

褐腐真菌木质纤维素降解机制的研究进展*

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:褐腐菌降解木材机理的研究日益受到关注,发现褐腐菌不具有对结晶纤维素降解十分重要的外切葡聚糖酶,而以一种独特的方式降解纤维素。近年来,关于其以自由基氧化降解机制进行作用的报道很多,并且各国研究工作者从褐腐菌中分离得到了不同性质的物质,提出了羟基自由基 $\text{HO}\cdot$ 循环形成的各种假说,但褐腐菌降解木材的确切机制仍未搞清楚,这些分离得到的具有一些特殊性质的胞外物质在降解中的作用还有待于证明。在此,对近年来褐腐菌纤维素降解机制的研究进展作一简单介绍。

关键词:褐腐真菌,纤维素,氧化降解,羟基自由基, $\text{G}\alpha$ -因子

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0090-04

在地球上可再生的绿色资源中,纤维素的来源是最大的,但人们对木材纤维素的开发与利用却非常有限,未能搞清天然纤维素的降解机制是一个重要原因。长期以来,关于纤维素降解机制的研究主要集中在木霉等丝状真菌的纤维素酶水解作用方面,现已基本搞清了它们水解结晶纤维素的机制,但都是以结晶纤维素为材料进行的,仍未能阐明天然木质纤维素难以被降解的原因。在天然木质纤维材料中,由于半纤维素和木素与纤维素间紧紧相连,特别是木素包被着纤维,纤维素酶无法与纤维接触,酶水解作用不能进行,这是木质纤维材料利用中的最大障碍。但褐腐菌可在木素很少被降解的情况下彻底降解木材,造成纤维素和半纤维素迅速解聚。研究发现此类菌有许多独特的地方:首先,褐腐菌虽然大量降解木材,但在生长前期,只造成纤维素聚合度大幅度降低,却不引起失重^[1];其次,尽管褐腐菌降解纤维素能力极强,它的纤维素酶系却不完整^[1]。目前,普遍认为真菌纤维素降解酶系一般由外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶组成,互相协同完成对纤维素的降解,而褐腐菌不具有对水解结晶区至关重要的外切葡聚糖酶;再者,褐腐菌降解木材时,植物细胞壁的 S_2 层先被降解,而紧贴菌丝的 S_3 层却保持完整^[2]。

鉴于褐腐菌降解天然纤维素的独特性,推测其可能存在一种独特的、非酶的木材降解体系,体系中可能有一小分子物质能够进入细胞壁的 S_2 层,使纤维素解聚。近来,关于这方面的研究报道较多,但仍未彻底搞清楚降解机理。褐腐菌纤维素降解机理的阐明可望在绿色资源的利用中逾越木素的障碍,直接利用秸秆等木纤材料中的纤维,其经济和社会效益是巨大的。另外,彻底搞清褐腐菌降解纤维素的机制,还可为研制木材防腐的制剂提供理论基础。下面就褐腐菌木质纤维素降解机制研究的进展和一些热点问题作一简单介绍。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39970004)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970004)

收稿日期: 2000-11-20, 修回日期: 2001-01-25

1 褐腐菌 HO· 自由基氧化降解纤维素机制的提出

起初,对褐腐菌纤维素降解机制的研究思路集中在寻找一种未知的小分子的酶,预想此酶能穿入木材细胞壁中,降低纤维素的聚合度。但在过去40年的研究中,对褐腐菌的胞外物质进行了大量的分析,但未找到这样一种酶。对木材细胞壁的孔径大小研究表明,酶分子不能穿过细胞壁^[3,4];60年代,研究发现 Fenton 试剂 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的 HO· 具有极强的纤维素降解能力: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$ 其引起纤维素聚合度下降的方式与初期褐腐菌降解木材的方式是一致的^[5];后经红外光谱、GC/MS 分析表明,纤维素经 Fenton 试剂 H_2O_2/Fe^{2+} 作用和纤维素经褐腐菌作用的产物是一致的。并在一些褐腐菌如 *Gloeophyllum trabeum* 中通过测定 KTBA (2-keto-4-thiomethylbutyric acid) 被 HO· 氧化产生的乙烯间接检测到了 HO· 生成^[6]。褐腐菌在降解天然纤维素时的独特性以及 HO· 的发现促成了褐腐菌 HO· 自由基氧化降解纤维素机制的提出。我们实验室在 *Gloeophyllum trabeum*、*Lentinus edodes*、*Lentinus lepideus* 等 7 株褐腐菌中的活体和胞外酶液中均检测到了 HO· 的生成,发现 HO· 的产生与纤维素的降解能力间普遍存在着一定的相关性^[7]。

另外,褐腐菌具有铁络合能力是一个重要发现。木材中铁的含量通常是很低的,为 $0 \sim 2\mu m$,而可溶性铁更低一些。Fenton 反应需要 Fe^{2+} 的参与, Fekete 等人利用 CAS 检测方法首次检测到了褐腐菌产生具有铁络合能力的络合物^[8],这一点为褐腐菌的依赖于 Fe^{2+} 的 HO· 氧化机制提供了证据。

根据众多的研究推测,褐腐菌可能产生一种胞外的 HO· 氧化体系,HO· 能穿过细胞壁,在纤维素降解初期大大降低聚合度^[9-11]。90 年代以后,研究工作集中在寻找含小分子物质的胞外氧化降解体系,其中体系中参与单电子氧化还原反应、具有铁络合能力的小分子物质的分离纯化及其在纤维素降解中的作用、HO· 的循环生成机制是研究的焦点和问题所在。

2 褐腐菌胞外氧化降解体系的分离

褐腐菌的氧化降解机制提出及发现其具有铁络合能力以后,试图对褐腐菌的胞外物质进行分离、纯化。由于 *Gloeophyllum trabeum* 的纤维素降解能力很强,常被作为褐腐菌的代表菌株进行研究。但寻找这样一种未知因子有一定的难度,且缺少好的检测方法,故分离方面的研究进展一直鲜有报道,总起来说有两类。

2.1 具有铁络合能力的糖肽化合物 Enoki 等人最早从褐腐菌 *G. trabeum* 以木质纤维素为底物的胞外培养液中分离得到了一个部分纯化的组分,含 Fe^{2+} 、蛋白质、和中性碳水化合物,凝胶过滤层析测得其分子量在 $1000 \sim 5000$,此组分可催化单电子供体如 NADH 与 O_2 形成 H_2O_2 后形成 HO·;而且此组分可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,并具有铁络合能力,实验证明为含糖的小肽^[11]。1994 年,我室在研究褐腐菌降解共性的基础上,于 *G. trabeum* 的胞外体系中分离得到一组分,分子量在 $2,000$ 左右,证明为一小肽,具有铁络合能力和 HO· 产生能力;能使羧甲基纤维素的 -C-C-键断裂,但不产生还原糖;此组分在与 H_2O_2 一同作用滤纸时,与 Fenton 试剂 H_2O_2/Fe^{2+} 作用的程度差不多^[7]。

2.2 关于 Gt-chelator 近来,关于褐腐真菌纤维素氧化降解体系中小分子物质为铁离子络合物的报道较多。1989 年, Fekete 等人发现多种褐腐菌可产生高度络合铁的物质,称为 siderophore^[8]。目前微生物所产生的 siderophores 可大体分为两类,一类是类酚结构

的化合物,另一类是氧肟酸。木材降解菌产生的 siderophores 一般是酚类化合物。Jellison 首次从 *G. trabeum* 的培养液中用薄层层析的方法分离得到具有高度络合铁离子能力的物质^[12],后经 HPLC、GC-MS、红外光谱检测鉴定为酚类物质。现一般把褐腐菌产生的具有铁离子络合能力的混合物称为 Gt-chelator。作为一种具有单电子氧化活性的小分子物质, Gt-chelator 在褐腐菌氧化降解纤维素中的作用受到重视。关于 Gt-chelator 研究工作的最新报道是 Zohar kerem 用 *G. trabeum* 的胞外培养液经截留分子量 < 1000 的膜超滤后经 HPLC 分离,得到一纯化的小分子组分,鉴定为 2, 5-二甲氧基-1, 4-苯醌,可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,且可自我氧化产生 H_2O_2 ,能强烈断裂与纤维素一样由 C-C-构成的聚乙烯乙二醇,推测 *G. trabeum* 利用这种氢醌驱动的 Fenton 反应裂解纤维素,氢醌在 H_2O_2 和 Fe^{2+} 的循环生成中起重要作用^[13]。

目前,关于褐腐菌的纤维素氧化降解体系中含类酚结构的物质的报道较多,人们也试图用一些诸如电化学的新方法来研究这种小分子物质在氧化还原反应中的作用,发现其确能降低 Fe^{3+}/Fe^{2+} 的氧化还原电势。褐腐菌褐腐木材时,分子氧的活化和最终导致纤维素的氧化降解不可能是一个电子载体的一步反应能完成的,应存在一个电子顺序传递的氧化还原体系。基于这一点,关于 Gt-chelator 的电子传递能力的研究结果是很有意义的。是否糖肽与酚类两种物质共同在纤维素降解中发挥作用还有待于进一步研究。

3 HO·的循环生成

3.1 H_2O_2 的生成 Fenton 反应中的一个重要物质是 H_2O_2 , Koeings 首先报道了褐腐菌中 H_2O_2 的产生。之后,许多研究者用不同的方法检测 H_2O_2 的生成^[1,10];至于褐腐菌中 H_2O_2 的生成机制,一直鲜有报道。在其他菌中许多酶可以产生 H_2O_2 ,如葡萄糖氧化酶、甲醇氧化酶等,但在褐腐菌中却未分离到这样的氧化酶系统。Hyde 和 Wood 曾报道过褐腐菌 *Coniophora puteana* 产生纤维二糖脱氢酶,可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,并自我氧化生成 H_2O_2 ^[14]。我们知道产生 H_2O_2 的胞外酶因为分子较大,是不能进入到木材细胞壁中的,但 HO·的寿命是很短的,氧化反应只能在相当于几个分子直径的距离内发生。从活性氧物质产生的空间位置上考虑, H_2O_2 的产生应在细胞壁内接近纤维素的地方,而酶又不能进入。最近,在 Kerem 的报道中发现 *G. trabeum* 中分离得到的 Gt-chelator——2, 5-二甲氧基-1, 4-苯醌可自我氧化生成 H_2O_2 ^[13],苯醌作为一种小分子物质是可以进入到细胞壁中去的,加之它还可以作为铁离子的载体,所以 H_2O_2 来自于类酚结构物质的自我氧化是可能的。

3.2 Fe^{3+} 的还原 Fe^{3+} 的还原对于 Fenton 反应中 HO·的循环产生是十分重要的。目前,有关 Fe^{3+} 还原的报道较少。上面提到的曾报道过 *C. puteana* 中的纤维二糖脱氢酶以及 *G. trabeum* 中分离得到的醌类物质均可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,但机制不清楚。我们知道单电子氧化剂如 Fe^{3+} 可与一些酚类物质通过两步反应形成活性氧自由基,中间产物是半醌。目前,分离得到的 Gt-chelator 多是羟基化的苯衍生物,与 Fe^{3+} 有可能按上述途径进行反应。

褐腐菌生长时周围 pH 值是较低的,在纤维素降解初期有大量草酸的产生,但当纤维素大量降解时,草酸的量却较少。有报道草酸在褐腐菌的木质纤维素降解中有重要作用^[15],不仅可以络合 Fe^{3+} ,还可还原 Fe^{3+} ,但因这种还原是光依赖反应,故草酸在

褐腐菌纤维素降解中还原 Fe^{3+} 的作用受到质疑。草酸在褐腐菌降解木材中的确切作用还有待于进一步阐明。

4 问题与展望

由近年来的研究进展可知,虽然做了一定的工作,但褐腐菌木质纤维素降解的机制还是没有彻底搞清楚。许多研究结论的提出是基于对一种菌的研究,是否适应于其它菌未曾考证;另外,缺少可靠、有效的检测方法也带来一定的问题,如对 H_2O_2 的检测、对瞬时产生的 $\text{HO}\cdot$ 的检测以及对具有短纤维形成能力的活力物质的检测等。到目前为止,研究工作还是局限于胞外氧化降解体系的分离及分到的小分子物质的氧化还原性质的检测上,对于检测小分子物质在纤维素降解及形成 $\text{HO}\cdot$ 的电子传递过程中的作用还未有突破。近两年,这方面的研究日趋活跃,但迟迟未有大的进展,可能是对胞外极低量的小分子活性物质的分离纯化、鉴定有一定难度。

在多年的研究中,已基本建立起来的结论是:褐腐菌可能以一种非酶的、小分子物质参与的、涉及 $\text{HO}\cdot$ 的氧化机制来降解纤维素,但围绕 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 反应的循环却有许多说法,或许褐腐菌胞外的小分子活性物质不止一种;或许 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 的体系的形成也不止一种机制,一种褐腐菌的降解机制不适于其它的菌。根据研究资料及我们实验室几年来的研究工作,我们认为彻底搞清此机制的一个重要环节也是非常困难的一个环节是对褐腐菌胞外氧化降解体系的分离、鉴定和分析。在分离纯化工作的基础上,排除干扰的、高灵敏度的分析检测方法又是关键。氧化降解体系的分离将对彻底阐明褐腐菌的木质纤维素降解机制起重要作用。

参考文献

- [1] Highley T L. *Holzforschung*, 1988, **42**: 211 ~ 216.
- [2] Highley T L, Murmanis L. *Holzforschung*, 1985, **39**: 73 ~ 78.
- [3] Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, *et al.* *Science*, 1979, **205**: 1144 ~ 1147.
- [4] Kim Y S, Goodell B, Jellison J. *Holzforschung*, 1991, **45**: 389 ~ 393.
- [5] Halliwell G. *Biochem. J.*, 1965, **95**: 35 ~ 40.
- [6] Chandhoke V, Goodell B, Jellison J, *et al.* *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, **90**: 236 ~ 266.
- [7] 王蔚、卢雪梅,高培基. *菌物系统*, 1997, **16**: 40 ~ 45.
- [8] Fekete F A, Chandhoke V, Jellison J. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**: 2720 ~ 2722.
- [9] Koenigs J W. *Wood fiber*, 1974, **6**: 66 ~ 80.
- [10] Murmanis L, Highley T L, Palmer J G. *Wood Sci. Technol.*, 1988, **22**: 59 ~ 66.
- [11] Enoki A, Itakura S, Tanaka H. *J. Biotechnol.*, 1997, **53**: 265 ~ 272.
- [12] Jellison J, Chandhoke V, Goodell B, *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, **35**: 805 ~ 809.
- [13] Zohar K, Kenneth A J, Kenneth E H. *FEBS Lett.*, 1999, **446**: 49 ~ 54.
- [14] Hyde S M, Wood P M. *Microbiology*, 1997, **143**: 259 ~ 266.
- [15] Shimada M, Akamitsu Y, Tokimatsu T, *et al.* *J. Biotechnol.*, 1997, **53**: 265 ~ 272.