

研究报告

宏基因组来源耐 Mn^{2+} 、热稳定细菌漆酶的分子克隆
及酶学特性董冰雪^{1,2Δ} 夏敏^{2Δ} 蔡心清³ 李鹏² 押玉柯² 毛润乾^{1*}(1. 广东省生物资源应用研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用
公共实验室 广东 广州 510260)

(2. 南阳师范学院生命科学与技术学院 河南 南阳 473061)

(3. 中山大学生命科学学院 广东 广州 510275)

摘要:【背景】漆酶和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, Mnp)是木质素降解的主要酶,二者有协同效应。Mnp 活性依赖于 Mn^{2+} , 而 Mn^{2+} 是大多数漆酶的抑制剂。【目的】获得耐 Mn^{2+} 的细菌漆酶用于木质素降解。【方法】构建许昌市某污水河污泥宏基因组文库,通过活性筛选获得细菌漆酶基因 *lac1542*。使用大肠杆菌异源表达 Lac1542, 研究纯化后的重组蛋白酶学性质并进一步检测了含 Lac1542 复合酶系降解木质素能力。【结果】测序结果显示 *lac1542* 编码一个含 513 个氨基酸的蛋白。以 ABTS 为底物 Lac1542 最适反应 pH 为 4.0, 在 pH 3.0–6.5 范围内酶活性稳定。最适反应温度是 75 °C, 在 70 °C 以下酶活性稳定; 100 mmol/L 的 Mn^{2+} 仍能提高酶的活性。动力学参数研究发现, 该酶的最适底物顺序为: ABTS>丁香醛联氮>儿茶酚>2,6-DMP>愈创木酚。Lac1542/Mnp 复合酶系对木质素降解率为 47.8%, 比单独使用 Mnp 木质素降解率(22.4%)提高 25.4%。Lac1542/Mnp/灰盖鬼伞过氧化物酶(*Coprinus cinereus* Peroxidase, CIP)复合酶系木质素降解高达 71.5%, 比 Mnp/CIP 酶系木质素降解率(48.9%)提高 22.6%, 加入 Lac1542 后的复合酶系能明显提高木质素的降解率。【结论】Lac1542 的可溶性表达、耐受高浓度 Mn^{2+} 、热稳定性使得 Lac1542 可以替代一些经典的真菌漆酶应用于制浆、造纸、纤维素乙醇生产、染料脱色等工业。

关键词: 细菌漆酶, Mn^{2+} 耐受, 酶学特性, 宏基因组, 木质素降解

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFF0210204); National Natural Science Foundation of China (31300669); Key Grant of Science and Technology Department of Henan Province (142102210479, 182102311044); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2013A061402006, 2017B020202005); GDAS Special Project of Science and Technology Development (2017GDASCX-0107); Key Scientific Research Fund of Henan Educational Committee (14B180003)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-20-34454321; E-mail: maorun@giabr.gd.cn

Received: August 17, 2017; Accepted: February 12, 2018; Published online (www.cnki.net): March 23, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0210204); 国家自然科学基金(31300669); 河南省科技厅科技攻关(142102210479, 182102311044); 广东省科技计划(2013A061402006, 2017B020202005); 广东省科学院科技发展专项(2017GDASCX-0107); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B180003)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 86-20-34454321; E-mail: maorun@giabr.gd.cn

收稿日期: 2017-08-17; 接受日期: 2018-02-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-23

Molecular cloning and enzyme characterization of a metagenome-derived bacterial laccase with Mn^{2+} tolerance and thermostability

DONG Bing-Xue^{1,2Δ} XIA Min^{2Δ} CAI Xin-Qing³ LI Peng² YA Yu-Ke² MAO Run-Qian^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

(2. School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

(3. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: [Background] Laccase and manganese peroxidase (Mnp) are major enzymes in lignin biodegradation and they act synergistically. The activity of Mnp depends on the Mn^{2+} , however, Mn^{2+} is the inhibitor to most laccases. [Objective] The aim of our study is to obtain bacterial laccase with Mn^{2+} tolerance for lignin degradation. [Methods] We constructed the metagenomic library with environmental DNA isolated from sewage river sediment of Xuchang, and identified a gene encoding a bacteria laccase, *lac1542*, from the metagenomic library via activity-based functional screening. Then, we overexpressed Lac1542 heterologously as soluble active enzyme in *Escherichia coli*, and characterized the recombinant enzyme after purification subsequently. Finally, we further investigated the lignin degradation ability of the complex enzyme systems containing Lac1542. [Results] Sequence analysis revealed that *lac1542* encoded a protein of 513 amino acids. The purified Lac1542 exhibited maximal activity at 75 °C and pH 4.0 with ABTS as substrate, and this enzyme was stable in the pH range of 3.0–6.5 and at the temperature below 70 °C. Interestingly, the enzymatic activity was increased after addition of 100 mmol/L Mn^{2+} . Also, the optimal substrates were in the order of ABTS>Syringaldazine>catechol>2,6-DMP>guaiacol based on the kinetic parameters. In addition, the degradation percentage of Lac1542/Mnp toward lignin was 47.8%, 25.4% higher than that (22.4%) of Mnp. The degradation percentage of Lac1542/Mnp/*Coprinus cinereus* Peroxidase (CIP) toward lignin was reached up to 71.5%, 22.6% higher than that (48.9%) of Mnp/CIP. These results suggested that the degradation percentage of the complex enzyme system toward lignin was distinctly improved after addition of Lac1542. [Conclusion] The highly soluble expression, tolerance to high concentration of Mn^{2+} , and thermostability of Lac1542 make it a good candidate of laccases in industrial applications for which classical laccases are unsuitable, such as biobleaching of paper pulp and cellulosic ethanol production, and dye decolorization.

Keywords: Bacterial laccase, Mn^{2+} tolerance, Enzyme characterization, Metagenome, Lignin degradation

木质纤维素是地球上含量最高、分布最广的可再生资源,可用作制浆、造纸、化工、纤维素乙醇等工业原料^[1-3];具有成本低且“不与粮争地”的优点^[2]。为了能更好地利用木质纤维素,木质素降解成为备受关注的热点^[4-5]。漆酶和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, Mnp)是木质素降解的主要酶^[6-8],二者之间存在协同效应^[9-10]。Mnp的活性发挥依赖于 Mn^{2+} ,然而绝大多数漆酶的活性都受到 Mn^{2+} 的抑制^[11-16]。现实生产中造纸、生物乙醇和染料等工业的反应往往在高温下进行,普通的酶很难适应。因此寻找耐热、耐受 Mn^{2+} 的漆酶是提高复合酶系降解

木质素能力、拓宽漆酶工业应用领域的重要途径。

目前工业生产中只有真菌漆酶得到了应用^[17],真菌漆酶的工业化应用往往需要高效重组表达,然而真核基因的克隆、翻译及翻译后加工都制约了其高效表达^[18],细菌基因的表达则容易得多。过去认为漆酶仅存在于植物与真菌中,近年来, Alexandre等^[19]通过对蛋白质数据库及细菌基因组进行同质性分析,发现漆酶可能广泛存在于原核生物中。尤其令人感兴趣的是细菌漆酶具有 Cu^{2+} 抗性^[20]、不需糖基化、热稳定性强^[21]、耐高浓度盐^[22]及酶的反应pH值范围广^[23]等优点而更适合工业应用^[24]。

虽然漆酶可能广泛存在于原核生物中,但目前已经发现的具有类似漆酶活性的细菌并不多^[25-29]。宏基因组技术的产生为从不同自然生境的未培养微生物中寻找新的漆酶基因资源提供了有力的技术手段^[30]。Ausec 等利用宏基因组技术得到一种耐高浓度氯化钠的漆酶,然而该酶不耐热^[31]。Ye 等利用宏基因组手段从红树林分离到一种碱性漆酶,但该酶活性受 Mn^{2+} 抑制且热稳定性差^[32]。从宏基因组文库筛选耐 Mn^{2+} 、耐高温的细菌漆酶尚未见报道。本文以许昌市某污水河造纸厂废水排入口处污泥为样品构建宏基因组文库,以期筛选出耐 Mn^{2+} 且性质稳定的细菌漆酶,低成本表达后组成高效复合酶系,为木质纤维素预处理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)pLysS 为本实验室保存;Mnp/GS115^[33]和 CIPmt5/GS115^[34]用于表达 Mnp 和突变灰盖鬼伞过氧化物酶(*Coprinus cinereus* Peroxidase, CIP) CIPmt5, 来自前期工作。表达载体 pET-28a 由本实验室保存,克隆载体 pUC118BamH I/BAP 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、高保真酶 PrimeSTAR Max Premix 和连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;土壤基因组快速提取试剂盒 Fast DNA Spin Kit For Soil 购自 MP Biomedicals 公司;蛋白纯化离心柱 Ni-NTA Spin Columns 购自 QIAGEN 公司;蛋白提取试剂 BugBuster Protein Extraction Reagent 购自 Novagen 公司;2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-酸) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]、丁香醛连氮(Syringaldazine, SGZ)、2,6-二甲氧苯酚(2,6-Dimethoxyphenol, 2,6-DMP)、儿茶酚和愈创木酚购自 Sigma 公司;木质素来自南阳天冠集团;其他试剂均为进口分析纯。离心机购自力新

仪器(上海)有限公司;NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计购自 Thermo Scientific 公司;PCR 仪、iMark 酶标仪、电泳仪和凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司。

1.2 土壤样品 DNA 提取

取许昌市某污水河造纸厂废水排入口处污泥作为实验样品,基因组 DNA 的提取使用土壤基因组快速提取试剂盒,参照商家提供的使用说明书进行操作。

1.3 基因组文库的构建及漆酶活性基因筛选

基因组 DNA 用 BamH I 部分酶切后回收 2.5–7.5 kb 的片段,连接到 pUC118BamH I/BAP 载体上,电击转化大肠杆菌 DH5 α ,构建污水河污泥样品的宏基因组文库。复制文库到每孔含 500 μ L LB 培养基(添加 50 μ g/mL Amp、0.25 mmol/L IPTG 和 1 mmol/L CuSO₄)的深孔 96 孔板 37 °C 培养过夜。4 000 r/min 离心 5 min 取细胞,加入蛋白提取试剂,参照说明书裂解细胞。4 000 r/min 离心 5 min 取上清,加入 1 mmol/L CuSO₄、5 mmol/L MnSO₄ 和 1 mmol/L 愈创木酚,挑取反应后变成棕红色的克隆,再使用 ABTS 和 SGZ 进行复筛。选取能使 ABTS 变蓝绿色、SGZ 变粉紫色的克隆检测并送 Invitrogen 公司测序。

1.4 漆酶 ORF 的确定、序列分析及系统发育树构建

将测序结果输入 NCBI 数据库,使用 ORF finder 工具对测序结果进行分析,寻找可能的漆酶开放阅读框。根据 ORF 的大小将该基因命名为 lac1542,编码蛋白 Lac1542,所在质粒命名为 pUC118-lac1542。利用 ClustalW 软件对 Lac1542 进行同源性分析并使用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.5 漆酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达条件优化

以 pUC118-lac1542 为模板,设计如下引物进行 PCR 扩增: Lac1542F (5'-CCGGAATTCATGACACTTGAAAAATTTGTGGAT-3') 和 Lac1542R (5'-GCTCTAGATCAGTTATGGGGATCAGTTATAT-3') (下划线部分代表酶切位点,斜体部分代表保护碱基)。反应体系(15 μ L):模板 1 ng, 2 \times PrimeSTAR Max

Premix 7.5 μ L, 10 pmol/ μ L 上、下游引物各 1 μ L, 添加无菌双蒸水至总体积 15 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 *EcoR* I/*Xba* I 双酶切后回收连接在用同样的酶处理过的 pET-28a 上, 电击转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS。挑转化子检测后命名为 Lac1542/BL21 并接种至 LB 液体培养基培养至 OD_{600} 为 0.6, 分别添加终浓度为 0.1–4.0 mmol/L 的 IPTG 和 0.1–1.5 mmol/L 的 $CuSO_4$, 不同温度(20、25、30、37 $^{\circ}$ C)下 200 r/min 培养 8 h 诱导目的蛋白表达。

1.6 重组漆酶纯化、分子量大小估算及蛋白浓度测定

在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 取细胞超声波破碎(400 W, 工作 3 s, 间隔 5 s, 工作时间 10 min), 根据蛋白纯化试剂盒使用说明书纯化蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳检测酶的纯度并估算分子量。NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计 280 nm 下测定酶蛋白的浓度 [$\epsilon=8.849 \times 10^4$ L/(mol \cdot cm)]。

1.7 酶活性的测定

漆酶活性测定采用 ABTS 法^[35], 25 $^{\circ}$ C 预热含 0.5 mmol/L ABTS 的缓冲液(pH 4.0), 加入适量的酶启动反应。用 iMark 酶标仪在 405 nm 下测量光吸收值变化, 以 1 min 内氧化 1 μ mol ABTS 所需要的酶量定义为 1 个单位(U) [$\epsilon=3.6 \times 10^4$ L/(mol \cdot cm)], Mnp 和 CIP 活性测定参考前期工作^[33-34]。

1.8 酶学特性研究

1.8.1 pH 对酶反应的影响

最适反应 pH 测定采用柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 3.0–8.0), 200 μ L 反应体系含 390 ng 纯化的 Lac1542, 其它条件同 1.7。pH 稳定性测定取纯化后的 Lac1542, 先置于上述缓冲液内冰上保温 2 h, 再调至最适 pH, 75 $^{\circ}$ C 测定剩余酶活, 以未处理的酶作对照, 每个反应至少 3 个重复。

1.8.2 温度对酶反应的影响

最适反应温度测定设置温度范围 30–90 $^{\circ}$ C, 每 5 $^{\circ}$ C 为一个梯度。以 pH 4.0 的醋酸钠(NaAc)作为缓冲液, 其它条件同最适 pH 测定。温度稳定性测定

取纯化后的 Lac1542, 先置于不同温度下保温 2 h, 冰上冷却, 再按最适条件测定剩余酶活, 每个反应至少 3 个重复。

1.8.3 动力学参数的测定

以不同浓度的 ABTS、2,6-DMP、SGZ、儿茶酚和愈创木酚为底物, 以 pH 4.0 的 NaAc 为缓冲液, 反应温度设为 75 $^{\circ}$ C; 相应波长下测量吸光值的变化(2,6-DMP、儿茶酚和愈创木酚使用波长 450 nm; SGZ 使用 540 nm), 计算出各浓度下不同底物对应的酶活, 每个反应至少 3 个重复。动力学参数(K_m 和 k_{cat})采用 GraphPad prism 6 软件中的米氏方程计算、拟合。

1.8.4 金属离子对酶反应的影响

将适量的酶和不同的金属离子在 pH 4.0 的 NaAc 缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 预处理 15 min, 加入 1 mmol/L $CuSO_4$ 和 0.5 mmol/L ABTS 起始反应, 在最适条件下测酶活, 以未加金属离子的反应作为对照, 计算出相对活性, 每个反应至少 3 个重复。

1.9 木质素降解的协同效应

1.9.1 Mnp 和 CIPmt5 粗酶液的获得

参考文献[33-34]。

1.9.2 木质素含量的测定

参考文献[33]。

1.9.3 Lac1542 降解木质素

以 50 mmol/L 丁二酸钠(pH 5.5)为缓冲液, 4 mL 反应体系含 50 g/L 木质素、1 mmol/L $CuSO_4$ 、0.025 mmol/L ABTS、25 mmol/L $MnSO_4$ 、2 U Lac1542, 30 $^{\circ}$ C 反应 8 h, 测剩余木质素的含量, 每个实验 3 个重复。

1.9.4 Mnp 降解木质素

以 50 mmol/L 丁二酸钠(pH 5.5)为缓冲液, 4 mL 体系含木质素 50 g/L、25 μ L 的 30% H_2O_2 、25 mmol/L $MnSO_4$ 、16 U Mnp, 30 $^{\circ}$ C 反应 8 h 后测剩余木质素的含量, 每个实验 3 个重复。

1.9.5 Lac1542 和 Mnp 复合酶降解木质素

将 Lac1542 和 Mnp 组成复合酶降解木质素经响应面优化, 最佳的反应条件: 反应体系 4 mL, 含 15 μ L 的 Lac1542 (1.8 U)、6.84 μ L 的 Mnp (12 U)、

30%双氧水 20 μ L, 其它条件同 1.9.3。

1.9.6 CIPmt5 和 Mnp 复合酶降解木质素

固定总酶量为 12 U, 将 Mnp 和 CIPmt5 以不同的比例混合(1:4、2:3、1:1、3:2、4:1)用于降解木质素, 其余条件同 1.9.4。

1.9.7 Lac1542、CIPmt5 和 Mnp 复合酶降解木质素

Lac1542 用量分别为 15 μ L 和 30 μ L (1.8 U 和 3.6 U), 添加 0.025 mmol/L ABTS 和 1 mmol/L CuSO₄, 其余条件同 1.9.6。

1.10 核酸序列登录号

所报道序列已经提交至 GenBank (登录号 MF579951)。

2 结果与分析

2.1 宏基因组文库的构建和漆酶基因的筛选

所构建的宏基因组文库得到的库容量约 10 700 个克隆。随机选取 20 个克隆提质粒进行酶切检测, 片段插入率为 100%; 插入片段平均大小为 4.5 kb,

大小范围从 2.5–8.0 kb, 包含约 48 Mb 的土壤微生物 DNA 信息。酶切结果显示所建文库的 DNA 插入片段高度多样化。经过初筛和复筛从文库中得到一个具有漆酶活性的克隆。

2.2 Lac1542 序列分析

测序分析显示 4.2 kb 的插入片段中存在一个完整的编码漆酶基因的开放阅读框。该基因全长 1 542 bp, 编码 513 个氨基酸组成的多肽, 所编码的蛋白属于含铜多酚氧化酶家族, 命名为 Lac1542。NCBI 数据库序列比对显示该蛋白在氨基酸水平上与施氏假单胞菌漆酶(AND62506.1)和枯草芽孢杆菌多铜氧化酶(WP_042977959.1B)有 99% 相似性; 与真菌漆酶相似性低: 酿酒酵母 S288C 漆酶(NP_116612.1) 20%、裂殖酵母 972h 漆酶(NP_594494.1) 22%、灵芝漆酶(ACR24357.1) 22%。系统发育树构建结果显示 Lac1542 与施氏假单胞菌漆酶亲缘关系最近, 聚在同一分支(图 1), 证明得到的是细菌漆酶。

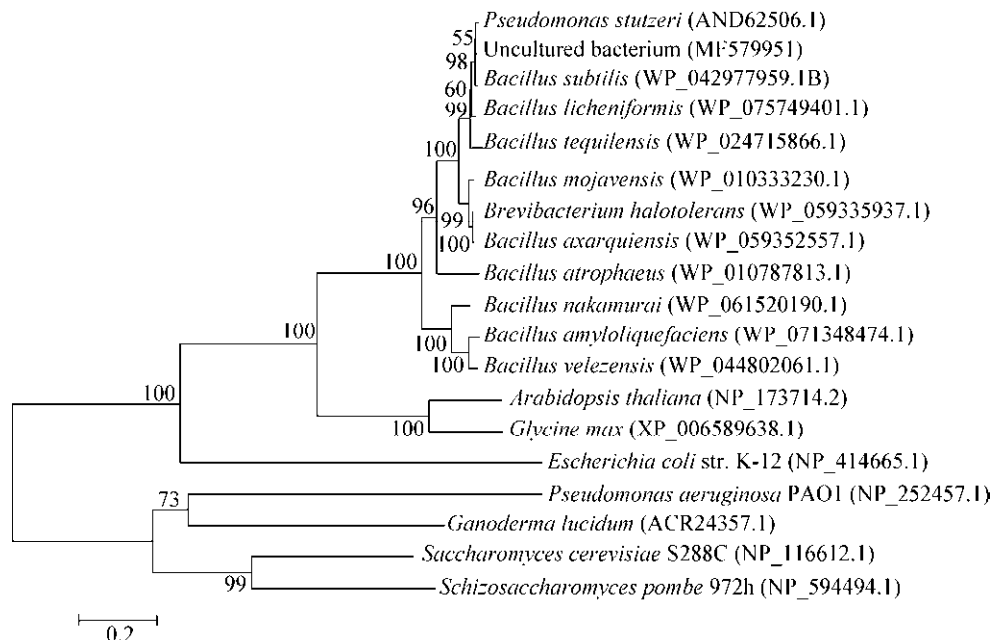


图 1 Lac1542 (uncultured bacterium MF579951)和近似相关蛋白系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of Lac1542 (uncultured bacterium MF579951) and closely related proteins

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 括号内为 GenBank 登录号; 标尺长度代表进化距离。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar represents sequence divergence.

2.3 重组 Lac1542 的表达、纯化和活性检测

培养 Lac1542/BL21 至 OD_{600} 达 0.6 时添加 0.25 mmol/L IPTG、1 mmol/L $CuSO_4$, 30 °C、200 r/min 培养 8 h 诱导目的蛋白表达效果最佳。对诱导后的细胞进行超声波破壁, SDS-PAGE 电泳结果显示蛋白以可溶性表达为主; 纯化后得到了单一条带, 分子量约为 70 kD, 与理论分析值相符(图 2)。重组蛋白对 ABTS 的比酶活为 99.64 U/mg, 还对 SGZ、儿茶酚、愈创木酚和 2,6-DMP 几种经典的漆酶底物显示了活性(表 1)。这些结果说明 Lac1542 是一个具有高酶活、底物范围广、可溶性表达的细菌漆酶, 在工业生产中具有潜在的应用价值。

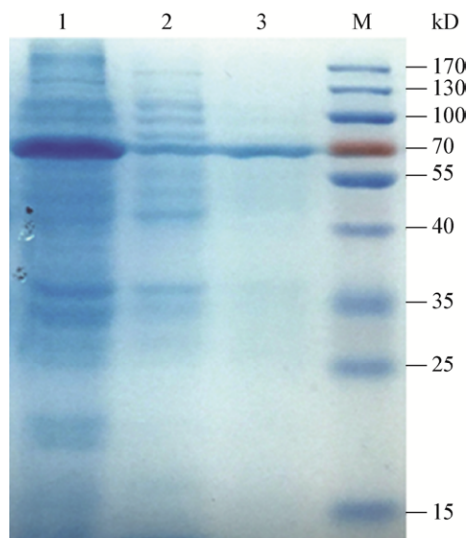


图 2 纯化后重组 Lac1542 的 SDS-PAGE 分析
Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified recombinant Lac1542

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 细胞裂解上清; 2: 细胞裂解沉淀; 3: 纯化后的 Lac1542.

Note: M: Standard protein molecular mass markers (sizes in kilodaltons are indicated on the right); 1: Recombinant Lac1542 from supernatant of *E. coli* BL21(DE3)plysS cell lysates; 2: Recombinant Lac1542 from precipitation of *E. coli* BL21(DE3)plysS cell lysates; 3: Recombinant Lac1542 purified by Ni-NTA Spin column.

表 1 不同底物的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of different substrates

Substrate	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($L/(s \cdot \mu\text{mol})$)	Activity (U/mg)
ABTS	194.9 ± 3.219	100.4 ± 3.27	0.516	99.64
2,6-DMP	407.7 ± 11.32	0.1126 ± 0.017	3.00×10^{-5}	0.061
SGZ	474.4 ± 52.76	0.9017 ± 0.902	1.90×10^{-4}	0.150
Catechol	620.2 ± 76.73	0.6445 ± 0.021	1.04×10^{-4}	0.549
Guaiacol	139.5 ± 22.46	0.0143 ± 0.001	1.03×10^{-5}	0.014

2.4 重组漆酶的酶学特性研究

2.4.1 pH 对重组漆酶的催化活性和稳定性的影响

以 ABTS 为底物, 重组 Lac1542 的最适 pH 为 4.0, 在 pH 3.5–4.5 保持有 80% 以上活性。此外, 酶在 pH 3.0–6.5 范围内活性稳定, pH 6.5 时处理 2 h 后残余酶活仍接近 60% (图 3)。可以看出 Lac1542 是一种在较广范围 pH 内有活性且比较稳定的酶。

2.4.2 温度对重组漆酶的催化活性和稳定性的影响

以 ABTS 为底物, 重组 Lac1542 的最适反应温度为 75 °C, 90 °C 时仍保留 70% 活性。在 70 °C 以下酶活性稳定, 保温 2 h 仍有 80% 以上活性, 75 °C 保温 2 h 酶活仍剩余 50% (图 4)。可见该酶是一个非常耐热的漆酶, 适合制浆、造纸、染料等工业上废水处理。

2.4.3 漆酶的动力学参数和底物专一性研究

酶的动力学参数 k_{cat}/K_m (催化效率) 通常被当作衡量酶对底物专一性强弱的一个指标。催化效率最高的 ABTS 被认为是漆酶的最佳底物, 其余最佳底物的顺序依次为: SGZ > 儿茶酚 > 2,6-DMP > 愈创木酚(表 1)。

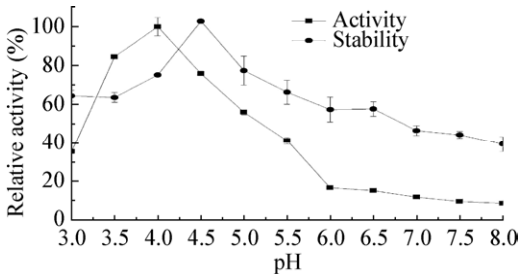


图 3 pH 对 Lac1542 活性和稳定性的影响
Figure 3 Effect of pH on activity and stability of Lac1542 using ABTS as substrate

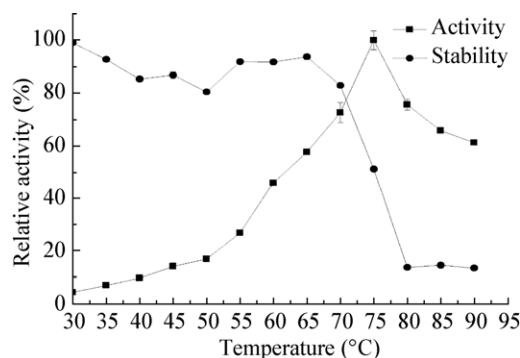


图4 温度对 Lac1542 活性和稳定性的影响

Figure 4 Effect of temperature on activity and stability of Lac1542 using ABTS as substrate

2.4.4 金属离子对酶活的影响

以 ABTS 为底物研究了不同金属离子对漆酶活性的影响。结果显示, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶都起抑制作用; 10 mmol/L 以下的 NH_4^+ 对酶有激活作用; Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 在 100 mmol/L 时仍能促进酶的活性(表 2)。这对于以后该酶和依赖 Mn^{2+} 的 Mnp 组成复合酶系进行木质素降解时有着不可比拟的优势。

2.5 木质素降解

单一的酶降解木质素效率都不高, 2 U 的 Lac1542 仅降解 18.7% 的木质素; 16 U 的 Mnp 可降解木质素

表2 金属离子对 Lac1542 活性的影响

Table 2 Effect of metal ions on Lac1542 (%)

Metal ions	Metal salts	Metal ions concentration (mmol/L)		
		1	10	100
Control	None	100.00	100.00	100.00
Cu^{2+}	$CuSO_4$	100.00	137.80	139.53
Fe^{3+}	$FeCl_3$	83.66	80.09	—
Na^+	$NaCl$	98.43	67.77	11.75
Fe^{2+}	$FeSO_4$	5.59	15.36	30.24
Mg^{2+}	$MgCl_2$	88.43	61.63	9.05
Ca^{2+}	$CaCl_2$	90.52	57.96	9.93
K^+	KCl	87.07	70.67	13.78
Mn^{2+}	$MnSO_4$	120.42	115.59	111.98
NH_4^+	$(NH_4)_2SO_4$	118.65	112.19	94.48

注: —: 未检测。

Note: —: No detection.

22.4%; 将 Lac1542 和 Mnp 组成复合酶系, 通过响应面优化 1.8 U Lac1542 和 12 U Mnp 即可提高木质素降解率至 47.8% (图 5A)。固定总的过氧化物酶量为 12 U, 将 Mnp 和 CIPmt5 以不同比例混合降解木质素效率都高于单独的 16 U Mnp, 其中以 1:1 混合的情况下降解率最高, 可达 48.9%。将 3 种酶组成复合酶系, 漆酶 1.8 U、CIPmt5 和 Mnp 比例为 2:3 时组成的复合酶系对木质素的降解效果最好, 达到 71.5% (图 5B), 说明 3 种酶组成的复合酶系可更有效地降解木质素。

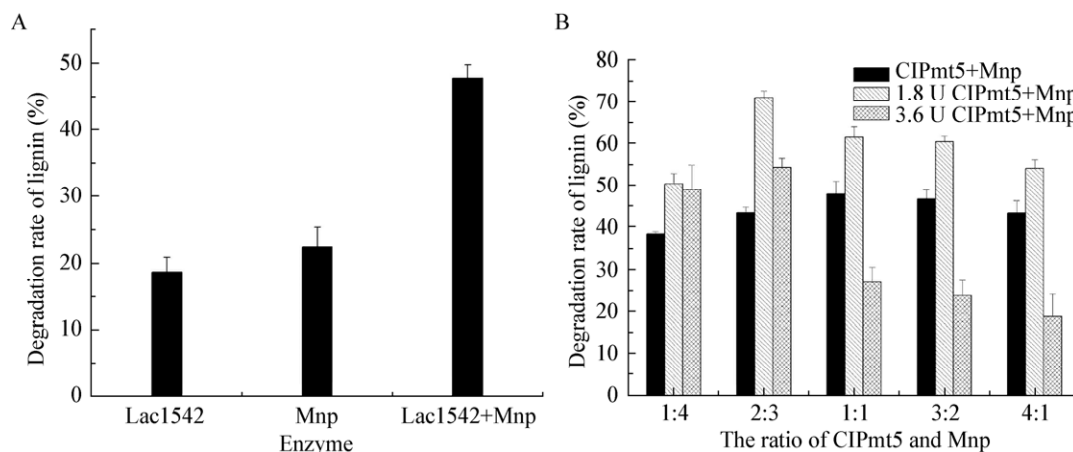


图5 酶降解木质素能力

Figure 5 lignin degradation ability using enzymes

注: A: 漆酶 Lac1542、锰过氧化物酶及其复合酶降解木质素能力; B: 灰盖鬼伞过氧化物酶、锰过氧化物酶复合酶系及漆酶 Lac1542、灰盖鬼伞过氧化物酶和锰过氧化物酶复合酶系降解木质素能力。

Note: A: Lignin degradation using laccase Lac1542, Mnp, and Lac1542/Mnp complex enzyme respectively; B: Lignin degradation using complex enzyme containing CIP/Mnp, CIP/Mnp/Lac1542 respectively.

3 讨论与结论

漆酶因底物谱广、绿色环保、不需要昂贵的辅因子而在制浆、造纸、化妆品、生物传感器、有机污染物生物修复等领域得到了广泛的研究与应用^[36]。在工业中使用的真菌漆酶反应 pH 偏酸, 在中性至碱性往往失去活性, 以 ABTS 为底物最适 pH 一般为 2.5 左右^[15,37]; 本实验筛选得到的 Lac1542 以 ABTS 为底物最适 pH 为 4.0, 以 SGZ 和愈创木酚为底物最适 pH 为 8.0, 反应 pH 范围广, 比真菌漆酶更有优势。Lac1542 最显著的特点是高浓度 Mn^{2+} 仍然可以促进酶的活性。目前仅查到 3 篇关于 Mn^{2+} 促进漆酶活性的报道。Kalyani 等^[36]报道 1 mmol/L 的 Mn^{2+} 对红色亚栖热菌漆酶活性有促进作用, 汪春蕾^[38]报道 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对枯草芽孢杆菌 WD23 芽孢漆酶有一定激活作用, 但两篇文献均未涉及更高浓度 Mn^{2+} 对酶活性的影响; Arias 等^[39]报道 20 mmol/L Mn^{2+} 可以促进蓝色链霉菌 CECT 3335 漆酶活性, 超过 40 mmol/L 则会产生抑制。Lac1542 在 100 mmol/L Mn^{2+} 存在时活性仍然不受抑制, 这对于和 Mnp 组成复合酶系处理多种污染物有着天然的优势。Lac1542 的第 2 个显著特点是反应温度高、热稳定性强。真菌漆酶的最适反应温度一般在 30–60 °C, 嗜热菌来源的漆酶最适反应温度在 50–60 °C^[40]。芽孢杆菌属来源的漆酶具有高的最适反应温度, Martins 等报道了枯草芽孢杆菌的芽孢漆酶 CotA 最适反应温度为 75 °C, 热稳定性强^[28], 和 Lac1542 相似; Koschorreck 等报道了地衣芽孢杆菌的漆酶最适反应温度为 85 °C, 70 °C 处理 1 h 酶活剩余 43%^[29], 而 Lac1542 在 70 °C 处理 2 h 酶活剩余 80% 以上。Lac1542 第 3 个显著特点就是 30 °C 诱导表达时以可溶性表达为主, 浓缩、纯化简单, 非常有利于工业应用。Martins 等的枯草芽孢杆菌漆酶在大肠杆菌中以包涵体表达为主^[28]; Koschorreck 等研究地衣芽孢杆菌漆酶原核表达时发现诱导温度超过 18 °C 就会形成无活性的包涵体^[29]。虽然 Martins 的枯草芽孢杆菌 CotA 在最适反应温度和耐

热性上和 Lac1542 近似, 但是以 ABTS、SGZ 和愈创木酚为底物时最适反应 pH 都低于 Lac1542, CotA 的包涵体表达方式使得它在工业应用前景上不如 Lac1542。

为了验证耐 Mn^{2+} 的 Lac1542 组成的复合酶系的功能, 分别对 Lac1542、Mnp、CIPmt5 以及由其组成的复合酶系进行了木质素降解能力的检测。单一的细菌漆酶 Lac1542 处理木质素降解率仅有 18.7%, 远低于前期工作中云芝漆酶的降解能力^[33], 可能跟细菌漆酶氧化还原电势低有关, 也可能跟反应温度有关。虽然提高温度后细菌漆酶降解木质素能力可能会有所提高, 考虑到要组成复合酶系并且降低能耗, 此处仍然选择了在 30 °C 反应。CIPmt5 本身不是木质素降解酶, 和 Mnp 不同比例混合组成的复合酶系降解能力均高于 Mnp; 当加入低浓度 Lac1542 (1.8 U) 时, 明显促进木质素降解, CIPmt5 和 Mnp 的最适比例为 2:3 最合适; 当加入较高浓度 Lac1542 (3.6 U) 且 CIPmt5 和 Mnp 比例大于 1 时反而会抑制木质素降解。多酶反应体系中高的 Lac1542 含量并不能促进木质素的降解, 说明漆酶浓度低时 3 种酶之间存在着某种协同, 漆酶浓度高时 3 种酶之间存在某种抑制效应, 具体原因还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] de Gonzalo G, Colpa DI, Habib MHM, et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 236: 110-119
- [2] Mathews SL, Pawlak J, Grunden AM. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 2939-2954
- [3] Čilerdžić J, Stajić M, Vukojević J. Activity of Mn-oxidizing peroxidases of *Ganoderma lucidum* depending on cultivation conditions[J]. BioResources, 2016, 11(1): 95-104
- [4] Davidi L, Morais S, Artzi L, et al. Toward combined delignification and saccharification of wheat straw by a laccase-containing designer cellulosome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(39): 10854-10859
- [5] Cui YH, Wang Q, Gou GJ, et al. Advances in catalytic degradation liquefaction of lignin[J]. Materials Review, 2017, 31(5): 112-116, 133 (in Chinese)
崔玉虎, 王奇, 苟光俊, 等. 木质素催化降解液化的研究进

- 展[J]. 材料导报, 2017, 31(5): 112-116,133
- [6] Paliwal R, Uniyal S, Rai JPN. Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(9): 6842-6853
- [7] Johansson M, Denekamp M, Asiegbu FO. Production and isozyme pattern of extracellular laccase in the S and P intersterility groups of the root pathogen *Heterobasidion annosum*[J]. Mycological Research, 1999, 103(3): 365-371
- [8] Masarin F, Norambuena M, Ramires HOR, et al. Manganese peroxidase and biomimetic systems applied to *in vitro* lignin degradation in *Eucalyptus grandis* milled wood and kraft pulps[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2016, 91(5): 1422-1430
- [9] Aarti C, Arasu MV, Agastian P. Lignin degradation: a microbial approach[J]. South Indian Journal of Biological Sciences, 2015, 1(3): 119-127
- [10] Galliano H, Gas G, Seris JL, et al. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1991, 13(6): 478-482
- [11] Li TL. Properties of spore laccase from *Bacillus subtilis* WN02 and its use in dye decolorization[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2010 (in Chinese)
李泰仑. 枯草芽孢杆菌 WN02 芽孢漆酶的性质及染料脱色研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2010
- [12] Jiang S. Characterization and dye decolorization ability of *Clostridium prazmowski* spore laccase[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2012 (in Chinese)
蒋帅. 梭状芽孢杆菌产漆酶的酶学性质及对染料脱色的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2012
- [13] Li J. Produce laccase bacteria strain screening and its application[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2013 (in Chinese)
栗君. 产漆酶细菌菌株的筛选及其应用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2013
- [14] Shi XW, Liu Q, Ma JS, et al. An acid-stable bacterial laccase identified from the endophyte *Pantoea ananatis* Sd-1 genome exhibiting lignin degradation and dye decolorization abilities[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(11): 2279-2288
- [15] Ai MQ, Wang FF, Huang F. Purification and characterization of a thermostable laccase from *Trametes trogii* and its ability in modification of Kraft lignin[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(8): 1361-1370
- [16] Zhu XF, Ding T. Effect of metal ions on activity of two laccases[J]. Chemical Research, 2003, 14(3): 50-51,54 (in Chinese)
朱显峰, 丁涛. 常见金属离子对漆酶酶活的影响[J]. 化学研究, 2003, 14(3): 50-51,54
- [17] Xu F, Damhus T, Danielsen S, et al. Catalytic applications of laccase[A]//Schmid RD, Urlacher VB. Modern Biooxidation[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2007: 43-75
- [18] Koschorreck K, Schmid RD, Urlacher VB. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis[J]. BMC Biotechnology, 2009, 9: 12
- [19] Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(2): 41-42
- [20] Hullo MF, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5426-5430
- [21] Suzuki T, Endo K, Ito M, et al. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(10): 2167-2175
- [22] Brander S, Mikkelsen JD, Kepp KP. Characterization of an alkali- and halide- resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99402
- [23] Ruijsenaars HJ, Hartmans S. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(2): 177-182
- [24] Zhao M, Wei XD, Wang CL, et al. Research progress of bacterial laccase[J]. Transactions of China Pulp and Paper, 2008, 23(3): 107-114 (in Chinese)
赵敏, 魏兴东, 汪春蕾, 等. 细菌漆酶的研究进展[J]. 中国造纸学报, 2008, 23(3): 107-114
- [25] Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(6): 823-832
- [26] Singh G, Capalash N, Goal R, et al. A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: purification, characterization and indigo carmine degradation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(6/7): 794-799
- [27] Wang CL, Cui DZ, Lu L, et al. Cloning and characterization of CotA laccase from *Bacillus subtilis* WD23 decoloring dyes[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(1): 461-467
- [28] Martins LO, Soares CM, Pereira MM, et al. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(21): 18849-18859
- [29] Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(2): 217-224
- [30] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry and Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [31] Ausec L, Berini F, Casciello C, et al. The first acidobacterial laccase-like multicopper oxidase revealed by metagenomics shows high salt and thermo-tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6261-6276
- [32] Ye M, Li G, Liang WQ, et al. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1023-1031
- [33] Dong BX. Synthesis, site-specific mutagenesis, expression in *Pichia pastoris* of ligninolytic enzymes from the white rot fungi

- and their degradability to lignocellulosic stuff used for paper industry[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Sun Yat-Sen University, 2008 (in Chinese)
- 董冰雪. 白腐真菌木质素降解酶的合成、定点突变、毕赤酵母表达以及它们对造纸工业中木质纤维原料降解的研究[D]. 广州: 中山大学博士学位论文, 2008
- [34] Zhang L, Zhang W, Fang JT, et al. Directed evolution of *Coprinus cinereus* peroxidase to improve the decolorization of textile wastewaters[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 774-782 (in Chinese)
- 张磊, 张伟, 方金涛, 等. 定向进化提高灰盖鬼伞过氧化物酶染织废水脱色效率[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 774-782
- [35] Galai S, Korri-Youssoufi H, Marzouki MN. Characterization of yellow bacterial laccase SmLac/role of redox mediators in azo dye decolorization[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2014, 89(11): 1741-1750
- [36] Kalyani DC, Munk L, Mikkelsen JD, et al. Molecular and biochemical characterization of a new thermostable bacterial laccase from *Meiothermus ruber* DSM 1279[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(5): 3910-3918
- [37] Han MJ, Choi HT, Song HG. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(6): 555-560
- [38] Wang CL. Clone and heterologous expression of CotA gene of spore coat protein processing bacterial laccase activity[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Forestry University, 2010 (in Chinese)
- 汪春蕾. 具细菌漆酶活性的芽孢外壁蛋白 CotA 基因克隆及异源表达研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2010
- [39] Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, et al. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1953-1958
- [40] Chefetz B, Chen Y, Hadar Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(9): 3175-3179

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2018 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413