

鸡腿菇漆酶基本酶学性质研究

韩洪波

(攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000)

【摘要】本文研究了鸡腿菇漆酶基本酶学性质, 研究表明: 鸡腿菇漆酶粗酶液最适温度是60℃。在高于60℃以上的高温水浴一小时以上酶活才会明显下降; 最适反应的pH值在6.0~7.0的范围内, pH值4~7的范围内变化不大。

【关键词】鸡腿菇漆酶; 最适温度; 热稳定性; 最适pH

【中图分类号】S646.1 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2008)02-0049-02

漆酶(laccase)是一种含铜的多酚氧化酶(EC 1.10.3.2)。广泛分布于微生物和大型真菌中, 是植物中的抗坏血酸氧化酶和哺乳动物的血浆铜蓝蛋白属于铜蓝氧化酶(blue copper oxidase)家族中的一小族, 在结构和功能上存在着许多相似之处, 一百多年前日本学者吉田^[1]首次在生漆中发现漆酶, 十年后Laborde等证实真菌也能分泌漆酶。一百多年过去了, 人们对漆酶进行了大量的研究, 发现漆酶是自然界广泛存在的, 是多种植物和大量菌类的分泌物。漆酶是科技界研究时间最长的酶之一, 涉及生物、化学、物理、医学、环境等多个学科领域^[2]。由于其对木质素的降解能力, 在制浆造纸、废物处理、环境污染物的降解等方面具有较大的研究价值和应用潜力^[3]。

国内外关于漆酶的研究涉及的真菌菌种范围很广, 但多集中在黄孢原毛平革菌和杂色云芝方面的研究, 目前开始将目光转移到食用真菌上, 如金针菇、香菇、杏鲍菇等, 但是对鸡腿菇漆酶的研究很少。

1 材料和方法

1.1 材料

鸡腿菇(*Coprinus comatus*), 由南京林业大学提供, 经攀枝花学院驯化保存, 接种到马铃薯-葡萄糖琼脂(PDA)平板上, 在25℃下培养15天后, 4℃下保存备用。接种后第22天从培养基中提取粗酶液

1.2 产酶培养基

培养基	g/L
磷酸二氢钾	1.0
磷酸氢二钾	0.4
七水合硫酸镁	0.5
氯化钙	0.013
酵母浸汁	6.0
盐酸-VB ₁	0.0025
葡萄糖	10
Trace element solution	1.0mL/L

1.3 主要试剂与仪器

愈创木酚、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、氯化钙、酵母浸汁。

生化培养箱、隔水式电热恒温培养箱、自动蒸汽灭菌锅、离心机、摇床和紫外分光光度计。

1.4 漆酶的活力测定

将提取的酶液在4℃, 4000rpm离心20min后, 取上清酶液0.1mL加入0.3mL蒸馏水和2mL 50mmol/L(含1mmol/L愈创木酚)琥珀酸缓冲液(pH5.0), 混合均匀后置于37℃水浴30min, 冰浴中终止反应, 在465nm处测其光吸收值。酶活单位定义为每分钟氧化1mol愈创木酚的酶量为一个酶活单位^[4]。酶活的计算公式:

$$\text{酶活} = 2.4OD / (12100 \times 30 \times V / 10^6)$$

12100——摩尔消光系数($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

OD——465nm处的吸光值;

V——酶液体积

2.4——稀释倍数

1.5 研究方法

1.5.1 不同反应温度对漆酶的影响

将从产酶培养基中提取的粗酶液在4℃, 4000r/min离心20min后, 取上清液0.1mL加入0.3mL的蒸馏水和2mL愈创木酚-琥珀酸缓冲液(pH5.0)放置于20℃、30℃、40℃、50℃、60℃和70℃水浴中反应30min, 并与37℃的水浴反应做对照。反应完毕后, 终止反应置于冰浴, 465nm处测其光吸收值。

1.5.2 不同温度对漆酶稳定性的影响

将粗酶液离心处理后取上清液, 于40℃、50℃、60℃、70℃和80℃的水浴中保温5min、10min、20min、30min、60min后, 测定鸡腿菇漆酶酶活。

1.5.3 不同pH值对漆酶酶活的影响

用不同pH的缓冲溶液: 柠檬酸-柠檬酸三钠(pH3.0, 5.0, 6.0); 琥珀酸: (pH4.0); KH_2PO_4 - K_2HPO_4 : (pH7.0, 8.0); HBO_3 - KCL - NaOH (pH9.0), 配制含1mmol/L愈创木酚的反应缓冲溶液, 分别对漆酶酶

活进行测定。

2 结果与分析

2.1 不同反应温度对漆酶的影响

试验结果表明(图1),随着反应温度的升高,测得的酶活数值也在增大,反应温度为60℃时,测得的酶活最高为110.59IU/mL,当反应温度继续升高酶活开始下降,在70℃时酶活仅为39.24IU/mL。由此得知,鸡腿菇粗酶液漆酶最适反应温度为60℃。

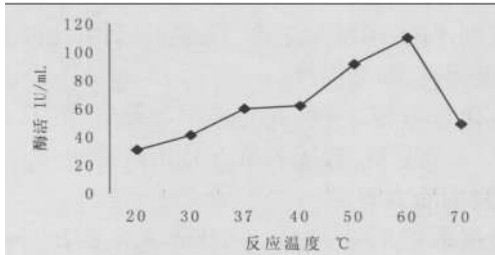


图1 不同反应温度对漆酶的酶活的影响

2.2 不同反应温度对漆酶稳定性的影响

漆酶的热稳定性较好(图2),在40℃水浴中放置1h,酶活下降不到10%。但是水浴温度越高,放置时间越长,酶活降低越多,在60℃的水浴中放置5min,酶活下降不到10%,但是如果将时间增加到1h酶活就降低到68%。在80℃时鸡腿菇漆酶粗酶液酶活下降显著,仅5min酶活就只剩14%,水浴20min之后酶活降至1.04%。从图2可以看出鸡腿菇漆酶酶活在80℃时的半衰期大约为3min;70℃时的半衰期大约为15min,由于良好的热稳定性,60℃及其以下的半衰期就不明显。

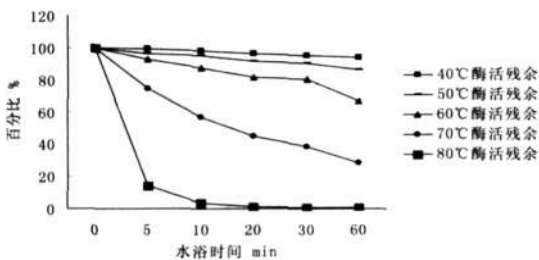


图2 不同温度下漆酶酶活的稳定性

2.3 不同pH对漆酶酶活的影响

由图3所示,鸡腿菇漆酶最适反应pH值为6.0。反应缓冲溶液pH值在4.0~7.0之间,鸡腿菇漆酶酶活变化不大;但pH<4.0或>7.0时,会使酶活显著下降。说明在选择反应pH值时只要不过高或过低,对漆酶的活性影响不大。总体说来,鸡腿菇漆酶的最适pH值为中酸性。

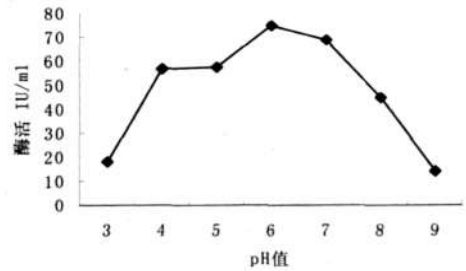


图3 不同pH的反应条件对酶活的影响

3 结论

在较低的温度范围内,反应速率随着温度的升高而增大。但是酶是蛋白质,随着温度升高,使酶蛋白逐渐变性而失活,超过一定的温度后,反应速率反而会下降。因此只有在某一温度下,即60℃时,反应速率达到最大值,达到最适温度;鸡腿菇漆酶的热稳定性很好,常温下一般不会失活。在高于60℃以上的高温水浴一小时以上酶活才会明显下降,鸡腿菇漆酶的这个特性使其易于保存。结合60℃的最适反应温度,鸡腿菇漆酶这种在较高温度下具有良好的稳定性和较高的反应活性的特点,使其具有很好的工业应用前景;鸡腿菇漆酶最适反应的pH值在6.0~7.0的范围内,总体上是在中性偏酸性的条件下,但是pH值在4~7的范围内变化不大。在较强的酸或碱性条件下,酶活急剧下降。

本实验中只是对鸡腿菇的粗酶液进行研究,没有将酶分离提纯,且对鸡腿菇漆酶性质只做了一些初步的探索。

注释及参考文献:

- [1] Yoshi H.Chemistry of Lacquer(Urusht)part1.J Chem Soc,1983,43:472-486.
- [2]Thurston CF.The structure and function of fungal laccase Microbiology,1994,140:19-26.
- [3]GivaudanA,EffosseA,FaureD,et al.Polyphenoloxidase from Azospirillum lipoferum isolated from the rhizosphere:evidence for aLaccase in non-motile strains of Azospirillum lipoferum.FEMS Microbiol.Lett,1993,108:205-210.
- [4]肖亚中,王军,王怡平.蜜环菌胞外漆酶的合成、纯化及性质研究[J].生物工程学报,2004,18(4):457-462.
- [5]王佳玲,余惠生,黄秀渝.碳源和Mn²⁺对白腐菌 Panus conchatus 产木素降解酶的影响[J].纤维素科学与技术,1998,6(3):27-31.
- [6]付时雨.周攀登.真菌漆酶及其催化对苯基苯酚聚合条件的研究[J].化学通报,2005,3:226-229.

[4]Nicholls, D.G., Locke R.M., Thermogenic mechanism in brown fat. *Physiol. Rev.* 1986:1-64.
 [5]Ricquier D., Casteilla L., Bouillaud F., *FASEB J*1991, 5:2237-2242.
 [6]Boss O., Samec S., Paoloni-Giacobino A., Rossier C., Dulloo A., Seydoux J., Muzzin P., Giacobino J.P., *FEBS Lett.* 1997, 408: 39-42.
 [7]李秋玲, 许尚忠, 答林森.解偶联蛋白与动物的冷适应[J].*中国畜牧兽医*,2006,33(4):3-5.
 [8]IshigakiY, KatagiriH, YamadaT, et al. Dissipating excess energy stored in the liver is apotential treatments strategy for diabetes associated with obesity[J]. *Diabetes*, 2005, 54 (2) : 322-332.

The Uncoupling Protein in the Brown Adipose Tissue

MA Jin-hua, WANG Hai

(*Xichang College, Xichang, Sichuan 615022*)

Abstract: In recent years, the adjustment functions and the heat production capabilities of the brown adipose tissue have always been closely concerned about, in particular, the presence of uncoupling protein in the brown adipose tissue is a hot topic in recent researches. The paper summarizes the structure of the uncoupling protein and its gene structure as well as its physiological functions.

Key words: Brown adipose tissue;Uncoupling protein

~~~~~  
(上接 50 页)

[8]赵敏,钱程.白腐菌木素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究[J].*中国造纸学报*,2005,20(2):101-105.

## Research on Basic Enzymology Properties of Coprinus Comatus Laccase

HAN Hong-bo

(*Biology & Chemistry Engineering College, Panzhihua College, Panzhihua, Sichuan 617000*)

**Abstract:**This paper studied the Coprinus comatus laccase basic enzymology properties. The result showed that the optimum temperature of crude enzyme of coprinus comatus is 60℃ , and the activity was obviously decreased in the high-temperature water bath of above 60℃ and more than an hour.The optimum pH is 6.0~7.0, there is a little change in pH 4~7.

**Key words:**Coprinus comatus laccase; Optimum temperature; Thermal stability; Optimum pH