

白玉菇酸性磷酸酯酶的分离纯化及酶学性质研究

张蕾¹, 张航² (1. 徐汇中学, 上海 200030; 2. 上海虹桥国际机场公司, 上海 200230)

摘要 [目的] 对白玉菇酸性磷酸酯酶进行分离纯化, 并研究其酶学性质。[方法] 以白玉菇为材料提取酸性磷酸酯酶(ACPase, EC.3.1.3.2), 进一步将原酶液盐析、层析 2 种常用的蛋白纯化技术, 分离得到酸性磷酸酯酶, 并对该酶的酶学性质进行研究。[结果] 该酶分子量约为 70 kD, 水解对硝基苯磷酸二钠(pNPP)最适 pH 为 4.5, 等电点为 5.5, 最适温度为 40 ℃, 该酶在 50 ℃ 时有热激活效应; 紫外吸收光谱测定结果表明, 酶有 2 个吸收峰, 分别在 220 和 280 nm 处; 耐热时间表明在 40 ℃ 下耐热保温 40 min 后, 酶活力为最大活力的 60.79%, 并在保温 20 min 时酶活力最大, 50 ℃ 时酶活力随着保温时间的延长而降低, 保温 20 min 后, 酶活力下降为最初酶活力的 20.77%; Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 4 种金属离子对酶活性均有抑制作用, Ag^{+} 抑制作用最强。酶的动力学参数 K_m 为 0.031 mmol/L、 V_{max} 为 0.204 mmol/(L·min)、酶反应初速度为 18.66×10^{-3} μmol/L。[结论] 酸性磷酸酯酶的活性受温度、pH、金属离子等外界条件的影响, 因此在栽培过程中需要控制环境温度及培养基酸碱度等条件。

关键词 白玉菇; 酸性磷酸酯酶; 分离纯化; 动力学特性; 酶活性

中图分类号 Q814

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)10-0004-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.10.002

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Separation and Purification of Acid Phosphatase and Enzymic Properties of White *Hypsizygus marmoreus*

ZHANG Lei¹, ZHANG Hang² (1. Xuhui High School, Shanghai 200030; 2. Shanghai Hongqiao International Airport Company, Shanghai 200230)

Abstract [Objective] To isolate and purify the acid phosphatase from white *Hypsizygus marmoreus* and study its enzymatic properties. [Method] The acid phosphatase (ACPase, EC.3.1.3.2) was extracted from white *Hypsizygus marmoreus* as the material, and the original enzyme solution was further salted out and chromatographed through two commonly used protein purification techniques to isolate the acid phosphatase, and the enzymatic properties of the enzyme were studied. [Result] The molecular mass of the enzyme was 70 kD, the optimum pH of ACPase was 4.5 when pNPP was used as substrate, isoelectric point was 5.5, and the optimum temperature was 40 ℃, and could be activated at 50 ℃. The results of UV absorption spectroscopy showed that the enzyme had two absorption peaks at 220 and 280 nm respectively. The heat-resisting time showed that after heat-resisting at 40 ℃ for 40 min, the enzyme activity was 60.79% of the maximum activity, and the enzyme activity was the largest at 20 min. At 50 ℃, the enzyme activity decreased with the extension of the incubation time. After 20 minutes of incubation, the enzyme activity decreased to 20.77% of the original enzyme activity. The four metal ions of Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} , Cd^{2+} had inhibitory effects on enzyme activity, and Ag^{+} had the strongest inhibitory effect. The enzyme kinetic parameters K_m was 0.031 mmol/L, V_{max} was 0.204 mmol/(L·min), and the initial reaction rate of the enzyme was 18.66×10^{-3} μmol/L. [Conclusion] The activity of acid phosphatase is affected by external conditions such as temperature, pH, metal ions, etc. Therefore, it is necessary to control the environment temperature and the pH of the medium during the cultivation process.

Key words White *Hypsizygus marmoreus*; ACPase; Separation and purification; Kinetic characteristics; Enzyme activity

白玉菇(white *Hypsizygus marmoreus*)属于伞菌目、口蘑科、白蘑属, 是一种珍稀食用菌, 富含有多种维生素、矿物质等营养物质, 经常食用能够改善人体的新陈代谢, 降低胆固醇^[1-2]。白玉菇在我国已经得到了广泛栽培。酸性磷酸酯酶(ACPase)广泛分布于动物和植物中, 是生物磷代谢的重要酶类, 除了参与磷脂的代谢外, 还参与代谢调节、能量转化等重要生命活动^[3]。ACPase 参与植物的磷代谢, 在细胞调节过程中起着重要的作用^[4]。白玉菇的生长环境尤其是环境中的金属离子可导致酶活力的变化, 进而影响白玉菇的生长发育。目前国内对白玉菇活性物质研究主要集中于多糖的研究, 对 ACPase 的研究鲜有报道^[5-7]。该试验以白玉菇为试验材料, 分离纯化 ACPase, 并对其酶学性质进行研究, 为白玉菇的栽培提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 酸性磷酸酯酶的制备 将白玉菇称重后, 按 1:2.0 (W:V) 加入预冷的 20 mmol/L pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液于匀浆机中充分破碎, 然后将匀浆液过滤, 再将过滤后的滤液离心

(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃) 得到的上清液即为粗酶液。取上清加入固体硫酸铵至饱和度为 40%, 4 ℃, 静止 30 min, 离心(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃), 弃沉淀。收集上清液加硫酸铵至饱和度为 60%, 离心(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃) 弃上清, 收集沉淀。用 20 mmol/L pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液悬浮沉淀, 4 ℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 去除未溶解的部分蛋白, 留取上清。去除杂蛋白后的酶液用超滤浓缩的方法浓缩到少量体积后再利用 SephadexG-200 柱(1.0 cm×100 cm) 层析纯化, 20 mmol/L pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液洗脱, 流速 0.5 mL/min。每管收集 2 mL, 合并有酶活的部分。

纯化后的样品采用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法进行酶蛋白纯度分析和相对分子质量的测定。分离胶质量浓度为 10%, 浓缩胶质量浓度为 3%。

1.2 酶学特性

1.2.1 酶活力的测定。 参照杨立红等^[8-9] 方法, 酶活力测定反应总体积为 5 mL 含 3 mL 20 mmol/L pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液、1 mL 10 mmol/L $MgSO_4$ 和 1 mL 5 mmol/L 的底物对硝基苯磷酸二钠(PNPP), 在 37 ℃ 下, 预热 5 min, 加 100 μL 酶液, 反应 10 min, 加 2.5 mL 200 mmol/L NaOH 溶液终止反应, 以去离子水代替酶液作为对照。

1.2.2 酶的最适 pH、最适温度的测定。酶活力反应体系同“1.2.1”，pH 3.5~ 6.0，室温下测定酶活力。最适温度测定同最适 pH 测定方法，设置 7 个温度，分别为 30、35、40、45、50、55、60 ℃。

1.2.3 酶等电点(pI)的测定。该试验在测定酶的等电点时，从 pH 3.0~6.0 每间隔 0.5 个数值设置 7 个 pH，以便了解等电点的大致范围。分别取不同 pH 酶反应缓冲体系 5 mL，加 100 μL 酶液，测波长 280 nm 下的吸光度，吸光度最大时沉淀最多，该 pH 即为酶的等电点。

1.2.4 酶促反应初速度、米氏常数的测定。在“1.2.1”活力测定体系中，在 2、4、6、8、10、15、20、25、30 min 分别测定反应速度，以反应产物浓度对时间作图，可得出反应初速度。改变底物浓度(5~30 mmol/L)，按照 lineweaver-Burk 作图法进行计算，得出米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

1.2.5 酶的紫外吸收光谱的测定。取适量酶液，于 200~320 nm 处测吸光度，绘出紫外吸光图谱。

1.2.6 重金属离子对 ACPase 活力的影响。参照杨立红等^[8]方法，在 4 mL 反应体系中，加入 3 mL 20 mmol/L pH 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液、1 mL 5 mmol/L 的 PNPP 溶液，再分别加入重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} 的盐溶液，使金属离子终浓度分别为 0、50、100、200、300、400、500 μmol/L，于 37 ℃ 恒温水浴中预热 5 min 后，加入 100 μL 酶液，37 ℃ 反应 10 min 后加入 2.5 mL 200 mmol/L 的 NaOH 溶液终止反应，测定420 nm 处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 ACPase 的分离纯化 将匀浆、盐析后的粗酶液上样于 Sephadex G-200 层析柱，如图 1 所示在第 12 管时出现酶活力峰，第 15 管后酶的活力显著降低。合并 12~15 管洗脱液，合并浓缩后 SDS-PAGE 纯度检测及相对分子质量测定结果如图 2，利用 Quantity one 软件进行蛋白纯度分析，纯度约为 95%。与蛋白 Marker 比对，分子量约为 70 kD，这与杨立红等^[10]纯化的大致相当。

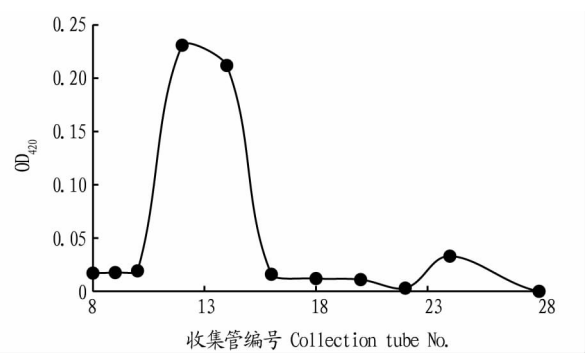
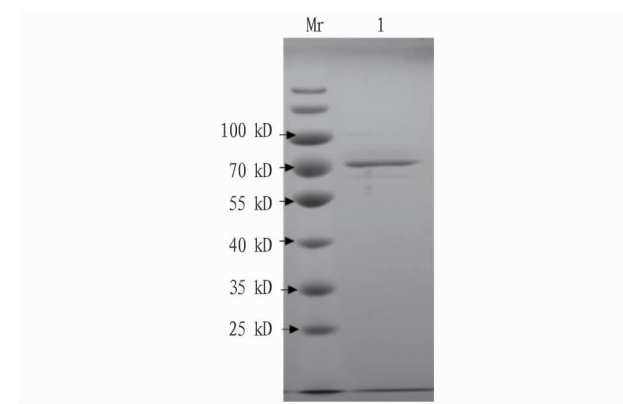


图 1 Sephadex G-200 柱层析洗脱曲线
Fig.1 Sephadex G-200 column chromatography elution curve

2.2 酶学特性

2.2.1 酶的最适 pH、最适温度及耐热性的测定。图 3a 表明 ACPase 的最适 pH 为 4.5，在最适 pH 条件下，测定不同温度下 ACPase 的活性，图 3b 显示 ACPase 的最适温度为 40 ℃；当温度上升至 50 ℃ 时，酶的活性均再次升高，推测该酶有热



注：1.纯化蛋白样品
Note: 1.Purified protein sample

图 2 SDS-PAGE 电泳图
Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis chart

激活现象。

酶在最适温度下孵育 35 min，20 min 时活性最大(图 4a)，50 ℃ 保温 20 min，酶活性显著下降，保温 20 min 时活力下降为最大活力的 20.77%(图 4b)。

2.2.2 酶促反应初速度、米氏常数的测定。由图 5 计算出酶反应初速度为 0.186 6 μmol/min。基于 lineweaver-Burk 双倒数曲线，以对硝基苯磷酸二钠(PNPP)为反应底物，分别对 ACPase 的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 进行分析，如图 6 所示，ACPase 的 K_m 值和 V_{max} 的值分别为 0.031 mmol/L 和 0.204 mmol/(L·min)。

2.2.3 酶的等电点测定。从白玉菇 ACPase 等电点测定结果(图 7)可以看出，在 pH 5.5 时 ACPase 的吸光度达到最大值，因此得出白玉菇 ACPase 等电点为 5.5。

2.2.4 酶的紫外吸收光谱的测定。从白玉菇 ACPase 的紫外吸收光谱测定结果(图 8)可以看出，白玉菇 ACPase 的紫外吸收峰在 220 和 280 nm 波长处，与蛋白质的紫外吸收光谱相符。

2.2.5 重金属离子对酶活力的影响。重金属离子对 ACPase 影响结果如图 9 所示，该试验所验证的重金属离子中， Ag^+ 对酶活性的影响有明显的抑制作用，浓度为 100 μmol/L 时，相对酶活性为 36.33%； Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对酶活性的影响也均有抑制作用，其中 Pb^{2+} 的抑制作用最弱。这与其他来源的 ACPase 试验结果有所不同，杨立红等^[8]对刺身 ACPase 的研究发现， Hg^{2+} 对酶的活性抑制作用最强，其次为 Ag^+ 。进一步表明不同来源的 ACPase 的酶学性质存在差异性。

3 讨论与结论

ACPase 是非绝对专一性的磷酸酯酶，具有多种同工酶，不同的环境条件会诱发出新的同工酶^[11]。该试验通过盐析、层析过滤等方法得到相对纯度较高的 ACPase，并对其酶学性质进行了研究。

ACPase 性质的研究对阐明其在细胞中的功能十分重要。尽管对植物组织、水产鱼类的研究已有报道，但对白玉菇中 ACPase 的研究鲜有报道。木豆中 ACPase 的最适 pH 为 4.0，刺身中 ACPase 的最适 pH 为 4.4，仙人掌中 ACPase 最

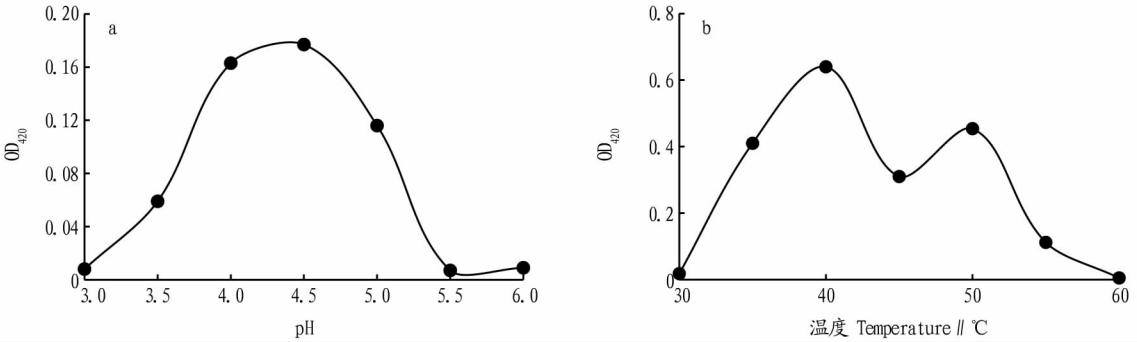


图 3 pH(a) 和温度(b)对酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH (a) and temperature (b) on enzyme activity

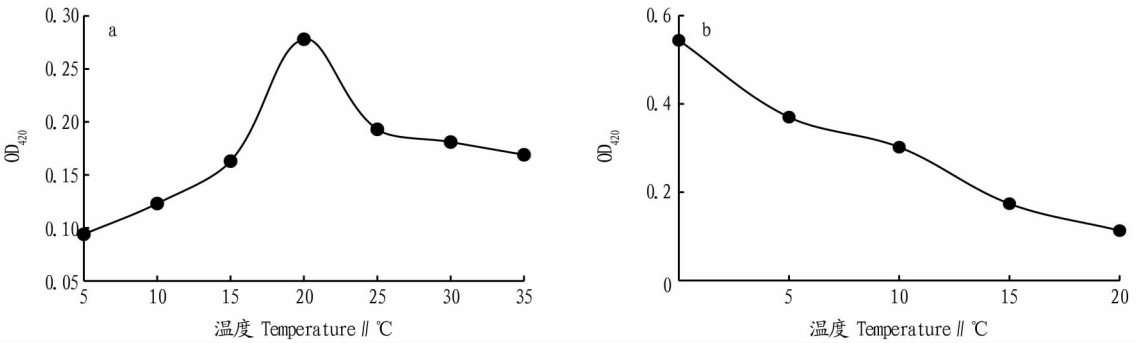


图 4 40 °C(a) 和 50 °C(b)时白玉菇 ACPase 的耐热时间

Fig.4 The heat-resistant time of ACPase of Shitake mushroom at 40 °C (a) and 50 °C (b)

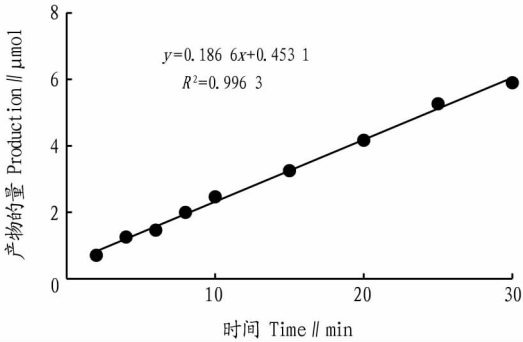


图 5 酶促反应初速度的测定

Fig.5 Determination of the initial velocity of the enzymatic reaction

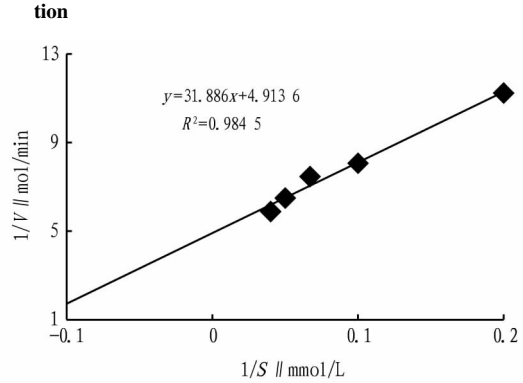


图 6 ACPase K_m 值的双倒数

Fig.6 Double reciprocal of ACPase K_m value

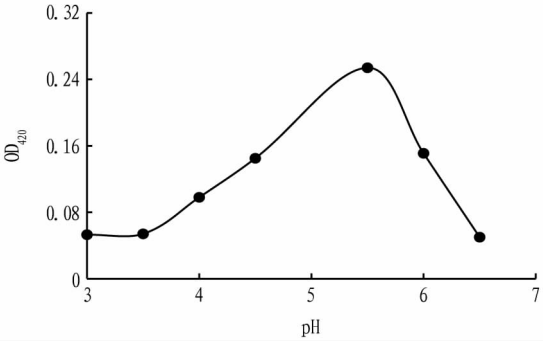


图 7 酶等电点测定

Fig.7 Determination of enzyme isoelectric point

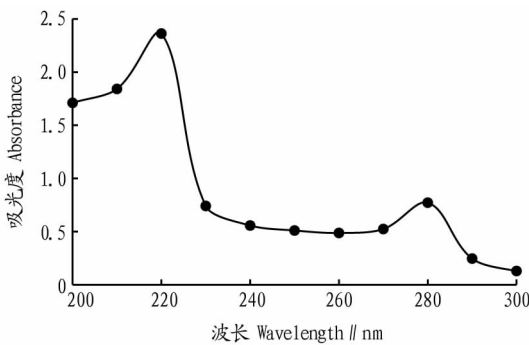


图 8 白玉菇酸性磷酸酯酶的紫外吸收光谱

Fig.8 UV absorption spectrum of ACPase

适 pH 为 4.4, 而该试验中白玉菇 ACPase 最适 pH 为 4.5, 与木豆和刺身的最适 pH 接近^[8,12-13]。该研究中测得白玉菇

ACPase 的 K_m 值为 0.031 mmol/L, 草鱼中 ACPase 的 K_m 值为 3.56 mmol/L^[14], 刺身 ACPase 的 K_m 值为 0.081 6 mmol/L^[8]。该研究得出白玉菇 ACPase 最适温度为 40 °C, 低于麦胚芽、

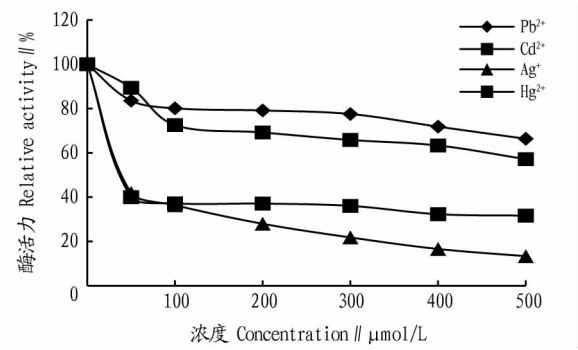


图9 重金属离子对白玉菇酸性磷酸酶活力的影响

Fig.9 Effects of heavy metal ions on the activity of ACPase

仙人掌中 ACPase 的最适温度^[12-13],在测定酶的最适温度中发现,在温度上升至 50 ℃ 时,酶的活性再次升高,推测白玉菇 ACPase 可能有热激活现象,杨立红等^[8,14]对斑玉蕈、草鱼和刺参的 ACPase 研究中也发现了热激活现象,但热激活温度不同,草鱼和斑玉蕈均为 60 ℃,刺参为 70 ℃。说明不同来源的 ACPase 酶学特征存在差异。

该试验体外检测了不同重金属离子对 ACPase 活性的影响,发现重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} 对 ACPase 酶活性均有明显的抑制作用。这与陈素丽等^[4,8,10,14]的研究结果一致。该试验白玉菇粗酶液经 Sephadex G-200 层析柱纯化后出现 3 个活力峰,杨杰等^[15]已报道 ACPase 通常存在多种同工酶,因此推断白玉菇中 ACPase 可能存在 3 种同工酶。该试验只对酶活力高的酶进行了研究。该酶以不同的同工酶存在于不同生物中,导致了该酶的酶学特征存在差异,这也是生物不断进化为适应不同物种生长和代谢所需要的结果。重金属离子能使大多数酶活力受到抑制,推测可能重金属离子与酶的活性部位结合,使酶的构象发生改变,进而影响酶

的活性。因此,在栽培环境中要严格金属离子的含量,为高产栽培创建优质条件。

参考文献

- [1] 孙丹丹,和焕香,王刚,等.不同品系真姬菇子实体营养成分和活性成分比较[J].食品研究与开发,2019,40(22):6-10.
- [2] 林路秀,李顺兴,李林燕,等.食用菌中微量元素分析及营养价值与食品安全评价[J].分析科学学报,2015,31(6):835-838.
- [3] 董登峰,杨杰,江立庚,等.大豆磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶研究Ⅲ、非专一性酸性磷酸酯酶的纯化与特性[J].广西植物,2005,25(5):472-476.
- [4] 陈素丽,陈清西,丘文杰,等.金属离子对长毛对虾酸性磷酸酶的影响[J].台湾海峡,1998,17(1):96-99.
- [5] 霍宗庆,徐婉晴,刘言娟.响应面法优化白玉菇多糖的提取工艺[J].食品工业科技,2017,38(22):145-149.
- [6] GUL MUNEEB(黄福).杏鲍菇、平菇及白玉菇碱提多糖的分离纯化及结构分析[D].长春:东北师范大学,2016.
- [7] 刘海兵,王斌,张腾霄.十四种常见食用菌中糖类物质含量比较分析[J].内江科技,2017,38(10):81-82.
- [8] 杨立红,孙振兴,王晓洁,等.刺参酸性磷酸酯酶的分离纯化及部分性质研究[J].食品科学,2008,29(10):440-443.
- [9] GREINER R, ALMINGER M L. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*) [J]. Journal of the science of food and agriculture, 1999, 79(11):1453-1460.
- [10] 杨立红,高兴喜,缪静,等.斑玉蕈酸性磷酸酯酶的酶学性质研究[J].菌物学报,2011,30(5):744-752.
- [11] 田江,廖红,王秀荣,等.磷酸胁迫诱导大豆叶片酸性磷酸酶同工酶的表达[J].植物学报:英文版,2003,45(9):1037-1042.
- [12] KALITA T, AMBASHT P K. Immobilization and characterization of acid phosphatase from wheat germ (Type I) in agarose gel [J]. Journal of proteins and proteomics, 2019, 10(4):291-297.
- [13] CHAFIK A, ESSAMADI A, ÇELİK S Y, et al. A novel acid phosphatase from cactus (*Opuntia megacantha* Salm-Dyck) cladodes: Purification and biochemical characterization of the enzyme [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 160:991-999.
- [14] 杨立红,肖波,王晓洁,等.草鱼酸性磷酸酯酶的性质及金属离子对其活性的影响[J].中国水产科学,2010,17(5):969-976.
- [15] 杨杰,董登峰,王永峰.木豆种子酸性磷酸酯酶 AcPase I 的部分纯化和动力学特性[J].广西农业科学,2007,38(4):386-390.