

蜜环菌胞外漆酶的合成、纯化及性质研究

肖亚中^{1,2} 王 军² 王怡平² 蒲春雷¹ 施蕴渝^{1*}

¹(中国科技大学中科院结构生物学开放实验室 合肥 230026)

²(安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

摘 要 研究了蜜环菌胞外漆酶合成条件和酶学性质。实验表明,培养基初始 pH5.5、培养温度 25℃有利于菌株产酶;与麦芽糖、山梨糖和半乳糖相比,纤维二糖和棉子糖作为碳源时漆酶产量更高;有机氮源比无机氮源有利于漆酶合成。泥炭提取液可显著诱导漆酶生成,当其含量为 50%时,菌株漆酶最高产量是对照组的 7 倍。在蜜环菌发酵上清液中检测到 3 个漆酶同功酶组分,其主要活性(约占 75%)组份漆酶 A 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、制备级 PAGE 电泳和阴离子交换柱层析被分离纯化至电泳均一,SDS-PAGE 法测得酶亚基分子量 59kD,凝胶过滤色谱法测定活性酶分子量 58kD。纯化的漆酶 A 等电点 pI 为 4.0,氧化愈创木酚的最适反应 pH 为 5.6,最适温度为 60℃,在 60℃和 65℃时半衰期分别为 45min 和 36.8min,在 pH5.2~7.2 范围内稳定性较好。100mmol/L Cl^- 对该酶有显著抑制作用,1mmol/L SO_4^{2-} 对漆酶有激活作用,1mmol/L NaN_3 可完全抑制酶活性,10 mmol/L EDTA 对漆酶活没有明显影响,1mmol/L Cu^{2+} 对漆酶有激活作用。以愈创木酚为底物时,测得酶的 $K_m = 1.026\text{mmol/L}$, $V_{\max} = 5\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{mg})$;以 ABTS 为底物时,测得其 $K_m = 0.22\text{mmol/L}$, $V_{\max} = 69\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

关键词 蜜环菌 漆酶 发酵条件 酶学性质

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0457-06

蜜环菌(*Armillaria mellea*)分类上属于担子菌纲伞菌目白蘑科,是名贵中药材天麻的共生菌^[1],经人工发酵蜜环菌制备的蜜环菌片和蜜环菌多糖等具有较广泛的医药应用价值^[2,3]。蜜环菌也是一种木腐菌,有较强的木素分解能力,它能分解木材以提供其自身生长所需养分,引起多种树木患根腐病,是一种林木病害真菌。

蜜环菌的木素分解能力与其代谢过程中合成的木素分解酶有关。漆酶(Laccase EC1.10.3.2)是目前公认的木素分解酶之一,它能在 O_2 存在的条件下脱去羟基上的电子或质子形成自由基,导致酚型木质素侧链脱羧或脱氢,造成 C—C 键断裂,从而降解高分子木质素,也能在多电子介体存在的条件下,氧化转化非酚型木质素类化合物,在制浆造纸、生物漂白和多种有毒芳香化合物脱毒转化等方面有广泛应用价值^[4-6]。对蜜环菌的前期研究表明,该菌株在次级生长代谢阶段能合成一定量的胞外漆酶,且该

胞外漆酶有较好的热稳定性,其产量明显受泥炭提取物添加量影响。为寻找新酶源,推进漆酶产业化,我们研究了蜜环菌胞外漆酶合成影响条件和该酶酶学性质,本文报道研究结果。

1 材料方法

1.1 菌种

蜜环菌(*Armillaria mellea*)系本室保存,4℃保藏于 CPDA 斜面。

1.2 试剂

DEAE-Sephrose FF 填料、Surperdex 200 HR10/30 预装柱和两性电解质为 Pharmacia 公司产品,2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)和蛋白质分子量标准为 Sigma 产品,Acrylamide 为 Bio-Rad 产品,Bisacrylamide 购自 Fluka 公司,泥炭提取液(Peat Extract, PE)由本实验室自行制备^[7],泥炭采自于安徽省繁昌县。

收稿日期 2002-01-07,修回日期 2002-03-10。

基金项目 安徽省自然科学基金资助项目(No.98212411)和教委自然科学基金资助项目(No.2000J1013)。

* 通讯作者。 Tel 86-551-3607464; Fax 86-551-3603754; E-mail yyshi@ustc.edu.cn

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.3 培养基

1.3.1 菌种保藏培养基:综合马铃薯培养基(CP-DA)(g/L):葡萄糖 20, $MgSO_4$ 1.5, KH_2PO_4 3, VB₁ 0.002, 琼脂粉 15, 20%土豆汁 1000mL, 调 pH 至 5.8。

1.3.2 液体发酵培养基(g/L):葡萄糖 15, 蛋白胨 3, 酵母提取物 3, K_2HPO_4 3, $MgSO_4$ 0.17, 麦芽糖 1, VB₁ 0.002, 蒸馏水 1000mL, 调 pH 至 5.8。

1.4 培养方法

从 CPDA 斜面挑取蜜环菌菌素(剔除琼脂块), 置匀浆器中, 加适量无菌水电动匀浆。取适量匀浆液接入发酵瓶中, 每样品至少做 3 个重复, 于 28℃, 100~110r/min 振荡培养。

1.5 分析方法

1.5.1 酶液制备:将发酵液于 4℃, 12000r/min 下离心 30min, 弃沉淀, 取上清经适当稀释后用于酶活测定, 或置于 4℃短期保存。

1.5.2 漆酶酶活测定^[8]:以愈创木酚为底物。4mL 50 mmol/L(含 1mmol/L 愈创木酚)琥珀酸缓冲液(pH4.5)加入 1mL 酶样液, 混合均匀后置于 25℃水浴保温反应 30min, 于 465nm 处测光吸收值。定义每分钟氧化 1 μ mol 愈创木酚的酶量为一个酶活力单位。

1.5.3 总糖测定:采用蒽酮硫酸法, 用葡萄糖作对照。

1.5.4 蛋白质含量测定^[9]:按照福林-酚法, 以 BSA 作标准品。

1.5.5 生物量测定:取发酵混合物, 过滤收集菌丝体, 用蒸馏水洗涤 3 次, 置 105℃烘箱, 干燥至恒重。

1.5.6 蜜环菌胞外漆酶的分离纯化:在蜜环菌培养的最高漆酶合成期收获培养物, 制备发酵上清液, 用 90%饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀蛋白质, 将所获蛋白用 20mL 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0)溶解, 适当透析后进行制备级聚丙烯酰胺凝胶电泳。从凝胶中回收漆酶活性组分, 并将此组分对 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液充分透析后, 上 DEAE-Sephrose FF 阴离子交换柱, 用 0.01~1.0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的磷酸盐缓冲液(pH6.0)进行线性梯度洗脱, 收集漆酶活性组分, 透析至 10 mmol/L 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液中。测定酶纯度和蛋白含量, 用于后续研究或置 -20℃以下冻藏保存备用。

1.5.7 漆酶分子量测定:酶亚基分子量采用不连续 SDS-PAGE 法, 分离胶浓度为 12%。活性酶分子量测定采用 FPLC 法, Pharmacia 预装柱(Surperdex 200

HR10/30), 洗脱缓冲液为 50 mmol/L PBS(pH7.0, 含 100 mmol/L NaCl)。

1.5.8 漆酶等电点测定:超薄层等电聚焦电泳法, 凝胶浓度 5%, 两性电解质 pH3.5~10.0, 聚焦结束后沿电场方向切胶, 并将胶条等距离切块浸泡于饱和 KCl 溶液中, 分别测定其 pH, 绘制 pH-长度图, 对照计算聚焦蛋白的 pI 值。

1.5.9 漆酶最适温度及最适 pH 测定:各取等量漆酶溶液分别在不同温度和 pH 条件下测定酶活性, 计算相对酶活。

1.5.10 漆酶热稳定性测定:将漆酶溶液置恒温水浴中保温, 间隔不同时间取样测定其残余活力, 以残余活性百分数的对数值对保温时间作图, 求出其半衰期。

1.5.11 不同离子和化合物对漆酶活力影响:在含有不同被测试离子或化合物的测活体系中测定漆酶活性, 计算残余酶活性。

1.5.12 漆酶 pH 稳定性试验:将漆酶用不同 pH 的缓冲液做同等倍数稀释, 并置于 4℃保存。间隔不同时间取样测定酶活性。

1.5.13 漆酶的动力学参数测定:分别以愈创木酚和 ABTS 为底物, 用 Lineweaver-Burk 作图法计算漆酶的 K_m , V_{max} 值。

2 结 果

2.1 蜜环菌的生长及其胞外漆酶的合成

2.1.1 蜜环菌生长和胞外漆酶合成动态:在接种后的前 5 天, 蜜环菌菌丝体处于高速生长期, 表现为生物量迅速增加(图 1), 同时, 培养基中的糖含量下降, pH 也有所降低, 但此阶段并没有胞外漆酶产生。当菌丝体到达高速生长期末时, 可检测到培养上清中有漆酶活性存在。在接种后第 14 天, 胞外漆酶的含量迅速升高, 此时培养基中的糖基本耗完, 而 pH 在经历了培养初期的下降后, 又开始增高。第 18 天时, 漆酶产量达到高峰, 与此相应, pH 也达到整个培养过程中的最高值。在经历短暂下降后, 第 21 天漆酶含量又有所增加, 此后酶活便迅速下降至消失。

2.1.2 培养温度对漆酶产量的影响:分别采用 22℃、25℃、28℃、32℃和 36℃温度对蜜环菌进行发酵培养, 比较不同温度条件对菌株漆酶合成的影响, 结果表明 25℃条件下比其它温度条件更适合蜜环菌产漆酶。实验中还观察到, 当培养温度达到 36℃以上时, 菌丝体的生长受到显著抑制, 不易获得漆酶。

2.1.3 初始 pH 对漆酶产量的影响:真菌最适生长

pH 通常为弱酸性。实验考查了培养液初始 pH(4.0 ~ 7.0)对菌株生长和合成漆酶影响。当培养基初始 pH 为 5.5 时,漆酶酶活达到最高值,菌丝生长良好,而当 pH 值小于 4.5 或大于 6.5 时,菌株产酶量都将显著下降。

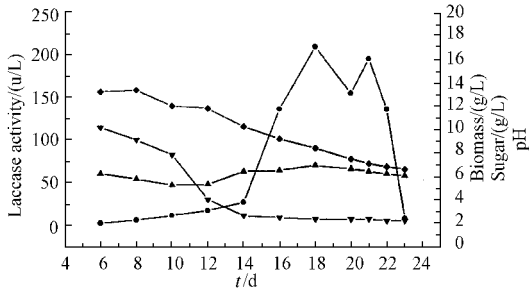


图 1 蜜环菌生长及其胞外漆酶的发酵合成动态曲线

Fig. 1 Time course of the culture and production of extracellular laccase by *Armillaria mellea*

● Activity ▲ pH ▼ Sugar ◆ Biomass

2.1.4 不同碳源对漆酶产量的影响 :将发酵培养基中的葡萄糖用其它糖类取代,终浓度均为 20g/L,结果见表 1。由表可知,纤维二糖、蔗糖和棉子糖等对产酶比较有利,而麦芽糖、山梨糖和半乳糖作为碳源时,蜜环菌胞外漆酶的产量相对较低。

表 1 不同碳源对蜜环菌漆酶合成的影响

Table 1 Effects of different carbohydrates on laccase extracellular production

Carbon sources(20g/L)	Enzyme activity/(u/L)
Glucose	1069.5
Maltose	743.3
Soluble starch	1048.8
Sucrose	1069.5
Lactose	1014.0
Sorbose	673.8
Cellubiose	1159.5
L-arabinose	986.3
Rhamnose	1034.8
D-galactose	555.5
D-mannose	1014.0
Xylose	979.3
Fructose	1037.5
Raffinose	1090.2

2.1.5 氮源对漆酶合成的影响 :发酵培养基中分别加入 56 mmol/L 的胰蛋白胨或 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 测试其

对漆酶产量影响。实验结果表明,添加蛋白胨的发酵瓶酶活为 1377.5u/L,而添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的发酵瓶酶活仅为 26.5u/L,两者相差达 50 倍,胰蛋白胨有利于菌株合成漆酶。

2.1.6 泥炭提取物(PE)对漆酶合成的影响 :将泥炭抽提液按不同比例加入发酵培养基中,并保持其它成分含量不变,相同条件下培养(结果见图 2)。从图中明显看出,PE 对蜜环菌漆酶的合成有诱导作用。当培养基中 PE 含量为 50% 时,漆酶的最高产量比对照组提高 7 倍。

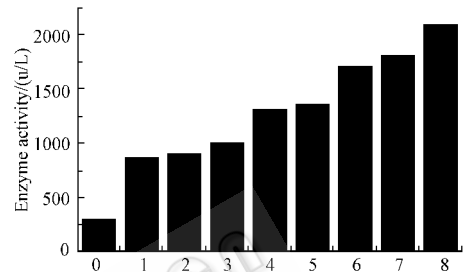


图 2 泥炭抽提物添加量对漆酶合成的影响

Fig. 2 Effect of peat extract on extracellular laccase production

0. Control 1. 5% PE 2. 10% PE 3. 15% PE 4. 20% PE 5. 25% PE 6. 30% PE 7. 40% PE 8. 50% PE

2.2 蜜环菌胞外漆酶的分离纯化及其性质分析

2.2.1 漆酶的分离纯化 :使用活性 PAGE 法在添加泥炭抽提液的蜜环菌发酵上清中检测到 3 个漆酶同工酶,按迁移率从大到小依次命名为 A、B 和 C,其中漆酶 A 约占总酶活的 75% 以上,为主要组分。由于发酵上清中含有大量褐色色素物质,常规蛋白质分离纯化方法难以实现均一漆酶组分制备。在进行蛋白质层析分离之前,先行制备级 PAGE,将其与色素和其它杂蛋白分开,排除干扰,因此仅需要 3 个步骤即可得到 SDS-PAGE 均一的漆酶 A,其纯化过程及得率列于表 2。漆酶 B 和 C 纯化研究将另文报道。

2.2.2 漆酶 A 表观分子量和等电点 :根据 SDS-PAGE 的实验结果,计算得到蜜环菌胞外漆酶 A 的亚基分子量为 59kD,通过 FPLC 法测得酶的活性酶分子量为 58kD,IEF 显示此酶的 pI = 4.0。

2.2.3 最适温度和最适 pH :在 25 ~ 75℃ 范围内测试纯化的蜜环菌漆酶 A 氧化愈创木酚活性,显示随温度升高酶活增加,至 60℃ 时达最大值,高于 65℃ 时酶活快速降低。因此,酶的最适作用温度为 60℃。在 pH 2.84、3.36、4.25、4.63、5.03、5.57、6.00、6.60、7.00、7.46 和 8.07 时测定酶活性作图为典型的钟型曲线,pH 5.6 时测定酶活最高,pH 3.36 和 7.46 时的酶活分别为 pH 5.6 时的 22% 和 27%。酶

的最作用 pH 为 5.6。

表 2 蜜环菌胞外漆酶 A 的分离纯化

Table 2 Purification of extracellular laccase A from *Armillaria mellea*

Purification step	Total activity/u	Total protein/mg	Specific activity/(u/mg)	Recovery/%	Purity/fold
Culture filtrate	1189.4	855.7	1.39	100%	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (90%)	1051.9	674.3	1.56	88.5%	1.1
Preparative PAGE	121.3	9.4	12.90	10.2%	9.3
DEAE-Sepharose FF	113.0	2.2	51.38	9.5%	36.9

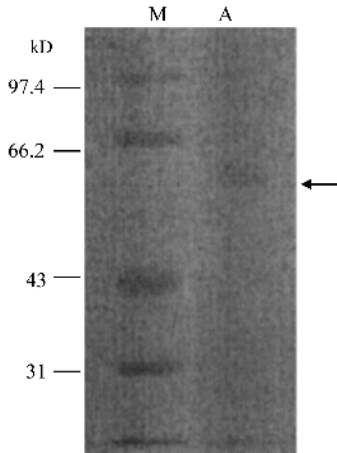


图 3 蜜环菌胞外漆酶 A 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE of purified extracellular laccase A of *Armillaria mellea*
M. Protein marker ; A. Purified laccase A



图 4 蜜环菌胞外漆酶 A 的 IEF 图谱

Fig.4 IEF of purified extracellular laccase A of *Armillaria mellea*
A. Purified laccase A

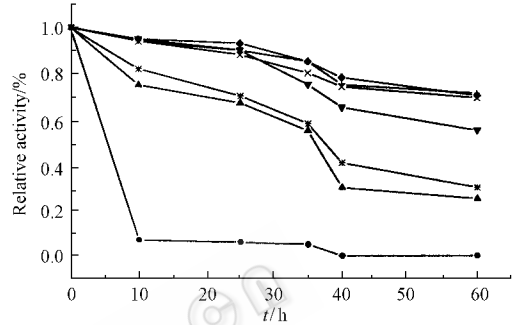


图 5 蜜环菌漆酶 A 的 pH 稳定性

Fig.5 Stability of extracellular laccase A against pH

● pH2.2 ; ▲ pH3.2 ; ▼ pH4.2 ; ◆ pH5.2 ;
+ pH6.2 ; × pH7.2 ; * pH8.2

(表 3)。结果表明 :1mmol/L Cu²⁺ 和 SO₄²⁻ 对漆酶 A 有激活作用 ,10mmol/L EDTA 对漆酶 A 活力没有影响 ,100mmol/L Cu²⁺ 和 Cl⁻ 对漆酶 A 活性有显著抑制作用 而 NaN₃ 在 1mmol/L 时可完全抑制漆酶 A 活力。

表 3 不同离子和化合物对蜜环菌胞外漆酶 A 活性的影响

Table 3 Effect of different ions and compounds on laccase A

Ions/compounds	Concentration(mmol/L)	Relative activity/%
Control	0	100
NaN ₃	1	0
EDTA	1	100
	10	98
Cl ⁻	1	95
	100	2
SO ₄ ²⁻	1	140
	100	105
Cu ²⁺	1	135
	100	5

2.2.4 酶的热稳定性和 pH 稳定性 :分别测定了 60℃和 65℃时漆酶 A 的稳定性。在 60℃时 ,其半衰期为 45min ,而在 65℃时 ,半衰期为 36.8min。 pH 稳定性实验表明(图 5),蜜环菌漆酶 A 在 pH5.2~7.2 条件下稳定性较好 ,而在酸性和偏碱性条件下活性较低 ,较不稳定。

2.2.5 金属离子及化合物对酶活的影响 :测试了不同离子和化合物对蜜环菌胞外漆酶 A 活性影响

2.2.6 蜜环菌胞外漆酶 A 动力学常数 :分别以愈创木酚和 ABTS 为底物 ,测定了蜜环菌胞外漆酶 A 动力学常数。以愈创木酚为底物时 ,测得 K_m = 1.026mmol/L ,V_m = 5μmol/(min · mg);以 ABTS 为底

物时测得:

$$K_m = 0.22 \text{ mmol/L}, V_{\max} = 69 \mu\text{mol} / (\text{min} \cdot \text{mg})$$

3 讨论

漆酶是一类含铜的多酚氧化酶,1883年首先由日本学者在漆树分泌物中发现(*Rhus laccase*),之后又在许多物种被检测到,尤其在某些高等丝状真菌中分布最为广泛。对真菌漆酶(*Fungal laccase*)的研究是因其在环境保护和生物修复中具有重要应用价值而激发的。已有结果表明,真菌漆酶能氧化降解广泛有机芳香污染物和某些非芳香有毒化合物,如单酚、二酚、芳胺、芳香酸、木素及其衍生物等^[10-13],真菌漆酶正在成为国际上处理有机芳香污染物最重要的环保用酶之一。蜜环菌胞外漆酶是蜜环菌次级生长代谢阶段产生的主要酶类,在蜜环菌发酵过程中,当菌丝体处于快速生长末期,且培养基中可利用碳源含量较低时才有漆酶产生(如图1),这一定程度上反映了木素分解真菌在无适合利用碳源的情况下改变代谢途径,合成木素分解酶(如漆酶)进而分解木素进行碳源代谢的生理机制;另一方面,多数漆酶产生菌的漆酶合成量受木素及其结构类似化合物诱导调控,虽然相关研究近年来有所进展,但确切机制还不清楚,也反映了真菌合成漆酶及其代谢木素类似化合物的复杂性。为提高蜜环菌胞外漆酶的合成量,研究中使用了泥炭抽提液添加于发酵培养基,该抽提液含有组分复杂的木质纤维转化物^[7],特别是大量的芳香族化合物,这些化合物能诱导漆酶合成,显著提高蜜环菌胞外漆酶产率。同时,泥炭提取液中存在的有机氮类物质也能刺激漆酶合成。另外,在实验范围内培养基初始pH的改变对蜜环菌菌丝体生长并没有明显影响,但不同pH条件下漆酶的产量却相差很大,这可能与漆酶在过酸或过碱的环境条件下不稳定有关。有报道有机氮源比无机氮有利于漆酶合成,本研究也显示有机氮有利于蜜环菌漆酶合成。

通过制备级活性PAGE电泳和阴离子交换柱层析,将蜜环菌漆酶同工酶A分离纯化至电泳均一。已经报道的真菌漆酶大多为含多铜的酸性蛋白质,分子量在60~80kD左右。研究表明,蜜环菌胞外漆酶A为单肽链蛋白,分子量59kD,等电点pI 4.0,原子吸收分光光度法测试的纯化酶蛋白中含有铜元素(数据未显示)。因此该酶是较典型的漆酶蛋白。漆酶氧化转化底物是靠电子转移实现的, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 是电子传递抑制剂,在1mmol/L时就能完全抑制蜜环菌胞

外漆酶A活性;低浓度 Cu^{2+} 对漆酶有激活作用,可能是因为纯化制备过程中造成酶拥有的部分 Cu^{2+} 丢失,当微量 Cu^{2+} 重新进入活性中心,增加了有效酶量,或 Cu^{2+} 的加入起到了稳定酶空间结构作用,提高了酶催化效率,而当 Cu^{2+} 浓度较高(100mmol/L)时,可能因高浓度重金属离子对蛋白质具有变性作用,导致漆酶失活。低浓度的金属离子螯合剂EDTA对漆酶酶活没有影响,与*Coprinus cinereus*漆酶相似^[13],高浓度的 Cl^- 对该酶活性有抑制作用。酶氧化ABTS的 K_m 值比氧化愈创木酚的 K_m 值小,显示ABTS是蜜环菌胞外漆酶A更适合的作用底物。与*Pleurotus ostreatus*和*Phanerochaete flavido-alba*漆酶相比^[14,15],蜜环菌胞外漆酶A的最适反应温度为60℃,在60℃和65℃时的半衰期分别为45min和36.8min,有较好的热稳定性,显示该酶在多酚类化合物脱毒转化和环境保护中有潜在应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] HUANG N I(黄年来). Colored Illustrations of Macrofungi (Mushrooms) of China(中国大型真菌原色图谱), Beijing: China Agricultural Press(中国农业出版社),1998, pp.101
- [2] MAO X I(卯晓岚). Economic Fungi of China(中国经济真菌), Beijing: Science Press(科学出版社),1998, pp.135
- [3] LI H S(李河水), WANG I(王琳), LIU X H(刘晓辉) et al. Synthesis of 6-(5-hydroxy 2-pyridylamino)-9-ribofuranosylpurine, a cerebral-protecting ingredient isolated from *Armillaria mellea* and derivatives. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*(中国药物化学杂志), 1998, 2(2):116~121
- [4] Youn H-D, Hah Y C, Kang S-O. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol*, 1995, 132:183~188
- [5] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role of for laccase in biodegradation. *FEBS Lett*, 1990, 267:99~102
- [6] Bourbonnais R, Paice M G. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *TAPPI J*, 1996, 79:199~204
- [7] WANG Y P(王怡平), XIAO Y Z(肖亚中), SHEN Z X(沈中兴) et al. Optimization of composition of peat medium for the submerged cultivation of *Pleurotus djamour* by orthogonal design. *Journal of Anhui University Natural Science Edition*(安徽大学学报自然版), 1996, 20(6):92~97
- [8] WU J(吴涓), XIAO Y Z(肖亚中), WANG Y P(王怡平) et al. Spectrophotometric determination of the extracellular laccase activity of *Armillaria mellea*. *Journal of Xiamen University Natural Science Edition*(厦门大学学报自然版) 2001, 4(4):893~898
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193:263~275
- [10] Ullah M A, Bedford C T, Evans C S. Reaction of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*,

- [11] Abadulla E , Tzanov T , Costa S *et al.* Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta* . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** (8) 3357 ~ 3362
- [12] Ullah M A , Kadhim H , Rastall R A *et al.* Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor* , for use in bioremediation on chlorophenols in aqueous effluents. *Appl Microbiol Biotechnol* . 2000 , **54** 832 ~ 837
- [13] Schneider P , Caspersen M P , Mondorf K *et al.* Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microbiol Technol* , 1999 , **25** :502 ~ 508
- [14] Youn H D , Kim K-J and Maeng J-S. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* . *Microbiology* , 1995 , **141** 393 ~ 398
- [15] Perez J , Martinez J and Rubia T D L. Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidobalba* . *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** (11) 4236 ~ 4267

Studies on Production , Purification and Partial Characteristics of the Extracellular Laccase from *Armillaria mellea*

XIAO Ya-Zhong^{1 2} WANG Jun² WANG Yi-Ping² PU Chun-Lei¹ SHI Yun-Yu^{1*}

¹(Laboratory of Structure Biology , University of Science and Technology of China , CAS , Hefei 230026 , China)

²(School of Life Sciences , Anhui University , Hefei 230039 , China)

Abstract The production conditions of extracellular laccase from *Armillaria mellea* and the characteristics of the enzyme were studied. The experiment proved that initial pH5.5 of the culture medium and temperature at 25 °C were favorable for laccase synthesis. As carbon resources , cellobiose and raffinose were better in terms of productivity than maltose , sorbose and galactose. organic nitrogen source was more suitable for *Armillaria mellea* to synthesize laccase than inorganic nitrogen source. Peat extract (PE) enhanced notably the yield of laccase ; the maximal yield was 7 times as much as that of the control when PE concentration was 50% . Three isozymes were detected in culture supernatant named A , B and C respectively after their mobility on PAGE. After concentrated by (NH₄)₂SO₄ precipitation , laccase A was further purified to homogeneity by preparative native PAGE and anion exchange column chromatography. The native enzyme was a single polypeptide with a molecular mass of approximately 59kD estimated by SDS-PAGE , while 58kD by gel filtration chromatography under non-denaturing conditions. Determined by IEF its isoelectric point was 4.0. The optimal pH value and temperature were 5.6 and 60 °C respectively in catalytic reaction of oxidizing guaiacol. At 60 °C and 65 °C , half-lives of laccase A were 45min and 36.8min , respectively. Enzyme activity was inhibited with 100mmol/L Cl⁻ , but was activated with 1mmol/L SO₄²⁻ . However , if the concentration of NaN₃ was only 1mmol/L , laccase A lost its activity completely. 10 mmol/L EDTA had no effect on laccase A , while 1mmol/L Cu²⁺ could enhance its activity. Laccase A showed a good stability when the pH of the buffer varied from 5.2 to 7.2. Using guaiacol as the substrate , the K_m was 1.026mmol/L and the V_{max} was 5 μmol(min · mg) ; using ABTS instead , the K_m was 0.22mmol/L and V_{max} was 69 μmol(min · mg) .

Key words *Armillaria mellea* , extracellular laccase , fermentation conditions , enzyme characteristics

Received : 01-07-2002

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of Anhui Province (No.98212411) and the Anhui Provincial Education Committee (No.2000J1013.)

* Corresponding author. Tel : 86-551-3607464 ; Fax : 86-551-3603754 ; E-mail : yyshi@ustc.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>