

斜卧青霉菌 P6 木素过氧化物酶的纯化与特性

杨金水 袁红莉 刘庆洪 阮芳勇 王贺祥 陈文新

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

摘要 木素过氧化物酶是降解木素类物质的主要酶类。使用硫酸铵盐析、DEAE-纤维素和 CM-纤维素离子交换层析、Sephadex G100 凝胶过滤等分离与纯化技术,从斜卧青霉菌 P6(*Penicillium documbens* P6) 发酵培养 7 d 的液体培养液中分离纯化得到电泳纯的木素过氧化物酶,经 SDS-PAGE 鉴定为单一条带,表观相对分子质量为 46.3×10^3 。以藜芦醇为底物测定了该酶的 K_m , v_{max} , 作用的 pH 和温度范围,结果为 $K_m 0.565 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $v_{max} 0.088 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$, pH 4~9, 温度 25~55 ℃。N 末端序列为 VLLPADEKNA, 与真菌 LiP 无同源性。此结果拓宽了木素过氧化物酶的微生物来源。

关键词 斜卧青霉菌; 木素过氧化物酶; 分离纯化

中图分类号 Q556

文章编号 1007-4333(2004)02-0001-05

文献标识码 A

Purification and identification of lignin peroxidase from *Penicillium documbens* P6

Yang Jinshui, Yuan Hongli, Liu Qinghong, Ruan Fangyong, Wang Hexiang, Chen Wenxin

(College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Lignin peroxidase was separated and purified from a liquid 7-day-culture filtrate of *Penicillium documbens* P6 by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose and CM-cellulose ion-exchanger resin chromatography, Sephadex G-100 gel-filtration chromatography. There was a single band in SDS-PAGE and molecular weight was estimated to be 46.3×10^3 by SDS-PAGE. K_m is $0.565 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, v_{max} is $0.088 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$. The effect of pH and temperature on enzyme activity using veretryl alcohol as substrate were determined. The pH range is 4—9 and the temperature range is 25—55 ℃. The N-terminal amino acid residue was VLLPADEKNA, there was no homologous with other fungal LiP.

Key words *Penicillium documbens*; lignin peroxidase; purification

木素是仅次于纤维素的第二大天然芳香聚合物,作为一种资源,在造纸、食品、化工、燃料等领域具有重要用途及应用潜力,但由于其疏水性和立体结构的复杂性,故降解性很低。

1983 年, Glenn 等首先在黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 中发现木素过氧化物酶(LiP)^[1],以后在其他担子菌中和 1 株子囊菌 (*Chrysonilia sitophila*) 中也发现了 LiP^[2]。1999 年, Laborda 等^[3]在一株降解褐煤的青霉菌中检测到锰过氧化物酶(MnP)活性,但未有 LiP 和漆酶活

性。LiP 是以血红素为辅基的糖蛋白,催化反应需要 H_2O_2 参与。其催化反应底物范围较广,酚类或非酚类的芳香族化合物均可作为底物。LiP 广泛应用于生物制浆、纸浆的酶法漂白、有机污染物的降解和环境的生物修复等方面^[4,5]。白腐真菌的 LiP 可氧化高氧化还原电势的芳香族化合物,相对分子质量为 $38 \times 10^3 \sim 47 \times 10^3$, pH 2.0~5.0。由于其广泛的应用潜力,目前已得到了详尽的研究^[6]。生物化学和分子生物学的研究表明,在白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 中,至少有 10 个结构上相关

收稿日期: 2003-12-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目资助(2003AA241170)

作者简介: 杨金水,博士研究生;陈文新,教授,博士生导师,主要从事生物固氮与细菌分类研究;袁红莉,博士,副教授,通讯作者,主要从事环境微生物学的研究。

联的 LiP 蛋白编码基因——*lipA* 到 *lipJ*。LiP 基因具有较高的保守性,其氨基酸序列有 53.0%~98.9%的相似性^[7,8],编码 10 个同工酶,分别命名为 H1 到 H10。其中 H3 (pI4.9),H4 (pI4.5) 和 H5 (pI4.2) 为 MnP 同工酶,其余的具有 LiP 典型的藜芦醇氧化活性^[9]。斜卧青霉菌 (*Penicillium* sp.) P6 是本实验室从降解褐煤的菌株中选育得到并命名的一株具有高降解活性的菌株,该菌降解内蒙古褐煤能明显提高其黄腐酸的含量,且降解产物的生物活性明显提高^[10,11]。对该菌降解褐煤机制的研究发现,该菌具有较高的 LiP 活性。关于青霉菌产生降解木素的胞外过氧化物酶的研究国外只有零星报道,且未见对其结构和特性的详细研究,国内尚无相关报道。此外,由于青霉菌本身的易培养性和生长优势,对其 LiP 的研究将具有重要的理论意义和实际应用潜力。本研究拟分离、纯化 P6 的 LiP,并对其相对分子质量、N 末端氨基酸序列等进行测定,为初步搞清青霉菌 LiP 的特点,克隆其功能基因,构建高效表达体系,开发新的木素过氧化物酶奠定基础。

1 试验材料与试剂

1) 材料。斜卧青霉菌 P6 菌株(下简称 P6)为本实验室分离并保存的,已申请保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCCNO.0866)。

2) 化学试剂。DEAE-纤维素、CM-纤维素、Sephadex G-100、丙烯酰胺、四甲基己二胺(TEMED)和标准蛋白质均为 Sigma 公司产品;N,N-甲叉双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品;藜芦醇(VA)为 Aldrich 公司产品;三羟甲基氨基甲烷(Tris)为 Promega 公司产品。其他化学试剂均为分析纯试剂。

2 试验方法

1) 粗酶制剂的制备。培养基(各种成分均为质量浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):葡萄糖 10,麦芽抽提物 3,酵母抽提物 3, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2。pH 6.0,115 灭菌 30 min。

将 28 $^{\circ}\text{C}$,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 7 d 的 P6 发酵液真空抽滤,离心,滤液即为粗酶液。

2) 酶的分离纯化。冰浴条件下,在粗酶液中添加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 80%(质量分数),冷冻离心弃去上清液,用 pH7.2,0.005 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液

溶解沉淀,透析除盐,依次应用 DEAE-纤维素,CM-纤维素 Sephadex G-100 凝胶过滤进行逐级纯化。

a. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和胶上活性染色。收集凝胶过滤洗脱液中具有 LiP 活性的部分,进行非变性的不连续 PAGE 分析,电泳后进行活性染色^[12],切割相应具有活性的蛋白带进行洗脱(1%(质量分数) Triton X-100, Tris-HCl 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.5),然后进行 SDS-PAGE 分析。

b. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。分离胶质量分数为 12%,缓冲液为 Tris-甘氨酸溶液,pH8.8。

3) 酶学特性测定。

a. 木素过氧化物酶的酶活性分析。取一定量酶液,加底物溶液(藜芦醇 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, H_2O_2 0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,琥珀酸缓冲液(pH3.0)40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),总体积 1 mL,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 min,在 310 nm 波长下测定 LiP 的酶活性。将 1 min 内生成 1 μmol 底物的量定义为 1 个酶活性单位^[13],相对酶活性以 409 nm 的吸光度为依据^[14]。

b. 温度和 pH 的稳定性。分别测定 P6 的 LiP 在 pH 为 3,4 和 5 的 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4OAc 缓冲液中的活性,在 pH 6 和 7 的 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液及 pH 8 和 9 的 Tris-HCl 缓冲液中的活性;温度梯度为 25,35,45,55 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 。

c. 动力学常数测定。在不同底物(VA)浓度的反应体系中,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 min,测定 A_{310} 以计算反应的初速度,做 Lineweaver-Burk 双倒数图。计算 K_m 和 v_{\max} 。

d. 蛋白质含量测定。按 Bradford 方法,并以牛血清白蛋白作为标准蛋白质。

4) N 末端氨基酸测序与序列比较。由北京大学生命科学中心采用 491 Protein Sequencer 仪器协助测定。测定结果与 Genbank 中的同源蛋白质进行氨基酸序列比较。

3 结果与分析

3.1 酶的分离纯化

1) DEAE-纤维素阴离子交换层析。采用 pH7.2,0.005 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液作为起始缓冲液,该木素过氧化物酶能很好地吸附到离子交换剂上。用 NaCl 离子梯度分段洗脱,盐离子梯度依次为 0,0.05,0.15,0.30 和 0.50 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 1 可以看出,在这 5 种离子强度下,共出现 5 个洗脱峰,

D2 ~ D5 洗脱峰在 409 nm 处都有吸收峰出现。对其分别进行藜芦醇活性检测,结果表明,D3 和 D4 两峰为活性洗脱峰,其余为杂蛋白质。D3 洗脱峰的藜芦醇氧化活性为 2.14 U/mg,D4 洗脱峰为 1.88 U/mg,D3 洗脱峰的藜芦醇氧化活性明显高于 D4 洗脱峰。

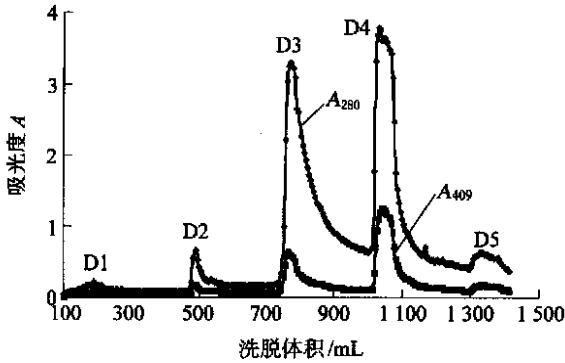


图 1 P6 LiP 的 DEAE 纤维素洗脱曲线

Fig. 1 DEAE-cellulose column chromatography of P6 lignin peroxidase

2) CM-纤维素阳离子交换层析。分别收集 D3 与 D4 两峰,用相对截留分子质量为 1×10^3 的 Ultracel Amicon YM 超滤膜超滤浓缩。对浓缩酶液透析后冷冻干燥。将冷冻干燥得到的 D3 洗脱峰的酶粉用 pH 4.5, $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{HAc-NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液溶解,上 CM-纤维素阳离子交换层析柱分离,采用 NaCl 梯度线性洗脱, $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{HAc-NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液为起始洗脱缓冲液,NaCl 梯度为 $0 \sim 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,图 2 为 D3 的 CM-纤维素阳离子交换层析图。

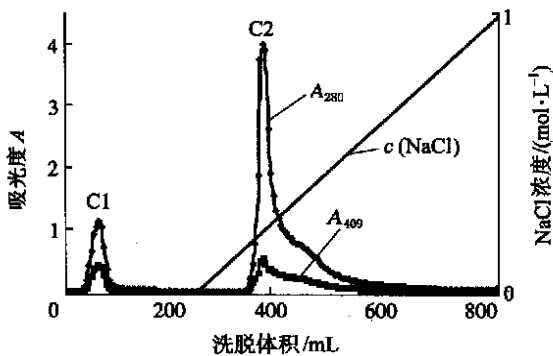


图 2 P6 LiP 的 CM-纤维素洗脱曲线

Fig. 2 CM-cellulose column chromatography of P6 lignin peroxidase

D3 洗脱峰经 CM-纤维素阳离子交换色谱分离后,得到很好的分离效果,被分成 2 个组分,即 C1 和 C2 洗脱峰,其中 C1 不具有藜芦醇氧化活性,C2 具有高的藜芦醇氧化活性;因此只对 C2 进行进一步的分离纯化。

3) Sephadex G-100 凝胶过滤分析。将收集到的 C2 洗脱峰用相对截留分子质量为 1×10^3 的超滤膜超滤浓缩,上 Sephadex G-100 柱进一步分离纯化,分离结果见图 3。可以看出,C2 经凝胶过滤后,得到 2 个主要的洗脱峰 S1 和 S2。其中只有 S1 具有较高的藜芦醇氧化活性,但 S2 峰与其部分重叠,说明此杂质峰的相对分子质量与目标蛋白质相似;故收集 S1 组分时尽量少收集混有 S2 的部分。

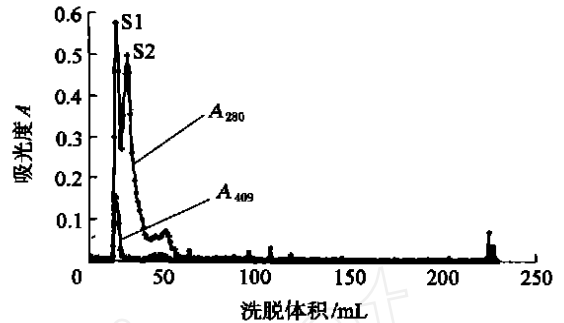
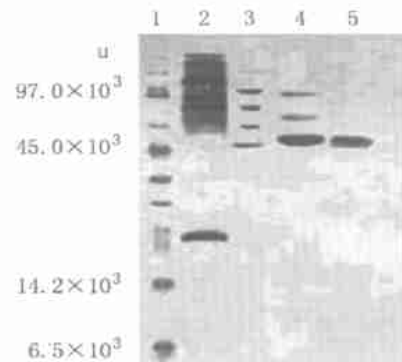


图 3 P6 LiP 的 Sephadex G-100 凝胶过滤洗脱曲线

Fig. 3 Sephadex G-100 column chromatography of P6 lignin peroxidase

对上述各步纯化得到的洗脱峰 D3,C2,S1 浓缩后进行 SDS-PAGE 分析,电泳图谱见图 4。可以看出,经过上述 3 步纯化后,S1 的电泳结果为一条主要的蛋白质带和一条弱蛋白质带。



1—相对分子质量标准;2—粗酶;3—D3 (DEAE); 4—C2 (CM); 5—S1 (sephadex G-100)

图 4 P6 Lip 不同纯化阶段的电泳图谱

Fig. 4 Purity of the P6 proteins at different stages of purification shown by SDS-PAGE

4) P6 LiP 纯度与相对分子质量的测定。收集 S1,进行 PAGE 分析,电泳结束后,进行胶上活性染色,结果如图 5 所示,仅有一条活性带 P1。

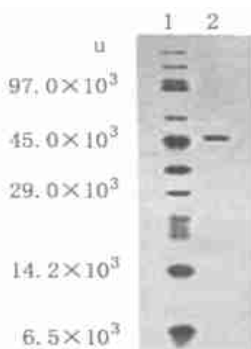
从胶上割下 P1 条带(未染色的 P1)并进行洗脱,收集后进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 6。可以看出,P6 的 LiP 经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白



图5 P6 LiP的PAGE分析结果

Fig. 5 PAGE analysis of P6 LiP

质带,表明纯化后的LiP为单一组分,已达到电泳纯,亚基的相对分子质量为 46.3×10^3 。



1—相对分子质量标准;2—纯化的LiP

图6 纯化P6 LiP的SDS-PAGE电泳图谱

Fig. 6 SDS-PAGE pattern of purified P6 LiP

3.2 酶学特性测定

纯化的P6 LiP在25℃时以藜芦醇为底物的 K_m 为 $0.565 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, v_{\max} 为 $0.088 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ 。

P6的LiP氧化藜芦醇最适pH测定结果表明,25℃时,其最适pH为4.0,在此条件下测定了温度对其酶活性的影响。P6 LiP的最适温度为45℃,随着温度的升高,其酶活性迅速下降,结果见图7和8。

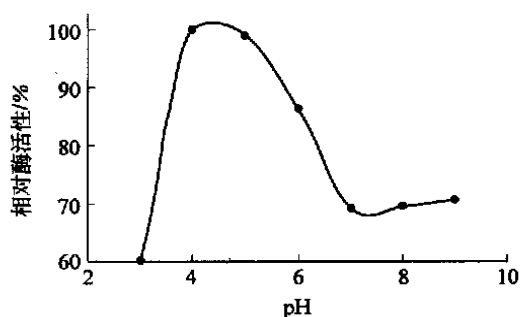


图7 pH对P6 LiP酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on P6 LiP activity

3.3 P6 LiP的N末端氨基酸序列

测定了纯化后P6 LiP N末端的10个氨基酸残基,并与Genbank中其他真菌的过氧化物酶进行同

源性比较,结果见表1。可以看出,P6的LiP具有真菌MnP和其他过氧化物酶的保守序列VLL,但是与真菌的LiP无同源性。

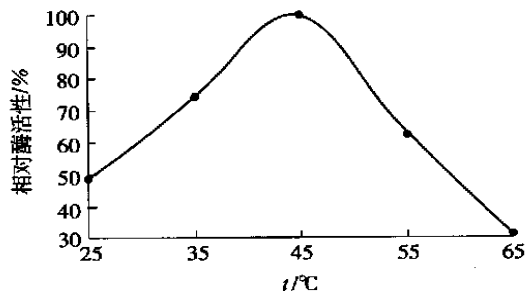


图8 温度对P6 LiP酶活性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on P6 LiP activity

表1 斜卧青霉菌P6 LiP N末端氨基酸序列与Genbank中相关序列的比较

Table 1 Comparison of N-terminal amino acid sequences of *Penicillium documbens* P6 and other fungal peroxidase sequences

测试菌株	序列
<i>P. documbens</i> P6 LiP	V L L P A D E K N A
<i>P. chrysosporium</i> MnP 1	Q V F L E V L L K G
<i>P. chrysosporium</i> MnP H3	V L L K G V G F P G
<i>P. chrysosporium</i> MnP H4	V L L K G T G F P G
<i>C. subvermispora</i> MnP 1	D T Q I F L E V L L
<i>A. rusticana</i> Peroxidase N	V L L D G T N S E K
<i>A. thaliana</i> Peroxidase 43	D L V L L S A A H T

4 讨论

通过DEAE洗脱峰在409 nm处的特征峰检测以及藜芦醇氧化活性测定,发现斜卧青霉菌P6可分泌2种LiP组分(D3洗脱峰和D4洗脱峰),且这2种组分的藜芦醇氧化活性大小不同。这2种组分与已报道的LiP同工酶的亲缘关系有待进一步研究。

虽然P6 LiP的最适pH为4.0,但其具有较广泛的pH范围,在pH 9.0时,其相对酶活性仍有70.6%,这与褐煤降解后期pH升高的现象吻合。P6的LiP具有相对高的温度稳定性,其最适温度为45℃,但在55℃时,其相对稳定性仍有62.5%。与已报道的LiP相比,P6的LiP在工业污染物的降解过程中具有更为广泛的实际应用潜力。SDS-PAGE表观相对分子质量测定结果表明,P6 LiP的相对分

子质量较大,为 46.3×10^3 。

N 末端序列测定有助于斜卧青霉菌 P6 中 LiP 基因的克隆,已测得其 N 末端序列为 VLLPADEKNA,具有过氧化物酶的保守序列 V-L-L。通过与已报道的真菌过氧化物酶相比较发现,P6 LiP 与其他多种菌株产生的过氧化物酶具有较高的同源性,如 *Arabidopsis thaliana* 的过氧化物酶 43, *Armoracia rusticana* 的过氧化物酶 N, *Ceriporiopsis subvermispora* 的 MnP, *Phanerochaete chrysosporium* 的 MnP

及同工酶 H3 等;但与已报道的 LiP 的氨基酸序列无同源性。结合 pH 的适用范围及相对分子质量检测结果,初步判定该青霉菌 P6 分泌的 LiP 可能为一具有藜芦醇氧化活性的新型 LiP 和新基因。

5 结 论

1) 使用硫酸铵盐析、DEAE-纤维素和 CM-纤维素离子交换层析、Sephadex G100 凝胶过滤等分离与纯化技术,从斜卧青霉菌 P6 的液体培养物中分离纯化得到 LiP,SDS-PAGE 分析结果表明,其表观相对分子质量为 46.3×10^3 。

2) 酶学特性研究结果表明,以藜芦醇为底物的 P6 LiP 的 K_m 为 $0.565 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, v_{\max} 为 $0.088 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$,最适 pH 为 4.0,最适温度为 45,其 N 末端氨基酸序列为 VLLPADEKNA,具有过氧化物酶的保守序列 V-L-L,与已报道的 LiP 的氨基酸序列无同源性。

参 考 文 献

- [1] Cohen M S, Gabriele P D. Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticolor*[J]. Appl Environ Microb, 1982,44:23~27
- [2] Duran N, Ferrer I, Rodriguez J. Ligninase from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441) [J]. Appl Biochem Biotech, 1987,16:157~167
- [3] Laborda F, Monistrol I F, Luna N. Processes of liquefaction/ solubilization of Spanish coals by microorganisms [J]. Appl Microbiol Biot, 1999,52:49~56
- [4] Ha HC, Honda Y, Watanabe T, et al. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degradating basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. Appl Microbiol Biot, 2001,55:704~711
- [5] 杨金水,袁红莉,陈文新. 锰过氧化物酶的研究进展[J]. 生物技术, 2003,13(2):45~47
- [6] Fakoussa R M, Hofrichter M. Biotechnology and microbiology of coal degradation[J]. Appl Microb Biot, 1999,52:25~40
- [7] Gaskell J, Stewart P, Kersten P, et al. Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: Application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biotechnology, 1994,12:1372~1375
- [8] 段新源,李杨,卢雪梅,等. 木素生物降解的分子生物学进展[J]. 纤维素科学与技术, 2001,9(4):51~58
- [9] Farrell R L, Murtagh K E, Tien M. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Enzyme Microb Technol, 1989,11:322~328
- [10] 袁红莉,蔡亚歧,周希贵,等. 微生物降解褐煤产生的腐植酸化学特性研究[J]. 环境化学, 2000,19(3):240~243
- [11] 袁红莉,王风芹,李宝珍,等. 微生物降解褐煤产生的腐植酸的生物活性研究[J]. 土壤学报, 2002,39:129~134
- [12] Shinmen Y, Asami S, Amachi T, et al. Crystallization and characterization of an extracellular fungal peroxidase [J]. Agric Biol Chem, 1986,50:247~249
- [13] Heinfling A, Mart íez M J, Mart íez A T. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction[J]. Appl Environ Microbiol, 1998,64(8):2788~2793
- [14] Bonnarme P, Jeffries T W. Mn () regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi[J]. Appl Environ Microbiol, 1990,56:210~217