

白腐菌 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 液态发酵水葫芦产漆酶

刘文华, 蔡宇杰, 孙付宝, 张 峰, 孙 啸, 范晶晶, 廖样儒*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用单因素法和响应面法对白腐菌 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 利用水葫芦液态发酵产漆酶的培养基和培养条件进行了优化, 确定了最佳培养基: 水葫芦 41.0 g/L, 玉米浆粉 50.8 g/L, 葡萄糖 30.0 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, 吐温-80 0.5 g/L, 香兰素 0.5 mmol/L, 无机盐混合液 50 mL/L。最佳培养条件为: 培养温度 30 ℃、初始 pH 值 4.0、装液量 80 mL/250 mL、接种体积分数 8%、200 r/min 摇瓶培养 8 d, 酶活性达 7 784 U/L, 是优化之前的 17.3 倍。该研究为水葫芦等生物质资源的有效利用提供了参考。

关键词: *Trametes hirsuta* SYBC-L19; 水葫芦; 漆酶; 优化; 响应面

中图分类号: Q 81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)12—1252—10

Study of *Trametes hirsuta* SYBC-L19 Liquidstate Fermentation for Laccase Production

LIU Wen-hua, CAI Yu-jie, SUN Fu-bao, ZHANG Feng, SUN Xiao, FAN Jing-jing, LIAO Xiang-ru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the nutritional and environmental conditions of white-rot fungi, *Trametes hirsuta* SYBC-L19, for laccase production were investigated and optimized through single factor experiments and response surface methodology. The optimum conditions described as follows: water hyacinth (dry weight) 41.0 g/L, corn steep powder 50.8 g/L, glucose 30.0 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, tween -80 0.5 g/L, vanilline 0.5 mmol/L, inorganic salt mixture 50 mL/L, inoculation concentration 8%, pH 4.0, liquid volume 80 mL/250 mL, culture temperature 30 ℃. With the conditions, the activity of laccase was achieved at 7 784 U/L, was higher 17.3 times than that of control. The study provides a path and a certain theoretical basis for effective utilization of the water hyacinth and other biomass resource.

Keywords: *Trametes hirsuta* SYBC-L19, water hyacinth, laccase, optimization, response surface methodology

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA101501); 国家重大科技支撑与自主创新专项引导资金项目(BY2010117)。

* 通信作者: 廖样儒(1964—), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

E-mail: 13771104596@163.com

漆酶是一种含有多个铜离子的氧化还原酶类,1883年,Yoshida首次从漆树中发现了该酶。漆酶是一种环境友好型酶类,其催化底物单电子氧化形成自由基,同时将分子氧还原形成水,产生的自由基则耦合形成二聚体或低聚物^[1]。漆酶可催化氧化多种底物,如酚类及其衍生物、芳胺及其衍生物、羟酸及其衍生物、一些金属有机化合物和甾类激素、生物色素等,在环境保护与修复、造纸工业、有机合成、食品工业、生物监测等领域有着广泛的应用前景^[2-4]。

白腐菌是漆酶的主要产生菌类^[1]。近年来,对白腐菌的研究主要集中在漆酶的生产、生物质(如农作物秸秆)的降解利用、有害物质的降解和生物修复等方面^[2,6-7]。水葫芦(Water Hyacinth)又名凤眼莲,是目前世界上危害最严重的水生植物,被称为世界十大害草之一。水葫芦繁殖迅速,在条件允许的情况下平均每5 d产生1棵新株,按照这个速度计算,1株水葫芦1年之内经过繁殖就可以达到1.4亿株,鲜重可达28 000 t,资源相当丰富。水葫芦含有丰富的营养成分,包括粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、无氮浸出物以及许多氨基酸、维生素C、胡萝卜素和多种微量元素,是大自然赐予人类的一种资源,有效地利用这种资源,不仅能解决目前水葫芦泛滥的危害,同时可以变废为宝^[8-9]。

王志新等人^[5]用血红密孔菌对水葫芦固态发酵产漆酶进行了研究,酶活达到19.17 U/g,但固态发酵存在周期长、自动化程度低、工艺参数难于检测和控制等问题。液态发酵可以克服以上问题,且更容易放大,而水葫芦液态发酵还没有报道过。作者对水葫芦液态发酵产漆酶进行了研究,对白腐菌液态发酵水葫芦生产漆酶的条件进行了优化,使用单因素、响应面设计等方法研究了碳源、氮源、无机盐、铜离子、诱导剂等培养基组成和温度、pH、装液量、接种体积分数等发酵条件对白腐菌产漆酶的影响,为水葫芦生物质资源的有效利用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

毛栓菌 *Trametes hirsute* SYBC-L19:作者所在实验室保藏。

1.2 主要试剂

DMP(2,6-Dimethoxyphenol):购自于美国Sigma公司;水葫芦:采自于无锡水体(晒干,粉碎,过50

目筛);玉米浆粉、豆粕、麸皮、花生饼粉、土豆:市售;其余有机及无机试剂:国产分析纯试剂。

1.3 培养基

1.3.1 PDA培养基(g/L) 土豆200,葡萄糖20、琼脂20;pH值自然。

1.3.2 PDA斜面培养基(g/L) 土豆100,葡萄糖10,琼脂20;pH值自然。

1.3.3 种子培养基(g/L) 土豆200,葡萄糖20;pH值自然。

1.3.4 初始培养基/产酶基础培养基(g/L) 水葫芦30,豆粕20,CuSO₄·5H₂O 0.375(1.5 mmol/L),愈创木酚0.062(0.5 mmol/L)。以上培养基均在115℃下蒸汽灭菌20 min。

无机盐混合液(mmol/L):NaH₂PO₄·2H₂O 100,CaCl₂ 50,FeSO₄·7H₂O 10,FeCl₃·6H₂O 1,ZnSO₄·7H₂O 10,MgSO₄·7H₂O 50,MnSO₄·H₂O 10,KCl 10。

1.4 方法

1.4.1 种子液制备 将毛栓菌 *Trametes hirsute* SYBC-L19菌株接种于PDA平板培养基上,30℃培养5~6 d,待菌丝均匀长满平板的临界位置时,用0.9 cm打孔器在菌落边缘截取6片菌块,置于含有50 mL种子培养基的250 mL三角瓶中,并在30℃、200 r/min条件下,培养48 h。

1.4.2 发酵产酶 将种子液接种于含有50 mL产酶基础培养基的250 mL三角瓶中,初始接种体积分数为10%,在30℃、200 r/min条件下振荡培养10 d,结束发酵。每个样品做3个平行。

1.4.3 粗酶液制备 发酵产酶结束后,取发酵液,8 000 r/min离心10 min,取上清液,即为漆酶粗酶液。

1.4.4 漆酶活力的测定 用DMP法测定^[10],以每分钟氧化1 μmol的DMP转化成3,5,3',5'-四甲氧基二苯醌($\varepsilon=9.6$ L/(mmol·cm))所需要的酶量定义为1个酶活力单位。

1.5 漆酶分泌条件的优化

1.5.1 碳氮源对漆酶分泌的影响 改变产酶基础培养基中水葫芦的含量,其他条件不变,发酵完后测定漆酶活力;在产酶基础培养基中加入不同质量浓度的小分子碳源葡萄糖,在相同培养条件下培养10 d后测定漆酶活力。以碳源优化培养基为基础,用不同的氮源代替其中的豆粕,其他条件不变,培养结束后测定漆酶活力;选出最适氮源,以最适氮源代替培养基中的豆粕,改变其质量浓度进行发

酵,结束后测定漆酶活力。

1.5.2 铜离子对漆酶分泌的影响 以碳氮源优化好的培养基作为基础,改变其中铜离子的质量浓度和加入时间,进行发酵产酶,结束后测定漆酶活力。

1.5.3 诱导剂对漆酶分泌的影响 用各类等物质的量的诱导剂代替上述各因素优化好的培养基中的愈创木酚,加入量不变,进行发酵产酶,结束后测定漆酶活力。向上述优化好的培养集中加入不同的表面活性剂,加入量为 0.05%,培养 10 d 后测定漆酶活力,以考察不同表面活性剂对漆酶分泌的影响。

1.5.4 无机盐对漆酶分泌的影响 在上述优化好的培养基中加入不同种类的无机盐(终浓度为 5 mmol/L)和不同量的无机盐混合液,进行发酵,结束后测定漆酶活力。

1.5.5 响应面分析实验 根据单因素实验的结果,对可能影响漆酶分泌的 7 个因素,水葫芦、葡萄糖、玉米浆粉、铜离子、诱导剂、表面活性剂、无机盐,利用 Plackett-Burman (PB) 设计,进行筛选试验(试验次数 12,中心点 4,重复 3 次),选出对漆酶分泌影响较大的因素,再据此设计中心组合实验(CCRD),对其添加量进行优化,获得最优结果。

1.5.6 发酵条件对漆酶分泌的影响 在优化培养基的基础上,利用单因素实验法,分别考察温度、pH、装液量、接种体积分数对漆酶分泌的影响,以确定漆酶发酵生产的最佳培养条件。

2 结果与讨论

2.1 碳源对漆酶分泌的影响

水葫芦作为发酵基质,需要对其某些性质进行了解,见图 1。图 1(a)表明使用水葫芦的茎部有利于漆酶的生产,其次为叶,最后为根部,可能是因为根部营养物质含量少且重金属等含量较多影响了菌体生长代谢。图 1(b)表明当水葫芦粉碎粒度在 50 目及以上时发酵产酶较好。改变产酶基础培养基中水葫芦的质量分数,获得水葫芦的最适加入量,结果见图 1(c)。

从图 1(c)可以看出,随着水葫芦的增加,漆酶活力增加,到水葫芦质量分数为 4.0%时,质量分数随之减少。在实际操作中,随着水葫芦的增加,营养物质增加,毛栓菌菌体质量分数增大,漆酶产量上升,但是当水葫芦质量分数继续增加,发酵液的粘稠度增加,不利于传氧传质,毛栓菌生长受限,漆酶

产量降低。当水葫芦质量分数达大于 7%时,发酵液呈半固体状态,影响搅拌与混合。

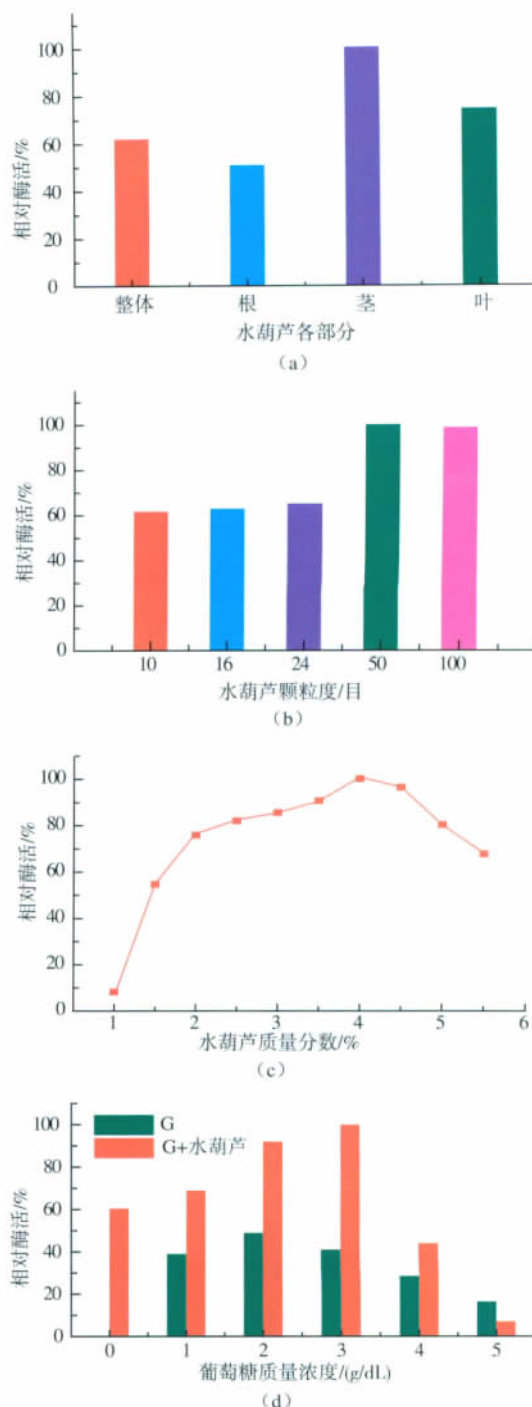


图 1 碳源对 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 产漆酶的影响
Fig.1 Effect of water hyacinth and glucose on laccase production of *Trametes hirsuta* SYBC-L19

由于水葫芦内还原糖质量浓度很低,在发酵初期影响毛栓菌的生长,故而考虑加入小分子碳源葡萄糖,结果见图 1d。当葡萄糖质量浓度为 3 g/dL 时,

漆酶活力最高,随着葡萄糖质量浓度增高,可能由于葡萄糖效应等原因,影响漆酶的分泌,故而酶活力降低。当培养基中的碳源只有葡萄糖时,漆酶活力均低于培养基中只含有 3% 的水葫芦时的酶活力水平,说明毛栓菌 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 在以水葫芦为碳源时比以葡萄糖为碳源时产酶量高。

2.2 氮源对漆酶分泌的影响

碳源对漆酶分泌的影响见图 2。图 2(a)、2(b) 分别显示了不同复合氮源(加入量 2 g/dL)和单一氮源(加入量 0.6 g/dL)对漆酶分泌的影响。图 2(a)显示以玉米浆粉为氮源时漆酶活力最高,乙酸铵、酒石酸铵、酵母膏不利于产酶,其余氮源均有利于产酶。图 2(b)显示无机氮源均不利于漆酶的产生。这可能是由于菌株更容易利用氨基酸中的氮,所以选玉米浆粉为氮源。图 2(c)显示当玉米浆粉质量分数达到 6% 时,漆酶活力最高。

2.3 铜离子对漆酶分泌的影响

漆酶中含有多个铜离子,构成了酶的活性中心。许多研究表明,铜离子能通过诱导基因表达、翻译和翻译后调控等方式调控漆酶的合成^[11-13]。

通过改变铜离子加入量和加入时间,考察了该菌株对漆酶分泌的影响,见图 3。

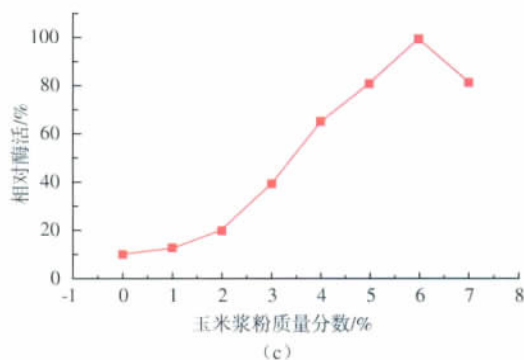
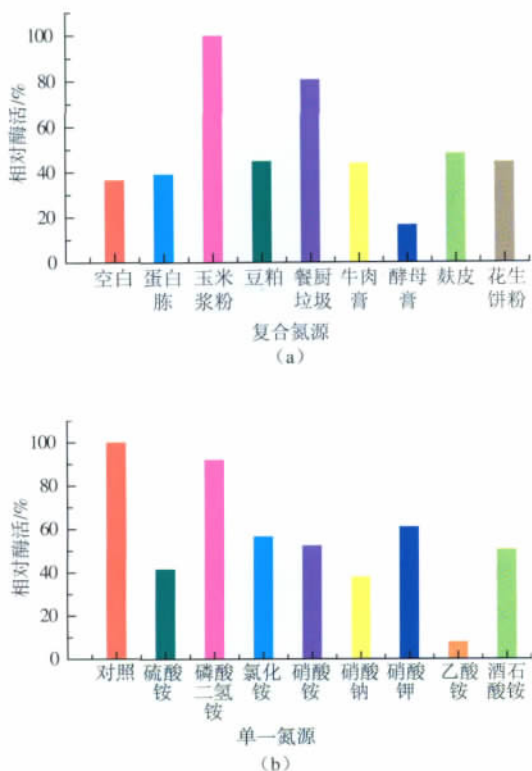


图 2 碳源对 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 产漆酶的影响
Fig.2 Effect of nitrogen sources and content of corn steep powder on laccase production

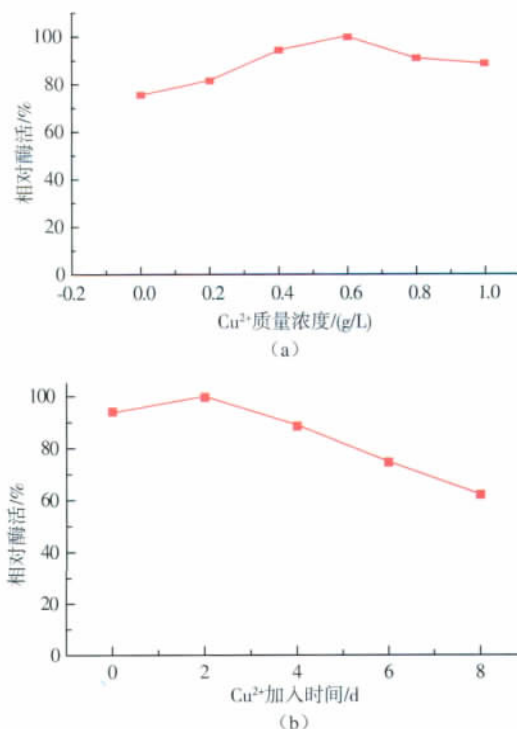


图 3 铜离子对漆酶分泌的影响

Fig.3 Effect of copper and its content on laccase production

图 3(a)显示加入铜离子的发酵液漆酶活力要高于没加铜离子时的活力,当加入的硫酸铜为 0.6 g/L 时活力达到最大。铜离子是一种金属离子,质量浓度高时对菌体的毒害作用明显,所以质量浓度超过 0.6 g/L 时漆酶活力降低。

图 3(b)显示,在第二天加入铜离子漆酶活力稍微高于之前加入铜离子的漆酶活力,可能由于发酵前两天,菌体没有受到铜离子的毒害,生长的更好;而之后加入铜离子的发酵液酶活力明显下降,表明在后期加入铜离子不利于菌体生长,不利于此菌产酶。

2.4 诱导剂对漆酶分泌的影响

良好的诱导剂能促进漆酶的合成^[14]。作者考察了诱导剂和表面活性剂对漆酶分泌的影响,见图 4。

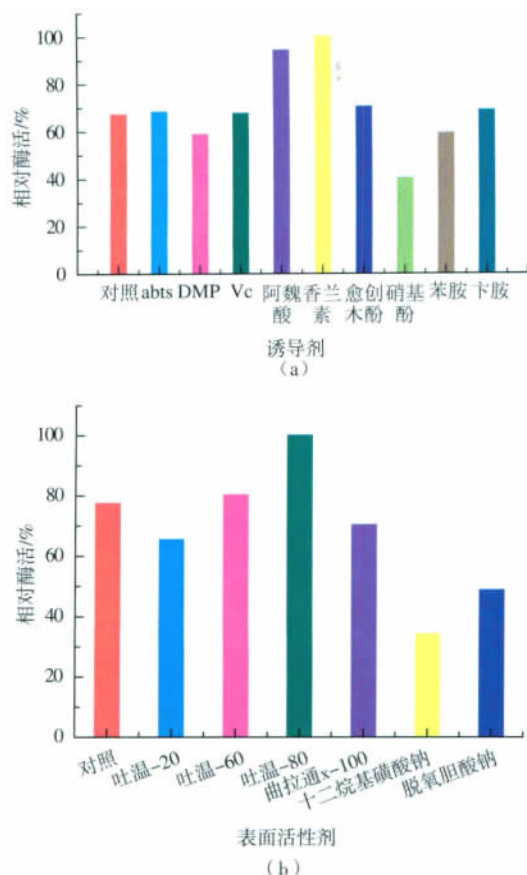


图 4 诱导剂对漆酶分泌的影响

Fig.4 Effect of inducer on the laccase production

图 4(a)显示,阿魏酸、香兰素对漆酶的分泌有明显的促进作用,两者都为小分子芳香族化合物,2-硝基酚有明显的抑制作用,其虽然也是小分子酚类化合物,可能存在的硝基起到了抑制作用,其余的诱导剂作用效果不很明显。

表面活性剂能增大膜的通透性,有利于漆酶胞外分泌。图 4(b)显示了不同表面活性剂对漆酶分泌的影响,吐温-80 对漆酶的分泌有明显的促进作用,十二烷基磺酸钠等有明显的抑制作用,可能由于这些表面活性剂对细胞造成了一定的损害,影响了漆酶的分泌。

2.5 无机盐离子对漆酶分泌的影响

无机盐是微生物生长必不可少的一类营养物质,对菌体的生长代谢起着重要的作用。在上述各类物质优化后的培养基中加入不同的无机盐,考察无机盐(终浓度为 5 mmol/L)对毛栓菌 *Trametes*

hirsuta SYBC-L19 分泌漆酶的影响,结果见图 5。

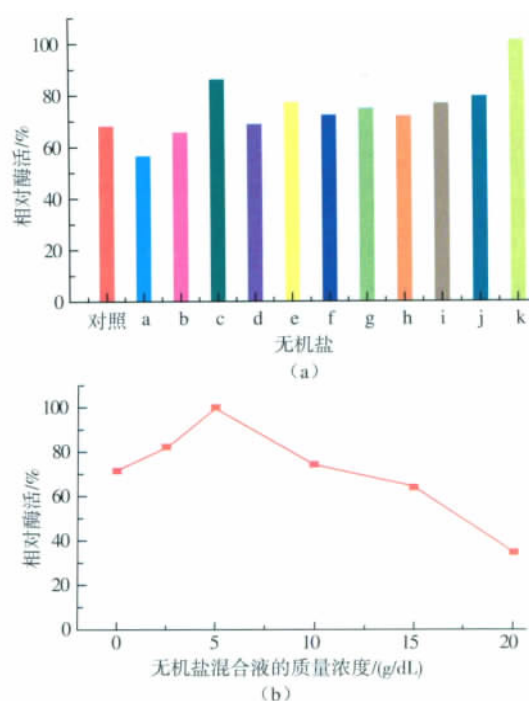


图 5 无机盐对漆酶分泌的影响

Fig.5 Effect of inorganic salts on the laccase production

图 5(a)显示大部分无机盐(特别是磷酸二氢钠)对毛栓菌产漆酶有促进作用,而钾盐(磷酸二氢钾、氯化钾)对漆酶的分泌有抑制作用;无机盐混合液(添加量为 5%)对漆酶的分泌有明显的促进作用,是未添加无机盐时的 1.45 倍。图 5(b)表明:无机盐混合液的最佳添加量为 5 g/dL,之后当无机盐含量增大时,漆酶分泌量降低,可能由于高无机盐含量产生了高渗透压或对菌体生长有毒害作用,影响菌体的生长。

2.6 Plackett-Burman(PB)筛选实验

根据以上单因素实验的结果,利用 Plackett-Burman 软件,根据发酵液中漆酶酶活力的大小对影响漆酶产量的主要因素进行筛选,实验设计及结果见表 1。

该实验的方差分析(ANOVA)见表 2。该模型的 $P < 0.05$,说明该模型在大于 95%概率水平下是显著的,而失拟合($P > 0.05$)不显著。根据方差分析的结果,在 6 种培养基中,水葫芦在 99.5%概率水平下显著,玉米浆粉在 99.9%概率水平下显著,其余的显著差异概率水平均在 95%之下,所以水葫芦和玉米浆粉是影响漆酶合成的主要因素。通过 Plackett-Burman 软件对漆酶产量进行分析,获得以漆酶产量

表 1 Plackett-Burman 实验设计及结果

Tab.1 Plackett-Burman experimental design and the results

实验号	因素							漆酶活力/ (U/L)
	水葫芦 质量分数 (X_1 , %)	玉米浆粉 质量浓度 (X_2 , g/dL)	葡萄糖 质量浓度 (X_4 , g/dL)	硫酸铜浓度 (X_5 , mmol/L)	无机盐 质量浓度 (X_7 , g/dL)	吐温-80 质量浓度 (X_8 , g/dL)	香兰素浓度 (X_{10} , mmol/L)	
1	0(4.0)	0(5.0)	0(3.0)	0(2.4)	0(0.5)	0(0.09)	0(0.10)	7 620.9
2	1(5.0)	-1(4.0)	1(3.5)	1(3.2)	-1(0.25)	-1(0.06)	-1(0.05)	7 203.2
3	-1(3.0)	-1	-1(2.5)	-1(1.6)	-1	-1	-1	5 116.9
4	1	-1	1	-1	1(0.75)	1(0.12)	-1	7 112.0
5	1	1(6.0)	1	1	-1	-1	1(0.15)	4 572.5
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	5 443.5
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	5 987.9
8	0	0	0	0	0	0	0	7 476.6
9	-1	1	-1	1	1	-1	-1	3 157.2
10	1	-1	-1	1	1	1	1	6 423.3
11	-1	-1	1	-1	1	-1	1	6 532.2
12	-1	1	1	1	1	1	-1	1 959.7
13	-1	1	1	-1	-1	1	1	4 354.8
14	1	1	-1	-1	1	-1	1	4 725.8
15	0	0	0	0	0	0	0	7 620.9
16	0	0	0	0	0	0	0	7 038.6

注: X_3, X_6, X_9, X_{11} 为虚拟因素, 未列出。

(Y_1) 为因变量的多元一次回归方程:

$$Y_1 = 5865.37 + 880.03X_1 - 1097.77X_2 + 81.65X_4 - 480.84X_5 - 172.38X_7 - 27.22X_8 + 117.94X_{10}$$

2.7 中心组合实验(CCD)

根据前期的单因素实验和 PB 实验, 漆酶合成影响较大的两个因素选出了水葫芦和玉米浆粉, 对两者利用中心组合实验进一步优化, 得出两者的最优值。实验设计水平和结果见表 3。

表 2 Plackett-Burman 设计方差分析

Tab.2 Results analysis of the Plackett-Burman ANOVA

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.714E+007	7	3.877E+006	9.12	0.004 68
X_1 -水葫芦	9.293E+006	1	9.293E+006	21.86	0.002 3
X_2 -玉米浆粉	1.446E+007	1	1.446E+007	34.01	0.000 6
X_4 -葡萄糖	80005.57	1	80005.57	0.19	0.677 5
X_5 -硫酸铜	2.775E+006	1	2.775E+006	6.53	0.037 8
X_7 -无机盐	3.566E+005	1	3.566E+005	0.84	0.390 2
X_8 -吐温-80	8889.51	1	8889.51	0.021	0.889 1
X_{10} -香兰素	1.669E+005	1	1.669E+005	0.39	0.550 8
剩余量	2.976E+006	7	4.251E+005		
失拟合	2.659E+006	4	6.647E+005	6.29	0.081 4
纯误差	3.171E+005	3	1.057E+005		
合计	4.506E+007	5			

表 3 中心组合设计水平、编码及实验结果

Tab.3 Experimental design and results of the central composite design

实验号	因素				酶活/(U/L)	
	水葫芦(X_1)		玉米浆粉(X_2)		实际值	预测值
	编码	实际值/%	编码	实际值/%		
1	0	4	0	5	7 801	7 786
2	0	4	0	5	7 648	7 786
3	1.414	4.71	0	5	6 672	6 761
4	-1	3.5	-1	4.5	5 518	5 750
5	-1.414	3.29	0	5	6 030	5 964
6	0	4	1.414	5.71	6 393	6 672
7	-1	3.5	1	5.5	6 521	6 374
8	0	4	-1.414	4.29	6 232	5 975
9	0	4	0	5	7 732	7 786
10	1	4.5	1	5.5	7 062	6 806
11	1	4.5	-1	4.5	6 321	6 444
12	0	4	0	5	7 758	7 786
13	0	4	0	5	7 993	7 786

根据实验数据,利用软件 Design-expert 拟合所得的二次多项式为:

$$Y_2=7786.4+281.49X_1+246.46X_2-65.5X_1X_2-711.76X_1^2-731.01X_2^2$$

中心组合实验的方差分析(AVONA)见表 4。该模型的 $P<0.0005$, 说明该模型在 99.95%概率水

平下是极其显著的,而失拟合不显著 $P>0.05$,表明该模型不需再引入其他因素。该模型的决定系数 $R^2=0.9523$, 表明实验 95.23%的变化情况能由该模型能解释。另外, $R^2=0.9523$, $R^2_{Adj}=0.9182$, 两者接近,表明该实验模型是合适的。

表 4 中心组合实验设计方差分析

Tab.4 Analysis of variance of the central composite design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.543E+006	5	1.509E+006	27.93	0.000 2
X_1 -水葫芦	6.339E+005	1	6.339E+005	11.74	0.011 0
X_2 -玉米浆粉	4.859E+005	1	4.859E+005	9.00	0.020 0
X_1X_2	17161.00	1	17161.00	0.32	0.590 6
X_1^2	3.524E+006	1	3.524E+006	65.24	<0.000 1
X_2^2	3.717E+006	1	3.717E+006	68.82	<0.000 1
剩余值	3.781E+005	7	54016.51		
失拟合	3.123E+005	3	1.041E+005	6.33	0.0534
纯误差	65817.20	4	16454.30		
合计	7.922E+006	12			

根据对回归方程进行求导,结合图 6~7 的三维响应图,求的该模型的因变量 Y_2 最大时,解为: $X_1=0.191, X_2=0.159$, 对应的水葫芦和玉米浆粉分别为 4.01、5.08 g/dL,模型的最大响应值为 7 832.92。图 6 展现了实际值与预测值的分布情况,两者都均匀分布在直线附近,表明该模型与事实相符。

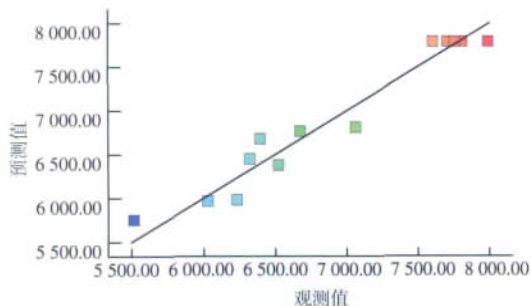


图 6 观测值与预测值之间关系图

Fig.6 Plot of predicted vs actual laccase activity (U/L)

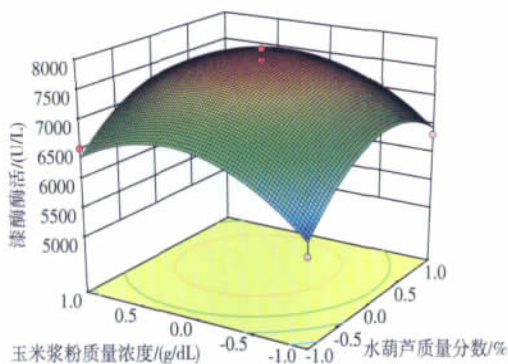


图 7 玉米浆粉及水葫芦对酶活的影响三维图

Fig.7 3D response surface curve for effects of corn steep powder, water hyacinth and their mutual interaction

2.8 发酵条件对漆酶分泌的影响

培养条件对菌体的生长和代谢产物的分泌有重要的影响,作者对温度、pH、装液量和接种量等培养条件进行了优化,结果见图 8。

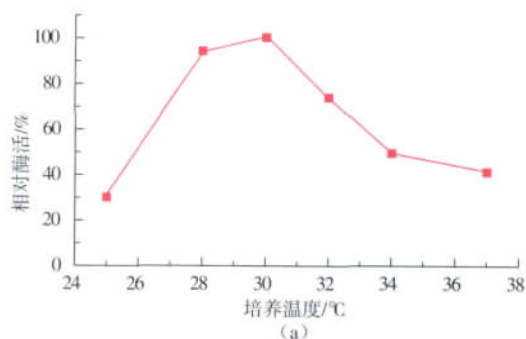
图 8(a)展示了温度对漆酶分泌的影响。结果表明,在 25 ℃下产酶较低,只有最高酶活时的 30%,随着温度的升高,酶活迅速增加,当达到 30 ℃时,漆酶分泌达到最高,之后随着温度的升高,漆酶分泌逐渐降低。表明较高和较低的温度均不利于漆酶的分泌。这与文献[15]的结论是相同的。

图 8(b)展现了培养基 pH 对漆酶分泌的影响,当 pH 值小于 3.0 或大于 5.0 时,漆酶产量很低,均

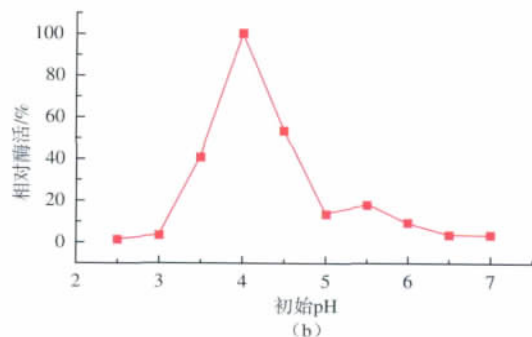
小于最高酶活时的 3%和 17%,表明 pH 对 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 分泌漆酶的影响很大; 当在 pH 值为 4.0 时,漆酶活性最高,说明该菌在 pH 4.0 培养基中漆酶分泌最佳。

图 8(c)展示了装液量对漆酶分泌的影响,结果表明:装液量对漆酶分泌的影响不大,当装液量为 80 mL/250 mL 时有最高酶活,装液量 30 mL/250 mL 时的酶活为最高酶活的 80%左右,当装液量大于 80 mL/250 mL 时,酶活下降,这是由于装液量增大,溶氧条件变差造成的。

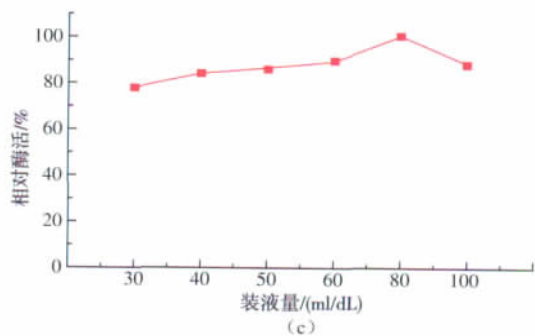
图 8(d)展现了接种量对漆酶分泌的影响,接种体积分数在小于 4%和大于 12%时的漆酶酶活分别为最高酶活的 25%和 35%,说明接种体积分数对漆酶的分泌影响较大,当接种体积分数达到 8%时,漆酶酶活达到最高。



(a)



(b)



(c)

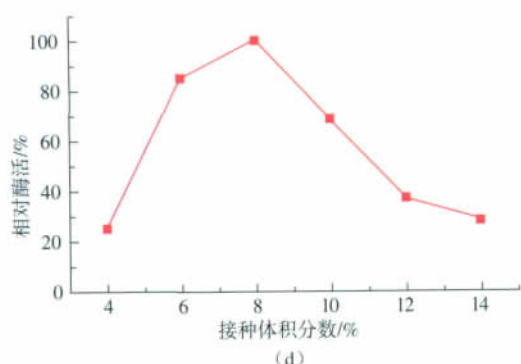


图 8 发酵条件对漆酶分泌的影响

Fig.8 Effects of temperature, initial pH, liquid volume and inoculation concentration on the laccase production

2.9 优化前后培养基产漆酶的比较

优化前后产酶曲线图见图 9, 表明优化后 *Trametes hirsute* SYBC-L19 产酶的发酵周期提前了 3 d, 最高酶活是优化前的 17.3 倍。

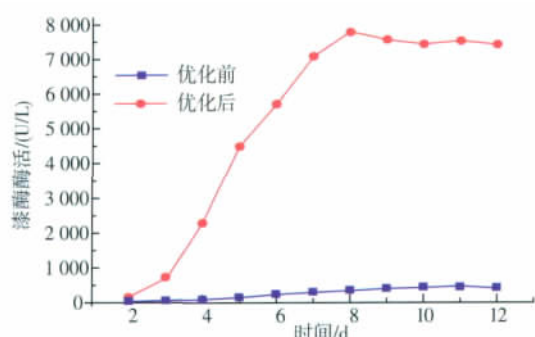


图 9 培养基优化前后 *Trametes hirsute* SYBC-L19 产酶曲线

Fig.9 Curve of laccase production before and after optimization

3 结 语

作者以实现水葫芦生物质资源的有效利用为目的,以白腐菌以水葫芦为原料分泌生产漆酶为思路,对以水葫芦作为底物,利用白腐菌液态发酵生产漆酶的条件进行了优化,其最优培养基为水葫芦 41.0 g/L, 玉米浆粉 50.8 g/L, 葡萄糖 30.0 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, 吐温-80 0.5 g/L, 香兰素 0.5 mmol/L, 无机盐混合液 50 mL/L。最佳培养条件为: 培养温度 30 ℃、初始 pH 值 4.0、装液量 80 mL/250 mL、接种体积分数 8%, 200 r/min 摇瓶培养 8 d, 酶活性达 7 784 U/L, 是优化之前的 17.3 倍。

自然界中有许多廉价、丰富易得的生物质资源,如水葫芦,白腐菌可将这些生物质资源转化为漆酶,实现生物质的有效利用。本研究仅为这些生物质的有效利用提供了一条途径和一定的理论和实验依据。对于利用类似途径进行生物质的有效利用存在的问题,如提高转化效率,缩短发酵周期,中试及放大等还需要进行更广泛和深入的研究。

文献参考:

- [1] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry[J]. *Trends Biotechnology*, 2006, 24(5): 219–226.
- [2] Couto S R, Herrera J L T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 500–513.
- [3] Ballerina P. Fungal laccases—occurrence and properties[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 215–242.
- [4] Vianello F, Ragusa S, Cambria M T, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(11): 2155–2160.
- [5] 王志新, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 18S rDNA 序列分析及其固态发酵水葫芦产漆酶的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(8): 832–839.
WANG Zhi-xin, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. 18S rDNA sequence analysis of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 and studies of laccase production on hyacinth solid-state fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(8): 832–839. (in Chinese)
- [6] Jurado M, Martín A T, Martínez M J, et al. Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes[J]. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, 2011, 6: 595–603.
- [7] Purnomo A S, Mori T, Kamei I, et al. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(7): 921–930.

- [8] 刘欣萍. 浅谈水葫芦治理与利用[J]. 中国环境管理, 2004, 4: 60-62.
LIU Xin-ping. Control and utilization in the *Eichhornia crassipes* Sloms[J]. **Chinese Journal of Environmental Management**, 2004, 4: 60-62. (in Chinese)
- [9] 朱磊, 胡国梁, 卢剑波, 等. 水葫芦的资源化利用[J]. 浙江农业科学, 2006, 4: 460-463.
ZHU Lei, HU Guo-liang, LU Jian-bo, et al. Resource utilization of water hyacinth [J]. **Journal of Zhejiang Agricultural Sciences**, 2006, 4: 460-463. (in Chinese)
- [10] 胡艳, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄菌液态发酵产漆酶培养条件的优化[J]. 食品科学与生物技术学报, 2011, 30(5): 773-778.
HU Yan, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization of *Shiraia bambusicola* liquid-state fermentation for laccase production [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 773-778. (in Chinese)
- [11] Galhaup C, Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2001, 56(1-2): 225-232.
- [12] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 6: 920-924.
- [13] Lorenzo M, Moldes D, Sanromán M A. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes[J]. **Chemosphere**, 2006, 63(6): 912-917.
- [14] Couto S R, Gundin M, Lorenzo M, et al. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions[J]. **Process Biochemistry**, 2002, 38(2): 249-255.
- [15] 王志新, 蔡宇杰, 李颜颜, 等. 培养基及培养条件对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 832-839.
WANG Zhi-xin, CAI Yu-jie, LI Yan-yan, et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L1[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 832-839. (in Chinese)

科技信息

美国研究: 一种常见的防腐剂 Nisin 可减缓癌细胞生长

据外媒报道, 人们普遍认为多吃防腐剂有害健康, 不过美国一项研究指出, 一种常见的食用防腐剂有助于减缓癌症细胞的生长。

美国密西根(Michigan)大学的一项研究发现, 一种常见的食物防腐剂-乳酸链球菌素(Nisin), 可能减缓或中止头颈部鳞状上皮细胞癌的蔓延。

研究主要负责人密西根大学牙医系教授卡皮拉(Yvonne Kapila)表示, 几十年前美国食品药品监督管理局(FDA)与世界卫生组织(WHO)就认为, 人类食用防腐剂安全。

口腔癌是全球癌症主要死因, 而口腔鳞状上皮细胞癌, 则占口腔癌 90% 以上。然而密西根大学这份研究显示, 口腔癌的存活率在过去几十年来并无多大改善。

专家表示, Nisin 本来就能防止细胞增长, 因此对抗癌症也可能有效, 不过还是建议, 为了维持健康, 还是尽量吃新鲜的食物。

[信息来源] 食品伙伴网. 一种常见的防腐剂 Nisin 可减缓癌细胞生长[EB/OL]. (2012-11-14). <http://www.foodmate.net/news/keji/2012/11/218079.html>.