

金针菇液体发酵产漆酶培养条件的研究

刘 苹, 李 刚, 温少红*
(烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘 要: 在液体培养条件下, 考察碳源、氮源、 Cu^{2+} 以及培养条件等因素对金针菇LP03产漆酶的影响。采用ABTS法测定金针菇LP03产漆酶活力。结果表明: 以3g/100mL玉米粉为碳源, 1g/100mL蛋白胨为氮源, 添加1mmol/L的 Cu^{2+} , 初始pH6.0、200mL/500mL三角瓶的装液量、培养温度28℃、摇床转速160r/min条件下培养, 金针菇LP03的漆酶产量最高, 菌株产酶活力为(1813.52±5.59)U/L, 是优化前(479.87U/L)的3.78倍, 且金针菇LP03菌体生长状况良好。

关键词: 金针菇; 漆酶; 培养条件

Optimization of Liquid Culture Conditions for Laccase Production by *Flammulina velutipes* LP03

LIU Ping, LI Gang, WEN Shao-hong*
(College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The effect of carbon resource, nitrogen source, Cu^{2+} and other factors on laccase secretion by and cell growth of *Flammulina velutipes* LP03 were investigated. The optimum conditions were 3 g/100 mL corn flour, 1 g/100 mL peptone, 0.5 g/100 mL glucose, 1 mmol/L copper sulfate, initial pH 6.0, 200 mL/500 mL liquid medium, 28 °C and 160 r/min. The maximal enzyme activity was (1813.52 ± 5.59) U/L, which was 3.78 times of that before optimization.

Key words: *Flammulina velutipes*; laccase; culture condition

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0226-05

漆酶是一种含 Cu^{2+} 的多酚氧化酶^[1], 能催化酚类等6大类约250多种不同类型底物的氧化反应^[1]。研究证明 Cu^{2+} 处于漆酶的活性中心, 在漆酶的催化氧化中起决定性作用。由于漆酶具有特殊的催化性能和广泛的作用底物, 所以其在木质素降解^[2]、染料脱色^[3]、绿色有机物质的合成^[4]、纸浆漂白^[5]、含酚废水检测及处理^[6]等方面具有广泛的应用潜力。

按来源漆酶主要可以分为漆树漆酶和真菌漆酶两类, 在真菌中, 漆酶广泛存在于担子菌(*Baidimycetes*)、多孔菌(*Polyporus*)、子囊菌(*Ascomycetes*)、脉孢菌(*Neurospora*)、柄孢壳菌(*Podospora*)和曲霉菌(*Aspergillus*)等^[7], 其中最重要的生产者是担子菌中的白腐菌。本实验以研究室筛选到的一株漆酶产量较高的金针菇LP03作为研究对象, 考察碳源、氮源、 Cu^{2+} 以及培养条件等因素对金针菇漆酶分泌的影响, 寻找适宜的营养及培养条件, 以提高金针菇LP03分泌漆酶的能力, 为以后的工业应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与培养基

金针菇LP03(*Flammulina velutipes* LP03)为烟台大学微生物实验室保存菌种。

固体培养基: 马铃薯200g/L、葡萄糖20g/L、 KH_2PO_4 3g/L、1000mL蒸馏水, pH值自然。

液体发酵培养基: 碳源3g/100mL、氮源1g/100mL、葡萄糖0.5g/100mL、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/100mL、 KH_2PO_4 0.1g/100mL、 VB_1 10 μg /100mL培养基, 微量元素10mL/L培养基。

1.2 方 法

1.2.1 粗酶液的制备

每隔1d定时无菌操作取5mL样品4000r/min离心5min, 上清液即为粗酶液。

1.2.2 酶活力的测定

采用ABTS法, 在文献[9]基础上进行了调整。移取1mL粗酶液于两试管中, 其中一支试管煮沸5min作对照, 向两只试管中分别加2mL ABTS缓冲溶液, 反应3min后放于40℃中进行水浴, 取出后在410nm波长处测吸光度。一个酶活力单位用每分钟吸光度增加0.1为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶酶活力}/(\text{U/L}) = \frac{10^6 \times \Delta A \times V_1 \times N}{V_2 \times \Delta t \times \epsilon}$$

收稿日期: 2011-09-05

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(2008BS02009); 山东省科技攻关计划项目(2010GGX10721)

作者简介: 刘苹(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物发酵。E-mail: eeliuping@126.com

*通信作者: 温少红(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为微生物代谢调控。E-mail: wenshaohong1@163.com

式中： ΔA 为吸光度的增量； Δt 为反应时间的变化量； V_1 为反应总体积/mL； V_2 为测定酶活力时所取的酶液体积/mL； ε 为 $3.6 \times 10^4 / (\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{cm}))$ ； N 为酶液稀释倍数。

1.2.3 培养基的优化

以8%接种量接种，在28℃、160r/min的恒温摇床上培养5d后，隔天取样测酶活力。培养19d后，过滤菌体，干燥后测其干质量。每个实验点均设3个平行。

分别以玉米粉、淀粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)作为发酵培养基中的碳源，蛋白胨作氮源，比较碳源的影响；分别以蛋白胨、牛肉膏、硝酸铵、硫酸铵、酒石酸铵作为发酵培养基中的氮源，比较氮源的影响；分别添加不同浓度(分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L)的CuSO₄至碳氮源优化后的培养基，以不添加CuSO₄的培养基作对照，比较Cu²⁺浓度的影响。

1.2.4 培养条件的优化

分别以筛选出的碳源、氮源和Cu²⁺浓度制备培养基。

将发酵培养基的初始pH值分别调整到4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0，在装液量220mL/500mL、摇床转速150r/min、培养温度28℃条件下培养，筛选初始pH值；采用500mL三角瓶，分别加入100、150、200、250、300mL液体发酵培养基，在筛选出pH值、摇床转速150r/min、培养温度28℃条件下培养，筛选装液量；分别在25、28、31、35、40℃，筛选出pH值、装液量及摇床转速150r/min条件下培养，筛选培养温度；分别在以上筛选条件下、不同摇床转速120、160、180、210r/min条件下进行液体培养，筛选摇床转速。

2 结果与分析

2.1 培养基的优化

2.1.1 不同碳源对金针菇LP03产漆酶的影响

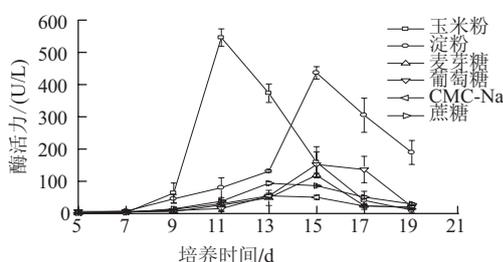


图1 碳源对金针菇LP03漆酶分泌的影响
Fig.1 Effects of carbon sources on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

由图1可知，不同碳源对金针菇LP03产漆酶的影响显著($P < 0.05$)，其中以玉米粉为碳源对漆酶发酵最有利，不仅酶活力明显高于其他碳源，而且产酶高峰出现

最早，培养至11d时酶活力达到最高，以其他物质为碳源，酶活高峰滞后2~4d。玉米粉中含有丰富的营养成分(谷固醇、卵磷脂、亚麻油、蛋白质、脂肪、谷胱甘肽、淀粉、VB₁、VB₂、VB₆、VA、VE、胡萝卜素、纤维素以及钙、磷、铁等)，促进菌体生长^[11]，同时促进了金针菇漆酶的合成。其中玉米粉中的纤维素含量在4%~10%，可能是纤维素类物质协同其他营养物质共同促进了漆酶的分泌。单独以CMC-Na作为碳源并不利于产酶。可见，以玉米粉为碳源可以提高金针菇LP03产酶。

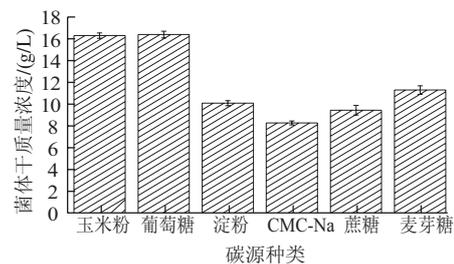


图2 不同碳源对金针菇LP03菌体生长的影响
Fig.2 Effects of carbon sources on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

菌体干质量反映了菌体的生长状态。由图2可知，以玉米粉、葡萄糖作为碳源时，对菌体生长有利，获得的生物量最高。从培养过程中可以看到，这两种情况下菌体长势最好，菌丝球大小均一。而在分别以麦芽糖、淀粉、蔗糖和CMC-Na为碳源的培养基中，菌体生长较慢。

以葡萄糖作碳源时，由于葡萄糖是小分子糖类，可以被菌体优先吸收利用，从而促进其快速生长，故菌体长势很好。但是漆酶的分泌量却较少。以淀粉为碳源时，较之以葡萄糖为碳源，其菌体干质量低62.5%，但是最高酶活力却高65.1%。说明菌体生长与漆酶的分泌量并非成正比，即菌体长势好，分泌漆酶不一定多，二者是部分相关关系。而以玉米粉为碳源时，菌体生长状态较好，菌丝球呈刺状^[12]，同时产酶量又高、产酶高峰出现得早。可见，玉米粉为金针菇LP03液体发酵产漆酶的最佳碳源。

2.1.2 不同氮源对金针菇产漆酶的影响

由图3、4可知，以蛋白胨为氮源最有利于漆酶的分泌，漆酶酶活力最高。按酶活力由高到低依次为蛋白胨>牛肉膏>酒石酸铵>硫酸铵>硝酸铵。以酒石酸铵、硝酸铵和硫酸铵作氮源时，漆酶分泌量比较相近。从生长状况看，生物量由高到低依次为酒石酸铵>蛋白胨>牛肉膏>硝酸铵>硫酸铵。以蛋白胨作氮源，既有利于菌体生长，同时又有利于漆酶分泌。可见，蛋白胨为金针菇LP03液体发酵产漆酶的最佳氮源。从酒石酸铵对生长和产酶的影响来看，它对生长有利但是却不利于产酶，说明菌体生长与漆酶分泌量存在部分相关关系。

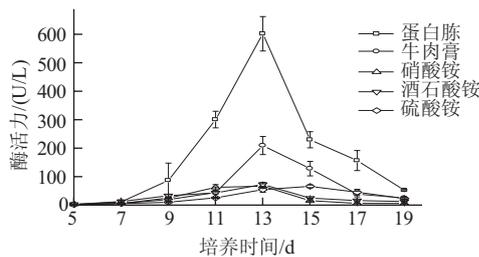


图3 不同氮源对金针菇LP03漆酶分泌的影响

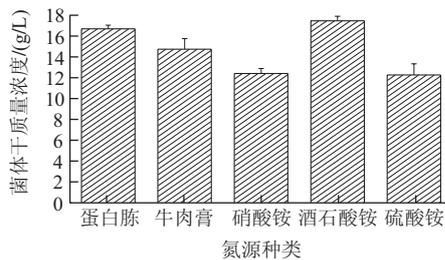
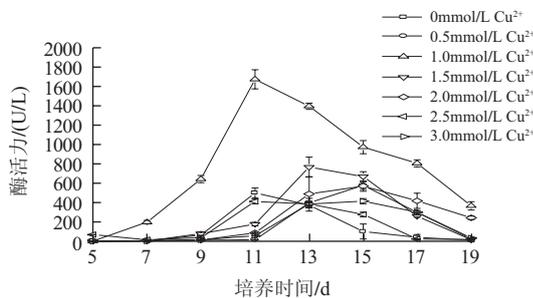
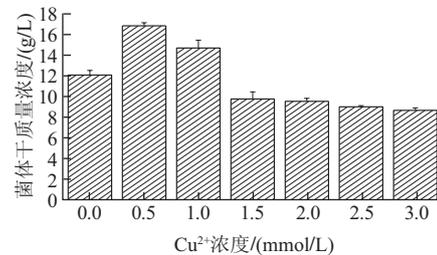
Fig.3 Effects of nitrogen source on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

图4 不同氮源对金针菇LP03菌体生长的影响

Fig.4 Effects of nitrogen source on cell growth of *Flammulina velutipes* LP032.1.3 Cu^{2+} 对金针菇LP03产漆酶的影响图5 不同浓度 Cu^{2+} 对金针菇LP03产漆酶的影响Fig.5 Effects of Cu^{2+} concentrations on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

漆酶为一种胞外诱导酶, Cu^{2+} 作为漆酶的组成成分及活性中心, 在培养基中加入少量的 Cu^{2+} 对于漆酶的分泌有一定的诱导作用。由图5可见, 添加 Cu^{2+} 对漆酶分泌影响显著, 适宜的添加浓度为1.0mmol/L。Fonseca等^[13]对 Cu^{2+} 影响真菌漆酶的分泌进行了研究, 在菌体生长至第7天添加0.5mmol/L CuSO_4 , 漆酶酶活力比不添加 CuSO_4 的培养基中提高49.2倍。欧阳翔等^[14]对灵芝漆酶进行了研究, 结果表明 Cu^{2+} 能够有效地诱导漆酶基因的表达, Cu^{2+} 存在与否及其浓度是影响漆酶合成的重要因素之一。实验结果表明, Cu^{2+} 浓度为0~1.0mmol/L时, 漆酶酶活力随着 Cu^{2+} 浓度的增加逐渐升高, 当 Cu^{2+} 浓度大于1.0mmol/L时, 酶活力随着 Cu^{2+} 浓度的增加又逐渐降低。对于不同的菌种生

长状况以及代谢类型存在一定的差异, 并且各菌种所分泌的漆酶在结构和组成上同样存在差异^[15], 从而导致其性质可能不尽相同, 使 Cu^{2+} 对不同菌株产漆酶的最佳诱导浓度不同。

图6 不同浓度 Cu^{2+} 对金针菇LP03菌体生长的影响Fig.6 Effects of Cu^{2+} concentration on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

Cu^{2+} 作为一种重金属离子, 一般会对菌体生长产生一定的毒害作用, 但是在培养基中添加少量 CuSO_4 可以促进菌体生长。由图6可知, 添加0.5mmol/L和1mmol/L的 Cu^{2+} 都有利于菌体生长, 当培养基中的 Cu^{2+} 浓度超过1mmol/L时, 细胞生长受到抑制。培养基中添加1mmol/L的 Cu^{2+} , 既有利于金针菇LP03菌体生长又有利于其产酶。

2.2 培养条件的优化

2.2.1 初始pH值对金针菇LP03产漆酶的影响

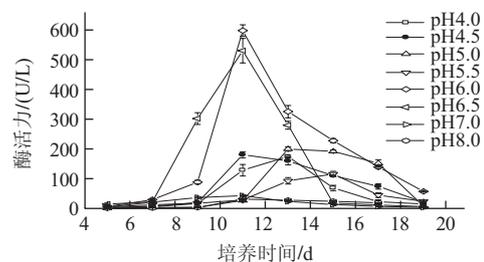


图7 不同初始pH值对金针菇LP03产漆酶的影响

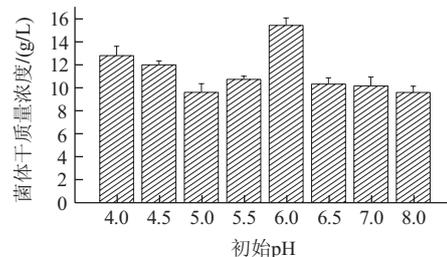
Fig.7 Effects of initial pH on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

图8 初始pH值对金针菇LP03菌体生长的影响

Fig.8 Effects of initial pH on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

由图7、8可知, 初始pH值为6.0时漆酶酶活力最高, 其次是pH 6.5, 之后依次为pH 5.0、4.5、4.0、5.5、7.0、

8.0。可见, 初始pH值在6.0~6.5时有利于金针菇分泌漆酶。在偏酸性环境下细胞通透性较好, 有利于漆酶的分泌, 而在碱性条件下漆酶分泌明显减少。从pH值对菌体生长的影响来看, 初始pH 6.0时, 菌体生长代谢旺盛, 菌体长势最好。可见, 初始pH 6.0为金针菇漆酶发酵的最佳pH值。

2.2.2 装液量对金针菇LP03产漆酶的影响

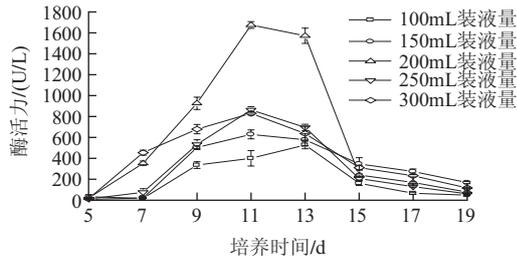


图9 不同装液量对金针菇LP03产漆酶的影响

Fig.9 Effects of liquid volume on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

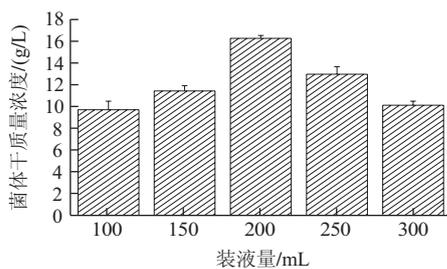


图10 不同装液量对金针菇LP03菌体生长的影响

Fig.10 Effects of liquid volume on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

装液量与发酵时氧气的传递有直接关系。由图9、10可知, 在500mL锥形瓶中加入200mL培养基时, 金针菇LP03分泌的漆酶酶活力最高, 同时也最有利于菌体的生长。

2.2.3 培养温度对金针菇LP03产漆酶的影响

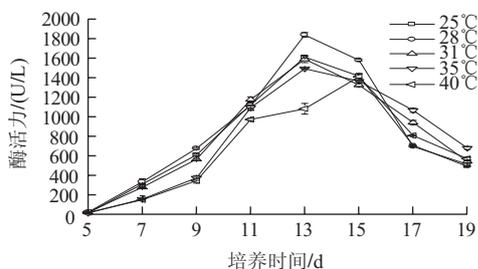


图11 不同培养温度对金针菇LP03产漆酶的影响

Fig.11 Effects of culture temperature on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

由图11可知, 在实验温度范围内, 28℃培养时漆酶产量最高, 酶活力最高达1807.38U/L, 而随着温度的上

升漆酶产量逐渐下降。在25~35℃范围内酶活峰值均在摇瓶培养至第13天时达到, 而在40℃条件下培养时酶活力峰值达到的时间有所延迟2d, 延长了发酵周期。

由图12可知, 在25~35℃范围内温度升高有利于金针菇LP03菌体生长, 并且菌体生长状况良好, 菌丝球大小均一。温度升高到40℃就会影响菌体的正常生长代谢, 导致菌体生长缓慢。因此, 综合考虑漆酶产量和菌体生长情况, 选择28℃为最适培养温度。

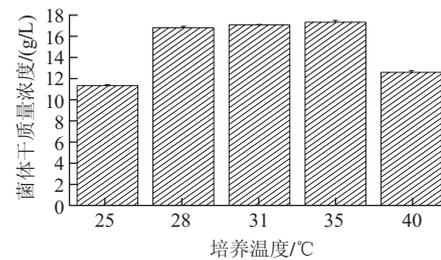


图12 不同培养温度对金针菇LP03菌体生长的影响

Fig.12 Effects of culture temperature on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

2.2.4 摇床转速对金针菇LP03产漆酶的影响

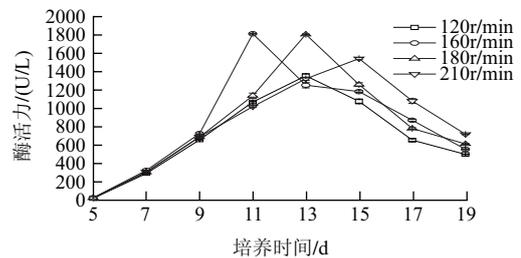


图13 摇床转速对金针菇LP03产漆酶的影响

Fig.13 Effects of rotation speed on the secretion of laccase by *Flammulina velutipes* LP03

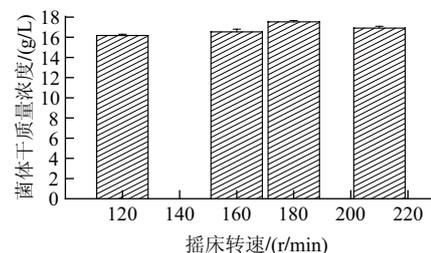


图14 摇床转速对金针菇LP03菌体生长的影响

Fig.14 Effects of rotation speed on cell growth of *Flammulina velutipes* LP03

金针菇LP03属于严格的好氧型白腐菌, 溶氧量的增加可以加速其产酶。液体培养时随着摇床转速的增大, 摇瓶内发酵液的传质状况得到了改善, 不仅营养物质的传递速率加快, 而且能够增加氧气的传递速率, 使溶氧

升高。因此在一定范围内提高摇床转速有利于漆酶的分泌。由图13、14可知,当摇床转速为160r/min时,漆酶酶活力达最高,为 (1813.52 ± 5.59) U/L,菌丝球密度较大。但是随着摇床转速的进一步提高,漆酶酶活力下降,可能是因为摇床转速过高,产生的剪切力太大反而不利于菌丝的生长以及产酶。

3 结 论

在金针菇LP03液体培养过程中,考察了培养基组成以及培养条件对漆酶分泌的影响。结果表明,最佳培养条件为:3g/100mL玉米粉、1g/100mL蛋白胨、1.0mmol/L的 Cu^{2+} 、初始pH6.0、三角瓶的装液量200mL/500mL、摇床转速160r/min、培养温度28℃,在此条件下培养的金针菇LP03,漆酶酶活力高,而且达到酶活力高峰的时间短,菌体生长较快。菌株产酶活力为 (1813.52 ± 5.59) U/L,是优化前 (479.87) U/L的3.78倍。

参考文献:

- [1] 凌庆枝,董丽辉,高丽丽,等.亮菌漆酶的初步研究[J].食品科学,2009,30(19):190-193.
- [2] 胡平平,付时雨.漆酶催化活性中心结构及其特性研究进展[J].林产化学与工业,2001,21(3):69-75.
- [3] SREBOTNIK E, HAMMEL K F. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxy-benzotriazole system[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 81(2/3): 179-188.
- [4] 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.
- [5] KARASMYSHEV A V, SHLEEV S V, KOROLEVA O V, et al. Laccase catalyzed synthesis of conducting polyaniline[J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 33(5): 556-564.
- [6] CALL H P, MÜCKE I. History of overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Ligonzym®-process)[J]. J Biotechnol, 1997, 53(2/3): 163-202.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] BHATTACHARYA S S, BANERJEE R. Laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlor-phenol using response surface methodology[J]. Chemosphere, 2008, 73(1): 81-85.
- [10] BOURBONNAIS R, PAICE M G. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation[J]. FEBS Lett, 1990, 267(1): 99-102.
- [11] 高年发,晋明芬,张健.玉米粉细菌发酵生产L-乳酸的研究[J].农业工程学报,2007,23(6):233-236.
- [12] 赵萍.影响灵芝深层发酵因素的探讨[J].食品科学,2002,23(11):88-92.
- [13] FONSECA M I, SHIMIZU E, ZAPATA P D, et al. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina) [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(6): 534-539.
- [14] 欧阳翔,吴婧,丁一新,等.灵芝漆酶基因转录 Cu^{2+} 诱导特性及其启动子的克隆与序列分析[J].南京农业大学学报,2009,32(1):36-40.
- [15] 苏国成,王剑锋,周长义,等.液态生产胞外漆酶大型真菌高产菌株筛选[J].生态学杂志,2007,26(8):1210-1216.