

真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶研究 II. 一株产锰过氧化物酶的担子菌——血红密孔菌 K-2352

周金燕 张发群

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

桑原正章

(日本京都大学木质科学研究所)

摘 要 对血红密孔菌在避光、高氮培养基中, 产生胞外锰过氧化物酶进行了研究。结果表明, 粗酶液中 94.5% 的过氧化物酶活必须依赖于 Mn^{2+} 的存在, 并且酶液能直接使 Mn^{2+} 氧化成 Mn^{3+} 。DEAE 凝胶色

谱和高压液相色谱分离出的酶组份中,有两个组份的酶学活性依赖于 Mn^{2+} 的存在,在分光光度计 A_{465nm} 处都有一吸收峰。

关键词 担子菌, 锰过氧化物酶, 木质素

微生物降解木质素是地球上生物碳循环中非常重要的组成部份。木质素生物降解的酶系主要分为木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase)和锰过氧化物酶(Mn-peroxidase)。^[1,2]自两种酶从黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的培养液中分离出来后^[3-6],大多数研究者都以这株菌为对象,对木质素过氧化物酶的分离提纯、特性及生物催化机理和产酶的最适培养参数作了大量工作,但对能产生这两种酶的其他菌报道甚少。Johansson 等人曾报道,*Trametes versicolor*^[7]、*Lentinula edodes*^[8]和 *Phlebia radiata*^[9]也能产生锰过氧化物酶。

本文对血红密孔菌 K-2352 在高氮液体培养基中产生锰过氧化物酶,以及该酶的分离和酶学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus* K-2352)由日本京都大学木质科学研究所提供。

1.2 培养基及培养条件

PM 高氮培养基含有(%) : 葡萄糖 1.0, 酵母粉 0.02, Kirk 无机盐溶液^[10] 1.0, 氮(采用日本多聚蛋白胨,氮含量为 12.5—14.5%) 60 mmol/L 和 20 mmol/L 苯二酸钠缓冲液, pH4.5。培养分两步进行,预培养 3 天后,用灭菌纱布过滤,菌体在乳钵中研磨,接种到装有 15 ml 培养液的 200 ml 三角瓶中,30℃ 下绝对避光静置培养。

1.3 锰过氧化物酶活力测定

1.3.1 愈创木酚法:一种反应混合液含 0.4 mmol/L 愈创木酚, 0.1 mmol/L H_2O_2 , 0.2 mmol/L $MnSO_4$ 和 50 mmol/L 琥珀酸钠缓冲液, pH4.5。另一种反应混合液不含 $MnSO_4$ 成份。测定两种反应液在 465nm 处的吸光度在单

位时间的增加数,这是由于愈创木酚被氧化引起的。一个活力单位定义为每分钟引起 A_{465nm} 一个单位变化所需的酶液量。

1.3.2 酚红法:基本按 Kuwahara 方法^[3],反应混合液含 0.1 mmol/L $MnSO_4$, 0.1 mmol/L H_2O_2 , 0.25 mmol/L 酚红钠盐和 20 mmol/L 乳酸缓冲液, pH4.5。30℃ 下反应 5 分钟后,立即用碱终止反应,测定 610nm 处的吸光度的增加数。

1.4 锰过氧化物酶的分离

1.4.1 酶液浓缩:收集第 5 天的培养液,过滤,以 9000r/min 离心去孢子,上清液用 Amicon PM-10 分子筛过滤膜,在 1 kg/cm² 压力下过滤,浓缩 35 倍,透析 12 小时。

1.4.2 DEAE-Sephrose CL-6B 柱层析:层析柱用 20 mmol/L、pH4.5 琥珀酸钠缓冲液平衡后,将透析过的酶液从柱顶加入,以同样的缓冲液洗脱,流速 10 ml/h,直到流出液在 OD_{280nm} 的吸收值低于 0.04,再用同样缓冲液配制的 0.15 mol/L NaCl 液洗脱。

以上步骤均在 4℃ 下完成。

1.4.3 TSK-GEL DEAE-5PW 高压液相色谱分析:将柱层析后得到的有酶活力管号中的收集液浓缩后,取 20 μ l 进样,用 20 mmol/L 琥珀酸钠缓冲液和用该缓冲液配制的 1 mol/L NaCl 液同时洗脱,流速 1.5ml/min。

1.5 Mn^{3+} 与乳酸形成络合物的测定

参照 Glenn 方法^[12]。

1.6 蛋白质测定

参照 Bradford 方法^[13],用牛血清白蛋白(Sigma 公司产品)作标准。

2 结果

2.1 锰过氧化物酶的鉴别

在降解木质素的酶系中,除木质素过氧化物酶外,还有锰过氧化物酶。为了证实血红密孔

菌产生锰过氧化物酶,对该菌在不同条件下培养得到的酶液进行了催化性质的分析。在有 H_2O_2 存在下,酶液不能氧化藜芦醇,说明酶液不具有木质素过氧化物酶的催化特性^[14]。以酚红为底物的酶液催化反应结果见表 1,在反应混合液中扣除 H_2O_2 的条件下,氧化反应不发生,即 ΔA_{610nm} 为零,表明该酶促反应需要 H_2O_2 存在;但在反应液中没有 Mn^{2+} 的情况下,有很少的氧化反应发生,这可能是普通辣根过氧化物酶氧化底物引起的,因为辣根过氧化物酶的催化性质与木质素过氧化物酶相似^[15]。除了这部分氧化,反应混合液中其余约 94.5% 的氧化反应都需要 Mn^{2+} 的存在。该结果与 Kuwahara 等人^[3]报道的锰过氧化物酶的催化性质是一致的。

锰过氧化物酶能直接氧化 Mn^{2+} 为 Mn^{3+} , Mn^{3+} 与 α -羟基酸形成络合物^[4,16,17]。该络合物再氧化木质素模型物或木质素^[18-19]。Mn-乳酸

络合物在 OD_{240nm} 处的吸收峰随反应时间的延长而升高(图 1),说明反应液中 Mn^{2+} 不断被锰过氧化物酶氧化成为 Mn^{3+} 。

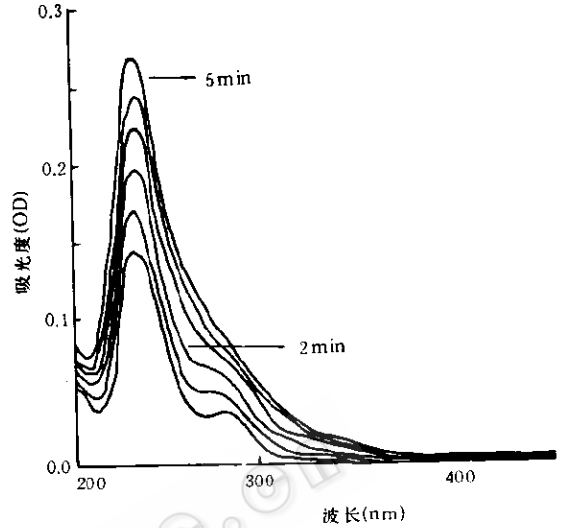


图 1 Mn^{3+} -乳酸络合物吸收光谱

表 1 酚红为底物的锰过氧化物酶活力

| 编号 | 反应条件 | A_{210nm} | | ΔA_{610nm} |
|----|---------------------|-------------|---------|--------------------|
| | | t=0 min | t=5 min | |
| 1 | 反应混合液 | 0.270 | 1.439 | 1.169 |
| 2 | -酶 | 0.266 | 0.268 | 0.002 |
| 3 | - H_2O_2 | 0.230 | 0.230 | 0 |
| 4 | - Mn^{2+} | 0.238 | 0.302 | 0.064 |
| 5 | - H_2O_2, Mn^{2+} | 0.235 | 0.236 | 0.001 |

“酶”:K-2352 菌的第 5 天培养液;“-酶”:表示从反应混合液中减去酶;“- H_2O_2 ”表示从反应混合液中减去 H_2O_2 ,下同

2.2 锰过氧化物酶的产生条件

在血红密孢菌 K-2352 菌株产生锰过氧化物酶的条件中,发现光照条件下该菌不产生锰过氧化物酶活力。而在 PM 高氮培养基中,闭光条件下产生的锰过氧化物酶活力在第六天达到最大,以后逐渐降低,胞外蛋白浓度随培养时间的延长而逐渐增大(图 2)。试验结果还表明,在低氮培养基^[10]中,该菌不产生锰过氧化物酶(数据未列出),因此丰富的氮可增强 K-2352 菌株产锰过氧化物酶活力。

2.3 酶的分离结果

从典型产木质素降解酶的黄孢原毛平革菌的培养液中,至少已分离出 4 个组份具有锰过

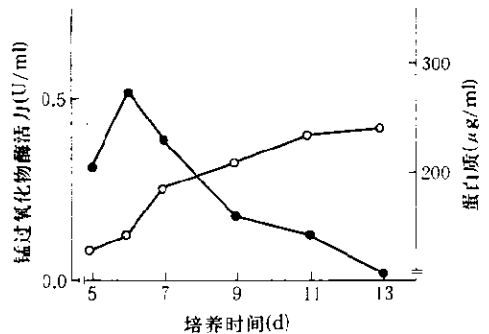


图 2 酶活和蛋白质浓度随时间变化
1:酶活力; 2:蛋白质浓度

氧化物酶活力,而且这些组份在406nm处均有一个特征吸收峰^[2]。本实验用柱层析和高压液相色谱分析对K-2352菌培养液中的锰过氧化物酶进行了分离。柱层析结果表明,36—38管号中的收集液有锰过氧化物酶活力(图3),合

并这3支管中的收集液,经高压液相色谱柱分离出两个组份有锰过氧化物酶活力。两组份分别为峰I和峰II(图4),并且两组份的吸收光谱扫描图上,在406nm处也都有一个吸收峰(图5)。

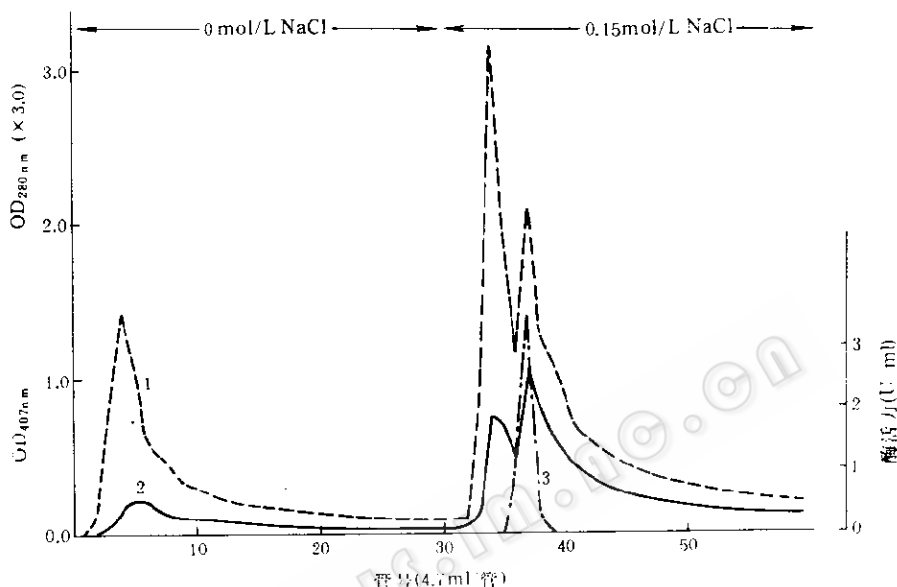


图3 DEAE-Sepharose CL-6B柱流出图谱
1. OD_{407nm}; 2. OD_{280nm}(×3.0) 3. 酶活力

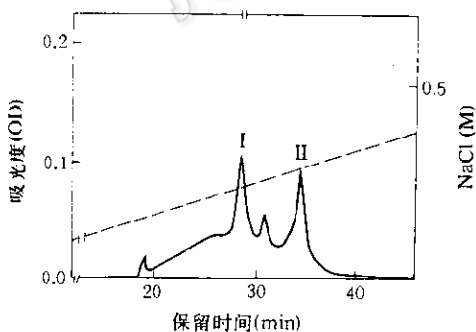


图4 锰过氧化物酶的HPLC层析图
“.....”示氯化钠浓度

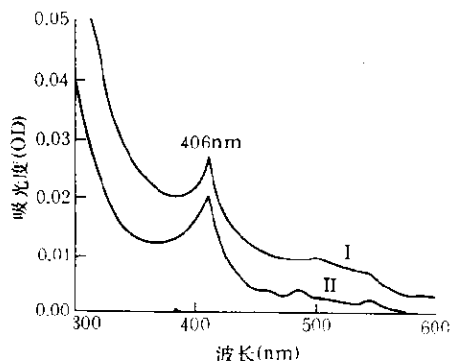


图5 锰过氧化物酶的吸收光谱
“I”示峰I; “II”示峰II

3 讨论

为证实血红密孔菌K-2352菌株产生的是锰过氧化物酶,必须首先要测定培养物中是否具有该酶的催化性质^[2]。本试验测定的血红密孔菌产生的过氧化物酶活力中,有少部分酶的

酶学活性不需要Mn²⁺存在,但又不能氧化藜芦醇,因此是普通的辣根过氧化物酶。大部分酶的酶学活性都依赖Mn²⁺的存在,并能直接氧化Mn²⁺成为Mn³⁺,这一结果与Kuwahara等

人^[3,18]从黄孢原毛平革菌得到的锰过氧化物酶的特性一致。从柱层析和高压液相色谱分离出的有锰过氧化物酶活性的两个组分(图4中的峰I和峰II),在406nm处均有一吸收峰(图5),与Paszczyński^[16]报道的锰过氧化物酶在406nm处有一个血红素IX吸收峰相同。

K-2352菌在以多聚蛋白胨为氮源的高氮液体培养基中产生锰过氧化物酶的活力较强。由于丰富的氮源充分满足了菌体的生长和蛋白质的合成,克服了限氮培养的不足,从而有利于生产大量的锰过氧化物酶,而其它报道的真菌仅在限氮培养或固体培养中产生这种酶^[4,8]。实验还证明光照对K-2352菌的生长和产酶影响也较大。

参 考 文 献

- [1] Buswell J A, Odier E. the CRC Critical Reviews in Biotechnology, 1987, **6**: 1-60.
- [2] Gold M H, Wariishi H, Valli K. ACS Symposium Series, 1989, **389**: 127-139.
- [3] Kuwahara M, Glenn J K, Morgan M A. FEBS Lett., 1984, **169**: 247-250.
- [4] Glenn J K, Gold M H. Arch. Biochem. Biophys., 1985, **242**: 329-341.
- [5] Paszczyński A, Huynh V-B, Crawford R L. FEMS Microbiol. Lett., 1985, **29**: 37-41.
- [6] Wariishi H, Akileswaran L, Gold M H. Biochemistry, 1988, **27**: 5365-5370.
- [7] Johansson T, Nyman P O. Acta Chem. Scand., 1987, **41**: 762-765.
- [8] Forrester I T, Grabski A C, Mishra C, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1990, **33**: 359-365.
- [9] Karhunen E, Kantelinen A, Niku Paavola M-L. Arch. Biochem. Biophys., 1990, **279**: 25-31.
- [10] Kirk T K, Schultz E, Connors W J, et al. Arch. Microbiol., 1978, **117**: 277-285.
- [11] Asada Y, Miyabe M, Kikkawa M et al. Agric. Biol. Chem., 1986, **50**: 525-529.
- [12] Glenn J K, Akileswaran L, Gold M H. Arch. Biochem. Biophys., 1986, **251**: 688-696.
- [13] Bradford M M. Anal. Biochem., 1976, **72**: 248-254.
- [14] Tien M, Kirk T K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, **81**: 2280-2284.
- [15] Kersten P J, Kalyanaraman B, Hammel K E, et al. Biochem. J., 1990, **268**: 475-480.
- [16] Paszczyński A, Huynh VB, Crawford R L. Arch. Biochem. Biophys., 1986, **244**: 750-765.
- [17] Huynh VB, Crawford R L. FEMS Microbiol. Lett., 1985, **28**: 119-123.
- [18] Forrester I T, Grabski A C, Burgess R R, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, **157**: 992-999.
- [19] Hammel K E, Tardone P J, Moen M A, et al. Arch. Biochem. Biophys., 1989, **270**: 404-409.

STUDIES ON THE Mn-PEROXIDASE AND LACCASE FROM FUNGUS II. THE Mn-PEROXIDASE PRODUCED BY A BASIDIOMYCETE, *PYCNOPORUS SANGUINEUS* K-2352

Zhou Jinyan Zhang Faqun

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Masaaki Kuwahara

(Wood Research Institute of Kyoto University, Japan)

Abstract The extracellular Mn-peroxidase secreted by *Pycnoporus sanguineus* K-2352 in high-nitrogen medium under absolute dark condition was studied. Results showed that the activity of Mn-peroxidase in the culture was near 94.5% and depended on the presence of Mn^{2+} the Mn-peroxidase was capable of oxidizing Mn^{2+} to Mn^{3+} . Two components obtained from the culture solution by DEAE-sepharose chromatography and HPLC had a absorption at 406nm.

Key words Basidiomycete, Mn-peroxidase, Lignin