

# 不同诱导物对白腐菌 XG8 菌株产漆酶的影响

吴丽洁<sup>1</sup>, 林连兵<sup>1</sup>, 陈克利<sup>2</sup>, 岳凤霞<sup>2</sup>, 魏云林<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学 生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650224 2 昆明理工大学 化学工程学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 利用木素溶液、蔗渣、乙醇及硫酸铜溶液分别对菌株 XG8 进行产漆酶诱导研究, 其中蔗渣的诱导效果最明显. 在静置培养时, 发酵液中漆酶的活力提高了 4 倍; 当利用蔗渣、乙醇及硫酸铜同时进行诱导时, 漆酶活性与对照相比, 提高了 10 倍. 这些廉价的诱导物很适合应用于大规模的工业化生产.

**关键词:** 白腐菌; 漆酶; 诱导物; 蔗渣

**中图分类号:** Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2008)06-0094-04

## Effect of Several Inducers on Laccase Production of White Rot Fungus Strain XG8

WU Lijie<sup>1</sup>, LIN Lianbing<sup>1</sup>, CHEN Keli<sup>2</sup>, YUE Fengxia<sup>2</sup>, WEI Yunlin<sup>1</sup>

(1. Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

2. Faculty of Biological and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

**Abstract** Lignin, bagasse, ethanol and copper sulphate are used as inducers for fungus strain XG8 to produce laccase. It is shown through the results that bagasse has the highest induction efficiency than the other inducers. In static culture, the laccase activity is increased four times. When induced with bagasse, ethanol and sulphate copper together, the laccase activity is ten times of that of the control. These inducers are quite suitable for inducing white rot fungus to produce laccase on a large scale for their low prices.

**Key words** white rot fungus, laccase, inducer, bagasse

### 0 引言

白腐真菌是自然界最重要的木素降解菌, 其产生和分泌一系列能降解木质素及其异生物质的酶类, 主要包括木素过氧化物酶, 锰过氧化物酶和漆酶<sup>[1]</sup>. 漆酶主要是由引起木材白色腐朽的担子菌分泌<sup>[2]</sup>, 是重要的木素降解酶, 属于含铜的一类多酚氧化酶, 它可以通过分子氧使酚化合物氧化<sup>[3]</sup>, 脱除木材、纸浆中的木素, 使纸浆和造纸工业中的流出物脱色和降解, 能显著减少排放到环境中的有毒污染物<sup>[4]</sup>.

据报道, 酚类底物、乙醇和某些金属离子对漆酶的产生和分泌有诱导作用<sup>[5]</sup>. 酚类底物通常都含较多的 -OH, -NH<sub>2</sub>, 木质素是由香豆醇、松柏醇及芥子醇等苯丙烷单体构成的聚合物作为底物类似物, 可以在一定的程度上诱导漆酶的产生. 醇类对漆酶的产生也有一定的诱导作用, 乙醇的诱导机制主要分为以下三点: ①增加了膜的渗透性, 促进蛋白的分泌; ②防止单个芳香化合物聚合; ③通过氧化作用间接诱导漆酶的合成<sup>[5]</sup>. 金属离子的诱导作用有很多报道, 其中 CuSO<sub>4</sub> 是使用最多、诱导最好的重金属诱导剂, Cu<sup>2+</sup> 的加入从两方面提高了漆酶的活性, 促进了漆酶的合成, 增强了漆酶在细胞外环境中的稳定性.

本试验选用食用菌 XG8 菌株(侧耳属), 研究木素、蔗渣、乙醇及不同铜离子浓度对其产漆酶能力的影响, 探索 XG8 菌株产漆酶的最佳诱导条件.

收稿日期: 2008-03-21. 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 20567001).

第一作者简介: 吴丽洁(1982-), 女, 硕士生. 主要研究方向: 微生物学. E-mail: wlyjokplac@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

食用菌 XG8 菌株: 购于昆明食用菌研究所。

### 1.2 培养基、诱导物及培养条件

#### 1.2.1 培养基

培养基组成:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g NaCl, 0.5 g  $KH_2PO_4$ , 1.0 g  $NH_4SO_4$ , 1.0 g 酵母粉, 1.0 g 葡萄糖, 15 g 加水定容至 1 L, 调 pH 值为 5~6 该培养基主要用于保藏菌种及在诱导试验中做为基础培养基。

#### 1.2.2 诱导物

木素溶液: 将 3.5 g 木质素颗粒溶于 115 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 115 °C 灭菌 20 min 使用前于 12 000 r/min 离心 2 min 上清液即为木素溶液。在诱导试验中, 待菌丝体培养 4 d 后在 100 mL 培养液中加入 0.5 mL 木素溶液。

$CuSO_4$  溶液: 配制 1 g/L 的  $CuSO_4$  原始溶液, 115 °C 灭菌 20 min 在诱导试验中, 待菌丝体培养 4 d 后, 分别向 100 mL 的培养液中加入 1 g/L 的  $CuSO_4$  溶液, 使培养液中  $CuSO_4$  终浓度分别为 5 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L。

乙醇溶液: 无水乙醇用 0.2  $\mu m$  的滤膜过滤除菌。在诱导试验中, 待菌丝体培养四天后, 分别向 100 mL 的培养液中加入 2.5 mL, 3.875 mL, 5.375 mL, 6.25 mL 无水乙醇, 使培养液中乙醇终浓度分别为 20 g/L, 31 g/L, 43 g/L, 50 g/L。

固体蔗渣: 称取 1 g 长约 2 cm 的蔗渣于 115 °C 灭菌 20 min 在诱导试验中, 待菌丝体培养 4 d 后添加入培养液中。

#### 1.2.3 培养条件

将适量菌苔接种到 100 mL 葡萄糖液体培养基中, 于 25 °C 静止培养 10 d 收获菌体, 后用 30 粒已灭菌的玻璃珠 (直径 2 mm) 将菌体破碎, 将破碎的菌体等量接种到装有 100 mL 液体基础培养基的 250 mL 的三角瓶中, 分别在静止、振荡及添加诱导物等不同条件下进行培养, 其中诱导物在菌体培养 4 d 后添加到培养液中, 进行诱导培养。

### 1.3 漆酶活力测定

漆酶测定以 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (简称 ABTS) 为底物, 反应体系中含有 0.15 mmol/L ABTS, 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.2) 和适量的粗酶液, 于 30 °C 下反应 5 min 测定反应液在 420 nm 处吸光值的增加值 ( $\epsilon_{420} = 36\ 000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )。定义每分钟使 1  $\mu mol$  ABTS 转化所需的酶量为 1 个活力单位 (U)。

## 2 结果

### 2.1 木素、蔗渣诱导下 XG8 菌株的产酶情况

白腐菌为严格好氧菌, 从图 1 可以看出培养方式对产酶的影响非常明显。XG8 菌株在整个产酶过程中, 静止培养的最高酶活力为 83.64 U/L, 而振荡培养的最高酶活力仅为 14.7 U/L。静止培养 13 d 后漆酶活力达到 60.53 U/L, 第 18 d 时其活力最高, 并保持相对稳定。振荡培养 9 d 后达到最高酶活, 在随后的 11 d 中漆酶酶活比较稳定。

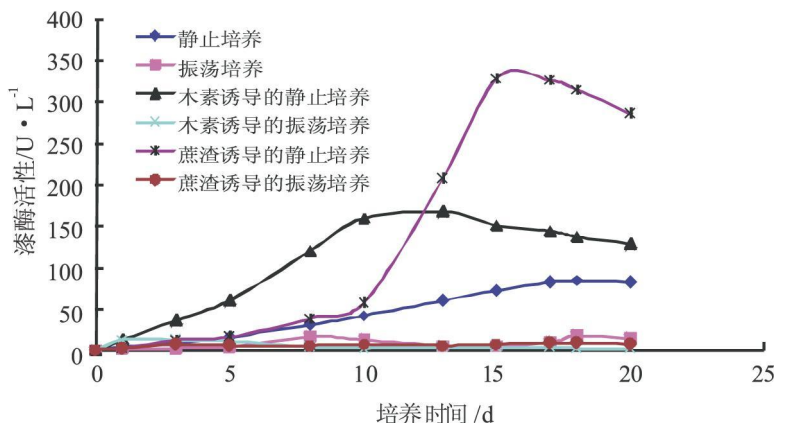


图1 木素、蔗渣诱导下的漆酶酶活比较

Fig.1 Comparison of laccase activity induced by lignin and bagasse

加入木素溶液诱导后, 静止培养的最高酶活为 166.44 U/L, 是对照样品(静止培养, 未加木素, 图 1)酶活的 2 倍. 在 0 至 11 d 中, 随着培养时间的延长, 静止培养的漆酶活力迅速增加, 第 11 d 漆酶酶活达到最高值, 并在随后的几天中保持稳定. 振荡培养的最高酶活只有 11.4 U/L, 没有明显的产酶高峰.

加入蔗渣诱导后的 XG8 菌株静止培养时, 在第 15 d 达到最高酶活 328 U/L, 与对照相比, 漆酶活力提高了 4 倍. 振荡培养下的 XG8 菌株没有出现明显的产酶高峰, 且酶活较低.

## 2.2 铜离子对产酶的影响

从图 2 可以看出, 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  可以不同程度地提高漆酶的活力. 当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达到 20 mg/mL 时漆酶酶活最高, 是对照样品的两倍.  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 5 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L 及 50 mg/L 时, 漆酶活力分别提高了 69%, 88%, 60% 和 12%.

## 2.3 乙醇对产酶的影响

XG8 菌株静止培养 18 d 后, 不同浓度乙醇诱导下的产酶情况如图 3 所示. 各个浓度的乙醇均可以提高漆酶的活力. 当乙醇浓度达到 43 g/L 时漆酶活力最高, 是对照样品的 3 倍. 乙醇浓度为 20 g/L, 31 g/L 及 50 g/L 时, 漆酶活力是对照样品的 2.3 倍, 2.9 倍和 2.4 倍.

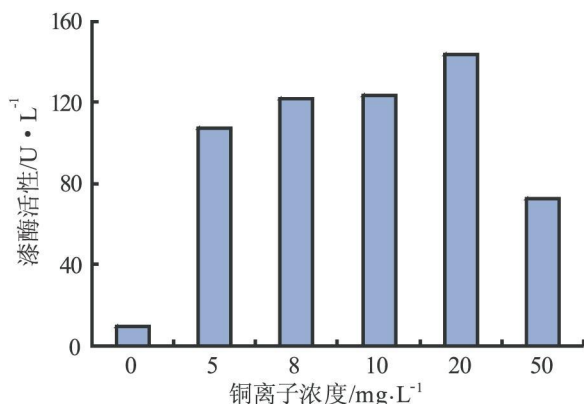


图2 不同浓度铜离子诱导的漆酶活性比较

Fig.2 Comparison of laccase activity induced by different concentration of copper

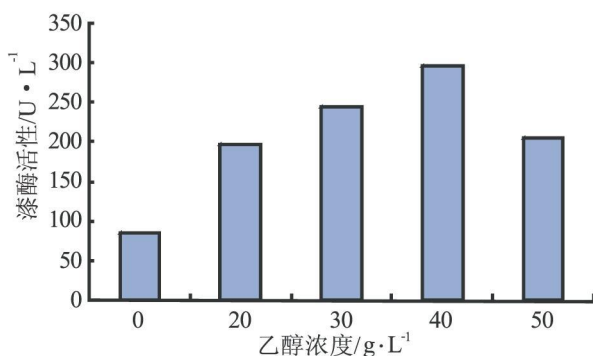


图3 不同浓度乙醇诱导的漆酶酶活比较

Fig.3 Comparison of laccase activity induced by different concentration of ethanol

## 2.4 多诱导物协同作用对产酶的影响

从图 4 可以看出, 在诱导物浓度分别为蔗渣 10 g/L,  $\text{CuSO}_4$  20 mg/L, 乙醇 43 g/L 的协同诱导情况下, 最高酶活达到 762 U/L, 是对照酶活的 10 倍.

## 3 讨论

根据国内外文献报道, 不同的培养条件对漆酶活力有显著的影响. 试验表明, 静止培养有利于 XG8 菌株产酶, 这可能与有些白腐真菌分泌的漆酶对振荡产生的机械剪切力敏感有关, 可见振荡培养并不适合部分白腐真菌漆酶的产生<sup>[6]</sup>.

木素是漆酶的作用底物之一, 在培养液中添加一定量的木素溶液有利于漆酶的产生, 本试验采用了木素、蔗渣、乙醇及  $\text{CuSO}_4$  溶液这几种廉价的诱导物, 试验结果表明, 蔗渣的诱导效果最好, 蔗渣具有一定的诱导效果可能和其中含有一定量的木素及酚类诱导物如阿魏酸、香豆酸的诱导作用有关. 和国内外文献报

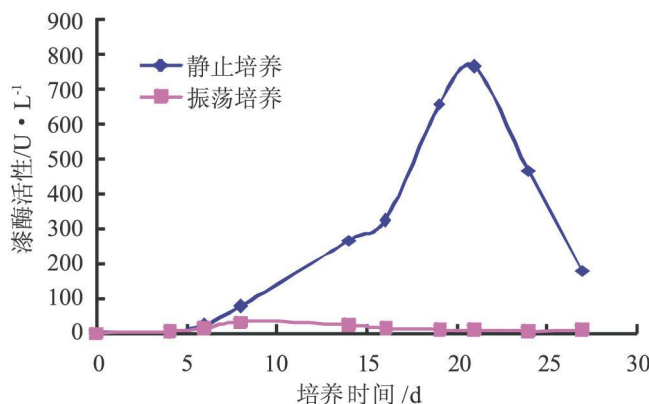


图4 多诱导物协同作用的漆酶酶活

Fig.4 Laccase activity induced by three inducers

道的用昂贵的 ABTS 及 2,5-二甲苯胺作为诱导剂<sup>[7]</sup>, 蔗渣的诱导效果更具有工业化应用的优势。

食用菌 XG8 菌株自身的产漆酶能力不及目前报道的朱红密孔菌 (*Pycnoporus cinnabarinus*)、毛栓菌 (*Trametes trogii*)<sup>[8]</sup> 等, 但其添加蔗渣、乙醇及硫酸铜后, 漆酶诱导效果显著, 本研究结果可为新型漆酶诱导物的开发提供一个新思路。利用蔗渣诱导漆酶的产生将有利于漆酶降解蔗渣中所含的大量木素分子, 从而将被木素分子粘连的蔗渣纤维相互分离, 实现了蔗渣的脱木素处理, 对蔗渣造纸工业有重要的应用价值。

#### 4 结 论

本试验选用木素、蔗渣、乙醇及不同铜离子浓度对食用菌 XG8 菌株的产漆酶能力进行诱导研究, 结果表明蔗渣的诱导效果最明显, 当利用蔗渣、乙醇及硫酸铜同时进行诱导时, 漆酶活性与对照相比, 酶活性提高了 10 倍。

#### 参考文献:

- [1] 李丹, 段舜山, 侯红漫, 等. 白腐菌对木质素降解能力的测定 [J]. 生态科学, 2002, 21(4): 346-347.
- [2] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展 [J]. 植物学报, 2001, 43(8): 771-779.
- [3] Juan CM, Anne L, Laurence C, et al. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(10): 3365-3371.
- [4] 赵敏, 钱程. 白腐菌木素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究 [J]. 中国造纸学报, 2005, 20(2): 101-105.
- [5] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] Hublik G, Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Peurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants [J]. *Enzyme and Microbiol Technol*, 2000, 27(3-5): 330-336.
- [7] Madhavi S, Revankar S. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1 [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(3): 581-588.
- [8] 王宜磊. 毛栓菌漆酶诱导及其部分特性研究 [J]. 生物技术, 2003, 13(3): 14-16.

(上接第 93 页)

- [3] Ren Wang-Jiang, Shuang-Cheng Ma, Zhen-Dan He, et al. Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia inax* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, (10): 2161-2170.
- [4] Ren Wang-Jiang, Paul P H But, Shuang-Cheng Ma, et al. Furanoditerpenoid lactones from the seeds of *Caesalpinia inax* Hance [J]. *Phytochemistry*, 2004, 57: 517-521.
- [5] Ren Wang-Jiang, Shuang-Cheng Ma, Paul P H But, et al. Isolation and characterization of spinoicaesalin, novel rearranged vouacapanediterpenoid from *Caesalpinia inax* Hance [J]. *Chem. Soc., Perkin Trans*, 2001, (1): 2920-2923.
- [6] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997.
- [7] Saszk i T, Kudoh K, Uda Y, et al. Effect of isothiocyanates on growth and metastaticity of B16-F10 melanoma cells [J]. *Nutr Cancer*, 1999, 33: 76-81.