

黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶的营养调控

李越中¹ 高培基 王祖农

(山东大学微生物学研究所 济南 256100)

摘要 本文研究了营养条件对黄孢原毛平革菌(*Phanerochate chrysosporium*) ME-446 合成木素过氧化物酶及其同工酶组分的影响。在最适培养条件下获得 1500U/L 的酶活。高效液相色谱分离的 5 个同工酶组分中以 P₂ 组分含量最高。低碳高氮培养基最适于酶的合成。降低氮和 KH₂PO₄ 含量致使各组分含量下降,而改变 MgSO₄ 和 CaCl₂ 浓度对 P₂ 组分无影响。表面活性剂吐温 80 主要通过提高细胞膜透性而增加酶的合成。黎芦醇对 5 种同工酶组分的合成均有诱导作用。培养基中各营养因子对木素过氧化物酶的合成存在着复杂的交互作用。

关键词 黄孢原毛平革菌, 木素过氧化物酶, 营养调控

1983 年 Kirk 和 Gold 两个研究小组分别报道在白腐菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochate chrysosporium*)中发现木素过氧化物酶(Lignin peroxidase)^[1,2]。此酶被认为是促使木素解聚的关键性酶^[3]。但是木素过氧化物酶最初被发现时的合成量很低(约 20U/L)^[1]。此后,经过对它的合成生理及培养条件的研究发现,此酶为次生代谢酶,受碳或氮限制的诱导启动合成^[4],为提高酶的产量,从培养方式^[5]、木素模型物的诱导^[6]、氧浓度的影响^[7]、细胞固定化培养^[8]、痕迹元素浓度的作用^[9]等方面进行了研究。在限碳振荡培养条件下获得 950U/L 的合成量^[10],极大地提高了酶的产量,然而距实际应用的需要尚相差很远。本文对黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶及其同工酶的营养条件进行了系统的研究,分析了多种碳源、氮源、表面活性剂等对产酶的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养方法

黄孢原毛平革菌(*Phanerochate chrysosporium*) ME-446(ATCC 34541)来自美国麦迪逊国家林产品研究所,由南京林业大学王传槐教授转赠。原菌株移接到麸皮浸汁斜面上,4℃保存。接种用的孢子悬液通过四层细纱布过滤除去菌丝,孢子浓度控制在 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml,每瓶接种量为 1×10^7 个孢子。

如无另外说明,均采用限碳培养基(L⁻¹):基本盐培养基^[11],葡萄糖 2g,酒石酸铵 6mmol,黎芦醇 1.5mmol,吐温 80lg,醋酸缓冲液 10mmol, pH4.5。基本盐培养基含

• 国家自然科学基金资助项目。

•• 现在中国科学院沈阳应用生态研究所。

本文于 1992 年 4 月 6 日收到。

(L^{-1}): KH_2PO_4 $1.47 \times 10^{-2} mol$, $MgSO_4$ $2.03 \times 10^{-3} mol$, $CaCl_2$ $6.8 \times 10^{-4} mol$, VB_1 $2.97 \times 10^{-5} mol$ 和 70ml 微量元素混合液(mol/L : 氨基乙酸 7.8×10^{-3} , $MgSO_4$ 1.2×10^{-2} , $MnSO_4$ 2.9×10^{-3} , $NaCl$ 1.7×10^{-2} , $FeSO_4$ 3.59×10^{-4} , $CoCl_2$ 7.75×10^{-4} , $CaCl_2$ 9.0×10^{-4} , $ZnSO_4$ 3.48×10^{-4} , $CuSO_4$ 4×10^{-5} , $AlK(SO_4)_2$ 2.1×10^{-5} , HBO_3 1.6×10^{-4} 和 $NaMoO_4$ 4.1×10^{-5}). 采用 20ml 培养液/250ml 三角瓶或 10ml 培养液/100ml 三角瓶, 39 C 静置培养 5—6 天. 试验均设三个重复. 收获后, 滤出培养液待测, 菌丝体 80 C 烘干称重.

1.2 分析测定方法

1.2.1 木素过氧化物酶活力用氧化黎芦醇的速率表示^[1]: 3.0ml 反应液中, 含 0.1mol/L 的酒石酸缓冲液, pH3.5, 5mmol/L 黎芦醇, 0.3ml 酶液(培养液或稀释液), 0.5mmol/L H_2O_2 . 30 C 反应, 检测加入 H_2O_2 后反应液在 310nm 波段光吸收的变化. 一个酶活力单位为每分钟氧化黎芦醇产生 $1\mu mol$ 的黎芦醛所需的酶量.

1.2.2 Mn-过氧化物酶: 以香草醛丙酮为底物, 测定反应液在 336nm 波段光吸收的变化^[11].

1.2.3 培养液中含糖量: 用 DNS 法测定^[12], 以葡萄糖做标准对照.

1.2.4 同工酶分析: 培养液超滤浓缩 5 倍(膜截留 $Mr=10\ 000d$), 浓缩液经 $0.3\mu m$ 孔径滤膜过滤, 滤液对蒸馏水透析. 在 Pharmacia (Piscataway, NJ) 的快速蛋白液体层析仪(FPLC) MonoQ 阴离子交换柱上层析^[13], 0.01—1mol/L 醋酸钠(pH6.0)连续梯度洗脱, 流速 0.5ml/min, 洗脱时间 40 分钟, 检测 409nm 波段光吸收值, 并分别收集吸收峰部分.

1.3 化学试剂

香草醛丙酮自己合成^[14], 其余均为市售化学纯或试剂纯. 1% 麸皮浸汁的制备: 10g 麸皮加水煮沸 20 分钟, 滤液加水至 1 000ml.

2 结果和讨论

2.1 木素过氧化物酶合成的营养条件

2.1.1 碳源: 在限碳(2g/L)条件下测定了不同碳源对酶合成的影响(表 1). 除 D-岩藻糖、葡萄糖甘露聚糖和果胶外, 其余各糖均是菌生长的良好碳源. 但糖结构对木素过氧化物酶合成的影响却很复杂. 如己醛糖 D-葡萄糖较己酮糖 L-山梨糖产酶高 3 倍; 还原性纤维二糖(β -葡萄糖- β -1,4-葡萄糖苷)与非还原性草糖(α -葡萄糖- α -1,1-葡萄糖苷)产酶相近, 而较之非还原性蔗糖(α -葡萄糖- β -1,1-果糖苷)高 5 倍; 不同来源的 β -D-吡喃型葡聚糖微晶纤维素、地衣多糖和海带多糖产酶量相当, 但低于纤维二糖, 而纤维二糖产酶又比 D-葡萄糖低, 与此类似, D-木糖合成的酶量比木聚糖高近 20 倍; 可溶性淀粉(α -1,4 型葡聚糖)产酶很低, 而淀粉不完全水解形成的寡聚环状糊精产酶比 D-葡萄糖还高. 由此可见, D-葡萄糖无论 α 型或 β 型均利于木素过氧化物酶的合成. 糖的还原性对产酶影响不显著. 菌分泌聚糖解聚酶对木素过氧化物酶的表达有抑制作用.

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on production of lignin peroxidase

碳源(2g/L) Carbon sources	酶活力(U/L) Enzyme activity	碳源(2g/L) Carbon sources	酶活力(U/L) Enzyme activity
三碳糖 Triose		寡糖 Mycose	265.2
甘油 Glycerol	126.3	非还原性三糖 Nonreducing trisaccharide	
戊醛糖 Aldopentose		D-松三糖 D-melezitose	75.8
D-核糖 D-ribose	168.0	上述糖等比混合 Mix of the above in equal number	400.0
D-木糖 D-xylose	227.3	吡喃型戊聚糖 Pyranose type pentosan	
L-阿拉伯糖 L-arabinose	122.1	木聚糖 Xylan	12.6
己醛糖 Aldohexose		呋喃型己聚糖 Furan type hexosan	
D-葡萄糖 D-glucose	324.2	菊糖 Inulin	46.3
己酮糖 Ketoheose		吡喃型己聚糖 Pyranose type hexosan	
L-山梨糖 L-sorbose	101.0	糊精 Dextrin	429.4
脱氧己糖 Deoxyhexose		可溶性淀粉 Soluble starch	42.1
D-岩藻糖 D-fucose	0	微晶纤维素 Avicel	172.6
L-岩藻糖 L-fucose	176.8	地衣多糖 Lichenin	193.7
鼠李糖 Rhamnose	4.2	海带多糖 Laminarin	164.2
还原二糖 Reducing disaccharide		其他 Others	
纤维二糖 Cellobiose	286.3	葡甘聚糖 Glucomannan	29.5
非还原二糖 Nonreducing disaccharides		果胶 Pectin	147.4
D-松二糖 D-turanose	0	麸皮浸汁(1%)Bran extract	256.8
蔗糖 Sucrose	54.7		

应特别指出的是环状糊精对产酶可能有独特的作用方式。

多种简单糖类同时存在时的产酶量比单用葡萄糖高,推测在一种糖利用完和另一种糖的分解酶表达之前,菌体对“暂时性的碳限制”会产生反应而启动木素过氧化物酶的转录表达,如此多次的刺激而获得更高的酶活。这对进一步提高产酶的设计提供了新的思路。

2.1.2 氮源:所测试的 12 种氮源均可支持菌的正常生长,但产酶差异显著(表 2)。复杂有机氮酵母浸汁和牛肉膏培养基中木素过氧化物酶活最高,但菌丝体的产酶效率(酶活/mg 菌丝)却以酒石酸铵最好。由表可见,酶的表达与菌丝生长量无显著联系。以氨基酸为

氮源中,L-谷氨酸可产生 257.5U/L 的酶活,但甘氨酸却抑制木素过氧化物酶的表达。

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on production of lignin peroxidase

氮源(12mmol/L N) Nitrogen sources	菌丝重(mg) Mycelium weight	酶活力(U/L) Enzyme activity
无机氮 Inorganics		
NH_4NO_3	14.2	237.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14.3	283.6
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	17.1	98.0
尿素 Urea	19.2	0
有机氮 Organics		
乙醇胺 Ethanolamine	20.1	0
丙烯酰胺 Acrylamide	18.5	247.8
酒石酸铵 $(\text{NH}_4)_2$ -tartrate	13.7	350.6
柠檬酸铵 $(\text{NH}_4)_3$ -citrate	16.9	0
甘氨酸 Glycine	21.4	0
L-谷氨酸 L-glutamic acid	20.3	257.5
复杂氮 Complexes		
酵母浸汁 Yeast extract	18.3	389.2
牛肉膏 Beef extract	20.7	436.9

2.1.3 基本盐:Kirk 等 1986 年报道^[9],培养基中微量元素增加 6 倍,可使木素过氧化物酶活力从 42U/L 提高到 95U/L。但基本盐中其他组分对产酶的影响尚未见报道。本文采用正交试验分析了基本盐各组分及其交互作用的影响(表 3,4)。

表 3 基本盐中各因子的正交设计 $L_{16}(2^{15})$

Table 3 Design of orthogonal experiment $L_{16}(2^{15})$ to factors in basal salts

因 子 Factors		KH_2PO_4 (mmol/L.)	MgSO_4 (mmol/L.)	CaCl_2 (mmol/L.)	微量元素(TE) Trace elements	V_{B} ($\mu\text{mol/L.}$)
水 平 Levels	-1 1	14.7 29.4	2.03 4.06	0.68 1.36	$\times 2/7^*$ $\times 10/7$	2.97 5.94

* 成分及浓度见“材料与方法”。

Components and concentrations see “Material and Methods”.

表 4 表 3 中试验结果的方差分析
Table 4 Variance analysis to results of experiment of Table 3

变异来源 Variance sources	F 值 F value	变异来源 Variance sources	F 值 F value
KH ₂ PO ₄	121.9**	KH ₂ PO ₄ · V _{BI}	16.5**
MgSO ₄	59.4**	MgSO ₄ · CaCl ₂	3.9
CaCl ₂	22.4**	MgSO ₄ · TE	<1
TE	15.8**	MgSO ₄ · V _{BI}	9.4**
V _{BI}	-1.6	CaCl ₂ · TE	<1
KH ₂ PO ₄ · MgSO ₄	-7.1*	CaCl ₂ · V _{BI}	-27.9**
KH ₂ PO ₄ · CaCl ₂	-3.3	TE · V _{BI}	<1
KH ₂ PO ₄ · TE	1.7		

$F_{0.05(1,33)}=4.13; F_{0.01(1,33)}=7.44$
* 在 0.05 水平显著 Significance at level of 0.05;
** 在 0.01 水平显著 Significance at level of 0.01.

结果分析表明,分别提高 KH₂PO₄、MgSO₄ 和微量元素浓度均极显著地提高木素过氧化物酶活,V_{BI} 提高浓度一倍对产酶无影响,CaCl₂提高浓度抑制酶活的表达。各因子间交互作用复杂,如 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 同时提高浓度可显著降低它们的增加酶活效应,而 KH₂PO₄ 和 V_{BI} 同时提高浓度所产生的交互作用却极显著地提高酶活。

2.1.4 碳氮比:以糊精和酒石酸铵为碳氮源时,低氮高碳培养基合成的酶活极低,而高碳高氮培养却获得了约 500U/L 的酶活(图 1)。这与其他作者报道的以葡萄糖和酒石酸铵为碳氮源时的结果不同^[5,15,16]。说明在本文的培养条件下,限碳或限氮并非木素过氧化物酶合成所必需。然而还原糖的存在强烈地抑制酶的合成。一般情况是高浓度的酒石酸铵和低浓度的糊精有利于酶的合成。

2.1.5 黎芦醇和吐温 80 对酶活力的影响:Faison 等证明黎芦醇对木素过氧化物酶的合成有诱导作用^[8]。而 Jager 等在培养基中添加低浓度的表面活性剂吐温 80,成功地解除了振荡培养对酶合成的抑制^[6]。我们的研究表明(图 2),在限碳静置培养条件下,不加黎芦醇而只加吐温 80,酶活提高有限;不加吐温 80 而只加黎芦醇,酶活大幅度提高;同时添加两种物质,酶活较只加一种成分的酶活增高,但同时提高黎芦醇和吐温 80 浓度所产生的交互作用却显著降低其增酶效应。

2.1.6 最适产酶培养基:根据上述试验结果,我们对合成本素过氧化物酶的培养基成分进行了优化试验。获得的最适培养基为(L⁻¹):糊精 2g,酒石酸铵 16mmol,黎芦醇 3 mmol,吐温 80 4g,醋酸缓冲液(pH4.5)10mmol,KH₂PO₄ 44.1 mmol,MgSO₄ 6.09 mmol,CaCl₂ 0.55 mmol,V_{BI} 2.9/μmol 和微量元素混合液 100ml。产酶最适时间 5 天。以此培养可获得 1500U/L 的酶活,这在目前的报道中是最高的^[10,17]。

2.2 营养因子对木素过氧化物酶同工酶组分合成的影响

用 HPLC 分析了不同培养条件下木素过氧化物酶同工酶组分(图 3)。在 409nm 波段

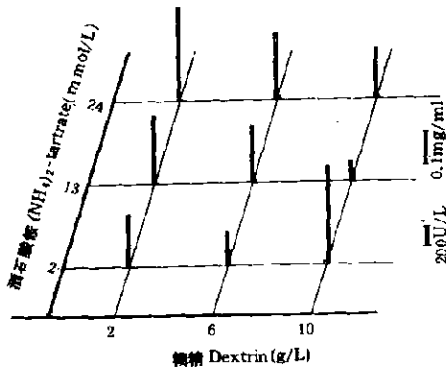


图 1 碳氮比对产酶的影响

Fig. 1 Effects of ratio of carbon and nitrogen on production of lignin peroxidase

□ 酶活 Enzyme activity; ■ 还原糖含量 Reduced sugar contents;

培养基 Medium: 黎芦醇 (Veratryl alcohol) 3 mmol/L; 吐温 80 (Tween 80) 2 g/L; KH_2PO_4 29.4 mmol/L; MgSO_4 4.06 mmol/L; 其余不变 The others unchanged.

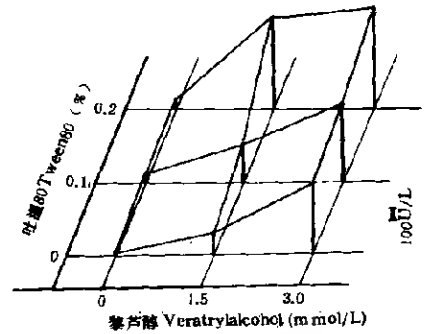


图 2 黎芦醇和吐温 80 对产酶的影响

Fig. 2 Effects of veratryl alcohol and tween 80 on production of lignin peroxidase

粗垂线的高度表示各试验点的酶活力

Height of the thick vertical bars represents lignin peroxidase activity at the experimental points;

培养基 Medium: 1% 麸皮浸汁 Bran extract; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mmol/L; KH_2PO_4 29.4 mmol/L; MgSO_4 4.06 mmol/L; 其他未变 The others unchanged.

检测分离出 8 条明显的峰带, 其中 5 个峰具黎芦醇氧化活性 (P_1 、 P_2 、 P_4 、 P_5 、 P_8), 4 个峰具香草醛丙酮氧化活性 (P_1 、 P_3 、 P_6 、 P_7)。在木素过氧化物酶各组分中, 以 P_2 含量最大, P_5 次之, 其余含量均较少。

图 3-B→H 为改变对照 (图 3-A) 培养基中某一成分后, 木素过氧化物酶活力及各组分含量的变化。在同样的限碳条件下, 以葡萄糖代替糊精作碳源, 则 P_1 含量增加成分主要组分之一, P_8 亦显著增加, P_2 和 P_5 有不同程度的下降 (图 3-A、B)。降低培养基中氮浓度, 则木素过氧化物酶各同工酶组分均下降 (图 3-A、C)。

图 3-D 是培养基中不添加外源黎芦醇时的产酶情况, 可见尽管黄孢原毛平革菌在次生代谢阶段能从头合成黎芦醇^[18], 但其合成量不足有效诱导木素过氧化物酶的合成。添加外源黎芦醇对几种组分的合成均有诱导作用 (图 3-A、D)。从图 3-A、E 的比较看, 吐温 80 在静置浅层培养中的作用可能主要是提高了细胞膜的渗透性, 解除已合成的木素过氧化物酶在细胞内对酶基因转录或酶 mRNA 翻译的阻遏, 从而提高酶的合成。

KH_2PO_4 和 MgSO_4 降低浓度均导致酶组分含量的降低 (图 3-A、F、G), 但程度不同, 机理也不一样。 KH_2PO_4 对木素过氧化物酶各组分的影响相近, 对 Mn-过氧化物酶的影响与木素过氧化物酶相似; 而 MgSO_4 的作用机制复杂, 它对木素过氧化物酶各组分的作用程度不同, 而且在降低木素过氧化物酶的同时, 却提高了 Mn-过氧化物酶的含量。提高

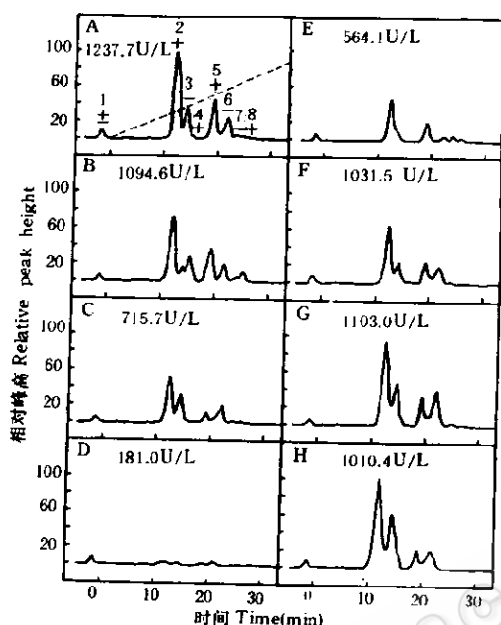


图 3 培养基成分对同工酶组分合成的影响

Fig. 3 Effects of ingredients in medium on syntheses of the isoenzymes

A. 对照 Control; B. 糊精 Dextrin→葡萄糖 Glucose; C. 酒石酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{-tartrate}$ 24→2mmol/L; D. 藜芦醇 Veratryl alcohol 3mmol/L→0; E. 吐温 80 Tween80 2g/L→0; F. KH_2PO_4 29.4→14.7mmol/L; G. MgSO_4 4.06→2.03mmol/L; H. CaCl_2 0.68→1.36mmol/L; “+”: 木素过氧化物酶 Lignin peroxidase, “-”: Mn-过氧化物酶 Mn-peroxidase.

CaCl_2 浓度, 主要导致 P_1 组分的降低, 对 P_2 没有影响(图 3-A、H)。

文献报道^[19,20], 合成木素过氧化物酶的遗传信息由多个结构基因组成。本文结果表明, 不同的培养基成分对酶各组分的影响方式不同, 说明酶合成调控的复杂性。改变培养条件对黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶总量的影响显著。

参考文献

- [1] Tien M, Kirk T K. *Science*, 1983, **221**: 661—663.
- [2] Glenn J K et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **114**: 1077—1083.
- [3] Tien M. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1987, **15**: 141—163.
- [4] Tien M, Kirk T K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 2280—2284.
- [5] Faison B D, Kirk T K. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**: 299—304.
- [6] Jager A et al. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**: 1274—1278.
- [7] Leisola M S A, Fiechter A. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, **29**: 33—36.
- [8] Linko Y Y et al. *J Biotechnol*, 1986, **4**: 283—291.
- [9] Kirk T K et al. *Enzyme Microb Technol*, 1986, **8**: 27—32.
- [10] Ma D B et al. *Wood Res*, 1990, **77**: 35—41.
- [11] Paszczynski A et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, **29**: 37—41.

- [12] Miller G L. *Anal Biochem*, 1961, **2**: 521—528.
- [13] Farrell R L *et al*. *Enzyme Microb Technol*, 1989, **11**: 322—328.
- [14] Huynh V B, Crawford R L. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, **28**: 119—123.
- [15] Leisola M S A *et al*. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 419—424.
- [16] Gold M H *et al*. *Arch Biochem Biophys*, 1984, **234**: 353—362.
- [17] Kirk T K *et al*. *Ann Rev Microbiol*, 1987, **41**: 465—505.
- [18] Lunquist K *et al*. *Phytochemistry*, 1978, **17**: 1676—1678.
- [19] Tien M, Tu C P D. *Nature*, 1987, **326**: 520—523.
- [20] DeBoer H A. *Gene*, 1987, **60**: 93—102.

NUTRITIONAL REGULATION OF SYNTHESIS OF LIGNIN PEROXIDASE BY *PHANEROCHATE* *CHRYSOSPORIUM* ME-446

Li Yuezhong Gao Peiji Wang Zunong

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The effects of nutritional conditions on synthesis of lignin peroxidase and its isoenzymes by *Phanerochate chrysosporium* ME-446 were studied. Under the optimal culture conditions, the activity of 1 500U/L was obtained. Of the five isoenzymes separated with high performance liquid chromatography, P₂ content is the highest. Low carbon and high nitrogen medium is most suitable for synthesis of the enzyme. Lower contents of nitrogen or KH₂PO₄ make decrease of all isoenzymes, while changing concentrations of MgSO₄ or CaCl₂ has no effects on P₂ component. Tween80 mainly increases permeability of cell membrane. Veratryl alcohol induces synthesis of each of lignin peroxidase isoenzymes. There exist complicated mutual functions between nutritional factors in culture on the enzyme synthesis.

Key words *Phanerochate chrysosporium*, Lignin peroxidase, Nutritional regulation