

木质素降解菌的分离鉴定及木素过氧化物酶的纯化

杨金水, 刘葳, 倪晋仁

(北京大学环境工程系 水沙科学教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要: 采用苯胺蓝脱色法, 从活性污泥中分离筛选得到 2 株具有分泌木质素降解过氧化物酶能力的细菌菌株 PKE117 和 PKE225. 根据生理生化反应结果和 16S rDNA 序列分析, 初步确定菌株 PKE117 为 *Pseudomonas* 属的 1 个新种, PKE225 为 *Pseudomonas thermaerum* 的 1 个新菌株. 对于菌株 PKE117 的发酵液依次经 DEAE-纤维素 32 Sephadex G-75 凝胶过滤纯化, 木素过氧化物酶的藜芦醇氧化比活力从 0.87U/mg 提高到 204.5U/mg, 酶的纯化倍数为 235.1, 回收率 15%.

关键词: 木质素; 分离鉴定; 木素过氧化物酶; 纯化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)05-0981-05

Isolation, Identification of Lignin-Degrading Bacteria and Purification of Lignin Peroxidase

YANG Jin-shui, LIU Wei, NI Jin-ren

(The Key Laboratory of Water and Sediment Sciences, Ministry of Education, Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Two strains that could use lignin as sole carbon source and excrete peroxidases were isolated from activated sludge. Both strains are belonged to *Pseudomonas* based on morphological, physio-biochemical characteristics and homology identification of 16S rDNA sequence, in which strain PKE117 is identified as a new species, while the strain PKE225 is identified as *Pseudomonas thermaerum*. Crude enzyme in liquid fermentation of PKE117 was analyzed with DEAE-cellulose 32 ion-exchanger resin chromatography and Sephadex G-75 gel-filtration in proper order. The lignin peroxidase specific activity increases from 0.87U/mg to 204.5U/mg, purification multiple is 235.1 and callback rate is 15%.

Key words: lignin; isolation and identification; lignin peroxidase; purification

木质素是植物细胞壁的重要组成部分, 约占植物体干质量的 20%, 是含量仅次于纤维素的最为丰富的碳素资源. 据估测, 全球每年可产生约 6×10^{14} t 木质素, 主要以造纸工业废水和农作物废弃秸秆形式存在^[1]. 但由于其疏水性和立体结构的复杂性, 木素的降解性很低, 其降解成为自然界碳素循环的限速步骤.

木素的生物降解是利用微生物产生的胞外酶, 主要是木素氧化酶系作用于木素并使其逐步分解转化的过程. 白腐真菌中的黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 是目前研究木素降解的模式菌株, 其分泌的胞外过氧化物酶参与对木素大分子聚合物的最初裂解反应^[2], 降解酶系主要包括木素过氧化物酶 (LiP)、漆酶 (laccase) 和锰过氧化物酶 (MnP). 这些酶可在木素聚合物内形成自由基, 导致键的不稳定从而打断木素大分子. LiP 被认为是在木素类物质的降解过程中起很主要作用的酶^[3~5].

本实验室在研究过程中筛选到 2 株具有高活性木素过氧化物酶活性的菌株, 与报道的白腐真菌相

比, 产酶时间显著缩短, 固体平板上 48h 即可看见明显的苯胺蓝脱色现象, 液体产酶时间缩短 3~6 倍左右, 具有进一步深入研究的理论意义. 关于革兰氏阴性细菌可分泌木素降解酶类, 尤其是木素过氧化物酶的报道国内外鲜有报道, 因此本研究对这 2 株革兰氏阴性细菌进行了系统分类研究, 并进一步对菌株 PKE117 的木素过氧化物酶进行了分离纯化, 为揭示细菌与白腐真菌木素过氧化物酶的异同奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 样品来源

分离样品来自高碑店污水处理厂的活性污泥

1.2 培养条件

无机盐培养基 (g/L): K_2HPO_4 1; NaH_2PO_4 1; $(NH_4)_2SO_4$ 0.5; $MgSO_4$ 0.2; $CaCl_2$ 0.1; $FeSO_4$ 0.05; $MnSO_4$ 0.02; 木屑 10; pH 7.2, 121 °C 灭菌

收稿日期: 2005-05-30; 修订日期: 2005-08-25

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2005037279)

作者简介: 杨金水 (1975~), 男, 博士, 主要研究方向为生物大分子的微生物降解, E-mail: yangjsh1999@163.com

30min.

基本培养基(BM)(g/L): 酵母膏 0.1; 葡萄糖 2; 自然 pH, 115℃灭菌 30min.

斜面保存培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基.

发酵用液体培养基(g/L): 葡萄糖 10; 麦芽抽提物 3; 酵母提取物 3; KH_2PO_4 1; MgSO_4 0.5; FeSO_4 0.2; pH7.2, 115℃灭菌 30min.

1.3 菌种分离

无机盐培养基中加 0.5% 的活性污泥, 30℃, 180 r/min 摇床培养 15d, 取富集液按 5% 的接种量接种到相同新鲜培养基, 相同条件下培养 15d. 3 次转接后, 取 0.1mL 培养液涂布在含有 0.1g/L 的 Azure-B 的 BM 平板上 30℃避光培养, 以蓝色培养基中菌落周围脱色圈的有无来定性检测木素过氧化物酶(LiP)及锰过氧化物酶(MnP)的产生与否^[6].

1.4 菌株的鉴定

根据细菌分类手册的标准^[7], 对分离到的木质素降解菌株进行了初步的形态观察和生理生化试验, 初步鉴定到属. 菌体形态采用日立 600 透射电镜进行观察.

1.5 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定

正向 P1 引物: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTT AGA ACG AAC GCT-3'

反向 P6 引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC G-3'

PCR 反应体系为 50μL, 在 0.2 mL Eppendorf 管中依次加入以下成分: Buffer 3 μL; 10 mmol/L DNTP 1μL; P1 引物 0.8μL; P6 引物 0.8μL; *Taq* 酶 1.5μL; 模板 2μL; 水 38.9μL. PCR 的反应条件为 94℃预变性 3 min, 然后 94℃变性 0.5 min, 57℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 总共 35 个循环, 最后 72℃延伸 5 min, 4℃维持. 得到的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带回收后由上海博亚生物工程有限公司进行序列测定.

1.6 序列数据处理和系统发育树的构建

对测序得到的核苷酸序列, 通过 NCBI 的 Blast 软件和 DNAMAN 软件与目前报道的 16S rDNA 序列进行比较, 构建系统发育树.

1.7 木素过氧化物酶的分离纯化

菌株 PKE117 液体发酵培养 48h 后, 5000 r/min 离心 15min, 弃去菌体细胞, 上清液冷冻干燥后, 重新溶于 5×10^{-3} mol/L 的磷酸缓冲液中 (pH7.2), 用分子量 8000 的透析带透析除盐, 得到粗酶液, 然后依次上 DEAE-纤维素和 Sephadex G-75

凝胶过滤, 对木素过氧化物酶进行分级纯化, 测定蛋白含量和酶活力.

1.8 木素过氧化物酶的活性分析

取一定量酶液, 加底物溶液(藜芦醇 4mmol/L, H_2O_2 0.4mmol/L, 琥珀酸缓冲液 (pH3.0) 40 mmol/L), 总体积 1 mL, 25℃反应 3 min, 在 310 nm 波长下测定. 以 1 min 内生成 1μmol 藜芦醛的量定义为 1 个酶活单位^[8].

1.9 蛋白质的测定

按 Bradford 方法^[9], 并以牛血清白蛋白为标准蛋白.

2 结果与讨论

2.1 苯胺蓝平板脱色结果

通过苯胺蓝脱色试验, 筛选到 2 株具有高活性胞外过氧化物酶产生能力的木素降解菌株 PKE117 和 PKE225. 由图 1 可以看出, 菌株 PKE117 和菌株 PKE225 在 BM 培养基上生长时, 在培养 48h 时即产生明显透明圈, 随着时间的延长, 透明圈不断扩大, 最终趋于稳定.

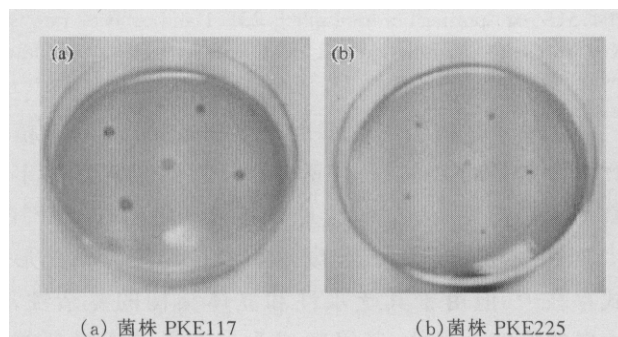


图 1 过氧化物酶的定性结果

Fig. 1 Results of peroxidases activity of strains PKE117 and PKE225

2.2 木素降解菌株的鉴定结果

电镜结果显示, 菌株 PKE117 为短杆状, 两端稍尖, PKE225 也为短杆状, 但两端钝圆. 二者均具有极生单鞭毛, 细胞大小分别为 $(1.3 \sim 1.6) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 0.7) \mu\text{m}$ 和 $(1.2 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (0.6 \sim 0.7) \mu\text{m}$.

结合细菌形态观察结果, 进一步测定了菌株 PKE117 和 PKE225 的氧化酶活性、接触酶活性、葡萄糖发酵等生理生化反应特性, 发现两者除了对硝酸盐还原的结果不同之外, 其余性质基本一致, 根据常用细菌鉴定方法, 初步确定两者均为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 结果如表 1 所示.

2.3 序列的数据处理和系统发育树的构建

表 1 分离菌株的初步鉴定

Table 1 The identification of the strains

特征	PKE117	PKE225
个体形态	短杆状	短杆状
革兰氏染色	-	-
芽孢有无	-	-
非水溶性色素	-	-
运动性	+	+
鞭毛着生位置	极生单鞭毛	极生单鞭毛
氧化酶	+	弱
接触酶	+	+
运动性	+	+
葡萄糖发酵	-	-
乙醇氧化	+	+
乙酸氧化	+	+
硝酸盐还原	+	-
pH4.5 生长	-	-

分别对菌株 PKE117 和 PKE225 提取 DNA, 然后进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 电泳检测后进行序列测定, 其大小分别为 1 368 bp 和 1 396 bp. 通过序列比对发现, 菌株 PKE117 与 *Pseudomonas resinovorans* 的同源性为 97%, 与 *Pseudomonas thermotolerans* 的同源性为 95%, 一般情况下, 16S rDNA 的同源性小于 98%, 可以认为同属不同种, 而同源性小于 93% ~ 95%, 则可以认为属于不同属^[10, 11], 菌株 PKE117 与其它成员同源性在 93% ~ 98% 之间, 因此推测菌株 PKE117 为 *Pseudomonas* 属的 1 个新种, 从系统发育树上也可以看出, 菌株 PKE117 与其它成员的进化距离较远; 菌株 PKE225 与 *Pseudomonas thermaerum* 的同源性为 100%, 与 *Pseudomonas aeruginosa* 的同源性为 99%, 因此初步推测 PKE225 为 *Pseudomonas thermaerum* 的 1 个新菌株, 尚需进行分子杂交确证. 采用 DNAMN 软件构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 由图中结果可以看出, 菌株 PKE117 和 PKE225 分别属于假单胞菌的不同种, 其同源性仅仅只有 31%, 亲缘关系较远.

2.4 过氧化物酶的部分纯化

由 BM 平板定性结果和藜芦醇氧化活性测定结果可知, 菌株 PKE117 和 PKE225 具有高的木素过氧化物酶的藜芦醇氧化活性, 因此进一步对菌株 PKE117 的 LiP 进行了分离纯化和活性分析. 对菌株 PKE117 发酵后得到的粗酶液上 DEAE-纤维素

32 阴离子交换树脂层析, 起始洗脱缓冲液为 pH7.2, 5×10^{-3} mol/L 的磷酸缓冲液, 采用 NaCl 离子浓度梯度洗脱, 盐离子浓度梯度依次为 0, 0.05, 0.15, 0.3, 0.5, 1mol/L, 由图 3 中可以看出, 在这 6 种离子强度下, 共出现 6 个洗脱峰, 其中 D1 和 D4 峰都具有高的藜芦醇氧化活性.

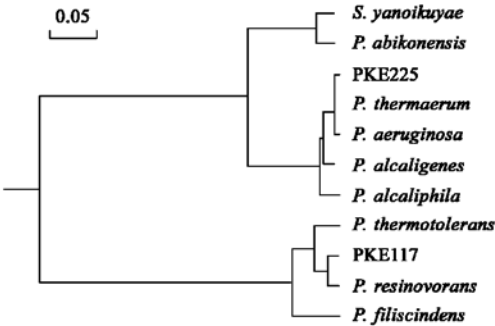


图 2 菌株 PKE117 与 PKE225 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strains PKE117 and PKE225 based on 16S rDNA sequences

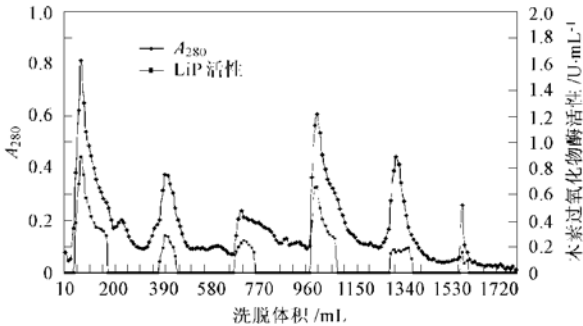


图 3 LiP 的 DEAE-纤维素 32 洗脱曲线

Fig. 3 DEAE-cellulose 32 column chromatography of lignin peroxidase of strain PKE117

收集 D4 洗脱峰, 浓缩除盐后上 Sephadex G-75 进一步分离纯化, 分离情况见图 4. 得到 1 个主要的蛋白洗脱峰, 且具有高的藜芦醇氧化活性. 其余均不具有藜芦醇氧化活性, 为杂蛋白.

假单胞菌 PKE117 胞外木素过氧化物酶的分离纯化结果如表 2 所示, 从表 2 中可以看出, 发酵液经冷冻干燥、DEAE-纤维素离子交换树脂层析及 Sephadex G-75 凝胶过滤后, LiP 的比活力从 0.87U/mg 提高到 204.5U/mg, 纯化倍数为 235.1, 回收率 15%.

2.5 讨论

木素过氧化物酶(EC1.11.1.14)不但可以氧化

表 2 PKE117 胞外木素过氧化物酶分离纯化结果

Table 2 Yields and specific activities during purification of extracellular lignin peroxidase

提纯步骤	总体积/mL	总蛋白含量/mg	总酶活/U	比活力/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	600	173.6	150.3	0.87	1.0	100
DEAE-cellulose 32	13	5.3	58.9	11.1	12.8	39.2
Sephadex G-75	1.7	0.11	22.5	204.5	235.1	15

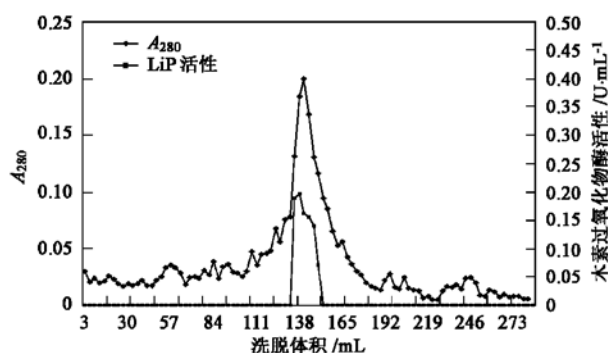


图 4 LiP 的 Sephadex G-75 凝胶过滤结果

Fig. 4 Sephadex G-75 column chromatography of lignin peroxidase of strain PKE117

木素和木素模型物, 并且可氧化一大类其他的有机复合物, 因此在造纸、污染物处理方面有着广泛的用途, 是目前研究的热点. LiP 最早在白腐真菌 *P. Chrysosporium* 中发现, 也是研究的最清楚的木素降解酶, 后来在其它一些担子菌, *Phlebia radiata*^[12], *Trametes versicolor*^[13], *Bjerkandera adusta*^[14], *Nematoloma frowardii*^[15] 和 1 株子囊菌 *Chrysonilia sitophila*^[16] 及革兰氏阳性菌 *Streptomyces viridosporus* T7A^[17,18] 中也发现木素过氧化物酶. 而关于革兰氏阴性细菌具有分泌木素过氧化物酶的研究目前尚未见相关报道. 本实验室从活性污泥中分离得到 2 株革兰氏阴性细菌, 经过生理生化反应和 16S rDNA 鉴定, 初步确定菌株 PKE117 为 *Pseudomanas* 属的 1 个新种, 而菌株 PKE225 为 *Pseudomanas thermaerum* 的 1 株新菌株, 且两者均具有分泌胞外过氧化物酶的能力. 根据已有报道, *Phanerochaete chrysosporium* 在不同的培养条件下, 产 LiP 的时间为 6 ~ 15d^[19,20], *Bjerkandera* sp. BOSS 和 *Lentinus edodes* 产 LiP 时间为 6d 左右^[21,22], *Polyporus tulipiferae* 产酶时间更长, 一般需要 12d^[23,24], 菌株 PKE117 和 PKE225 液体发酵 48h 产 LiP 活力即可达到最大, 大大缩短了发酵周期, 具有良好的研究潜力. 对菌株 PKE117 产生的 LiP 依次经过 DEAE-纤维素 32 Sephadex G-

75 凝胶过滤进行部分纯化, 比活力从 0.87U/mg 提高到 204.5U/mg, 纯化倍数为 235.1, 回收率 15%, 纯化后的酶活性与白腐真菌来源的 LiP(比活 0.11 U/mg) (Fluka) 相比, 活性显著提高, 具有进一步研究的意义.

3 结论

(1) 对菌株 PKE117 和 PKE225 经形态观察、生理生化反应和 16S rDNA 鉴定, 初步确定菌株 PKE117 为 *Pseudomanas* 属的 1 个新种, 而菌株 PKE225 为 *Pseudomanas thermaerum* 的 1 株新菌株.

(2) 菌株 PKE117 分泌的胞外 LiP 依次经过 DEAE-纤维素 32、Sephadex G-75 凝胶过滤部分纯化, 比活力从 0.87U/mg 提高到 204.5U/mg, 纯化倍数为 235.1, 回收率为 15%.

参考文献:

- [1] 冀珍芳, 石淑兰. 木质素的微生物降解[J]. 广西轻工业, 2002, 15(1): 4~5.
- [2] Collins P J, Field J A, Teunissen P, et al. Stabilization of lignin peroxidase in white rot fungi by tryptophan[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2543~2548.
- [3] Barr D P, Aust S D. Mechanisms white rot fungi use to degrade environmental pollutants[J]. Environ. Sci. Technol., 1994, 28: 78A~87A.
- [4] Hammel K E, Jensen K A, Mozuch M D, et al. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase[J]. J. Biol. Chem., 1993, 268: 12 274~12 281.
- [5] Hammel K E, Mozuch M D, Jensen K A, et al. H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol β -aryl ether structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase[J]. Biochemistry, 1994, 33: 13 349~13 354.
- [6] 蔡磊, 尹峻峰, 杨丽萍, 等. 几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 67~69.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [8] Lee K, Moon S H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase[J]. J. Biotechnol., 2003, 102(3): 261~268.
- [9] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

- [10] 夏颖, 闵航, 周德平, 等. 两株菲降解菌株的特性及其系统发育分析[J]. 中国环境科学, 2003, **23**(2): 162~ 166.
- [11] 王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究[J]. 微生物学报, 2000, **40**(2): 115~ 120.
- [12] Hatakka A, Kantelinen A, Terviö-Wilo A, *et al.* Production of ligninases by *Phlebia radiata* in agitated conditions[A]. In: Odier E. Lignin-enzymic and microbial degradation[M]. Paris: INRA, 1987, 335~ 340.
- [13] Dodson P J, Evans C S, Harvey P H, *et al.* Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C α -C β cleavage in a lignin model compound[J]. FEMS Microbiol. Lett., 1987, **42**: 17~ 22.
- [14] Kimura Y, Asada Y, Kuwahara M. Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, **35**(4): 510~ 514.
- [15] Hofrichter M, Fritsche W. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems II The ligninolytic enzymes of the coal-humic acid-degrading fungus *Nematoloma frowardii* b19[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, **47**: 419~ 424.
- [16] Duran N, Ferrer I, Rodriguez J. Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441) [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 1987, **16**: 157~ 167.
- [17] Adhi T P, Korus R A, Crawford D L. Production of major extracellular enzymes during ligninocellulose degradation by two *Streptomyces* in agitated submerged culture [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**: 1165~ 1168.
- [18] Crawford D L, Pometto A L III, Crawford R L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus* isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1983, **45**: 898~ 904.
- [19] Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Duenas F J, *et al.* Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites[J]. J. Biol. Chem., 1999, **274**(15): 10 324~ 10 330.
- [20] Tuisel H, Sinclair R, Bumpus J A, *et al.* Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and stability to temperature and pH [J]. Arch. Biochem. Biophys., 1990, **279**: 158~ 166.
- [21] Mester T, Field J A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme producing by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese [J]. J. Biol. Chem., 1998, **273**: 15 412~ 15 417.
- [22] Crestini C, Giovannozzi S, Sermanni G. Aromatic ring oxidation of vanillyl and veratryl alcohols by *Lentinus edodes*: possible artifacts in the lignin peroxidase and veratryl alcohol oxidase assays[J]. J. Biotechnol., 1995, **39**: 175~ 179.
- [23] Rothschild N, Novotný C, Šásek V, *et al.* Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) isolation and characterization of lignin peroxidase[J]. Enzym. Microbiol. Technol., 2002, **31**: 627~ 633.
- [24] 林鹿, 余家鸾, 陈嘉翔. 纸浆的酶生物漂白及其机理[J]. 应用基础与工程科学学报, 1996, **4**(4): 353~ 362.