

毛栓菌产漆酶条件优化及该酶对合成染料脱色的特性

刘文华 蔡宇杰 范晶晶 廖祥儒*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】提高菌株 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 漆酶产量, 并研究该酶对合成染料脱色的性质。【方法】通过单因素和响应面设计, 对产漆酶培养基进行优化。【结果】最优培养基为: 玉米粉 20.0 g/L、马铃薯淀粉 32.4 g/L、酒石酸铵 2.9 g/L、吐温 80 0.5 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mmol/L、香兰素 0.54 mmol/L、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L; 最佳培养条件为: 培养温度 30 °C, 初始 pH 6.0, 装液量 40 mL/250 mL, 接种量 8%。【结论】培养 8 d 酶活达 35 U/mL, 是优化前的 39 倍。对漆酶催化合成染料脱色进行了考察, 发现该酶在 60 °C 下对偶氮类染料 AR1 和 RB5 能迅速脱色, 5 min 内即可完成。

关键词: *Trametes hirsuta* SYBC-L19, 漆酶, 优化, 响应面, 脱色

The optimization on laccase production from *Trametes hirsuta* and its property in the decolorization of synthetic dyes

LIU Wen-Hua CAI Yu-Jie FAN Jing-Jing LIAO Xiang-Ru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To improve laccase production and apply it to decolorize synthetic

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2010AA101501); 重大科技支撑与自主创新专项引导资金项目(No. BY2010117); 无锡市科技支撑计划项目(No. CSE01N1210)

*通讯作者: Tel: 86-510-85326880; 13771104596@163.com

收稿日期: 2012-07-01; 接受日期: 2012-10-24

dyes, we made this research. **[Methods]** The nutritional and environmental conditions for laccase production were investigated. **[Results]** The optimum conditions described as follows: corn flour 20.0 g/L, potato starch 32.4 g/L, ammonium tartrate 2.9 g/L, Tween 80 0.5 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mmol/L, vanilline 0.54 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, inoculation concentration 8%, pH 6.0, liquid volume 40/250 mL, culture temperature 30 °C. **[Conclusion]** With the conditions, the activity of laccase was achieved at 35 U/mL, was higher 39 times than control. The laccase was applied to decolorize synthetic dyes and it was found that the laccase could decolorize azo dyes AR1 and RB5 rapidly which could be completed in 5 minutes.

Keywords: *Trametes hirsuta* SYBC-L19, Laccase, Optimization, Response surface methodology, Decolorization

漆酶(Laccase, p -diphenoloxidase, EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶, Yoshida (日本学者吉田, 1883)首次从漆树中发现了该酶^[1]。漆酶广泛分布于多种植物^[2]和真菌, 部分细菌^[3]和昆虫中, 在一些动物肾脏和血清中也有发现^[4]。白腐菌是漆酶的主要生产菌类, 近几年对漆酶的研究也主要集中在真菌漆酶^[5]。漆酶是一种环境友好型酶类, 其催化底物单电子氧化形成自由基, 同时将分子氧还原形成水, 产生的自由基则偶合成二聚体或低聚物^[6]。漆酶可催化氧化多种底物, 如酚类及其衍生物、芳胺及其衍生物、羧酸及其衍生物、一些金属有机化合物和甾类激素、生物色素等, 在环境保护与修复、造纸工业、有机合成、食品工业、生物监测等领域有着广泛的应用前景^[7-9]。例如在染料脱色方面, 以白腐真菌为主的一组丝状真菌对染料的降解脱色在近 20 年来成为染料生物脱色研究的热点和主流^[10]。

尽管漆酶在自然界中分布广泛, 但无论是从自然界中筛选还是进行改造, 真正具有高漆酶产量的菌株并不多, 因此通过优化培养条件提高漆酶产量是目前的一种主要手段。毛栓菌(*Trametes hirsuta*), 隶属于菌物界, 担子菌门, 伞菌纲, 多孔菌目, 多孔菌科, 是一类重要的产漆酶白腐

菌。本文通过单因素和响应面方法, 对筛选的具有较高漆酶产量的 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 菌株进行了培养条件的优化, 同时探索了该漆酶在合成染料脱色方面的性质。优化后的酶活达 35 U/mL, 并且该酶对偶氮染料 AR1 和 RB5 能够高效降解, 具有工业生产及应用潜力。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

毛栓菌 *Trametes hirsute* SYBC-L19, 于无锡鼋头渚板栗树上筛得, 向 NCBI 提交其 ITS 区序列获得登录号为 JX861099。

1.2 主要试剂

DMP (2,6-Dimethoxyphenol)、ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)] 购自于 Sigma 公司, 玉米粉、豆粕、麸皮、花生饼粉、土豆等为市售, 其余有机及无机试剂为国产分析纯试剂(AR)。

1.3 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然。

种子培养基(g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, pH 自然。

初始培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酒石酸铵 4, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.375 (1.5 mmol/L), 愈创木酚 0.062 (0.5 mmol/L), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, pH 自然。

以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 方法

1.4.1 种子液制备: 将毛栓菌 *Trametes hirsute* SYBC-L19 菌株接种于 PDA 平板培养基上, 30 °C 培养 5–6 d, 待菌丝均匀长满平板的临界位置时, 用 0.9 cm 打孔器在菌落边缘截取 6 片菌块, 置于含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 并在 30 °C、200 r/min 条件下培养 48 h。

1.4.2 发酵产酶: 将种子液接种于含有 50 mL 产酶基础培养基的 250 mL 三角瓶中, 初始接种量为 10%, 在 30 °C、200 r/min 条件下振荡培养 10 d, 结束发酵。每个样品做 3 个平行。

1.4.3 粗酶液制备: 发酵产酶结束后, 取发酵液, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即为漆酶粗酶液。

1.4.4 漆酶活力的测定: 用 DMP 法测定^[11], 以每分钟氧化 1 μmol 的 DMP 转化成 3,5,3',5'-四甲氧基二苯醌 [$\epsilon=49.6 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$] 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。实验中以灭活后的发酵粗酶液(煮沸 20 min)为对照进行测定, 以消除培养基中各种成分可能对酶活测定造成的影响。

1.5 漆酶分泌条件的优化

1.5.1 碳氮源对漆酶分泌的影响: 改变初始培养基中的碳源种类, 其他条件不变, 发酵完后测定漆酶活力; 在初始培养基中加入不同含量的最适碳源, 在相同培养条件下发酵后测定漆酶活力。以碳源优化培养基为基础, 用不同的氮源代替初始培养基中的酒石酸铵, 其他条件不变, 培养结束后测定漆酶活力; 选出最适氮源, 改变其含量进行发酵, 结束后测定漆酶活力。

1.5.2 铜离子及诱导剂对漆酶分泌的影响: 良好的诱导剂能促进漆酶的合成^[12]。以碳氮源优化好的培养基作为基础, 改变其中铜离子的含量(作为诱导剂的铜离子为二价铜离子, 引入形式为 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 进行发酵产酶, 结束后测定漆酶活力; 改变小分子诱导剂的种类(初始含量为 0.5 mmol/L)和含量进行发酵产酶, 结束后测定漆酶活力; 添加不同种类的表面活性剂(初始含量为 0.05%)并改变其含量进行发酵产酶, 发酵完后测定漆酶活力。以上三类诱导剂均在发酵培养的第 3 天加入。

1.5.3 响应面分析实验: 根据单因素试验的结果, 选出对漆酶分泌影响较大的 3 个因素: 马铃薯淀粉、酒石酸铵、香兰素, 以此设计中心组合实验(CCD), 对三因素的添加量进行系统的优化, 获得最优结果。

1.5.4 发酵条件对漆酶分泌的影响: 在优化培养基的基础上, 利用单因素实验法, 分别考察温度、pH、装液量和接种量对漆酶分泌的影响, 以确定漆酶发酵生产的最佳培养条件。

1.6 发酵液对合成染料的脱色

本文对两大类共 6 种染料进行漆酶脱色性质的考察, 分别为(染料后面括号为染料实验浓度下的最大吸收波长): AR1 (506)、RB5 (597)、刚果红(595)、RB4 (595)、AB129 (629)、RBBR (592), 前 3 种为偶氮类染料, 后 3 种为蒽醌类染料。

3 mL 反应体系中包含 1 U 漆酶, 20 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0), 不同终浓度的染料溶液(AR1、RB5、刚果红、RB4、AB129、RBBR 分别为 10.0、18.3、25.0、35.0、83.3、50.0 mg/L)。蒽醌类染料能被漆酶降解, 而偶氮类染料需要加入小分子介体参与协助才能被降解^[13], 因此偶氮类额外加入终浓度为 1 mmol/L 的 HOBT。分别在 25 °C (室温)和 60 °C (DMP 为底物时的最适反应温度)下反应一段时间测吸光

值。对照组中,使用高温灭活后的漆酶代替有活性的漆酶。

2 结果与讨论

2.1 漆酶发酵条件的优化

2.1.1 碳源对漆酶分泌的影响:向培养基中添加不同种类的碳源,可以获得该菌产漆酶的最佳碳源,如图 1A 所示,玉米粉为碳源时漆酶酶活力最高,马铃薯淀粉和可溶性淀粉次之,其余物质

作为碳源时酶活都低于初始培养基时的酶活,因此以玉米粉为发酵碳源。图 1B 为玉米粉含量对产漆酶的影响,漆酶活力随着玉米粉含量的增加而增加,但在实验中发现,当玉米粉含量超过3%时,培养基灭菌之后较粘稠,不利于发酵生产,而低浓度的玉米粉往往导致发酵过程中碳源的缺乏,因此考虑加入第二碳源。玉米粉的最佳浓度则以每 1%玉米粉含量所产酶活力最高时的浓度计,即 2%。

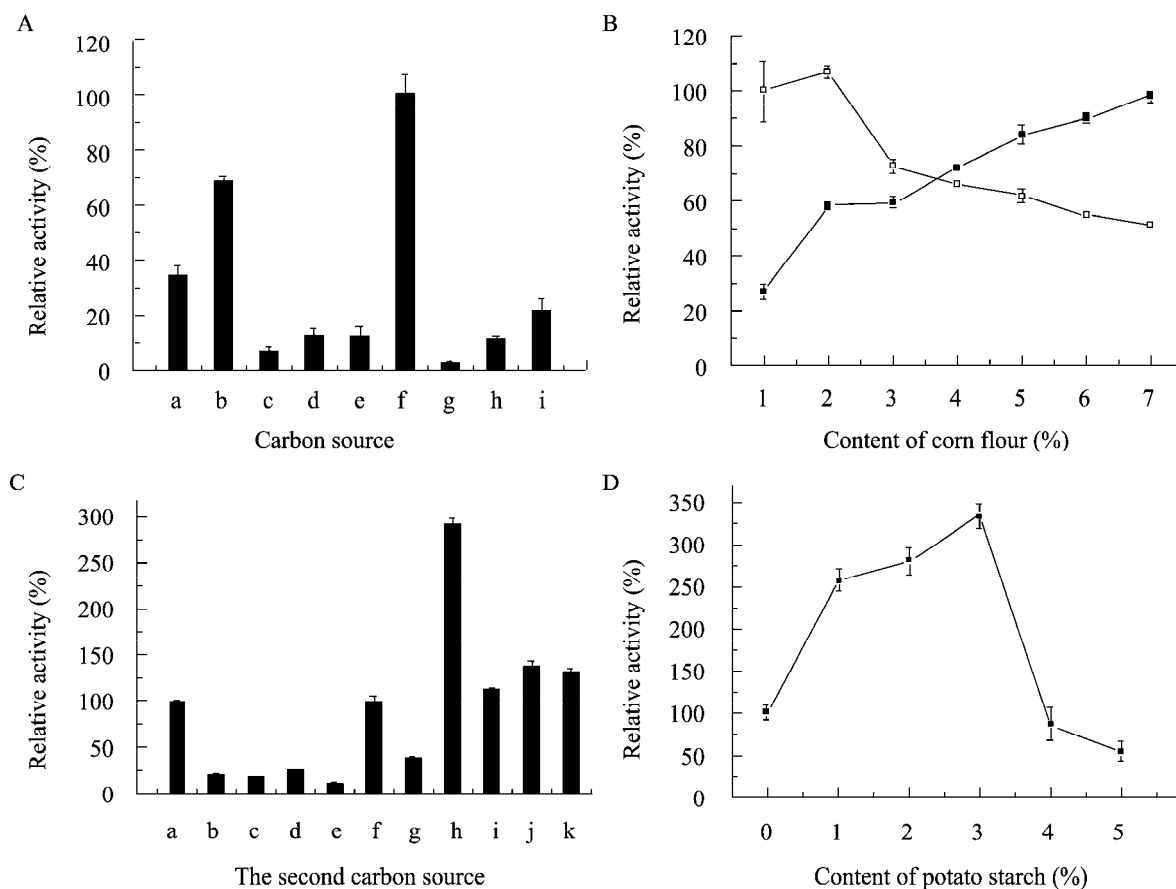


图 1 碳源种类及含量对漆酶分泌的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources and its content on the laccase production

注: A: a-i: 可溶性淀粉, 马铃薯淀粉, 蔗糖, 果糖, 麦芽糖, 玉米粉, 麸皮, 乳糖, 葡萄糖。B: ■-■: 不同玉米粉含量的相对酶活; □-□: 不同玉米粉含量中每 1%玉米粉含量的相对酶活。C: a-k: 空白, 甘蔗渣, 餐厨垃圾, 水葫芦, 花生饼粉, 乳糖, 可溶性淀粉, 马铃薯淀粉, 葡萄糖, 麦芽糖, 果糖。

Note: A: a-i: Soluble starch, potato starch, sucrose, fructose, maltose, corn flour, wheat bran, lactose, glucose. B: ■-■: Relative activity of different corn flour content; □-□: Relative activity of each 1% corn flour in different corn flour content. C: a-k: Control, bagasse, food waste, water hyacinth, peanut meal, lactose, soluble starch, potato starch, glucose, maltose, fructose.

以 2% 玉米粉作为初始培养基的碳源, 其他条件不变, 添加不同种类的其他碳源(2%)作为第二碳源, 结果如图 1C 所示, 马铃薯淀粉比用其他碳源所产漆酶活力提升显著, 因此以马铃薯淀粉为第二碳源。对其含量进行研究, 如图 1D 所示, 当含量为 3% 时有最高酶活, 继续增加马铃薯淀粉含量, 酶活迅速下降, 因此选择马铃薯淀粉的添加量为 3%。

2.1.2 氮源对漆酶分泌的影响: 氮源对漆酶分泌的影响见图 2。

图 2A 显示了不同氮源对漆酶分泌的影响, 含有铵离子的无机氮源对毛栓菌分泌漆酶有明显的促进作用, 有机氮源对漆酶的分泌作用不大, 其中以酒石酸铵为氮源的培养基产漆酶活力最高, 因此选择酒石酸铵为最佳氮源。图 2B 显示了酒石酸铵含量对漆酶分泌的影响, 当其含量为 0.4% 时酶活达最大值, 之后酶活力迅速下降, 可能由于高浓度的铵离子不利于菌体生长从而影响产酶量。

2.1.3 铜离子及诱导剂对漆酶分泌的影响: 漆酶中含有多个铜离子, 构成了酶的活性中心。许多

研究表明, 铜离子能通过诱导基因表达、翻译和翻译后调控等方式调控漆酶的合成^[14-16]。

图 3 显示了铜离子加入量对漆酶分泌的影响。结果表明加入铜离子对毛栓菌漆酶的分泌有明显的促进作用, 其不同的加入量虽然影响不同但差异不大; 当铜离子浓度为 2 mmol/L 时漆酶酶活最高, 较空白对照提高了约 35%; 而后漆酶活力有大幅度降低, 可能是由于在第 3 天时发酵液中菌体量已达到一定浓度, 受铜离子的毒害作用较小。

图 4 显示了小分子诱导物对漆酶分泌的影响。由图 4A 可知: 香兰素和愈创木酚对漆酶的分泌有促进作用, 香兰素的促进作用最大; 阿魏酸、ABTS 和 DMP 对毛栓菌产漆酶影响很小; 苜蓿胺和苯胺对漆酶的分泌有抑制作用, 结合实验中发酵情况分析, 可能是因为两者对菌体生长造成了影响, 含有两者的发酵液中菌体含量明显较少。图 4B 为香兰素含量对漆酶分泌的影响, 表明低浓度的香兰素对漆酶分泌影响不大, 当含量为 0.50 mmol/L 时酶活力最大。

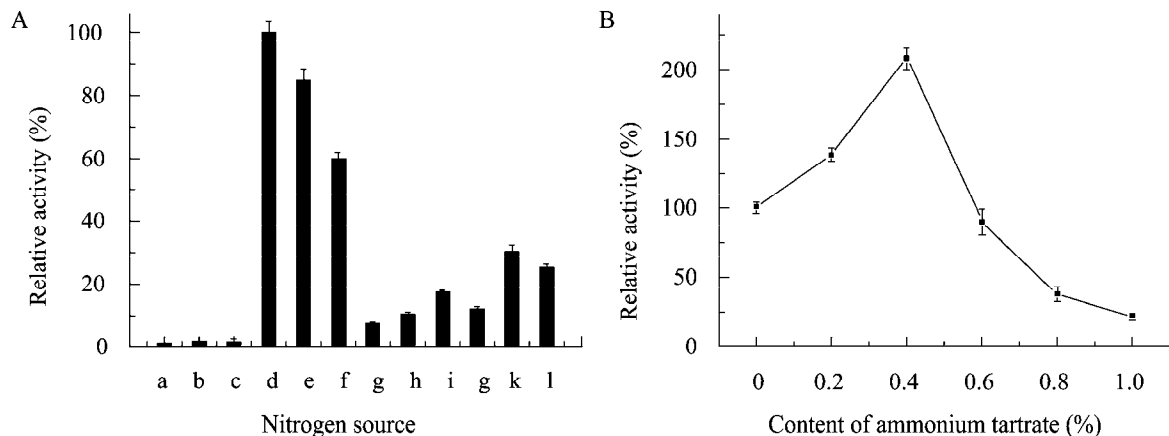


图 2 氮源种类(A)及其含量(B)对漆酶分泌的影响

Fig. 2 Effect of inorganic salts on the laccase production

注: a-l: 花生饼粉、豆粕、麸皮、酒石酸铵、硫酸铵、磷酸二氢铵、玉米浆粉、硝酸铵、蛋白胨、硝酸钾、牛肉膏、酵母膏。
Note: a-l: Peanut meal, soybean meal, wheat bran, ammonium tartrate, ammonium sulfate, ammonium dihydrogen phosphate, corn slurry powder, sodium nitrate, peptone, potassium nitrate, beef extract, yeast extract.

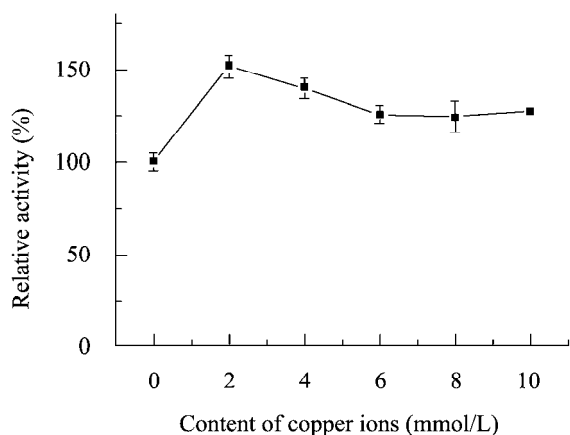


图3 铜离子含量对漆酶分泌的影响

Fig. 3 Effect of copper content on the laccase production

图5显示了表面活性剂对漆酶分泌的影响。如图5A所示:吐温80对漆酶分泌有促进作用,其余表面活性剂特别是吐温20都对漆酶分泌有明显的抑制作用,分析原因可能是由于这些表面活性剂对细胞造成了一定的损害,影响了漆酶的分泌。

2.1.4 中心组合实验:通过上述单因素实验大致确定了碳氮源、诱导剂的种类和含量,并且可以分析出含量对于漆酶分泌较重要的物质是马铃薯淀粉、酒石酸铵和香兰素,而其余物质,尤其是铜离子,其含量的变化对漆酶分泌的影响较这

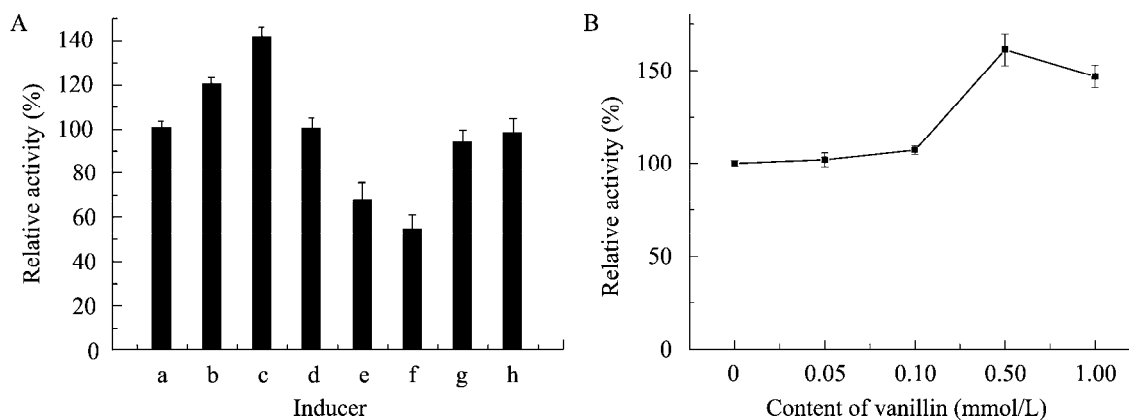


图4 诱导剂种类(A)及其含量(B)对漆酶分泌的影响

Fig. 4 Effect of inducers (A) and its content (B) on the laccase production

注: a-h: 空白、愈创木酚、香兰素、阿魏酸、苄胺、苯胺、ABTS、DMP.

Note: a-h: Control, guaiacol, vanillin, ferulic acid, benzylamine, aniline, ABTS, DMP.

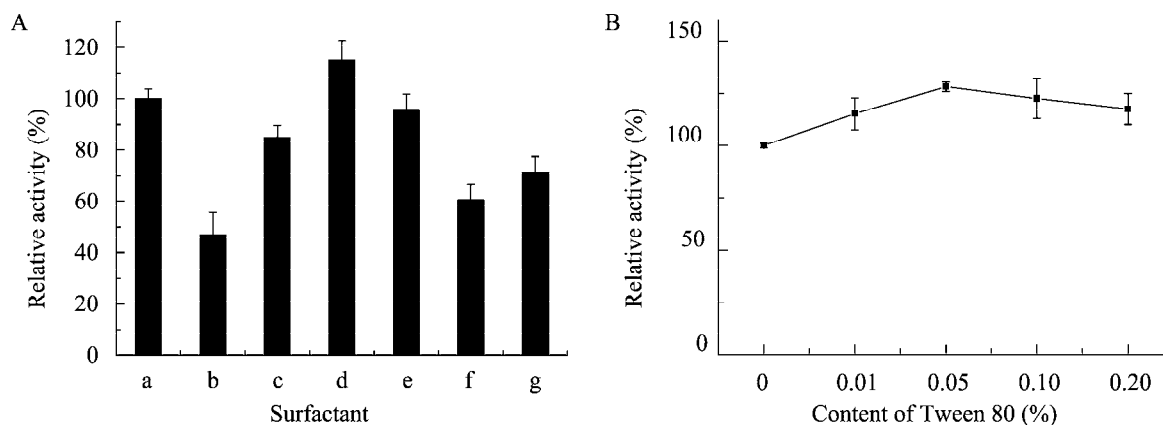


图5 表面活性剂及其含量对漆酶活性的影响

Fig. 5 Effect of surfactants and its content on the laccase production

注: a-g: 空白、吐温20、吐温60、吐温80、曲拉通X-100、SDS、脱氧胆酸钠.

Note: a-g: Control, Tween 20, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, SDS, sodium deoxycholate.

3 种物质小, 可见这 3 种物质对漆酶的分泌影响较大, 因而对三者利用中心组合实验进行进一步优化, 得出两者的最优值。实验设计水平和实验结果见表 1。

根据实验数据, 利用软件 Design-Expert 拟合所得的二次多项式为:

$$Y=20.02+1.59X_1-2.59X_2+0.40X_3+0.50X_1X_2-0.32X_1X_3-0.23X_2X_3-2.77X_1^2-3.04X_2^2-1.58X_3^2$$

中心组合实验的方差分析(AVONA)见表 2, 该模型的 $P<0.0001$, 说明该模型在 99.99% 概率水平下是极其显著的, 而失拟合不显著 $P>0.05$, 表明该模型不需再引入其他因素。该模型的决定系数 $R^2=0.9523$, 表明实验 95.23% 的变化情况能由该模型能解释。另外, $R^2_{Adj}=0.8838$, 两者接近, 表明该实验模型是合适的。

表 1 中心组合设计水平、编码及实验结果
Table 1 Experimental design and results of the central composite design

实验号 Experiment No.	因素 Factor						漆酶活力	
	马铃薯淀粉(X_1)		酒石酸铵(X_2)		香兰素(X_3)		Laccase activity (U/mL)	
	Potato starch		Ammonium sulfate		Vanillin		实际值 Actual	预测值 Predicted
	编码值 Code	实际值 Actual (%)	编码值 Code	实际值 Actual (%)	编码值 Code	实际值 Actual (mmol/L)		
1	-1.682	1.32	0.000	0.35	0.000	0.50	7.95	9.51
2	-1.000	2.00	-1.000	0.20	1.000	0.80	16.76	15.09
3	0.000	3.00	0.000	0.35	1.682	1.00	15.73	16.24
4	1.000	4.00	-1.000	0.20	1.000	0.80	16.24	16.62
5	1.000	4.00	1.000	0.50	-1.000	0.20	11.34	12.28
6	-1.000	2.00	1.000	0.50	-1.000	0.20	8.58	7.47
7	-1.000	2.00	-1.000	0.20	-1.000	0.20	13.68	13.18
8	1.000	4.00	1.000	0.50	1.000	0.80	12.21	11.98
9	-1.000	2.00	1.000	0.50	1.000	0.80	8.37	8.44
10	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	21.08	20.02
11	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	22.64	20.02
12	0.000	3.00	0.000	0.35	-1.682	0.00	14.36	14.89
13	1.000	4.00	-1.000	0.20	-1.000	0.20	16.78	15.98
14	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	18.64	20.02
15	0.000	3.00	1.682	0.60	0.000	0.50	7.21	7.06
16	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	18.54	20.02
17	1.682	4.68	0.000	0.35	0.000	0.50	15.38	14.85
18	0.000	3.00	-1.682	0.10	0.000	0.50	14.57	15.76
19	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	18.96	20.02
20	0.000	3.00	0.000	0.35	0.000	0.50	20.44	20.02

表 2 中心组合实验设计方差分析
Table 2 Analysis of variance of the central composite design

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值(Prob>F) P value
Model	369.83	9	41.09	17.05	<0.000 1
X_1	34.40	1	34.40	14.27	0.003 6
X_2	91.44	1	91.44	37.94	0.000 1
X_3	2.22	1	2.22	0.92	0.360 0
X_1X_2	2.02	1	2.02	0.84	0.381 5
X_1X_3	0.81	1	0.81	0.33	0.575 8
X_2X_3	0.44	1	0.44	0.18	0.677 6
X_1^2	110.65	1	110.65	49.91	<0.000 1
X_2^2	133.61	1	133.61	55.44	<0.000 1
X_3^2	35.79	1	35.79	14.85	0.003 2
Residual	24.10	10	2.41		
Lack of fit	10.27	5	2.14	0.80	0.592 9
Pure error	13.38	5	2.68		
Total	399.94	19			

根据对回归方程进行求导, 结合图 6A-C 的三维响应图, 求得该模型的因变量 Y 最大时, 解为: $X_1=0.241$, $X_2=-0.410$, $X_3=0.134$, 对应的马铃薯淀粉、酒石酸铵、香兰素的量分别为 3.24%、0.29%、0.54 mmol/L, 模型的最大响应值为 20.77。图 6D 展现了实际值与预测值的分布情况, 两者都均匀分布在直线附近, 表明该模型与事实相符。

2.2 发酵条件对漆酶分泌的影响

培养条件对菌体的生长和代谢产物的分泌有重要的影响, 本研究对温度、pH、接种量和装液量等培养条件进行了优化, 结果见图 7。

图 7A 展示了温度对漆酶分泌的影响, 结果表明, 在 25 °C 下产酶较低, 只有最高酶活时的 40%, 温度当达到 30 °C 时, 漆酶分泌达到最高, 而后漆酶分泌逐渐降低。表明较高和较低的温度均不利于漆酶的分泌。

图 7B 展现了培养基 pH 对漆酶分泌的影响, 其中 pH 5.5 为培养基的自然 pH, 图 7B 表明在 pH 2.0-8.0 范围内有 2 个最大值, 即 pH 3.0 和 pH 6.0, 均大于自然时的酶活, 而其余 pH 下酶活均明显小于自然时的酶活, 表明 pH 对 *Trametes hirsute* SYBC-L19 分泌漆酶的影响很大; 当在 pH 为 6.0 时, 漆酶活性最高, 说明该菌在 pH 6.0 培养基中漆酶分泌最佳。

图 7C 展现了接种量对漆酶分泌的影响, 接种量在小于 2% 和大于 12% 时的漆酶酶活都为最高酶活的 80%, 说明接种量对漆酶的分泌影响较小, 当接种量达到 8% 时漆酶酶活最高。

图 7D 展示了装液量对漆酶分泌的影响, 结果表明: 装液量对漆酶分泌的影响不大, 当装液量为 40 mL/250 mL 时有最高酶活, 当装液量大于 80 mL/250 mL 时, 酶活下降, 这是由于装液量增大, 溶氧条件变差造成的。

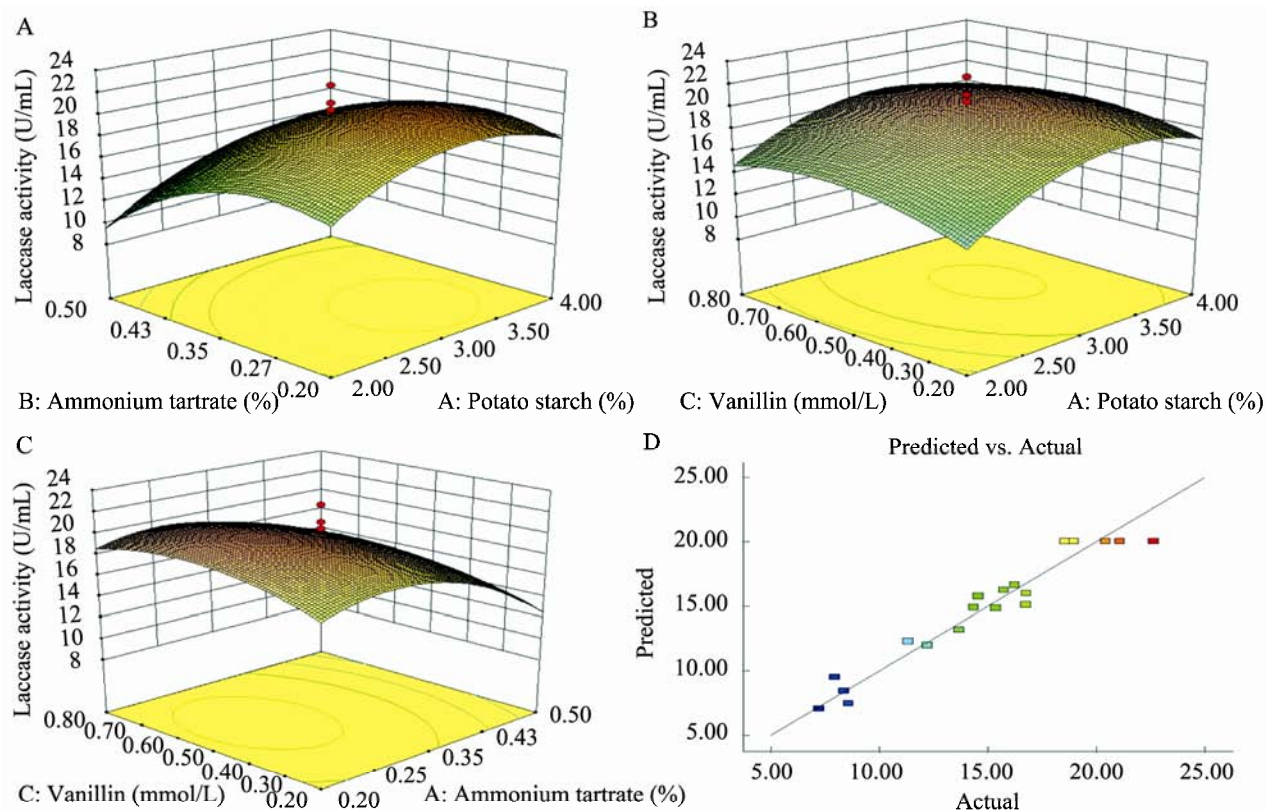


图 6 响应面运行结果关系图

Fig. 6 the Results of respond surface design

注: A: 酒石酸铵和马铃薯淀粉对漆酶分泌的三维图; B: 香兰素和马铃薯淀粉对漆酶分泌的三维图; C: 香兰素和酒石酸铵对漆酶分泌的三维图; D: 模型的预测值和实际值的关系图。

Note: A: Response surface plot between ammonium tartrate and potato starch; B: Response surface plot between vanilline and potato starch; C: Response surface plot between vanilline and ammonium tartrate; D: Plot of predicted vs. actual laccase activity.

2.3 优化前后 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 产漆酶情况

用优化后的培养基及培养条件进行发酵产酶, 获得产酶曲线, 并与优化前的产酶情况相比较, 结果如图 8 所示, 培养基及发酵条件优化后, *Trametes hirsuta* SYBC-L19 产酶量显著提升, 在第 8 天有最大酶活, 约 35 U/mL, 比优化前的最大酶活 0.9 U/mL 提高了 39 倍, 最高产酶时间提前了 2 d。

2.4 漆酶对合成染料脱色性质的研究

不同菌所产的漆酶对合成染料的脱色性质不尽相同, 对合成染料脱色的特异性也成为漆酶的

一种性质, 寻找对合成染料高效脱色的漆酶可为合成染料的生物降解提供帮助, 因此对 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 所产漆酶进行了合成染料脱色性质的研究。结果如图 9 所示。

图 9A 和图 9B 显示的染料脱色的温度分别为 60 °C 和 25 °C。对于偶氮类染料, AR1 和 RB5 在 60 °C 下能迅速脱色, 5 min 内即可完成脱色, 在 25 °C 下 RB5 脱色较 AR1 快, 30 min 内可分别脱色 70% 和 50%, *Trametes hirsuta* SYBC-L19 漆酶对刚果红脱色能力不强, 在 60 °C 和 25 °C 下反应 30 min 分别可脱色 20% 和 10%。

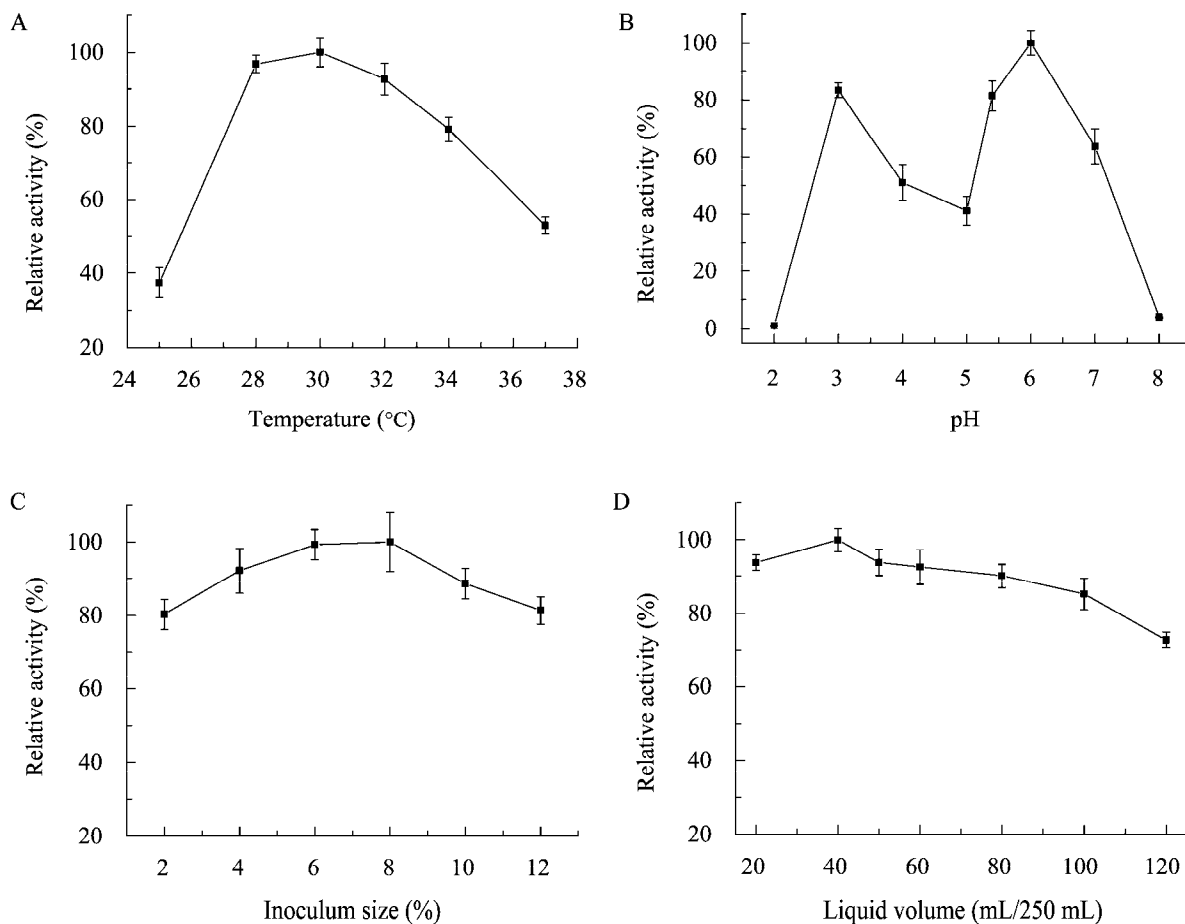


图 7 发酵条件对漆酶分泌的影响

Fig. 7 Effect of fermentation conditions on the laccase production

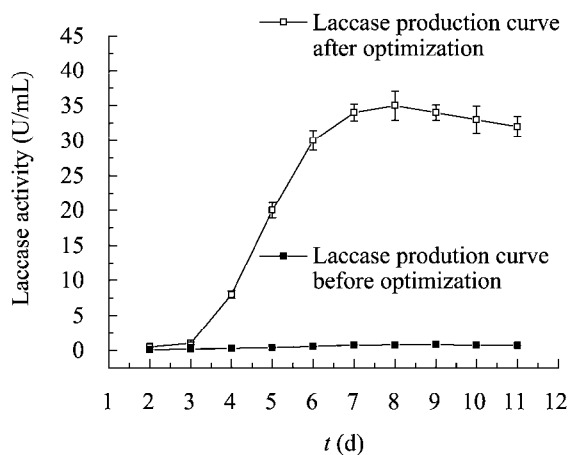


图 8 优化前后产漆酶曲线

Fig. 8 The curve of laccase production before and after optimization

对于蒽醌类染料, RB4 和 RBBR 在较低的温度下脱色较快, 30 min 内脱色约 60%, AB129 在 60 °C 下比在 25 °C 时脱色稍快, 30 min 内能分别脱色 50% 和 40%。

3 结论

本文以提高漆酶产量为目的, 以单因素实验和响应面设计为手段, 对所筛选的菌株 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 的产漆酶培养条件进行了优化, 获得最优培养基为: 玉米粉 20 g/L, 马铃薯淀粉 32.4 g/L, 酒石酸铵 2.9 g/L, 吐温 80 0.5 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mmol/L, 香兰素 0.54 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L,

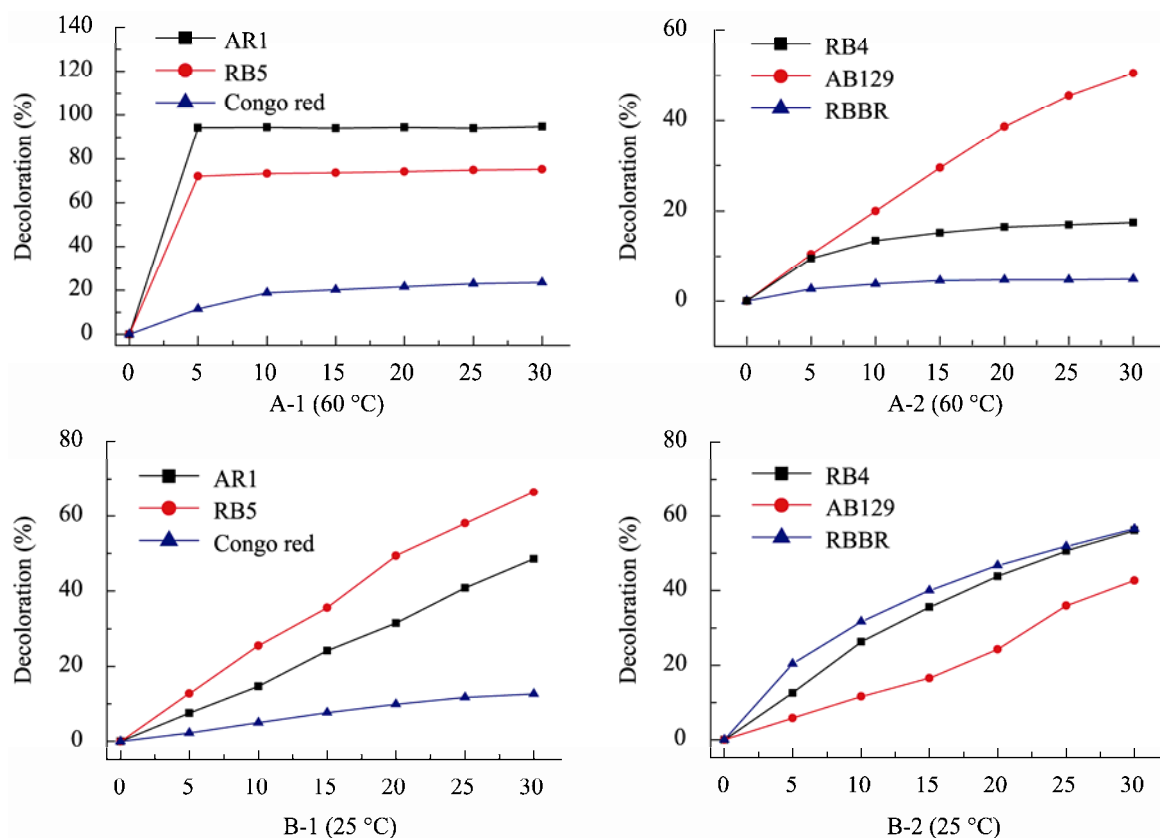


图9 漆酶对合成染料脱色的影响

Fig. 9 Effect of laccase on different synthetic dyes

MnSO₄·H₂O 0.1 g/L。最佳培养条件为: 培养温度 30 °C、初始 pH 6.0、装液量 40 mL/250 mL、接种量 8%, 200 r/min 摇瓶培养 8 d 酶活性达 35 U/mL, 较优化前 0.9 U/mL 提高了 39 倍, 产量较高, 有一定的工业化应用价值。

同时, 本文对 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 漆酶催化合成染料脱色进行了考察, 发现该酶在 60 °C 下对偶氮类染料 AR1 和 RB5 能迅速脱色, 5 min 内即可完成, 为两种合成染料的生物脱色提供了一种方法。

参考文献

- [1] Yoshida H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi) part 1. Communication from the chemical society of Tokio[J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1883, 43: 472–486.
- [2] Ahmadi N, Mibus H, Serek M. Isolation of an ethylene-induced putative nucleotide laccase in miniature roses (*Rosa hybrida* L.)[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2008, 27(4): 320–330.
- [3] Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(2): 41–42.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 219–226.
- [7] Couto SR, Herrera JLT. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 500–513.

- [8] Ballerina P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215–242.
- [9] Vianello F, Ragusa S, Cambria MT, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(11): 2155–2160.
- [10] 杨清香, 贾振杰, 杨敏. 微生物染料脱色研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 144–148.
- [11] 胡艳, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄菌液态发酵产漆酶培养条件的优化[J]. 食品科学与生物技术学报, 2011, 30(5): 773–778.
- [12] Couto SR, Gundín M, Lorenzo M, et al. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(3): 249–255.
- [13] Wong YX, Yu J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes[J]. Water Research, 1999, 33(16): 3512–3520.
- [14] Galhaup C, Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(1/2): 225–232.
- [15] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied and Environment Microbiology, 2000, 66(3): 920–924.
- [16] Lorenzo M, Moldes D, Sanromán MA. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes[J]. Chemosphere, 2006, 63(6): 912–917.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2013年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413