



白腐菌SQ01锰过氧化物酶对联苯中间代谢物的转化

杨秀清*, 张新宪

山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: 【目的】在对白腐菌栓菌(*Trametes* sp.) SQ01锰过氧化物酶(MnP)纯化的基础上, 通过MnP对HOPDAs的转化实验, 了解白腐菌 MnP对2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA)及其衍生物的作用, 揭示MnP新的催化特性。【方法】利用紫外可见光谱法分析锰过氧化物酶对10种不同取代基的HOPDAs转化情况, 并对锰过氧化物酶的稳态动力学参数进行了测定; 红外光谱法分析了HOPDA及其产物的分子结构。【结果】锰过氧化物酶可以转化HOPDA及其卤代HOPDAs, 特别是锰过氧化物酶可以催化3,8,11-3Cl HOPDA, 而这一物质几乎不能被联苯水解酶(2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯酸水解酶)和红球菌(*Rhodococcus* sp.) R04转化。稳态动力学分析表明, 在5种HOPDAs中, HOPDA是锰过氧化物酶的最适底物, 3,10-2F HOPDA的转化效率(k_{cat}/K_m)是最高的。紫外可见光谱分析表明, 锰过氧化物酶在转化HOPDA及其衍生物时最大吸收峰在可见光区均会发生蓝移。红外分析表明, 锰过氧化物酶可以使HOPDA的共轭双烯转化为单烯, C_p 上的羟基消失。【结论】锰过氧化物酶能够有效降解HOPDA及其衍生物, 这为联苯及其中间代谢物的顺利降解提供了新的策略。

关键词: 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA), 锰过氧化物酶, 白腐菌, 栓菌

白腐真菌(white rot fungi)它是一种专门用于降解木质素、纤维素、半纤维等物质的真菌, 降解酶系统主要包括3种酶: 木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)、锰过氧化物酶(manganese-dependent peroxidase, MnP)、漆酶(laccase, Lac)。这3种酶都具有多种各自的同工酶, 白腐真菌的降解能力与这些酶的产生密切相关。白腐菌独特和有效的降解能力, 使其成为环境保护的优势资

源, 白腐菌能够对制浆造纸废水、橄榄油生产废水、军火工业废水和工业有机废水进行生物降解。近年来, 白腐菌对污染土壤的整治表现出强劲的发展势头, 如对污染土壤中的PCP的原位去除和固相处理, 污染土壤中PAH的降解和氧化等^[1]。

MnP (EC 1.11.1.13) 是几乎所有的木生白腐真菌和各种土壤中的枯叶分解真菌所产生的, 是最

基金项目: 国家自然科学基金(3080030); 山西省自然科学基金(2014011030-3)

*通信作者。Tel/Fax; +86-351-7010215; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-06; 修回日期: 2016-01-11; 网络出版日期: 2016-01-13

为普遍的木质素修饰过氧化物酶, 分子质量在38.0–62.5 kDa, 该酶对降解木质素结构起着至关重要的作用, 被认为是木质素降解的关键酶^[2–3]。大多数的MnP催化均依赖H₂O₂, 小部分MnP可以直接氧化酚类及非酚类芳香族化合物^[1], 其底物包括酚类、胺类、非酚类芳香族化合物、羧酸、硫醇、不饱和脂肪酸等。Pasti等^[4]研究表明MnP单独作用同样可以降解多种不同类型的污染物。由于MnP可以降解多种底物, 近年来越来越多地被应用于纸浆生物漂白、有机污染物(DDT、2,4,6-三氯苯酚、二氯苯胺等)降解、染料脱色等方面^[5–6]。

多氯联苯(PCB)是分布很广的有毒有机污染物, 是土壤和沉积物中颇受关注的污染物, 对环境和人类健康的危害很大且较难降解。典型的多氯联苯/联苯降解途径中, 通过间位键断裂生成黄色开环化合物2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA)^[7](图1)。随后联苯水解酶(BphD)将HOPDA水解生成苯甲酸和2-羟基-2,4-戊二烯酸(HPD)^[8], 然而其中间代谢物HOPDAs会存在许多天, 并限制多氯联苯的顺利降解, 使之不能够被完全矿化, 从而形成了二次污染; 研究还发现HOPDAs可能比其前体(多氯联苯)具有更大的毒害作用^[9]。

前文我们报道了白腐菌栓菌(*Trametes* sp.)

SQ01产生的漆酶可以有效转化多种HOPDAs^[10], 最近我们发现栓菌SQ01 MnP像其产生的漆酶一样可以降解HOPDA, 为了揭示MnP转化HOPDA的特性及催化的可能机制, 本文采用紫外可见光谱法和红外光谱法对锰过氧化物酶转化HOPDA及其衍生物进行了分析。该研究不仅拓展了锰过氧化物酶的作用底物, 而且为多氯联苯及其类似物的顺利降解提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 联苯购自军事医学科学院试剂站, 4-氟联苯(4-FB)、4,4'-二氟联苯(4,4'-FB)、4-溴联苯(4-BrB)、2-氯联苯(2-CB)、2,2'-连氮-双-(3-乙基-6苯并噻唑磺酸)二胺(ABTS)、4-氯联苯(4-CB)、2,3,4,5-四氯联苯(2,3,4,5-CB)、3,4-二氯联苯(3,4-CB)、4-甲基联苯(4-MB)全部购自美国Fluka公司。联苯水解酶(BphD)由本实验室保存。PerkinElmer LAMBDA35型UV-vis分光光度计、傅立叶变换红外光谱仪, HH显恒温水浴锅、PH试纸、离心机、30 °C恒温振荡摇床, 30 °C培养箱。

1.1.2 菌种及其生长培养基: 菌株SQ01和红球菌(*Rhodococcus* sp.) R04, 均由本实验室保存。

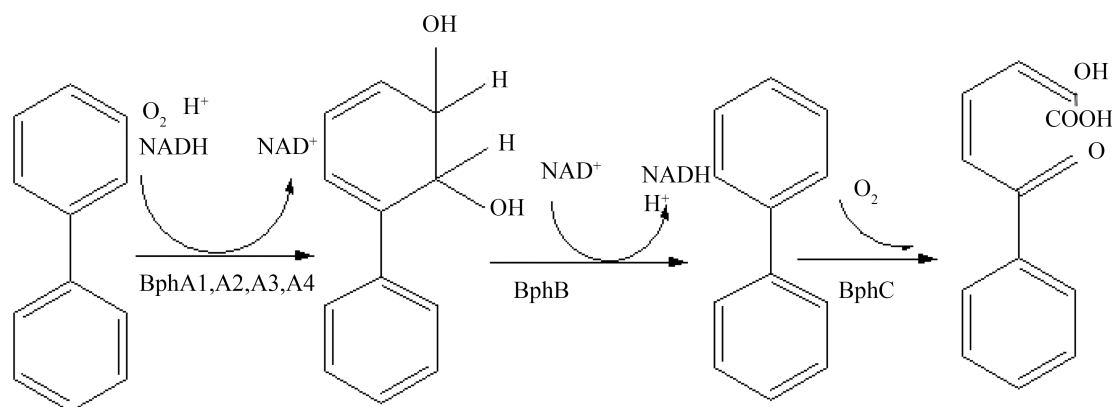


图 1. 联苯的生物降解途径^[7]

Figure 1. Degradation pathway of biphenyl^[7].

(1) PDA培养基: 马铃薯提取液1 L, 葡萄糖20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, VB_1 1 mg, 琼脂20 g。(2) 白腐菌产酶培养基: 葡萄糖10 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 琥珀酸1.18 g, 酒石酸铵1.84 g, 100 mg/L VB_1 10 mL, 微量元素溶液70 mL, 吐温80 0.5 mL, 蒸馏水1 L。(3) 红球菌R04基础培养基: KH_2PO_4 2.93 g, K_2HPO_4 5.87 g, MgSO_4 0.30 g, FeSO_4 0.01 g, NaCl 2.00 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.00 g, NiSO_4 0.3 mg, 微量盐溶液2 mL, 蒸馏水1 L。

1.2 锰过氧化物酶的纯化

将 -20°C 的丙酮加到粗酶液中达25% (V/V), 12000 r/min离心20 min, 弃去不溶性黏状物。向上清中继续加丙酮到浓度为66% (V/V), -20°C 静置2–3 h沉淀蛋白。12000 r/min离心20 min, 沉淀溶解于20 mmol/L pH 7.0的Tris-HCl缓冲液(缓冲液A)中。将待纯化的蛋白上样于已用缓冲液A平衡过的DEAE-cellulose 52层析柱。用0–0.6 mol/L $\text{NaCl} \cdot \text{Tris-HCl}$ 线性梯度洗脱并分步收集洗脱液。测定各管洗脱液中锰过氧化物酶的活性, 4°C 保存备用。

1.3 酶活测定

1.3.1 锰过氧化物酶(MnP)酶活测定: 方法参考文献[11]略做修改, 反应体系为20 mmol/L酒石酸-酒石酸钠缓冲液(pH 4.5) 0.8 mL、2 mmol/L MnSO_4 溶液0.05 mL、酶液0.1 mL、2 mmol/L H_2O_2 0.05 mL, 测定238 nm处吸光值在单位时间内的变化 $[\varepsilon_{238}=6500 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})]$ 。以每分钟生成1 $\mu\text{mol Mn}^{3+}$ 所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.3.2 联苯水解酶(BphD)酶活测定: 方法参考文献[12]进行, 每分钟转化1 μmol HOPDA所需BphD的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.4 HOPDAs制备和提纯

2,3-二羟基联苯(DHBP) 0.5 mg溶解于丙酮中, 在磷酸钾缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)中加入适量DHBP与0.2 mg的2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶

(BphC), 反应至 OD_{435} 不再增加, 离心(12000 r/min, 10 min)取上清用盐酸酸化使pH在1–2范围内, 用等体积乙酸乙酯萃取3次, 冷冻干燥得到纯的HOPDA粉末。

采用静息细胞法^[13]处理R04菌株, 按文献方法制备HOPDAs^[9], 当HOPDAs在各自最大吸收波长处的吸光值达到最大时, 将培养液离心(12000 r/min, 10 min), 取上清并进一步制备HOPDAs干粉。

1.5 锰过氧化物酶转化HOPDAs

反应体系为20 mmol/L, pH 8.0磷酸钾缓冲液^[14] 1.5 mL, HOPDAs干粉, 0.1 U MnP 0.5 mL, 在300–550 nm波长范围内进行紫外可见光谱扫描, 以煮沸灭活的MnP作为对照, 反应在室温下进行。

1.6 全波长扫描分析BphD、Lac、MnP转化HOPDA

在含有一定浓度的HOPDA的磷酸钾缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)中分别加入0.1 U BphD、0.1 U Lac和0.1 U MnP, 在200–600 nm波长范围内进行紫外可见光谱扫描, 以煮沸灭活的BphD、Lac和MnP作为对照。

1.7 动力学试验

分别配制浓度为5、10、15、20、25 mmol/L的磷酸钾缓冲液(pH 8.0), 加入酶液混匀, 反应体系为2 mL, 反应温度为室温, 在紫外可见分光光度计下以1 min的时间间隔扫描15 min, 得到时间-吸光值变化曲线, 曲线斜率即酶反应速率, 采用Lineweaver-Burk双倒数作图法, 求出其米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_m , $k_{cat}=V_{max}/[E]$, $[E]$ 为酶浓度; 转化效率 $=k_{cat}/K_m$, 实验重复3次, 实验数据以3次平均值 \pm 标准偏差表示。

1.8 红外光谱分析

将一定量的HOPDA粉末分别溶解于磷酸钾缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)中, 加入1 U MnP, 当反应溶液黄色完全消失时, 加入盐酸酸化使pH在1–2范围内, 然后用等体积乙酸乙酯萃取3次, 最

后冷冻干燥后得到锰过氧化物酶催化HOPDA的产物；然后将HOPDA、以及锰过氧化物酶催化HOPDA所制备的产物分别取1 mg与80–100 mg KBr混合，于研钵中在红外烘灯下边烘边研磨，并在压片机上压成片(压力不超过4 MPa)。测试条件：波数 450–4000 cm^{-1} ，扫描次数32次，分辨率 4 cm^{-1} 。

2 结果和讨论

2.1 锰过氧化物酶的纯化

经2次丙酮沉淀和DEAE-cellulose52柱对锰过氧化物酶进行纯化。纯化后的蛋白经过SDS-PAGE检测为单一条带，MnP蛋白分子量为45 kDa(图2)。

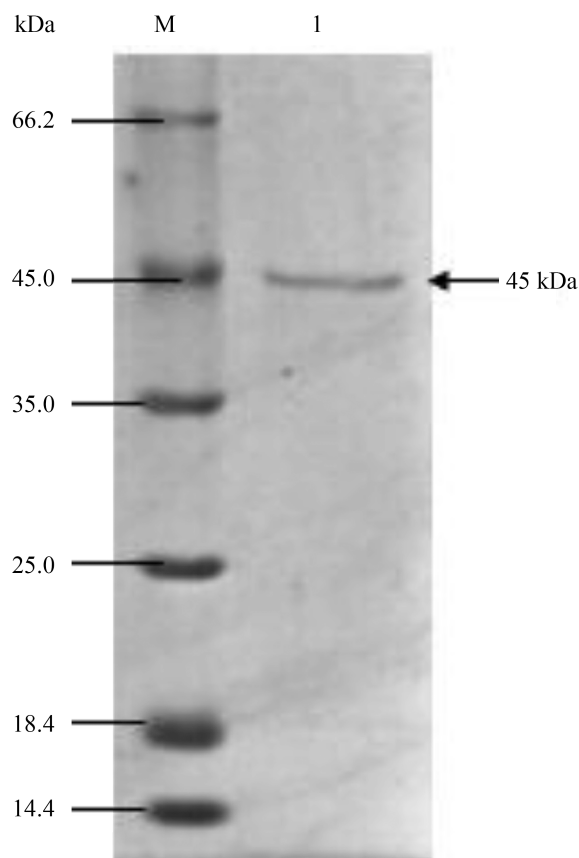


图 2. MnP的SDS-PAGE分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of MnP. M: marker.

2.2 锰过氧化物酶转化HOPDAs

本研究中，我们在300–550 nm波长范围内光谱扫描锰过氧化物酶对10种HOPDAs的转化。研究发现锰过氧化物酶对氟取代的HOPDA转化较为迅速，10-F HOPDA和3,10-2F HOPDA分别在15 min、19 min后就可以完全转化(图3-A、B)。等量的锰过氧化物酶完全转化HOPDA则需要 26 min (图3-G)，8-Cl，10-Cl和9，10-2-Cl HOPDA大约21–76 min才能完全转化(图3-C、D和H)。然而，锰过氧化物酶转化10-Br、10-Me (甲基)、3,8,10-3Cl和8,9,10, 11-4Cl HOPDA 则较为困难，其中10-Br HOPDA在反应3.5 h后，424 nm处吸光值的变化为0.03；10-Me HOPDA反应较为困难，在反应5 h后，426 nm处吸光值的变化仅为0.02；锰过氧化物酶转化3, 8, 10-3Cl HOPDA则需要更长的时间，反应 9.6 h 后才几乎转化完全；而8,9,10,11-4Cl HOPDA则在反应 11 h 后才几乎转化完全(图3-E、F、I和J)。文献报道，在BphD催化HOPDAs过程中，HOPDAs的3位4位氢原子被氯取代，会抑制BphD的活性^[9, 15–16]。此外，3位取代基团原子半径增加会降低 BphD 的转化效率：BphD对3位取代的HOPDAs降解能力顺序为 H > F > Cl > Me^[17]。研究表明，在这10种 HOPDAs 中，分别加入等量的锰过氧化物酶，氟取代的 HOPDA 可以快速完全转化；像 8-Cl、10-Cl、9, 10-2Cl和8, 9, 10, 11-4Cl HOPDA的这样苯基上的单个或多个氢原子被氯取代后，锰过氧化物酶对其转化能力弱于HOPDA。这些结果表明锰过氧化物酶对3, 10-2F HOPDA的转化较快，对氯原子取代数目不同的HOPDAs转化可以看出，随着氯原子数目的增加，Cl-HOPDA越来越难降解，降解能力顺序为：H > Cl > 2Cl > 3Cl > 4Cl，这可能是随着氯原子数目的增加影响了Cl-HOPDA的空间结构，降低其与锰过氧化物酶的亲和力，这与稳态动力学分析结果相一致(表1)；锰过氧化物酶对10-Cl、

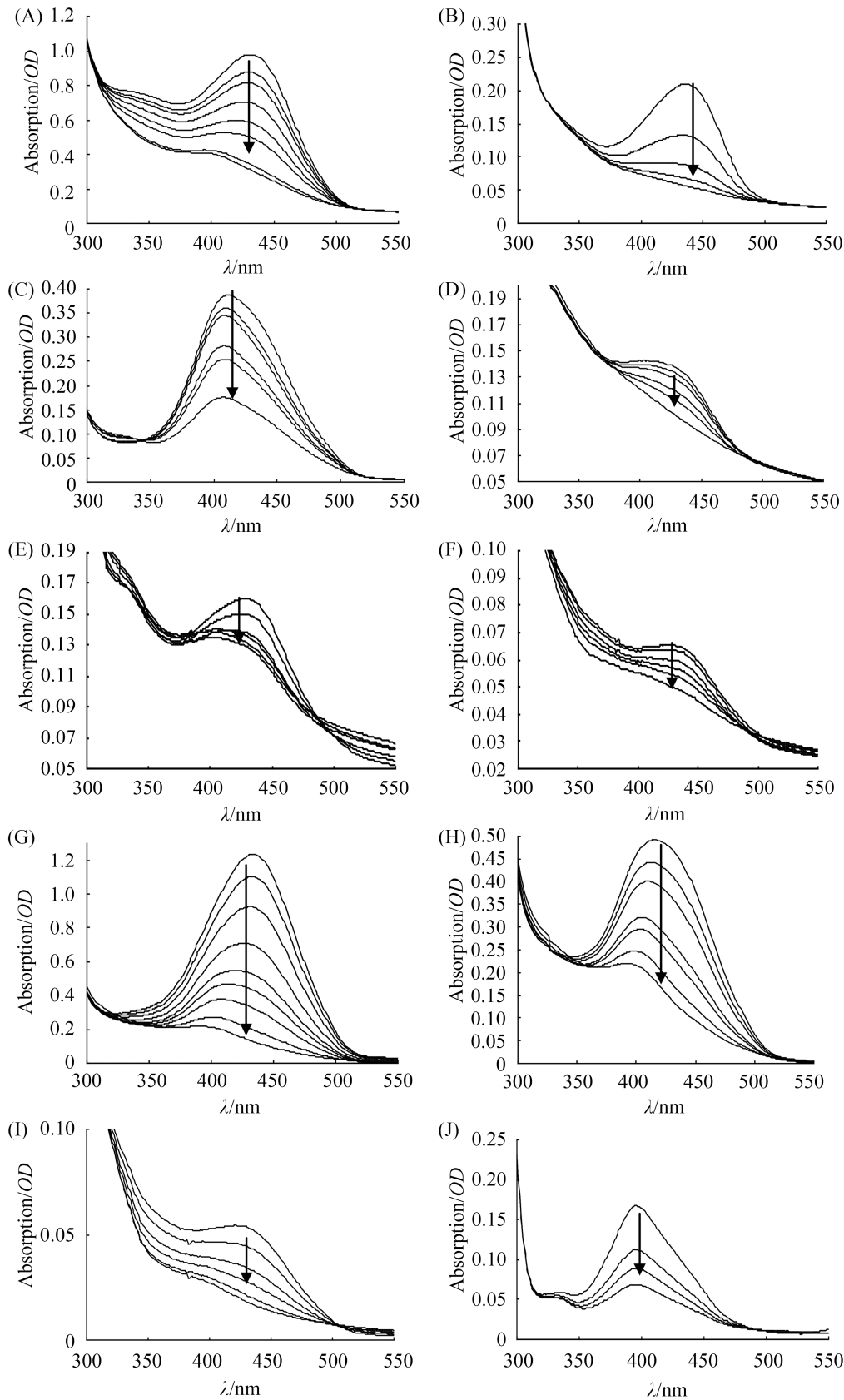


图 3. 锰过氧化物酶转化HOPDAs光谱扫描

Figure 3. Spectra of HOPDAs transformed by manganese peroxidase. Indicates the changing direction of absorption spectra curves. Solid line: HOPDAs added with MnP. A: 10-F HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=15 min; B: 3, 10-2F HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=19 min; C: 8-Cl HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=43 min; D: 10-Cl HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=51 min; E: 10-Br HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=3.5 h; F: 10-Me HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=5 h; G: HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=26 min; H: 9, 10-2Cl HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=76 min; I: 3, 8, 11-3Cl HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=9.6 h; J: 8, 9, 10, 11-4Cl HOPDA, MnP 0.1 U, time between scans=11 h.

10-Br、10-Me和10-F HOPDA的转化可以发现, 10位取代基团原子半径增加会降低锰过氧化物酶的转化效率: HOPDAs降解能力顺序为 $F > Cl > Me > Br$, 这表明 HOPDA 衍生物二烯酸部分的氟原子对锰过氧化物酶催化能力的影响小于其他取代基团。同时从锰过氧化物酶转化 HOPDAs 的紫外可见光谱图中可以发现在转化过程中 HOPDAs 的最大吸收峰均有一定程度的蓝移, 特别是在转化 HOPDA、10-F HOPDA、9,10-2Cl HOPDA 和 10-Br HOPDA 的过程中蓝移较为明显; 文献报道, *Phanerochaete chrysosporium* 锰过氧化物酶在降解靛蓝胭脂红时最大吸收峰会发生蓝移^[18]; 这可能是由于锰过氧化物酶在转化底物的过程中碳碳双键数目减少或丢失, 共轭体系减弱, 从而导致最大吸收峰发生蓝移^[19-20]。微生物降解多氯联苯过程中 HOPDAs 的积累不仅会降低降解效率, 而且还会阻碍多氯联苯的代谢途径, 使之不能够被完全矿化。特别是在降解 2,4',5-CB 过程中 3,8,11-3Cl HOPDA 很容易产生并大量积累, 而且培养 5 d 后仍存在于培养基中, BphD

与 *Rhodococcus* sp. R04 几乎不能转化 3,8,11-3Cl HOPDA^[21], 但是在本研究中, 虽然锰过氧化物酶对 3,8,11-3Cl HOPDA 的转化能力较弱, 但是锰过氧化物酶仍可以在 9.6 h 后将 3,8,11-3Cl HOPDA 完全转化。由此可见, 锰过氧化物酶对 HOPDAs 的转化能力与 BphD 相比有一定差别。本文通过锰过氧化物酶对 HOPDAs 的转化实验不仅证明了 Pasti 等的观点^[4]: MnP 单独作用同样可以降解多种不同类型的污染物, 而且为有效解决卤代联苯代谢过程中 HOPDAs 的积累问题提供了一种新的方法。

2.3 紫外光谱扫描分析 BphD、Lac 和 MnP 转化 HOPDA

研究中发现虽然 BphD、Lac 和 MnP 都可以转化 HOPDA, 但是三者转化 HOPDA 的紫外可见光谱图却有非常明显的区别, 不仅表现在可见光区有差别, 而且在 220–280 nm 波长范围内的紫外光区差别非常明显。如图 4-A 所示, 当 BphD 催化 HOPDA 反应开始后, 最大吸收峰 435 nm 处的吸光值逐渐降低, 且最大吸收峰的峰型对称; 从图

表1. 锰过氧化物酶催化 HOPDAs 的稳态动力学参数

Table 1. Steady-state kinetic parameters of manganese-dependent peroxidase with HOPDAs

HOPDA substituent	$\varepsilon/[\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})]$	$K_m/(\mu\text{mol}/\text{L})$	$k_{\text{cat}}^*/\text{s}$	$[k_{\text{cat}}/K_m(10^5)]/[\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})]$
None	25.7 ^[9]	8.13±0.89	0.70±0.02	0.86±0.07
8-Cl	40.3 ^[9]	11.15±0.07	0.64±0.06	0.57±0.19
10-Cl	26.3 ^[9]	9.11±0.69	0.53±0.09	0.58±0.20
9,10-2Cl	37.9 ^[8]	21.94±0.53	0.49±0.02	0.22±0.06
3,10-2F	27.5 ^[23]	10.85±0.63	2.05±0.18	1.90±0.01

* k_{cat} values of HOPDAs were calculated with the substrate concentration 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

中可以发现,虽然在紫外光区有代表苯环特征的吸收峰,但是吸光值有较大变化:在整个反应过程中223 nm处吸光值变化0.23, 263 nm处吸光值

变化0.20;图4-A中插图所示的差示谱中可以看出,在220–280 nm波长范围内形成两个新的吸收峰,其中225 nm处吸收峰的吸光值逐渐增加;而

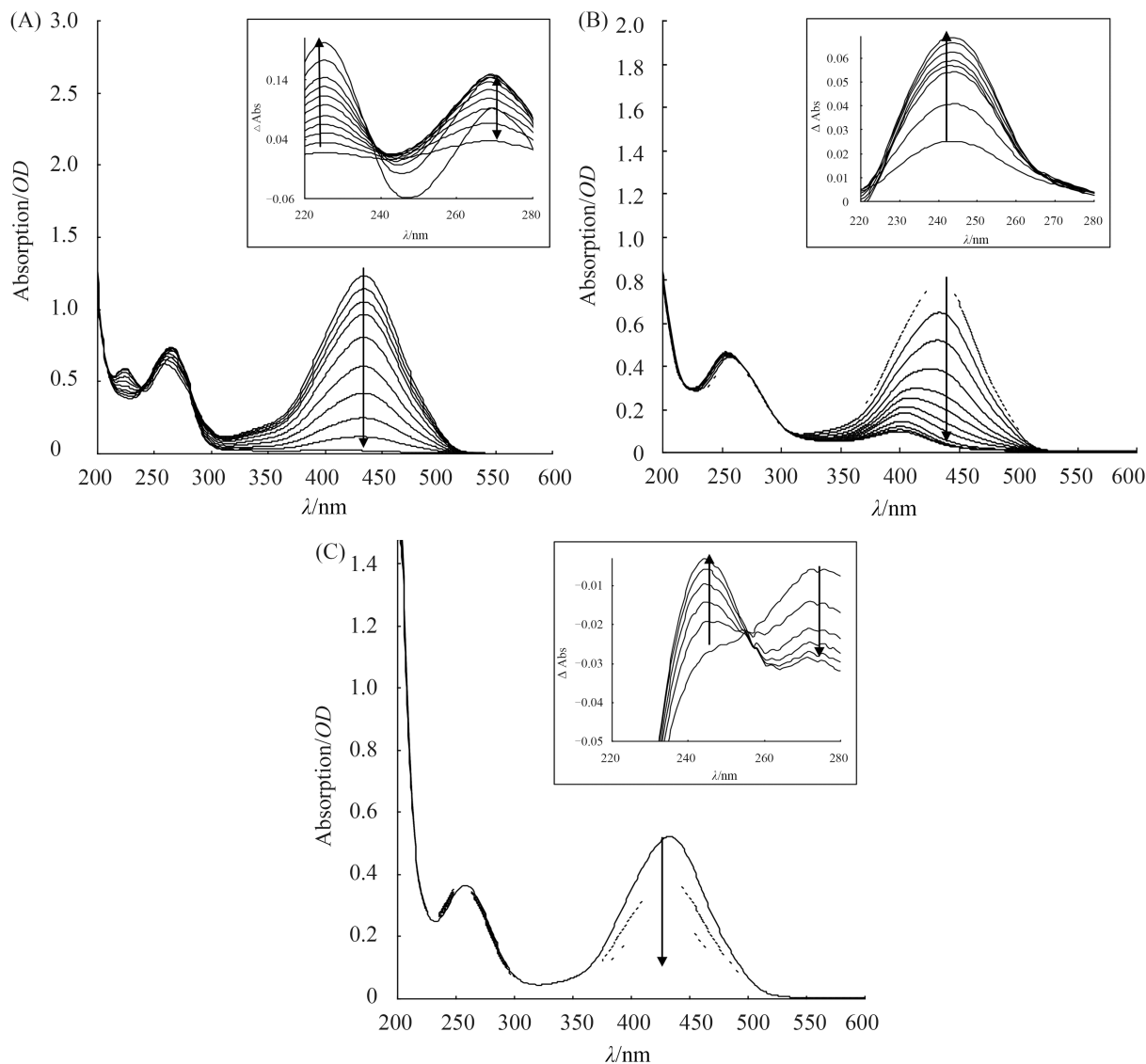


图 4. 光谱扫描 BphD、MnP和Lac转化 HOPDA

Figure 4. Spectra of HOPDA transformed by BphD, MnP and Lac. “↓” indicates the changing direction of absorption spectra curves. A: HOPDA catalyzed by BphD, 600 s, the inset shows the difference spectrum resulting from the subtraction of the HOPDA spectrum (added with inactive BphD) from the time sequence spectra at 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 s (added with active BphD). B: HOPDA catalyzed by manganese peroxidase, 12 min, the inset shows the difference spectrum resulting from the subtraction of the HOPDA spectrum (added with inactive manganese peroxidase) from the time sequence spectra at the start, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 min (added with active manganese peroxidase). C: HOPDA catalyzed by laccase, 10 min, the inset shows the difference spectrum resulting from the subtraction of the HOPDA spectrum (added with inactive laccase) from the time sequence spectra at the start, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 min (added with active laccase)^[10].

在267 nm处形成一个吸收峰, 它的吸光值在反应开始300 s内逐渐增加, 之后逐渐降低, 整个反应过程中267 nm处吸光值的变化约为0.15, 出现这一现象的原因是: HOPDA 经BphD催化产生苯甲酸和2-羟基-2,4-戊二烯酸, 同时也伴随着一个2-羟基-2,4-戊二烯酸被BphD继续分解的过程^[22]。BphD在转化HOPDA的过程中C₅-C₆发生断裂, 生成2-羟基-2,4-戊二烯酸, 在此过程中苯环侧链长度变化非常大, 从而对苯环在紫外区的吸收影响较大; 同时由于在转化过程中没有碳碳双键的丢失, 因此在反应过程中紫外区OD值变化较大但是最大吸收峰的峰型对称没有蓝移现象发生; 图4-B中, 当MnP催化HOPDA 反应开始后, 435 nm处吸光值随着反应的进行逐渐下降, 且随着反应的进行最大吸收峰发生蓝移, 峰型不对称; 虽然锰过氧化物酶转化HOPDA过程中紫外区吸光值变化并不明显, 但是有代表苯环特征的吸收峰; 这些现象表明在转化过程中苯环没有发生断裂, 只是侧链有一些变化, 虽然这种变化会对苯环246 nm处的吸光值产生影响, 但是影响又不会很大, 所以OD值变化并不明显, 这与图4-B 插图所示的差示谱中: 220–280 nm范围内形成了1个新的吸收峰, 在246 nm处吸光值逐渐增加且OD值变化不明显的结果相一致。图4-C中Lac转化HOPDA 反应开始后, 435 nm处吸光值也逐渐下降, 且最大吸收峰的峰型对称; 同时紫外光区的吸光值几乎没有变化, 图4-C插图所示的差谱中可以发现, 在220–280 nm范围内形成了2个新的吸收峰, 其中245 nm处吸收峰的吸光值逐渐增加, 但是273 nm处吸收峰的吸光值却逐渐降低^[10]。由此可见, MnP催化HOPDA的机制与BphD、Lac都不相同。

2.4 稳态动力学分析

锰过氧化物酶以HOPDA为底物, pH为8.0磷酸钾缓冲液, 反应温度为30 °C时的稳态动力学分析表明, 在5种测试底物中, HOPDA 是锰过氧化物

酶的最适底物(表1)。分别以10-Cl HOPDA与8-Cl HOPDA为底物时锰过氧化物酶的 K_m 值相近, 且均大于HOPDA。虽然3,10-2F HOPDA并非锰过氧化物酶的最适底物, 但对其的转换数 k_{cat} 与转化效率 k_{cat}/K_m 却是最高, 锰过氧化物酶对HOPDA的 k_{cat} 与 k_{cat}/K_m 都低于3,10-2F HOPDA, 而对9,10-2Cl HOPDA 的转化效率却是5种底物中最低的。这表明 HOPDA衍生物二烯酸部分的氟原子对锰过氧化物酶催化能力的影响小于包括氢原子在内的其他取代基团。

我们的研究结果表明, *Trametes* sp. SQ01锰过氧化物酶在二价锰离子存在的情况下能够氧化2,6-二甲氧基苯酚、愈创木酚、2,2'-连氮-双-(3-乙基-6苯并噻唑磺酸)二胺和过氧化氢等化合物, 同时也能作用二价锰离子, 在与这些底物反应中, 过氧化氢是锰过氧化物酶的最适底物, 其 K_m 为3.7 $\mu\text{mol/L}$ 。在本文测试的5种底物中, 锰过氧化物酶对9,10-2Cl HOPDA 的转化效率是最低的, 略高于漆酶对9, 10-2Cl HOPDA [$k_{cat}/K_m = 0.21 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$]的转化, 而低于漆酶对8-Cl HOPDA [$k_{cat}/K_m = 0.88 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$]的转化, 同时锰过氧化物酶对其余4种HOPDAs的转化效率均高于9,10-2Cl HOPDA, 可见, 锰过氧化物酶对 HOPDAs这类非酚类化合物的转化能力与漆酶相比较为相近。

HOPDAs是联苯及多卤代联苯降解过程中的一种中间代谢物, 这类化合物是联苯降解上游途径中联苯水解酶(BphD)的底物, 研究结果表明BphD可以催化HOPDA及多种卤代 HOPDAs, 如HOPDA、8-Cl、10-Cl和9,10-2Cl HOPDA, 其 K_m 值分别为0.19、0.33、0.13和0.154 $\mu\text{mol/L}$ ^[15]。MnP能够有效降解HOPDA及其衍生物, 以HOPDAs为底物时MnP的 K_m 值是 BphD的10倍以上, 在上述4种底物中, HOPDA 是BphD的最适底物, 而本研究中MnP的最适底物也是HOPDA, 但是BphD对10-Cl HOPDA 的转化效率是最高的, 对8-Cl HOPDA 的转化效率是最低的; 而

MnP对二者的转化效率却较为相近, 尽管在这几种底物中, BphD 对8-Cl HOPDA 的转化能力最弱, 但仍高于MnP。由此可见, MnP、BphD 对HOPDAs 的催化性能有较大差异。

2.5 红外光谱分析

2.5.1 HOPDA红外光谱分析: 反应前HOPDA分子的红外图谱如图5-A所示。3500-3300 cm^{-1} 之间的谱带代表2位C上的O-H和1位C上COOH的O-H伸缩振动; 1800 cm^{-1} 与1650 cm^{-1} 之间的谱带代表羧基与羰基的C=O双键的振动; 1600 cm^{-1} 与1643.24 cm^{-1} 代表2、4位共轭C=C双键伸缩振动; 3000 cm^{-1} 与2500 cm^{-1} 区域有宽吸收峰, 显示有COOH存在; 1050 cm^{-1} 与1101 cm^{-1} 分别为1, 2位C上的C-O弯曲振动; 1650-1400 cm^{-1} 之间的谱带代表芳香结构的骨架振动, 900-650 cm^{-1} 之间的谱带代表苯环C-H面外弯曲振动。

2.5.2 锰过氧化物酶转化HOPDA的红外光谱分析: 图5-B为锰过氧化物酶转化HOPDA产物的红外图谱, 1650-1400 cm^{-1} 之间的谱带代表芳香结构的骨架振动; 1643.24 cm^{-1} 处的谱带代表C=C双键的吸收振动; 1800 cm^{-1} 与1650 cm^{-1} 之间的谱带代表羧基与羰基的C=O双键振动; 同时3500-3400 cm^{-1} 处代表O-H伸缩振动吸收的条带。与图5-A相比, 从中可以看出一些主要的峰型和出峰位置有较为明显的变化, 同时部分吸收峰的峰强度有所变化, 比较明显的是C=C只剩1643.24 cm^{-1} 处的伸缩振动, 且均在1650-1400 cm^{-1} 之间有代表芳香结构骨架的振动吸收, 说明锰过氧化物酶转化HOPDA时苯环没有发生断裂, 且转化产物与HOPDA相比共轭双烯结构转化为共轭单烯, 共轭体系减弱, 与紫外-可见光谱结果一致。在3500-3300 cm^{-1} 之间均可检测到吸收峰, 此处的吸收峰是羟基的特征吸收峰, 但是底物的羟基吸收峰峰型较尖, 而经过锰过氧化物酶的催化作用, 产物羟基吸收峰变宽且吸收频率增大, 同时图5-B中2位C上的C-O在1100 cm^{-1} 处弯曲振动消失, 我们认为1, 2位

的C-C发生断裂, 生成新的羧基, 由于羧酸发生缔合使O-H伸缩振动吸收的条带变宽, 同时不再受2位C上的O-H影响, 3000-2800 cm^{-1} 之间透光率增加, 根据以上数据推测锰过氧化物酶转化HOPDA是C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 之间断裂形成芳香酸。锰过氧化物酶转化酚类与非酚类化合物机制并不相同, 在转化酚类化合物时一般先形成苯氧基自由基中间物, 随后自由基进一步氧化生成以C为中心的阳离子, 紧接着失去1个质子变为酮二聚物, 最后发生芳基-苯基断裂, 产物多为醛类、醇类、苯醌或

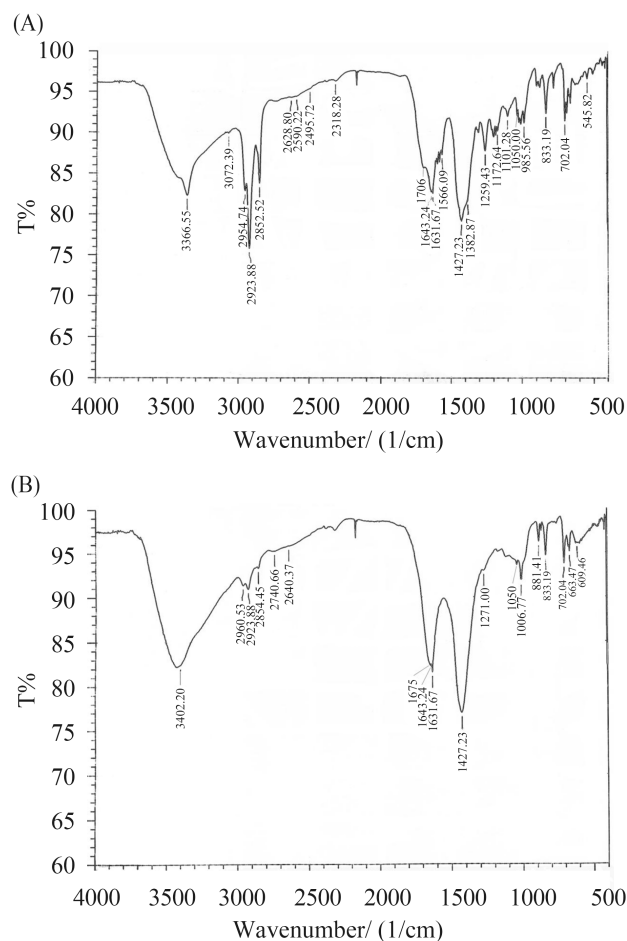


图 5. HOPDA及其锰过氧化物酶转化产物的红外光谱扫描

Figure 5. FTIR spectrum of HOPDA and its products converted by MnP. "T%" indicates transmittance. A: FTIR spectrum of HOPDA. B: FTIR spectrum of products of HOPDA.

酮式化合物, 这与谢慧芳等^[24]报道的白腐菌 *P. sordida* YK-624 锰过氧化物酶描述相一致。根据红外光谱, 并结合反应过程中的紫外可见光分析, 我们推测的 锰过氧化物酶催化非酚类底物 HOPDA 反应机理及其对应的反应化学式如图 6 所示。文献报道, 锰过氧化物酶催化高分子的非酚类 β -O-4 木质素化合物可能发生酮式断裂或 C_{α} - C_{β} 断裂^[25], 这与本中文锰过氧化物酶转化 HOPDA 的机制非常相似。本次研究中如果锰过氧化物酶转化 HOPDA 是酮式断裂, 那么将会在 C_5 - C_6 之间断裂形成 HPD 和苯甲酸, 这就与 BphD 催化

HOPDA 机制相同^[22], 但是紫外光谱扫描分析 BphD 和锰过氧化物酶转化 HOPDA 说明两者转化机制是不同的, 同时苯甲酸红外光谱在 3567 cm^{-1} 处有尖锐的吸收峰, 代表 O-H 伸缩振动; 1752 cm^{-1} 处有代表 $C=O$ 伸缩振动的吸收峰; 1169 cm^{-1} 处有代表 O-H 弯曲振动的吸收峰^[26]; 这与图 5-B 中所示的 $3500\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ 宽泛吸收峰代表 O-H 振动, 1675 cm^{-1} 处吸收峰代表 $C=O$ 振动, 1050 cm^{-1} 处吸收峰代表 O-H 弯曲振动差别明显, 所以我们认为锰过氧化物酶转化 HOPDA 是 C_{α} - C_{β} 之间断裂, 释放苯基形成芳香酸。

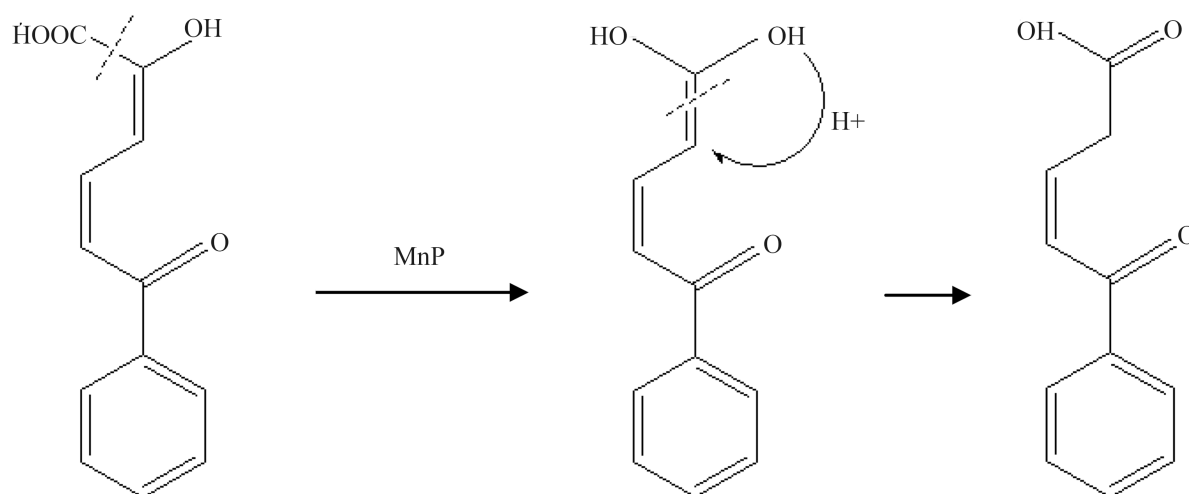


图 6. 推测的锰过氧化物酶催化 HOPDA 反应的机理

Figure 6. Putative mechanism of HOPDA reaction catalyzed by manganese peroxidase.

参考文献

- [1] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Deguchi T, Kitaoka Y, Kakezawa M, Nishida T. Purification and characterization of a Nylon-degrading enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1366–1371.
- [3] Blanchette RA, Krueger EW, Haight JE, Akhtar M, Akin DE. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of Biotechnology*, 1997, 53(2/3): 203–213.
- [4] Pasti-Grigsby MB, Paszczynski A, Goszczynski S, Crawford DL, Crawford RL. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(11): 3605–3613.
- [5] Li HR, Li HB, Li WQ, Zhao F, Geng L. Decolorization and biodegradation of six kinds of dyes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(3): 14–17, 21. (in Chinese)
李慧蓉, 李华兵, 李文琼, 赵飞, 耿磊. 黄孢原毛平革菌对 6 种染料的脱色降解. *环境科学研究*, 1999, 12(3): 14–17, 21.
- [6] Yan B, Zhou JT, Liu GF, Huang GH, Fu HY, Chai T, Jin L, Shi Q. Study on biodegradation mechanism of azo dyes. *Environmental Science and Technology*, 2008, 21(5): 1–5. (in Chinese)
严滨, 周集体, 柳广飞, 黄国和, 傅海燕, 柴天, 金磊, 石谦. 偶氮染料生物降解机理的研究. *环境科技*, 2008, 21(5): 1–5.
- [7] Furukawa K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation*, 1994, 5(3/4):

- 289–300.
- [8] Seeger M, Timmis KN, Hofer B. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7): 2654–2658.
- [9] Seah SYK, Labbé G, Nerdinger S, Johnson MR, Snieckus V, Eltis LD. Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(21): 15701–15708.
- [10] Yang XQ, Wen XW. New function of laccase from *Trametes* sp. SQ01: transforming 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(8): 913–918. (in Chinese)
杨秀清, 文潇玮. 白腐真菌 *Trametes* sp. SQ01 漆酶的新功能: 转化 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯酸. *微生物学报*, 2014, 54(8): 913–918.
- [11] Paszczyński A, Crawford RL, Huynh VB. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in Enzymology*, 1988, 161(12): 264–270.
- [12] Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002, 60(6): 551–565.
- [13] Yang XQ, Zheng Y, Li PL, Wang JR. Influencing factor for the biodegradation of polyhalogenated biphenyls by *Rhodococcus* sp. R04. *China Environmental Science*, 2010, 30(5): 694–698. (in Chinese)
杨秀清, 郑媛, 李鹏丽, 王婧人. 红球菌-R04 生物降解多卤代联苯的影响因素研究. *中国环境科学*, 2010, 30(5): 694–698.
- [14] Yang XQ, Li SR, Shen C, Wang JR. Triphenylmethane dye decoloration using hydrogen peroxide-resistant manganese peroxidase. *Microbiology China*, 2013, 40(8): 1356–1364.
- [15] Seah SYK, Labbé G, Kaschabek SR, Reifenrath F, Reineke W, Eltis LD. Comparative specificities of two evolutionarily divergent hydrolases involved in microbial degradation of polychlorinated biphenyls. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1511–1516.
- [16] Seah SYK, Ke J, Denis G, Horsman GP, Fortin PD, Whiting CJ, Eltis LD. Characterization of a C-C bond hydrolase from *Sphingomonas wittichii* RW1 with novel specificities towards polychlorinated biphenyl metabolites. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4038–4045.
- [17] Bhowmik S, Horsman GP, Bolin JT, Eltis LD. The molecular basis for inhibition of BphD, a C-C bond hydrolase involved in polychlorinated biphenyls degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(50): 36377–36385.
- [18] Li HX, Zhang RJ, Tang L, Zhang JH, Mao ZG. Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2015, 23(1): 227–233.
- [19] Zheng WY, Ding ZH, Liu H. Spectral characterization for capsanthin molecule with in vitro oxidative defense reaction. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2014, 34(2): 358–363. (in Chinese)
郑文宇, 丁筑红, 刘海. 辣椒红素分子体外氧化防御反应 UV-Vis 及 FTIR 光谱特征分析. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(2): 358–363.
- [20] Cai XM, Qin X, Zhang L, Cui HR. Hydrogen peroxide catalytic wet oxidation of leachate and the spectroscopic analysis of dissolved organic matters. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(9): 2930–2935. (in Chinese)
蔡先明, 秦侠, 张丽, 崔红蕊. 催化湿式过氧化氢氧化处理垃圾渗滤液及其 DOM 光谱分析. *环境科学学报*, 2015, 35(9): 2930–2935.
- [21] Yang XQ, Sun Y, Qian SJ. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31(9): 415–420.
- [22] Horsman GP, Ke JY, Dai SD, Seah SYK, Bolin JT, Eltis LD. Kinetic and structural insight into the mechanism of BphD, a C-C bond hydrolase from the biphenyl degradation pathway. *Biochemistry*, 2006, 45(37): 11071–11086.
- [23] Pollard JR, Henderson IMJ, Bugg TDH. Chemical and biochemical properties of 2-hydroxypentadienoic acid, a homologue of enolpyruvic acid. *Chemical Communications*, 1997, (19): 1885–1886.
- [24] Xie HF, Fang L, Zhao LG. Transformation of 2-chlorophenol by white rot fungus *P. sordida* YK-624 and its manganese peroxidase. *Environmental Pollution and Control*, 2008, 30(5): 51–54. (in Chinese)
谢慧芳, 方林, 赵林果. 白腐菌 *P. sordida* YK-624 及其锰过氧化物酶对 2-氯酚的转化. *环境污染与防治*, 2008, 30(5): 51–54.
- [25] Jensen KA, Bao W, Kawai S, Srebotnik E, Hammel KE. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3679–3686.
- [26] Stepanian SG, Reva ID, Radchenko ED, Sheina GG. Infrared spectra of benzoic acid monomers and dimers in argon matrix. *Vibrational Spectroscopy*, 1996, 11(2): 123–133.

Transformation of biphenyl intermediate metabolite by manganese peroxidase from a white rot fungus SQ01

Xiuqing Yang^{*}, Xinxian Zhang

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

Abstract: [Objective] To understand the biochemical role of white rot fungus *Trametes* sp. SQ01 manganese peroxidase (MnP) towards 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoates (HOPDA)/HOPDA derivatives and to reveal the new catalytic features of MnP, white rot fungus *Trametes* sp. SQ01 MnP was extracted, and the purified enzymes were used in the oxidation of HOPDAs. [Methods] UV-vis spectrophotometry was used to study the transformation of 10 substituted HOPDAs by manganese peroxidase and measure the steady-state kinetics parameters of manganese peroxidase against parts of HOPDAs. The molecular structures of HOPDA and HOPDA oxidation product were analyzed by infrared spectroscopy. [Results] Manganese peroxidase exhibited catalytic activity towards both HOPDA and halogenated HOPDA. Especially, our manganese peroxidase used 3,8,11-3Cl HOPDA as substrate, while biphenyl hydrolase (2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase) and *Rhodococcus* sp. R04 showed negligible activity towards this substrate. The steady-state kinetic analysis indicated that HOPDA displayed the lowest K_m among 5 HOPDAs, the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of 3, 10-2F HOPDA was the highest. UV-visible spectroscopy analysis indicated that the maximum absorption of products of HOPDA showed blue-shift with increasing the reaction time in the visible region. Infrared analysis showed that MnP converted conjugated diene of HOPDA to monoethylenically, and cause hydroxyl on C_β to disappear. [Conclusion] Manganese peroxidase can effectively degrade HOPDA and its derivatives. Such catalytic properties of manganese peroxidase provide a new strategy for successfully degrading biphenyl and its intermediate metabolites.

Keywords: HOPDA (2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoates), manganese peroxidase, white rot fungi, *Trametes*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3080030) and by the National Natural Science Foundation of Shanxi Province (2014011030-3)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-351-7010215, E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

Received: 6 November 2015; Revised: 11 January 2016; Published online: 13 January 2016