

## 灵芝漆酶的分离纯化及其部分酶学性质研究\*

Purification and Partial Properties of Laccase from *Ganoderma lucidum*林卫军<sup>1,2</sup>,周玉恒<sup>1</sup>,经艳<sup>1,2</sup>,卫力<sup>1,2</sup>,覃香香<sup>1</sup>,张厚瑞<sup>1\*</sup>LIN Wei-jun<sup>1,2</sup>, ZHOU Yu-heng<sup>1</sup>, JING Yan<sup>1,2</sup>, WEI Li<sup>1,2</sup>, QIN Xiang-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Hou-rui<sup>1\*</sup>

(1.广西植物研究所,广西桂林 541006; 2.广西师范大学生命科学学院,广西桂林 541004)

(1. Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

**摘要:**将灵芝(*Ganoderma lucidum*)漆酶经过 Sephadex G-75和 DEAE-Sepharose Fast Flow 两步纯化,获得具有3个同工酶的组分,并且纯度提高了81倍,酶活回收率高达83.9%。以ABTS为底物,漆酶最适pH值是2.2~2.6,在pH值4.6~7.8范围内稳定;最适温度45℃,在低于45℃时较稳定。大部分金属离子、酸根离子对灵芝漆酶普遍有抑制作用,除盐可以提高漆酶活力。

**关键词:**漆酶 纯化 酶学性质 灵芝

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)01-0082-05

**Abstract** After the crude laccase from *Ganoderma lucidum* was purified by Sephadex G-75 gel filtration and DEAE-Sepharose Fast Flow ion exchange column chromatography, a final yield of 83.9% and a specific activity of 81-fold were achieved. The results of native polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) with active staining showed that there were three kinds of isoenzymes. The optimum pH value of purified laccase was between 2.2~2.6 with ABTS as substrate and the optimum temperature was 45℃. When the temperature was below 45℃ and the pH value was in the range of 4.6~7.8, the laccases exhibited maximal stability. Laccases from *Ganoderma lucidum* were universally inhibited by metal and acid ions, and desalting facilitated the activity.

**Key words** laccase, purification, enzymological properties, *Ganoderma lucidum*

漆酶(p-diphenol oxygen oxidoreductase; EC

1.10.3.2)是一种含铜离子的多酚氧化酶,其催化的底物广泛,包括有酚类及其衍生物、芳胺及其衍生物、羧酸及其衍生物、甾体激素和生物色素、氨基的吲哚衍生物等,并且在介体N-hydroxybenzotriazole(HBT) [2, 2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)](ABTS)等存在的情况下还可以氧化非酚型底物。由于这些特性,漆酶在纸浆漂白、纺织印染

染料脱色、果汁饮料澄清、工业废水处理以及生物修复等行业具有广泛的应用前景<sup>[1]</sup>。尤其在制浆造纸方面,漆酶可以直接氧化纸浆的生色物质木质素,被认为是最有可能取代纯化学漂白剂,解决含氯、硫化化合物的污染,最终实现造纸业的清洁性生产一个有效途径,因而漆酶的研究成为该行业的一个世界性研究热点。

目前限制漆酶广泛应用的一个重要原因是难以获得优良高产菌株。灵芝(*Ganoderma lucidum*)作为一种重要的产漆酶微生物<sup>[2]</sup>,在工业染料行业已显示出出色的脱色能力<sup>[3]</sup>。我们采用Sephadex G-75和DEAE-Sepharose Fast Flow 两步纯化方法研究灵芝漆酶的纯化及其酶学性质,为进一步利用和评价灵芝漆酶提供依据。

收稿日期: 2008-05-05

修回日期: 2008-11-17

作者简介: 林卫军(1981-),男,硕士,主要从事微生物发酵研究。

\* 广西创新能力建设项目(No. 033015-1B),广西自然科学基金项目(No. 0731033)资助。

\*\* 通讯作者: zhh@ hotmail.com

## 1.1 菌种

灵芝 (*G. lucidum*) 购于广西轻工业研究院

## 1.2 仪器

T6新世纪分紫外可见光光度计,北京普析通用仪器有限公司出品。HH-S恒温水浴锅,江苏省金坛市正基仪器有限公司出品。DYY-6C型电泳仪, DYG<sup>Z</sup>-28A型电泳槽,北京市六一仪器厂生产。冷冻干燥机 100200型,德国出品。

## 1.3 试剂

2, 2-连氮双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS),标准蛋白,牛血清白蛋白,均购自Sigma公司;考马斯亮蓝 R-250,丙烯酰胺,NN-甲叉双丙烯酰胺,均为 Amresco公司进口分装;Sephadex G-75凝胶,DEAE-Sephadex Fast Flow 离子交换剂,购自 Pharmacia公司;其它生化试剂均为国产分析纯试剂

## 1.4 漆酶活力测定<sup>[4]</sup>

反应总体积 3ml 中,含 0.1ml 酶, 1.9ml 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH值 4.5),加入 1.0ml 0.5mmol/L ABTS以启动反应,30℃水浴保温 4min,后沸水浴灭酶 1min,测 420nm 吸光值。1个酶活力单位(IU)是指在上述条件下,反应体系中每分钟催化 1<sup>μ</sup>mol ABTS氧化所需的酶量(420nm 处 ABTS的摩尔吸光系数  $\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

## 1.5 蛋白质含量测定

280 nm ( $A_{280}$ )光吸收法<sup>[5]</sup>,以牛血清白蛋白作标准曲线对照。

## 1.6 聚丙烯酰胺(PAGE)

PAGE按文献[5]分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 4%。用考马斯亮蓝 R-250染色 30min,脱色液由 10%的甲醇和 10%的醋酸组成,脱色 12h,每两个小时换 1次脱色液;PAGE活性染色按文献[3],用 1mmol/L的愈创木酚(0.02mol/L, pH值 4.5的柠檬酸钠缓冲液)进行活性染色。

## 1.7 漆酶的制备、分离与纯化

### 1.7.1 培养基

灵芝固体发酵,蔗渣(W):麦麸(W)=1:1,盐液组成:磷酸二氢钾 5g/L,硫酸镁 0.5g/L,硫酸铵 5g/L;培养基固液比=1:3.5

### 1.7.2 培养方法

将 90g 湿培养基混匀装于 500ml 三角瓶,棉塞封口,121℃灭菌 30min,自然冷却至室温后,接入一块斜面培养物,28℃恒温培养 13d

### 1.7.3 粗酶液制备

灵芝培养 13d后,培养基加入一定体积的去离子水室温浸提 1h,滤除残渣,滤液离心除悬浮颗粒,所得上清液再经 0.45微米的微孔滤膜抽滤,滤液真空冷冻浓缩至一定体积即得粗酶液。

### 1.7.4 Sephadex G-75凝胶色谱

取粗酶液 2ml,经 Sephadex G-75进行色谱分离。流动相为 0.02mol/L pH6.9磷酸盐缓冲液,凝胶柱体积 2.5cm×46cm,流速 0.5ml/min,每管收集 3ml 检测每管蛋白质以及漆酶活力,分别合并有活力的漆酶峰,经透析袋用聚乙二醇 20000浓缩备用。

### 1.7.5 DEAE-Sephadex Fast Flow 离子交换色谱

将经过 Sephadex G-75凝胶色谱收集的活力峰,再经 DEAE-Sephadex F.F.离子交换色谱。柱体积 1.5cm×17cm,初始缓冲液为 0.02mol/L pH值 6.9的磷酸盐缓冲液,依次用含 0~0.9mol/L Na<sup>+</sup>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>的上述磷酸盐缓冲液梯度洗脱,每一梯度洗脱两个柱床体积,合并有漆酶活力的组分,进行 PAGE检测。

## 1.8 漆酶酶学性质

### 1.8.1 最适反应 pH值及 pH值稳定性

在 pH值 2~9.0的 0.02mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中,测纯化的漆酶活力,以酶活最高者为 100%,绘曲线比较出最适 pH值

将酶液分别用 pH值 2~9.0缓冲液稀释,25℃保温 2h 4h后,测残余酶活力,以原酶活力为 100%,比较 pH值稳定性

### 1.8.2 最适反应温度及热稳定性

在最适 pH值条件下,分别在不同温度条件下反应 4min,沸水浴灭活 1min,以酶活最高者为 100%,比较出最适温度

将酶液于不同温度下保温 1h,迅速冷却,在最适 pH值和最适温度下检测活力,比较热稳定性

### 1.8.3 离子对漆酶酶活力的影响

经过纯化的酶液中加入不同浓度的金属离子或酸根离子,测定漆酶活力,以原酶活力为对照,计算经过上述处理的酶液的相对活力

## 2 结果与分析

### 2.1 漆酶的分离与纯化

通过对灵芝漆酶粗酶液进行 Sephadex G-75凝胶色谱分离,结果显示如图 1,只有一个色谱峰有漆酶活力,将此色谱峰收集液进行电泳,分别用愈创木

酚底物活性染色和考马斯亮蓝染色,染色结果表明这一个活性峰包含有 3 个迁移率很接近的同工酶(图 2-A),但相应的考马斯亮蓝染色的结果显示的蛋白条带并不止 3 条(图 2-D),说明了这一步纯化虽然去除了大量的杂蛋白,但仍有少量杂质存在,通过分子筛色谱不能去除。

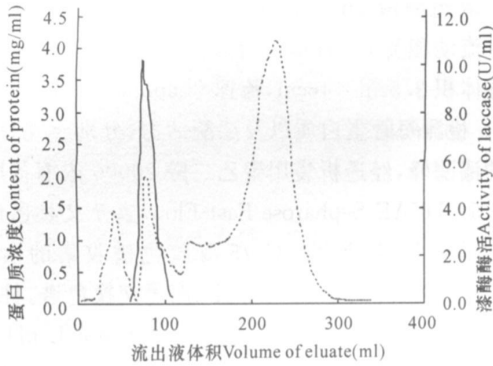


图 1 Sephadex G-75 分离纯化漆酶色谱

Fig. 1 Chromatography of laccase on Sephadex G-75

.....: 蛋白质浓度; —: 酶活。  
.....: Content of protein; —: Activity.

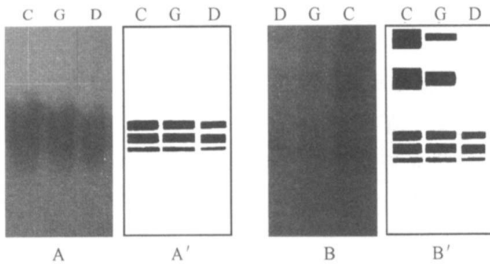


图 2 灵芝漆酶纯化前后 PAGE

Fig. 2 The PAGE of laccase from *G. lucidum*

A. PAGE 活性染色; B. PAGE 考马斯亮蓝染色; A' 和 B' 分别为 A 与 B 的手画补充图; C. 粗酶; G. 经 Sephadex G-75 纯化的漆酶; D. 经 Sephadex G-75 和 DEAE-Sephrose F. F 两步纯化的漆酶。

A. PAGE by active stainin, B. PAGE by Coomassie brilliant blue R-250, A' and B' describing by handwork for addition to A and B separately, C. Crude enzyme, G. laccase on sephadex G-75, D. laccase on sephadex G-75 and DEAE-Sephrose F. F.

因此我们继续对 Sephadex G-75 凝胶色谱分离所获得的活性峰进行第 2 步的 DEAE-Sephrose F. F. 离子交换色谱分离(分离图未显示),收集活性峰进行电泳,活性染色表明仍然具有 3 个同工酶,且考马斯亮蓝染色亦只有 3 条迁移率非常接近的蛋白质带,说明经过了离子交换色谱,杂质已经完全去除,同时也说明这 3 个同工酶不仅分子量相近,在带电性质和分子形状上亦非常接近。两步分离没有获得电泳纯的单一一条带,但活性染色表明均属于具有活性的漆酶,因此,我们将此纯化出的酶作为下一步酶学性质分析使用。

经过两步的纯化后,酶活收率如表 1 所示,第 1 步纯化了 25 倍(表 1),第 2 步后纯化了 81 倍,总酶活收率是 83.9%。Younes<sup>[6]</sup>纯化来自 *Perenniporia tephropora* 的单一漆酶,经过 5 个步骤,纯化了 4.17 倍 Litthauer<sup>[7]</sup>纯化 *Pycnoporus Sanguineus* 漆酶、Wang<sup>[8]</sup>纯化的 *Pleurotus eryngii* 漆酶,所用的纯化步骤都超过 4 步,回收率分别只有 38% 和 15%。它们都远低于本研究对灵芝漆酶的纯化效果

表 1 灵芝漆酶的纯化效果

Table 1 The effects of purification of laccase from *G. lucidum*

纯化步骤 Purification procedure	总活力 Total activity (IU)	总蛋白 Total protein (mg)	回收率 Activity recovery (%)	比活力 Specific activity (IU/mg)	纯化倍 数 Pur- ification fold
粗酶 Crude enzyme	1160	154.25	100	7.52	1
Sephadex G-75	1599.6	8.48	137	188.58	25
DEAE- Sephrose F. F.	973.2	1.58	83.9	615.97	81.9

值得注意的是,灵芝漆酶的粗酶经 Sephadex G-75 凝胶色谱之后,相对酶活达到 137%,最有可能的解释是纯化去除了抑制物,尤其是离子的抑制作用。Litthauer<sup>[7]</sup>也发现通过透析脱盐 *P. sanguineus* 漆酶相对酶活提高了 13%。此外,凝胶柱层析后的漆酶外观无色,说明此过程能同时去除粗酶液中的各种色素。

## 2.2 灵芝漆酶部分酶学性质

### 2.2.1 灵芝漆酶最适 pH 值以及其 pH 值稳定性

以 ABTS 为底物,在柠檬酸 磷酸氢二钠缓冲液中,灵芝漆酶的最适 pH 值是 2.2~2.6(图 3),在此范围以外酶活均迅速下降,说明漆酶具有较窄的最适反应 pH 值。然而,pH 稳定性曲线却显示漆酶在最适 pH 值下的稳定性却很低(图 4)。其 pH 值稳定范围是 4.6~7.8,高于其最适 pH 值范围。Han<sup>[9]</sup>和 Hela<sup>[10]</sup>均报道过类似的最适 pH 值不在稳定范围内的情况,在应用和储存的时候应该注意。

### 2.2.2 灵芝漆酶的最适温度及其对温度的稳定性

和很多真菌漆酶一样<sup>[8]</sup>,灵芝漆酶最适温度范围很窄。以 ABTS 为底物,其最适温度范围为 40~50℃,当反应温度为 45℃ 时表现出最大酶活(图 5)。保温 1h 后的活力表明在低于 45℃ 时稳定性较高,高于 50℃ 后活力迅速下降,60℃ 保温 1h,仅残存酶活 38%,与 Han<sup>[9]</sup>研究的 *Trametes versicolor* 漆酶接近。而 Murugesan<sup>[3]</sup>所报导的耐热型灵芝漆酶 60℃

的半衰期为 2h,与之相比,本研究的灵芝漆酶热稳定性较低

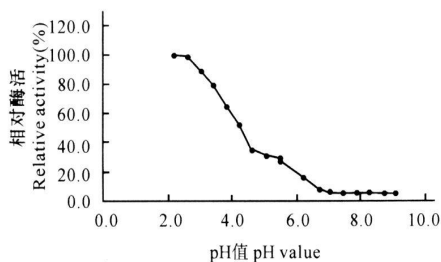


图3 漆酶的最适 pH 值

Fig. 3 The optimal pH value of laccase

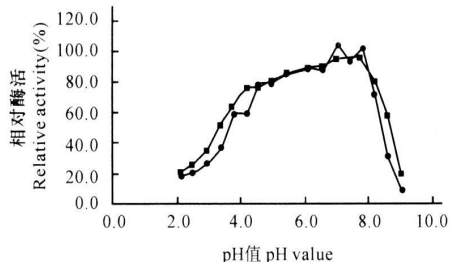


图4 漆酶的 pH 值稳定性

Fig. 4 The pH value stability of laccase

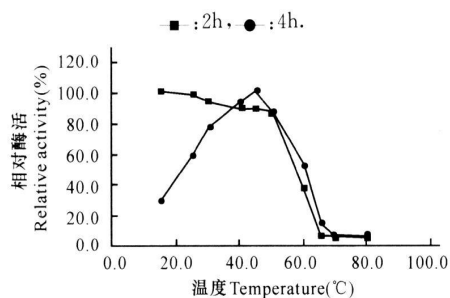


图5 温度对漆酶酶活的影响

Fig. 5 The effect of temperature on laccase activity

■:稳定性, ●:最适温度。■:The stability, ●:The optimal temperature.

### 2.2.3 离子对漆酶酶活力的影响

在测试的浓度范围内,所有的离子都对漆酶有不同程度的抑制作用(表2),这再次印证了经过 Sephadex G-75 凝胶色谱除去盐类时活力升高的现象。在金属离子中,除  $K^+$  以外,其它金属离子均对漆酶活性表现抑制作用,以  $Fe^{2+}$  的抑制作用最强,在  $0.005\text{mol/L}$  的条件下,漆酶的活性保留不足 10%;当离子浓度上升到  $0.1\text{mol/L}$  时,除了  $Al^{3+}$  离子和  $Na^+$  离子,其它金属离子对漆酶活性的抑制作用都明显增强。特别指出的是,虽然漆酶是含铜离子的氧化酶,  $Cu^{2+}$  没有促进灵芝漆酶的酶活,  $0.1\text{mol/L}$  时对漆酶有 27% 抑制率,在同类研究中,  $Cu^{2+}$  离子对不同漆酶的影响不同,比如, Lorenzo<sup>[11]</sup> 报道,  $0.02\text{mol/L}$   $Cu^{2+}$  对 *T. versicolor* 漆酶有 40% 的抑制

率,而据 Baldrian<sup>[12]</sup> 报道,  $0.05\text{mol/L}$   $Cu^{2+}$  能促进 *Pleurotus ostreatus* 漆酶活力且酶活能保持。阴离子中,  $Cl^-$  和  $CO_3^{2-}$  抑制作用最强烈,  $SO_4^{2-}$  最低。Federico 等<sup>[13]</sup> 报导过卤化物对漆酶的抑制,他们认为  $I^-$   $Br^-$   $Cl^-$   $F^-$  对漆酶的抑制依次增强,抑制的程度取决于其对酶活中心铜原子的可接近性。在储存、纯化和酶促反应时应力求避免接触  $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $CO_3^{2-}$ 、 $NO_3^-$  以及卤化物。

表2 离子对漆酶酶活力的影响

Table 2 The effect of ions on purified laccase activity

化学物质 Chemical reagent	保留活力 Remain activity(%)	
	$c_1=0.005\text{mol/L}$	$c_2=0.1\text{mol/L}$
NaCl	37.21	8.29
$Na_2CO_3$	86.78	2.70
$NaNO_3$	77.89	30.93
$Na_2SO_4$	96.85	96.09
$ZnSO_4$	74.21	18.42
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	93.82	72.91
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	8.29	4.01
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	92.90	91.72
$MnSO_4$	80.82	10.62
$K_2SO_4$	99.40	86.19
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	90.90	56.07

### 3 结论

灵芝漆酶经过两步色谱纯化后可以全部去除杂质,获得 3 个分子量及带电性质相近的同工酶,两步纯化后的酶活收率可达 83.9%,比活提高了 81 倍。并且证明了大部分离子对其活性有抑制作用,脱除离子有助于提高活性。

灵芝漆酶具有偏向酸性的最适反应 pH 值 2.2 ~ 2.6,但是 pH 值稳定性却为 4.6 ~ 7.8,其储存的稳定 pH 值远离最适的 pH 值。

灵芝漆酶最适反应温度在  $45^\circ\text{C}$ ,在低于  $45^\circ\text{C}$  时较稳定。

参考文献:

- [1] Sergio R Laccases blue enzymes for green chemistry [J]. TREN DS in Biotechnology, 2006, 24(5): 219-226
- [2] Madhavi S, Revankar S S, Lele. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp* WR-1 [J]. Bioresource Technology, 2007, 98 775-780.
- [3] Murugesan K, Nam I H, Kim Y M, et al Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40 1662-1672.
- [4] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of nonphenolic

- substrates An expanded role for laccase in ligninbiodegradation[ J]. FEBSLett, 1990, 267 99-102.
- [5] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000 243-260.
- [6] Younes S B, Meehichi T, Sayadi S Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolorization of synthetic dyes[ J]. Applied Microbiology, 2006, 102 1033-1042.
- [7] Lithauer D, Marielle J V V, Andre V T, et al. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* ( SCC 108) [ J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40 563-568.
- [8] Wang H X, Ng T B. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* [ J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69 521-525.
- [9] Han M J, Choi H T, Song H G. Purification and characterization of laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor* [ J]. Microbiology, 2005, 43 ( 6): 555-560.
- [10] Hela Z M, Tahar M. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme [ J]. Enzyme and Microbial technology, 2006, 39 141-148.
- [11] Lorenzo M, Moldes D, Rodriguez C S, et al. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds [ J]. Chemosphere, 2005, 60 1124-1128.
- [12] Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* [ J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 206 69-74.
- [13] Federico R, Laura F F. Purification and characterization of periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliuti* [ J]. Enzyme and Microbial technology, 2005, 36 800-807.

(责任编辑: 邓大玉)

## 《广西科学》投稿要求和注意事项

- 1 文稿务必论点明确, 数据准确, 文字精炼。每篇论文(含图、表、公式、参考文献等)一般不超过 5 000 字, 研究简报不超过 2 000 字。
- 2 研究论文请按题目、作者姓名、作者单位、摘要(300 字以内)、关键词(3-8 个)、正文、致谢(必要时)、参考文献的顺序书写; 后附与中文相应的英文题目、英文作者姓名、英文作者单位、英文摘要(一般不超过 1 500 字符)和英文关键词。
- 3 英文稿同时附中文稿一份。文稿请寄投打印稿 2 份, 同时可来电子版文稿(接受方正小样、.TXT、.DOC、.WPS 文件), 文稿务必做到清稿定稿; 务必字迹清楚, 用字规范, 物理量和单位符合国家标准和国际标准; 外文字母、符号用打印字体, 必须分清大写、小写, 正体、斜体(学名、量的符号等用斜体); 上标、下标的字母、数码和符号的位置高低区别应明显可辨; 外文缩略词和容易混淆的外文字、符号, 请在第一次出现时注明。
- 4 文稿中只需附必要的图、表、照片, 要求有标题和序号, 并在正文中标注图需用专业画图工具绘好; 其标题、内容说明和图中注释文字、符号同时用中英文标明清楚, 并与正文一致。图和照片大小以 75 mm×50 mm 或 150 mm×100 mm 为宜, 要求清晰、层次分明。
- 5 参考文献只需择主要者列入, 未公开发表的资料请勿引用。文献请在正文中标注, 文献序号请按文中出现先后为序编排。书写格式, 期刊: “序号 作者姓名(不超过 3 人者全部写出, 超过者只写前 3 名, 后加‘等’或‘et al.’。外文姓前名后, 名缩写, 不加缩写点, 姓名用大写字母)。文章题目 [J]。期刊名(外文期刊可用标准缩写, 不加缩写点), 年, 卷(期): 起止页码”; 如果期刊无卷号, 则为“年(期): 起止页码”。专著: “序号 作者姓名(英文姓名用大写), 书名 [文献类型标志]。版次(第一版不写)。出版地: 出版单位(国外出版单位可用标准缩写, 不加缩写点), 出版年: 起止页码。”
- 6 文责自负。本刊编辑部可以对采用稿件必要的删改, 如作者不允许, 务请在来稿中注明。
- 7 来稿请自留底稿, 无论刊登与否恕不退稿, 要求一式两份(并附一份不一稿多投的证明), 请勿一稿多投, 收到本刊收稿回执后 3 个月未接到本刊采用通知时, 可以自行处理。双方另有约定者除外。
- 8 自治区、省(部)级以上重大科研项目及攻关项目, 国家 863 计划项目, 自然科学基金资助项目, 开放实验室研究项目和拟到国际学术会议上宣读的论文优先发表, 请作者注明(并注明项目编号)。
- 9 来稿不得侵犯他人版权, 如有侵权, 由投稿者负完全责任。
- 10 来稿一经采用, 酌收版面费; 刊登后, 付稿酬(含《中国学术期刊(光盘版)》中国期刊网、万方数据网及台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务网等网络发行的稿酬), 并同时赠送给每位作者 1 本样刊。