

# 一种 pH 稳定的黄色漆酶的快速纯化和性质特征

杨秀清<sup>1\*</sup> 赵晓霞<sup>1</sup> 赵永福<sup>2</sup> 郑媛<sup>1</sup>

(1. 山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

(2. 山西省交城县环境保护局 山西 交城 030500)

**摘要:** 通过丙酮沉淀和 DEAE-cellulose DE52 柱层析, 快速、有效地从一株白腐菌 *Trametes* sp. SQ01 的发酵液中纯化了漆酶。纯化的漆酶并非传统漆酶那样呈现蓝色, 而是一种黄色蛋白。以 ABTS 为底物时, 该酶的最适 pH 和温度分别是 pH 4.5 和 70°C,  $K_m$  为 0.029 mmol/L。T. SQ01 漆酶在 pH 3.0~11.0 时, 酶活相对稳定, 在 pH 5.0 时最为稳定, 是目前报道的 pH 稳定性最好的漆酶。低浓度的金属离子(1 mmol/L)  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  对漆酶有促进作用, 而高浓度(5 mmol/L)的  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  却抑制漆酶酶活。SDS 对该酶有激活作用, 当其浓度为 1 mmol/L 时, 漆酶相对酶活达到 128%。DTT 对漆酶强烈抑制, 即使是浓度为 1 mmol/L, 亦可完全抑制漆酶酶活。纯化后的漆酶对亮蓝(RBBR) (100 mg/L) 的脱色能力显著, 0.5 U/mL 的漆酶在 10 min 内即可达到 80% 的脱色率。T. sp. SQ01 漆酶的快速纯化以及高效脱色的能力表明该酶在染料脱色降解方面有着广阔的应用前景。

**关键词:** 漆酶, 纯化, pH 稳定性, 底物特异性, 染料脱色

## A pH-stable Yellow Laccase from White Rot Fungus *Trametes* sp. SQ01: Rapid Purification and Characterization

YANG Xiu-Qing<sup>1\*</sup> ZHAO Xiao-Xia<sup>1</sup> ZHAO Yong-Fu<sup>2</sup> ZHENG Yuan<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Shan Xi University, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

(2. Jiaocheng Bureau Environmental Protection of Shanxi, Jiaocheng, Shanxi 030500, China)

**Abstract:** The white rot fungus *Trametes* sp. SQ01 secretes a high level of laccase in the basal liquid medium without induction. The laccase has been purified to homogeneity through acetate acetone precipitation and DEAE-cellulose 52 anion-exchange chromatography with a final purification fold of 15.4 and an overall yield of 43.6%. The purified enzyme was identified with a molecular mass of 62 kD by SDS gel electrophoresis. The purified enzyme was not blue like the typical laccase but yellow, and had not the basic spectroscopic features of a typical blue laccase. The enzyme oxidized a series of diphenol, creosol and non-phenol, including 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), catechols, hydropuinsonone, 2,6-dimethoxyphenol (DMP), and guaiacol. With ABTS as a substrate, the optimum pH and temperature for the purified laccase were 4.5 and 70°C, respectively. The enzyme was highly stable in the pH range 3~11, and the most stable under the pH 5.0. The enzyme was stable up to 50°C, and had half-life of 30 min at 60°C.

\* 通讯作者: Tel: 86-351-701766100; ✉ xiuqyang@sxu.edu.cn  
收稿日期: 2008-08-26; 接受日期: 2008-10-07

The susceptibility of laccase towards several surfactants, inhibitors and metal cations was also assessed. The enzyme activity was completely inhibited by DTT at the concentration of 1 mmol/L, but 1 mmol/L of SDS activated the laccase activity by 128%. Laccase activity was also inhibited by several metal cations at a 5 mmol/L of concentration, especially  $Mn^{2+}$ . The purified enzyme efficiently decolorized Remazol Brilliant Blue R (RBBR) in the absence of added redox mediators. The high production of *Trametes* sp. SQ01 laccase as well as its decolorization ability demonstrated its potential application on dye decolorization.

**Keywords:** Laccase, Purification, pH stability, Substrate specificity, Dye decolorization

漆酶(*p*-diphenol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶。该酶与植物的抗坏血酸氧化酶和哺乳动物的血浆铜蓝蛋白同属于铜蓝蛋白家族。1883年,日本学者吉田首次从日本紫胶漆树(*Rhus vernicifera*)的渗出液中发现该酶<sup>[1]</sup>,随后人们发现某些高等真菌也能分泌这种酶,其中最重要的是担子菌中的白腐真菌(white rot fungi)。漆酶一直是生物学、化学和环境科学等领域十分活跃的研究热点,尤其在生物制浆、生物漂白、脱色以及有毒化合物的降解等方面具有潜在的应用价值,并已取得某些突破性成果和显著成就。

典型的漆酶含有4个Cu原子,根据它们的特征可分为3类:型或蓝型,型或通常型,型或偶联的双核同型。其中,型在610 nm处有特征吸收,型无特征吸收峰,型除610 nm外,在330 nm处有特征吸收。到目前为止,纯化的漆酶大多为蓝色漆酶,即型或是型漆酶,也有少数为无色漆酶,即型漆酶。但是,1997年俄罗斯科学家在几株白腐菌的固态发酵提取物中纯化出的漆酶却呈现黄色,而且该酶也没有典型漆酶所具有的特征吸收峰和电子顺磁共振谱,然而,同样的菌株在液体发酵液中分泌的漆酶却是典型的蓝色漆酶<sup>[2]</sup>。此后,又有一些科学家从固态发酵物中分离出了黄色漆酶,并进行一些酶学性质的研究<sup>[3]</sup>。本实验室选用栓菌 *Trametes* sp. SQ01 进行液体发酵产漆酶时,却意外地发现,该菌产生的漆酶也为黄色,为了进一步分析该酶的性质及动力学特征,我们对该漆酶进行了分离纯化,同时对其底物特异性及染料脱色的性能进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

栓菌 *Trametes* sp. SQ01 由本实验室筛选并保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMP (2,6-dimethoxyphenol), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)], Catechol, Hydroquinone, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, guaiacol, 牛血清白蛋白(BSA), 丙酮酰胺(Sigma), DEAE-cellulose DE52 (Whatman), 分子量蛋白 Marker(北京天为时代科技有限公司), 其余试剂均为分析纯。

日立 UV-2010 分光光度计, pH 计, 梯度混合器, 电泳仪。

### 1.3 培养基及培养条件

**1.3.1 种子培养基:** 土豆葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯提取液 1.0 L, 葡萄糖 20.0 g,  $KH_2PO_4$  3.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g,  $V_{B1}$  1 mg, 琼脂 20.0 g。

**1.3.2 基础产酶培养基:** 每升含葡萄糖 10.0 g,  $KH_2PO_4$  2.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g, 琥珀酸钠 1.18 g, 酒石酸铵 1.84 g,  $V_{B1}$  (100 mg/L) 10 mL, 微量元素溶液 70 mL, 吐温-80 0.5 mL; 微量元素混合液: 每升含  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.0 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.5 g, NaCl 1.0 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g,  $CoCl_2$  0.1 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1 g,  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  10 mg,  $H_3BO_3$  10 mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  10 mg。

### 1.4 粗酶液的制备

将待试菌株接种于 PDA 固体培养基上, 30°C 活化培养 7 d, 用打孔器制成直径 8 mm 的菌塞, 接种 5 个菌塞到含有 50 mL 产酶培养液的 250 mL 三角瓶中, 于 30°C 振荡培养 7 d, 过滤收集培养液, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液即得粗酶液。实验结果以平均值  $\pm$  标准偏差计。

### 1.5 漆酶活性的测定

以 0.5 mmol/L ABTS作为反应底物, 在pH 4.5 酒石酸-酒石酸钠缓冲体系中,加入适量酶液, 25°C 进行反应, 于紫外可见分光光度计 420 nm 处测定反应吸光值的变化( $\epsilon_{max} = 3.6 \times 10^4$  L/(mol·cm)<sup>[4]</sup>)。每分钟转化 1  $\mu$ mol 底物所需的酶量定义为一个酶活

力单位。

### 1.6 蛋白浓度的测定

按 Bradford<sup>[5]</sup> 法测定蛋白浓度, 以牛血清白蛋白为标准, 绘制标准曲线。

### 1.7 糖含量的测定

采用硫酸-酚法测定糖含量, 以葡萄糖作为标准<sup>[6]</sup>。

### 1.8 漆酶的分离纯化

将  $-20^{\circ}\text{C}$  的丙酮缓慢加入粗酶液中达 25%(V/V), 12000 r/min 离心 20 min, 弃去不溶性黏状物。向上清中继续加丙酮到浓度为 66%(V/V),  $-20^{\circ}\text{C}$  静置 2 h~3 h 沉淀蛋白。12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀溶解于 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液(缓冲液 A)中。将待纯化的蛋白上样于已用缓冲液 A 平衡过的 DEAE-cellulose 52 层析柱(2.6 cm×10 cm)。以 0 mol/L~0.6 mol/L NaCl-Tris-HCl 线性梯度洗脱并分步收集洗脱液, 每管收集 3 mL。测定各管洗脱液的漆酶活性, 收集酶活性峰,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.9 一般性质

**1.9.1 漆酶的表现分子量测定:** 纯化后的漆酶样品和已知分子量的标准蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 分离胶的浓度为 12%, 浓缩胶的浓度为 4%; 然后根据标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移率  $R_f$ , 绘制  $\log W_m - R_f$  图, 求得漆酶分子量。

**1.9.2 漆酶的紫外可见吸收光谱:** 将纯化后的漆酶液于 UV-2010 紫外可见分光光度计 250 nm~700 nm 范围内进行扫描, 以获得漆酶的紫外可见特征吸收光谱。

**1.9.3 漆酶 N-端氨基酸序列:** 漆酶 N-氨基酸序列分析由上海基康生物技术公司进行。

**1.9.4 漆酶的最适温度和热稳定性:** 将漆酶酶液置于  $25^{\circ}\text{C}$ ~ $80^{\circ}\text{C}$  的水浴中, 测定漆酶酶活, 以最高的酶活为 100%, 相对酶活(%)=(各温度条件下的酶活/最高酶活)×100%。

将酶液置于  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 、 $70^{\circ}\text{C}$  和  $80^{\circ}\text{C}$  的水浴中保温 30 min, 冷却至室温测残余酶活力, 以未处理酶液的酶活力为 100%, 残余酶活(%)=(各温度条件下的残余酶活/最初酶活)×100%。

**1.9.5 漆酶的最适 pH 值和 pH 稳定性:** 等量的酶液置于不同的 pH (2.2、3、4、4.5、5、6、7、8) 缓冲

液中测定其活性。pH 2.2~pH 5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Citric acid; pH 4.5, Sodium tartrate-tartaric acid; pH 6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7~pH 8, Tris-HCl; pH 9~10, Glycin-NaOH; pH 11,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH。以最高的酶活 100%, 相对酶活(%)=(各 pH 条件下的酶活/最高酶活)×100%。

在酶对 pH 值的稳定性实验中, 将 pH 8.0 的漆酶储液置于不同 pH 值的溶液中, 分别测定 12 h 后漆酶的残余活力。以未处理酶液酶活为 100%, 剩余酶活(%)=(各 pH 条件下的剩余酶活/最初酶活)×100%。

**1.9.6 金属离子、表面活性剂和抑制剂对漆酶活性的影响:** 用 0.1 mol/L 酒石酸钠缓冲液(pH 4.5) 配成含不同浓度金属离子、表面活性剂或抑制剂的缓冲液, 与一定量漆酶液  $25^{\circ}\text{C}$  保温 30 min 后测定漆酶活力, 以不含金属离子、表面活性剂、抑制剂的漆酶反应液为对照, 金属离子、表面活性剂、抑制剂的终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L。每种金属离子的两个剂量都设 3 个平行, 结果以平均值±标准偏差计。

### 1.10 动力学参数的测定

配制一系列不同浓度底物 ABTS、DMP、Hydroquinone、Catechol、3-methylcatechol、4-methylcatechol、4-chlorocatechol 和 guaiacol, 在 pH 4.5,  $30^{\circ}\text{C}$  的条件下反应, 测定漆酶反应的初速度, 求出二者的倒数, 按照双倒数法(Lineweaver-Burk法)作图, 得到斜率为  $K_m/V$  的直线, 由此得到  $K_m$  值。重复 3 次测定底物动力学参数, 结果以平均值±标准偏差计。

### 1.11 纯酶对亮蓝(RBBR)脱色

在 RBBR 溶液中加入一定量的纯酶液, 在不同实验条件下(RBBR 的不同浓度、不同酶量、不同脱色溶液 pH 和温度)作用一段时间后, 于染料的最大吸光处测定反应体系的吸光值(RBBR 最大吸收波长 595 nm), 并计算脱色率。相同实验条件下, 加入等量  $100^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min 的酶液作为对照。

将染料溶液稀释到吸光值与染料浓度成线性的范围内, 用分光光度计测定染料最大吸光处的吸光值, 再乘以稀释倍数, 即为该样品的理论吸光值  $A_0$ 。

$$\text{脱色率} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100\%$$

$A_0$  — 脱色反应前溶液的吸光值,  $A_1$  — 脱色反应后溶液的吸光值。

实验设 3 个平行样品, 结果以平均值  $\pm$  标准偏差计。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *T. sp. SQ01* 漆酶的生产

**2.1.1 产酶:** 图 1 所示, 白腐菌 *T. sp. SQ01* 在基础培养基的培养过程中, 从第 2 天开始分泌漆酶, 酶活性在第 7 天达到最大值 4538.7 U/L, 此后略有下降。培养基中葡萄糖在第 6 天耗尽。不同菌株漆酶的生产有所差异, *T. harzianum* 漆酶酶活第 4 天最大, 此后漆酶生产率逐渐减小<sup>[7]</sup>。白腐菌 *Phlebia oridensis*<sup>[8]</sup> 和 *Pleurotus ostreatus*<sup>[9]</sup> 则分别在第 20、14 天产漆酶最大。

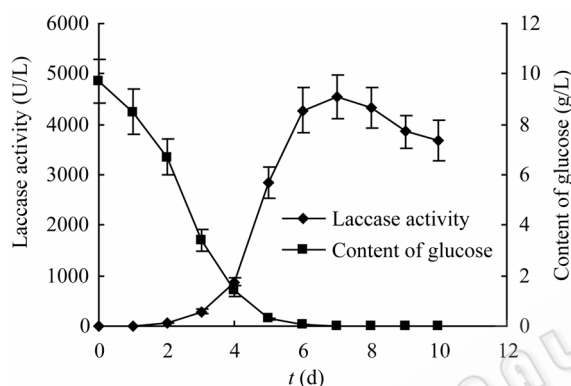


图 1 *T. sp. SQ01* 漆酶的生产 and 葡萄糖的消耗

Fig. 1 *T. sp. SQ01* laccase production and consumption of glucose

**2.1.2 铜离子浓度对漆酶生产的影响:** 图 2 表明, 当培养基中不含  $\text{Cu}^{2+}$  时, *T. sp. SQ01* 几乎不产漆酶; 当培养基中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 0.028 mmol/L 时, *T. sp. SQ01* 漆酶的酶活力最高, 且此时的生物量(干重)也最大。随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的进一步增加, 漆酶活力逐渐降低, 生物量也降低。当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达到 0.5 mmol/L 时, 漆酶的活力与不加  $\text{Cu}^{2+}$  的空白相当。已报道的木霉 *LaTr01* 的培养基中不含  $\text{Cu}^{2+}$  时酶活 107.03 U/L, 当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达到 0.5 mmol/L 时产漆酶活性最大 252.35 U/L<sup>[10]</sup>。而杂色云芝漆酶则在  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 0.05 mmol/L 时分泌量最大, 酶活性最高<sup>[11]</sup>。可见不同菌株漆酶的生产依赖的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度也不尽相同。

### 2.2 漆酶的分离纯化

经过丙酮分级沉淀得到比活为 36.3 U/mg, 纯化倍数为 5.5 的漆酶, 接着将活性部分上样于 DEAE-cellulose 52 层析柱, 分管收集洗脱液并测定

各管酶活性, 最后得到比活 101.7 U/mg, 纯化倍数为 15.4 的漆酶(表 1)。漆酶的纯化方法有多种, *Pycnoporus sanguineus* 粗酶液经超滤浓缩、DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-75 三步纯化, 最终得到纯化倍数为 36.53 的漆酶<sup>[12]</sup>。*T. harzianum* 的漆酶发酵液经丙酮沉淀、Sephadex G-100 凝胶柱、Concanavalin-A 亲和层析后, 纯化了 151.7 倍<sup>[7]</sup>。本文选择丙酮沉淀结合离子柱进行分离纯化步骤简单、操作简便, 大大减少酶的损失, 而且离子柱比凝胶柱上样量大, 回收率高, 有利于漆酶的进一步应用。

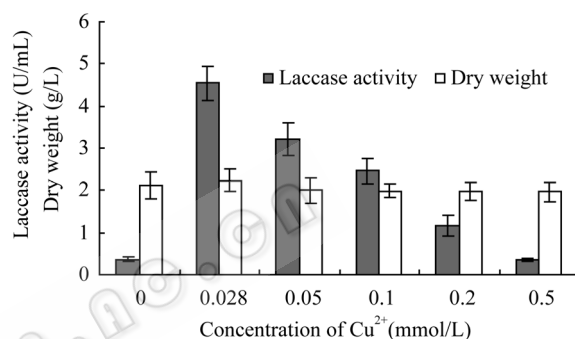


图 2 不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对 *T. sp. SQ01* 产漆酶活性和干重的影响

Fig. 2 Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on *T. sp. SQ01* laccase production and dry weight

表 1 漆酶的纯化			
Table 1 Purification of laccase from <i>T. sp. SQ01</i>			
纯化步骤 Purification step	Super-natants	Acetone-precipitation	DEAE-cellulose 52
酶活 Activity (IU)	1400	1088	610
总蛋白 Total protein (mg)	213	30	6
比活 Specific activity (U/mg)	6.6	36.3	101.7
纯化倍数 Purification (fold)	1	5.5	15.4
回收率 Yield (%)	100	77.7	43.6

### 2.3 一般性质

**2.3.1 漆酶表观分子量的确定:** 纯化后的 *T. sp. SQ01* 漆酶经 SDS-PAGE 分析为一条带(图 3), 表明该酶已达到电泳纯。由  $\log W_m - R_f$  图计算得 *T. sp. SQ01* 漆酶的表观分子量约为 62 kD。不同来源漆酶的表观分子量差异较大, 大多介于 50 kD~

90 kD 之间,少数大于 90 kD, 而特征性真菌漆酶表观分子量则以 60 kD~70 kD 居多<sup>[13]</sup>。本研究分离纯化的 *T. sp. SQ01* 漆酶的分子量与报道的 *Albatrella dispansus* (62 kD)<sup>[14]</sup>、*Trametes ochracea* (64 kD±2 kD)<sup>[15]</sup>漆酶分子量相近。

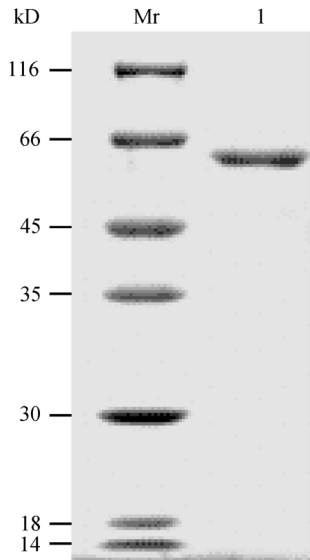


图 3 漆酶的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of laccase  
Mr: Molecular weight markers ; l: Purified Lac.

**2.3.2 漆酶的紫外可见吸收光谱:** 如图 4 所示, 1.25 mg/mL 的漆酶的紫外可见光谱在 280 nm 有最大吸收峰, 610 nm 处没有明显的吸收, 在 330 nm 处有一肩峰。纯化后的漆酶显黄色, 这与 Leontievsky 报道的固体发酵物中的漆酶特征相同<sup>[2]</sup>, 所不同的是, 我们采用的是液态而非固态发酵。这可能是第一次报道从液体发酵液中分离出黄色漆酶。究其呈现黄色的原因, Leontievsky 认为是固体发酵时, 一些木质的芳香化合物结合到酶分子上面, 使得漆酶呈现出黄色<sup>[2]</sup>。然而, 我们在发酵过程中并没有添加木质素类物质, 因此, *T. sp. SQ01* 漆酶显黄色的原因还有待进一步研究。

**2.3.3 漆酶N-端氨基酸序列:** 由表 2 可知, *T. sp. SQ01* 漆酶N-端氨基酸序列与 *Pycnoporus cinnabarinus* 漆酶的N-端氨基酸序列最为接近, 有 80% 的氨基酸相同<sup>[16]</sup>, 而与其他真菌漆酶的N-端氨基酸序列有 60%~70% 的同源性<sup>[17-20]</sup>。可见 *T. sp. SQ01* 漆酶是一种比较新的漆酶。

**2.3.4 漆酶的最适反应温度和热稳定性:** *T. sp.*

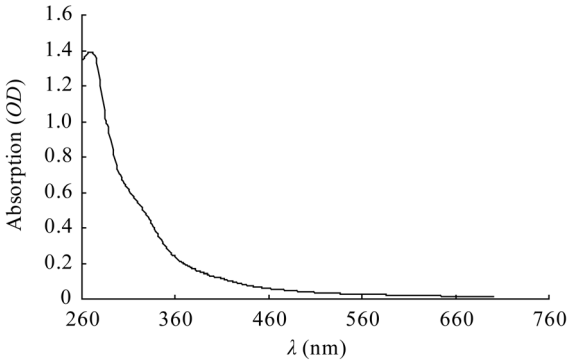


图 4 *T. sp. SQ01* 漆酶的紫外可见吸收光谱  
Fig. 4 UV-Vis spectrum of the purified laccase in *T. sp. SQ01*

表 2 <i>T. sp. SQ01</i> 漆酶与其它真菌漆酶 N-端氨基酸序列的比较 Table 2 Comparison of N-terminal amino acid sequence of laccase from <i>Trametes sp. SQ01</i> and other fungal laccases		
Microorganism	N-terminal aa sequence	Reference
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<u>A</u> IGPVADLTL	16
<i>Coriolus hirsutus</i>	<u>A</u> IGPTADLTI	17
<i>Trametes versicolor</i>	GIGPVADLTI	18
<i>Trichophyton rubrum</i>	<u>A</u> IGPVADLHI	19
<i>Lentinula edodes</i>	<u>A</u> IGPVTDLHI	20
<i>Trametes sp. SQ01</i>	<u>A</u> IGPVASLVL	This study

*SQ01* 漆酶的最适反应温度是 70℃ (图 5a)。 *T. sp. SQ01* 漆酶在 25℃~40℃ 保温 30 min 剩余酶活在 85% 以上, 80℃ 保温 10 min, 酶活力即全部损失(图 5b)。若以保温 30 min 后剩余酶活力 50% 时的温度作为半失活温度, 则它的半失活温度为 60℃。大多数真菌漆酶的最适反应温度在 30℃~60℃, 少数漆酶最适反应温度在 30℃ 之下。灵芝 (*G. lucidum*)漆酶的最适反应温度为 25℃<sup>[21]</sup>, 担子菌漆酶的最适反应温度为 65℃<sup>[22]</sup>。不同来源的漆酶的温度稳定性也有所差异, 典型真菌漆酶的半衰期在 70℃ 时低于 60 min, 80℃ 时低于 10 min<sup>[23]</sup>。

**2.3.5 漆酶的最适pH和pH稳定性:** 与大多数真菌漆酶一样, *T. sp. SQ01* 漆酶最适pH为 4.5(图 6), 但也有部分真菌漆酶最适pH小于 4.5, 如 *Trichophyton rubrum* LKY-7 的漆酶最适 pH 为 3~4<sup>[24]</sup>, 刘淑珍报道的担子菌漆酶的最适 pH 为 2.2~2.8<sup>[22]</sup>。

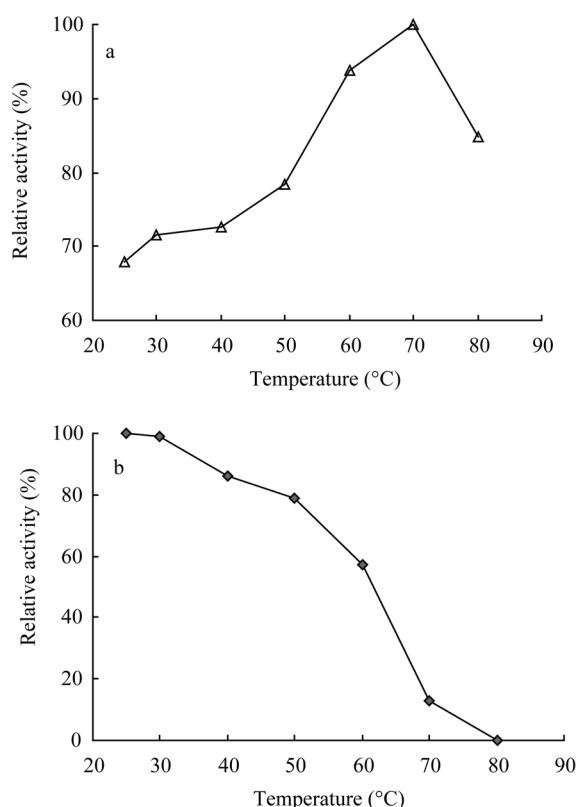


图5 *T. sp. SQ01* 漆酶的最适反应温度(a)和热稳定性(b)曲线

Fig. 5 Optimum reaction temperature and thermostability curve of *T. sp. SQ01* laccase

图7表明, pH 8.0的*T. sp. SQ01*漆酶溶液在pH 3.0~11.0条件下25°C保温12 h酶活比较稳定,在pH 3.0~4.0酶活大于78%;在pH 5.0时,该漆酶最为稳定,酶活比处理前漆酶酶活提高约20%;在pH 6.0, pH 7.0和pH 9.0时,相对酶活为100%;pH 10.0和pH 11.0酶活大于81%。但是,大部分漆酶的pH稳定范围较窄,稳定性较差,如灵芝TR6号漆酶在pH 6.0~8.0比较稳定<sup>[24]</sup>,杂色云芝漆酶LacA在pH 5.0以下30°C水浴4 h残余酶活保持在70%以上,pH高于6.0酶活损失严重<sup>[10]</sup>。毛木耳漆酶LacB在不同pH条件下于4°C保存24 h后测活,结果表明在pH 3.6~7.0比较稳定,残余酶活保持在60%以上,尤其pH为6.0时,残余酶活85%以上<sup>[25]</sup>。担子菌漆酶在pH 3.0~8.0、25°C保温1 h酶活力损失14%,在pH 5.0~9.5、25°C保温16 h酶活力损失12%<sup>[22]</sup>。就我们所知,*T. sp. SQ01*漆酶是目前报道的pH稳定性最好的漆酶。

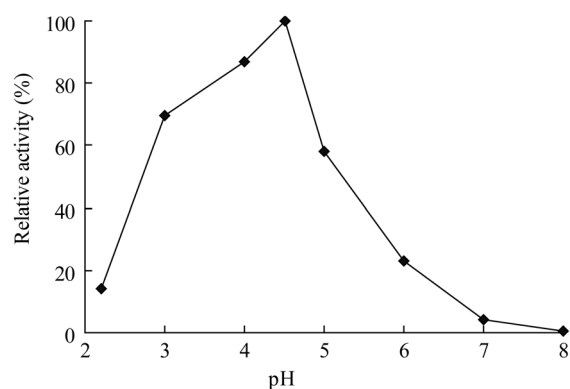


图6 *T. sp. SQ01* 漆酶的最适 pH

Fig. 6 The optimum pH of *T. sp. SQ01* laccases

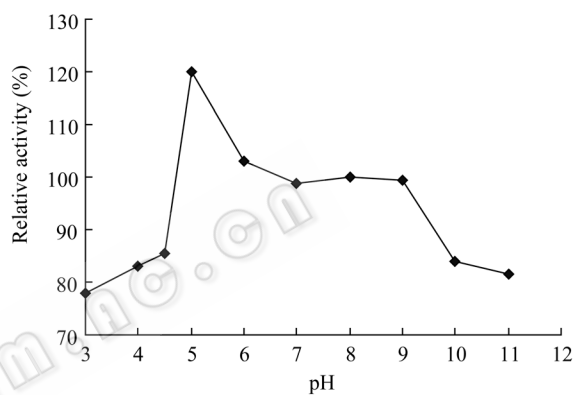


图7 *T. sp. SQ01* 漆酶的 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of *T. sp. SQ01* laccases

2.3.6 金属离子、表面活性剂和抑制剂对酶活性的影响: 一般认为漆酶为含有铜的酶,  $\text{Cu}^{2+}$ 对漆酶有较明显的促进作用, 我们的实验结果(见表3)也表明1 mmol/L和5 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ 对*T. sp. SQ01*漆酶有微弱的促进作用。比较而言, 其他金属离子中, 1 mmol/L的 $\text{Co}^{2+}$ 对该漆酶有明显促进作用, 其相对酶活性可达112%;而5 mmol/L的 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对漆酶表现为抑制作用; SDS、Tween-80在所试浓度下对漆酶有激活作用, 特别是1 mmol/L SDS可以使漆酶酶活提高到128%。EDTA在1 mmol/L时对漆酶有微弱的促进作用, 但当浓度提高到5 mmol/L时, 则表现为强烈抑制作用。DTT的抑制作用最强, 表现为完全抑制。与我们的研究结果不同的是, 无论1 mmol/L EDTA还是1 mmol/L SDS对*Trametes gallica* SAH-12漆酶都表现为抑制作用, 剩余酶活分别为57.4%和71%<sup>[26]</sup>。1 mmol/L SDS对灵芝TR6号漆酶也起抑制作用, 其相对酶活为92%<sup>[24]</sup>。

表 3 金属离子、表面活性剂和抑制剂对漆酶活性影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Effects of some metal ions、surfactants and inhibitors on laccase activity ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

金属离子 Metal ions	相对活性 Relative activities		活性剂/抑制剂 Surfactants/ inhibitors	相对活性 Relative activities	
	1 mmol/L	5 mmol/L		1 mmol/L	5 mmol/L
Control	100	100	SDS	128 ± 7.8	114 ± 5.3
Cu <sup>2+</sup>	108 ± 5.0	108 ± 6.1	Tween-80	117 ± 6.5	108 ± 5.4
Zn <sup>2+</sup>	99 ± 3.5	777.1	EDTA	104 ± 2.1	15 ± 3.6
Mn <sup>2+</sup>	99 ± 1.2	69 ± 6.5	DTT	0	0
Mg <sup>2+</sup>	106 ± 4.6	79 ± 6.8			
Ca <sup>2+</sup>	105 ± 3.1	99 ± 1.5			
Co <sup>2+</sup>	112 ± 4.5	78 ± 6.5			
Ag <sup>+</sup>	92 ± 3.8	94 ± 3.6			

2.4 动力学参数的测定

漆酶的底物专一性不强, 能催化许多化合物的氧化反应, 包括许多与对二酚结构类似的化合物, 如氨基苯酚, 邻、对苯二酚、多酚、多胺、木质素和芳基二胺等。一些漆酶能高效地氧化抗坏血酸, 另外一些真菌漆酶还能催化木质素和甲氧基酚酸的脱甲基反应。如表 4 所示, *T. sp.* SQ01 漆酶能够氧化诸如ABTS等一系列非酚类、多酚类及甲氧酚类化合物。这些底物中, ABTS是该漆酶的最适底物, 而且也是转化效率最高的底物, 其次是多酚类特别是双酚类底物, 无论是对漆酶的亲和力还是转化效率都比甲氧酚类物质好的多。Catechol和Hydroquinone的转化效率是 2,6-DMP 和Guaiacol的 10~30 倍, 即使是甲基化和氯化的双酚类物质(如 3-methyl- catechol、4-methylcatechol、4-chlorocatechol), 其转化效率基本上和 2,6-DMP 一样, 而比 Guaiacol 高。*T. sp.* SQ01 漆酶对 ABTS 的转化效率比文献报道

的高(*P. sanguineus* 漆酶对 ABTS 的转化效率为  $1.0 \times 10^6$ , *T. rubrum* LKY-7 漆酶对 ABTS 的转化效率为  $1.4 \times 10^7$ )<sup>[12,23]</sup>。以前的研究结果认为漆酶对甲氧酚类物质的催化效果比双酚类物质高, 而且底物专一性实验亦表明 Catechol 不是漆酶的良好底物<sup>[23]</sup>, 但是我们的实验表明 Catechol 是漆酶的一个比较好的底物, 这可能是该黄色漆酶的一个特征。

2.5 漆酶对 RBBR 的脱色

RBBR 是一种很重要的工业用蒽醌染料, 经常用作许多染料合成的前体物质, 由于 RBBR 的多环结构具有一定的代表性, 再加上其性质相对稳定, 因此选择 RBBR 做为漆酶脱色的染料具有一定的意义。

2.5.1 漆酶添加量对 RBBR 脱色的影响: 采用不同的酶量(0.25 U/mL~1.5 U/mL)对 100 mg/L RBBR 溶液进行脱色降解试验(图 8)。随着作用时间的延

表 4 *T. sp.* SQ01 漆酶的动力学参数 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )  
Table 4 Kinetic parameters for laccase from *T. sp.* SQ01 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

底物 Substrate	底物浓度 Concentration (mmol/L)	最大波长 Wave length (nm )	米氏常数 $K_m$ (mmol/L)	转换数 $k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	转化效率 $k_{cat}/K_m$ (mol/L·min)
ABTS	0.5	420	0.029 ± 0.004	1422.5 ± 235	4.9×10 <sup>7</sup>
2,6-DMP	0.5	469	0.230 ± 0.003	435 ± 57	1.9×10 <sup>6</sup>
Catechol	0.5	387	0.062 ± 0.008	1052 ± 175	1.7×10 <sup>7</sup>
3-methylcatechol	0.5	423	0.056 ± 0.006	102.6 ± 20	1.8×10 <sup>6</sup>
4-methylcatechol	0.5	399	0.050 ± 0.006	801 ± 1	1.6×10 <sup>6</sup>
4-chlorocatechol	0.5	394	0.053 ± 0.007	151.3 ± 17	2.9×10 <sup>6</sup>
Hydroquinone	0.5	265	0.047 ± 0.005	1506.5 ± 210	3.2×10 <sup>7</sup>
Guaiacol	0.5	470	0.568 ± 0.078	532.8 ± 68	9.4×10 <sup>5</sup>

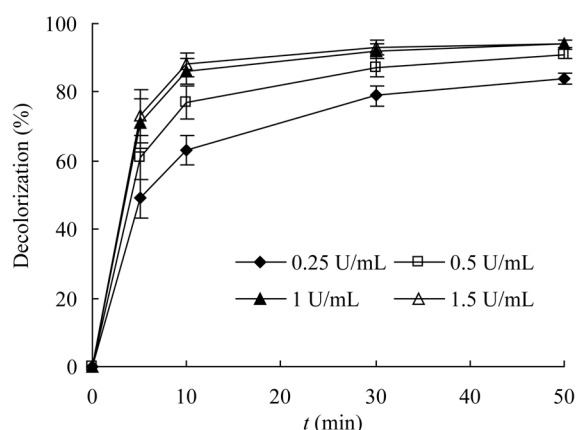


图8 漆酶添加量对亮蓝脱色的影响

Fig. 8 Effects of laccase dosage on decolorization of RBBR

长, 脱色率均上升并逐渐趋于平稳。随着酶量的加大, 脱色率也相应增大, 当酶活超过 1 U/mL 后, 进一步提高酶量对脱色率基本无影响。据报道 5 U/mL *L. edodes* 漆酶对 100 mg/L RBBR 脱色 90 min 后脱色率为 90%<sup>[27]</sup>。5 U/mL *P. sanguineus* 漆酶脱色 90% RBBR(100 mg/L)需 10 min<sup>[12]</sup>。而 1 U/mL 的 *T. sp. SQ01* 漆酶脱色相同浓度 RBBR 10 min 就能达到 90% 以上。由此可见 *T. sp. SQ01* 漆酶对 RBBR 有很强的脱色能力。

**2.5.2 染料浓度对脱色的影响:** 采用 0.6 U/mL 纯化漆酶对不同浓度的亮蓝溶液进行脱色, 结果见图 9。脱色率随着作用时间的延长而上升。亮蓝质量浓度 100 mg/L 时脱色率最大, 随着亮蓝浓度的进一步提高脱色率开始下降。而当浓度达到 1 g/L 作用 40 min 后, 脱色率为 50%。*P. sanguineus* 漆酶对 RBBR 的脱色率同样随着 RBBR 浓度的增大而降低, 其染料脱色的最佳浓度为 50 mg/L<sup>[12]</sup>。

**2.5.3 pH对脱色的影响:** 当脱色体系 pH 为 3.0~6.0, 在 25°C 条件下, 以 0.6 U/mL 漆酶对 100 mg/L RBBR进行脱色, 此时脱色率与体系 pH 值的关系如图 10 所示。RBBR 在 pH 4~4.5 时脱色率较高, 最适脱色 pH 为 4.5, 这和该漆酶的最适反应 pH 为 4.5 一致。报道的 *P. sanguineus* 漆酶在 pH 3.0~5.0 对 RBBR 脱色 2 h 效果较好, 脱色率大于 94%<sup>[12]</sup>。

**2.5.4 温度对脱色的影响:** 当RBBR浓度为 100 mg/L, 漆酶浓度为 0.6 U/mL, pH 值为 4.5 时, 将脱色体系置于 25°C~70°C条件下, 结果如图 11 所示。在 25°C~50°C范围内, 脱色率随温度的升高逐渐增大;

50°C~60°C脱色最佳。这表明 *T. sp. SQ01* 漆酶足以在 40°C~60°C 的相对低温范围内高效的脱色 RBBR。同样的结果也可见于 Murugesan<sup>[28]</sup> 和 Lu Lei<sup>[12]</sup>的报道。

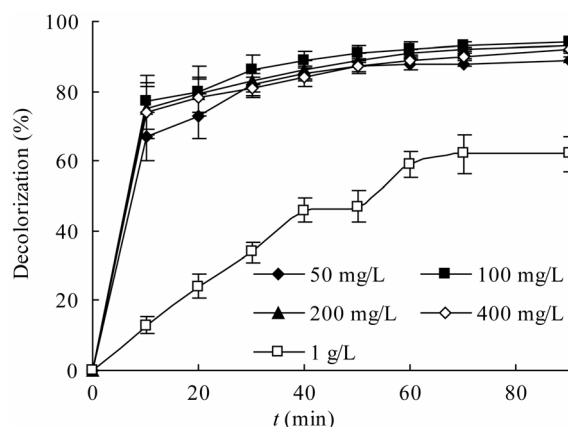


图9 亮蓝浓度对脱色的影响

Fig. 9 Effects of concentration of RBBR on decolorization of RBBR

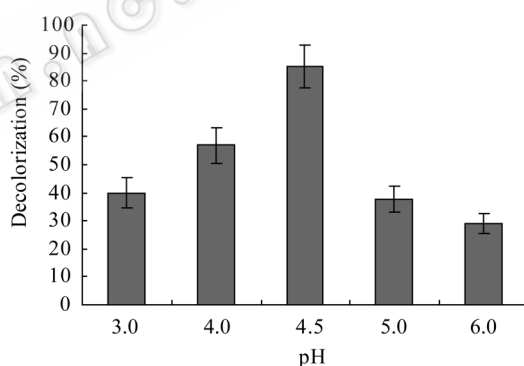


图10 溶液 pH 对 RBBR 脱色的影响

Fig. 10 Effects of pH on the decolorization of RBBR

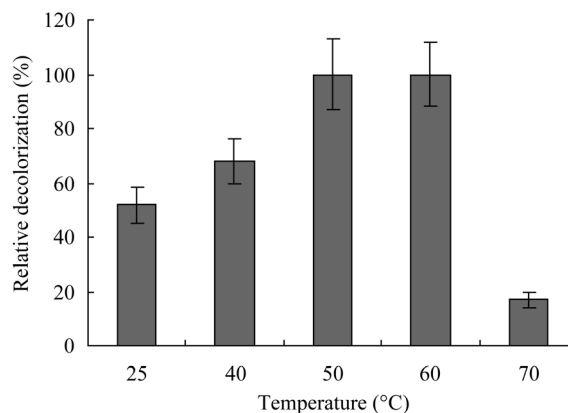


图11 温度对脱色的影响

Fig. 11 Effects of temperature on the decolorization of RBBR



### 3 结论

1) 在基础培养基中, 白腐菌 *Trametes* sp. SQ01 产漆酶约 4538.7 U/L, 是一株产漆酶效率较高的菌株。

2) 采用丙酮沉淀与 DEAE-cellulose 52 阴离子层析柱即可有效地分离纯化 *T. sp.* SQ01 漆酶, 该纯化步骤简单、操作简便, 大大减少酶的损失, 回收率高。

3) 纯化的漆酶是一种少见的黄色漆酶, 不具有典型漆酶的特征, 该漆酶是第一例从液体发酵液中提取的黄色漆酶。

4) *T. sp.* SQ01 漆酶溶液在所试验的 pH 范围 (pH 3.0~11.0) 内 25°C 保温 12 h, 酶活相对稳定 (大于 78%), 在 pH 5.0 时最为稳定, 比处理前酶活提高约 20%。这是目前报道的一种 pH 稳定性最好的漆酶。

5) 本文选用蒽醌类染料中常见的 RBBR 作为实验用染料, 结果表明脱色体系中不加任何氧化还原媒介的情况下, *T. sp.* SQ01 漆酶对亮蓝表现出高效的脱色能力。其脱色最适酶液量是 1 U/mL, 最适 pH 4.5, 最适温度是 50°C 和 60°C。该酶对 RBBR 的显著脱色能力有利于对其他蒽醌类染料的高效脱色降解, 也为 *T. sp.* SQ01 漆酶在染料废水方面的应用奠定了一定的基础。

### 参 考 文 献

- [1] Yoshida H. Chemistry of Lacquer (Urusht) part 1. *J Chem Soc*, 1883, **43**: 472–486.
- [2] Leontievsky AA, Vares T, Lankinen P, *et al.* Blue and yellow laccase of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **156**(1): 9–14.
- [3] Alexey Leontievsky, Nina Myasoedova, Natalia Pozdnyakova, *et al.* Yellow laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters*, 1997, **413**: 446–448.
- [4] Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1151–1158.
- [5] Bradford MM. 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.
- [6] 张树政, 孟广震, 何忠效. 酶学研究技术. 北京: 科学

出版社, 1987, pp.86–89.

- [7] Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, *et al.* Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 2008, **43**: 736–742.
- [8] Arora DS, Gill, PK. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*, 2000, **73**: 283–285.
- [9] Hou H, Zhou J, Wang J, *et al.* Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem*, 2004, **39**: 1415–1419.
- [10] 郑晓冰, 郭丽琼, 付小燕, 等. 木霉 LaTr01 菌株产漆酶发酵的条件. 生物加工过程, 2007, **5**(4): 19–24.
- [11] 吴 坤, 闵 航, 朱显峰. 杂色云芝漆酶的分离、纯化和酶学特性研究. 高校化学工程学报, 2003, **17**(2): 174–179.
- [12] Lu L, Zhao M, Zhang BB, *et al.* Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**: 1232–1239.
- [13] Baldrian P. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**: 215–242.
- [14] Wang HX, Ng TB. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). *Biochem & Biophys Res Commun*, 2004, **319**: 381–385.
- [15] Shleev SV, Morozova OV, Nikitina OV, *et al.* Comparison of physicochemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*, 2004, **86**: 693–703.
- [16] Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1151–1158.
- [17] Kojima Y, Tsukuda Y, Kawai Y, *et al.* Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J Bacteriol*, 1990, **265**: 15224–15230.
- [18] Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, *et al.* Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1876–1880.
- [19] Jung H, Xu F, Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microbiol Technol*, 2002, **30**: 161–168.
- [20] Nagai M, Sato T, Watanabe H, *et al.* Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**:

327-335.

- [21] Ko EM, Leem YE, Choi HT. Purification and characterization of laccase isoenzymes from the white rot basidiomycete *Ganoderma alucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 98-102.
- [22] 刘淑珍, 钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究. *微生物学报*, 2003, **43**(1): 73-78.
- [23] Jung H, Xu F, Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichopyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microbial Technol*, 2002, **30**: 161-168.
- [24] 韩君莉, 郭丽琼, 郑晓冰, 等. 灵芝 TR6 号漆酶的分离纯化及性质研究. *应用与环境生物学报*, 2008, **14**(1): 99-103.
- [25] 杨建明, 张小敏, 邢增涛. 毛木耳漆酶纯化及其部分漆酶特性的研究. *菌物学报*, 2005, **24**(1): 61-70.
- [26] 黄乾明, 杨婉身, 陈华萍, 等. 粗毛栓菌诱变菌株 SAH-12 漆酶的分离纯化及酶学性质研究. *菌物学报*, 2007, **26**(4): 539-548.
- [27] Nagai M, Sato T, Watanabe H, *et al.* Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 327-335.
- [28] Murugesan K, Arulmani M, Nam IH, *et al.* Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajorcaju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 939-946.

## 新辟栏目介绍

### 教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974~2006)一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn