

产锰过氧化物酶细菌的筛选及其对孔雀石绿脱色的研究

杨 晔¹, 李国辉¹, 高剑平², 丁重阳^{*1}, 顾正华¹, 张 梁¹, 石贵阳¹

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 漳州职业技术学院, 福建 漳州 363000)

摘要:从无锡某木材厂的腐木及腐殖土的表层土样中筛选分离得到6株产锰过氧化物酶的细菌, 其中产酶最优的一株菌J09经鉴定为草木犀中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti*。在优化的条件下, 该菌株发酵72 h 锰过氧化物酶产量达到最高值, 为607.7 U/L。利用粗酶液和发酵培养液对15 mg/L的孔雀石绿进行脱色处理3 h, 脱色率分别达到78.5%和89.8%, 好氧条件下的脱色率高于厌氧条件的脱色率, 孔雀石绿对该菌具有一定的毒性。

关键词: 锰过氧化物酶; 草木犀中华根瘤菌; 染料脱色; 孔雀石绿

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)011—1180—04

Screening and Decolorization of Malachite Green of a Manganese Peroxidase-Producing Bacteria

YANG Ye¹, LI Guo-hui¹, GAO Jian-ping², DING Zhong-yang^{*1},
GU Zheng-hua¹, ZHANG Liang¹, SHI Gui-yang¹

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Six strains with manganese peroxidase-producing capability were screened from the soil samples which were collected in a Wood factory, Wuxi, China. The strain J09 which has the highest yield was identified as *Sinorhizobium meliloti*. The enzyme activity reached the peak of 607.7 U/L at the third day under the optimized conditions. For the crude enzyme liquid and fermentation medium with initial concentration of 15 mg/L malachite green, the decolorization rate could reach more than 75% and 85% by 3 hours respectively. Under aerobic condition the decolorization rate was higher than that under the anaerobic condition and malachite green has some toxicity to the bacteria.

Keywords: Manganese peroxidase, *Sinorhizobium meliloti*, dye decolorization, malachite green

收稿日期: 2011-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(50978124); 福建省教育厅 A 类科技项目(JA11312); 漳州职业技术学院科技项目(ZZY1110)。

* 通信作者: 丁重阳(1975—), 男, 江苏南通人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵工程研究。E-mail: zyding@jiangnan.edu.cn

木质素降解酶主要有 3 种:木质素过氧化物酶(Lignin peroxidases/Lip)、锰过氧化物酶(Manganese peroxidases/Mnp)和漆酶(Laccase/Lac),这些氧化酶对多种污染物都表现出了广谱的降解作用,包括酚类、多环芳烃、多种染料、五氯联苯等难降解物质^[1],其中 Lip 与 Mnp 合成后分泌到胞外,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的染料^[2],具有重要的应用价值。据报道,白腐真菌拥有强大的木质素降解酶系统^[3],但真菌的在极端环境和底层环境中,如高 pH 值、缺氧、高渗透压以及木质素浓聚物中的稳定性较差;而细菌具有来源广泛、生长快速、适应能力强、易于改造及大规模应用等优势,且在木质素的降解过程中,需要多菌种协同作用^[4],因此细菌产木质素降解酶的研究显示出诱人的前景和广阔的发展空间。目前,对于细菌产木质素降解酶的研究,主要以木质素过氧化物酶(Lip)为主^[5-6],鲜有关于细菌产锰过氧化物酶的研究报道。

作者从采自江苏省无锡市多个木材厂的腐木及腐殖土的表层土样等 12 份样品中筛选得到一株高产锰过氧化物酶活力的菌株,并对其在孔雀石绿染料降解与脱色上的应用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从无锡某木材厂中采集到的腐木及腐殖土的表层土样等 12 份样品。

1.2 培养基

无机培养基(g/L): K_2HPO_4 1; NaH_2PO_4 1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5; $MgSO_4$ 0.2; $CaCl_2$ 0.1; $FeSO_4$ 0.05; $MnSO_4$ 0.02;木屑 10;pH 值 7.0;LB 培养基(g/L):氯化钠 5,酵母膏 5,蛋白胨 10,pH 值自然;苯胺蓝脱色培养基^[7]:每 1 000 mL LB 培养基中加入 0.1 g 苯胺蓝,避光;染料脱色培养基(g/L):LB 培养基中加入一定量的染料构成染料脱色培养基。

1.3 试剂及仪器

主要试剂:孔雀石绿;磷酸氢二钾,磷酸二氢钠,硫酸铵,硫酸镁,氯化钙,硫酸亚铁,硫酸锰:分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司生产。

主要仪器:U-3000 紫外分光光度计:日立公司产品;MK3 酶标仪:上海科学仪器有限公司产品。

1.4 方法

1.4.1 产木质素降解酶菌株筛选 称取 10 g 腐殖土,加入含有 90 mL 无菌水的锥形瓶中,置于摇床 150 r/min 振荡 20 min,取 10 mL 上述溶液接种于无机培养基(50 mL/250 mL),30 ℃、150 r/min 富集培养 7 d 后,取富集液适当稀释涂布苯胺蓝脱色培养基,30 ℃ 避光培养,选取透明圈产生快速、明显的菌落接种 50 mL LB 培养基,24 h 后转接相同新鲜 LB 培养基,30 ℃、120 r/min 振荡培养。定时取样测定酶活力,选取产酶活力高的菌株经多次复筛纯化后保藏待用。

1.4.2 酶活力的测定 Mnp 酶活力的测定按文献[8]的方法进行,Lip 酶活力的测定按文献[9]提供的方法进行,按文献[10]提供的方法进行 Lac 酶活力的测定。

1.4.3 菌种鉴定 参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. IV)》对菌株 J09 进行生理生化鉴定。通过 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction 和 DNA 自动测序仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号 ABI 3130)测定 16S rDNA 序列,并通过 16S rDNA 进行同源性序列比较及进化树分析对菌株 J09 进行菌种鉴定。

1.4.4 菌种对染料的脱色 染料最大吸收波长的测定:使用分光光度计对含一定量染料的空白发酵液在 200~900 nm 进行全波长扫描,确定其最大吸收波长。

发酵液对染料的脱色:培养至酶活力最高时加入一定浓度染料,30 ℃、150 r/min 继续培养,每隔 3 h 取样,离心取上清液,在最大吸收波长下检测染料吸光值的变化。

粗酶液对染料的脱色:培养至酶活力最高时,离心除去菌体,得粗酶液,100 mL 锥形瓶中加 50 mL 粗酶液和一定浓度的染料,定时取样,检测染料吸光值的变化,至吸光值不变。

生物量的测定:测定所取培养基样品在 620 nm 下的吸光度,以不接菌的空白培养基为对照;脱色率的测定:加入染料后混匀,在染料的最大吸收波长下测定上清液初始吸光值 A_0 ,定时取样,测定上清液吸光值 A_1 。染料脱色率= $((A_0-A_1)/A_0) \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 产锰过氧化物酶细菌的筛选

初筛获得具有产锰过氧化物酶能力的菌株 70

株,在进一步复筛获得 6 株菌株的基础上筛选得到 1 株具有高产锰过氧化物酶能力的菌株 J09。在优化的条件下,该菌株发酵 3 d 锰过氧化物酶活力达到最大,为 607.7 U/L。

2.2 产锰过氧化物酶细菌的鉴定

参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. IV)》对菌株 J09 进行生理生化鉴定。生理生化特征与草木犀中华根瘤菌相吻合,结果见表 1。

表 1 菌株 J09 的生理生化特征

Tab.1 Conventional tests for identification of J09

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	-	明胶液化	-
VP 实验	-	淀粉水解	-
葡萄糖(产酸)	+	葡萄糖(产气)	-
乳糖(产酸)	-	乳糖(产气)	-
蔗糖(产酸)	-	蔗糖(产气)	-

利用 PCR 技术和 DNA 测序技术对得到的菌株进行 16S rDNA 扩增测序,将测序结果与 GeneBank 中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较,构建系统发育树,最终确定菌株的进化分类地位。结果如图 1 显示,菌株 J09 与草木犀中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)同源性达到 99%,命名为草木犀中华根瘤菌 J09(*Sinorhizobium meliloti* J09)。该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为 CCTCC M 2011318。

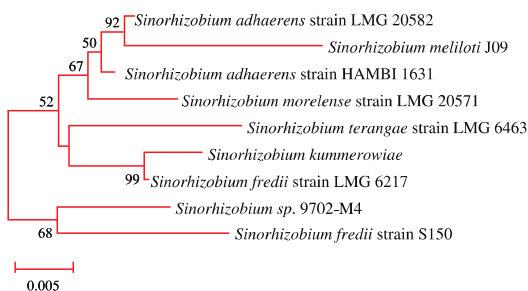


图 1 基于 16s RNA 序列同源性的 J09 系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of J09 based on 16s RNA sequences

2.3 *Sinorhizobium meliloti* J09 对染料的脱色

2.3.1 脱色光谱分析 在 LB 培养基中添加孔雀石绿至终质量浓度为 15 mg/L,由图 2 可见,孔雀石绿的最大吸收波长在 617 nm。经过发酵液和粗酶液脱

色后,此处的吸收峰均明显降低,且经发酵液脱色后的吸光值降低幅度较大,表明该菌株所产酶对孔雀石绿有明显的脱色作用,且其菌体对孔雀石绿也具有一定的吸附作用。

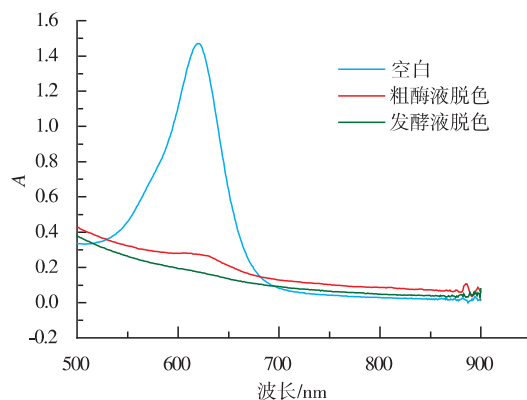


图 2 孔雀石绿及脱色处理后的紫外—可见光谱
Fig.2 Visible spectrum of malachite green

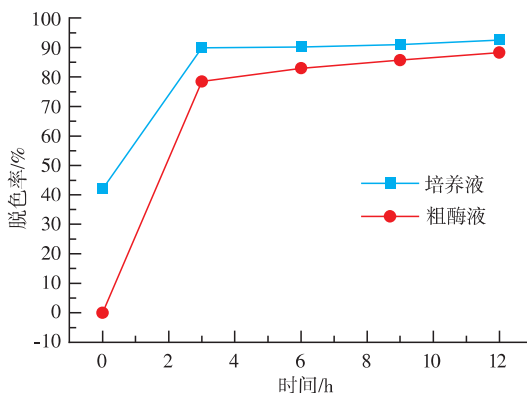


图 3 孔雀石绿脱色率随时间变化曲线

Fig.3 Decolorization rate of malachite green at different times

2.3.2 发酵液及粗酶液对孔雀石绿染料的脱色 由图 3 可知,发酵液与粗酶液对孔雀石绿均表现出显著的脱色效果。脱色处理 3 h 时,发酵培养液对染料的脱色率已经达到 89.8%,粗酶液对染料的脱色率达到 78.5%;3 h 后,随时间的延长,脱色率增长缓慢,推测其原因为菌体对染料的吸附能力已基本饱和且粗酶液酶活降低。

在 Mnp 酶活为 607.7 U/L 的粗酶液中加入孔雀石绿后并没有立即表现出脱色效果,而含有菌体的发酵液在加入孔雀石绿后,随即表现出 42%的脱色率,表明菌体细胞对孔雀石绿有一定的吸附作用。发酵液的脱色效果是菌体吸附与酶降解共同作用的结果,因而优于粗酶液,这与光谱分析的结果一

致。

2.3.3 氧气对培养液脱色效果的影响 由图 4 可见,在振荡培养的条件下的脱色率均高于静置培养条件下的脱色率,表明该菌在氧气充足的条件下脱色效果更好。草木犀中华根瘤菌是好氧细菌,充足的溶氧更利于菌体生长和酶的合成,因此对染料有更好的脱色效果。

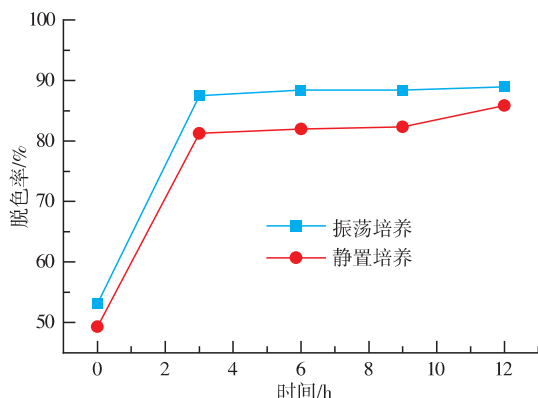


图 4 不同培养条件下孔雀石绿脱色率随时间变化曲线

Fig.4 Decolorization rate of malachite green at different times on different conditions

参考文献:

- [1] 武善军. 产木质素降解酶真菌的分离及其发酵条件的研究[D]. 合肥:安徽大学,2010.
- [2] 鲁时瑛,李华钟,陈坚,等. EDTA 对木质素过氧化物酶在染料脱色中的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2002,21(4):393-396.
LU Shi-ying, LI Hua-zhong, CHEN Jian, et al. Effect of ethylenediamine tetraacetic acid on dye-decolorization by Lignin peroxidase[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2002, 21(4):393-396. (in Chinese)
- [3] 李燕荣,周国英,胡清秀,等. 食用菌生物降解木质素的研究现状[J]. 中国食用菌,2009,28(5):3-6.
LI Yan-rong, ZHOU Guo-ying, HU Qing-xiu, et al. Research advance on biodegradation of lignin mushroom[J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(5):3-6. (in Chinese)
- [4] 郁红艳,曾光明,牛承岗,等. 细菌降解木质素的研究进展[J]. 环境科学与技术,2005,28(2):107-109.
YU Hong-yan, ZENG Guang-ming, NIU Cheng-gang, et al. Advances in biodegradation of lignin by bacteria[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 28(2):107-109. (in Chinese)
- [5] Ahmad M, Taylor CR, Pink D, et al. Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders[J]. The Royal Society of Chemistry, 2010, 6, 815-821.
- [6] Michizoe J, Okazaki S, Goto M, et al. Catalytic properties of lignin peroxidase ALip-P3 hosted in reversed micelles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 8: 129-134.
- [7] 吴薇,田世杰,顿宝庆,等. 高效木质素酶产生菌的分离筛选[J]. 食品科技,2010,35(1):10-14.
WU Wei, TIAN Shi-jie, DUN Bao-qing, et al. Separation and filtration of a strain of high effective lignin-modifying enzymes production[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(1):10-14. (in Chinese)
- [8] Archibald F S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(9):3110-3116.
- [9] LIU Li-hua, LIN Zhi-wei, ZHENG Teng, et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44:426-433.
- [10] HOU Hong-man, ZHOU Ji-ti, WANG Jing, et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye[J]. Process Biochemistry, 2004, 39:1415-1419.

2.3.4 染料对菌体生长的影响 为探究染料对菌体生长的影响,菌体培养 72 h 时,向发酵液中加入 15 mg/L 的孔雀石绿。加入染料后,由于染料的特征吸收峰 617 nm 与细胞吸收峰 620 nm 相近,使得细胞表观吸光值增高。随着染料的不断降解,在以后的整个细菌生长过程中,染料组的细胞生物量均低于对照。结果表明三苯甲烷类染料孔雀石绿加速了细胞衰亡,对菌体生长有一定的不利影响。

3 结 语

从无锡某木材厂中采集到的腐木及腐殖土的表层土样分离到一株高产锰过氧化物酶的细菌 J09, 经鉴定为草木犀中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*)。该菌发酵所得的发酵液及粗酶液对孔雀石绿均有显著的脱色效果,在酶活达到最高时,分别在发酵液和粗酶液中加入 15 mg/L 的孔雀石绿,在振荡培养 3 h 后,其脱色率分别达到 89.8% 和 78.5%;充足的氧气利于该菌株脱色效率的提高;同时,研究表明孔雀石绿对该菌体生长有不利影响。