

# 1株真菌漆酶高产菌株的筛选及其漆酶的纯化和性质研究\*

李松<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1</sup>, 汤文晶<sup>1</sup>, 陈阿娜<sup>1</sup>, 汤斌<sup>1</sup>, 崔凤杰<sup>2</sup>, 赵鹏翔<sup>3</sup>

1(安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽 芜湖, 241000)

2(江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江, 212013)

3(国网节能服务有限公司 北京生物质能源技术中心, 北京, 100053)

**摘要** 使用愈创木酚筛选平板筛选分离获得1株真菌漆酶高产菌株,通过形态学观察和5.8S rDNA-ITS序列分析,将该菌株鉴定为栓菌属真菌。初步摇瓶发酵研究结果表明该菌株发酵至第10天时,漆酶活力达到20.3 U/mL。发酵液经硫酸铵盐析和DEAE FF柱层析方法纯化后,该酶蛋白分子质量约为65 kDa。性质研究表明,该酶在60℃以下及pH 3.5~5.0较为稳定,其 $V_{\max}$ 和 $K_m$ 分别为31.06 mmol/(L·min)和152 μmol/L。筛选得到的栓菌菌株具有产酶速率快、发酵周期短等特点。

**关键词** 真菌漆酶;筛选;发酵;纯化;酶学性质

漆酶(EC 1.10.3.2)是木质素代谢过程中的一种主要酶,属于蓝多铜氧化酶(blue multicopper oxidases, MCOs)家族的一种,能够在氧气作为电子受体的条件下氧化芳香族化合物且底物作用特异性低。漆酶最早发现于日本紫胶漆树 *Rhus vernicifera* 的浸出液中,随后在几乎所有已研究的木腐真菌中均有发现,同时也存在于部分植物、细菌和昆虫之中<sup>[1-3]</sup>。随着小分子介体的发现以及漆酶/介体系统(LMS)作用机理的深入研究和应用,漆酶逐渐在食品、造纸、印染、生物能源和医药等行业中表现出良好的应用前景<sup>[4-7]</sup>。

目前具有工业生产应用潜力的漆酶生产方式是微生物发酵法,尤其是高等真菌中白腐真菌(white-rot fungi)的漆酶分泌量较高<sup>[8-10]</sup>。但是研究中发现,白腐真菌往往需要较长的发酵周期来获得较高的漆酶产量,使漆酶的工业化生产成本过高并在一定程度上限制了漆酶的广泛应用。例如,Galhaup等<sup>[9]</sup>利用 *Trametes pubescens* 制备漆酶发酵周期为16~40 d,发酵活力为319~743 U/mL(底物为ABTS);Rosales等<sup>[8]</sup>利用 *T. hirsuta* 制备漆酶发酵周期为23 d,发酵活力为12.26 U/mL(底物为ABTS)。江南大学廖祥

儒教授研究室陆续报道了可以利用 *Trametes* sp. 和 *T. hirsuta* 在8 d的发酵周期内实现漆酶的最高发酵活力,分别达到65.13 U/mL<sup>[11]</sup>和35 U/mL<sup>[12]</sup>(均以DMP为底物),大幅度缩减了白腐真菌产漆酶的发酵周期,显示白腐真菌可以在较短发酵期间内实现漆酶的高产。另一方面,预示着在白腐真菌漆酶生产菌种的选育和开发方面仍具有很大的挖掘潜力。

本文采用愈创木酚显色法对多个自然样本进行筛选并获得1株漆酶高效产生菌株,对该菌株的发酵产酶特性及其漆酶酶学性质进行了初步研究,以期优良的漆酶生产菌株的选育工作打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 筛选样本

分离样本采集于芜湖神山公园、赭山公园和清水苗圃园等富含腐烂植物茎叶组织的土壤。

#### 1.1.2 培养基

PDA培养基(g/L):葡萄糖20,土豆(浸出汁)200,琼脂粉15,pH值自然;筛选培养基:PDA培养基添加愈创木酚(0.04%)和卡那霉素(20 mg/L);种子培养基(g/L):葡萄糖20,蛋白胨5,酵母粉3,pH值自然;发酵培养基(g/L):乳糖10,蛋白胨5,酵母粉3,酒石酸铵10,CuSO<sub>4</sub> 0.25,NaCl 1,pH值自然。

#### 1.1.3 主要试剂

PCR产物回收、纯化、质粒的提取等DNA操作试剂盒,购自大连生物工程(大连)有限公司;抗生素和

第一作者:博士,讲师(本文通讯作者,E-mail:Lisong821123@126.com)。

\*安徽省自然科学基金资助项目(1408085QC61);安徽工程大学引进人才科研启动基金(2013YQQ003);国家电网公司科技项目资助(合同号:SGECS56-2014)

收稿日期:2015-04-30,改回日期:2015-05-18

愈创木酚(1,2-甲氧基苯酚)等,购自上海生工生物工程技术服务有限公司;ABTS [2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐]和 DMP(邻苯二甲酸二甲酯)购自 Sigma 公司;其他分析纯或化学纯生化试剂,购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 产漆酶真菌的筛选

将采集的样本在无菌环境中打碎并稀释至  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$  和  $1 \times 10^{-3}$  等系列浓度。分别取 200  $\mu\text{L}$  各样本梯度稀释液涂布于筛选平板,在 30  $^{\circ}\text{C}$  下恒温培养 3~4 d 后挑取具有红褐色氧化圈的菌落进行分离和纯化。在完全相同的培养条件下,挑取在一定时间内产生红褐色氧化圈较大的菌株进行后续实验。

### 1.2.2 漆酶产生菌株的显微形态观察

将在平板上表现最好的漆酶产生菌株在 30  $^{\circ}\text{C}$  下恒温培养 4 d 形成巨大菌落并取菌丝制片,分别进行光学显微镜和扫描电镜观察以研究菌丝形态特征。

### 1.2.3 漆酶产生菌株的分子生物学鉴定

分离菌株染色体 DNA 的提取、质粒 DNA 的小量制备及 DNA 的酶切、连接、转化等分子操作参见文献<sup>[13]</sup>进行。其中,以 CTAB 抽提法获得的该菌株染色体 DNA 为模板,以 5.8S rDNA-ITS 区域通用引物为扩增引物,使用 PCR 方法获得该菌株 5.8S rDNA-ITS 片段并测序。序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。通过在线数据库 Blast/blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 对测定序列进行比对并使用 MEGA 5.0 软件通过 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统发育树。

### 1.2.4 摇瓶发酵及酶活力测定

用无菌水洗下 PDA 培养基中培养 4 d 的菌丝并接入种子培养基 30 mL/250 mL,在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 48 h 后按 10% 比例接入发酵培养基 50 mL/250 mL 并在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下进行发酵。期间每隔 24 h 取样 1 mL 并于 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液并使用醋酸/醋酸钠缓冲液稀释一定比例后进行漆酶活力测定以了解该菌株发酵产漆酶过程并判断发酵终点。漆酶活力的测定:(1)以 ABTS 为底物,使用等体积的 0.5 mmol/L ABTS 底物溶液与适当稀释的酶液在 40  $^{\circ}\text{C}$  进行反应,测定反应前 3 min 内反应体系在 420 nm 处吸光值的变化并定义 1 min 内氧化 1  $\mu\text{mol}$  ABTS 所需要的酶量为 1 个漆酶活力单位(U);(2)以 DMP 为底物,使用等体积的 1.0 mmol/L DMP 溶液和适当稀释的粗酶液 40  $^{\circ}\text{C}$  反应并

测定反应前 3 min 内反应体系在 420 nm 处吸光值的变化并定义每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  DMP 所需的酶量为 1 个漆酶活力单位(U);(3)以愈创木酚为底物,使用等体积的 0.8 mmol/L 愈创木酚溶液和适当稀释的粗酶液在 40  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后冰浴终止反应并立即在 465 nm 处测定吸光值并定义每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  愈创木酚所需的酶量为 1 个漆酶活力单位(U)。其中,所有底物或酶液均使用醋酸/醋酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 4.0)配制或稀释并以煮沸灭活的酶液作为对照。如无特殊说明,文中所述漆酶活力的测定均以 DMP 为底物。

### 1.2.5 漆酶蛋白纯化

(1)粗酶液的制备:10 L 全自动通风发酵罐中装 7 L 发酵培养基,种子培养基和发酵培养基与摇瓶发酵相同,接种量为 10%。通过调节转速、罐压和通气量将溶氧控制在 30% 左右。整个发酵过程不控制 pH 并在发酵 10 d 后结束。发酵结束后使用 4 层纱布过滤去除发酵液中的菌丝体等大型固形物,过滤液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 条件下离心 30 min,收集上清即制得漆酶粗酶液。(2)粗酶液的纯化 粗酶液经饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (80%) 盐析后使用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)溶解沉淀并经透析过夜后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液并使用微孔滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤。使用 ÄKTA prime plus 纯化系统对滤过液进行纯化。使用 Hitrap<sup>TM</sup> desalting (GE) 柱脱盐和真空冷冻干燥,使用缓冲液溶解酶粉并上样于 Hitrap<sup>TM</sup> DEAE FF (GE) 柱,使用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(0~0.5 mol/L NaCl, pH 7.5)进行梯度洗脱,收集洗脱峰并进行酶活力测定和 SDS-PAGE。同时对纯化酶液进行再脱盐和真空冷冻干燥以制备酶粉备用。

### 1.2.6 蛋白质浓度测定方法

以牛血清蛋白为标准蛋白做标准曲线,采用 Bradford<sup>[14]</sup> 所述方法进行测定。

### 1.2.7 SDS-PAGE

具体实验方法参见文献<sup>[15]</sup>进行。其中,本研究使用的分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,上样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.8 一般性质研究

在上述标准的漆酶反应条件下变换不同温度和 pH 值,测定酶活力并计算相对酶活以研究温度和 pH 对该酶催化活力的影响;将酶液使用 pH 4.0 缓冲液稀释并在不同温度下保温 0.5 h 后使用冰水将酶液

快速冷却并分别测定残留酶活力,计算相对酶活力以考察该酶的热稳定性;使用不同 pH 值的缓冲液溶解酶粉并适当稀释,于 40 ℃ 条件下保温 0.5 h 后迅速冷却并使用醋酸/醋酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 4.0)作 10 倍梯度稀释,分别测定稀释酶液残留酶活力,计算相对酶活力以考察该酶的 pH 稳定性。以不同浓度的 ABTS 为底物在最适的反应温度和 pH 条件下测定底物的氧化速率,按照 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算该酶的米氏动力学常数  $V_{\max}$  和  $K_m$ 。

2 结果与讨论

2.1 漆酶产生菌株筛选及形态学观察

从 27 个自然样本中共筛选得到 4 株产漆酶真菌,其中从第 10 号样本(神山公园腐烂树叶)分离得到的 1 株真菌产漆酶活力最强(红褐色氧化圈直径最大)并初步命名为 LS-10C,其巨大菌落及显微形态如图 1 所示。该菌株在 PDA 平板上生长菌落呈白色,基内菌丝不发达,气生菌丝细而致密。

2.2 LS-10C 分子生物学鉴定

经测序表明,研究中获得 5.8S rDNA-ITS 部分片段大小为 570 bp。通过 Blast 同源序列比对表明该基因与 *T. hirsuta* (GenBank:KC848298.1) 同源性最高。

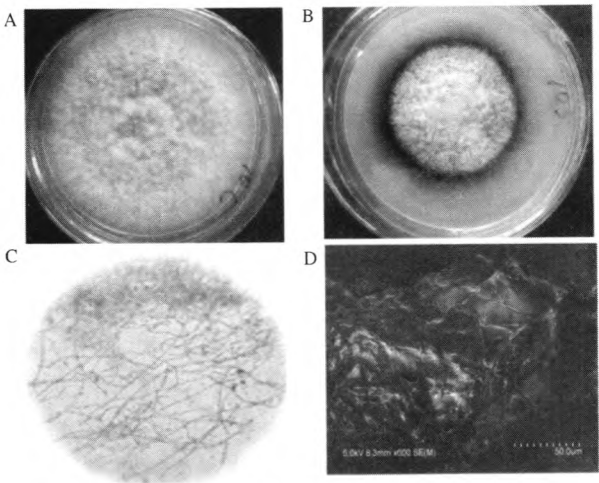


图 1 LS-10C 巨大菌落形态(A)、筛选平板中红褐色氧化带(B)、400 倍光学显微镜观察菌丝形态(C)和 SEM 600 倍视野下菌丝形态(D)

Fig. 1 The large colony (A), red brown oxidation zone (B), morphology (magnification: ×400) under optical microscope (C) and morphology (magnification: ×600) under SEM microscope (D) of LS-10C

利用 N-J 法构建系统进化树,如图 2 所示。结构形态学特征和进化树聚类分析,该菌株 LS-10C 被鉴定为栓菌(*Trametes* sp.)。

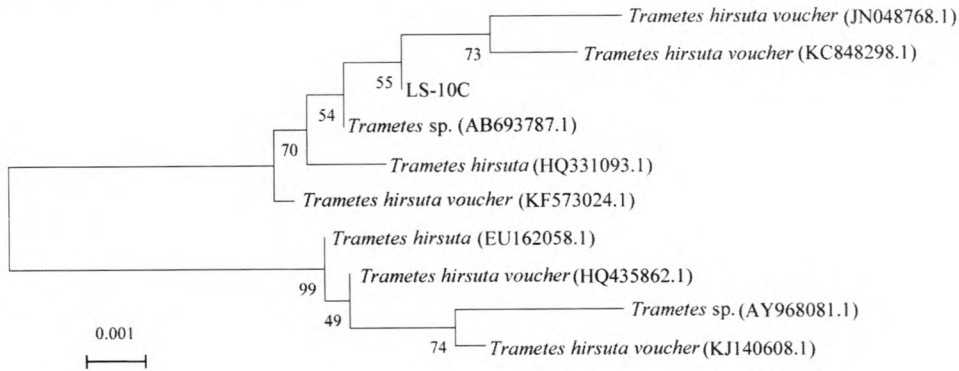


图 2 菌株 LS-10C 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 5.8S rDNA-ITS sequences and Neighbor-Joining analysis

2.3 漆酶活力测定方法比较

目前测定漆酶活力普遍使用的底物为 ABTS、DMP 和愈创木酚,但由于漆酶对 3 种不同底物的氧化速率的不同而呈现多种漆酶活力的表述方式,使得各研究中漆酶的活力不易做横向比较。因此本研究中使用 3 种底物对 5 种具有不同活力的酶液进行了测定和比较。结果表明该漆酶对 3 种底物的平均氧化速率(以平均酶活力计)约为 ABTS: DMP: 愈创木酚 = 10: 3: 3,即该漆酶对 ABTS 的氧化速率最快,对

DMP 和愈创木酚的氧化速率相当,结果如表 1 所示。

表 1 使用 3 种底物测定的漆酶活力 单位: u/mL

Table 1 Determined laccase activities on 3 substrates

实验号	底物		
	ABTS	DMP	愈创木酚
1	164.78	49.62	50.55
2	62.21	20.61	21.82
3	32.01	10.04	10.35
4	16.70	4.95	5.08
5	5.63	1.65	1.67

在 5 组不同原始酶浓度条件下有 3 种底物表现的漆酶活力趋势稳定、重复性好。同时,在 3 种底物中 ABTS 作为漆酶活力测定底物时具有反应时间短和检测灵敏等特点,较适用于漆酶活力的定量检测。

2.4 *Trametes* sp. LS-10C 发酵产酶特性

一般情况下葡萄糖会对微生物的产酶形成一定的抑制作用,因此本研究中初步选择乳糖作为主要碳源进行产酶实验。按 10% 的接种比例接种后摇瓶发酵至 10 d 时漆酶活力达到最高的 20.3 U/mL,其发酵过程曲线和产酶速率如图 3 所示。在前 3 天的时间内产酶速率较小,平均约为 0.5 U/(d · mL);从第 4 天开始进入产酶高峰期一直持续至第 8 天,该期间内平均产酶速率约为 3.3 U/(d · mL)并且在 7 ~ 8 d 时间段内达到最大的产酶速率 5.3 U/(d · mL);随后产酶速率开始下降并在 10 d 后呈负增长趋势,可能是因为培养基中营养物质的极度匮乏和菌体细胞

的自溶解导致了漆酶蛋白的降解。从该菌株产漆酶趋势可以看出,虽然最高发酵活力出现在第 10 天,但第 8 天之后漆酶活力增长缓慢,因此该菌株在发酵至第 8 天时即可结束发酵。与已报道的多数栓菌产漆酶相比较(见表 2),本研究中利用 *Trametes* sp. LS-10C 产漆酶具有发酵时间短、产酶速度快等特点。

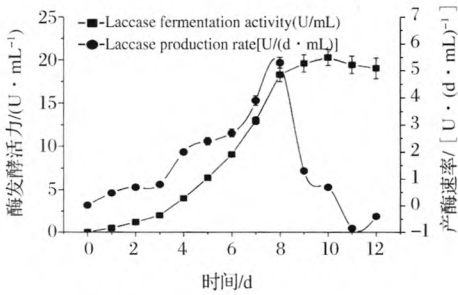


图 3 菌株 LS-10C 发酵产酶及其产酶速率变化曲线  
Fig. 3 Time course of laccase production and laccase producing rate by LS-10C

表 2 不同栓菌属微生物发酵产漆酶比较

Table 2 Laccase fermentation properties of different *Trametes* strains

菌种	漆酶活力(底物)	发酵方式	时间/d	参考文献
<i>Trametes hirsuta</i>	12.26 (ABTS)	固态发酵 (0.1 L)	23	[8]
<i>Coriolus versicolor</i>	4.11 (丁香醛)	摇瓶发酵 (100/250 mL)	12 ~ 16	[16]
<i>Trametes pubescens</i>	319 (ABTS)	摇瓶发酵 (200/1 000 mL)	16	[9]
<i>Trametes pubescens</i>	743 (ABTS)	补料分批发酵 (20 L 搅拌罐)	40	[9]
<i>Trametes</i> sp.	60.13 (DMP)	摇瓶发酵 (80/250 mL)	8	[11]
<i>Trametes hirsuta</i>	35 (DMP)	摇瓶发酵 (40/250 mL)	8	[12]
<i>Trametes hirsuta</i>	1.37 (ABTS)	摇瓶发酵 (200/500 mL)	14	[17]
<i>Trametes</i> sp.	20.3 (ABTS)	摇瓶发酵 (50/250 mL)	10	本研究

2.5 漆酶的纯化

经发酵后获得的粗酶液 SDS-PAGE 如图 4(A) 所示,可以发现该菌株的胞外蛋白主要集中在 60 kDa 左右。研究中利用 ÄKTA prime plus 纯化系统及 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (80%) 盐析和 DEAE FF 柱层析等步骤纯化漆酶,具体步骤及纯化结果见表 3。经纯化后,漆酶活力的回收率为 58.94% 并纯化了 2.36 倍,同时

获得该酶的比酶活力为 450.55 U/mg。最终纯化蛋白 SDS-PAGE 结果如图 4(B) 所示,表明该菌株分泌的漆酶蛋白质分子质量约为 65 kDa。真菌所产漆酶的分子质量一般在 50 ~ 90 kDa 之间不等,多数在 60 ~ 80 kDa。本研究中漆酶的分子质量与 *Thelephora terrestris* 漆酶 (66 kDa)<sup>[18]</sup> 和 *Pleurotus ostreatus* 漆酶 (67 kDa)<sup>[19]</sup> 分子质量较为接近。

表 3 漆酶纯化过程

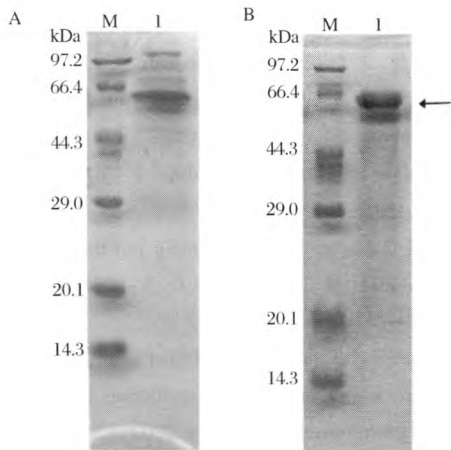
Table 3 The purification process of laccase

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U · mg <sup>-1</sup> )	纯化倍数	回收率/%
培养物过滤液	106 675.89	559.78	190.57	1	100
80% 硫酸铵盐析	92 829.23	356.34	268.93	1.41	87.02
DEAE FF	62 870.74	139.54	450.55	2.36	58.94

2.6 TlsL 的一般性质

为了初步了解该菌株所产漆酶的反应条件,研究中使用粗酶液在不同温度和 pH 条件下测定该酶的

最适作用温度、最适作用 pH 以及该酶的热稳定性。结果表明,该酶在 35 ~ 45 ℃ 具有较高催化活力并在 20 ℃ 以下仍具有较好的催化活力,但在 60 ℃ 以上催



M - 蛋白质标准分子质量样品;1 - 漆酶样品  
图4 漆酶发酵液上清总蛋白(A)和纯化后蛋白  
(B)的SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of laccase protein from fermentation supernatant (A) and purified sample (B)

化活力较弱,如图5(A)所示;作用 pH 研究表明该酶最适反应 pH 范围较窄,在 pH 3.5 ~ 4.5 可发挥最大催化效率,但当 pH 降至 3.0 或升至 5.0 以后其催化活力急剧下降,如图5(B)所示;热稳定性研究表明该酶在 60 °C 以下相对比较稳定,在 60 °C 以上保温 30 min 后尚有 60% 左右残留酶活,但在 80 °C 保温 30 min 后酶活全部损失,如图5(C)所示;pH 稳定性研究结果显示该酶在 pH 4.5 条件下最为稳定,当 pH 高于 6.0 之后酶活力损失严重,表明该酶在弱酸 (pH 3.5 ~ 5.0) 环境中相对比较稳定,如图5(D)所

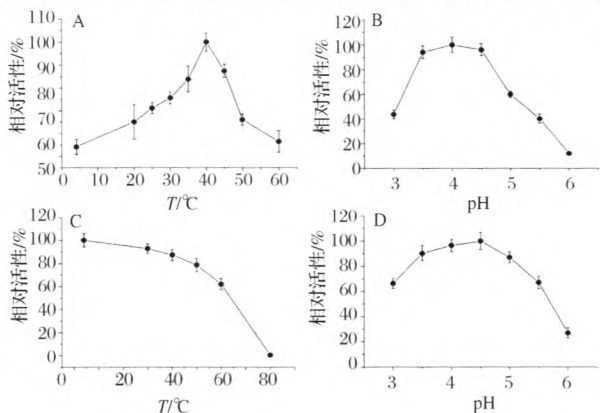


图5 温度对酶催化活性的影响(A)、pH 值对酶催化活性的影响(B)、温度对酶稳定性的影响(C)以及 pH 值对酶稳定性的影响(D)

Fig. 5 The effects of temperature (A) and pH (B) on the catalytic activity of laccase, and the effects of temperature (C) and pH (D) on the stability of laccase

示。研究中依据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算得到该漆酶的  $V_{max}$  和  $K_m$  分别为 31.06 mmol/(L · min) 和 152  $\mu$ mol/L。报道中,不同来源漆酶的米氏常数差异较大,如以 ABTS 为底物测得的  $K_m$  多数在 10 ~ 100  $\mu$ mol/L 之间,如 *T. terrestris* 漆酶的  $K_m$  为 16  $\mu$ mol/L<sup>[18]</sup>,而 *Lentinula edodes* 漆酶 Lcc1 的  $K_m$  为 108  $\mu$ mol/L<sup>[20]</sup>。相比较而言,本研究中 TlsL 的  $K_m$  值相对较高,表明该酶对底物的亲和力较小。

### 3 结论

(1)通过愈创木酚显色法快速从自然界中筛选得到 1 株漆酶高产菌株并在发酵至 10 d 时漆酶活力可达到最高的 20.3 U/mL,具有产酶速率快、发酵周期短等特点,为漆酶生产菌种的选育和优化提供了 1 株良好的出发菌种。

(2)通过 5.8S rDNA-ITS 同源比对构建系统发育树并结合显微观察将筛选菌株鉴定为栓菌属 (*Trametes* sp.),丰富了白腐真菌漆酶产生菌种资源。

(3)利用硫酸铵盐析和 DEAE 柱层析法快速对该漆酶进行了分离和纯化,结合发酵上清液以及纯化后蛋白质的 SDS-PAGE 分析表明该菌株发酵液中的蛋白质主要以漆酶为主,这为漆酶纯蛋白的制备和应用提供了极大的便利。

(4)测定并比较了该漆酶对 ABTS、DMP 和愈创木酚 3 种底物氧化速率的差别和比例关系,对漆酶酶活力定义及其表述方式的横向比较具有借鉴价值。

(5)该漆酶最适作用温度和 pH 分别为 40 °C 和 4.5,在 60 °C 以下及 pH 3.5 ~ 5.0 具有较好的稳定性,为该漆酶的应用研究提供了基本条件。

### 参 考 文 献

- [1] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, et al. Laccases: a never-ending story [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(3): 369 - 385.
- [2] Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution [J]. Micron, 2004, 35(1 - 2): 93 - 96.
- [3] Hoegger P J, Kilaru S, James T Y, et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences [J]. FEBS Journal, 2006, 273(10): 2308 - 2326.
- [4] WENG S S, LIU S M, LAI H T. Application parameters of laccase-mediator systems for treatment of sulfonamide antibiotics [J]. Bioresource Technology, 2013, 141: 152 - 159.



- [5] Ragauskas A J, Beckham G T, Biddy M J, et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery [J]. *Science*, 2014, 344(6 185): 1 246-843.
- [6] Hadibarata T, Yusoff A R M, Kristanti R A. Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133 [J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 2012, 223(2): 933-941.
- [7] Shiraishi T, Sannami Y, Kamitakahara H, et al. Comparison of a series of laccase mediators in the electro-oxidation reactions of non-phenolic lignin model compounds [J]. *Electrochimica Acta*, 2013, 106: 440-446.
- [8] Rosales E, Couto S R, Sanroman M A. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(5): 1 286-1 290.
- [9] Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(4): 529-536.
- [10] Baldrian P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(5): 560-563.
- [11] 刘家扬, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 漆酶高产菌的筛选及产酶优化 [J]. *食品与机械*, 2010, 26(4): 10-14.
- [12] 刘文华, 蔡宇杰, 范晶晶, 等. 毛栓菌产漆酶条件优化及该酶对合成染料脱色的特性 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(5): 727-738.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [15] Merrill C R. in *Guide to protein purification: gel-stained techniques* [M]. San Diego, C. A: Academic Press Inc, 1990: 477-488.
- [16] Kahraman S S, Gurdal I H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(3): 215-217.
- [17] 周喜燕, 谢益民, 杨海涛, 等. 白腐菌 *Trametes hirsuta* BYBF 产漆酶发酵条件的优化 [J]. *造纸科学与技术*, 2010, 29(2): 64-67.
- [18] Kanunfre C C, Zancan G T. Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 161(1): 151-156.
- [19] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(50): 31 301-31 307.
- [20] Nagai M, Sato T, Watanabe H, et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3): 327-335.

## Isolation of a high-level laccase-producing fungus strain, and purification and characterization of laccase

LI Song<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, TANG Wen-Jin<sup>1</sup>, CHEN A-na<sup>1</sup>, TANG Bin<sup>1</sup>,  
CUI Feng-jie<sup>2</sup>, ZHAO Peng-xiang<sup>3</sup>

1 (School of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

2 (School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

3 (Beijing Biomass Energy Technology Center, State Grid Energy Conservation Service Ltd., Beijing 100053, China)

**ABSTRACT** This study aimed to select high-level laccase-producing fungus strain from natural samples. The laccase producing ability of the selected strain and the properties of produced laccase were further studied. The target strain was selected and purified by guaiacol-containing selecting medium and the isolated strain was identified as *Trametes* sp. by morphology observation and 5.8S rDNA-ITS sequence analysis method. In shaking flask fermentation, a high laccase producing level of 20.3 u/mL was observed in the supernatant on 10<sup>1</sup> d. The produced laccase protein was salted out by ammonium sulfate fraction and further purified by DEAE FF chromatographic column. The molecular mass of the purified laccase was around 65 kDa, and the laccase was stable under 60 °C and pH 3.5 ~ 5.0. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  of the laccase were 31.06 mmol/(L · min) and 152 μmol/L, respectively. The isolated fungus strain *Trametes* sp. has an ability to produce high-level laccase in a short period, which could make it a good candidate for breeding and optimization of industrial laccase producing strain.

**Key words** fungal laccase; isolation; fermentation; purification; enzyme properties