

烟管菌漆酶合成的营养条件研究

王剑锋^{1,2} 苏国成³ 刘建玲¹ 王 璋²

1(西北大学生命科学学院,西安,710069) 2(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

3(集美大学生物工程学院,厦门,361201)

摘 要 对筛选到的漆酶高效产生菌烟管菌(*Bjerkandera adusta*) WZFF.W-Y11 合成漆酶的营养条件进行了研究,发现该烟管菌漆酶属于一种组成型酶,酶活力高,产酶高峰到来早,酶的合成与菌体生长过程紧密相关。漆酶合成需要丰富的营养因子,麸皮水解液是重要的成分,葡萄糖-淀粉的复合碳源和氯化铵-豆粕粉的复合氮源以及适量的无机盐有利于漆酶的产生。虽然增加 Fe^{2+} 的量明显抑制了漆酶的产生,但 Cu^{2+} 却能有效地促进漆酶的合成。在经过优化的培养条件下,酶活力高达 $1\ 108\ \text{U}/\text{mL}$ 。

关键词 烟管菌,漆酶,营养条件

漆酶(EC.1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化还原酶,与植物中的抗坏血酸氧化酶、哺乳动物中的血浆铜蓝蛋白都属于铜蓝氧化酶家族中的同一小族^[1],按照来源分为植物漆酶和真菌漆酶,前者在植物体内主要催化木质素的聚合过程,使木质素沉淀,后者却参与木质素的降解过程^[2],能有效地降解与木质素结构单元类似的环境污染物如 DDT、林丹、二恶英、多氯联苯、苯并芘、菲、杂酚油等^[3];在催化过程中,漆酶活性中心的铜离子从还原态底物吸收电子,底物被氧化为自由基,自由基导致各种非酶促反应,如羟化、歧化、聚合等,分子氧作为电子受体被还原为水^[4],漆酶的底物广泛多样。研究表明,漆酶在生物制浆、生物漂白、环境修复、绿色有机合成、食品加工诸领域有着巨大的应用价值。

本实验室在前期研究中从野外分离到 1 株漆酶高效产生菌,经鉴定属于多孔菌科的烟管菌(*Bjerkandera adusta*),以烟管菌作为漆酶产生菌国内未见报道,国外也鲜见报道。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

烟管菌(*Bjerkandera adusta*) WZFF.W-Y11,本实验室从杨树堆中分离筛选得到的保藏菌株。

1.2 培养基

1.2.1 菌种保藏培养基

马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 1.5 g,水 1 000 mL,pH 自然。

1.2.2 种子培养基

马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 1.5 g,水 1 000 mL,pH 自然。

1.2.3 基础产酶培养基

培养基 1(参照文献[5]进行小部分调整):葡萄糖 10 g, NH_4Cl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, CaCl_2 0.1 g, KH_2PO_4 2 g,微量元素混合液 10 mL,0.01 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH5.8) 1 000mL。

微量元素混合液(mmol/L):Gly 7.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.9, NaCl 17, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.359, CoCl_2 0.775, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.348, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.021, H_3BO_3 0.16, NaMoO_4 0.041。

培养基 2(参照文献[6]进行小部分调整):葡萄糖 10 g, NH_4Cl 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCl_2 0.01 g, K_2HPO_4 3.0 g, NaH_2PO_4 1.5 g, NaCl 0.1 g,水 1 000mL,pH6.0。

培养基 3:马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g, NH_4Cl 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, KH_2PO_4 3 g,水 1 000mL,pH6.2。

培养基 4:葡萄糖 20 g,大豆蛋白胨 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, KH_2PO_4 3 g,水 1 000 mL,pH6.2。

培养基 5:麸皮水解液 1%(以干麸皮计),葡萄糖 10 g, NH_4Cl 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, KH_2PO_4 3 g,水 1 000mL,pH 5.9。

培养基 6:麸皮水解液 5%(以干麸皮计),葡萄糖 10 g, NH_4Cl 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, KH_2PO_4 3 g,水 1 000 mL,pH 5.9。

1.3 菌体培养方法

取 1 块约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的斜面菌种接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃,

第一作者:硕士研究生(王璋博士为通讯作者)。

收稿日期:2005-09-15

150 r/min 恒温培养 4 d。在装有 50 mL 基础产酶培养基的 250 mL 三角瓶内接入种子液 5 mL, 28℃, 150 r/min 恒温培养, 定期测定菌体量及漆酶活性。每一菌株及培养条件至少进行 3 个平行试验。

1.5 酶液制备

取摇瓶发酵液 10 mL 在低温下 3 000 r/min 离心 10 min, 将得到的上清液作为粗酶液。

1.6 漆酶活力测定

根据 Coll 等人方法^[7]进行改进, 主要操作方法如下: 在含有 1.0 mmol/L 愈创木酚的 4 mL 50 mmol/L 琥珀酸缓冲液(pH 4.5)中加入 1 mL 经适当稀释的粗酶液, 混匀, 置 30℃ 恒温水浴反应 30 min, 然后在波长 465 nm 处比色, 以煮沸热灭活粗酶液和上述含愈创木酚的琥珀酸缓冲液作为空白对照。1 个酶活单位(IU)定义为: 每分钟氧化 1 μmol 愈创木酚所需要的酶量。

1.7 菌体量测定

以菌丝体细胞干重(DCW)表示, 发酵液经 80 目铜网过滤、离心洗涤后菌体置 80℃ 烘至恒重, 称重。

1.8 实验数据处理

采用软件 DPS v3.01 专业版^[8]进行计算分析。

2 结果与讨论

2.1 烟管菌在不同培养基上的漆酶产生能力

作为一种大型真菌, 在确保烟管菌大量合成漆酶的基本要求下, 促使菌体快速生长繁殖是一个重要因素, 选择一个合适的产酶培养基是实验的关键前提。因此, 本实验首先参照以前有关发酵生产漆酶的文献报道, 设计了 6 种不同基础产酶培养基, 在相同摇瓶条件下, 比较了烟管菌在这 6 种培养基上的菌丝体生长状况和漆酶生产能力, 实验结果如表 1 所示。

表 1 烟管菌在不同培养基上的生长和产酶状况

培养基	最终 pH	DCW /g·L ⁻¹	酶活 /U·mL ⁻¹
1	6.0	0.18	0
2	3.4	0.15	0
3	2.4	9.26	66.4
4	4.4	0.35	8.2
5	2.9	3.71	318.7
6	4.2	9.82	188.0

这在 6 种培养基中, 培养基 1 是根据比较常见的漆酶发酵合成培养基^[5]进行部分调整的, 培养基 2 则根据层孔菌漆酶发酵培养基^[6]进行部分微调, 但从表 1 的结果可以看出, 在这 2 种培养基中, 该烟管菌

的菌体生长很差, 也不能合成出漆酶来, 分析其原因是 2 种培养基中缺乏烟管菌良好生长以及合成漆酶所必要的生长因子。因此, 对碳源和氮源分别进行修饰, 设计了培养基 3 和 4。从实验结果可以看到, 菌体生长得到了很好改善, 尤其是采用培养基 3, 菌丝体生长良好, 这说明一些生长因子在烟管菌的培养中是不可或缺的条件; 而且也体现出部分漆酶活性, 表明了生长因子对烟管菌合成漆酶的必要性, 但还相当有限, 可能是因为在这培养基中有利于促进漆酶生物合成的营养作用因子含量少。

在选择麸皮水解液作为部分替代碳源的同时, 引入一些有可能作为促进漆酶生物合成的诱导性营养物质成分, 设计了培养基 5 和 6。实验结果表明, 该烟管菌在得到很好生长繁殖的同时, 可以显著合成漆酶产品, 酶活力最高达到 318.7 U/mL。然而, 在培养基 6 中加大麸皮水解液的量时, 虽然菌体生长因子丰富, 而生长繁殖相当良好, 但漆酶活力反而下降, 这说明营养条件对漆酶合成的影响是十分显著的, 从菌体生长与产酶的关系来看, 漆酶的产生需要菌体具有一定的生长量, 但菌体生长过于旺盛并不适合于漆酶的合成。因而菌体适量的生长是漆酶合成的重要条件, 实验中确定培养基 5 是适宜烟管菌漆酶合成的基础产酶培养基。

2.2 烟管菌在麸皮水解液培养基上的产酶曲线

以培养基 5 作为筛选出的基础产酶培养基对烟管菌进行液体培养, 每日定时取样分析漆酶活力、菌体干重和 pH 的结果如图 1 表示。

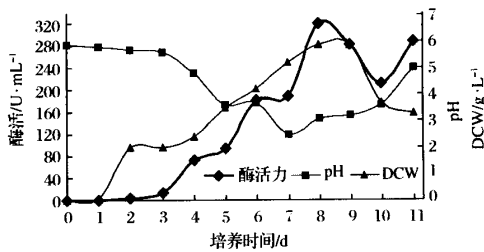


图 1 B. adusta 在麸皮水解液产酶培养基上的发酵历程

可以看出, 在该培养体系下, 烟管菌生长状况很好, 培养 1 d 后菌丝体开始大量繁殖, 到第 8 d 仍保持旺盛增长势头。菌体培养 2 d 后开始合成漆酶, 随后酶活力持续增加, 在第 8 d 达到高峰; 虽然在培养周期的后续阶段中酶活有所下降, 但在培养 10 d 后漆酶活力又基本接近培养 7 d 时的酶活水平。从菌体生长与产酶的关系上看, 菌体一定的生长量是产酶的

必要条件,高的菌体量相应伴随着较高的漆酶活力水平,菌体干重有所降低的同时,漆酶酶活开始下降,这都说明了酶的合成与菌体生长过程紧密相关,分属于中期偶联型;同时,也反映出在该培养体系下的整个生长过程中,该烟管菌是以一种组成型酶的生物合成过程产生漆酶。

另外,在整个培养过程中 pH 变化很大,开始时,由于菌体的快速生长和对葡萄糖的迅速利用导致 pH 5.7 快速下降到第 6 d 的 pH 2.5,然后再逐步回升至培养结束时的 pH 5.0。pH 对该烟管菌合成漆酶活力的影响也比较明显,从第 5 d 的 pH 3.6 降为第 6 d 的 pH 2.5,这一期间漆酶酶活却没有继续上升;而在培养的最后阶段,可能菌体代谢作用明显下降和菌体自溶等缘故引起 pH 显著上升,导致了本来应当处于下降趋势的漆酶活性却反而明显上升,有待于研究。

2.3 碳源对烟管菌漆酶合成的影响

以不同碳源替代麸皮水解液产酶培养基中的葡萄糖,对烟管菌进行液体培养,探讨对漆酶合成和菌体生长影响的试验结果如表 2 所示。

表 2 碳源对烟管菌漆酶合成和菌体生长的影响

碳源	最终 pH	DCW /g·L ⁻¹	酶活 /U·mL ⁻¹
单一			
葡萄糖	2.5	5.27	307.3
果糖	2.7	4.25	437.3
蔗糖	2.7	5.01	427.0
麦芽糖	2.7	5.45	394.5
糊精	2.7	5.51	358.6
淀粉(玉米)	3.3	5.37	221.1
玉米粉	5.7	3.93	265.2
甘油	2.9	6.14	437.5
复合			
甘油-淀粉(1:1)	2.5	3.64	86.6
葡萄糖-淀粉(1:4)	3.2	5.19	243.9
葡萄糖-淀粉(1:1)	2.8	4.73	540.2
葡萄糖-淀粉(7:3)	2.6	5.72	346.8
果糖-淀粉(1:4)	3.2	5.06	264.4
果糖-淀粉(1:1)	3.2	5.52	356.3
果糖-淀粉(7:3)	3.1	5.30	405.5

从表 2 可以看出,甘油、果糖、蔗糖和麦芽糖等小分子量碳源在菌体生长方面基本保持了与葡萄糖一样的程度,但明显促进了酶的合成,其中,以甘油为碳源时,酶的合成与生长量呈正相关,既有利于菌体的生长又有利于漆酶的合成,但是对实验结果进行单因素方差分析和多重比较(结果未列出)后发现,它们对酶合成的影响水平相当,不存在显著性差异。虽然糊精有利于漆酶的合成,产酶水平较高,但是以玉米粉

与玉米淀粉的高分子量物质作为碳源时,漆酶生产能力却明显下降。

为了进一步筛选有利于漆酶合成的碳源,实验中考察了多种复合碳源,结果发现,将葡萄糖和淀粉按照 1:1 配合使用时最有利于漆酶的合成,以下的试验即采用葡萄糖-淀粉(1:1)作为碳源。

2.4 氮源对烟管菌漆酶合成的影响

表 3 显示了使用葡萄糖-淀粉作为碳源,而用不同氮源取代 NH₄Cl 的麸皮水解液产酶培养基培养烟管菌 7 d 后,不同氮源对漆酶合成影响的实验结果。在单一氮源中, NH₄Cl 最有利于漆酶的产生,而尿素最差,基本上不产生漆酶。(NH₄)₂HPO₄ 最有利于菌体生长,却不利于酶的合成。酪氨酸是一些真菌漆酶的作用底物,然而对烟管菌漆酶的生物合成没有任何促进作用,影响了酶的产生。

表 3 氮源对漆酶合成和菌体生长的影响

氮源	最终 pH	DCW/g·L ⁻¹	酶活/U·mL ⁻¹
NH ₄ Cl	2.8	4.98	575.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	5.03	385.5
NH ₄ NO ₃	3.1	5.45	316.6
NaNO ₃	4.3	4.40	98.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.9	6.27	98.8
柠檬酸铵	4.0	5.95	149.9
酪氨酸	4.0	4.83	196.2
尿素	5.8	5.42	17.1
胰蛋白胍	4.6	5.90	443.4
大豆蛋白胍	4.5	6.16	419.6
豆饼粉	4.4	5.79	397.4
玉米浆	4.5	4.56	293.3
酵母浸粉	4.3	5.30	282.4
酪蛋白胍	4.5	5.01	345.0

有机氮源大多可以保持较高的漆酶生产能力,其中,胰蛋白胍、大豆蛋白胍、豆饼粉的效果较好,实验结果的方差分析和多重比较也证实了这些有机碳源以及 (NH₄)₂SO₄ 的产酶效果相当,但也都未能超过 NH₄Cl。

从豆饼粉的单独产酶效果及其价格廉宜性考虑,进一步比较了豆饼粉和 NH₄Cl 或 (NH₄)₂SO₄ 配合作为复合氮源对漆酶合成的影响效果。从表 4 可以看出,豆饼粉和 NH₄Cl 或 (NH₄)₂SO₄ 按 2:3 或 3:2 配合的复合氮源在充分保证菌体生长,具有足够的菌体量情况下,对菌体产酶都很有利,明显超过各自单独氮源的产酶水平。而且豆饼粉在比例略高(无机盐:豆饼粉=2:3)的情况下,漆酶生产活力较高。然而,当进一步提高豆饼粉比例时,虽然菌体量有大幅度提高,但是酶活性却明显下降。因而,下面试验采用

NH₄Cl 和豆饼粉以 2:3 组合作为复合氮源。

表 4 组合氮源对漆酶合成与菌体生长的影响

氮源		pH	DCW /g·L ⁻¹	酶活 /U·mL ⁻¹
成分	比例			
NH ₄ Cl	—	2.2	4.97	562.3
NH ₄ Cl:豆饼粉	1:4	3.8	7.30	421.1
NH ₄ Cl:豆饼粉	2:3	2.4	4.38	843.4
NH ₄ Cl:豆饼粉	3:2	2.4	4.08	759.5
豆饼粉	—	4.8	5.61	388.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ :豆饼粉	1:4	3.8	9.36	247.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ :豆饼粉	2:3	2.9	6.87	766.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ :豆饼粉	3:2	2.5	4.45	629.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	2.4	3.79	383.2

2.5 无机盐的添加对烟管菌漆酶合成的影响

培养基中的无机盐对菌体生长和代谢物质的产生具有重要的作用,由于在基础产酶培养基中除含有一些无机盐外还添加了 1% 的麸皮 HCl 水解液,因而,其中的无机盐的种类和量基本可以满足产酶的需要。但是,为了进一步了解过渡金属元素对氧化还原酶可能产生的潜在影响作用,实验中通过 L₈(2⁷)正

交实验^[10]进行了析因试验分析,培养基中的无机盐种类和水平如表 5 所示。

表 5 无机盐种类及水平

无机盐	FeSO ₄ /mg·L ⁻¹	ZnSO ₄ /mg·L ⁻¹	CuSO ₄ /mg·L ⁻¹	MnSO ₄ /mg·L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ /g·L ⁻¹	MgSO ₄ /g·L ⁻¹	CaCO ₃ /g·L ⁻¹
水平 1	0	0	0	0	3.0	1.5	0
水平 2	5.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.1

表 6 显示了采用经过上述优化的复合碳-氮源麸皮水解液培养基中添加这些无机盐后培养烟管菌,进行析因试验的漆酶生产结果。结果显示,KH₂PO₄ 的绝对值最大,说明其影响作用最大,其次为 CuSO₄、FeSO₄ 和 MgSO₄,MnSO₄ 最差。

表 6 漆酶活力平衡均值的极差分析

无机盐	FeSO ₄	ZnSO ₄	CuSO ₄	MnSO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCO ₃
水平 1	239	210	181	216	171	205	220
水平 2	192	222	251	215	260	227	211
极差 R	- 47	12	70	- 1	- 89	- 22	- 9
调整 R	- 67	18	99	- 2	- 126	- 31	- 13

表 7 L₈(2⁷)正交设计方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性水平值	影响度顺序
FeSO ₄	13207	1	13207	13.19604	0.00224	3
ZnSO ₄	925	1	925	0.92427	0.35066	5
CuSO ₄	29051	1	29051	29.02685	0.00006	2
MnSO ₄	9	1	9	0.00937	0.92410	7
KH ₂ PO ₄	47082	1	47082	47.04284	0.00000	1
MgSO ₄	2882	1	2882	2.87964	0.10907	4
CaCO ₃	477	1	477	0.47664	0.49984	6
模型误差	1410	3	470	0.47009	0.86311	
重复误差	16013	16	1001			
合并误差	17423	19	917			

由表 7 的方差分析结果可以看出,7 种无机盐显著性水平值所表现出的对漆酶合成的影响程度顺序与表 6 的极差分析结果完全一致,其中,KH₂PO₄、CuSO₄·5H₂O 和 FeSO₄·7H₂O 对酶的合成影响极为显著,其显著性水平值远小于 0.01;而 MgSO₄·7H₂O 的影响也很明显,显著性水平在 0.1 左右,ZnSO₄·7H₂O、CaCO₃ 和 MnSO₄·H₂O 对酶的合成均无显著影响。各主要无机盐对漆酶合成的作用性质有较大的差异,CuSO₄·5H₂O 能够促进烟管菌漆酶的合成,Cu²⁺ 是漆酶的组成部分,1 分子漆酶中含有 4 个 Cu²⁺,微量 Cu²⁺ 的存在对促进漆酶催化活性的发挥十分有利^[9]。Fe²⁺ 则由于对真菌漆酶的催化氧化活性有明显的竞争性抑制作用^[11~12],在培养基中不添加为宜,这也表明在今后进行工程化大罐发酵生产漆

酶时采用不锈钢发酵罐为佳。KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O 的含量减小,有利于漆酶的合成,尤其是降低 KH₂PO₄ 的含量,培养基中 CaCO₃ 为 0.1 g/L 时对漆酶的合成没有显著性影响,说明以自来水配制培养基时水的硬度不会造成酶活的降低。另外,有研究证实,提高 Mn²⁺ 含量会明显抑制漆酶的合成^[12],实验中发现,添加 MnSO₄·H₂O 对漆酶的合成没有影响,这可能与菌株的特异性有关。

2.6 优化条件下产酶试验

通过上面进行的几种主要发酵培养基组成对烟管菌 WZFF.W-Y11 摇瓶生产漆酶影响的各种比较性分析试验,可以得出该菌株发酵生产酶制剂的最优化培养条件为,碳源:可溶性淀粉 1.0% + 葡萄糖 1.0%、氮源:NH₄Cl 0.08% + 豆饼粉 0.12%、外加麸皮水解液 1.0%,初始 pH5.9。接着,利用该优化

发酵工艺条件,在经过 72h 种子培养,以接种量 10% 将种子液接入本实验室自行设计装配的 2L 容积的小型便易生化反应器^[13],装液量 1400 mL 和添加 0.02% 消泡剂,控制温度 28℃、搅拌速度 200 r/min 和通气量容积比约为 0.8 vvm 的条件下,连续培养 7 d 生产漆酶。

实验结果在较好地再现了图 1 所示的摇瓶试验结果的同时,产酶能力有所提高。在发酵至第 8 d 时漆酶活性达到了峰值,为 1 108 U/mL。3 次重复实验,都可以持续稳定地获得 1 100 U/mL 以上的漆酶,这表明该烟管菌生物合成漆酶性能的遗传稳定性,也说明本研究探讨总结出的发酵工艺条件的合理性以及本实验的小型生化反应器的实效性应用成果。

3 结 论

本实验室筛选到的漆酶高产菌株—烟管菌 (*Bjerkandera adusta*) WZFF.W-Y11 不同于其他已经研究过的漆酶产生菌如杂色云芝 (*Coriolus versicolor*)、贝壳状革耳菌 (*Panus conchatus*) 等,该菌株所产漆酶为组成型漆酶,酶的产生与菌体的生长过程相偶联,酶活高峰出现在培养的第 8 d。漆酶的产生需要丰富的生长因子,麸皮水解液是培养基中的一个重要成分,而且价格低廉;葡萄糖和淀粉混合形成的复合碳源、NH₄Cl 与豆饼粉组合成的复合氮源均有利于漆酶的产生;控制 KH₂PO₄ 的浓度为 1.0 g/L、微量添加 Cu²⁺ 能显著提高漆酶的合成量,而 Fe²⁺ 的存在显著抑制漆酶酶活的提高。在经过优化的实验条

件下,该烟管菌可以连续稳定地生产漆酶,酶活力在 1 100 U/mL 以上,具有明显的工业实用开发价值。

参 考 文 献

- 1 钞亚鹏,钱世均. 真菌漆酶及其应用[J]. 生物工程进展, 2001, 21(5): 23~28
- 2 胡平平,付时雨. 漆酶催化活性中心结构及其特性研究进展[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(3): 69~74
- 3 吴 坤,闵 航,朱显峰,等. 杂色云芝漆酶的分离、纯化和酶学特性研究[J]. 高校化学工程学报, 2003, 17(2): 173~179
- 4 王国栋,陈晓亚. 漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J]. 植物学通报, 2003, 20(4): 469~475
- 5 付时雨,余惠生. 贝壳状革耳菌在固体及液体培养过程漆酶同功酶的产生研究[J]. 纤维素科学与技术, 1998, 6(3): 32~36
- 6 康从宝,赵建,李清心. 层孔菌漆酶的摇瓶最适培养条件研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 42~45
- 7 Coll P M, Fernandez-Abalos JM, Villanueva JR, et al. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971) [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(8): 2607~2613
- 8 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002
- 9 王习文,詹怀宇,何为. 铜(II)对漆酶活性的影响[J]. 纸和造纸, 2003, 7(4): 43~44
- 10 周纪芾,茆诗松. 质量管理统计方法 [M]. 北京: 中国统计出版, 1999. 173~177
- 11 王习文,詹怀宇. Fe(II)对漆酶催化活性的影响[J]. 生物技术, 2003, 13(3): 13~14
- 12 朱 陶,赵永芳. 粗毛栓菌漆酶活性的初步研究[J]. 唐山师范学院学报, 2001, 23(5): 1~3
- 13 刘新征,王灼维,王 璋. 谷氨酰胺转胺酶的发酵生产及酶纯化技术的研究 [C]. 2002 年中国酶制剂生产与应用技术交流会论文集, 2002. 112~119

Effects of Nutritional Factors on Laccase Production

from White Rot Fungi *Bjerkandera adusta*

Wang Jianfeng^{1,2} Su Guocheng³ Liu Jianling¹ Wang Zhang²

1(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

2(China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

3(School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT The nutritional conditions in liquid culture medium for the laccase production from a novel isolated strain *Bjerkandera adusta* WZFF.W-Y11 were studied. The fungal laccase was found to be a kind of composite enzyme with high activity. The enzyme production is closely related with mycelium growth and biomass and the maximal enzyme productivity could be reached within a short period. The effects of several nutritional factors on production of the enzyme were investigated, and the results showed that wheat bran was an important component for laccase production. Using glucose and soluble starch as carbon sources, ammonium chloride and powder of bean cake as nitrogen sources and adding suitable inorganic salts, a high activity level was obtained in this study. Though ferric ion showed significant inhibition effect on laccase biosynthesis, Cu²⁺ could effectively enhance the enzyme production. Under the optimized nutritional culture condition, the enzyme activity reached as high as 1108 U/mL.

Key words *Bjerkandera adusta*, laccase, nutritional factors