

真菌产生的短肽对天然纤维材料的降解作用*

杨炜华 刘洁 张颖舒 高培基**

山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要 实验表明真菌产生的低分子量短肽对纯纤维素材料能起氧化降解作用. 文中证实此类短肽对天然纤维材料也具有同样的降解作用. 还观察到分属于白腐菌、褐腐菌和软腐菌等3大类34种共57株纤维分解真菌的胞外培养液都能够产生分子量低于5000且能形成羟基自由基的短肽. 扫描电子显微镜和红外光谱检测表明, 来自拟康氏木霉的短肽能破坏棉纤维氢键网络, 解聚、分离出单根微纤维. 它们和纤维素酶协同作用时可明显提高对秸秆、木材等天然纤维材料还原糖的产率. 微热量法研究表明该类短肽对纤维素的作用是吸热反应. 研究工作表明微生物对纤维素的降解是一受热力学控制的动力学过程, 仅用糖苷键的水解作用不能全面阐明其降解作用机理.

关键词 真菌 纤维素 氧化降解 羟基自由基 HO^\cdot

纤维素是植物细胞壁的主要组成部分, 主要存在于次生壁内, 与半纤维素、木素组成木质纤维. 长期以来, 研究纤维素的酶降解作用时都以滤纸、微晶纤维素等纯纤维为材料, 它们都是植物纤维经强碱/酸处理, 溶解木素、半纤维素后又经挤压、粉碎等机械处理后得到的, 其结构已发生了变化. 广为认可的纤维素酶解机理假说也都是以纤维素酶作用于滤纸、微晶纤维素等材料的研究结果为依据而提出的^[1,2]. 此类纤维素酶虽能有效降解滤纸等纤维制品, 却都不能有效降解天然植物纤维. 它们的产生菌如木霉类, 对秸秆、木材等纤维材料的降解率也比较低^[3]. 通常把此类现象归结为木素的包被作用, 致使纤维素酶分子不能与纤维素接触. 目前只能借助于物理、化学处理方法去除或溶解木素, 以提高酶解效率, 这是可再生性纤维材料利用中的主要困难. 但是, 自然界中的秸秆、木材等纤维材料却能被微生物彻底降解, 可见, 此过程中还有未被认识的环节, 这很可能是天然纤维材料降解过程中的限速步骤. 褐腐真菌在木素未发生显著降解的情况下, 能使木材纤维素聚合度大幅度降低,

这为纤维素降解机理的研究和应用提供了新线索^[4~6].

本实验室1996年发现木霉等纤维降解真菌产生的低分子量短肽(称其为短纤维形成因子, short fiber generating factor, SFGF), 可使纤维素发生氧化降解形成短纤维, 有利于纤维素酶的水解作用^[5,6], 并证实其作用机理为: SFGF能与 Fe^{3+} 螯合并将其还原为 Fe^{2+} , 继而通过Fenton反应形成羟基自由基, 氧化纤维素分子中的羟基, 导致纤维素链内氢键断裂, 破坏纤维素的超分子结构^[7]. 此后, 我们又在密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 中纯化得到了此类短肽. 电子自旋共振、X光衍射分析进一步证实了羟基自由基是通过超氧阴离子自由基途径形成的^[8,9]. 此类短肽对纯纤维素材料的氧化降解机理已基本阐明, 它们是否能在天然纤维材料降解中发挥同样作用以及是否在真菌中普遍存在, 已成为确定其作用的关键^[4,10].

本文报道SFGF类短肽在纤维分解真菌中存在的普适性研究结果及其在秸秆、木材等天然纤维材料酶解过程中的作用.

2004-03-19 收稿, 2004-05-27 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30370013)和国家重点基础研究发展规划(批准号: CB716006)资助项目

** 通讯作者, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn

1 材料与方

1.1 供试菌株

分属于白腐菌(white-rot)、褐腐菌(brown-rot)和软腐菌(soft-rot)等3大类^[11]34种共57株具纤维分解能力的真菌。

1.2 方法

1.2.1 真菌的培养及 SFGF 的获得 麸皮/玉米秸粉(质量比 2/8)培养基,加 3 倍水混匀,装入 250 mL 三角瓶,每瓶装干料 10 g。灭菌后接入孢子悬浮液,30 °C 静止培养 7 d。用醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.8, 0.05 mol/L)浸泡抽提上述培养物 4 h,纱布过滤后 12000 r/min 离心 20 min,经截留分子量 5000 的膜(Amicon)超滤一次,滤过液即为含 SFGF 的粗样品。来自 *Trichoderma pseudokoningii* S38 的粗样品经分子筛层析、高效液相分离得到纯化的 SFGF^[5~7]。

1.2.2 TBA(thiobarburic acid, 硫代巴比妥酸)法测 HO[·]的生成^[12] 用 TBA 法检测各菌株胞外培养液产生羟基自由基的能力。经 TBA 反应后测量在 532 nm 处光吸收值的增加以表征产羟基自由基的活力。

1.2.3 扫描隧道显微镜研究^[13] 在磷酸缓冲体系(pH 6.0, 0.05 mol/L)中,用 SFGF 处理天然纤维素(粉碎、过筛分选的脱脂棉粉)。取适量稀释后的悬浮液滴于新揭开的高定向石墨表面,静止 5 min,旋转除去多余液体。滴加一滴重蒸水,静止 5 min,旋转除去多余液体。此步骤反复操作多次,以除去反应液中的盐,防止干扰。室温下自然风干。用扫描隧道显微镜 CSPM-930a(中国科学院化学研究所制造)在室温、大气下进行观察。采用恒流模式,探针为用化学腐蚀法自制的钨针尖。隧道电流和偏压及扫描范围参见相应图片说明。所有 STM 图像均为原始图像,未经滤波和平滑处理。

1.2.4 红外光谱分析 利用 710 FT-IR 红外光谱仪(Nicolet 产品),以 KBr 压片法对经 SFGF 作用过的棉纤维进行检测。

1.2.5 SFGF 与纤维素酶的协同作用 *T. pseudokoningii* S38 等菌的胞外培养液离心后均分为两份,一份经 5000 Amicon 膜超滤两次以除去 SFGF,然后用同样缓冲液补足原体积,另一份不超滤。超滤液和未超滤液经内切葡聚糖酶活测定和滤纸酶活测定,在结果统计时除去差异。取打麦场堆积的新鲜麦秸和玉米秸,剪成 2 cm 段,烘干后装 50 mL 三角瓶,每瓶 1 g,加入 30 mL 酶液,1% 甲苯,50 °C 反应 5 d;过 28 目筛的杨木木屑 0.5 g 置于 20 mL 试管中,加入 10 mL 酶液,1% 甲苯,50 °C 反应 5 d。取反应后的液体及充分洗涤并烘至恒重的秸秆和木屑进行检测。

1.2.6 微热量法研究纤维素降解过程中的热活性变化 以脱脂棉粉为底物,适量的 SFGF 与底物混合于磷酸缓冲液中(pH 6.0, 0.02 mol/L),反应总体积均为 1 mL。在恒温 45 °C 下用瑞典 Thermo Metric AB 公司生产的微量热活性检测系统(2277, Thermal Activity Monitor)进行测定。

2 结果

2.1 真菌中 HO[·]产生的普遍性

由表 1 可见,57 株纤维分解真菌在纤维性材料上生长得到的培养滤液中,分子量小于 5000 的组分均具有 TBA 反应,表明纤维分解真菌产生分子量低于 5000 并具有形成羟基自由基能力的短肽,为一普适特性。

2.2 拟康氏木霉 S38 菌株产生的 SFGF 对棉纤维的作用

2.2.1 扫描隧道显微镜观察 棉纤维是天然纯纤维素材料,纤维素含量高达 95%~97%。经过脱脂,是研究纤维素结构及其生物降解的合适底物。

图 1-(a)显示在未加 SFGF 的磷酸缓冲体系中做同样处理后棉花纤维的结构。为一根直径为 100 nm 的纤丝,由 10~20 nm 的微纤丝组成,结构紧密,表面光滑,无裂解痕迹。与报道过的未经任何处理的结晶纤维素结构类似^[13]。

经 SFGF 处理后,纤维素各个层次的结构均发生了变化:

表1 57株纤维素降解真菌的短肽形成羟基自由基的相对活力

	Strains	TBA activity	Strains	TBA activity
白 腐 菌	<i>Laccaria sp.</i> ¹⁾	0.200	<i>Pleurotus sp.</i> ¹⁾	0.294
	<i>Hericium erinaceus</i> ACCC ²⁾ 50011	0.182	<i>Polystictus versicolor</i> As ³⁾ 5.48	0.126
	<i>Flammulina velutipes</i> ¹⁾	0.143	<i>Polystictus sp.</i> ¹⁾	0.261
	<i>Agaricus bisporus singer</i> ¹⁾	0.298	<i>Schizophyllum commune</i> As5.53	0.298
	<i>Auricularia polytricha</i> ACCC50142	0.029	<i>Pleurotus ostreatus</i> CFCC ⁴⁾ 7112	0.117
	<i>Phanerochate chrysosporium</i>	0.015		
	ME446 ATCC ⁵⁾ 34541			
	<i>Gloeophyllum trabeum</i> CFCC7047	0.580	<i>Poria cocos</i> As5.78	0.212
	<i>Gloeophyllum trabeum</i> As5.98	0.400	<i>Poria cocos</i> As5.55	0.312
	<i>Laetiporus sulphureus</i> As 5.622	0.404	<i>Poria plaeura</i> CFCC7130	0.385
褐 腐 菌	<i>Laetiporus sulphureus</i> As5.617	0.134	<i>Poria corticola</i> CFCC7129	0.172
	<i>Lentinus lepideus</i> As5.171	0.300	<i>Aspergillus niger</i> An76 ¹⁾	0.189
	<i>Lentinus edodes</i> As5.171	0.096	<i>Aspergillus niger</i> L22 ¹⁾	0.122
	<i>Lentinus edodes</i> As5.708	0.295	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> S38 ¹⁾	0.581
	<i>Lentinus edodes</i> As 5.714	0.240	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 ATCC56765	0.150
	<i>Ganoderma lucidum</i> As5.65	0.177	<i>Trichoderma reesei</i> QM9414 ATCC 26921	0.189
	<i>Ganoderma applanatum</i> As5.249	0.112	<i>Penicillium decumbens</i> JtrA10 ¹⁾	0.149
	<i>Ganoderma gibbasum</i> As5.151	0.298	<i>Penicillium citrinum</i> Thom As 3.690	0.181
	<i>Ganoderma capense</i> As5.71	0.092	<i>Penicillium janthinellum</i> ¹⁾	0.429
	<i>Neurospora crassa</i> 3402 As3.1598	0.112		
软 腐 菌	<i>Stemphylium sp.</i>	0.180	<i>Rhizopus</i> ¹⁾	0.011
	<i>Stemphylium sp.</i>	0.056	<i>Helmothosporium</i>	0.111
	<i>Stemphylium sp.</i>	0.568	<i>Exserohilum sp.</i>	0.022
	<i>Drechslera sp.</i>	0.093	<i>Colletotrichum phomoides</i> ¹⁾	0.258
	<i>Drechslera sp.</i>	0.161	<i>Fusicladium pirina</i>	0.177
	<i>Bipolaris sp.</i>	0.204	<i>Rhizoctonia solani</i>	0.025
	<i>Alternaria altenata</i>	0.371	<i>Ophiobolus graminis</i> ¹⁾	0.214
	<i>Alternaria mali</i>	0.217	<i>Ceratocystis fimbriata</i> ¹⁾	0.051
	<i>Alternaria ameniaca</i>	0.224	<i>Curularia sp.</i>	0.161
	<i>Botryosphaeria piricola</i>	0.194	<i>Glomerella cingulata</i>	0.259
<i>Phytophthora sp.</i>	0.145			

1) 本实验室分离保存; 2) ACCC, 中国农业科学研究院菌种保藏中心; 3) As, 中国科学院北京微生物研究所菌种保藏中心; 4) CFCC, 中国林业科学研究院菌种保藏中心; 5) ATCC, 美国菌种保藏中心; 其余为山东农业大学植物病理系提供

(1) SFGF 破坏纤丝的结构: 图 1(b) 中, 直径约为 120 nm 的纤丝沿纵轴被破坏, 中间的微纤丝脱离其他微纤丝翻翘起来, 并且左端呈参差不齐的断口; 另有两根微纤丝发生横向分离, 呈叉状结构。

(2) SFGF 破坏微纤丝的结构: 见图 1-(c), 直径为 18 nm 的微纤丝被分成粗细基本相同的两根。棉纤维的右端, 基元纤丝的结构显得松散, 并露出游离的末端。

(3) SFGF 造成纤维横向断裂: 见图 1-(d), 经 SFGF 长时间处理, 纤维被“切”断, 变成短纤维碎片, 每个碎片由多个细纤维组成, 结构松散。这种结构显著增加了酶与底物的接触面积, 解除了天

然纤维素中紧密结构造成的空间障碍, 有利于纤维素酶的吸附和水解作用。

横向断裂产生的微纤丝碎片的长度远远小于纤维素分子的长度, 在这个过程中有糖苷键的断裂。根据我们以往的结果, SFGF 能够对纤维素进行氧化降解, 尽管检测不到可溶性还原糖的产生, 但是不溶性产物的还原性末端有所增加^[7]。一方面, SFGF 通过破坏氢键在纵轴方向破坏纤维素结构, 使更多的末端游离出来; 另一方面, SFGF 氧化纤维素分子上的羟基, 进而作用于糖苷键, 导致纤维素分子链间氢键的断裂, 但不导致还原糖的产生^[7]。

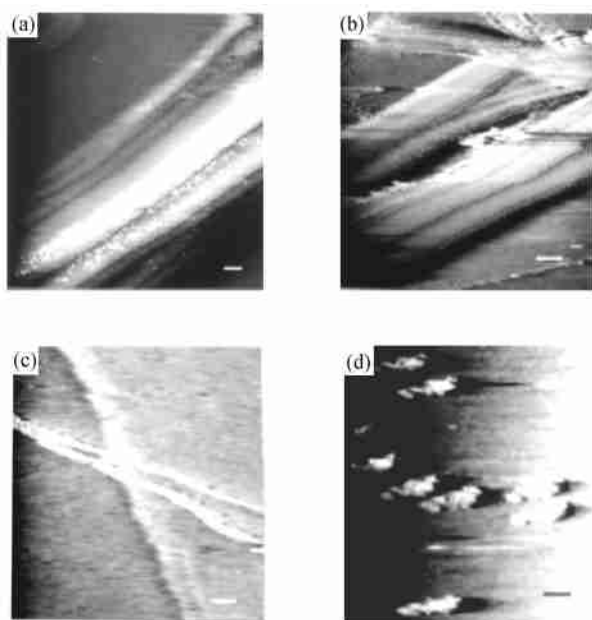


图1 SFGF作用之后棉纤维的STM图像

(a) 对照 $I_{ref} = -0.13 \text{ nA}$, $V_{bias} = 575 \text{ mV}$, 标尺: 10 nm; (b) SFGF破坏纤丝的结构图 $I_{ref} = -0.23 \text{ nA}$, $V_{bias} = 491 \text{ mV}$, 标尺: 20 nm; (c) 经SFGF处理后微纤丝的结构变化图 $I_{ref} = -0.08 \text{ nA}$, $V_{bias} = 68 \text{ mV}$, 标尺: 20 nm; (d) SFGF造成纤维横向断裂 $I_{ref} = -0.12 \text{ nA}$, $V_{bias} = 541 \text{ mV}$, 标尺: 40 nm

2.2.2 SFGF作用后棉纤维的红外光谱 从图2中可以看出, 经SFGF处理后, 纤维素在 $3600 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收强度明显减少, 这恰恰与分子内和分子间的氢键有关, 说明SFGF对纤维素的作用涉及氢键的变化。

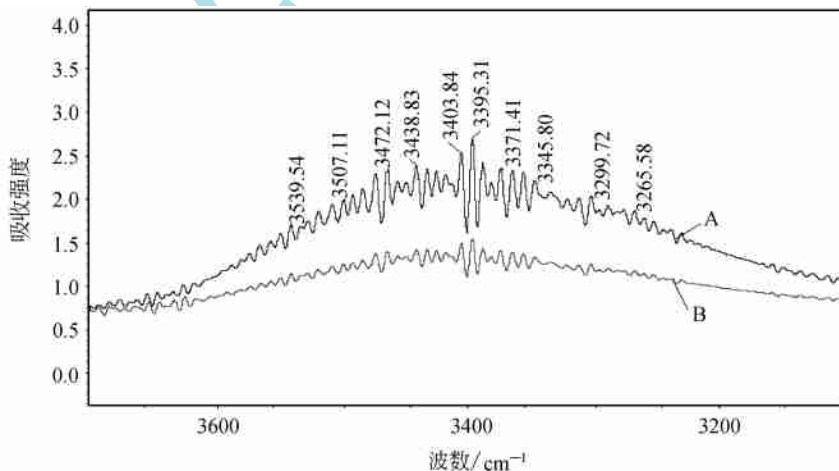


图2 SFGF作用于棉纤维之后红外光谱的比较

A 未经处理的棉纤维; B SFGF处理后的棉纤维

2.3 SFGF在天然纤维材料降解中的作用

由图3可知, SFGF和纤维素降解酶共同作用于麦秸、玉米秸和杨木木屑后提高了还原糖产率。来自拟康氏木霉 S38 的纤维素酶和 SFGF 协同作用于天然纤维素后, 还原糖的生成量明显高于纤维素酶单独作用, 以杨木木屑为底物时还原糖产率提高尤为明显。其他几种菌的情况也与 S38 一致。疫霉不是典型的纤维素降解菌, 不含 SFGF 的胞外酶液不能使木屑产生还原糖, 但加入 SFGF 后, 相同条件下明显可见还原糖的产生。小麦全蚀病菌只能入侵正在生长中的未木素化的植物细胞壁, 它产生 HO 的能力非常微弱, 正如图中显示, 它的纤维素酶和 SFGF 共同作用后, 并没有明显提高还原糖产率。这从多方面证实了 SFGF 在天然纤维材料降解中的作用。

但在测定降解后纤维材料失重率的变化时, 出现了协同效应并不明显的复杂情况, 见图4。而这与我们早已观察到的 *G. trabeum* 和 *T. pseudokoningii* S38 等产生的纤维素酶系能有效把滤纸等纤维降解, 但这两株菌在培养过程中并未使秸秆显著失重的结果相一致^[3]。推测这可能是由羟基自由基在活菌体内的多方面作用造成的。本实验室另一项研究工作¹⁾证实此类短肽产生的羟基自由基还具有氧化降解木素以及提高木素降解酶类(Lip, Mnp等)催化能力的作用。

1) 王蔚. 褐腐真菌降解木质纤维素机制的研究. 山东大学博士学位论文, 济南, 2002

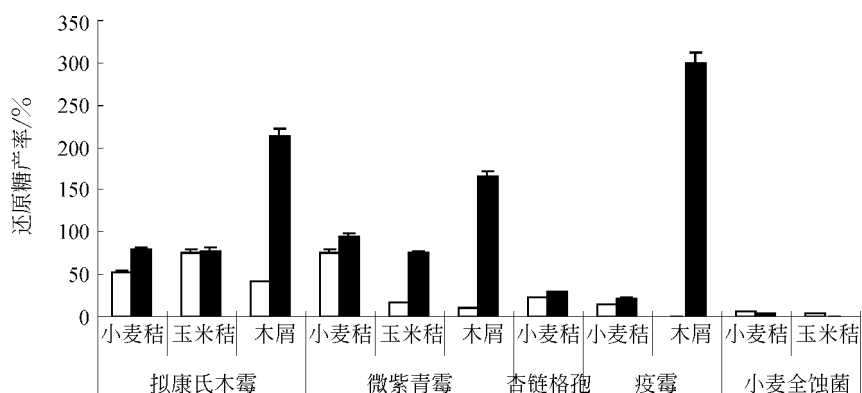


图3 纤维素降解过程中还原糖的产率
纤维素酶单独作用； 纤维素酶和 SFGF 共同作用

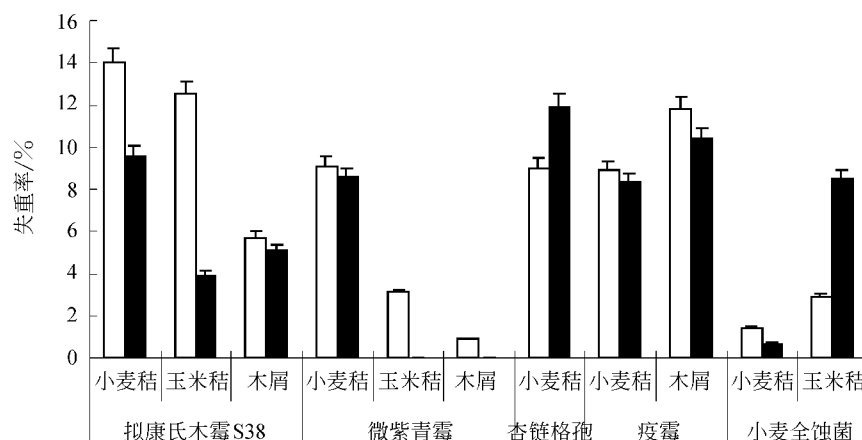


图4 纤维素降解过程中底物的失重率
纤维素酶单独作用； 纤维素酶和 SFGF 共同作用

羟基自由基是寿命短,有效位移小的不稳定分子,直接检测它在生物体内的作用甚为困难,我们改为通过测定作用过程中的热活性变化对其作用机理做进一步研究.

2.4 SFGF 作用过程中的热活力变化

由图5可见, SFGF 与纤维素作用为一纯吸热反应,加入羟基抑制剂 D-甘露醇后,可抑制此反应的进行,热谱曲线可拟合双曲线单点吸附方程.吸热量与 SFGF 用量成正相关(图6).这与本实验室曾观察到的内、外切纤维素酶与纤维素作用时为放热反应不同^[14].这表明 SFGF 氧化纤维素分子链上的羟基导致氢键断裂为一吸热过程. Enoki 也曾提

出在菌体内羟基自由基持续形成需要 NADH 提供能量^[4].

无机酸催化水解纤维素时,是在高温下进行,纤维素分子链间氢键的断开和糖苷键的水解是同时发生的,研究工作主要涉及直接影响得糖率的水解作用而未考虑氢键的作用,也很少考虑热力学因素的影响^[15].但酶催化是在中温下进行的,红外光谱分析和微量热活性测定都表明降解过程中由氢键断裂决定的分子键的解聚需要能量供应.这表明微生物对纤维素的降解过程是一由热力学控制的动力学过程,要求能量供应才能断裂氢键,进而导致纤维素分子链断裂,在此基础上,纤维素酶类催化的糖

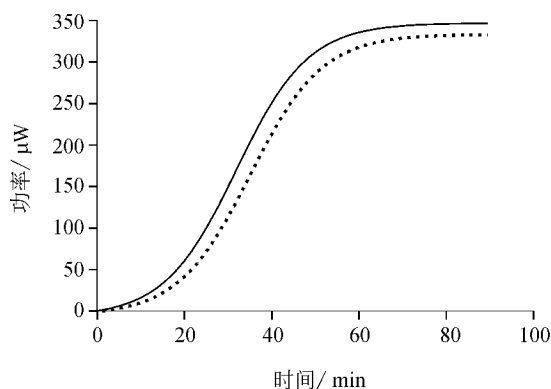


图5 SFGF与纤维素作用过程中的热谱图
—SFGF 作用于棉纤维 $P_1 = 343.2 / (1 + 17.75e^{-0.094t})$;
.....体系中加入 D-甘露醇 $P_2 = 330 / (1 + 22.2e^{-0.091t})$

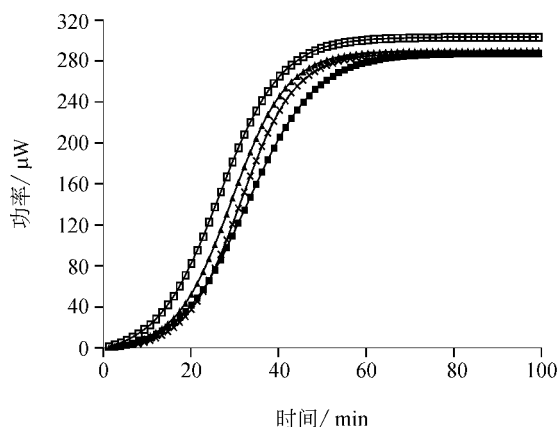


图6 不同剂量的 SFGF 与纤维素作用过程中
微量热活力的测定

52.8 μg SFGF, 26.4 μg SFGF,
× 21.12 μg SFGF, 10.56 μg SFGF

苷键水解作用才得以有效进行。我们从对纤维素酶合成过程中 ATP 和 cAMP 调控机理的研究中观察到, 纤维素酶的合成也需要外源 cAMP 供应^[16]。所以, 仅从水解作用过程研究纤维素降解机理显然不全面, 也难以解决分子转换率低等应用中的难题。纤维素分子链解聚在纤维素降解过程中为需要供给能量的限速步骤, 深入研究此过程应是实现纤

维素材料经济有效利用的有效途径^[3,8,10]。

参 考 文 献

- 1 Klyosov A A, et al. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry*, 1990, 29(47): 10577
- 2 Beguin P, et al. The biological degradation of cellulose. *TEMS Microbio Rev*, 1994, 13: 25
- 3 Gao P J, et al. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20: 581
- 4 Enoki A, et al. Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂ producing one-electron oxidases by brown-rot fungi. *Wood Sci Technol*, 1989, 23: 1
- 5 Liu J, et al. Short fibre formation during cellulose degradation by cellulolytic fungi. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(11): 1235
- 6 Liu J, et al. Short fibre formation during cellulose degradation. *Am Chem Soc Symp Ser*, 1996, 655: 166
- 7 Wang W, et al. Function of a low molecular weight from *Trichoderma pseudokoningii* S38 during cellulose biodegradation. *Current Microbiology*, 2003, 46: 371
- 8 Wang W, et al. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. *Journal of Biotechnology*, 2003, 101: 119
- 9 Wang W, et al. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO· involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. *Biodegradation*, 2002, 13: 383
- 10 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展. *自然科学进展*, 2003, 13(1): 21
- 11 Highleg T L. Cellulolytic activity of brown-rot and white-rot fungi on solid media. *Hoozforschung*, 1988, 42: 211
- 12 Halliwell G, et al. Greenwald R A ed, *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton FL: CRC Press, 1985
- 13 刘洁, 等. 天然纤维素超显微结构的扫描隧道显微镜研究. *电子显微学报*, 1997, 16(6): 736
- 14 Gao P J, et al. Non-hydrolytic disruption of crystalline structure of cellulose by cellulose binding domain and linker sequence of cellobiohydrolase from *Penicillium janthinellum*. *ACTA Biochimica et Biophysica Sinica*, 2001, 33(1): 13
- 15 高洁, 等. *纤维素科学*. 北京: 科学出版社, 1996
- 16 Wang D, et al. Regulation of cellulase synthesis in mycelial fungi: Participation of ATP and cyclic AMP. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(6): 593