微生物. 其中, 黄孢原毛平革菌(*Phanerochete chrysosporium*)作为一模式菌株研究得最为广泛<sup>[1]</sup>, 木素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)<sup>[2,3]</sup>和锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)<sup>[4]</sup>就是从此菌中发现的. 由于木素结构复杂, 各

类木素降解酶在胞外均难以实现对天然木素的彻底降解; 另外, 免疫标记研究证明, 大分子酶蛋白无法穿过完整木材的微孔结构进入细胞壁启动木素的降解<sup>[5,6]</sup>. 这些研究均促使研究者对已发现的木素降解酶在天然木素降解中的作用进行重新评价, 并推测木素降解可能需要各种小分子活性物质的参与. 目前发现的参与木素降解的低分子物质除O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>外, 主要有羟基自由基/铁离子<sup>[7~10]</sup>、活性氧基(reactive

收稿日期: 2005-08-22; 接受日期: 2005-09-13

<sup>\*</sup>国家自然科学基金(批准号: 30470051)、全国优秀博士论文基金、973 国家重点项目(批准号: 2004CB719702)和山东省自然科学基金(批准号: Y2004D07)资助项目

<sup>\*\*</sup> 联系人, E-mail: luxuemei@sdu.edu.cn; gaopi@sdu.edu.cn

oxygen species, ROS)<sup>[11]</sup>、藜芦醇(veratryl alcohol, VA)<sup>[12]</sup>、草酸等小分子有机酸/锰离子<sup>[13]</sup>和 3-羟基邻氨基苯甲酸(3-hydroxyanthranilic acid, 3- HAA)<sup>[14]</sup>等,但迄今为止,关于它们在木素生物降解过程中的作用都是推测。

我们从 *P. chrysosporium* 胞外培养液中分离到具有类似漆酶活性的低分子量组分,命名为 Pc 因子。该物质能氧化酚型木素模型物,但不需要  $Mn^{2+}$  和  $H_2O_2$  的参与,这可能为一类新的氧化途径和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养方法

*P. chrysosporium* ME446 (ATCC 34541) 来自美国麦迪逊国家林产品研究所。培养基配方(培养基以糊精和无机盐为主要成分)及培养条件依照已取得的结果<sup>[15]</sup>。

### 1.2 氧化活力的测定方法

以 2,6-二甲氧基酚(2,6-dimethoxyphenol, 2,6-DMP)为底物,3.0 mL 反应体系中含 pH 8.6 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,2 mmol/L 2,6-DMP,以及 0.3 mL 适当浓度的样品,检测 1 min 内 470 nm 处吸光值的增加。

### 1.3 分离纯化

*P. chrysosporium* 的胞外培养液经过截留分子量为 5000 Da 的膜(Amicon)超滤,滤过液冷冻干燥浓缩后上 Sephadex G-10 柱( $\phi 1.6 \times 100$  cm)进行初步分离,用蒸馏水洗脱,流速 9 mL/h,每管 3 mL,检测 210 nm 处的吸光值。测定分步收集的组分氧化 2,6-DMP 的活力,并收集活性组分浓缩备用。

经 Sephadex G-10 柱凝胶过滤的样品浓缩后用高效液相(Shimadzu, Japan, 泵: LC-10AT, 检测器: SPD-10A)分离。分离柱采用 HPLC TSK-GEL G2500PW (TOSOH, Japan)柱,流动相为 0.1%甲酸溶液(90%) + 甲醇(10%),流速为 0.8 mL/min,进样 30  $\mu$ L,温度 25°C,检测波长为 210 nm。

将上步所得活力组分用高效液相 VP-ODS 反相 C18 烷基硅胶柱(shim-pack 250 $\times$ 4.6 Particle size: 4.6

$\mu$ m)进行第二步分离,流动相为: 0.2%甲酸溶液(50%)+ 甲醇(50%)。流速为 1.0 mL/min,进样 3  $\mu$ L,温度 25°C,检测波长为 210 nm。收集活力组分,浓缩。

上步所得活力组分继续用反相 C18 烷基硅胶柱进行第三步高效液相分离,流动相为: 0.15%甲酸溶液(70%) + 甲醇(30%)。流速为 0.5 mL/min,进样 3  $\mu$ L,温度 25°C,检测波长为 210 nm。收集活力组分,冷冻干燥。HPLC 分离过程中所用试剂均为色谱纯。

### 1.4 分析方法

#### (1) 结构检测:

分子量测定: 维生素  $B_{12}$ (1355.38 Da)、辅酶 II (743.4 Da)、核黄素(376.4 Da)作为标准样品,经 HPLC TSK-GEL G2500PW 柱分析,与活性组分的保留时间比较,估计分子量范围。

氨基酸分析: 6 mol/L HCl, 5 mol/L NaOH, 真空条件下 110°C 水解 24 h, HITACHI 835 氨基酸分析仪分析水解产物。

紫外可见光谱: 在 UV-3100 紫外-可见分光光度计(Shimadzu, 日本)上连续扫描,扫描波长为 190~600 nm。

红外光谱: 采用 KBr 压片法制备样品,用 NEXUS 470 型傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet, 美国)在 500~4000 波数范围内测其红外光谱。酰胺 I 带光谱用 Gaussian 分峰软件进行解析。

质谱分析: 在 API 4000 型质谱仪(Applied Biosystems, 美国)上用 ESI/MS 分析 Pc 因子的分子量及碎裂片断。

核磁共振波谱: 溶剂为重水, 25°C 条件下用 AVANCE 400 兆核磁共振波谱仪(Bruker, 瑞士)测定 Pc 因子的  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR。

#### (2) 热稳定性和 pH 稳定性:

热稳定性: 将样品分别置于 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 和 100°C 下保温不同时间(0.5, 5 和 24 h), 分别取样 0.3 mL, 以 2,6-DMP 为底物, 室温下在 470 nm 处检测 1 min 内吸光值的变化。

pH 稳定性: 将样品加入不同 pH 的缓冲液中, 室温保持不同时间(24, 48 和 72 h), 加入底物 2,6-DMP 后在 470 nm 处检测 1 min 内吸光值的变化。pH 测定

范围为2.2~10.6。

### (3) 络合 $\text{Fe}^{3+}$ 和还原 $\text{Fe}^{3+}$ 能力的测定:

采用国际上普遍使用的铬天青(chrome azuores S, CAS)法<sup>[16]</sup>: 1 mL CAS溶液与1 mL样品混合, 测定不同时间后630 nm处的吸光值(630 nm处的吸光值下降表明样品络合 $\text{Fe}^{3+}$ )。

用Ferrozine作为 $\text{Fe}^{3+}$ 还原为 $\text{Fe}^{2+}$ 的指示剂<sup>[17]</sup>: 2 mL适当浓度的样品溶液和0.5 mL Ferrozine(15 mmol/L)和0.5 mL新配制的 $\text{FeCl}_3$ 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处的吸光值升高表示 $\text{Fe}^{3+}$ 被还原为 $\text{Fe}^{2+}$ )。

(4) 络合 $\text{Fe}^{2+}$ 的测定: 用邻菲罗啉法检测活性组分中是否络合 $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[18]</sup>。取0.5 mL浓缩样品, 依次加入1 mL邻菲罗啉溶液(2.5 g/L)和0.25 mL的醋酸缓冲液(1 mol/L, pH=4.5), 加水至5 mL, 放置15~30 min后, 在512 nm处测吸光值。

(5) 金属离子, EDTA 和反应体系中氧分压对Pc因子氧化活力的影响:

金属离子和EDTA的影响: Pc因子反应体系中分别加入各种金属离子及EDTA, 30℃下保温1 h后, 加入底物2,6-DMP测定其残余氧化活力。

反应体系中氧分压的影响: Pc因子氧化2,6-DMP的反应体系加入底物前分别充 $\text{O}_2$ 和 $\text{N}_2$  30 min, 造成显著不同的氧分压环境, 加入底物测定其残余氧化活力。残余相对活力以不加入Pc因子的反应体系作为对照, 以未做处理的反应体系为参照计算相对活力。

(6) 检测羟基自由基 $\text{HO}^\cdot$ 产生: 在含Pc因子的反应体系中加入NADH, NADPH作为电子供体, 或加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 或通入 $\text{O}_2$ , 以提供可产生 $\text{HO}^\cdot$ 的条件, 采用硫代巴比妥酸(thiobarbaric acid, TBA)<sup>[19]</sup>和2-酮-4-硫甲基丁酸(2-keto-4-thiomentylbutyric acid, KTBA) 法<sup>[20]</sup>, 检测在各种条件下是否产生 $\text{HO}^\cdot$ 。

(7) 底物作用范围: 反应体系同上, 底物分别用2,2'-连氮二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(2,2'-azinobis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfinic acid), ABTS)、愈创木酚、2,3-二甲氧基酚、3,4-二甲氧基酚、3,5-二甲氧基酚、1,2,4-三甲氧基苯、1,2,3-三甲氧基苯、1,3,5-三甲氧基苯、丁香醛联氮、丁子香酚和藜芦醇进行,

加入样品前后均进行200~800 nm扫描, 比较有无新的吸收峰出现。

## 2 结果

### 2.1 Pc因子与MnP氧化2,6-DMP的动力学比较

在以糊精为碳源的培养条件下, *P. chrysosporium*产生的分子量小于5000 Da的组分能够直接氧化酚型木素模型物2,6-DMP而不需要 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的激活。这一个现象尚未见文献报道, 表明可能为一类新的氧化途径和机制。已知在此培养条件下*P. chrysosporium*确定不产生漆酶<sup>[21]</sup>, 而该菌产生的MnP必需在 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 存在的条件下才能够氧化2,6-DMP, 此外, MnP和漆酶的分子量远远大于5000 Da, 所以由此可以推断此氧化活性不是由漆酶和MnP引起的。

从*P. chrysosporium*发酵液中分离纯化得到具有酚氧化活力的低分子组分, 命名为Pc因子。Pc因子和MnP与2,6-DMP的反应表现出明显不同的动力学特点。MnP的 $v$ - $t$ 曲线始终为线性, 符合一级反应动力学模式:  $y = y_0 + ax$ , 线性方程拟合得到很好的结果, 斜率可表征反应速率, 如图1(a)。Pc因子则为S型曲线模式, 反应速率上升很快, 可迅速到达饱和值, 适合用Sigmoidal dose-response (variable slope) 方程拟合

$y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hillslope}}}$ , 如图1(b)。

目前国际上很少有此类因子的报道, 对此尚未有统一的活力测定及计算方法; 因其具有反应时间短、速度快的特点, 我们用加入底物后1 min内的470 nm吸光值的增加值来反映其氧化活力。

### 2.2 分离纯化

*P. chrysosporium*的胞外培养液中分子量小于5000 Da的部分经Sephadex G-10柱进行初步分离, 其分离图谱如图2。图中470 nm吸光值的曲线是Pc因子的活力曲线, 即在没有 $\text{H}_2\text{O}_2$ 及 $\text{Mn}^{2+}$ 激活时就能表现出对2,6-DMP的氧化能力, 其峰值与分离图谱中第二个吸收峰重合, 从而判断该峰为Pc因子的区域。该区域在210 nm有明显吸收, 但与其后的峰互有重叠, 不能完全分开。将上步所得活力组分浓缩后用HPLC进行分离。在HPLC TSK-GEL G2500PW柱

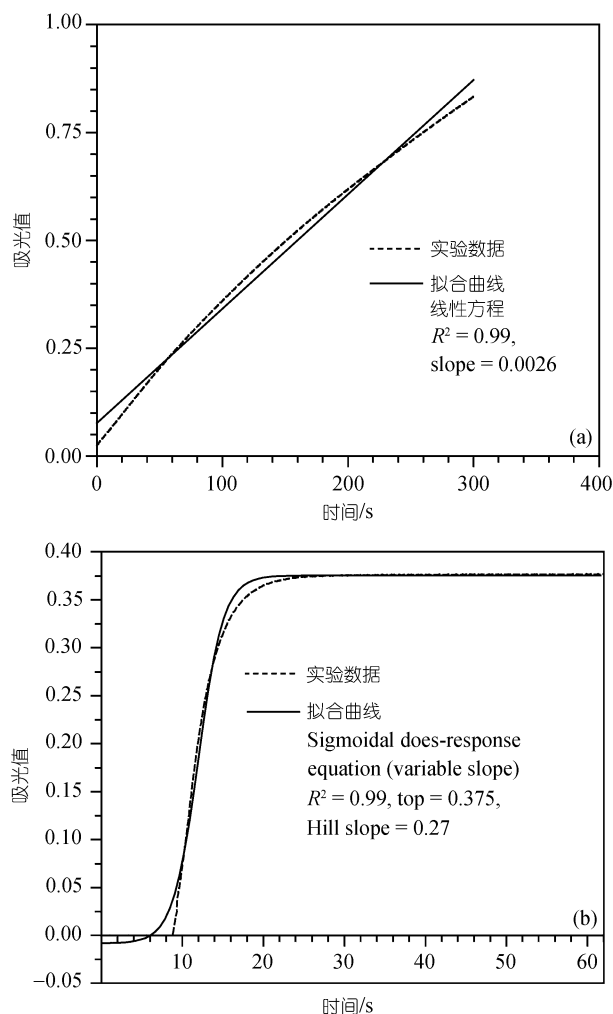


图 1 Pc 因子与 MnP 氧化 2,6-DMP 的动力学比较  
(a) MnP 催化 2,6-DMP 氧化的反应过程及其拟合方程; (b) Pc 因子氧化 2,6-DMP 的反应过程及其拟合方程

上的分离如图 3 所示, 经检测峰 2 为 Pc 因子. 第二步 HPLC 分离采用 VP-ODS 反相 C18 烷基硅胶柱, 对活力峰浓缩后进行进一步分离, Pc 因子为图 4 中峰 2. 改变流动相继续分离, 获得活力单峰如图 5. 改变流动相的极性或换用不同类型的其他分析柱分离图 5 中所得的活力峰, 发现仍为一单峰, 故判断为一纯组分.

### 2.3 物理化学性质

(1) 结构特点: 经 HPLC 凝胶过滤测定 Pc 因子的分子量大约在 600 Da 左右. 其氨基酸组成分析表明,

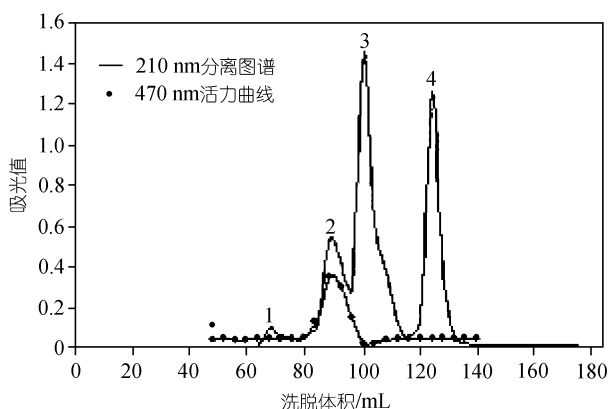


图 2 *P. chrysosporium* 胞外滤出液(<5000 Da)在 Sephadex G-10 柱上的分离图谱  
用蒸馏水洗脱, 流速 9 mL/h, 检测波长 210 nm, 峰 2 示活力区域

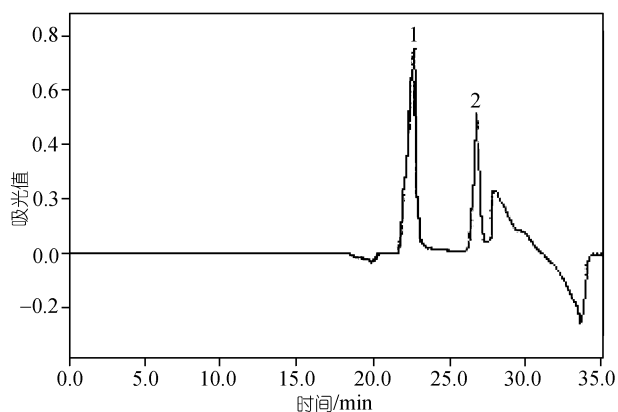


图 3 Pc 因子在 HPLC TSKgel G2500PW 柱上的分离图谱  
流动相: 0.1% 甲酸溶液(90%) + 甲醇(10%), 流速 0.8 mL/min, 上样 30  $\mu$ L, 温度 25 $^{\circ}$ C, 波长 210 nm

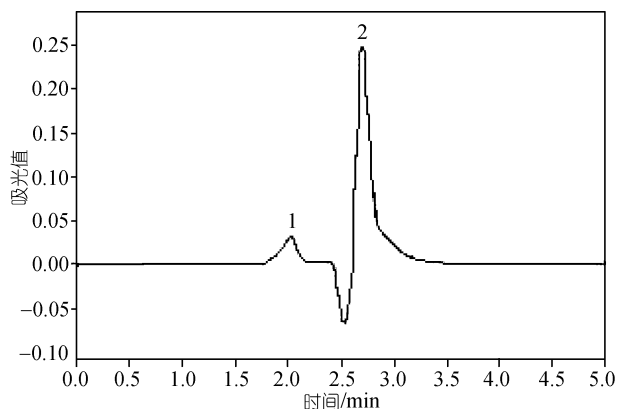


图 4 Pc 因子在 HPLC 反相 C18 柱上的第一次分离  
流动相: 0.2% 甲酸溶液(50%) + 甲醇(50%), 流速 1 mL/min, 上样 3  $\mu$ L, 温度 25 $^{\circ}$ C, 波长 210 nm

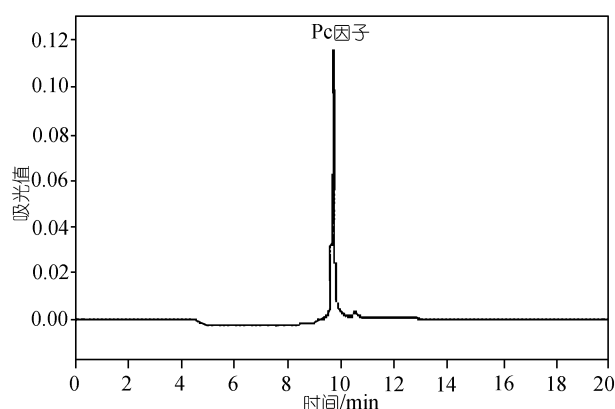


图5 Pc因子在HPLC反相C18柱上的第二次分离  
流动相: 0.15%甲酸溶液(70%)+甲醇(30%), 流速 0.5 mL/min, 上样 3  $\mu$ L, 温度 25 $^{\circ}$ C, 波长 210 nm

Pc因子含有Glu, Gly和Val三种氨基酸, 其紫外可见光谱分析可见在 250~190 nm吸光值逐渐增强, 用Gaussian分峰方法可得到4个吸收峰(图6)。由红外光谱的解析图谱可见 1686  $\text{cm}^{-1}$ 左右的 $\beta$ -折叠, 1669  $\text{cm}^{-1}$ 附近的 $\beta$ -转折以及 1648 和 1674  $\text{cm}^{-1}$ 处的肽伸展无序结构(图7)。但Pc因子的质谱分析未得到分子离子峰, 其碎裂片断表明还存在其他未知结构。Pc因子的 $^{13}\text{C}$ -NMR谱结果显示化学位移( $\delta_{\text{C}}$ )信号集中在 52.42, 71.01~71.60 和 172.67~174.30 三个区域,  $\delta_{\text{C}}$  52.42 可能是由氨基酸残基中C $\alpha$ 引起的,  $\delta_{\text{C}}$  172.67~174.30是由—COOH和—CONH—引起的。 $^1\text{H}$ -NMR谱表明其质子共振分为2个区, 其化学位移( $\delta_{\text{H}}$ )位于 3.67 和 4.59~4.65。根据典型的化学位移范围可将其归属为氨基酸 $\alpha$ 次甲基区,  $^1\text{H}$ 信号有重叠现象, 很难

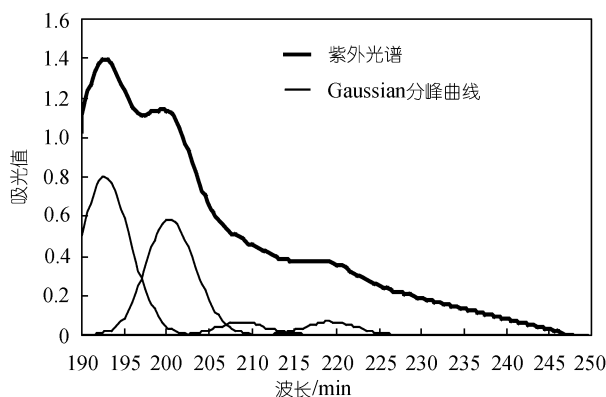


图6 Pc因子的紫外光谱及其Gaussian分峰曲线

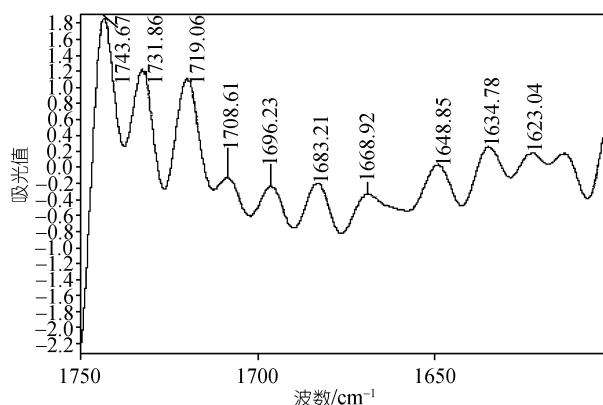


图7 Gaussian分峰软件解析Pc因子红外光谱分析的酰胺I带图谱

对其进行归属。另外由于溶剂是重水, 其分子内活泼氢被氘取代, 所以信号没有显示出来。基于上述分析结果可进一步推断Pc因子应属多肽类物质, 其分子结构需要更深入的分析测定。

(2) 催化特点: Pc因子氧化2,6-DMP的能力受温度影响不大, 在30~80 $^{\circ}$ C内基本保持一致(数据略), 其热稳定性非常好, 甚至在100 $^{\circ}$ C保温30 min, 其活力没有明显下降, 这与酶的耐热性能有很大区别。Pc因子在pH 3.0~9.0范围内都表现出对2,6-DMP的氧化活性(数据略), 但在弱酸性条件下, Pc因子的活力丧失很快(24 h内活力几乎全部丧失); 而在弱碱性条件下, 其氧化活力保持稳定, 因此本文中活性检测的缓冲体系均定在pH 8.6。

关于木腐真菌中产生低分子量物质的研究中, 此类物质的不稳定是一大难题, 很多研究都由于目的组分活力不稳定而停滞不前。巴西的Angela等人<sup>[22]</sup>从*Thermoascus aurantiacus*中发现了一种具有酚氧化活性的物质, 但因其活力极不稳定无法进行深入研究; 另有日本的Enoki小组<sup>[23]</sup>在*P. chrysosporium*中部分纯化到一种低分子量的糖肽类物质, 但一直未见其进一步纯化及相关机理的后续报道。

目前, 由木腐真菌中得到的纯组分低分子量肽类物质都来自本实验室<sup>[10,24]</sup>。Pc因子在弱碱性条件下保持稳定, 为对其分离纯化并进行深入研究提供了可能。

(3) 络合 $\text{Fe}^{3+}$ 和还原 $\text{Fe}^{3+}$ 能力: 经国际通用的



CAS方法检测, 样品溶液与CAS反应液混合后, 630 nm的吸光度值迅速下降, 这说明Pc因子有络合 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力. 木材中铁的含量通常是很低的, 约为 0~2  $\mu\text{mol/L}$ , 而可溶性铁则更低一些. *P. chrysosporium* 产生具有络合 $\text{Fe}^{3+}$ 能力的化合物来富集 $\text{Fe}^{3+}$ , 说明铁离子在该菌的生长中具有重要生理作用.

Pc因子还原 $\text{Fe}^{3+}$ 能力的结果如图 6 所示. 从图中可知, Pc因子具有较强的还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力.

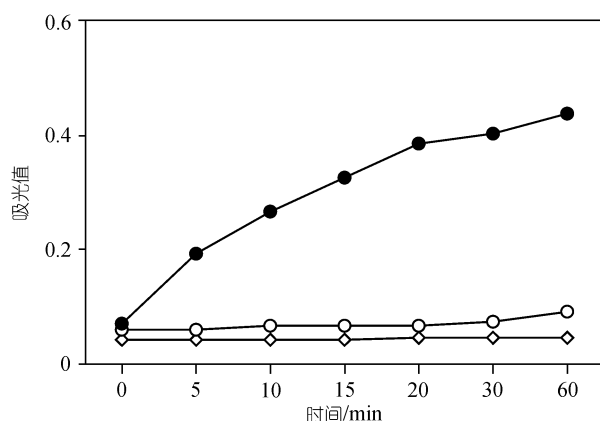


图 8 Pc因子对 $\text{Fe}^{3+}$ 的还原作用

● ferrozine试剂; ○ ferrozine试剂中加入Pc因子; ◇ ferrozine 试剂中加入 $\text{Fe}^{3+}$ 和Pc因子

Pc因子能够把 $\text{Fe}^{3+}$ 还原为 $\text{Fe}^{2+}$ , 而 $\text{Fe}^{2+}$ 具有多种生理功能, 如可以通过Fenton反应产生羟基自由基 $\text{HO}^{\cdot}$ .  $\text{HO}^{\cdot}$ 对木质纤维素的氧化降解机制一直备受关注, 有些研究发现对木材的降解速度与培养液中的 $\text{HO}^{\cdot}$ 产量有关, 而与LiP和MnP活力不相关<sup>[8,25]</sup>. 目前, 木腐真菌中发现的一些低分子量物质, 如醌类物质<sup>[7]</sup>, 铁螯合物<sup>[9]</sup>, 糖肽类物质<sup>[10,23]</sup>都能还原铁并介导羟基自由基 $\text{HO}^{\cdot}$ 的产生.

(4) 络合 $\text{Fe}^{2+}$ 的能力: 邻菲罗啉法可用来检测微量的 $\text{Fe}^{2+}$ . 适当浓缩的Pc因子样品溶液与邻菲罗啉反应, 在512 nm有明显吸光值, 说明Pc因子能够络合一定量的 $\text{Fe}^{2+}$ , 而 $\text{Fe}^{2+}$ 在Pc因子的氧化作用中可能起到重要作用.

(5) 金属离子, EDTA和反应体系中氧分压对氧化活力的影响: 由表 1 中结果可知,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ 多种过渡态金属离子都可以不同程度地促进

Pc因子氧化 2,6-DMP的能力. 在实验过程中发现, 金属离子的浓度对Pc因子的氧化能力影响较大, 如微量 $\text{Cu}^{2+}$ 即可促进Pc因子氧化 2,6-DMP, 而 $\text{Fe}^{2+}$ 在较低浓度时起到促进作用, 浓度较高时却表现出抑制现象. 反应体系中加入EDTA严重削弱了Pc因子的氧化能力. 此结果说明, 金属离子在Pc因子氧化的过程中起到了关键性的作用, 但究竟是金属离子以何种机制起作用, 包括浓度效应的机理有待于进一步研究.

表 1 金属离子和 EDTA 对 Pc 因子氧化活力的影响

| 金属离子                | 相对残余活力/%                         |                                   |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
|                     | 离子浓度/(1 mmol · L <sup>-1</sup> ) | 离子浓度/(10 mmol · L <sup>-1</sup> ) |
| 对照                  | 100                              | 100                               |
| $\text{Cu}^{2+}$ a) | 124 ± 2                          | 125 ± 3                           |
| $\text{Mn}^{2+}$    | 118 ± 3                          | 160 ± 3                           |
| $\text{Co}^{2+}$    | 112 ± 1                          | 147 ± 2                           |
| $\text{Fe}^{2+}$ b) | 113 ± 2                          | 90 ± 2                            |
| $\text{Fe}^{3+}$    | 105 ± 1                          | 119 ± 2                           |
| $\text{Na}^{+}$     | 100 ± 1                          | 100 ± 1                           |
| $\text{Mg}^{2+}$    | 100 ± 1                          | 100 ± 1                           |
| $\text{Ca}^{2+}$    | 100 ± 1                          | 100 ± 1                           |
| $\text{Al}^{3+}$    | 100 ± 1                          | 100 ± 1                           |
| $\text{K}^{+}$      | 100 ± 1                          | 100 ± 1                           |
| EDTA                | 95 ± 1                           | 34 ± 1                            |

a)  $\text{Cu}^{2+}$  的终浓度分别是 0.04 和 0.4 mmol/L; b)  $\text{Fe}^{2+}$  的终浓度分别是 0.4 和 4 mmol/L

Pc因子氧化 2,6-DMP的体系分别充入 $\text{N}_2$ 和 $\text{O}_2$ , 结果如表 2 所示. 由结果可知氧气可以大大促进Pc因子氧化 2,6-DMP的能力, 而氮气则可以抑制其氧化活力, 这表明Pc因子的氧化作用需要在较高的氧化还原电位下发生.

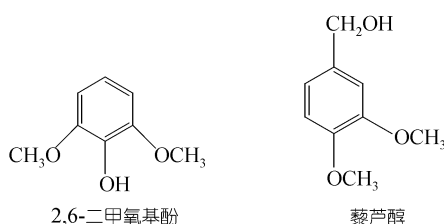
表 2 反应体系中氧分压对 Pc 因子的影响

| 处理条件              | 相对活力/%  |
|-------------------|---------|
| 对照                | 100     |
| 充 $\text{N}_2$ 样品 | 49 ± 1  |
| 充 $\text{O}_2$ 样品 | 162 ± 2 |

(6) TBA法和KTBA法检测 $\text{HO}^{\cdot}$ 产生: TBA反应和KTBA反应是常用的羟基自由基 $\text{HO}^{\cdot}$ 测定方法. 在体系中加入电子供体, 或加入微量 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 提供产生的 $\text{HO}^{\cdot}$ 条件, 经这两种方法检测, 都没有测到有 $\text{HO}^{\cdot}$ 明显产生. 限于检测技术, 其电子传递机理尚未得到阐

明.

(7) 底物作用范围: 从实验结果可知, Pc 因子能够迅速氧化部分酚型模型物, 如 2,6-DMP, ABTS, 丁香醛联氮, 丁香酚, 3,5-二甲氧基酚等, 而不能氧化非酚型木素模型物, 如藜芦醇等. 这是由于非酚型木素模型物的非酚型结构具有较高的氧化还原电势, 比酚型结构更难以被氧化. 这一结果也表明木素的彻底降解需要一系列酶和非酶因子的参与. 酚型木素模型物 2,6-DMP 和非酚型模型物藜芦醇(VA)的结构如下所示.



### 3 讨论

自从 1996 年本实验室发现木霉类真菌可产生低分子量氧化性降解纤维的短肽以来<sup>[24]</sup>, 后续的研究又证明了分属于白腐菌、褐腐菌和软腐菌三大类 34 个属共 57 株真菌都可产生分子量低于 5000 Da 的具有氧化性降解活力的短肽类化合物<sup>[10,15,26-28]</sup>. 但是, 由于这类物质分离纯化困难和稳定性差, 对其作用机理还缺少系统研究, 因此也没有一个公认的命名规则. 最初, 依据它的功能称其为短纤维生成因子(short fiber generating factor, SFGE)<sup>[10]</sup>; 但从密粘褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)获得的纯组分之后, 又依其来源称为 Gt 因子<sup>[10]</sup>, 所以这次由 *P. chrysosporium* 中得到的纯组分被命名为 Pc 因子.

Pc 因子的性质与以往发现的 SFGE 和 Gt 因子既有相似处又存在不同点. 微量 Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 等金属离子可以促进 Pc 因子的氧化作用, 而 EDTA 和氮气则可产生抑制作用, 这与 SFGE 和 Gt 因子同类研究中的结果都相同. 然而, SFGE 和 Gt 因子这两类短肽的氧化作用都需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 并产生 HO·, 且由 Gt 因子介导 HO· 的产生途径已经通过电子自旋波谱法得到证实<sup>[27]</sup>, 而在 Pc 因子的试验中, 即使在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 条件下也检测不到 HO· 的产生; 并且 Pc 因子在弱碱性条件下稳定, 酸性条件下易失活, 这又与 Gt 因子的性质相反. 所以,

根据多方面分析显示, 它是与 SFGE 和 Gt 性质不同的另一类具有氧化活力的短肽. Pc 因子与 2,6-DMP 反应呈 S 型曲线, 在数十秒内即迅速饱和, 这一动力学特点表明在没有新的电子供体和受体存在的条件下, 其氧化能力不能持续进行, 表现为一个电子传递体的特征.

生物体系中涉及能量产生的氧化还原作用, 都是由电子传递链来进行的, 由 NADH 到分子氧经过多个电子传递体, 逐步传递电子, 应为一共同的规律. 但是, 目前尚未把这种认识应用在木素氧化性降解研究中.

沿用常规的酶学研究方法, 木素生物降解机理研究进展缓慢. 在胞外组建可持续性进行的木素氧化性降解系统, 可望为木素降解研究开创一条新途径. 这样看来, Pc 因子的发现和作为木素氧化性降解过程中的一个电子传递体的进一步研究, 对木素生物降解这一难点的解决可望产生一定的影响; *P. chrysosporium* 等白腐菌, 目前正应用于褐煤液化和环境中难降解芳香化合物的处理研究, 但机理不清为一大难题. Pc 因子的氧化性质的研究对此可能也具有重要的意义. 因为自由基引发的木素氧化性降解具有随机性, 产物种类繁多, 目前还难以依据呼吸链中类似的研究方法, 如加入 NADH 和 NADPH 等来研究电子传递途径. 我们正试用本实验室在同类研究中应用过的电化学方法<sup>[10]</sup>、电子自旋波谱法<sup>[27]</sup>、色质联用<sup>[28]</sup>等方法, 以 Pc 因子的氧化性质为根据, 来研究胞外组建系统的电子传递途径.

### 参 考 文 献

- 1 Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol*, 1987, 41: 465~505[DOI]
- 2 Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenocete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science*, 1983, 29: 37~41
- 3 Glenn J K, Morgan M A, Gold M H, et al. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 114: 1077~1083
- 4 Kuwahara M, Glenn J K, Gold M H, et al. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*, 1984, 169: 247~250[DOI]
- 5 Carpita N, Sabulase D, Montezinos, D, et al. Determination of

- the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, 1979, 205: 1144~1147
- 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: 2608~2614
- 7 Zohar K, Kenneth A J, Kenneth E H. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-drive Fenton reaction. *FEBS Lett*, 1999, 446: 49~54[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 *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*, 1999, 53: 21~28[DOI]
- 9 Goodell B, Jellison J, Daniel G, 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]
- 10 Wang W, Gao P J. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. *J Biotechnol*, 2003, 101: 119~130[DOI]
- 11 Kenneth E H, Alexander N K, Kenneth A J, et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microbial Technol*, 2002, 30: 445~453[DOI]
- 12 Lundquist K, Kirk T K. De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry*, 1978, 17: 1676
- 13 Wariishi H, Valli K, Gold M H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Boil Chem*, 1992, 267: 23688~23695
- 14 Eggert C, Temp U, Dean J F, et al. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett*, 1996, 391: 144~148[DOI]
- 15 李越中, 高培基, 王祖农. 黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶的营养调控. *微生物学报*, 1994, 34(1): 29~36
- 16 Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160: 47~56[DOI]
- 17 Gibbs C R. Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Anal chem*, 1976, 48: 1197~1201
- 18 陈国珍, 黄贤智, 刘文远, 等. 紫外-可见分光光度法. 北京: 原子能出版社, 1987. 164~166
- 19 Halliwell B, Gettridge J M C, Greenwald R A. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press, 1985. 177~180
- 20 Enoki A, Tanaka H, Fuse G. Relationship between degradation of wood and production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. *Wood Sci Technol*, 1989, 23: 1~12
- 21 段新源, 卢雪梅, 高培基, 等. 黄孢原毛平革菌合成漆酶的研究. *山东大学学报*, 2002, 37(1): 91~94
- 22 Angela M, Hiroshi A, Nelson D. Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256: 20~26[DOI]
- 23 Tanaka H, Itakura S, Hirano T, et al. An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron. *Holzforschung*, 1996, 50: 541~548
- 24 Liu J, Gao P J. Short fibre formation during cellulose degradation by cellulytic fungi. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(11): 1235~1240[DOI]
- 25 Bes B, Ranjeva R, Boudet A M. Evidence for the involvement of activated oxygen in fungal degradation of lignocellulose. *Biochimie*, 1983, 65: 283~289
- 26 杨炜华, 刘洁, 高培基, 等. 真菌产生的短肽对天然纤维材料的降解作用. *自然科学进展*, 2004, 14: 1230~1235
- 27 Wang W, Gao P J. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO<sup>•</sup>-involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. *Biodegradation*, 2002, 13: 383~394[DOI]
- 28 黄峰, 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*, 2000, 30(1): 91~96