纤维二糖脱氢酶对锰过氧化物酶降解木素的促进作用

黄 峰① 方 靖① 卢雪梅① 高培基①* 陈嘉翔②

(①山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; ②华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广州 510641.
* 联系人, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn)

摘要 发现在白腐菌锰过氧化物酶酶解硫酸盐浆酶分离木素(CEL)时加入纤维二糖脱氢酶(CDH)能使木素降解溶出物质明显增加, CDH 能促进锰过氧化物酶(Mnp)的降解作用, 使 CEL 中甲氧基、羧基、酚羟基和总羟基含量减少. ^{1}H NMR 分析表明锰过氧化物酶处理时加入 CDH 能使 CEL 中质子数进一步减少. 实验结果证实 CDH 具有促进 Mnp 对木素降解的作用, 从而表明 CDH 不仅能促进纤维素降解, 而且也是木素生物降解体系中的重要组成部分之一.

关键词 纤维二糖脱氢酶 过氧化物酶 木素降解

木素是生物圈中最丰富的可再生芳香化合物, 其在木质植物细胞壁中占 20%~30%并维持其强度防止生物降解, 近年来木素降解机理研究有了很大进展, 白腐菌是已知的惟一一类可彻底降解木素的微生物, 木素生物降解主要是通过氧化途径, 已知的木素降解酶有木素过氧化物酶(Lip)、锰依赖型过氧化物酶(Mnp)和漆酶(Laccase), 但是, 研究发现这些酶类在体外不能彻底降解木素, 随着研究的深入, 对木素降解的理解由认为是一氧化解聚过程转向认为是氧化和还原转换过程, 在这一过程中有不同的酶参与[1,2], 除上述酶类以外, 纤维二糖脱氢酶(CDH, 原称纤维二糖氧化酶)和纤维二糖: 醌氧化还原酶(CBQ)被认为在木材降解过程中可能起作用[3,4], CDH 是由某些纤维降解真菌产生的血黄素酶, 每个 CDH 分子中含一个血红素 b 和一个黄素腺嘌呤二核苷酸组成两个结构域: 一个结构域含血红素, 另一个结构域含黄素腺嘌呤二核苷酸[5], CBQ 是一种黄素酶, 被认为是由 CDH 经质子迁移产生的[6].

CDH 能氧化纤维二糖和较大的纤维糊精产生内酯, 从而解除纤维二糖对外切纤维素酶的抑制作用. 这种酶具有变化较大的电子受体如细胞色素 C, 2,6-二氯靛粉[7], Fe^{3+}[4], MnO_2[8]和 O_2[9], 此外, 在纤维二糖存在下它也能还原木素相关酚类如阳离子自由基和酚氧自由基[7,10,11], 根据这些特性, 研究者们推测 CDH 在木质纤维素降解中也应具有以下功能: (1) H_2O_2存在下 CDH 还原 Fe^{3+}产生羟自由基促进纤维素降解[12]; (2) 增加 Mn^{3+}复合物促进 Mnp 活性[13]; (3) 防止经氧化酶作用后木素再聚合. CDH-介体还原酚氧自由基和阳离子自由基有利于黄孢原毛平革菌过氧化物酶降解木素[3,4], 但是仍都缺少深入的实验支持.

许多实验室研究用各种木素降解酶类进行硫酸盐浆漂白脱木素, CDH 也曾被设想用于纸浆脱木素. 本文报道裂褶菌(*Schizophyllum commune*)所产 CDH 在黄孢原毛平革菌锰过氧化物酶降解硫酸盐浆木素中的促进作用的系统研究结果.

1 实验条件

(ⅰ) 实验用酶及其产生菌. 选用白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* ME446(ATCC34541)诱变株 LIP14 生产制备过氧化物酶, 酶液组分: Mnp 127 IU/L, 不含 CDH, Lip 和 Laccase; 选用裂褶菌 *Schizophyllum commune* AS5.391 生产制备 CDH[8], 纯化后 CDH 的活力为 11.5 μmol·min^{-1}·mg^{-1}; 拟康氏木霉 *Trichoderma pseudokoningii* S38 纤维素酶按文献[14]方法制备.

(ⅱ) 桉木硫酸盐浆纤维素酶木素(CEL)制备. 用卡伯值 30.8 桉木硫酸盐浆为原料提取纤维素酶木素(CEL), CEL 分离纯化按文献[15]方法, 这一过程中纤维素酶用于除去浆中碳水化合物.

(ⅲ) 过氧化物酶和 CDH 降解 CEL 实验. 称取纯化 CEL(1 g)于 5 mL 乙酸缓冲溶液(4 mmol/L pH 4.8)中, 其中含 *Phanerochaete* 过氧化物酶酶液 0.4 mL, CDH 50 μg, 1 mmol/L H_2O_2 40 μL, 10 mmol/L $MnSO_4$ 20 μL, 1 mmol/L 纤维二糖溶液 200 μL. 置于往复式旋转振荡器(150 r/min), 28℃作用 72 h, 每隔 12 h 补充 1 mmol/L H_2O_2 20 μL, 1 mmol/L 纤维二糖溶液 50 μL, 反应完毕离心(10000×*g*)10 min, 上清液分出留待紫外光谱分析, 沉淀用超纯水洗涤十数次后

于真空冷冻干燥机冻干，于 P_2O_5 真空干燥器贮存. 再称取一份 CEL，加入已灭活 CDH，其余操作相同，作为对照. 冻干样品作进一步分析.

(ⅳ) CEL 样品分析. HPLC 分析 CEL 样品中残糖，示差折光检测器，SC1011 测糖柱(8 mm × 300 mm)，1 mL/min 纯水为流动相.

C, H, N 等元素用 Heraeus CHN-O 型元素分析仪测定，S 用氧瓶燃烧法测定，O 由 C, H, N 和 S 等测量数据计算. GPC 法测定 CEL 样品平均分子量. CEL 样品甲氧基[16]、羧基[17]、酚羟基[18]、羰基[19]等含量按文献方法测定. Nicolet 20SX 型红外光谱仪进行红外光谱分析，分辨率 4 cm^{-1}，扫描次数 32，扫描范围 4000~400 cm^{-1}，KBr 压片. CEL 样品 ^{1}H-NMR 分析选用 Bruker DRX400 型核磁共振波谱仪，溶剂为 $CDCL_3$，乙酰化 CEL 样品 10~20 mg.

2 结果与讨论

2.1 CEL 提取和纯化

酶法提取木素能够最大限度保留木素原有结构形态，实验选用珠磨机对分散于甲苯中的硫酸盐浆进行温和处理，破坏纤维素结晶结构以提高纤维素酶对浆纤维组织的水解作用力，整个处理过程体系温度保持 30℃以下. 用冷冻超速离心机和真空冻干机等提高纯化效率，纯化后 CEL 得率为 66.28%，碳水化合物分析结果显示纯化后 CEL 含糖量为 2.61%，水解后糖组成以木糖为主，元素分析结果显示 N 元素含量 0.52%，表明提取和纯化方法合理.

2.2 氧化还原酶处理前后 CEL 基本结构变化

氧化还原酶处理前后 CEL 基本结构见表 1. 酶处理条件中除酶以外其他物质加入量很少，对木素样品结构不会有影响. 桉木硫酸盐浆木素中甲氧基含量为(15.01 ± 0.09)%，LIP14 酶处理使 CEL 中甲氧基含量有所降低，为(14.72 ± 0.12)%，同时单元分子量、重均分子量($\overline{M}_w$)和数均分子量($\overline{M}_n$)也有下降，但多分散性有增加趋势. LIP14 酶与 CDH 协同处理 CEL，使其甲氧基含量进一步降低为(13.52 ± 0.05)%，同时单元分子量、重均分子量($\overline{M}_w$)、数均分子量($\overline{M}_n$)和多分散性等均呈下降趋势. 这一结果表明 LIP14 酶能够降解 CEL，多分散性稍有增加可能是降解产生的自由基某种程度聚合的反映. 统计学分析显示甲氧基含量变化时两组测定数据差别显著，CDH 能够促进过氧化物酶降解木素脱甲基作用. 由实验数据平均值计算出木素结构单元实验式见表 1，LIP14 酶降解 CEL 时加入 CDH 使木素结构单元分子量进一步下降. 对降解溶出物质进行紫外光谱分析证实 CDH 的加入使 LIP14 酶降解 CEL 的作用提高，氧化还原酶处理后 CEL 降解溶出物有所增加，图 1 为紫外光谱分析结果，CDH 与 LIP14 酶协同作用 CEL 使降解溶出物在 280 nm 附近吸收强度(虚线)远远大于 LIP14 酶单独作用(实线)，从二者差谱曲线可见，增加的木素降解溶出物质在 240, 260 和 280 nm 附近有较强吸收.

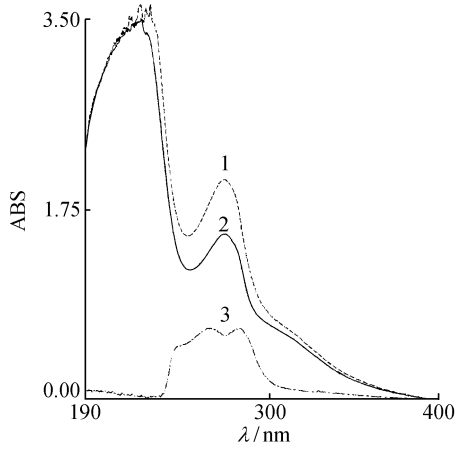


图 1 木素降解溶出物质紫外吸收曲线

1 示 LIP14 + CDH 处理液，2 示 LIP14 处理液，3 示二者差谱曲线

2.3 CEL 样品氧化还原酶处理前后助色基团和发色基团变化

(ⅰ) 羧基含量变化. 从表 2 可见，LIP14 酶处理

表 1 CEL 样品氧化还原酶处理前后基本结构

CEL 样品	OCH_3 / %	t 值	结构单元实验式	单元分子量	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	多分散性 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$
对照	15.01 ± 0.09		$C_9H_{12.49}O_{3.71}(OCH_3)_{1.04}$	212.31	8283	4738	1.748
LIP14	14.72 ± 0.12	$t = 9.67 > t_{(4)0.01}$, $P < 0.01$ $t = 17.14 > t_{(4)0.01}$, $P < 0.01$	$C_9H_{11.03}O_{3.79}(OCH_3)_{1.01}$	211.19	8174	4664	1.753
LIP14+CDH	13.52 ± 0.05		$C_9H_{10.26}O_{3.43}(OCH_3)_{0.92}$	201.86	8105	4643	1.746

使 CEL 中羧基含量由(23.97 ± 0.11)%降为(6.71 ± 0.08)%, 减少 72.0%, 反应中加入 CDH 使 CEL 中羧基含量进一步降为(5.67 ± 0.04)%, 减少 76.3%, 显然, CDH 使 LIP14 酶对 CEL 氧化降解脱羧作用得到加强. 统计学分析显示羧基含量变化时两组测定数据差别显著.

表 2 酶处理前后 CEL 羧基含量变化

CEL 样品	(COOH/CEL) /%	t 值	羧基含量变化/%
对照	23.97 ± 0.11		
LIP14	6.71 ± 0.08	$t = 575.30 > t_{(4)0.01}$, $P < 0.01$	−72.0
LIP14 + CDH	5.67 ± 0.04	$t = 26.00 > t_{(4)0.01}$, $P < 0.01$	−76.3

(ⅱ) 羰基含量变化. CEL 样品羰基含量变化结果见表 3.

工业木素通常含有苯甲醛型羰基、邻醌型羰基和较多的 α 羰基, 从表 3 可见, 桉木硫酸盐浆 CEL 中羰基以酚型 α 羰基为主, 其次是醚化 γ 羰基, LIP14 酶处理使这两类羰基增加, 使酚型 γ 羰基和醚化 α 羰基减少, 尤其是醚化 α 羰基含量下降显著. CDH 与 LIP14 酶协同处理 CEL 使醚化 γ 羰基含量增加 1 倍, 作用显著, 酚型 γ 羰基也有所增加, α 型羰基减少, CDH 的加入使 LIP14 酶对 CEL 的作用位点、降解途径和降解产物结构形成等发生某种变化, 从总羰基计算结果看, LIP14 酶处理使 CEL 中总羰基含量增加, CDH 与 LIP14 酶协同处理则使这一增加趋势明显加强. 统计学分析结果显示数据变化显著. 总羰基含量增加表明酶处理后 CEL 中产生新的生色结构, 这对于硫酸盐浆的漂白具有影响, 我们实验用 CDH 与 LIP14 酶协同漂白桉木硫酸盐浆可使浆卡伯值从 9.9 降为 7.6, 但白度提高不大, 由 56.0%变为 56.6%(ISO), 因此, 不能仅以白度变化评价木素酶类对硫酸盐浆漂白脱木素作用.

(ⅲ) 酚羟基含量变化. 酚型结构在碱性溶液中形成酚氧离子而强化与苯环的共轭体系, 使紫外光吸收峰强度增加并向长波方向移动, 因此利用酚型化合物在碱性溶液和中性或微酸性溶液中紫外光谱变化这一特征, 用离子化差示光谱方法即可对酚羟基进行检测. 表 4 所示酚羟基含量检测结果可见, LIP14 酶处理使 254 nm 对应酚羟基含量变化较小, CDH 与 LIP14 酶协同处理 CEL 使这一波长对应酚羟基含量下降较为明显, 由(2.12 ± 0.01)%降为(1.90 ± 0.02)%; 296 nm 对应酚羟基含量经氧化还原酶处理后有所上升, 这一波段吸收主要由非共轭体系酚氧离子产生, 与酚氧离子共轭的羰基也会产生吸收, 氧化还原酶处理使 CEL 中羰基含量增加, 因此 296 nm 吸收峰强度增加的原因较为复杂. 365 nm 处吸收由共轭体系酚氧离子产生, 对应酚羟基含量较少, 氧化还原酶处理后酚羟基含量变化较小; 254 nm 处吸收由共轭和非共轭体系酚氧离子产生, 对应酚羟基含量较多, 氧化还原酶处理后下降明显, 对这一组数据进行统计学分析结果显示, 数据变化显著.

2.4 CEL 样品氧化还原酶处理前后 FTIR 分析

图 2 为 CEL 样品氧化还原酶处理前后 FTIR 分析结果, 谱带相对强度见表 5. CEL 经过氧化物酶与 CDH 协同处理后 3450 和 3000 cm^{-1} 谱带相对强度下降, 这两谱带与羟基伸展振动有关, 表明 CEL 中羟基含量有所减少. 1731 cm^{-1} 为乙酰基及其他酯键结构吸收谱带, LIP14 酶与 CDH 酶协同处理使 CEL 中此谱带强度进一步减弱, 说明氧化还原酶作用造成木素中乙酰基脱落或使酯键断裂, 羧基含量减少也会减弱 1731 cm^{-1} 谱带强度, 氧化还原酶处理使 CEL

表 3 CDH 酶与 LIP14 酶协同处理后 CEL 中羰基含量变化(个/100 C_9)

	酚型α 羰基	酚型 γ 羰基	醚化α 羰基	醚化 γ 羰基	总羰基	t 值(总羰基)
对照	2.18 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.34 ± 0.02	2.80 ± 0.03	
LIP14	2.31 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.41 ± 0.01	2.84 ± 0.01	$t = 2.00 < t_{(4)0.01}$, $0.01<P<0.05$
LIP14 + CDH	2.14 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.80 ± 0.01	3.19 ± 0.05	$t = 8.75 > t_{(4)0.01}$, $P<0.01$

表 4 CDH 与 LIP14 酶协同处理后 CEL 中酚羟基含量变化

CEL 样品	酚羟基含量/ %			t 值(254 nm)
	254 nm	296 nm	365 nm	
对照	2.12 ± 0.01	2.66 ± 0.02	0.47 ± 0.01	
LIP14	2.11 ± 0.03	2.87 ± 0.01	0.46 ± 0.02	$t = 0.50 < t_{(4)0.01}$, $P > 0.05$
LIP14 + CDH	1.90 ± 0.02	2.81 ± 0.04	0.46 ± 0.01	$t = 21.00 > t_{(4)0.01}$, $P < 0.01$

表 5 CEL 样品氧化还原酶处理前后 FTIR 谱带强度比较

波数/cm^{-1}	谱带相对强度(A_i/A_{1506})			波数/cm^{-1}	谱带相对强度(A_i/A_{1506})		
	对照	LIP14	LIP14 + CDH		对照	LIP14	LIP14 + CDH
3450	0.9800	1.0069	0.8238	1462	1.0307	1.0233	1.0273
3000	0.5625	0.5784	0.4528	1422	0.8750	0.8759	0.8727
2938	0.8767	0.8841	0.7810	1328	0.8077	0.8076	0.8019
2880	0.6091	0.6192	0.4999	1267	1.1336	1.1241	1.1558
2850	0.6346	0.6465	0.5181	1224	1.0745	1.0618	1.0865
1731	0.4644	0.4578	0.4082	1124	1.3883	1.3659	1.4158
1662	0.5320	0.5388	0.4951	1034	1.2264	1.1997	1.2384
1591	0.8204	0.8391	0.8240	922	0.3618	0.3458	0.3309
1506	1.0000	1.0000	1.0000	830	0.5344	0.5347	0.5138

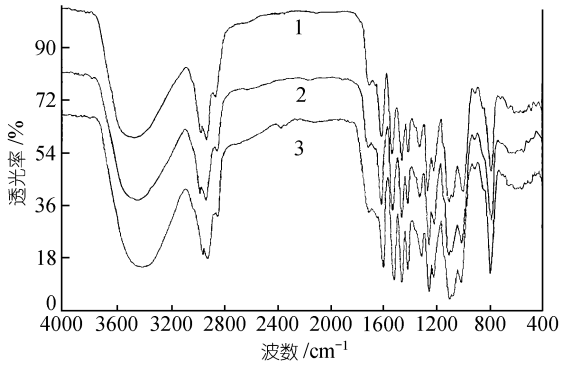


图 2 木素样品红外光谱分析结果

1 示 CEL, 2 示 LIP14 处理 CEL, 3 示 LIP14 + CDH 处理 CEL

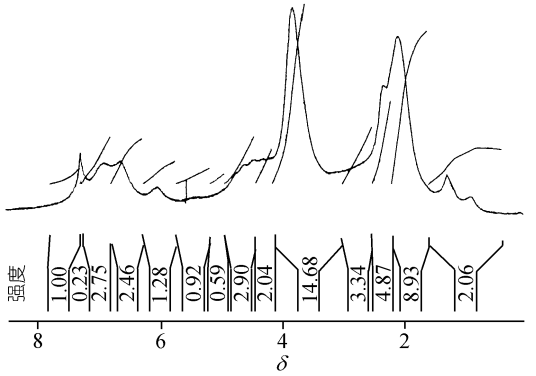


图 3 酶分离木素(CEL)^{1}H NMR 分析

中羧基含量减少与此吻合. 1662 cm^{-1} 谱带为苯环侧链共轭羰基伸展振动吸收, CDH 与 LIP14 酶处理使 CEL 中该谱带吸收强度有所减弱, 表明这一发色结构被部分破坏. 1328, 1224 和 1124 cm^{-1} 谱带均与紫丁香基结构单元有关, LIP14 酶和 LIP14 酶与 CDH 协同处理 CEL 后这些谱带相对吸收强度不变或略有上升, 说明氧化还原酶对硫酸盐浆木素中紫丁香基结构单元的降解作用不大, 这与降解相关物质 GC-MS 分析结果相吻合[20].

2.5 CEL 样品氧化还原酶处理前后 ^{1}H NMR 分析

图 3 和图 4 为 CEL 经锰过氧化物酶及锰过氧化物酶与 CDH 协同处理前后 ^{1}H NMR 分析结果, 按照文献[21, 22] 方法将谱图分为 8 个区域对质子信号归属进行分析, 见表 6.

由表 6 中数据可见, LIP14 酶降解 CEL 过程中加入 CDH, 使 CEL 结构中质子含量减少更加明显, 酶作用下木素结构中质子数的减少是一种氧化现象, 被认为是还原酶类的 CDH 能够促进过氧化物酶对 CEL 的氧化作用, 说明 CDH 的作用不仅仅在于还原

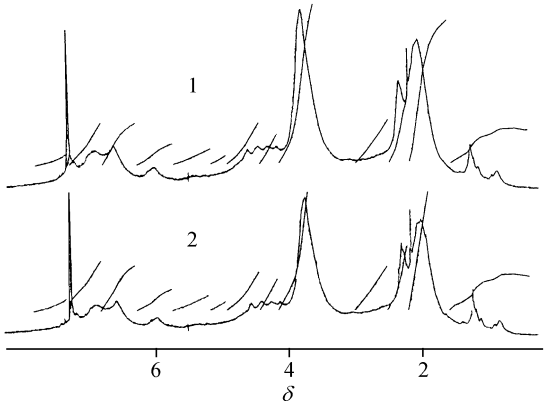


图 4 CEL 经氧化还原酶处理后 ^{1}H NMR 分析

1 示 LIP14 处理 CEL, 2 示 LIP14 + CDH 处理 CEL

由过氧化物酶氧化降解木素和木素降解物产生的自由基成为稳定的中性分子从而防止自由基再聚合, 这一现象值得注意. 由表 6 中数据推算出 CEL 样品中甲氧基和各类羟基含量列于表 7.

不同结构中的质子信号展宽与其他结构中质子信号重叠造成 ^{1}H-NMR 方法测定值偏高[23~25], 从酶处理后 CEL 中甲氧基和各类羟基含量的变化趋势看,

表 6 CEL 酶处理前后 ^{1}H NMR 谱图质子信号归属和质子数

区域	化学位移(δ)	质子类型	质子百分比/%			质子/C_9		
			1[a)]	2[b)]	3[c)]	1[a)]	2[b)]	3[c)]
1	8.00~11.50	羧基和醛基上的质子						
	7.30~7.80	对羟苯基芳核上的质子	2.16	1.84	1.63	0.46	0.35	0.29
2	6.78~7.25	愈创木基芳核上的质子	6.45	6.74	6.75	1.38	1.29	1.20
	6.28~6.78	紫丁香基芳核上的质子	5.71	5.63	6.04	1.22	1.08	1.08
3	5.75~6.28	β-O-4 和β-1 结构中的质子	2.77	2.82	2.90	0.59	0.54	0.52
4	5.19~5.75	β-5 结构中的 H_α	1.99	2.12	2.10	0.43	0.41	0.37
	4.95~5.19	糖类组分中的质子	1.28	1.27	1.19	0.27	0.24	0.21
	4.48~4.95	β-O-4 结构中的 H_β, H_γ	6.27	5.76	5.29	1.34	1.10	0.94
5	4.15~4.48	几种结构中的质子	4.41	4.23	4.24	0.95	0.81	0.76
	3.00~4.15	甲氧基中的质子	31.75	30.08	29.77	6.80	5.76	5.31
	2.52~3.00	几种结构中的质子	7.22	5.85	5.84	1.55	1.12	1.04
6	2.18~2.52	芳乙酰基上的质子	10.53	9.55	8.69	2.26	1.83	1.55
7	1.60~2.18	脂肪族乙酰基上的质子	19.32	19.57	20.98	4.14	3.75	3.74
8	0.38~1.60	脂肪族甲基和亚甲基上质子	4.46	4.53	4.57	0.96	0.87	0.82

a) 对照, b) 过氧化物酶处理, c) 过氧化物酶与 CDH 协同处理

表 7 由 ^{1}H NMR 分析推算出 CEL 样品中甲基和各类羟基含量

功能基/C_9	1[a)]	2[b)]	3[c)]
甲氧基	2.27	1.92	1.77
酚羟基	0.75	0.61	0.52
醇羟基	1.38	1.25	1.25
总羟基	2.13	1.86	1.77

a), b), c) 同表 6 中 a), b), c)

光谱法与波谱法所得结果表现出一致性, 两种分析方法检测结果均表明 CDH 与 LIP14 酶协同作用可以减少 CEL 中甲氧基和各类羟基含量.

由以上 CEL 样品功能基分析结果可见, LIP14 酶处理使桉木硫酸盐浆 CEL 中羧基、酚羟基和总羟基等基团含量减少, CDH 与 LIP14 酶协同处理 CEL 可以使 LIP14 酶的这一作用显著增强. LIP14 是典型木素降解菌株 *P. chrysosporium* ME446 的 Lip 缺陷诱变株, 仅含有 Mnp 活力[26], 实验结果及我们已有研究[20]均表明 Lip 并不是木素降解中所必需的惟一关键酶组分. 天然状态木素羧基含量极少, 白腐菌过氧化物酶类对之作用氧化产生羧基, 硫酸盐浆中残余木素由于高温强碱及一定压力等强烈处理条件使木素分子化学键断裂、酚环氧化开裂等而含有相当量的羧基, 木素生物降解终端被矿化成为 CO_2 和 H_2O, 是木素这一有机物质转变为无机物质的变化过程, 羧基降解脱落形成 CO_2 是木素降解途径之一. CDH 能够促进锰过氧化物酶降解木素作用以及增加木素降解溶出物质, 表明 CDH 不仅能促进纤维素降解, 而且也是木素生物降解体系中重要组成部分.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20077015, 29906005)和教育部全国优秀博士论文作者基金(批准号: 200023)资助项目.

参 考 文 献

1 Ander P, Marzullo L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. J Biotechnol, 1997, 53: 115~131
2 Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J Biotechnol, 1995, 41: 1~17
3 Ander P. The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation——a review. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13: 297~312
4 Eriksson K E L, Habu N, Samejima M. Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductases. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 1002~1008
5 Henriksson G, Pettersson G, Johanson G, et al. Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. Eur J Biochem, 1991, 196: 101~106
6 Wood D, Wood P M. Evidence that cellobiose: quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase. Biochim Biophys Acta, 1992, 1119: 90~96
7 Samejima M, 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
8 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
9 Wilson M T, Hogg N, Jones D. Reaction of reduced cellobiose oxidase with oxygen. Biochem J, 1990, 270: 265~267
10 Roy B P, Archibald F S. Effects of kraft pulp and lignin on

Trametes versicolor carbon metabolism. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1855~1863

11 Roy B P, Dumonceaux T, Koukoulas A A, et al. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 4417~4427

12 Kremer S M, Wood P M. Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Eur J Biochem, 1992, 208: 807~814

13 Archibald F S, Bourbonnais R, Jurasek L, et al. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. J Biotechnol, 1997, 53: 215~236

14 Ma D B, Gao P J, Wang Z N. Preliminary studies on the mechanism of cellulase formation by *Trichoderma pseudokoningii* S38. Enzyme Microb Technol, 1990, 12: 631~635

15 Jiang J E, Chang H M, Bhattacharjee S S, et al. Characterization of residual lignins isolated from unbleached and semi-bleached softwood kraft pulps. J Wood Chem Technol, 1987, 7: 81~96

16 Chen C L. Determination of methoxyl groups. In: Lin S Y, Dence C W, eds. Methods in Lignin Chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 465~472

17 Pobiner H. Improved inflection points in the non-aqueous potentiometric titration of acid functionalities in lignin chemicals by using internal standardization and ion exchange. Anal Chim Acta, 1983, 155: 57~65

18 Goldschmid O. Determination of phenolic hydroxyl content of lignin preparations by ultraviolet spectrophotometry. Anal Chem, 1954, 26: 1421~1423

19 Adler E, Marton J. Zur kenntnis der carbonyl-gruppen in lignin. Ⅰ. Acta Chem Scand, 1959, 13: 75~96

20 黄峰, 高培基, 陈嘉翔. 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

21 Lundguist K. NMR studies of lignins. 2. Interpretation of the ^{1}H-NMR spectrum of acetylated birch lignin. Acta Chem Scand, 1979, B33: 27~30

22 Chen C L, Robert D. Characterization of lignin by ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. Methods Enzymol, 1988, 161: 137~174

23 Faix O, Grünwald C, Beinhoff O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignins (MWL's) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, ^{1}H-NMR, and UV spectroscopy. Holzforschung, 1992, 46: 425~432

24 Faix O, Argyropoulos D S, Robert D, et al. Determination of hydroxyl groups in lignins evaluation of ^{1}H-, ^{13}C-, ^{31}P-NMR, FTIR and wet chemical methods. Holzforschung, 1994, 48: 387~394

25 Vazquez G, Antorrena G, González J, et al. FTIR, ^{1}H-and ^{13}C-NMR characterization of acetosolv-solubilized pine and eucalyptus lignins. Holzforschung, 1997, 51: 158~166

26 卢学梅, 李越中, 王蔚, 等. 黄胞原毛平革菌木素过氧化物酶类在天然木素降解中作用的研究. 菌物系统, 1998, 17(2): 179~184

(2001-03-20 收稿, 2001-06-28 收修改稿)