

层孔菌产漆酶的摇瓶最适培养条件研究*

康从宝 赵建 李清心 曲音波** 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 筛选到一株高产漆酶的层孔菌 W-1, 对其液体产漆酶的培养条件进行了优化, 确定了最适的碳源、氮源, 并用正交试验确定了培养基中碳源和氮源的浓度。在最优化的培养条件下, 培养 7d 后, W-1 产生的漆酶活力可以达到 7.1 U/mL。采用补料的方法, 可以得到大量的漆酶粗酶液。

关键词: 白腐菌, 漆酶, 正交试验

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0042-04

STUDY ON LIQUID CONDITIONS IN SHAKING FLASKS FOR LACCASE PRODUCTION BY A WHITE ROT FUNGUS

KANG Cong-Bao ZHAO Jian LI Qing-Xin QU Yin-Bo GAO Pei-Ji

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong Univ., Jinan 250100)

Abstract: A white-rot fungi *Rigidoporus* sp. W-1 which could produce laccase was isolated. The fermentation conditions in shaking flasks were investigated. The optimal carbon source was wheat bran and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was the optimal nitrogen source. The components of the medium were optimized by orthogonal experiment. When W-1 was cultured under the optimum conditions, the activity of laccase could get to 7.1 U/mL in 7 days. A great amount of crude laccase could be obtained by adding fresh medium to the 7 days old mycelium.

Keywords: White rot fungus, Laccase, Orthogonal experiment

漆酶 (EC1.10.3.2) 是一类含铜的氧化酶, 能够催化许多芳香化合物的氧化, 具有非底物特异性^[1]。漆酶可以应用于生物制浆、生物漂白、漂白废水处理、印染废水的脱色及土壤中酚类物质的去除等许多方面, 在清除环境污染物的过程中起着很大的作用^[2]。近年来, 人们对漆酶的研究越来越深入, 其应用的泛围也越来越广泛^[3]。

我们筛选到了一株可以产生漆酶的白腐菌, 在研究中发现, 培养基对 W-1 产酶的影响很大。本文对 W-1 产漆酶的条件做了优化, 确定了其最佳的产漆酶的培养基和培养条件。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20077015)

华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室开放基金资助项目

** 联系作者

收稿日期: 2001-03-01, 修回日期: 2001-05-04

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：实验室分离到的层孔菌 W-1 (*Rigidoporus* sp. W-1)。

1.1.2 培养基：斜面培养基：马铃薯 20g，葡萄糖 10g，琼脂 20g，定容至 1L，pH6.0~7.0；产酶培养基：葡萄糖 10g， NaH_2PO_4 3.5 g， K_2HPO_4 5.0g， NH_4Cl 2.0 g， MgSO_4 0.2 g， NaCl 0.1 g，定容至 1L，pH 6.0~7.0。

1.2 方法

1.2.1 漆酶酶活的测定^[4]：在 3.0mL 反应体中含 2.92mL 0.2mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH3.6)，加入 50 μL 的酶液，30 μL 10mmol/L 的 DMP (2, 6 -二甲氧基酚)，于 470nm 处测光吸收的变化，以每分钟使 OD_{470} 处吸光度增加 1.0 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.2 粗酶液的制备：将发酵液于 6000r/min 下离心 8min，取上清液即可。

1.2.3 菌丝干重的测量：取一定量的菌丝悬液，6000r/min 离心 8min，弃上清，用蒸馏水洗涤两次后，置于干燥箱中，烘干后测量。当以麸皮为碳源时进行测菌丝干重时，在配制培养基时，先将培养基煮沸 40min，过滤除去麸皮，灭菌后，接种培养，然后再按上述方法进行测量菌体的干重。

2 结果与讨论

2.1 W-1 的产酶曲线

将种子液接入产酶培养基中，接种量为 5%，置于 28℃160r/min 的摇床上培养，每天取样测酶活。结果表明，该菌在稳定期时大量产酶，培养到第 7d 时，酶活达到峰值。由此确定最适培养时间为 7d (图 1)。

2.2 培养基初始 pH 对产酶的影响

将发酵培养基灭菌后，用灭菌的 HCl 和 NaOH 溶液调节培养基的初始 pH 值，置于 28℃160r/min 的摇床上培养 7d 后，取样测酶活。结果发现，当培养基的最适初始 pH 为 6.0~7.0 时，利于酶的产生，最适产酶的 pH 为 7.0。当培养基的初始 pH 小于 5.0 或大于 8.0 时，酶活力急剧下降，这可能是由于 pH 的变化使 W-1 生长受到了影响，从而也影响了酶的生产。

2.3 摇瓶内培养基装液量对产酶的影响

在 300mL 三角瓶中分别装液 40、60、80、100、120mL 发酵培养基，置于 28℃160r/min 的摇床上培养，每天取样测酶活，结果发现，在各种装液量的情况下，都是在培养 7d 后，酶活力达到最大值。但是，装液量少时，酶活力相对较高，这可能是因为菌体生长及酶的产生需大量的氧，考虑长时间培养时水分蒸发的影响，我们在以后培养时，装液量采用 80ml/300mL 三角瓶。

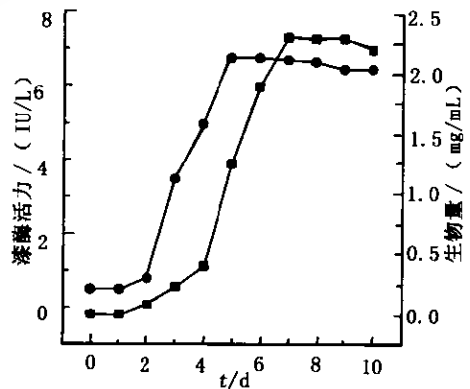


图 1 W-1 的产酶曲线

■ 漆酶酶活 (IU/L), ● 生物量 (mg/mL)

2.4 培养温度对产酶的影响

产酶培养基装液量为 80mL, 灭菌后, 调节 pH 到 7.0, 分别置于温度为 25℃、28℃、32℃、35℃、40℃ 160r/min 的摇床上培养, 结果发现当培养温度为 28℃时, 发酵液的酶活力较高。

2.5 培养基中碳源对产酶的影响

在发酵培养基中, 分别采用不同的碳源, 浓度为 1g/L, 初始 pH 为 7.0, 28℃培养 7d后测酶活。结果发现, 麸皮可以作为 W-1 产酶的最佳碳源, 这可能是因为麸皮不仅可以作为 W-1 的碳源物质, 而且还能为 W-1 的生长提供其它生长因子 (表 1)。

2.6 培养基中氮源对产酶的影响

以 1g/L 的麸皮为碳源, 分别用 2g/L 的牛肉膏、蛋白胨、NH₄NO₃、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、尿素作为培养基的氮源, 置于 28℃160r/min 摇床上培养, 取样测酶活, 结果发现, 当使用 (NH₄)₂SO₄ 作为氮源时, 发酵液中酶活最高, 可以达到 3.1U/mL, 而其它氮源对产酶的影响相差不大 (表 2)。

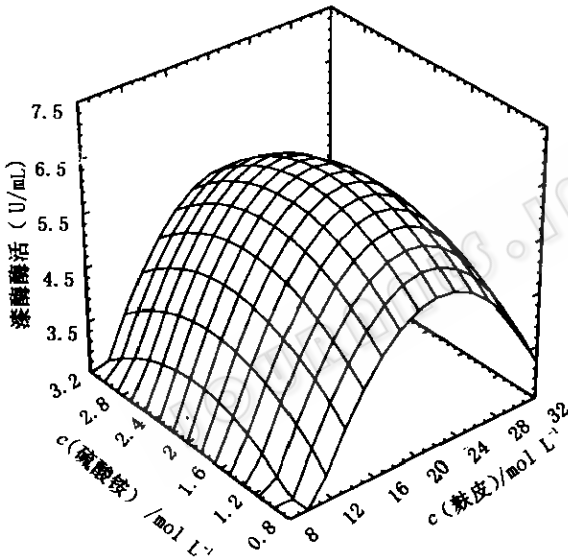


图2 麸皮和硫酸铵浓度对产酶的影响

表 1 各种碳源对产酶和生物量的影响

碳源	酶活力 (U/mL)	生物量 (mg/mL)
葡萄糖	2.3	5.6
蔗糖	2.2	5.5
麦芽糖	2.0	5.1
淀粉	2.0	5.0
麸皮	3.1	5.8

表 2 不同氮源对产酶的影响

氮源	酶活力 (U/mL)	生物量 (mg/mL)
牛肉膏	2.2	5.6
蛋白胨	2.5	5.5
NH ₄ NO ₃	2.0	5.0
NH ₄ Cl	2.0	6.8
尿素	2.15	6.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.1	6.0

2.7 表面活性剂对产酶的影响

在实验中加入 1g/L 表面活性剂吐温 80、PEG, 结果表明 PEG 可以提高酶活力, 这可能因为表面活性剂增大了细胞膜的通透性, 从而使溶液中酶量增加的缘故。

2.8 W-1 产酶培养基的优化

我们用正交试验的方法对 W-1 的产酶培养基进行了优化, 得到最适产漆酶培养基为: 麸皮 15g, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, NaH₂PO₄ 1.5g, K₂HPO₄ 3.0g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1g, PEG 0.8g, CaCl₂ 0.01g, 定容至 1L, pH 7.0。采用此培养基, 培养 7d 后, W-1 漆酶活力可以达到 7.1U/mL, 比未优化前提高了 2 倍。正交试验中表明, 碳源和氮源的浓度对酶活力的影响非常显著, 产酶培养基中麸皮浓度和 (NH₄)₂SO₄ 浓度对酶活力的影响见图 2。从图中可以看出, 当麸皮和 (NH₄)₂SO₄ 的浓度分别为 15 和 2g/L 时, 产酶最高。应

指出的是：由于各培养条件对酶合成影响的线性相关区是有限的，而各条件彼此间的影响更是正交试验所难以反映的。因此，正交试验的结果在生物试验中都有局限性。

2.9 用补料的方法获得大量的漆酶

由于 W-1 需要培养 7d 后，即在 W-1 生长的稳定期后期，漆酶活力才能达到最高值，因此，为了获得大量的漆酶粗酶液，我们采用补料的方法^[5]，即在培养 7d 后，将摇瓶中的发酵液倒出（注意保留菌丝体，由于 W-1 经培养后，大部分呈球状，而部分分散的菌丝体被固定在麸皮上，因此非常容易保留。），然后接入新鲜的产酶培养基（即将产酶培养基经煮沸半小时，过滤除去麸皮，灭菌）。在这样的培养条件下漆酶活力提前达到最大值（图 3），这可能是由于采用补料的方法可缩短 W-1 生长的延迟期的缘故。用这样的方法，经过多次循环，可以得到大量的漆酶粗酶液。因此，可缩短生产周期，为漆酶的产业化奠定了基础。

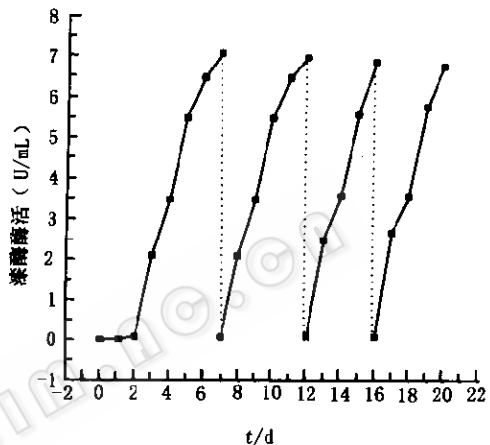


图3 补料时 W-1 的产酶曲线

参考文献

- [1] Pezet R. FEMS Microbiology letters, 1998, 167: 203 ~ 208.
- [2] 王太宇, 乔主义. 菌物系统, 1999, 18 (3): 321 ~ 325.
- [3] Feng X Y, Juozas J, Duke K, et al. Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66 (5): 2052 ~ 2056.
- [4] Toy K D, Nirav J P, Shrikrishna W D, et al. FEMS Microbiology letters, 1997, 149: 65 ~ 70.
- [5] Ziegenhagen D, Hofrichter M. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 57: 553 ~ 557.