

摘 要

褐腐真菌 (Brown-rot fungi) 是降解木材能力极强的一类担子菌, 可在木素少量被修饰或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。研究发现此类菌在降解纤维素时有许多独特的地方。它是一种研究天然木质纤维素降解的重要的生物种类, 为人们研究新的纤维素降解机制、彻底了解纤维素的微生物降解机制和最终开发纤维素资源提供了新的途径。

关于褐腐菌降解木质纤维素的研究大多是以一种菌为模型进行研究的, 因此大多数结论的得出也是基于一种菌的研究, 未免存在片面性, 研究结论是否适用于其他褐腐菌未曾考证。本文的第二章对褐腐真菌降解纤维素的特性进行了普遍研究, 证明了褐腐真菌在木纤材料上生长时, 普遍产生具有产 $\text{HO} \cdot$ 活性的低分子量的物质。

另外, 铁元素在褐腐菌的整个纤维素辅助降解体系中起着至关重要的作用, 这提示我们褐腐菌产生铁螯合组分的重要作用。为了更好的研究褐腐菌的氧化降解体系, 我们把研究的重点转向了这种螯合铁活性组分。本文第三章对褐腐菌产生的这种铁螯合物进行了一系列分离纯化, 获得的初步纯化的铁螯合物, 并对其结构性质进行生物化学性质分析。在第四章中, 本文初步探讨了这种铁螯合物对不同真菌、细菌的影响。

本文为研究纤维素的降解机制、开发和利用纤维素资源以及研究开发开发新的微生物活性药物提供了重要的实验证据。

关键词: 褐腐菌、纤维素、羟自由基、铁螯合物。

Abstract

Brown-rot fungi is one of the three groups of wood-decaying fungi. They can strongly decompose cellulose and lignin, and play an important role in carbon recycle and formation of humus in nature. But the mechanism by which they degrade lignocellulose is still not clear. White-rot fungi have lignin peroxidase and cellulase system, can degrade lignocellulose; Brown-rot fungi don't have exo-glucanase and lignin-degrading enzyme system, but they can greatly degrade cellulose and lignin. Nowadays, biodegradation of lignocellulose by brown-rot fungi has received increasing attention. But until now, most studies are phenomena descriptions and deductions of the mechanism, which are lack of direct evidence.

In the second part of this article, I testify that a kind of low-molecular-weight substance with $\text{HO}^\bullet$ -producing activity is generally produced when brown-rot fungi grew on lignocellulose material. This makes the mechanism of cellulose degradation

In the third part, I partially purified a iron chelator from the extracellular substance and did some research on the judgement of structural character. Furthermore, I also primarily tested the biological effect of the iron chelator on other microorganisms---typical genus of bacteria and fungi.

Key words: Brown-rot fungi, Cellulose, Hydroxyl radical, Iron Chelator.

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 张子翔 日期： 2006. 6. 10

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名： 张子翔 导师签名： 马 日期：

第一章 绪 论

1.1 纤维素降解的战略意义

1.1.1 开发生物质资源的战略意义

生物质是地球上数量最丰富的可再生性资源。据报道,全球每年通过光合作用产生的植物物质高达 1,500~2,000 亿吨¹,相当于目前世界能源消耗的 8~10 倍²,是石油等无法比拟的可再生资源。其中 80 %以上为木质纤维素类物质(如各种草类、树木等都是纤维素、半纤维素和木素等聚合物的复合物)³。而纤维素占植物总干重的 30 %~50 %,是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物。我国的纤维素资源也很丰富,仅农作物秸秆一项,每年可达 6~10 亿吨。虽然纤维素资源是巨大的,但人们对它的开发和利用却十分有限,除了纺织、造纸和木材工业外,只有少量低值应用,相当大的部分自然腐烂或燃弃,仅我国每年的各种农业废弃物就有近十亿吨,工业纤维性废渣数万吨,这无疑是对自然资源的极大浪费。更重要的是,生物质资源的不充分利用还造成了严重的环境污染,威胁着人类的生存和健康⁴。

当今世界存在“资源、能源、农业、人口和环境”五大危机,缓解乃至解决这些危机在很大程度上依赖于生物技术的发展,植物物质资源的生物转化和利用是其中的一个重点。由于纤维素在造纸、纺织、化工、医药、建筑等领域的广泛应用及其在国民经济发展中占有的重要地位,使得纤维素资源的开发利用具有重要的意义。但是五十年代至六十年代,由于合成高分子材料的兴起,纤维素资源的开发研究受到极大的影响;七十年代初期,由于石油危机的出现,这种曾被忽视的可再生性资源又再次被重视起来⁵,尤其是近年来,可持续性发展战略的提出使这一问题提升到了前所未有的高度。据资料统计,日本政府每年对有数百名科学工作者参与的植物物质生物转化系列项目的专项资助已达数十亿日元。Biomass 一词原来中文注释普遍为“生物量”,现在已有新释“生物原料”⁶,这也从一个侧面说明大力开发和利用可再生资源日益成为人们的共识,几十年来,关于木质纤维素的研究一直较为活跃。

1.1.2 木质纤维素资源的利用

作为陆生植物的骨架材料,亿万年的长期历史进化使植物纤维素类物质具有非常强的自我保护功能。其三类主要成分——纤维素、半纤维素和木素本身均为具有复杂空间结构的高分子聚合物,它们相互结合形成为复杂的超分子复合物,并进一步形成各种各样植物细胞壁结构。这些复杂的三维空间结构使植物体得以避免微生物及各种物理化学因素的攻击。木质纤维素材料的这种难降解性是其未得到有效利用的主要原因。纤维素是地球上数量最多的可再生性生物质能,微生物对它的降解是自然界碳素循环的主要环节,利用这种转化作用,可望将其转化为饲料、粮食和化工原料,同时在污染的防治中也可发挥重要作用。

因此,生物质资源充分利用的主要难题是如何克服木质纤维素材料的这种难降解性。阻碍着由葡萄糖组成的纤维素有效利用的最大障碍,是它被难以降解的木素所包围。目前在工农业生产中的纤维素利用所遇到的障碍多由此而来。例如:未木质化的牧草中的纤维素 80 % 可为牛羊体内的微生物分解消化,而木质化的麦秆纤维素的可消化率仅为 20 %。已有各类提高其消化率的物理、化学预处理方法,往往因为耗能大、成本高、污染环境等问题未能得以实用。而实现这一目标是需要对相关酶类对木质纤维素材料的降解过程有非常深入的了解的。目前国外在这方面的研究异常活跃,国内也已有了良好的开端。

妨碍木质纤维素资源生物转化技术实用化的另一个主要障碍,是自然界中的主要纤维降解酶类的比活力通常都比较低,致使酶的生产成本较高,影响了酶的广泛使用。随着人们对纤维降解酶的立体结构和作用机理认识的深入,以及基因工程、蛋白质工程技术的迅速发展,改造酶结构、提高酶比活力也已成为可能。国内外有不少研究工作,已有通过蛋白质工程使酶的使用性能得到改善的成功报道。

总之,生物质资源有效转化的最佳途径是使用现代生物技术,而生物技术成功的关键是提高生物转化的效率。组织生物、化学、轻工、化工等多学科、多专业科技人员的大规模合作研究,努力搞清生物质自我保护功能的结构基础,深入探讨生物质资源降解的机理,研究固体纤维素材料加工的生化工程基础问题,探寻生物质资源转化和废弃物资源化的新技术,是解决上述资源环境问题的关键。

1.2 降解木质纤维素的微生物类群

自然界中, 伴随着亿万年的进化历程, 出现了众多能降解纤维素的微生物, 包括细菌、放线菌和真菌^{7~9}。初步统计, 已发现具有降解纤维素能力的微生物有近 200 中。其中, 丝状真菌是研究最多的纤维素降解类群。包括木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)的丝状真菌和担子菌, 其中又以木霉属的瑞氏木霉(*T. reesei*)、康氏木霉(*T. koningii*)、绿色木霉(*T. viride*)和拟康氏木霉(*T. pseudokoningii*)及青霉属的斜卧青霉(*P. decumbens*)、微紫青霉(*P. janthinellum*)研究较多^{10~14}, 许多菌已应用到了工业生产中。它在降解纤维素底物时, 菌丝穿过次生壁进入胞腔, 由内向外降解纤维素, 使纤维素逐步被破坏; 而细菌则是粘附在纤维上, 从纤维的表面向内生长, 在接触点处纤维素被降解, 使纤维表面呈锯齿蚀痕。以纤维单胞菌属(*cellulomonas*)、噬纤维菌属(*cytophaga*)、生孢噬纤维菌属(*sporocytophaga*)、假单胞菌属(*pseudomonas*)、梭菌属(*clostridium*)和芽孢杆菌属(*bacillus*)中的菌研究的较多; 放线菌中对高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)和小单胞菌属(*Micromonospora*)有所研究。表 1 是常见的可降解纤维素的菌种。

插表 1

基于木材腐朽类型, 可把木腐微生物分为白腐菌(White-rot Fungi)、褐腐菌(Brown-rot Fungi)和软腐菌(Soft-rot Fungi)三类, 白腐菌是研究最多、最为深入的一类降解木素的微生物, 它具有完整的木素降解酶系, 能将木素彻底分解为 CO_2 ; 而褐腐菌分解木素的能力很差, 普遍认为脱甲基是褐腐菌对木素的主要修饰反应; 软腐菌部分分解或修饰木素, 其降解木素的能力介于白腐菌和褐腐菌之间。放线菌降解木素研究以链霉菌(*Streptomyces* sp.)进行的较多。与大数白腐菌不同, 链霉菌降解木素活性是在初级代谢阶段, 通过脱甲基、芳环断裂和侧链氧化降解木素。其它细菌如假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和梭菌(*Clostridium* sp.)等也有降解木素能力, 细菌降解木素以溶解木素作用为主, 使木素矿化成为 CO_2 的能力远低于白腐菌。

表 1.1: 降解纤维素的部分微生物类群

Group	Microorganiam	Group	Microorganiam
Fungi		Fungi	
	<i>Trichoderma reesei</i>		<i>Phanerochaete</i>
	<i>T. viride</i>		<i>Chrysosporium</i>
	<i>T. koningii</i>		<i>Schizophyllum commune</i>
	<i>T. pseudokoningii</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>T. harzianum</i>		<i>Rhizopus javanicus</i>
	<i>T. lignorum</i>		<i>Pyricularia oryzae</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>		<i>Coriolus versicolor</i>
	<i>Penicillium citrinum</i>		<i>Fomes fomentaris</i>
	<i>P. funiculosum</i>		<i>Hymenogaster grisea</i>
	<i>P. irensis</i>		<i>Pleurotus ostreatus</i>
	<i>P. janthinellum</i>		<i>Physarium polycephalum</i>
	<i>P. notatum</i>		<i>Phoma hibernica</i>
	<i>P. variabilla</i>		<i>Fusarium moniliforme</i>
	<i>P. verruculosum</i>		<i>Hypocypria merdaria</i>
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Myrothecium verrucaria</i>
	<i>A. flavus</i>		
	<i>A. foetidus</i>	Bacteria	
	<i>A. fumigatus</i>		<i>Cloustridium acetobutylium</i>
	<i>A. oryzae</i>		<i>C. lochheadii</i>
	<i>A. saitoi</i>		<i>C. longisporum</i>
	<i>A. sojae</i>		<i>C. thermocellusm</i>
	<i>A. terreus</i>		<i>C. thermomonospora</i>
	<i>A. aculeatus</i>		<i>C. thermocellulaseum</i>
	<i>Neurospora crassa</i>		<i>C. stercoraium</i>
	<i>Humicola insolens</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Myrothecium verrucaria</i>		<i>Ruminococcus albus</i>
	<i>Macrophomina phaseolina</i>		<i>R. flavefaciens</i>
	<i>Myceliophthora</i>		<i>Cellvibrio fulvus</i>
	<i>cellulophilum</i>		<i>C. gilvus</i>

1.3 纤维素生物降解的机理

1.3.1 纤维素酶解机制

自从 1906 年从蜗牛消化液中发现纤维素酶以来,人们对纤维素的酶解进行了大量的研究。从化学反应看,纤维素的降解只涉及 β -1,4-糖苷键的水解及氢键的断裂,是一个简单的反应过程,但作为植物细胞结构材料的纤维素是由纤维二糖单元组成的螺旋形的糖链,借氢键或其他共价键相互作用定向平行排列和堆砌而成的惰性高聚物。纤维素底物结构的高度复杂性以及酶组分的多样性为彻底了解纤维素降解机制带来一定的困难。

1950 年 Reese 等¹⁵提出了著名的 C_1 - C_x 假说,认为 C_1 因子首先破坏纤维素结晶区链间的氢键,然后在 C_x 和葡萄糖苷酶的作用下彻底水解, C_1 因子好比氢键酶的作用。1969 年 Eriksson¹⁶提出了顺序作用的 C_x - C_1 假说, C_x 酶随机水解纤维素链的糖苷键,生成还原性和非还原性末端,紧接着 C_1 酶从非还原性末端水解产生纤维二糖。由于这一机制在当时较好地解释了 C_1 和 C_x 的协同作用且后来得到了实验验证,逐渐发展成为现普遍认可的外切酶—内切酶的协同作用机制, C_1 被确定为外切纤维素酶¹⁷。

现普遍认为真菌降解纤维素酶系由以下三种酶组成,三种酶组分协同作用完成对纤维素的彻底降解。

1. 内切葡聚糖酶 (Endo-glucanase), 随机水解纤维素链内的 β -1, 4-葡萄糖苷键;
2. 外切葡聚糖纤维二糖水解酶 (外切酶, cellobiohydrolases, 简称 CBH), 从纤维素的非还原性末端水解释放纤维二糖;
3. β -葡萄糖苷酶 (β -1,4-glucosidase), 水解纤维二糖生成葡萄糖。

虽然上述机制基本可以解释外切酶-内切酶的协同作用,但仍存在一些难以解释的问题如 为什么酶组分之间存在协同作用的差异性? 不同纤维素酶组分的底物特异性如何解释? 尤其是无法说明这种协同作用的起始反应是如何进行的,特别是对天然纤维素结晶区的酶解机制没有搞清楚。自 80 年代末,随着分子生物学和现代实验技术的发展和运用,对纤维素的酶解机制以及酶的结构和功能的研究取得了突破性认识。1986 年, Tilbeurgh¹⁸ 用木瓜蛋白酶水解 *T. reesei* 的 CBH I, 得到了具有吸附结晶纤维素能力的吸附结构域 (Cellulose Binding

Domain, CBD) 和具有催化(水解)能力核心蛋白区, 即 CD 区 (Catalytic Domain)。研究发现 CBHI 失去 CBD 区后, 对结晶纤维素的吸附和水解能力大部分丧失, 但对非结晶区的吸附和水解能力基本未变¹⁹, 对 *T. reesei*, *C. fimi* 及 *Cellulomonas* 的 CBHI 的 CBD 进行定点突变的研究结果也证实了这一点^{20, 21}。Knowles 等人认为 CBD 具有“疏解”纤维素链的作用²¹, 我实验室对拟康氏木霉 *T. pseudokoningii* 和微紫青霉的 CBHI 的 CBD 的研究也获得类似结果, 并进一步观察到 CBD 吸附于纤维素后会导致纤维素超分子结构的破坏, 但不伴有还原糖的产生, 即纤维素内的糖苷键未发生水解^{22~24}。这一发现为彻底搞清结晶纤维素的起始降解机制提供了重要依据; 同时也引发出一个问题, 即纤维素超分子结构的变化是否是降解的起始?

1.3.2 氧化机制

虽然上述酶解机制已得到认可, 但几十年来, 人们利用纤维素降解酶系离体降解纤维素的转化效率一直较低, 这也成为纤维素酶应用中的一个障碍。是否除了酶解机制外, 还有其它的因子或机制参与纤维素的降解? 最初发现氧化作用的参与是 1974 年, Eriksson²⁵ 发现氧气可以提高白腐菌 *P. chrysosporium* 对纤维素的降解速度, 于是猜测是否有氧化酶参与降解。同年, Westermarck 和 Eriksson 从 *P. chrysosporium* 中分到了纤维二糖脱氢酶(CDH)^{25, 26}; 1977 年, Ander 和 Eriksson²⁷ 又从其他六株白腐菌中分到了 CDH, 到目前为止, 已从多株木材降解菌中发现了 CDH 的存在²⁷, 我室也得到了类似的实验结果, 发现在产生 CDH 的微生物中可能存在着纤维素降解的氧化机制²⁸。1992 年, Kremer 和 Wood²⁹ 发现 CDH 对纤维素的影响与氧气的消耗有着直接的联系, 且发现 CDH 可以还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} 并以纤维二糖为电子供体还原 O_2 产生 H_2O_2 , 以 Fenton 反应的形式产生羟基自由基 $\text{HO}^\cdot$, Henriksson 更进一步提出了 CDH 以产生的 $\text{HO}^\cdot$ 氧化解聚纤维素的观点³⁰, 此后又有一些研究表明 CDH 产生的 $\text{HO}^\cdot$ 能破坏结晶纤维素的紧密结构, 在降解中起着重要的作用^{31~33}。

虽然 CDH 在纤维素降解中的氧化机制是近十年讨论的一个热点, 但实际上关于 $\text{HO}^\cdot$ 氧化作用纤维素的观点早在 1965 年就已提出, Halliwell³⁴ 发现 Fenton 试剂 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的 $\text{HO}^\cdot$ 具有极强的纤维素降解能力, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\cdot$

$\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$, 遂提出了 $\text{HO} \cdot$ 氧化降解纤维素的假说。木材降解菌的一大类群——褐腐菌降解纤维素机制的研究更使研究者们认识到 $\text{HO} \cdot$ 氧化机制在纤维素降解中存在的可能性和重要性。褐腐菌不具有对于水解纤维素结晶区至关重要的外切纤维素酶, 却能完成对纤维素的彻底降解, 迄今已从多株褐腐菌中分离到能介导 $\text{HO} \cdot$ 生成的小分子物质, 对纤维素的作用实验表明 $\text{HO} \cdot$ 确实在纤维素的降解初期起着重要的作用³⁵。

除上述之外, 近来还有关于短纤维形成因子的报道。早在六、七十年代, Halliwell 就曾报道过短纤维形成现象^{34 36}, 认为短纤维的形成是纤维素降解的起始。1984 年, Griffin³⁷ 从 *T. reesei* 菌的商品酶中分离得到一个能将滤纸裂解为短纤维的非酶因子, 与底物作用时体系中无可溶性还原糖的产生; 此后对多株木材降解菌的研究, 更是证实了此种短纤维形成因子存在的可能性和与纤维素酶组分的不同³⁸。虽然短纤维形成因子的作用机制还未确证, 但从其作用特点看, 极有可能是氧化机制在起作用。

1.4 褐腐真菌降解木质纤维素的研究

1.4.1 研究进展

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内、外纤维素酶怎样催化纤维素分子链 β -葡萄糖苷键的水解作用方面, 已深入到分子水平, 现已基本搞清了它们水解结晶纤维素的机制, 但研究大都是以不含木素的纤维素材料进行的, 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。虽然木素可被白腐菌等微生物彻底降解, 但降解机理没有搞清, 依靠木素降解途径来解决天然木纤材料中纤维利用的研究也受阻。为摆脱上述困境, 研究者们一直在探索新的降解途径。近年来, 褐腐菌因其降解木材的强大能力、降解方式的独特性而备受关注, 其降解纤维素机制的研究成为国际上研究和争论的一个热点。

1.4.2 褐腐菌降解木材纤维素的特点

褐腐菌是降解木材能力极强的一类担子菌,可在木素少量被修饰或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。研究发现此类菌在降解纤维素时有许多独特的地方。

1. 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³⁹;
2. 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³⁹。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,三者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;
3. 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⁴⁰。

1.4.3 $HO\cdot$ 氧化降解纤维素机制

鉴于上述降解天然纤维素的特点,研究者们推测褐腐菌可能存在一种独特的木材降解体系。起初,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,酶分子不能穿过完整的木材细胞壁^{41~43};另有免疫电子显微镜观察发现褐腐菌的胞外降解酶类和代谢物,包括各种纤维素酶等在早期降解阶段,都不能进入到木材细胞壁中^{44~45}。1965年, Halliwell 发现 Fenton 试剂 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的 $HO\cdot$ 具有极强的纤维素降解能力³⁴,



推测在天然纤维素的降解中可能存在非酶的氧化机制。关于非酶机制的最有力的证据是1981年 Cobb 所做的实验。他将纤维素底物进行同位素标记,将底物与活菌体用能阻挡酶组分滤过的超滤膜分隔开,但还是检测到了带有同位素标记的可溶性产物,表明褐腐菌有非酶的小分子组分参与了纤维素的降解。Koenigs 等人也发现经 Fenton 试剂作用过的木材在物理化学性质上与褐腐的木材是相似的^{46, 47}, 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^{48, 49}, 褐腐菌以 HO· 氧化降解纤维素的假说日渐形成。

此外, 褐腐菌具有铁络合能力也是一个重要发现。木材中铁的含量通常是很低的, 为 0~2 μmol/L, 而可溶性铁更低一些。Fenton 反应需要 Fe²⁺ 的参与, Fekete 和 Jellison 等人利用 CAS 检测方法首次由褐腐菌中检测和分离得到了具有铁络合能力的络合物^{50, 51}, 这为褐腐菌的依赖于 Fe²⁺ 的 HO· 氧化机制提供了证据。

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, 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机制是研究的焦点。由于密粘褶菌 *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。但因寻找这样一种未知因子有一定的难度, 且检测其活性的方法与水解酶类也很不相同, 因此研究工作一直未有大的突破, 进展较为缓慢。

1992 年, Enoki 等人⁵¹ 从 *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 Fe²⁺、蛋白质、和中性碳水化合物, 凝胶过滤层析测得其分子量在 1000~5000, 此组分可催化单电子供体如 NADH 与 O₂ 形成 H₂O₂; 而且此组分可将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, 并具有铁络合能力, 实验证明为含糖的小肽。但此后十年再也没有关于糖肽研究的详尽的报道, 已公开发表的研究工作也只限于分离纯化方面, 这种小分子物质在纤维素氧化降解中的作用未有阐述。

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 siderophore⁵⁰, 木材降解菌产生的 siderophores 一般是类酚结构的化合物。1991 年, 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⁵², 后经 HPLC、GC-MS、红外光谱检测鉴定为酚类物质, 进一步研究发现酚类化合物可以还原 Fe³⁺, 产生 HO·, 对纤维素底物具有一定

的作用。Goodell 等人将此类由 *G.trabeum* 产生的、经 1000 Da 的膜超滤过并经乙酸乙酯抽提出的具有铁络合能力的酚类物质称为 Gt factor⁵³。目前关于 Gt factor 的报道均来自于 Goodell 研究小组⁵³。

Zohar⁵⁴ 也曾报道 *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。Kenneth 及 Andrzej 等人^{55,56} 也有类似的报道。

关于多株褐腐菌降解纤维素特性研究主要有 Highley 和 Enoki 等人的工作。Highley 通过对多株褐腐菌作用后的纤维素底物进行分析发现, 在纤维素降解初期, 纤维素迅速解聚, 解聚与底物大量失重是两个独立的过程; Enoki 等人则发现多株褐腐菌的粗酶液所具有的单电子氧化活性似乎与底物的降解有关系。但两人的研究都没有分离纯化工作作基础, 都是胞外粗酶液作用的结果分析。本实验室的王蔚等人以褐腐菌的典型代表菌株—密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 为研究对象, 于其胞外酶液中首次分离纯化得到一低分子量的活性多肽组分(称作 Gt 因子), 研究了 Gt 因子介导的羟基自由基 $\text{HO}^\cdot$ 的形成机制及其在木质纤维素降解中的作用。电子自旋共振(ESR)、红外光谱(FT-IR)、X-光衍射等分析证实 Gt 因子可介导 $\text{HO}^\cdot$ 的生成, 且以 $\text{HO}^\cdot$ 破坏纤维素中的氢键连接并导致糖苷键的断裂, 使其暴露出更多的还原性和非还原性末端, 为纤维素的进一步降解提供条件。为研究褐腐菌中 $\text{HO}^\cdot$ 氧化降解纤维素机制的确立提供了直接的证据^{57~60}。

1.4.4 目前研究中存在的问题

由近年来的研究进展可知, 关于褐腐菌降解木质纤维素的研究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。虽然现普遍认为褐腐菌以 $\text{HO}^\cdot$ 机制氧化降解纤维素, 但由于缺少诸多直接的、确凿的证据, $\text{HO}^\cdot$ 氧化降解机制的确立还需要进一步的研究。

Enoki 的糖肽以及 Goodell 的 Gt chelator 都是由密粘褶菌分得的, 是否存在于其他褐腐菌未曾考证; 此外, Gt chelator 是从以葡萄糖为碳源的 *Gloeophyllum trabeum* 的液体发酵液中分到的。许多研究已表明在自然环境中, 真菌以木纤材料为底物的固体发酵的降解酶系与以葡萄糖等为碳源的液体发酵的降解酶系是根本不同的^{61~63}; 且酚、醌类物质为次级代谢产物, 是木素降解的中间体, 褐腐菌在降解木质纤维素的初期基本不降解木素, 所以醌类物质为降解初期的小分子活性物质的可能性不大。

虽然关于褐腐菌的研究已有几十年, 关于褐腐菌降解木质纤维素的研究大多是以一种菌—密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 为模型进行研究的, 因此大多数结论的得出也是基于一种菌的研究, 未免存在片面性, 研究结论是否适用于其他褐腐菌未曾考证, 还未有人对多株褐腐菌进行系统的研究, 这其中也包括分离纯化工作的片面性。近来, 关于褐腐菌胞外低分子量活性物质分离的研究较多, 但此类物质是否广泛产生, HO· 氧化降解纤维素的特点是否具有普适性, 还需要多株褐腐菌研究结果的支持。

本文在第二章中对褐腐真菌降解纤维素的特性进行了普遍研究, 证明了褐腐真菌在木纤材料上生长时, 普遍产生具有 HO· 活性的低分子量的物质。

1.5 褐腐真菌产生的铁螯合物在纤维素降解可能的机制分析

褐腐真菌降解纤维素机理的研究主要是建立在 1965 年 Halliwell 提出的假说, 即由于 Fenton 试剂 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的 HO· 具有极强的纤维素降解能力³⁴, 继而推测在天然纤维素的降解中可能存在羟自由基相关的非酶的氧化机制。到目前为止, 越来越多的研究证明了这种氧化机制的存在及其在羟自由基在纤维素降解中的作用^{57~60}。值得注意的是, 在褐腐菌的氧化降解纤维素的体系中, 铁离子在羟自由基产生体系和纤维素降解过程中起着至关重要的作用, 另外, 它还是重要的氧载体和电子传递体, 影响着生物体的物质代谢和能量代谢。本实验室王蔚等的研究表明, Gt 因子不但具有产羟自由基的活性, 还具有螯合铁离子的活性。随着研究的深入, 我们发现凝胶过滤层析中, 螯合铁活性组分与 Gt 因子活性部分不是完全重合的, 更重要的是, 能产生羟自由基的物质非常多, 而且目前羟自由基常用的简便检测方法的特异性较差。为了更好的研究褐腐菌的氧化降解体

系，我们把研究的重点转向了这种螯合铁活性组分。

环境科学的研究表明⁶⁴，一些铁有机配体化合物具有光化学活性，如铁-草酸配合物，铁-柠檬酸、甲酸、酒石酸配合物，铁-硬脂酸盐等。其中一些化合物的光活性被利用来降解有机物。一些作者还报道了草酸铁与光-Fenton试剂结合降解全氯烃及实际废水中的有机污染物。有报道说铁-硬脂酸盐可来降解大分子有机聚合物，如塑料包装袋等。铁有机配合物为什么能降解有机化合物甚至是大分子有机化合物呢？Zuo^{65~67}等人的研究表明，铁-草酸盐络合物的光解是大气水相中 H_2O_2 的主要来源。大气水相中，铁-草酸盐络合物作为一种催化剂，在溶解氧体系中，经紫外光或可见光的照射可以通过一系列的自由基反应发生光解反应，产生 H_2O_2 。 H_2O_2 通过Fenton反应产生羟自由基，后者可以氧化多种天然或人工的有机物或者无机物，具有相当重要的意义。这就为铁螯合物在纤维素降解机制中的作用研究提供了崭新的思路。褐腐菌是否就是通过这种低分子量的铁螯合活性物质和铁共同的催化作用，使水相中产生 H_2O_2 ，继而产生一系列自由基反应来达到其辅助降解纤维素的作用呢？本文的第三章就把研究重点放在褐腐菌产生的铁螯合物上，进行了一系列研究。对褐腐菌产生的这种具有辅助降解纤维素作用的铁螯合物进行了一系列分离纯化的尝试，对其结构特征进行了分析。

下面简要介绍一下铁螯合物相关的研究现状。

1.6 铁螯合物的多样性

铁是一种地球上含量丰富的金属元素，主要以不溶性的 Fe^{3+} 形式存在，pH7时的溶解度仅为 $10^{-8}mol/L$ ⁶⁸。一般生物利用铁都是通过一些螯合铁的组分把这种低浓度的铁进行富集或者把不能利用的铁转化为可利用的形式。Hopping (1963) 研究认为铁是以螯合物的形式被吸收的。在动物的肠腔内，无论是 Fe^{2+} 还是 Fe^{3+} ，都必须与内源或外源配位体结合形成络合物，再以此形式吸收并进一步转运。从另外角度讲，细胞膜是由蛋白质和脂类组成的，它是细胞内外环境的天然屏障，铁离子要穿过细胞膜，需要一种载体分子将之包被起来，形成一种有机的脂溶性表面，才能穿过细胞膜。可见，铁螯合物在比较原始的微生物类群中起着重要的作用，在高等动植物甚至是人的代谢中也起着非常重要的作用。

下面首先介绍一下铁螯合物相关的概念和研究背景。

1.6.1 铁螯合物相关概念

铁螯合物 (iron chelator) 是指生物为了利用铁元素或者其他代谢需要所产生的一类重要的能够螯合铁的生物活性分子。能够对铁有螯合作用的物质很多, 它们是生物利用铁元素的一种重要的分子。其中, 铁载体 (siderophores; iron carriers) 是一种非常重要的铁螯合物。它是指细菌或真菌在缺铁压力下产生的一种分子量相对比较低铁离子的特异性螯合物⁶⁹。本文研究的褐腐菌产生的铁螯合物大致可以归为铁载体这一类生物活性物质。

这些化合物对微生物的作用是在环境中获取铁或者使这些矿物质变得可用。相关的研究已经有五十多年的历史, 其中比较有趣的是大多数好氧和兼性好氧微生物至少产生一种铁载体。铁载体与微生物对动物和植物的毒性有关, 现在有良好的临床应用的前景, 并在农业中有起着很重要的作用⁶⁹。

1.6.2 产生铁螯合物微生物的多样性

目前报道的能产生铁螯合物的微生物很多。在真菌和细菌中都有报道。

Milagres 等用改良的络天青 S (CAS) 琼脂糖平板方法从多株真菌 (担子菌、半知菌、子囊菌、接合菌) 和细菌 (革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌) 中检测到了铁螯合物活性, 证明了铁螯合物的广泛存在。特别地, 一些具有木材降解功能的担子菌和曲霉的 CAS 反应最迅速⁷⁰。

荧光假单胞菌群 (*Fluorescent Pseudomonads*) 在 LB 培养基上可以产生一种黄绿色色素, 大量的研究已经确证这种色素就是一种铁载体。产生铁载体的菌株表现为在菌苔周围形成橙红色晕圈, 检测结果十分直观⁷¹。

Macrellis 等对海水里的铁螯合物进行了富集分离, 63% 的铁螯合物分子量在特定的分子量范围内 (300-1000 Da), 而且, 发现所有的螯合物都具有儿茶酚和羧基, 证明了海水中的铁载体与实验室分离到的铁载体类型是一致的, 这一结果的重要性在于对人们理解整个自然界中铁螯合物的性质有很大的帮助⁷²。

Milagres 等还从白腐菌中检测的明显的儿茶酚类、羧基衍生物和草酸三种

铁螯合活性。并认为在过氧化氢存在的条件下, 这些螯合物就可能通过Fenton反应产生自由基的方式对纤维素和半纤维素进行攻击而降解纤维素并得到和褐腐菌降解显微素类似的结果。另外, 他还研究了这种铁螯合物在造纸制浆漂白中的作用⁷³。

促进植物生长的根际细菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) 通过多种直接或间接的代谢机制抑制病原菌的繁殖并促进植物的生长。在低铁的环境中, PGPR 主要的抑菌机制是分泌一类与铁高亲和 ($K_d=10^{-20}\sim 10^{-50}$) 的铁载体, 分子量约为 400~1000Da, 并以特异的转运系统转移至体内, 供微生物自身生长的需要, 同时, 降低了环境中的铁浓度, 使植物病原真菌生长受到抑制。在土壤中, 大多数植物根系与植物病原真菌相比, 能在铁浓度低 1000 倍的条件下正常生长。所以, PGPR 引起的局部缺铁不会损害植物的正常生长⁶⁸。

1.6.3 铁螯合物结构的多样性

早期的研究认为: 铁载体型螯合物可以分为两大类: 儿茶酚型衍生物和氧肟酸型衍生物。随着研究的深入, 越来越多结构类型的铁载体被发现。后来儿茶酚型衍生物、氧肟酸型衍生物和二羟基苯甲酸盐型衍生物被认为是三种常见的铁载体类型。螯合物分离过程中铁的存在使铁螯合物结构的确定变得困难, 这是因为一方面铁会使结构单元遭到氧化破坏, 另一方面其顺磁性会干扰核磁共振对其结构的测定⁶⁹。然而, 还是有很多新的结构类型的铁螯合物被发现: 肽类、羟基喹啉、有机酸、氨基酸等类型的铁载体类型化合物都有报道。

Paulette等用乙醇和反相高效液相的方法从假单胞菌细胞膜上分离到了一种铁螯合物, 经核磁共振和质谱鉴定为一种新型的铁螯合物: 4-羟基-2-非喹啉 (4-hydroxy-2-nonylquinoline)⁷⁴。

Boopathi等用柱层析和RP-HPLC色谱从植物根际假单胞菌的发酵液中分离到一种多肽类铁载体, 并证明了该铁载体含有喹啉结构。另外, 他通过CD谱的方法证明了肽-铁-喹啉复合物存在一种新型独特的转角结构, 继而推测其在铁载体二级结构的形成中起重要作用⁷⁵。

迄今为止, 肽类铁载体的研究比较多。Gregory等已经能够通过一系列分子

生物学的方法和计算分析,对链霉菌的非核糖体合成的肽合成酶的基因簇进行了研究,从而对其基因编码的一种肽类铁载体: Coelichelin进行结构预测。为研究这类铁载体创造了新的途径⁷⁶。

铁色素 (ferrichrome) 是人们研究较充分的一种铁载体,最早从真菌 *Ustilago sphaerogena* 中提取得到,为一种环肽结构,含有三个甘氨酸和三个修饰了的鸟氨酸残基,通过六个氧原子螯合铁。后来研究发现,许多中细菌 (包括大肠杆菌) 都能利用和它结构非常类似的铁载体。结构如下图:

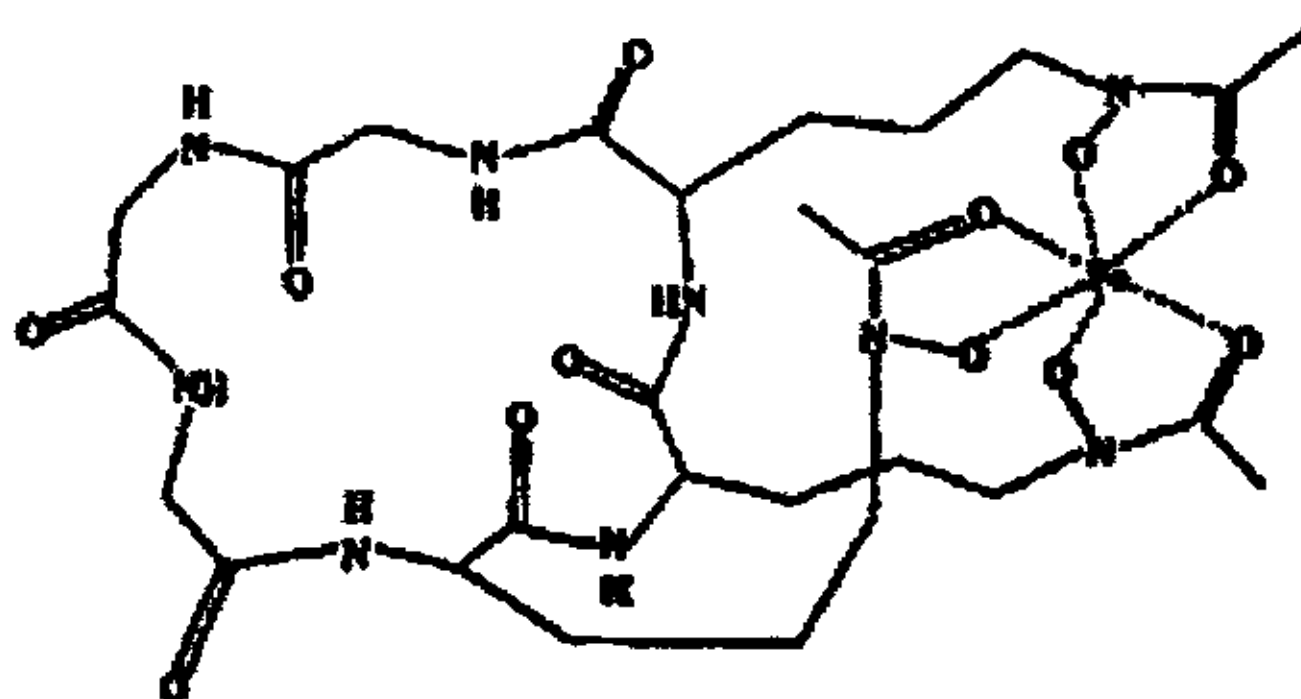


图1.1. 铁色素的化学结构

根据对细菌体内铁的运输的研究,发现细菌产生一种被称为铁传递色素 (Siderochromes) 的特殊螯合剂(一种在配位结合时能形成多环的配体),对 $\text{Fe}(\text{II})$ 有高亲和力,能形成亲脂性螯合物(多环络合物)并通过膜结合运送铁。然后在细胞壁上释放 $\text{Fe}(\text{II})$ 单独通过或完全螯合进入细胞。这种特殊螯合剂是以羟肟酸或邻苯二酚母体为配位单位的多肽化合物等大分子,它们与 $\text{Fe}(\text{II})$ 络合的通式为

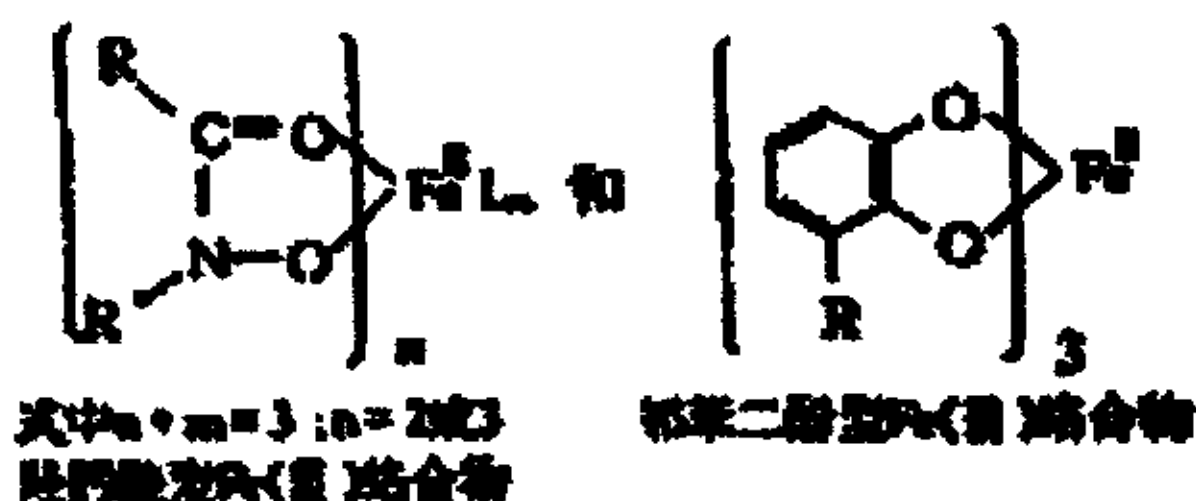


图 1.2. 铁传递色素与铁的络合方式

去铁敏B (Deferoxamine B) 是典型的羟肟酸型铁载体,由三个羟肟酸结构单元组成。现在已经广泛的应用于临床,作为一种常规的药物使用⁷⁷。

Rhizoferrin, 一种从根际微生物分离到的一种在赖氨酸和鸟氨酸处有羟基聚羧酸结构的铁螯合物, 既不是儿茶酚型衍生物也不是氧肟酸型衍生物⁷⁸。结构如下:

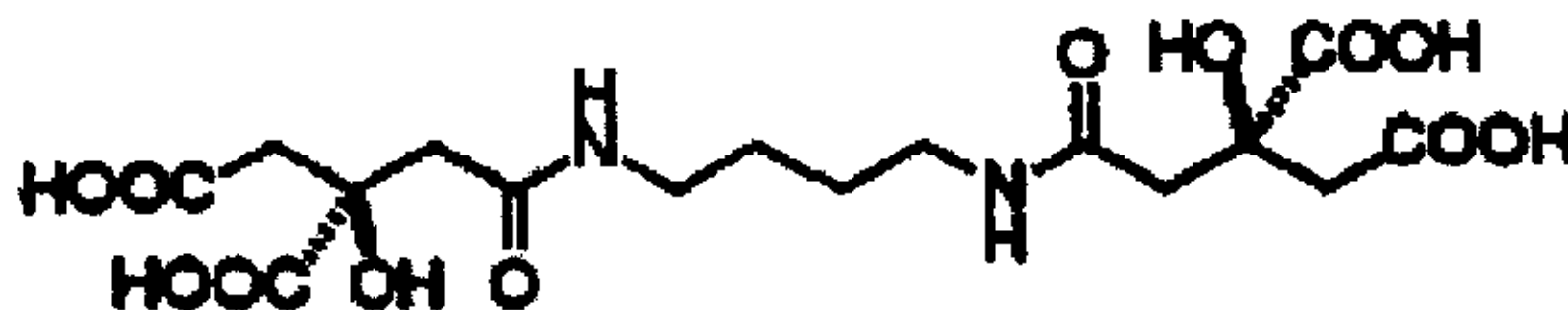


图 1.3 Rhizoferrin 的结构

1.6.4 铁螯合物生物学功能的多样性

铁螯合物在自然界中存在非常广泛, 对生命现象也起着非常重要的作用。例如血红蛋白就是一种含铁的铁螯合物, 它在人体内起着送氧的作用。Goto F 等研究表明, 铁结合蛋白能在过量的铁引起的自由基毒害中维持光合作用的功能, 对病毒引起的坏死和真菌的感染表现出耐性, 蛋白质通过截获细胞间铁, 从而阻止铁参与 Fenton 反应产生具有强活性的羟自由基, 而保护细胞免受各种环境胁迫而导致的细胞氧化性损伤。Laulhere 等的研究说明螯合形式的铁, 而非 Fe^{3+} 是铁还原的底物, 控制铁结合蛋白对铁的吸收, 从而控制细胞中铁的含量和 $\text{Fe}(\text{II})/\text{Fe}(\text{III})$ 比。而当铁的吸收和释放同时进行, 铁螯合力是影响整个铁交换的关键因子⁷⁹。

微生物分泌的铁螯合物在研究初期得到关注在于它们能富集铁元素, 提高土壤难溶铁的溶解性从而提高铁的有效性。随后的研究发现, 微生物产生的铁螯合物的作用不仅限于此, 目前, 它已被人们广泛的用于医药、造纸印染工业, 化肥工业、农牧业等。

铁螯合物的抗癌、抗病毒、抗氧化作用

Fe^{2+} 对细胞凋亡呈双相作用, 缺乏铁可以引起细胞凋亡的发生, 如用铁螯合剂 DFO (deferoamine) 作用后可以引起 HL-60 细胞凋亡, 此作用可被 FeCl_3 所阻断。但机体铁含量过多亦会引起细胞凋亡, Jacob 等就发现以 8-羟喹啉作为 FeCl_3 及柠檬酸铁胺的载体, 作用 HUVE 细胞 (human umbilical vein endothelial cell) 引起细胞发生凋亡, 此作用可被铁螯合剂所拮抗。

铁对于凋亡所呈现的双相调节作用可能是由于 Fe^{2+} 所催化的氧化还原反应是机体抗氧化机制的一个中间环节, 通过此环节细胞将某些氧化还原活性物转变为另外一类的氧化还原物, 然后通过其他途径加以转换消除。因此, 当铁催化的环节发生变化时就会导致此环节的底物或产物(均为氧化还原活性物)含量的变化, 可能引起细胞凋亡。此外, 由于不同细胞正常的铁含量不同以及所含的其他转化酶系的不同, 也使铁在不同细胞表现的作用不同⁸⁰。

博莱霉素 A (bleomycin A, BLMA) 是一种抗肿瘤抗生素, 亦是一种金属螯合剂, 可以与 Fe^{2+} 、 Co^{3+} 等过渡金属离子络合, 激活 O_2 , 造成 DNA 氧化损伤, 这也是其抗肿瘤的分子机制。

色霉素 (Chromomycin A_3) 和光神霉素 (Mithramycin、Plicamycin[®]) 螯合铁的二聚复合物, 比原来单体更有较强的抗癌活性, 且造成细胞进行有程序死亡。而且该二聚复合物与常用的抗癌药物比较如 cisplatin 和 doxorubicin 更具有抗癌活性, 解决了常用抗癌药物的抗药性问题, 且也具有与双股脱氧核糖核酸链接合的能力, 尤其在 mithramycin 螯合铁的二聚复合物更具有切割 DNA 的能力。光神霉素目前临床已在使用中, 此药物直接是以静脉注射使用中。本发明系将 Plicamycin 与铁结合形成稳定, 并具有高效能之复合物。

阿霉素具有广谱抗癌活性, 广泛用于临床, 但其在机体内产生自由基杀伤癌细胞的同时, 心肌细胞线粒体膜也遭受严重损伤, 从而引起心脏毒性。右雷佐生为 EDTA 的环状衍生物, 易扩散进入细胞, 细胞内水解产物可与铁离子形成金属螯合物, 有效除去阿霉素-铁螯合物中的铁离子, 从而阻断由阿霉素-铁螯合产生的自由基, 起到保护心脏作用。与常用化学保护剂去铁胺比, 本品具有细胞跨膜转运分布快, 迅速除去铁蛋白中铁离子的特性, 不存在去铁胺对眼视网膜、听力及肺功能的副作用, 且不影响阿霉素的疗效, 本品在国外已上市, 广泛用于临床, 因此开发该产品前景看好。

苯丙素甙 (PPG), 一种分离自民间中药马先蒿 (Pedicularis) 的活性铁螯合物, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗血小板凝集及抑制白三烯 B_4 合成等作用。有研究表明, 苯丙素甙能够抑制鼠肝微粒体脂质过氧化、自由基引起的红细胞溶血和肿瘤细胞生长, 清除超氧阴离子自由基和羟自由基, 使肿瘤细胞发生再分化以及快速修复氧化胁迫引起的 DNA 损伤。

另外, Laine 等分析了 CAS 法测定的铁载体分泌量和抗病原菌能力的相关性, 发现假单胞菌的某些菌株分泌的铁载体具有种的选择性, 对某些病原真菌具有很强的抑菌作用, 对另一些病菌可能没有拮抗作用, 甚至会有相反的促进作用^{68, 81}。

在治疗疟疾中起重要作用

疟原虫需要铁来合成具有重要生命功能的含铁蛋白, 如核糖核酸还原酶 (Ribonucleotide reductase, RR) 催化还原为脱氧核糖核酸, 在 DNA 的合成中起重要作用; 疟原虫 Fe-SOD 是其抵抗氧化压力的重要防御机制; 细胞色素则在生物氧化与能量代谢起作用。血红蛋白是红内期原虫获得所需营养的重要来源, 血红蛋白在食物泡内被降解成氨基酸和以铁原卟啉 IX 形式存在的血红素, 后者聚合成对疟原虫无毒的疟色素。因此, 铁对原虫是非常重要的。

疟原虫在宿主体内的数量是以指数方式增长, 铁的需求很高, 铁螯合剂可造成选择性的原虫“铁饥饿” (iron starvation), 而人体正常组织更能耐受暂时的铁缺乏。DFO、羟胺-铁离子螯合剂 (reversed siderophores, RSF)、异烟酰及苯甲酰肼类等铁螯合剂也不断的被发现并应用于临床⁸²。

铁过量和缺乏病

铁过量 地中海贫血病患者是因为长期输血治疗导致体内铁离子沉淀而造成器官损害。去铁胺 B 可与铁螯合, 给患者服用去铁胺 B 后, 可有效地与铁螯合经尿排出⁸³。

铁缺乏 铁缺乏是世界范围的最常见营养缺乏病。但目前使用的各种补铁剂, 从简单的硫酸亚铁到各种有机铁盐, 结果并不理想, 不但对胃有很大刺激性, 而且由于铁离子或简单铁复合物产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基可能存在对细胞损伤。此外, 作为补铁剂的 Fe(II) 盐在制备和贮存过程中易受氧化, 而 Fe(III) 盐在生理 pH 下

又易水解聚合、影响吸收。现在已经研制出一种多糖天然高分子铁络合物补铁剂商品名 NIFEREX^R-150 并用于临床。

在工业上的应用

螯合分散剂作为一种特殊的环保型高分子化合物,对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属离子具有很强的螯合作用,用于退浆、煮练、漂白和染色等工序中,消除水中钙、镁、铁等金属离子对产品质量的影响,(如织物黄斑等),清除悬浮污垢和杂质,分解设备内存在的钙皂沉淀物,是 H_2O_2 的良好稳定剂,可显著提高白度,消除黄斑现象,对纤维有保护作用。用于染料印花或染色后的净洗和皂洗工序,防止染料的粘色,提高产品质量。

在农牧业中的应用

土壤有效铁浓度通常低于作物吸铁临界水平,作物难于吸收利用。施入土壤的无机铁肥因氧化作用及土壤碱性作用最终会转化为氢氧化铁,因此,无机铁肥在土壤中的效果很差。而有机螯合铁肥则是稳定性很高的含铁化合物,其稳定常数多接近于氢氧化铁的稳定常数,而且有机螯合铁肥多为溶性的,其对植物的有效性很高。而有机螯合铁肥化合物的稳定性愈接近氢氧化铁者,其有效性就愈高。

Junko Ohra 等研究发现,从真菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 中分离出的一种植物毒素具有除草活性,对 7 种不同杂草的杀草谱实验表明, jointvevch 受害最严重、pigweed 和 florida beggarweed 遭受严重的灼伤,并被抑制生长, Johnsongrass 虽未被杀死,但却被严重矮化。毒素提取纯化后经红外线光谱、核磁共振等实验分析发现,该毒素为高铁藏红花素,是一种铁离子载体,其作用机制可能与螯合物的形成有关⁸⁴。

另外,氨基酸是一种比较适合配位体,是铁吸收的原始模式之一。目前,氨基酸已经是一种常用的畜禽饲料的添加剂⁸⁵。

综上所述,铁螯合物是一种重要的生物活性物质,在生命代谢中其中非常重要的调节作用。对铁螯合物的研究有着重要的理论和应用指导意义。

1.7 本论文的研究内容和意义

褐腐菌是降解木材能力极强的一类担子菌,可在木素少量被修饰或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。研究发现此类菌在降解纤维素时有许多独特的地方。它是一种研究天然木质纤维素降解的重要的生物种类,为人们研究新的纤维素降解机制、彻底了解纤维素的微生物降解机制和最终开发纤维素资源提供了新的途径。

虽然关于褐腐菌的研究已有几十年,褐腐菌对木质纤维素的降解尚有大量关键的问题等待去阐明和解释。关于褐腐菌降解木质纤维素的研究大多是以一种菌为模型进行研究的,因此大多数结论的得出也是基于一种菌的研究,未免存在片面性,研究结论是否适用于其他褐腐菌未曾考证。本文对褐腐真菌降解纤维素的特性进行了普遍研究,证明了褐腐真菌在木纤材料上生长时,普遍产生具有 HO $\cdot$ 活性的低分子量的物质。

随着对褐腐菌降解纤维素机理研究的深入,人们不断完善小分子物质参与的辅助降解纤维素机制。本实验室王蔚等的研究提出了一系列 Gt 因子产生的羟自由基辅助参与纤维素降解的理论,完善了褐腐菌独特的降解纤维素机制。王蔚等提出了 Gt 因子的螯合铁组分,在褐腐菌降解纤维素的初期起了富集三价铁离子的作用,继而通过一系列的氧化还原和自由基反应,最终生产羟自由基,后者通过打断纤维素的氢键而为进一步的酶解创造条件。但是, Gt 因子辅助降解纤维素的理论还存在一些问题。羟自由基产生的过程还不清楚,凝胶过滤层析的结果表明,螯合铁活性组分与 Gt 因子活性部分不是完全重合的,更重要的是,能产生羟自由基的物质非常多,而且目前羟自由基常用的简便检测方法的特异性较差。为了更好的研究褐腐菌的氧化降解体系,我们把研究的重点转向了这种螯合铁活性组分。我们对褐腐菌产生的这种铁螯合物进行了生物化学性质分析,并在其对其他微生物的生理的影响方面进行了初步的探讨。

以上研究为研究纤维素的降解机制、开发和利用纤维素资源以及研究开发开发新的微生物活性药物提供了一定的实验依据。

第二章 羟基自由基 $\text{HO}^\cdot$ 的产生是褐腐真菌降解木质纤维素时的普遍性现象

迄今为止, 关于褐腐菌降解木质纤维素的研究大多是以一种菌——密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 为模型进行的, 因此大多数结论的得出也是基于一种菌的研究, 未免存在片面性。近来, 关于褐腐菌胞外低分子量活性物质分离的研究较多, 但此类物质是否广泛产生, $\text{HO}^\cdot$ 氧化降解纤维素的特点是否具有普适性, 还需要多株褐腐菌研究结果的支持⁸⁶。

关于多株褐腐菌降解纤维素特性研究主要有 Highley⁴⁷ 和 Enoki 等人的工作。Highley 通过对多株褐腐菌作用后的纤维素底物进行分析发现, 在纤维素降解初期, 纤维素迅速解聚, 解聚与底物大量失重是两个独立的过程; Enoki 等人则发现多株褐腐菌的粗酶液所具有的单电子氧化活性似乎与底物的降解有关系^{48, 51}。但两人的研究都没有分离纯化工作作基础, 都是胞外粗酶液作用的结果分析。如绪论所述, 以纯化低分子量活性物质为基础的褐腐菌的研究工作是阐明褐腐菌降解纤维素机制的关键, 故本部分工作首先以分离纯化工作作为出发点⁸⁷。

2.1 实验设计

对我室常规的木材降解菌的培养方法及文献报道的培养基配方进行改进, 11 株褐腐菌的培养尽可能模拟其自然生长条件, 不添加任何成分复杂的天然物质如麸皮汁, 故实验中设计以木浆片为唯一碳源, 在无机盐培养基上进行固体发酵。为了避免酶液中的其他组分对研究纤维素降解的影响, 对 11 株褐腐菌的胞外抽提液均进行初步的分离纯化, 然后再对活性组分进行一系列的分析。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株

Gloeophyllum trabeum CFCC 7047

Poria plaeura CFCC 7130

以上两株菌由中国林业科学院林业科研所提供

Gloeophyllum trabeum As 5.98

Laetiporus sulphureus As 5.617

Laetiporus sulphureus As 5.622

Lentinus lepideus As 5.171

Poria cocos As 5.55

Poria cocos As 5.78

Lentinus edodes As 5.708

Lentinus edodes As 5.714

Ganoderma lucidum As 5.65

由中科院微生物菌种保藏中心提供。

2.2.2 培养基及培养方法

无机盐培养基(w/v): 含 0.15%的 KH_2PO_4 ; 0.05%的 MgSO_4 ; 0.05%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01%的 CaCl_2 ; 0.001%的 MnSO_4 ; 0.001%的 FeSO_4 . 60 ml 的无机盐培养基装入 250 ml 的烧杯中, 加 1.5%的琼脂, 5 层纱布覆盖烧杯口, 灭菌. 待培养基凝固后, 在其表面放置无菌的木浆片(1.5×1.5 cm), 接种生长在土豆培养基上的菌丝块, 28℃ 恒温静置培养 28 天。

培养 28 天后, 用醋酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 4.8) 浸泡培养基, 抽提 4 h, 抽提的胞外培养液经 10000 r/min 离心取上清液。

2.2.3 纤维素酶活力及还原糖的测定

还原糖的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法⁸⁸。

滤纸酶活 (FPA): 50 mg 滤纸放入到 1.0 ml 醋酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8) 中, 加入 0.5 ml 酶液, 50℃ 保温 50 分钟, 加入 2 ml DNS 终止反应, 煮沸 10 分钟, 540 nm 下测定还原糖的生成。

外切葡聚糖酶 (CBH): p-对硝基酚-β-纤维二糖苷 (pNPC, 0.5 %) 溶于 1.0 ml 醋酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8) 中, 加入 0.5 ml 酶液, 50℃ 保温 50 分钟, 加入 2 ml DNS 终止反应, 煮沸 10 分钟, 540 nm 下测定还原糖的生成。

内切葡聚糖酶 (CMCase): 羧甲基纤维素钠 (CMC, 0.5 %) 溶于 1.0 ml 醋酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8) 中, 加入 0.5 ml 酶液, 50℃保温 30 分钟, 加入 2 ml DNS 终止反应, 煮沸 10 分钟, 540 nm 下测定还原糖的生成。

β -葡萄糖苷酶: 水杨素 (0.5 %) 溶于 1.0 ml 醋酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8) 中, 加入 0.5 ml 酶液, 50℃保温 50 分钟, 加入 2 ml DNS 终止反应, 煮沸 10 分钟, 540 nm 下测定还原糖的生成。

木聚糖酶: 木聚糖 (0.5 %) 溶于 1.0 ml 醋酸缓冲液 (0.05 M, pH 4.8) 中, 加入 0.5 ml 酶液, 50℃保温 50 分钟, 加入 2 ml DNS 终止反应, 煮沸 10 分钟, 540 nm 下测定还原糖的生成。

在上述酶活力的测定中, 每分钟酶水解产生 1 微摩尔的葡萄糖为一个酶活单位。
纤维二糖脱氢酶 (CDH)⁸⁹: 1 ml 柠檬酸缓冲液 (0.05 M, pH 5.0) 中, 细胞色素 C 25 μ mol/L, 纤维二糖 500 μ mol/L, 加入 0.5 ml 酶液, 550 nm 下测定光吸收的变化。550 nm 下 cyt c 的消光系数为 21 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

木素过氧化物酶 (LiP): 以藜芦醇为底物, 3.0 mL pH 3.5 的 80 mmol/L 酒石酸缓冲液中含 5 mmol/L 藜芦醇, 0.4 mmol/L H_2O_2 , 0.3 mL 酶液, 30℃下检测 310 nm 处的光吸收变化。消光系数 $\epsilon = 95000 \text{ mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$, 以每分钟转化 1 μ mol 底物定义为一个酶活力单位。

锰过氧化物酶 (MnP): 以 2,6-DMP (2,6-dimethoxyphenol) 为底物, 3.0 mL pH 4.5 的 50 mmol/L 醋酸缓冲液中含 1 mmol/L 2,6-DMP, 0.3 mL 酶液, 12.5 μ L 10 mmol/L H_2O_2 , 30℃下检测 470 nm 处的光吸收变化。以每分钟转化 1 μ mol 底物定义为一个酶活力单位。

漆酶 (laccase): 以 2,6-DMP 为底物, 3.0 mL pH 4.5 的 50 mmol/L 醋酸缓冲液中含 1 mmol/L 2,6-DMP 1 mL, 酶液 2 mL, 30℃下检测 470 nm 处的光吸收变化。消光系数 $\epsilon = 49600 \text{ mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$, 以每分钟转化 1 μ mol 底物定义为一个酶活力单位。

2.2.4 褐腐菌胞外培养液的初步分离与纯化

各株褐腐菌的胞外抽提液分别经截留分子量 5 k Da 的膜 (Amicon) 超滤, 滤过液冷冻干燥浓缩约 50 倍后上 Sephadex G-10 柱 ($\phi 1.6 \times 100$ cm) 进行初步分离, 醋酸缓冲液洗脱 (0.05 mol/L, pH 4.5), 流速 9 ml/h.

2.2.5 TBA 法测定 $\text{HO}^\cdot$ 的生成⁹⁰

1 ml 含 2-D-脱氧核糖 (4 mMol/L)、纤维二糖 (0.8 mmol/L)、 FeCl_3 (0.1 mmol/L) 的柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L pH 5.5) 中, 加入一定量的样品, 30℃振荡反应 1h, 加入 1 ml 硫代巴比妥酸 (TBA, 1%, 用 0.05mol/L NaOH 溶液配制) 和 1 ml 三氯乙酸 (2.8%), 100℃加热反应 15 min, 冷却后于 532 nm 测光吸收, 532 nm 下的吸收表明有 $\text{HO}^\cdot$ 的生成.

2.2.6 Fe^{3+} 的还原⁹¹

利用 ferrozine 作为 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 的指示剂, 2 ml 样品溶液与 0.5 ml ferrozine (15 mmol/L) 和 0.5 ml FeCl_3 (1.2 mmol/L) 混合, 测定不同时间后 562 nm 处的吸光度值, 以不含 FeCl_3 的样品作对照. OD_{562} 随时间不断增加表明有 Fe^{3+} 逐渐被还原为 Fe^{2+} .

2.2.7 CMC-Na 粘度实验

将样品溶液与等体积的 4% 的 CMC-Na 溶液混合, 50℃保温一定时间后通过测定溶液流经奥氏粘度计的时间的变化来相对地测定 CMC-Na 溶液粘度的变化和表征其解聚的发生.

2.2.8 铁氰化钾法对纤维素底物还原力的检测⁹²

向 20 mg 棉花纤维素粉中加入 3 ml 蒸馏水, 再加 1 ml 氰化物-碳酸盐溶液 (0.064% 氰化钾与 0.52% 碳酸钠) 和 1 ml 0.05% 铁氰化钾溶液, 沸水浴 15 min, 冷却 5 min, 加入 2 ml 铁铝-磷酸试剂显色, 600nm 下测定光吸收. 含样品棉粉的溶液与对照棉粉的溶液在 600 nm 下吸收的差值可代表样品棉纤维还原末端的增加.

2.3 结果与讨论

2.3.1 褐腐菌胞外培养液的各种酶活力测定

11 株褐腐菌的胞外培养液中各种纤维素酶及半纤维素酶活力如表 2.1 所示.

Table 2.1 Extracellular enzyme activities of 11 strains of brown-rot fungi

Strains	FPA (IU/L)	CBH (IU/L)	CMCase (IU/L)	β -glucosidase (IU/L)	CDH (IU/L)	Xylanase (IU/L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Laccase (U/L)
<i>G.trabeum</i> 7047	47.2	0	96.0	47.8	ND	90.6	ND	ND	ND
<i>G.trabeum</i> As 5.98	39.5	0	78.2	30.8	ND	64.7	ND	ND	ND
<i>P.plauea</i> 7130	36.8	0	93.4	24.7	ND	16.8	ND	ND	ND
<i>L.sulphureus</i> As 5.617	12.8	0	69.5	34.6	ND	43.1	ND	ND	ND
<i>L.sulphureus</i> As 5.622	22.1	0	95.8	10.2	ND	399.2	ND	ND	ND
<i>L.lepideus</i> As 5.171	50.3	0	50.3	27.3	ND	29.7	ND	ND	ND
<i>P.cocos</i> As 5.55	33.1	0	124.2	52.1	ND	179.8	ND	ND	ND
<i>P.cocos</i> As 5.78	12.6	0	104.3	39.6	ND	135.7	ND	ND	ND
<i>L.edodes</i> As 5.708	36.4	0	68.9	8.0	ND	5.6	ND	ND	ND
<i>L.edodes</i> As 5.714	27.8	0	54.6	7.3	ND	4.4	ND	ND	ND
<i>G.lucidum</i> As 5.65	5.4	0	33.2	4.2	ND	3.5	ND	ND	ND

ND Not Detected

由上表可以看出, 11 株褐腐菌均具有内切纤维素酶及 β -葡萄糖苷酶活力, 却不具有外切葡聚糖酶活性; 由表征纤维素降解的综合活力的滤纸酶活的数据可知, 这些褐腐菌却都具有降解纤维素的能力, 培养中发现, 20 多天后木片上长满了菌丝, 木片变得十分松软, 失重可达 50%, 随着培养时间的延长, 木片失重仍继续增加。众所周知, 外切纤维素酶对于水解结晶纤维素是至关重要的, 褐腐菌在不具有外切纤维素酶的情况下, 仍然可完成对纤维素的降解, 必然有其他的组分在褐腐菌降解纤维素中起着重要的作用。

2.3.2 褐腐菌中产生 $\text{HO}^\cdot$ 的普遍性

各株褐腐菌的胞外培养液经截留分子量为 5k Da 的膜 (Amicon) 超滤后, 滤过液中经 TBA 实验测定发现均具有产生 $\text{HO}^\cdot$ 的活性, 推测可能有分子量较小的活性物质存在于 <5k Da 的各菌株的滤过液中, 遂将滤过液浓缩后上 Sephadex G-10 柱进行初步分离, 结果发现可能由于各褐腐菌的胞外培养液所含组分大体相同, <5k Da 的滤过液在 Sephadex G-10 柱上的分离图谱大致相似, 见图 2.1, 且都在第三个洗脱峰 III 中检测到了产生 $\text{HO}^\cdot$ 的活性, TBA 反应是常用的 $\text{HO}^\cdot$ 的测定方法, 2-脱氧-核糖被 $\text{HO}^\cdot$ 氧化生成丙二醛, 丙二醛与 TBA 反应生成的产物在 532 nm 处有特征吸收, 光吸收值与羟基自由基 $\text{HO}^\cdot$ 的量在一定范围内有线形关系, 该反应具有很强的专一性^[9]。各菌株的峰 III 组分产 $\text{HO}^\cdot$ 的活性如表 2.2 所示。

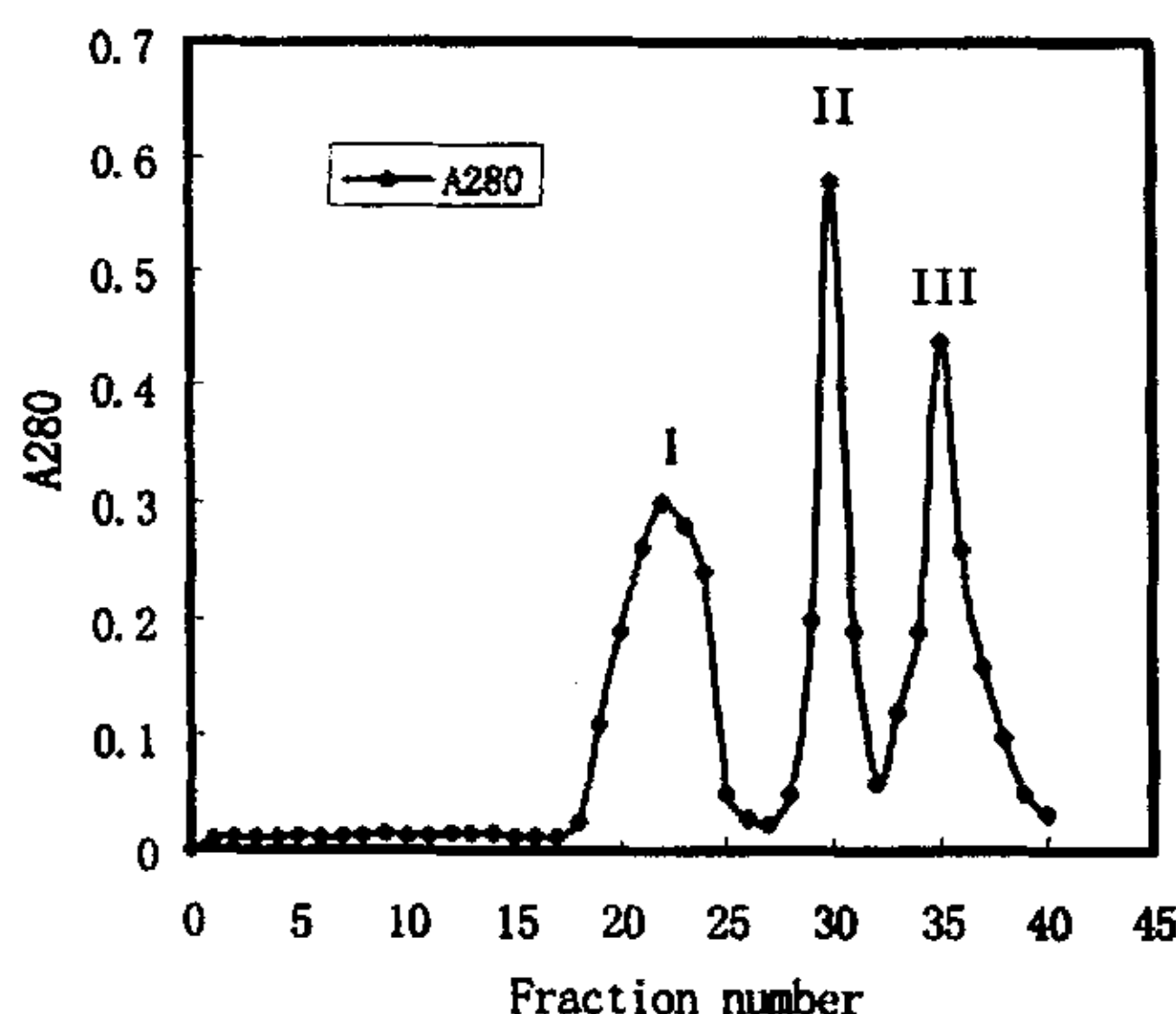


Fig 2.1 Chromatography of extracellular culture (MW < 5k Da) of brown-rot fungi on Sephadex G-10 column eluted with 0.05 mol/L pH 4.5 acetate buffer

Table 2.2 HO[·] production by Fraction III of 11 strains of brown-rot fungi

Strains	TBA activity (OD ₅₃₂)	Strains	TBA activity (OD ₅₃₂)
<i>G.trabeum</i> CFCC 7047	0.580	<i>P.cocos</i> As 5.55	0.312
<i>G.trabeum</i> As 5.98	0.400	<i>P. cocos</i> As 5. 78	0.212
<i>P.plaewra</i> 7130	0.385	<i>L.edodes</i> As 5.708	0.295
<i>L.sulphureus</i> As 5.617	0.134	<i>L.edodes</i> As 5.714	0.240
<i>L.sulphureus</i> As 5.622	0.404	<i>G.lucidum</i> As 5.65	0.177
<i>L.lepideus</i> As 5.171	0.300		

各菌株的峰 III 组分取 1ml 进行测试

由表 2.2 的结果看, 具有 HO[·] 产生活性的低分子量物质广泛存在于褐腐菌的胞外培养液中。褐腐菌不具有外切纤维素酶, 推测此类产 HO[·] 的物质的普遍存在可能具有一定的意义, 故下文对 III 组分进行了研究。

2.3.3 III 组分还原 Fe³⁺ 为 Fe²⁺ 的实验

ferrozine 是 Fe²⁺ 的指示剂, 可与 Fe²⁺ 形成稳定的红色化合物, 在 562 nm 处有特征吸收⁹¹, 此反应非常灵敏, 痕量 Fe²⁺ 即可反应。实验中当反应体系中分别加入 2 ml 各株褐腐菌的 III 组分后, 溶液迅速变为红色, 562 nm 处的吸收值逐渐增高, 如图 2.2, 表明 III 组分能将 Fe³⁺ 逐步还原为 Fe²⁺, 实验中在反应的前 10 min 内吸光值的变化是很快, 可见 III 组分还原 Fe³⁺ 的能力是很强的。Fe²⁺ 是 Fenton's 反应的重要成分, 是 HO[·] 产生的充分条件, HO[·] 循环不断的产生必须要有 Fe³⁺ 不断地被还原为 Fe²⁺。以上结果表明, III 组分普遍具有还原 Fe³⁺ 的能力, 这为 HO[·] 的循环产生提供了条件。

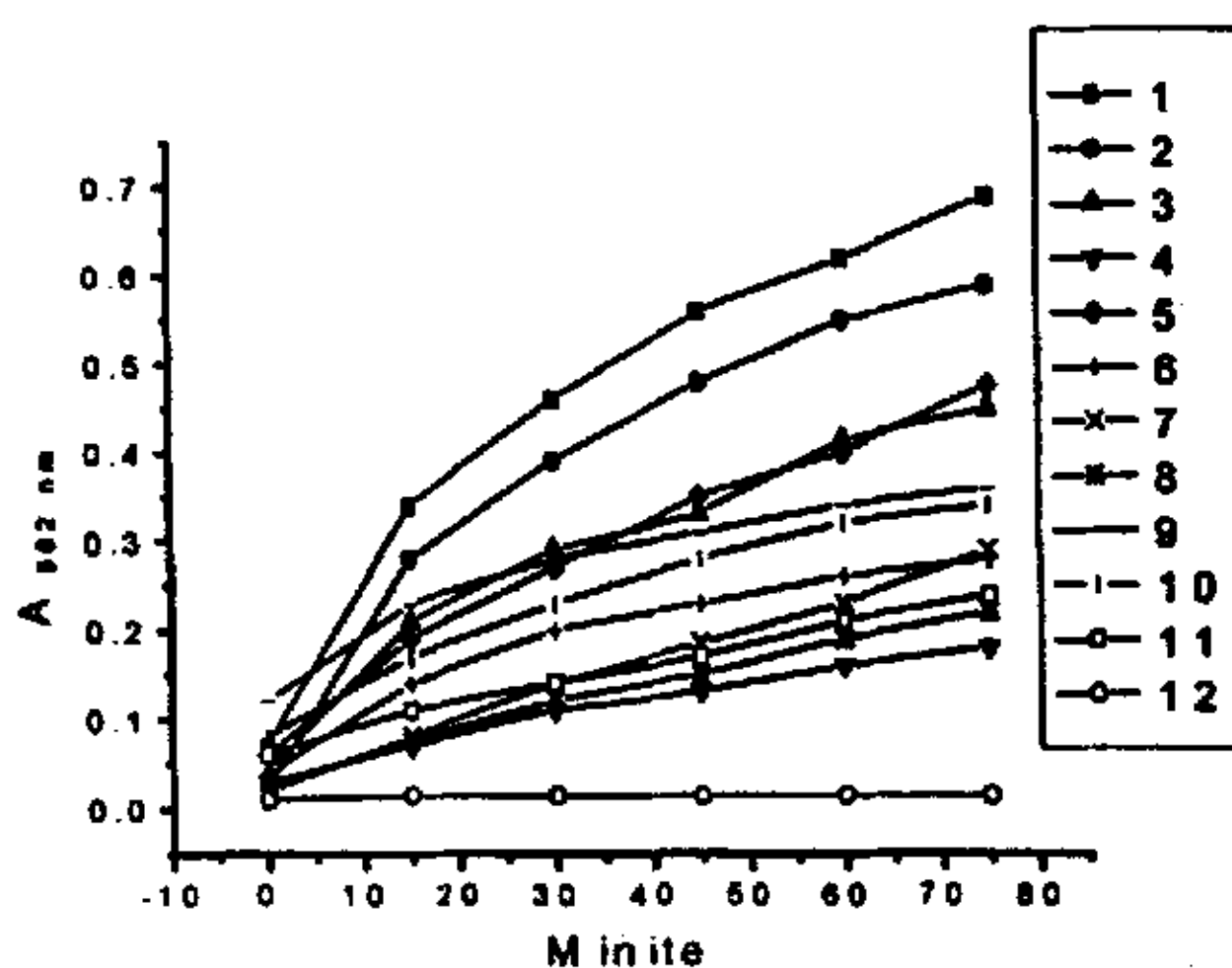


Fig. 2.2 Reduction of Fe³⁺ by Fraction III from 11 strains of brown-rot fungi

图中各数字从小到大分别代表 *G.trabeum* 7047、*G.trabeum* 5.98、*P.plaueura* 7130、*L.sulphureus* 5.617、*L.sulphureus* As 5.622、*L.lepideus*、*P.cocos* 5.55、*P.cocos* 5.78、*L.edodes* 5.708、*L.edodes* As 5.714、*G.lucidum* 5.65、control

2.3.4 III 组分对羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液的粘度影响实验

β -1,4-葡萄糖苷键的随机断裂可造成纤维素底物聚合度的降低,但是由于棉纤维、滤纸等底物的不溶性,纤维素链中糖苷键的断裂很难简便而准确地测定,且只有在高温水解、酸水解或完整的纤维素酶系水解等较强的条件下,才能造成较大幅度的 β -1,4-葡萄糖苷键的断裂,从而才能表现出较为明显的聚合度的变化。所以,可以采用水溶性的羧甲基纤维素 CMC 作为底物,通过测定其粘度的变化来表征纤维素聚合度的变化,CMC 溶液粘度的变化以溶液通过奥氏粘度计的时间的变化来表征。这个方法是十分灵敏的,因为少数几个 β -1,4-葡萄糖苷键的断裂就可造成 CMC 溶液明显的粘度的降低。实验中分别取 1 ml 各菌株的 III 组分与 1 ml 4% 的 CMC 溶液混合,50℃保温 30 min 后测定 CMC 溶液粘度的变化。结果发现各菌株的 III 组分均能使 CMC 溶液流经粘度计的时间降低,如表 2.3 所示,这表明各菌株的 III 组分能普遍降低底物 CMC 的聚合度。但反应体系中未能检测到还原糖的产生,说明 III 组分对 CMC 的作用是不同于内切纤维素酶对 CMC 的水解机制的,这可能与其产生的 $\text{HO}\cdot$ 的强氧化性有关, $\text{HO}\cdot$ 氧化断裂 CMC,造成其溶液粘度的下降。

Table 2.3 Effects of Fraction III on CMC viscosity

	tn* of CMC solution(sec)	Decrease of CMC viscosity (%)
Control**	102	0
<i>G.trabeum</i> 7047	75	26.5
<i>G.trabeum</i> As 5.98	87	14.7
<i>P.plaueura</i> 7130	80	21.6
<i>L.sulphureus</i> As 5.617	90	11.8
<i>L.sulphureus</i> As 5.622	83	18.6
<i>L.lepideus</i> As 5.171	90	11.8
<i>P.cocos</i> As 5.55	76	26.3
<i>P.cocos</i> As 5.78	73	28.4
<i>L.edodes</i> As 5.708	72	29.4
<i>L.edodes</i> As 5.714	81	20.6
<i>G.lucidum</i> As 5.65	93	8.8

* tn: CMC 溶液流经粘度计的时间

** 1 ml 0.05 M, pH 4.5 HAC-NaAC 缓冲液 + 1 ml 4% CMC

2.3.5 各菌株的 III 组分对纤维素底物还原力的影响

取 20 mg 的脱脂棉粉, 分别用 2 ml 各菌株的 III 组分浸泡, 45℃ 作用 5 天后, 取出棉粉烘干、称重, 结果发现经各菌株的 III 组分作用过的脱脂棉粉均未发生失重, 且反应体系中也未检测到还原糖的产生。运用非常灵敏的铁氰化钾法对棉纤维的还原末端进行测定, 发现经各菌株的 III 组分作用 5 天后, 棉纤维的还原力均有不同程度的升高, 如表 2.4 所示测试溶液的 OD₆₀₀ 均有增加; 若反应体系中加入 HO· 特异性的抑制剂硫脲, 则反应溶液的 OD₆₀₀ 值明显下降, 此实验证实是 III 组分产生的 HO· 导致棉纤维还原力的增加。棉纤维还原性的增加可能来自于纤维素链中葡萄糖环上羟基被氧化为醛基以及由此导致的氢键的破坏和糖苷键的断裂⁹³。III 组分产生的 HO· 可能先破坏纤维素链内或链间的氢键, 使其暴露出更多的还原性末端或非还原性末端, 为纤维素酶的进一步降解提供条件。

Table 2.4 Changes of reducing ends of cotton fibre after treated with Fraction III of 11 strains of brown-rot fungi

Strains	OD ₆₀₀	Strains	OD ₆₀₀
Reference	0.303	<i>L.lepideus</i> As 5.171	0.395
<i>G.trabeum</i> CFCC 7047	0.694	<i>P.cocos</i> As 5.55	0.412
<i>G.trabeum</i> As 5.98	0.546	<i>P. cocos</i> As 5. 78	0.362
<i>P.plaueura</i> 7130	0.484	<i>L.edodes</i> As 5.708	0.466
<i>L.sulphureus</i> As 5.617	0.341	<i>L.edodes</i> As 5.714	0.378
<i>L.sulphureus</i> As 5.622	0.446	<i>G.lucidum</i> As 5.65	0.342

2.4 结论

(1) 在以木浆片为唯一碳源进行培养时, 褐腐菌胞外产生 HO· 的低分子量活性物质广泛存在, 且 HO· 的产生与纤维素底物的降解有相关性。已知 CBH 对于水解纤维素的结晶区是至关重要的, 褐腐菌在不具有 CBH 的情况下, 低分子量的产生 HO· 的活性物质广泛存在, 推测有其存在的必要性, 且可能在纤维素的降解中尤其是起始阶段起着重要的作用。

(2) 具有氧化还原性质的 Fraction III 组分是明显不同于已知的纤维素酶组分的物质, 对其进一步的分离纯化将是搞清低分子量活性物质在纤维素降解中作用机制的关键所在。

第三章 密粘褶菌 *Gloeophyllum trabeum* 产生的螯合三价铁活性组分的初步分离纯化摸索及性质的研究

3.1 引言

本文的第二章对褐腐真菌降解纤维素的特性进行了普遍研究,证明了褐腐真菌在木纤材料上生长时,普遍产生具有产 $\text{HO}^\cdot$ 活性的低分子量的物质。

然而,铁元素在褐腐菌的整个纤维素辅助降解体系中起着至关重要的作用,铁螯合物在自然界中存在的比较广泛,并且对生命现象有着重要的作用。Milagres 等还从褐腐菌和白腐菌中检测的明显的儿茶酚类、氧肟酸衍生物和草酸三种铁螯合活性。并认为在过氧化氢存在的条件下,这些螯合物就可能通过 Fenton 反应产生自由基的方式对纤维素和半纤维素进行攻击而降解纤维素而对纤维素物质进行氧化降解⁷³。这提示我们褐腐菌产生铁螯合组分的重要作用。为了更好的研究褐腐菌的氧化降解体系,我们把研究的重点转向了这种螯合铁活性组分。本章对褐腐菌产生的这种铁螯合物进行了一系列分离纯化,获得的初步纯化的铁螯合物,并对其结构及其生物化学性质进行了分析。

由于铁螯合物在结构多样性,螯合物分离纯化的方法也相应的具有。有报道说,首先通过纸电泳的方法对铁螯合物进行初步的分离纯化,研究 pH 对其电荷的影响,再通过离子交换树脂进一步分离⁶⁹。马向东等通过聚酰胺柱层析和有机溶剂沉淀法从嗜水气单胞菌中分离得到了含 2,3-二羟基苯甲酸 (2,3-DHB) 基团的酚盐类铁载体⁹⁴。更多的分离纯化工作是基于凝胶过滤层析和 RP-HPLC 的工作。

本文通过凝胶过滤层析、离子交换层析、金属离子螯合层析、薄层层析、吸附层析、电泳等法对褐腐菌产生的胞外螯合铁物质进行了分离纯化尝试。

3.2 材料与方法

3.2.1 主要材料、试剂与药品

3.2.1.1 超滤

杯式超滤器 $\Phi 62\text{mm}$, 由 Amico Incorporation 公司生产 (Beverly, 美国)。

超滤材料 5,000NMWL 聚醚砜超滤膜(62mm)由 Millipore 公司生产(Bedford, 美国)。

3.2.1.2 层析

(1) 层析系统:

紫外检测仪、记录仪、分步收集器、蠕动泵、梯度洗脱仪等。

(2) 分离介质:

凝胶过滤层析: 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20。离子交换层析: 琼脂糖凝胶 DEAE-Sepharose(fast flow), CM-Sepharose(fast flow)为 Pharmacia 产品 (瑞典)。金属离子螯合色谱: 3-氯-1,2-环氧丙烷, 硼氢化钠上海生物工程中心生产; IDA 为 Sigma 公司的产品。硅胶 G 板: 青岛产。

3.2.1.3 电泳

(1) 电泳设备

垂直电泳系统, 北京六一仪器厂生产。

(2) 试剂

丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺为 Bio-Rad Lab.生产。TEMED 和过硫酸胺由 Bio-Rad 公司生产。SDS-PAGE 变性电泳用标准分子量蛋白, Sigma 公司生产, 内含六种标准蛋白, 分别为

Triosephosphate Isomerase (MW=26,600);

Myoglobin (MW=17,000);

α -Lactalbumin (MW=14,200);

Aprotinin (MW=6,500);

Insulin Chain B (MW=3,496);

Bradykinin (MW=1,060)。

其他化学药品均采用国产分析纯试剂。

3.2.2 菌种、培养基及培养条件

- (1) 菌种: 密粘褶菌 *G. trabeum* CFCC 7047 由中国林业科学院林业科研所提供。
- (2) 无机盐培养基(w/v): 含 0.15%的 KH_2PO_4 ; 0.05%的 MgSO_4 ; 0.05%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01%的 CaCl_2 ; 0.001%的 MnSO_4 ; 0.001%的 FeSO_4 . 60 ml 的无机盐培养基装入 250 ml 的烧杯中, 加 1.5%的琼脂, 5 层纱布覆盖烧杯口, 121℃ 灭菌 30min。
- (3) 培养条件: 待培养基凝固后, 在其表面放置无菌的木浆片(1.5×1.5 cm), 接种生长在土豆培养基上的菌丝块, 28℃ 恒温静置培养 28 天。

3.2.3 实验方法

3.2.3.1 发酵液预处理:

浸提: 固体发酵培养 28 天后, 用醋酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 4.8) 浸泡培养基, 低温抽提 4 h, 用滤纸过滤后, 胞外培养液经 8000 r/min 离心取上清液。

超滤: 采用截留分子量为 5kDa 的聚醚砜超滤膜进行超滤。取透过液。

3.2.3.2 凝胶过滤层析:

将超滤透过液冷冻干燥约 50 倍后上 Sephadex LH-20 柱进行初步分离。凝胶充分溶胀后, 装柱 ($\phi 1.6 \times 100$ cm), 用醋酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 4.5) 充分平衡后上样, 上样量为 3.0ml, 流速为 9 ml/h。检测器灵敏度根据蛋白含量不同, 分别采取 0.2~0.5A, 分步收集器每 20 分钟收集一管, 将获得的组分进行铁螯合物的活性测定。

3.2.3.3 离子交换色谱

将弱阴离子琼脂糖凝胶 DEAE-Sephrose Fast Flow 和弱阳离子琼脂糖凝胶 CM-Sephrose Fast Flow 装柱 ($\phi 1.0 \times 10$ cm), 依据实验要求用不同 pH 的缓冲液 (0.02M) 充分平衡后 (大约平衡 10 个柱体积) 上样。若样品为分子筛收集液, 不经浓缩, 上样量可达 10ml。灵敏度采用 0.2A 或 0.5A。洗脱方法采用 NaCl 梯度洗脱和 pH 梯度洗脱方法。NaCl 盐离子梯度洗脱是在 120 分钟内使 pH 从 0-0.8 mol/L。pH 梯度洗脱是依照离子交换树脂的不同使 pH 从 4.8~2.0、pH 从 8.0~10。

3.2.3.4 金属离子整合色谱

Sephadex G-25 的活化⁹⁵ —3-氯-1,2-环氧丙烷法 200g Sephadex G-25 干胶加入到含有 100ml 2M NaOH, 10ml 3-氯-1,2-环氧丙烷, 375mg 硼氢化钠的溶液中。反应溶液在室温下搅拌两个小时, 并在这一过程中再加入 100ml 2M NaOH 和 50ml 3-氯-1,2-环氧丙烷。此反应允许过夜。

与 IDA 直接交联 2g IDA 溶于 50ml 2M pH 8-12.5 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 溶液。10g 活化的 Sephadex G-25 放入含有 3g IDA 的 20ml 2M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ buffer 中, 调至合适的 pH (8.0)。60-65°C 搅拌 24hr。反应产物分别用 2000 ml 水, 500ml 10%醋酸, 2000 ml 水淋洗。

金属离子的固定 用 0.05mol/L 的 FeCl_3 溶液使胶饱和后装柱(1*10cm), 用蒸馏水和 0.02mol/L pH6.0 的磷酸盐缓冲液充分洗去未结合的离子, 流速为 0.5ml/min。上样 50ml 浓缩样品;

洗脱 使用 pH 梯度洗脱和盐离子梯度洗脱方法。pH 梯度洗脱: 通过混和不同 pH 值的 NaAc-Hac buffer, 使 NaAc-Hac buffer pH 从 6.5~3.5。盐离子梯度: 分别尝试了 pH5.8 和 pH8.9 的 NH_4Ac 盐离子梯度和 NaCl 盐离子梯度洗脱方法。使盐离子浓度从 0~0.5mol/L。

3.2.3.5 聚酰胺吸附层析^{96, 97}

聚酰胺: 80-100 目, 购自爱博生物公司; 层析柱: $\Phi 4.6 \times 100$ cm; 用蒸馏水溶解聚酰胺后, 分别用甲醇、丙酮洗去有机组分, 再用蒸馏水充分洗去有机溶剂后, 用双蒸水平衡, 上样后再用双蒸水洗柱, 直到基线变得平直; 洗脱条件: 乙醇 / 0.2N 醋酸 = 3: 1

3.2.3.6 低分子量 SDS-PAGE 电泳

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 SDS-PAGE)¹⁰⁰。本实验采用垂直板电泳方式。目前用电泳的方法分离低分子量多肽的技术还不是很成熟, 报道的有不连续电泳和不连续电泳两种。不连续电泳是一种经典的三层胶的电泳方法, 操作复杂⁹⁸, 而连续电泳是一种新报道的一种操作简单方法⁹⁹。两种方法报道的分离的最低分子量为 2, 056Da。

(1) Tricine-SDS-PAGE 不连续电泳体系: 凝胶的 pH 为 8.45, 1% (w/v) SDS; 浓缩胶浓度: 4%T, 3% C; 间隙胶浓度: 10% T, 3% C; 分离胶浓度: 16.5% T, 6% C, 其中含有 6mol/L 的尿素; 阳极缓冲液为 pH8.9 0.2mol/L Tris-HCl buffer; 阴极缓冲液为 pH8.25 0.2mol/L Tris-HCl buffer, 含 0.1mol/L 的 Tricine, 0.1% (w/v) SDS。浓缩胶部分采用 30V 恒压电泳, 待样品进入间隔胶后, 调 90V 恒压电泳, 直到溴酚蓝前沿跑至距胶边缘 0.5cm。

(2) 连续电泳体系: 凝胶 pH 为 7.4 0.12mol/L 的 Tris-HCl buffer; 浓度为 17%T, 胶中含有 0.05mol/L 的 Tricine、0.5% (w/v) 甘油、0.1mol/L 的 Ser, Gly, Asn; 上样缓冲液: 60 mM TrisHCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) 甘油, 0.1M 巯基乙醇, and 0.01% (w/v) 溴酚蓝; 电泳缓冲液: 0.025 mol/L Tris-HCl buffer, 0.192 mol/L 甘氨酸, 0.1% (w/v) SDS。90V 恒压电泳直到溴酚蓝前沿跑至距胶边缘 0.5cm。

考马斯亮蓝染色法: 固定液为 45% 甲醇、10% 乙酸; 染色液为 45% 甲醇、10% 乙酸的 1% 考马斯亮蓝 R250 溶液; 脱色液为 10% 乙酸。

银染法详见《蛋白质电泳》¹⁰¹

3.2.4 螯合物物理化学性质的测定

3.2.4.1 蛋白含量的初步测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度¹⁰²。

3.2.4.2 非特异性铁螯合物的分析方法⁵⁰

采用国际上普遍使用的 CAS 法。1.5 ml 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 7.5 ml 2 mM 的无水铬天青 (CAS) 溶液混合, 在搅动下慢慢加入 6 ml 10mM 的十六烷基三甲基溴化铵 (HDTMA), 溶有 4.307 g 无水吡嗪的溶液与上述溶液混合后加入 6.25 ml 12 M 的 HCL 定容至 100 ml。1.5 ml 上述 CAS 溶液与 1.5 ml 样品混合, 测定不同时间后 630 nm 处的吸光值, 吸光值的下降表明样品对 Fe^{3+} 的络合。以不加样品的 CAS 溶液为对照。

3.2.4.3 特异性铁螯合物的分析方法^{103, 104}

3.2.4.3.1 儿茶酚型螯合物

取 1.0 ml 样品, 依次加入 1.0 ml 0.5 mol/L 的盐酸, 1.0 ml 亚硝酸-钼酸试剂 (10g 亚硝酸钠、10g 钼酸钠定容至 100ml), 1.0 ml 1.0 mol/L 氢氧化钠, 1.0 ml 双蒸水, 混匀。儿茶酚同亚硝酸反应呈黄色, 而调 pH10 时呈红色。

3.2.4.3.2 2,3-二羟基苯甲酸 (2,3-DHB) 盐型螯合物

测定样品在 318nm 处的紫外吸收, 二羟基苯甲酸盐型螯合物在 318nm 处有特征吸收。

3.2.4.3.3 氧肟酸型螯合物¹⁰⁵

(1) 各浓度的羟胺标准物、样品和空白对照物水, 1ml 分别加 3 mol/L 的 H_2SO_4 , 密封后于 120 °C 水解 4 小时。

(2) 待冷却后, 将水解液倾入 25 ml 容量瓶中, 分别加入 3.5 ml 2 mol/L NaAc、1 ml 1% (w/v) 的磺胺 (30% (v/v) 乙酸溶液)、1 ml 0.65 % w/v 的碘液 (1 % w/v KI 溶液)、1 ml 0.05 mol/L pH 3.1 邻苯二甲酸氢钾缓冲液 (510 mg 邻苯二甲酸氢钾加 20 ml 水溶解后加 10 ml 0.1 mol/L 盐酸、再加水定容至 50 ml), 混匀后反应五分钟。

(3) 加入 1 ml 1.5 % 亚砷酸钠

(4) 加入 1 ml 0.05 % w/v N- (1-苯) -乙二胺水溶液, 反应 30 分钟后, 稀释到 25 ml, 543 nm 测 O.D 值。

此反应也可用来定性测定氧肟酸型螯合物, 羟胺标准品显紫色。由于此方法的检测限较高, 不适用于微量螯合物的定量测定, 本实验中仅用定性方法测定样品中是否含有氧肟酸型螯合物。

3.2.4.3.4 荧光法鉴定喹啉结构⁷⁵

荧光分光光度仪 Shimadzu RF4500, 1cm 厚的石英四面比色杯。激发光为 260nm, 测 460nm 发射光。喹啉结构衍生物的铁螯合物在 260nm 的激发光的激发下可在 460nm 产生最大发射光。加入铁离子后, 该发射光消失。本实验就是通过荧光法测螯合物是否含有喹啉结构。

3.2.4.4 UV-VIS 光谱

紫外-可见分光光度仪: UV-3100; 两次空白标定后进行连续扫描, 扫描波长为 190 - 800 nm, 狭缝 1 nm。

3.2.4.5 温度和 pH 对螯合作用的影响

将分离得到的铁螯合物分别置于室温、50℃、75℃、90℃、100℃ 3hr，待样品全部冷却后加入 CAS 试剂，迅速测 630nm 吸收值的变化。630nm 吸收值下降的越快表明铁螯合活性越强。

0.5ml 铁螯合物样品和 2.5ml 不同 pH 值的缓冲液混匀后，取 100ul 置于 96 孔板内，加入等体积的 CAS 试剂，观察不同 pH 值颜色的变化。另外，测不同 pH 值的混和液紫外吸收光谱，观察吸收峰的变化。

3.3 实验结果与讨论

3.3.1 凝胶过滤层析及分子量的分子筛层析法测定

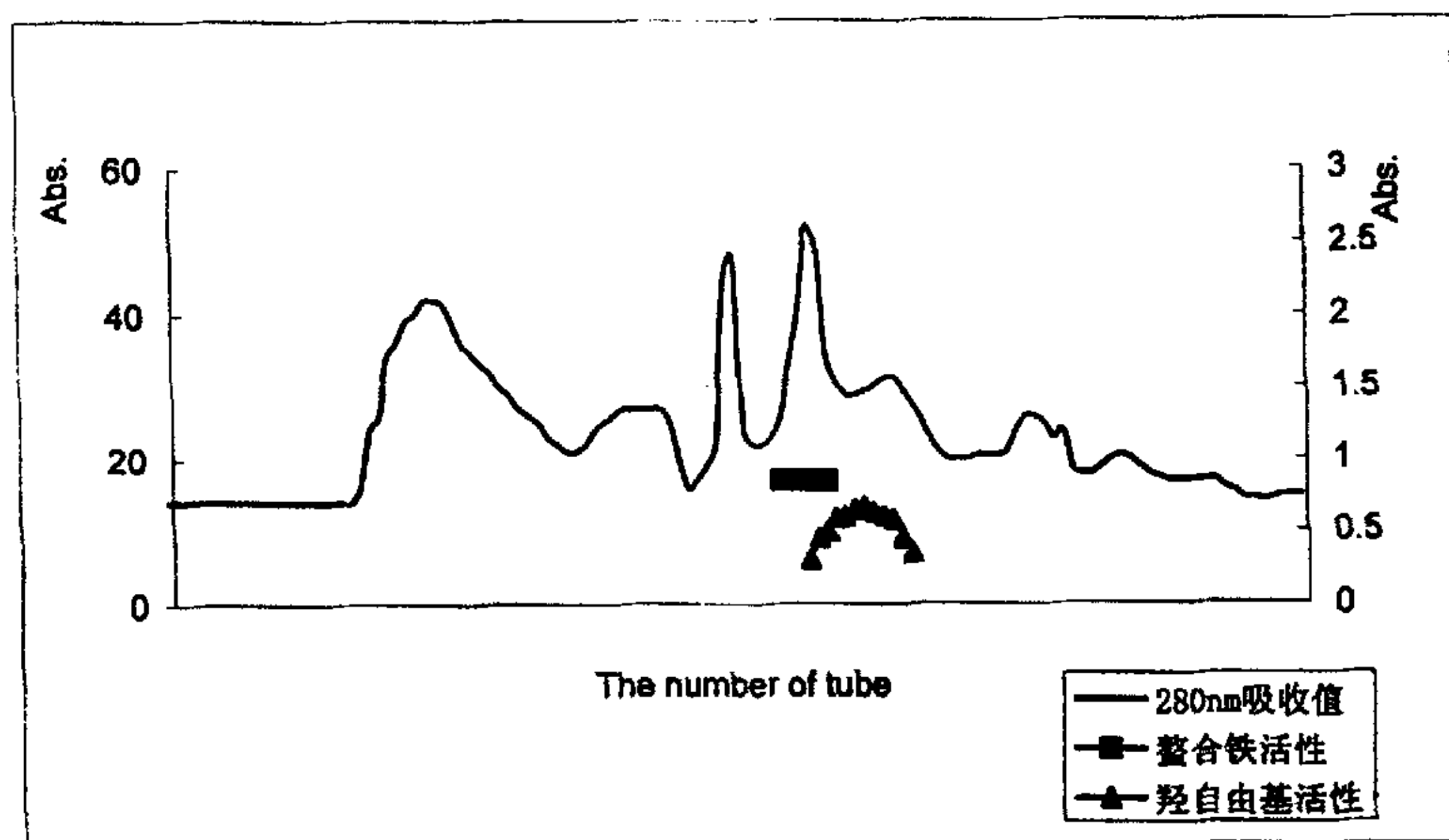


Fig.3.1 Sephadex LH-20 Chromatography

图 3.1 Sephadex LH-20 柱层析

图中，光滑曲线为 280 nm 的层析图，■为有铁螯合活性组分，▲为产羟自由基活性组分。其中，产羟自由基活性的组分被命名为 Gt 因子（又名活性组分 III，见第二章）；由该图可见，螯合铁活性组分和产羟自由基组分是部分重合的，螯合铁组分是产羟自由基组分的一部分。另外，柱层析分子量测定结果表明，铁螯合物的分子量大约在 2000 左右。

3.3.2 其他层析

离子交换层析：盐离子梯度和 pH 梯度洗脱得到了一定的洗脱峰，但是没有检测到活性组分。经过多次重复结果亦是如此。可能该螯合物的带电情况受 pH 影响不大。

金属离子螯合色谱：盐离子梯度和 pH 梯度洗脱经过重复都没有检测到明显的螯合铁活性。可能该物质与铁离子的结合能力较强，盐离子和 pH 梯度洗脱不易洗脱。

聚酰胺吸附柱层析：有洗脱峰出现，但把洗脱峰浓缩后测活性，没有检测到活性洗脱组分。

薄层层析：样品与茚三酮显色颜色比较弱；用有机溶剂（甲醇、丙酮、氯仿、醋酸）展层的时候，跑不出理想的斑点；用不同的溶剂试点时，所得的展圈没有明显的同心圆。另外，我还尝试了用 CAS 作为显色剂也没有得到好的分离效果。

综合以上结果，各种层析方法都没有得到进一步纯化的组分，这可能是跟螯合物分子量比较低、结构性质不明确有关。离子交换层析、金属离子螯合色谱都比较适合分子量比较大的物质，如蛋白质的分离，而该螯合物的分子量远不在这种分离方法的分离范文内。而聚酰胺吸附柱层析和薄层层析是适合酚类铁载体的一种分离方法，而褐腐菌产生的这种铁螯合物的结构不是酚类结构，该方法没有分到活性组分与该铁螯合物的结构有关，为了进一步明确分离方法，本文进行了 3.3.5 的一系列铁螯合物性质测定的生物化学相关实验。

进一步的分离纯化应考虑高效液相法，由于当前仪器条件的限制，本文没有开展相关的工作。

另外，为了更好更准确的确定其分子量，本文对其进行了下面 3.3.3 的 SDS-PAGE 分离分析。

3.3.3 低分子量 SDS-PAGE



Fig.3.2 Low molecular weight SDS-PAGE electrophoresis

图 3.2 低分子量 SDS-PAGE

本文尝试了现有报道的新的和经典的低分子电泳方法以及两种染色方法, 都没有分离到低于两千的分子量 Marker, 而样品也没有明显显带。考马斯亮蓝和银染法的结果一致, 都不能得到 2000 以下的带, 即分子量标准中的 1, 060 带在两种方法中都没有明显显带。我用分子筛层析测得的分子量在 2000 左右, 电泳的方法分离不到, 我认为可能是这种低分子方法本身不成熟的原因: 目前的报道分离的多肽最低分子量在 2500 左右, 而且分辨率不高。不连续电泳基本和连续电泳分辨率相似, 但不连续电泳样品扩散略大。

3.3.4 蛋白含量的测定

考马斯亮蓝法测蛋白含量时, 样品的显色与空白值非常接近, 所以可以认为蛋白含量 < 10 ug/ml (考马斯亮蓝法的最低检出线)。

3.3.5 螯合物类型的测定

铁螯合物结构类型非常多, 儿茶酚型衍生物、氧肟酸型衍生物和二羟基苯甲酸盐型衍生物是三种常见的铁载体类型。迄今为止, 许多新的结构类型的铁螯合

物被发现：肽类、羟基喹啉、有机酸、氨基酸等类型的铁载体都有报道。

3.3.5.1 儿茶酚型螯合物结构测定

Table.3.1 Catechol type iron chelator

表 3.1 儿茶酚型螯合物

儿茶酚型螯合物	加亚硝酸-钼酸试剂	调 pH10 后
Catechol	黄色	红色
Sample	黄色	黄色减弱、微呈蓝色

3.3.5.2 二羟基苯甲酸盐型螯合物结构测定

Table 3.2 2,3-DHB 3.2 type iron chelator

表 3.2 2,3-二羟基苯甲酸盐型螯合物

2,3-二羟基苯甲酸（2,3-DHB）盐型螯合物	318nm 处紫外吸收
2,3-DHB	有
Sample	无

3.3.5.3 氧肟酸型螯合物结构测定

Table 3.3 hyduoxamate type iron chelator

表 3.3 氧肟酸型螯合物

氧肟酸型螯合物	颜色
hyduoxamate	紫色
Sample	无色

从以上三组数据看出，该铁螯合物不是三种典型的结构类型中的一种。

3.3.5.4 荧光法鉴定喹啉结构

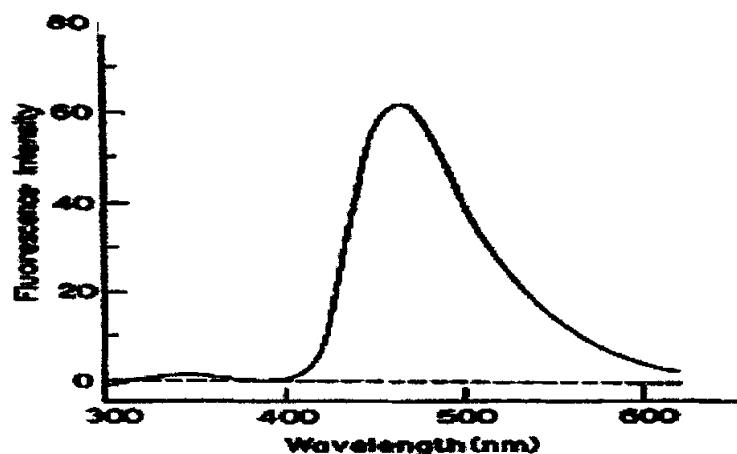


Fig. 3.3 Emission spectra of quinoline

图 3.3 喹啉结构化合物的荧光发射光谱

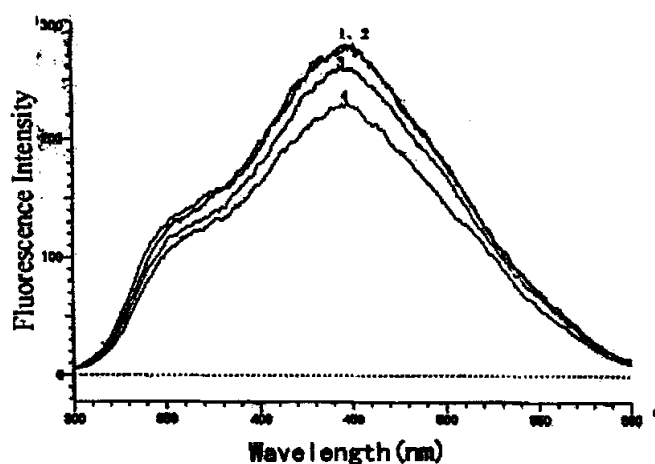


Fig 3.4 Emission spectra of iron chelator in *Gloeophyllum trabeum*.

图 褐腐菌产生的铁螯合物的荧光发射光谱

图中, 1, 2, 3, 4 分别是样品和样品加入 10^{-4} mol/L、 10^{-4} mol/L、 10^{-4} mol/L FeCl_3 后的荧光发射光谱, 含喹啉结构的铁螯合物在加了三价铁离子以后, 其 450 nm 的最大发射峰消失; 该螯合物 450 nm 处的最大发射峰在加入不同浓度的铁离子后仍然存在, 此结果不能说明活性组分中含有喹啉结构。

3.3.6 紫外-可见光谱

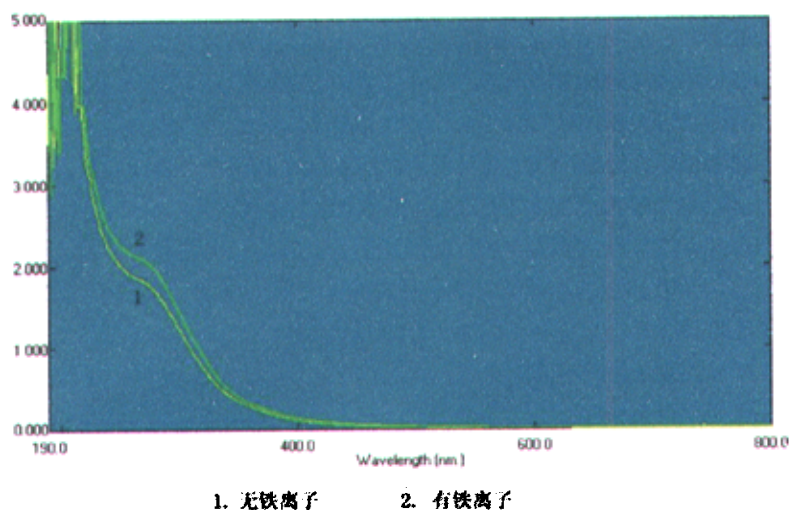


Fig. 3.5 Iron on the UV-VIS spectrum of the iron chelator

图 3.5 , 铁离子对螯合物紫外-可见光谱的影响

由该图可见, 铁螯合物在 270 nm 左右有明显紫外吸收。

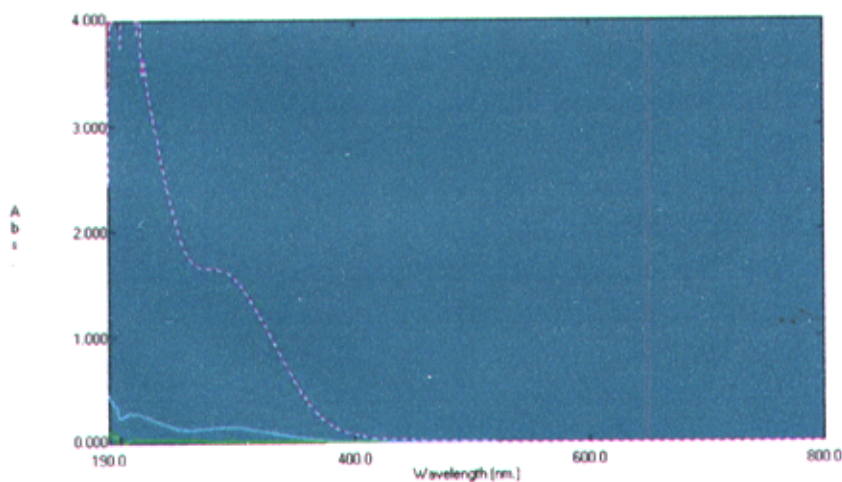


Fig.3.6 Iron in itself on the UV-VIS spectrum

图 铁离子本身对紫外-可见光谱的影响

铁离子的存在使其在 270 nm 的吸收增强, 后来的铁离子空白实验表明, 这是因为高浓度的铁离子造成的。

3.3.7 温度和 pH 对螯合作用的影响

3.3.7.1 温度对螯合作用的影响

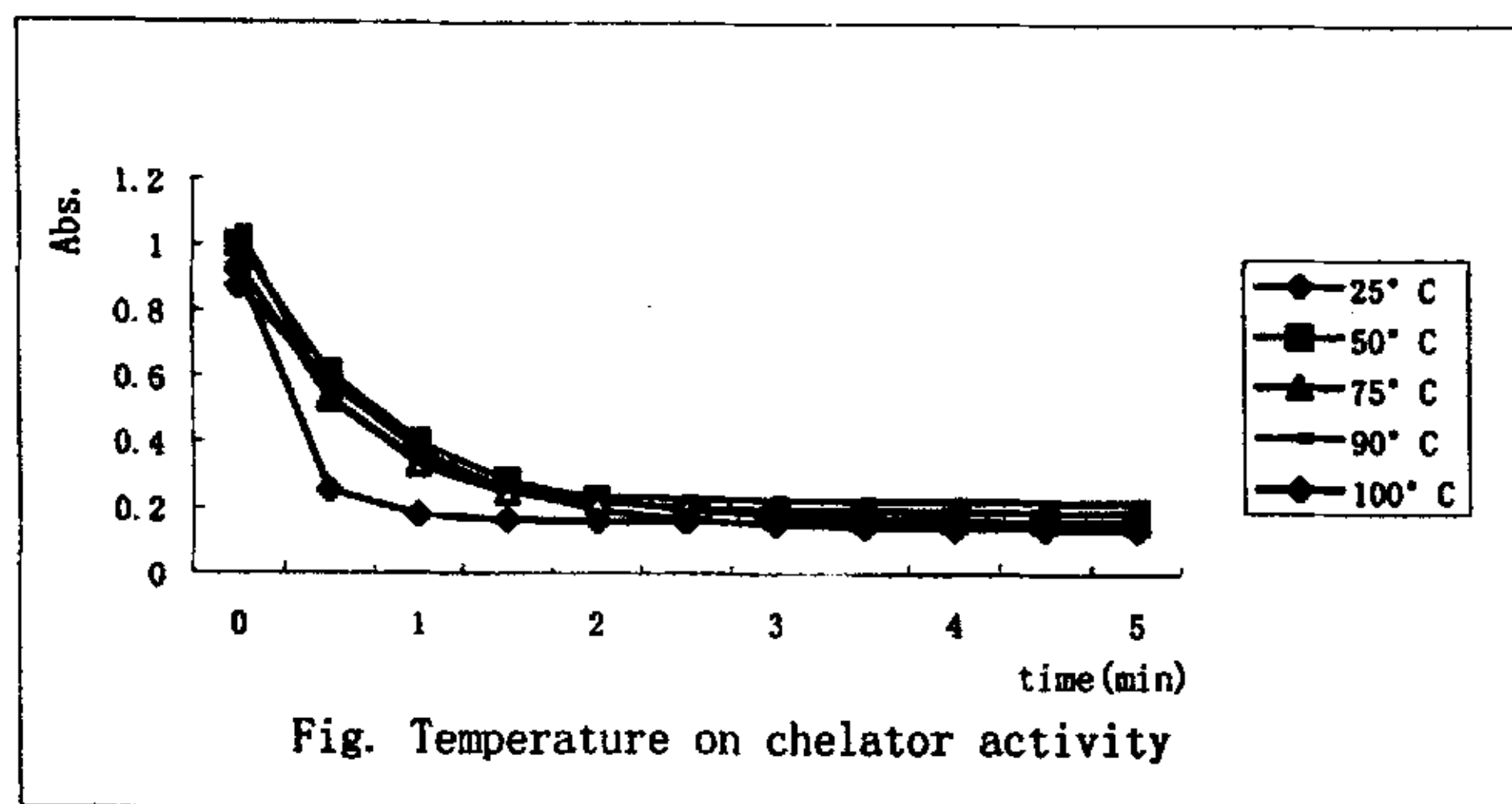


Fig. 3.7 Temperature on the chelate activity

图 3.7 温度对铁螯合物活性的影响

从该图可以看出，曲线的变化率从大到小依次为：100°C、90°C、75°C、50°C、室温。也就是说铁螯合物越是经过高的温度处理，它的螯合铁的能力就越强。

3.3.7.2 pH 对螯合作用的影响

CAS 颜色反应：

Table 3.4 pH on the chelate activity

表 3.4 pH 对螯合物活性的影响

pH 值	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
颜色	--	--	--	--	--	++	+	+	-	X	X	XX

表 3.4 中，--为蓝色，即样品显色为蓝色，和对照颜色一致，没有螯合铁作用；-为红色，即样品显色为红色，对照为蓝色，样品有明显的铁螯合作用；X为绿色，即对照和样品都显色为绿色，不能判断螯合作用的有无。从上表可见，该铁螯合物在 pH5.0~6.5 合作用较强，其中 pH5.0 螯合作用最强。pH 高于 6.5 时，OH⁻的作用干扰螯合作用的测定。pH 在 2.5~4.5 时螯合作用的测定不受 pH 影响。

3.3.8 pH 对 UV-VIS 光谱的影响:

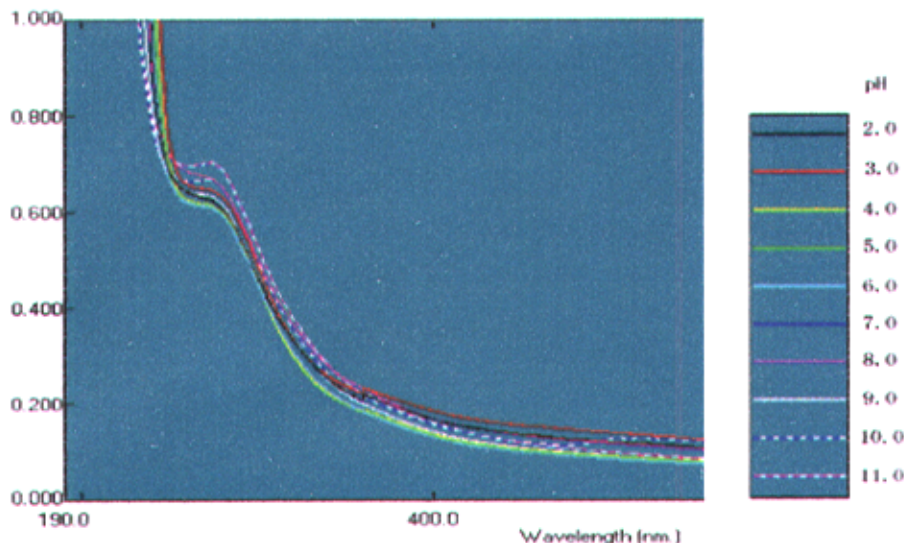


Fig 3.8 pH on the UV-VIS spectrum

图 3.8 pH 对 UV-VIS 影响

可见, pH 不能明显改变螯合物的最大紫外波长。另外, 从图 3.8 可见, 270 nm 螯合物最大紫外吸收值有所变化, 空白实验证明在 270 nm 处螯合物最大紫外吸收值的变化是由缓冲液本身造成的。

3.4 结论

1. 分离纯化工作。

本章通过凝胶过滤层析、离子交换层析、金属离子螯合层析、薄层层析、吸附层析、电泳等法对褐腐菌产生的胞外螯合铁物质进行了分离纯化尝试。通过超滤和凝胶过滤层析得到了粗分离的铁螯合物组分。由于仪器条件和时间的限制, 没有得到进一步纯化的螯合物组分, 更高纯度的铁螯合物有望通过 RP-HPLC 得到分离。另外, 可以考虑有机相的分离方法, 如萃取、有机相层析等⁶⁹。

常规的水相分离方法没有得到进一步纯化的组分, 这是和褐腐菌本身产生的铁螯合物的性质相关的。首先, 它的分子量很低, 低于一般纯化手段的检测和分离范围, 为纯化工作造成了困难。其次, 铁螯合物的结构具有多样性, 褐腐菌产

生的铁螯合物不是常见的三种铁螯合物种类中的一种，尚未确定其基本结构单元，分离纯化条件不成熟，常用的水相纯化方法的应用收到限制。

2. 铁螯合物结构测定。

考马斯亮蓝法测蛋白含量时，浓缩后的螯合组分样品所得的吸收值仍然低于考马斯亮蓝法的检测限，该实验结果不能说明该螯合物结构为多肽类。

该螯合物的结构类型不属于儿茶酚型螯合物、二羟基苯甲酸盐型螯合物、氧肟酸型螯合物、喹啉型铁螯合物。它在 270 nm 有最大紫外吸收，推测其分子可能含有共轭结构，但目前还没有得到该物质的纯组分，进一步确定其结构特征还需要更深入的分离纯化工作做基础。它不但对高温有耐受性，而且温度越高，其螯合活性越强。该铁螯合物在 pH5.0~6.5 合作用较强，其中 pH5.0 螯合作用最强。pH 高于 6.5 时，OH⁻的作用干扰螯合作用的测定。pH 在 2.5~4.5 时螯合作用的测定不受 pH 影响。pH 不能造成该螯合物最大紫外吸收波长的改变。

第四章 螯合铁活性组分的生物学效应

4.1 引言

Fe^{2+} 对细胞凋亡呈双相作用, 缺乏铁可以引起细胞凋亡的发生, 但机体铁含量过多亦会引起细胞凋亡。即铁对于细胞凋亡呈现一种双相调节作用。 Fe^{2+} 所催化的氧化还原反应是机体抗氧化机制的一个中间环节, 通过此环节细胞将某些氧化还原活性物转变为另外一类的氧化还原物, 然后通过其他途径加以转换消除。因此, 当铁催化的环节发生变化时就会导致此环节的底物或产物含量的变化, 可能引起细胞凋亡。不同细胞正常的铁含量不同以及所含的其他转化酶系的不同, 也使铁在不同细胞表现的作用不同。所以, 研究铁螯合物的作用就是了解生物体铁代谢、继而使之造福于人类的很重要的一部分。博莱霉素 A、色霉素、光神霉素、阿霉素等都是很重要的铁螯合物, 在生物体中起着抗病毒、抗肿瘤等重要的作用, 很多已经被应用于临床。但是, 这些螯合物在应用于临床时还存在不同程度的副作用, 螯合物在机体中的作用以及发现新的结构类型的铁螯合物是目前迫切存在的问题。

铁载体是铁螯合物中很重要的一种。它是指细菌或真菌在铁缺乏条件下产生的低分子量的铁的特异性螯合物。大多数好氧和兼性好氧微生物合成至少一种铁载体¹⁰⁸。它是自然界中存在的一类天然的铁螯合物, 有着巨大的应用潜能。目前研究普遍认为, 它是微生物产生的多种致病因子之一^{109~109}。现在, 越来越多的人在微生物中发现新的有用的铁螯合物。所以, 微生物产生的铁螯合物的研究无论在研究领域还是在应用方面都有着重要的意义。Manninen 和 Laine 认为铁载体对病原菌的抑制作用在种的水平上具有选择性, 除了用 CAS 法测定铁载体的分泌量外, 还必须采用生物测定的方法, 才能判断这些铁载体对某种病原菌是否有拮抗作用^{110~111}。本文就是对褐腐真菌产生的铁螯合物的生物学效应进行了初步的尝试, 针对它对微生物生长的影响设计了一系列实验。

由于铁螯合物对细胞代谢起着重要的作用, 本文以第二部分所得的部分纯化的密粘褶菌所产生的铁螯合物作为样品, 以几株典型的细菌和真菌作用实验对象, 通过一系列的微生物学实验, 验证了它对细菌和真菌的影响。本文通过多种

方法,从多个角度观察了螯合物对微生物的生长情况的影响,同时还观察了三价铁离子对微生物生长的效应以及铁离子存在下螯合物对铁离子所产生效应的影响。

4.2 材料与方方法

4.2.1 菌种

生物活性实验中使用的细菌为革蓝氏阳性菌枯草杆菌 *s. bacillus* 和革蓝氏阴性菌大肠杆菌 *E.coli 31343*; 其他细菌还有金黄色葡萄球菌、变形杆菌、恶臭、葱头假单孢菌; 真菌为本实验室保藏的苹果轮纹大茎点菌 *Macrophoma kawatsukai* Hara 和拟康氏木霉 S-38。

4.2.2 培养基

4.2.2.1 细菌培养基 (LB 培养基):

培养基组成(w/v): 牛肉膏 0.5%; 蛋白胨 1%; 氯化钠 0.5%, pH 7.2, 固体培养基加琼脂 2%。半固体培养基加琼脂 0.5%。

4.2.2.2 真菌培养基 (麸皮培养基):

培养基配方(w/v): 取 10% 麸皮于蒸馏水中, 煮沸 30 分钟, 过滤后定容, 加琼脂 2% 后灭菌倒平板。

4.2.3 铁螯合物样品的制备

详见 3.2.3.2。多次凝胶过滤层析得到的铁螯合活性样品经浓缩后, 用该 Sephadex LH-20 柱进行二次层析, 最终得到的浓度较高的螯合活性物质作为样品 (Iron chelator), 进行下面的一系列生物学实验。样品的终浓度大约为 500 ug/ml, 按需要稀释后使用。

4.2.4 活性组分对细菌的作用

4.2.4.1 平板涂布法

斜面挑取一环 *E.coli* 菌体接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 下 160 rpm 摇床培养 12 h, 1% 转接后 37 °C 下 160 rpm 摇床培养 2~3h。取 0.1 ml 菌液加入到 0.9 ml LB 液体培养基中, 并逐级稀释, 从 10^{-1} 到 10^{-6} , 取 10^{-5} 稀释度的细菌进

行实验(预实验证明该浓度比较适合)。取 0.2 ml 各稀释度的 *E.coli* 菌液与 0.2 ml (500 ug/ml)混合, 37 °C 摇床 160 rpm 振荡 3 小时后涂固体 LB 平板。37 °C 倒置培养过夜, 对平板菌落进行计数, 取平均值作图。以无菌醋酸缓冲液作为空白对照, 每组样品设 5 个平行样。

4.2.4.2 牛津杯法

斜面挑取一环 *E.coli* 菌体接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 下 160 rpm 摇床培养 12 h, 1 % 转接后 37 °C 下 160 rpm 摇床培养 2~3h。取 100 μ l 和半固体培养基混匀后倒双层平板, 安放牛津杯, 每皿 4 个, 等间隔排开, 将制备好的不同浓度的螯合物样品过滤除菌后注入牛津杯, 加入量为 0.2 ml。每个牛津杯设一个用 0.02 mol/L 的醋酸缓冲液作为空白的对照样。37 °C 培养 24 h, 观察牛津杯周围是否有明显透明区域。

4.2.5 活性组分对真菌的作用

4.2.5.1 平板孢子涂布法

用无菌蒸馏水制备浓孢子悬液并进行系列稀释, 取 10^{-5} 孢子悬液进行试验。取 0.2 ml 孢子悬液和 0.2 ml 样品 (200 ug/L) 用漩涡混合器混匀。28 °C 保温作用一定时间后, 再用漩涡混合器混匀后, 涂布固体培养基, 28 °C 培养 2~3 天, 观察孢子的生长情况, 对平板上的孢子形成的菌苔进行计数, 取平均值作图。以无菌 0.02 mol/L 的醋酸缓冲液作为空白对照, 每组样品设 5 个平行样。

4.3 结果与讨论

4.3.1 活性组分对细菌的作用

4.3.1.1 平板涂布法

用平板涂布法测得的铁螯合物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌作用结果见图 4.1。

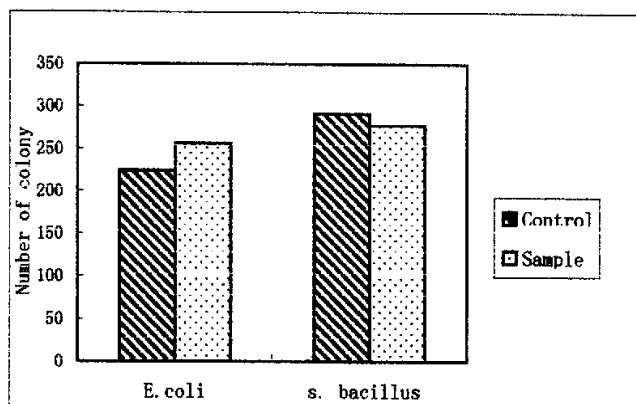


Fig4.1 Iron chelator on bacteria

图 4.1 铁螯合物对细菌的作用

图 4.1 中，斜线柱代表空白（缓冲液处理后）菌落的数量，点状柱代表样品作用后的菌落数。对大肠杆菌而言，从平均的菌落数来看，样品处理过的菌落略多于对照；对枯草芽孢杆菌而言，从平均的菌落数来看，样品处理过的菌落略少于对照。铁螯合物对两株细菌特别没有明显的抑制作用。

4.3.1.2 牛津杯法

下图是铁螯合物对大肠杆菌的作用。其他细菌的作用结果和该图基本一致，本文就以大肠杆菌的照片为例说明铁螯合物对细菌的作用。

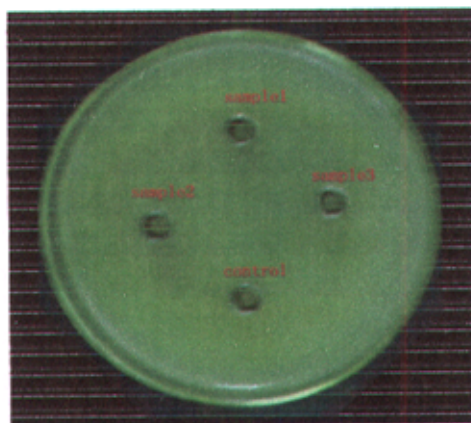


Fig4.2 Iron chelator on E.coli

图 4.2 铁螯合物对大肠杆菌的作用

图 4.2 中, Control 是无菌醋酸缓冲液, Sample1、2、3 分别是 50 ug/ml、100 ug/ml、200 ug/ml 的铁螯合物样品。从图 4.2 可见, 铁螯合物对细菌没有明显的抑制作用。金黄色葡萄球菌、变形杆菌、恶臭、葱头假单孢菌的结果也表明, 褐腐菌产生的铁螯合物对细菌没有明显的抑制作用。

4.3.2 活性组分对真菌的作用

4.3.2.1 固体平板涂布法

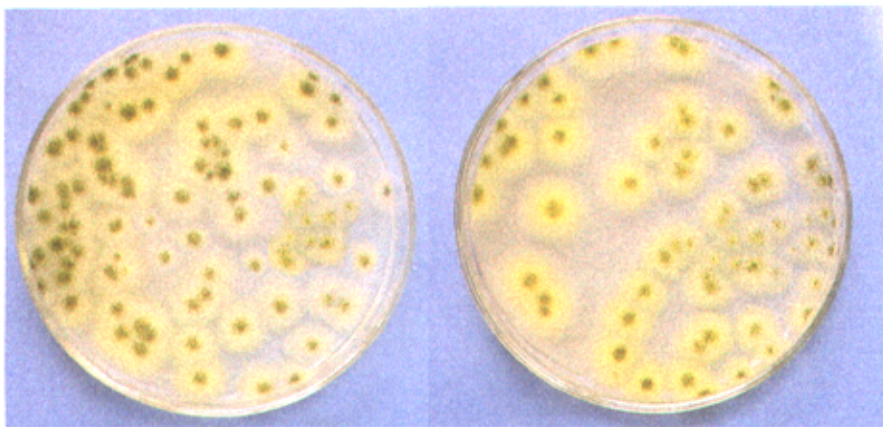


Fig 4.3 Iron chelator on MK

图 4.3 铁螯合物对苹果轮纹真菌的作用

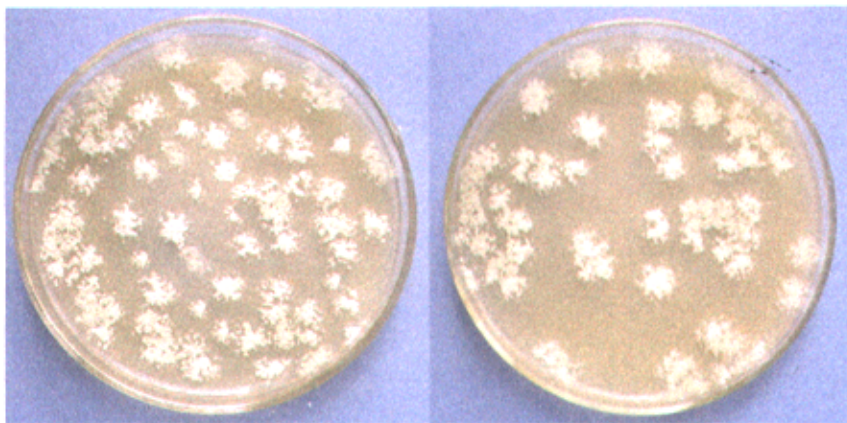


Fig 4.4 Iron chelator on S38

图 4.4 铁螯合物对拟康氏木霉的作用

图 4.3、图 4.4 是铁螯合物作用后的真菌涂固体平板的照片，其中左边的是空白对照，右边是螯合物作用后的真菌生长情况。对其菌苔进行计数，多次结果求平均值后的结果如下图：

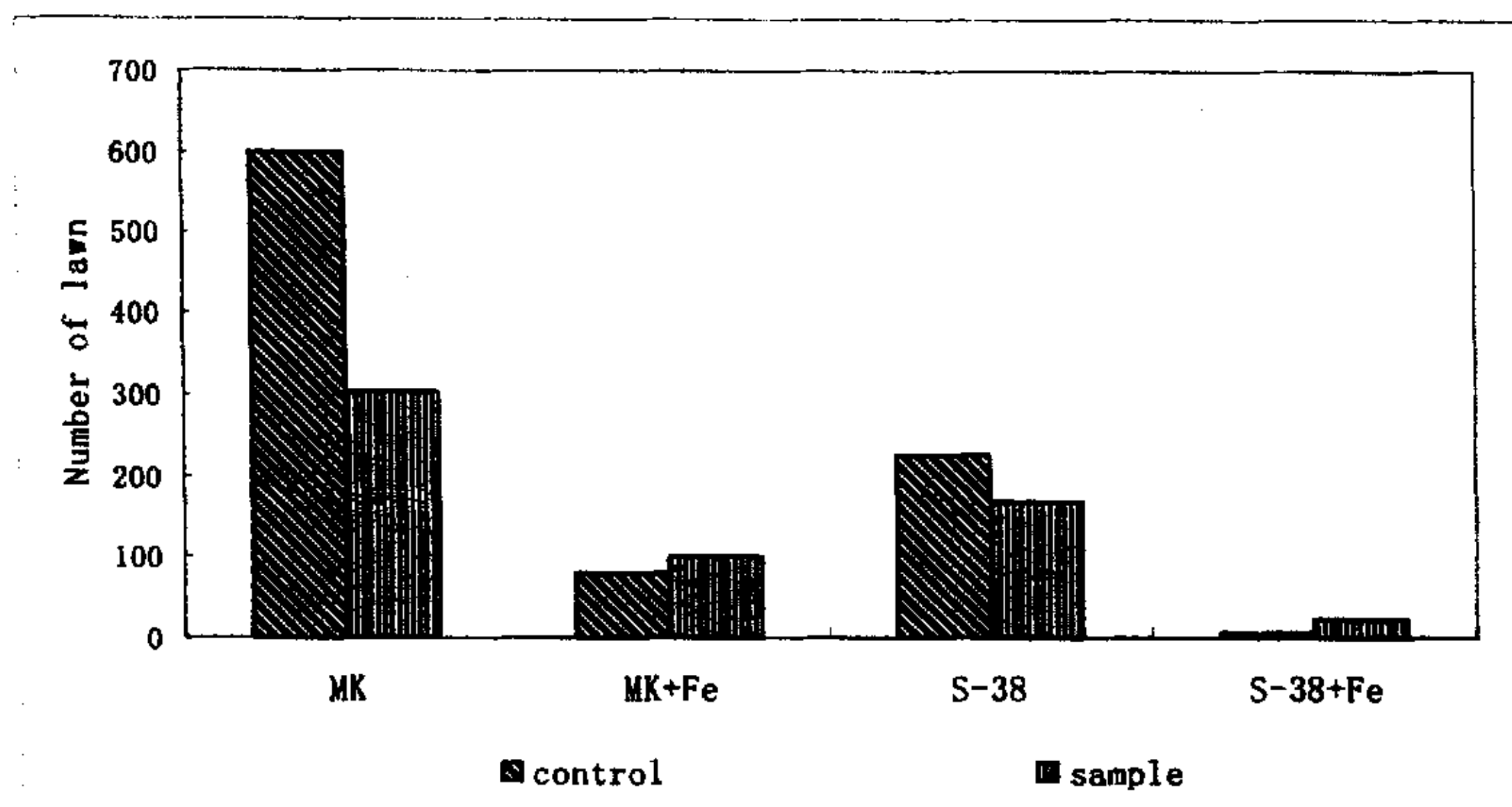


Fig.4.5 Iron chelator on fungi

图 4.5 铁螯合物对真菌的作用

图 4.5 中，斜线柱代表空白（缓冲液处理后）菌落的数量，竖线柱代表样品作用后的菌落数。两种真菌样品处理过的菌落相对对照都有一定程度的减少；从图 4.5 可见，铁螯合物本身对真菌有一定程度的抑制作用，MK 的抑制率比较大，在 40 %左右，对 S-38 的抑制率较低。而且， 10^{-4} mol/L 的铁离子的存在对真菌的生长有明显的抑制作用。由于铁本身对细菌的抑制作用，铁螯合物的抑制作用表现的不明显甚至是没有抑制作用。

4.4 结论

1. 铁螯合物对细菌的作用。

牛津杯法和平板涂布法的结果共同表明，褐腐菌产生的具有辅助降解纤维素功能的铁螯合物对两株代表细菌：革蓝氏阳性的枯草芽孢杆菌和革蓝氏阴性的大肠杆菌没有明显的杀伤作用。牛津杯实验进一步验证了上述结论，并证明了该铁螯合物对其他细菌也没有明显的抑制作用。本文初步证明了褐腐菌产生的铁螯合活性物质对细菌没有明显的抑制作用。

2. 铁螯合物对真菌的作用。

铁螯合物的对两株真菌呈现一定程度的抑制作用。这与 Boopathi 等人的结果有相似处, 他们的结果表明了真菌产生的铁螯合物对部分病原真菌表现出一定的抑制作用⁷⁶。但是, 也有报道说这类铁螯合物质对其他真菌的生长有促进作用, 可见, 真菌的生长是一个很复杂的过程, 测定药物对真菌生物量的影响也是一个多因素控制的过程, 简单生物量的测定不能真正反应药物对真菌的实际作用。另一方面, 药物对于真菌的作用又很可能是一个多因素共同的结果, 所以, 生物量的工作有待于进一步深入的研究。

综合以上结果, 褐腐真菌产生的铁螯合活性物质对细菌没有明显的抑制作用, 对真菌却呈现一定的抑制效应。这在一定程度上验证了 Neilands 对于微生物产生的一类铁螯合物的定义, 即它与微生物对植物或动物的毒性有关⁶⁹。

参 考 文 献

1. 王子珍. 生物能源潜力巨大. 科技文摘报. 1996, 11, 17.
2. 刘家建, 陆怡. 纤维素酶的研究与应用综述. 林产化工, 1995, (1), 6.
3. 曲音波, 开发生物质资源, 实现可持续发展, 国际技术经济研究, 1999, 2 (2).
4. 周亚樵, 植物生物转化发展近况. 纤维素科学与技术, 2000, 8 (3), 59-65.
5. 梁峰, 纤维素科学与技术研究进展. 纤维素科学与技术, 1993, 1 (3), 1-11.
6. 陈家楠, 纤维素科学的现状与发展趋势. 纤维素科学与技术, 1995, 3 (1), 3-5.
7. 王祖农. 当前纤维素微生物研究工作中的几个方面: 微生物学专题报告集. 北京: 科学出版社. 1964, 235.
8. Bisaria V. S. and Ghose T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Micro. Technol. 1981, 3 (2), 90-104.
9. Robson L.M. and Chambliss G.H. Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microb. Technol. 1989, 11, 626-644.
10. Reese E.T and Mandels M. Stability of the cellulases of *Trichoderma Reesei* under use conditions. 1980, 22(2), 323-336.
11. Kubick C.P. The cellulases protein of *T. reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. Adv. Biochem. Eng., 1992, 45, 1-27.
12. Kubieck C. P., Muhlbauer G., Krotz M. et al. Properties of a conidial bound cellulase enzyme system from *T. reesei*. J. Gen. Microbiol., 1988, 134, 1215-1222.
13. Halliwell G. and Vincent R. The action of cellulose and its derivatives of a purified 1,4- β -glucannase from *Trichoderma koningii*. Biochem. J. 1991, 199, 409-417.
14. 曲音波, 高培基, 王祖农. 斜卧青霉纤维素酶系的酶学研究. 微生物学报. 1988, 28(2), 121-130.
15. Reese E.T., Siu R.G.H., Levinson H.S. et al. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bacteriol. 1950, 59, 485-497.
16. Eriksson K.E. Cellulose complex of Ruminicocos and new mechanism for cellulose degradation. In: Hajny, G.J. Reese E.T.(eds) Cellulases and their applications. Adv.Chem. Ser. 95, 58-59.
17. Nisizawa K., Tomita Y., Kanda T. et al. Substrate specificity of C_1 and C_X cellulase components from fungi: In: Fermentation Technology Today. Proc Int Fermentation Symp. 4th. Terui G ed. Society of Fermentation Technology Osaka, Japan, pp719.
18. Tilbeurgh H., Tomme P., Claeysens M. et al. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *T. reesei*. FEMS lett., 1986, 204, 223-227.
19. Tomme D. Tilbeurgh H., Pettersson G. et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Eur. J. Biochem, 1988, 170, 575-587.
20. Ståhlberg J., Johansson G., Pettersson G., Biotechnol. 1991, 9, 286-290.
21. Knowles J., Lehtovaara P., Teeri T. Trends in Biotechnol. 1987, 5, 255-261.
22. 阎伯旭, 孙迎庆, 高培基. 有限酶切拟康氏木霉纤维素分子研究其结构域的结构与功能. 纤维素科学与技术. 1998, 6, 1-9.
23. Yan B. X. and Sun Y.Q. Domain structure and conformation of a cellobiohydrolase from *Trichoderma pseudokoningii* S38. J. Protein. Chem., 1997, 16, 59-66.
24. 汪天虹, 王春卉, 高培基等. 微紫青霉 CBH I 酶的 CBD 蛋白编码区在大肠杆菌中的亚

- 克隆及表达. 微生物学报. 1998, 38, 269-275.
25. Eriksson K. E., Pettersson B. and Westermarck U. Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. FEBS Lett., 1974, 49, 282-285.
26. Westermarck U. and Eriksson K.E. Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. Acta Chem. Scand. 1974, B28, 209-214.
27. Ander P. and Eriksson K.E. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. Physiol Plant, 1977, 41, 239-248.
28. Fang J., Qu Y. B., Gao P. J. Wide distribution of cellobiose-oxidizing enzymes indicates a physiological role in lignocellulosics degradation. Biotechnology Techniques, 1997, 11, 195-197.
29. Kremer K.M. and Wood P.M. Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Eur J. Biochem., 1992, 208, 807-814.
30. Henriksson G., Ander P., Petersson G. et al. Cellobiose dehydrogenase(cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood-degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan, synthetic lignin. Appl. Microbiol. Technol. 1995, 42, 790-796.
31. Mansfield S.D., Jong E.D., Saddler J.N. Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization. Appl. Environ Microbiol. 1997, 63, 3804-3809.
32. Hyde S.M. and Wood P.M. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from hyphae. Microbiology, 1997, 143, 259-266.
33. Fang J., Liu W., Gao P.J. Cellobiose dehydrogenase from *Schizophyllum commune*: purification and study of some catalytic, inactivation, and cellulose-binding properties. Arch Biochem. Biophys 1998, 353, 37-46.
34. Halliwell G. Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. Biochemical Journal. 1965, 95, 35-40.
35. 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. Journal of Biotechnology. 1997, 53, 133-162.
36. Halliwell G. and Riaz M. The formation of short fibres from native cellulose by components of *Trichoderma koningii* cellulase. Biochem. J. 1970, 116, 35-42.
37. Griffin M., Dintzis F.R., Krull L. et al. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Bioeng. 1984, 26, 296-300.
38. Liu J., Shen X.Y., Gao P. J. Study on the generality of short-fibre formation during cellulose degradation by cellulolytic fungi. Biotechnology Letters, 1996, 18, 11.
39. Highley T L. Cellulolytic activity of brown-rot and white-rot fungi on solid media. Holzforchung, 1988, 42, 211-216.
40. Highley T L, Murmanis L. Micromorphology of degradation in western hemlock and sweetgum by the brown-rot fungus *Poria placenta*. Holzforchung, 1985, 39, 73-78.
41. 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.
42. Flournoy D. S, Kirk T K, Highley T L. Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume. Holzforschung, 1991, 45, 383-388.
43. Tepfer M. and Taylor I.E.P. The permeability of plant cell walls as measured by gel filtration chromatography. 1981, 213, 761-763.

44. Kim Y. S, Goodell B., Jellison J.. Immuno-electron microscopic localization of extracellular metabolites in spruce wood decayed by brown-rot fungus *Postia placenta*. *Holzforschung*, 1991, 45, 389-393.
45. Srebotnik E., Messner K. Immunoelectron microscopical study of the porosity of brown-rot degraded wood. *Holzforschung*, 1991, 45, 95-101.
46. Koenigs J. W. Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot Basidiomycetes. *Wood fiber*, 1974, 6, 66-80.
47. Highley T. Degradation of cellulose by *Poria placenta* in the presence of compounds that affect hydrogen peroxide. *Mater. Org.*, 1980, 15, 81-90.
48. Enoki A, Tanaka H, Fuse G. Relationship between degradation of wood and production of H_2O_2 producing one-electron oxidases by brown-rot fungi. *Wood Sci. Technol.*, 1989, 23, 1-12.
49. Chandhoke V., Goodell B., Jellison J., et al. Oxidation of KTBA by iron-binding compounds produced by wood-decaying fungus *Gloeophyllum trabeum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 90, 236-266.
50. Fekete F. A, Chandhoke V., Jellison J. Iron-binding compounds produced by wood-decaying Basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 2720-2722.
51. Enoki A, Hirano T, Tanaka H. Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. *Mater Org.* 1992, 27, 247-261.
52. Jellison J., Chandhoke V., Goodell B & Fekete F. The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35, 805-809.
53. Xu, G. & Goodell, B.. Mechanism of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *Journal of Biotechnology*, 2001, 27, 43.
54. Zohar K, Kenneth A J & Kenneth E H. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *FEBS Lett.* 1999, 446, 49-54.
55. Kenneth A., Jensen J. R., Carl. J. et al. Pathway for extracellular Fenton chemistry in the Brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(6), 2705-2711.
56. Andrzej P., Ronald C., David F. et al. De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(2), 674-679.
57. 王蔚, 高培基, 密粘褶菌胞外低分子量多肽在纤维素降解中作用的研究, *微生物学报* 2002;42(2):220-5.
58. Wang W, Gao P. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. *J Biotechnol.* 2003 Mar 6;101(2):119-30.
59. Wang W, Liu J, Chen G, Zhang Y, Gao P. Function of a low molecular weight peptide from *Trichoderma pseudokoningii* S38 during cellulose biodegradation. *Curr Microbiol.* 2003 May;46(5):371-9.
60. Wang W, Gao P. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO^* -involved oxidative

- degradation of cellulose by brown-rot fungi. *Biodegradation*. 2002;13(6):383-94.
61. Dawson A. B. E. and Morrel J. J. Extraction of proteins from wood wafers colonized by decay fungi. *Holzforschung*, 1992, 46, 117-120.
62. Zhao J., De Koker T. H. and Janse B. G. Comparative studies of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidases produced by selected white-rot fungi in solid media. *FEMS Microbial Lett.*, 1996, 145, 393-399.
63. Datta A., Bettermann A., Kirk T. K. Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Appl. Environ Microbiol.*, 1991, 57, 1453-1460.
64. 吴峰等, 铁-草酸盐络合物的光解对水溶性染料脱色作用的研究, 环境污染和防治, 1998, 20 (1)
65. Y. Zuo et al. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26:1014~1022
66. B.C. Faust et al. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27:2517~2522
67. J. Hougne et al. Photochemical reactions in Atmospheric Waters: Roles of Dissolved Iron Species In Aquatic and Surface Photochemistry (ed. G. Helz et al.), Lewis, 1994, 75~84.
68. 许煜泉等, 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌, 微生物学通报, 1999, 26 (3): 180~184
69. J. B. Neilands, Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(45):26723~26726
70. Adriane M.F. Milagres, Angela Machuca, Diovana Napoleao, Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay, *Journal of Microbiological Methods* 37 (1999) 1-6
71. 王平等, 小麦根围细菌铁载体的检测, 微生物学通报, 1994, 21 (6): 323-327
72. Heather M. Macrellis, et. Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater, *Marine Chemistry* 76 (2001): 175~187
73. Milagres, Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching, *Enzyme and Microbial Technology* 30(2002): 562-565
74. Paulette W. Royt,*, 4-Hydroxy-2-nonylquinoline: A Novel Iron Chelator Isolated from a Bacterial Cell Membrane. *Bioorganic Chemistry* 29, 387~397
75. E. Boopathi, K. Sankara Rao * A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1; structural and biological characterization *Biochimica et Biophysica Acta* 1435 (1999) 30~40
76. Gregory L. Challis a; Jacques Ravel Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase *FEMS Microbiology Letters* 187 (2000) 111~114
77. Gavino Faa, Guido Crisponi, Iron chelating agents in clinical practice, *Coordination Chemistry Reviews*, 1999, 184:291-310
78. Raymond J. Bergcron et. Total Synthesis of Rhizoferrin, An Iron Chelator, *Tetrahedron*, 1997, 53(2):427~434.
79. 周志钦, 植物铁结合蛋白基因研究现状, 生物技术, 2001, 11 (3)
80. 冯丰, 金属元素与细胞凋亡, 国外医学卫生分册, 2000, 27 (4): 235~239
81. Laine M H, Karwoski M T, Raaska L B et al. *Letters in Appl Microbiol*, 1996, 22:214-218
82. Nancy F. Oliviei, Gary M. Brittenham, Iron-Chelating Therapy and Treatment of Thalassemia, *Blood, The Journal of the American Society of*

- Hematology,1997,89(3):739-761
83. Gavino Faa,Guido Crisponi,Iron chelating agents in clinical practice,Coorination Chemistry Reviews,1999,184:291-310
84. Junko Lhra,et al.,1995
85. 周桂莲, 氨基酸螯合铁的研究与应用进展
86. 王蔚, 高培养基褐腐真菌木质纤维素降解机制的研究进展微生物学通报 2002 年 03 期
87. 王蔚 张齐翔 高培养基, 褐腐真菌纤维素降解初期产生羟基自由基的普遍性研究, 菌物系统, 22 (1), 135-141, 2003
88. 赵昕, 王冬, 高培基等. 纤维素微生物及纤维素酶技术 (第三版), 1994.
89. Samejima M. and Eriksson K. E. L. A comparison of the catalytic properties of cellobiose; quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Biochem. 1992, 207,103-107.
90. Halliwell B., Getteridge J. M. C.. Green-wald R A ed, handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton CRC Press, 1985, 177- 180.
91. Gibbs C R, Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. Anal Chem, 1976. 48, 1197~1201.
92. Halliwell G. The action of cellulolytic enzymes from *Myrothecium verrucaria*. Biochem J, 1961, 79, 185~192.
93. 李建武, 萧能庚, 余瑞元等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社. 1994.
94. 马向东、陆承平、陈怀青、凌红丽; 嗜水气单胞菌铁载体的提纯及特性分析, 微生物学报, 2000, 40 (1): 91~94
95. Development of immobilized metal affinity chromatography. Journal of Chromatography, 323 (1985), 247-254
96. Barhgouthi R Y, Olson M O J, Arceneaux L A. J. Bacteriol.,1989,171;1811~1816
97. Robinson A V, Biochem, 1979,95:364~370
98. Schagger H. and Van Jagoe G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 1987, 166, 368-373.
99. Sung-kun yim etc. Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel application for separation of peptides, Anal. Biochem. 305:277-279(2002)
100. 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社. 1999
101. 等蛋白质电泳, 科学出版社, 1999, 108-112
102. 李建武, 萧能庚, 余瑞元等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社. 1994.
103. 陈明杰、卫扬保, 铁 (III) 对趋磁性细菌 WD-1 菌株分泌铁螯合物活性的影响, 武汉大学学报, 1998, 44 (4): 474~476
104. Holzkeg M, Artis William M. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens, Infect Immun, 1983,40 (3):1134~1139
105. Csaky T Z. Acta Chem Scand, 1948,2: 450~454
106. 涂小林、陆承平, 微生物学报,1992,32(6):432~438.
107. 李焕容, 陈怀青, 陆承平, 南京农业大学学报, 1996, 19 (3): 88~94
108. 严亚贤, 陈怀青, 陆承平, 微生物学报, 1996, 36 (2): 144~150
109. 陈怀青, 陆承平, 中华微生物学和免疫性杂志, 1996, 16: 200~202
110. Manninen M, Mattila-Sandholm T J. Microbiol. Methods, 1994,19: 223~234
111. Laine M H, Karwoski M T, Raaska L B et al. Letters in Appl Microbiol, 1996, 22:214~218

致 谢

本文是在我的导师高培基教授和卢雪梅教授的悉心指导下完成的。高老师渊博的学识、严谨的工作态度、执着的敬业精神给我留下了深刻的印象，使我受益匪浅，这将成为我一生的宝贵财富，也是我今后研究工作中努力的方向，永远激励我不断探索进取。感谢我的老师卢雪梅教授，她不但在三年研究过程中给了我极大的帮助、耐心的指导我的每一项工作，而且在生活上给予我殷切的关怀与鼓励，在这里我向她表示诚挚的谢意。

本文在实验和撰写过程中还得到了众多实验室成员的帮助和支持，特别感谢金建玲老师、张为灿老师和赵越老师对我的关心和照顾，同时还要感谢王蔚、段新源，胡明，刘淑艳，杨炜华，孟甄等几位师姐，她们在这三年里给了我莫大的支持和帮助。非常感谢师弟于仁涛和周磊磊，他们在具体实验步骤的落实上给予我很大的协助。吴旺宝、张辉、华国强、辛玮、孙红启、刘波、武斌、姚遥等同学也在本论文的撰写过程中，给予我极大的帮助。与他们共同度过的时光，将成为美好的记忆，让我永远珍藏。

我还要特别感谢我的父亲、母亲、姐姐和姐夫，他们一直不断地帮助、鼓励和支持我。正是他们的支持和理解，使我顺利完成学业。

感谢在读期间所有关心、帮助和支持我的老师和同学们。谢谢！

张 齐 翔

二零零四年四月八日

攻读学位期间发表的学术论文目录

1. 王蔚 张齐翔 高培基, 褐腐真菌纤维素降解初期产生羟基自由基的普遍性研究, 菌物系统, 22 (1), 135-141, 2003
2. X.Y. Duan, S.Y. Liu, W.C. Zhang, Q.X. Zhang, P.J. Gao , Volumetric productivity improvement for endoglucanase of *Trichoderma pseudokoingii* S-38, Journal of Applied Microbiology, Vol 96, 772-776, 2004