

# 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶的研究

## I. 富氮培养基筛选产酶的真菌

周金燕 张发群

(中国科学院成都生物研究所,成都 610015)

桑原正章

(日本京都大学木质科学研究所,京都)

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份,是仅次于纤维素的第二再生有机资源<sup>[1]</sup>。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木质纤维材料方面都具有工业潜力。生物分解木质素的研究已取得许多进展<sup>[1,2]</sup>,1983年从木材白腐菌——黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的培养液中发现了木质素过氧化物酶(*Lignin peroxidase*)<sup>[3-6]</sup>,随后日本的桑原等<sup>[7]</sup>又在同株菌的培养液中分离出另一组降解木质素的锰过氧化物酶(*Manganese peroxidase*,简称 MnP)。由于该菌比其它真菌具有更强降解木质素的能力<sup>[8]</sup>,因此有关降解木质素的研究都主要集中在这株上<sup>[9]</sup>。

本文采用富氮培养法筛选产生胞外锰过氧化物酶和漆酶的真菌,并比较了两种培养基对真菌分泌锰过氧化物酶和漆酶的影响。

### 材料和方法

#### (一)材料

1. 菌种:实验菌株均由日本京都大学木质科学研究所提供。
2. 试剂:牛血清白蛋白为美国 Sigma 公司产品,其它试剂均为日本制药公司产品。酵母粉的氮含量为 6%—9%,蛋白胨(polypepton)氮含量为 12.5%—14.5%。

#### (二)方法

1. Kirk 低氮培养基<sup>[10]</sup>。
2. PM 富氮培养基:1%葡萄糖,0.02%酵母粉,1%Kirk 无机盐溶液<sup>[10]</sup>,含有 60nmol/L 氮的蛋白胨和 20nmol/L 苯二酸钠缓冲液,pH4.5。
3. 菌种培养:将 8ml 培养基装入 100ml 三角瓶中,灭菌后接种。菌种直接取叙面种子,先在灭菌乳钵中研磨,再接种到三角瓶中。30℃静止培养 8 天。
4. 二级培养:斜面种子接种到装有适量培养基的 300ml 三角瓶中,预培养 3—5 天,再接种到盛有 15ml 培养基的 200ml 三角瓶中,30℃静止培养,时间见结果。
5. 酶活力测定:
  - (1) MnP 活力:酶活力是在  $Mn^{2+}$  存在下和除去  $Mn^{2+}$  条件下测定的。反应体系含 50mmol/L 琥珀酸

钠缓冲液(pH4.5),0.4mmol/L 愈创木酚和 0.1mmol/LH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,测定 465nm 处吸光度在单位时间内的增加。定义每分钟引起一个吸光度的增加所需的酶液量为一个活力单位。

(2) 漆酶活力:反应混合液含 50mmol/L 琥珀酸钠缓冲液(pH4.5),0.4mmol/L 愈创木酚和适量酶液,在 465nm 处测定吸光度在一定时间内的增加。

6. 蛋白质浓度测定。参见 Bradford 方法<sup>[12]</sup>,用牛血清白蛋白作标准。

## 结 果

### (一) 高氮培养基中分泌的 MnP 和漆酶活性

MnP 降解木质素,必须要有二价锰离子(Mn<sup>2+</sup>)存在,MnP 首先将 Mn<sup>2+</sup>氧化成 Mn<sup>3+</sup>,Mn<sup>3+</sup>再氧化降解有羟基末端的木质素和其它一些酚类有机物<sup>[11,13,14]</sup>。用富氮法培养的供试菌株,分泌的 MnP 的检出是采用测定该酶氧化的产物 Mn<sup>3+</sup>与乳酸形成的络合物<sup>[11]</sup>,该络合物在 240nm 处有吸收峰(图 1)。

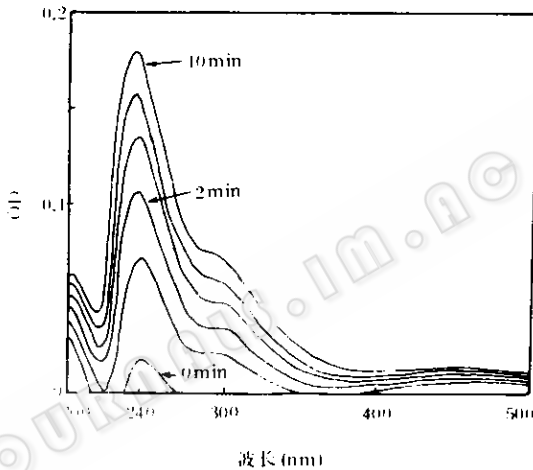


图 1 Mn<sup>3+</sup>-乳酸络合物的吸收光谱  
(酶:乳白靶菌 IFO 5367 的培养液)

在富氮培养条件下 13 株供试菌中有 6 株既分泌 MnP,又分泌漆酶,其中 K-1198、K-1982 和 K-1957 三株革盖菌的活力较高(表 1)。在试验条件下,有 4 株菌只产生 MnP,其中烟管菌 K-2679 的酶活性较高。实验中发现,该菌和乳白靶菌 IFO 5367 除产生 MnP 外,还产生辣根过氧化物酶(数据未显示)。从表 1 可以看出,菌株生长与酶活无直接关系,随菌株不同而异。如 IFO 6502 菌生长很好,却无酶活。

### (二) 低氮培养基中分泌的 MnP 和漆酶活性

将在富氮培养基产酶和不产酶的几株菌,用低氮培养基进行对照培养,结果见表 2。在富氮培养基中产酶的 K-1982、K-1957 和 K-2679 菌株,在对照培养中活性明显降低;而在富氮培养基中不产酶的菌,如 IFO 6502,在对照培养中依然不产生酶活。除 K-2666 菌株在低氮培养基中生长比富氮培养基中生长好外,低氮培养基中菌株的生长都比富氮培养基中生长差。

表 1 富氮培养基中的锰过氧化物酶和漆酶活力

菌株	菌株号	锰过氧化物酶活力 (U/ml)		漆酶活力 (U/ml)		生长	
		5d	8d	5d	8d	5d	8d
<i>Coriolus verticillatus</i>	K-1982	0.64	0.41	0.02	0.26	++	++
<i>Coriolus verticillatus</i>	K-1957	0.31	0.20	0.10	0.17	+	++
<i>Coriolus consors</i>	K-1198	0	0.32	0	0.15	+	++
<i>Coriolus versicolor</i>	IFO 30388	0	0.17	0	0.06	+	++
<i>Pleurotus ostreatus</i>	IFO 30776	0	0.07	0.06	0.08	-	+
<i>Pleurotus</i> sp.	K-1415	0	0.05	0	0.02	-	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	FL-21	0.08	0.26	0	0	++	++
<i>Bjerkandera adusta</i>	K-2679	0.90	0.61	0	0	++	++
<i>Irpez lacteus</i>	IFO 5367	0	0.37	0	0	+	++
<i>Farolus arcularis</i>	IFO 4959	0	0	0.04	0	+	++
<i>Coriolus hirsutus</i>	IFO 4917	0	0.18	0	0	++	++
<i>Schizophyllum commune</i>	IFO 6502	0	0	0	0	++	++
<i>Trachyderma tsunodaie</i>	K-2666	0	0	0	0	-	-

++: 生长旺盛; +: 生长; -: 未生长

表 2 低氮培养基中的锰过氧化物酶和漆酶活力

菌株号	锰过氧化物酶活力 (U/ml)		漆酶活力 (U/ml)		生长	
	5d	8d	5d	8d	5d	8d
K-1982	0.19	0	0.03	0.05	+	++
K-1957	0.06	0	0	0	+	++
K-2679	0.01	0	0	0	+	+
IFO 5367	0	0.86	0	0	+	+
IFO 4917	0	0	0	0	+	+
IFO 4959	0	0	0	0	+	+
IFO 6502	0	0	0	0	+	+
K-2666	0	0	0.03	0.01	+	+

++: 生长旺盛; +: 生长

### (三) 酶活力与胞外蛋白质浓度的关系

将几株产 MnP 活性的菌进行二级培养,对酶活及胞外蛋白质浓度随培养时间的变化进行了测定。结果发现在低氮条件下,酶活力很低(如图 2-A 中的 IFO 5367 菌株;K-2679 和 K-1198 两株菌活力接近零),该条件下菌体向胞外分泌的蛋白质也很低。富氮培养基中,三株菌的酶活力及胞外蛋白浓度都较高(图 2-B)。这说明限制氮源条件不利菌体向胞外分泌蛋白质和提高酶活力。

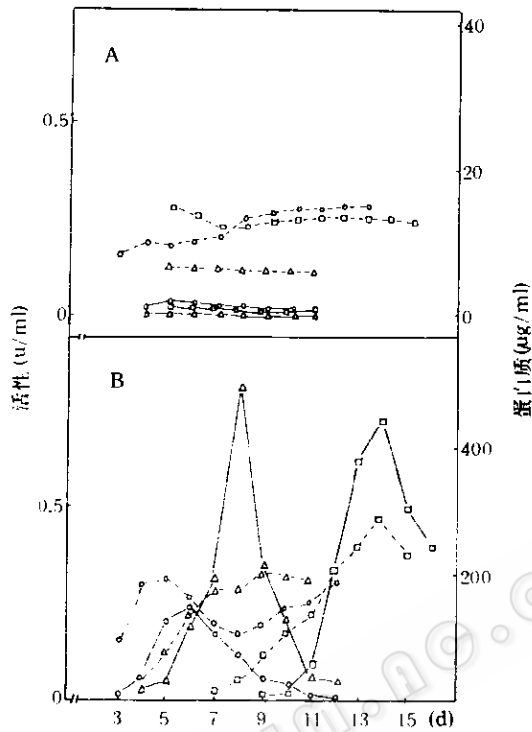


图2 产锰过氧化物酶和胞外蛋白质的时间过程

A. 低氮培养; B. 富氮培养

○: 乳白担菌 IFO 5367; △: 烟管菌 K-2679; □: 蛙贝革盖菌 K-1198  
— 酶活性; - - 蛋白质

### 讨 论

在木质素的生物降解研究中,营养氮的限制一直被认为有利于木质素的降解,但是大多使用的菌株都是黄孢原毛平革菌<sup>[15-17]</sup>。另一方面,氮的限制不利于菌体合成蛋白,有人认为通过限氮培养基生产大量降解木质素的酶不是一个好方法<sup>[18-19]</sup>。我们用富氮培养法取得了比较好的结果,与限氮培养法比较,几株供试菌株的胞外酶活力和胞外蛋白浓度均有显著提高。由于培养基中氮源丰富,有利于进一步扩大培养,提高酶的生产量。

自从黄孢原毛平革菌的培养液中分离出锰过氧化物酶,又有采绒革盖菌(*C. versicolor*)和 *Phiebia radiata* 产锰过氧化物酶的报道<sup>[20-21]</sup>。本实验检测出的产锰过氧化物酶的烟管菌和乳白担菌都未见报道,而且这两株菌都未测到漆酶活性,这一特性与黄孢原毛平革菌至今还未发现漆酶的特性相似。

### 参 考 文 献

- [1] Crawford, R. L. et al. ; *Enzyme Microbiol. Technol.* , **6**:433-480,1984.
- [2] Higuchi, T. ; *Wood Sci. Technol.* , **24**:23-63,1988.
- [3] Gold, M. H. et al. ; *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*, p. 219-222, Eds. , Uni. Tokyo, 1983.
- [4] Kirk, T. K. et al. ; *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*, p. 233-245, Eds. , Uni. Tokyo,

1983.

- [5] Glenn, J. K. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **114**:1077—1083, 1983.
- [6] Tien, M. et al. : *Science* , **221**:661—663, 1983.
- [7] Kuwahara, M. et al. : *FEBS Lett.* , **169**:247—250, 1984.
- [8] Kirk, T. K. et al. : *Ann. Rev. Microbiol.* , **41**:465—505, 1987.
- [9] Buswell, J. A. et al. : *CRC Critical Reviews in Biotechnology* , **6**:1—60, 1987.
- [10] Kirk, T. K. et al. : *Arch. Microbiol.* , **117**:277—285, 1978.
- [11] Glenn, J. K. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **251**:688—696, 1986.
- [12] Bradford, M. M. : *Anal. Biochem.* , **72**:248—254, 1976.
- [13] Glenn, J. K. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **242**:329—341, 1985.
- [14] Paszczynski, A. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **244**:750—765, 1986.
- [15] Tien, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , **81**:2280—2284, 1984.
- [16] Gold, M. H. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **243**:353—362, 1984.
- [17] Faison, B. D. et al. : *Appl. Env. Microbiol.* , **49**:299—304, 1985.
- [18] Kawai, S. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **262**:99—110, 1988.
- [19] Kimura, Y. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **32**:436—442, 1990.
- [20] Johansson, T. et al. : *Acta. Chem. Scand.* , **41**:762—765, 1987.
- [21] Karhunen, E. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **279**:25—31, 1990.

## STUDIES ON THE Mn-PEROXIDASE AND LACCASE FROM FUNGUS

### I. SCREENING OF FUNGUS FOR Mn-PEROXIDASE AND LACCASE USING HIGH-NITROGEN CULTURE

Zhou Jinyan Zhang Faqun

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610015)

Masaaki Kuwahara

(Wood Research Institute of Kyoto University, Japan)

A cultivation method using high-nitrogen culture was developed for the screening of Mn-peroxidase and laccase by fungi. *Irpex lacteus* and *Bjerkandera adusta* produced Mn-peroxidase in a high-nitrogen culture. *Coriolus verllereus* and *Coriolus consicolor* produced Mn-peroxidase and laccase. Analyses of activities and protein concentration showed that a much higher level of activity and of protein concentration in a high-nitrogen culture compared to that in Kirk's low-nitrogen culture.

**Key words** Manganese peroxidase; Laccase; Fungus