

文章编号: 1005-8893 (2006) 01-0014-04

白腐真菌锰过氧化物酶的研究

陈兆林¹, 胡大烽², 李慧蓉¹

(1. 江苏工业学院 环境与安全工程系, 江苏 常州 213016; 2. 中国建筑装饰研究院, 北京 100023)

摘要: 建立白腐真菌如 *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes hispidia* 等菌的液体反应体系。研究各种因子对产锰过氧化物酶的影响。研究表明: ① Mn^{2+} 是产锰过氧化物酶必不可少的因子; ② 在所有体系中 VA (0.4 mmol/L)、Tween80 (0.1%) 和草酸 (5 mmol/L) 都能促进产酶; ③ 对 *Phanerochaete chrysosporium* 而言, 高 N 抑制产酶; 对 *Trametes hispidia* 而言, N 源多少对产酶没有影响; ④ L-苯丙氨酸 (20 mmol/L)、D-苯丙氨酸 (20 mmol/L) 和二巯基苏糖醇 (0.1%) 均抑制 *Phanerochaete chrysosporium* 产酶; ⑤ *Trametes versicolor* 产酶能力比 *Phanerochaete chrysosporium* 大的多, 且 *Trametes versicolor* 产酶时间长。

关键词: 白腐真菌; 锰过氧化物酶; 因子

中图分类号: Q 939.9

文献标识码: A

Study of Manganese Peroxide of White Rot Fungi

CHEN Zhao-lin¹, HU Da-feng², LI Hui-rong¹

(1. Department of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016, China; 2. Building & Decoration Design and Research Institute of China, Beijing 100023)

Abstract: By establishing liquid systems of white rot fungi such as *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes hispidia*, the effects of several factors on the production of Manganese Peroxidase were studied. The investigation showed: ① Mn^{2+} was necessary for production of Manganese Peroxidase to all tested species; ② VA (0.4 mmol/L), Tween80 (0.1%) and oxalic acid (5 mmol/L) could stimulate Manganese Peroxidase synthesis to all tested species; ③ to *Phanerochaete chrysosporium*, higher nitrogen inhibited activities of Manganese Peroxidase; to *Trametes hispidia*, amount of nitrogen had no effect on Manganese Peroxidase synthesis; ④ L-Phenylalanine (20 mmol/L), D-Phenylalanine (20 mmol/L) and Dithiothreitol (0.1%) suppressed Manganese Peroxidase synthesis; ⑤ the ability of Manganese Peroxidase production by *Trametes versicolor* was higher than that of *Phanerochaete chrysosporium*, and the duration time of Manganese Peroxidase production by *Trametes versicolor* was longer.

Key words: white rot fungi; Manganese Peroxidase; factors

利用白腐真菌技术处理有机废水中的有机物是废水生化处理技术的热门之一^[1]。白腐真菌之所以能降解有机物, 关键在于其分泌的胞外降解酶, 主

要有木质素过氧化物酶 (Lignin Peroxidase, LiP)、漆酶 (Laccase, Lac) 和锰过氧化物酶 (Manganese Peroxidase, MnP), 形成降解酶系

收稿日期: 2005-06-13

作者简介: 陈兆林 (1981-), 男, 江苏南通人, 硕士生。

统。

木质素是一种高度复杂的、不定形的芳香环聚合物,是木质植物的主要组成成分,是仅次于纤维素的第二再生有机资源^[2]。降解木质素的微生物及其产生的酶在制浆工业及转化木质素和纤维材料方面都具有巨大的工业潜力。生物分解木质素的研究已经取得许多进展^[3,4]。由于黄孢原毛平革菌具有十分强烈的降解木质素的能力,因此有关降解木质素的研究主要都集中在这一菌种上^[5]。

为了进一步发挥白腐真菌的降解有机物的能力,笔者对白腐真菌分泌胞外降解酶(LiP、Lac和MnP)的影响因子进行了系统的研究。本文主要研究各种因子对菌产MnP的影响。

笔者研究了 Mn^{2+} 、L-苯丙氨酸、D-苯丙氨酸、二巯基苏糖醇、Tween80、VA等因子以及氮源对Pc合成MnP的影响,确定了它产MnP的最佳条件,并且确定各活性因子间的相互影响。彩绒革盖菌(*Trametes versicolor*, Tv)、多毛栓菌(*Trametes hispida*, Thp)、*Trametes hirsuta* (Thu)等菌为近年来白腐真菌研究的热点菌种。因此本文还研究了各种因子对Tv、Thp、Thu等菌产MnP的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

黄孢原毛平革菌品系OGC101由美国俄勒冈科学技术研究院赠送(简称Pc菌);彩绒革盖菌(*Trametes versicolor* 简称Tv菌);多毛栓菌(*Trametes hispida* 简称Thp菌);*Trametes hirsuta* 由国际交流获得(简称Thu菌)。

1.2 培养基

固体生长培养基用于菌的扩增,液体营养限制培养基用于建立菌的产酶体系,见文献[6]。

1.3 建立产酶体系

用100 mL锥形瓶,加入10 mL液体培养基。液体培养基为液体营养限制培养基分别加入 Mn^{2+} 、L-苯丙氨酸、D-苯丙氨酸、二巯基苏糖醇、Tween80、VA等活性因子以及加入氮源构成的。按每10 mL培养液中加入1 mL浓度为 1.25×10^7 孢子/mL的孢子悬浮液量接种^[7]。在39℃恒温培养箱静置培养。

1.4 MnP活性的测定

2 mL反应液中,含有终浓度为0.5 mmol/L愈创木酚,0.25 mmol/L H_2O_2 , 0.25 mmol/L $MnSO_4$ 及3 mmol/L乙酸和1.5 mmol/L乙酸钠组成的缓冲体系调节至pH 4.5,加入 H_2O_2 启动反应,30℃反应5 min。测定反应液在 $\lambda=465$ nm处单位时间吸光度的增加值。一个酶活单位定义为每min引起 $\lambda=465$ nm处吸光度一个0.01单位变化所需要的酶液量^[8]。

2 结果与分析

2.1 Pc菌产MnP体系

2.1.1 Mn^{2+} 的浓度对Pc菌产MnP的影响

5份液体营养限制培养基中分别加入 $MnSO_4$ 使 Mn^{2+} 浓度分别达到0、5、50、200、250 $\mu\text{mol/L}$ 。

Mn^{2+} 浓度对Pc菌产MnP的影响见图1。

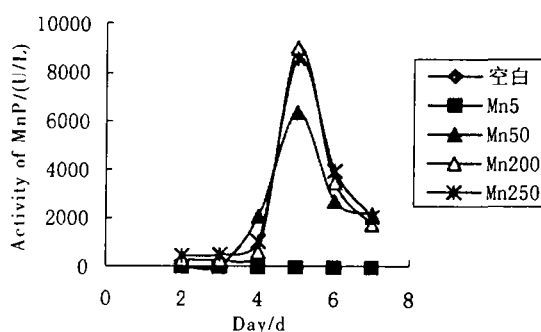


图1 Mn^{2+} 浓度对Pc菌产MnP的影响

Fig.1 Effect of concentration of Mn^{2+} on MnP of *Phanerochaete chrysosporium*

由图1可知,当培养基中不含 Mn^{2+} 时,Pc菌不产MnP,因为 Mn^{2+} 产生MnP的最基本的要素之一;当培养基中 Mn^{2+} 的浓度较小时,微量的 Mn^{2+} (5 $\mu\text{mol/L}$)也不能诱导Pc菌产MnP;随着 Mn^{2+} 的浓度的不断增加,Pc菌产MnP的能力也不断增加,当 Mn^{2+} 的浓度达到200 $\mu\text{mol/L}$ 时,产酶达到能力最大, Mn^{2+} 浓度再增加时,产酶能力基本不再增加。因此,在以后Pc、Thp、Thu菌体系中均使 Mn^{2+} 的浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.2 草酸及氮量对Pc菌产MnP的影响

液体营养限制培养基为低氮培养基,记作LN,把营养限制培养基中酒石酸铵的量改为 5×1.2 mmol/L,称之为高氮培养基,记作SN。在LN、SN中分别加入草酸,使草酸浓度分别为0、

200 $\mu\text{mol/L}$ 、5 mmol/L。

草酸及氮量对 Pc 菌产 MnP 的影响见图 2。

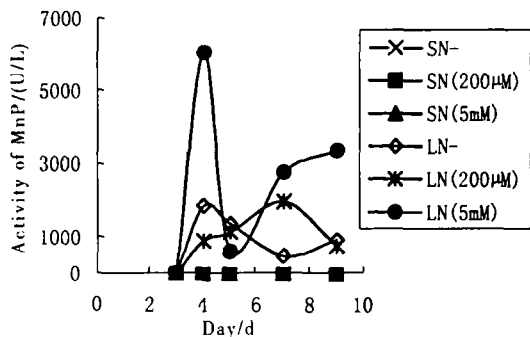


图 2 草酸及氮量对 Pc 菌产 MnP 的影响

Fig. 2 Effect of Oxalic acid and amount of nitrogen on MnP of *Phanerochaete chrysosporium*

由图 2 可知,高氮培养基中 Pc 菌生长受到抑制,从而导致 Pc 菌至始至终都没有产酶;LN-及 LN (5 mmol/L) 的产酶高峰出现在第 4 d,而 LN (200 $\mu\text{mol/L}$) 的产酶高峰出现在第 7 d。

2.1.3 VA、Tween80 对 Pc 菌产 MnP 的影响

共配制 4 份培养液,其中 1 份为液体营养限制培养基记作空白,其余 3 份分别在液体营养限制培养基中加入藜芦醇 (VA)、Tween80、Tween80,使得 VA 的浓度为 0.4 mmol/L, Tween80 的质量分数分别为 0.1%、0.2%。

VA、Tween80 对 Pc 菌产 MnP 的影响见图 3。

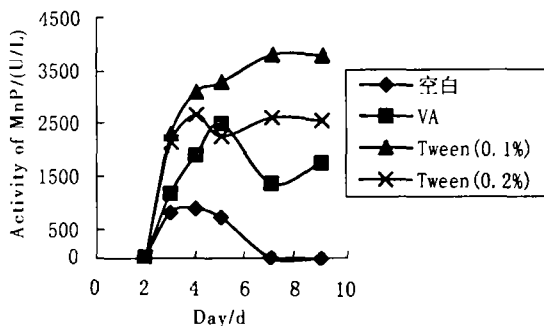


图 3 VA、Tween80 对 Pc 菌产 MnP 的影响

Fig. 3 Effect of VA and Tween80 on MnP of *Phanerochaete chrysosporium*

由图 3 可知,表面活性剂 VA 促进 Pc 菌产 MnP,且促进作用十分明显,第 5 d 出现产 MnP 的高峰,其活性为 2 400 U/L; Tween80 也能促进产酶,其中质量分数为 0.1% 比 0.2% 的产酶效果更佳。另外, Tween80 与 VA 相比, Tween80 产酶效果较好。

2.1.4 苯丙氨酸等物质对 Pc 菌产 MnP 的影响

共配制 4 份培养液,其中 1 份为液体营养限制培养基记作空白,其余 3 份分别在液体营养限制培养基中加入 D-苯丙氨酸 (0.1%)、L-苯丙氨酸

(0.1%)、二巯基苏糖醇 (0.1%), 分别记作 L、D、S。

苯丙氨酸、二巯基苏糖醇对 Pc 菌产 MnP 的影响见图 4。

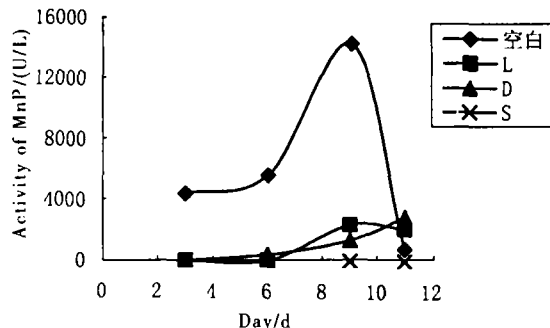


图 4 苯丙氨酸、二巯基苏糖醇对 Pc 菌产 MnP 的影响

Fig. 4 Effect of Phenylalanine and Dithiothreitol on MnP of *Phanerochaete chrysosporium*

由图 4 可知,空白体系中产出 MnP 的量较大,第 9 d 达到产酶高峰,其活性为 14 400 U/L; D-苯丙氨酸及 L-苯丙氨酸都抑制 Pc 菌产 MnP, D-苯丙氨酸体系中 Pc 菌于第 6 d 才开始产 MnP, L-苯丙氨酸体系中 Pc 菌于第 9 d 才开始产 MnP,而且产酶量都较小;二巯基苏糖醇体系不产 MnP,说明该物质对 Pc 菌产 MnP 有完全抑制作用。

2.2 Thp 菌产 MnP 体系

液体营养限制培养基为低氮培养基,记作 N,把营养限制培养基中酒石酸铵的量改为 $5 \times 1.2 \text{ mmol/L}$,称之为高氮培养基,记作 5N。

氮量对 Thp 菌产 MnP 的影响见图 5。

由图 5 可知,培养基中氮量的多少对 Thp 菌产 MnP 的影响不大;无论是高氮 (5N) 培养基中还是在低氮 (N) 培养基中,产酶均呈现出先增大后下降然后再增大的趋势,而且后一个高峰比前一个高峰大;在第 9 d 时,5N 中 MnP 活性达到 10 720 U/L, 1N 中 MnP 活性则为 9 200 U/L。

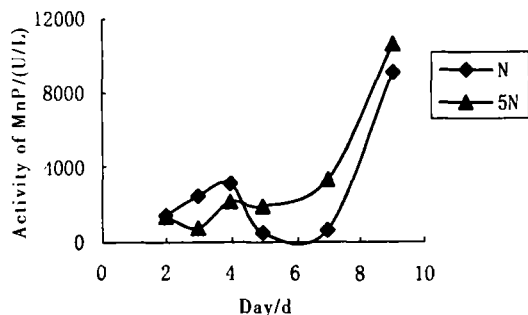


图 5 氮量对 Thp 菌产 MnP 的影响

Fig. 5 Effect of amount of nitrogen on MnP of *Trametes hispidia*

2.3 Thu 菌产 MnP 体系

共配制 4 份培养液, 其中 1 份为液体营养限制培养基记作空白, 其余 3 份分别在液体营养限制培养基中加入草酸 (5 mmol/L)、VA (0.4 mmol/L)、Tween80 (0.1%), 分别记作草酸、VA、Tween80。

草酸、VA、Tween80 对 Thu 菌的产 MnP 的影响见图 6。

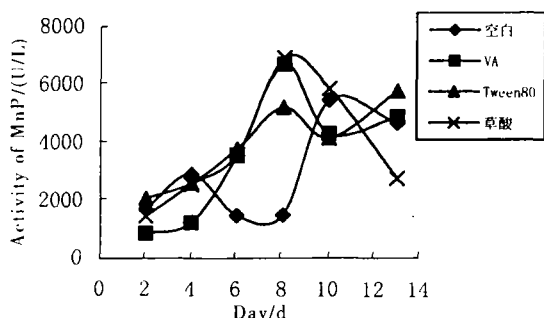


图 6 草酸、VA、Tween80 对 Thu 菌的产 MnP 的影响

Fig. 6 Effect of Oxalic acid, VA and Tween80 on MnP of *Trametes hirsuta*

由图 6 可知, 草酸、VA、Tween80 均在不同程度上促进了 Thu 菌的产酶。VA 在加入后的前 4 d, 表现对 Thu 菌的很小程度上的抑制, 从第 4 d 开始抑制作用逐渐消失, 转而表现为对产酶的促进作用。

2.4 Tv 菌产 MnP 体系

共配制 4 份培养液, 其中 2 份为液体营养限制培养基即低氮培养基, 其余 2 份为高氮培养基即酒石酸铵的量为 5×1.2 mmol/L, 分别在 2 份低氮培养基、2 份高氮培养基各加入 MnSO_4 使 Mn^{2+} 浓度分别达到 50、200 $\mu\text{mol/L}$, 把 4 份培养液分别记作 L50、L200、S50、S200。

氮量及 Mn^{2+} 浓度对 Tv 产 MnP 的影响见图 7。

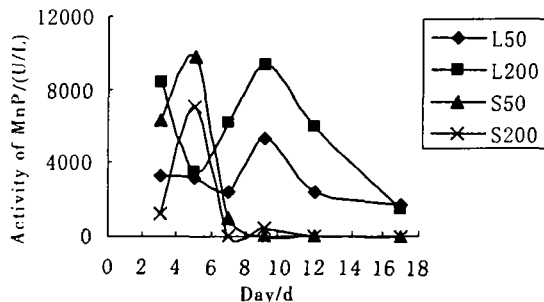


图 7 氮量及 Mn^{2+} 浓度对 Tv 产 MnP 的影响

Fig. 7 Effect of concentration of Mn^{2+} and amount of nitrogen on MnP of *Trametes versicolor*

由图 7 可知, Tv 菌孢子接种后的第 3 d 就出现较高的 MnP 活性。高氮, 在第 4 d 时就出现产酶高峰, 而低氮在第 9 d 才出现, 且低氮较高氮产酶时间长。

3 结 论

① Mn^{2+} 是 Pc 菌产 MnP 的必不可少的因子, Mn^{2+} 的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, Pc 菌产酶能力达到最大; VA、Tween80 等诱导因子均是 Pc 菌产酶的活化剂, Tween80 可以延迟产酶高峰的出现; 草酸作为 Mn 的螯合剂, 能够刺激 MnP 的活性, 这与 Gold 和 Glenn 等人的研究是一致的^[8]; 高氮抑制 Pc 菌产酶, 这种现象被称之为“氮代谢物抑制”。②氮源的丰富与否对 Thp 菌产 MnP 没有影响。说明 Thp 菌不一定存在“氮代谢物抑制”。③在 Thu 菌的体系中, 发现草酸、VA、Tween80 等诱导因子也能促进 Thu 菌产 MnP。加入草酸、VA、Tween80 使产酶高峰提前。④Tv 菌产 MnP 体系中, 高氮产酶时间短, 而低氮使得产酶时间延长, 其原因有待于进一步研究。

初步研究, 得出了各影响因子对白腐真菌产 MnP 的影响, 这些结论对白腐真菌的降解有机物的工程实践应用有较高的价值。

参考文献:

- [1] 李慧蓉, 罗丽娟, 罗光坤. 黄孢原毛平革菌对代表性染料生物降解及降解途径的初探 [J]. 环境化学, 2001, 20 (4): 379-380.
- [2] Barr D P, Aust S D. Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants [J]. Environ Sci Technol, 1994, 28 (2): 78A-87A.
- [3] Martinez A T. Molecular Biology and Structure-Function of Lignin-Degrading Heme Peroxidase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 425-444.
- [4] Hofrichter M. Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (Mnp) [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 454-466.
- [5] Gold M H, Alic M. Molecular Biology of Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Microbiological Reviews, 1993, 57: 605-622.
- [6] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] Kirk T K, Scultz E, Connors W J, et al. Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Arch Microbiol, 1978, 117: 227-285.
- [8] Michael H Gold, Jeffrey K Glenn. Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in enzymology, 1988, 16: 258-264.