

文章编号: 1673-1689(2011)05-0773-06

## 竹黄菌液态发酵产漆酶培养条件的优化

胡艳<sup>1,2</sup>, 蔡宇杰<sup>\* 1,2</sup>, 廖祥儒<sup>1,2</sup>, 马文寅<sup>1,2</sup>, 李枝玲<sup>3</sup>, 张大兵<sup>3</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

**摘要:** 分离筛选到一株产漆酶的竹黄菌, 采用单因子相互比较法, 研究了该菌株的最适发酵产酶条件。确定了最适的碳源为 2 g/dL 可溶性淀粉、最适的氮源为 0.8 g/dL 的酵母膏, 以及最适铜离子浓度为 2.4 mmol/L, 在自然 pH 5.0, 装液量为 50 mL, 30 °C、200 r/min 摇瓶振荡培养 64 h 下, 产漆酶酶活水平达 120 000 U/L, 比优化前提高近 17 倍。该竹黄菌株与已报道的白腐真菌相比, 具有发酵周期短且产漆酶酶活较高的优点。

**关键词:** 竹黄菌; 漆酶; 发酵

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

## Optimization of *Shiraia bambusicola* Liquid-State Fermentation for Laccase Production

HU Yan<sup>1,2</sup>, CAI Yujie<sup>\* 1,2</sup>, LIAO Xiang-ru<sup>1,2</sup>,  
MA Wen-yin<sup>1,2</sup>, LI Zhiling<sup>3</sup>, ZHANG Da-bing<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Hanbon Science and Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** A new laccase producing strain, *Shiraia bambusicola*, was isolated from the natural screening. In this study, the optimum nutrition and environmental conditions were investigated and listed as follows: 2% soluble starch, 0.8% yeast extract, and copper ion 2.4 mmol/L, pH 5.0, liquid volume 50/250 mL, 30 °C, 200 r/min. With the optimum conditions, the activity of laccase was achieved at 120 000 U/L after 64 h, was higher 17 times than that of the control. Compared with the reported white-rot, *Shiraia bambusicola* has the advantages of short fermentation period and higher laccase activity.

**Key words:** *Shiraia bambusicola*, laccase, fermentation

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶<sup>[1]</sup>, 该酶最早是在漆树的汁液中发现的,

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: 江苏省科技创新与成果转化(重大科技支撑与自主创新)专项引导资金项目(BY2010117); 科技部科技人员服务企业项目(2009GJ10038); 国家自然科学基金项目(21045007)。

\* 通信作者: 蔡宇杰(1973-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。Email: yu\_jie\_cai@yahoo.com.cn

故将其命名为漆酶;此后在多种植物、真菌<sup>[2]</sup>、少数细菌和昆虫体内均有发现<sup>[3]</sup>。

漆酶属于蓝-铜族氧化酶,其活性中心由4个铜原子组成,在氧化还原反应中起着决定作用。漆酶的I型铜原子和氨基酸残基结合成为单核中心,使酶表现为明显的蓝色。另外,它还包含II型和III型铜原子,构成三核中心。I型铜原子作为初级电子的接受者,参与分子内的电子传递,把电子从底物传递到其他铜原子上,然后电子结合于三核位点。该位点进一步把电子传递给结合活性中心的第二底物氧分子,使之还原为水,而铜的存在是形成复合体所必需的<sup>[4]</sup>。它们催化的反应是利用分子氧,产生的副产物只有水,所以又称漆酶为“生态友善酶”。

由于漆酶具有特殊的催化性能和宽泛的作用底物,在生物制浆、生物漂白、以及有毒化合物的降解等方面具有潜在应用价值,因而引起人们越来越多的研究兴趣,成为环境保护用酶研究的热点<sup>[5]</sup>。近年来,人们对漆酶的研究越来越深入,其应用的范围也越来越广泛。

尽管漆酶在自然界中广泛分布,但真正具有较高漆酶产量的菌株并不多,分泌漆酶的真菌主要分布于担子菌(*Basidiomycotina*)、多孔菌(*Polyporus*)、子囊菌(*Ascomycotina*)、脉孢菌(*Neurospora*)、柄孢壳菌(*Podospora*)和曲霉菌(*Aspergillus*)等属种,其中最主要的是担子菌亚门的白腐真菌,研究也较多<sup>[6-8]</sup>。但是大部分真菌发酵周期较长,使得工业化生产具有一定的局限性。

本研究室前期分离筛选得到的一株竹黄菌<sup>[9]</sup>,目前还未见关于竹黄菌产漆酶的相关报道。通过对其产酶培养条件的初步探究,我们发现培养基组分对其产漆酶能力具有较大的影响,在优化后的培养基组分下发酵,漆酶酶活由优化前的7 000 U/L提高到120 000 U/L,提高了近17倍,且发酵周期短(64 h),具有工业化生产的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

竹黄菌种(*Shiraiia bambusicola*):作者所在实验室保藏。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面 PDA 培养基(组分 g/L)** 马铃薯 200,葡萄糖 10,琼脂 20; pH 值自然,120 °C灭菌 20 min。

**1.2.2 种子培养基** 即为 PDA 液态培养基。

**1.2.3 发酵培养基(组分 g/L)** 马铃薯 200,葡萄糖 20; pH 值自然,120 °C灭菌 20 min。

### 1.3 方法

**1.3.1 种子制备** 将菌株接种到斜面 PDA 培养基上,30 °C恒温培养 5~7 d后,观察试管壁上有黑色孢子生成。取 10 mL 无菌水冲洗种子试管壁上的孢子,取 1 mL 孢子菌悬液接种到种子培养基 50 mL(250 mL 三角瓶),30 °C、200 r/min 摇床恒温培养 16 h。

**1.3.2 液态发酵** 取菌悬液接入液态发酵培养基 50 mL(250 mL 三角瓶),接种体积分数 10%,30 °C、200 r/min 摇床恒温培养 64 h。培养条件的优化按单因子顺次进行,每次优化结果用于后续实验。

**1.3.3 粗酶液的制备** 发酵液经 10 000 r/min、4 °C离心 15 min,取得的上清液即为粗酶液,适当稀释后用于酶活测定。

### 1.4 漆酶酶活的测定

漆酶酶活测定以 DMP 为底物,参考 Litthauer 等人的测定方法稍做调整<sup>[10]</sup>。每 3 mL 反应体系含:0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 3.5) 2.4 mL,0.01 mol/L DMP 0.5 mL,60 °C保温 10 min 后加入 0.1 mL 酶液,在 470 nm 处测吸光值。以每分钟氧化 1  $\mu$ mol DMP 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位( $\varepsilon=49.6$  L/(mmol·cm),酶活以 U/L 表示)。

### 1.5 生物量测定

发酵培养物经过滤脱水后,用蒸馏水洗涤 2 次,于干燥箱中 80 °C恒温干燥 48 h,用分析天平测定菌丝体干重。

### 1.6 pH 值测定

使用精密酸度计(SARTORIUS AG PB-10)测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 优化前产漆酶情况

将培养 7 d 的孢子接种至液态发酵培养基中,200 r/min、30 °C恒温培养,每 8 小时取样测定漆酶活力,结果见图 1。菌株在液态发酵条件下,第 1 天之后开始慢慢产酶,同时观察到发酵液的颜色逐渐变红,在第 48 小时漆酶酶活有很大的提高,第 64 小时漆酶活力达到最高,因此选择 64 h 作为后续发酵研究的培养时间。

### 2.2 碳源对产漆酶的影响

碳氮源的种类和浓度不仅是菌体生长的必要

因素,而且对产酶也有重要的影响。分别用等质量的乳糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉、柠檬酸、甘露醇和蔗糖替代基础液态发酵培养基中的葡萄糖, 30℃、200 r/min 摇床恒温培养 64 h 后,测定不同碳源对漆酶产量的影响,结果见图 2。以可溶性淀粉促进发酵产酶效果最好,柠檬酸严重抑制了漆酶的产生。因此确定可溶性淀粉为液态发酵产漆酶培养基的碳源。

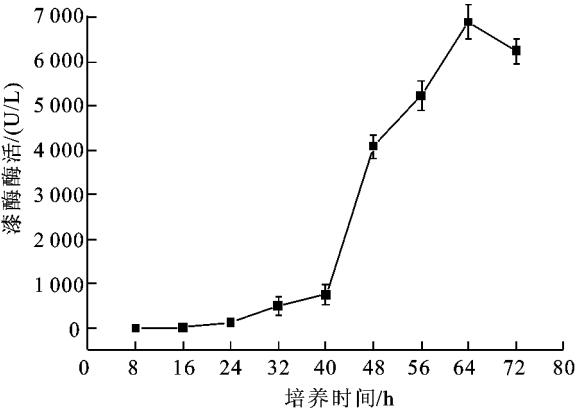


图 1 优化前产漆酶曲线

Fig. 1 Curves of the laccase production before optimization

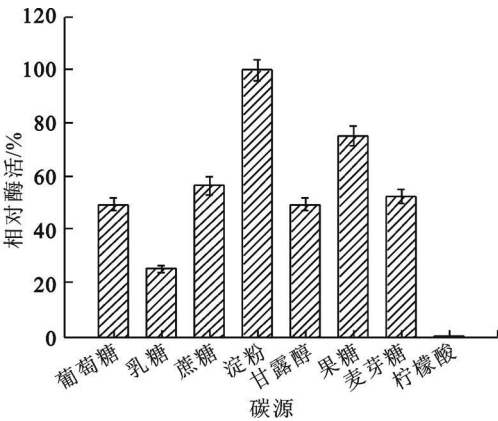


图 2 碳源对产漆酶的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on laccase production

2 3 可溶性淀粉质量浓度对产漆酶的影响

将发酵培养基中的可溶性淀粉分别调至不同的浓度, 200 r/min、30℃恒温培养 64 h 后,测定可溶性淀粉质量浓度对产漆酶的影响,结果见图 3。在可溶性淀粉质量浓度达到 20 g/L 之前,漆酶活力随着质量浓度的增加而升高,说明培养基中添加一定量的可溶性淀粉有利于菌体生长,对漆酶的产生有促进作用,但可溶性淀粉超过 20 g/L 时,可溶性淀粉溶解性能不佳,漆酶活力则开始下降。所以,确定产漆酶的最佳可溶性淀粉质量浓度为 20 g/L。

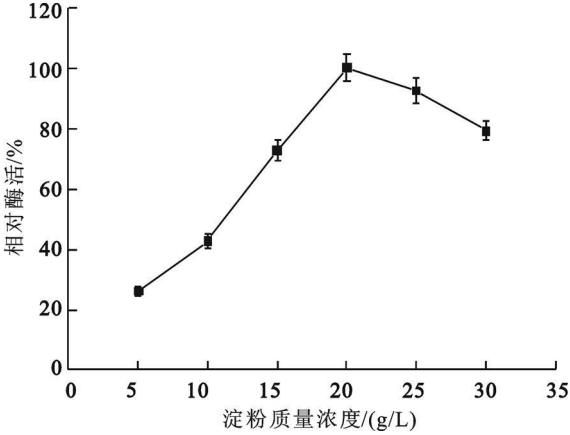


图 3 可溶性淀粉浓度对产漆酶的影响

Fig. 3 Effect of concentration of soluble starch on laccase production

2 4 氮源对产漆酶的影响

氮源主要用于构成菌体细胞物质(氨基酸、蛋白质、核酸等)和含氮代谢物。分别用等摩尔量(2 mmol)的豆粕,玉米浆,酵母膏,牛肉膏,蛋白胨,尿素,硝酸铵,硫酸铵,酒石酸铵,氯化铵, L-天冬氨酸,硝酸钠作为氮源进行初步培养,发现与有机氮源相比,无机氮源均不利于菌体产酶,尤其是尿素,硫酸铵和氯化铵明显抑制了酶的产生。然后从中选取产漆酶较高的 6 种氮源(豆粕,酵母膏,酒石酸铵,牛肉膏,硝酸铵,玉米浆)重新发酵培养,结果见图 4。可以看出:酵母膏的作用最为显著,豆粕次之。

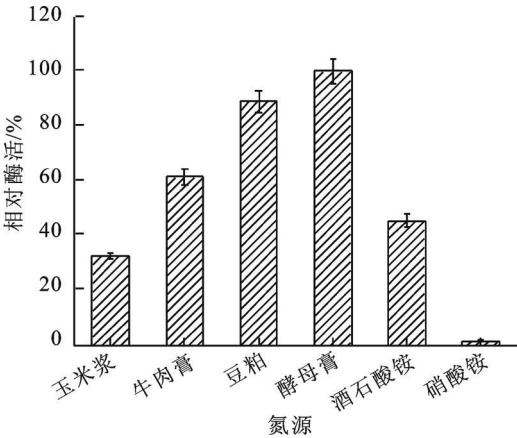


图 4 氮源对产漆酶的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen sources on laccase production

2 5 酵母膏质量浓度对产漆酶的影响

在液态发酵培养基中加入不同质量浓度的酵母膏, 200 r/min、30℃恒温培养 64 h 后,测定酵母膏质量浓度对产漆酶的影响,结果见图 5。加入酵母膏可以明显促进漆酶的产生,当质量浓度为 10 g/L 时,漆酶酶活达到最高,之后随着酵母膏质量浓度的增大,培养基溶氧下降,漆酶酶活开始降低,说

明酵母膏过量对漆酶的产生有一定的抑制作用。

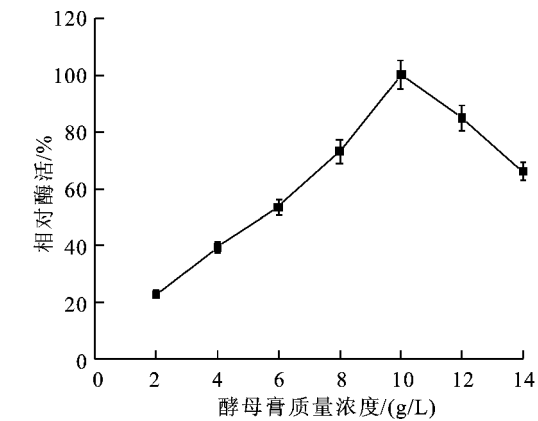


图 5 酵母膏质量浓度对产漆酶的影响  
Fig. 5 Effect of concentration of yeast extract on laccase production

2 6 不同离子对产漆酶的影响

在液态发酵培养基中添加相同浓度的金属离子, 200 r/min、30 ℃恒温培养 64 h 后, 测定不同的金属离子对产漆酶的影响, 结果见图 6。可以观察到,  $\text{Cu}^{2+}$  可显著促进漆酶的增加;  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  也能微弱地促进漆酶的产生, 但促进程度依次递减;  $\text{Mn}^{2+}$  效果不明显;  $\text{Zn}^{2+}$  具有明显的抑制作用。

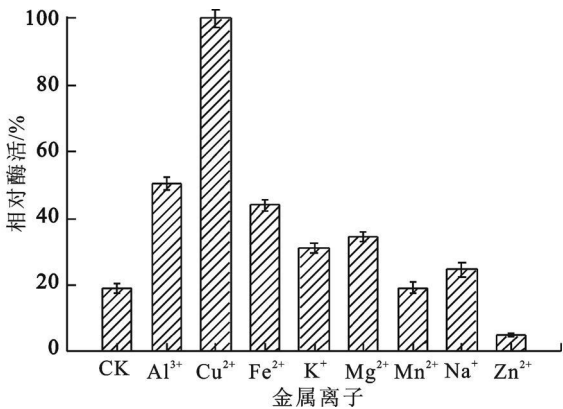


图 6 不同金属离子对产漆酶的影响  
Fig. 6 Effect of metal ions on laccase production

2 7  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对产漆酶的影响

铜是生物体所必需的微量元素之一, 同时在基因转录水平中作为辅助因子及调节物参与漆酶的生物合成, 这在糙皮侧耳 (*P. ostreatus*), 毛栓菌 (*T. pubescens*) 和密孔菌 (*P. coccineus*) 等菌株的漆酶转录上已经得到印证<sup>[11-12]</sup>。因此, 铜离子作为漆酶合成中一种不可缺少的物质, 被认为是漆酶发酵的有效诱导剂。

在本研究中, 在液态发酵培养基中添加不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ , 200 r/min、30 ℃恒温培养 64 h 后, 测定铜离子浓度对产漆酶的影响, 结果见图 7。添加不

同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对漆酶酶活有一定的影响, 不添加  $\text{Cu}^{2+}$  时漆酶酶活较低, 浓度为 2.4 mmol/L 时漆酶酶活达到最高, 之后随着铜离子浓度的升高酶活开始下降, 可以看出高浓度的铜离子对漆酶的产生有一定的抑制作用。

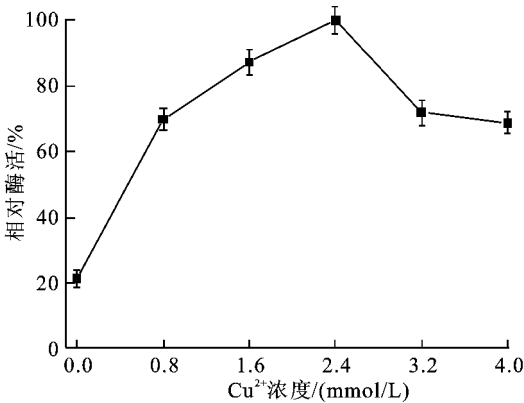


图 7  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对产漆酶的影响  
Fig. 7 Effect of concentration of copper ion on laccase production

2 8 正交试验

采用  $\text{L}_9(3^3)$  正交试验因素水平表进行正交试验。根据实验设计表 1 进行 9 组实验, 正交试验结果方差分析见表 2。

| 表 1 正交试验设计                                                       |                |                 |                                  |
|------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------------------------|
| Tab. 1 Analysis of the $\text{L}_9(3^3)$ orthogonal array design |                |                 |                                  |
| 水平                                                               | 因素             |                 |                                  |
|                                                                  | A 淀粉/<br>(g/L) | B 酵母膏/<br>(g/L) | C $\text{Cu}^{2+}$ /<br>(mmol/L) |
| 1                                                                | 15             | 8               | 2.0                              |
| 2                                                                | 20             | 10              | 2.4                              |
| 3                                                                | 25             | 12              | 2.8                              |

| 表 2 正交实验结果                                                     |        |        |        |                                      |
|----------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------------------------------------|
| Tab. 2 Result of the $\text{L}_9(3^3)$ orthogonal array design |        |        |        |                                      |
| 实验号/<br>因素                                                     | A      | B      | C      | 酶活/<br>( $\times 10^4 \text{ U/L}$ ) |
| 1                                                              | 1      | 1      | 1      | 9.09                                 |
| 2                                                              | 1      | 2      | 2      | 10.94                                |
| 3                                                              | 1      | 3      | 3      | 8.93                                 |
| 4                                                              | 2      | 1      | 2      | 12.05                                |
| 5                                                              | 2      | 2      | 3      | 11.08                                |
| 6                                                              | 2      | 3      | 1      | 10.26                                |
| 7                                                              | 3      | 1      | 3      | 10.01                                |
| 8                                                              | 3      | 2      | 1      | 9.96                                 |
| 9                                                              | 3      | 3      | 2      | 9.87                                 |
| $K_1$                                                          | 9.653  | 10.383 | 9.770  |                                      |
| $K_2$                                                          | 11.130 | 10.660 | 10.953 |                                      |
| $K_3$                                                          | 9.947  | 9.687  | 10.007 |                                      |
| R                                                              | 1.477  | 0.973  | 1.183  |                                      |

设计 3 个因素, 3 个水平, 9 组实验对发酵培养基进一步优化。A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub> 为最优水平组合, 即可溶性淀粉质量浓度为 20 g/L, 酵母膏质量浓度为 8 g/L, Cu<sup>2+</sup> 浓度为 2.4 mmol/L。极差分析比较 R<sub>A</sub> > R<sub>C</sub> > R<sub>B</sub>, 即可溶性淀粉质量浓度对产漆酶的影响最大, 其次为 Cu<sup>2+</sup> 浓度, 酵母膏质量浓度对其影响最小。

2.9 优化条件下漆酶发酵动态

优化后的发酵培养基为: 马铃薯 200 g/L, 可溶性淀粉 20 g/L, 酵母膏 8 g/L, Cu<sup>2+</sup> 2.4 mmol/L, 在自然 pH 5.0。装液量为 50 mL/250 mL, 30 ℃、200 r/min 摇瓶振荡培养 3 d。

优化后的产酶曲线见图 8。第 1 天菌体处于延滞期, 细胞处于适应环境状态, 菌体生长缓慢, 基本不产漆酶, pH 值变化不大; 第 2 天菌体的生长进入对数生长期, 第 32 天菌体的干重开始明显增加, 说明 32 ~ 40 h 是菌体的快速生长繁殖阶段, 此时 pH 值也快速增加到 6.5 左右, 随后 pH 值开始下降, 漆酶酶活开始增加, 说明菌体开始进入产酶阶段。48 h 以后细胞生长处于平稳期, 漆酶酶活呈现指数增长阶段, pH 值缓慢降低, 并呈现波动现象。第 64 小时产酶达到最大值, pH 在 5.5 左右; 之后产酶开始衰减, 由于进入发酵的后期, 菌体自溶, pH 又开始缓慢回升, 影响了漆酶的产生以及漆酶的活性。

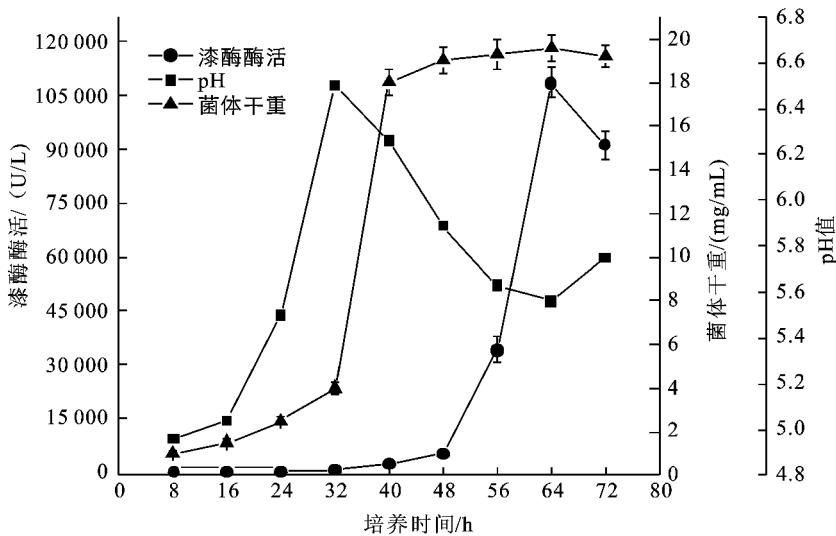


图 8 优化后的发酵产漆酶过程曲线  
Fig. 8 Curves of the laccase production after optimization

和优化前的产酶曲线相比, 两者有着相同的走势。1) 40~ 48 h 是菌体生长和发酵产酶的转折点, 之前主要是菌体的生长和繁殖, 之后主要是发酵产漆酶; 2) 都在 64 h 达到产漆酶的最大值, 发酵周期短。

由图 8 还可以看出, 菌体生长的最适 pH 值在 6.5 左右; 发酵产漆酶的最适 pH 值在 5.5 左右, 可以尝试在发酵过程中通过分阶段控制 pH 值和补料的办法来进一步提高漆酶的产量。

3 结 语

人们对于漆酶的认识已有 100 多年了, 随着研究的不断深入, 对于漆酶的活性中心及其催化机

理<sup>[13]</sup>, 漆酶基因的克隆、异源表达, 以及漆酶的产业化应用等方面都有了很好的了解, 但仍然存在着不少问题。如菌株合成漆酶水平偏低、发酵周期长、不适于工业化生产等。所以, 近年来有关漆酶生产方面的研究工作, 均围绕提高漆酶的产量而展开, 选育漆酶高产菌株和构建产漆酶的工程菌株已成为研究热点。

与所报道的诸多产漆酶菌株相比, 本竹黄菌株具有以下优点: 产酶发酵培养基配方简单经济, 发酵条件温和, 且发酵周期短(发酵 64 h 左右漆酶活力即可达到 120 000 U/L), 符合工业化生产酶制剂的要求, 为进一步研究漆酶的性质以及其在工业上的应用提供了一定的理论依据。

## 参考文献(References):

- [1] 王佳玲, 余惠生. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 233–236.  
LIU Jia-ling, YU Hui-sheng. Research progress of laccase from white rot fungus[J]. **Microbiology**, 1998, 25(4): 233–236. (in Chinese)
- [2] 钞亚鹏, 钱世钧. 真菌漆酶及其应用[J]. 生物工程进展, 2001, 21(5): 23–28.  
CHAO Ya-peng, QIAN Shi-jun. Fungal laccase and its applications[J]. **Progress in Biotechnology**, 2001, 21(5): 23–28. (in Chinese)
- [3] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria[J]. **Trends in Biotechnology**, 2000, 18(2): 41–42.
- [4] Faraco V, Giardina P, Palmieri G et al. Metal-activated laccase promoters[J]. **Progress in Biotechnology**, 2002, 21: 105–111.
- [5] 尹亮, 陈章和, 赵树进. 白地霉产漆酶条件优化及对偶氮染料的脱色[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2008, 36(12): 85–90.  
YIN Liang, CHEN Zhang-he, ZHAO Shu-jin. Optimization of laccase production from *Geotrichum candidum* and decoloration of azo dyes by laccase[J]. **Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition**, 2008, 36(12): 85–90. (in Chinese)
- [6] 梁帅, 周德明, 冯友仁. 白腐真菌漆酶的研究进展及应用前景[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1317–1319.  
LIANG Shuai, ZHOU Deng-ming, FENG You-ren. Research progress and application prospect of laccase from white rot fungus[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2008, 36(4): 1317–1319. (in Chinese)
- [7] 李兵, 王宇光. 平菇漆酶与  $\text{Cu}^{2+}$  调控关系的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, (07): 2660–2661.  
LI Bing, WANG Yu-guang. Research progress on the regulation relationship between laccase in *Pleurotus ostreatus* and  $\text{Cu}^{2+}$  [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2008, (07): 2660–2661. (in Chinese)
- [8] 赵林果, 陆叶, 谢惠芳, 等. 碳源和氮源对彩绒革盖菌液体发酵合成漆酶的影响[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 57–60.  
ZHAO Lin-guo, LU Ye, XIE Hui-fang, et al. Influences of carbon and nitrogen sources on production of coriolus versicolor laccase in submerged culture[J]. **Journal of Microbiology**, 2007, 27(5): 57–60. (in Chinese)
- [9] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄发酵菌丝与竹黄子座成分比较分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 16–20.  
LIANG Xiao-hui, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Analysis of the chemical compositions of *Shiraia* sp. SUPER-H168 fermented mycelia and the stromata of *Shiraia bambusicola*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 16–20. (in Chinese)
- [10] Litthauer D, van Vuuren M J, van Tonder A et al. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108)[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, 40(4): 563–568.
- [11] Galhaup C, Halt rich 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] Hoshida H, Fujita T, Murata K, et al. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2005, 69(6): 1090–1097.
- [13] 万云洋, 杜予民. 漆酶结构与催化机理[J]. 化学通报, 2007, (9): 662–670.  
WAN Yun-yang, DU Yu-min. Structure and catalytic mechanism of laccases[J]. **Chemistry**, 2007, (9): 662–670. (in Chinese)