

# 白腐真菌 F9 产漆酶发酵条件的优化

艾 良, 朱启忠, 李文静, 宋炳红

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

**摘 要:** 采用液体摇瓶培养方法, 探讨了碳源、氮源、pH 值、培养温度等各种因素对白腐真菌分泌漆酶能力的影响, 采用正交试验对主要的影响因素进行了优化。优化的培养条件为: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L,  $\text{VB}_1$  0.1 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  0.05 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.05 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L, pH 6, 120 r/min, 28℃发酵到 10 d 左右粗酶液酶活达到 109.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

**关键词:** 漆酶; 培养条件; 酶活

**中图分类号:** Q 949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0144-03

白腐真菌是一种能够引起木材白色腐烂的担子菌, 因其特殊的代谢类型及其独有的细胞外降解特性, 降解各种生物难降解的有机污染物而成为近年来国内外研究的热点<sup>[1]</sup>。漆酶(Laccase, EC1.10.3.2)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, 都属于蓝色多铜氧化酶家族。在自然界中, 漆酶分布于多种植物、真菌体内, 以及少数昆虫和细菌中<sup>[2]</sup>。

漆酶广泛应用于木质素降解<sup>[3]</sup>、生物燃料电池<sup>[4]</sup>、反应中的酶标签<sup>[5]</sup>、生物传感<sup>[6]</sup>、纸浆漂白<sup>[7]</sup>、绿色有机物质的合成<sup>[8]</sup>、染料脱色<sup>[9]</sup>、生物修复功能<sup>[10]</sup>、含酚废水检测及处理<sup>[11]</sup>等方面, 具有十分重要的应用价值及前景, 因而成为当今研究的热点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 山东大学自助筛选的具有高产漆酶活性的白腐真菌, 暂命名为 F9。

1.1.2 试剂 邻联甲苯胺(上海化学试剂总厂分析纯); 其它试剂均为分析纯或者化学纯。

1.1.3 培养基 综合马铃薯固体培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L,  $\text{VB}_1$  0.1 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  0.05 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.05 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L, 琼脂 20 g/L); 液体培养基(综合马铃薯固体培养基中去除琼脂)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 扩大培养 综合马铃薯固体培养基接种白腐真

菌 F9, 28℃恒温培养。

1.2.2 液体产酶培养 250 mL 三角瓶中装入 70 mL 液体培养基, 接入 4 片(8 mm)9 d 龄平板菌种, 120 r/min, 28℃摇床培养。

1.2.3 粗酶液制备 液体培养至第 9 天时, 用 6 层纱布过滤培养液, 4 000 r/min 离心, 取上清即为粗酶液。

1.2.4 酶活测定<sup>[12]</sup> 0.1 mol/L、pH 4.6 的醋酸缓冲液 3.5 mL, 加入 3.36 mmol/L 的邻联甲苯胺 0.5 mL, 再加入适当稀释的粗酶液 0.5 mL, 25℃保温 5 min, 722E 型可见分光光度计测 595 nm 处光密度(OD 值)。试验中定义酶活力单位为: 样品与底物反应 5 min 后光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 C 源、N 源对漆酶分泌的影响

2.1.1 C 源对漆酶分泌的影响 在液体培养基中分别以 20 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、麸皮作为 C 源, 其它成分不变, 装液量 70 mL, 接种量 4 片, 28℃, 120 r/min 摇床发酵培养。培养 9 d 后测定漆酶酶活(见表 1)。由表 1 可知, 当以可溶性淀粉、麸皮为 C 源时有利于菌丝体的生长, 但不适于漆酶的分泌。以葡萄糖为 C 源时所产漆酶活力最高。

表 1 不同碳源对生物量及漆酶分泌的影响

碳源	菌丝球湿重/g	酶活力/ $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$
葡萄糖	9.272	62.8
蔗糖	6.184	12.2
麦芽糖	5.379	10.7
可溶性淀粉	13.429	18.7
麸皮	14.368	20.5

2.1.2 N 源对漆酶分泌的影响 以 20 g/L 的葡萄糖为碳源, 分别加入 5 g/L 的  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素, 装液量 70 mL, 接种量 4 片, 28℃, 120 r/min, 摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活(见表 2)。由表 2 可以看出, 有机氮源促进漆酶分泌的效果总体好于

第一作者简介: 艾良(1985-), 女, 山东济南人, 在读硕士, 现从事酶工程方向研究。E-mail: ailiang927@163.com。

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 本科, 教授, 现主要从事生物化学与酶工程方面研究。

收稿日期: 2009-11-20

无机氮源。当以酵母膏为 N 源时最有利于漆酶的分泌,牛肉膏、蛋白胨作为 N 原也比较有利于漆酶的分泌。综合以上因素,确定最佳的产酶培养基配方为: 马铃薯 200 g/ L, 葡萄糖 20 g/ L, 酵母膏 5 g/ L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/ L, VB<sub>1</sub> 0.1 g/ L, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 g/ L, MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/ L, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 3.0 g/ L。

表 2 不同氮源对生物量及漆酶分泌的影响

氮源	菌丝球湿重/ g	漆酶活力 /U · mL <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10.232	28.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11.411	32.7
尿素	7.546	17.8
牛肉膏	12.392	72.2
酵母膏	14.814	83.2
蛋白胨	11.752	71.1

2.2 环境条件对漆酶分泌的影响

2.2.1 装液量对漆酶分泌的影响 250 mL 三角瓶中分别加入液体培养基 50、60、70、80、90 mL, 接种量 3 片, 28℃, 120 rpm 摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活(见图 1)。由图 1 可以看出,当装液量为 70 mL 时最有利于漆酶的分泌,此时的酶活力最高,随着装液量的增加,酶活力也迅速降低,因此最佳装液量为 70 mL。

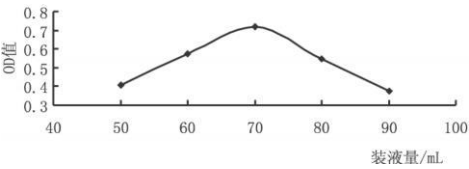


图 1 装液量对漆酶分泌的影响

2.2.2 接种量对漆酶分泌的影响 250 mL 三角瓶装液量为 70 mL, 分别接入直径 8 mm 的菌片 2、3、4、5、6 片, 28℃, 120 r/min 摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活, 结果见图 2。接种量为 4 片时最有利于漆酶的分泌。当接种量过大时反而不利于漆酶的分泌。

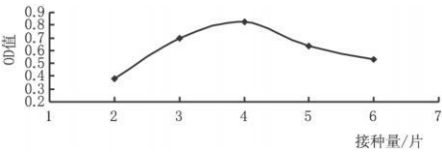


图 2 接种量对漆酶分泌的影响

2.2.3 发酵温度对漆酶分泌的影响 250 mL 三角瓶中加入液体培养基 70 mL, 接种量 4 片, 转速 120 rpm, 分别在 20、25、28、32、37℃摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活, 结果见图 3。温度在 25~30℃之间时产酶活力比较高, 温度过高或者过低均不利于漆酶的分泌, 所以最适发酵温度为 28℃。

2.2.4 转速对漆酶分泌的影响 250 mL 三角瓶中加入 70 mL 液体培养基, 接种量 4 片, 温度 28℃, 分别以 100、110、120、130、140 rpm 进行摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活, 结果见图 4。当转速为 120 rpm 时产酶活力最高, 当转速过快或者过慢时, 均不利于漆酶的产生。

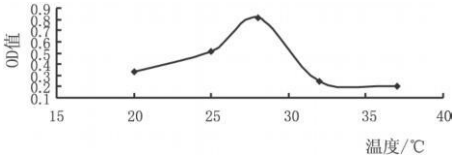


图 3 温度对漆酶分泌的影响

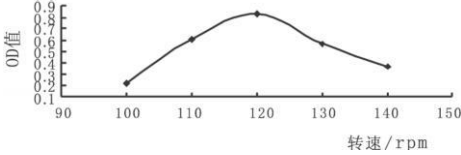


图 4 摇床转速对漆酶分泌的影响

2.2.5 培养基初始 pH 值对漆酶分泌的影响 分别调初始 pH 为 4、5、6、7、8、9、10, 250 mL 三角瓶装液量 70 mL, 接种量 4 片, 28℃, 120 rpm 摇床发酵培养, 第 9 天测定酶活, 结果见图 5。该菌种在较广泛的 pH 条件下均可产漆酶, 特别是在碱性条件下仍具有产漆酶的能力。最有利的产酶 pH 在 6 附近。

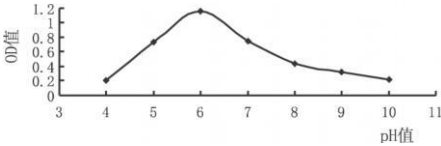


图 5 初始 pH 值对漆酶分泌的影响

2.3 最佳产酶条件的优化分析

采用接种量 4 片, 28℃, 120 rpm, 针对碳源、氮源、装液量和初始 pH 值设计 L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>), 进行正交试验和极差分析。结果表明, pH 值、氮源、碳源对酶活力影响较大, 尤其以 pH 的影响最大, 装液量的影响最小。优化后所的组合为 A2B3C1D2, 即葡萄糖 20 g/ L, 酵母膏 5 g/ L, pH 6, 装液量 70 mL。此结果与上述的单因素试验结果较为一致。

2.4 最佳产酶条件下的产酶进程曲线

通过单因素试验和正交试验, 得到最适培养基为: 马铃薯 200 g/ L, 葡萄糖 20 g/ L, 酵母膏 5 g/ L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/ L, VB<sub>1</sub> 0.1 g/ L, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 g/ L, MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/ L, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 3.0 g/ L。培养条件为: pH 6 转速 120 rpm, 装液

量 70 mL, 28℃摇床培养, 漆酶产量从第 7 天开始迅速上升, 第 9、10 天达到最高, 随后产酶能力逐渐降低(见图 6)。

表 3 培养基碳源、氮源、pH 值和装液量  
正交试验结果

序号	A/g·L <sup>-1</sup>	B/g·L <sup>-1</sup>	C	D/mL	酶活力/ $\mu$ ·mL <sup>-1</sup>
1	1(15)	1(3)	1(6)	1(60)	64.7
2	1(15)	2(4)	2(8)	2(70)	36.5
3	1(15)	3(5)	3(10)	3(80)	42.9
4	2(20)	1(3)	2(8)	3(80)	30.8
5	2(20)	2(4)	3(10)	1(60)	50.5
6	2(20)	3(5)	1(6)	2(70)	109.1
7	3(25)	1(3)	3(10)	2(70)	22.3
8	3(25)	2(4)	1(6)	3(80)	83.6
9	3(25)	3(5)	2(8)	1(60)	38.4
X1	48.033	39.267	85.8	51.2	
X2	63.467	56.867	35.233	55.967	
X3	48.1	63.467	38.567	52.433	
R	15.434	24.2	50.567	4.767	

注 A. 葡萄糖浓度 B. 酵母膏浓度 C. pH 值 D. 装液量。

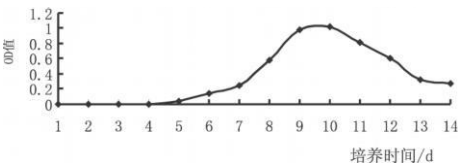


图 6 最佳条件下的产酶进程曲线

3 结论

采用单因素法结合正交试验分析对白腐真菌 F9 产漆酶条件, 该菌种最适产酶条件为: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L, VB<sub>1</sub> 0.1 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L, pH 6, 转速 120 rpm, 装液量 70 mL, 28℃发酵到第 10 d 左右粗酶液酶活达到 109.1  $\mu$ /mL。

该试验所用菌种为山东大学自主筛选, 其生理生化试验还有待进一步进行, 同时由于时间缘故, 金属离子等其它因素对该菌种产酶影响的研究及所产漆酶的酶学性质研究尚未进行, 这些工作有待在以后逐步完成。

参考文献

[1] 黄丹莲, 曾光明, 黄国和, 等. 白腐菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 112-115.  
[2] 范文霞, 刘学铭. 漆酶的生产和应用研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2007(5): 15-18.  
[3] Srebotnik E, Hammel K E. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxy-benzotriazole system[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 81(2, 3): 179-188.  
[4] Barton S G, Kim H H, Binyamin G, et al. The "wired" laccase cathode: high current density electroreduction of O<sub>2</sub> to water at +0.7V (NHE) at pH5[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 5802-5803.  
[5] Kuznetsov B A, Shumakovich G P, Koroleva O V, et al. On applicability of laccase as label in the mediated and mediator-less electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode[J]. Biosens Bioelectron, 2001, 16: 73-84.  
[6] Kulys J, Vidziunaite R. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 18(23): 319-325.  
[7] Call H P, Mucke I. History, Overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Ligonzym (R)-process)[J]. J Biotechnol, 1997, 53: 163-202.  
[8] Karanyshev A V, Shleev S V, Koroleva O V, et al. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline[J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 33: 556-564.  
[9] 高恩丽, 张数江, 夏黎明. 云芝菌发酵产漆酶及其对靛蓝脱色的研究[J]. 高校化学工程学报, 2007, 21(1): 111-115.  
[10] Mayer A M, Staples R C. Laccase: new function for an old enzyme[J]. Phytochemistry, 2002, 60: 551-565.  
[11] 罗开昆, 彭红, 龚跃法. 漆酶的固定化及其在废水处理中的应用[J]. 工业水处理, 2005, 25(5): 14-17.  
[12] 王宜磊, 邓振旭, 朱陶, 等. 采绒革盖菌 CV-8 漆酶活性的初步研究[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(4): 60-62.

Studies on Fermentation Conditions for Laccase Production from White-Rot Fungi F9

AI Liang, ZHU Qi-zhong, LI Wen-jing, SONG Bing-hong  
(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

**Abstract:** The main factors affecting laccase production in liquid shake-flask fermentation were studied. The effects of carbon source, nitrogen source, pH value culture, culture temperature on producing laccase were studied. The optimization of fermentation conditions were conducted according to the orthogonal experiment. The optimal fermentation conditions for laccase production were as follows: potato 200 g/L, yeast paste 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L, vitamin B1 0.1 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L, pH 6, and incubation with 120 rpm at 28℃ for 10 days. Laccase activity was 109.1  $\mu$ /mL.

**Key words:** laccase; culture condition; enzyme activity