



青島農業大學

# 学士学位论文

题 目	大球盖菇中 MnP 的纯化
姓 名	陈显磊
学 号	20170205695
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术
班 级	201702
指导教师	于浩

二〇二一年五月

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

## 学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

## 大球盖菇中 MnP 的纯化

**摘要：**染料是一种重要的环境污染物，每年纺织工业都要产生大量的含高浓度染料的废水，白腐真菌是主要的染料降解生物之一。本研究通过对 7 种染料筛选发现，大球盖菇具有较高的染料脱色效率。进一步研究发现，大球盖菇中的锰过氧化物酶（MnP）是其主要脱色酶。为了获得该染料脱色酶，首先通过液体深层发酵获得了含有 MnP 的粗酶液，利用 AKTA avant 系统对该酶进行了纯化，经过阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、疏水柱层析，我们获得了初步纯化的蛋白。研究表明初步纯化的蛋白能够降解酸性红 GR 和活性蓝 KNR，本研究为使用真菌降解染料提供参考。

**关键词：**大球盖菇；蛋白纯化；染料降解；AKTA Avant

## **Purification of MnP in *Stropharia rugosoannulata***

**Abstract:** Dye is an important environmental pollutant. A large amount of wastewater containing high concentration dye was produced in textile industry every year. White rot fungus is one of the main dye degrading organisms. In this study, the dye degradation capacity of seven dyestuffs were evaluated, and it was found that *Stropharia rugosoannulata* had the highest dye decolorization efficiency. Further study showed that manganese peroxidase (MnP) was the main decolorizing enzyme. In order to obtain the dye decolorizing enzyme, the crude enzyme solution containing MnP was obtained by submerged fermentation. The MnP was purified by AKTA avant. The MnP protein with high purity was obtained by anion exchange chromatography, cation exchange chromatography and hydrophobic column chromatography. Studies have shown that the preliminarily purified protein could degrade acid red GR and reactive blue KNR. This study provides a useful reference for understanding the degradation of dyes by white rot fungi.

**Key words:** *Stropharia rugosoannulata*; protein purification; Dye degradation; AKTA Avant

# 目 录

1 文献综述.....	1
2 材料与方法.....	2
2.1 试剂.....	2
2.2 试剂的配制.....	3
2.3 实验所需仪器.....	3
2.4 实验方法.....	4
2.4.1 实验技术路线.....	4
2.4.2 菌株筛选染料降解实验.....	4
2.4.3 培养基的制备.....	5
2.4.4 培养基的活化.....	5
2.4.5 酶活力测定.....	5
2.4.6 测定染料的最适波长.....	5
2.4.7 降解效率测定.....	5
2.4.8 硫酸铵浓度对于沉淀蛋白的研究.....	5
2.5 大球盖菇蛋白粗酶液的纯化.....	6
2.5.1 DEAE-SepHarose FF.....	6
2.5.2 SP- $\mu$ Sphere.....	6
2.5.3 苯基疏水 6FF.....	7
2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳的使用.....	8
2.6.1 SDS-PAGE.....	8
2.6.2 酶谱的制作.....	8
3 结果.....	9
3.1 菌株筛选染料种类实验:.....	9
3.2 染料的最适波长.....	10
3.3 对于培养活化的研究分析.....	10
3.4 使用 AKTA avant 纯化蛋白.....	11
3.4.1 DEAE-SepHarose FF.....	11
3.4.2 过 SP- $\mu$ Sphere 的结果分析.....	14
3.4.3 硫酸铵沉淀蛋白的研究.....	16
3.4.3 苯基疏水 6FF 柱结果分析.....	17
4 结论.....	20
参考文献.....	22

致谢.....	23
---------	----

## 1 文献综述

随着生活质量的不断提高,人们对于色彩追求也逐步提升,工业印染也飞速发展,并广泛的被应用于纺织印染、造纸、塑料等工业过程中<sup>[1]</sup>。大部分用于染棉织品的染料具有毒性,不但污染土壤和水源,而且随着染料种类和数量不断增加,染料带来的污染日益严重,所以开发一种高效,快速,环保的方法是当今研究的热点。目前处理染料的降解主要有化学降解和生物降解,生物降解具有环境友好、成本低、效率高等特点<sup>[4]</sup>,可以将染料分子降解成无色,低毒的化合物所以生物降解成为研究的热点<sup>[2]</sup>,白腐菌是一类丝状真菌,它依靠在次生代谢阶段产生的胞外酶对难降解污染物具有广谱降解作用,尤其是能降解多环芳香烃类和毒性较大的有机污染物,包括不同结构的多种染料<sup>[3]</sup>。而大部分真菌具有生长快、繁殖旺、培养价格低的特性,是理想的实验材料。

目前白腐菌主要的脱色酶均为木质纤维素降解酶,木质素降解酶系可以有效降解多类有机污染物,包括漆酶、锰过氧化物酶(MnP)、木质素过氧化物酶等<sup>[5]</sup>。其中大部分的白腐菌是以漆酶作为主要的脱色酶的,有一些白腐菌仅能够分泌漆酶。也有少量的白腐菌是以 MnP 作为主要脱色酶的。锰过氧化物酶(MnP)是降解木质素等各种芳香类化合物的关键酶之一,具有很高的工业应用价值<sup>[6]</sup>。目前主要报道的具有脱色活力的白腐菌为侧耳属真菌、香菇、云芝等。大球盖菇报道较少,目前是尚无对于大球盖菇 MnP 脱色的研究报道。

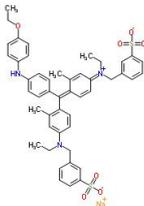
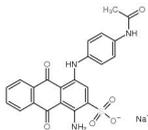
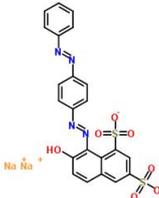
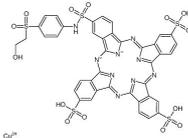
我们筛选了大球盖菇、平菇、真姬菇、香菇四种白腐菌对于 7 种染料的降解效果,从降解染料种类实验结果可以明显看出,大球盖菇对染料降解效率最高,降解效果最明显,大球盖菇能够对偶氮类、蒽醌类和三苯甲烷类染料进行降解。而且大球盖菇生长繁殖速率快,培养价格低廉,是非常良好的实验材料,通过实验还可以发现大球盖菇对于酸性红 GR 和活性蓝 KNR 的降解效果出众,酸性红 GR 和活性蓝 KNR 是现代工业染色常用的染料<sup>[7]</sup>,而大球盖菇中存在有蛋白可以降解这些染料,所以纯化出可以降解染料的蛋白,有助于我们深入了解白腐菌的染料脱色机理。

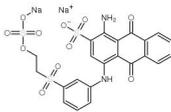
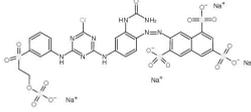
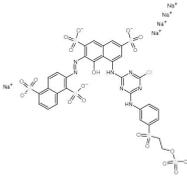
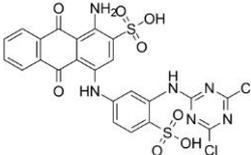
## 2 材料与方法

### 2.1 试剂

葡萄糖、硫酸锰、丙二酸、丙二酸钠、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸、2,6-二甲基苯酚、硫酸铵、考马斯亮蓝 G250、NaCl、酸性蓝、酸性红、酸性黄、活性黄、活性红、活性翠蓝、活性蓝、硫酸铵、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、丙酮、浓盐酸、考马斯亮蓝 R250

表 2.1 实验中使用的染料的相关信息

染料名称	分子式	分子量	结构	CAS 号
考马斯 G250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	854.020		6104-58-1
酸性蓝 -40	$C_{22}H_{16}N_3NaO_6S$	473.43400		6424-85-7
酸性红 GR	$C_{22}H_{14}N_4Na_2O_7S_2$	556.479		5413-75-2
活性翠 蓝 KNG	$C_{40}H_{25}CuN_9O_{14}S_5$	1079.55000		12236-86-1

活性蓝 KNR	$C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$	626.54400		2580-78-1
活性黄 3R	$C_{28}H_{20}ClN_9Na_4O_{16}S_5$	1026.25000		93050-80-7
活性红 3B	$C_{31}H_{19}ClN_7Na_5O_{19}S_6$	1136.31000		93050-79-4
活性艳 蓝	$C_{23}H_{14}Cl_2N_6O_8S_2$	637.429		13324-20-4

## 2.2 试剂的配制

漆酶活力测定试剂：称取 0.155 g 丙二酸钠、0.06 g 丙二酸、ABTS 4.1 mg 加入 30 mL 蒸馏水混匀。

MnP 活力测定试剂：称取 0.155 g 丙二酸钠、0.06 g 丙二酸、2-6 DMP 4.1 mg、硫酸锰 5.9 mg 加入 30 mL 蒸馏水混匀。

饱和硫酸铵的制作：将硫酸铵缓慢加入去离子水中，使用磁力搅拌器加热并低速搅拌，直至晶体析出，使用抽滤泵将上清抽滤，保存在 4℃ 冰箱内。

## 2.3 实验所需仪器

表 2.2 实验仪器

名称	型号	厂家
蛋白质纯化层析系统	Avant	美国 GE
恒温震荡培养箱	HZQ-F160	哈尔滨东联电子技术

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 实验技术路线

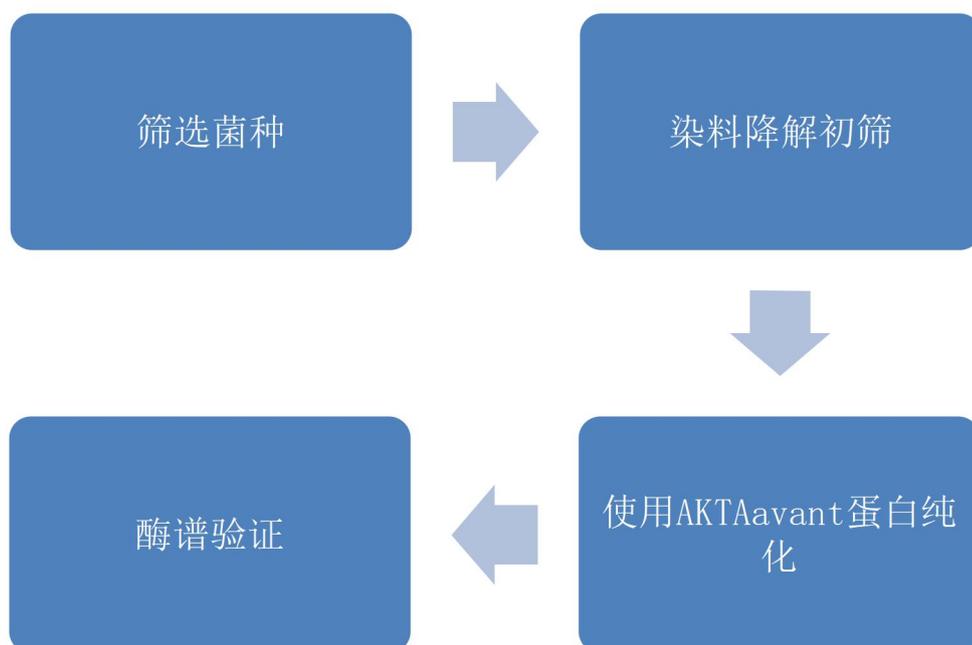


图 2.1 技术路线

### 2.4.2 菌株筛选染料降解实验

将 100 mg/L 酸性蓝、酸性红、酸性黄、活性黄、活性红、活性翠蓝、活性蓝染料过滤除菌，配制马铃薯培养基，115℃下灭菌 30 min。在超净工作台下分别将不同的染料 PDA 倒入 5 个培养皿中，每个培养皿倒入大约 20 mL，将食用菌菌丝接种到平板中央，不接种食用菌的作为对照。置于 25℃恒温培养箱于黑暗条件下培养<sup>[7]</sup>。等到菌丝长满平板，可用于进一步研究。

### 2.4.3 培养基的制备

开始采用 PDB 作为大球盖菇液体培养基。每瓶接种 5 块 1 cm<sup>2</sup> 菌块于 25℃ 摇床培养，转速 125 rpm，第 5 天时，取菌球 4 mL 接种到 50 mL PDB 培养基中，进行第二轮转接，直至第三轮转接结束，将培养好的菌株作为种子液进行后续实验。

### 2.4.4 培养基的活化

将种子液接种到终浓度是 200 μM 的硫酸锰的 PDB 培养基中，培养接种量为 8%，放入 25℃ 震荡培养箱中震荡培养，每天取 500 μL 酶液加入反应混合物后使用分光光度计测 0~60 s 的吸光值的变化，再根据酶活公式计算出酶活。

### 2.4.5 酶活力测定

漆酶酶活采用 ABTS 作为底物<sup>[9]</sup>，MnP 活力测定采用 2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-DMP) 作为底物<sup>[8, 10]</sup>，具体的测定方法见参考文献。

### 2.4.6 测定染料的最适波长

使用全波长扫描仪扫描酸性大红 GR 和活性艳蓝 KNR 的全波长，确定最适波长，以便于后续的研究。

### 2.4.7 降解效率测定

为了检测大球盖菇对酸性大红 GR、活性艳蓝 KNR 降解率的研究，按照 8% 接种量培养大球盖菇，培养至第 8 天时，加入终浓度 50 mg/L 的酸性大红 GR、活性艳蓝 KNR，每组三个重复，定时取样，上清用紫外分光光度计测定，酸性大红 GR 测定波长 510 nm，活性艳蓝 KNR 测定波长 590 nm。

计算公式： $D\% = 100 * (A_i - A_f) / A_i$

D 为降解率， $A_i$  是染料初始吸光值， $A_f$  是染料最终吸光值。

### 2.4.8 硫酸铵浓度对于沉淀蛋白的研究

研究在不同的硫酸铵浓度下，蛋白被沉淀的情况，以便于后续实验的开展，首先称取硫酸铵在低温的情况下，缓慢加入在磁力搅拌器上低速搅拌的蛋白上清中。

表 2.3 不同饱和度硫酸铵质量

硫酸铵百分比	40 %	50 %	60 %
--------	------	------	------

1mL 含硫酸铵/g	2.43	3.13	3.90
------------	------	------	------

在 4℃ 冰箱静置过夜，等取出时用转速为 8,000 r/min，4℃ 的低温离心机离心 5 min，弃掉沉淀取蛋白上清测量 MnP 和漆酶的酶活。

## 2.5 大球盖菇蛋白粗酶液的纯化

### 2.5.1 DEAE-SepHarose FF

首先采用阴离子交换色谱 DEAE 进行蛋白纯化，使用柱子前需要准备流动相配制缓冲液 20 mM Tris-HCl pH8.2、1 M NaCl、20 %乙醇、超纯水，除 20 %乙醇用孔径大小为 0.22 μm 的有机相滤膜外，其余均用孔径大小为 0.45 μm 水相膜抽滤，再用超声波清洗 20 min 即可。

流动相准备完后打开电脑和 AKTA avant，设置清洗管道，将 A 泵和 B 泵的气泡用注射器抽出，将 A 相连接 20 mM Tris-HCl，B 相连接 1 M NaCl，组装柱子和 AKTA avant，用 A 相和 buffer 相连接的 20 mM Tris-HCl，2.5 mL/min 冲洗柱子中的 20 %的乙醇，等到柱子和管路中的乙醇冲洗干净，将 buffer 相连接大球盖菇的蛋白粗酶液中。在使用前大球盖菇的蛋白粗酶液，需要使用 8,000 r/min 的转速 4℃ 离心 10 min 放置在冰上。

经过多次摸索条件后确定适用的条件后，首先用 buffer 相将样品以 2.5 mL/min 的流速通入柱子，上样 200 mL，然后使用 100 %的 Tris-HCl 冲洗 50 mL 去除杂蛋白，接着分别用 A 相：B 相 95 %：5 %冲洗 25 mL、A 相：B 相 85 %：15 %冲洗 75 mL、A 相：B 相 70 %：30 %冲洗 50 mL、A 相：B 相 50 %：50 %冲洗 50 mL、B 相 100 %冲洗 50 mL，每 5 mL 收集一管，将收集的酶液进行测定 MnP 活力和终浓度为 50 μg/L 活性蓝 KNR 及酸性红 GR 的降解率，使用完后需要使用 NaCl 冲洗 50 mL 等到电导率稳定后换 100 %的 20 mM Tris-HCl 冲洗到电导率到 1 左右。然后将 A 相和 B 相的探头放入 20 %的乙醇中，用低流速冲洗柱子，从而达到将柱子和导管保存在 20 %的乙醇中的目的。在低流速的条件下去拆卸柱子时应先拧柱子下方的螺丝将管子拔掉后，迅速用堵头堵上，但不能堵死应仍有液体流出，拧开柱子上方的螺丝拔掉管子，将堵头堵住，最后关闭电脑和 AKTA avant。

### 2.5.2 SP-μSphere

使用阳离子柱首先要准备流动相配制 20 mM Tris-HCl，使用 1 M NaOH 配制 pH 4.5 的 1 M NaCl，然后打开电脑和 AKTA avant，设置清洗管道，将 A 泵和 b

泵的气泡用注射器抽出，将 A 相连接 20 mM Tris-HCl，B 相连接 1 M NaCl，连接柱子和 AKTA avant，用 A 相和 buffer 相连接的 20 mM Tris-HCl，2.5 mL/min 冲洗柱子中的 20 % 的乙醇，等到柱子和管路中的乙醇冲洗干净，将 buffer 连接大球盖菇的蛋白上清。提前将阴离子柱纯化的大球盖菇的蛋白上清，使用低温离心机按照 8,000 r/min 4℃ 离心 10 min，收集上清后放置在冰上。用 buffer 相将样品以 2.5 mL/min 的流速通入柱子，上样 200 mL 然后使用 100 % 的 20 mM Tris-HCl 冲洗 50 mL 去除杂蛋白分别用 A 相：B 相 95 %：5 %、A 相：B 相 85 %：15 %、A 相：B 相 70 %：30 %、B 相 100 % 这四个条件各冲洗 50 mL，每 5 mL 收集一管，将收集的酶液测定 MnP 活力和终浓度为 50 μg/L 活性蓝 KNR 及酸性红 GR 的降解率最后使用 NaCl 冲洗 50 mL 等到电导率稳定后换 100 % 的 20 mM Tris-HCl 冲洗到电导率到 1 左右。然后将 A 相和 B 相管的探头放入 20 % 的乙醇中，用低流速冲洗柱子，从而达到将柱子和导管保存在 20 % 的乙醇中的目的。在低流速的条件下去拆卸柱子时应先拧柱子下方的螺丝将管子拔掉后，迅速用堵头堵上，但不能堵死应仍有液体流出，拧开柱子上方的螺丝拔掉管子，将堵头堵住，取下柱子保存在 4℃ 冰箱里。

### 2.5.3 苯基疏水 6FF

疏水柱的需要流动相配制 30 % 的饱和硫酸铵和 20 mM Tris-HCl，将疏水柱的 A 相管连接 30 % 饱和硫酸铵，而 B 相管连接 20 mM Tris-HCl，使用疏水柱前需将阳离子柱纯化出的 A 相：B 相 85 %：15 % 冲下来的峰，在低温情况下加入饱和硫酸铵，缓慢滴加的过程中用磁力搅拌器不断搅拌，配制成终浓度成 40 % 的硫酸铵，在 4℃ 冰箱放置过夜。在 8,000 r/min 的转速下离心 10 min，弃沉淀，取上清放置在冰盒上。经过多次摸索条件后确定适用的条件，用 S1 将样品以 2.5 mL/min 的流速通入柱子，上样 70 mL 使用 100 % 的 30 % 的饱和硫酸铵冲洗 25 mL 去除杂蛋白，再用 100 % 的 20 mM Tris-HCl 冲洗，直至峰完冲洗完毕收集，每管收集 5 mL，将收集的酶液测定酶活和降解率，等到电导率稳定到，将所有的管路放入 20 % 乙醇，通入 2.5 mL/min 流速保存柱子和管路，在低流速的条件下去拆卸柱子时应先拧柱子下方的螺丝将管子拔掉后，迅速用堵头堵上，但不能堵死应仍有液体流出，拧开柱子上方的螺丝拔掉管子，将堵头堵住，取下柱子保存在 4℃ 冰箱里。

因为蛋白活力低，并不能在 SDS-PAGE 凝胶上清晰的看到条带，将样品加入超滤管超滤，在转速为 9,000 r/min 4℃ 的条件下离心 10 min，取出样品记录终体积，计算出浓缩倍数，但是粗酶中含有多糖，超滤管浓缩倍数不够，再采用丙酮沉淀蛋白提高蛋白含量<sup>[1]</sup>。

### 丙酮沉淀蛋白摸条件

各取 300  $\mu\text{L}$  的蛋白上清，分装在 4 个离心管按照表 2.4 加入丙酮。

表 2.4 不同体积比的丙酮沉淀蛋白效果

	一倍体积	二倍体积	三倍体积	四倍体积
丙酮/ $\mu\text{L}$	300	600	900	1200
酶液量/ $\mu\text{L}$	300	300	300	300
总体积/ $\mu\text{L}$	600	900	1200	1500

将四个样品混匀后放入  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱，冷藏 2 h 后取出，使用转速为 10,000 r/min 离心 5 min，取出弃掉上清，打开盖子放入  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱晾干大约 2 h 取出，使用 50 mM 丙二酸缓冲液重旋，测定 MnP 和漆酶的酶活，并通过酶活公式计算。

## 2.6 SDS—PAGE 凝胶电泳的使用

### 2.6.1 SDS-PAGE

使用 5 % 的浓缩胶和 12.5 % 的分离胶对所纯化蛋白进行 SDS-PAGE 检测。具体的试验方法见参考文献。

### 2.6.2 酶谱的制作

染色：用蒸馏水配制终浓度为 200 mg/L 的活性蓝 KNR 染液，将 SDS-PAGE 胶剥离完后放入染液，染色 20 min。

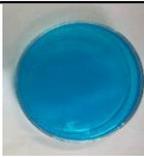
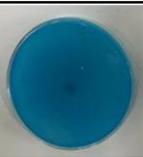
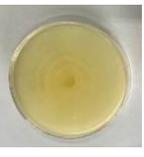
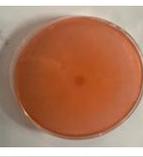
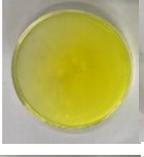
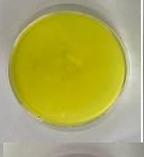
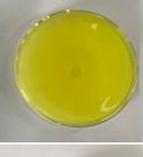
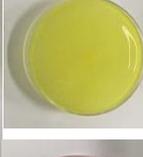
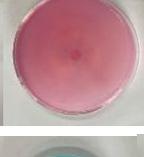
脱色处理：配制不加 2,6-DMP 的 MnP 反应混合物 30 mL，将染色完的胶放入混合物，每 10 min 观察一次，直至透明的条带出现，拍照记录，对比透明带与 Maker 的大小。

### 3 结果

#### 3.1 菌株筛选染料种类实验：

平菇、大球盖菇、真姬菇、香菇四种白腐菌对 7 种染料降解的结果表 3.1 所示。

表 3.1 筛选不同菌株对不同染料降解结果

	未接菌	平菇	真姬菇	大球盖	香菇
酸性蓝					
酸性红					
酸性黄					
活性黄					
活性红					
活性翠蓝					
活性蓝					

根据实验结果降解效果对比,可以发现大球盖菇对于降解多种染料效果较好,因此后续实验选择大球盖菇作为实验材料。

由于偶氮类和蒽醌类染料在所有染料中占比最多,因此选择了酸性红 GR 和

活性蓝 KNR 两种染料进行下步实验。

### 3.2 染料的最适波长

使用紫外可见分光光度计扫描酸性大红 GR 和活性艳蓝 KNR 的全波长扫描，已确定用来进行脱色测定的波长。

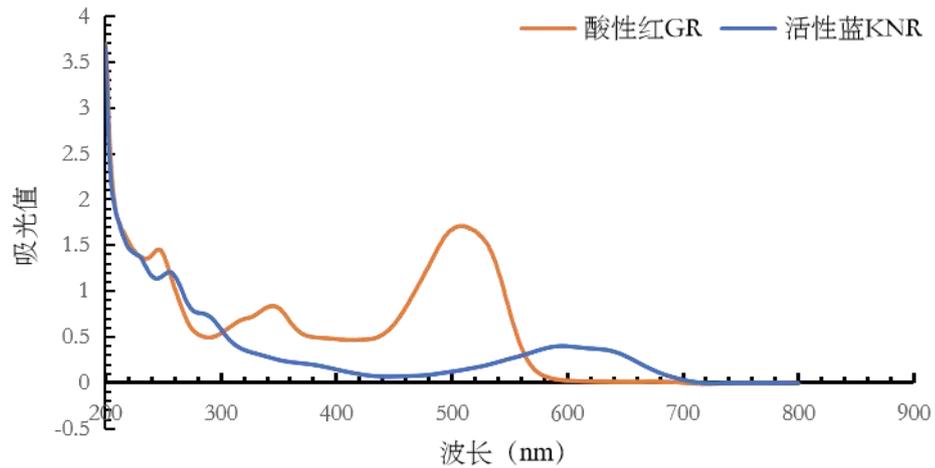


图 3.1 活性蓝 KNR 与酸性红 GR 的全波长

如图 3.1 所示，可以看出活性蓝和酸性红的最适吸收峰值分别为 590 和 510，后续实验采用该波长作为检测这两种染料脱色的波长。

### 3.3 对于培养活化的研究分析

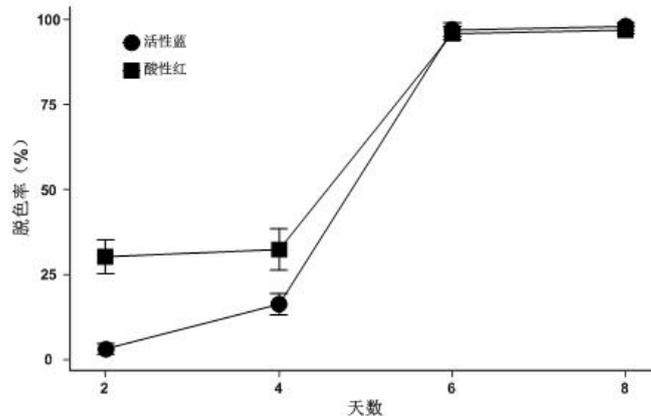


图 3.2 不同天数大球盖菇对于染料脱色的研究

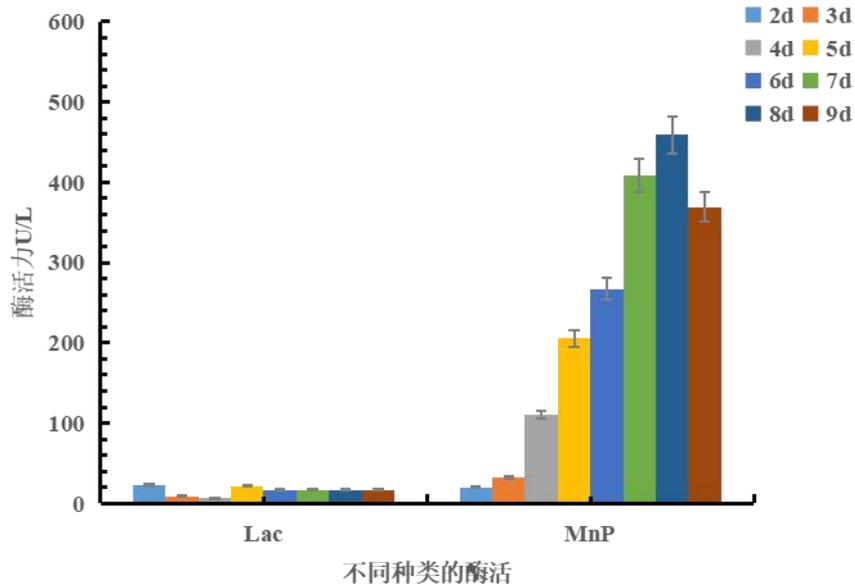


图 3.3 不同时间大球盖菇上清粗酶液蛋白活力测定

如图 3.2、图 3.3 所示，每天取培养液测酶活和降解率，结果表明，随着 MnP 的测定活力越高对于染料降解率越高，并且 MnP 的活力远高于漆酶的活力，因此我们可以确定，在大球盖菇上清中起到了脱色作用的主要酶是 MnP 而不是漆酶。

### 3.4 使用 AKTA avant 纯化蛋白

#### 3.4.1 DEAE-SepHarose FF

通过活力测定实验，我们可以确定培养到第 8 天的 MnP 活力最高，所以当震荡培养到第 8 天时，从震荡培养箱中取出，将蛋白上清使用八层纱布初步过滤后，再使用 200 目的网筛过滤，取得上清，放入 -20℃ 冰箱冷藏，使用前取出解冻后将蛋白粗酶使用离心机 8,000 r/min 离心 5 min 后取上清放置在冰上，使用 AKTA avant 系统纯化。

首先是用 DEAE 阴离子交换柱对脱色酶进行纯化，试验采用了梯度洗脱的方式进行蛋白纯化，图 3.4 显示这 5 个条件浓度下冲洗柱子均有明显的峰，收集含有蛋白峰的试管，测定酶活和降解率。

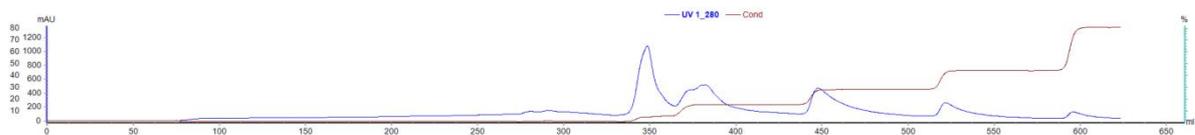
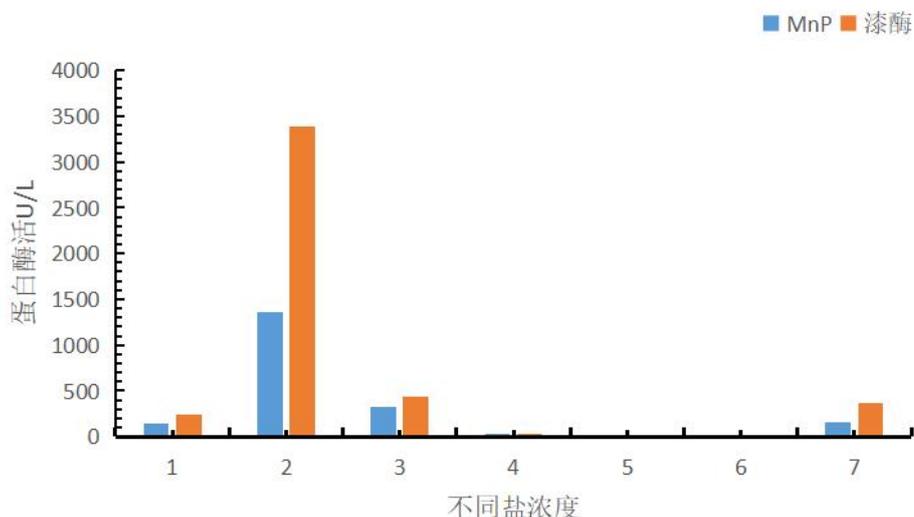


图 3.4 第一次蛋白纯化流程图

第一次纯化酶液的活力测定



注：1：5 %盐浓度（100%为 1 M NaCl）冲洗、2：15 %盐浓度冲洗一峰、3：15 %盐浓度冲洗二峰、3：30 %盐浓度冲洗、4：30 %盐浓度冲洗、5：50 %盐浓度冲洗、6：100 %盐浓度冲洗、7：粗酶液

图 3.5 第一次蛋白纯化酶活测定

根据分光光度计测定一分钟的酶活变化可以计算出，15 %的 MnP 的酶活力对比其他盐浓度和最高。这表明了大部分的 MnP 可以用 15 %盐浓度冲洗下来。

将透析过的蛋白取 500 μL 加入终浓度是 20 mg/L 的活性蓝 KNR，放入 25℃ 震荡培养箱中培养观察颜色变化（+表示染料的降解程度）

表 3.2 第一次纯化酶液对染料的降解

	1	2	3	4	5	6	7
0.1 h	+	+++	++	-	-	-	++
0.2 h	+	+++	++	-	-	-	++

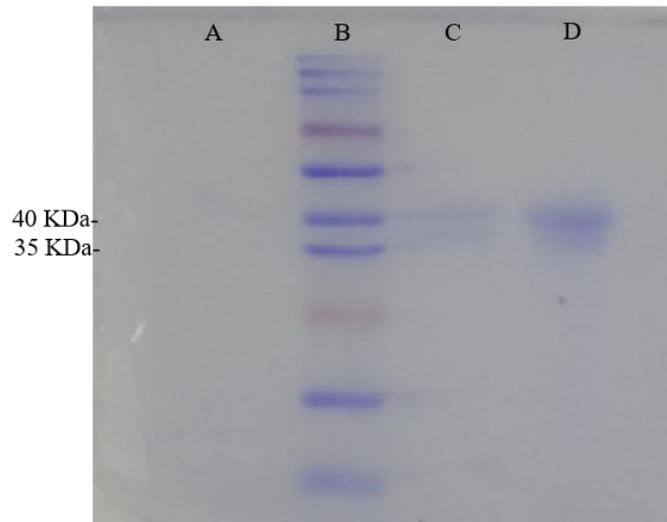
注：1：5 %盐浓度冲洗、2：15 %盐浓度冲洗一峰、3：15 %盐浓度冲洗二峰、3：30 %盐浓度冲洗、4：30 %盐浓度冲洗、5：50 %盐浓度冲洗、6：100 %盐浓度冲洗、7：粗酶液

如表 3.2 所示，可以看出能够降解活性蓝 KNR 的酶主要在 2、3、7，这个结果与前面的酶活性测定的结果一致。

表 3.3 酶液酶谱分析

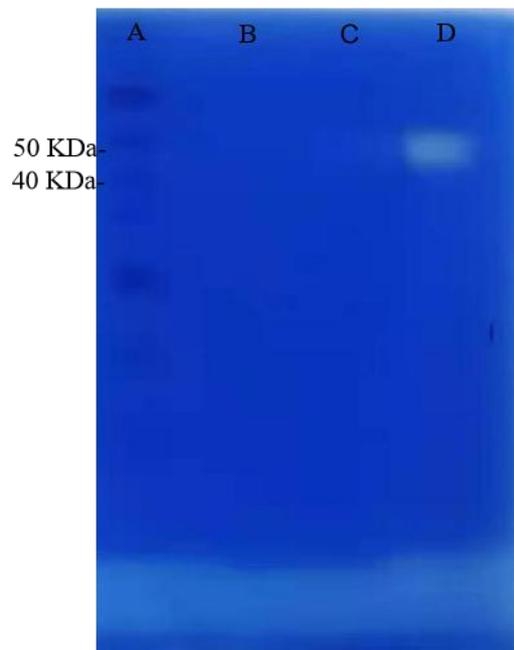
样品	灭活	染色液	脱色液
----	----	-----	-----

酶谱	取 20 $\mu$ L 浓缩后的发酵上清液混和 4 $\mu$ L 25 %甘油	否	200 mg/L 的活性蓝 染液	PBS 缓冲液
SDS 配制	取 20 $\mu$ L 浓缩后的发酵上清液混和 4 $\mu$ L loading buffer	是	考马斯亮 蓝 R250	23% (v/v) 乙醇



注：A：粗酶液；B：maker；C：15 %盐浓度二峰；D：15 %盐浓度一峰

图 3.6 SDS-PAGE 胶图电泳结果



注：A：maker；B：粗酶液；C：15 %盐浓度二峰；D：15 %盐浓度一峰

图 3.7 纯化酶谱胶图分析结果

酶谱结果显示具有脱色活力的酶的大小在 40-50 Kda 之间，但是在 SDS-PAGE 结果显示并没有明显的与之对应的条带，这表明了上清中可能存在多种杂蛋白，需要进一步的进行纯化获得较纯的脱色酶。

### 3.4.2 过 SP- $\mu$ Sphere 的结果分析

将上一步 15% 的 B 缓冲液（1 M NaCl）洗脱的蛋白透析之后，进行阳离子柱的纯化。从图 3.8 的结果可以看出 A 相:B 相 85%: 15%、B 相 30% 这两个条件浓度下冲洗柱子有明显的峰，收集峰的试管。

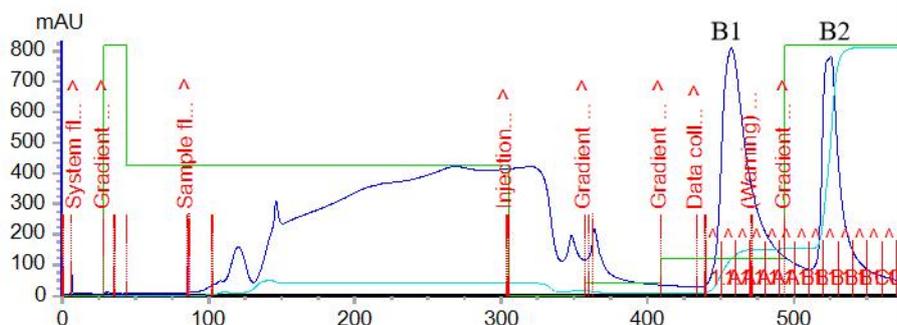


图 3.8 第二次纯化蛋白流程图

将峰值最高的 B1 和 B2 取出 200  $\mu$ L 酶液，加入终浓度为 50 mg/L 的活性蓝 KNR 后，放入 25 $^{\circ}$ C 震荡培养箱培养 2 h 观察并记录结果。（+表示染料的降解程度变化）

表 3.4 第二次纯化酶液染料的降解

	B1	B2	粗酶液
1 h	+++	++	+++
2 h	+++	++	+++

从结果分析 B1、B2 都具有脱色活力，降解效果如图 3.9 所示，使用它们进行下一步实验。

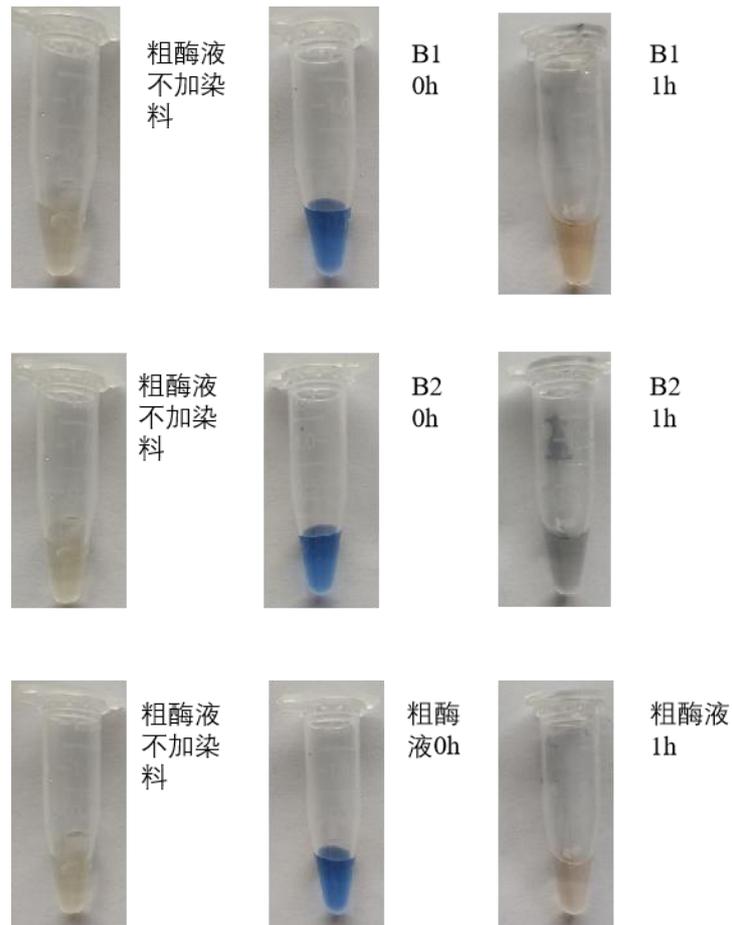


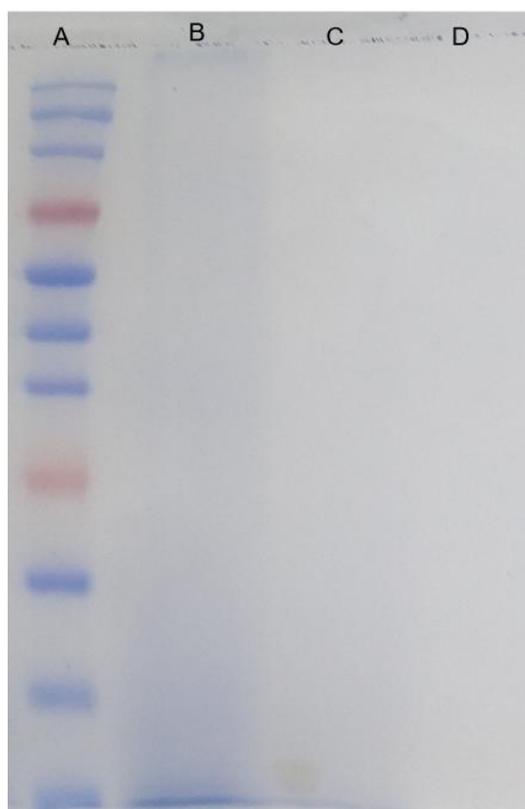
图 3.9 第二次纯化酶液对的降解染料

从脱色结果分析脱色活力最高的是 B1，再进行进行酶谱分析。

表 3.5 第二次纯化酶液 SDS 配制

	样品	灭活	染色液	脱色液
SDS 配制	20 $\mu$ L 混和 4 $\mu$ L loading buffer	是	考马斯亮 蓝 R250	23% (v/v) 乙醇

制作 SDS 配制与粗酶液比较



注：A: maker; B: B1; C: B2; D: 粗酶液

图 3.10 SDS-PAGE 胶图结果分析

经过与粗酶液制作的酶谱分析对比，SDS 没有出现条带，而粗酶酶液制作的酶谱，出现透明条带的大小约为 50 KDa 左右，可能蛋白浓度太低并不能跑出条带。还需要进一步探索条件。

### 3.4.3 硫酸铵沉淀蛋白的研究

因为疏水柱蛋白样品配置使用的是 40 %的硫酸铵，所以研究硫酸铵浓度对于酶活的关系，以便于下一步研究的进行。

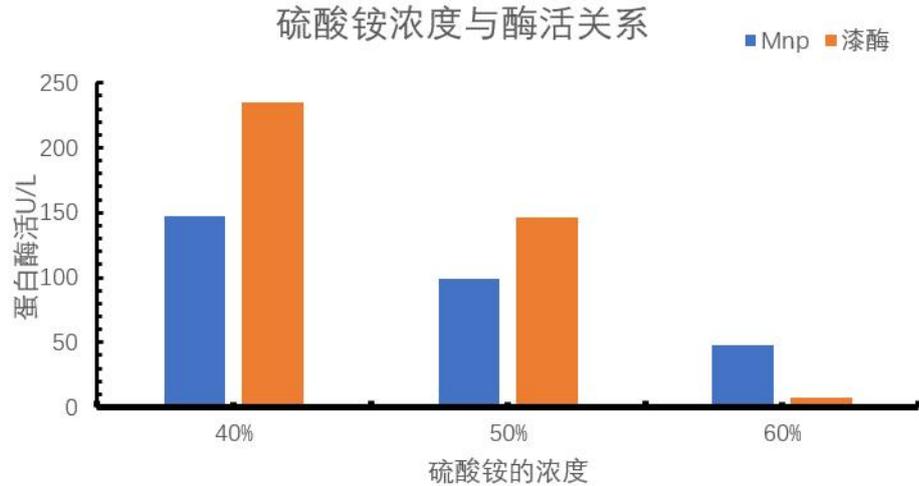


图 3.11 硫酸铵浓度与酶活关系示意图

如图 3.11 可以明显看出实验结果硫酸铵的浓度越高蛋白的酶活越低，当硫酸铵浓达到 50 % 时，上清中的蛋白酶活明显降低，说明蛋白被沉淀，而到达 60 % 时大部分都会被沉淀，所以选择 40 % 硫酸铵进行蛋白纯化。

### 3.4.4 苯基疏水 6FF 柱结果分析

使用 AKTAavant 自动纯化在 20 mM Tris-HCl 冲洗下的可以在电脑上非常直观的看出下冲洗柱子有明显的峰，收集峰的试管

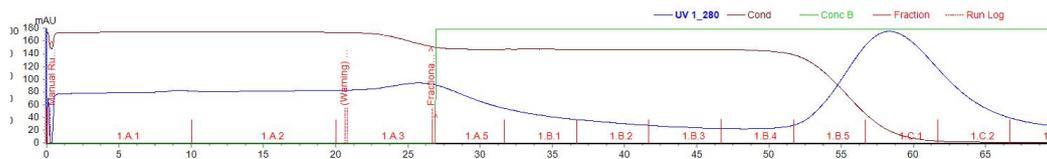


图 3.12 第三次纯化蛋白流程图

将收集的酶液加入反应混合物后使用分光光计测定 0~60 s 之间的吸光值变化，选择出酶活最高的几管收集液根据酶活公式计算出酶活。

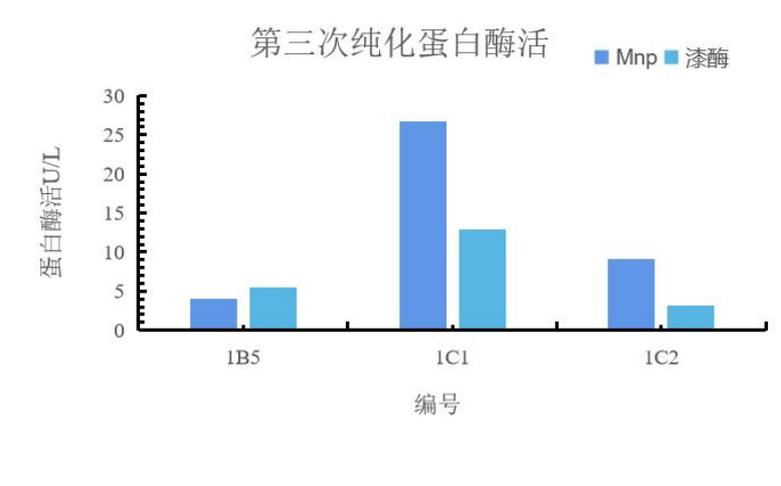


图 3.13 第三次纯化蛋白酶活示意图

配制 MnP 不加 2,6-DMP 的反应混合物,取 400  $\mu\text{L}$  反应混合物,加上 392  $\mu\text{L}$  的酶液和 8  $\mu\text{L}$  的 1 g/L 的活性蓝 KNR,放入 25 $^{\circ}\text{C}$  震荡培养箱中震荡培养每 2 h 观察一次,记录脱色情况(+表示染料降解程度)。

表 3.6 第三次纯化酶液降解染料

	1B5	1C1	1C2	原液
2 h	+	++	+	++

因为蛋白浓度过低制作酶谱分析效果不明显,所以采用丙酮沉淀蛋白

丙酮浓度对于沉淀蛋白的酶活

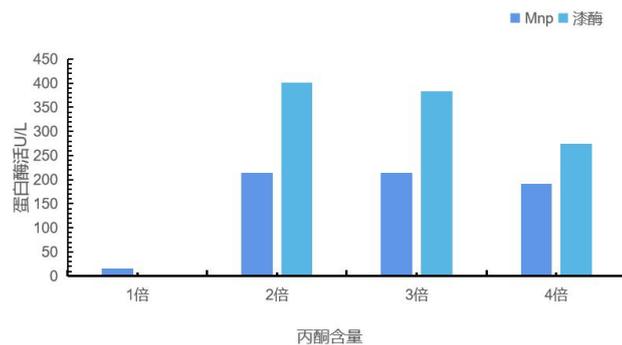


图 3.14 丙酮浓度对于沉淀蛋白的酶活影响示意图

如图 3.14 所示,加入二倍体积和三倍体积丙酮溶液的酶活力最高,有机溶剂易使蛋白质或酶变性,低浓度的丙酮沉淀了少量的蛋白,而高浓度的丙酮抑制

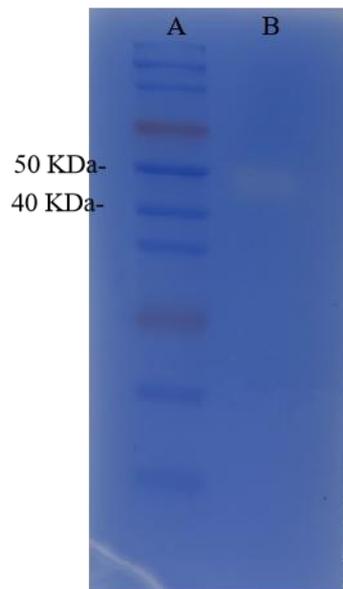
力蛋白的活力。

根据摸索的条件，取 100  $\mu\text{L}$  的样品加入 300  $\mu\text{L}$  的丙酮溶液，混匀后放入  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱，冷藏 2 h 后取出，取出弃掉上清，打开盖子放入  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱晾干大约 2 h 取出，使用 40  $\mu\text{L}$  的超纯水重旋，使蛋白溶解在水中。将重旋后的蛋白分为两管。

表 3.7 第三次纯化蛋白酶液 SDS 和酶谱配制

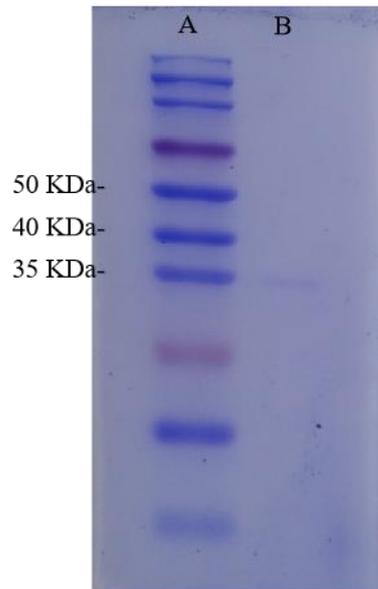
	样品	灭活	染色液	脱色液
酶谱	20 $\mu\text{L}$ 洗脱液和 4 $\mu\text{L}$ 25 %甘油	否	200 mg/L 的活性蓝染液	PBS 缓冲液
SDS 配制	20 $\mu\text{L}$ 洗脱液和 4 $\mu\text{L}$ loading buffer	是	考马斯亮蓝 R250	23% (v/v) 乙醇

制作酶谱和 SDS-PAGE 胶配制，电泳后将胶脱色对比拍照：



注：A: Maker; B: C1

图 3.15 蛋白纯化酶谱胶图分析结果



注：A：Marker；B：C1

图 3.16 SDS-PAGE 胶图结果分析

经过酶谱分析与 SDS-PAGE 配制，SDS-PAGE 出现的条带与 Marker 相比大约在 35 KDa 左右，而与酶谱对比，出现透明条带的大小约为 50 KDa 左右，所以用疏水柱纯化得到的蛋白并不纯，SDS 配制与酶谱条带大小对应不起来，证明还存在杂蛋白，需要进一步探索条件。

## 4 结论

关于染料的降解，目前常用的方法有物理法、化学法、生物法等，生物降解稳定性强，效率高，成本低，所以生物降解成为研究的热点，真菌因菌丝生长速率快、培养价格低是理想的实验材料。我们筛选了实验室保藏的几种常见的食用菌大球盖菇、平菇、真姬菇、香菇进行了染料降解能力的筛选。结果显示大球盖菇的降解效率最高。

通过每天测定粗酶液中蛋白活力，发现随着培养时间的延长，粗酶液中 MnP 活力呈现先增加后降低的趋势，在培养第 8 天，MnP 活力达到最大，同时上清的脱色活力也在第 8 天达到最大，这表明了上清中的 MnP 是主要的脱色酶。通过酶谱分析发现该酶的大小为 40-50KDa。

为了进一步证明在染料降解过程中起作用的蛋白可能是大球盖的 MnP，首

先利用 AKTA 进行了蛋白纯化。使用 PDB 培养大球盖菇，利用阴离子柱 DEAE-SepHarose FF、阳离子柱 SP- $\mu$ Sphere、疏水柱苯基疏水 6FF 三种不同性质的柱子分步纯化，每次纯化完成后，均验证酶活及降解率，因培养基中杂质较多，纯化蛋白难度较大，可能因为粗酶液中需纯化蛋白浓度较低，纯化完成后，经 SDS-PAGE 未得到目的条带，接下来，可以继续扩大纯化体系，或者进一步改良培养基配方，提高粗酶液中蛋白含量。

本研究虽然最终未获得高纯度的 MnP，但是前期实验也证明了大球盖菇存在高效的染料脱色酶。大球盖菇是一种草腐菌能够在地里面进行栽培，因此大球盖菇不仅仅可以进行废水中染料的降解而且能够进行土壤中染料污染的修复具有很强的应用前景。

## 参考文献

- [1]巴桑.偶氮染料与化合物的颜色及危害[J].西藏科技,2015(1):38-39.
- [2]吕鹏.微生物降解纺织染料研究进展[J].价值工程,2016,35(18):217-221.
- [3]徐成勇,郭波,周莲,等.白腐菌对染料脱色和降解作用的研究进展[J].中国生物工程杂志,2002,22(001):57-60.
- [4]王辉,韩迪,郎峰,等.微生物脱色降解染料废水研究[J].中国科技纵横,2016(5):6-6.
- [5]郭玉敏,代广辉.木质素降解酶系染料降解原理概述[J].河北建筑工程学院学报,2019,37(02):116-120.
- [6]闫苗,罗青,赖春芬,李崇,刘骊,孙淑静.杏鲍菇菌糠锰过氧化物酶提纯工艺研究[J].江苏农业科学,2019,47(02):297-301.
- [7]姚英,于存.一色齿毛菌对刚果红的脱色优化及其毒性变化研究[J].菌物学报,2019,38(2):272-280.
- [8]谢慧芳,近藤隆一郎,李忠正.白腐菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 产锰过氧化物酶的生产及初步纯化[J].林产化学与工业,2003,23(4):22-26.
- [9]田林双.木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J].畜牧与饲料科学,2009,30(10):13-15.
- [10] Wariishi H , VaLLi K , GoLd M H . manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators.[J]. Journal of BioLogical Chemistry, 1992, 267(33):23688-95.
- [11]吴天鸽,黄文君,冯嘉轩.三氯醋酸/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法去除血浆高丰度蛋白效果的对比研究[J].重庆医学,2020,49(23):3876-3879.

## 致谢

通过这几个月的实验，大学生活即将圆满的结束，论文的完成也是为本科生涯画上句号，短短的四年我在科研方面成长了许多，首先得感谢我的本科导师于浩老师的授识之恩，在他的帮助下，我如期完成了论文，在他的身上学到了很多科研的思路，也收获了宝贵的经验，不在仅仅局限于书本，也不会成为纸上谈兵的说客，而是能吃苦耐劳的科研能力，他培养我的科研精神，将使我未来的科研道路走的更远也走的更稳。

其次要感谢我的父母养育之恩，正是父母的支持才有了今天的我，造就了今天的我。

最后要感谢我的师姐赵书雪和师兄李晓航，正是他们的细微的指导和耐心的讲解，我们才能学到更多的东西，朝夕相处的几个月，与师兄师姐并肩作战，体验到了研究生的生活，也获得了许多科研能力的提升，也感谢我的同学朱祥祥、吴桂平、刘赞，他们给我很好的建议，也给了我许多鼓励和支持。科研的道路还很长，希望我能走的更远。