

杂色云芝组成型漆酶的纯化和底物专一性

李 杨, 段新源, 刘 稳, 方 靖, 高培基*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 采用合成培养基培养杂色云芝 As5.48, 从发酵液中纯化出一种组成型漆酶同功酶。经超滤浓缩, DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析, Bio-gel P-100 凝胶过滤纯化了该酶。SDS-PAGE 分析发现, 该酶分子量为 68 kD, 薄层等电聚焦测得等电点为 3.5。漆酶的底物范围较宽, 以 O₂ 为电子受体, 可以氧化多种木素单体模型物, 包括 2,6-二甲氧基酚, 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS), 愈创木酚, 咖啡酸, 阿魏酸和邻联茴香胺。结果表明, 该酶在木质素的生物降解中可能有重要的作用和应用价值。

关键词 杂色云芝, 漆酶, 纯化, 木素模型化合物
中图分类号 Q741

Purification and Substrate Specificity of a Constitutive Laccase from a White-rot Fungus *Trametes versicolor*

LI Yang, DUAN Xin-yuan, LIU Wen, FANG Jing, GAO Pei-ji*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract A constitutive laccase (EC 1.10.3.2) isolated from *Trametes versicolor* As5.48 was purified to electrophoretic homogeneity by ultrafiltration, DEAE-Sephadex A50 ion-exchange chromatography and gel filtration on Bio-gel P-100. The molecular weight of the enzyme was 68 000 determined by SDS-PAGE and the isoelectric point was estimated to be pH 3.5 by IEF. The enzyme has a wide range of substrates in the presence of oxygen as the electron receptor, including 2,6-dimethoxyphenol, ABTS, guaiacol, caffeic acid, ferulic acid, o-dianisidine. The results indicates that the enzyme may play an important role in lignin degradation.

Key words *Trametes versicolor*, laccase, purification, lignin model compound

漆酶(laccase)是一种含铜的多酚氧化酶(EC 1.10.3.2),1883年日本人Yoshida首次从漆树分泌物中发现,因而得名。它在植物的多种生物合成和降解中都有作用,但它对木素降解的研究晚于其它两种酶——木素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)和依赖锰的过氧化物酶(manganese-dependent peroxidase,简称MnP)。随着研究工作的深入,人们发现它广泛存在于自然界多种植物和菌类的分泌物中,并且比LiP和MnP更具有工业应用价值,漆酶的研究正逐渐成为热点。

漆酶作用底物专一性不强,可以氧化多种木素模型化合物,除柄孢漆酶等少数几类是四聚体外,其他漆酶一般由约500个氨基酸的单一多肽组成,含4个Cu离子。不同的培养条件下不同菌种产生的漆酶具有多型性,分子量和等电点差别很大。Yaver等人研究了*T. villosa*的两种同工漆酶,SDS测得的

分子量都为63kD,而pI分别为3.5和6~6.5^[1]。Hisayoshi Kofujita等人研究了*L. edodes*的漆酶,SDS-PAGE分子量为66kD,pI为3.5^[2]。Bollag总结了三种真菌漆酶的性质,SDS-PAGE分子量:非诱导型漆酶*F. annosus*中者为73kD,*P. mutabilis*为64kD,

收稿日期:2002-01-16,接受日期:2002-03-12

国家自然科学基金资助项目(No. 20077015)和国家优秀博士论文基金资助项目

*联系人:Tel:(0531)8564429,Fax(0531)8565234

E-mail:gaopj@sdu.edu.cn

李杨,男,1977年3月生,硕士

Received:January 16,2002;Accepted:March 12,2002

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 20077015) and State Fund for Excellent Doctoral Theses of China

*Corresponding author Tel:(0531)8564429,Fax(0531)8565234

E-mail:gaopj@sdu.edu.cn

T. versicolor 为 70 kD; 诱导型漆酶 *F. annosus* 为 62 kD, *P. mutabilis* 为 47 kD, *T. versicolor* 为 61 kD^[3].

漆酶在植物中的生物学功能主要是参与木素合成^[4]、细胞壁降解^[5]、脱毒、创伤保护和形态分化调控;在工业中,漆酶广泛应用于制浆工业、果汁、啤酒的澄清,生漆干燥成膜,毛发染色,固定化酶电极、免疫学分析,有机合成和环境保护有毒废物的处理等很多领域^[6,7].

本实验室选用杂色云芝 (*Trametes versicolor*) As 5.48 作为供试菌株,系统地进行了产漆酶条件优化,漆酶的分离纯化,漆酶的基本酶学性质研究等一系列的工作.本文主要报道一种简便的云芝组成型漆酶的纯化方法及底物作用专一性的研究结果.

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂和主要仪器

杂色云芝 *Trametes versicolor* As 5.48 由中科院微生物菌种保藏中心提供. 2,6-二甲氧基酚 (2,6-DMP) 为 Fluka 公司产品, DEAE-Sephadex A-50 葡聚糖凝胶和 Bio-gel P-100 凝胶为 Pharmacia 产品,其余配制培养基、缓冲液及电泳所用试剂均为分析纯试剂. 主要仪器有:超滤杯 (8200) (amicon);超速冷冻离心机 (SorvallRC28S) (Dupont 公司);UV-3100 紫外分光光度计 (Shimadzu 产品);UV-240 紫外分光光度计.

1.2 方法

1.2.1 漆酶活力测定 以 2,6-DMP (2,6-二甲氧基酚) 为底物,用 50 mmol/L 的 pH 3.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 0.2 mmol/L 的 2,6-DMP (2,6-二甲氧基酚) 溶液. 30 时将 50 μ l 酶液和 2 ml 0.2 mmol/L 的 2,6-DMP 溶液混合,检测 469 nm 处的光吸收变化 (A_{469} , 27 500),定义每分钟转化 1 μ mol 底物为一个酶活力单位.

1.2.2 蛋白质含量的测定 采用 BCA 法进行,以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标准曲线^[8].

1.2.3 杂色云芝漆酶的分离纯化 用琼脂块法将菌种接种土豆培养基斜面,菌丝体长满斜面后取菌苔匀浆,按 10 ml/L 的接种量接种于 2 L 的产酶培养基中,28 $^{\circ}$ C 摇床培养 14 d,转速为 120 r/min,过滤除菌体得到粗酶液.粗酶液冻融后过滤除去部分多糖,使用截留分子量为 10 000 的超滤膜超滤浓缩,浓缩液对 pH 4.6,50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液透析.然后经 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析 (预先用 pH 4.6,50 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡),NaCl 梯度洗脱 (0~0.6 mol/L),测定 A_{280}

光吸收和酶活力,合并有酶活力的部分,超滤浓缩后再经过 Bio-gel P-100 凝胶过滤,合并有酶活的部分经 PAGE 检测,确定酶的纯度.

1.2.4 活性电泳 用 Native-PAGE 的方法电泳,电泳结束后用 1 mmol/L 的愈创木酚 (pH 5.0 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液) 溶液浸泡显色,棕红色的条带显示了漆酶的位置.

1.2.5 分子量的测定 采取电泳方法进行测定. SDS-PAGE 按文献进行,垂直板电泳,胶浓度 10%,SDS-不连续系统.考马斯亮蓝 R250 染色,从标准蛋白分子量曲线求得酶的分子量.

1.2.6 等电点的测定 等电聚焦电泳参照文献进行^[9].胶浓度 5.0%,内含 0.8% 载体两性电解质 (pH 3.5~10).考马斯亮蓝 R250 染色,以 LKB 标准等电点 Marker 作参照.

1.2.7 电子吸收光谱分析 各种条件下酶反应电子吸收光谱测定在 UV-3100 或 UV-240 紫外可见分光光度计上进行.狭缝 2 nm,光径 1 cm,扫描速度 10 nm/s,扫描范围:190~700 nm.

2 结果和讨论

2.1 杂色云芝漆酶产酶培养基的优化,酶的纯化和纯度鉴定

目前对漆酶的研究主要集中在担子菌上,这些漆酶的产生有一个共同特点,即都需要加入特定的诱导剂,主要是结构和木素相关的低分子芳香族化合物,才能有效促进该酶的产生,而对其组成型漆酶的研究则鲜有报道.我们从普适白腐菌的合成培养基出发^[10],优化得到杂色云芝的产酶培养基 (葡萄糖 10.0 g;酵母膏 0.5 g;(NH₄)₂HPO₄, 0.7 g;MgSO₄·6H₂O, 0.23 g;KH₂PO₄, 1.0 g;FeSO₄·7H₂O, 0.01 g;CaCl₂·2H₂O, 0.008 g;MnSO₄·H₂O, 0.0023 g;ZnSO₄·7H₂O, 0.006 g;CuSO₄·5H₂O, 0.015 g;20 mmol/L 琥珀酸-琥珀酸钠缓冲体系,pH 4.6) 获得了较高产量的组成型漆酶,产酶曲线见 Fig. 1.由 Fig. 1 可见在第 14 d 时漆酶酶活达到最高.

酶的纯化过程见 Fig. 2.活性电泳表明,该发酵液中有 2 种同功漆酶.我们建立了一套基于离子交换和分子筛的分离方法纯化了其中一个同功组分,命名为漆酶.该法简便易行,收率高达 54.%,可以为不同的研究提供高纯度的酶制剂,结果见 Table 1.纯化的漆酶活性电泳结果见 Fig. 3A.漆酶经 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,显示一条蛋白带,结果见 Fig. 3B.

Table 1 Purification of laccase

Procedure	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/U · mg ⁻¹	Purification folds	Recovery(%)
Crude extract	1096	680	1.6	1	100
Freeze/thaw	1090	680	1.6	1	100
Ultrafiltration	1033	210	4.9	3.1	94.8
DEAE-Sephadex A-50	705	21	33.5	20.9	64.4
Bio-Cel P-100	596	12.3	48.5	30.3	54.6

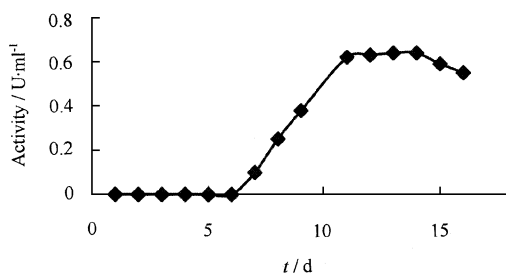


Fig. 1 Production of Laccase under non-induced condition

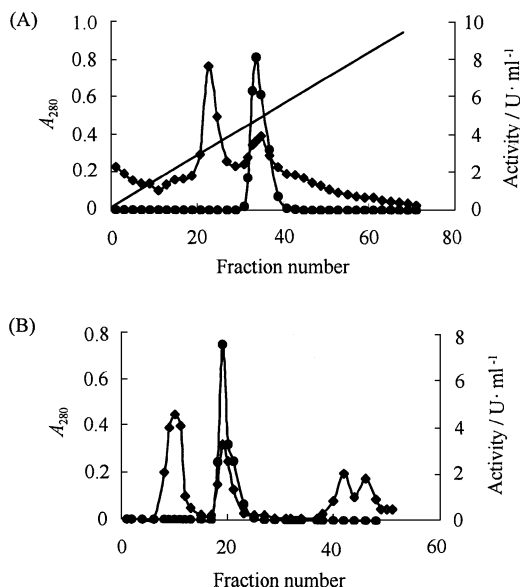


Fig. 2 Purification of laccase by successive chromatography

(A) DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography;

NaCl gradient (0—0.6 mol/L)

(B) Bio-gel P100 gel filtration chromatography

Protein concentration() ; Laccase activity()

2.2 酶的分子量和等电点

从蛋白在 SDS-PAGE 的迁移率求得漆酶 的分子量为 68 000. 用 IEF 电泳测得漆酶 的等电点为 3.5,属于酸性蛋白,结果见 Fig. 4. 相关的研究工作仍在进行.

2.3 酶作用专一性的测定

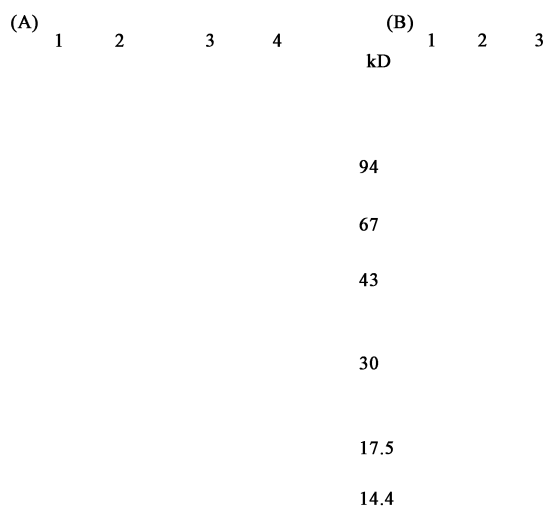


Fig. 3 Electrophoresis of laccase

(A) Native-PAGE

1. Crude sample ; 2. Laccase ; 3. Laccase ; 4. Crude sample.

1,2. Stained by Guaiacol ;

3,4. Stained by Coomassie brilliant blue R250

(B) SDS-PAGE

1. Molecular weight marker ; 2. Laccase ; 3. Crude sample

pI 1 2

9.30—

8.65—

8.15—

7.35—

6.85—

6.55—

5.85—

5.20—

4.55—

3.55—

Fig. 4 IEF of laccase

1. LKB marker ; 2. Laccase

不同的底物用 50 mmol/L pH 3.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配成溶液,30 °C 保温 20 min 后,加入酶液反应,根据底物或产物的特征光吸收波长,用 UV240 检测光吸收变化,判断酶能否氧化该底物,并根据光吸收变化快慢判断漆酶与底物反应的速率^[11].

Table 2 Substrates oxidized by laccase

Substrate	max (substrate)	max (product)	Activity of laccase
ABTS	277 (d)	420/730 (a)	+++
Guaiacol	270 (i)	432/437 (a)	+++
2,6-Dimethoxyphenol	256 (d)	470 (a)	+++
3,5-Dimethoxyphenol	265 (i)		-
3,4-Dimethoxyphenol	220/285 (i)	380/660 (a)	-
Vanillin	336 (d)		-
1,2,4-Trimethoxybenzene	285 (i)	328 (a)	-
Ferulic acid	287/310 (d)		++
Caffeic acid	318 (d)	420 (a)	++
Veratryl alcohol	275 (d)	310 (a)	-
O-Dianisidine	360 (d)	450 (a)	+++

(a) Appearance of new peak (s). (d) Disappearance of substrate's original peak (i) Additional increase in substrate's original peak (s). Individual changes in absorbance were recorded as +++ (very fast), ++ (fast), + (moderate rate of change), - (slow), and - (no change)

由上表可知, *Trametes versicolor* As 5.38 Laccase 的底物专一性不强,可氧化多种芳香族化合物. 80 年代以来,人们对漆酶底物的专一性进行了大量的研究,取得了一定的进展. 初步统计,漆酶催化氧化不同类型的底物已达 250 多个^[12,13]. 按结构主要可分为: (1) 酚类及其衍生物,如 2,6-二甲氧基酚,愈创木酚等. 这一类底物最容易被氧化. (2) 芳胺及其衍生物,如邻联茴香胺. 这类化合物结构与酚类相似,比较容易被氧化. (3) 羧酸及其衍生物,如咖啡酸,阿魏酸等,也可以被氧化. (4) 其它一些人工合成的化合物如 ABTS 等非酚类化合物也可以作为漆酶的底物. (5) 另有报道一些金属有机化合物和生物色素类物质也可以被漆酶氧化. 人们对于漆酶催化底物氧化反应的化学机理研究得比较清楚,但是对于漆酶底物专一性不高的机理性研究还未见报道. 原因可能是由于漆酶的含糖量较高(在漆树漆酶中高

达 45%),难以得到漆酶的单晶用于 X-射线分析,人们对于它的三维空间结构尚不清楚. 总之,关于漆酶底物专一性的研究还有待于进一步的深入,其结果对于阐明漆酶在木质素降解的作用有很大帮助.

参考文献 (References)

- Yáver S D, Xu F, Elizabeth J. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two Laccases genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **62** (3): 834 ~ 841
- Hisayoshi K, Tomoko O, Yasuhiko A. Purification and Characterization from *Lentinus edodes*. *Mokuzai Gakkaishi*, 1991, **37** (6): 562 ~ 569
- Bollag J M, Leonowicz A. Comparative Studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48** (4): 849 ~ 854
- O Malley D M, Whetten R, Bao W. The role of laccase in lignification. *Plant J*, 1993, **4**: 751 ~ 757
- Katase T, Bollag J M. Transformation of trans-4-hydroxycinnamic acid by a laccase of the fungus *Trametes versicolor*: its significance in humification. *Soil Sci*, 1991, **151**: 291 ~ 296
- Kuznetsov B A, Shumakovich G P, Koroleva O V. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosens Bioelectron*. 2001, **16** (6): 425 ~ 430
- Uchida H, Fukuda T, Miyamoto H, Kawabata T. Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, **287** (2): 355 ~ 358
- Hermens T W, Willems M G, Marja P. *Quantification of Circulating Proteins*. Kluwer Academic Publishers, 1982
- Catsimpooolas N. Micro isoelectric focusing in polyacryl amide gel columns. *Anal Biochem*, 1968, **26**: 480 ~ 482
- Masaphy S, Levanon D. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**: 828 ~ 832
- 刘稳, 方靖, 高培基. 豆壳过氧化物酶的分离纯化及其性质研究. 中国生物化学与分子生物学报 (Liu Wen, Fang Jing, Gao Pei-ji. Purification and characterization of Soybean Hull Peroxidase. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1998, **14** (5): 577 ~ 582
- 季立才, 胡培植. 漆酶氧化反应研究进展. 林产化学与工业. (Ji Li-cai, Hu Pei-zhi. Research progress of laccase-catalytic oxidation. *Chemistry and Industry of Forest products*) 1997, **17** (1): 79-84
- 康从宝, 刘巧, 李清心, 高培基. 白腐菌产漆酶的纯化及部分酶学性质. 中国生物化学与分子生物学报 (Kang Cong-bao, Liu Qiao, Li Qing-xin, Gao Pei-ji. Purification and properties of laccase produced from a white rot fungus (w-1). *Chin J Biochem Mol Biol*), 2002, **18** (5): 638 ~ 642