

# 用于烟梗木质素降解的漆酶的分离纯化研究

张锐<sup>1,4</sup>, 李元实<sup>2</sup>, 寇霄腾<sup>3</sup>, 朱良华<sup>2</sup>, 余翔<sup>1</sup>, 马林<sup>1</sup>

- (1. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 吉林烟草工业有限责任公司 生产技术中心, 吉林 延吉 133000;
3. 安徽中烟工业有限责任公司 原料研究部, 安徽 蚌埠 233000;
4. 云南中烟再造烟叶有限责任公司 技术中心, 云南 昆明 650000)

**摘要:**通过云芝菌发酵得到的漆酶粗酶液经超滤浓缩后,以硫酸铵为盐析剂进行分级盐析沉淀,利用DEAE-Sephrose-F. F.柱层析对漆酶的发酵液进行分离纯化。SDS-PAGE电泳分析证明获得了电泳纯漆酶,其分子量约为64.4 kD。分离纯化过程中酶被纯化了22.80倍,酶活的回收率为36.32%,表明云芝菌产漆酶得到了很好的分离纯化。将漆酶液用于烟梗木质素的降解,实验结果表明,经此降解处理过的烟梗其内在品质得到了一定的提高:杂气和刺激性明显降低,木质气明显减弱,香气和余味均有改善。

**关键词:**烟梗木质素;漆酶;分离纯化;云芝菌

**中图分类号:**TS41<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.06.002

## Separation and purification of laccase used for tobacco stem lignin degradation

ZHANG Rui<sup>1,4</sup>, LI Yuan-shi<sup>2</sup>, KOU Xiao-teng<sup>3</sup>, ZHU Liang-hua<sup>2</sup>, YU Xiang<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1</sup>

- (1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Production and Technical Center, Jilin Tobacco Industry Co., Ltd., Yanji 133000, China;
3. Department of Materials Research, China Tobacco Anhui Industry Co., Ltd., Bengbu 233000, China;
4. Technology Center, China Tobacco Yunnan Reconstituted Tobacco Co., Ltd., Kunming 650000, China)

**Abstract:** After the laccase crude enzyme which was obtained by fermenting *Coriolus versicolor* had been concentrated and hyperfiltrated, grading salting precipitation and DEAE-Sephrose-F. F. column chromatography had been taken to separate and purify the laccase fermented liquid with ammonium sulfate as the salting-out agent. SDS-PAGE electrophoresis results showed that pure laccase could be obtained, the molecular weight was about 64.4 kD, enzyme was purified for 22.80 times by the purification process, the enzyme activity recovery rate was 36.32%. These proved that the laccase which was produced by *Coriolus versicolor* could be well purified. Using the enzyme solution in the experiment stem lignin degradation, the results showed that the intrinsic quality of the processed tobacco stems had been improved to some extent, miscellaneous gases and irritating significantly reduced, wood gas also significantly reduced, aroma and aftertaste slightly improved.

**Key words:** tobacco stem lignin; laccase; separation and purification; *Coriolus versicolor*

**收稿日期:**2014-04-22

**作者简介:**张锐(1988—),男,云南省昆明市人,郑州轻工业学院硕士研究生,云南中烟再造烟叶有限责任公司助理工程师,主要研究方向为烟草薄片质检。

**通信作者:**马林(1964—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为烟草生物技术及卷烟工艺。

## 0 引言

烟梗的主要成分是细胞壁物质,如纤维素、半纤维素、木质素以及多糖等.烟梗中的木质素对烟草内在品质及风味有不利影响,抽吸时会产生多种有害成分,故烟梗在卷烟产品中的应用受到了很大的限制.从烟梗中分离木质素,运用漆酶对其进行降解,可改善烟梗的品质.

漆酶是一种含铜离子的多酚氧化酶,与植物抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同属于铜蓝蛋白家族<sup>[1]</sup>.它最早在日本紫胶漆树的渗出液中被发现<sup>[2]</sup>,后在真菌中被发现<sup>[3-4]</sup>,在白腐菌中普遍存在,少数低等真菌和植物中也产生漆酶<sup>[5]</sup>.目前,使用较广泛的产漆酶菌株有杂色云芝菌(*Coriolus versicolor*)、彩绒革盖菌(*Trametes versicolor*)等.在纯系培养中漆酶能有效地将木质素分解为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O,但由于漆酶发酵周期长、原料成本高、酶活力较低,因而此种分解方法还未能实现大规模的工业化生产.为了更好地利用云芝菌产漆酶,本文拟通过研究漆酶粗酶液经过分离纯化后的酶活力变化情况,将纯化的漆酶应用于烟梗木质素的降解,从而改善烟梗品质,提高烟梗在卷烟中的使用价值.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验仪器和材料

菌种:云芝菌由郑州轻工业学院生物实验室保存,菌丝体于4℃保存在PDA斜面培养基上.

材料:牛肉膏、蛋白胨、琼脂等(生化试剂),北京奥博星生物技术有限责任公司产;氯化钙、硫酸亚铁、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸镁、硫酸铵等(AR级),天津大茂化学试剂厂产;葡萄糖,广东汕头市西陇化工厂产.

PDA固体培养基:马铃薯提取液20%,葡萄糖20.0g/L,蛋白胨4.0g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 500mg/L, ZnSO<sub>4</sub> 500mg/L,琼脂20.0g/L.

PDA液体产酶优化培养基:马铃薯提取液20%,葡萄糖20.0g/L,蛋白胨5.0g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 500mg/L, ZnSO<sub>4</sub> 500mg/L, CuSO<sub>4</sub> 1.0mmol/L, 维生素B<sub>1</sub>微量.

测酶活试剂:0.5mmol/L的2,2-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)溶液;醋

酸-醋酸钠缓冲溶液(pH=4.5).

实验仪器见表1.

表1 实验仪器

仪器	型号	生产厂家
双人单面超净工作台	JJ-CJ-1D	苏州金净设备有限公司
立式圆形压力蒸汽灭菌器	LDZX-30KBS	上海申安医疗器械厂
离子交换柱	DEAE-Sephrose-F.F.	美国GE公司
紫外可见分光光度计	TU-1800PC	北京普析通用仪器有限公司
高速离心机	MicroCL17	美国热电
电热恒温培养箱	DHP-600	北京永光明医疗仪器厂
全温振荡培养箱	HZQ-F160	太仓市实验设备厂
凝胶成像仪	MiniBIS Pro	以色列DNR成像系统有限公司

### 1.2 实验方法

**1.2.1 漆酶粗酶提取液的制备** 将保藏的云芝菌种转接于固体的PDA培养基上,于30℃下培养6d.将生长得到的菌丝平面制成直径约为10mm的菌片,然后在无菌条件下将3块菌片接入发酵培养基.在云芝菌液体发酵产漆酶的最适发酵条件下(摇床转速150r/min,初始pH=5.0,发酵温度28℃)培养7d,取发酵液于离心管中,在12000r/min下离心10min,得到上清液,即为粗酶液.

**1.2.2 漆酶酶活力和蛋白质含量的测定** 在一定条件下,1min氧化1.0μmol的底物所需要的酶量定义为1个酶活力单位(U).实验以ABTS(0.5mmol/L)为底物,于25℃,在2.5mL缓冲液(0.1mol/L醋酸-醋酸钠,pH=4.5)中加入0.4mL ABTS,然后加入0.1mL的粗漆酶液体启动反应,在420nm下测定3min内吸光值的变化,以按照同样方法处理加热失活的酶液作空白对照.

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝R-250比色法<sup>[6]</sup>.

**1.2.3 漆酶粗酶液的超滤浓缩** 在最佳的发酵条件下制得300mL粗酶液,并在4℃,10000r/min的条件下离心15min,取上清液用0.22μm的滤膜过滤,然后在4℃下进行超滤浓缩,直至体积为150mL左右.

**1.2.4 硫酸铵分级沉淀** 准确量取100mL漆酶粗酶液,缓慢加入研磨的硫酸铵粉末,缓慢搅拌至其完全溶解,取少量上清液和沉淀,测定酶活和蛋白质含量.每隔10%为1个硫酸铵饱和样点,确定沉淀所用的最佳饱和浓度.在粗酶液中加入硫酸铵饱和溶液至饱和度为40%,缓慢搅拌至混合均匀,然后在4℃下静置4h,使蛋白质充分沉淀.在4℃,

18 000 r/min 的条件下离心 20 min, 取上清液. 在上清液中继续加入硫酸铵粉末至二级饱和度, 缓慢搅拌至均匀, 4 ℃ 静置过夜, 离心后收集沉淀溶于 20 mL 乙酸钠缓冲液 (10 mmol/L, pH = 4.5) 中, 在 4 ℃ 环境下保存备用.

**1.2.5 透析** 将透析袋 (透析膜截留相对分子质量为  $1.5 \times 10^3$ ) 剪成 15 cm 长的片断放入盛有 2% 碳酸氢钠和 1 mmol 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液的烧杯中煮沸 10 min. 然后用蒸馏水洗涤后再煮沸 10 min, 将冷却后的透析袋浸入蒸馏水中, 在 4 ℃ 下存放于 95% 乙醇中备用. 将适量的酶液装入透析袋, 放入蒸馏水中透析 24 h, 每隔 6 h 更换 1 次缓冲液.

**1.2.6 酶液浓缩** 在透析袋外涂布聚乙二醇粉末, 放置冰箱内片刻后取出, 然后更换干燥的聚乙二醇粉末继续浓缩, 直至酶样品体积浓缩到 5 mL 左右.

**1.2.7 酶液 DEAE - Sepharose - F. F. 离子交换层析及分子量的测定** 将经过透析、浓缩后的酶液上样于预装好的 DEAE - Sepharose - F. F. 离子交换柱 (3.0 cm × 20 cm), 然后用 0.1 ~ 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 洗脱流速为 2.0 mL/min. 用自动分步收集器收集洗脱液, 每管收集 4 mL, 检测每管洗脱液的蛋白质含量及酶活力, 收集具有酶活力的组分洗脱液并将收集的酶液透析、浓缩后, 在 4 ℃ 条件下保存备用.

采用 SDS-PAGE 电泳检测漆酶的纯度及分子量<sup>[6]</sup>. 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4%. 电泳条件为恒压, 浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V. 电泳后用考马斯亮蓝 R - 250 进行染色. 根据标准蛋白 Marker 在 SDS-PAGE 中的相对迁移率对相对分子质量作图, 求出该漆酶的相对分子质量, 测定样品和标准蛋白的相对迁移率  $R_f$  值, 求得其纯酶的相对分子质量.

**1.2.8 漆酶降解烟梗中的木质素** 准确称取 2 g 烟梗粉末置于三角瓶中, 加入酶解液 (酶液、缓冲溶液和水) 100 mL, 每组重复 3 个平行样, 置于恒温振荡培养箱中进行酶解, 使烟梗末与酶液充分混合. 到达规定时间后取出, 过滤处理液并洗净样品, 用灭活后的酶解液作为对照, 其他处理条件同上. 然后用 Klason 法<sup>[7]</sup> 测定经过酶液处理前后烟梗中木质素含量, 并将降解前后的烟梗制成梗丝进行感官评吸鉴定. 其中木质素的降解率计算公式为

$$\text{木质素的降解率}/\% =$$

$$\frac{\text{酶解前烟梗中木质素含量} - \text{酶解后烟梗中木质素含量}}{\text{酶解前烟梗中木质素含量}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 硫酸铵分级沉淀

硫酸铵分级沉淀过程中上清液漆酶活力及蛋白质含量的变化情况如图 1 所示.

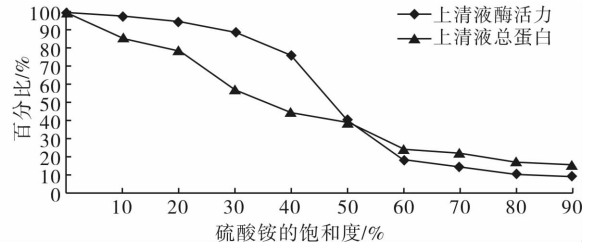


图 1 硫酸铵沉淀上清液漆酶活力及蛋白质含量变化曲线

从图 1 可以看出, 当硫酸铵饱和度 < 30% 时, 上清液中漆酶活力变化不明显, 约 44% 的蛋白质沉淀下来; 当硫酸铵饱和度在 40% ~ 60% 之间时, 上清液漆酶活力迅速下降; 当硫酸铵饱和度继续增加时, 上清液中漆酶活力变化不大, 此时上清液中的漆酶活力已经很低, 而在此过程中, 上清液中蛋白质含量的变化呈现缓慢下降的趋势. 综合硫酸铵分级沉淀过程中漆酶活力和蛋白质含量的变化情况, 选取饱和度为 40% 的硫酸铵为其分级沉淀的一级饱和度.

### 2.2 离子交换柱层析

将硫酸铵分级沉淀后的酶液, 经过透析和聚乙二醇粉末浓缩至 5 mL 后, 利用 DEAE - Sepharose - F. F. 层析柱, 对漆酶液进行提纯, 然后用 0.1 ~ 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 结果如图 2 所示.

由于蛋白质在 280 nm 处有光谱吸收, 故利用紫外可见分光光度计在 280 nm (A280) 处测量酶液的吸光值 (Abs). 由图 2 可以看出, 在整个洗脱阶段出现了两个大小不等的蛋白质峰. 检测洗脱液各管的漆酶活力后, 结果显示第 28#—40# 管的蛋白质峰较高, 与漆酶酶活峰相一致, 表示该蛋白质即为漆酶酶蛋白.

### 2.3 漆酶纯化过程中酶活力及总蛋白的变化情况

漆酶纯化过程中酶活力及总蛋白变化结果见表 2. 由表 2 可知, 在漆酶纯化过程中, 经过超滤浓缩、硫酸铵分级沉淀, 以及 DEAE - Sepharose - F. F. 柱层析的逐级分离后, 漆酶粗酶液得到了纯化, 且效果较好. 在分离纯化过程中漆酶被纯化了

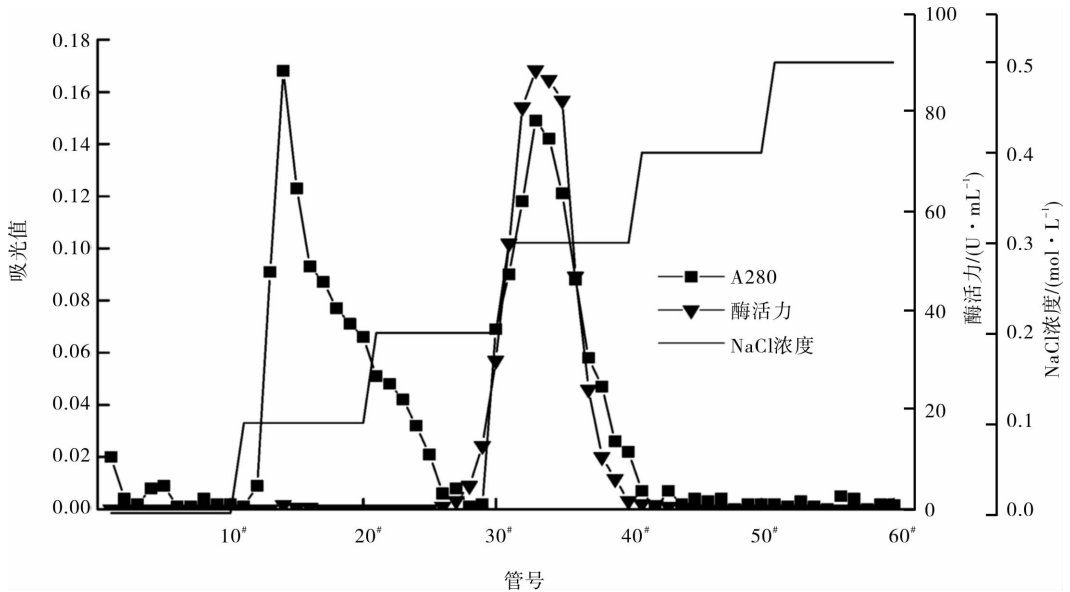


图 2 云芝菌漆酶的 DEAE - Sepharose - F. F. 层析图

22.80 倍,酶活的回收率为 36.32%.

### 2.4 漆酶纯度及分子量测定

云芝菌漆酶 SDS - PAGE 电泳图见图 3. 经过盐析和 DEAE - Sepharose - F. F. 柱层析纯化后所得的漆酶为单一区带,说明样品达到电泳纯. 根据标准蛋白的相对迁移率对相对分子量作图,求出该酶的分子量为 64.4 kD.

表 2 漆酶纯化过程中酶活力及总蛋白变化结果

纯化步骤	体积 /mL	酶活力/ $(U \cdot mL^{-1})$	总蛋白 /mg	比活力/ $(U \cdot mg^{-1})$	回收率 /%	纯化倍数
粗酶液	300	78.20	397.60	59.00	100.00	1.00
超滤液	150	74.95	169.03	66.51	95.84	1.91
硫酸铵分级沉淀	20	51.78	14.76	70.16	66.21	2.90
柱层析	52	28.41	6.34	233.02	36.32	22.80

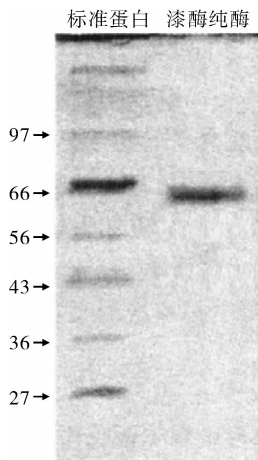


图 3 云芝菌漆酶 SDS - PAGE 电泳图

### 2.5 木质素的降解对烟梗内在品质的影响

用酶液对烟梗中的木质素进行降解,结果见表 3. 将降解前后的烟丝进行感官评吸,结果见表 4.

表 3 烟梗中木质素降解结果 %

样品	酶解前木质素含量	酶解后木质素含量	木质素降解率
烟梗 - 1	4.85	4.03	16.9
烟梗 - 2	4.78	3.99	16.5
烟梗 - 3	4.73	3.94	16.7

表 4 木质素降解对烟梗内在品质的影响

梗丝	香气	杂气	刺激性	余味	劲头
对照	尚充实,略粗糙	较重	较大	不干净,不舒适	小
处理	充实,略粗糙	稍重	有	欠干净,略舒适	小

由表 3 可知,在漆酶的作用下,烟梗中木质素的降解率最高可达 16.9%. 从表 4 明显看出,木质素降解后烟梗的内在品质均得到了一定的提高,杂气和刺激性明显降低,木质气明显减弱,香气和余味略有改善.

### 3 结论

本文通过超滤浓缩、硫酸铵盐析、透析、DEAE - Sepharose - F. F. 柱层析、NaCl 梯度洗脱等一系列的纯化步骤,对云芝菌产漆酶的分离纯化进行了研究,在分离纯化过程中漆酶被纯化了 22.80 倍,酶活的回收率为 36.32%. SDS - PAGE 电泳分析证明,获得了电泳纯漆酶,确定了漆酶的分子量约为 64.4 kD,

(下转第 12 页)

时需频繁更换色谱柱带来的仪器损耗,提高了检测效率.同时日常检测结果表明,水基胶中苯系物(在120℃之前苯系物从色谱柱中全部流出)并不会对邻苯二甲酸酯含量的测试结果带来较大的影响.

### 参考文献:

- [1] 何凤生. 中华职业医学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999:434-533.
- [2] 周国泰. 危险化学品安全技术全书[M]. 北京:化学工业出版社, 1997:17-18.
- [3] 王民生. 邻苯二甲酸酯(塑化剂)的毒性及对人体健康的危害[J]. 江苏预防医学, 2011, 22(4):68.
- [4] YC/T 333—2010, 烟用水基胶·邻苯二甲酸酯的测定·气相色谱-质谱联用法[S].
- [5] YC/T 334—2010, 烟用水基胶·苯、甲苯及二甲苯的测定·相色谱-质谱联用法[S].
- [6] 刘泽春, 黄华发, 刘江生, 等. 异丙醇萃取-气相色谱法同时测定烟用接装纸和包装纸中邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 分析仪器, 2010(2):30.
- [7] 韩云辉, 李旭华, 叶长文, 等. 烟用拉线中邻苯二甲酸酯类物质的测定[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2012, 27(1):26.
- [8] 郑向华, 林立毅, 方恩华, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱法测定食品中23种邻苯二甲酸酯[J]. 色谱, 2012, 30(1):27.
- [9] GB/T 21928—2008, 食品塑料包装材料中邻苯二甲酸酯的测定[S].
- [10] 李志伟, 纪朋, 马慧丽. 塑料中邻苯二甲酸酯类化合物的GC/MS分析方法[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2009, 24(5):12.
- [11] 黄惠贞, 梁晖, 刘秀彩. 顶空-气质联用法分析水基胶中的苯系物[J]. 安徽农业科学, 2012, 27(40):13598.

(上接第8页)

实验结果显示,云芝菌产漆酶得到了很好的分离纯化.将纯化的漆酶应用于烟梗木质素的降解中,可提高烟梗的可用性,将处理后的烟梗应用到卷烟的生产中,可以在很大程度上提高卷烟制品的品质.本文为烟梗在卷烟制品中的应用提供了较好的理论基础.

### 参考文献:

- [1] 刘淑珍, 钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1):73.
- [2] Yosiida H. Chemistry of lacquer(Urusht)[J]. Chem Soc, 1883, 43:172.
- [3] Bertrand G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons [J]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1987, 123:463.
- [4] Laborde J. Sur lacasse des vins [J]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1896, 123:1074.
- [5] Reinhannar B. Laccase in Copper Proteins and Copper Enzymes[M]. Boca Raton Fla: CRC Press, 1984.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000:243-260.
- [7] Ryan S, Schnitzhofer W, Tzanov T, et al. An acid-stable laccase from Sclerotium rolfsii with potential for wool dye decolourization[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33:766.