

# 香菇漆酶同工酶的部分酶学性质的研究

王方忠, 朱启忠, 董学卫, 林金飞, 曲悦文, 顾文辉

(山东大学 威海分校海洋学院 山东 威海 264209)

**摘要:** 通过丙酮分级沉淀、DEAE-纤维素离子柱层析和Sephadex G100 柱层析得到两种香菇漆酶同工酶, 分别命名为 lac1 和 lac2, 并对其理化性质进行了研究。考察了香菇漆酶同工酶最适反应温度和 pH 值、热稳定性和 pH 值稳定性、反应动力学常数以及金属离子对酶活的影响。试验结果表明: Lac1、lac2 最适作用温度都为 30℃, 在不低于 40℃的条件下保存 30 min, lac1 残余酶活在 60%以上, lac2 在不低于 60℃有较高热稳定性, 残余酶活在 80%以上。最适 pH 值, lac1 为 3.6, lac2 为 4.0。pH 值 3.0~4.8, lac1 有较强稳定性, 在 pH 值 4.0~4.6 lac2 有较强的稳定性。以邻联甲苯胺为底物 lac1 和 lac2 的  $K_m$  分别为 0.964 mmol/L 和 1.38 mmol/L。金属离子  $Cl^-$  对 lac1 有激活作用,  $Ag^+$ 、 $Mn^{2+}$  对 lac1 有抑制作用。金属离子  $Ba^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  对 lac2 有激活作用,  $Fe^{3+}$ 、 $Cl^-$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Mn^{2+}$  对 lac2 有抑制作用。

**关键词:** 同工酶; 香菇; 酶学性质

**中图分类号:** Q 949.329; Q 814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)07-0219-03

漆酶(对苯二酚: 氧气氧化还原酶 E.C. 1.10.3.2)是一种多铜酶, 它是蓝色氧化酶家族中的一员。现在已经在植物、真菌、昆虫和细菌中发现具有漆酶活性的多铜氧化酶, 并且主要见于真菌。不同来源的真菌漆酶, 在分子量、对温度和 pH 的适应性以及耐受能力、酶反应动力学等特征方面都有一定的差异, 这些差异不仅表现在异种微生物之间, 以及在同种微生物的不同菌株之间, 也表现在同株微生物漆酶的同工酶之间。

漆酶是一种多底物的酶, 已发现的底物包括: 酚类、芳胺、羧酸及其衍生物、甾体激素、生物色素、木素、金属有机化合物和其它非酚类化合物等。由于漆酶具有特殊的催化性能和广泛的作用底物反应, 其在生物制浆<sup>[1]</sup>、生物漂白<sup>[2]</sup>以及有毒化合物的降解<sup>[3]</sup>等方面具有潜在的应用价值, 因而引起人们越来越多的研究兴趣, 成为环境保护用酶的研究热点。通过丙酮分级沉淀、DEAE-纤维素离子柱层析和Sephadex G100 柱层析得到两种同工酶, 并对其理化性质进行了研究, 为以后进一步酶基因克隆或酶功能开发奠定理论基础。目前国内关于香菇漆酶同工酶的研究尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

1.1.1 菌种 采自威海市玛珈山上并经分离纯化而得,

第一作者简介: 王方忠(1986-), 男, 本科在读, 现从事酶工程方向研究学习。E-mail: 1001-0009(2008)07-00-04。

通讯作者: 朱启忠。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

收稿日期: 2008-02-23

测定发现具有较高的漆酶活性。

1.1.2 主要试剂及仪器 邻联甲苯胺(分析纯), 上海化学试剂总厂生产 DEAE-纤维素(Pharmacia 公司), Sephadex G100 (Pharmacia 公司), 牛血清蛋白为进口分装(电泳纯); 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), 核酸蛋白检测仪(浙江温州永嘉上塘教学仪器厂), DYY-III-5 电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.1.3 培养基 经筛选, 适合香菇产胞外漆酶的培养基成分如下(g/L): 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L,  $KH_2O_4$  3 g/L,  $MgSO_4$  1.5 g/L,  $V_{B1}$  0.01 g/L, 0.5%的酵母膏。

### 1.2 试验方法

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 d 龄用打孔器打成的 10 mm 菌片(PDA 固体培养基培养: 马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%) 2 片, 130 rpm, 28℃恒温振荡培养 10 d。

1.2.2 粗酶液制备 按文献<sup>[4]</sup>进行。

1.2.3 酶的分离与纯化 ①55%饱和度的丙酮进行分级沉淀, 于 4℃、10 000 rpm 离心 30 min, 弃沉淀。于上清中加入终浓度 75%饱和度的丙酮进行分级沉淀, 于 4℃、10 000 rpm 离心 30 min, 弃上清液, 4℃过夜, 沉淀用 0.2 mol/L pH 值 4.0 的醋酸盐缓冲液溶解; ②透析: 将经①处理的酶液装入透析袋 1/15 mol/L pH 值 6.0 的磷酸缓冲液透析 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 值 6.0)平衡过夜, 加经透析且适当浓缩的酶液 3 mL, 用 100 mL 1/15 mmol PL 磷酸缓冲

液(pH 值 6.0)洗脱后,再用磷酸缓冲液配制的 0~1.0 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,流速 20/min,收集酶活部分进行酶活检测。④Sephadex G100 柱层析(1.5 cm×75 cm):蒸馏水洗脱,洗脱速度 15 mL/h,每管 3 mL,收集酶活部分进行酶活检测;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 酶活测定 0.2 mol/L pH 值 4.0 的醋酸缓冲液

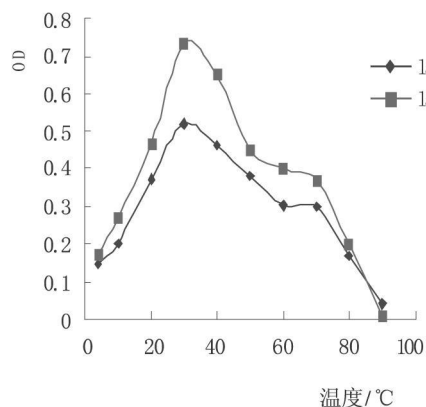


图1 温度对漆酶 lac1 和 lac2 活性的影响

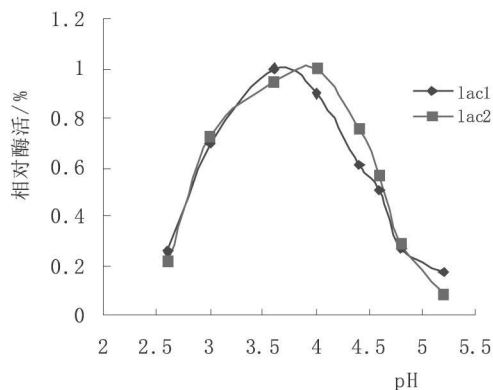


图3 pH 对漆酶 lac1 和 lac2 活性的影响

## 2 结果与分析

### 2.1 漆酶的纯化

将粗酶液经过 55%~75% 饱和度的丙酮分级沉淀后,再经过 DEAE-纤维素离子柱层析和 Sephadex G100 柱层析后得到 2 个有漆酶活力组分,分别命名为 Lac1 和 lac2,纯化后漆酶酶液为无色。

### 2.2 漆酶同工酶的理化性质分析

2.2.1 最适温度和热稳定性 酶的最适温度和热稳定性是酶的重要特征之一。在不同温度下酶反应速率有较大的差别,而酶的温度耐受也和其自身结构有很大的关系。由图 1 可见漆酶 lac1 和 lac2 的最适反应温度都为 30°C, 20~70°C 温度范围内均显示较高的活力。在温度稳定性研究中将酶液分别在 4、10、20、30、40、50、60、70、80°C 水浴中保温 30 min 然后测定漆酶活性结果见图 2。由图 2 可以看出, lac1 在 40°C 以下相对稳定,至 60°C 以

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, 20°C 保温 5 min, 722E 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,以每分钟光密度增加 0.01 为一个酶活力单位(u/mL)<sup>[4]</sup>。

1.2.5 蛋白浓度的测定 考马斯亮蓝 G-250 法测蛋白,以牛血清蛋白作为标准蛋白质<sup>[9]</sup>。

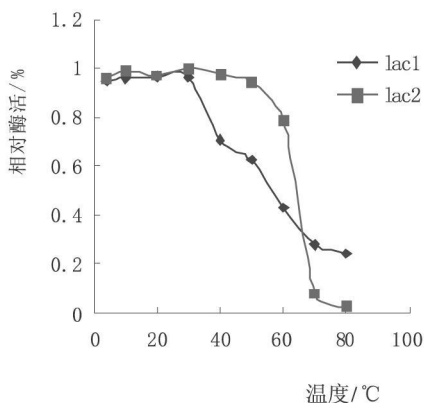


图2 漆酶 lac1 和 lac2 热稳定性的曲线

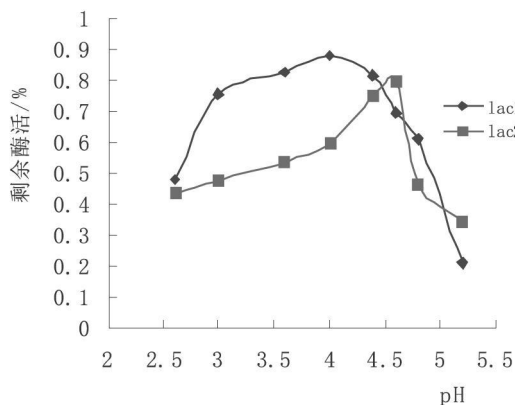


图4 漆酶 lac1 和 lac2 的 pH 稳定性

上时,酶活力有较大损失,说明漆酶 lac1 在较高的温度下变化比较大;在 60°C 以下 lac2 相对稳定,70°C 时酶几近失活,酶活力损失达 90% 以上。说明来源相同的同工酶之间在耐热性上存在一定的差异。

2.2.2 pH 对 lac1 和 lac2 酶反应速率的影响 大部分酶都受其环境 pH 影响显著,在一定浓度的底物作用下表现出最适的 pH。由图 3 可知: lac1 和 Lac2 受 pH 影响显著。其中 lac1 在 pH 值为 3.6 时表现最大酶活力,在 pH 值为 3~4.4 相对酶活都高于 60%, pH 高于 4.8 时,酶活力表现较小, lac2 在 pH 值为 4.0 时表现最大酶活力,在 pH 值为 3~4.4 时,相对酶活都高于 60%。在 pH 稳定性试验中将 lac1 和 lac2 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 lac1 在 pH 值 3.0~4.8 比较稳定。漆酶 lac2 在 pH 值 4.0~4.6 比较稳定,pH 值高于 4.6 酶活损失较大。由此表明 lac1 和 lac2 都是耐酸性酶(在酸性条件下比较稳定)。

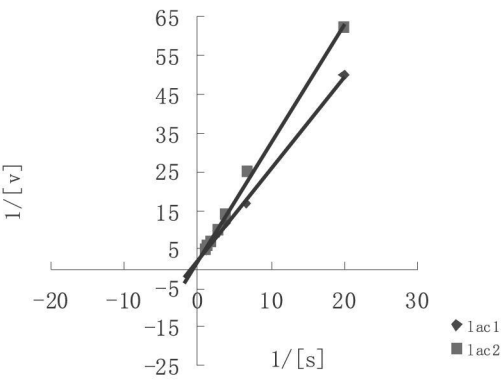


图5 漆酶lac1 和 lac2 的动力学曲线

表 1 无机离子对漆酶 lac1 和 lac2 活力的影响

试剂 /0.15g·L <sup>-1</sup>	lac1 相对 活 %	lac2 相对 活 %	试剂 /0.15g·L <sup>-1</sup>	lac1 相对 活 %	lac2 相对 活 %
H <sub>2</sub> O	100	100	ZnCl <sub>2</sub>	105	79
NaCl	112	89	CuSO <sub>4</sub>	101	114
KCl	116	71	MnSO <sub>4</sub>	89	83
CaCl <sub>2</sub>	100	85	MnCl <sub>2</sub>	94	93
FeCl <sub>3</sub>	104	88	AgNO <sub>3</sub>	55	64
BaCl <sub>2</sub>	102	120	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	102	101
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	96	KNO <sub>3</sub>	101	102
MgSO <sub>4</sub>	97	99			

2.2.3 无机离子对酶解活性的影响 金属离子对酶的作用有两种,一是作为酶的辅助因子,二是作为激活剂起作用。通过测定不同金属离子对 lac1 和 lac2 的酶活影响(酶反应液内盐浓度为 0.15g/L 时)。金属离子 Cl<sup>-</sup> 对 lac1 有激活作用,Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对 lac1 有抑制作用。金

属离子 Ba<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对 lac2 有激活作用,Fe<sup>3+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对 lac2 有抑制作用。lac1 和 lac2 表现出不一致性。金属离子与酶作用的分子机理有待进一步研究。

2.2.4 lac1 和 lac2 底物浓度效应 以邻联甲苯胺为底物,浓度范围分别为 0.05 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 lac1 和 lac2 反应,测其酶促反应速率,所得结果用 Lineweaver-Burk 作图法进行 lac1 和 lac2 的 K<sub>m</sub> 值测定。lac1 和 lac2 的 K<sub>m</sub> 分别 0.964 mmol/L 和 1.38 mmol/L。

3 小结

3.1 lac1、lac2 最适作用温度都为 30℃,在不高于 40℃ 的条件下保存 30 min, lac1 残余酶活在 60%以上, lac2 在不高于 60℃ 有较高热稳定性,残余酶活在 80%以上。

3.2 最适 pH lac1 为 3.6, lac2 为 4.0,由此表明 lac1 和 lac2 都是耐酸性酶。在 pH 值 3.0~4.8 lac1 有较强稳定性,在 pH=4.0~4.6 lac2 有较强的稳定性。

3.3 以邻联甲苯胺为底物 lac1 和 lac2 的 K<sub>m</sub> 分别 0.964 mmol/L和 1.38 mmol/L。

3.4 金属离子 Cl<sup>-</sup> 对 lac1 有激活作用,Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对 lac1 有抑制作用。金属离子 Ba<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对 lac2 有激活作用,Fe<sup>3+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对 lac2 有抑制作用。

参考文献

[ 1 ] Eggert C, Temp U, Eriksson K E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters* [ J ]. 1997, 407: 89-92.  
[ 2 ] Wong Y X, Yu J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes [ J ]. *Wat Res*, 1999, 33: 3512-3520.  
[ 3 ] Majcherzyk A, Johannes G, Huttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*[ J ]. *Enz Micro Tech*, 1998, 22: 335-341.  
[ 4 ] 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.  
[ 5 ] 朱启忠. *生物化学技术指南* [ M ]. 新疆科技卫生出版社, 1995: 36-37.

Study on Partial Character of Two Isoforms of Laccases from *Lentinus edodes*

WANG Fang-zhong, ZHU Qi-zhong, DONG Xue-wei, LIN Jin-fei, QU Yue-wen, GU Wen-hui  
(Department of Marine Biology, Shandong University at Weihai, Weihai Shandong 264209, China)

**Abstract:** The laccase of *Lentinus edodes* was purified by classification deposition of acetone, DEAE - Cellulose ion exchange and Sephadex G100 column chromatography. Two sorts of laccases named lac1 and lac2 were acquired. We also studied the partial enzymological properties. The optimum temperature of lac1 and lac2 were 30℃, and over 60% activity of the lac1 remained within 30 min when the temperature was not higher than 40℃. The lac2 showed higher stability and over 80% activity of the lac2 remained and when the temperature was not higher than 60℃. The optimum pH of lac1 and lac2 were 3.6 and 4.0 respectively. The lac1 was kept strongly active when pH ranged from 3.0 to 4.8. lac2 was 4.0~4.6. The K<sub>m</sub> of lac1 and lac2 were 0.964 mmol/L and 1.38 mmol/L respectively with o-Tolidine as substrate. The lac1 was activated by Cl<sup>-</sup> and its activity was inhibited by Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>. The lac2 was activated by Ba<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> and its activity was inhibited by Fe<sup>3+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>.

**Key words:** Isoforms of laccases; *Lentinus edodes* (Berk.) Sing; Purification; Enzymological properties