

变色栓菌锰过氧化物酶同工酶的纯化及其性质研究

张连慧^{1,2} 杨秀清¹ 葛克山² 钱世钧^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要 变色栓菌(*Trametes versicolor*)胞外产酶培养液经硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose DE52 离子交换柱层析后,获得两个活性组分 D1 和 D2,其中活性组分 D2 经 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水层析后,所得样品 MnP1 经 SDS-PAGE 检测已达到电泳纯。活性组分 D1 经 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水层析、Sephacryl S-200HR 凝胶过滤层析后,所得样品 MnP2 经 SDS-PAGE 检测已达到电泳纯。两种同工酶 MnP1 及 MnP2,各自的比活力为 579.09、425.00U/mg,纯化倍数为 17.51、12.85;活力回收率为 6.17%、2.47%。由 SDS-PAGE 法测得 MnP1 及 MnP2 的表观分子量分别为 46.3kD、43.0kD。两种同工酶催化 DMP [2,6-二甲氧基酚]氧化反应的最适 pH 值及最适反应温度有所不同,最适 pH 值分别为 pH5.8、pH6.2,最适反应温度分别为 60℃、65℃。在 45℃ 以下, pH4.0~7.0 之间, MnP1 及 MnP2 的稳定性好。DMP 为最佳酶促反应底物,以 DMP 为底物的 K_m 分别为 13.43 μ mol/L、12.45 μ mol/L。在无 Mn^{2+} 存在的条件下,酶促反应几乎不发生。EDTA 在较高浓度时抑制酶的活性,DTT 在所试浓度下都完全抑制酶的活性。

关键词 变色栓菌,锰过氧化物酶,纯化,性质

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0711-05

木质素是由天然芳香族化合物前体通过自由基缩合反应形成的以苯丙烷结构为单元、高度分枝的高分子无定形聚合物。木质素主要存在于细胞壁中,占植物细胞化学组成的 15%~30%,可有效阻止微生物对植物的攻击,因此木质素属于自然界中较难生物降解的物质。但木质素是自然界中仅次于纤维素的最为丰富的有机物,所以其生物降解在自然界的碳循环中起着十分重要的作用,成为自然界碳素循环的限制步骤。研究发现锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP; E. C 1.11.1.13)对木质素的降解起着关键性作用^[1]。木材的衍生物——褐煤是一种应用价值低的劣质煤,工业应用价值不高。但利用微生物转化技术生产腐殖酸,尤其是低分子量、高生物活性的黄腐酸正成为国际研究的热点, MnP 在褐煤的生物转化过程中起重要作用。MnP 在生物制浆、纸浆的酶法漂白、有机污染物的降解和环境的生物修复领域也有重要用途。

目前,国内对 MnP 的研究报道较少^[2,3],还没有关于 MnP 的纯化及性质研究报道。本实验室已筛选到一株产 MnP 的菌株——变色栓菌(*Trametes versicolor*),对该菌产 MnP 的培养条件已进行了优

化,本文对 MnP 的分离纯化及性质进行了研究,为该酶的应用打下一定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 变色栓菌(*Trametes versicolor*)由本实验室筛选并保存。培养基(1)综合 PDA 培养基^[4](2)产酶基础培养基:每升含葡萄糖 10.0g, KH_2PO_4 2.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g, 琥珀酸 1.18g, 酒石酸铵 1.84g, V_{B1} (100mg/L)10mL, 微量元素溶液 70mL, 吐温 80 0.5mL, pH 值为 5.0, 微量元素混合液:每升含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.5g, NaCl 1.0g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $CoCl_2$ 0.1g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.1g, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 10mg, H_3BO_3 10mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 10mg。

1.1.2 主要试剂和仪器: DMP [2,6-dimethoxyphenol], ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)], 牛血清白蛋白(BSA), 丙烯酰胺(Sigma 公司); DEAE-cellulose DE52 (Whatman 公司); Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow, Sephacryl S-200HR (Pharmacia 进口分装); 甲叉双丙

基金项目 国家 863 计划 (2001AA24161)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62651598, E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介 张连慧(1977-),女(满),辽宁营口人,硕士研究生。E-mail: jianhui@163.com

收稿日期 2005-03-03,修回日期 2005-06-29

烯酰胺(Koch-light 公司);SDS(十二烷基硫酸钠)(Serva 公司);低分子量蛋白 Marker(北京天为时代科技有限公司);其余常用试剂均为市售国产试剂。721 分光光度计(上海第三分析仪器厂);冷冻离心机(HITACHI);pH 计(Cole Parmer);pole 浓缩仪(颇尔过滤器北京有限公司);层析柜、梯度混合器(LKB 公司);UHP-43 小型浓缩仪(Pharmacia 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);TS-2000 脱色摇床(北京新技术应用研究所)。

1.2 培养方法

500mL 三角瓶中装液体培养基 100mL,接入 7 日龄平板菌种 10 片(ϕ 8mm),280r/min 于 30℃ 恒温振荡培养。

1.3 酶活力的测定方法

1.3.1 粗酶液的制备 经检测确定锰过氧化物酶为胞外酶,所以取上述培养液 10000r/min 离心 10min,上清液即为粗酶液。

1.3.2 测定方法 参照文献 [5]。

1.4 蛋白含量的测定

按 Bradford 法^[6]测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白为标准,绘制标准曲线。

1.5 SDS-PAGE 分析

具体步骤参照文献 [7],分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%。

1.6 酶的分和纯化

1.6.1 粗酶液的浓缩 在冰浴条件下将粗酶液经 Pole 浓缩仪浓缩,所用的滤膜是 10kD 孔径的膜。

1.6.2 硫酸铵沉淀 在 4℃ 条件下,将硫酸铵粉末边搅拌边缓慢加入到上述经浓缩的粗酶液中,收集 40% 至 95% 饱和度的沉淀部分,沉淀溶解于 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液,用最小体积溶解沉淀。

1.6.3 透析 将上述溶液对 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液透析。将透析后的溶液 10000r/min 冷冻离心机离心 30min,将上清液收集。

1.6.4 DEAE-cellulose DE52 柱层析 在 4℃ 条件下,将上述收集的上清液加至已用 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 DEAE-cellulose DE52 层析柱(ϕ 2.6cm \times 30cm)上。继续用 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液洗柱,然后改用含 0 ~ 1.0mol/L NaCl 的 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液梯度洗脱,洗脱完毕后进行蛋白含量、MnP 活力的测定,并结合 SDS-PAGE 检测蛋白区带情况,合并蛋白条带相似并具有活性的组分。

1.6.5 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水柱层析 上

述所得的活性组分经浓缩、硫酸铵浓度调节后加到已用含 1.0mol/L 硫酸铵的 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水层析柱(ϕ 1.0cm \times 20cm),继续用含 1.0mol/L 硫酸铵的 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液洗柱,然后改用含 1.0 ~ 0mol/L 硫酸铵的 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液逆梯度洗脱。活性组分处理方法同上。

1.6.6 Sephacryl S-200HR 凝胶过滤层析 上述所得的活性组分经浓缩后用 pH7.2、20mmol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 Sephacryl S-200HR 层析柱(ϕ 1.6cm \times 90cm),然后用同样的缓冲液洗脱。活性组分处理方法同上。

1.7 酶学性质

1.7.1 表观分子量的测定 采用 SDS-PAGE 方法,根据已知分子量(M_r)的标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R_f ,作 R_f -Log M_r 图,求得 MnP 分子量。

1.7.2 最适反应温度和热稳定性 在不同温度下按照标准方法测定酶活力,以酶活力最高者为 100%。酶液在 30℃、45℃、55℃、65℃ 下分别保温 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h、3.5h、12h、24h,迅速冷却至室温,按上述方法测残余酶活力,以未保温的酶液的酶活力为 100%。

1.7.3 酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性 将酶液分别加在不同 pH(pH2.2 ~ 7.0)的缓冲液中,按标准方法测酶活力,以酶活力最高者为 100%。将酶液用不同 pH(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力为 100%。

1.7.4 动力学常数的测定 在不同底物(DMP)浓度的反应体系中,30℃ 反应 5min,测定 OD_{469} ,以计算酶反应的初速度,作 Lineweaver-Burk 双倒数图。

1.7.5 底物特性的测定 分别以 DMP、ABTS、愈创木酚、邻苯二胺为底物(各底物的摩尔浓度相同)的反应体系中加入一定量的酶液,30℃ 水浴 10min,测定它们的吸光值(λ 值分别为 469nm、436nm、450nm、440nm)在 10min 内的变化。

1.7.6 糖含量测定(硫酸-酚法) 参照文献 [8] 进行,以葡萄糖为标准。

1.7.7 金属离子对 MnP 活力的影响 在酶反应体系内加入不同的金属离子,30℃ 下保温 5min,测 A_{469} ,各种金属离子的终浓度分别为 0.1mmol/L、1mmol/L。以不含金属离子的反应液为对照。

1.7.8 Mn^{2+} 浓度对 MnP 活力的影响 在反应体系内

加入不同浓度的 Mn^{2+} 离子, 30℃保温 5min 测 A_{469} 。

1.7.9 DTT、EDTA 等物质对 MnP 活力的影响 :在酶反应体系内加入 DTT、EDTA 等物质, 30℃下保温 5min 测 A_{469} , 各物质的终浓度分别为 0.5mmol/L, 2mmol/L。以不加入这些物质的反应液为对照。

2 结果和分析

2.1 锰过氧化物酶的纯化

经 DEAE-cellulose DE52 离子交换柱层析后, 获得两个活性组分 D1 和 D2, 洗脱曲线见图 1, 其中活性组分 D2 经 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水层析后, 所得样品 MnP1 比活力为 579.09U/mg, 纯化倍数

17.51, 活力回收率为 6.17%, 该样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 2), 表明纯化后的 MnP1 为单一组分, 已达到电泳纯。

活性组分 D1 经 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 疏水层析后, 所得组分(命名为 P)经 SDS-PAGE 检测显示两条蛋白带。组分 P 经 Sephacryl S-200HR 凝胶过滤层析后, 所得样品 MnP2 比活力为 425.00 U/mg, 纯化倍数 12.85, 活力回收率为 2.47%, 该样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 2)。表明纯化后的 MnP2 为单一组分, 已达到电泳纯(表 1)。根据上述纯化结果初步推测 MnP1、MnP2 是两种 MnP 的同工酶, 其中 MnP1 是主要的同工酶。

2.2 锰过氧化物酶的部分酶学性质

2.2.1 分子量 :采用 SDS-PAGE 法测定 MnP1 及 MnP2 的分子量。以标准蛋白分子量的对数对其迁移率作图, 求得 MnP1 及 MnP2 的表观分子量分别为 46.3kD, 43.0kD(图 2)。

2.2.2 最适反应温度和热稳定性 :从图 3 可看出 MnP1 及 MnP2 的最适反应温度有所不同, 分别为 60℃, 65℃。MnP1 在 30℃保温 24h, 残留 92.3% 活力, 45℃保温 24h 残留 51.4% 活力, 55℃保温 3.5h 残留 37.2% 活力, 保温 12h, 酶活力全部消失, 65℃

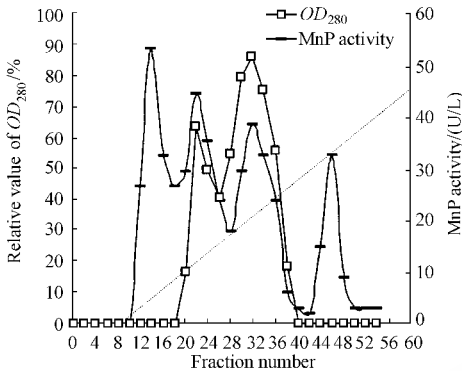


图 1 DEAE-Cellulose DE52 柱层析

Fig.1 DEAE-Cellulose DE52 column chromatography

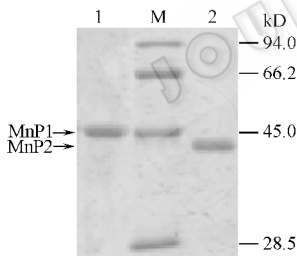


图 2 纯化后的 MnP1 和 MnP2 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE pattern of purified MnP1, MnP2

M. Molecular weight markers; 1. Purified MnP1; 2. Purified MnP2.

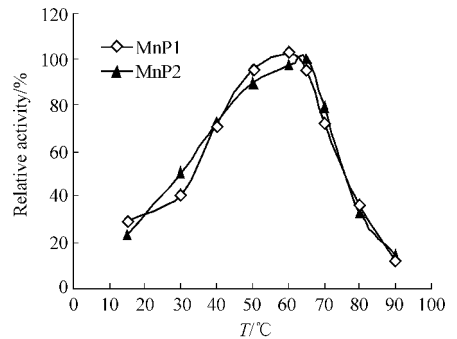


图 3 温度对 MnP1, MnP2 活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on MnP1, MnP2 activity

表 1 MnP 的纯化总表

Table 1 A summary of MnP purification

| Purification steps | Total activity/U | Total protein/mg | Specific activity(U/mg) | Purification fold | Yield /% |
|-------------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|-------------------|----------|
| Crude enzyme | 5160.00 | 156.00 | 33.08 | 1.00 | 100 |
| Concentration | 4841.20 | 111.15 | 43.56 | 1.32 | 93.82 |
| Ammonium sulfate Precipitation | 2832.00 | 61.20 | 46.27 | 1.40 | 54.88 |
| DEAE-cellulose (D1) | 772.00 | 6.20 | 124.52 | 3.76 | 14.96 |
| DEAE-cellulose (D2) | 1015.00 | 4.60 | 228.26 | 6.90 | 20.35 |
| Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow(P) | 192.48 | 0.86 | 222.78 | 6.74 | 3.73 |
| Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow(MnP1) | 318.50 | 0.55 | 579.09 | 17.51 | 6.17 |
| SephacrylS-200HR(MnP2) | 127.50 | 0.30 | 425.00 | 12.85 | 2.47 |

保温 0.5h, 酶活力就全部消失。MnP2 的热稳定性较 MnP1 稍好。所以从整体情况来看, 变色栓菌锰过氧化物酶的热稳定性较好。

2.2.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性: MnP1 及 MnP2 的最适反应 pH 值也略有差异, MnP1 的最适反应 pH 值为 6.2; MnP2 的最适反应 pH 值为 5.8(图 4)。MnP1 在 pH4.0~7.0, 25℃ 保温 1h 酶活力损失 20% 左右, 25℃ 保温 16h 酶活力损失 30% 左右。说明 MnP1 在 pH4.0~7.0 范围内比较稳定, MnP2 的 pH 稳定性与 MnP1 基本相似。

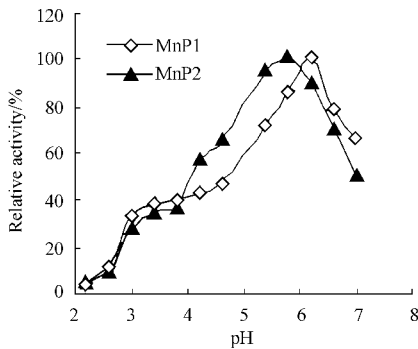


图 4 pH 对 MnP1, MnP2 活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on MnP1, MnP2 activity

2.2.4 动力学常数的测定: MnP1 和 MnP2 在 30℃ 下以 DMP 为底物的 K_m 分别为 13.43 $\mu\text{mol/L}$, 12.45 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.5 底物特性的测定: 吸光值的变化表明 MnP1 及 MnP2 均可与 DMP、ABTS、愈创木酚、邻苯二胺 4 种底物作用, 但在 10min 内 DMP 显色反应最为灵敏且明显, ABTS 颜色变化也较明显, MnP2 分别以 DMP、ABTS 为底物, 吸光值差别不大。愈创木酚、邻苯二胺较 DMP、ABTS 颜色变化较慢。所以 DMP 为较理想的底物。

2.2.6 糖含量测定(硫酸-酚法): 本实验检测 MnP1 及 MnP2 的含糖量分别为 3.89%、3.34%。

2.2.7 金属离子对 MnP 活力的影响: Fe^{2+} , Fe^{3+} 在较高浓度(1.0mmol/L)下对 MnP1 及 MnP2 活力有明显的抑制作用, Fe^{2+} 的抑制作用明显。实验浓度下 Zn^{2+} 对 MnP1 及 MnP2 活力均表现出促进作用, 而 Mg^{2+} 则在较高的浓度(1.0mmol/L)下才对 MnP1 及 MnP2 活力表现出促进作用。在较低的浓度下(0.1mmol/L), 大部分金属离子对 MnP1 及 MnP2 活力的影响不大。

2.2.8 Mn^{2+} 对 MnP 活力的影响: 从图 5 可看出, 在无 Mn^{2+} 存在的条件下, 酶促反应几乎不发生, 而加入 Mn^{2+} 反应才得以进行, Mn^{2+} 浓度在 8mmol/L 左

右相对酶活力较高, 而继续增加 Mn^{2+} 浓度, Mn^{2+} 的促进作用不明显。

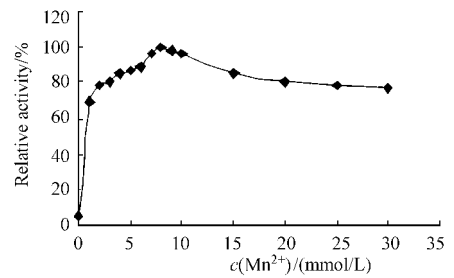


图 5 Mn^{2+} 对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of Mn ions on MnP1, MnP2 activity

2.2.9 DTT、EDTA 对 MnP 活力的影响: DTT 作为一种还原剂在所试浓度下都完全抑制酶的活性, 初步分析是 DTT 打开了酶分子中胱氨酸内的二硫键, 使酶钝化失活。而 EDTA 只有在较高浓度时抑制酶的活性, 低浓度时影响不大。

3 讨论

锰过氧化物酶多数是以同工酶的形式分泌到胞外的, 如白腐真菌(*Ceriporiopsis subvermispora*) 同时分泌 11 种同工酶到胞外^[9]。本文的研究是在对 *Trametes versicolor* 进行优化培养的基础上完成的。由于 MnP 是一种胞外酶, 粗酶液中其浓度相对较低。因此需要粗酶液量较大, 浓缩及硫酸铵沉淀时间较长, 又受操作环境温度的影响, 酶活力损失较大, 酶活力回收较低。

经纯化得到锰过氧化物酶的同工酶 MnP1 和 MnP2, 两种同工酶分子量差别不大(46.3kD, 43.0kD), 目前纯化出的 MnP 分子量多数在 45kD 左右^[10, 11]。两种同工酶都表现很好的热稳定性, 锰过氧化物酶的易生产性及对温度、pH 值的稳定性已得到证实^[12, 13]。从本文对酶的性质研究来看, 两种同工酶的各种性质差别不大。

锰过氧化物酶可以以酚类物质为底物, 如 DMP 和愈创木酚等。目前研究发现, 锰过氧化物酶也可以作用于非酚类物质^[14-16], 这依赖于菌种及培养条件的不同。需要说明的是上面提到的酶促反应均是在 Mn^{2+} 存在的条件下发生的, 无 Mn^{2+} 存在的条件下, 酶促反应几乎不发生。 Mn^{2+} 是木材中天然存在的金属离子, 并参与白腐菌的木质素降解过程。 Mn^{2+} 不仅可以作为 MnP 的反应底物及催化过程的传播中介, 同时还可以在 MnP 生产过程中通过诱导基因转录来调整 MnP 生产。在酶促反应过程中起着至关重要的作用。

也有实验结果证明 MnP 能够在无 Mn^{2+} 存在的条件下氧化酚类底物,目前已报道的白腐真菌有 *Phanerochaete ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera*。但若在 Mn^{2+} 存在的条件下,氧化反应的速度会大大加快^[17]。

参 考 文 献

[1] Hofrichter M. Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microb Technol* , 2002 , **30** :454 - 466 .
 [2] 桑希斌,王宜磊. 采绒革盖菌锰过氧化物酶的诱导及部分特性研究. 山东师范大学学报(自然科学版) 2002, **17**(2) :76 - 78 .
 [3] 谢慧芳,近藤隆一郎,李志正. 白腐菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 产锰过氧化物酶的生产及初步纯化. 林产化学与工业, 2003, **23**(4) :22 - 26 .
 [4] 范秀容,李广武,沈萍. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社, 1992 :262 .
 [5] Martinez M J , Ruiz-Duenas F J , Guillen F , et al . Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii* . *Eur J Biochem* , 1996 **237** :424 - 432 .
 [6] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding . *Anal Biochem* , 1976 **72** :248 - 254 .
 [7] 卢圣栋主编 . 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京协和医科大学出版社, 1999 :382 - 386 .
 [8] 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 .

[9] Urzua U , Larrondo L F , Vicuna R , et al . Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora* . *FEBS Letters* , 1995 , **371** :132 - 136 .
 [10] Hatakka A . Biodegradation of lignin . In : Hofrichter M , Steinbuechel A . ed . Biopolymers . Lignin , humic substances and coal . Weinheim . Germany : Wiley-VCH , 2001 **1** :129 - 180 .
 [11] Hatakka A . Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : production and role in lignin degradation . *FEMS Microbiol Rev* , 1994 **13** :125 - 135 .
 [12] Grabski A C , Grimek H J , Burgess R R . Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn^{2+} -chelates as a chemical oxidant of chlorophenols . *Biotechnol Bioeng* , 1998 **60** :204 - 215 .
 [13] Okazaki S , Goto M , Furusaki S , et al . Preparation and catalytic performance of surfactant-manganese peroxidase-Mn^{II} ternary complex in organic media . *Enzyme Microb Technol* , 2001 **28** :329 - 332 .
 [14] D'Annibale A , Crestini C , Di Mattia E , et al . Veratryl alcohol oxidation by manganese- dependent peroxidase from *Lentinus edodes* . *J Biotechnol* , 1996 **48** :231 - 239 .
 [15] Bao W , Fukushima Y , Jensen K A , et al . Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase . *FEBS Lett* , 1994 **354** :297 - 300 .
 [16] Kapich A , Hofrichter M , Hatakka A . Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins . *Biochem Biophys Res Commun* , 1999 **259** :212 - 219 .
 [17] Giardina P , Palmieri G , Fontanella B , et al . Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust . *Arch Biochem Biophys* , 2000 **376** :171 - 179 .

Purification and properties of manganese peroxidase from *Trametes versicolor*

ZHANG Lian-hui^{1,2} YANG Xiu-qing¹ GE Ke-shan² QIAN Shi-jun^{1*}

(¹ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² College of Food Science and Nutritional Engineering of China Agricultural University , Beijing 100083 , China)

Abstract : Two manganese peroxidase (MnP) active fractions D1 and D2 were got from the extracellular culture of *Trametes versicolor* by using ammonium sulfate precipitation , DEAE-cellulose DE52 chromatography . MnP1 was purified to electrophoretic homogeneity from the D2 by Phenyl SepharoseTM 6 Fast Flow chromatography and MnP2 was purified to electrophoretic homogeneity from the D1 by Sephacryl S-200HR chromatography and Phenyl SepharoseTM 6 Fast Flow chromatography . The specific activities of two MnP isozymes are 579.1U/mg and 425.0U/mg ; purification folds are 17.51 and 12.85 and the yields are 6.17% and 2.47% , respectively . MnP1 and MnP2 have approximate molecular masses of 46.3kD and 43.0kD respectively , as determined by SDS-PAGE . The isoenzymes differed in optimum temperature (60°C and 65°C) and optimum pH (5.8 and 6.2) for oxidation of DMP (2,6-dimethoxyphenol) . MnP1 and MnP2 are stable below 45°C and ranging from pH4.0 to pH7.0 . DMP is the best substrate , the K_m values of MnP1 and MnP2 for DMP are 13.43 μ mol/L and 12.45 μ mol/L respectively . Catalysis doesn't occur in the complete absence of Mn . EDTA inhibites the activities of MnP1 and MnP2 at the higher concentration and DTT inhibites the enzyme activities completely .

Key words : *Trametes versicolor* , Manganese peroxidase , Purification , Properties

Foundation item : Chinese National Program for High Technology Research and Development (2001AA24161)

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-62651598 ; E-mail : qiansj@sun . im . ac . cn

Received date 03-03-2005