

东北林区土著白腐菌 *Pleurotus ostreatus*

产漆酶培养基的优化

高大文^{1,2}, 梁红², 李保深², 陈军²

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090, gaodw@hit.edu.cn;

2. 东北林业大学 林学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 为提高东北土著白腐真菌的产酶能力, 采用摇瓶试验对采自东北林区的白腐真菌 *Pleurotus ostreatus* 的产漆酶培养基进行优化, 并与目前普遍采用的 TK 培养基进行对比. 结果表明: 最佳碳源为玉米粉, 质量浓度为 8 g/L; 最佳氮源为氯化铵, 质量浓度为 0.88 g/L. 在最佳培养基条件下, 白腐真菌 *Pleurotus ostreatus* 的漆酶活力和生物量分别达 149.45 U/L 和 0.045 2 g (干重)/L. 对比优化后的培养基和目前普遍采用的 TK 培养基的产漆酶活性, 结果表明优化的培养基产漆酶活性是 TK 培养基的 3 倍. 运用 SPSS 统计软件对各影响因素进行了差异显著性检验, 发现白腐真菌 *Pleurotus ostreatus* 产漆酶的主要影响因子为碳源类型. 试验证明优化后的培养基能明显促进白腐真菌产漆酶, 而选取适合的碳源类型则是配制培养基的关键.

关键词: 白腐真菌; *Pleurotus ostreatus*; 漆酶; 培养基; 优化

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)10-1564-04

Optimization of the culture medium for laccase production by white rot fungus (*Pleurotus ostreatus*)

GAO Da-wen^{1,2}, LIANG Hong², LI Bao-shen², CHEN Jun²

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, gaodw@hit.edu.cn; 2. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To enhance the enzyme production of white rot fungus grown in northeast forest area in China, an indigenous white rot fungi *Pleurotus ostreatus* was used to investigate its laccase production and the culture medium was optimized by using shake flask experiment, and also the results were compared with the TK medium that is used universally. The results showed that the best medium for *Pleurotus ostreatus* were corn meal as carbon source with the concentration of 8 g/L, and ammonium chloride as nitrogen source with the concentration of 0.88 g/L. Under the optimized medium conditions, the laccase activity and biomass of *Pleurotus ostreatus* reached to 149.45 U/L and 0.045 2 g (dry weight)/L, respectively. The optimized medium made white rot fungi *Pleurotus ostreatus* 3 times laccase activity compared with TK medium. The statistical software SPSS was applied to do the significant difference test on the factors impacted laccase production. The results showed that the type of carbon source played a vital role in laccase production by *Pleurotus ostreatus*. It concluded that the optimized medium could enhance the laccase production, and the selection for the appropriate type of carbon course was the key to the preparation of the medium.

Key words: white-rot fungus; *Pleurotus ostreatus*; laccase; culture medium; optimization

收稿日期: 2009-01-10.

基金项目: 全国优秀博士学位论文作者专项基金资助项目(2005044);
黑龙江省杰出青年基金资助项目(JC200909).

作者简介: 高大文(1967—), 男, 博士, 教授, 博士生导师.

白腐菌是一类具有引起木质白色腐烂功能的丝状真菌的总称, 白腐菌是目前已知能够将木质素彻底降解为二氧化碳和水的唯一生物, 因此, 近

年来受到广泛关注,将其应用到解决环境中持久性有机污染物的降解中^[1-3].白腐菌降解木质素依赖于其分泌的木质素降解酶,主要包括木质素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)和漆酶(Lac).漆酶是一类含铜的多酚氧化酶,于1883年由日本吉田首次从漆树中发现^[4].漆酶广泛存在于真菌中,尤其是白腐真菌,是重要的产漆酶菌^[5].由于漆酶能够催化许多芳香族化合物和其他底物分解,很快成为环境保护研究领域的热点^[6],如用于有毒有害物质的降解^[7]、染料脱色^[8]及土壤中杂芬油类物质的去除^[9]等.

本研究在前期工作的基础上^[10-12],为开发本土白腐真菌资源,选用东北林区广泛分布的糙皮侧耳菌(*Pleurotus ostreatus*)为研究对象,采用正交试验对此菌株的产漆酶培养基进行优化,进而获得最佳的培养基组成,并与目前普遍采用的TK培养基做对比,为更好地将此菌株应用于环境污染治理奠定理论基础和提供技术支持.

1 试验

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

白腐真菌 - 糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*).

1.1.2 培养基

1) 固体培养基: 土豆液 20%, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, VB_1 0.01 g/L.

2) TK 培养基: 参照 Tien & Kirk 培养基配制^[13].

3) 试验用培养基: 在 TK 培养基的基础上,选择不同种类的碳源和氮源,选取不同的碳源和氮源质量浓度,按照正交表配制.

1.2 方法

1.2.1 菌株培养

糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 经培养箱 25 °C 活化 3 d, 从斜面接种于固体培养基的平板上, 7 d 左右待糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 长满整个平板后, 用无菌打孔器打成直径为 10 mm 的菌片, 接种于含有 50 mL 液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 接种量为 3 片, 在 120 r/min、25 °C 的条件下进行摇床培养, 定时取样测定生物量和漆酶酶活力.

1.2.2 正交试验

糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 产漆酶的液体培养基采用四水平五因素正交试验, $L_{16}(4^5)$

正交表见表 1.

表 1 正交试验因素水平表

碳源 A	氮源 B	ρ (碳源)/	ρ (氮源)/	pH E
		(g · L ⁻¹) C	(g · L ⁻¹) D	
葡萄糖	酒石酸铵	8	0.11	6
蔗糖	氯化铵	10	0.44	6
麸皮	酵母粉	12	0.88	6
玉米粉	蛋白胨	14	1.32	6

麸皮和玉米粉选用其浸出液, 即煮沸 30 min, 过滤所得. pH 固定为 6, 以便在后期做方差分析.

1.2.3 粗酶液的制备、漆酶活力和生物量的测定
参见文献[14].

2 结果与分析

2.1 糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 产漆酶培养基条件的优化

2.1.1 正交试验结果

按 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验, 以漆酶为评价指标, 平均最高产酶结果见表 2.

表 2 正交试验产漆酶 (Lac) 结果

样号	因素					平均最高酶活/ (U · L ⁻¹)
	A	B	C	D	E	
1	1	1	4	3	2	47.22
2	1	2	3	2	3	41.11
3	1	3	1	4	4	56.67
4	1	4	2	1	1	83.34
5	2	1	1	1	3	58.89
6	2	2	2	4	2	40.00
7	2	3	4	2	1	43.89
8	2	4	3	3	4	62.78
9	3	1	3	4	1	56.11
10	3	2	4	1	4	48.89
11	3	3	2	3	3	80.00
12	3	4	1	2	2	81.11
13	4	1	2	2	4	110.56
14	4	2	1	3	1	149.45
15	4	3	3	1	2	113.89
16	4	4	4	4	3	102.78

试验结果表明, 有机碳源类型培养基相对于无机碳源类型培养基的平均最高酶活较高. 初步判断有机碳源利于产酶. 14 号样产酶量相对于其他 15 个试验号样产酶量要高, 平均最高酶活达到 149.45 U/L.

2.1.2 结果分析

通过对正交试验数据进行直观分析得到最佳产酶培养基的成分组成为: 碳源为玉米粉, 其质量浓度为 8 g/L, 氮源为氯化铵, 其质量浓度为 0.88 g/L, 培养基中的其他成份为 KH_2PO_4 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 维生素 0.5 mL/L, Tween80 0.9 mL/L, 无机溶

液1 mL/L, pH = 6.

通过极差分析,可以排列出各因素对白腐真菌分泌漆酶影响大小的顺序. 图1为各因素的水平-指标均值. 可以看出, A因素:在试验选取的4种碳源中,玉米粉最有利于产漆酶,当其质量浓度为8 g/L时对产酶的促进作用最大. 玉米粉在培养基成分中属于有机碳源,其浸出液能促进漆酶的分泌^[15]. 而无机碳源蔗糖能支持菌的生长,不能促进漆酶的分泌. B因素:试验中选取的4种氮源,氯化铵最利于产漆酶;说明白腐真菌 (*Pleurotus ostreatus*) 更易于利用无机氮源,而有

机氮需要分解成无机氮才被利用^[16]. C因素:试验选取不同碳源质量浓度中,当质量浓度为8 g/L时产漆酶最高. D因素:4种氮源质量浓度中,当质量浓度为0.11 g/L时产漆酶最高;氮源是影响漆酶分泌的一个重要因素,高碳氮质量浓度比有利于漆酶的分泌^[17]. E因素看作空白列,有利于后期做数据分析时进行方差分析,根据本实验室的相关研究选取 pH = 6. 通过极差分析,得出各因素对产漆酶影响依次为:碳源种类 > 碳源质量浓度 > 氮源质量浓度 > 氮源种类.

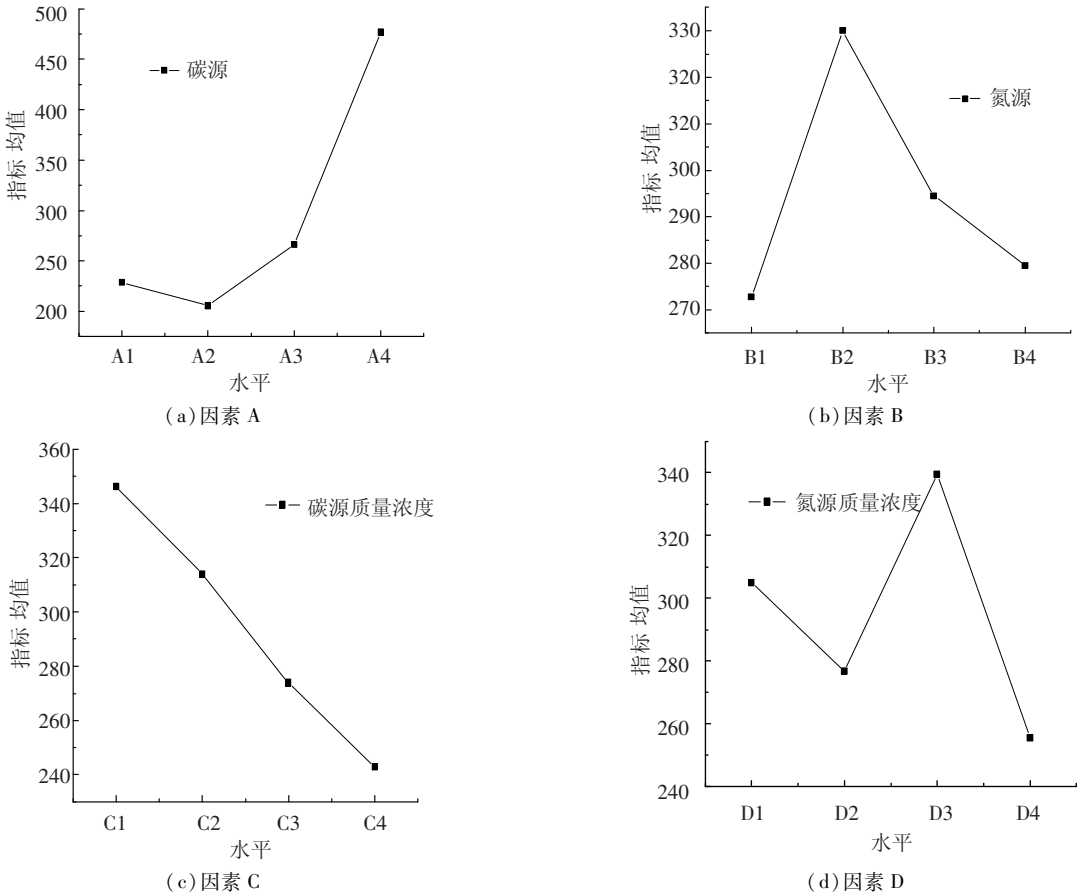


图1 各因素的水平-指标均值

用 SPSS 软件对正交试验数据进行方差分析得出碳源类型对漆酶影响显著. 此外, F_x 检验可知,因素水平的改变对指标的影响超过了试验误差引起的影响,试验条件改变引起的以漆酶酶活为试验指标的数据波动不是由试验误差引起的,而是由试验所选的因素水平的不同所引起的,各因素不同水平之间对试验结果有显著性的差异.

上述分析结果与直观分析和极差分析得出的结果一致. 从直观分析结果可以看出,正交试验得出结果是 14 号样产酶量最高,那么该试验条件下各因素所在的水平应该优于其他试验条件下各因素所在的水平,即各因素都存在一个最优水平,各

因素不同水平之间对试验结果也应该存在着差异. 上述方差分析的结果充分肯定了各因素不同水平之间的这种差异,说明了这些差异是真实存在的,而不是由试验误差引起的.

2.2 优化后培养基产酶情况同 TK 培养基产酶比较

比较优化培养基和目前普遍采用的 TK 培养基在培养糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 的产酶情况. 从图2可以看出,优化的培养基产漆酶酶活明显高于 TK 培养基,酶活峰值达 149.45 U/L,而 TK 培养基的酶活峰值仅为 50.00 U/L,优化后的培养基产漆酶酶活是 TK 培养基的 3 倍.

根据以上分析, 建议做更深入的碳源优化, 碳源类型是对糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 产漆酶影响最大的因子, 找出合适的碳源种类是研究此菌种分泌漆酶最佳培养基的关键。

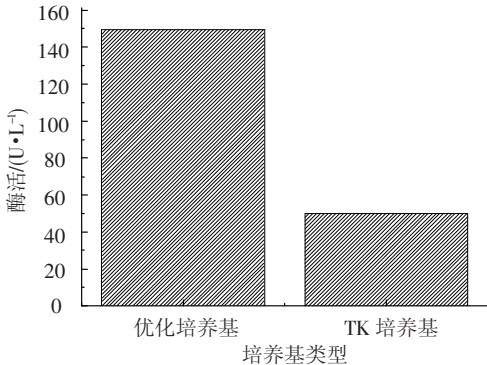


图 2 不同培养基产漆酶情况

2.3 白腐真菌生长与产酶的关系

白腐真菌的生长状态关系到其分泌漆酶酶活的高低, 只有当生物量达到一定程度时, 白腐菌才开始分泌漆酶。基于此, 采用优化后的培养基对糙皮侧耳菌的生长与产酶关系进行了研究, 结果如图 3 所示。

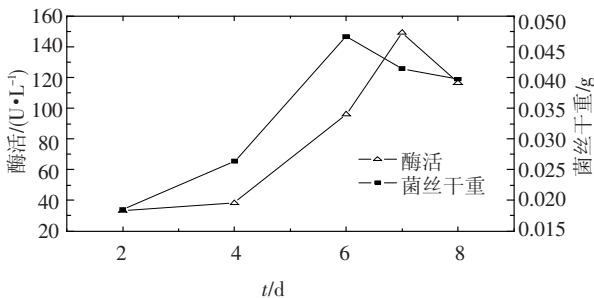


图 3 糙皮侧耳菌的生长和产酶关系

糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 在前期生长过程中酶活和生物量均随时间增加而升高, 第 6 天时菌体生长达到最大值, 第 7 天时漆酶酶活达到最高值, 两者在峰值出现的时间上并不一致, 该研究结果与前期研究的另一种白腐真菌——偏肿拟栓菌的结果相同^[14]。由此可以说明漆酶的分泌具有滞后性。因此, 有关土著白腐真菌的酶学特性仍需进一步研究。

3 结 论

1) 有机碳源类型的培养基更利于糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 产漆酶, 该菌株最佳产漆酶培养基组成为: 碳源为玉米粉, 质量浓度为 8 g/L, 氮源为氯化铵, 质量浓度为 0.88 g/L。通过极差分析, 得出各因素对产漆酶影响依次为: 碳源种类 > 碳源质量浓度 > 氮源质量浓度 > 氮源种类。同时方差分析的结果也进一步证明碳源种类对产酶影响更显著。

2) 糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 在经过优化的培养基中产漆酶酶活最大值为 149.45 U/L, 而在文献中普遍采用的 TK 培养基中产漆酶酶活最大值仅为 50.00 U/L, 因此, 优化后培养基提高了糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 的产漆酶能力近 3 倍。

3) 糙皮侧耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) 的最大生长量时间与其分泌漆酶的峰值时间并不一致, 表现为其分泌漆酶具有一定的滞后性, 因此, 有关土著白腐真菌的酶学特性仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] ALAM M Z, MANSOR M F, JALAL K C A. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme production from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 162(2/3):708-715.
- [2] WANG C, XI J Y, HU H Y, et al. Biodegradation of gaseous chlorobenzene by white-rot fungus *Phanerocheate chrysosporium* [J]. Biomedical and Environmental Science, 2008, 21(6):474-478.
- [3] KURNIAWATI S, NICELL J A. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16):7825-7834.
- [4] SCHERER M, FISCHER R. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 199(2):207-213.
- [5] THURSTON C F. The structure and function of fungal laccase [J]. Microbiology, 1994, 140:19-26.
- [6] 刘涛, 曹瑞钰. 漆酶在环境保护领域中的研究及应用进展 [J]. 云南环境科学, 2005, 24(3):12-14.
- [7] GULLOTTO A, BRANCIAMORE S, DUCHI L, et al. Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and poly-aromatic hydrocarbons [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17):8353-8359.
- [8] COUTO S R. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsute* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 148(3):768-770.
- [9] EGGEN T. Application of fungal substrate from commercial production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 1999, 44(2):117-126.
- [10] GAO D W, ZENG Y G, WEN X H, et al. Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions [J]. Process Biochemistry, 2008, 43:837-944.