

刘金雷,刘天佳,于莹,等.木质素降解酶系在毕赤酵母中的表达及降解木质素的活性[J].江苏农业科学,2015,43(11):58-62.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.016

# 木质素降解酶系在毕赤酵母中的表达 及降解木质素的活性

刘金雷<sup>1</sup>,刘天佳<sup>2</sup>,于莹<sup>1</sup>,李天明<sup>1</sup>,仪宏<sup>1</sup>

(1.河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050000; 2.河北常山生化药业股份有限公司,河北石家庄 050000)

**摘要:**自然界中的木质素是潜在丰富的可再生资源,近年来利用生物法降解木质素成为研究的热点。利用 RT-PCR 克隆了黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 木质素过氧化物酶基因 (*LiP*)、锰过氧化物酶基因 (*MnP*)、黑曲霉 (*Asperillus niger*) 葡萄糖氧化酶基因 (*gox*) 及白腐真菌 (White Rot Fungi) 漆酶基因 (*Lac*),并构建了毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达载体,电转化入 *Pichia pastoris* X-33 宿主菌中,获得转化子并进行微培养,通过测定培养液的酶活,筛选出高酶活菌株。对 4 种重组菌株进行发酵,以经过处理的玉米皮作为底物,分别加入 4 种酶的发酵液及 4 种酶的混合液,于 30 ℃ 反应后测定不同反应时间木质素的降解量,反应 24h,木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶吸光度  $D_{280nm}$  的降低幅度分别为 45%、39%、9%、57%;复合酶降解木质素的活性明显高于单一酶,吸光度的降低幅度为 78%,说明木质素降解酶系的相互协同作用,提高了木质素的降解效率,为木质素酶解提供了新方法。

**关键词:**木质素;降解酶系;新方法;异源表达;毕赤酵母;酶活性

**中图分类号:** S188<sup>+</sup>.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0058-05

木质素是一种丰富的天然可再生的有机高分子化合物,广泛存在于植物体中,它包围着纤维素,和半纤维素一起填充于微原纤维之间,与纤维素、半纤维素一起构成植物细胞壁的主要成分,是自然界中植物光合作用制造的总量仅次于纤维素的碳素资源<sup>[1]</sup>。据估计,全世界每年由植物生长产生的木质素达 1 500 亿 t,其中造纸工业废液中产生的工业木质素有 3 000 万 t<sup>[2]</sup>,因此对大自然给予人类的木质素等丰富的可再生天然资源予以充分重视并加以研究和利用,对于可持续发展具有重要意义。

木质素的结构复杂,不易分解<sup>[3-4]</sup>,从 20 世纪开始,国内外的学者一直寻找木质素降解的最佳途径,研究内容主要包括物理法、化学法、物理化学法、生物降解法<sup>[5]</sup>。木质素的微生物降解不仅可以缓解环境污染、变废为宝,而且对生物质资源的充分利用有重大的现实意义,因此对木质素的生物降解已经成为当今世界国内外学者的研究热点<sup>[6-9]</sup>。木质素的降解是由一系列酶协同完成的,目前已知,在降解木质素过程中起主导作用的主要是漆酶 (laccase, LAC)、木质素过氧化物酶 (lignin peroxidase, LIP)、锰过氧化物酶 (manganese peroxidase, MNP) 这 3 种酶<sup>[10]</sup>。此外,葡萄糖氧化酶 (glucose 1-oxidase, GO)、芳醇氧化酶 (aryl-alcohol oxidase, AAO)、乙二醛氧化酶 (glyoxaloxidase, GLOX) 等也对木质素的降解产生一定的影响或者直接参与其降解<sup>[11]</sup>。

木质素降解的相关酶最早是在白腐真菌的胞外培养液中发现的,近年来随着国内外学者对木质素降解酶系的研究进展,发现在自然界中木质素的降解是由真菌、细菌、放线菌三者共同作用的结果,其中真菌起主要作用<sup>[12]</sup>。自然界中降解木质素能力最强的一类真菌是白腐菌<sup>[13-16]</sup>,白腐菌虽然有广谱的酶系统,但是由于其生理代谢的特殊性以及近乎苛刻的对环境因子的要求,对于实现工业化产酶产生了严重阻碍。随着分子生物学的发展,基因工程菌的构建和木质素酶系的异源表达成为从根本上解决这一问题的一种可能的途径。本研究主要利用基因重组技术,利用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌表达了不同来源的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶基因,利用工程菌的发酵液降解天然木质素,并通过木质素降解酶系的协同作用,增强了木质素的降解效率,为木质素酶解提供了新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 Trans 5 $\alpha$  菌株购自北京全金生物技术有限公司, *P. pastoris* X-33 菌株和表达质粒 pGAPZ $\alpha$  由河北科技大学分子生物学实验室保存,黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、黑曲霉 (*Asperillus niger*)、白腐真菌 (White Rot Fungi) 为笔者所在实验室保藏的野生型菌株。

1.1.2 培养基 LB、YPDS、YPD 培养基均按照《Invitrogen 公司操作手册》推荐的方法配制。

1.1.3 试剂 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、Bcabest<sup>TM</sup> RNA PCR 试剂盒,购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaRaKa); Trizol Reagent, 购自 Gibco 公司; DNA 回收试

收稿日期:2014-11-16

作者简介:刘金雷 (1988—),男,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向为分子定向进化与生物催化。E-mail:1060083086@qq.com。

通信作者:李天明,硕士,助理研究员,研究方向为分子定向进化与生物催化。E-mail:iamltm2000@hotmail.com。

剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖,购自天根生化科技(北京)有限公司;PMD-18 克隆载体,购自北京全式金生物技术有限公司;PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成;DNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。如无特别说明,所有的化学试剂均为分析纯产品。

## 1.2 试验方法

1.2.1 基因的操作 质粒提取、酶切反应、DNA 片段回收、连接以及大肠杆菌转化等均参照试剂盒提供的方法进行操作。

1.2.2 基因的克隆 采用液氮研磨-SDS 法提取黄孢原毛平革菌、黑曲霉和白腐真菌总 RNA,以合成的 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,纯化 PCR 产物,与 PMD-18 连接,构建 PMD-18-LiP、PMD-18-MnP、PMD-18-gox、PMD-18-Lac 质粒,转化 *E. coli* Trans5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含 150  $\mu$ g/L 氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、X-gal 的 LB 平板,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取白色菌落,提质粒,PCR 验证,对阳性克隆进行 DNA 序列测定。

1.2.3 重组表达载体的构建 载体 pGAPZ $\alpha$ A 用 *Eco*R I、*Kpn* I 双酶切,产生的 3.1 kbDNA 片段用 DNA 回收试剂盒回收纯化。以测序验证正确的含有 *Lac* 基因的 PMD-18-Lac 质粒作模板 PCR,PCR 片段用 *Eco*R I、*Kpn* I 双酶切,1.5 kb 片段用上述方法纯化,将片段与用 *Eco*R I/*Kpn* I 酶切后的 pGAPZ $\alpha$ A 片段用 T4 连接酶于 16  $^{\circ}$ C 过夜连接;连接液转化 *E. coli* Trans5 $\alpha$ ,涂布于含有博来霉素(Zeocin)(100 mg/L)的 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜,随机选取转化子提取质粒,PCR 分子验证,PCR 验证正确的转化子用 *Eco*R I、*Kpn* I 双酶切再次验证,将重组质粒送相应公司测序。*LiP*、*MnP*、*gox*、*Lac* 基因表达载体的构建方法一样,只是酶切位点不同,*LiP* 基因的酶切用 *Eco*R I/*Not* I,*MnP* 基因的酶切用 *Eco*R I/*Not* I,*gox* 基因的酶切用 *Kpn* I/*Not* I,*Lac* 基因的酶切用 *Eco*R I/*Kpn* I,从而得到表达载体 GAPZ $\alpha$ A-LiP、pGAPZ $\alpha$ A-MnP、pGAPZ $\alpha$ A-gox、pGAPZ $\alpha$ A-Lac。

## 1.2.4 酶活测定

1.2.4.1 木质素过氧化物酶(LiP)酶活的测定<sup>[17]</sup> 2 mL 反应体系中含 0.4 mL 发酵液(或稀释酶液)、10 mmol/L 藜芦醇、50 mmol/L 酒石酸缓冲液(pH 值 2.5),加入 0.4 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,30  $^{\circ}$ C 反应 2 min 后,以不加发酵液、用蒸馏水补齐的 2 mL 反应液作对照,用酶标仪在 310 nm 处测定吸光度  $D_{310\text{ nm}}$ 。

1.2.4.2 锰过氧化物酶(MnP)酶活的测定<sup>[18]</sup> 2 mL 反应体系中含 0.4 mL 发酵液(或稀释酶液)、100  $\mu$ mol/L MnSO<sub>4</sub>、0.01% 苯酚红、0.1% 牛血清蛋白、25 mmol/L 乳酸锂、50 mmol/L 酒石酸缓冲液(pH 值 4.5),加入 0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,于 30  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后,加入 100  $\mu$ L 2mol/L NaOH 溶液终止反应,以先加终止剂的作对照,测 610 nm 处的吸光度  $D_{610\text{ nm}}$ 。

1.2.4.3 葡萄糖氧化酶(GO)酶活的测定<sup>[19]</sup> 5 mL 反应体系含 0.7 mL 发酵液(或稀释酶液)、0.04 mol/L 葡萄糖、3 mL 0.2 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4)、1.3 mL 靛蓝胭脂红溶液(1.0  $\times 10^{-3}$  mol/L),于 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 10 min,再于

100  $^{\circ}$ C 水浴 13 min,用流水冷却 5 min 以终止反应,以不加发酵液用蒸馏水补齐的等量体系作对照,测 615 nm 处的吸光度  $D_{615\text{ nm}}$ 。

1.2.4.4 漆酶(LAC)酶活的测定<sup>[20-21]</sup> 3 mL 反应体系中含有 2.95 mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 值 3.4)、1 mL 1 mol/L ABTS、0.05 mL 稀释后的酶液,于 25  $^{\circ}$ C 反应 3 min 后,对照为未加 ABTS 同体积的反应混合液,用酶标仪在 420 nm 下测定吸光度  $D_{420\text{ nm}}$ 。

## 1.3 毕赤酵母重组菌株的获得及鉴定

将重组质粒用 *Bsp*H I 酶切,使其完全线性化,电击转化至毕赤酵母 X33 感受态细胞中,感受态细胞及电转化过程参照《Invitrogen 公司操作手册》<sup>[22]</sup>。电转化液均匀涂布到含 100 mg/L Zeocin 的 YPDS 培养基上,于 30  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d 至长出重组子。将平板上生长的重组子分别挑取到含有 3 mL YPD 培养基的 24 孔板中,于 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养,漆酶重组菌株培养 5 d,木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶重组菌株培养 3 d,根据上述方法测定酶活。高温裂解高酶活酵母转化子,获得其 DNA,以此为模板,用目的基因引物进行 PCR 扩增,用琼脂糖电泳进行鉴定。

## 1.4 重组菌株对天然木质素玉米皮的酶解

将木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶重组酵母工程菌株和转有空质粒的对照酵母菌株于 25 mL YPD 培养基中 30  $^{\circ}$ C 振荡培养(200 r/min),木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶及葡萄糖氧化酶工程菌株培养 3 d,漆酶工程菌株及转有空质粒的对照酵母菌株培养 5 d,4 000 r/min 离心 5 min,得到上清液。取 1 mL 5 株菌的上清液加入到 4 mL 经 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液预处理的玉米皮上清液中,另各取 250  $\mu$ L 木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶的工程菌株发酵上清液混合,加入到 4 mL 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液浸泡 24 h 的玉米皮上清液中,置于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中降解木质素。用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调零,于 280 nm 处测吸光度  $D_{280\text{ nm}}$ ,吸光度的降低值表征木质素的降解量。为了降低误差,平行做 3 组玉米皮的酶解试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LiP*、*MnP*、*gox*、*Lac* 基因表达载体的构建及序列测定和分析

*LiP* 基因的纯化回收片段与载体 pGAPZ $\alpha$ A 用 *Eco*R I/*Not* I 酶切,*MnP* 基因的纯化回收片段用 *Eco*R I/*Not* I 酶切,*gox* 基因的纯化回收片段用 *Kpn* I/*Not* I 酶切,*Lac* 基因的纯化回收片段用 *Eco*R I/*Kpn* I 酶切。T4 连接酶于 16  $^{\circ}$ C 过夜连接,连接液转化到感受态细胞 *E. coli* Trans5 $\alpha$ ,构建 pGAPZ $\alpha$ A-LiP、pGAPZ $\alpha$ A-MnP、pGAPZ $\alpha$ A-gox、pGAPZ $\alpha$ A-Lac 质粒。挑选阳性克隆,提质粒,分别用 4 种基因的限制性内切酶对构建的质粒进行酶切验证,从图 1 可以看出,*LiP*、*MnP*、*gox*、*Lac* 基因与载体连接成功;重组阳性质粒 pGAPZ $\alpha$ A-LiP、pGAPZ $\alpha$ A-MnP、pGAPZ $\alpha$ A-gox、pGAPZ $\alpha$ A-Lac 经测序结果表明,*LiP* 基因长 1 003 bp,*MnP* 基因长 1 100 bp,*gox* 基因长 1 963 bp,*Lac* 基因长 1 563 bp。将基因序列用 DNAsclab 翻译为氨基酸序列后,在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,*LiP*、*MnP* 基因与黄孢原毛平革菌的同源

性达 100%,*gox* 基因与黑曲霉的同源性达 100%,*Lac* 基因与白腐真菌的同源性达 100%,说明构建 pGAPZαA - *LiP*、pGAPZαA - *MnP*、pGAPZαA - *gox*、pGAPZαA - *Lac* 成功。

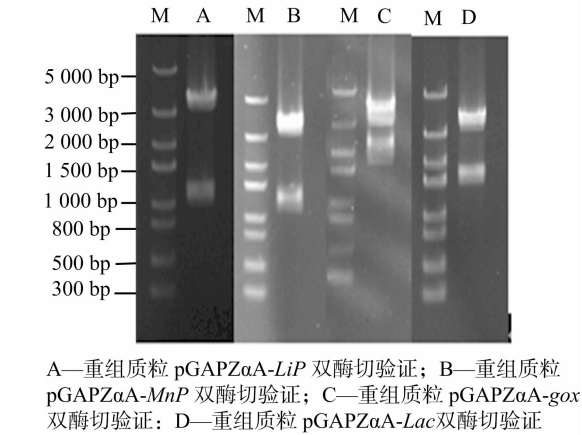


图1 重组质粒的双酶切验证结果

2.2 转化与高表达工程菌株的筛选

用电转化方法分别将重组表达载体 pGAPZαA - *LiP*、pGAPZαA - *MnP*、pGAPZαA - *gox*、pGAPZαA - *Lac* 和空载体 pGAPZαA 转化到毕赤氏酵母中,电转化液均匀涂布到 YPDS 培养基上,Zeocin 浓度为 100 mg/L,在平板上分别获得转化子。采用 24 孔板微培养抗性转化子,以酶活性为筛选指标,依据上述测定酶活方法等比例缩小反应体系为 200 μL,采用 96 孔板测定吸光度,筛选阳性转化子。木质素过氧化物酶工程菌株发酵 3 d,共筛选了 561 个转化子,筛选出酶活力较大且酶活稳定的 2 株工程菌株(表 1);锰过氧化物酶工程菌株发酵 3 d,共筛选了 632 个转化子,筛选出酶活力较大且酶活稳定的 5 株工程菌株(表 2);葡萄糖氧化酶发酵 3 d,共筛选了 731 个转化子,筛选出酶活力较大且酶活稳定的 2 株工程菌株(表 3);漆酶发酵 5 d,测定酶活,共筛选了 863 个转化子,筛选出酶活力较大且酶活稳定的 3 株工程菌株(表 4)。

表 1 重组菌株产生的木质素过氧化物酶的吸光度	
重组菌株编号	$D_{310nm}$
LiP1	0.369
LiP2	0.386
对照(空载体)	0

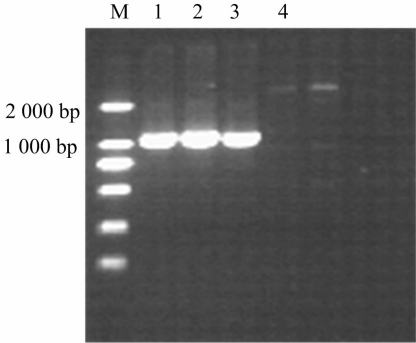
表 2 重组菌株产生的锰过氧化物酶的吸光度	
重组菌株编号	$D_{610nm}$
MnP1	0.268
MnP2	0.291
MnP3	0.278
MnP4	0.286
MnP5	0.276
对照(空载体)	0

表 3 重组菌株产生的葡萄糖氧化酶的吸光度	
重组菌株编号	$D_{615nm}$
GO1	0.310
GO2	0.326
对照(空载体)	0

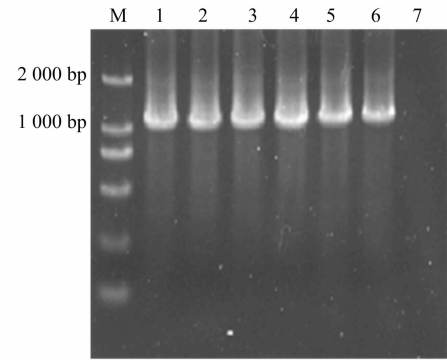
表 4 重组菌株产生的漆酶的吸光度	
重组菌株编号	$D_{420nm}$
Lac1	0.551
Lac2	0.526
Lac3	0.531
对照(空载体)	0

2.3 工程菌株的鉴定

筛选出的酶活较高的工程菌株经分离纯化后,用 PCR 方法对筛选得到的工程菌株进行鉴定,pGAPZαA - *LiP* 转化毕赤酵母 X-33 所得到的阳性转化子的 PCR 鉴定结果见图 2;pGAPZαA - *MnP* 转化毕赤酵母 X-33 所得阳性转化子的 PCR 鉴定结果见图 3;pGAPZαA - *gox* 转化毕赤酵母 X-33 所得阳性转化子的 PCR 鉴定结果见图 4;pGAPZαA - *Lac* 转化毕赤酵母 X-33 所得阳性转化子的 PCR 鉴定结果见图 5。



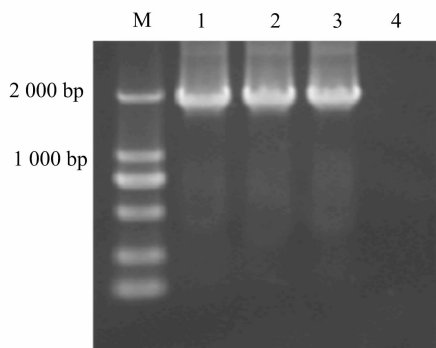
1~2—X-33作为受体菌的阳性克隆子; 3—阳性对照; 4—空质粒 pGAPZαA 作阴性对照  
图2 pGAPZαA-*LiP*转化毕赤酵母 X-33 所得到的阳性转化子的 PCR 鉴定结果



1~5—X-33 作为受体菌的阳性克隆子; 6—阳性对照; 7—空质粒 pGAPZαA作阴性对照  
图3 pGAPZαA-*MnP*转化毕赤酵母 X-33 所得到的阳性转化子的 PCR 鉴定结果

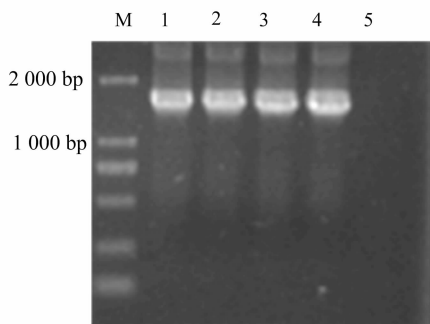
2.4 单一酶和复合酶对天然木质素的降解效果

玉米皮水溶性差,直接加入降解酶会影响酶的降解效果, $OH^-$ 能够减弱纤维素与半纤维素之间的氢键,并且皂化半纤维素与木质素分子之间的酯键,使木质素释放出玉米皮结构组织,因此应先将玉米皮用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液浸泡 24 h。将高酶活表达的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶基因的工程菌株发酵液于 4 000 r/min 离心,取上清液。将 4 种酶及转有空质粒的对照酵母菌株的上清液分别加入玉米皮上清液中,将 4 种酶的上清液等比例配



1、2—X-33 作为受体菌的阳性克隆子；3—阳性对照；  
4—空质粒 pGAPZαA 作阴性对照

图4 pGAPZαA-*gox* 转化毕赤酵母 X-33 所得到的  
阳性转化子的 PCR 鉴定结果



1~3—X-33 作为受体菌的阳性克隆子；4—阳性对照；  
5—空质粒 pGAPZαA 作阴性对照

图5 pGAPZαA-*Lac* 转化毕赤酵母 X-33 所得到的  
阳性转化子的 PCR 鉴定结果

合后也加入到玉米皮的上清液中,置于 30 ℃ 的恒温培养箱中降解木质素,用酶标仪在 280 nm 处测 0、6、12、18、24 h 的吸光度,吸光度的下降幅度表征木质素的降解量,详见图 6。根据木质素降解造成的吸光度递减数据可知,4 种酶均对木质素有一定的降解作用,其中木质素过氧化物酶、漆酶的降解活性高于锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶;木质素与过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、漆酶反应 24 h,  $D_{280\text{nm}}$  的降低幅度分别为 45%、39%、9%、57%,复合酶降解木质素的活性明显高于单一酶,  $D_{280\text{nm}}$  的降低幅度为 78%,说明复合酶增强了木质素的降解效率。

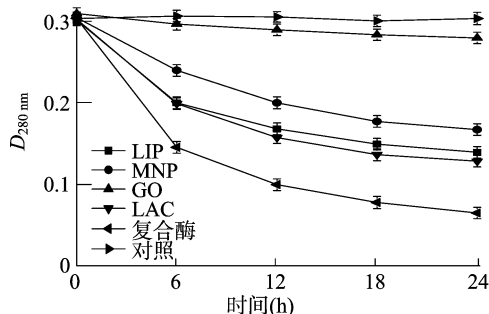


图6 酶降解木质素的吸光度变化

### 3 讨论

Raymond 报道用 *Pichia methanolica* 表达系统表达木质素

过氧化物酶,产生的蛋白量达到 500 mg/L<sup>[23]</sup>;国际上亦曾报道毕赤酵母中漆酶基因的最高酶活达到 11.5 U/mL<sup>[24]</sup>;关于锰过氧化物酶基因在 *Pichia pastoris* 中异源表达的报道较少,Gu 等在 2000 年发表的会议论文中报道,重组锰过氧化物酶的酶活力为 7 U/L<sup>[25]</sup>。目前,葡萄糖氧化酶的研究主要集中在来源于青霉和黑曲霉的基因,Whittington 等在酿酒酵母中成功表达了来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因<sup>[26-27]</sup>;母敬郁等采用瑞典木霉表达了黑曲霉来源的葡萄糖氧化酶基因<sup>[28]</sup>;国内外的研究人员也在毕赤酵母中成功表达了来源于青霉和黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因<sup>[29-30]</sup>。本研究采用 RT-PCR 方法克隆了黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 来源的木质素过氧化物酶基因 (*LiP*)、锰过氧化物酶基因 (*MnP*)、黑曲霉 (*Asperillus niger*) 来源的葡萄糖氧化酶基因 (*gox*) 及白腐真菌 (White Rot Fungi) 来源的漆酶基因 (*Lac*),氨基酸序列与 NCBI 报道的同源性达到 100%。

对于木质素降解酶的异源表达,研究人员尝试了不同的表达系统,包括昆虫杆状病毒表达系统、大肠杆菌表达系统、黑曲霉表达系统以及酵母表达系统<sup>[31]</sup>。结果表明,相比较而言木质素降解酶系在酵母中的表达比较成功。酿酒酵母是最早用于表达的酵母菌,但它有一定的局限性,因此科研人员将焦点转移到毕赤酵母上,毕赤酵母有其他表达系统不可比拟的优势,它既有原核生物易于培养、生长速度快、培养基廉价和试验过程简单等特点,而且有强有力的启动子,可对异源蛋白进行加工折叠和翻译后修饰,然后分泌到胞外,具有典型的真核生物表达体系的特点<sup>[32]</sup>。毕赤酵母表达系统表达量高,易于大规模培养,同时生产成本低,能进行蛋白质翻译后修饰,且生物安全性高,到目前为止已经有超过 500 种蛋白在毕赤酵母中得到了高效表达<sup>[33]</sup>。随着毕赤酵母基因测序工作的完成<sup>[34]</sup>,毕赤酵母的代谢调控信息会更加明晰,所以重组蛋白的毕赤酵母表达系统会得到进一步的发展。本研究分别构建了 4 种酶的毕赤酵母表达载体,转化宿主 X33,采用 24 孔板微培养转化子,再利用酶标仪测定酶活力,高酶活菌株再做 PCR 进一步确认,提高了筛选效率,建立了 1 种简单快速、高通量筛选方法,提高了异源蛋白在毕赤酵母中表达的效率。

本研究利用毕赤酵母成功分泌表达了漆酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和葡萄糖氧化酶,借鉴其他研究者酶活的测定方法,采用特定底物,都分别表现了各自的酶活性。与其他研究者不同的是,本研究采用了玉米皮作为底物,与 4 种酶的发酵液及其混合液反应,研究其发酵液对天然木质素的降解效果。试验结果显示,4 种酶对玉米皮中的木质素成分均有降解作用,而且复合酶的酶活水平比单一酶的酶活明显提高,降解效率提高了 2 倍左右。木质素降解酶系的协同作用,提高了木质素的降解效率,这在国内外相关研究中未见报道,为探索木质素酶解的新方法、新途径提供了一个全新思路。

### 参考文献:

- [1] Leonowicz A, Cho N S, Luterek J, et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin[J]. Journal of Basic Microbiol, 2001, 41 (3/4): 185-227.

- [2] Karels A E, Niemi A. Fish community responses to pulp and paper mill effluents at the southern Lake Saimaa, Finland[J]. Environmental Pollution, 2002, 116(2): 309–317.
- [3] 赵红霞, 杨建军, 詹勇. 白腐真菌在秸秆作物资源开发中的研究[J]. 饲料工业, 2002(11): 40–42.
- [4] Kersten P, Dan C. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Fungal Genetics and Basidiomycete, 2006, 44(2): 77–85.
- [5] 杨长军, 汪勤, 张光岳. 木质纤维素原料预处理技术研究进展[J]. 酿酒科技, 2008, 03(3): 85–89.
- [6] Dashtban M, Schraft H, Syed T A, et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin[J]. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 1(1): 36–50.
- [7] Xu C, Ma F, Zhang X, et al. Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(20): 10893–10898.
- [8] Qu Y, Wu D, Lan J, et al. High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(4): 483–490.
- [9] Strom P F. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(4): 906–913.
- [10] Kirk T K, Cullen D. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry[M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1997: 273–300.
- [11] 张辉, 戴传超, 朱奇, 等. 生物降解木质素研究新进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1780–1784.
- [12] 刘晨娟, 蔡皓, 李庆, 等. 桑粒肩天牛肠道木质纤维素分解细菌的分离和鉴定[J]. 化学与生物工程, 2010(7): 66–68, 91.
- [13] 任克宁, 张福元. 木质素酶及其生产菌株选育的研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2010(6): 36–39.
- [14] 许贺, 张莉力, 曹新民. 秸秆利用中白腐真菌的作用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 15172–15173.
- [15] 刘坤, 李会宣, 李敬. 白腐真菌菌株共培养降解玉米秸秆的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1327–1329.
- [16] 李春风, 王力生. 白腐真菌降解木质素酶系特性及其应用[J]. 现代农业科技, 2009(11): 274–275.
- [17] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(8): 2280–2284.
- [18] Kuwahara M, Glenn J K, Morgan M A, et al. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. FEBS Letters, 1984, 169(2): 247–250.
- [19] Keyser P, Kirk T K, Zeikus J G. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 135(3): 790–797.
- [20] Niladevi K N, Sukumaran R K, Jacob N, et al. Optimization of laccase production from a novel strain – *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology[J]. Microbiological Research, 2009, 164(1): 105–113.
- [21] Pazarlioglu N K, Sarişik M, Telefoncu A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(5): 1673–1678.
- [22] Tien M, Kirk T K. Lignin-Degrading enzyme from the hymenomycete *phanerochaete chrysosporium* burds [J]. Science, 1983, 221(4611): 661–663.
- [23] Raymond C K. Recombinant protein expression kit in *Pichia methanolica*[J]. Gene Expression Systems, 1999: 4–5.
- [24] Hong F, Meinander N Q, Jönsson L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 79(4): 438–449.
- [25] Gu L, Kelly C, Lajoie C. Cloning of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene (*MnP2*) into the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [C]//Wood and Cellulose: Building Blocks for Chemicals, Fuels and Advanced Materials. Syracuse, New York, USA: Second Annual Partnerships for Environmental Improvement and Economic Development Conference, 2000: 19–31.
- [26] Whittington H, Kerry-Williams S, Bidgood K, et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Genetics, 1990, 18(6): 531–536.
- [27] Frederick K R, Tung J, Emerick R S, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(7): 3793–3802.
- [28] 母敬郁, 王屹, 杨纯中, 等. 瑞氏木霉表达黑曲霉葡萄糖氧化酶[J]. 生物工程学报, 2006(1): 82–86.
- [29] 周亚凤, 张先恩, 刘虹, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在酵母中的高效表达[J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 400–405.
- [30] Crognale S, Pulci V, Brozzoli V, et al. Expression of penicillium variable P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(6): 1230–1235.
- [31] Jin F L, Xu X X, Yu X Q, et al. High-level expression of active recombinant ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase of *Drosophila melanogaster* in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2009, 65(2): 115–121.
- [32] Otterbein L, Record E S, Asther M, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1–937 and expression in *Pichia pastoris*[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(6): 1619–1625.
- [33] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249–270.
- [34] de Schutter K, Lin Y C, Tiels P, et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* [J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(6): 561–566.