

## 红栓菌胞外漆酶的诱导、纯化及部分特性研究

秦小琼\* 傅庭治 曹幼琴 姜建明

(南京大学生物科学与技术系 南京 210093)

**摘 要** 红栓菌(*pycnoporus cinnabarius*)在发酵培养 3d 后出现胞外漆酶活性峰。木素类似物对红栓菌胞外漆酶活性有诱导作用,阿魏酸、香兰素、愈创木酚和 DL- $\beta$ -苯丙氨酸诱导 24h 后,发酵液中漆酶活性分别是对照的 2.8、4.3、3.5 和 1.7 倍。发酵液经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀, Sephadex G-150、DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-25 柱层析纯化后,冷冻干燥。高效液相色谱(HPLC)检测为一单峰,分子量为 26 000,含 17 种氨基酸,氨基酸总量占酶组成的 64.27%。等离子光谱(ICP)分析表明漆酶含有铜。该酶反应的最适温度为 30℃,与邻联苯甲胺反应最适 pH 为 4.0,  $K_m$  值为 385  $\mu\text{mol/L}$ ;与丁香醛连氮反应最适 pH 为 5.8,  $K_m$  值为 833  $\mu\text{mol/L}$ 。

**关键词** 红栓菌,胞外漆酶,诱导

木素(lignin)是植物体内含量仅次于纤维素的一个组份,一般占干重的 20%,木材中含量更高。其基本结构为苯丙烷单元组成的芳香族高分子化合物,很难为大多数生物直接利用,因而造成这一丰富自然资源的巨大浪费。研究木素降解已成为当前关注的重要课题之一。

木素芳香结构的降解异常艰难。生长于木材上的木腐真菌(wood-decaying fungi)能够分解木材以提供其生长发育的碳源,根据它们对纤维素、半纤维素、木素三类结构化合物降解能力的不同可将它们分为白腐菌(white-rot fungi)和褐腐菌(brown-rot fungi),前者在降解纤维素和半纤维素的同时还分解木材中的木素成分,后者只利用木材中的纤维素和半纤维素,留下的芳香族木素在空气中氧化成棕色腐蚀斑。在检测酚氧化酶(phenol oxidase)活性的培养基上,96%的白腐菌呈阳性反应,80%的褐腐菌呈阴性反应<sup>[1]</sup>,可见木素降解与酚氧化酶有着必然联系,实验证明酚氧化酶缺陷型菌株不能降解任何粗木素或木材,而酚氧化酶恢复型菌株则普遍能够降解粗木素和木材中的所有主要成分<sup>[2]</sup>。

漆酶(laccase, EC1.10.3.2)是酚氧化酶中的一种,它是一种含铜的糖蛋白。从它与各种酚类化合物、尤其是丁香醛型化合物的反应中可以肯定其在木素降解中起一定的作用<sup>[3]</sup>。现已发现它能催化木素相关酚类的一电子氧化,形成酚氧基,结果导致  $\text{C}_\alpha$  氧化、芳香基- $\text{C}_\alpha$  断裂以及侧链上  $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$  之间的断裂<sup>[4]</sup>。

研究漆酶的特性,可为提高漆酶活性、降解木素提供一定的科学依据。国外关于漆酶

\* 现地址:中国农业科学院生物技术研究中心,北京100081

本文于 1995 年 5 月 19 日收到。

的研究始于本世纪初,涉及的真菌菌种范围很广,尤以担子菌纲的多孔菌目为多,然而有关红栓菌的漆酶则未见报道。国内在 80 年代曾对漆树漆酶及其在生漆氧化中的作用做过比较详尽的研究,内容涉及漆树漆酶的分离、纯化、固定化<sup>[5,6]</sup>以及漆酶活性的测定方法<sup>[7]</sup>等。在真菌漆酶方面,较多的报道是以漆酶同功酶谱作分类指标<sup>[8]</sup>。本文以红栓菌作材料,探讨了诱导物对红栓菌胞外漆酶的诱导作用,并对其部分理化特性作了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

红栓菌 *Pycnoporus cinnabarius* (Jacq.Fr.)Karst, Syn 由本课题组自行分离纯化得到,并经中国科学院微生物研究所鉴定定名。

### 1.2 试剂

Sephadex G-25、Sephadex G-150、DEAE-Sephadex A-25 为 Pharmacia 公司产品,丁香醛连氮为 Sigma 公司产品。

### 1.3 基本培养基

参照 Malmstrom 等<sup>[9]</sup>和 Leonowicz & Trojanowski<sup>[10]</sup>培养基,筛选出适合于红栓菌的培养基成分如下(g/L):葡萄糖 10,天门冬酰胺 2.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.47,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.45,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001 及  $\text{VB}_1$  50 $\mu\text{g}$ , 高压灭菌后 pH 约 6.0。

### 1.4 方法

1.4.1 样品制备:红栓菌接种量为 15%, 28℃ 恒温液体振荡培养,发酵液先经单层尼龙布过滤,再经滤纸真空抽滤,收集清液 4℃ 贮存。

1.4.2 干重测定:菌丝球 80℃ 烘干至恒重。

1.4.3 漆酶活性的测定:1.5ml 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH5.8)+0.2ml 0.5mmol/L 丁香醛连氮(醇溶)+1.8ml 样品, 30℃ 反应 5min 后于 525nm 处比色,每分钟使  $\text{OD}_{525}$  值改变 0.001 为一个酶活力单位。

1.4.4 蛋白质测定:参照 Bradford 方法<sup>[11]</sup>,以小牛血清蛋白作标准曲线。

1.4.5 红栓菌胞外漆酶的纯化:(1)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀:培养清液经 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀, 4℃ 过夜, 4000r/min 离心 30min, 沉淀用 0.2mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH6.0)溶解。(2) Sephadex G-150 凝胶过滤(2.0×100cm): 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH6.0)平衡、洗脱,收集 280nm 峰,进行酶活性检测。(3) DEAE-Sephadex A-25 柱层析(2.0×60cm): 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH6.0)平衡,用相同缓冲液(NaCl 浓度为 0.2~0.5mol/L)进行梯度洗脱,收集活性部分,进行酶活检测。(4) Sephadex G-25 柱层析(2.0×60cm)脱盐: 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH6.0)平衡、洗脱,收集活性部分。(5) 冷冻干燥(Labconao 型冷冻干燥机)。

1.4.6 分子量测定: Kontron HPLC400 系统, TSK3000SW 柱, 流动相为 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0), 检测波长 280nm, 流速 0.5ml/min。标准蛋白为:  $\alpha$ -淀粉酶(97 600), 小牛血清蛋白(67 000), 卵清蛋白(45 000), 烟草花叶病毒外壳蛋白(17 500), 溶菌酶(13 930)。以保留时间为纵坐标、分子量的对数为横坐标作图, 计算漆酶的分子量<sup>[12]</sup>。

**1.4.7 酶蛋白氨基酸组份分析:**用日立 835-50 型氨基酸分析仪进行。

**1.4.8 铜离子分析:**用等离子光谱(ICP)测定。

**1.4.9 漆酶的动力学特征:**以邻联苯甲胺和丁香醛连氮为底物的反应模式分别为:1ml 1mmol/L 邻联苯甲胺溶液+1ml 50mmol/L 醋酸钠/醋酸缓冲液(pH4.0)+0.2ml 蒸馏水+0.2ml 酶液,反应 5min,于 600nm 比色;0.2ml 0.5mmol/L 丁香醛连氮溶液(醇溶)+1.5ml 50mmol 磷酸缓冲液(pH5.8)+1.8ml 酶液,反应 5min,于 525nm 比色。

## 2 结果和讨论

### 2.1 红栓菌在基本培养基中的发酵

红栓菌胞外漆酶活性在接种后第三天达到最高峰(图 1),此时菌丝生长处于迅速生长期末,培养基 pH 为 3.81,残糖含量为 7.75mg/ml,即葡萄糖消耗量约 20%。在整个培养过程中,pH 由 6.0 降至最低点 3.7,而后又略有回升至 4.0 左右,Rogalski 等利用 *Fomes fomentarius* 发酵培养漆酶时,pH 值也呈现类似的变化<sup>[13]</sup>。从葡萄糖含量与酶活性变化曲线可以看出,漆酶活性在峰值后的下降与培养基中葡萄糖量下降的曲线相平行(在培养的第 4、5、6d 时,葡萄糖消耗量分别达 60%、80%和 90%),由此反映出培养液中漆酶活性的下降可能与可利用的葡萄糖量不足有关。

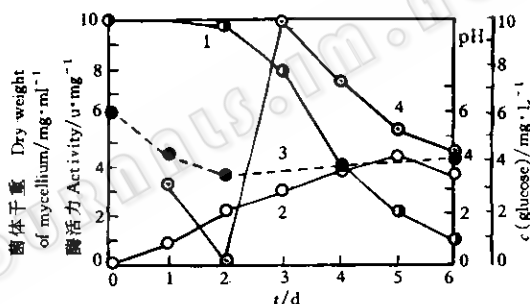


图 1 红栓菌发酵培养中各主要参数的变化

Fig.1 Curves of major parameters during fermentation of *P.cinnabarius*

1.葡萄糖含量 Glucose content; 2.菌丝生长 Mycelium growth; 3.培养基 pH 值 pH of medium; 4.漆酶产量 Laccase activity.

在 *F.fomentarius* 发酵过程中,漆酶活性在 16d 以后才达到最高值,静止培养则更慢<sup>[13]</sup>。Leatham & Stahmann 用香菇作试验时,最早也要 10d 才出现漆酶活性最高峰<sup>[14]</sup>,而红栓菌在接种后 3d 胞外漆酶即达到最高峰,这在已有的文献中还未见报道,因此用红栓菌作为生产漆酶的菌株看来优于以上已报道的菌种。

### 2.2 诱导物种类及其浓度的筛选

四种木素类似物:阿魏酸、香兰素、愈创木酚和 *DL*- $\beta$ -苯丙氨酸都具木素特征性的苯环结构,其中阿魏酸及 *DL*- $\beta$ -苯丙氨酸为木素聚合的中间体。诱导物在接种后第二天即酶活峰出现前加入,继续培养 24h 后收集样品。研究发现,四种诱导物对红栓菌胞外漆酶活性均有不同程度的诱导作用,最适浓度均为  $5 \times 10^{-4}$  mol/L。在此浓度诱导下,红栓菌胞外漆酶活性如表 1 所示,阿魏酸、香兰素、愈创木酚和 *DL*- $\beta$ -苯丙氨酸分别将红栓菌胞外漆酶活性提高至原来的 2.8、4.3、3.5 和 1.7 倍,可见小分子的木素类似物或木素

聚合中间体对降解木素的漆酶有诱导作用。阿魏酸、香兰素、愈创木酚对漆酶的诱导倍数(2.8、4.3、3.5)较  $DL\text{-}\beta\text{-}$ 苯丙氨酸(1.7倍)更为明显,它们之间结构上的差异仅在于前三者的苯环上带有相邻的羟基( $-\text{OH}$ )与甲氧基( $-\text{OCH}_3$ ),而  $DL\text{-}\beta\text{-}$ 苯丙氨酸苯环上则无。由此推测具相邻羟基与甲氧基的苯环结构可能对红栓菌胞外漆酶的诱导效果有促进作用,但对其诱导机理尚需作进一步研究。

表 1 木素类似物对红栓菌胞外漆酶活性的诱导作用

Table 1 Induction of laccase activity of <i>P.cinnabarius</i> by lignin-like substances					
	对照	阿魏酸	香兰素	愈创木酚	$DL\text{-}\beta\text{-}$ 苯丙氨酸
	Control	Ferulic acid	Vallilin	Guaiacol	$DL\text{-}\beta\text{-}$ phenylalanine
$OD_{525}/\text{min}$	0.212	0.594	0.912	0.742	0.360
倍数 fold	—	2.8	4.3	3.5	1.7

Leonowicz & Grzywnocicz 曾用阿魏酸诱导变色栓菌(*Trametes versicolor*)的胞外漆酶,使酶活性达到未经诱导的 2 倍<sup>[15]</sup>,本文的研究发现,香兰素和愈创木酚对红栓菌胞外漆酶的诱导力比阿魏酸更高。在以往文献中尚无类似的报道。

2.3 红栓菌胞外漆酶的纯化

纯化漆酶 HPLC 图谱见图 2,为一单峰,分离纯化结果见表 2,最终纯化倍数为 31.9,回收率 79.8%。

表 2 红栓菌胞外漆酶的纯化

Table 2 Purification of extracellular laccase from <i>P.cinnabarius</i>				
分离步骤	总量	比活力	纯化倍数	回收率
Purification steps	Total amount / ml	Activity / U · ml <sup>-1</sup>	Purification fold	Recovery / %
Culture from fermentation	5000	47	—	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sedimentation	250	935	19.9	99.5
Sephadex G-150	260	894	19.0	98.9
DEA E-Sephadex A-25	130	1472	31.3	81.4
Sephadex G-25	125	1500	31.9	79.8

2.4 红栓菌胞外漆酶的一些基本性质

2.4.1 漆酶的理化特性:用 HPLC 测定红栓菌胞外漆酶全酶的分子量为 26 000(图 3)。不同来源的漆酶分子量差异很大,如构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)漆酶有四种同工酶,分子量分别为 110 000、80 000、55 000、36 000<sup>[16]</sup>,嗜粪子囊菌(*Podospora anserina*)胞外漆酶分子量范围在 340 000~390 000<sup>[17]</sup>等。红栓菌胞外漆酶分子量约 26 000,是一种分子量较小的漆酶。

据 Keilin & Mann<sup>[18]</sup>报道,漆酶是一种铜结合蛋白,本文用 ICP 分析红栓菌胞外漆酶证明其中含有铜离子。

酶蛋白氨基酸组份分析显示红栓菌胞外漆酶含 17 种氨基酸(表 3),总量为 64.27%,折算成氮含量为 8.16%,较之漆树漆酶的氮含量(6.45%)和蛋白质含量(45%)要高<sup>[18]</sup>。

其中含量较多的是天门冬氨酸、丝氨酸和谷氨酸。

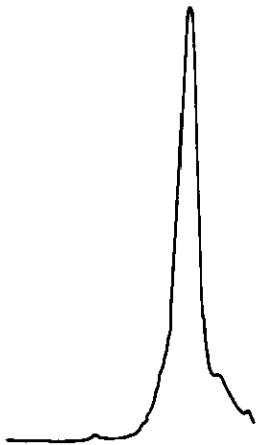


图 2 纯化漆酶的 HPLC 峰  
Fig.2 Purification of  
*P. cinnabarius* laccase by HPLC

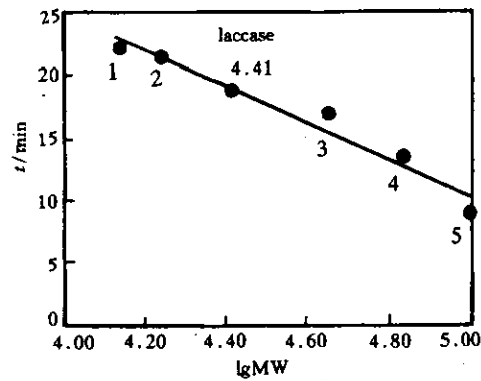


图 3 漆酶的分子量测定  
Fig.3 Detection of laccase molecular weight  
1.溶菌酶 lysozyme; 2.烟草花叶病毒外壳蛋白  
TMV CP; 3.卵清蛋白 Ovalbumin; 4.小牛血清蛋白  
BSA; 5.α-淀粉酶 α-amylase.

表 3 红栓菌胞外漆酶的氨基酸组成

Table 3 Amino acid contents of *P.cinnabarius* extracellular laccase

氨基酸	含量	氨基酸	含量	氨基酸	含量
Amino acid	Content / %	Amino acid	Content / %	Amino acid	Content / %
Asp	5.81	Ser	5.13	Val	4.06
Pro	4.64	Ala	4.54	Met	2.14
Ile	3.02	Tyr	3.64	Lys	3.14
Arg	3.34	Thr	4.02	Glu	5.89
Leu	3.98	Cys	1.29	Gly	4.91
Phe	2.56	His	2.15		

2.4.2 红栓菌胞外漆酶的反应动力学:红栓菌胞外漆酶与丁香醛连氮反应的最适温度为 30℃,当温度为 70℃时,反应速率仅为 30℃时的 48.2%(图 4)。据报道丝核菌漆酶反应的最适温度为 40℃<sup>[19]</sup>,变色栓菌漆酶反应的最适温度为 60℃<sup>[15]</sup>,说明不同来源的漆酶最适反应温度不同。

红栓菌胞外漆酶与邻联苯甲胺和丁香醛连氮反应的最适 pH 分别为 4.0 和 5.8(图 5)。对丁香醛连氮反应的最适 pH 较之对邻联苯甲胺反应的最适 pH 高,这与文献中以其它菌种作材料的结果相似,香菇漆酶以邻联苯甲胺为底物时的最适 pH 约 4.0<sup>[14]</sup>,变色栓菌漆酶对丁香醛连氮反应的最适 pH 为 5.3<sup>[15]</sup>。不同来源的漆酶对这两种底物显示的差异在红栓菌胞外漆酶中得到了相似的反映。在以邻联苯甲胺和丁香醛连氮为底物时的米

氏常数( $K_m$ )分别为  $385\mu\text{mol/L}$  和  $833\mu\text{mol/L}$ , 这表明其对邻联苯甲胺的亲合力大于丁香醛连氮。

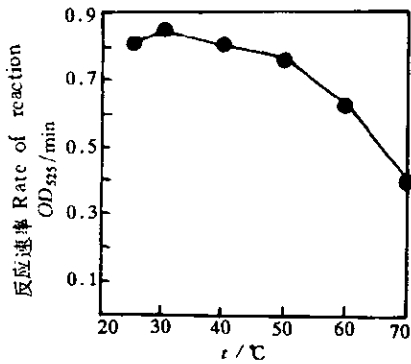


图4 漆酶反应速率与温度的关系  
Fig.4 Relationship between reaction rate and temperature for laccase of *P.cinnabarius*

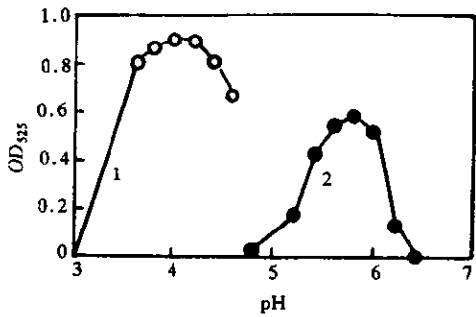


图5 酶反应与 pH 的关系  
Fig.5 Relationship between reaction and pH for laccase of *P.cinnabarius*  
1.邻联苯甲胺 Tolidine,600nm;  
2.丁香醛连氮 Syringaldazine,525nm.

**致谢** 本文在修改过程中得到中国农业科学院生物技术研究中心贾士荣研究员精心指正,仅表谢意。

参 考 文 献

[1] Davidson W R, Campbell W A, Blaisdell D J et al. *J Agricul Res*, 1938, **57**(9): 683~695.  
[2] Ander P, Eriksson K E. *Arch Microbiol*, 1976, **109**: 1~8.  
[3] Kirk T K. *Ann Rev Microbiol*, 1987, **41**: 465~505.  
[4] Kawai S, Umezawa T, Shimada M et al. *FEBS Lett*, 1988, **236**(2): 309~311.  
[5] 李勇富,郭明高.林产化学与工业,1988,**8**(2): 34~39.  
[6] 李勇富,郭明高,郭庆宇.林产化学与工业,1988,**8**(4): 39~44.  
[7] 周易勇,郭明高.林产化学与工业,1987,**7**(4): 41~46.  
[8] 方自若,候文英,郑美媛.真菌学报,1985,**4**(3): 174~179.  
[9] Malmstrom G, Fahraeus G, Mosbach R. *Biochim Biophys Acta*, 1958, **28**: 652~653.  
[10] Leonowicz A, Trojanowski J. *Acta Biochim Polon*, 1975, **22**(4): 291~295.  
[11] Bradford MM. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~251.  
[12] 沈同,王镜岩,赵邦悌.生物化学.第一版.北京:高等教育出版社,1980.139~140.  
[13] Rogalski J, Wojtas-Wasilewska M, Apalovic R et al. *Biotech Bioengin*, 1991, **37**: 770~777.  
[14] Leatham G, Stahmann M A, *J Gen Microbiol*, 1981, **125**: 147~157.  
[15] Leonowicz A, Grzywnowicz K. *Enzyme Microbiol Technol*, 1981, **3**: 55~58.  
[16] Kurtz M B, Champe S P. *J Bacteriol*, 1982, **150**(3): 1338~1345.  
[17] Durrens P. *Arch Microbiol*, 1981, **130**: 121~124.  
[18] Keilin D, Mann T. *Nature*, 1940, **145**: 304.  
[19] Bollag J M, Sjoblad R D, Liu S Y. *Can J Microbiol*, 1979, **25**: 229~233.

## PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR LACCASE FROM *PYCNOPORUS CINNABARIUS*

Qin Xiaoqiong \* Fu Tingzhi Cao Youqin Jiang Jianming

(Department of Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093)

**Abstract** The activity of extracellular laccase reached a peak value three days after inoculation. It was found that the activity of laccase could be induced by ferulic acid, vallilin, guaiacol and *DL*- $\beta$ -phenylalanine to 2.8, 4.3, 3.5, 1.7 times higher than that of the noninduced control, respectively. After  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sedimentation followed by Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-25 chromatography, we obtained purified laccase that showed a single peak on HPLC. The molecular weight of laccase detected by HPLC is 26 000. The *P. cinnabarius* laccase contains 17 kinds of amino acids whose total amounts accounted for 64.27% of the total molecules. ICP analysis indicates that the laccase is a copper-associated protein. The optimal reaction temperature for *P. cinnabarius* laccase is 30°C. With toluidine as substrate, the optimum pH for laccase reaction is 4.0 and  $K_m$  is 385  $\mu\text{mol/L}$ , while for substrate syringaldazine, the data is 5.8 and 833  $\mu\text{mol/L}$ , respectively.

**Key words** *Pycnoporus cinnabarius*, Laccase, Induction

\* Present address: Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081.