

双孢菇漆酶酶学性质及染料脱色初探

刘新颖, 朱启忠, 赵春媛, 魏翩翩

(山东大学威海分校 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 对双孢菇漆酶的酶学性质及对染料的脱色性能进行了研究。结果表明: 双孢菇漆酶的最佳反应温度和保存温度都是 25℃, 最佳反应 pH 和保存 pH 都是 5.0, 对大多金属离子不敏感, 但 Al^{3+} 对其有明显抑制作用。对 8 种工业染料中的 4 种脱色效果比较明显, 其中弱酸艳蓝—RAWL 的脱色率达到 79%。

关键词: 双孢菇; 漆酶; 酶学性质; 脱色

中图分类号: S 646.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0182-02

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种多酚氧化酶, 属于蓝色氧化酶家族。漆酶能催化降解多种芳香族化合物特别是酚类, 是一种天然环保型酵素^[1]。随着染料工业和纺织业的迅速发展, 印染废水对水体的污染已经成为突出的环境问题, 直接影响着人类的正常生产和生活。印染废水的处理、脱色是要首先解决的关键问题^[2]。近年来, 随着人们环保意识的增强, 漆酶在污水处理方面的作用显得越来越重要, 成为酶工程与环境保护交叉领域研究的热点^[3]。双孢菇(*Agaricus bisporus*)是世界范围内栽培的一种大型食用菌, 课题组曾通过对其液体深层发酵的优化研究发现其高产漆酶, 现进一步对双孢菇漆酶的酶学性质及其对几种染料的脱色性能进行了比较研究, 以期对双孢菇漆酶的应用提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 双孢菇(*Agaricus bisporus*)自威海市玛珈山采集、分离、纯化而得。

1.1.2 试剂 邻联甲苯胺分析纯(上海化学试剂总厂), 其它试剂均为分析纯或化学纯, 供试染料由山东大学威海分校生化实验室提供。

1.1.3 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 后的菌液, 取样, 4 000 r/min 离心, 上清液即为粗酶液, 于 -4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 酶活力测定^[4] 0.1 mol/L、pH 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, 以每分钟光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位(U/mL)。

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, 最后加入双孢菇粗漆酶酶液 1 mL 启动反应, 在 25℃ 下静置反应 2 h 后, 测各染料在 λ_{max} 处的吸光值, 得到吸光值 A_1 ; 在各染料溶液中加入等量灭活后的酶液作对照; 用同样的方法测得其吸光值 A_0 。则: 脱色率 $m/\%$ = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 漆酶的酶学性质

2.1.1 温度对漆酶反应的影响 由图 1 可知, 温度对双孢菇漆酶酶解的影响较大, 在试验条件下最适酶解温度为 25℃, 与董学卫等^[5]报道的白毒鹅膏菌漆酶的 20℃ 有所差异, 可能是不同菌株之间有所差异。

2.1.2 pH 对漆酶反应的影响 由图 2 可知, 双孢菇漆酶在醋酸缓冲液的最适 pH 为 5.0, 查阅相关文献^[5-9], 发现来源不同的漆酶最适反应 pH 不同, 可能来源不同漆酶的结构不同。

2.1.3 漆酶的热稳定性 将漆酶酶液在不同温度(15~55℃)、pH 4.6 的醋酸缓冲液中保存 1.5 h, 在最适 pH 和最适温度下测定酶活力, 结果如图 3 所示。可知双孢菇漆酶的最适保存温度是 25℃, 55℃ 时酶活力迅速下降。

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。

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 山东单县人, 教授, 系主任, 现从事生物化学的教学与科研工作, 已发表论文 70 余篇, 主编著作和教材 10 余部。

基金项目: 山东大学威海分校科研资助项目(A09010)。

收稿日期: 2010-04-21

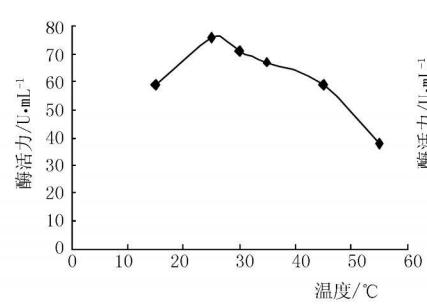


图1 温度对漆酶活力的影响

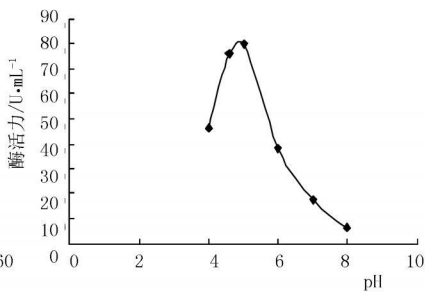


图2 pH对漆酶活力的影响

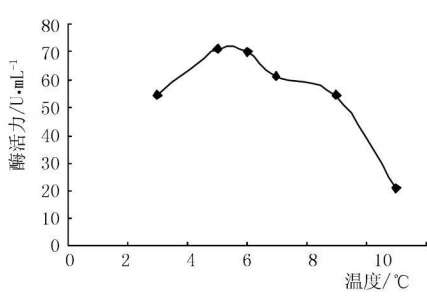


图3 漆酶的热稳定性

2.1.4 漆酶的 pH 稳定性 将漆酶酶液在不同 pH (4~8)醋酸缓冲液 25℃下保存 1.5 h, 在最适 pH 和最适温度下测定酶活力, 结果如图 4 所示。可知双孢菇漆酶的最适保存 pH 是 5.0, 碱性情况下酶活力迅速下降。

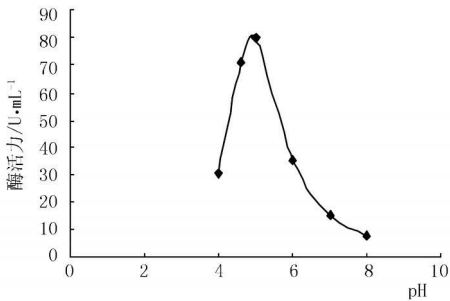


图4 漆酶的 pH 稳定性

2.1.5 金属离子对漆酶活力的影响 由表 1 可知, 当反应酶液中金属离子浓度是 0.1 g/L 时, 已测大多金属离子对漆酶活力影响较小, 但 Al^{3+} 表现比较明显的抑制作用。

表 1 金属离子对双孢菇漆酶活力的影响

试剂/0.1 g · L ⁻¹	酶活力/U · mL ⁻¹	试剂/0.1 g · L ⁻¹	酶活力/U · mL ⁻¹
H ₂ O	73.6	ZnCl ₂	71.52
MgCl ₂	73.6	KCl	72.12
NaCl	70	AlCl ₃	28.96
MnCl ₂	70.4	CaCl ₂	72.12

2.2 染料脱色

在 pH 4.6 和 25℃恒温水浴条件下, 利用粗漆酶(65 U/mL)处理 8 种工业染料, 120 r/min 震荡反应 2 h, 结果如表 2 所示。可知双孢菇漆酶可降解 8 种工业染料中的 6 种, 其中对弱酸艳蓝—RAWL 的脱色率达到 79%,

其余 5 种脱色率较小, 而对活性黄 M-3RE、活性红 M-3BE 表现为不直接催化。

表 2 8 种染料的脱色率

染料	λ_{max}	$r_D/\%$
弱酸艳蓝 RAWL	590	79.3456
活性红 M-3BE	540	7.10988
中性枣红 GRL	550	31.93277
中性深黄 GL	440	33.20433
弱酸艳红 B	540	39.58333
活性黄 M-3RE	430	0.692042
中性黑 BL	580	25
直接黑	650	21.9780

3 结论

对双孢菇漆酶特性的研究结果表明, 它是一种较稳定的低温酶, 最适反应温度 25℃; 其最适 pH 为 5.0, 酸性条件下表现出较强的稳定性; 因而可在较低的温度和酸性环境中发挥较大作用。通过对 8 种工业染料的脱色比较表明, 双孢菇漆酶具有较大的底物广泛性, 可以在工农业生产中发挥重要作用。

参考文献

[1] 王祎宁, 赵国柱, 谢响明, 等. 漆酶及其应用的研究进展[J]. 生物技术通报 2009(5): 35-38.

[2] 高孟春, 张小敬, 李冰, 等. 海绵铁对酸性媒介黑 T 废水脱色的研究[J]. 工业水处理, 2009, 29(9): 31-33.

[3] 王志新, 施晓燕, 蔡宇杰, 等. 白腐真菌 SY BC-L2 漆酶的分离纯化及其在毛纺染料脱色中的应用[J]. 生物技术通报 2009(8): 157-161.

[4] 董学卫, 吕新萍, 徐国英, 等. 漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2007, 28(3): 52-56.

[5] 董学卫, 朱启忠, 吕新萍, 等. 白毒鹅膏菌胞外漆酶的部分酶学性质研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2007, 25(2): 133-136.

[6] 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.

Studies on Characters of Laccase from *Agaricus bisporus* and Ability to Degrade Dyes

LIU Xin-ying, ZHU Qi-zhong, ZHAO Chun-yuan, WEI Pian-pian

(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

Abstract: To reaserch the characters of the laccase from *Agaricus bisporus*, and its ability to degrade the dyes. The results showed that the best reaction temperature and preservation temperature was 25℃. The best reaction pH and preservation pH was 5.0. Most metal ions didn't influence its characters, but Al^{3+} could significantly inhibit its activity. The reaction with eight commerical dyes showed that four dyes could be degraded by the laccase. The decolorization rate of the weak acid brilliant blue RAWL could reach 79%. The laccase from *Agaricus bisporus* had a certain industrial applications.

Key words: *Agaricus bisporus*; laccase; character of laccase; decolorization