

# 白腐菌漆酶的研究进展

王佳玲 余惠生 付时雨 黄秀瑜

(中国科学院广州化学研究所纤维素开放实验室 广州 510650)

关键词 白腐菌, 漆酶, 木质素

分类号 Q93-936

自然界中木素的降解主要是通过丝状真菌, 其中主要由白腐担子菌的分解作用来完成。白腐菌降解木质素, 是通过其分泌的酶的作用来实现, 白腐菌所分泌的木素降解酶主要有三种, 即木素过氧化物酶(Lignin Peroxidase, 简称LiP), 依赖锰的过氧化物酶(Manganese-dependent Peroxidase, 简称MnP)和漆酶(Laccase)。

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶(p-diphenol oxidase, EC 1. 10. 3. 2), 最早是从漆树的分泌物中发现(Yoshida, 1883), 随后人们发现一些高等真菌也能分泌这种酶(Bertrand, 1896; Laborde, 1896)。现在人们知道, 漆酶广泛地存在于担子菌、半知菌和子囊菌中, 但其中最主要的生产者是在担子菌中的白腐菌。迄今为止, 只发现有一种细菌(*Azospirillum lipoferum*)能分泌漆酶<sup>[1~2]</sup>。

漆酶在木素降解过程中的作用, 至今人们还很不清楚。作为一种多酚氧化酶, 它可催化氧化酚类化合物, 同时分子氧被还原为水。这一过程中, 漆酶从氧化底物分子中提取一个电子, 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。漆酶降解木素过程的可能的机理, 最近已有综述报道<sup>[3]</sup>。

近年来, 有关漆酶的研究越来越受到国际上的重视。由于它在降解木素、微生物菌体形态形成以及植物病原等方面的功能, 使之在制浆造纸工业、染发工艺、饮料加工工艺<sup>[4]</sup>等方面得到了重要的研究和应用。尤其在制浆造纸工业的纸浆生物漂白<sup>[5~6]</sup>、废水处理<sup>[7]</sup>等方面具有很大的研究价值和应用潜力。由于漆酶可与有毒的酚类物质作用, 使苯氧基类除草剂, 石油工业废物等造成环境污染的物质去毒<sup>[8]</sup>, 因而颇具环保意义。

由于漆酶的应用已取得一些突破性成果和显著的

成就, 白腐菌漆酶的生产因而也越来越受到人们的关注。大量的研究工作围绕如何提高白腐菌漆酶的产量而展开。采用的方法是筛选及选育优良的菌种, 探索最适宜的培养方式及最佳生理培养条件。近十几年来, 尤其是最近的五、六年来, 国际上有关这方面的工作取得了相当大的进展, 然而也仍然存在着不少亟待解决的问题, 本文将分以下六个方面进行扼要的综述。

## 1 菌种

大量白腐菌能够分泌漆酶, 但直至八十年代为止, 研究报道的白腐菌菌种不过有限的十几种。大部分工作都是以 *Polyporus versicolor* (亦称 *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*) 为研究对象<sup>[9~11]</sup>。八十年代以来的这十几年间, 随着有关漆酶的研究工作的大量增加, 除继续对一些已被认为高产漆酶的菌种进行深入研究以外, 还进一步选育开发出许多新的菌种。下面将1981~1995年间研究报道的主要高产漆酶白腐菌示于表1。

## 2 培养方式

目前研究最多的是液体培养, 但也有采用固体培养的报道<sup>[12]</sup>。这两种不同的培养方式对菌体生长和漆酶酶活究竟有什么影响, 现在还不很清楚。有报道 *Rigidoporus lignosus* 在固体培养条件下漆酶和锰过氧化物酶的产量都较液体培养条件下的大大提高<sup>[13]</sup>。固体培养条件下营养物质, 诱导剂, 微量元素, 温度及pH值等生理条件对漆酶的影响尚未见有详细考察。

在液体培养研究中, 采用静置培养的情况比振荡

\* 本研究得到国家自然科学基金、广东省自然科学基金和制浆造纸工程国家重点实验室资助

1997-06-12收稿

表1 主要的高产漆酶的菌种

属名	菌种名
<i>Polyporus</i>	<i>P. versicolor</i> , <i>P. hirsutus</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>P. anceps</i>
<i>Coriolus</i>	( <i>C. versicolor</i> ), ( <i>C. hirsutus</i> ), <i>C. consor</i>
<i>Trametes</i>	( <i>T. versicolor</i> ), <i>T. villosa</i> , <i>T. gibbosa</i> , <i>T. sanguinea</i>
<i>Pleurotus</i>	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. sajor-caju</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>P. pulmonarius</i>
<i>Phlebia</i>	<i>P. radiata</i> , <i>P. tremellosa</i>
<i>Lentinus</i>	<i>L. edodes</i> , <i>L. tigrinus</i>
<i>Pycnoporus</i>	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>P. coccineus</i>
<i>Polystictus</i>	<i>P. versicolor</i> , <i>P. sanguineus</i>
<i>Ganoderma</i>	<i>G. lucidum</i> , <i>G. valesioides</i>
others	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> , <i>Irpex lacus</i> , <i>Daedalea</i> <i>flavida</i> , <i>Fomes annosus</i> , <i>Rhizoctonia praticola</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Lenzites</i> <i>betulina</i> , <i>Sporotrichum</i> <i>pulerulentum</i> , <i>Pholiota mutabilis</i> <i>Serum purpureum</i> , <i>Schinus molle</i> , <i>Coprinus congregatus</i> , <i>Ceriporiopsis</i> <i>subvermispora</i> , <i>Cerrena unicolor</i> , <i>Panus tigrinus</i> , <i>Bjerkaradera</i> <i>adusta</i> , <i>Poliporus pinsinus</i> , <i>Dichomitus squalenss</i> , <i>Pyricularia</i> <i>oryzae</i> , <i>Fyathus bulleri</i>

注: \* *Botrytis cinerea*属半知菌。

培养的为多。如 *Pleurotus florida* 在静置培养条件下可获高产量漆酶(4.60u/ml, 愈疮木酚为底物)<sup>[14]</sup>。此外, 采用深层培养的情况比浅层培养的情况多, 前者比后者似更有利于提高漆酶产量。

### 3 培养基

Fahraeus 曾提出 *Polyporus versicolor* 在合成培养基中较之在麦芽汁中生长更旺盛, 漆酶产量更高<sup>[10]</sup>。

为提高漆酶产量, 在合成培养基中加入某种天然成分配制而成的半合成培养基在提高漆酶产量的应用也非常广泛。例如 Kharazipour, Trojanowshi<sup>[15]</sup> 等人把

土豆浆加入培养基中得到了高产漆酶。有报道的其他可提高漆酶产量的天然物质如洋葱、柠檬浆等。

培养基中直接加入木素、稻草、锯木屑等, 形成的半合成培养基可称作是一种选择性培养基, 可选择性地提高木素降解酶的产量。1985年 Arora 和 Sandhu<sup>[16]</sup> 报道加入 0.02% 的纯松木素 (Indulin AT) 给出最高漆酶产量。1989年 Gomez-Alarcon 等人报道 *Pycnoporus cinnabarinus* 在有 Kraft lignin (Indulin AT 0.05%) 存在时漆酶酶活提高了 3 倍<sup>[17]</sup>。1991年 Rogalski 报道木素磺酸盐和合成木素质选择性地提高了漆酶产量<sup>[18]</sup>。1992年 Massaphy 报道 *Pleurotus pulmonarius* 漆酶酶活在有棉花-小麦秆存在时产酶效果提高了 10 倍<sup>[19]</sup>。

### 4 诱导剂

结构和木素有关的低分子芳香化合物或木素降解的碎片化合物, 可作为漆酶的诱导剂提高酶活, 如香草酸、香豆酸、单宁酸、藜芦醇、阿魏酸、咖啡酸、地衣酚、苜蓿醇、焦儿茶酚、愈疮木酚、紫丁香醛、吐温 (Tween)、甲苯胺、二甲苯胺等。这些物质结构上的共同特征是芳核上连有 -OH 或 -NH<sub>2</sub> 基团。

大量文献报道了这些芳香化合物 (通常都有毒) 在适当的时间以适当的浓度加入培养基中时, 可提高漆酶活性。早在 1958 年 Fahraeus 就提出对 *Polyporus versicolor* 的漆酶来说, 2, 5-二甲苯胺是最有效的诱导剂<sup>[10]</sup>。这一结论已获公认, 现在二甲苯胺已成为一种常用的产漆酶诱导剂。另又有报道以对甲氧基苯胺 (茴香胺) 为诱导剂, *Rhizotonia praticola* 漆酶酶活被提高了 30 倍<sup>[20]</sup>。对不同的菌种来说, 不同的诱导剂对酶活的影响往往不同, 不同的菌有不同的最适宜诱导剂。

如果有两个不同的菌放在一起培养, 其中一个具产漆酶能力, 另一个本身不能分泌漆酶, 在这种情况下, 原来具产酶能力的菌的漆酶产量可能会得到提高。这种作用的结果与芳香化合物对漆酶的诱导作用结果相类似, 其中的机理目前还不是很清楚。由于起诱导作用的芳香化合物往往是有毒的, Freitag 等人推测漆酶的分泌与去毒作用有关; 同样, 在几种菌的混合培养体系里, 漆酶也与产酶菌的自身保护机制 (去毒) 有关<sup>[21]</sup>。

### 5 微量元素

微量元素, 如 Fe, Zn, Mn, Co, Cu 等, 往往或是酶的活性基的组成成分, 或是酶的激活剂, 对酶活的影响不容忽视。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 铜对漆酶有活

化作用<sup>[10]</sup>。Mn<sup>2+</sup>对漆酶酶活可能也有重要影响。不加Mn<sup>2+</sup>使*Agaricus campestris*的漆酶酶活显著降低,但Mn<sup>2+</sup>对其的影响是以有Cu<sup>2+</sup>存在为前提,如果没有Cu<sup>2+</sup>,那么漆酶酶活与Mn<sup>2+</sup>浓度无关,而且始终很低<sup>[22]</sup>。有报道高浓度的Mn<sup>2+</sup>会提高*Phlebia brevispora*漆酶酶活<sup>[23]</sup>,但对*Dichomitus squalenss*来说,漆酶酶活却不受Mn<sup>2+</sup>的影响<sup>[24]</sup>。Vares等人报道高浓度Mn<sup>2+</sup>抑制白腐菌*Phlebia tremellosa*的LiP酶活,但导致漆酶酶活升高,其中的原因可能与LiP-Laccase协同体系在木素降解过程中的机理有关<sup>[25]</sup>。

## 6 影响漆酶酶活的其他因素

影响漆酶酶活还有一些其他因素,如氮/碳源浓度、通气情况、培养温度、pH值乃至环境湿度等。

通氧会降低*Phlebia radiata*漆酶酶活<sup>[26]</sup>,纯氧则更是显著抑制其酶活<sup>[27]</sup>。培养温度和pH值对漆酶产生的影响因具体菌种而异,不同的菌种有不同的适宜培养温度和pH值。如表2所示。增加环境湿度可提高*Polyporus versicolor*漆酶酶活<sup>[28]</sup>。

表2 若干白腐菌分泌漆酶的适宜温度和pH值

菌种	培养温度(°C)	培养pH值	最高漆酶酶活	参考文献
<i>Polyporus pinsitus</i>	24		250—300u/ml	Kharazipour <sup>[15]</sup>
<i>Coriolus consors</i>	25	4.5	7.3u/ml	Ohio Pharmaceutical Co. Ltd. <sup>[29]</sup>
<i>Irpex lactus</i>	28	6.0		Arai et al. <sup>[30]</sup>
<i>Polyporus sanguineus</i>	37	3.0		Sandu & Arora <sup>[16]</sup>

## 参 考 文 献

[1] Givaudan A, Effose A, Faure D, et al. FEMS Microbiol Lett. 1993, 108:205~210.  
 [2] Faure D, Bouillant ML, Bally R. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(9):3413~3415.  
 [3] Youn H D, Hah Y C, Kang S O. FEMS Microbiol Lett, 1995, 132(3):183~188.  
 [4] Cliff S, Fauer M S, Maier G, et al. J Agric Food Chem, 1994, 42:1824~1828.  
 [5] Reid I D, Paice M G. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13(2-3):369~375.

[6] Martinez A T, Camarero S, Guillen F, et al. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13(2-3):265~273.  
 [7] Davis S, Burns R G. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(4):474~479.  
 [8] Bollag J M, Shuttleworth K L, Anderson B K. Appl Environ Microbiol, 1988, 54:3086~3091.  
 [9] Fahraeus G, Reinhammar B. Acta Chem Scand, 1967, 21(9):2367~2378.  
 [10] Bock S M. Phytochemistry, 1967, 6(6):777~783.  
 [11] Fahraeus G, Tullender V. Physiologia Plantarum, 1956, 9:494~501.  
 [12] Dawson-Andoh B E, Morrell, J J. Holzforschung, 1992, 46(2):117~120.  
 [13] Galliano H, Gas G, Boudet A M. FEMS Microbiol Lett, 1990, 67(3):295~299.  
 [14] Khaliwal R P S, Garcha H S, Khanna P K. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1992, 8:39~41.  
 [15] Kharazipour A, Huettermann A, Mayer F. Ger DE 1990, 4,033,246.  
 [16] Sandhu D K, Arora D K. Experientia, 1985, 4(3):355~356.  
 [17] Gomez-Alarcon G, Lahoz R, Molina D. J Basic Microbiol, 1989, 29(1):23~29.  
 [18] Rogalski J, Lundell T K, Leonowicz A, et al. Phytochemistry, 1991, 30(9):2869~2872.  
 [19] Massaphy S, Levanon D. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36(6):828~832.  
 [20] Shuttleworth K L, Posie L, Bollag J M. Can J Microbiol, 1986, 32(11):867~870.  
 [21] Freitag M, Morrell J J. Can J Microbiol, 1992, 38:317~323.  
 [22] Martin G, Legrand G. Bull Soc Chim Biol, 1959, 41:1463~1467.  
 [23] Peroz J, Jeffries T W. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(6):1806~1812.  
 [24] Peric F H, Gold M H. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(8):2240~2245.  
 [25] Vares T, Niememnaa O, Hatakka A. Appl Environ Microbiol. 1994, 60(2):569~575.  
 [26] Leonowicz A, Lundell T K, Rogalski J, et al. Acta Microbiol Pol, 1991, 40(3-4):205~220.  
 [27] Lundell T, Leonowicz A, Rogalski J, et al. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(9):2623~2629.  
 [28] Arora D S, Sandu D K. Acta Biotechnol, 1986, 6(3):293~297.  
 [29] Oho Pharmaceutical Co Ltd. Jpn Kokai Tokyo

Koho JP 1983, 58 47, 689.

Tokkyo Koho JP 1985, 60 156, 385.

[30] Arai T, Tamura S, Katsumata H, *et al.* Jpn Kokai