

## 碳源氮源对杂色云芝产漆酶的影响\*

朱友双

(济宁医学院生物科学系, 山东日照 276826)



朱友双, 男, 汉族, 1981 年 2 月出生于山东省济宁市。2011 年 12 月毕业于山东大学微生物技术国家重点实验室微生物学专业, 获理学博士学位。2012 年 2 月到济宁医学院生物科学系工作, 主要从事纤维素酶、半纤维素酶、漆酶及过氧化物酶高产真菌筛选、诱变和相关酶代谢机理调控研究。目前以第一作者发表的 SCI 论文 4 篇。

**摘要 目的** 研究碳源氮源对杂色云芝合成漆酶的影响。**方法** 以本实验室保藏的高漆酶合成菌株杂色云芝为研究对象, 首先比较不同培养方式对该菌株漆酶合成的影响, 然后通过单因素实验和响应面分析实验研究了碳源和氮源对漆酶合成的影响。**结果** 摇床振荡培养产酶效果优于静止培养, 在不同的碳源与氮源中, 蔗糖为该菌株产漆酶的合适碳源, 合适的氮源是酵母粉, 培养基中碳氮源的最佳含量为: 蔗糖 10.2 g/L, 酵母粉 7.2 g/L。**结论** 碳源和氮源对杂色云芝发酵生产漆酶有很大的影响, 响应面法对杂色云芝产液态发酵产漆酶条件的优化是可行的。

**关键词** 杂色云芝; 漆酶; 碳源; 氮源; 响应面分析

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2014)10-305-04

### Effect of carbon and nitrogen sources on laccase production by *Coriolus versicolor*

ZHU You-shuang

(Department of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** To investigate the influence of different carbon and nitrogen sources on laccase production by *Coriolus versicolor*. **Methods** The effects of different culturing methods, carbon and nitrogen sources on the laccase production were studied by means of single factor experiment method. Response surface method was employed to optimize the concentration of carbon and nitrogen sources. **Results** The laccase production of *Coriolus versicolor* in the shaking culture were higher than those in the static culture. The suitable carbon and nitrogen sources for laccase production were sucrose and yeast extract respectively. A maximal yield of laccase could be obtained when the concentrations of sucrose, and yeast extract were set at 10.2 g/l, 7.2 g/l, respectively. **Conclusion** Carbon and nitrogen sources in the growth medium play an important role in the production of laccase by *Coriolus versicolor*. Optimization of laccase production using response surface method is particularly useful.

**Key words:** *Coriolus versicolor*; Laccase; Carbon sources; Nitrogen sources; Response surface method

漆酶, 即对苯二酚: 氧氧化还原酶 (p-benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC1. 10. 3. 2), 属于含铜的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase)<sup>[1-2]</sup>, 广泛分布于植物、昆虫、真菌和细菌中<sup>[3-5]</sup>。漆酶具有以氧气为电子受体氧化酚类和部

分非酚类化合物的特性以及非常宽的底物专一性<sup>[6]</sup>, 因而漆酶在纸浆的去木质化、染料污水处理、生物能源、生物传感器、食品饮料行业以及有机合成和药物合成中有广泛的应用前景<sup>[7-9]</sup>。

漆酶中研究最多、最为深入、应用最为广泛是真菌漆酶, 目前人们研究的真菌漆酶主要集中在担子菌 (Basidiomycota) 和子囊菌 (Ascomycota)

\* [基金项目] 济宁医学院博士科研启动基金 (编号: 094201)

中,子囊菌和担子菌多为白腐菌<sup>[6]</sup>。本文以实验室保存的高产漆酶菌株杂色云芝为研究对象,通过单因素实验和响应面分析实验研究了碳源、氮源对该菌株合成漆酶的影响,优化了培养条件,为漆酶工业化生产提供一定的指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌种** 杂色云芝(*Coriolus versicolor*)系本实验室保藏,4℃保存于PDA斜面中。

**1.1.2 培养基** 初始合成培养基(1 L, W/V): 0.5% 葡萄糖, 0.5% 酵母粉, 0.0001% CuSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 80, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.004% CaCl<sub>2</sub>, 0.0001% MnSO<sub>4</sub>, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>, 0.0001% FeSO<sub>4</sub>, 0.0001% 维生素 B<sub>1</sub>, pH 调节至 5。研究不同碳源对漆酶合成的影响时,分别以 0.5% 的蔗糖、淀粉、碳酸氢钠取代初始合成培养基的葡萄糖,其余营养物质种类和含量同初始合成培养基。研究不同氮源对漆酶合成的影响时,分别以 0.5% 的蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸铵取代初始合成培养基中的酵母粉,其余营养物质种类和含量同初始合成培养基。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种的活化** 将杂色云芝接种于 PDA 平板,30℃ 培养活化 7d。

**1.2.2 漆酶活性和生物量测定** 取培养液经过滤后,滤液于 4℃, 10000 g 离心 10 min,上清液用于测定漆酶活性。漆酶活性测定以 ABTS 为底物,每分钟转化 1 μmol 底物所需酶量定义为一个酶活单位(U)。

过滤滤纸在过滤前置于 60℃ 烘干至恒重,过滤除菌液后再次烘干至恒重,两次重量的差值即为菌丝体的生物量。

**1.2.3 产酶和生长时间曲线** 为研究培养方式对杂色云芝生长和漆酶产量的影响,本实验对静止培养和震荡培养条件进行了考察,生物量和漆酶活性间隔测量时间为 1d。

**1.2.4 响应面分析实验** 响应面分析方法,将实验得出的数据结果,进行响应面分析,通过二次函数进行拟合,得到的预测模型,在各因素水平响应值的基础上,可以找出预测的响应最优值以及相应的实验条件。在本文研究中,对影响漆酶产量的关键因素:蔗糖浓度、酵母粉浓度进行优化,利用 Design Expert version 7.0 (State-Ease, Inc, Minneapolis, USA) 对实验进行设计和数据的回归分析,

2 个变量,5 个水平(-α, -1, 0, +1, +α),变量的范围为:蔗糖 8~12 g/L;酵母粉 5.5~8.5 g/L,响应分析实验设计见表 1,2 个变量可近似为下列二次模型方程:

$$Y = k_0 + k_1 x_1 + k_2 x_2 + k_{11} x_1^2 + k_{22} x_2^2 + k_{12} x_1 x_2 \quad \text{Eq. (1)}$$

该方案共需 13 组实验,实验设计如表 1 所示,其中包括 5 个中心点实验,每组实验重复 3 次,从而评估其影响系数,更好的预测产酶的最优条件。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养方式对杂色云芝生长和产酶的影响

静止培养和摇床振荡培养条件下杂色云芝的生产和产酶情况如图 1、图 2 所示。结果表明,不论是静止培养还是摇床振荡培养,其生长和繁殖都有延滞期、对数期、稳定期和衰亡期几个阶段,其中对数期菌体生长最快,生长旺盛;在摇床振荡培养条件下杂色云芝产酶量和生物量都较静止培养有所增加,且生长时间明显缩短。产酶时间均较菌体生物量的增长时间略微滞后,随着真菌进入稳定期产酶量达到最大,进入衰减期后酶活性开逐渐减低。因此摇床振荡培养更有利于杂色云芝的产酶发酵。分析认为,振荡培养可以使菌体与培养基充分接触,满足菌体的生长需要,其次加速营养物和氧气在细胞间的传质效率,增加了溶氧量,利于菌体的生长和产酶。而在静止培养条件下菌体可能会沉在底部,减缓生长速度,进而影响的酶的生产。

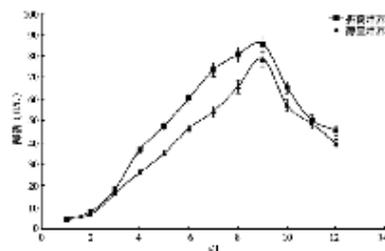


图 1 振荡培养与静止培养条件下杂色云芝产酶曲线

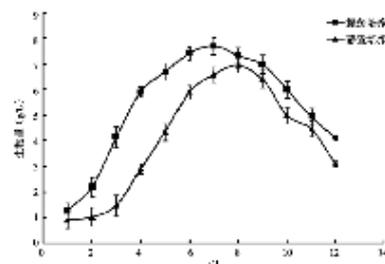


图 2 振荡培养与静止培养条件下杂色云芝生长曲线

2.2 不同碳源对漆酶活性的影响

在振荡培养条件下考察了葡萄糖、蔗糖、淀粉和碳酸氢钠 4 种碳源对杂色云芝合成漆酶的影响(图 3),结果表明,碳源对漆酶活性具有重要影响,有机碳源和无机碳源对酶活性的影响具有显著性差异( $P < 0.05, n = 3$ ),有机碳源培养酶活性相对较高。无机碳源碳酸氢钠培养不利于杂色云芝的吸收利用和漆酶的分泌,酶活性相对较低。有机碳源是杂色云芝合成漆酶的优选碳源。

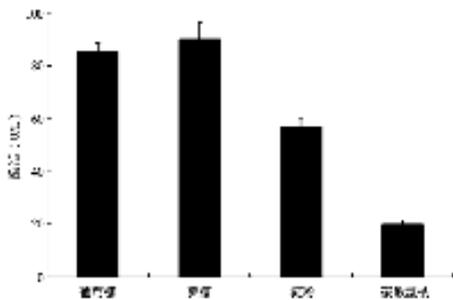


图 3 不同碳源对漆酶合成的影响

2.3 不同氮源对漆酶活性的影响

研究了酵母粉、蛋白胨、胰蛋白胨和硫酸铵四种氮源对杂色云芝漆酶活性的影响(图 4)。结果表明,其中以酵母提取物为氮源时漆酶活性最高,胰蛋白胨次之,蛋白胨较低,无机氮源硫酸铵最低,不同氮源对酶活性影响具有显著性差异( $P < 0.05, n = 3$ )。有机氮源酵母提取物营养相对丰富,可为微生物生长提供维生素、氨基酸及生长因子等多种营养成分,杂色云芝生长快,有利于漆酶的分泌;硫酸铵营养成分单一,杂色云芝利用吸收慢,影响生长,不利于漆酶的合成。根据实验结果后面的响应面分析实验选择酵母粉作为氮源。

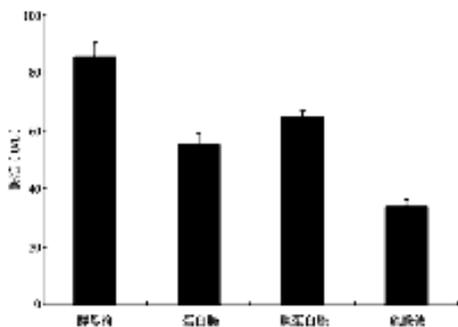


图 4 不同氮源对漆酶合成的影响

2.4 响应面分析实验

根据 Eq. (1), 我们用 Design Expert version

7.0 对实验数据进行分析,得到二项式 Eq. (2):

$$Y = -2135.61 + 158.29 X_1 + 437.97 X_2 + 2.13 X_1 X_2 - 8.49 X_{12} - 31.99 X_{22} \text{ Eqs. 2}$$

$X_1$ : Sucrose,  $X_2$ : east extract,

回归分析结果如表 1,模型决定系数  $R^2$  其值越接近 1,表明实验结果与预测结果拟合性越好<sup>[10]</sup>。本模型的  $R_2 = 0.9888$ ,与 1 非常接近,表明模型的可靠性和适合度非常高。此外,模型的适用性还可以进一步通过最小二乘拟合残差分析来进行判断<sup>[11]</sup>。从图 5 中可以看出实验实际值和预测值非常相似,均匀分布在直线两侧,说明模型也是可信的、有效的,能够适用于研究碳源氮源对杂色云芝液态发酵产漆酶的影响。

表 1 响应面设计实验

序列	变量		酶活(u/L)
	蔗糖(g/L)	酵母粉(g/L)	
1	8.00	5.50	122.46
2	12.00	5.50	123.68
3	8.00	8.50	133.5
4	12.00	8.50	160.32
5	7.17	7.00	174.69
6	12.83	7.00	193.45
7	10.00	4.88	75.69
8	10.00	9.12	140.50
9	10.00	7.00	246.85
10	10.00	7.00	247.13
11	10.00	7.00	245.96
12	10.00	7.00	245.78
13	10.00	7.00	246.53
P	0.0544	0.0006	< 0.0001
$R^2$			0.9888

$P < 0.05$  表明该模型项目显著

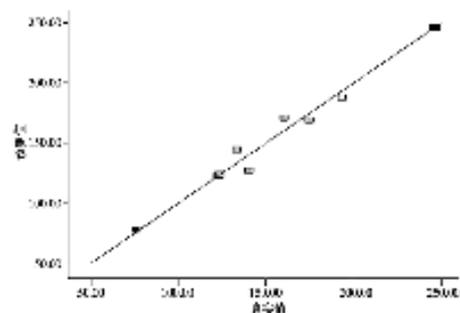


图 5 模型适合度检验图

两因素对漆酶产量的 3-D 响应面分析图与等高线图如图 6 所示,根据微分学的极大值和极小值原理对 Eqs. 2 进行微积分,可以得到如下偏微分方程:

$$Y = -2135.61 + 158.29X_1 + 437.97X_2 + 2.13X_1X_2 - 8.49X_1^2 - 31.99X_2^2$$

$$\partial Y / \partial X_1 = 158.29 + 2.13X_2 - 16.98X_1 \text{ Eqs. 3}$$

$$\partial Y / \partial X_2 = 437.97 + 2.13X_1 - 63.98X_2 \text{ Eqs. 4}$$

当  $(\partial Y / \partial X_1), (\partial Y / \partial X_2)$  等于零的时候,响应面漆酶产量最高。根据代数的方法对 Eqs. 3 和 Eqs. 4 求解得各变量的值分别为:  $X_1 = 10.2, X_2 = 7.2$ 。根据拟合得到的二项式计算得到的预测最高漆酶产量为 248.14 u/L。根据最优液态发酵条件(蔗糖=10.2 g/L,酵母粉=7.2 g/L)进行实验,得到真实最高漆酶量为 254.26 u/L,与预测值的差别小于 5%,表明预测值和实验值相吻合,模型是有效的。

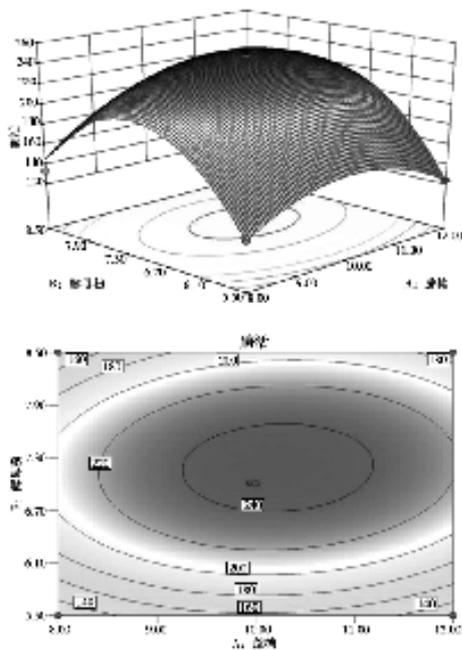


图 6 蔗糖与酵母粉对酶活的响应面分析图与等高线图

### 3 结论

综上所述单因素和响应面分析实验结果表明振荡培养适合杂色云芝合成漆酶,碳源和氮源对杂

色云芝发酵生产漆酶有很大的影响,漆酶合成的合适碳源为蔗糖,合适氮源为酵母粉,培养基中碳氮源的最佳含量为:蔗糖 10.2 g/L,酵母粉 7.2 g/L。培养基优化后漆酶的产量比初始培养基提高了接近 2 倍,验证实验也表明预测值和实验值相吻合,证明使用响应面法对杂色云芝培养基碳氮源的优化是有效的、可靠的。优化结果为漆酶的液态发酵提供了指导,可以在发酵过程中合理的添加碳源、氮源,有效地提高漆酶产量并降低发酵成本。

### 参考文献:

- [1] Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(6): 551-565.
- [2] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry[J]. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(54): 219-226.
- [3] Leontievsky AA, Vares T, Lankinen P, et al. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 156(1): 9-14.
- [4] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, et al. Laccases: a never-ending story[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(3): 369-385.
- [5] Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 41-42.
- [6] Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, et al. "Blue" laccases[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(10): 1136-1150.
- [7] 葛宏华, 武赞, 肖亚中, 等. 漆酶空间结构、反应机理及应用[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(2): 156-63.
- [8] Dias AA, Bczerra Rm, Percira AN. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 92: 7-13.
- [9] Sigoillot C, Record E, Belle V, et al. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(3): 346-352.
- [10] Bhattacharya SS, Banerjee R. Laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using response surface methodology[J]. *Chemosphere*, 2008, 73: 81-85.
- [11] Ceylan H, Kubilay S, Aktas N, et al. An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed biotransformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM)[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 2025-2031.

(收稿日期 2014-08-11)