

# 白腐真菌漆酶的固定化及其应用研究\*

张书祥 肖亚中 王怡平 张敏

(安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

**摘要:**以尼龙网为载体,戊二醛为交联剂,进行固定化真菌漆酶的条件优化和性质研究,优化条件为:尼龙网在5%的戊二醛溶液中交联6 h后,加入30 U漆酶溶液固定8 h,酶活回收率为50.3%。与游离酶相比,固定化漆酶的热稳定性明显提高,最适pH值略有下降。用该固定化漆酶处理低浓度造纸废水,经过8批次连续试验,酶活保留52%。

**关键词:**尼龙网,固定化,真菌漆酶

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0085-04

## Immobilization of Fungal Laccase on Nylon Net and Application of the Immobilized Enzyme

ZHANG Shu-Xiang XIAO Ya-Zhong WANG Yi-Ping ZHANG Min

(School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039)

**Abstract:** Condition optimization for immobilization of Fungal laccase with Nylon Net and glutaraldehyde and the nature of the immobilized enzyme were studied. The optimum conditions of the immobilization are: Nylon Net is crosslinked with 5% glutaraldehyde 15mL for 6 hours; the 30U laccase is added for immobilization for 8 hours. On this case, the recovery of enzyme activity was 50.3%. Compared with free enzyme, the thermal stability of immobilized enzyme was improved evidently but the optimal pH decreased slightly. 52% enzyme activity of immobilized laccase was hold after 8 cycles treatment with low concentration pulp wastewater.

**Key words:** Nylon net, Immobilization, Fungal laccase

漆酶(Laccase EC1.10.3.2)氧化可分为真菌漆酶,细菌漆酶和漆树漆酶。真菌漆酶主要来源于担子菌纲中的白腐菌类,它能催化多酚、氨基酚等化合物<sup>[1]</sup>,在废水处理、生物漂白、饮料加工等方面具有良好的应用前景<sup>[2]</sup>。真菌漆酶和其他游离酶一样,易受环境条件影响而失活,且难以实现重复利用。固定化漆酶的研究和应用是实现真菌漆酶重复使用和稳定性改善的有效手段,目前,国外对固定化漆酶进行了较深入的研究<sup>[3,4]</sup>。国内有关固定化漆酶的研究鲜见报道。在本文前面的研究中,我们用壳聚糖为载体,戊二醛为交联剂,进行了固定化漆酶及其处理酚类污染物的研究<sup>[5]</sup>。本文选用性能稳定、易大量制备的尼龙网为载体进行试验,并用制备的固定化漆酶处理低浓度造纸废水,为探讨固定化漆酶连续处理废水打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株 *Trametes* sp. AH28-2, 本课题组分离并保存。尼龙网 100 目, 市售。戊二醛

\*国家自然科学基金资助项目(No.30370045)

安徽省优秀青年基金资助项目(No.04043048)

安徽省教育厅重点科研项目(No.2002KJ034z1)

收稿日期:2003-12-22, 修回日期:2004-02-15

(25%) 等其它试剂为国产分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 真菌漆酶的制备：见参考文献 [5]。

1.2.2 固定化程序的选择：选用先戊二醛交联后吸附和先吸附后戊二醛交联的方法进行固定化，分别测定固定化漆酶的酶活。结果表明先交联后吸附的固定化方法效果较好，因此，以下试验均采用此法进行操作。

1.2.3 固定化漆酶的制备：将尼龙网剪成 1 cm × 1 cm 大小的方块，用含 19% CaCl<sub>2</sub>、19% 水的甲醛溶液处理 15 min，洗净后吸干，于 5 mol/L HCl 中水解 40 min，洗至 pH 中性，吸干<sup>[6,7]</sup>，用 3% ~ 8% 戊二醛交联后，加入适量漆酶液固定，用缓冲液轻洗，得到固定化漆酶。

1.2.4 酶活的测定：游离酶活测定：以愈创木酚为底物，在 4 mL 50 mmol/L (含 1 mmol/L 愈创木酚) 琥珀酸缓冲液 (pH 4.5) 中加入 1 mL 适当稀释的酶液，混合均匀后置于 25℃ 水浴保温反应 30 min，于 465 nm 处测定光吸收值。愈创木酚消光系数为  $\epsilon = 12,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ，定义上述条件下，每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物所需的酶量为一个酶活力单位。固定化酶酶活的测定：取适量固定化酶与上述底物混合，同样条件下反应，反应液在 465 nm 处测光吸收。固定化酶的催化能力 (酶活) 用每克载体的酶活单位 (U/g) 表示。

1.2.5 固定化漆酶处理低浓度造纸废水的研究：将 5 g 固定化漆酶装入 1 L 的玻璃反应器中，用硅胶管将反应器与储液瓶、恒流泵相连，构成循环的反应装置 (图 1)。储液瓶内装经预处理的低浓度造纸废水，共进行 8 个批次运行试验。分别测定每批废水循环后固定化漆酶的酶活。

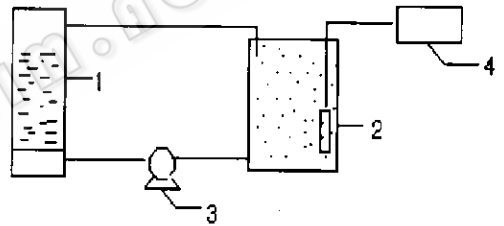


图 1 固定化漆酶反应装置示意图

1 玻璃反应器, 2 储液瓶, 3 恒流泵,  
4 空气泵

## 2 结果

### 2.1 漆酶固定化条件优化选择

2.1.1 戊二醛浓度的确定：15 mL 3%，4%，5%，6%，7%，8% 浓度梯度的戊二醛溶液中各加入 1 g 尼龙网，交联过夜后，将交联后的尼龙网分别加到适量的漆酶溶液中，于 4℃ 冰箱静置吸附一夜，制备固定化漆酶，测定固定化漆酶的酶活，结果表明，当戊二醛浓度为 5% 时，固定化漆酶活力回收较高。

2.1.2 戊二醛交联时间的选择：在 6 个装有 1 g 尼龙网载体的平皿中分别加入 15 mL 5% 戊二醛，交联时间分别为 2 h，4 h，6 h，8 h，10 h，12 h。其余同上法操作，测定结果表明，当戊二醛交联 6 h 固定化漆酶活力较高。

2.1.3 固定化漆酶时间的选择：在 6 个装有 1 g 尼龙网载体的平皿中分别加入 15 mL 5% 戊二醛，均交联 6 h 后，将交联后的尼龙网分别加入到适量的漆酶溶液中，漆酶的固定化时间为 2 h，4 h，6 h，8 h，10 h，12 h，分别测定固定化酶活力，当固定化时间为 8 h 时，漆酶的活力回收较高。

2.1.4 给酶量对漆酶固定化活力的影响：分别取 1 g 尼龙网载体用 5% 戊二醛交联 6 h 后，加入不同酶活单位的漆酶溶液 (10 U，20 U，30 U，40 U，50 U) 均固定 8 h，结果

表明: 固定 30.0 U 的漆酶, 酶活回收率最高, 为 50.3%。

## 2.2 固定化漆酶的理化性质研究

**2.2.1 固定化漆酶的最适温度:** 在 35℃ ~ 65℃ 的范围内, 测定不同温度下, 游离酶和固定化酶的活力变化, 结果见图 2, 由图 2 可见, 游离漆酶的最适温度为 50℃, 固定化漆酶最适温度为 55℃, 表明固定化漆酶的最适温度有所提高。

**2.2.2 固定化酶的最适 pH:** 在 pH3.5 ~ 6 范围内测定游离酶和固定化酶的活力变化。结果如图 3 所示, 固定化漆酶的最适 pH 值为 4.5, 游离酶的最适 pH 值为 5.0。表明固定化漆酶的最适 pH 值比游离酶的最适 pH 值略有下降。

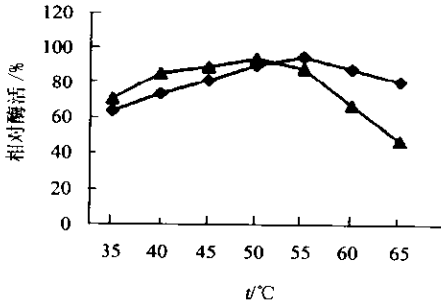


图 2 温度对固定化酶与游离酶的影响

—◆— 固定化酶, —▲— 游离酶

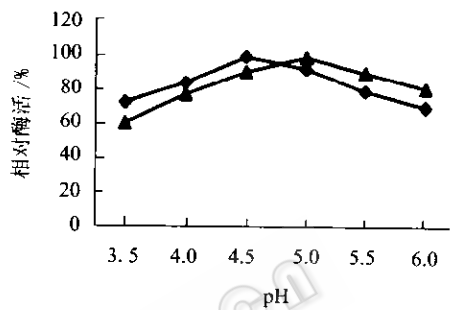


图 3 pH 对固定化酶与游离酶的影响

—◆— 固定化酶, —▲— 游离酶

**2.2.3 固定化酶的热稳定性:** 将固定化酶、游离酶置于 70℃ 水浴中保温, 分别定时取样测其活性, 结果见图 4, 表明漆酶经固定化后其热稳定性有了一定的提高。

**2.2.4 固定化酶的  $K_m$  值:** 以 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mmol/L 不同浓度愈创木酚的琥珀酸盐缓冲液 (pH4.5) 为底物, 25℃ 反应 30 min, 测酶活, 用双倒数作图法求得  $K_m$  值。固定化漆酶的  $K_m = 0.563$  mol/L, 同样条件下, 测定游离酶的  $K_m = 0.427$  mol/L, 固定化漆酶的表现米氏常数增大, 说明固定化漆酶与底物的亲和力有所下降。

## 2.3 固定化漆酶处理低浓度造纸废水试验

固定化漆酶在反应器中处理低浓度的造纸废水, 连续运行 8 个批次, 固定化漆酶的酶活保留情况, 见图 5。

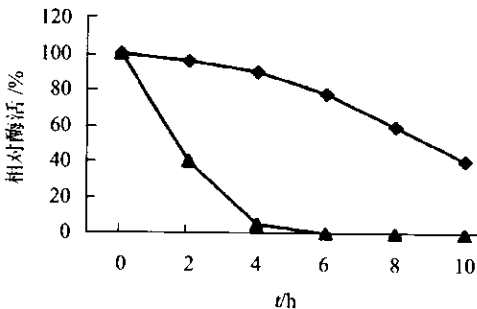


图 4 固定化酶与游离酶的热稳定性比较

—◆— 固定化酶, —▲— 游离酶

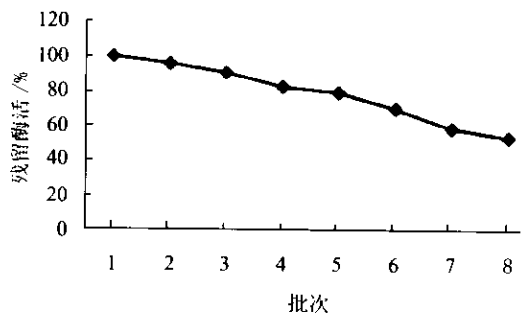


图 5 固定化漆酶处理废水的操作稳定性

—◆— 残留酶活

### 3 讨论

戊二醛分子两端的两个醛基可以分别与载体及配基上的氨基以五碳桥的形式交联起来,这一反应条件温和,操作简便,因而应用广泛<sup>[8]</sup>。尼龙网是由酰胺键联接起来的亲水性载体,与肽键结构非常相似<sup>[6,7]</sup>,其价格低廉,化学性质稳定,具有良好的可操作性。用尼龙网作载体已成功固定了果胶酶、木瓜蛋白酶<sup>[6,7]</sup>。而用该载体固定化漆酶尚未见报道。本试验选用尼龙网作载体在优化条件下固定化漆酶,活力回收为50.3%,表明尼龙网载体具有固定化漆酶的作用,但固定化漆酶的酶活回收率尚待进一步提高。在固定化漆酶降解低浓度造纸废水的试验中,经过8个批次的连续运行后,固定化酶活保留52%,漆酶的使用效率大大提高。

致谢 吴影,齐东飞同学参加了部分试验,特此致谢。

### 参考文献

[1] 陈坚,任洪强,堵国成.环境生物技术应用与发展.北京:中国轻工业出版社,2001.310~311.

[2] Hublik G, Schinner F. *Enzyme Microbiol Technol*, 2000, **27**: 330~336

[3] Annibala A, Stazi S R, Vinciguerra V, *et al.* *J Biotech*, 2000, **77**: 265~273.

[4] Jolivalt C, Brenon S, Caminade E, *et al.* *J Membrane Sci*, 2000, **180**: 103~113.

[5] 肖亚中,张书祥,胡乔彦,等.微生物学报,2003, **43** (2): 245~250

[6] 张来群,高天慧.生物化学杂志,1992, **8** (4): 462~467.

[7] 徐彩,李明启.生物化学杂志,1992, **8** (2): 302~305.

[8] 蒋中华,张津辉.生物分子固定化技术及应用.北京:化学工业出版社,2003. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>