包埋法固定双孢菇漆酶及其应用研究

刘新颖, 朱启忠, 赵春媛, 赵 垒

(山东大学威海分校 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘 要: 采用海藻酸钠包埋法固定双孢菇漆酶, 优化固定条件并研究了固定化酶酶学性质, 以及其在染料脱色方面的应用。结果表明: 最适固定条件为海藻酸钠 10 g/L, $CaCl_2$ 0.25 mol/L, 酶与海藻酸钠体积比为 1。相比于游离酶, 固定化酶的最适反应温度与保存温度和前者相同, 但固定化酶作用的温度范围更广, 且固定化酶提高了游离酶的热稳定性。固定化酶与游离酶相比更耐酸碱。对 8 种工业染料中 4 种染料脱色效果较为明显, 其中弱酸艳蓝 RAWL 的脱色率达 64.7%。固定化酶优化了游离酶的部分酶学性质, 并具有一定应用价值。

关键词: 漆酶; 海藻酸钠; 固定化; 染料脱色

中图分类号: S 646.1+9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)02-0151-03

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶, 它最早在日本紫胶漆树的渗出液中发现, 随后在许多昆虫和各种真菌, 甚至细菌中也发现[1]。漆酶按其来源主要分为漆树漆酶(Rhus laccase)和真菌漆酶(Fungal laccase)。不同来源的漆酶具有不同的催化性质, 即使是相同来源, 比如同一白腐菌菌种, 可分泌多种具有不同性质的漆酶组分, 包括氧化能力、酶蛋白分子量、最适 pH 值、底物的专一性等[2]。由于漆酶作用底物较为广泛, 且反应条件较为温和, 在生物技术和环境保护等方面具有较大的发展潜力。目前, 漆酶已尝试地被用于造纸木质素的处理、含酚工业废水和纺织染料废水的处理、环境中多环芳香化合物的降解、杀虫剂和农药的降解等[3]。但游离酶在使用过程中易随环境的变化而变性失活, 且不易从反应体系中分离达到重复使用的目的, 在一定程度上限制了漆酶的工业化应用[4]。

固定化酶是 20 世纪 60 年代发展起来的一项新技术。该技术除保留游离酶的优点外, 还具有游离酶无法媲美的优越性, 如可耐一定强度的酸、碱、热及有机溶剂, 能反复使用[5]。海藻酸钠又称褐藻酸钠, 是一类从褐藻类的细胞壁中提取出来的天然多糖, 主要化学成分为 α-D-甘露糖醛酸和 α-L-古洛糖醛酸。其亲水性极强, 溶于水后成为半透明的粘稠胶体溶液并带有腥味[6]。海藻酸钠具有很好的溶胶-凝胶特性和无毒性, 被广泛应用于工业、农业和医药等众多领域, 并显示出良好的应用前景。现对海藻酸钠固定化双孢菇漆酶进行研究, 以期为双孢菇漆酶的应用提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种: 菌株采自威海市玛珈山, 经分离纯化而得, 经鉴定为双孢菇, 并发现具有高产漆酶能力; 试剂: 邻联甲苯胺, 海藻酸钠(天津大茂化学试剂厂, 化学纯), 其它试剂均为化学纯或分析纯。供试染料由山东大学威海分校生化实验室提供; 仪器: 752E 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 酶液 培养 8 d 的液体培养基, 4 000 rpm 离心 15 min, 上清液即为粗酶液, 4 ℃保存备用。

1.2.2 包埋法制备固定化漆酶 取适量粗酶液加入等体积的 10 g/L 的海藻酸钠溶液, 搅拌均匀, 用 5 号注射器将混合液逐滴滴入到 0.25 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液中, 硬化 30 min, 用蒸馏水冲洗, 制得固定化漆酶, 于 4 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 染料最大吸收波长测定 用 752E 型紫外可见分光光度计扫描染料水溶液, 确定染料在 400~1 000 nm 内的最大吸收波长 λ_{max}。

1.2.4 染料脱色率测定 脱色体系中以 0.1 M、pH 4.6 醋酸缓冲溶液配制的待降解染料(0.1 g/L)4 mL, 最后加入适量固定化酶启动反应, 在 25 ℃下静置反应 1.5h 后, 测各染料在 λ_{max} 处的吸光值, 得到吸光值 A_1; 以染料溶液作对照, 用同样的方法测得其吸光值 A_0。则: 脱色率 r_D/% = $(A_0-A_1)/A_0$。

1.2.5 酶活力测定 游离酶活测定[7]: 0.1 mol/L、pH

第一作者简介: 刘新颖(1989-), 女, 山东曲阜人, 在读本科, 研究方向为酶工程。E-mail: k181521@126.com。

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 山东单县人, 教授, 硕士研究生导师, 现从事生物化学的教学与科研工作。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

基金项目: 山东大学威海分校科研资助项目(A09010)。

收稿日期: 2009-08-20

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4.6 的醋酸缓冲液 3.5 mL,加入 3.36 mmol/L 的邻联甲苯胺 0.5 mL,再加入适当稀释的粗酶液 0.5 mL,25 ℃保温 5 min,752E 型紫外可见分光光度计测 595 nm 处光密度(OD 值),酶活力以样品与底物反应 5 min 后光密度的改变值表示,以 1 min 光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位(U/mL)。固定化酶酶活测定:采用上述反应体系,取 0.5 g 固定化酶与底物混合,于室温下反应 30 min,上清液在 595 nm 处测光密度(OD 值),固定化酶的酶活以 1 g 载体的酶活力(U/g)表示。

相对酶活的计算以各自的最高酶活力为 100%。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠包埋法固定化漆酶的优化条件研究

2.1.1 海藻酸钠浓度　一定量的漆酶分别加入到等体积的浓度为 5、10、20、30、40 g/L 的海藻酸钠溶液中,制备固定化酶。试验中发现,当海藻酸钠的浓度为 5 g/L 时固定化酶酶活回收率最高,但制得载体的强度不高,很容易破碎,而 10 g/L 的海藻酸钠制得固定化酶的性能较好。

2.1.2 酶液与海藻酸钠体积比　其它条件不变,将酶液与 10 g/L 的海藻酸钠按 1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5 的比例混匀,制备固定化酶。结果表明,当酶液与海藻酸钠体积比为 1 时,固定化酶的回收率相对较高。

2.1.3 $CaCl_2$ 浓度　其它条件不变,将酶液与 10 g/L 的海藻酸钠以 1∶1 的比例混合,分别滴入到浓度为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液中,结果表明,当 $CaCl_2$ 浓度为 0.25 mol/L 时,制得载体强度较高,且固定化酶酶活回收率最高。

2.2 固定化酶的酶学性质研究

2.2.1 最适反应温度　在不同的温度下,分别测定游离酶与固定酶的酶活力,结果如图 1 所示。固定化酶与游离酶的最适反应温度均为 20 ℃,但固定化酶相比于游离酶更耐高温。

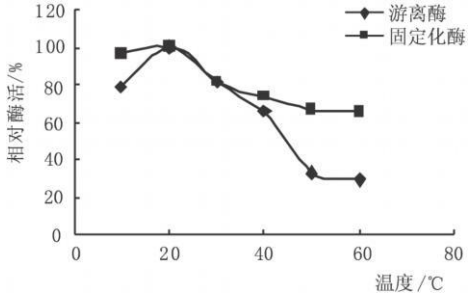

图 1　温度对游离酶和固定化酶活力的影响

2.2.2 最适反应 pH 值　在 20 ℃下,将等量的固定化酶分别放入 4 mL,pH 3.0~8.0 的缓冲体系中,分别测定游离酶与固定化酶的酶活力变化,结果如图 2 所示。结果表明,固定化酶与游离酶的最适反应 pH 值均为 5.0,但固定化酶较游离酶更耐酸碱。

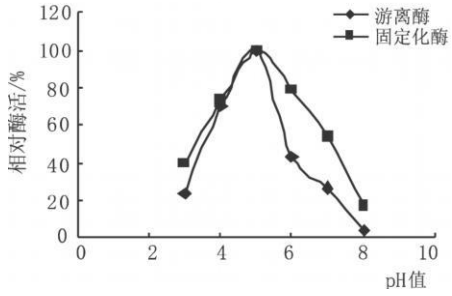

图 2　pH 值对游离酶和固定化酶活力的影响

2.2.3 固定化漆酶的热稳定性　在无底物的情况下,同时将保存于 4 mL,pH 4.6 的醋酸缓冲液中的游离酶与固定化酶于不同温度下保温 1.5 h 后,在室温下测定剩余酶活力,结果如图 3 所示。结果表明,游离酶与固定化酶均于低温下保存酶活损失较小,之后随温度升高,游离酶酶活迅速下降,固定化酶酶活在 40 ℃以后也开始下降,较之游离酶,固定化酶具有更宽的温度保存范围。

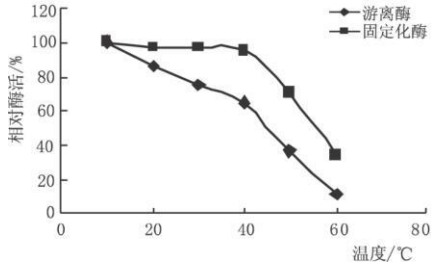

图 3　游离酶与固定化酶的热稳定性

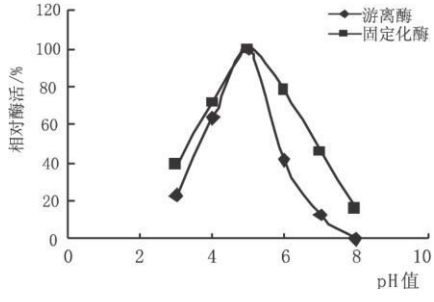

图 4　游离酶与固定化酶的 pH 值稳定性

2.2.4 固定化漆酶的最适保存 pH 值　在无底物情况下,将保存于不同 pH(3.0~8.0)的缓冲液的游离酶与固定化酶于室温下保温 1.5 h 后,测定剩余酶活力,结果如图 4 所示。游离酶与固定化酶的最适保存 pH 值均为 5.0,但后者承受酸碱的能力明显优于前者。

2.2.5 固定化酶的操作稳定性　在上述步骤所探讨的固定化酶的最优条件下,使固定化酶与适量的邻联甲苯

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胺进行反应,重复操作6次,结果如图5所示。可见当固定化酶重复利用3次,酶活回收率仍保持在40%以上。

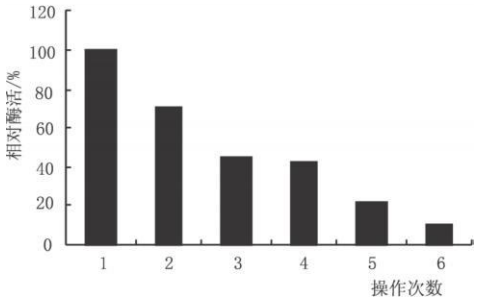

图5 固定化酶的操作稳定性

表1 8种染料的脱色率

染料	λmax	rD/%
弱酸艳蓝 RAWL	590	64.70211
活性红 M-3BE	540	3.607504
中性枣红 GRL	550	50.36593
中性深黄 GL	440	9.175314
弱酸艳红 B	540	3.649123
活性黄 M-3RE	430	8.627451
中性黑 BL	580	49.2268
分散蓝 2BLN	555	31.31991

2.3 固定化漆酶对染料脱色研究

将适量的固定化酶与8种工业染料混合,脱色1.5 h后,分别测定每种染料的脱色率,结果见表1。由表1可知,固定化漆酶对8种染料中4种有较好的脱色和降解能力,其中对弱酸艳蓝-RAWL脱色率达64.7%。对游离漆酶对染料的脱色探讨发现,漆酶固定化后对一些染料的脱色发生的变化,可能是因为固定化漆酶对染料的脱色不仅与漆酶本身的活力有关,还与染料的溶解度、进出载体的能力和载体对染料的吸附有关。

3 结论与讨论

海藻酸钠在自然界中资源丰富、价格低廉、化学性质稳定,该研究初步尝试了采用海藻酸钠凝胶包埋法固定双孢菇漆酶,确定最适固定条件为:10 g/L的海藻酸钠与等体积的酶液混合滴入至0.25 mol/L的$CaCl_2$溶液中,硬化0.5 h。对固定化漆酶的酶学性质研究结果表明,固定化酶相比于游离酶,具有更好的热稳定性,以及酸碱承受能力。通过对8种染料进行脱色研究,得知固定化漆酶具有较高的底物广泛性,且对弱酸艳蓝RAWL的脱色效果最为明显,脱色率达64.7%,具有一定的应用价值。

参考文献

[1] Bertrand T, Jolivalt C, Caminade E, et al. Acta CrystallogrD Biol[J]. Crystallogr, 2002, 58: 319-321.

[2] Bollag J M, Leonowicz A. Comparative studies of Extracelluar Fungal Laccase[J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 48(4): 849.

[3] Collp M, Femandez-abalosj M, Villanuevaj R, et al. Purification and characterization of a phenoloxidase from the lignindegrading Basidiomycete PM1[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(8): 2607-2613.

[4] 高千千,朱启忠,杨志国,等.改良壳聚糖固定化真菌漆酶的研究[J].北方园艺,2009(5):31-34.

[5] 朱惠莉,黎锡流.糖化酶的固定化研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27(6):75-78.

[6] 支巨振,邓光联,颜启传.农作物种子检验规程实施指南[M].北京:中国标准出版社,2000.

[7] 张伟,杨秀山.酶的固定化技术及应用[J].自然杂志,2000,22(5):282-286.

Immobilization of Laccase from *Agaricus bisporus* in Alginate Gel and its Application

LIU Xin-ying, ZHU Qi-zhong, ZHAO Chun-yuan, ZHAO Lei
(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

Abstract: The gel sodium alginate as carrier was used to immobilize laccase from *Agaricus bisporus*, optimizing immobilization conditions and study the character of the immobilized enzyme and its application value in deccolorization. The result showed that best immobilization conditions was alginate 10 g/L, $CaCl_2$ 0.25 mol/L, the volume ration of laccase with alginate was the best reacting temperature and saving temperature of the immobilized enzyme were same with the free enzyme. But, the reaction range of the temperature was wider. The thermal stability was also increased. Compared with free enzyme, the immobilized enzyme can adapt to more acidic and alkaline environment. The reaction with eight commercal dyes showed that four dyes can be obviously degraded by the laccase. The decolorization rate of the weak acid brilliant blue RAWL can reach 64.7%. The immobilized laccse from *Agaricus bisporus* optimized the enzymatic properties, so the immobilized enzyme had a certain industrial applications.

Key words: laccase; alginate; immobilization; decolorization

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net