

香菇漆酶的纯化及部分性质研究

王方忠, 朱启忠, 董学卫, 林金飞, 曲悦文, 徐国英

(山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 对香菇漆酶进行了丙酮分级沉降、半透膜透析、DEAE—纤维素及 Sephadex G100 柱层析纯化, 并研究了漆酶的产酶曲线及酶作用最适条件。结果表明: 在该培养条件下, 香菇第 10 天达产酶高峰, 峰值酶活为 216 U/mL, 酶作用的最适 pH 值为 3.6, 在 pH 值 3.6~4.6 有较强的稳定性。最适酶解温度为 30℃, Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 对香菇漆酶有激活作用, 而 Ag^{+} 、 Fe^{3+} 则能明显抑制漆酶活性, 其它离子影响相对较小。以邻联甲苯胺为底物的表观 K_m 值为 1.68 mmol/L。

关键词: 香菇; 漆酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号: S 646.1⁺ 2; Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0036-03

木质素(Lignin)是一种高度复杂、不定形的芳香族化合物,是仅次于纤维素的第二大再生有机资源。木质素的降解非常困难,大多数生物不能直接利用,因而造成这一自然资源的巨大浪费。同时,木质素的降解及其相关酶类在造纸工业和环保等方面都具有重大意义。因此木质素降解及相关酶类的研究已经成为人们关注的重要课题之一。

漆酶(Laccase, 苯二酚氧化还原酶)是一种含铜多酚氧化酶^[1],因能降解木素,使苯氧基类除草剂、工业废水去除毒性。近年来,在造纸、饮料加工、环保等方面得到广泛的研究和应用^[2]。近些年国内对香菇(*Lentinus edodes*)漆酶有简要报道,但未进行较细致和深入研究。现在对该菌产酶条件研究的基础上,对胞外漆酶进行了纯化,并对部分性质进行了研究,以便为木质素降解和筛选产漆酶菌种提供一定的科学依据,同时为漆酶在造纸工业和环保工业上的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 香菇采自威海野外经分离纯化而得,培养鉴定为香菇,测定发现具有较高的漆酶活性。

1.1.2 试剂 邻联甲苯胺(分析纯),上海化学试剂总厂生产 DEAE—纤维素, Sephadex G 100, 为 Pharmacia 公司产品;牛血清蛋白为进口分装(电泳纯);其它均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 722E 型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂), SL—II 数控层析冷柜,全自动高速冷冻离心机

(Cole—Parmer 公司), HL—2 型恒流泵, TH—250 梯度混合器, BS—100A 型自动部分收集器, pH—3C 精密酸度计。

1.1.4 培养基 经筛选,适合香菇产胞外漆酶的培养基成分如下:马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, VB_1 0.01 g/L, 0.5% 的酵母膏。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 250 mL 三角瓶装液体培养基 50 mL, 灭菌后接入 7 日龄用打孔器打成的 10 mm 菌片(PDA 固体培养基培养;1.1.4 中的培养基去掉酵母膏,加入琼脂 20 g/L)2 片, 130 r/min, 28℃ 恒温振荡培养 10 d。

1.2.2 粗酶液制备 按文献^[3]进行。

1.2.3 漆酶的纯化 ①55% 饱和度的丙酮进行沉淀, 于 4℃、10 000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀。于上清液中加入终浓度 75% 饱和度的丙酮进行分级沉淀, 于 4℃、10 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 4℃ 过夜, 沉淀用 0.2 mol/L pH 4.0 醋酸盐缓冲液溶解; ②透析: 将经①处理的酶液装入透析袋 66.7 mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液透析 48 h, 中间换水 3 次; ③DEAE—纤维素离子交换层析(1.5 cm×40 cm): 处理后的 DEAE 纤维素装柱后用缓冲液(pH 6.0)平衡过夜, 加经透析且适当浓缩的酶液 3 mL, 用 100 mL 66.7 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)洗脱后, 再用磷酸缓冲液配制的 0~1 M NaCl 进行梯度洗脱, 流速 20 mL/min, 对收集液同时进行可溶性蛋白质浓度和漆酶活力的测定, 将有漆酶活性部分分步收集起来。④Sephadex G 100 柱层析(1.5 cm×75 cm): 66.7 mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液洗脱, 洗脱速度 15 mL/h, 每管 3 mL, 对收集液同时进行可溶性蛋白质浓度和漆酶活力的测定, 收集有酶活部分。柱层析过程中用核酸蛋白检测仪检测 280 nm 处光吸收。

1.2.4 蛋白质测定 考马斯亮兰法^[4], 牛血清蛋白作标

第一作者简介: 王方忠(1986-), 男, 本科, 现从事酶工程研究工作。E-mail: wangshenwu@163.com。

通讯作者: 朱启忠。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

收稿日期: 2007-12-23

准曲线。

1.2.5 酶活性测定 参照文献^[3]：于 0.2 mol/L pH 4.0 的醋酸缓冲液 3.5 mL 中加入 3.36×10^{-3} mol/L 的邻联甲苯胺 0.5 mL，再加入适当稀释的酶液 0.5 mL，25℃反应 5 min 后于 595 nm 处比色。以每分钟使 OD 595 增加 0.01 为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 漆酶产酶曲线

由图 1 可以看出，漆酶从第 5 天酶活迅速提高，第 10 天达产酶高峰，且从第 5 天到第 13 天酶活均维持在较高水平上。

2.2 香菇胞外漆酶的纯化

酶液经 DEAE—纤维素离子柱层析时，在用 100 mL 66.7 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 洗脱时有一酶活峰出现，命名为 lac1，后用磷酸缓冲液配制的 0~1 M NaCl 进行梯度洗脱，又出现一很高的漆酶酶活峰，命名为 lac2。

表 1 漆酶分离纯化结果					
纯化步骤	总酶活 /IU	总蛋白 /mg	比活 /IU·mg ⁻¹	提纯 倍数	得率 /%
粗酶液	32 074	138.55	231		
丙酮分级沉淀	29 718	54.79	542	2.34	93
透析	26 374	38.47	685	2.96	82
DEAE—纤维素离子柱层析					
lac1	4 682	1.50	3 113	13.50	14.6
lac2	14 529	8.32	1 747	7.60	45.3
Sephadex G100 柱层析					
lac1	2 662	0.6	4 392	18.97	8.3
lac2	8 659	2.65	3 294	14.22	27

2.3 酶的特性

2.3.1 漆酶作用的最适 pH 值 由表 2 可以看出在醋酸缓冲液中，香菇漆酶最适酶解 pH 为 3.6，与秦小琼等^[9]报道的红栓菌漆酶最适 pH 为 4.0 有所差别。经

查阅资料^[5]发现不同来源的漆酶其最适 pH 值确有差别，这说明不同来源漆酶虽能作用于同一底物，但酶的组成、结构可能有所差异，可能不同菌株间也有差异。

表 2 pH 值对漆酶酶解活力的影响

pH 值	酶活(OD)
2.6	0.015
3.0	0.27
3.6	0.39
4.0	0.37
4.4	0.29
4.6	0.16
4.8	0.08
5.2	0.027

表 3 漆酶的 pH 稳定性

pH 值	剩余酶活率/%
2.6	33
3.0	52
3.6	68
4.0	84
4.4	97
4.6	68
4.8	56
5.2	51

2.3.2 漆酶作用的 pH 稳定性 将粗酶液分别置于 pH (2.6、3.0、3.6、4.0、4.4、4.8、5.2) 缓冲液中，保持 6 h 后，再测其剩余酶活力。以最初所测酶活力为对照 (100%)，剩余酶活率(%)=(各 pH 条件下的剩余酶活力/最初酶活力)×100%，结果表明：漆酶在 pH 3.6~4.6 比较稳定，残余酶活保持在 60% 以上，由此表明此酶是耐酸性酶(在酸性条件下比较稳定)。

2.3.3 温度对漆酶活力的影响 由图 2 可见，温度对漆酶酶解的影响较大，在试验条件下最适酶解温度为 30℃，和其它报道相比略低，可能是不同菌株之间有所差异。

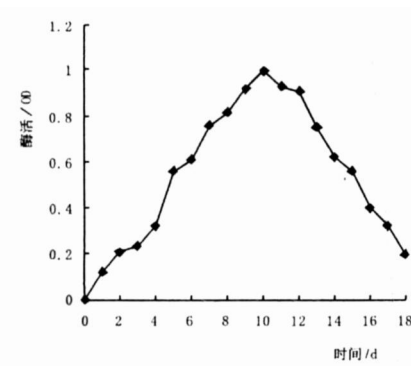


图 1 香菇漆酶的产酶曲线

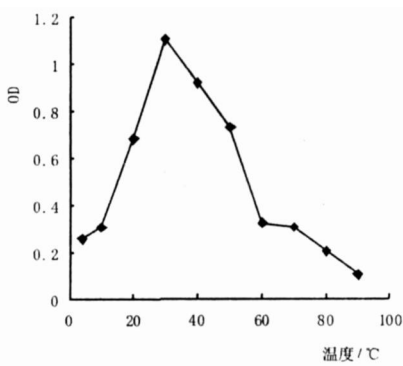


图 2 温度对漆酶活性的影响

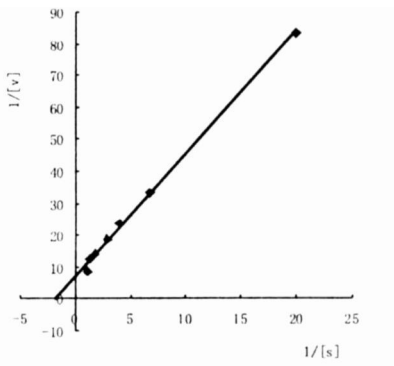


图 3 漆酶的动力学曲线

2.3.4 无机离子对酶解活性的影响 当酶反应液内盐浓度为 0.15 g/L 时，Ba²⁺、Cu²⁺ 对香菇漆酶有激活作用，

而 Ag⁺、Fe³⁺ 则能明显抑制漆酶活性，其它离子影响相对较小(表 4)。

表 4 无机离子对香菇胞外漆酶活力的影响

试剂(0.15g/L)	lac1 相对活性/%	试剂(0.15g/L)	lac1 相对活性/%
H ₂ O	100	ZnCl ₂	99
NaCl	93	CuSO ₄	126
KCl	91	MnSO ₄	95
CaCl ₂	91	MnCl ₂	91
FeCl ₃	83	AgNO ₃	58
BaCl ₂	108	K ₂ SO ₄	102
Na ₂ SO ₄	89	KNO ₃	107
MgSO ₄	95		

2.3.5 酶液保存温度与漆酶酶活 酶液分别在 4、10、20、30、40、50、60、70、80 和 90℃水浴中保温 30 min, 按 1.2.5法测定漆酶活性, 结果见表 5。由表 5 可以看出酶液在 50℃以下短暂保温对酶活影响较小, 温度进一步提升至 60℃则酶活会严重受影响。如提升到 70℃酶活仅为原酶活的 0.04%。80℃时, 已基本上测不到酶活, 90℃时酶已完全没有活性。

表 5 酶液保存温度与漆酶活性的关系

温度/℃	酶活/(OD)	温度/℃	酶活/(OD)
4	0.95	50	0.79
10	0.96	60	0.29
20	0.97	70	0.04
30	0.98	80	0.03
40	0.86	90	0.00

2.3.6 底物浓度对酶活的影响及酶的表现 Km 值 以邻联甲苯胺为底物, 浓度范围分别为 0.07、0.15、0.25、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 将不同浓度的底物分别与酶液反应, 测其酶促反应速率, 所得结果用 Lineweaver-Burk 作图法进行漆酶表现 Km 值测定。香菇的表现 Km 值为 1.68mmol/L。

3 小结

香菇产生的漆酶在 1.2.1 培养条件下, 第 10 天达产酶高峰, 峰值酶活为 216 U/mL。

香菇漆酶的分离纯化试验表明: 粗漆酶样品依次经过丙酮分级沉降、DEAE-纤维素柱层析 Sephadex G100 凝胶过滤, 得 2 种漆酶同工酶, 分别命名为 lac1 和 lac2。lac1 被纯化了 18.97 倍 比活力达 4 392 U/mg 酶活回收率 8.3%。lac2 被纯化了 14.22 倍, 比活力达 3 294 U/mg酶活回收率 27%。

香菇漆酶的最适反应温度为 30℃ 最适 pH 3.6 在 pH 3.6~4.6 内保存, 酶仍保持 60%以上的酶活, 这表明酶可应用于酸性的环境中, Ba²⁺、Cu²⁺ 对香菇漆酶有激活作用, 而 Ag⁺、Fe³⁺ 则能明显抑制漆酶活性。所以利用漆酶进行木素降解时要考虑到反应液中是否存在金属离子及存在何种金属离子。

参考文献

[1] Eggert C, Temp U, Eriksson K E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase[J]. Appl. Environ. Microbiol Apr 1996, 62(4): 1151-1158.
[2] 张敏, 肖亚中, 龚为民. 真菌漆酶的结构与功能[J]. 生物学杂志, 2003, 20(5): 6-8.
[3] 王宜磊, 邓振旭, 朱陶, 等. 彩绒革盖菌 CV-8 漆酶活性的初步研究[J]. 微生物学杂志, 1998 18(4): 60-62.
[4] 朱启忠. 生物化学技术指南 M]. 新疆科技卫生出版社, 1995: 36-37.
[5] 秦小琼, 傅庭治, 曹幼琴, 等. 红栓菌胞外漆酶的诱导、纯化及部分特性研究[J]. 微生物学报, 1996 36(5): 360-366.
[6] 朱启忠, 赵宏, 韩晓弟, 等. 彩绒革盖菌 CV28 胞外漆酶的诱导纯化及部分性质研究[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 13-15.

Purification and Partial Characterzation of Laccase from *Lentinus edodes*

WANG Fang-zhong, ZHU Qi-zhong, DONG Xue-wei, LIN Jin-fei, QU Yue-wen, XU Guo-ying
(Dept. of Marine Biology, Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

Abstract: The laccase of *Lentinus edodes* was purified by classification deposition of acetone, dialyzed by semipermeable membrane, DEAE-Cellulose ion exchange and Sephadex G100 column chromatography. The curve of laccase production and optimal condation of laccase reaction were also studied. The results showed that *Lentinus edodes* came the laccase production peak which was 216 U/mL at the 10 day in this culture condition. The optimal temperature and optimal pH of laccase reaction were at 30℃ and pH 3.6. The laccase was kept strongly active when pH ranged from 3.6 to 4.6. Ba²⁺、Cu²⁺ increased laccase activity whereas Ag⁺、Fe³⁺ obviously inhibited it. The form view Km of laccase was 1.68 mmol/L with o-Tolidine as substrate.

Key words: *Lentinusedodes*; Laccase; Purification; Enzymological properties