

## 非离子反胶束中木素过氧化物酶催化性能研究

# Studies on the Catalytic Performance of Lignin Peroxidase in Nonionic Reversed Micelles

张文娟<sup>1</sup>, 王 丹<sup>1</sup>, 黄锡荣<sup>1,2\*</sup>, 曲音波<sup>2</sup>, 高培基<sup>2</sup>

ZHANG Wen-Juan<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, HUANG Xi-Rong<sup>1,2\*</sup>, QU Yin-Bo<sup>2</sup> and GAO Pei-Ji<sup>2</sup>

1. 山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室, 济南 250100

2. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

1. Key Laboratory of Colloid & Interface Chemistry of the Education Ministry of China, Shandong University, Jinan 250100, China

2. State Key Laboratory of Microbial Technology of China, Shandong University, Jinan 250100, China

**摘 要** 木素过氧化物酶(LiP)在环己烷/Brij30/水反胶束体系中可体现催化活力,然而在水/醇/TritonX-100/环己烷反胶束体系中却没有催化活力。对影响 Brij30 反胶束中 LiP 催化活力各主要因素进行了优化并测定了 LiP 在其中的时间稳定性,结果表明,20℃下,使 LiP 体现最佳活力的 Brij30 反胶束介质条件为: $\omega_0 = 8.5$ , pH = 2.2 [Brij30] = 600mmol/L;在此条件下, LiP 的半衰期可达到 50h;与水介质相比,酶活力下降了,但稳定性却提高了。直链醇是 TritonX-100 形成反胶束的必要组分,为揭示醇的作用,还考察了戊醇对 Brij30 反胶束中 LiP 催化活力的影响,发现高浓度戊醇对 LiP 有失活作用。据此推测助表面活性剂醇可能是 LiP 在环己烷/TritonX-100/戊醇/水反胶束中不能体现催化活力的主要原因。

**关键词** 木素过氧化物酶, 非离子反胶束, 催化活性, 戊醇

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0654-04

**Abstract** Lignin peroxidase (LiP) hosted in Brij 30/cyclohexane/water nonionic reversed micelle could express its catalytic activity, but in Triton X-100/n-pentanol/cyclohexane/water nonionic reversed micelle LiP didn't show any catalytic activity. Some key factors that affected the catalytic activity of LiP in Brij 30 reversed micelle were studied at 20°C. The optimum conditions were  $\omega_0 = 8.5$ , pH = 2.2, [Brij30] = 600mmol/L; under these conditions the half time of LiP was ca. 50 hours. As compared with the properties of LiP in aqueous solution, the activity of LiP hosted in Brij 30 reversed micelle dropped, but its stability improved greatly. To reveal the role of normal alcohol, which was a necessary component for forming Triton X-100 reversed micelles, the effect of n-pentanol on the catalytic activity of LiP in Brij 30 reversed micelle was investigated. Results indicated that high concentration of the alcohol deactivated LiP. So it was deduced that the phenomenon that LiP hosted in the Triton X-100 reversed micelles could not express its activity was mainly due to the alcohol co-surfactant.

**Key words** lignin peroxidase, nonionic reversed micelles, catalytic activity, n-pentanol

Received: February 4, 2005; Accepted: April 19, 2005.

This work was supported by the grants from the Interdisciplinary Science Foundation of Shandong University, the Middle-aged and Youthful Excellent Scientists Encouragement Foundation of Shandong Province, the Natural Science Foundation of Shandong Province, and the National Natural Science Foundation of China (No. 30470048).

\* Corresponding author. Tel: 86-531-8365433; E-mail: xrhuang@sdu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30470048) 山东省自然科学基金、山东省优秀青年科学家奖励基金和山东大学跨学科基金资助项目

反胶束是由水、表面活性剂以及非极性有机溶剂(油)等构成的宏观均匀、微观多相的热力学稳定体系。反胶束体系能较好地模拟酶的天然环境,在此体系中大多数酶均能保持一定的催化活性和稳定性,有的甚至表现出超活性。20多年来,国内外有20多个实验室对50多种酶在反胶束体系中的酶学性质进行了广泛而深入的研究,并由此形成了一个新的跨学科交叉研究领域——胶束酶学<sup>[1-4]</sup>。

木素过氧化物酶(LiP)是1983年从某些白腐菌中(如 *Phanerochaete chrysosporium* 中)发现的一种含有血红素的过氧化物酶<sup>[5-6]</sup>。在天然高聚物木素和小分子环境污染物的生物降解过程中起着关键性作用<sup>[7-14]</sup>。因此, LiP 的催化性能及机制研究对于充分利用自然资源、保护生态环境、进行水体与土壤的生物修复、实现可持续发展等具有十分重要的意义。

以往对 LiP 的研究多集中在传统的水介质中<sup>[15-17]</sup>。近来,人们开始研究反胶束介质中 LiP 的催化性能<sup>[18]</sup>。我们在研究非离子反胶束介质中 LiP 催化性能时发现,在由月桂醇聚氧乙烯醚(Brij30)形成的环己烷/Brij30/水反胶束介质中 LiP 可体现催化活力,但在水/醇/Triton X-100/环己烷反胶束介质中,无论改变体系的  $\omega_0$ 、水相 pH、Triton X-100 浓度及直链醇种类( $n = 4, 5, 6, 8, 12$ ,  $m$  为直链醇链长碳原子数)结果均未发现 LiP 在其中有明显活力。本文对 LiP 可在其中体现活力的环己烷/Brij30/水反胶束进行了初步优化并测定了 LiP 在其中的时间稳定性,此外还考察了戊醇对 LiP 活力的影响,探讨了 LiP 在 TritonX-100 反胶束中不能体现活力的主要原因。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司)及其恒温附件; HZS-H 型恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司)。

月桂醇聚氧乙烯醚(Brij30)、Triton X-100 购自 Sigma 公司,藜芦醇(VA)购自 Fluka 公司,环己烷、柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、 $H_2O_2$ 、戊醇等均为国产分析纯试剂,水为三蒸水。

### 1.2 反胶束的配制

在小锥形瓶中加入一定体积的环己烷,按所要表面活性剂浓度称取一定质量的某表面活性剂于锥形瓶中,再加入一定体积某 pH 缓冲液(缓冲液的体积等于按给定水与表面活性剂摩尔比  $\omega_0$ )计算所得的总水体积减去酶液和用于引发酶促反应所需的  $H_2O_2$  水溶液体积,实验中油水比随  $\omega_0$  而变),振荡片刻,即形成澄清、透明的反胶束体系。

Brij30 易形成反胶束,而 Triton X-100 必须在较高浓度的助表面活性剂存在下才能形成反胶束。

### 1.3 木素过氧化物酶(LiP)的制备

产木素过氧化物酶的菌种、培养条件及其酶的分离纯化同文献<sup>[19]</sup>。

### 1.4 酶活力测定步骤

直接称取一定量的底物藜芦醇(VA)溶于上述反胶束体

系中,溶解后摇匀(考察直链醇影响时还需加入一定量的直链醇)。取一定体积的上述溶液于石英比色皿中,加入一定体积的 LiP 酶液并摇匀,在  $20^\circ C$  下预热 2min,以  $10 \text{ mmol/L}$   $H_2O_2$  水溶液引发,在分光光度计上记录  $310 \text{ nm}$  处吸光度  $A$  随时间  $t$  变化的曲线。

### 1.5 活力表示方法

藜芦醇是木素过氧化物酶的最适底物,在过氧化氢存在下,其 LiP 氧化产物为藜芦醛,后者在  $310 \text{ nm}$  处有较强的光吸收( $\epsilon = 9.3 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )。文中所示 LiP 催化活力均是基于  $310 \text{ nm}$  处  $A \sim t$  曲线。由初始直线的斜率经吸光度/浓度换算求出反应初速率  $v_0$ (单位  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Brij30 反胶束组成优化

2.1.1 水与表面活性剂的摩尔比:水与表面活性剂的摩尔比( $\omega_0$ )决定反胶束的大小,它是影响反胶束中酶催化活力的主要因素。Brij30 反胶束中 LiP 催化 VA 氧化反应初速率  $v_0$  随  $\omega_0$  值的变化如图 1 所示,曲线呈钟罩形,最佳  $\omega_0$  值在 8.5 左右。

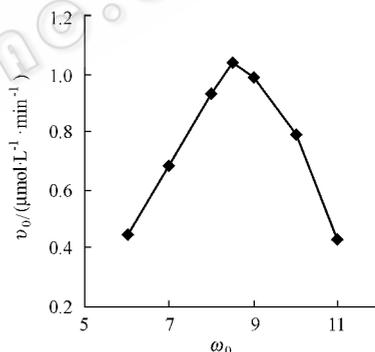


图 1  $\omega_0$  值对 LiP 活力的影响

Fig. 1 Effect of  $\omega_0$  on the activity of LiP

Conditions: Cyclohexane 2.8 mL [ $\text{Brij30}$ ] = 400mmol/L; pH = 3.4; [VA] = 10mmol/L; LiP 40 $\mu\text{L}$ ;  $H_2O_2$  20 $\mu\text{L}$ ;  $T = 20^\circ C$ .

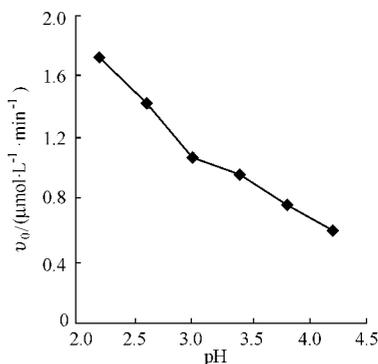


图 2 缓冲液 pH 对 LiP 活力的影响

Fig. 2 Effect of the buffer pH on the activity of LiP

Conditions: Cyclohexane 2.8 mL [ $\text{Brij30}$ ] = 400mmol/L;  $\omega_0 = 8.5$ ; [VA] = 10mmol/L; LiP 40 $\mu\text{L}$ ;  $H_2O_2$  20 $\mu\text{L}$ ;  $T = 20^\circ C$ .

2.1.2 缓冲液 pH 实验时发现,在 pH4.2~2.2 范围内,随着

缓冲液 pH 值的降低, LiP 活力逐渐升高。由于 0.1mol/L 的柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲体系最高酸度只能配到 pH2.2, 为此采用了 0.1mol/L 的盐酸溶液代替缓冲液, 结果 LiP 仍能体现活力, 反应初速率为  $1.613 \mu\text{mol} / (\text{L} \cdot \text{min})$ 。进一步提高盐酸浓度会使体系混浊而无法测定。在以后的实验中我们选用 pH2.2 的缓冲液。

在水介质中, LiP 最佳酶活对应的缓冲液 pH 为 3.5, 而在 Brij30 反胶束中则为 pH2.2。很显然, 这与反胶束中 LiP 分子周围的聚氧乙烯链头基有关, 醚氧的质子化使 LiP 分子感受到的实际 pH 大大降低。

**2.1.3 表面活性剂浓度:** Brij30 浓度对 LiP 活力的影响见图 3, 曲线呈钟罩形, 最佳表面活性剂浓度约为 600 mmol/L。在恒定  $\omega_0$  下, 改变表面活性剂浓度(也就是改变体系的水含量)会导致反胶束个数的增减。上述表面活性剂浓度的影响曲线主要是由反胶束中 LiP 分子感受到的 VA 浓度所决定。反胶束中 VA 的浓度取决于如下两方面因素: 一方面, 随着表面活性剂浓度的增加, 增溶在每个反胶束中 VA 的量下降; 另一方面, 含水量的增加又会增加 VA 从油相分配到反胶束拟相中的量。

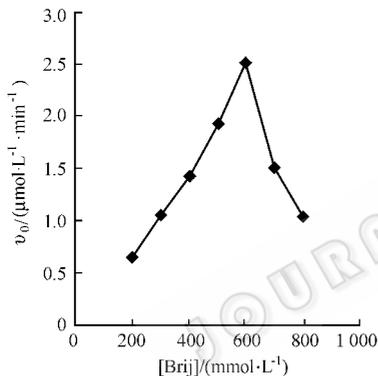


图 3 Brij30 浓度对 LiP 活力的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of Brij30 on the activity of LiP

Conditions: Cyclohexane 2.8 mL;  $\omega_0 = 8.5$ ; pH = 2.2; [VA] = 10 mmol/L; LiP 40  $\mu\text{L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{L}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ .

## 2.2 LiP 在 Brij30 反胶束中的时间稳定性

在最佳介质条件下测定了 LiP 在 Brij30 反胶束中的时间稳定性。由图 4 可见, 半衰期在 50h 左右。水介质中, LiP 的稳定性随酸度的增加变差。在 pH3.0 的水介质中, LiP 的半衰期约为 1h, 据此可推测在 pH = 2.2 的水介质中 LiP 的时间稳定性会更差。可见 LiP 在 Brij30 反胶束中的稳定性得到了大幅度提高。这种提高很可能与反胶束界面对 LiP 构象的束缚作用有关。

## 2.3 戊醇对 Brij30 反胶束中 LiP 催化活力的影响

由非离子表面活性剂、油和水形成的反胶束或油包水微乳液相区较小, 要扩大这一相区, 需加助表面活性剂(通常是 6~8 个碳的直链醇), 尤其是对 HLB 值较大的非离子表面活性剂(如 Triton X-100 必须在较高浓度的助表面活性剂的存在下才能形成反胶束), 为此, 本文还研究了戊醇对 Brij30 反

胶束中 LiP 催化活力的影响, 结果见表 1。

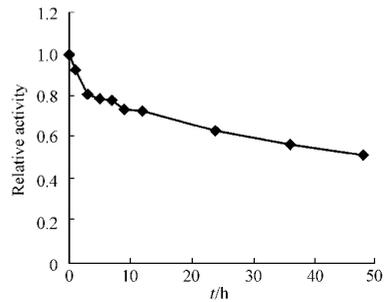


图 4 LiP 在 Brij30 反胶束中的时间稳定性

Fig. 4 Stability of LiP hosted in Brij30 reversed micelles

Conditions: Cyclohexane 2.8 mL; [Brij30] = 600 mmol/L;  $\omega_0 = 8.5$ ; pH = 2.2; [VA] = 10 mmol/L; LiP 40  $\mu\text{L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{L}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ .

表 1 戊醇对 Brij30 反胶束中 LiP 催化活力的影响  
Table 1 Effects of n-pentanol on the catalytic activity of LiP in Brij 30 reversed micelles

[n-Pentanol] (mmol·L <sup>-1</sup> )	$v_0$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	
	$\omega_0 = 4$	$\omega_0 = 10$
0	0.520	1.487
10	0.520	1.613
100	0.538	1.935
200	—	1.523
500	—	0

Conditions: Cyclohexane 2.8 mL; [Brij30] = 600 mmol/L; pH = 2.2; [VA] = 10 mmol/L; LiP 20  $\mu\text{L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{L}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ . — Turbid system

由表 1 可见, 在 Brij30 反胶束中, 戊醇对 LiP 催化活力的影响与反胶束大小有关。只有在高  $\omega_0$  下戊醇对 LiP 活力的影响才比较明显。在  $\omega_0 = 10$  时 500 mmol/L 的戊醇便可使 LiP 活力完全丧失。

我们先前研究发现 LiP 在环己烷/Brij30/水体系中可表现活力, 然而在水/醇/TritonX-100/环己烷体系中, 无论怎样改变反胶束组分和含量均未发现 LiP 在其中有明显活力。由于形成澄清、透明的 TritonX-100 反胶束所需助表面活性剂醇的浓度通常超过 500 mmol/L, 因此, 推测高浓度醇对 LiP 的失活作用是 LiP 在 TritonX-100 反胶束中不能体现活力的主要原因。

## 3 结论

在环己烷/Brij30/水反胶束中 LiP 体现最佳催化活力的介质条件为:  $\omega_0 = 8.5$ , pH = 2.2, [Brij30] = 600 mmol/L; 在此条件下, LiP 的半衰期可达到 50h; 与水介质相比, 酶活力下降了, 但稳定性却提高了。高浓度戊醇对 LiP 有失活作用, 这很可能是 LiP 在环己烷/Triton X-100/醇/水反胶束中不能体现活力的主要原因。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Martinek K, Levashov AV, Khmelnitsky YL *et al.* Colloidal solution of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions. *Science*, 1982, **218**( 4575 ): 889 – 891
- [ 2 ] Martinek K, Klyachko NL, Kabanov AV *et al.* The second E. C. Slater lecture. Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **981**( 2 ): 161 – 172
- [ 3 ] Luisi PL. Enzyme hosted in reversed micelles in hydrocarbon solution. *Angew Chem*, 1985, **24**( 6 ): 439 – 450
- [ 4 ] Luisi PL, Giomini M, Pileni MP *et al.* Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **947**( 1 ): 209 – 246
- [ 5 ] Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 1983, **221**: 661 – 663
- [ 6 ] Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB *et al.* An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **114**: 1077 – 1083
- [ 7 ] ten Have R, Teunissen PJM. Oxidative mechanism involved in lignin degradation by white rot fungi. *Chem Rev*, 2001, **101**: 3397 – 3413
- [ 8 ] Bumpus JA, Tien M, Wright D *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 1985, **228**: 1434 – 1436
- [ 9 ] Barr DP, Aust SD. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol*, 1994, **28**( 2 ): 78A – 87A
- [ 10 ] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Advanc*, 2003, **22**: 161 – 187
- [ 11 ] Joshi DK, Gold MH. Oxidation of dibenzo-p-dioxin by lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, 1994, **33**( 36 ): 10969 – 10976
- [ 12 ] Vijay G, Reddy B, Gold MH. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology*, 2000, **146**: 405 – 413
- [ 13 ] Ruttimann-Johnson C, Lamar RT. Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**( 10 ): 3890 – 3893
- [ 14 ] Valli K, Wariishi H, Gold MH. Degradation of 2, 7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 2131 – 2137
- [ 15 ] Wariishi H, Huang J, Dunford HB *et al.* Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol. Transient-state kinetic characterization. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 20694 – 20699
- [ 16 ] Tien M, Kirk TK, Bull C *et al.* Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3, 4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *phanerochaete chrysosporium* burds. *J Biol Chem*, 1986, **261**( 4 ): 1687 – 1693
- [ 17 ] Khindaria A, Grover TA, Aust SD. Evidence for formation of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. *Biochemistry*, 1995, **34**( 18 ): 6020 – 6025
- [ 18 ] Kimura M, Michizoe J, Oakazaki S *et al.* Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**( 4 ): 495 – 501
- [ 19 ] Huang X, Wang D, Liu C *et al.* The roles of veratryl alcohol and nonionic surfactant in the oxidation of phenolic compounds by lignin peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **311**: 491 – 495