

产漆酶菌株筛选及一株产酶菌株的优化与鉴定

张延威^{1,2} 邱树毅^{1*} 韩燕峰^{1*} 梁宗琦¹

(1. 贵州大学 生命科学院 贵州 贵阳 550025)

(2. 贵州师范学院 贵州省生物资源开发利用特色重点实验室 贵州 贵阳 550018)

摘要: 【目的】从 26 株真菌菌株中筛选高产漆酶菌株。【方法】采用愈创木酚法进行产漆酶菌株的筛选,通过正交实验对筛选出的高产菌株进行优化,并通过形态学和分子系统学对菌株进行鉴定。【结果】26 株真菌菌株中有 4 株可产生漆酶,其中菌株 H52.1 为产漆酶最好菌株;菌株 H52.1 产漆酶优化培养基碳源为可溶性淀粉,氮源为硝酸铵, pH 为 8,金属离子为 Ca^{2+} ;经鉴定,该菌株为大孢戴氏霉。【结论】大孢戴氏霉在产漆酶方面值得进一步研究开发。

关键词: 漆酶, 优化, 戴氏霉, 大孢戴氏霉

Screening of fungal strains with laccase and optimization and identification of the strain with high-yield laccase

ZHANG Yan-Wei^{1,2} QIU Shu-Yi^{1*} HAN Yan-Feng^{1*} LIANG Zong-Qi¹

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

(2. Key Laboratory of Guizhou Bioresource Development and Utilization, Guizhou Normal College, Guiyang, Guizhou 550018, China)

Abstract: [Objective] To obtain the fungal stain with high-yield laccase. [Methods] Strains producing laccase were screened out by the guaiacol method. Then the strain with the high-yield laccase screened was optimized by the orthogonal experiment design and identified using the morphological characters and the molecular systematics. [Results] Four strains could produce laccase in these 26 fungal strains, and the strain H52.1 was the best high-yield strain, and its optimal medium components and conditions were as follows, the optimal carbon source was soluble starch, nitrogen source was ammonium nitrate, pH value was 8 and metal ion was Ca^{2+} . The result of identification showed that the strain H52.1 was *Taifanglania major*. [Conclusion] *Taifanglania major* has been worth doing further research and exploitation in the laccase development.

Keywords: Laccase, Optimization, *Taifanglania*, *Taifanglania major*

漆酶(Laccase)是一种含铜的多酚氧化酶,与抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同源,属于蓝色多铜氧化酶家族。最早在日本紫胶漆树(*Rhus verniciflua*)漆液中发现,在自然界中存在于多

基金项目: 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(No. 黔科合人字(2013)05 号)

*通讯作者: Tel: 86-851-3627690; 信箱: syqiu@gzu.edu.cn, swallow1128@126.com

收稿日期: 2013-10-20; 接受日期: 2013-12-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-27

种植物、真菌、昆虫和细菌中。产漆酶真菌主要集中于担子菌门、子囊菌门及半知菌类等真菌,特别是白腐菌中分布更为广泛。漆酶在生物合成、有毒化合物的生物消除、食品加工、生物及免疫检测、造纸工业、新能源等诸多方面有着重要的应用价值与潜力,近年来有关漆酶的研究越来越受到重视^[1-3]。多数真菌漆酶的最适反应温度较低,也有部分真菌漆酶最适反应温度较高,但其长时耐热性往往并不理想。能够长时耐热的真菌漆酶目前并不多,Jordaan 等报道从嗜热白腐真菌菌株中得到的耐高温漆酶 60 °C 保温 9 h 仍具有完全活性^[4],Coll 等报道担子菌 PM1 (CECT2971)漆酶 60 °C 保温 1 h 酶活基本无损失^[5]。因为耐高温的漆酶应用范围相对比较广,本文对来自 3 个省区的土样和枯枝落叶中分离到的 26 株真菌菌株进行了产耐高温漆酶菌株筛选,并对筛选出的菌株进行优化与鉴定,以期真菌漆酶的研究和应用提供新的真菌资源。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:自贵州、云南和河北的枯枝落叶及土样进行真菌分离获得的 26 株真菌菌株,其中高温型菌株 12 株(最适生长温度 40 °C 左右),中温型菌株 14 株(最适生长温度 25 °C 左右)。菌株均保

存于贵州大学真菌资源研究所(GZAC)。

1.1.2 试剂与仪器:70 %的乙醇,蔗糖,磷酸盐,葡萄糖,羧甲基纤维素钠,可溶性淀粉,愈创木酚,氯化铵,硝酸钠,硝酸铵及各种实验所需的无机盐与金属离子等;引物、*Taq* 酶、dNTPs 等购自上海生物工程公司;紫外分光光度计,岛津 UV2450。

1.1.3 培养基

查氏培养基(g/L): NaNO₃ 2, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30, 琼脂 17-20, 水 1 000 mL, pH 自然。灭菌条件: 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。以下培养基灭菌条件与此相同。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯(切块) 200, 用水煮沸 30 min, 取滤液, 加葡萄糖 20, 琼脂 20, 水补足 1 000 mL, pH 自然。

产漆酶初筛所用培养基(g/L): PDA 培养基中加 0.04%浓度(质量体积比)的愈创木酚^[6]。

产漆酶复筛所用培养基(g/L): 蔗糖 2, NH₄NO₃ 1, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, CuSO₄ 0.01, V_{B1} 0.015, 水 1 000 mL, pH 自然。

正交优化培养基: 以查氏培养基为基础培养基, 加入优化方案的各成分。具体见表 1。

1.2 方法

1.2.1 产漆酶菌株的筛选:(1) 产漆酶菌株的初筛:

表 1 L₉4³ 正交试验各因素和水平
Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment (L₉4³)

实验组 Group	碳源(A) Carbon source (20 g/L)	氮源(B) Nitrogen source (2.84 g/L)	pH 值(C) pH	金属离子(D) Metal ion (0.5 mmol/L)
1	葡萄糖	氯化铵	5.0	Fe ²⁺
2	葡萄糖	硝酸铵	6.5	Ca ²⁺
3	葡萄糖	硝酸钠	8.0	Cu ²⁺
4	蔗糖	氯化铵	6.5	Cu ²⁺
5	蔗糖	硝酸铵	8.0	Fe ²⁺
6	蔗糖	硝酸钠	5.0	Ca ²⁺
7	可溶性淀粉	氯化铵	8.0	Ca ²⁺
8	可溶性淀粉	硝酸铵	5.0	Cu ²⁺
9	可溶性淀粉	硝酸钠	6.5	Fe ²⁺

将分离获得的 26 株真菌菌株活化后接种到产漆酶初筛培养基上, 高温型菌株置于 40 °C, 中温型菌株置于 25 °C, 恒温培养 3 d。观察记录菌落周围有无红褐色氧化带。

(2) 产漆酶菌株的复筛: 将初筛获得的产漆酶菌株, 接种在 PDA 培养基的平板上, 高温型菌株置于 40 °C, 中温型菌株置于 25 °C, 恒温培养, 待平板的菌株菌落长到适合大小, 用打孔器将长势相似的 1 cm² 大小的菌丝块接种到已灭菌的装有 50 mL 复筛液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 每瓶接 3 块菌丝块, 每组 3 个重复, 分别置于 40 °C 和 25 °C 摇床培养 7 d。将培养好的发酵液于 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液, 测定其酶活力^[7-8]。

(3) 漆酶活力测定及酶活力定义: 5 mL 反应混合液中, 50 mmol/L (含 1 mmol/L 愈创木酚) 琥珀酸缓冲液(pH 5.2) 4 mL, 1 mL 适当稀释的酶液, 置于 40 °C 水浴保温 30 min, 于 465 nm 处测定光吸收值, 以酶液事先灭活后的反应混合液为对照。在上述反应条件下, 酶活性单位定义为 1 min 内催化氧化 1 μmol 愈创木酚的酶量为 1 个酶活单位(U)。465 nm 处愈创木酚摩尔消光系数:

$$\epsilon_{465} = 1.21 \times 10^4 \text{ mol / (L} \cdot \text{cm)}。$$

1.2.2 菌株 H52.1 的优化培养: 将复筛获得的高产漆酶菌株 H52.1 菌株, 接种在 5 个 PDA 培养基的平板上, 于 40 °C 培养, 待平板的菌落长到适合大小后, 用打孔器将长势相似的 1 cm² 大小的菌丝块接种到已灭菌的装有 50 mL 按表 1 设计的正交

优化液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 每瓶接 3 个菌丝块, 每组 3 个重复, 40 °C 摇床培养 7 d, 观察各实验组培养性状, 并通过紫外分光光度计测定各实验组粗酶液的 OD₄₆₅ 值, 计算酶活。对各实验组的酶活结果进行分析, 得出该菌株优化培养的最佳方案。

1.2.3 菌株 H52.1 的鉴定: 在查氏培养基上 40 °C 培养 7 d, 参照梁宗琦等^[9]的分类标准和系统, 观察记载菌落特征并用显微镜观察、测定和拍照微观产孢结构进行鉴定。同时, 在查氏培养基上 40 °C 培养 14 d, 挑取新鲜菌丝, 用改进的 CTAB 法^[10]提取其总 DNA。采用通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGTGAGAGATTCTGTGC-3') 进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海鼎安生物科技有限公司进行测序, 得到的序列经校对后提交 GenBank (No. KF719172), 对其序列进行比对分析, 并用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 产漆酶菌株的初筛

通过观察 26 株真菌菌株在产漆酶培养基上的菌落周围情况, 菌株 H52.1、BFH8、FMM4 和 H57.2 有红褐色的氧化带产生(图 1), 其他菌株并没有红褐色氧化带产生。4 株菌中, H52.1、BFH8 和 H57.2 属于高温型菌, FMM4 属中温型菌。通过测定其氧化带的相对大小初步判断, 这 4 株菌的产漆酶能力大致为 H52.1>H57.2>BFH8>FMM4。

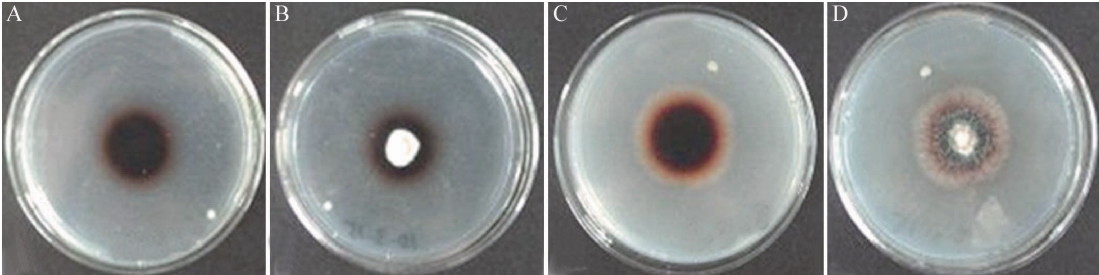


图 1 部分真菌菌株产漆酶情况初筛

Figure 1 Preliminary screening of part of fungal strains

注: A, B: H52.1 菌株菌落的背正面; C, D: H57.2 菌株菌落的背正面。

Note: A, B: Reverse side and surface of H52.1 strain; C, D: Reverse side and surface of H57.2 strain.

2.2 产漆酶菌株的复筛

H52.1、BFH8、FMM4 和 H57.2 这 4 株产漆酶菌株在产漆酶复筛培养基中培养 7 d 后,测定各菌株粗酶液 OD_{465} 值并计算其酶活。各菌株酶活见表 2。方差分析表明,菌株 H52.1 和 H57.2 与菌株 FMM4 和 BFH8 差异显著($P<0.05$),虽然菌株 H52.1 与菌株 H57.2 差异不显著,但其 $P=0.051$,结合比较两者的酶活值,选定菌株 H52.1 为本次所筛选的产漆酶活力最高的菌株。

表 2 复筛菌株酶活 Table 2 Enzyme activity of further screening strains		
菌株 Strain	酶活 Enzyme activity (U/L)	
FMM4	110.74 ± 23.74	
BFH8	134.99 ± 15.52	
H57.2	249.04 ± 15.81	
H52.1	316.53 ± 25.98	
P	0.434	0.051

2.3 高产漆酶菌株 H52.1 的正交优化

对产漆酶菌株 H52.1 的各实验组正交实验结果进行极差分析(表 3),结果表明影响产漆酶菌株 H52.1 产酶活性的 4 因素中,主要因素是碳源,其次为氮源,然后是金属离子,最后是 pH,其影响的次序为 $A>B>D>C$,产漆酶最佳培养基组合为 $A_3B_2C_3D_2$ 。同时,对该实验结果进行方差分析(表 4),结果表明,4 个因素对菌株产漆酶的影响都显著,影响程度大小为 $A>B>D>C$; 4 个因素分别在水平上进行成对比较,各因素的 3 个水平之间都差异显著($P<0.05$),各因素水平上最大均值组合为最佳组合,即 $A_3B_2C_3D_2$ 。方差分析结果与极差分析结果一致。由上,此实验中菌株 H52.1 产漆酶优化培养基的最适碳源为可溶性淀粉,最适氮源为硝酸铵,最适 pH 为 8,最适金属离子为 Ca^{2+} 。由于此培养方案未包含在以上正交实验中,因此将菌株接种在该组合培养基中进行酶活验证,测得的酶活为 792.81 ± 8.06 U/L,与上面分析结果相符。

表 3 菌株 H52.1 正交实验极差分析 Table 3 Extreme difference analysis of H52.1 orthogonal experiment					
实验组 Group	A	B	C	D	酶活 Enzyme activity (U/L)
1	1	1	1	1	155.92±3.18
2	1	2	2	2	333.61±4.11
3	1	3	3	3	3.86±0.99
4	2	1	2	3	109.92±3.82
5	2	2	3	1	421.49±9.65
6	2	3	1	2	136.91±5.69
7	3	1	3	2	674.66±16.60
8	3	2	1	3	598.35±9.86
9	3	3	2	1	497.24±6.35
K_1	493.39	940.50	891.18	1 074.65	
K_2	668.32	1 353.45	940.77	1 145.18	
K_3	1 770.25	638.01	1 100.01	712.13	
k_1	164.46	313.50	297.06	358.22	
k_2	222.77	451.15	313.59	381.73	
k_3	590.08	212.67	366.67	237.38	
R	425.62	238.48	69.61	144.35	

表 4 菌株 H52.1 正交实验方差分析
Table 4 Variance analysis of H52.1 orthogonal experiment

方差来源 Source	离均差平方和 Type III sum of squares	自由度 df	均方差 Mean square	F	P
A	958 399.884	2	479 199.942	2 473.143	0.000
B	257 951.226	2	128 975.613	665.641	0.000
C	23 807.446	2	11 903.723	61.435	0.000
D	107 977.791	2	53 988.896	278.636	0.000
Error	3 487.707	18	193.762		

Note: $R^2=0.997$ (Adjust $R^2=0.996$).

为了对该菌株进行进一步的研究分析,需要得到该菌株的正确分类地位,故对该菌株采用形态和分子相结合的手段进行了鉴定。

2.4 菌株H52.1的描述与鉴定

查氏培养基上, 40 °C, 7 d, 菌落直径为35–40 mm左右, 圆形, 平展, 绒毛状, 中间为浅黄褐色, 边缘为白色, 背面灰白色, 中部颜色较深。菌丝分隔, 透明, 光滑, 宽1.2–2.5 μm。瓶梗单生, 不规则的着生在气生菌丝或原瓶梗上, 或简单的分生孢子梗上, 大多数为(5.0–20.0) μm×(2.0–5.5) μm, 基部柱状、近球形、拟椭圆形膨大或锥形; 顶端突然变细或逐渐变细, 长2.5–12.0 μm。分生孢子光滑, 梭形或长椭圆形, (5.5–9.0) μm×(2.5–4.5) μm, 聚集成链状, 孢子之间有明显的孢间连丝。形态描述表明该菌株为戴氏霉属中成员^[9,11]。该菌株分离自云南腾冲土样。

对该菌株进行DNA提取、PCR扩增和测序, 从GenBank中进行BLAST下载相似度大于80%的种以及一些形态相似的种共17个菌株, 以*Cookeina venezuelae*为外群, 用ClustalX 1.83软件进行多序列比对, 用MEGA 5.0软件邻接法(NJ)构建系统发育树(图2)。从树图看出菌株H52.1与戴氏霉属成员以99%的支持率聚在一起, 并与大孢戴氏霉*Taifanglania major*以86%的支持率聚在一起。戴氏霉属共报道了10个种, 其中孢子呈梭形的有膨大戴氏霉*T. inflata*、合川戴氏霉*T. hechuanensis*和大孢戴氏霉, 但膨大戴氏霉孢子(3–4) μm×(2–3) μm和合

川戴氏霉孢子(4.3–7.3) μm×(2.1–3.5) μm较小。该菌株与大孢戴氏霉的形态特征相似。因此, 菌株H52.1鉴定为大孢戴氏霉 *Taifanglania major* (Z. Q. Liang, H. L. Chu & Y. F. Han) Z. Q. Liang, Y. F. Han & H. L. Chu。

3 讨论

戴氏霉属是由Liang Z. Q.等^[9]于2009年建立的新属, 由原拟青霉属中的单瓶梗拟青霉种组成。目前对戴氏霉属中进行过研究的种有4个种, 分别是膨大戴氏霉(原名膨大拟青霉*Paecilomyces inflatus*)、叉戴氏霉*T. furcata*(原名叉拟青霉*P. furcatus*)、合川戴氏霉(原名合川拟青霉*P. hechuanensis*)和大孢戴氏霉(原名大孢拟青霉*P. major*), 其中对膨大戴氏霉的研究最早也比较多, 但最新报道^[12]该种已被移入单胞瓶霉属(*Phialemonium*), 命名为*Phialemonium inflatum*, 故此处不再将其列入戴氏霉进行讨论。对叉戴氏霉、合川戴氏霉和大孢戴氏霉的研究简介如下: 叉戴氏霉中菌株H104-1, 研究了培养条件对菌株产漆酶的影响和最佳产酶培养条件, 以及菌株漆酶对4-氯苯酚(4-CP)的降解效果^[7,13]。合川戴氏霉中菌株H08-1, 该菌株具纤维素酶酶活, 采用愈创木酚法定性检测漆酶时发现氧化带颜色变化, 推测其能产漆酶^[7,14]。大孢戴氏霉具纤维素酶CMC酶活^[15], 另外, 刘志钰对一株产漆酶菌株*Paecilomyces* sp. WSH-L07进行了高产漆酶研究^[16], 根据其对菌株形态和菌落特征的描述以及相应的照片, 并对其提供的该菌株的

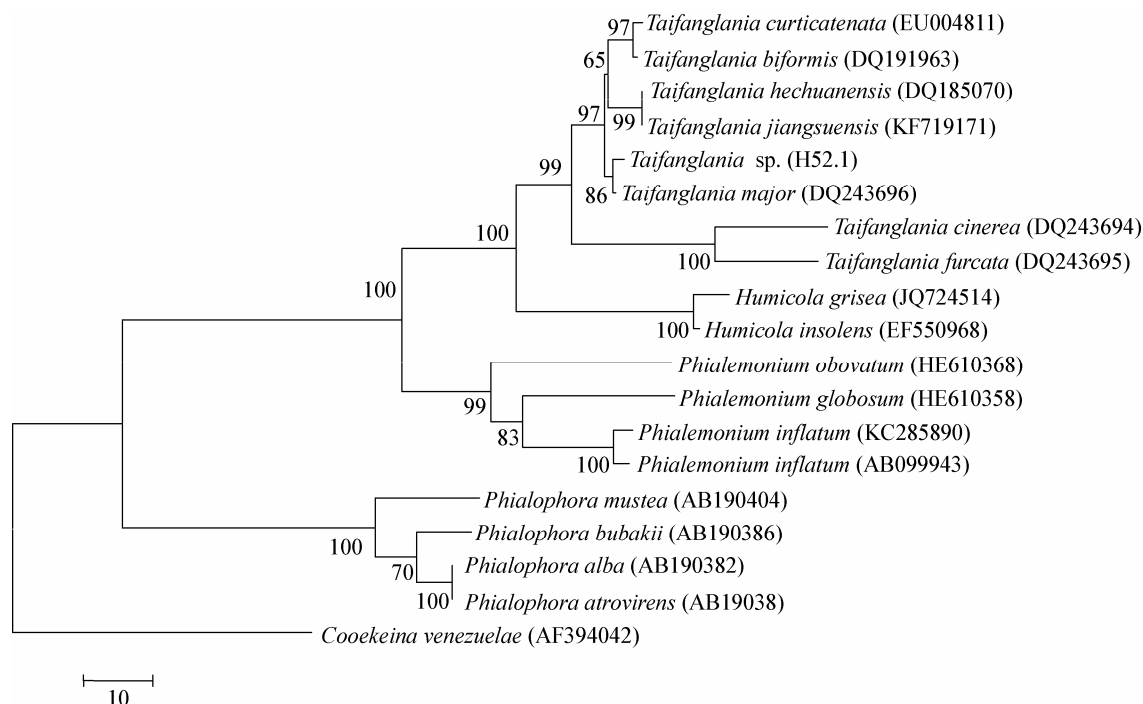


图2 H52.1菌株和相似属的一些种基于rDNA ITS-5.8S-ITS2序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on analysis of rDNA ITS-5.8S-ITS2 sequences of H52.1 and some related species

ITS-5.8S rDNA 的序列进行比对分析,笔者认为该菌株 *Paecilomyces* sp. WSH-L07 为大孢戴氏霉。由上,已研究的3种戴氏霉都能产漆酶,两种能产纤维素酶。

又戴氏霉菌株 H104-1 添加诱导物后漆酶酶活提高了2倍多,优化后酶活可提高6倍;大孢戴氏霉菌株(*Paecilomyces* sp. WSH-L07)添加诱导物后漆酶酶活提高了2倍,菌株诱变后酶活比原菌株提高了3倍多,诱变菌株优化后酶活比原菌株提高近7倍,同时诱变菌株对温度和pH的耐受性提高,热稳定性也有所改善^[16-17]。本实验中的大孢戴氏霉菌株 H52.1 经初步优化后酶活提高了2.5倍,如参照以上两种戴氏霉的优化,进一步扩大碳氮源等条件的优化范围,或采用添加合适诱导物、菌株诱变等手段,相信其酶活可进一步提高。同时,根据 Baldrian 等的研究^[18],混菌培养能显著提高漆酶酶活,故通过混菌培养方面的研究来提高实验菌株的酶活也不失为一条可行的值得考虑的途径。另外,实验中菌株 H57.2 (已鉴定为大孢戴氏霉,分离自

河北唐山土样)由复筛结果来看,作为产漆酶菌株同样值得研究。

目前对于戴氏霉的应用研究在产漆酶和纤维素酶方面,其它方面的研究未见报道。综合上面几种已研究的戴氏霉,对于此属这类耐高温的单瓶梗真菌类群,产漆酶是否是该属真菌的特性?有待对戴氏霉属中其它种进行这方面的研究后作出结论。至少该属中的大孢戴氏霉在产漆酶方面值得进一步研究开发。

参考文献

- [1] 司静,李伟,崔宝凯,等. 真菌漆酶性质,分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通报,2011,2: 48-55.
- [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.
- [3] 初华丽,梁宗琦. 漆酶的潜在应用价值[J]. 山地农业生物学报,2004,23(6): 529-533.
- [4] Jordaan J, Leukes WD. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(23): 212-219.
- [5] Coll PM, Tabernero C, Santamaria R, et al.

- Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic *basidiomycete* PM1 (CECT 2971)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4129-4135.
- [6] 王宜磊, 朱陶, 邓振旭. 愈创木酚法快速筛选漆酶产生菌[J]. *生物技术*, 2007, 17(2): 40-42.
- [7] 初华丽. 高温拟青霉资源及其产漆酶菌株研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2005.
- [8] 李琼芳, 刘明学, 徐志鹏, 等. 纤维素分解菌的分离及产酶条件研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 18: 18-20.
- [9] Liang ZQ, Han YF, Chu HL, et al. Studies on the genus *Paecilomyces* in China V. *Taifanglania* gen. nov. for some monophialidic species[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 34: 69-77.
- [10] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. *湛江海洋大学学报*, 2003, 23(6): 72-73.
- [11] 韩燕峰, 梁建东, 董旋, 等. 戴氏霉属的利用研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(3): 76-78.
- [12] Haybrig P, Dania G, Josepa G, et al. *Phialemoniopsis*, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*[J]. *Mycologia*, 2013, 105(2): 398-421.
- [13] 赵丹. 拟青霉 H-104-1 (*Paecilomyces* sp. H-104-1)产漆酶及其对4-氯苯酚的降解研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2006.
- [14] 韩燕峰, 王宝林, 陈万浩, 等. 合川戴氏霉菌株产纤维素酶活力的条件优化[J]. *贵州农业科学*, 2012, 40(7): 109-111.
- [15] 张延威, 陈万浩, 王玉荣, 等. 嗜热戴氏霉真菌产纤维素酶的筛选[J]. *中国酿造*, 2013, 32(3): 45-47.
- [16] 刘志钰. 拟青霉漆酶发酵调控, 分离纯化及性质的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2010.
- [17] Liu Z, Zhang D, Yun D, et al. Enhanced laccase production by ion-implanted mutant of *Paecilomyces* sp. S152[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 108: S128.
- [18] Baldrian P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 50(3): 245-253.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。