

荷叶离褶伞高产漆酶菌株选育及其漆酶酶学特性

梁倩倩^{1,2}, 魏生龙¹, 丁玲强², 闫红霞², 梁艳萍², 席亚丽^{1*}

¹河西学院食用菌研究所; ²河西学院农业与生物技术学院, 张掖 734000

摘要:应用原生质体紫外诱变,对一株产漆酶荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*)菌株紫外诱变,用愈创木酚马铃薯葡萄糖固体平板变色法初筛,然后用 ABTS [2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐]测定漆酶活性进行复筛,获得 1 株漆酶高产诱变菌株 HY1022-01;对 HY1022-01 所产漆酶粗酶液酶学特性进行研究,结果表明, HY1022-01 所产漆酶最大酶活力比出发菌株提高 30.32%,最适条件下酶活达 991.67 U/mL,且产酶稳定; HY1022-01 所产漆酶最适作用温度为 35 ℃,在 30~35 ℃较为稳定;最适反应 pH 值为 3.0, pH 在 2.2~3.8 较为稳定, ABTS 的漆酶动力学常数为 72.622 μM。

关键词:荷叶离褶伞;漆酶;紫外诱变

中图分类号: S646.2

文献标识码: A

Mutational Screening of *Lyophyllum decastes* with High Yield of Laccase and Characteristics of Laccase from the Mutant

LIANG Qian-qian^{1,2}, WEI Sheng-long¹, DING Ling-qiang², YAN Hong-xia², LIANG Yan-ping², XI Ya-li^{1*}

¹Institute of Edible Fungi, Hexi University; ²Department of Life Science and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, China

Abstract: The protoplasts of one *Lyophyllum decastes* were exposed to UV radiation and the mutants were screened on guaiacol-containing PDA plates. The laccase activities of the mutated strains were further determined by ABTS. A mutant strain HY 1022-01 with high production yield of laccase was obtained. The further investigation on the characteristics of laccase from mutant strain HY 1022-01 showed that the maximum laccase activity increased 30.32% compared to its parent strain and up to 991.67 U/mL in optimum condition. The laccase activity was stable in 30-35 ℃ and pH of 2.2-3.8, while the optimal temperature and pH was 35 ℃ and 3.0 respectively. The K_m was 0.72622 μM on the basis of ABTS.

Key words: *Lyophyllum decastes*; laccase; ultraviolet mutagenesis

漆酶是一种结合多个铜离子的蛋白质,属于铜蓝氧化酶,存在菇、菌及植物中,它作用底物广泛,能催化氧化多种酚类和芳胺类化合物,在造纸、食品、废水处理、土壤净化、染料脱色等方面具有广阔的应用前景^[1-3],因此开发高产漆酶的菌株具有重要意义。分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌门、子囊菌门及半知菌类等真菌。

荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*)属野生优良食用菌,本实验室于 2008 年获得了该菌的国家发明专利授权^[4],2009 年以来我们对荷叶离褶伞菌丝体的发酵条件及菌丝体和发酵液中营养成分等方面进行了相关研究^[5-7],发现该菌株具有产漆酶活性。因此本研究对该菌株进行原生质体紫外诱变育种,并对

其漆酶的酶学特性进行了研究,为今后开展研究漆酶在荷叶离褶伞生长过程中所起的生物学功能及进一步开发应用奠定基础;目前,关于荷叶离褶伞漆酶方面的研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

供试荷叶离褶伞菌株(*L. decastes*, 保藏号 CGM-CC 1518, 菌株号 ZY 48-1, 专利号 ZL 200510096405.0)由甘肃省真菌研究工程实验室提供。

溶壁酶(广东省微生物研究所);蜗牛酶(北京百泰生化技术公司);ABTS(Ruibio 进口分装);其他试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器

BK-FL 荧光倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);SF-CJ-2A 净化工作台(扬州市三发电子有限公司);HZQ-X400 恒温振荡培养箱(华美生化

收稿日期:2013-11-06 接受日期:2014-07-02

基金项目:科技部甘肃科技支撑项目(1104NKCG091);河西学院校长基金项目(xz20109)

* 通讯作者 E-mail:zywsw0281@163.com

仪器厂); 移液枪(日本); DKB-501 恒温水浴锅(扬州三发电子有限公司); LRH-500-D 恒温培养箱(韶关市泰虫医疗器械有限公司); CL-32L 蒸汽灭菌锅(日本 ALP 公司); 数显恒温磁力搅拌器(常州国华电器有限公司); SP-722 型分光光度计(上海光谱); TCL-20M 台式高速冷冻离心机(湖南赛特湘离心机仪器有限公司); IMS-50 制冰机(江苏格林电器有限公司)。

1.3 培养基

(1) 固体培养基: 马铃薯 200 g、麸皮 30 g、磷酸二氢钾 1 g、蛋白胨 3 g、葡萄糖 20 g、琼脂 16 g、水 1000 mL、pH 值自然; (2) 固体斜面筛选培养基(愈创木酚 PDA 固体培养基): 马铃薯 200 g、麸皮 30 g、磷酸二氢钾 1 g、葡萄糖 20 g、琼脂 16 g、愈创木酚 0.04%、水 1000 mL、pH 值自然; (3) 液体培养基: 马铃薯 200 g、麸皮 30 g、磷酸二氢钾 1 g、蛋白胨 3 g、葡萄糖 20 g、水 1000 mL、pH 值自然; (4) 原生质体再生培养基: 马铃薯 200 g、麸皮 30 g、磷酸二氢钾 1 g、蛋白胨 3 g、葡萄糖 20 g、琼脂 16 g、蔗糖 205.374 g、水 1000 mL、pH 值自然。

1.4 方法

1.4.1 菌种培养^[7]

菌株活化: 将菌株 ZY48-1 接种固体培养基平板, 25 °C 黑暗连续活化培养 5 d, 取直径 5 mm 活化后的菌落三块, 接种 80 mL 液体培养基三角瓶(250 mL), 25 °C、120 rpm 振荡培养 72 h。按照 5% 接菌量, 将活化菌丝接种 80 mL 的液体培养基三角瓶(250 mL), 25 °C、120 rpm 连续黑暗振荡培养 72 h。

1.4.2 原生质体诱变^[7]

取 72 h 菌丝培养液, 2 层擦镜纸过滤收集菌丝, 无菌水冲洗 5 遍, 0.6 mol/L 蔗糖渗透压稳定剂洗涤 2 遍。置菌丝体于无菌的离心管中, 加入 1% 溶壁酶 + 0.5% 蜗牛酶的混合酶液, 使菌丝体与混合酶液的质量体积比为 250 mg/mL, 30 °C 下酶解 2.5 h, 用无菌带脱脂棉滤芯的针管过滤, 滤液 3500 rpm 离心 10 min, 弃上清, 用 0.6 mol/L 蔗糖渗透压稳定剂洗涤 3 次, 得到纯化的原生质体(整个过程在无菌条件下进行)。

无菌条件下, 原生质体稀释至 10^4 个/mL, 取 2 mL 于 7.5 cm 无菌培养皿, 置电磁搅拌器, 使原生质体悬液保持均匀。黑暗条件下, 在预热稳定的 15 W 紫外灯下距离 30 cm 处分别照射 0、5、10、15、20、25、30、45、60、120 s, 在红光灯下, 吸取原生质体悬液 200 μ L, 涂布再生培养基, 用黑纸包好, 25 °C 黑暗培

养 10 d, 计菌落数, 计算原生质体紫外线诱变半致死剂量。绘制荷叶离褶伞原生质体紫外诱变剂量效应曲线, 确定原生质体紫外诱变合适诱变剂量。

致死率(%) = (未照射的再生菌落数 - 照射后的再生菌落数) / 未照射的再生菌落数 \times 100

1.4.3 PDA 平板变色圈初筛

选择半致死剂量 30 s 的剂量作为诱变剂量诱变, 再生平板上长出菌落后, 转至愈创木酚 PDA 固体培养基 25 °C 进行变色圈筛选, 观察测量显色圈大小, 挑选显色圈较出发菌株深、大的菌落初定为漆酶高产菌株。

1.4.4 漆酶酶活测定复筛

对经 PDA 平板变色圈初筛的 Z1、Z2、Z4、Z6 进行菌种培养, 从发酵的 72 h 开始, 过滤取上清液, 置于 12000 rpm 离心 10 min, 取上清为粗酶液, 以 ABTS 为底物, 每 24 h 测一次漆酶酶活, 到第 240 h 结束, 筛选高产漆酶酶活菌株。

漆酶酶活力测定, 液体培养基经 4 °C、12000 rpm 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。以 ABTS 为底物(420 nm 处 ABTS 的摩尔吸光系数: $\epsilon = 3.6 \times 10^4$ mol/cm), 3 mL 反应混合液中, 含 2.75 mL pH = 3.8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系, 200 μ L 0.5 mmol/L ABTS 和 50 μ L 粗酶液, 25 °C 反应 2 min 后立即用冰浴终止反应, 于 420 nm 处测定吸光度。以灭活的酶液反应混合液为对照。酶活单位定义: 1 min 内催化氧化 1 μ mol ABTS 的酶量为 1 个酶活单位。

漆酶活力(U/mL) = $\Delta OD \times V1 / (\Delta t \times V2 \times \epsilon \times 10^{-6})$

式中: ϵ_{420} (ABTS) = 3.6×10^4 mol/cm; ΔT —2 min; ΔOD —吸光度的变化值; $V1$ —反应液的总体积; $V2$ —反应中酶液的体积(mL)。

1.4.5 高产漆酶突变株酶学性质研究

1.4.5.1 漆酶最适 pH 和 pH 稳定性

荷叶离褶伞突变菌株漆酶粗提液, 在 pH 分别为 1.5、2.2、3.0、3.8、4.6、5.4、6.2、7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 25 °C 下水浴 2 min 后 420 nm 测定其漆酶活性。

稳定性: 将荷叶离褶伞漆酶粗提液于 pH 分别为 1.5、2.2、3.0、3.8、4.6、5.4、6.2、7.0 在 25 °C 下水浴 30 min 后 420 nm 测定其漆酶活性。

1.4.5.2 漆酶最适温度和温度稳定性

用 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲体系分别在不同温度下检测突变菌株漆酶活力, 荷叶离褶伞突变菌株漆酶粗提液在 20、25、30、35、40、45、50、

55、60 °C 下加底物和缓冲液水浴 2 min,测定不同温度下的酶活。

稳定性:将荷叶离褶伞漆酶粗提液于 30 °C 和 40 °C 下保温 1、1.5、2、2.5 h 后检测漆酶活力,根据不同时间段内酶活力的变化判断漆酶热稳定性。

1.4.5.3 漆酶动力学常数的测定

酶液与不同浓度的底物 (ABTS) 反应后测其酶活力,用 Lineweaver-Burk 作图法求出酶对 ABTS 的 K_m 值。

2 结果及分析

2.1 原生质体诱变

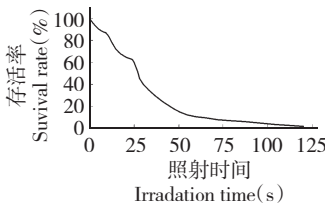


图 1 荷叶离褶伞原生质体紫外诱变剂量效应曲线

Fig. 1 The dose response curve of *L. decastes* protoplasts by UV radiation

荷叶离褶伞原生质体紫外诱变剂量效应曲线,如图 1 所示,原生质体经紫外线照射后,再生菌落数逐渐减少。在 0 ~ 45 s 照射时间内,曲线变化很剧烈。45 s 以后,曲线趋于平缓,因此荷叶离褶伞原生质体紫外线辐射至半致死率的照射剂量约为 30 s。

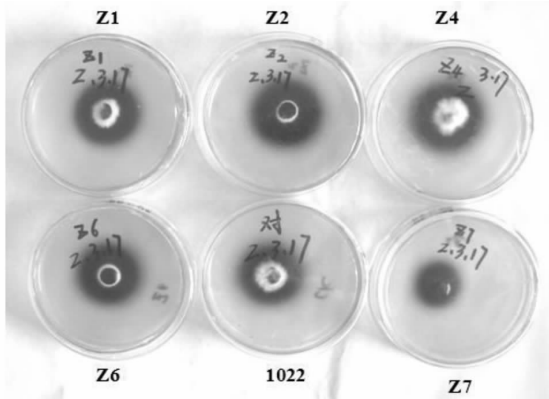


图 2 愈创木酚变色初筛平板

Fig. 2 Screening higher producing strain by guaiacol medium preliminary

Z1、Z2、Z4、Z6、Z7 为诱变菌株;1022 为出发菌株
Z1、Z2、Z4、Z6 and Z7 are mutated strains;1022 is ck strain

2.2 愈创木酚变色圈初筛

从 27 株诱变菌株中,初步筛选出 4 株菌株 Z1、

Z2、Z4、Z6,结果见图 2 其变色圈均大于对照 1022 且颜色较深。

2.3 漆酶酶活复筛

由图 3 显示,Z1 菌株较其他几个菌株表现出漆酶高产(216 h, $U = 805.83 \text{ u/mL}$) 早产(168 h, $U = 576.67 \text{ u/mL}$),并且各个时期产酶量均高于对照 1022;菌株 1022 (618.33 u/mL) 和 Z1 (805.83 u/mL)、Z2 (629.9997 u/mL)、Z4 (575.8331 u/mL)、Z6 (601.6664 u/mL) 分别在 216 h、216 h、192 h、240 h、168 h 时的漆酶产量最高,酶活力最大。初筛突变菌株中 Z6 酶活和出发菌株 1022 差距较小,但是其产酶较早,在 168 h 达到最大酶活。复筛确定 Z1 为高产漆酶突变菌株,将其命名为 HY1022-01。

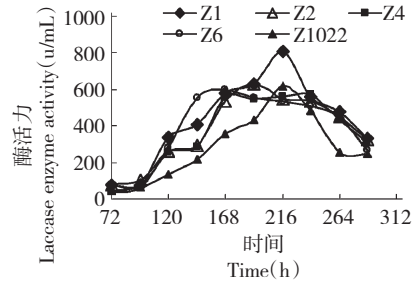


图 3 菌龄对漆酶活力影响

Fig. 3 Enzyme activities of laccase at different times
1022 为原菌株;Z1、Z2、Z4、Z6 为突变株
Z1、Z2、Z4、Z6 and Z7 are mutated strains;1022 is ck strain

2.4 突变株漆酶酶学性质

2.4.1 漆酶最适 pH 值及稳定性

不同 pH 值条件对漆酶活力的影响,见图 4,pH 对酶活的影响较大,pH 微弱的变化会极大影响酶活,pH 1.5 ~ 3.0 酶活曲线陡峭,酶活在 pH 3.0 达到最大值,pH 3.0 ~ 7.0 相对较为平缓,当 pH 值达到 7.0 时漆酶酶活为 0。图 5 结果表明,酶活在 pH 2.2 ~ 3.8 较为稳定,保持了 80% 以上的酶活,在 pH 高于 4.6 后酶活损失严重,由此表明荷叶离褶伞漆酶为耐酸性酶。

2.4.2 漆酶最适反应温度和稳定性

温度对漆酶活性及稳定性的影响如图 6、7 所

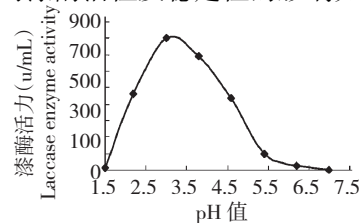


图 4 pH 值对漆酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of laccase

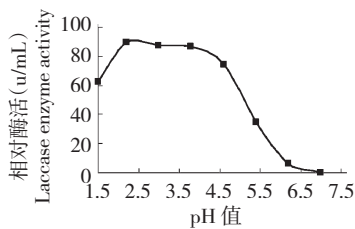


图5 pH对漆酶稳定性的影响

Fig. 5 Effects of pH on stabilities of laccase

示,此酶的最适反应温度为 35 ℃,在 20~35 ℃,随着反应温度的升高,漆酶催化氧化效率增加,当温度 35~40 ℃时漆酶活性变化较大,随温度增加酶失活率增加;酶活温度稳定性曲线图 7,酶活随水浴时间的增加而下降,在 0~1 h 变化较快,30 ℃时酶活下降了 25%,40 ℃时酶活下降了 33%,30 ℃保温 2.5 h 后,残留酶活为 66.12%,在 40 ℃保温 2.5 h 后,残留酶活为 53.21%;说明温度对酶活的影响较大,且温度越高影响越大,在进行酶的分离纯化等操作须低温以提高酶活力,此时测得的最大酶活 991.67 U/mL。

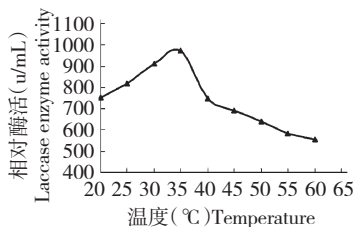


图6 温度对漆酶活力的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the activity of laccase

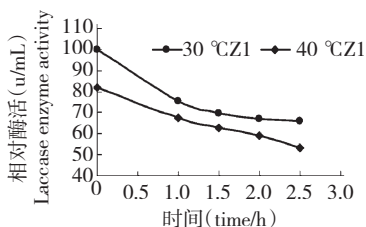


图7 温度对漆酶稳定性的影响

Fig. 7 Effects of temperature on stabilities of laccase

2.4.3 动力学 Km 值

在 35 ℃、pH = 3.0 时测得不同浓度 ABTS ([S]) 下的反应速度 (v)。图 8 给出了 1/v 与 1/[S] 的关系曲线,可以看出,该曲线线性关系较好,可以得到漆酶催化 ABTS 的米氏常数 (Km) 为 0.72622 μM。

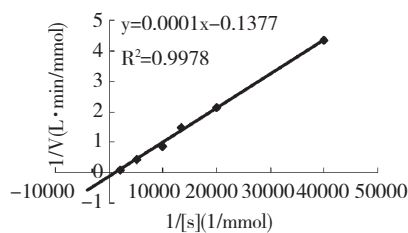


图8 HY1022-01 漆酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 8 Lineweaver-Burk plots of laccase from HY1022-01

3 结论

目前,漆酶在造纸、脱色、食品加工等领域均有广泛的应用潜力,但有关漆酶的优良菌种的选育以及能否规模化工业生产是制约其应用开发的主要瓶颈之一。荷叶离褶伞有关其分泌漆酶的特性鲜有报道。本研究以荷叶离褶伞为出发菌株,通过紫外线诱变,经过愈创木酚—PDA 培养基初筛,ABTS 测定酶活复筛,最终筛选得到一株酶活力高且遗传性状稳定的突变株 HY1022-01,其酶活力比出发菌株提高了 30.32%,最大酶活为 991.67 U/mL,最适作用温度为 35 ℃,在 30~35 ℃较为稳定;最适反应 pH 值为 3.0,pH 在 2.2~3.8 较为稳定,ABTS 的漆酶动力学常数为 72.622 μM。

参考文献

- Baldrian P. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol*, 2011, 30: 185-227.
- Faraco V, Giardina P, Sanna G. Metal responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 2010, 149: 2155-2162.
- Desai SS, Nityanand C. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J Biotechnol*, 2011, 3: 98-124.
- Wei SL (魏生龙). The culture of edible mushroom-*Lyophyllum decastes* (荷叶离褶伞食用菌菌株). ZL200510096405.0. 2008-07-02.
- Xi YL (席亚丽), Wang ZJ (王治江), Wang XQ (王晓琴), et al. Comparative analysis of nutrients in fruit body, mycelia and fermentation broth of *Lyophyllum decastes*. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31(6): 155-157.
- Xi YL (席亚丽), Mao AL (茆爱丽), Wang XQ (王晓琴), et al. Assessment for protein nutrition of fruit bodies, mycelia and fermentation broth of *Lyophyllum decastes*. *Mycosystema* (菌物学报), 2010, 29: 603-607.
- Liang QQ (梁倩倩), Wei SL (魏生龙), Wang H (王慧), et al. Protoplast preparation and regeneration of *Lyophyllum decastes*. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2013, 8: 603-607.