

黄孢原毛平革菌在多种氨氮浓度下木质素降解酶的产生

喻国策, 文湘华, 李东锋, 李锐, 钱易 (清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:在氨氮浓度 0.0308—0.924 g/L 下对黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)在空气环境中进行自由悬浮振荡培养。在氨氮浓度 0.0308—0.308 g/L 下可检测到木质素过氧化物酶活性, 最高酶活为 42.8 U/L; 在氨氮浓度 0.0308 g/L 和 0.154 g/L 下可检测到漆酶活性, 最高酶活为 35.0 U/L。在氨氮浓度不低于 0.154 g/L 时, 葡萄糖消耗速率大致相当, 明显高于在氨氮浓度 0.0308 g/L 下的葡萄糖消耗速率; 氨氮在葡萄糖耗尽时达到最低值, 然后开始增大; 木质素过氧化物酶和漆酶的活性峰与葡萄糖和氨氮的最大消耗基本对应。实验结果对木质素降解酶发酵和白腐真菌在环境工程中的直接应用具有启发意义。

关键词:黄孢原毛平革菌; 液体振荡培养; 氨氮浓度; 木质素过氧化物酶; 漆酶

Formation of the ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* under various ammonium nitrogen concentrations

YU Guoce, WEN Xianghua, LI Dongfeng, LI Rui, QIAN Yi (Environment Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: Agitated submerged culture of *Phanerochaete chrysosporium* was carried out in air at ammonium nitrogen concentrations ranging from 0.0308 to 0.924 g/L. Lignin peroxidase was detected within a range of nitrogen concentration from 0.0308 to 0.308 g/L with the highest peak activity of 42.8 U/L, and laccase between 0.0308 g/L and 0.154 g/L with the highest activity of 35.0 U/L. At nitrogen concentrations of 0.154 g/L and above, glucose consumption rates were comparable and evidently higher than that at 0.0308 g/L, and ammonium nitrogen reached minimums when glucose was depleted and thereafter began to increase. Activity peaks of lignin peroxidase and laccase coincided with the maximum or nearly maximum consumption of glucose and nitrogen at nitrogen concentrations of 0.154 g/L and above. The results would be of importance in the fermentation of the ligninolytic enzymes and the direct application of white rot fungi in environmental engineering.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*; agitated submerged culture; ammonium nitrogen concentrations; lignin peroxidase; laccase

白腐真菌能够产生和分泌木质素降解酶, 降解木质素以及许多持久性和有毒有机污染物^[1-3], 白腐真菌及其木质素降解酶在造纸工业的生物制浆和纸浆的生物漂白、水污染控制和土壤修复等方面具有重要的应用价值。黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是白腐真菌产酶和降解研究的模式菌种, 深入认识其产酶和表达调控机制对白腐真菌及其木质素降解酶的应用具有基础意义。

一般认为黄孢原毛平革菌木质素降解酶系统主要包括木质素过氧化物酶(EC1.11.1.14)、锰过氧化物酶和产 H₂O₂ 酶, 木质素降解酶受氮、碳或硫营养限制激发产生^[4,5], 在高氧条件下表现活跃^[6,7]。一般认为 *P. chrysosporium* 不产生漆酶(EC 1.10.3.2)^[8]。然而, 木质素降解酶的

收稿日期: 2002-11-04; 修订日期: 2003-03-12

基金项目: 863 计划探索性项目(2002AA649100)

作者简介: 喻国策(1967—), 男, 博士

表达调控机制至今尚未彻底了解清楚. Chen 等^[9]报道,用聚氨酯海绵或泡沫固定化培养 *P. chrysosporium*,可以在氮充分条件下(22 mmol/L)产生木质素过氧化物酶. Dosoretz 等^[10]对 *P. chrysosporium*进行非浸没式固定化培养,发现即使在氮过量条件下(45 mmol/L, 60 mmol/L)也可以产生木质素过氧化物酶,且其酶活峰值高于氮限制和氮充分条件下的酶活峰值. Rothchild 等^[11]报道 *P. chrysosporium*在用聚氨酯泡沫固定、低 C/N 比(7.47)和空气条件下培养可以产生木质素过氧化物酶. 另外, Srinivasan 等^[12]在用纤维素而不是通常的葡萄糖作碳源培养 *P. chrysosporium*时检测到漆酶的存在. Rodriguez 等^[13]发现 *P. chrysosporium*可以在半固态培养条件下产生漆酶,并受二氧化锰的明显促进. 已知木质素降解酶的产生受培养基组成、培养方式和培养条件的影响极为显著^[1,14,15].

我们在考察碳源和氮源对包括 *P. chrysosporium* 在内的数株白腐真菌生长和产酶的影响时发现, *P. chrysosporium* 在空气中自由悬浮振荡培养时在 22 mmol/L 氮氮浓度下可以产生少量的木质素过氧化物酶,在 2.2 mmol/L 氮氮浓度下可以产生少量的漆酶,而这样的培养条件往往被认为不宜于木质素降解酶的产生. 我们因此进一步考察 *P. chrysosporium* 在多种氮氮浓度下培养时产生木质素降解酶的情况,以期增进对白腐真菌产酶生理的了解,促进木质素降解酶生产和白腐真菌在环境治理中的直接应用.

1 材料和方法

1.1 菌种

Phanerochaete chrysosporium BKM-F-1767 (ATCC 24725) 由本实验室保存.

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基 采用 PDA 培养基,即土豆汁 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L.

1.2.2 液体培养基 基于 Tien 和 Kirk^[16]培养基配制,其中葡萄糖浓度为 10 g/L,采用 0.02 mol/L 乙酸缓冲液(pH 4.4)代替丁二酸二甲酯缓冲液. 不同氮源浓度下(以酒石酸氮为氮源)氮氮浓度分别为 0.0308 g/L (2.2 mmol/L)、0.154 g/L (11 mmol/L)、0.308 g/L (22 mmol/L)、0.462 g/L (33 mmol/L)、0.616 g/L (44 mmol/L) 和 0.924 g/L (66 mmol/L). VB₁ 为 1 mg/L,接种前无菌过滤加入. 不加入藜芦醇和表面活性剂.

1.3 培养过程

从在 30 °C下培养 15 d 的 PDA 平板上剥取适量的孢子,在无菌水中混匀得到孢子悬浮液,等量接入含 100 mL 培养基的一系列 250 mL 锥形瓶中,每瓶中相当于接入平板面积为 1 cm² 的孢子. 置于旋转式摇床在空气条件下培养,温度为 35 °C,转速为 160 r/min. 培养过程中每天定时取样. 对于所要考察的每 1 种情况同时进行 3 组平行实验,实验结果取其平均数值.

1.4 分析方法

1.4.1 主要仪器和试剂 可见光分光光度计(UV-1200V, SHIMADZU),可见紫外分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU);藜芦醇、2,2'-连氮-二-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate), ABTS)和次氨基三乙酸盐均为 Fluka 公司产品,葡萄糖测定试剂盒为上海生物制品研究所上海申索试剂有限公司产品,其余药品均为分析纯试剂.

1.4.2 粗酶液制备 样品经离心(9000 r/min, 10 min)得到上清液,用于酶活等检测.

1.4.3 木质素过氧化物酶 采用 Tien 和 Kirk^[16]方法,定义每 1 min 氧化 1 μmol 藜芦醇成藜芦醛所需的酶量为 1 个酶活力单位.

1.4.4 漆酶 采用 Bourbonnais 和 Paice^[17] 方法,定义每 1 min 氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位.

1.4.5 葡萄糖 采用葡萄糖测定试剂盒测定.

1.4.6 氨氮 采用纳氏试剂比色法测定^[18].

2 结果和讨论

2.1 木质素降解酶的产生

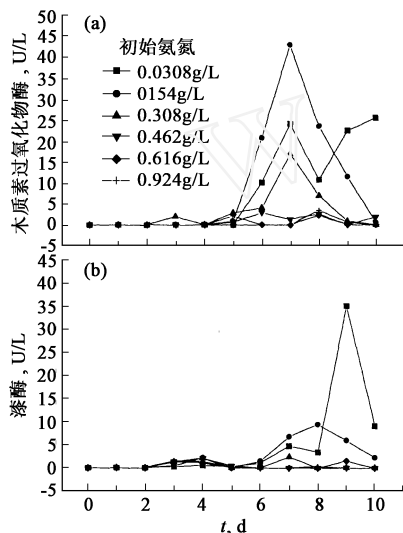


图1 *P. chrysosporium* 木质素降解酶的产生
(a) 木质素过氧化物酶 (b) 漆酶

Fig.1 Formation of the ligninolytic enzymes by *P. chrysosporium* in agitated submerged culture in air ((a) lignin peroxidase (b) laccase)

产生受氮浓度条件影响,低氮浓度有利于酶的产生,高氮浓度则抑制酶的产生.氮浓度条件对木质素过氧化物酶和漆酶产生的影响又有所不同,木质素过氧化物酶在氮浓度低于 0.462 g/L 时有酶活表现,在 0.154 g/L 时获得最大值;漆酶在氮浓度低于 0.308 g/L 时有酶活表现,酶活随氮浓度的减小而增大.

一般认为 *P. chrysosporium* 在非氮限制和空气条件下培养不利于木质素过氧化物酶的产生^[4,6,7].本文不但在氮限制条件下(0.0308 g/L)而且在更高的浓度(0.154 g/L)甚至氮充分条件下(0.308 g/L)检测到少量木质素过氧化物酶活性.

P. chrysosporium 一般在麦芽汁琼脂平板上保存,将孢子萌发的菌丝混匀后用于接种^[16],本实验菌种在 PDA 平板上保存,接种物为培养较长时间的孢子,种液制备过程的差异可能会引起菌丝后续生长和代谢的变化,从而引起木质素

P. chrysosporium 振荡培养时木质素过氧化物酶的产生情况如图 1(a) 所示.在较低的氨氮浓度 0.0308 g/L、0.154 g/L 和 0.308 g/L 下,可以比较明显地检测到木质素过氧化物酶的产生,酶活在 5 d 左右出现,在 7 d 产生峰值,在氨氮浓度 0.154 g/L 下有最大酶活性表现 (42.8 U/L).值得注意的是,在氨氮浓度 0.154 g/L 和 0.308 g/L 下,酶活峰值出现的时间与葡萄糖消耗尽或接近于消耗尽的时刻以及氨氮消耗至最低值的时刻相对应(参见图 3).在较高的氨氮浓度(0.462 g/L—0.924 g/L)下木质素过氧化物酶的产生很不明显.

漆酶的产生情况如图 1(b) 所示.在较低的氨氮浓度 0.0308 g/L 和 0.154 g/L 下,可以检测到漆酶的产生,酶活峰值分别出现在 9 d 和 8 d,在氨氮浓度 0.0308 g/L 下表现出最大酶活 35.0 U/L.在氨氮浓度 0.154 g/L 下酶活峰值出现的时间也对应着葡萄糖完全耗尽以及氨氮处于最低值的时刻(参见图 3).在较高的氨氮浓度(0.308 g/L—0.924 g/L)下很难检测到漆酶活性.

木质素过氧化物酶和漆酶活力峰值随初始氨氮浓度的变化如图 2 所示.从中可以明显看出,木质素降解酶的产生

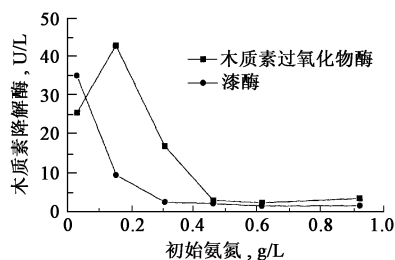


图2 木质素降解酶活力峰值
随氨氮浓度的变化

Fig.2 Changes in peak activities of the ligninolytic enzymes with increasing ammonium nitrogen concentrations

过氧化物酶在培养过程受到调节而得到表达.在氮氮浓度 0.154 g/L 和 0.308 g/L 下酶活峰值与葡萄糖消耗尽或接近于消耗尽相对应,因此木质素过氧化物酶的产生可能与碳营养的限制有关.在 *P. chrysosporium* 振荡培养时经常向其中加入某些诱导物质如藜芦醇以及表面活性剂,我们在实验中曾检测到一定浓度(40 mmol/L)的藜芦醇对细胞生长和木质素过氧化物酶的产生有明显的抑制作用,木质素降解酶表达对培养条件如培养基成分和温度(实验控制在 35 °C)等的敏感可能也会对酶的合成有所影响.张朝晖等^[19]也曾在空气环境下自由悬浮振荡培养 *P. chrysosporium* SHL-1 获得约 110 U/L 木质素过氧化物酶酶活. *P. chrysosporium* 漆酶的表达和调控机制至今尚不清楚,漆酶活性的出现也应与种子的状态和营养供应等有关.液体振荡培养时木质素过氧化物酶和漆酶活力比较小,并且酶活因 H_2O_2 和蛋白酶的存在等而很不稳定^[20,21],这可能是酶活不易检测到的一个原因.

虽然本文在一定的较高氮源浓度下检测到木质素过氧化物酶和漆酶的存在,但酶的产生在更高的氮源浓度下仍受到抑制,因此木质素降解酶表达的氮调节模式可能并未改变,只是抑制酶产生的氮浓度的阈值有所增大.这同时说明培养过程中木质素降解酶产生所受氮浓度的调节可能不是固定不变的,而会受到某些因素的影响而在一定程度上发生变化.另外,虽然在较高氮源浓度下检测到木质素降解酶的存在,但其同功酶组成与在氮限制条件下比较,可能会发生改变^[10].

2.2 *P. chrysosporium* 对碳氮营养的利用

P. chrysosporium 在不同氮氮浓度下生长时形成均匀的菌球,经观察在氮氮浓度 0.308 g/L 和 0.462 g/L 下菌球稍大,图 3 表示 *P. chrysosporium* 在培养过程对碳源和氮源的利用情况.在氮限制条件下(氮氮 0.0308 g/L)葡萄糖消耗速率较低,在培养结束时仍有相当量的葡萄糖残留.在氮浓度不低于 0.154 g/L 时葡萄糖消耗速率大致相当,都明显高于氮限制条件下的葡萄糖消耗速率,此时葡萄糖消耗大致存在 3 个阶段,在培养前期(0—4 d)葡萄糖消耗速率较低,接着葡萄糖进入一个快速消耗期,并在 7 d 或 8 d 完全耗尽,然后培养过程处于无碳状态(图 3(a)).

氮氮的消耗除在氮限制条件下不够明显外大致呈现相同的规律,在培养前期(0—3 d)均不够明显,这与葡萄糖在培养前期消耗的低速率相一致.此后氮氮进入一个较快的消耗期,这大致对应着葡萄糖的快速消耗期.氮氮浓度在 7 d 或 8 d 达到一个最低值,这恰好与葡萄糖完全耗尽相对应.有趣的是,同 Dosoretz 等^[10]报道的情况相似,氮氮在达到最低值后开始逐渐增加,直至培养结束,这对应着培养液的无碳状态(图 3(b)).

在不同氮氮浓度下 *P. chrysosporium* 对碳源和氮源的利用有着较好的对应关系,碳氮利用和木质素降解酶的产生也有着一定的对应关系.氮氮浓度在培养液中无碳时从最低值开始增大,这可能是由于这时细胞自溶的结果,这其中包括细胞蛋白质的水解^[10].

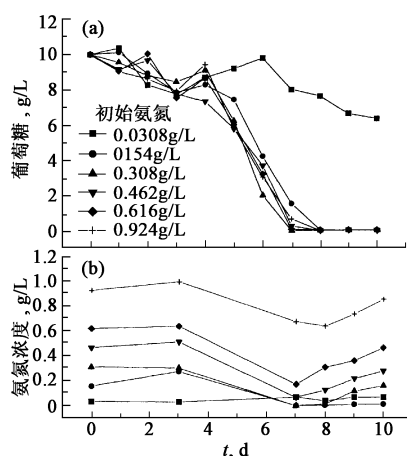


图3 *P. chrysosporium* 对碳氮营养的利用
(a) 葡萄糖; (b) 氮氮

Fig. 3 Nutrient consumption by *P. chrysosporium* in agitated submerged culture in air
(a) glucose. (b) ammonium nitrogen

3 结论

P. chrysosporium 在空气中振荡培养时可以在一定的高于氮限制的氮源浓度下产生少量木质素过氧化物酶,在氮限制浓度下产生少量漆酶.木质素降解酶表达所受的氮调节情况可能不是固定不变的,而会在一定程度上受到某些培养因素的影响.这些结果进一步表明了木质素降解酶表达调控机制的复杂,并对木质素降解酶发酵和白腐真菌在环境工程中的直接应用具有启发意义.进一步工作将包括考察接种物状态等对木质素降解酶产生的影响.

参考文献:

- [1] Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin[J]. *Ann Rev Microbiol*, 1987, 41: 465—505
- [2] Bumpus J A, Tien M, Wight D, et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. *Science*, 1985, 229: 1434—1436
- [3] Barr D P, Aust S D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants[J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28: 78A—87A
- [4] Keyser P, Kirk T K, Zeikus J G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation[J]. *J Bacteriol*, 1978, 135: 790—797
- [5] Jeffries T W, Choi S, Kirk T K. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42: 290—296
- [6] Faison B D, Kirk T K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49: 299—304
- [7] Dosoretz C G, Chen A H C, Gethlein H E. Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 34: 131—137
- [8] Thurston C F. The structure and function of fungal laccases [J]. *Microbiology*, 1994, 140: 19—26
- [9] Chen A H C, Dosoretz C G, Gethlein H E. Ligninase production by immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* grown under nitrogen-sufficient conditions [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13: 404—407
- [10] Dosoretz C G, Rothschild N, Hadar Y. Overproduction of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) under nonlimiting nutrient conditions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 1919—1926
- [11] Rothschild N, Hadar Y, Dosoretz C. Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1833—1838
- [12] Srinivasan C, D'Souza T M, Boominathan K, et al. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 4274—4277
- [13] Rodriguez C S, Santoro R, Cameselle C, et al. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Biotechnol Letts*, 1997, 19: 995—998
- [14] Buswell J A, Odier E. Lignin biodegradation [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1987, 6: 1—60
- [15] Dosoretz C G, Gethlein H E. Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 28/29: 253—265
- [16] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238—249
- [17] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation [J]. *FEBS Letts*, 1990, 267: 99—102
- [18] 国家环保局. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997
- [19] 张朝晖, 夏黎明, 柯世省, 等. 固定化黄孢原毛平革菌合成木质素过氧化物酶 [J]. *高校化学工程学报*, 1999, 13: 135—140
- [20] Bockle B, Martinez M J, Guillen F, et al. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 923—928
- [21] Dosoretz C G, Chen H C, Gethlein H E. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 395—400