

# 亮菌漆酶的初步研究

凌庆枝<sup>1,2</sup>, 董丽辉<sup>1</sup>, 范三微<sup>1</sup>, 高莉莉<sup>1</sup>, 黄贝贝<sup>1</sup>, 袁怀波<sup>2</sup>, 魏兆军<sup>2</sup>

(1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 对亮菌(*Armillariella tabescens*)固体发酵产生的漆酶进行研究, 其粗酶液经过硫酸铵盐析、DEAE-cellulose柱纯化, 活力回收率为42.3%, 得到电泳纯的亮菌漆酶, SDS-PAGE法证实其分子量约为55.6kD。实验表明, 亮菌漆酶最适反应温度为50℃、最适反应pH值为4.0, 催化ABTS的米氏常数为0.018mmol/L, 在pH4.0~5.0的偏酸性环境中, 酶活力较高, 活性较稳定。酸根阴离子和金属阳离子对酶活力都有不同程度的影响, 其中 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Na}^+$ 对亮菌漆酶的活力有促进作用,  $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对酶的活力有抑制作用。

**关键词:** 亮菌; 漆酶; 纯化; 性质

## Preliminary Study on Laccase from *Armillariella tabescens*

LING Qing-zhi<sup>1,2</sup>, DONG Li-hui<sup>1</sup>, FAN San-wei<sup>1</sup>, GAO Li-li<sup>1</sup>, HUANG Bei-bei<sup>1</sup>, YUAN Huai-bo<sup>2</sup>, WEI Zhao-jun<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China;

2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Laccase in *Armillariella tabescens* solid-state fermentation liquid was purified by ammonium sulfate salting-out and DEAE-cellulose column chromatography with an overall activity recovery of 42.3%. Electrophoretically pure laccase was obtained and its apparent molecular weight was approximately 55.6 kD, which was proved by SDS-PAGE analysis. The optimum reaction temperature and pH for this enzyme were 50℃ and 4.0, respectively, and the  $K_m$  value was 0.018 mmol/L with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as a substrate. This enzyme maintained high and stable activity at pH 4.0-5.0. Various acid radical ions and metal ions had different effects on laccase activity, which was revealed an enhancement effect from  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{Na}^+$ , and an inhibition effect from  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Key words:** *Armillariella tabescens*; laccase; purification; characteristics

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0190-04

漆酶(laccase, EC1.10.3.2)是一种含铜离子的多酚氧化酶。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。现将漆酶按其来源主要分为漆树漆酶(rhus laccase)和真菌漆酶(fungal laccase)。漆酶的作用底物比较广泛, 不同漆酶的作用范围也不尽相同, 涉及的底物主要包括单酚、邻苯二酚、对苯二酚、甲氧基酚、苯二胺等。近年来, 约有20多种不同来源的漆酶得到纯化, 并对其性质进行了研究, 越来越多的漆酶基因被克隆和表达, 漆酶的应用也取得一些突破性的成果和显著的成就, 特别是在多种有毒化合物的降解、纺织面料处理、纸浆的生物漂白等多方面发挥着重要作用<sup>[1-3]</sup>。

亮菌(*Armillariella tabescens*), 学名假密环菌

[*Armillariella tabescens*(Scop.ex.Fr.) Sing], 属白蘑科蜜环菌属, 最早于20世纪60年代在江苏省丹徒县民间用来治疗当地俗称的“膈食病”, 近年的研究证明亮菌具有抗辐射、抗乙肝病毒等作用, 可治疗肝炎、胆囊炎、胃炎、新生儿高胆红素血症等<sup>[4-8]</sup>。亮菌主产于安徽、江苏、浙江等地, 是重要的药用真菌。本实验用固体发酵法产生亮菌漆酶, 对亮菌漆酶进行分离纯化, 并对其性质进行初步研究, 以为亮菌漆酶的开发应用提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

亮菌(*Armillariella tabescens*) 中国科学院中国普通

收稿日期: 2009-07-05

基金项目: 安徽省科技厅重点科研计划项目(07020303041); 浙江医药高等专科学校科研基金项目(ZPCSR2008001)

作者简介: 凌庆枝(1963-), 男, 副教授, 博士, 主要从事生物技术制药和食品生物技术研究。

E-mail: lingqingzhi@sina.com

微生物保藏中心。

## 1.2 试剂

ABTS[2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)] 美国 Sigma 公司；DEAE-纤维素 英国 Whatman 公司；低分子量标准蛋白 美国 GE 公司；其他试剂均为国产分析纯。

## 1.3 仪器与设备

TU-1810紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；Mini-protean3 垂直电泳仪、Bio-rad 凝胶成像分析系统 Bio-rad 公司；Biofuge Stratos 冷冻离心机 德国贺利氏公司；BT1-100 恒流泵、SBS-100-LCD 数控自动收集器、HD-21-88 紫外检测仪 上海琪特分析仪器有限公司；PHS-3C 型 pH 计 上海精科仪器有限公司；BCM-1000 型生物净化工作台 苏州净化设备有限公司；SPX 智能型生化培养箱 宁波江南仪器厂。

## 1.4 培养基<sup>[9-11]</sup>

马铃薯综合培养基：葡萄糖 2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{VB}_1$  微量、琼脂粉 1.8%、土豆汁 20%；种子培养基：葡萄糖 2%、蛋白胨 1.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%、玉米粉 2%；固体发酵培养基：葡萄糖 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25%、 $\text{CuSO}_4$  0.02%、 $\text{VB}_1$  少量、玉米粉 15%、 $\text{CaCl}_2$  0.48%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5%。

固态发酵培养：将斜面种子接入 100ml 种子培养基中，150r/min、27℃ 恒温振荡培养 3d，10% 接种量接入固体培养基中，27℃ 培养。

## 1.5 固体酶曲中漆酶活力测定

取亮菌固体培养基表面生长良好的亮菌，去培养基后称取 1g 湿曲，研磨，加 99ml 蒸馏水，并迅速放置 4℃ 冰箱浸泡过夜，将浸泡液过滤得滤液即为粗酶液。

取 3.0ml 0.5mmol/L 的 ABTS(2'-连氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)作为反应底物，在 pH4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲体系中加入 1ml 稀释的粗酶液，30℃ 反应 5min，于波长 420nm 处测定反应吸光度随时间的变化，取吸光度变化的线性部分。每分钟消耗 1 $\mu\text{mol}$  ABTS 底物所需的酶量为一个酶活力单位，以 U/ml 表示。

## 1.6 亮菌漆酶的分离纯化

### 1.6.1 盐析

粗酶液用饱和度为 75% 硫酸铵沉淀，4℃ 静置过夜。10000r/min 低温离心 10min，弃去上清，沉淀溶于 0.02mol/L 磷酸钠(pH6.0)缓冲溶液中。

### 1.6.2 透析

将适量的酶液装入透析袋中，于磷酸钠(pH6.0)缓冲溶液中透析 24h，每隔 6h 更换一次缓冲液。

### 1.6.3 DEAE-纤维素阴离子柱层析

将处理过的酶液上已平衡的 DEAE-纤维素柱(1.5cm  $\times$  3.0cm)：先用 4℃ 超纯净水浸泡 DEAE-纤维素 24h，后用 0.02mol/L、pH6.0 磷酸钠缓冲液 4℃ 下平衡 DEAE-纤维素柱 24h，接着用上述磷酸钠缓冲液洗脱几分钟，再用 0~0.5mol/L NaCl 与磷酸钠溶液进行梯度洗脱，洗脱速度为 1ml/min，每 4min 收集一管，测其  $A_{280\text{nm}}$  值并计算酶活力，合并有活力的组分。

## 1.7 电泳

采用垂直型 SDS-PAGE 凝胶电泳，分离胶 10%、浓缩胶 4% 的不连续体系，电极缓冲液为 pH8.3，配胶比例按照文献[12]进行，并用凝胶成像系统进行分析。

## 1.8 亮菌漆酶性质研究

### 1.8.1 分子量测定

将样品及已知分子量的标准蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳，然后以相对迁移率计算出亮菌漆酶的分子量<sup>[13]</sup>。

### 1.8.2 亮菌漆酶最适反应 pH 值测定

将亮菌漆酶分别加到 pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中，在 30℃ 条件下测定漆酶活力，以最高活力为 100%，其他与之相比作图，得酶最适反应 pH 值。

### 1.8.3 亮菌漆酶最适反应温度测定

亮菌漆酶在最适反应 pH 值条件下，分别在不同温度(20、30、40、50、55、60℃)下测定亮菌漆酶活力，得出最适反应温度，以最高活力为 100%，其他与之相比作图，得出亮菌漆酶的最适反应温度。

### 1.8.4 亮菌漆酶热稳定性测定

亮菌漆酶在不同温度(20、25、30、35、40、45、50、55℃)保温 1h，在最适反应温度、pH 值下测试酶活力，以保温前的酶活力为对照，计算相对活力，得出亮菌漆酶的热稳定性。

### 1.8.5 亮菌漆酶 pH 值稳定性测定

将漆酶分别加到 pH3.0、4.0、4.5、5.0、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中浸泡 24h 后，在 30℃ 反应条件下测试酶活力，以浸泡前的酶活力为对照，计算相对活力，得出漆酶的 pH 值稳定性。

### 1.8.6 阴离子对亮菌漆酶的影响

将亮菌漆酶分别加到 1mmol/L 和 100mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$  溶液中浸泡 24h 后，在 30℃、pH4.0 反应条件下测试酶活力，以浸泡前的酶活力为对照，计算相对活力，得出亮菌漆酶的阴离子稳定性。

### 1.8.7 阳离子对亮菌漆酶的影响

将亮菌漆酶分别加到 1、100mmol/L 的  $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液中浸泡 24h 后，

在 30℃、pH4.0 反应条件下测试酶活力,以浸泡前的酶活力为对照,计算相对活力,得出亮菌漆酶的阳离子稳定性。

### 1.8.8 亮菌漆酶米氏常数测定

在 pH4.0 条件下,配制 5 个不同的 ABTS 底物浓度 (0.03、0.04、0.05、0.07、0.1mmol/L), 30℃ 条件下反应,测定漆酶反应初始速度,求出两者倒数,以  $1/v$  对  $1/S$  作图,按照双倒数法作图,得到斜率为  $K_m/v$  的直线,由此得到  $K_m$  的值。

## 2 结果与分析

### 2.1 亮菌漆酶的分离纯化

固体发酵后提取的亮菌粗漆酶液,经硫酸铵盐析、DEAE-纤维素柱层析后,活力回收率为 42.3%,见表 1。该酶样品经 SDS-PAGE 实验,根据已知分子量的标准蛋白质的相对迁移率,计算出亮菌漆酶的分子量约为 55.6kD,见图 1。

表 1 亮菌漆酶的纯化与活力的关系

Table 1 Summary of purification procedures of laccase from *Armillariella tabescens* solid-state fermentation liquid

纯化步骤	酶活力(U/g)	活力回收率(%)
粗酶液	22180	100
盐析	18463	83.2
DEAE-纤维素柱	9400	42.3

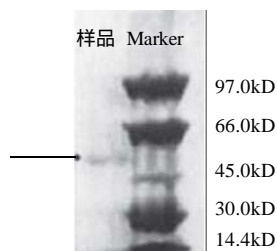


图 1 亮菌漆酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of laccase purified from *Armillariella tabescens* solid-state fermentation liquid

### 2.2 亮菌漆酶的最适反应 pH 值

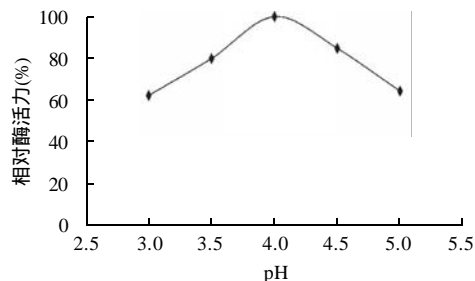


图 2 pH 值对亮菌漆酶活力的影响

Fig.2 Effects of pH value on laccase activity from *Armillariella tabescens*

本实验测定了亮菌漆酶与 ABTS 在不同的 pH 值缓冲溶液中的酶活力,结果如图 2 所示,实验表明亮菌漆酶与 ABTS 的最适反应是 pH4.0,且在 pH3.0~5.0 酸性环境中活力较好。

### 2.3 亮菌漆酶的最适反应温度

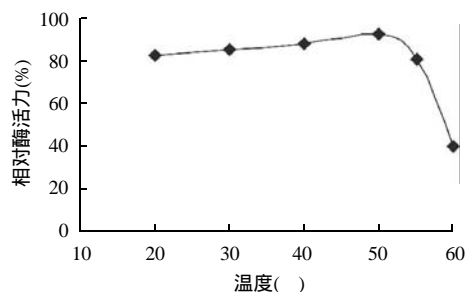


图 3 温度对亮菌漆酶活力的影响

Fig.3 Effects of temperature on laccase activity from *Armillariella tabescens*

亮菌漆酶与底物 ABTS 在不同温度下发生反应时的相对活力如图 3 所示,结果表明,亮菌漆酶在 50℃ 时,酶活力最高,故最适反应温度为 50℃。当温度由 20℃ 升至 50℃ 时,酶的相对活力从 83% 左右持续升至 93% 左右;温度超过 50℃ 时,酶的活力下降速度较快,温度 60℃ 时酶活力只剩最高时的 40%。

### 2.4 亮菌漆酶的热稳定性

环境温度对酶的稳定性有较大影响,是引起酶失活的原因之一。本实验研究了亮菌漆酶在不同温度下的热稳定性,结果如表 2 所示。当温度在 30℃ 以下时,稳定性较好,1h 内至少能保持 84% 的活性;当温度在 35~45℃ 之间,1h 后酶只能保持 50% 左右的活性;当温度高于 50℃ 时,1h 后几乎丧失全部活性。

表 2 亮菌漆酶的热稳定性(1h 后)

Table 2 Thermal stability of laccase from *Armillariella tabescens* (at different temperatures after 1h)

温度(°C)	20	25	30	35	40	45	50	55
相对酶活力(%)	98.2	89.6	84.4	64.0	57.2	24.7	5.2	1.1

### 2.5 亮菌漆酶的 pH 值稳定性

表 3 亮菌漆酶在不同 pH 值溶液中的稳定性

Table 3 pH stability of laccase from *Armillariella tabescens*

pH 值	3.0	4.0	4.5	5.0	6.0
相对酶活力(%)	2.2	27.4	97.6	74.1	24.1

环境 pH 值对酶的稳定性有较大影响,也可能是引起酶失活的主要原因。本实验将亮菌漆酶置于不同 pH 值环境下 24h,结果如表 3 所示。实验表明,亮菌漆

酶在 pH4.0~5.0 酸性环境中较稳定, pH < 4.0 或 pH > 5.0, 对亮菌漆酶的稳定性影响均较大。

## 2.6 酸根阴离子对亮菌漆酶活力的影响

溶液中所含阴离子也可能是影响酶活力的因素。本实验研究了不同浓度下的 4 种阴离子对亮菌漆酶活力的影响, 结果如表 4 所示。实验表明, 高浓度的酸根阴离子对酶活力的影响较大, 在这 4 种阴离子中,  $\text{SO}_4^{2-}$  对酶活力影响最小, 且低浓度对酶活力有增强作用。 $\text{CO}_3^{2-}$  对酶活力影响最大, 100mmol/L 的  $\text{CO}_3^{2-}$  溶液可使亮菌漆酶活力几乎完全丧失。

## 2.7 金属阳离子对亮菌漆酶活力的影响

表 4 酸根离子对亮菌漆酶活力的影响  
Table 4 Effects of acid radical ions on laccase activity from *Armillariella tabescens*

酸根离子(mmol/L)	$\text{CO}_3^{2-}$		$\text{NO}_3^-$		$\text{SO}_4^{2-}$		$\text{Cl}^-$	
	1	100	1	100	1	100	1	100
相对酶活力(%)	27	8	95	83	105	98	96	42

由表 4 可知,  $\text{SO}_4^{2-}$  对亮菌漆酶活力的影响较小, 故本实验研究了不同阴离子硫酸盐(均含  $\text{SO}_4^{2-}$  但金属阳离子不同)对亮菌漆酶活力的影响, 结果如表 5 所示。实验表明, 高浓度的不同金属阳离子对酶活力的影响较大( $\text{Mg}^{2+}$  除外), 在这 4 种金属离子中,  $\text{Cu}^{2+}$  对酶活力影响最大,  $\text{Na}^+$  对酶活力影响最小, 且低浓度的  $\text{Na}^+$  对亮菌漆酶活力有增强作用。

表 5 不同金属离子对亮菌漆酶活力的影响  
Table 5 Effects of metal ions on laccase activity from *Armillariella tabescens*

金属离子(mmol/L)	$\text{Cu}^{2+}$		$\text{Na}^+$		$\text{Zn}^{2+}$		$\text{Mn}^{2+}$		$\text{Mg}^{2+}$	
	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100
相对酶活力(%)	90	79	106	91	91	74	100	86	94	94

## 2.8 亮菌漆酶的米氏常数测定

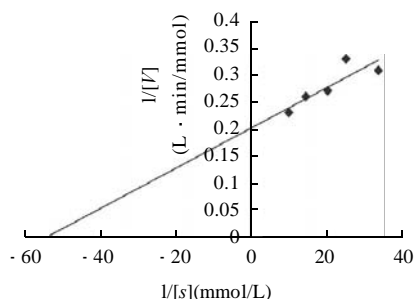


图 4 亮菌漆酶的动力学曲线  
Fig.4 lineweaver-Durk plot for of laccase from *Armillariella tabescens*

用 ABTS 作为亮菌漆酶反应底物, 在 30℃、pH4.0 条件下取不同浓度的 ABTS(0.03、0.04、0.05、0.07、0.1mmol/L), 测定其反应速度  $v$ , 得到  $1/[v]$  与  $1/[s]$

的关系曲线, 如图 4 所示, 从而计算得到亮菌漆酶对 ABTS 的  $K_m$  值为 0.018mmol/L。

## 3 结 论

真菌漆酶是一种含多个铜原子的多酚氧化酶, 催化机理独特, 底物广泛多样, 参与真菌的木质素降解、色素沉着、子实体和孢子的形成, 甚至致病机制的形成等生理过程, 在生物制浆、印染废水脱色、洗涤剂、绿色有机合成等工业领域具有巨大的应用潜力。近年来, 多种来源的真菌漆酶通过超滤、硫酸铵一步沉淀、阴离子交换层析和凝胶过滤等常规分离方法进行了分离和纯化, 但未见有关亮菌漆酶的研究报道。本实验采用硫酸铵盐析、DEAE-纤维素柱层析方法, 对亮菌粗酶液进行初步分离, 得到的亮菌漆酶分子量约为 55.6kD。亮菌漆酶与底物 ABTS 反应的最适 pH 值为 4.0, 最适反应温度为 50℃, 米氏常数为 0.018mmol/L; 在亮菌漆酶的稳定性研究实验中发现, 当环境在 pH4.0~5.0 的酸性范围, 酶活力较高, 酶较稳定; 当环境温度在 30℃ 以下时, 酶活力较高, 酶较稳定。在阴、阳离子对亮菌漆酶活力影响的实验中, 发现  $\text{SO}_4^{2-}$  阴离子对其活力影响最小,  $\text{CO}_3^{2-}$  对其活力影响最大;  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对亮菌漆酶的活力有抑制作用;  $\text{Na}^+$  对亮菌漆酶的活力有促进作用。有关亮菌漆酶的性质及其应用, 本课题组将作进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] MIKOLASCH A, SCHAUER F. Fungal laccase as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82(4): 605-624.
- [2] MAI C, MILSTEIN O, HUTTERMANN A. Fungal laccase grafts acrylamide onto lignin in presence of peroxides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(4): 527-531.
- [3] JOLIVALT C, MADZAK C, BRAULT A, et al. Expression of laccase b from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66(4): 450-456.
- [4] 沈业寿, 马金宝. 亮菌研究的现状与展望[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2007, 31(1): 82-86.
- [5] 凌枝枝, 袁怀波, 王妮娜, 等. 亮菌固态和液体发酵多糖及其醒酒作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 324-326.
- [6] 姜天俊, 闫慧颖, 范荣, 等. 亮菌口服液治疗急性黄疸型肝炎临床研究[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(7): 826-827.
- [7] 黄炳贺, 姚冬生, 陈伟强, 等. 假密环菌杂多糖 Y-HW 组分在实验性肝损伤中护肝作用的研究[J]. 实用医学杂志, 1998, 14(8): 602-603.
- [8] 曾少娟, 刘曼玲, 王淑娥, 等. 亮菌口服液防治新生儿高胆红素血症的临床观察[J]. 医学理论与实践, 2002, 15(6): 686-687.
- [9] 徐勇, 朱均均, 叶汉玲, 等. 白构菌液体发酵合成漆酶的培养条件研究[J]. 林产化工通讯, 2004, 38(3): 1-5.
- [10] 陶君, 马爱民, 郭爱玲, 等. 灵芝漆酶活性的测定及其产漆酶条件的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 310-313.
- [11] 高恩丽, 张树江, 夏黎明. 云芝菌发酵产漆酶及其对靛蓝脱色的研究[J]. 高校化学工程学报, 2007, 21(1): 111-115.
- [12] 郭晓君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 128-140.
- [13] 王重庆, 李云兰. 高级生物化学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001: 42-53.