

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0048 - 05

黄孢原毛平革菌合成锰过氧化物酶的工艺

李华钟, 章燕芳, 华兆哲, 陈坚

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了多种营养条件及培养条件对黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)WX213 合成锰过氧化物酶的影响.当培养基中葡萄糖质量浓度为 10 g/L,酒石酸铵质量浓度为 0.2 g/L,吐温 80 质量浓度为 1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 为 0.14 g/L,采用苯二甲酸缓冲液,最终 pH 4.5,250 mL 的三角瓶装液量 90 mL,接种量为 $1.2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 时所获酶活较高.经条件优化后锰过氧化物酶的活力达到 559 U/L,比未优化前提高了 36%.加入染料培养,发现该酶对所选用的偶氮染料、三苯甲烷类染料、杂环类染料均有较好的脱色效果.

关键词:黄孢原毛平革菌,锰过氧化物酶,脱色,染料

中图分类号:Q 814.9

文献标识码:A

Production Conditions of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*

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

(The key laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effect of different conditions on manganese peroxidase produced by *Phanerochaete chrysosporium* WX213 was investigated. High activity of manganese peroxidase was obtained when there were 10 g/L glucose, 0.2 g/L ammonium tartar, 1 g/L tween 80, 0.14 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in culture medium, the initial pH was 4.5, and the medium was buffered with sodium phthalate. The cultivations were performed in 250 mL shake flasks containing 90 mL medium, and was inoculated to a concentration of 1.2×10^6 spores/mL. The manganese peroxidase activity reached to 559 U/L under optimum conditions, 36% higher than that before optimization. After cultivation with dyes under this condition, good decolorization of azo dye, triphenylmethane dye and heterocyclic dye by manganese peroxidase was observed.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; Manganese Peroxidase; decolorization; dyes

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是一类奇特的腐生真菌,该菌在一些主要营养物(碳源、氮源等)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^[1,2],在环境保护领域显示出强大的作用潜力.20 世纪 80 年代初

人们开始对其在染料降解方面的作用进行研究.

降解过程中起主要作用的有 2 个酶: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

收稿日期 2001 - 09 - 15; 修订日期 2001 - 12 - 15.

作者简介:李华钟(1958 -)男,山东龙口人,工学硕士,副教授.

万方数据

还原反应降解各种结构的染料.关于 *Phanerochaete chrysosporium* 合成 LiP 的条件及在染料降解中的作用,前人已作了大量的研究^[3,4],而 MnP 的相关报道较少.和 LiP 相比,MnP 合成具有对氧分压要求低,氮源浓度范围宽等优势^[5],并且 MnP 单独作用同样可以降解多种不同结构的染料^[6].

作者对 *Phanerochaete chrysosporium* 合成 MnP 的摇瓶培养条件进行了优化实验,在此基础上,初步研究该酶在染料脱色中的性能.

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

1.1.1 菌种 黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)WX213,江南大学生物工程学院微生物实验室提供.

1.1.2 基本培养基 葡萄糖 10 g/L,酒石酸铵 0.2 g/L,吐温 80 1 g/L,苯甲醇 0.54 g/L,KH₂PO₄ 2.56 g/L,MgSO₄ 0.71 g/L,VB₁ 0.001 g/L,邻苯二甲酸缓冲液 10 mmol/L,微量元素液 70 mL/L,最终 pH 4.5.

微量元素液(g/L):氨基乙酸 0.6,MnSO₄·H₂O 0.5,NaCl 1,FeSO₄·7H₂O 0.1,CoSO₄·7H₂O 0.22,CaCl₂·2H₂O 1.56,ZnSO₄·7H₂O 0.1,CuSO₄·5H₂O 0.1,AlK(SO₄)₂·12H₂O 0.01,HBO₃ 0.01,Na₂MoO₄·2H₂O 0.01.

1.1.3 培养条件 250 mL 的三角瓶装液量 90 mL,接种量(以孢子计)1 × 10⁶ mL⁻¹,培养温度 37 °C,转速 150 r/min,培养时间 5 d.

1.1.4 同步产酶染料脱色 培养到第 5 天,当 MnP 酶活最大时在培养液中加入一定质量浓度的纯染料,放入摇床继续培养,每隔一定时间取样在分光光度计上分析染料特征吸光度的变化.

1.2 分析方法

1.2.1 MnP 活性的测定

3 mL 反应液中,含 50 mmol/L 琥珀酸钠(pH 4.5),50 mmol/L 乳酸钠(pH 4.5),0.1 mmol/L 酚红,0.1 mmol/L MnSO₄,3 mg/mL 明胶,还有 0.2 mL 发酵液或其稀释液,50 μmol/L H₂O₂ 启动反应,30 °C 下反应 2 min 后加入 100 μL 5 mmol/L 的 NaOH 终止反应,测 610 nm 处的吸光度变化^[7].

一个酶活单位(U)定义为:每分钟氧化酚红产生 1 μmol 产物所需的酶量^[8].

1.2.2 菌体干重的测定 用滤纸过滤发酵液,纯水洗涤菌体 3 遍,菌体在 80 °C 下烘干 3 h 称重.

1.2.3 脱色率测定及计算 染料加入后,每隔一定时间从未加染料的对照样及样品中取出一定量的

培养液,7 000 g 离心 10 min 使菌体及胶状物沉淀.于染料最大吸收波长处测定上清液吸光度,根据标准曲线,计算出培养液中剩余染料浓度 c₁,原染料浓度 c 与 c₁ 之差占 c 的百分比即为染料脱色率:

$$\text{染料脱色率} = \frac{c - c_1}{c}$$

2 结果与讨论

2.1 *Phanerochaete chrysosporium* WX213 合成 MnP 的条件考察

2.1.1 氮源的选择及氮源浓度对合成 MnP 的影响

实验证明,本实验所用菌种在限碳培养条件下不能合成木质素降解酶系,故采用限氮培养条件.

在限氮培养中,氮源是控制产酶的关键因素.考察各种氮源对产酶的影响,结果见表 1.可以发现以酒石酸铵作为氮源时,对 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.其中酒石酸铵、硫酸铵、尿素:1.2 mmol/L;氯化铵、硝酸铵、L-谷氨酸 2.4 mmol/L;蛋白胨质量浓度 0.22 g/L.

表 1 不同氮源对合成 MnP 的影响

Tab.1 Effect of different nitrogen source on MnP production

氮源	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)	氮源	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)
酒石酸铵	402	1.60	尿素	0	1.53
硫酸铵	300	1.65	L-谷氨酸	0	1.51
氯化铵	281	1.60	蛋白胨	0	1.11
硝酸铵	355	1.36			

在碳源不变的情况下,氮源浓度是关系到菌体生长和菌球形态的关键因素.保持其它条件不变,考察酒石酸铵浓度在 0.4 ~ 2.0 mmol/L 之间菌体生长和产酶的变化.

由图 1 发现,酒石酸铵浓度在 0.4 ~ 2.0 mmol/L 之间菌体都能合成 MnP,且在此范围内氮源浓度的变化对酶活的影响不大,MnP 的活性基本保持在 400 U/L 左右,酒石酸铵浓度为 1.2 mmol/L 时酶活相对较高.当酒石酸铵浓度大于 1.8 mmol/L 时,酶活迅速下降至零,说明此条件已达不到限氮的要求.

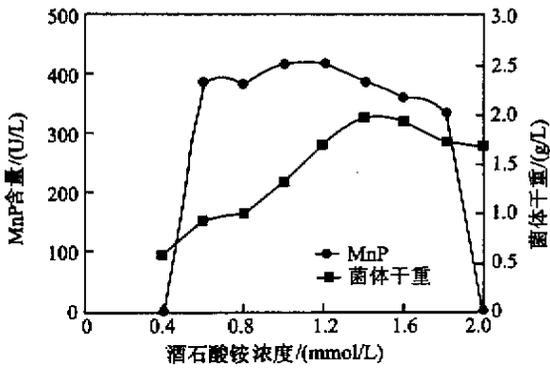


图1 酒石酸铵浓度对合成 MnP 的影响

Fig.1 Effect of the concentration of ammonium tartrate on MnP production

菌球形态是影响产酶的重要因素^[9],限氮培养条件下氮源浓度对菌球形态有很大的影响,随着氮源浓度的上升菌球逐渐变大.菌球太大,不利于传质、传氧.酒石酸铵浓度为 1.2mmol/L 左右时,菌体已得到充分生长,且形成的菌球大小合适,故酶活较高.

2.1.2 碳源的选择及碳源浓度对合成 MnP 的影响

从表 2 中可以发现,果糖、糊精、麦芽糖、葡萄糖都是菌体生长的良好碳源,其中以糊精最好,而以木糖、糊精、麦芽糖、葡萄糖为碳源时都能得到较高的酶活.当葡萄糖作为碳源时,不但菌体生长较好,且所获酶活最高.故以葡萄糖为碳源,考察不同葡萄糖浓度对 MnP 合成的影响.

表2 不同碳源对 MnP 合成的影响

Tab. 2 Effect of different carbon source on MnP production

碳源 (10 g/L)	MnP 含量/ (U/L)	菌体 干重/ (g/L)	碳源 (10 g/L)	MnP 含量/ (U/L)	菌体 干重/ (g/L)
蔗糖	0	1.39	糊精	317	1.72
果糖	242	1.59	麦芽糖	322	1.57
木糖	295	1.23	葡萄糖	405	1.58

从图 2 中可以看出,葡萄糖质量浓度在较低(< 10 g/L)的情况下,随着葡萄糖质量浓度的升高,菌体量和 MnP 的活性都逐步增加,而当葡萄糖质量浓度大于 10 g/L 时,菌体量和 MnP 的活力趋于恒定.限氮条件下,是氮源的耗尽启动菌体进入次级代谢,进而诱导木质素降解酶系的合成,而与碳源无关.当葡萄糖质量浓度小于 10 g/L 时,菌体合成量少,影响到了 MnP 的合成量.而当葡萄糖质量浓度超过 10 g/L 时,菌体生长受到氮源的限制,再增加碳源对菌体生长和 MnP 的合成影响不大.

万方数据

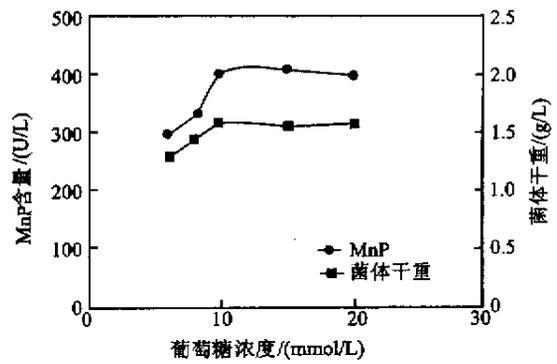


图2 葡萄糖质量浓度对产 MnP 的影响

Fig.2 Effect of the concentration of glucose on MnP production

2.1.3 装液量、接种量对合成 MnP 的影响

考察 250 mL 的三角瓶中装液量对 MnP 合成的影响,结果见表 3,装液量在 90 ~ 110 mL/瓶左右酶活较高.装液量太低,培养 5 d 后观察到所有的菌球都聚集在瓶底,无法自由悬浮在培养液中,培养液浑浊,可看到很多游离的菌丝碎片,由此认为培养过程中菌体相互摩擦,对菌体造成了损伤,使酶活较低.装液量太高,溶氧达不到要求,对酶活和菌体生长都不利.

表3 装液量对合成 MnP 的影响

Tab.3 Effect of medium volume on MnP production

装液量/ (mL/瓶)	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)
50	201	1.67
70	365	1.56
90	414	1.67
110	418	1.43
130	333	1.27

考察接种量对 MnP 合成的影响,结果见表 4.接种量在 1.2×10^6 mL⁻¹ 时, MnP 酶活最高.观察菌体形态可以发现:接种量小,菌球少且松散;接种量大,菌球多且紧密.以上两种形态的菌球对于传质传氧都十分不利.只有大小适中的菌球才能保证传质、传氧,才有利于 MnP 的合成.

2.1.4 缓冲溶液及 pH 对合成 MnP 的影响

考察 3 种缓冲液对 MnP 合成的影响.结果表明,邻苯二甲酸缓冲液是合成 MnP 的最佳缓冲液(410 U/L),醋酸缓冲液次之(317 U/L),使用酒石酸缓冲液则不能产酶,且菌体生长差.3 种缓冲液中,以邻苯二甲酸的缓冲能力最强,醋酸次之,而酒石酸则能被菌体利用,导致培养基 pH 值变化,故不能

产酶. 实验数据见表 5、表 6.

表 4 接种量对合成 MnP 的影响

Tab.4 Effect of inoculum concentration on MnP production

接种量 (1×10^6 个/mL)	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)
0.4	341	1.43
0.8	410	1.55
1.2	424	1.67
1.6	375	1.44
2.0	353	1.36

表 5 缓冲液对合成 MnP 的影响

Tab.5 Effect of buffer on MnP production

缓冲液	MnP 含量(U/L)	菌体干重(g/L)
酒石酸	0	1.22
醋酸	317	1.58
邻苯二甲酸	410	1.65

表 6 pH 值对合成 MnP 的影响

Tab.6 Effect of pH on MnP production

pH 值	MnP 含量(U/L)	菌体干重(g/L)
4.2	0	1.36
4.5	416	1.62
4.8	189	1.68
5.1	0	1.72

采用邻苯二甲酸缓冲液, 调节不同 pH 值, 考察 pH 对产酶的影响, 发现该菌对 pH 的要求较为严格, 只有当 pH 值在 4.5 附近时才能产酶, 且菌体生长较好, 故产酶的最佳 pH 值为 4.5.

2.1.5 苯甲醇、吐温 80 对合成 MnP 的影响

前人的大量研究都以藜芦醇作为合成 Lip 的诱导物, 后经研究发现, 价格便宜的苯甲醇可以取代昂贵的藜芦醇起到诱导作用^[10], 实验中发现苯甲醇对 MnP 的合成也有一定的促进作用. 以苯甲醇为诱导物, 考察不同浓度对产酶的影响, 如表 7 所示. 可知, 苯甲醇对菌体生长有一定的抑制作用, 但能明显提高酶活, 最佳添加量为 5 mmol/L.

由表 8 可知, 吐温 80 能显著提高 MnP 的活力, 最佳添加量为 1 g/L, 吐温 80 在低质量浓度时对菌体生长有促进作用, 能够提高细胞膜通透性, 解除已合成的 MnP 在细胞内对酶基因转录或 mRNA 翻译的阻碍, 从而有利于酶的分泌^[11].

表 7 苯甲醇浓度对合成 MnP 的影响

Tab.7 Effect of benzyl alcohol concentration on MnP production

苯甲醇浓度/ (mmol/L)	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)
0	282	1.81
3.4	363	1.58
5	410	1.65
6.7	352	1.62

表 8 吐温 80 质量浓度对合成 MnP 的影响

Tab.8 Effect of tween80 concentration on MnP production

吐温 80 质量浓度(g/L)	MnP 含量/ (U/L)	菌体干重/ (g/L)
0	40	1.47
0.5	390	1.86
1	428	1.64
1.5	407	1.60
2	0	1.45
3	0	1.35

2.1.6 Mn^{2+} 浓度对合成 MnP 的影响

考察培养基中添加不同浓度的 Mn^{2+} (以 $MnSO_4$ 形式) 对 MnP 活力的影响. 从图 3 看出, 培养基中不添加 Mn^{2+} 将不能合成 MnP, 但只要添加微量的 Mn^{2+} , 即能合成较高活力的 MnP, 直至 Mn^{2+} 达到很高的浓度 (3.36 mmol/L) 才会表现出明显的抑制作用. Mn^{2+} 对菌体生长有一定的影响, 在缺乏 Mn^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度过高的情况下, 菌体生长较差. Mn^{2+} 浓度在 0.84 mmol/L 时菌体生长和产酶情况都最好.

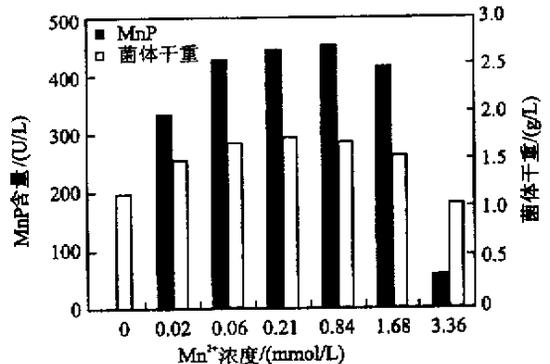


图 3 Mn^{2+} 浓度对合成 MnP 的影响

Fig.3 Effect of Mn^{2+} concentration on MnP production

锰离子对合成 MnP 是必不可少的. Dan Lf^[12] 等发现 MnP 的合成是由锰离子 (包括 Mn^{2+} 和 Mn^{3+}) 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.

2.1.7 优化结果 根据以上实验,得到优化的培养基为:葡萄糖 10 g/L,酒石酸铵 0.2 g/L,吐温 80 1 g/L,苯甲醇 0.54 g/L, KH_2PO_4 2.56 g/L, $MgSO_4$ 0.71 g/L, VB_1 0.001 g/L;邻苯二甲酸缓冲液 10 mmol,微量元素液 70 mL(其中 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 为 0.84 mmol/L);最终 pH 值为 4.5.培养条件为:250 mL 的摇瓶装液量 90 mL,接种量 1.2×10^6 mL⁻¹(以孢子计),培养温度 37 °C,转速 150 r/min.在此条件下,MnP 酶活达到 559 U/L,比未优化前提高了 36%.

2.2 染料脱色

目前印染工业常用染料为偶氮类染料,其次为三苯甲烷类等染料.选取 6 种具代表性的染料在酶活达到最大时加入培养基并继续培养,染料初始质量浓度为 40 mg/L.

由图 4 可以看出,MnP 对各种结构的染料都有较好的脱色效果.加入染料的菌体培养 24 h 后,偶氮类染料甲基橙、橙 I、刚果红、直接湖蓝 6B 的脱色率分别为 92.0%、93.1%、81.0%、78.4%;三苯

甲烷类染料结晶紫、杂环类染料次甲基蓝的脱色率分别 66.8% 和 82.0%.

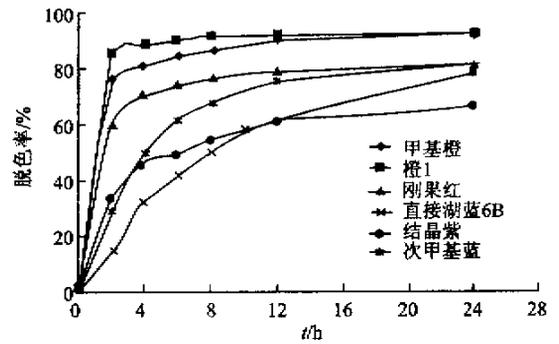


图 4 MnP 对几种染料的脱色情况

Fig.4 Decoloration of several dyes by MnP

3 结论

1 经条件优化后锰过氧化物酶的活力达到 559 U/L,比未优化前提高了 36%.

2 经优化后加入染料进行同步产酶染料脱色,发现该酶对所选用的偶氮染料、三苯甲烷类染料、杂环类染料均有较好的脱色效果.

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. Mechanisms of white rot fungi use to degrade pollutant[J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28, (2): 78 - 87.
- [3] LESTAN D, LESTAN M, PERDIH A. Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by Phanerochaete Chrysosporium[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(2): 606 - 612.
- [4] OLLIKKA P, ALHONMAKI K, LEPPANEN V M, et al. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(12): 4010 - 4016.
- [5] DOSORETZ C G, GRETHLEIN H E. Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 28/29: 253 - 265.
- [6] PASTI M B, PASZCZYNSKI A, GOSZCZYNSKI S, et al. Influence of Aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces spp* and *Phanerochaete Chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(11): 3605 - 3613.
- [7] GLENN G K, GOLD M H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycet[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1985, 242(2): 329 - 341.
- [8] KUWAHARA M, GLENN G K, GOLD M N. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of phanerochaete chrysosporium[J]. *FEBS Lett*, 1984, 169: 247 - 250.
- [9] GLORIA A, JIMENEZ-TOBON, PENNINGCKX M J, et al. The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 21: 537 - 542.
- [10] 张朝晖, 夏黎明, 林建平, 等. 黄孢原毛平革菌培养合成木质素过氧化物酶的研究[J]. *浙江大学学报*, 1999, 33(2): 132 - 135.
- [11] ASTHER M, CORRIEU G. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-14[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1987, 9: 245 - 251.
- [12] MESTER T, ED DE JONG, 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.

(责任编辑 杨萌, 秦和平)