

白腐真菌 AH28-2 菌株发酵合成漆酶初步研究*

张敏 肖亚中** 蒲春雷 赵萍 王军 吴涓 王怡平

(安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

摘要: 从 224 个野外采集的真菌样品中筛选分离到一株产漆酶活性较高菌株 AH28-2, 经初步鉴定为白腐真菌。采用单因子相互比较法, 研究了该菌株最适发酵产酶条件。应用添加有 1g/L Kraft 木素的液体发酵培养基, 接种量 5% (V/V), 初始 pH8.5, 装液量为 50%, 28℃、150r/min 摇瓶振荡培养 4~5d, 漆酶酶活水平达 20184IU/L。

关键词: 白腐真菌 AH28-2, 漆酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0037-05

* 安徽省自然科学基金资助项目 (No. 98212411)

安徽省高校自然基金重点资助项目 (No. 2000J1013)

** 通讯联系人

收稿日期: 2001-04-03, 修回日期: 2001-08-20

PRELIMINARY STUDIES ON LACCASE PRODUCTION BY A WHITE-ROT FUNGUS AH28-2

ZHANG Min XIAO Ya-Zhong PU Chun-Lei ZHAO Ping WANG Jun WU Juan WANG Yi-Ping

(School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039)

Abstract: A novel white-rot fungus AH28-2, which was isolated from 224 fungi samples, ability to produce effectively laccase by induction. Several factors influencing laccase production were investigated. The optimum conditions were as follows: the 300mL Erlenmeyer flask containing 150mL of liquid medium was inoculated with 7. 5mL of mycelial fragments and the medium was supplied with lignin at a concentration of 0. 1% (initial pH8.5). The cultures was incubated at 28℃ on rotary shaker (150r/min) for 4~5 days. The maximum enzyme activity was 20184IU/L.

Key words: White-rot fungus AH28-2, Laccase

漆酶 (p-diphenol oxidase, EC1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 最早发现于漆树分泌物中, 后来证明广泛存在于真菌中, 近年来也发现存在于细菌菌株中, 但自然界中主要生产者还是白腐真菌^[1]。漆酶可催化氧化酚类化合物, 同时伴随有分子氧被还原为水。漆酶从底物分子提取一个电子, 使之形成自由基, 该自由基不稳定, 可进一步发生聚合或解聚反应。真菌漆酶与真菌的多种生物学过程相关。如孢子生成、菌索形成、色素产生等^[2-4]。由于其对芳香化合物具有聚合或解聚的催化特性, 特别是能够转化或降解木素及其类似物, 使得真菌漆酶在生物制浆、生物漂白、废水处理、芳香化合物脱毒, 甚至选择性生物整治和区域性生物转化等方面具有重要环保应用价值和开发潜力。近年来, 国内外学者对多种真菌漆酶及其产生菌株进行了广泛的研究, 内容涉及菌株生长特征、漆酶的合成调控、酶蛋白质的分离纯化和催化特性等多方面^[5-7], 有关漆酶及漆酶生产菌的研究正在成为国际上酶工程和环境微生物学交叉领域的研究热点。目前, 已有多个漆酶蛋白被分离纯化, 部分漆酶编码基因被克隆测序, 并在酵母等真核细胞实现异源表达^[8], 但相当多的研究仍集中在进一步选育开发新的漆酶产生菌种、探讨适宜培养方式和产酶条件等, 以提高漆酶产量。本文就液体培养方式下自选白腐真菌 AH28-2 菌株产漆酶的发酵条件进行了初步探索。

1 材料与方 法

1.1 菌种

白腐真菌 AH28-2 菌株, 本室筛选并初步鉴定产漆酶菌株, 4℃保藏于 CPDA 斜面。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (CPDA): 葡萄糖 20g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, KH_2PO_4 3g, VBI 2mg, 琼脂粉 15g, 20% 土豆汁 1000mL。

1.2.2 液体发酵培养基: 葡萄糖 20g, 天冬酰胺 2.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2mg, $NaHPO_4 \cdot H_2O$ 100mg, KH_2PO_4 1.0g, $CaCl_2$ 10mg, VBI 50mg, Kraft Lignin (碱溶木素) 1g, H_2O 1000mL。

1.3 方 法

1.3.1 种瓶制备: 取保藏的真菌斜面进行活化培养, 挑取适量菌丝块于 150mL 三角瓶中 (内装 50mL 液体培养基), 于 28℃, 150r/min 振荡培养 4d。

1.3.2 发酵培养: 将种瓶培养物匀浆后按一定的接种量接入发酵瓶, 按需要进行培养。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 粗酶液制备: 发酵液经8层纱布过滤, 于28℃, 12000r/min离心30min, 取上清液, 适当稀释后用于酶活测定。

1.3.4 漆酶活力测定: 以2, 2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(以下简称ABTS)为底物, 反应总体积为3mL。取2.85mL 0.5mol/L的酒石酸盐缓冲液(pH4.0), 加入100 μ L 15mmol/L的ABTS和50 μ L适当稀释的酶样液, 混合, 于30℃水浴中准确反应3min, 迅速测定 OD_{420} 值。定义每分钟氧化1 μ mol ABTS所需的酶量为一个酶活单位^[6]。每样品做3个重复(下同), 其平均偏差小于10%。

1.3.5 总糖测定: 采用蒽酮-硫酸法^[9], 以葡萄糖为标准溶液, 用7230G分光光度计测反应液 A_{620} 值, 计算样品中总糖含量。

1.3.6 生物量测定: 发酵培养物经过滤脱水后, 用蒸馏水洗涤两次, 于干燥箱中80℃恒温干燥48h, 用分析天平测定菌丝体干重。

1.3.7 pH测定: 精密酸度计法。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选

野外采集的224个样品经富集培养、分离纯化, 筛选到若干株产漆酶菌株, 通过摇瓶发酵复筛, 得到一漆酶高产菌株, 经初步鉴定为白腐真菌, 命名为AH28-2菌株, 以下是对菌株产酶条件的优化研究。

2.2 培养方式和发酵产酶时间的选择

在相同条件下, 比较了静止培养和摇瓶振荡培养两种方式对漆酶活性的影响。结果表明, 静止培养酶活峰值高, 但发酵周期长, 约15d; 振荡培养酶活峰值稍低, 但生产时间短, 约4~5d。因此选择生产周期较短的摇瓶振荡培养方式进行其它产酶影响条件研究。

表1 不同诱导剂对白腐真菌AH28-2菌株漆酶合成的影响(IU/L)

发酵时间 (d)	对照	愈创木酚 1 (mmol/L)	Kraft Lignin (1%)	没食子酸 1 (mmol/L)	吐温 80 1 (mmol/L)	二苯胺 1 (mmol/L)
3	0	224	1313	362	41	0
4	249	1070	2585	937	277	123
5	147	1060	1969	373	345	137
6	119	1138	1392	513	284	0
7	92	927	1371	444	239	0

2.3 漆酶合成诱导剂的确定

向液体发酵培养基中分别添加1mmol/L的愈创木酚、没食子酸、吐温80、二苯胺和1%的Kraft Lignin, 进行漆酶合成试验。由表1可以看出, 试验菌株产漆酶为诱导酶, 在液体发酵培养基中加入1%Kraft Lignin可获得较好诱导效果; 愈创木酚和没食子酸对漆酶生成有一定促进作用, 吐温80对漆酶合成影响不明显, 而二苯胺试剂则不利于漆酶产生。

2.4 摇瓶装液量

装液量是发酵液溶氧的一个间接指标。在初始pH5.3(自然pH), 28℃, 150r/min振荡培养条件下, 不同装液量的产酶情况如图1。由图可知, 120mL/250mL的摇瓶装液

量最佳,其发酵酶活达 2681 IU/L,而装液量为 30mL/250mL 时,酶活水平仅 1685 IU/L,说明该菌株漆酶合成需一定量的氧,但过高溶氧对产酶不利。因此,在后续研究中均采用 120mL/250mL 三角瓶装液量或不同的三角烧瓶体积 50% 的装液比。

2.5 摇床转速

转速是发酵液通氧的另一选择指标,在其它条件相同时,摇床转速不同,试验菌株发酵产酶情况也有明显差异(图 2)。当摇床转速在 150r/min 以下时,酶活水平随转速升高而增高;150r/min 时酶活水平最高,达 3754 IU/L;转速超过 150r/min 时,酶活水平不升反而略有下降。这也说明试验菌株漆酶合成需要一定量氧,但过量氧对产酶不利。因此,应用该菌株进行漆酶生产时选择 150r/min 为宜。

2.6 接种量

考察了种瓶到发酵瓶不同的接种量(V/V)对菌体生长和漆酶合成的影响(图 4)。测试表明不同接种量对菌体生物量的影响不大,特别是大于 5% 的接种量对菌体生物量影响不明显。而漆酶活性在 5% 接种量时较高,达 3624 IU/L,因此 5% 是最适接种量。

2.7 培养温度

在 20℃~40℃ 范围内选取不同培养温度,考察对产酶的影响。结果(图 4)表明,28℃ 为最适产酶温度,其酶活水平达 4400 IU/L。培养温度过高或过低,都不利于漆酶的合成。

2.8 初始 pH

初始 pH 直接影响菌株生长和代谢活动,一般要求初始 pH 应使菌株生长快速,且有利于目标物质的代谢合成。由图 5 可以看出, pH8.5 时产酶最多(8763 IU/L),为最适发酵产酶初始 pH。当 pH 值低于 7 或高于 10,发酵液漆酶活性都很低。这是因为该菌株漆酶合成既需要一定的菌体生物量,更需要一定浓度的诱导物。可溶性诱导物的浓度对漆酶合成有直接影响。试验所用诱导物 Kraft Lignin 是碱溶物质,培养液 pH 值越高,其有效浓度越大,对漆酶合成的诱导作用亦越强。但培养液 pH 过高,菌体生长较差,甚至不长,因而酶活很低或没有酶活。当初始 pH 较低时,菌体生长较好,但 Kraft Lignin 有效浓度较低,诱导作用微弱,所以,酶活水平也很低。因此,不同初始 pH 对

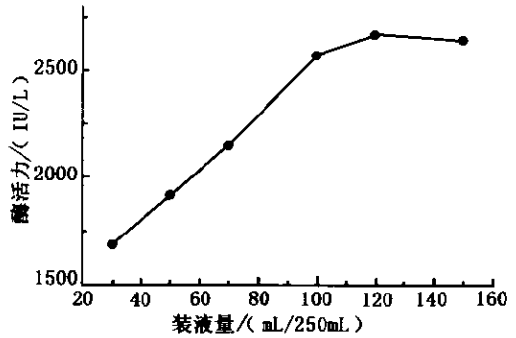


图 1 摇瓶装液量对实验菌株漆酶合成的影响

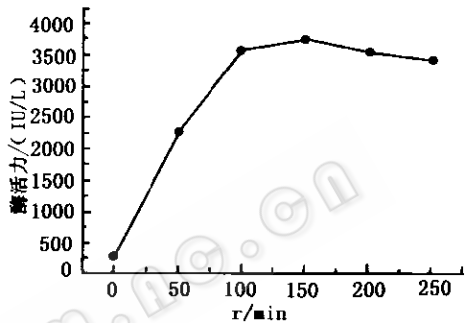


图 2 摇床转速对实验菌株漆酶水平的影响

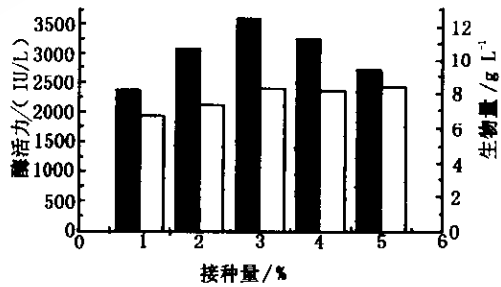


图 3 接种量对实验菌株生长及合成漆酶的影响

1 1%, 2 2.5%, 3 5%, 4 7.5%, 5 10%

■ 漆酶, □ 生物量

菌株产酶存在有两方面影响,一是影响菌体初期生长;二是通过改变诱导剂在培养基中有效浓度来影响漆酶生成。本实验条件下初始 pH 宜选择 8.5。

2.9 优化条件下 AH28-2 菌株的发酵动态

以初始 pH 8.5, 接种量 5%, 于 150r/min 28℃ 下摇瓶放大培养白腐真菌 AH28-2 菌株, 考察发酵过程中几个参数的变化。由图 6 可以看出, 当培养至第 5d 时, 发酵液中的碳源迅速被消耗, 葡萄糖含量下降到原来的 1/3, 而漆酶酶活和生物量均达到最高, 分别为 20184 IU/L 和 8.0g/L, 此时 pH 值则降至最低点 (pH 4.8)。随着时间延长, 漆酶活力逐渐下降, 生物量也有所降低, 至第 10d, 葡萄糖基本耗尽, pH 值则开始升高, 这是因为菌体细胞开始自溶, 胞质外流, 氨基类物质分解所造成。因此, 发酵生产周期应控制在 5d 左右。

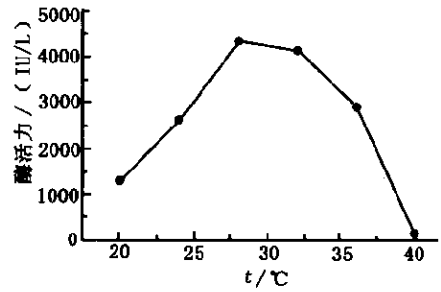


图 4 培养温度对实验菌株漆酶合成的影响

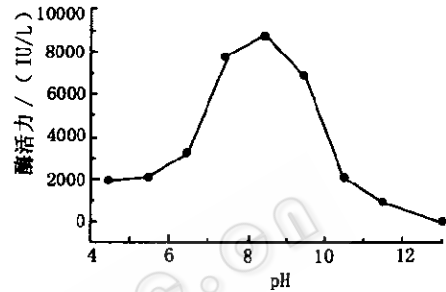


图 5 发酵液初始 pH 对实验菌株漆酶合成的影响

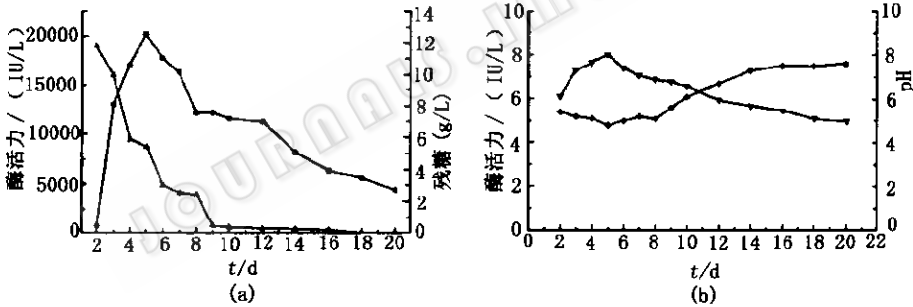


图 6 优化条件下白腐真菌 AH28-2 菌株生长及其漆酶合成动态曲线

(a) ● 漆酶, ▲ 残糖 (b) ▼ 生物量, ◆ pH

2.10 小结

漆酶及其生产菌株在环境保护和工农业生产中具有重要应用价值。白腐真菌是最主要的漆酶生产者, 开展白腐真菌发酵产酶条件优化研究可为进一步开发应用漆酶提供物质技术基础。白腐真菌 AH28-2 菌株在优化条件下摇瓶振荡培养 5d, 漆酶酶活水平达 20184 IU/L, 比初始发酵产酶提高了近 20 倍, 显示了良好的漆酶合成能力, 值得进行深入研究。

参考文献

- [1] Hurston C F. *Microbiology*. 1994, **140**: 19~26.
- [2] Reid I D, Paice M C. *FEMS. Microbiol. Rev.* 1994, **3**: 369~376.
- [3] Coll P M, Fernandez-Abalos J M, Villanueva J R, *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, **59**: 2607~2613.
- [4] Sandhu D K, Arora D S. *Experientia*. 1985, **41**: 355~366.
- [5] 秦小琼, 傅庭治, 曹幼琴, 等. *微生物学报*, 1996, **36** (5): 360~366.

- [6] Herpoel I, Moukha S, Lesage-Messen L, *et al*. FEMS Microbiol Lett. 2000, **183**: 301 ~ 306.
- [7] Paimier G, Giardiana P, Bianco C, *et al*. J Biol Chem, 1997, **272** (50): 31301 ~ 31307.
- [8] Hatamoto O, Hekine S, Nakano E, *et al*. Biosci Biotech Biochem. 1999, **63** (1): 58 ~ 64.
- [9] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术 (第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 12 ~ 13.