

担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究*

刘淑珍 钱世钧**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 采用硫酸铵盐析、DEAE 纤维素柱层析、Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水柱层析等方法,得到电泳纯的漆酶同工酶 Lac1,纯化倍数为 318.4,活力回收率为 18.6%。用 SDS-PAGE 测得该酶分子量为 60.3kD,而经质谱分析为 55.94kD。最适反应温度为 65℃,最适反应 pH 值为 2.2~2.8,酶的等电点 pI(室温)为 4.02,其 N 末端序列为 AIGPVTDL,用硫酸-酚法测得其含糖量为 49.2%。25℃条件下,以 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate))为底物的 K_m 为 17.5 μ mol/L。该酶在 45℃ pH3.0~9.5 较稳定。 Cu^{2+} 对酶活有明显的促进作用, Fe^{2+} 完全抑制酶的活性, Mn^{2+} 和 Ag^+ 对酶活无明显影响。DTT(Dithiothreitol,二硫苏糖醇)和 NaN_3 完全抑制酶的活性。Koshland 试剂对漆酶的活力影响比较大,色氨酸可能是酶活力的必需基团。

关键词:担子菌,漆酶,纯化,性质

中图分类号:Q554 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)01-0073-06

漆酶(p-diphenol oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2.)是一种含铜离子的多酚氧化酶,与植物抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同属于铜蓝蛋白家族。它最早在日本紫胶漆树(*Rhus vernicifera*)的渗出液中发现^[1],后在真菌中发现^[2,3],在白腐菌中普遍存在,少数低等真菌和植物中也产生,目前只在细菌 *Azospirillum lipoferum* 中发现了漆酶的存在^[4]。漆酶多为分泌型糖蛋白,含糖 10%~80% 不等。一部分菌株的漆酶是由数种同工酶组成,多为单体酶。只在 *Podospora* 中发现漆酶由 4 个亚单位组成^[5]。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、抗坏血酸、二胺化合物(如苯二胺,多巴胺)等。

近年来,约有 20 种不同来源的漆酶得到纯化,并对其性质作了进一步研究,越来越多的漆酶基因被克隆和表达,漆酶的应用也已取得一些突破性成果和显著的成就。由于漆酶能降解多种有毒化合物,如氯代酚、多氯联酚、二氧六环、二氯苯胺、杀虫剂、炸药、染料等,所以颇具环保意义。又由于漆酶能降解木质素,必将使它在造纸废水的处理和纸浆的生物漂白方面发挥着重要作用。对真菌培养液的漆酶研究以往多用合成培养基,且需加

* 国家 863 项目资助(2001AA214161)

** 通讯作者, E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介:刘淑珍(1972-),女(汉族),山西大同人,中国科学院微生物研究所 99 级硕士生,主要从事酶学研究(E-mail: szliu0252@sina.com)

收稿日期:2002-04-15,修回日期:2002-07-23

入特定的诱导剂,如抑制蛋白合成的抗生素类物质、酚类化合物等。本文所用的漆酶产生菌是运用平板筛选法得到的 1 株担子菌^[6],是在天然培养基上培养,无需额外添加诱导剂,产酶可达 3U/mL。我们首先对它进行了纯化,并对其同工酶 Lac1 的一些理化性质、生物学性质进行了研究,为今后的基础研究和工业应用提供有价值的参考数据。

1 材料和方法

1.1 菌种

本实验室筛选所得^[6]。

1.2 主要生化试剂

ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]、Koshland 试剂(2-羟基-5-硝基溴苯):Sigma 公司;DEAE-cellulose (DE11):Whatman 公司;Phenyl SepharoseTM 6 Fast Flow (high sub) 等电点标准蛋白:Pharmacia 公司;PCMB(对氯汞苯甲酸):Hopkin&Williams 公司;N-AL(N-乙酰咪唑) Serva 公司;NBSF(对硝基苯基磺酰氟)Pierce 公司。其它生化试剂均为国产试剂。

1.3 培养基

见参考文献 [6]

1.4 漆酶活力的测定

按参考文献 [7] 略作改动。3mL 反应总体积中,含 0.1mL 酶液,2.7mL 0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.5),加入 0.2mL 0.5mmol/L ABTS 以启动反应,25℃水浴保温 5min,测 OD₄₂₀。1 个酶活力单位(U)是指在上述条件下,反应体系中每分钟催化 1 μ mol ABTS 氧化所需的酶量。

1.5 蛋白质含量测定

按 Lowry 法^[8]测定,以牛血清白蛋白作标准。

1.6 电泳

SDS-PAGE 见参考文献[9]、PAGE 见参考文献[10]。分离胶浓度均为 10%,SDS-PAGE 用考马斯亮蓝 R-250 摇床染色 2h;PAGE 活性染色按参考文献 [11] 略加修改。

1.7 酶的分离与纯化

1.7.1 硫酸铵盐析 菌种在自制液体培养基中培养 7d 后,经 4 层纱布过滤,6 000r/min 20min 离心,所得上清液即为粗酶液。75% 饱和度硫酸铵沉淀 4℃静置过夜。10 000 r/min 离心 20min,弃去上清,沉淀溶解于 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液(PBS pH6.5)中,继续对其彻底透析。

1.7.2 DEAE-纤维素(DE11)柱层析 将上述所得酶液加到已用 PBS 平衡过 DEAE-纤维素柱(1.5cm \times 51cm),先用 PBS 洗柱,后改用含 0~0.5 mol/L NaCl 的 PBS 梯度洗脱,合并有活力组分。

1.7.3 Phenyl SepharoseTM 6 Fast Flow 疏水柱层析 将上述所得活力组分经硫酸铵沉淀处理后,溶解于蒸馏水中,继续对水透析除盐,后改用对含 0.9mol/L 硫酸铵的 PBS 透析,所得酶液加到平衡好的层析柱(1.0cm \times 20cm)上,先用上述缓冲液洗柱,后改用 0.9~0 mol/L 硫酸铵的 PBS 梯度洗脱,合并 Lac1 活力组分。

1.8 酶学性质

1.8.1 表观分子量测定 SDS-PAGE 法测定漆酶的亚基分子量 根据已知分子量的标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R_f 作 R_f -LogMr 图 求得其分子量 ;MALDI-TOF 质谱法测定酶分子量 由北京质谱中心采用 BIFLEX III 仪器协助测定。

1.8.2 最适反应温度及热稳定性 :在不同温度下按照标准方法测定酶活 ,以酶活最高者为 100%。酶液在 65℃、55℃、45℃、35℃ 下分别保温 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 迅速冷却至室温 按标准方法 测残余酶相对活力 ,以未保温的酶液的酶活为 100%。

1.8.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性 :将酶液分别加在 pH2.2~5.0 的缓冲液中 按标准方法测酶活力 ,以酶活最高者为 100%。将酶液用不同 pH2.2~9.5 的缓冲液稀释 25℃ 保温 1h、16h 后 测残余酶活力 ,以未保温的酶液的酶活为 100%。

1.8.4 等电点测定 :见参考文献 [12] 以 Pharmacia 公司的等电点标准蛋白为标准。

1.8.5 动力学常数测定 :在不同底物(ABTS)浓度的反应体系中 ,25℃ 反应 5min ,测定 OD_{420} 以计算酶反应的初速度 作 Lineweaver-Burk 双倒数图。

1.8.6 糖含量测定(硫酸-酚法) 按参考文献 [10] 进行 ,以葡萄糖为标准。

1.8.7 N-末端测定 :由北京大学生命科学中心采用 491Protein sequencer 仪器协助测定。

1.8.8 金属离子对酶活力影响 :用 0.1mol/L 乙酸钠缓冲液(pH4.5)配成含不同浓度金属离子的缓冲液 与一定量酶液 25℃ 保温 5min 后 加 ABTS 至终浓度为 0.5mmol/L 25℃ 反应 5min 测漆酶活力 ,以不含金属离子反应液为对照 金属离子终浓度为 0.1~2mmol/L。

1.8.9 抑制剂对酶活力的影响 :加入不同浓度的可能抑制剂于酶液中 ,并使其终浓度为 0.1~2.0 mmol/L 然后按标准方法测定其酶活力。

1.8.10 修饰剂对酶活力的影响 :见参考文献 [13] 不同浓度的不同修饰剂与酶液保温一段时间后稀释 按标准方法测酶活 ,以不含修饰剂的酶液为对照。

2 结果

2.1 漆酶的分离与纯化

漆酶的分离与纯化结果见表 1。粗酶液经硫酸铵盐析、DEAE-纤维素(DE11)柱层析和疏水柱层析后所得样品 Lac1 比活力为 159.2 纯化倍数为 318.4 活力回收率为 18.6%。该酶样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 1)。表明纯化后的漆酶 Lac1 为单一组分 ,已达到电泳纯。

表 1 漆酶的纯化总表

Table 1 A summary of laccase purification

Purification step	Total activity /U	Total protein /mg	Specific activity (U/mg)	Purification /fold	Yield /%
Crude enzyme	941.2	2017.6	0.5	1	100
Ammonium sulfate precipitation	667.4	154.7	4.3	8.6	70.9
DEAE-cellulose chromatography	529.2	19.3	27.4	54.8	56.2
Phenyl Sepharose™ 6 HIC(Lac1)	175.1	1.1	159.2	318.4	18.6

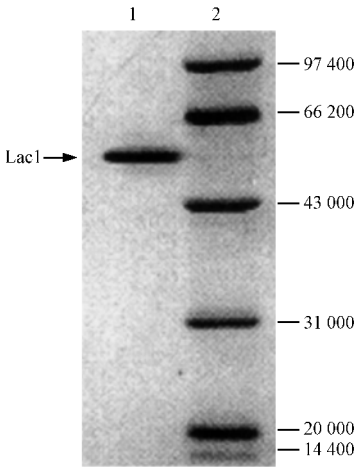


图 1 纯化后漆酶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of purified Laccase
1. Purified laccase 2. Molecular weight markers.

2.2 漆酶的部分酶学性质

2.2.1 分子量 :由 SDS-PAGE 法测得,漆酶亚基分子量为 60.3kD。由质谱法测得该酶的分子量为 55.94kD。表明该酶为单体酶。

2.2.2 最适反应温度及热稳定性 :实验结果表明,酶的最适反应温度为 65℃;酶在 35℃ 保温 2h 残留 90% 活力,45℃ 保温 1.5h 残留 70% 活力,55℃ 保温 1h 残留 40% 活力。

2.2.3 最适反应 pH 及 pH 稳定性 :实验结果可知,该酶的最适反应 pH 为 2.2 ~ 2.8;该酶在 pH3.0 ~ 8.0, 25℃ 保温 1h 酶活力损失 14%,在 pH5.0 ~ 9.5,25℃ 保温 16h 酶活力损失 12%,说明该酶在 pH3.0 ~ 9.5 之间比较稳定。

2.2.4 等电点测定 漆酶的等电点 pI 为 4.0(室温)。

2.2.5 动力学常数测定 :该酶在 25℃ 下以 ABTS 为底物的 K_m 为 17.5 μ mol/L。

2.2.6 含糖量测定 :该酶的含糖量为 49.2%。其含糖量较高,是一种典型的糖蛋白。

2.2.7 N-末端氨基酸序列测定 :纯化后漆酶的 N-末端氨基酸序列为 Ala-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Asp-Leu。

2.2.8 金属离子对漆酶活性的影响 :铜离子对漆酶活性有明显的促进作用,这与 Kurtz 和 Champe 的结果相一致^[14]。而锰离子和银离子对酶活无明显影响,亚铁离子完全抑制漆酶的活性。

2.2.9 抑制剂对漆酶活力的影响 :DTT 和 NaN_3 在所试浓度下都完全抑制漆酶的活性,而 EDTA 只在高浓度(100mmol/L)完全抑制酶活性,低浓度时对酶活影响不大。

2.2.10 漆酶的选择性化学修饰 :NBSF、N-AI、DEPC、PCMB 和双氧水在所试的浓度下,对漆酶的活力没有影响。说明酪氨酸、组氨酸、巯基都不是酶活力的必需基团,DEPC 在修饰过程中引起的酶的部分钝化,可能是修饰了必需基团以外的组氨酸残基而间接地引起酶分子构象改变之故。

Koshland 试剂对漆酶的活力影响比较大(见图 2),色氨酸可能是酶活力的必需基团。

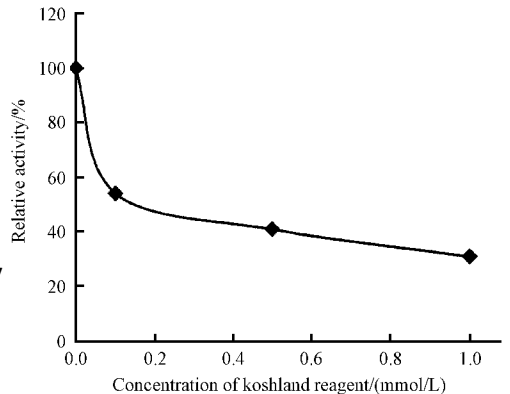


图 2 Koshland 试剂对漆酶活力的影响

Fig.2 The effect of Koshland reagent on laccase

3 讨论

漆酶多数是以同工酶形式分泌到细胞外的^[15,16],本实验所研究的菌株产生两种同工酶 Lac1 和 Lac2,这可由 ABTS 活性染色图证实(文中未标出)。我们发现这两种同工酶的相对含量受培养时间和培养基成分的影响较大。本文报道的漆酶的粗酶液中含有 Lac1 和 Lac2 两种组分,所以纯化后的 Lac1 活力回收率相对较低。关于 Lac2 的纯化、性质及其与 Lac1 的性质比较研究正在开展之中。

多数真菌胞外漆酶是糖蛋白^[17,18]。本文报道的漆酶同样是糖蛋白,含糖量达 49.2%。由于其含糖量较高,相对较少的 SDS 分子结合在蛋白质分子上,降低了荷质比,从而影响了其在 SDS-PAGE 中的迁移率,因而测出的分子量(60.3kD)高于 MALDI-TOF 质谱法所测的分子量(55.94kD)。

N-末端序列的测定有助于漆酶基因的克隆,现已测得漆酶 Lac1 的 N-末端氨基酸序列是 AIGPVTDL。它具有担子菌的保守序列 I-G-P。通过与已报道的多种真菌漆酶相比较,我们发现,它与其它多种菌株产生的漆酶有较高的同源性,如与 *Ceriporiopsis subvermispora* 同源性为 100%,与 *Pycnoporus cinnabarinus* 和 *Dichomitus squalens lc1 & lc2* 同源性为 87.5%,与 *Coriolus hirsutus* 和 *Trametes versicolor I* 同源性为 75%,而与 *Rigidoporus lignosus(D)* 完全没有同源性。尽管与 *Ceriporiopsis subvermispora* 的同源性为 100%,但两者的氨基酸组成以及许多性质(如分子量、等电点、最适温度、最适 pH、含糖量等)都存在明显差异,说明 Lac1 可能是新酶、新基因。

该酶最适反应 pH 在 2.2~2.8,这可能依赖于专一性底物的使用^[19]。其它多数真菌漆酶最适反应 pH 在 4~6 之间,最适反应温度在 30℃~60℃,而本漆酶最适反应温度在 65℃,这些特点表明该酶可在较酸和较高温度的环境中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Yoshida H. Chemistry of Lacque(Urusht)part 1. *J Chem Soc* ,1883 **A3** :472 ~ 486.
- [2] Bertrand G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. C. R. Hebd Seances. *Acad Sci* ,1987 **123** :463 ~ 465.
- [3] Laborde J. Sur la casse des vins. C. R. Hebd Seances. *Acad Sci* ,1896 **123** :1074 ~ 1075.
- [4] Givaudan A, Effosse A, Faure D, et al. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccases in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol lett* ,1993 **108** :205 ~ 210.
- [5] R. Loitie. Laccase in copper proteins and copper enzymes, Vol 3. Boca Raton Fla: CRC Press Inc. 1984. 1 ~ 35.
- [6] 钞亚鹏,叶军,钱世钧.担子菌组成型漆酶产生特性的研究.微生物学报,2000 **40**(6):628 ~ 632.
- [7] Robert Bourbonnais, Michael G Paice. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* in the presence of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and biotechnology* ,1992 **36**(6):823 ~ 827.
- [8] O H Lowry, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* ,1951 **193** :265 ~ 275.
- [9] 夏其昌.蛋白质化学研究技术与进展.北京:科学出版社,1997. 102 ~ 107.
- [10] 张树政,孟广震,何忠效,等.酶学研究技术(上册).北京:科学出版社,1987. 86 ~ 98, 277 ~ 280.
- [11] 丁少军,宋美静.云芝漆酶的培养和分离纯化的研究.纤维素科学与技术,1998 **4**(3):16 ~ 20.
- [12] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生物化学实验方法和技术.第二版.北京:高等教育出版社,1997. 111 ~ 116.
- [13] 钱世钧,郝凤兮,孟广震.大肠杆菌 AS1.375 L-天门冬酰胺酶的选择性化学修饰.微生物学报,1984 **24**(4):352 ~ 356.

- [14] Kurtz M B ,Champe S P. Purification and characterization of the conidial Laccase of *Aspergillus nidulans* . *J Bacteriol* ,1982 , **15** :1138 ~ 1345.
- [15] Cheung D S M ,Marshall K C. Antigenic and some kinetic properties of three p-diphenol oxidase isoenzymes of *Trametes versicolor* . *Biochim Biophys Acta* ,1969 ,**178** :177 ~ 180.
- [16] Rehman A U ,Thurston C F. Purification of laccase I from *Armillaria mellea* . *J Gen Microbiol* ,1992 ,**138** :1251 ~ 1257.
- [17] Wood D A. Production ,purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* . *J Gen Microbiol* ,1980 ,**117** :327 ~ 338.
- [18] Eggert C ,Temp U ,Eriksson K E L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* :purification and characterization of the laccase . *Appl Environ Microbiol* ,1996 ,**62** :1151 ~ 1158.
- [19] Fukushima Y ,Kirk T K. Laccase component of the Ceriporiopsis subver-mispora lignin-degrading system . *Appl Environ Microbiol* ,1995 ,**61** :872 ~ 876.

Purification and Properties of Laccase from *Basidiomycete*

Liu Shuzhen Qian Shijun

(*Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China*)

Abstract : Laccase produced by *Basidiomycete* was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of ammonium sulfate precipitation ,DEAE-cellulose and hydrophobic interaction column chromatography . Purification of about 318.4 fold was achieved with an overall yield of 18.6% . Its molecular weight was estimated to be about 60.3kD by SDS-PAGE ,and that of it was 55.94kD by mass spectrum . The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 65°C and 2.2 ~ 2.8 respectively . The isoelectric point was 4.02 (room temperature) . Its N-terminal sequence was AIGPVTDL . The carbohydrate content was 49.2% by the phenol-sulfuric acid method . Michaelis constant of the enzyme for ABTS was 17.5μmol/L . The enzyme activity was stable under 45°C and in the pH range of 3.0 ~ 9.5 . The activity was enhanced by Cu²⁺ ,and was strongly inhibited by Fe²⁺ . While Mn²⁺ and Ag⁺ had no effect on laccase activity . Dithiothreitol and sodium azide inhibited completely the activity . Trp was possible essential residue for enzyme activity .

Key words : *Basidiomycete* ,Laccase ,Purification ,Properties

新 书 简 介

由中国科学院田波院士作序 ,浙江大学洪 健、李德葆、周雪平教授主编的《植物病毒分类图谱》一书由科学出版社出版 . 全书以国际病毒分类委员会(ICTV)的病毒分类第七次报告为依据 ,充分吸收国内外大量植物病毒文献资料 ,结合作者多年的研究成果编写而成 . 系统描述了植物病毒 15 科、72 属及植物病毒卫星和类病毒的形态结构、基因组特征、抗原特性、细胞病理、生物学特性等 . 全书共 40 余万字 ,136 版电镜照片 ,文字精炼 ,内容丰富 ,图文并茂 ,是病毒学、植物病理学、生物学、农学、植物检疫、电镜专业工作者以及大专院校师生和农业科技人员的重要参考书 .

精装本定价 110 元 ,欲购书者可与浙江大学生物技术研究所洪健联系 ,款到即寄书和发票 . 联系地址 杭州市凯旋路 268 号浙江大学华家池校区 邮编 310029 电话 0571 - 86971179 E-mail jhong@zju.edu.cn