

红芝组成型漆酶酶学性质的研究

赵亮亮^{1,2}, 谌斌^{1,2}, 李燕荣³, 孙秋芳^{1,2}, 冯志菊^{1,2}

(1. 广西环境工程与保护评价重点实验室, 广西 桂林 541004; 2. 广西师范大学 环境与资源学院, 广西 桂林 541004;

3. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 研究了温度、pH 值、金属离子和抑制剂对红芝漆酶活性和稳定性的影响, 测定该漆酶的 K_m 值和 V_{max} 。结果表明: 红芝漆酶最适反应温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 低于 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时较稳定; 最适 pH 值为 3.0, 在 pH 2.5~4.0 的范围表现出较强的稳定性; Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活有促进作用, 而 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 和抑制剂 EDTA、DMSO、SDS 对酶活有抑制作用; 以愈创木酚为底物时 K_m 值为 0.13 mmol/L , 最大反应速率 V_{max} 为 $234\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

关键词: 红芝; 漆酶; 组成型; 酶学性质

中图分类号: Q 55 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)05-0138-03

红芝 (*Ganoderma lucidum*), 隶属真菌门 (Eumycota) 担子菌纲 (Basidiomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 多孔菌科 (Polyporaceae), 灵芝属 (*Ganoderma*), 又称赤芝是一种珍贵的药用真菌^[1]。

漆酶 (Laccase) 是一种含铜的多酚氧化酶, 属于蓝色氧化酶家族成员^[2], 具有广泛的作用底物, 是重要的木质纤维降解酶之一^[3]。在自然界中广泛分布于真菌中, 尤其是担子菌中^[4]。真菌漆酶根据其生成方式的不同, 可分为组成型和诱导型 2 种, 组成型漆酶的合成贯穿于菌体生长各个阶段, 其合成量较少受诱导物影响, 在工业生产及应用中具有工艺简单和产酶稳定等优点^[5]。真菌漆酶的应用涉及生物、化学、物理、医学、环境等多个学科, 在造纸、纺织、食品、环保、新能源开发等诸多领域具有潜在的应用价值, 成为近年来倍受关注的环境友好材料^[6]。现对红芝组成型漆酶进行分离提取, 并对其酶学性质进行研究。

1 材料与实验方法

1.1 试验材料

红芝 (*Ganoderma lucidum*), 广西师范大学微生物研究所保藏菌种。培养基: 菌种保藏培养基: PDA 培

养基。种子培养基: 土豆 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, VB_1 0.01 g/L, pH 4.0 加玻璃珠。固态发酵培养基: 甘蔗渣 55.8%, 麸皮 37.2%, 葡萄糖 0.5%, 硫酸铵 5%, CaCl_2 0.48%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, CuSO_4 0.02% pH 4.0 含水率 70%。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养与粗酶液提取 将菌株接种到 PDA 平板进行活化, 待铺满平板后打孔, 接种到种子培养基 100 mL (250 mL 三角瓶), $28\text{ }^\circ\text{C}$, 120 rpm, 振荡培养 5~6 d 制得种子液, 然后按 10% 的接种量转接到固态发酵培养基 50 g (1 000 mL 三角瓶), $28\text{ }^\circ\text{C}$, 静置培养 8 d。将制得的酶曲加水 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡过夜, 过滤, 冷冻离心得到上清液, 即为粗酶液。

1.2.2 酶粉的制备 先将 40% 的硫酸铵缓慢加入酶液中, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中静置过夜, 离心除去杂蛋白, 继续添加硫酸铵至饱和度为 75%, 再置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中静置过夜, 离心去上清液, 即得酶泥, 加入适量可溶性淀粉助剂, 冷冻干燥, 即得酶粉, $0\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏, 试验时将酶粉用缓冲液稀释成酶液。

1.2.3 酶活测定 测定方法参考文献 [7] 略作修改: 以愈创木酚为底物, 取 4 mL 含有 1 mmol/L 愈创木酚的 50 mmol/L 琥珀酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 4.5), 加入 1 mL 酶样液, 混合均匀后于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 30 min, 测 OD_{466} 值。对照管中加 4 mL 不含底物的上述缓冲液和 1 mL 酶样液。定义 1 min 内转化 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 底物所需的酶量为一个酶活力单位 (U/mL)。

$$\text{漆酶活力 (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_1 \times 10^6}{\Delta t \times \epsilon \times V_2} \times N,$$

$$\epsilon_{466} (\text{愈创木酚}) = 1.21 \times 10^4 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}).$$

第一作者简介: 赵亮亮 (1983-), 男, 硕士, 研究方向为真菌资源开发。E-mail: liangzhao332@163.com。

通讯作者: 谌斌 (1967-), 男, 博士, 副研究员, 现主要从事英国光源开发方面研究工作。E-mail: binchen1967cn@126.com。

基金项目: 广西环境工程与保护评价重点实验室基金资助项目 (桂科能 0702Z022); 广西环境工程与保护评价重点实验室平台建设资助项目 [桂教科研 (2008) 27 号]; 广西研究生教育创新计划资助项目 (2009106020830M66)。

收稿日期: 2009-11-20

Δt -酶反应时间(min); ΔOD -吸光度的变化值; V_1 -酶反应中, 反应液的总体积; V_2 -酶反应中, 酶液的体积(mL); N -酶液稀释倍数。

1.2.4 最适反应温度 分别在 25~70℃水浴条件下进行酶解反应, 按标准方法测定酶活, 以酶活最高者为 100%, 相对酶活对温度作图。

1.2.5 热稳定性 将稀释过的酶液放入上述一系列温度下保温 1 h, 然后测定剩余酶活力, 以保温前的酶活力为 100%, 剩余相对酶活力对温度作图。

1.2.6 最适反应 pH 值 选择不同 pH 值(2.5~6.0)的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 于最适温度条件下进行酶解反应。以酶活力最高者为 100%, 相对酶活力对 pH 值作图。

1.2.7 pH 值稳定性 将酶液置于上述一系列不同 pH 值的缓冲液中, 25℃条件下保温 2 h, 然后测定剩余酶活力, 以处理前的酶活力为 100%, 剩余相对酶活力对 pH 值作图。

1.2.8 金属离子对酶活力的影响 用 pH 3.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制浓度为 5 mmol/L 的不同金属离子溶液, 将酶液加入到上述金属盐溶液中, 使金属离子终浓度为 2 mmol/L, 立即进行酶解反应, 按标准方法测定酶活力, 以未添加金属离子的酶液作对照。

1.2.9 抑制剂对酶活力的影响 在酶液中分别添加不同的抑制剂, 使其终浓度为 2 mmol/L, 按标准方法测定剩余酶活力, 以未添加抑制剂的酶液作对照。

1.2.10 动力学参数测定 在 30℃、50 mmol/L、pH 4.5 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中酶液与不同浓度愈创木酚反应。Lineweaver-Burk 双倒数作图, 计算 K_m 、 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 温度对酶活力的影响

不同温度下测得的酶活力见图 1, 以愈创木酚为底物时, 该酶的最适反应温度为 60℃, 当温度低于 60℃时, 酶活随着温度的升高而增大, 当温度高于 60℃时, 酶活迅速下降, 可能是由于高温导致酶的失活。

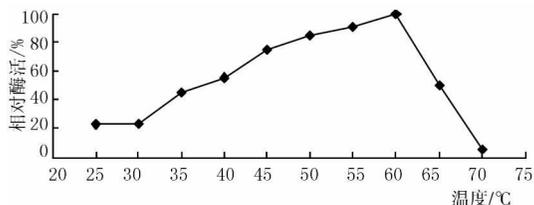


图 1 温度对酶活力的影响

2.2 漆酶的热稳定性

该酶在 50℃以下具有较好的热稳定性(见图 2), 当温度为 60℃时酶失活过半, 70℃时剩余酶活几乎为 0。

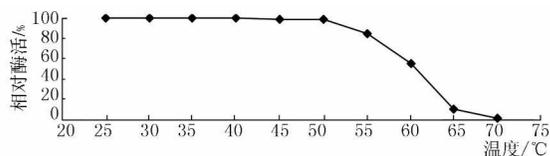


图 2 漆酶的热稳定性

2.3 pH 值对酶活力的影响

由图 3 可知, 该漆酶的最适反应 pH 值为 3.0, 在 pH 值 2.5~4.0 范围内, 相对酶活均在 86%以上, 当 pH 值大于 4.5 时, 酶活迅速下降, 说明该酶在酸性条件下具有较高的酶活。

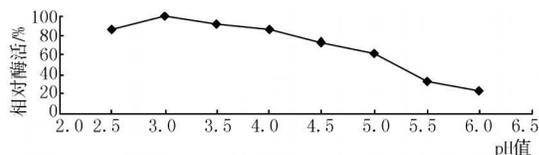


图 3 pH 值对酶活力的影响

2.4 漆酶的 pH 值稳定性

该漆酶在 pH 2.5~4.5 范围内能维持较高的酶活(见图 4), 剩余酶活均在 76%以上, 当 pH 值超过 4.5 时酶活迅速下降, 表明该酶具有耐酸性。

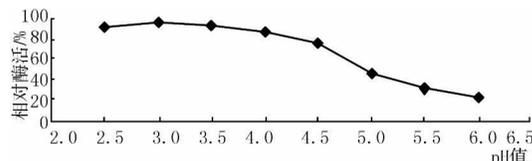


图 4 漆酶的 pH 值稳定性

2.5 金属离子对酶活力的影响

从表 1 可以看出, 金属离子对该漆酶酶活力的影响差别较大。Cu²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 对该酶酶活力有促进作用, 其中 Cu²⁺、Mn²⁺ 的促进作用较大, 其相对酶活提高到 130%以上, 而 Mg²⁺ 对酶活的影响不大, 略有促进作用; Cr³⁺、Hg²⁺、Fe²⁺ 对酶活力有明显的抑制作用, 其中 Fe²⁺ 的抑制作用最强, 使酶活力完全损失, 这与 Murugesan 研究结果一致^[8]; 王习文等^[9] 研究指出 Cu²⁺ 对漆酶的激活作用是通过与漆酶活性部位周围的酸性氨基酸残基中的游离 ω-羧基阴离子结合, 从而影响漆酶分子的电荷分布及电子传递来影响漆酶活性的。同时朱显峰等^[10] 研究了 Cr³⁺、Hg²⁺、Fe²⁺ 对酶的抑制作用是因为这些金属离子占据漆酶的活性中心, 改变酶的构象, 从而使酶失去催化活性。也有研究表明 Fe²⁺ 是通过与底物催化产物反应影响了漆酶的活性, 而且这种抑制作用是暂时的当 Fe²⁺ 全部氧化成 Fe³⁺ 时, 漆酶的催化活性

表 1 不同的金属离子对酶活的影响

金属离子	对照	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺	Hg ²⁺	Cr ³⁺
相对酶活/%	100	140	137	108	96	0	20.3	40

又会恢复^[11]。

总之,这3种离子对酶的活性均有毒害作用,在漆酶应用时应避免加入这些离子。其它金属离子对漆酶作用的分子机理有待进一步深入研究。

2.6 抑制剂对酶活力的影响

由表2可知,EDTA、DMSO、SDS对该漆酶都具有较强的抑制作用,酶活力几乎下降一半。有研究表明,EDTA是与金属离子形成配合物,使漆酶失去金属辅助因子而失活,而且这种失活是不可逆失活^[2]。DMSO、SDS对漆酶抑制作用的机理有待进一步研究。

表 2 抑制剂对酶活的影响

抑制剂	对照	EDTA	DMSO	SDS
相对酶活/%	100	58	56.8	57

2.7 漆酶的动力学参数

以愈创木酚作底物, Lineweaver-Burk 作图法得到的米氏方程 $y=0.5532x+4.2671$ (见图5), 从该方程计算出漆酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 分别为 0.13 mmol/L 和 $234 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。该漆酶的 K_m 较低, 说明该酶对底物愈创木酚的亲合性较高。

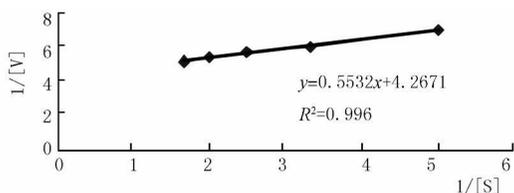


图 5 Lineweaver-Burk 作图法得到的米氏方程

3 结论

该研究结果表明,该酶具有耐热、耐酸的特点,最适

反应温度为 60°C , 低于 50°C 时较稳定, 最适 pH 值为 3.0, 在 pH 2.5~4.0 的范围表现出较强的稳定性, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活力有较强的促进作用, Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活力有较强的抑制作用, 其中 Fe^{2+} 可使该漆酶完全失活, EDTA、DMSO、SDS 对漆酶活力的抑制作用较大, 使酶活力几乎下降一半; 以愈创木酚作底物时该酶的 K_m 值为 0.13 mmol/L , 最大反应速率 V_{max} 为 $234 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 陈秀炳, 陈丹灿, 肖方道. 红芝的特性及栽培技术研究[J]. 福建林业科技, 1995, 16(1): 27-29.
- [2] Shleeve S, Nikitina O, Christenson A, et al. Characterization of two new multifunctional forms of *Trametes pubescens* laccase[J]. Bioorg Chem, 2007, 35(1): 35-49.
- [3] 王方忠, 朱启忠, 董学卫, 等. 香菇漆酶的纯化及部分性质研究[J]. 北方园艺, 2008(6): 36-38.
- [4] Lithauer D, van Vuuren M J, van Tonder A, et al. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108)[J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 40(4): 563-568.
- [5] 谢斌, 赵亮亮, 聂小琦, 等. 组成型漆酶高产菌株的筛选及其产酶条件研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2009, 27(2): 76-79.
- [6] 钲亚鹏, 钱世钧. 真菌漆酶及其应用[J]. 生物工程进展, 2001, 21(5): 23-28.
- [7] 王剑锋, 王璋, 饶军, 等. 烟管菌漆酶的分离纯化及部分酶学性质研究[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 297-308.
- [8] Murugesan K, Kim Y M, Jeon J R, et al. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum* [J]. J Hazard Mater, 2009, 168(1): 523-529.
- [9] 王习文, 詹怀宇, 何为. 铜(II)对漆酶活性的影响[J]. 纸和造纸, 2003(4): 43-44.
- [10] 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): 50-54.
- [11] 陈维新. 过渡金属离子对漆酶催化活性的影响[J]. 分析测试学报, 2004, 23(4): 78-80.
- [12] 金春德, 王进, 吴薇, 等. 金属离子和乙二胺四乙酸对漆酶活化竹材产生活性氧类自由基的影响[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(12): 26-27.

Enzymology Characteristics of Constitutive-Form Laccase Derived from *Ganoderma lucidum*

ZHAO Liang-liang^{1,2}, CHEN Bin^{1,2}, LI Yan-rong³, SUN Qiu-fang^{1,2}, FENG Zhi-ju^{1,2}

(1. Guangxi Key Lab of Environmental Engineering and Protection and Assessment, Guilin, Guangxi 541004; 2. College of Environment and Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 3. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The effect of temperature, pH, inorganic ion and inhibitor on *Ganoderma lucidum* laccase activity and stability was studied. Meanwhile, the K_m and V_{max} were measured. The result showed that the optimal temperature and optimal pH of laccase reaction were at 60°C and pH 3.0, the laccase showed higher stability when temperature was not higher than 50°C , and the laccase was kept strongly active when pH ranged from 2.5 to 4.0. The laccase was activated by Cu^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} , and its activity was obviously inhibited by Cr^{3+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} and inhibitor. The K_m and V_{max} of laccase were 0.13 mmol/L and $234 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ respectively with guaiacol as substrate.

Key words: *Ganoderma lucidum*; laccase; constitutive; enzymology characteristics