

## 4 种白腐真菌单独及混合培养时漆酶活性比较

蒋 瑾, 刘 驰, 高玉千, 赵鹏娟, 张世敏, 徐淑霞, 吴 坤\*

(河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为提高白腐真菌漆酶产量, 以黑木耳、杂色云芝、杏鲍菇和硫磺菌为出发菌株, 观察和分析了各个菌株单独培养和混合培养时的漆酶产生情况。结果表明, 单独培养时杂色云芝的产漆酶能力最强(1060.2 U/L), 其次是否鲍菇(541.7 U/L), 硫磺菌不产漆酶。硫磺菌和其余 3 种真菌混合培养时, 硫磺菌可以提高黑木耳的产漆酶能力, 酶活性最大提高 20%; 但抑制杏鲍菇和杂色云芝产漆酶, 漆酶活性下降 34.3% 和 14.1%, 缩短杂色云芝达到产酶高峰的时间(2 d)。

**关键词:** 白腐真菌; 黑木耳; 杏鲍菇; 杂色云芝; 硫磺菌; 混合培养; 漆酶

**中图分类号:** Q646.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)9-0115-04

### Study on the Laccase Production of Four Fungi under Alone and Mixed Culture

JIANG Jin, LIU Chi, GAO Yu-qian, ZHAO Pen-juan, ZHANG Shi-min, XU Shu-xia, WU Kun\*

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To study the changes of enzyme-production abilities of four fungi, *Laetiporus sulphureus* cultured with *Auricularia auricula*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus eryngii*, respectively, after four fungi had been cultured solely. The results showed that under the condition of cultured independently, *L. sulphureus* couldn't produce laccase, while the highest activity of the laccase production was observed with *C. versicolor* (1160.2 U/L), followed by *P. eryngii*. When *L. sulphureus* was mixed with the other three types of fungi, *L. sulphureus* promoted *A. auricula* to produce laccase about 20%, but restrained the laccase production of the *P. eryngii* and *C. versicolor* (lower 34.3% and 14.1%, respectively) and shorten two days to the peak of laccase production of *C. versicolor*.

**Key words:** Fungi; *Auricularia auricula*; *Pleurotus eryngii*; *Coriolus versicolor*; *Laetiporus sulphureus*; Mixed culture; Laccase

漆酶(laccase, EC1.10.3.2)和植物中的抗坏血酸氧化酶、哺乳动物的血铜蓝蛋白同属铜蓝氧化酶, 在各种植物、真菌和多种细菌中广泛存在<sup>[1]</sup>。漆酶能够催化单酚、二酚、多酚、芳香胺和甲基酚等多种芳香化合物发生氧化, 同时伴随着分子氧还原成水, 因而常用于木质素的降解和纸浆的生物漂白<sup>[2]</sup>、新型传感器的研制和生物检测<sup>[3-4]</sup>、环境污染物的降解<sup>[5]</sup>、食品饮料中酚类物质的去除<sup>[6]</sup>及其他潜在的应用。在工业、医学、食品和环境技术上需要大量低成本的漆酶, 但自然界中大部分白腐真菌的漆酶产量太低, 不能满足

需求。部分漆酶已成功在毕赤酵母<sup>[7]</sup>、酿酒酵母<sup>[8]</sup>、乳酸克鲁维氏酵母<sup>[9]</sup>、黑曲霉和米曲霉<sup>[10]</sup>中得到了异源表达, 但重组酶的表达同样不能达到应用需求。因此, 寻找新的漆酶高产菌和提高现有白腐真菌的漆酶产量刻不容缓。

选择适当的芳香化合物诱导可以提高漆酶产量, 但从环境保护角度考虑, 在漆酶生产过程中不宜使用高浓度的有毒芳香化合物。利用生物控制原理, 选择适合的菌株与漆酶产生菌共培养, 同样可以达到促进漆酶合成的目的。将杂色云芝(*Coriolus*

收稿日期: 2011-05-29

基金项目: 河南省科技厅重点攻关项目(82102220011)

作者简介: 蒋 瑾(1986-), 女, 江苏常州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 环境微生物的资源利用。E-mail: concon77@126.com

\* 通讯作者: 吴 坤(1963-), 男, 河南平舆人, 教授, 博士, 主要从事环境微生物资源利用和污染治理研究。

E-mail: wukun63@126.com

versicolor)和哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) 2 个不同的真菌放在一起培养,其中杂色云芝具产漆酶能力,哈茨木霉本身不能分泌漆酶,在这种情况下,杂色云芝产酶能力得到提高<sup>[11]</sup>。杂色云芝和其他土壤真菌或土壤细菌共同培养时,能使漆酶活性提高 5~15 倍不等,和哈茨木霉共同培养时活性提高 45 倍<sup>[12]</sup>。在不添加诱导剂的条件下,密粘褶菌与栓菌 AH28-2 共培养能提高漆酶活性到 210 U/L,而米曲霉菌与栓菌 AH28-2 共培养则不能显著提高后者漆酶活性;在诱导物存在时,2 种共培养方式却使栓菌 AH28-2 培养上清中漆酶活性分别减少约 8% 和 11%<sup>[13]</sup>。为了鉴定将 2 种不同的白腐真菌(White Rot Fungi, WRF)放在一起培养是否还具有这种效应,本试验选择了硫磺菌这种不产漆酶的白腐真菌,分别和产漆酶的黑木耳、杏鲍菇、杂色云芝进行等量共同培养,对其产漆酶活性进行研究,探讨不同真菌共同培养对漆酶活性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

黑木耳(*Auricularia auricula*)、杂色云芝(*Coriolus versicolor*)、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)、硫磺菌(*Laetiporus sulphureus*)等 4 种白腐真菌均由河南农业大学生命科学学院环境微生物实验室保藏。2,2'-连氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸,简称为 ABTS)购自 Sigma 公司。

### 1.2 试验方法

500 mL 锥形瓶中装入 150 mL PDA 培养基(土豆 200 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 5 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g),灭菌后接入培养 8 d 的平板菌种 4 片(用打孔器打成直径 1 cm 的菌片,黑木耳、杂色云芝、杏鲍菇、硫磺菌单独培养时各 4 片;硫磺菌和其他 3 种白腐真菌混合培养时,硫磺菌 2 片,另一种菌 2 片),150 r/min 28℃ 的恒温振荡摇床中培养。接种后的第 3 天开始测酶活性,每隔 1 d 测一次吸光值并计算漆酶活性。设置 4 个重复避免试验误差。

### 1.3 漆酶活性测定

超净工作台取待测样发酵液 500  $\mu$ L,4℃ 低温离心机中 8000 r/min 离心 5 min,上清液即为粗酶液。酶活性测定体系为 3 mL,其中 0.1 mol/L, pH4.5 乙酸-乙酸钠缓冲液 2.7 mL,适当稀释的粗酶液 0.1 mL 和 0.5 mmol/L ABTS 溶液 0.2 mL。25℃ 水浴锅中反应 3 min 后,迅速转入冰水以终止反应,紫外分光光度计测定 420 nm 处反应吸光值的变化。定义 1 min 氧化 1  $\mu$ mol ABTS 所需的酶量为

1 个酶活力单位(U/L)。每个样品 3 个重复,以煮沸灭活粗酶液为对照。

酶活性计算公式<sup>[14]</sup>:

$$\text{漆酶活性(U/L)} = \frac{\Delta OD \times V_1}{\Delta t \times V_2 \times \epsilon_{420} \times 10^{-6}} \times \text{稀释倍数}$$

式中: $\epsilon_{420}$ (ABTS)= $3.6 \times 10^4$  L/(mol·cm); $\Delta t$ ——1 min; $\Delta OD$ ——1 min 内吸光度的变化值; $V_1$ ——酶反应中反应液的总体积(3 mL); $V_2$ ——酶反应中酶液的体积(0.1 mL)。

## 2 结果和分析

### 2.1 4 种白腐真菌在液体摇瓶中单独培养时的漆酶活性

图 1 表明:硫磺菌不产漆酶,而黑木耳、杏鲍菇和杂色云芝均产漆酶;但菌种不同,漆酶产量不同、达到峰值时间也不同。黑木耳在第 13 天达到峰值,漆酶活性为 205.6 U/L;杏鲍菇在第 11 天时出现峰值(541.7 U/L);杂色云芝最大酶活性为 1060.2 U/L,于第 9 天出现。整个培养期间,黑木耳的产漆酶能力始终低于杏鲍菇和杂色云芝。

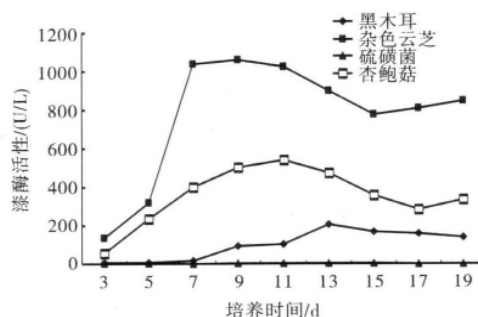


图 1 4 种白腐真菌单独培养时的漆酶活性

### 2.2 硫磺菌分别与黑木耳、杂色云芝和杏鲍菇共同培养时的漆酶活性

硫磺菌分别与黑木耳、杂色云芝、杏鲍菇进行共同培养时,组合不同,产漆酶的能力和达到峰值的时间不同。漆酶活性由高到低分别为:杂色云芝+硫磺菌(911.1 U/L)、杏鲍菇+硫磺菌(355.8 U/L)、黑木耳+硫磺菌(239.8 U/L)。

### 2.3 黑木耳、杂色云芝和杏鲍菇单独培养以及与硫酸菌混合培养效果比较

在整个发酵期间,黑木耳单独培养的产漆酶能力低于黑木耳和硫磺菌共同培养时的产酶能力(图 3),可见硫磺菌可以提高黑木耳的产漆酶能力,酶活性最大提高 20%。杏鲍菇和杂色云芝单独培养的产漆酶能力高于共同培养时的产漆酶能力,最大酶

活分别下降了34.3%和14.1%(图4、图5),说明硫磺菌降低杏鲍菇和杂色云芝的产漆酶能力,但硫磺菌缩短了杂色云芝达到峰值的时间(2 d),接种后7 d即达到产酶高峰。

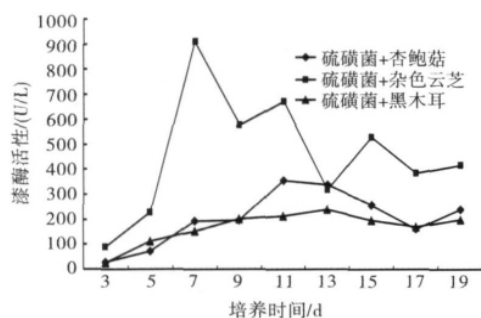


图2 硫磺菌和其余3种白腐真菌共同培养的漆酶活性

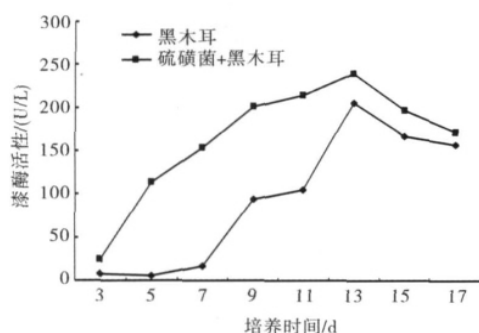


图3 黑木耳单独培养以及混合培养时的漆酶活性

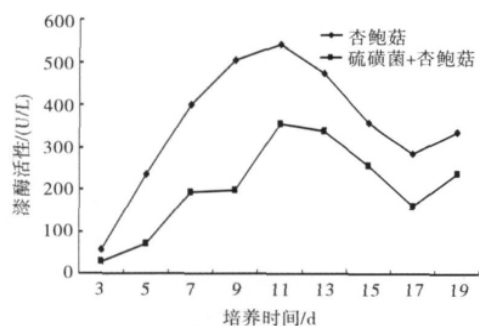


图4 杏鲍菇单独培养以及混合培养时的漆酶活性

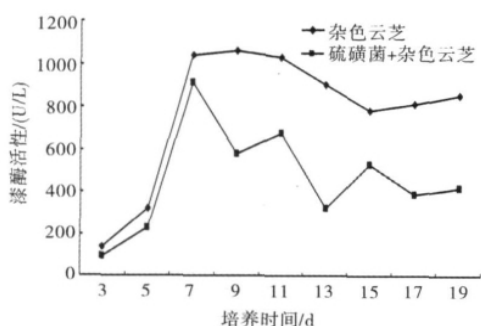


图5 杂色云芝单独培养以及混合培养时的漆酶活性

### 3 讨论

根据前人研究结果,杏鲍菇第9天达到产漆酶峰值(1.39 U/mL)<sup>[14]</sup>,杂色云芝第9天达到最大酶活力90 U/mL<sup>[15]</sup>,黑木耳第12天的酶活最大(386.85 U/L)<sup>[16]</sup>。本试验测定的漆酶活性相比而言略微偏低,这一方面与所用的培养基配方、金属离子有无、接种的菌龄和装液量等有关,另一方面,不同白腐真菌生活史长短、营养需求、生长因子及漆酶同工酶等生物学特性也会影响漆酶的分泌。

平菇和虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)共培养时能够显著提高漆酶活性和锰过氧化物酶活性<sup>[17]</sup>。齿毛芝(*Cerrena unicolor*)单独培养时漆酶活性为98 U/mL,灵芝(*Ganoderma lucidum*)单独培养时酶活性为40 U/mL,稀硬木层孔菌(*Phellinus robustus*)为5 U/mL,齿毛芝和稀硬木层孔菌共培养时,漆酶活性提高2倍多,但齿毛芝和灵芝共培养时没有促进漆酶产生<sup>[18]</sup>。本试验将不同的白腐真菌共同培养时,硫磺菌提高黑木耳的产漆酶能力,降低了杏鲍菇和杂色云芝的产酶能力,却缩短了杂色云芝达到最大产酶高峰的时间,说明真菌间漆酶产生的促进效益具有种特异性。虽然这种促进作用的具体机制还不太清楚,但利用不同种属之间的相互作用来提高漆酶产量是一个尝试。

### 参考文献:

- [1] Morozova O V, Shumakovich G P, Gorbacheva M A, et al. "Blue" laccases [J]. Biochemistry (Moscow), 2007, 72(10): 1136-1150.
- [2] Cecile S, Susana C, Teresa V, et al. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(4): 333-343.
- [3] Gomes S A, Nogueira J M, Rebelo M J. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20(6): 1211-1216.
- [4] Fabio V, Antonio C, Santa R, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as bio-recognition element [J]. Biosensors and Bio-electronics, 2004, 20(2): 315-321.
- [5] Atef J, Francisco G, Michel J P, et al. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill waste-water [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4): 478-486.
- [6] Servili M, De Stefano G, Piacquadio P, et al. A novel

- method for removing phenols from grape must[J]. Am J Enol Viticulture, 2000, 51: 357-361.
- [7] 谌斌, 唐学明, 沈微等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 43-46.
- [8] Bleve G, Lezzi C, Mita G, *et al.* Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(5): 731-741.
- [9] Faraco V, Ercole C, Festa G, *et al.* Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 77(6): 1329-1335.
- [10] Larrondo L F, Avila M, Salas L, *et al.* Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns[J]. Microbiology, 2003, 149(5): 1177-1182.
- [11] Freitag M, Morrell J J. Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* [J]. Can J Microbiol, 1992, 38(4): 317-323.
- [12] Baldrian P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 50(3): 245-253.
- [13] 肖亚中. Trametes sp. AH28-2 漆酶研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2002.
- [14] 刘敏, 李娟, 贾乐. 产漆酶杏鲍菇液体发酵条件与部分酶学性质初探[J]. 研究与探讨, 2005, 6(8): 67-72.
- [15] 吴坤, 朱显峰, 张世敏, 等. 杂色云芝产漆酶的发酵条件研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 207-312.
- [16] 高玉千, 高方, 张世敏, 等. 黑木耳漆酶高产菌株的筛选[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 301-304.
- [17] Chia Y, Hatakka A, Maijala P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? [J]. Int Biodeterioration Biodegradation, 2007, 59: 32-39.
- [18] Elisashvili V, Kachlishvili E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes[J]. J Biotechnol, 2009, 144(1): 37-42.