

文章编号 :1009 - 038X(2003)04 - 0023 - 04

黄孢原毛平革菌产蛋白酶对过氧化物酶的影响

鲁时瑛¹, 王树英², 李华钟¹, 陈坚¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘要:在培养黄孢原毛平革菌产生木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)过程中产生的胞外蛋白酶与 LiP 和 MnP 的快速失活有关. 该蛋白酶在 pH 7 的条件下酶活很高, 其主要作用是促进 LiP 和 MnP 的分解, 而不是抑制它们的产生. HgCl₂ 是蛋白酶的抑制剂, 其抑制机理类似于 HgCl₂ 对蛋白酶 K(PK)的抑制. 添加 HgCl₂ 的发酵液能提高过氧化物酶的酶活和稳定性, 最佳添加量为 1 μmol/L, 最佳添加时间在接种后第 5 天.

关键词:黄孢原毛平革菌, 木质素过氧化物酶, 锰过氧化物酶, 蛋白酶, 抑制

中图分类号: Q 556. 9

文献标识码: A

Effect of *Phanerochaete chrysosporium* Produced Protease on Peroxidases

LU Shi-ying¹, WANG Shu-ying², LI Hua-zhong¹, CHEN Jian¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Extracellular protease produced by cells of *Phanerochaete chrysosporium* has been studied in terms of the decay of lignin peroxidase(LiP) and manganese peroxidase(MnP). The activity of this protease was high when pH was about 7. 0, and it mainly accelerated the deactivation of the peroxidases rather than inhibited their production. HgCl₂ was showed to be an effective inhibitor of the protease and the inhibition mechanism was similar to that of Protease K inhibition by HgCl₂. The activity and stability of ligninase system were improved by addition of HgCl₂. The optimal addition amount was 1 μmol/L, and the best adding time was the 5th day after the inoculation.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; lignin peroxidase(LiP); manganese peroxidase(MnP); protease; inhibition

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是一类腐生真菌, 该菌在一些主要营养物(如氮、碳、硫)受到限制时形成的木质素降解酶系对各种异生物质具有独特的降解能力^[1, 2]. 大量研究表

明, 该菌可以降解多种染料^[3], 包括偶氮类、三苯甲烷类、杂环类、聚合染料等. 对底物的氧化表现出高度非特异性的特点, 在染料废水处理方面具有广泛的应用前景^[4].

收稿日期 2003-02-19; 修回日期 2003-03-20.

作者简介: 鲁时瑛(1978-)女, 浙江绍兴人, 环境工程硕士研究生.

万方数据

黄孢原毛平革菌合成的木质素降解酶系中起主要作用的有两个酶:木质素过氧化物酶(Lignin Peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Manganese Peroxidase, MnP).它们合成后被分泌到胞外,经H₂O₂启动一系列自由基链反应,依靠氧化还原反应降解结构各异的有机物.但研究中发现,在LiP和MnP酶活达到最高后很快就下降,难以长时间起到很好的氧化作用,限制了它们在工业生产中的应用.有报道^[5,6]称过氧化物酶稳定性的下降与细胞产生的蛋白酶有关.作者研究了蛋白酶与LiP和MnP之间的关系,并对该蛋白酶的一些性质做了初步研究.

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

菌种:黄孢原毛平革菌 WX213;由作者所在微生物实验室提供;基本培养基(g/L)^[7]:葡萄糖 10, 酒石酸铵 0.2, 苯甲醇 0.54, MgSO₄ 0.71, 吐温 80 1, KH₂PO₄ 2.56, VB₁ 0.001, 邻苯二甲酸缓冲液 10 mmol, 微量元素液 70 mL, 调 pH 4.5.

微量元素液(g/L):氨基乙酸 0.6, MnSO₄·H₂O 0.5, NaCl 1, FeSO₄·7H₂O 0.1, CoSO₄·7H₂O 0.22, CaCl₂·2H₂O 1.56, ZnSO₄·7H₂O 0.1, CuSO₄·5H₂O 0.1, AlK(SO₄)₂·12H₂O 0.01, HBO₃ 0.01, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01.

培养条件:250 mL的摇瓶装液量 90 mL,接种量 1×10⁶ 个孢子/mL,培养温度 37℃,转速 150 r/min,培养 5~6 d^[8].

1.2 分析方法

LiP活力的测定:见参考文献[7].

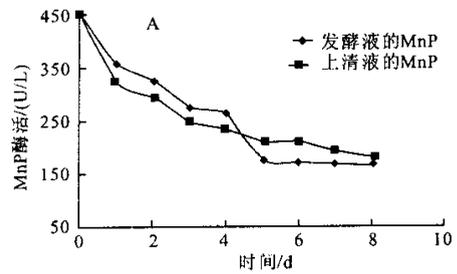
MnP活力的测定:见参考文献[9].

蛋白酶活力的测定:将发酵液离心取上清液,4℃透析24 h,然后用血红蛋白法测定^[10].

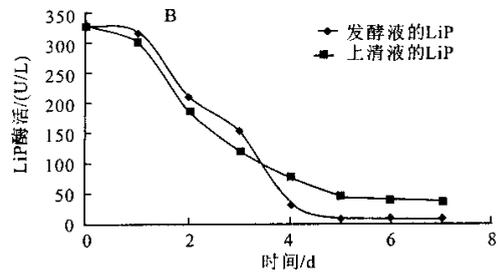
2 结果与讨论

2.1 胞外蛋白酶的确证

2.1.1 菌球对酶活的影响 在酶活达到最高后,将同一体系的发酵液均分成两份,一份是离心去除菌体的上清液,另一份是带菌球的发酵菌悬液,将此上清液与发酵液4℃冰箱贮藏,每隔1 d测定LiP和MnP的酶活见图1.结果显示两者在持酶性上相差不大,如果LiP和MnP酶活的下降主要是由蛋白酶引起的,那该蛋白酶主要是胞外酶,而不是胞内酶,与菌球的存在与否关系不大,不会随贮存时间的延长而缓慢释放出来.这与文献报道不相符^[5].



A. MnP



A. Lip

图1 菌球对酶活的影响

Fig.1 Effect of pellets on enzymes

2.1.2 胞外蛋白酶的确证 取同一发酵产物,分别在3种情况下测定蛋白酶酶活:离心滤除菌球后的上清液、经超声波破碎的菌球悬浮液、发酵原液.结果见表1.表明上清液与发酵液中蛋白酶酶活相差不大,而菌球中蛋白酶活性很小,说明蛋白酶基本上都在胞外,该蛋白酶是胞外酶.

表1 不同处理条件下蛋白酶的酶活

Tab.1 Protease activity under different treatment

样品	蛋白酶酶活/(U/mL)
上清液	12.68
超声波破碎后的菌球悬浮液	1.19
发酵原液	12.75

2.2 蛋白酶与LiP和MnP的关系

接种后每天取样测定蛋白酶酶活及LiP和MnP酶活,结果见图2.

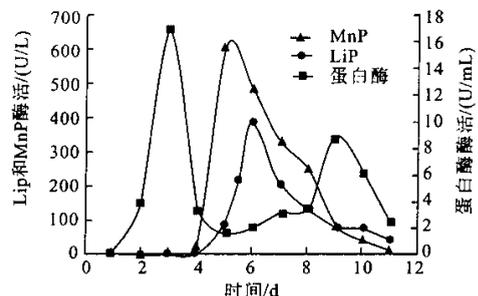


图2 各酶活变化曲线图

Fig.2 Production of LiP, MnP and protease

由图 2 知,蛋白酶酶活在第 3 天达到最高,在第 9 天也有一个小高峰.蛋白酶酶活高低与 LiP 和 MnP 酶活高低基本呈负对应关系,尤其是与木质素过氧化物酶.锰过氧化物酶(MnP)在第 5 天酶活最高,木质素过氧化物酶第 6 天酶活最高,而到第 9 天两者的酶活都迅速下降,而此时蛋白酶活力较高.

2.3 蛋白酶对过氧化物酶作用机制的初探

2.3.1 pH 对蛋白酶的影响 分别取第 3 天(第一个蛋白酶酶活高峰)和第 9 天(第 2 个蛋白酶酶活高峰)的培养液,在不同 pH 条件下测定蛋白酶的酶活(见图 3),结果发现蛋白酶在 pH 7.0 时酶活最高, pH>8 时酶活较低,第 3 天的酶活高于第 9 天的酶活,主要是由于发酵液中前者的酶量大于后者.实验发现酶活达到最高后,适当调高 pH 值,有利于保持 LiP 和 MnP 的酶活,这进一步证实 LiP 和 MnP 的稳定性与蛋白酶酶活高低有一定关系.

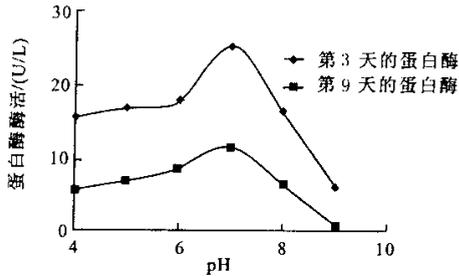


图 3 pH 对蛋白酶酶活的影响

Fig.3 Effect of pH on protease activity

2.3.2 蛋白酶作用方式的初探 实验中发现 HgCl₂ 能抑制蛋白酶的酶活,在蛋白酶产酶的 2 个高峰期(第 3 天和第 9 天)分别加入终浓度为 0.5 μmol/L 的 HgCl₂,以不加 HgCl₂ 的发酵液做对照见图 2,观察蛋白酶、LiP 和 MnP 的变化情况见图 4.

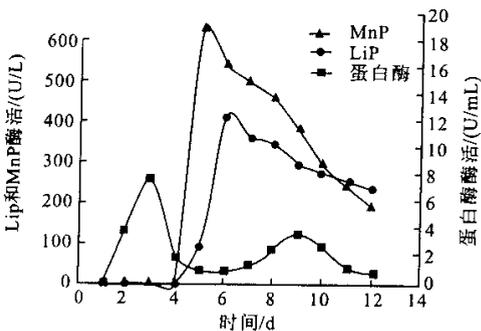


图 4 添加 HgCl₂ 后各酶活变化曲线图

Fig.4 Production of LiP, MnP and protease with HgCl₂ addition

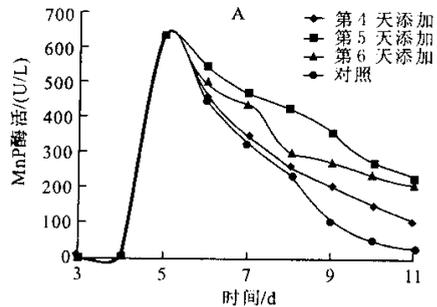
图 4 可知,添加 HgCl₂ 抑制了蛋白酶的酶活,但发酵前期,LiP 和 MnP 的产生时间及产量与未加

HgCl₂(见图 2)的发酵过程相比较无明显变化,说明蛋白酶对菌体生长及 LiP 和 MnP 的产生无明显的影响.到达 LiP 和 MnP 产酶高峰后,添加 HgCl₂ 的样品中, LiP 和 MnP 的下降趋势变缓,尤其是 LiP 效果明显,未添加 HgCl₂ 的样品中,两者酶活都迅速降低.该现象说明蛋白酶的作用方式主要是促进 LiP 和 MnP 的分解,而不是抑制它们的产生.

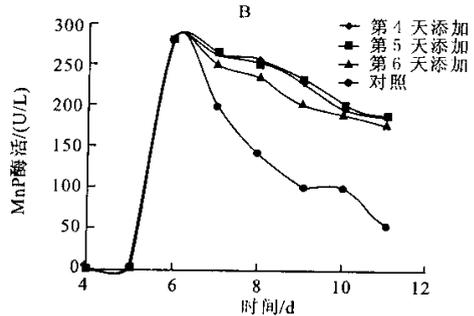
2.4 添加 HgCl₂ 对蛋白酶的抑制

2.4.1 添加时间对酶活的影响 在接种后第 1 或 2 天添加 HgCl₂,发现菌球不再长大,可能是因为 HgCl₂ 抑制了蛋白酶,菌球缺少生长所需的氨基酸,无法进入次级代谢,从而使菌球产酶受到抑制.

第 3 天添加 HgCl₂,如 2.3.2 所述,对 LiP 和 MnP 的产酶时间和酶产量都没什么影响,故考虑在产酶高峰期前后添加 HgCl₂.分别在接种后第 4、5、6 天添加 HgCl₂,MnP 和 LiP 的产酶情况见图 5.对于 MnP,第 4 天添加 HgCl₂ 酶活无显著提高,第 5、6 天添加, MnP 下降趋势减缓,但第 6 天不及第 5 天.对于 LiP,添加 HgCl₂ 能较明显的减缓酶活的下降,第 4、5 天添加的效果略好于第 6 天.综合这两种酶考虑,第 5 天添加 HgCl₂ 能较好的起到抑制蛋白酶的作用,有利于 MnP 和 LiP 酶活的保持.



A. MnP



B. LiP

图 5 添加时间对酶活的影响

Fig.5 Effect of HgCl₂ adding time on enzymes

2.4.2 添加量对酶活的影响 在第5天 MnP 酶活达到最高时加入不同浓度的 HgCl₂ 观察 MnP (见图6) 和 LiP (见图7) 酶活变化情况. 添加 0.1 μmol/L 和 10 μmol/L HgCl₂ 对 MnP 的作用效果差不多, 与对照比较, 酶活及稳定性都无多大提高, 添加 0.5 μmol/L 和 5 μmol/L 的效果相近, 比 0.1 μmol/L、10 μmol/L 和对照的稍好, 下降趋势也比对照缓慢. 添加 1 μmol/L 效果最好, 酶活比对照及其他添加量的稍有提高, 而且 MnP 酶活下降趋势相对较缓.

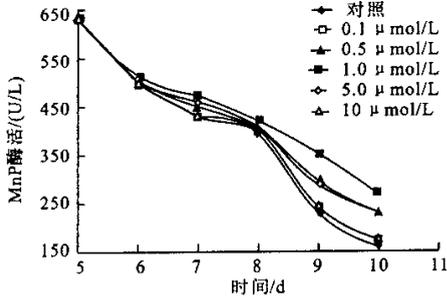


图6 不同浓度 HgCl₂ concentration 对 MnP 的影响

Fig.6 Effect of HgCl₂ on MnP

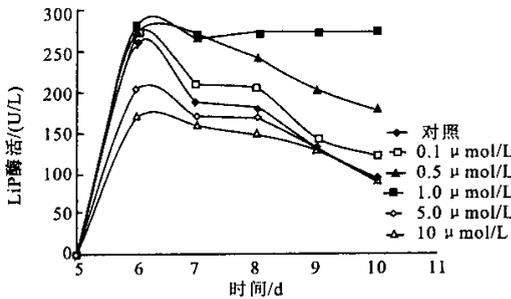


图7 不同浓度 HgCl₂ 对 LiP 的影响

Fig.7 Effect of HgCl₂ concentration on LiP

图7反映了 HgCl₂ 作用于 LiP 的情况. 添加 5 μmol/L 和 10 μmol/L HgCl₂ 反而抑制了 LiP, 添加 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L HgCl₂ 时 LiP 酶活有一定提高, 但稳定性无显著提高, 1 μmol/L 为最适添加量, 既提高了酶活, 又提高了稳定性.

2.4.3 添加 HgCl₂ 条件下蛋白酶与过氧化物酶的产生情况 根据 2.4.1 和 2.4.2 所确定的条件, 在接种后第5天向培养基中添加 1 μmol/L 的 HgCl₂, 在培养过程中蛋白酶和两种过氧化物酶的变化情况见图8, 比较图8和图2可以发现, 在第5天添加 1 μmol/L HgCl₂, 蛋白酶活性明显降低, LiP 酶活得以保持, MnP 酶活虽然仍在逐渐降低, 但降低的程度受到一定的遏制, 说明 HgCl₂ 是该蛋白酶的抑制剂, 它的存在提高了过氧化物酶的稳定性.

万方数据

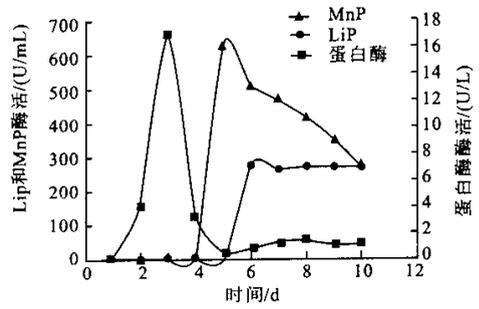


图8 添加 1 μmol/L HgCl₂ 时蛋白酶与过氧化物酶关系图

Fig.8 Production of LiP, MnP and protease with addition of 1 μmol/L HgCl₂

2.4.4 HgCl₂ 对蛋白酶抑制机理的初探 在蛋白酶第一个产酶高峰期, 加入不同浓度的 HgCl₂, 反应相同时间后测定蛋白酶的酶活. 如图9所示, HgCl₂ 浓度低于 1 μmol/L 时, 随 HgCl₂ 浓度的升高, 蛋白酶酶活降低. 当 HgCl₂ 的添加量超过 1 μmol/L 时, 蛋白酶的酶活并没有再继续降低. 这与 HgCl₂ 对蛋白酶 K (PK) 的抑制机理很相近. HgCl₂ 是蛋白酶 K (PK) 的抑制剂^[11], HgCl₂ 浓度低时, 首先占据的是 PK 上的共价结合位点, 产生不可逆抑制, 随浓度的升高抑制效果增加; 超过一定浓度后, 占据的是非共价结合位点, 这种可逆抑制会因底物浓度的升高而解除.

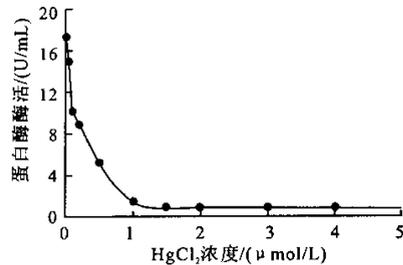


图9 蛋白酶酶活与 HgCl₂ 浓度的关系

Fig.9 Relationship of protease activity and HgCl₂ concentration

3 结论

1) 在培养黄孢原毛平革菌产生 LiP 和 MnP 过程中产生的蛋白酶能使 LiP 和 MnP 快速失活, 该蛋白酶系胞外酶.

2) 蛋白酶在 pH 7.0 的酸性条件下酶活很高, 其主要作用是促进 LiP 和 MnP 的分解, 而不是抑制它们的产生.

(下转第 31 页)

参考文献:

- [1] 边文华. 果品南北货实用手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982.
- [2] 华南农学院. 果品贮藏加工学[M]. 北京:农业出版社,1981.
- [3] 玉才. 给水果穿上“漂亮”的外衣[N]. 中国食品报,1997-10-22.
- [4] 王伯森. 关于我国水果产区节能果库的建设问题[J]. 冷藏技术,1984(1):16.
- [5] 梁殿佑. 果品蔬菜贮藏保鲜方法[M]. 北京:宇航出版社,1989.
- [6] 国家科委科研成果管理办公室. 水果蔬菜贮藏保鲜技术[M]. 北京:科学技术文献出版社,1988.
- [7] 彭子模. 果蔬贮藏原理与实用技术[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1994.
- [8] 陕西省仪祉农业学校. 果品贮藏加工实验实习指导[M]. 北京:农业出版社,1983.
- [9] 绪方邦安. 水果蔬菜贮藏概论[M]. 陈租绒译. 北京:农业出版社,1982.
- [10] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社,1989.

(责任编辑 杨勇)

(上接第26页)

3) HgCl_2 能抑制蛋白酶,抑制机理类似于 HgCl_2 对蛋白酶K的抑制.添加 HgCl_2 能提高过氧化物酶尤其是LiP的酶活和稳定性,在实验条件下,接种

后第5天添加 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 HgCl_2 时LiP酶活最高.

参考文献:

- [1] Bumpus J A, Tien M, Wright D, *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. **Science**, 1985, 228:1434-1436.
- [2] Barr D P, Aust S D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutant[J]. **Environ Sci Technol**, 1994, 28(2):78-87.
- [3] Ollikka P, Alhonnaki K, Leppanen V M, *et al.* Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from phanerochaete chrysosporium[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 59(12):4010-4016.
- [4] 李华钟, 章燕芳, 华兆哲, 等. 白腐菌与染料废水处理[J]. 工业水处理, 2001, 21(5):1-4.
- [5] Dosoretz C G, Dass S B, Reddy C A. Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of phanerochaete chrysosporium[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1990, 56(11):3429-3434.
- [6] Bonnarme P, Asther M. Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus phanerochaete chrysosporium on lignin peroxidase activity[J]. **Biotechnol**, 1993, 30:271-282.
- [7] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of phanerochaete chrysosporium[J]. **Methods in Enzymology**, 1988, 161:238-249.
- [8] 鲁时瑛, 李华钟, 陈坚. EDTA对木质素过氧化物酶在染料脱色种的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4):393-396.
- [9] Glenn J K, Gold M H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycet[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1985, 242(2):329-341.
- [10] 凌关庭, 王亦云, 唐述潮. 食品添加剂手册(下)[M]. 北京:化学工业出版社, 1989. 518-519.
- [11] Alexander M, Wolfram S. Inhibition of proteinase K by mercuric[J]. **Advance in experimental medicine and biology**, 1996, 379:183-189.

(责任编辑 杨萌)