

# 纤维二糖脱氢酶在纤维素降解中的作用研究\*

方 靖 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要:** 裂褶菌纤维二糖脱氢酶(cellobiose dehydrogenase, CDH)可以提高纤维素酶对纤维素的降解。以纤维二糖为电子供体,CDH 作用于羧甲基纤维素可降低其溶液的粘度,作用于纤维素 CF11 和磷酸膨胀纤维素,分别使其悬浊液的浊度提高 7% 和 14.4%。CDH 与纤维二糖水解酶或内切纤维素酶在降解棉花纤维素时没有表现出协同作用。但若棉花事先在纤维二糖存在下用 CDH 预处理,则变得易于被水解。

**关键词:** 纤维二糖脱氢酶,纤维素降解,丝状真菌

**中图分类号:** Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-0015-04

## STUDY ON THE ROLE OF CELLOBIOSE DEHYDROGENASE IN CELLULOSE DEGRADATION

FANG Jing GAO Pei-Ji

(The State Key Lab of Microbiol Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract:** Cellobiose dehydrogenase (CDH) of *Schizophyllum commune* could increase cellulose degradation by cellulases. In the presence of cellobiose, CDH could decrease the viscosity of carboxymethylcellulose solution. It could also increase the turbidity of the suspension of cellulose CF11 and  $H_3PO_4$ -swollen cellulose, indicating that the short fiber fragments were formed. CDH had little synergism with cellobiohydrolase I (CBH I) or endoglucanase I (EG I) in cotton cellulose degradation. But if the cotton cellulose was pre-treated by CDH in the presence of cellobiose, it became to be easily hydrolyzed by CBH I or EG I.

**Key words:** Cellobiose dehydrogenase, Cellulose degradation, Filamentous fungi

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39430020)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39430020).

收稿日期: 1998-10-08 修回日期: 1999-12-25

纤维二糖脱氢酶 (cellobiose dehydrogenase CDH, 以前又称纤维二糖氧化酶 cellobiose oxidase CBO) (EC1.1.99.18) 是一类黄素血色素蛋白<sup>[1]</sup>。该酶主要由一些可降解木质纤维素的丝状真菌合成<sup>[2~4]</sup>。CDH可以氧化纤维二糖和纤维寡糖生成相应的内酯。以纤维二糖为电子供体, CDH可以还原多种物质, 象细胞色素 C、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{O}_2$  等<sup>[2,3]</sup>。与其他电子受体比, CDH还原 $\text{O}_2$ 的速度很慢, 故而人们现多称之为脱氢酶。由于CDH可以还原 $\text{Fe}^{3+}$ 和 $\text{O}_2$ 生成 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 发生 Fenton 反应生成具有强氧化力的羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ):  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$  因此, 人们推测该酶可能在纤维素的降解过程中起氧化降解作用。

但是, 至今人们还没有完全搞清楚它的真正的生物学功能。裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) AS5.391 属白腐菌, 具有较强的分解纤维素的能力, 以纤维素为碳源生长时可以大量合成 CDH<sup>[5]</sup>。本文研究了该菌所产的 CDH 在纤维素降解中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品

脱脂棉花粉、纤维素粉 CF11 (Sigma)、磷酸膨胀纤维素和羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 用做底物。磷酸膨胀纤维素的制备参阅文献 [6]。

### 1.2 实验用酶

CDH 的制备纯化参见我们以前的工作<sup>[5]</sup>。拟康木霉 S38 (*Trichoderma pseudokoningii* S38) 所产纤维二糖水解酶 I (cellobiohydrolase I, CBH I) 和内切葡萄糖苷酶 I (endoglucanase I, EG I) 的分离纯化见文献 [7]。

### 1.3 CDH 对纤维素酶水解纤维素的影响

取  $500 \pm 0.1\text{mg}$  CF11 纤维素粉于 30mL pH4.8 的醋酸缓冲液 (50mmol/L) 中, 内含纤维素酶 4mg, CDH 的加量为 0~50 $\mu\text{g}$ , 加入  $\text{FeCl}_3$  (10 $\mu\text{mol/L}$ ) 和青霉素 (10U/mL)。30 $^\circ\text{C}$  下振荡 (100r/min) 酶解 24h。反应完毕, 用事先称好的干滤纸过滤, 并用蒸馏水洗涤两遍, 纤维素未水解部分和滤纸与 100 $^\circ\text{C}$  下烘 12h, 然后称重。计

算纤维素失重, 即用 500mg 纤维素和干滤纸的重量减去烘干后未水解纤维素和滤纸的重量。

### 1.4 CDH 对羧甲基纤维素黏度的影响

羧甲基纤维素钠溶解于 50mmol/L, pH5.0 的醋酸缓冲液中, 浓度为 1%, 内含纤维二糖 2mmol/L。将底物溶液与适当浓度的 CDH 酶液以 1:1 比例混合, 置于 30 $^\circ\text{C}$  保温, 采用奥氏黏度计, 定时测定溶液的黏度。以溶液流经时间 (s) 代表黏度大小。以 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液为对照。上述条件下, 添加  $\text{FeCl}_3$  (1mmol/L) 或  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1mmol/L), 观察它们对 CDH 降低溶液黏度的影响。

### 1.5 CDH 对纤维素悬浊液浊度的影响

纤维素 CF11 和磷酸膨胀纤维素用作底物。6mL 50mmol/L, pH4.8 醋酸缓冲液中, 底物含量为 0.25%, 纤维二糖 2mmol/L, 青霉素 10U/mL,  $\text{FeCl}_3$  10 $\mu\text{mol/L}$ , CDH 为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。30 $^\circ\text{C}$  下振荡 (100r/min) 24h 后, 测浊度变化, 以不加 CDH 的为对照。为了了解不同 CDH 加量对浊度变化的影响, 以 CF11 为底物, 加入不同量的 CDH, 于相同条件下测定浊度变化。浊度测定采用可见-紫外分光光度计 (UV-240, Shimadzu) 的积分球附件进行<sup>[8]</sup>。浊度的增加表示为  $T\% = (\text{Ts} - \text{Tc}) / \text{Tc}$ 。其中, Ts 和 Tc 分别代表样品和对照的浊度。

### 1.6 CDH 与 CBH I 和 EG I 协同作用的研究

(1) 2mL 50mmol/L, pH4.8 的醋酸缓冲液中, 脱脂棉花 10mg, CDH 20 $\mu\text{g}$ , 10 $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ , 青霉素 10U/mL, CBH I 100 $\mu\text{g}$ , 30 $^\circ\text{C}$  下振荡 (100r/min) 24h。用酚-硫酸法测定溶液中可溶性糖的量, 不加 CDH 的为对照。

(2) 方法同上, 以 EG I 替代 CBH I, EG I 的用量为 50 $\mu\text{g}$ 。

(3) 脱脂棉粉事先用 CDH 在纤维二糖存在下处理, 然后依前面的方法分别用 CBH I 和 EG I 进行水解实验。脱脂棉粉的预处理如下: 12mL 50mmol/L, pH4.8 的醋酸缓冲液中含脱脂棉粉 80mg, 纤维二糖 2mmol/L,  $\text{FeCl}_3$  10 $\mu\text{mol/L}$ , 青霉素 10U/mL, CDH 120 $\mu\text{g}$ , 30 $^\circ\text{C}$  下振荡 (100r/min) 12h 后, 补加纤维二糖 (1mmol/L),

再作用 12h。缓冲液洗涤数遍至检测不到可溶性糖的存在,干燥备用。

所有实验结果为 3 次平行实验结果的平均值。

2 结果

2.1 CDH 与纤维素酶协同作用增进纤维素的降解

CDH 与纤维素酶作用于纤维素 CF11 的结果见表 1。添加一定量的 CDH 使纤维素酶水解纤维素造成的失重增加。当 CDH 的量为 20 $\mu$ g/mL 时,纤维素失重达 108.7mg,比对照提高 18%。与此同时,我们发现当 CDH 的添加量增大到一定时,底物的失重反而开始减少。当 CDH 的浓度为 50 $\mu$ g/mL 时,底物失重比对照减少了 19%。

表1 CDH对纤维素酶降解纤维素CF11的影响\*

CDH添加量 ( $\mu$ g/mL)	纤维素失重	相对于对照 失重的百分比
0	92.1	100
10	104.1	113
20	108.7	118
30	94.0	102
40	82.9	90
50	74.6	81

\* 实验结果的平均相对偏差小于1.5%

2.2 CDH 对羧甲基纤维素的降解

以纤维二糖为电子供体,CDH 可以作用于 CMC-Na,使其溶液的黏度下降(图 1)。上述条件下,加入 FeCl<sub>2</sub>,CMC-Na 溶液黏度的下降速度变化不显著。但是,若加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>时,CMC-Na 溶液的黏度却迅速降低。以 0.1mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 单独作用于 CMC-Na 时,其黏度几乎没有变化,排除了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 直接作用于底物导致溶液黏度下降的可能。这说明 CDH 降低 CMC-Na 黏度的过程中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的合成是一限速步骤。

2.3 CDH 作用于纤维素提高其悬浊液浊度

在纤维二糖存在下,CDH 可以作用于 CF11 纤维素和磷酸膨胀纤维素,使其悬浊液的浊度分别提高 7% 和 14.4%。纤维素悬浊液浊度的提高说明:CDH 作用于纤维素生成了短小

纤维片段。不同浓度的 CDH 对纤维素 CF11 的浊度影响见表 2。CDH 的加量为 50 $\mu$ g/mL 时效

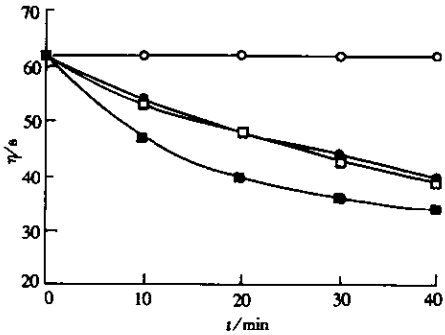


图 1 纤维二糖存在条件下 CDH 对 CMC-Na 溶液黏度的影响

○ 对照, ● 加 CDH, □ 加 1mmol/L FeCl<sub>2</sub>,  
■ 加 0.1mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(实验平均相对偏差小于 1.5%)

果最好。但是,当 CDH 的加量增多时,悬浊液的浊度不再提高,而是逐渐降低,但同对照比仍有提高。

表2 CDH对纤维素CF11悬浊液浊度的影响\*

CDH添加量 ( $\mu$ g/mL)	浊度提高百分数 (%)
0	0
20	6.8
30	9.3
50	10.8
100	7.0
200	2.5

\* 实验结果的平均相对偏差小于4%

2.4 CDH 的加入对 CBH I 或 EG I 降解棉花纤维素没有影响

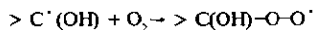
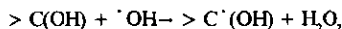
(1) CDH 与 CBH I 共同降解棉花时生成的可溶性糖量为 42.0 $\mu$ g/mL,而 CBH I 单独作用于棉花时糖的生成 40.9 $\mu$ g/mL,可见 CDH 的加入对 CBH I 水解天然结晶纤维素几乎没有帮助,CDH 和 CBH I 没有表现出协同作用。但是,棉花在纤维二糖存在条件下预先被 CDH 处理后,再用 CBH I 进行水解,反应结束后生成的可溶性糖为 62.1 $\mu$ g/mL,比未经处理的提高了 50%。

(2) CDH 和 EG I 共同降解棉花生成的糖为 4.9 $\mu$ g/mL,EG I 单独水解棉花时生成的糖

为  $5.2\mu\text{g/mL}$ 。同样 CDH 和 EG I 亦没有表现出协同降解纤维素的作用。而底物事先经 CDH 预处理后再用 EG I 水解效果明显不同, 溶液中生成的可溶性糖为  $10.3\mu\text{g/mL}$  (两个实验结果的平均相对偏差不大于 5%)。

### 3 讨论

纤维素酶水解纤维素生成纤维二糖, 以纤维二糖为电子供体, CDH 还原  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{O}_2$ , 最终生成具有强氧化性的  $\cdot\text{OH}$ 。 $\cdot\text{OH}$  可以发生夺取氢原子、羟基化等反应, 可使糖、蛋白质、核酸及脂类发生氧化受到破坏。 $\cdot\text{OH}$  氧化碳水化合物, 使原来的羟基被氧化生成羰基<sup>[9]</sup>:



天然纤维素受  $\cdot\text{OH}$  的攻击亦可发生上述反应。这样, 靠羟基形成的氢键就会消失, 链间作用力因此变小而使结构变得松散, 从而使天然纤维素的结晶区趋向于无定型化。进一步的反应会导致纤维素的超分子发生断裂。这可能是 CDH 作用于纤维素生成短小纤维的原因。这样, 纤维素变得易于同纤维素酶接触, 对于纤维素酶的作用。因此, CDH 可以促进纤维素酶对纤维素的降解; 在纤维二糖存在下, 可作用于 CMC-Na 溶液使其黏度降低, 作用于纤维素使其悬浊液的浊度提高。

但是, 由于  $\cdot\text{OH}$  是强氧化剂, 不仅可以破坏纤维素, 也可使酶失活。因此, 当 CDH 的加量过多、溶液中纤维二糖浓度较大时, 就会生成超过生理需要的  $\cdot\text{OH}$ , 引起酶的失活, 从而使得

纤维素的降解下降。由此可见, 纤维素的降解过程中并非 CDH 的量越多越好。

CBH I 从纤维素的非还原性末端水解纤维素生成纤维二糖, EG I 则随机水解纤维素生成纤维寡糖且倾向于水解纤维素的非结晶区。CBH I 或 EG I 单独水解结晶度很高的棉花时, 生成的糖很少, 不能为 CDH 提供一定量的电子供体。因此, 在本实验条件下, CDH 无论和 CBH I 或 EG I 在降解棉花时都不会表现出协同作用, CDH 的加入对 CBH I 或 EG I 水解结晶纤维素不会有明显的促进。但是, 棉花事先在纤维二糖存在下用 CDH 处理后, 由于受到 CDH 生成  $\cdot\text{OH}$  的氧化, 变得易于水解。因此, 再用 CHH I 或 EG I 水解就会生成较多的糖。

### 参 考 文 献

- [1] Bao W, Usha S N, Renganathan V. Arch Biochem Biophys, 1993, 300:705~713.
- [2] Eriksson K E L, Habu N, Samejima M. Enzyme Microb Technol, 1993, 15:1002~1008.
- [3] Ander P, FEMS Microbiol Rev, 1994, 13:297~312.
- [4] Fang J, Qu Y B, Gao P J. Biotechnol Tech, 1997, 11:195~197.
- [5] Fang J, Liu W, Gao P J. Arch Biochem Biophys, 1998, 353:37~46.
- [6] Wood T M. Methods Enzymol, 1988, 160:19~26.
- [7] Yan B X, Sun Y Q, Gao P J. J Protein Chem, 1998, 17:107~111.
- [8] Liu J, Gao P J. ACS Symposium Series, 1996, 655:160~174.
- [9] Kremer S M, Wood P M. Eur J Biochem, 1992, 208:807~814.