

## 秀珍菇废渣中木质素降解酶系的研究\*

# Studies on Ligninases of Pleurotus Geesteranus

潘丽霞,黎演明,竺利波\*\*

PAN Li-xia, LI Yan-ming, ZHU Li-bo

(广西科学院,非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物质产业化工程院,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nan-ning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】重点研究秀珍菇废渣中的木质素降解酶系。【方法】对秀珍菇废渣中可能存在的3种木质素降解酶:锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)及漆酶(Laccase, Lac)进行活力测定,并对漆酶的最适pH值和最适温度进行考察。【结果】在秀珍菇废渣中未检测到锰过氧化物酶活力,检测到漆酶和木质素过氧化物酶活力。漆酶的最适pH值为6.2,最适温度为30℃。【结论】较一般食用菌不同,秀珍菇废渣中同时具有木质素过氧化物酶和漆酶活力,并且木质素过氧化物酶活力还较高。

**关键词:**秀珍菇废渣 锰过氧化物酶 木质素过氧化物酶 漆酶

中图分类号:S782.23 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2014)02-0101-03

**Abstract:**【Objective】This paper focuses on lignin degrading enzymes of pleurotus geesteranus. 【Methods】Manganese peroxidase, lignin peroxidase and laccase from pleurotus geesteranus were detected. Optimal pH and temperature of laccase were also analyzed. 【Results】The results showed that only manganese peroxidase and laccase were assayed in the pleurotus geesteranus residues and no lignin peroxidase were checked. Optimal pH and temperature of laccase were 6.2 and 30℃, respectively. 【Conclusion】Different from normal mushroom, pleurotus geesteranus showed both lignin peroxidase and laccase activity.

**Key words:**pleurotus geesteranus residues, manganese peroxidase, lignin peroxidase, laccase

【研究意义】食用菌是一种具有较高经济价值的大型食用真菌,目前食用菌的开发与利用已经越来越受到国内外的重视。与此同时,在食用菌的生产加工过程中,会产生大量的废渣,给生产厂家、社会、环境带来诸多问题,如何更好的利用食用菌废渣成摆在人们面前的一个有待解决的问题。食用菌废渣中富含多种酶类,包括蛋白酶、半纤维素酶、纤维素酶和木质素酶等,这些酶都是附加值较高的产品,人

们已经逐步开始对其进行相关研究<sup>[1]</sup>。【前人研究进展】木质素的降解酶系是非常复杂的体系,目前对它的研究较多,普遍认为最重要的木质素降解酶有三种:锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)、木质素过氧化物酶(Ligninperoxidase, LiP)和漆酶(Laccase, Lac)。一些白腐菌能产生所有上述这3种分解木质素的酶,而大多数白腐菌仅产生2种甚至1种分解木质素的酶,表明这3种酶在分解木质素的过程中并不是全都必需的。大多数白腐菌产生MnP和Lac,目前已知只有少数几种白腐菌能够产生LiP。因此,MnP和Lac是降解木质素的主要酶系<sup>[2,3]</sup>。MnP(EC1.11.1.13)是一种依赖H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的亚铁血红素糖蛋白酶,仅广泛存在于木材白腐菌和各种栖息土壤的枯落层降解担子菌中,细

收稿日期:2013-12-17

修回日期:2014-01-20

作者简介:潘丽霞(1981-),女,硕士,从事生物质能源方面的研究。

\* 广西自然科学基金(2013GXNSFBA019089)资助。

\*\* 通讯作者:竺利波(1982-),女,硕士,主要从事生物技术方面的研究。E-mail:zhulibo@gxas.cn。

菌、酵母菌、霉菌和菌根菌都不产生 MnP。Lac (EC1.10.3.2)是一种含铜的糖蛋白氧化还原酶,在植物、真菌、昆虫和细菌中都检测到了该酶的存在,其中在白腐真菌和植物中最为普遍。LiP (EC1.11.1.14)与 MnP 一样,也是一种含亚铁血红素的过氧化物酶。【本研究切入点】秀珍菇是一种高蛋白、低脂肪的营养食品,鲜美可口,具有独特的风味,更有人将其称为“味精菇”,另外,秀珍菇具有很强的腐生能力,很容易进行人工栽培,因此成为近年来的菌中新秀,颇受市场欢迎,秀珍菇废渣的有效利用也日益受到人们的重视。【拟解决的关键问题】针对秀珍菇废渣中的木质素降解酶系进行分析,确定其主要的木质素酶系,并对漆酶的酶学特性进行研究,为更有效的利用秀珍菇废渣进行一些初步的研究和探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种来源:秀珍菇废渣由广西大学生命科学与技术学院蒙健宗老师提供,试验前保藏于 4℃ 冰箱。

试剂:丙二酸钠, MnSO<sub>4</sub>, 2,6-DMP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 黎芦醇, 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐均购于上海生物工程有限公司。

仪器:紫外可见分光光度计(BECKMAN COULTER DU800)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 粗酶液的提取方法

先对秀珍菇废渣的天然 pH 值进行测定,选取在其天然 pH 值附近的缓冲液作为提取液,每千克废渣用 1L 的提取液浸泡,浸泡液先用滤布过滤,再在 4℃,9000r/min 条件下离心 10min,取上清即为粗酶液。

#### 1.2.2 Manganese peroxidase 酶活测定方法

Manganese peroxidase 的活性通过紫外可见分光光度计在 470nm 处检测 2,6-DMP 的氧化进行测定<sup>[4]</sup>。反应体系 1mL,其中丙二酸钠缓冲液(50mmol/L)840 $\mu$ L, MnSO<sub>4</sub>(10mmol/L)50 $\mu$ L, 2,6-DMP(10mmol/L)50 $\mu$ L,酶液样品 50 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10mmol/L)10 $\mu$ L,以 1mL 去离子水作为对照,测定 470nm 处吸光度在 1min 内变化值,反应起始于 10mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的加入。

酶活单位(U):上述条件下,每分钟催化 1 $\mu$ mol 2,6-DMP 所需的酶量。计算中的  $\epsilon_{470} = 49600(1/\text{molcm})$ 。

#### 1.2.3 Lignin peroxidase 酶活测定方法

Lignin peroxidase 采用以黎芦醇(VA)为底物的测定方法<sup>[5]</sup>。反应体系 1mL,其中丙二酸钠缓冲液(100mmol/L, pH 值为 3.0)340 $\mu$ L,黎芦醇(20mmol/L)100 $\mu$ L,酶液样品 550 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(54mmol/L)10 $\mu$ L,以 1mL 去离子水作为对照,测定 310nm 处吸光度在 3min 内变化值,反应起始于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的加入。

酶活单位(U):上述条件下,每分钟催化 1 $\mu$ mol VA 所需的酶量。计算中的  $\epsilon_{310} = 9300000(1/\text{molcm})$ 。

#### 1.2.4 Laccase 酶活测定方法

Laccase 的活性通过紫外分光光度计在 420nm 处检测 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)的氧化进行测定<sup>[6]</sup>。反应体系 1mL,其中丙二酸钠缓冲液(50mmol/L)850 $\mu$ L,酶液样品 100 $\mu$ L,ABTS(20mmol/L)50 $\mu$ L,以 1mL 去离子水作为对照,测定 420nm 处吸光度在 3min 内的变化值,反应起始于 20mmol/L ABTS 的加入。

酶活单位(U):上述条件下,每分钟催化 1 $\mu$ mol ABTS 所需的酶量。计算中的  $\epsilon_{420} = 36000(1/\text{molcm})$ 。

#### 1.2.5 Laccase 最适 pH 值和温度的测定

(1)最适 pH 值的测定:用不同 pH 值(5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.0)的丙二酸钠缓冲液配制反应体系后按 2.4 提供的方法测 Laccase 酶活力,并 pH 值对酶活力的影响曲线。

(2)最适温度的测定:分别在 20~45℃(间隔 5℃)条件下按 2.4 提供的方法测定 Laccase 酶活力,并绘制温度对酶活力的影响曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 秀珍菇废渣中 Manganese peroxidase 酶活的测定

实验结果显示,在反应过程中,吸光度没有改变,即不检测不到 Manganese peroxidase 酶活力,说明在秀珍菇废渣粗酶液中不存在 Manganese peroxidase。

### 2.2 秀珍菇废渣中 Lignin peroxidase 酶活的测定

具体反应过程如图 1 所示,吸光度变化明显,在 1min 内呈现出较强的上升趋势,在 2min 内,上升趋势变得缓慢,再往后基本保持不变。经计算,Lignin peroxidase 的酶活力为 49600U/mL。

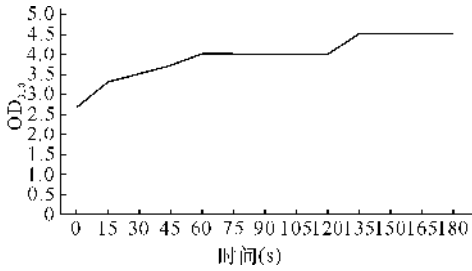


图1 Lignin peroxidase 酶活的测定

### 2.3 秀珍菇废渣中 Laccase 酶活的测定

具体反应过程如图 2 所示,吸光度出现明显的变化,在 3min 内呈现出良好的线形上升趋势。经计算,Laccase 的酶活力为 92.6U/mL。

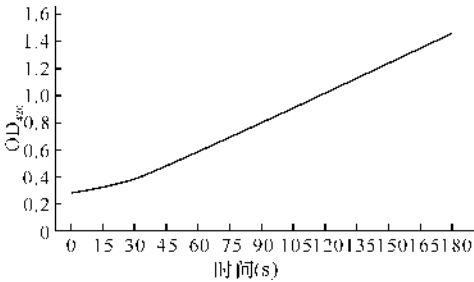
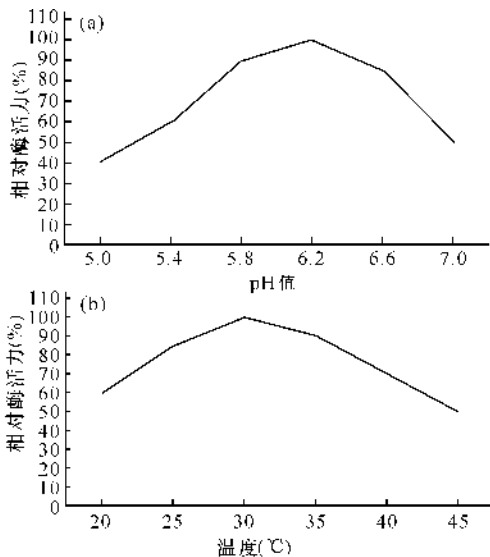


图2 Laccase 酶活的测定

### 2.4 秀珍菇废渣中 Laccase 最适 pH 值和温度的测定

由于秀珍菇废渣中的 Laccase 酶学特性的相关报道较少,对其最适 pH 值和温度进行了粗测。pH 值的范围选择在其天然生长 pH 值附近,温度同样选在其天然生长温度附近。结果如图 3(a,b)所示,秀珍菇废渣中 Laccase 的最适 pH 值为 6.2,最适温度为 30℃。

图3 Laccase 最适 pH 值和温度的测定  
(a)最适 pH 值;(b)最适温度。

## 3 结论

本文对秀珍菇废渣中的木质素降解酶系进行了初步的测定,结果较一般食用菌不同,如红平菇废渣中既没有锰过氧化物酶活力又没有木质素过氧化物酶活力,只有漆酶活力,秀珍菇废渣中同时具有木质素过氧化物酶和漆酶活力,但不具有锰过氧化物酶活力。本文同时研究了漆酶的最适 pH 值和最适温度,结果表明,其最适 pH 值为 6.2,最适温度为 30℃。值得注意的是,秀珍菇废渣中具有木质素过氧化物酶活力,并且酶活力还较高,这对目前价格较高的木质素过氧化物酶是否是一种新的生产来源,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:5.
- [2] Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13: 125-135.
- [3] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 454-466.
- [4] Wariishi H, Valli K, Gold M H. Manganese oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *phanerochaete chrysosporium* kinetic mechanism and role of chelators[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(33): 23688-23695.
- [5] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 238-249.
- [6] Eggert C, Temp U, Eriksson K E. The ligninolytic system of the white-rot fungus *pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1151-1158.

(责任编辑:陆雁)