

栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化

司静 崔宝凯 戴玉成*

(北京林业大学微生物研究所 北京 100083)

摘要: 利用显色反应对栓孔菌属(*Trametes*)进行了漆酶高产菌株的筛选, 并对目标菌株的产酶条件进行了优化, 在添加愈创木酚的固体培养基中, 通过显色反应初步筛选出漆酶高产菌株东方栓孔菌 *Trametes orientalis* Cui 6300; 进一步通过单因子分析、正交试验和 ABTS 法确定了菌株 Cui 6300 的最适产酶条件: 麦芽糖 15 g/L, 蛋白胨 3 g/L, pH 4.8, Cu^{2+} 2.0 mmol/L, 培养温度 28 °C, 接种饼直径 1.5 cm, 此时酶活最高可达 19.923 U/mL; 同时探索了 Cu^{2+} 浓度及添加时间对其菌丝生物量和漆酶活力的影响。研究表明, Cu^{2+} 最适添加浓度为 2.0 mmol/L, 添加时间为接种后第 3 天。
关键词: 漆酶, 菌株 Cui 6300, 初步筛选, 条件优化, Cu^{2+}

Primary screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production

SI Jing CUI Bao-Kai DAI Yu-Cheng*

(Institute of Microbiology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production by the diameters of colored rings by adding guaiacol to the solid medium and assaying the diameters of colored rings, we got the target strain *Trametes orientalis* Cui 6300. Meanwhile, the optimal conditions of strain Cui 6300 for laccase production were obtained by means of single factor analysis, orthogonal test and ABTS method: maltose 15 g/L, peptone 3 g/L, pH 4.8, Cu^{2+} 2.0 mmol/L, culture temperature 28 °C, inoculum 1.5 cm in diameter, then the highest activity was 19.923 U/mL. Besides, the influences of Cu^{2+} concentration and adding time on biomass and laccase activity were tested, and the optimal concentration and adding time were 2.0 mmol/L and on day 3 of culturing, respectively.

Keywords: Laccase, Strain Cui 6300, Initial screening, Optimization, Cu^{2+}

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30900006)

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-10-62336309; ✉ yuchengd@yahoo.com
收稿日期: 2010-09-13; 接受日期: 2010-11-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶(Polyphenol oxidase EC. 1. 10. 3. 2), 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^[1]。1883年, 日本学者吉田^[2]首次在日本紫胶漆树(*Rhus verniciflua*)漆液中发现一种可催化漆固化过程的蛋白质, 即为漆酶。漆酶在自然界中广泛分布于植物、真菌、少数昆虫和细菌中, 一些动物肾脏(如猪肾)和血清中也发现了漆酶。其中, 白腐真菌产生的漆酶被认为效果最好, 因此大量关于漆酶的研究工作取材于真菌。分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota)及半知菌类(Imperfect fungi)等真菌, 其中最主要的是担子菌门的白腐真菌^[3]。近年来, 漆酶广泛应用于纸浆造纸^[4-5]、生物合成^[6-7]、食品^[8-10]、能源^[11-13]、木材加工^[14-15]、环保^[16-19]、改善纤维特性^[20-21]、生物检测^[22-24]等多个领域, 鉴于其重要的应用价值, 漆酶正日益受到重视。

栓孔菌属, 隶属于菌物界, 担子菌门, 伞菌纲, 多孔菌目, 多孔菌科, 是重要的白腐真菌, 同时也是真菌漆酶的研究热点。栓孔菌多是重要的生物资源, 在我国广泛分布^[25-27], 已经发现 18 种^[28], 其

中 6 种为药用真菌^[29]。过去对我国栓孔菌的产漆酶能力缺乏系统研究, 本文对我国主要栓孔菌产漆酶能力进行了初步筛选, 得到目标菌株东方栓孔菌 *T. orientalis* Cui 6300, 并对其产漆酶条件进行了优化, 同时探索了 Cu^{2+} 浓度和添加时间对菌丝生物量和酶活的影响, 这些都为其菌种选育和漆酶基因工程菌的构建奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 菌种: 供试菌株见表 1, 均由北京林业大学微生物研究所保藏。
- 1.1.2 试剂: ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)] (Sigma); 其它试剂均为国产分析纯。
- 1.1.3 培养基: 固体培养基(g/L): 麦芽浸粉 20.0, 葡萄糖 10.0, KH_2PO_4 3.0, 琼脂粉 18.0, pH 自然, 1.0×10^5 Pa 灭菌 30 min。基础产漆酶培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 3.0, KH_2PO_4 3.0, $\text{ZnSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, pH 自然, 1.0×10^5 Pa 灭菌 30 min。

表 1 供试菌株 Table 1 Strains for this study			
种类 Species	菌株 Strains	采集地点 Localities	寄主 Hosts
<i>Trametes elegans</i> 雅致栓孔菌	Cui 7783	Jiangxi: Mt. Dagang	Fallen trunk of <i>Cyclobalanopsis</i> sp.
	Dai 10748	Hainan: Danzhou	Angiosperm stump
<i>Trametes gibbosa</i> 迷宫栓孔菌	Cui 7748	Jiangxi: Mt. Dagang	Fallen trunk of <i>Alnus</i> sp.
	Cui 8658	Sichuan: Mianyang	Fallen trunk of <i>Camptotheca</i> sp.
<i>Trametes modesta</i> 谦逊栓孔菌	Cui 6452	Hainan: Res. Bawangling	Fallen trunk of <i>Sapium discolor</i>
	Cui 8364	Yunnan: Mengla	Fallen angiosperm trunk
<i>Trametes ochracea</i> 赭栓孔菌	Dai 5900	Hubei: Shennongjia	Fallen trunk of <i>Fagaceae</i>
	Cui 6888	Hebei: Mt. Wuling	Fallen trunk of <i>Populus</i> sp.
<i>Trametes orientalis</i> 东方栓孔菌	Cui 6300	Hainan: Danzhou	Stump of <i>Acacia</i> sp.
	Dai 10735	Hainan: Haikou	Fallen angiosperm trunk
<i>Trametes pubescens</i> 绒毛栓孔菌	Cui 6015	Jiangxi: Lushan	Fallen trunk of <i>Abies</i> sp.
	Cui 7571	Guangdong: Res. Chebaling	Fallen angiosperm trunk
<i>Trametes suaveolens</i> 香栓孔菌	Cui 6092	Jiangxi: Jiujiang	Fallen angiosperm trunk
	Cui 7202	Beijing: Miyun	Stump of <i>Populus</i> sp.
<i>Trametes velutina</i> 毡毛栓孔菌	Cui 5620	Liaoning: Mt. Tianhua	Fallen trunk of <i>Betula</i> sp.
	Dai 10149	Jilin: Mt. Changbai	Fallen trunk of <i>Betula</i> sp.

1.2 方法

1.2.1 活化及培养: 于固体平板培养基上活化, 28 °C 恒温培养箱培养 5–6 d 备用。

1.2.2 愈创木酚平板显色法: 将所选取的 16 株菌株接种到滴加有终浓度 0.04%愈创木酚的固体平板培养基上, 28 °C 恒温静置培养, 若菌落边缘出现红褐色, 表明有漆酶产生, 依据显色程度和测量显色圈直径初步判断其产酶能力, 每个菌株 3 个平行。

1.2.3 产漆酶条件优化: 依次以培养基碳源、氮源、pH 值、金属离子以及培养条件温度、接种量 6 个因素做单因子试验, ABTS 方法测定酶活; 然后对培养基组分进行正交试验, 得到最适组合; 最后, 对 Cu²⁺浓度和添加时间对菌丝生物量和漆酶活力的影响进行了相关试验。

1.2.4 粗酶液获取: 取 250 mL 三角瓶分装 100 mL 基础产漆酶培养基, 接种直径 1 cm 菌饼, 28 °C 恒温静置培养, 每隔 2 d 测定酶活。取 1 mL 培养基于离心管中, 4 °C 低温 12 000 r/min 离心 15 min, 所得上清液即为粗酶液。

1.2.5 漆酶活力测定: 3 mL 反应体系中含 1.95 mL 柠

檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 5.0), 50 μL 稀释后的酶液和 1 mL 1 mol/L ABTS, 25 °C 反应 3 min 后, 于 420 nm 处测定吸光度, 以未加 ABTS 同体积的反应混合液为对照。以 1 min 内催化氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位(IU)。已知 420 nm 处 ABTS 摩尔消光系数 $\epsilon_{420}=3.6\times10^4$ L/(mol·cm)。

2 结果与分析

2.1 愈创木酚平板显色法检测产漆酶能力

16 株菌株在滴加有愈创木酚的固体平板培养基上培养, 测其显色圈直径见表 2。

表 2 表明, 各菌株在其他条件一致的情况下, 于添加有愈创木酚的固体平板培养基上培养 10 d 左右, 菌落边缘会出现红色到红褐色反应, 程度不一, 到 8–9 d 后显色反应停止, 颜色逐渐褪去。通过显色程度及显色圈直径测量结果表明, 菌株 Cui 6300 菌落颜色变化明显, 显色圈直径较大, 效果最显著, 且比较稳定, 因此, 以下均以东方栓孔菌 Cui 6300 作为目标菌株进行产酶条件的优化。

表 2 滴加愈创木酚后的显色圈直径变化 Table 2 The diameter changes of colored rings after adding guaiacol												
种类 Species	菌株 Strains	培养时间/显色圈直径 Incubation period (d)/Diameter of colored ring (mm)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>T. elegans</i>	Cui 7783	0	8	18	30	33	37	42	46	50	55	52
	Dai 10748	0	11	20	27	31	35	40	45	49	56	51
<i>T. gibbosa</i>	Cui 7748	0	13	26	33	38	43	50	55	52	49	44
	Cui 8658	0	9	24	30	35	41	46	52	48	45	41
<i>T. modesta</i>	Cui 6452	0	14	24	33	38	46	48	53	57	54	47
	Cui 8364	0	11	25	34	37	43	46	54	56	50	44
<i>T. ochracea</i>	Dai 5900	0	5	10	15	22	26	30	37	40	33	27
	Cui 6888	0	7	13	18	24	29	33	35	37	31	26
<i>T. orientalis</i>	Cui 6300	0	13	26	35	40	46	49	54	58	53	45
	Dai 10735	0	11	21	32	39	44	47	52	55	52	46
<i>T. pubescens</i>	Cui 6015	0	6	18	28	36	41	46	51	47	44	40
	Cui 7571	0	11	21	26	33	37	41	46	48	43	36
<i>T. suaveolens</i>	Cui 6092	0	3	7	10	12	15	19	21	23	18	15
	Cui 7202	0	5	8	11	15	18	21	24	25	22	19
<i>T. velutina</i>	Cui 5620	0	5	9	16	19	22	25	28	32	29	25
	Dai 10149	0	9	17	22	28	35	38	42	45	44	38

为检测愈创木酚平板显色处理对 16 株菌株产漆酶是否有不同的影响,验证其合理性,选取酶活达到最大值所测定的结果进行方差分析,结果如表 3 所示。

表 3 愈创木酚平板显色圈直径方差分析 Table 3 The anova of colored rings' diameter in plate after adding guaiacol					
变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	6 318.312	15	421.221		
Within groups	720.667	32	22.521	18.704	0.000
Total	7 038.979	47			

方差分析结果表明,愈创木酚平板显色法筛选对 16 株菌株的影响差异显著,16 株菌株的选取较合理,达到了预期筛选漆酶高产菌株的目的。

2.2 培养基单因子试验

2.2.1 碳源:蛋白胨为氮源,分别以麦芽糖、淀粉、葡萄糖、蔗糖、木糖、果糖作为供试碳源培养菌株 Cui 6300,测定的漆酶活力曲线(单位 U/mL)见图 1。

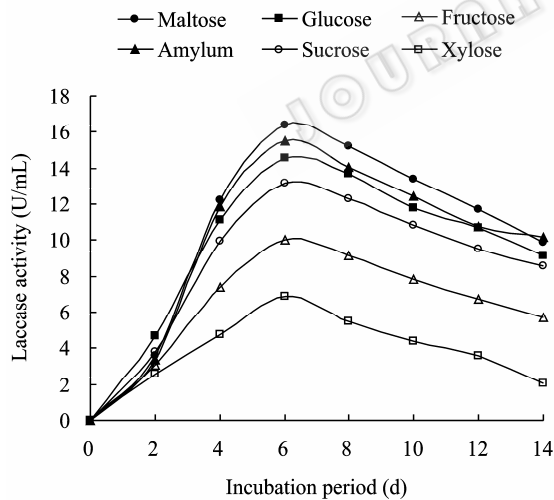


图 1 14 d 内不同碳源条件下的漆酶活力变化曲线
Fig. 1 The variation curve of laccase activities with different carbon sources during 14 days

如图 1 所示,在含有不同碳源的培养基上,菌株 Cui 6300 的产漆酶量存在较大差异。麦芽糖作为碳源时菌株 Cui 6300 产漆酶活力优于其他 5 种碳源,

淀粉和葡萄糖次之,所以将菌株 Cui 6300 产漆酶的最适碳源确定为麦芽糖。

为检测 6 种碳源处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有不同的影响,验证碳源选取的合理性,选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析,其结果见表 4。

表 4 碳源方差分析 Table 4 The anova of carbon sources					
变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	199.843	5	39.969		
Within groups	3.326	12	0.277	144.211	0.000
Total	203.169	17			

方差分析结果表明,6 种碳源的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著,选取较合理。

2.2.2 氮源:麦芽糖为碳源,分别以蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、尿素、硫酸铵、硝酸钾作为供试氮源培养菌株 Cui 6300,测定的漆酶活力(单位 U/mL)见图 2。

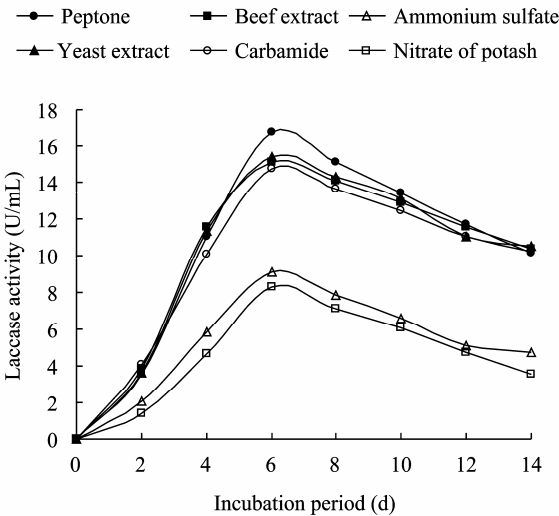


图 2 14 d 内不同氮源条件下的漆酶活力变化曲线
Fig. 2 The variation curve of laccase activities with different nitrogen sources during 14 days

如图 2 所示,以蛋白胨作为氮源的效果最明显,酵母膏、牛肉膏次之;相对于无机氮源,有机氮源更适于菌株 Cui 6300 的生长和产酶活力的提高。推测

这些有机氮源是由于富含各种氨基酸, 可以直接被菌株吸收利用, 所以菌株 Cui 6300 菌丝生长快, 产漆酶活性也高。

为检测 6 种氮源处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有明显的影响, 验证氮源选取的合理性, 选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 其结果见表 5。

表 5 氮源方差分析					
Table 5 The anova of nitrogen sources					
变差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
Variation	Sum of squares	df	Mean square	F value	Sig.
Between groups	192.308	5	38.462		
Within groups	3.759	12	0.313	122.774	0.000
Total	196.067	17			

方差分析结果表明, 6 种氮源的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

2.2.3 金属离子: 麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 以终浓度为 1.5 mmol/L 的 NaCl、KCl、CaCl₂、MnSO₄、FeCl₃、CuSO₄ 作为诱导剂探索其对菌株 Cui 6300 产漆酶能力的影响, 并以未添加金属离子的同体积培养基作为对照, 测定的漆酶活力(单位 U/mL)见图 3。

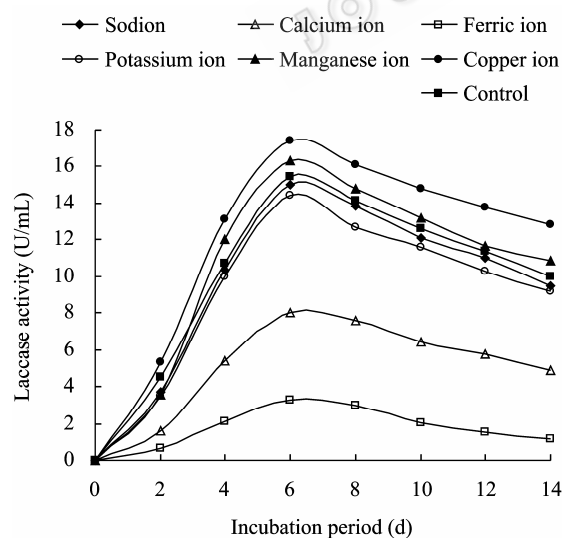


图 3 14 d 内不同金属离子条件下的漆酶活力变化曲线

Fig. 3 The variation curve of laccase activities with different metal ions during 14 days

如图 3 所示, 金属离子对菌株 Cui 6300 产漆酶影响很大, 6 种金属离子中, Cu²⁺对菌株 Cui 6300 产漆酶有明显的诱导作用, Mn²⁺也有诱导作用, 而 K⁺、Na⁺对其产漆酶无明显影响, Ca²⁺、Fe³⁺则有明显的抑制作用, 尤其是 Fe³⁺。

为检测 6 种金属离子处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有不同的影响, 验证金属离子选取的合理性, 选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 见表 6。

表 6 金属离子方差分析					
Table 6 The anova of metal ions					
变差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
Variation	Sum of squares	df	Mean square	F value	Sig.
Between groups	486.640	6	81.107		
Within groups	4.636	14	0.331	244.932	0.000
Total	491.276	20			

方差分析结果表明, 6 种金属离子的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

2.2.4 培养基初始 pH 值: 以麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 分别探索 3.6、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0、6.6、7.0 作为初始 pH 值对菌株 Cui 6300 产漆酶能力的影响, 测定的漆酶活力(单位 U/mL)见图 4。

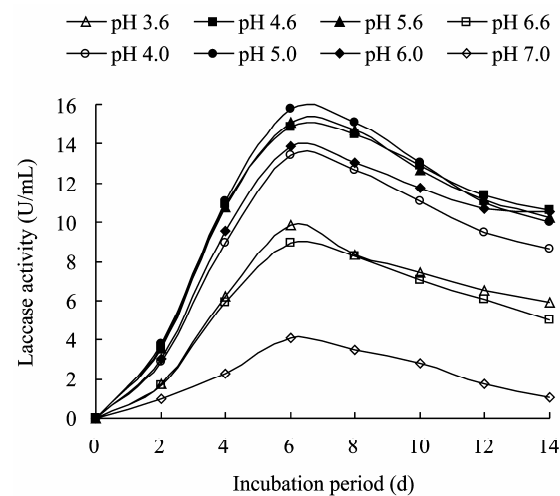


图 4 14 d 内不同 pH 值条件下的漆酶活力变化曲线

Fig. 4 The variation curve of laccase activities with different pH values during 14 days

如图 4 所示, pH 值对菌株 Cui 6300 产漆酶具有明显的影响, 一般认为培养基中的氢离子和氢氧根离子对微生物的影响是间接的, 首先作用于胞外可解离的弱酸或弱碱, 形成易透过细胞膜的游离态进入胞内, 再作用于参与代谢的各种酶类, 从而影响菌体的生长和酶的合成。在 pH 4.0–6.0 之间, 菌株 Cui 6300 产漆酶较多, 其中尤以 pH 5.0 时产漆酶最多, 而在 pH 3.0 及 6.6–7.0 时, 产漆酶量较低, 也不利于生长。说明过高或过低 pH 值对菌株 Cui 6300 的生长和产漆酶都不利, 最适产漆酶初始 pH 值为 5.0。

为检测 8 个 pH 值处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有不同的影响, 验证 pH 值选取的合理性, 选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 其结果见表 7。

表 7 pH 值方差分析 Table 7 The anova of pH values					
变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	343.705	7	49.101		
Within groups	4.207	16	0.263	186.752	0.000
Total	347.912	23			

方差分析结果表明, 8 个 pH 值的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

综上可知, 培养菌株 Cui 6300 产漆酶, 选择麦芽糖、蛋白胨作为最适碳、氮源, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 作为诱导剂, 5.0 作为初始 pH 值是较为合理的选择, 为下一步的正交试验奠定基础。

2.3 培养条件单因子试验

2.3.1 温度: 以麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 于 20 °C、24 °C、28 °C、32 °C、36 °C 5 个温度下培养菌株 Cui 6300, 测定的漆酶活力(单位 U/mL)见图 5。

温度是重要的影响生物生长和生存的环境因素之一, 当温度升高时, 微生物细胞内的化学和酶促反应都以较快的速度进行, 生长也会变得越来越快, 但是超过一定的温度, 蛋白质、核酸及细胞组分会受到不可逆的损害, 细胞机能会急剧下降到零。图 5 所示, 菌株 Cui 6300 产漆酶的最适温度为 28 °C。当

温度低于 24 °C 或高于 32 °C 时, 菌株 Cui 6300 产漆酶活性受到抑制, 同时菌丝生长也受到影响。分析原因可能是因为温度过高或过低均不利于胞外酶的稳定性, 使酶活降低甚至失活。

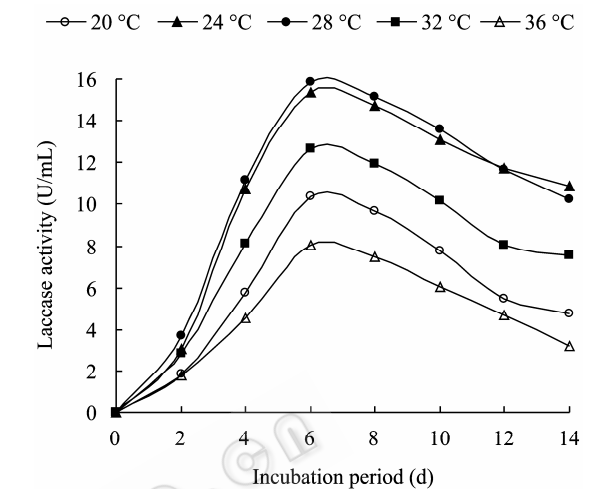


图 5 14 d 内不同温度条件下的漆酶活力变化曲线
Fig. 5 The variation curve of laccase activities with different temperature during 14 days

为检测 5 个温度处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有不同的影响, 验证温度选取的合理性, 选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 其结果见表 8。

表 8 温度方差分析 Table 8 The anova of temperature					
变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	130.947	4	32.737		
Within groups	2.246	10	0.225	145.727	0.000
Total	133.193	14			

方差分析结果表明, 5 个温度的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

2.3.2 接种直径: 麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 将直径为 0.5 cm、1.0 cm、1.5 cm、2.0 cm、2.5 cm、3.0 cm 的菌株 Cui 6300 菌饼分别接种到产漆酶培养基中, 测定的漆酶活力(单位 U/mL)见图 6。

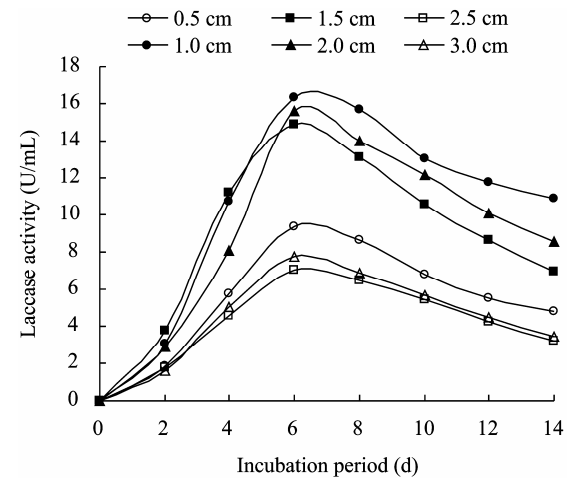


图 6 14 d 内不同接种量条件下的漆酶活力变化曲线
Fig. 6 The variation curve of laccase activities with different inoculums during 14 days

如图 6 所示, 接种饼直径 1.0–2.0 cm 时酶活力较高, 过低的接种量易引起杂菌生长, 不利于酶的产生, 随着接种量的加大, 虽然菌体的生长旺盛, 但对于酶活的提高却没有促进, 因此, 选择 1.5 cm 直径左右的菌饼为最佳接种量。

为检测 6 种接种直径处理对菌株 Cui 6300 产漆酶是否具有不同的影响, 验证接种直径选取的合理

性, 选取酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 见表 9。

方差分析结果表明, 6 种接种直径的处理方法对菌株 Cui 6300 产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

通过单因子试验对培养条件进行优化, 确定了最适培养温度及接种直径。结果表明菌株 Cui 6300 产漆酶的最适培养条件为温度 28 °C, 接种直径 1.5 cm。

表 9 接种量方差分析 Table 9 The anova of inoculums					
变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	266.569	5	53.314		
Within groups	8.644	12	0.720	74.011	0.000
Total	275.214	17			

2.4 培养基正交试验

根据以上培养基单因子试验结果, 以最适碳、氮源的量、pH 值、Cu²⁺浓度作为因子, 进行四因子三水平正交试验, 结果见表 10 所示。

表 10 四因子三水平正交试验 Table 10 Orthogonal test of L ₉ (3 ⁴)					
试验号 Test number	因子 Factor				酶活力 Laccase activity (U/mL)
	麦芽糖 Maltose (g/L) (A)	蛋白胨 Peptone (g/L) (B)	pH 值 pH value (C)	铜离子 Cu ²⁺ (mmol/L) (D)	
1	5.0	1.0	4.8	1.0	7.556
2	5.0	3.0	5.0	1.5	3.715
3	5.0	5.0	5.2	2.0	5.931
4	10.0	1.0	5.0	2.0	10.388
5	10.0	3.0	5.2	1.0	10.499
6	10.0	5.0	4.8	1.5	4.958
7	15.0	1.0	5.2	1.5	12.980
8	15.0	3.0	4.8	2.0	19.923
9	15.0	5.0	5.0	1.0	17.556
K ₁	17.202	30.924	32.437	35.611	—
K ₂	25.845	34.137	31.659	21.653	—
K ₃	50.459	28.445	29.410	36.242	—
X ₁	5.734 000	10.308 000	10.812 330	11.870 330	—
X ₂	8.615 000	11.379 000	10.553 000	7.217 667	—
X ₃	16.819 670	9.481 667	9.803 333	12.080 670	—
R	11.085 670	1.897 333	0.259 333	4.963 000	—

从表 10 中的极差 R 可以看出, 影响菌株 Cui 6300 产漆酶能力的因素强弱依次为: 碳源> Cu^{2+} >氮源>pH 值。并且得到, 28 °C 下菌株 Cui 6300 产漆酶的最适培养基组合为 A3B2C1D3, 即麦芽糖 15.0 g/L, 蛋白胨 3.0 g/L, pH 4.8, Cu^{2+} 2.0 mmol/L, 此时, 漆酶酶活可达到 19.923 U/mL, 效果显著。

对上述所得到的数据进行方差分析, 结果见表 11。

由表 11 可知, 各数据差异显著, 达到了确定最适碳、氮源的量、pH 值及 Cu^{2+} 浓度的目的, 结果较为准确。

2.5 Cu^{2+} 浓度和添加时间对菌丝生物量和漆酶活力的影响

以麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 培养基初始 pH 4.8, 分别于接种前、接种后第 2、3 天加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L Cu^{2+} , 28 °C 下静置培养, 测定其菌丝生物量和漆酶活力(单位%、U/mL)见图 7。

如图 7 所示, 添加 Cu^{2+} 会抑制菌丝体的生长, 增加 Cu^{2+} 浓度会减少菌丝生物量的积累。对于生物体来说, 铜是微量元素中十分重要的一种, 尽管如此, 需求量却很少, 浓度较大反而对微生物有毒害作用, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加菌丝体生物量逐渐减少; Cu^{2+} 添加时间越晚, 菌丝体长势越好。生物量一般以未添加 Cu^{2+} 的空白对照长势最好, 可达到 7.74%; 而在一定范围内, 漆酶活力随着 Cu^{2+} 浓度的增加而提

高。本试验中, 分别于接种前、接种后第 2、3 天添加 Cu^{2+} , 均以浓度为 2.0 mmol/L 时的漆酶活力最高, 但当 Cu^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时, 酶活反而下降。漆酶活力在接种后第 3 天添加 Cu^{2+} 时最高, 尤以添加 2.0 mmol/L Cu^{2+} 酶活可达到 17.628 U/mL, 推断是因为此时菌丝体生长处于对数期, 生长速率快, 有一定的生物量积累, 同时添加作为诱导剂的一定浓度 Cu^{2+} 也使得漆酶活力达到最高。由此可知, 应在接种后第 3 天时添加 2.0 mmol/L 的 Cu^{2+} 作为诱导剂促进菌株 Cui 6300 合成漆酶, 此时得到的酶活较高。

为检测 4 个 Cu^{2+} 添加浓度处理对菌株 Cui 6300 菌丝体生长及产漆酶是否具有不同的影响, 验证其选取的合理性, 选取菌丝生长达到最大值的第 14 天、酶活达到最大值的第 6 天所测定的结果进行方差分析, 其结果分别见表 12、13、14 和表 15、16、17。

方差分析结果表明, 采取 4 个 Cu^{2+} 浓度的处理方法对菌株 Cui 6300 菌丝体生长、产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

为检测 3 个 Cu^{2+} 添加时间处理对菌株 Cui 6300 菌丝体生长及产漆酶是否具有不同的影响, 验证其选取的合理性, 选取菌丝生长达到最小值、酶活达到最大值所测定的结果进行方差分析, 其结果分别见表 18、19。

表 11 正交试验方差分析 Table 11 The anova of Orthogonal test					
变差来源 Source	III 型平方和 Type III sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Corrected model	501.852 ^a	8	62.732	13 109.124	0.000
Intercept	1 942.972	1	1 942.972	406 026.379	0.000
Carbon	397.017	2	198.509	41 482.736	0.000
Nitrogen	10.859	2	5.430	1 134.663	0.000
pH	3.295	2	1.647	344.247	0.000
Cu^{2+}	90.681	2	45.340	9 474.850	0.000
Error	0.043	9	0.005	—	—
Total	2 444.867	18	—	—	—
Corrected total	501.895	17	—	—	—

Note: a: $R^2=1.000$ (Adjusted $R^2=1.000$).

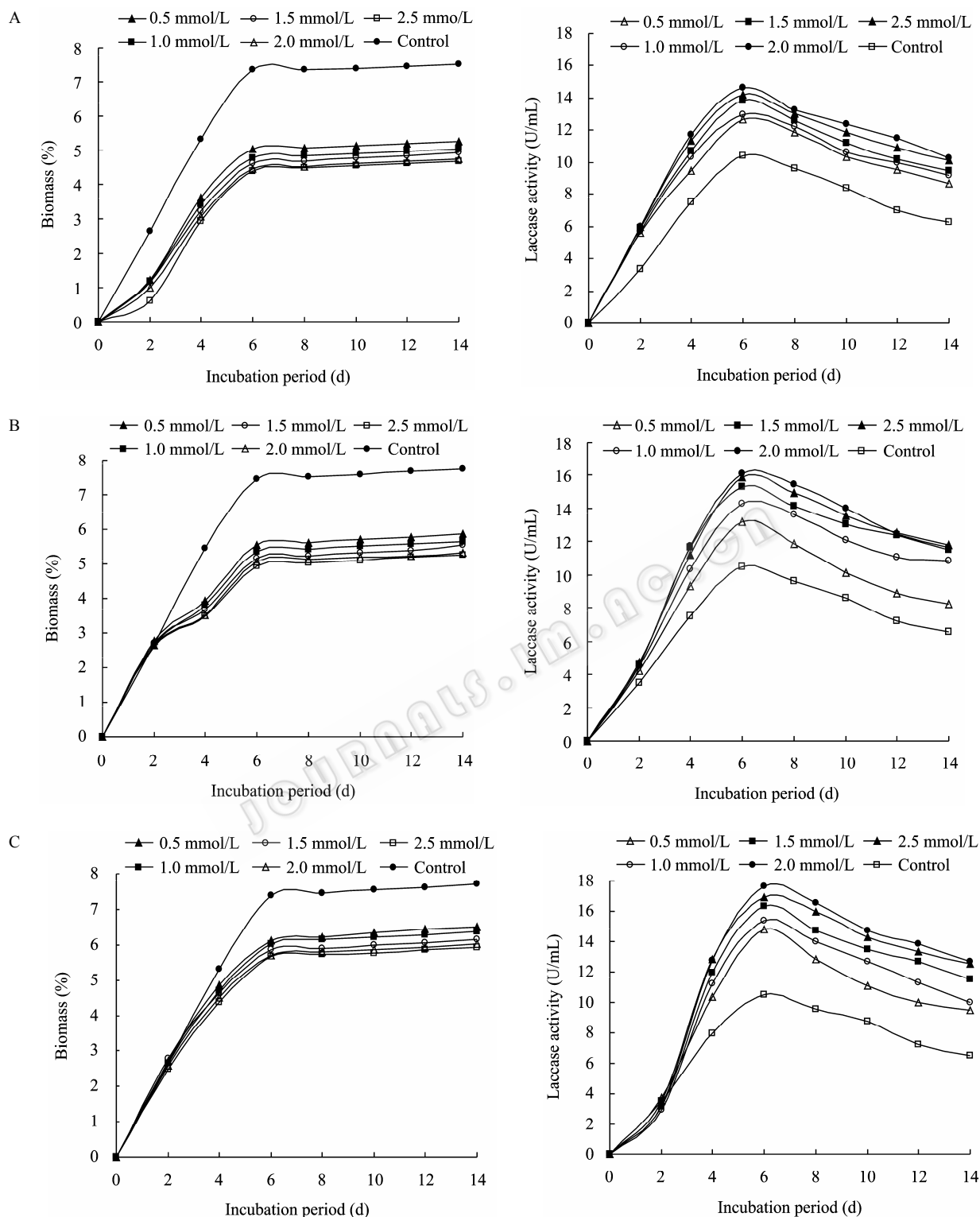


图7 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L Cu^{2+} 分别于接种前(A), 接种后第2天(B)、3天(C)添加的菌株 Cui 6300 菌丝生物量(%) 和漆酶活力(U/mL)变化

Fig. 7 Variations of biomass (%) and laccase activity (U/mL) of strain Cui 6300 at the control test, adding 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L Cu^{2+} before inoculation (A), inoculated two days (B) and inoculated three days (C)

表 12 接种前添加 Cu^{2+} 的生物量方差分析
Table 12 The anova of biomass with the addition of Cu^{2+} before inoculation

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	17.302	5	3.460		
Within groups	0.131	12	0.011	316.508	0.000
Total	17.434	17			

表 13 接种第 2 天添加 Cu^{2+} 的生物量方差分析
Table 13 The anova of biomass with the addition of Cu^{2+} on the second day of culturing

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	13.061	5	2.612		
Within groups	0.161	12	0.013	194.934	0.000
Total	13.221	17			

表 14 接种第 3 天添加 Cu^{2+} 的生物量方差分析
Table 14 The anova of biomass with the addition of Cu^{2+} on the third day of culturing

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	6.451	5	1.290		
Within groups	0.131	12	0.011	118.545	0.000
Total	6.581	17			

表 15 接种前添加 Cu^{2+} 的漆酶活力方差分析
Table 15 The anova of laccase activity with the addition of Cu^{2+} before inoculation

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	35.089	5	7.018		
Within groups	0.039	12	0.003	2 185.208	0.000
Total	35.128	17			

表 16 接种第 2 天添加 Cu^{2+} 的漆酶活力方差分析
Table 16 The anova of laccase activity with the addition of Cu^{2+} on the second day of culturing

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	67.521	5	13.504		
Within groups	0.036	12	0.003	4 498.645	0.000
Total	67.557	17			

表 17 接种第 3 天添加 Cu^{2+} 的漆酶活力方差分析
Table 17 The anova of laccase activity with the addition of Cu^{2+} on the third day of culturing

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	97.428	5	19.486		
Within groups	0.028	12	0.002	8 432.896	0.000
Total	97.456	17			

表 18 Cu^{2+} 添加时间对生物量影响的方差分析
Table 18 The anova of influences of Cu^{2+} adding time on biomass

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	2.350	2	1.175		
Within groups	0.029	6	0.005	239.776	0.000
Total	2.379	8			

表 19 Cu^{2+} 添加时间对漆酶活力影响的方差分析
Table 19 The anova of influences of Cu^{2+} adding time on laccase activity

变差来源 Variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
Between groups	13.407	2	6.704		
Within groups	0.004	6	0.001	10 981.530	0.000
Total	13.411	8			

方差分析结果表明, 采取 3 个 Cu^{2+} 添加时间的处理方法对菌株 Cui 6300 菌丝体生长、产漆酶的影响差异显著, 选取较合理。

3 讨论

3.1 愈创木酚平板显色法检测产漆酶能力

漆酶的测定方法很多, 本实验初步筛选菌株采取的以愈创木酚为底物的固体平板显色法, 是一种简单、直观、快速、稳定的方法, 可用于东方栓孔菌及其他产漆酶菌株的初步筛选, 一定程度上能辅助判断菌种的优劣。而 ABTS 法测定漆酶酶活时, 不会有其他副反应和副产物, 亲和力强、灵敏度高, 根据 420 nm 处的紫外吸光值即可得到酶活, 因此, 进一步的条件优化则采取 ABTS 方法测定酶活力。

3.2 单因子与正交试验

以麦芽糖、蛋白胨为碳、氮源, 初始 pH 值为 4.8 的液体培养基有利于菌株 Cui 6300 分泌漆酶, 这有别于其他一些白腐菌^[30-32]。不同菌株对碳、氮源的利用能力不同, 这和菌株的营养需求紧密相关, 同一种菌株生长的最适 pH 值和产酶的最适 pH 值也有差异, 各菌株之间产漆酶的最适 pH 值也会有很大的差别^[33-34]。菌株 Cui 6300 在 pH 7.0 时产酶量较低, 这可能是由于离子强度较高, 导致培养基中渗透压较大, 不利于其菌丝体生长和产酶。

6 种金属离子中, Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 对菌株 Cui 6300 产漆酶有较强的抑制作用, 其中 Fe^{3+} 的抑制作用最强, 可能是占据了底物与酶的结合位点, 改变了酶的构象, 从而使酶活受到明显的抑制作用。由于这 2 种离子对其漆酶的活性中心均有毒害作用, 应避免在培养中加入。而 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对菌株 Cui 6300 产漆酶均有激活作用, 这与 Mn^{2+} 是多种氧化还原酶催化激活剂的特性比较一致, 而漆酶也是一种氧化还原酶; Cu^{2+} 的促进作用可能与漆酶的结构相关, 漆酶分子一般含有 4 个铜原子, 在漆酶催化氧化酚类底物的过程中起电子传递作用, 且有稳定漆酶的作用。

通过正交试验得到培养基成分影响菌株 Cui 6300 产漆酶能力的因素强弱依次为: 碳源> Cu^{2+} >氮源>pH 值, 这与其他真菌产酶条件的影响程度不同, 需要进一步研究。单因子及正交试验得到的菌株 Cui 6300 产漆酶最适培养基及培养条件, 为今后其菌种选育及漆酶基因工程菌株的构建奠定了基础。由于 Cu^{2+} 对菌株 Cui 6300 产漆酶能力有较强的影响, 因此本试验中对其浓度和添加时间对菌丝生物量和漆酶活力的影响做了进一步研究。

3.3 培养条件

于固体和液体培养基中培养菌株 Cui 6300, 得到的漆酶活力最高分别出现在第 8 天和第 6 天, 说明若要得到数量大、酶活高、培养周期短的漆酶, 选择液体培养基较为合适。漆酶是一种胞外酶, 其合成一般是伴随着菌丝体的生长而同时进行的, 生长旺盛的菌体是其生物活性物质产生的基础, 若菌龄过小, 接种后在新培养基中延滞期较长会影响液体发酵扩大培养, 因此选择适合菌龄的菌丝体以及培

养基、培养条件十分必要。

3.4 Cu^{2+} 浓度和添加时间对菌丝生物量和漆酶活力的影响

添加 Cu^{2+} 会抑制菌丝体生长, 但同时会激活其产漆酶能力; 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 菌丝体生物量逐渐减少, 而其漆酶的合成速率逐渐增快; Cu^{2+} 添加越晚, 菌丝体长势越好, 漆酶活力提高越慢。若要得到较高的酶活, Cu^{2+} 应在对数生长期时添加, 此时菌丝体生物量已积累到一定程度。此外, 漆酶是含铜的多酚氧化酶, Cu^{2+} 处于酶的活性中心, 在漆酶催化底物发生氧化时起着传递电子的作用^[35-36], 所以, 培养基中 Cu^{2+} 浓度对酶活力有很大的影响。综上, 漆酶活力的提高依赖于诱导剂浓度和添加的时间。

参考文献

- [1] Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(8): 601-605.
- [2] Yoshida H. Chemistry of Lacquer (Urushi) part 1[J]. J Chem Soc, 1883, 43: 472-486.
- [3] 王祎宁, 赵国柱, 谢响明, 等. 漆酶及其应用的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(5): 34-38.
- [4] 王松, 谢益民, 王鹏, 等. 漆酶去除造纸废水中木素及多酚类化合物应用[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(7): 53-57.
- [5] 赵敏, 刘欣, 王秋玉. 漆酶在生物造纸中的应用[J]. 森林工程, 2009, 25(2): 28-32.
- [6] 付时雨, 周攀登. 真菌漆酶及其催化对苯基苯酚聚合条件的研究[J]. 化学通报, 2005, 68(3): 26-28.
- [7] 史广兴, 魏丽华. 三种树种木纤维的漆酶活化胶合[J]. 木材工业, 2005, 19(1): 25-26.
- [8] 杨林, 王建洲, 刘刚. 漆酶及其在食品中的应用[J]. 内江科技, 2009, 30(2): 39-41.
- [9] 王岁楼, 王琼波. 漆酶在食品工业中的应用及其产生菌的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 260-263.
- [10] 李玉英, 杨震宇. 漆酶的特性和应用研究进展[J]. 江西科学, 2009, 27(5): 680-684.
- [11] Barton SC, Kim HH, Binyamin G, et al. Electoreduction of O_2 to water on the "wired" laccase cathode[J]. J Phys

- Chem B, 2001, 105(47): 11917-11921.
- [12] Willner I. Biomaterials for sensors, fuel cells and circuitry[J]. Science, 2002, 298(5602): 2407-2408.
- [13] 许云贺, 张莉力, 曹新民. 秸秆利用中白腐真菌的作用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 15172-15173.
- [14] 周冠武, 段新芳, 李家宁, 等. 漆酶活化木材产生活性氧类自由基的处理条件研究[J]. 木材工业, 2006, 20(5): 17-20.
- [15] 王国栋, 陈晓亚. 漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J]. 植物学通报, 2003, 20(4): 469-475.
- [16] Rigas F, Papadopoulou K, Philippoussis A, et al. Bioremediation of lindane contaminated soil by *Pleurotus ostreatus* in non sterile conditions using multilevel factorial design[J]. Water Air Soil Pollut, 2009, 197(1/4): 121-129.
- [17] 王志新, 施晓燕, 蔡宇杰, 等. 白腐真菌 SYBC-L2 漆酶的分离纯化及其在毛纺染料脱色中的应用[J]. 生物技术通报, 2009(8): 156-165.
- [18] 朱启忠, 吕新萍, 徐国英, 等. 漆酶对染料的脱色研究[J]. 资源开发与市场, 2009, 25(6): 484-486.
- [19] 赵月春, 付蓉, 莫测辉, 等. 漆酶修复土壤 DDT 污染的动力学研究[J]. 环境化学, 2008, 27(4): 476-480.
- [20] 刘娜, 石淑兰, 秦梦华. 漆酶/丁香酸甲酯改善未漂硫酸盐浆纤维特性的 EPR 研究[J]. 中国造纸学报, 2009, 24(1): 11-15.
- [21] 王鹏, 谢益民, 范建云. 漆酶催化交联对纸张湿强度及纤维微细结构的影响[J]. 纸和造纸, 2009, 28(7): 39-42.
- [22] Bogdanovskaya VA, Kuznetsova LN, Tarasevich MR. Bioelectrocatalytic and enzymic activity of laccase in water-ethanol solutions[J]. Russian Journal of Electrochemistry, 2002, 38(10): 1074-1081.
- [23] 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.
- [24] 曹治云, 郑腾, 谢必峰, 等. 漆酶在生物检测中的应用进展[J]. 传感器技术, 2004, 23(8): 1-8.
- [25] 戴玉成. 中国东北地区木材腐朽菌的多样性[J]. 菌物学报, 2010, 29(6): 801-818.
- [26] Cui BK, Wei YL, Dai YC. Polypores from Zijin Mountain, Jiangsu Province[J]. Mycosystema, 2006, 25(1): 9-14.
- [27] 李海蛟, 何双辉, 崔宝凯. 海南霸王岭自然保护区多孔菌研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(6): 828-833.
- [28] 戴玉成. 中国多孔菌名录[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 315-327.
- [29] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 801-824.
- [30] 刘敏, 李娟, 贾乐. 产漆酶杏鲍菇液体发酵条件与部分酶学性质初探[J]. 食品工业科技, 2005, 26(8): 67-70.
- [31] 张莉萍, 高慧. 培养条件对白腐菌分泌漆酶的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(2): 330-334.
- [32] 陶君, 马爱民, 郭爱玲, 等. 灵芝漆酶活性的测定及其产漆酶条件的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 310-313.
- [33] 孙巍, 夏春雨, 赵祥杰, 等. 毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*)产漆酶培养条件优化[J]. 食用菌学报, 2008, 15(2): 69-74.
- [34] 赵凤霞, 张莉. 白腐菌 *Trametes pubescens* MB89 产漆酶发酵条件的优化及其部分酶学性质的研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(4): 175-180.
- [35] Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, et al. Crystal structure of the type - 2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinnereus* at 2.2 resolution[J]. Nat Struct Biol, 1998, 5: 310-315.
- [36] 李兵, 王宇光. 平菇漆酶与 Cu^{2+} 调控关系的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(7): 2660-2661.