

# 黄孢原毛平革菌选择性合成木质素过氧化物酶 和锰过氧化物酶

李华钟, 章燕芳, 华兆哲, 陈坚

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 在黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的限氮浸没式培养中, 研究了不同条件对选择性合成木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)的作用. LiP 只在很窄的氮源浓度范围内(0.8~1.8 mmol/L)才能测到, 而 MnP 在较宽浓度范围内(0.4~1.8 mmol/L)表现出较高的酶活水平. 培养基中缺乏  $Mn^{2+}$ 不能合成 MnP, 但可以得到活力较高的 LiP.  $[Mn^{2+}]$ 在 0.06~0.84 mmol/L 时可获得 LiP. 添加微量  $Mn^{2+}$ 即可获得较高活力的 MnP, 此后增加  $Mn^{2+}$ 对 MnP 的活力影响不大, 直至浓度为 3.36 mmol/L 才表现出明显的抑制作用. 通纯氧可使 LiP 活力提高 50%, 但对 MnP 影响不大.

**关键词:** 黄孢原毛平革菌; 木质素过氧化物酶; 锰过氧化物酶; 选择性合成

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2002)02-0137-05

## 1 前言

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是一类腐生真菌, 该菌在一些主要营养物(如氮、碳、硫)受到限制时形成的木质素降解酶系对各种异生物质具有独特的降解能力<sup>[1,2]</sup>. 20世纪80年代以来的研究表明, 该菌对底物的氧化具有高度非特异性的特点, 可以降解多种有机物, 包括天然高聚物、还原性化合物、氧化性化合物、有毒化合物等.

黄孢原毛平革菌合成的木质素降解酶系中起主要作用的有两种酶: 木质素过氧化物酶(Lignin Peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Manganese Peroxidase, MnP). 它们合成后被分泌到胞外, 经  $H_2O_2$  启动一系列自由基链反应, 依靠氧化还原反应降解各种结构各异的有机物. 虽然整个酶系对底物的氧化是高度非特异性的, 但 LiP 和 MnP 对不同结构底物的降解能力存在差异<sup>[3,4]</sup>, 一般地, LiP 主要催化降解非酚类底物, 而 MnP 主要催化降解酚类、胺类等底物.

本研究对培养基中氮源浓度、 $Mn^{2+}$ 浓度和氧的供应等影响产酶的关键条件进行研究, 以期确定选择性合成 LiP 和 MnP 的条件.

## 2 材料与方法

### 2.1 菌种及培养条件

菌种: 黄孢原毛平革菌 WX213, 由江南大学生物工程学院微生物实验室提供.

基本培养基(g/L)<sup>[5]</sup>: 葡萄糖 10, 酒石酸铵 0.2, 苯甲醇 0.54,  $MgSO_4$  0.71, 吐温 80 1.0,  $KH_2PO_4$  2.56,  $VB_1$  0.001, 邻苯二甲酸缓冲液 10 mmol/L, 微量元素液 70 ml, pH 调节为 4.5.

微量元素液(g/L): 氨基乙酸 0.6,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.5,  $NaCl$  1,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  0.22,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  1.56,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1,  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  0.01,  $HBO_3$  0.01,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.01.

培养条件：250 ml 三角瓶装液 90 ml，接种孢子  $1 \times 10^6$  个/ml，培养温度 37°C，转速 150 r/min，培养时间 6 d。间歇通氧培养时，培养 3 d 后以 1 L/min 通纯氧一定时间，然后用硅胶塞封口，以后每隔 24 h 通一次纯氧。

## 2.2 分析方法

LiP 活力测定<sup>[5]</sup>：1 ml 反应液中含 0.2 ml 藜芦醇溶液(10 mmol/L)、0.4 ml 酒石酸缓冲液(250 mmol/L, pH 3.0)、0.4 ml 培养液或稀释液、20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(20 mmol/L)，于 30°C 反应 2 min，测 310 nm 波长下的吸光度( $\xi$ )变化。一个酶活力单位(U)定义为每分钟氧化藜芦醇产生 1  $\mu$ mol 藜芦醛所需的酶量。 $\xi_{310}=9300$  L/(mol·cm)。

MnP 活力的测定<sup>[6]</sup>：试剂 A(mmol/L)：琥珀酸钠 60，乳酸钠 60，酚红 0.12，MnSO<sub>4</sub> 0.12，明胶 3.6 mg/ml，pH 4.5；试剂 B：6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液。3 ml 反应液中含 2.5 ml 试剂 A、0.5 ml 发酵液或稀释液、50  $\mu$ l 试剂 B，于 30°C 反应 2 min 后加入 5 mol/L 的 NaOH 100  $\mu$ l。终止反应，测 610 nm 波长下的吸光度变化。一个酶活单位(U)定义为每分钟氧化酚红产生 1  $\mu$ mol 产物所需的酶量。 $\xi_{610}=4460$  L/(mol·cm)。

菌体干重的测定：中速定性滤纸过滤发酵液，用纯水洗涤菌体 3 次，在 80°C 烘干 3 h，称重。  
还原糖测定：3, 5-二硝基水杨酸法。

## 3 结果与讨论

### 3.1 氮源的影响

#### 3.1.1 氮源的选择

实验证明，所用菌种在限碳条件下不能合成木质素降解酶系，故采用限氮培养方式。在限氮培养中，氮源是控制产酶的关键因素。考察了不同氮源对产酶的影响，结果见表 1。由表可见，以酒石酸铵为氮源时，对 LiP 和 MnP 的合成较为有利，因此选择酒石酸铵为氮源作进一步的研究。

表 1 不同氮源对合成 LiP 和 MnP 的影响

Table 1 Effect of different nitrogen sources on the synthesis of LiP and MnP

Nitrogen source (mmol/L)	Ammonium tartrate 1.2	Ammonium sulfate 1.2	Ammonium chloride 2.4	Ammonium nitrate 2.4	Urea 1.2	L-Glu 2.4	Peptone 220 (mg/L)
LiP (U/L)	368	231	306	0	0	0	0
MnP (U/L)	402	300	281	355	0	0	0

#### 3.1.2 氮源浓度对合成 LiP 和 MnP 的影响

保持其它条件不变，考察酒石酸铵浓度对产酶的影响，结果见图 1。从图可见，MnP 产酶范围比 LiP 宽。在酒石酸铵浓度为 0.4~2.0 mmol/L 的范围内 MnP 都能被合成，而 LiP 只有在 0.8~1.8 mmol/L 的范围内才能被合成。在整个实验范围内，氮源浓度的变化对 MnP 的影响不大，MnP 的活力基本保持在 400 U/L 左右，而对 LiP 的影响显著，酒石酸铵浓度在 1.2 mmol/L 时，LiP 的活力达到最大。氮源浓度对菌体生长的影响见图 2。从图看出，随着氮源浓度的上升，葡萄糖消耗量增多，菌体生长量增加，直至酒石酸铵浓度达到 1.4 mmol/L 后菌体生长量有所下降。

在限氮的培养条件下，黄孢原毛平革菌的木质素降解酶系的合成是由氮源的缺乏而启动的，当酒石酸铵浓度大于 1.8 mmol/L 时，即已达不到限氮的要求，故不能合成 LiP 和 MnP。而由氮源缺乏引起的菌体生长量少也会对酶系的合成造成不利影响，且对 LiP 的影响比对 MnP 的影响大。

菌球形态是影响产酶的重要因素，限氮培养条件下氮源浓度对菌球形态有很大影响(见表 2)。

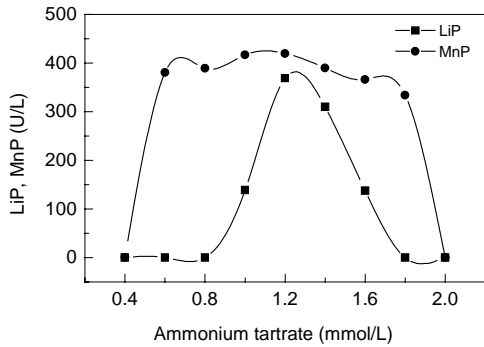


图 1 氮源浓度对合成 LiP 和 MnP 的影响  
Fig.1 Effect of the nitrogen concentration on LiP and MnP

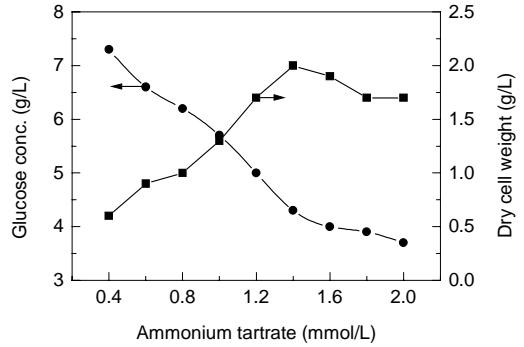


图 2 氮源浓度对菌体生长及葡萄糖消耗的影响  
Fig.2 Effect of the nitrogen concentration on growth and glucose consumption

随着氮源浓度升高, 菌球逐渐变大, 且颜色有明显变化. 当酒石酸铵浓度大于 1.4 mmol/L 时, 培养液粘稠. 由于氧气在菌垫中的穿透能力不强, 在菌垫厚 1.5 mm 处溶氧已接近零, 厚 2 mm 处则完全测不到溶氧<sup>[7]</sup>, 即菌球的直径一旦超过 3 mm, 菌球中心的细胞会缺氧, 严重时引起自溶, 释放出胞内物质. 经测定使培养液粘稠的物质为多糖物质. 菌球变大不利于传质、传氧, 而多糖物质的存在进一步引起了传质、传氧效率的下降, 使菌体生长和产酶受到了影响.

表 2 氮源浓度对菌球形态的影响

Table 2 Effect of nitrogen source concentration on pellet morphology

Ammonium tartrate (mmol/L)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
Pellet diameter (mm)	0.8~1.0	1.2~1.5	1.5~1.8	2.0~2.4	2.5~3.0	2.8~3.2	3.0~3.5	3.2~3.8	3.5~4.0
Surface	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Rough	Radiant	Radiant	Radiant
Color	Hoary	Hoary	White	Yellow	Brown	Dusky	Dusky	White	White

### 3.2 Mn<sup>2+</sup>对合成 LiP 和 MnP 的影响

20 世纪 80 年代初人们在对微量元素进行优化时就发现, Mn<sup>2+</sup>对整个酶系的活力有着显著的影响. 进一步的研究<sup>[8,9]</sup>表明, Mn<sup>2+</sup>对 LiP 和 MnP 的作用是不同的, MnP 的合成依赖于 Mn<sup>2+</sup>的存在, 而 LiP 的表达受到离子态锰(包括 Mn<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup>)的抑制, 由此通过控制培养基中 Mn<sup>2+</sup>的浓度来实现对两种酶合成的调节控制, 结果见图 3.

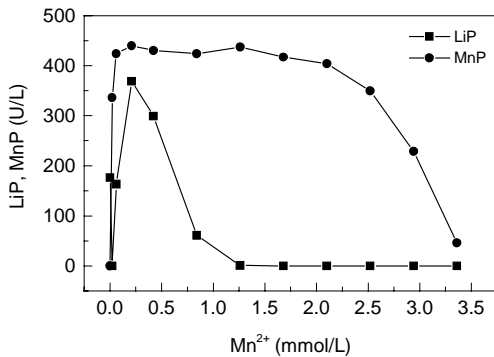


图 3 Mn<sup>2+</sup>浓度对合成 LiP 和 MnP 的影响  
Fig.3 Effect of the concentration of Mn<sup>2+</sup> on LiP and MnP

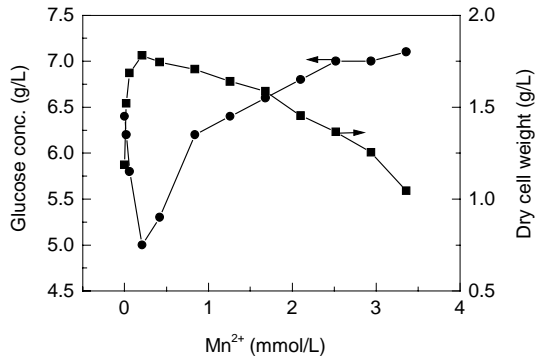


图 4 Mn<sup>2+</sup>浓度对菌体生长和葡萄糖消耗的影响  
Fig.4 Effect of the concentration of Mn<sup>2+</sup> on growth and consumption of glucose

由图看出,当培养基中缺乏  $Mn^{2+}$  时只能合成 LiP,培养基中存在  $Mn^{2+}$  的情况下,  $Mn^{2+}$  浓度小于 3.36 mmol/L 时都能合成 MnP,但只在 0.06~0.84 mmol/L 范围内才能合成 LiP.  $Mn^{2+}$  对菌体生长和葡萄糖消耗都有一定的影响(图 4),在缺乏  $Mn^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  浓度过高的情况下,葡萄糖消耗量下降,菌体生长量减少.  $Mn^{2+}$  浓度在 0.21 mmol/L 时菌体生长和产酶情况都最好.

锰离子对 LiP 合成的影响比较复杂. 研究中发现,培养基中只有添加合适浓度的  $Mn^{2+}$ ,在培养至 3.5 d 左右培养液才会开始变黄,随后菌球慢慢变成褐色,并且颜色逐渐加深,此时开始测到 LiP 的活力,菌球上沉积的褐色物质经证实为  $MnO_2$ <sup>[8]</sup>,它可以催化  $H_2O_2$  的分解,保护 LiP 不受  $H_2O_2$  的毒害,故适量的  $Mn^{2+}$  可提高 LiP 的活力;当培养基中缺乏  $Mn^{2+}$  时,细胞可以合成藜芦醇,藜芦醇既是合成 LiP 的诱导物,同时又能保护 LiP 不因  $H_2O_2$  而失活,因此细胞能够合成一定量的 LiP<sup>[10]</sup>;当培养基中只含有微量的  $Mn^{2+}$  时,无  $MnO_2$  形成,同时细胞也不能合成藜芦醇来诱导 LiP 的合成;而在高浓度  $Mn^{2+}$  的条件下,大量的  $Mn^{2+}$  在 MnP 的作用下被氧化成  $Mn^{3+}$ ,培养液呈橙红色,过量的  $Mn^{3+}$  也无法转化成  $MnO_2$ ,从而使 LiP 的表达受到了抑制.

锰离子对合成 MnP 是必不可少的. LI 等<sup>[11]</sup>发现, MnP 的合成是由锰离子诱导的,锰离子的存在增加了 *mnp mRNA* 的合成量,提高了 MnP 基因的转译,所以培养基中缺乏  $Mn^{2+}$  时就不能合成 MnP.

### 3.3 氧对合成 LiP 和 MnP 的影响

高氧环境有利于木质素降解酶系的合成,这是 Bar-lev 等<sup>[12]</sup>研究了浅层静置限氮培养条件下氧浓度对木质素降解的影响后得出的结论. 后经多人证实,氧对木质素降解酶系,尤其是木质素过氧化物酶的合成十分重要. 以间歇通氧的方式考察了不同通氧时间对产酶的影响,结果见表 3.

表 3 通纯氧时间对合成 LiP 和 MnP 的影响

Aeration time (min)	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Dry cell weight (g/L)
0 (in air)	369	402	1.60
10	446	378	1.46
30	512	406	1.50
50	554	390	1.46
70	472	403	1.57

Note: Basic culture medium and culture conditions are showed in Section 2.1.

由表可以看出,随着通氧时间的增加, LiP 的活力明显上升,而对 MnP 和菌体生长的影响不大,说明空气中的氧含量已经能够满足合成 MnP 的需求,而对于合成 LiP 还远远不够. 间歇通纯氧培养可使 LiP 的活力提高 50%,由此可得到高 LiP 的双酶培养物. 观察整个培养过程发现,通氧时间长的摇瓶中培养液先变黄,菌球颜色加深早,说明纯氧促进了  $MnO_2$  的合成,而  $MnO_2$  可以保护 LiP 不因  $H_2O_2$  而失活. 随着通氧时间继续增加, LiP 的活力反而下降,这是因为氧供应过高导致高水平的次级蛋白酶生成<sup>[13]</sup>,而此酶能迅速分解 LiP,使 LiP 的活力下降.

## 4 结论

通过研究培养基中氮源浓度、 $Mn^{2+}$  浓度及通氧强度对黄孢原毛平革菌选择性合成两种酶的影响,发现:

(1) 培养基中酒石酸铵浓度在 0.4~2.0 mmol/L 范围内能合成 MnP,但只在 0.8~1.8 mmol/L 范围内才能合成 LiP,小于 0.4 mmol/L 或大于 2.0 mmol/L 则两种酶都不能合成.

(2) 培养基中缺乏  $Mn^{2+}$  时只能合成 LiP; 培养基中存在  $Mn^{2+}$  的情况下,  $Mn^{2+}$  浓度小于 3.36 mmol/L 时都能合成 MnP, 但只在 0.06~0.84 mmol/L 范围内才能合成 LiP, 大于 3.36 mmol/L 则两种酶都不能合成。

(3) 间歇通纯氧培养可使 LiP 的活性显著提高。

#### 参考文献:

- [1] Bumpus J A, Tien M, Wright D, et al. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus [J]. Science, 1985, 228: 1434-1436.
- [2] Barr D P, Aust S D. Mechanisms of White Rot Fungi Used to Degrade Pollutants [J]. Environ. Sci. Technol., 1994, 28(2): 78-87.
- [3] Pasti M B, Paszczynski A, Goszczynski S, et al. Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo Dye Degradability by *Stretomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58(11): 3605-3613.
- [4] Paszczynski A, Huynh V B, Crawford R. Comparison of Ligninase-1 and Peroxidase-M2 from the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 244(2): 750-765.
- [5] Tien M, Kirk T K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 238-249.
- [6] Glenn J K, Gold M H. Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-dependent Peroxidase from the Lignin-degrading Basidiomycete [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985, 242(2): 329-341.
- [7] Leisola M, Ulmer D, Fiechter A. Problem of Oxygen Transfer During Degradation of Lignin by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1983, 17: 113-116.
- [8] Brown J A, Alic M, Gold M H. Manganese Peroxidase Gene Transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by Manganese [J]. J. Bacteriol., 1991, 173: 4101-4106.
- [9] Perez J, Jeffries T W. Roles of Manganese and Organic Acid Chelators in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58(8): 2402-2409.
- [10] Mester T, Jong E, Field J A. Manganese Regulation of Veratryl Alcohol in White Rot Fungi and Its Indirect Effect on Lignin Peroxidase [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(5): 1881-1887.
- [11] LI D, Alic M, Brown J A, et al. Regulation of Manganese Peroxidase Gene Transcription by Hydrogen Peroxide, Chemical Stress, and Molecular Oxygen [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(1): 341-348.
- [12] Bar-Lev S, Kirk T K. Effect of Oxygen on Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 99(2): 373-378.
- [13] Dosoretz C G, CHEN H C, Grethlein H E. Effect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Lignolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 56(2): 395-400.

## Selective Synthesis of Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*

LI Hua-zhong, ZHANG Yan-fang, HUA Zhao-zhe, CHEN Jian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,

School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

**Abstract:** Selective synthesis of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* in N-limited submerged cultures was studied under different physiological conditions. Whereas lignin peroxidase was detectable only in a narrow range of nitrogen source concentration (0.8~1.8 mmol/L), manganese peroxidase reached considerable levels over a broad range (0.4~2.0 mmol/L). In the absence of  $Mn^{2+}$ , only lignin peroxidase was detectable, which was also found when the concentration of  $Mn^{2+}$  was in the range of 0.06~0.84 mmol/L. High level of manganese peroxidase was obtained at very low concentration of  $Mn^{2+}$ , and almost kept constant with the increment of  $Mn^{2+}$ , but was repressed obviously when the concentration of  $Mn^{2+}$  was beyond 3.36 mmol/L. Pure oxygen increased the activity of lignin peroxidase by 50%, but had no obvious effect on manganese peroxidase.

**Key words:** *Phanerochaete chrysosporium*; lignin peroxidase; manganese peroxidase; selective synthesis