

一株木蹄层孔菌 SO3 高产漆酶发酵工艺及部分酶学特性研究

谢玉清^{1,2}, 陈 竞^{1,2}, 代金平^{1,2}, 杨新平^{1,2},
古丽努尔·艾合买提^{1,2}, 王志方^{1,2}, 王小武^{1,2}, 冯 蕾^{1,2*}

¹新疆农业科学院微生物应用研究所; ²新疆特殊环境微生物重点实验室, 乌鲁木齐 830091

摘要:从采自新疆阿勒泰山的木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)中筛选获得一株高产漆酶的SO3菌株,对其产酶发酵工艺进行优化,并对部分酶学特性进行了研究。结果表明:SO3菌株产漆酶的最佳碳、氮源分别为麦麸和酵母粉;Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺和Mg²⁺的添加对SO3产漆酶有一定的促进作用,而Cu²⁺具有明显的抑制作用;没食子酸和单宁酸可使产酶高峰期提前2天;添加ABTS可使酶活由6 736 U/L提高至8 470 U/L;正交实验L₉(3⁴)优化培养基最佳组分为:酵母粉0.5%、麦麸2.5%、葡萄糖0.5%,磷酸二氢铵0.5%,漆酶活性达到10 863 U/L。酶学特性结果表明:SO3菌漆酶最适反应温度为50℃,且在80℃仍具有漆酶活性,最适反应pH为3.0,在40℃,pH 4.0~5.0之间,酶活性最稳定;同时研究表明Mn²⁺和Zn²⁺对酶稳定性有一定的促进作用,Co²⁺、Cd²⁺、Cr²⁺和Pb²⁺对酶的稳定性具有明显的破坏作用;对菌体及发酵液进行了双向电泳检测,测定其等电点为4.1,获得了1个纯化酶蛋白质谱序列。结果表明,该蛋白为LaccaseE(*Trametes* sp. 420)。SO3菌株具有潜在的应用价值。

关键词:木蹄层孔菌;漆酶;发酵工艺优化;酶学特性;质谱测序

中图分类号:Q939.97

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)2-0296-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.2.014

Fermentation technology of *Fomes fomentarius* SO3 producing laccase and partial enzymatic properties

XIE Yu-qing^{1,2}, CHEN Jin^{1,2}, DAI Jin-ping^{1,2}, YANG Xin-ping^{1,2},
GuliAhmat^{1,2}, WANG Zhi-fang^{1,2}, WANG Xiao-wu^{1,2}, FENG Lei^{1,2*}

¹ Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences;

² Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China

Abstract: Strain *Fomes fomentarius* SO3 with high-yield laccase was screened from the Alter Mountains in Xinjiang. We optimized the fermentation technology and studied the partial enzymatic properties. The experimental result showed that the optimal carbon and nitrogen sources were wheat bran and yeast extract powder. Adding Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ and Mg²⁺ could promote the yield of laccase, the effect of Cu²⁺ was adverse. Gallic acid and tannic acid made enzyme production peak two days ahead and ABTS may increase enzyme activity from 6 736 U/L to 8 470 U/L, orthogonal experiment L₉(3⁴) proved that optimum medium consists of 0.5% yeast extract powder, 2.5% wheat bran, 0.5% glucose and 0.5% (NH₄)₂PO₄, in this case, enzyme activity could reach to 10 863 U/L. The study of enzymatic properties showed optimal reaction temperature of laccase is 50℃ and there was still activity at 80℃, optimal reaction pH was 3.0 and enzyme activity was stable when pH was 4.0~5.0 and temperature was under 40℃. At the same time, Co²⁺, Cd²⁺, Cr²⁺ and Pb²⁺ could damage enzyme stability. Bidirectional electrophoresis was performed on the bacteria and fermentation liquid in which isoelectric point of laccase was determined to be 4.1. A pure enzyme protein sequence was obtained by mass spectrometry that showed the protein to be LaccaseE (*Trametes* sp. 420).

Key words: *Fomes fomentarius* SO3;laccase;optimizing fermentation technology;enzymatic properties;mass spectrometry sequencing

收稿日期:2019-08-01 接受日期:2019-12-17

基金项目:国家自然科学基金(2166038);新疆维吾尔自治区重点研发项目(2017B01003);新疆维吾尔自治区重点研发项目(2017B01001);

新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2017065)

*通信作者 Tel:86-018799195918;E-mail:fj_xj03@sina.com

漆酶最早于 1883 年在漆树的汁液中发现,后来研究表明漆酶广泛存在于自然界中,如植物、真菌、细菌、动物及昆虫中^[1]。漆酶属于蓝色氧化酶家族,是一种含铜的多酚氧化酶,以分子氧作为最终电子受体,是重要的木质纤维降解酶之一,还能催化降解多种芳香族化合物,特别是酚类^[2]。因而漆酶作为一种绿色生物催化剂在生物质能源、纸浆生物漂白、染料脱色、废水处理、食品加工等领域具有广阔的应用前景^[3]。

真菌漆酶比细菌漆酶、植物漆酶等具有更好的热稳定性、金属离子耐受性及更高的底物催化氧化性,在工农业及环境领域的应用中得到了较高的关注^[4]。木蹄层孔菌属担子菌纲的白腐菌目,是漆酶最主要的生产者之一^[5]。真菌漆酶的生产模式包括固态发酵和液体发酵,工业生产基本以液体发酵为主,而高酶活发酵工艺的优化及漆酶稳定性的研究是工业化生产漆酶的关键^[6]。本研究对新疆阿勒泰山区分离筛选到的一株木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)SO3 菌产漆酶的发酵条件及部分酶学特性进行研究,为真菌漆酶的规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 实验菌种

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)SO3 为本实验室从采自新疆阿勒泰山的菌种中分离筛选获得。

1.1.2 培养基

产酶基础培养基 MF^[7-9]:麦麸 25 g,葡萄糖 10 g,酒石酸铵 1.84 g,NaCl 1.0 g,KH₂PO₄ 2 g,琥珀酸钠 1.18 g,VB₁ 10 mg,聚山梨酯-80 0.5 g,微量元素溶液 70 mL,加水定容至 1 000 mL,pH 调至 5.5。

微量元素组成:MgSO₄ · 7H₂O 3.0 g,MnSO₄ · H₂O 0.5 g,ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g,CuSO₄ · 7H₂O 0.1 g,CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g,KAl(SO₄)₂ · 12H₂O 10 mg,H₃BO₃ 10 mg,NaMnO₄ · 2H₂O 10 mg,加水定容至 1 000 mL。

1.1.3 酶检测试剂

0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液(pH 4.0),0.5 mmol/L 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS),漆酶(laccase)。

1.2 实验方法

1.2.1 漆酶活力测定

采用 ABTS[2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]法^[10-12]。反应体系组成为:0.1

mol/L NaAc-HAc 缓冲液(pH4.0)1.95 mL、0.5 mmol/L 连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)2.00 mL 和适当稀释的酶液 50 μL,28 ℃启动反应。并在 3 min 内连续测定反应液 420 nm($\varepsilon = 3.6 \times 10^4$ mol/L/cm)处吸光值的增加值。该条件下,每分钟使 1 μmol/L 的 ABTS 氧化的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

漆酶活力计算公式:漆酶活力(U/L) = (n × $\Delta A \times 10^6 \times V_1$) / (3.6 × 10⁴ × 3 × V₂)

其中:n 为酶液稀释倍数;V₁ 为反应总体积;V₂ 为反应酶液体积; ΔA 为 3 min 内反应液在 420 nm 处吸光度的变化值;3.6 × 10⁴ 为 ABTS 氧化态的摩尔吸光系数(mol/L/cm)。

1.2.2 产漆酶发酵条件的研究

1.2.2.1 不同碳源对发酵产漆酶的影响

采用单因素试验设计^[13],在基础培养基 MF 的基础上进行碳源替换,分别以 0.5% 的麦芽糖、蔗糖、甘油、葡萄糖、羧甲基纤维素钠、淀粉、麦麸作为碳源,装液量 50 mL/瓶,种子菌龄为 5 天,接种量 5%,pH 调至 5.5,发酵 7 天后检测漆酶活性。

1.2.2.2 不同氮源对发酵产漆酶的影响

采用单因素试验设计,在基础培养基 MF 的基础上进行氮源替换,分别以 0.5% 干酪素、酵母粉、蛋白胨、硝酸铵、硫酸铵、磷酸二氢铵、酒石酸铵作为氮源,装液量 50 mL/瓶,种子菌龄为 5 天,接种量 5%,pH 调至 5.5,发酵 7 天后检测漆酶活性。

1.2.2.3 不同金属离子添加对发酵产酶的影响

以 MF 为产漆酶基础培养基,分别添加浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的 Cu²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Co²⁺,培养 6 天,测定漆酶的活性(U/L)。

1.2.2.4 不同诱导剂对漆酶活性的影响^[14]

以 MF 为基础产漆酶培养基,pH 调至 5.5,装液量 50 mL/瓶,种子菌龄为 5 天,接种量 5%,接种后第二天添加不同诱导剂,诱导剂分别为藜芦醇、ABTS、没食子酸、单宁酸及愈创木酚,终浓度为 0.025 mmol/L。分别在第 3、5、7、9、11 天测定酶活。

1.2.2.5 正交实验优化培养基

在 MF 基础产漆酶培养基基础上,各选择两种最优的碳、氮源进行组合,设计正交实验,选用 L₉(3⁴)正交实验,具体组合如表 1。

表 1 培养基组成因素水平表
Table 1 Orthogonal of medium component

水平因子 Level factor	A 酵母粉 Yeast powder(%)	B 麦麸 Wheat bran(%)	C 葡萄糖 Glucose(%)	D 磷酸二氢铵 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (%)
1	0	0	0.5	0.2
2	0.5	1.0	1.0	0.5
3	1.0	2.5	2.0	1.0

1.2.3 漆酶部分酶学特性研究

1.2.3.1 SO₃漆酶的最适反应温度和热稳定性

在 pH4.0 的 NaAc-HAc 缓冲液中, 在预试验基础上, 分别在 20、30、40、50、60、70、80 ℃ 条件下测定酶活, 设定在 50 ℃ 条件下测定的 SO₃ 漆酶活性为 100%, 确定漆酶最适反应温度; 在上述不同反应温度下继续保温 10 min 后, 再次测定漆酶活性, 以反应起始的酶活为对照, 计算残留酶活, 确定其热稳定性。

1.2.3.2 SO₃漆酶的最适反应 pH

分别用 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制反应底物, 测定漆酶活力。

1.2.3.3 SO₃漆酶 pH 稳定性

将酶液加入 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制的底物, 放入 40 ℃ 的水浴中保温 24 h, 测定酶活。

1.2.3.4 不同金属离子对 SO₃漆酶稳定性的影响

用 pH4.0 的 NaAc-HAc 缓冲液配制 FeCl₂、MnSO₄、NaCl、CoCl₂、ZnSO₄、CaCl₂、MgSO₄、CuSO₄、KCl、CdCl₂、CrCl₃、PbCl₂、AgNO₃、BaSO₄ 溶液, 使其终浓度为 4 mmol/L, 在最适反应温度下, 以不添加上述金属离子的反应体系作为对照, 计算漆酶的相对活力。

1.2.4 SO₃漆酶蛋白性质研究

1.2.4.1 SO₃分泌蛋白 SDS-PAGE 分析

按最优的发酵条件获得漆酶发酵液, 10 000 rpm、4 ℃、离心 20 min, 经过了 30% ~ 80% 的硫酸铵分段盐析、Macro-Prep DEAE 弱阴离子交换层析和 Bio-Gel P-60 凝胶过滤层析系列纯化, 纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳分析^[15]。

1.2.4.2 SO₃分泌蛋白双向电泳、漆酶等电点测定及主要蛋白质谱分析^[16]

采用 Bio-Rad 蛋白质双向电泳系统测定木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO₃漆酶的等电点, 将漆酶发酵液经过 10 000 rpm、4 ℃、离心 20 min 后, 分别收集上清液和沉淀, 使用 pH7.5、20 mmol/L 的 Tris ·

HCl 缓冲液将沉淀冲洗 4 ~ 5 次, 然后加入 Tris · HCl 缓冲液进行超声波破碎(冷却进行)后, 10 000 rpm、4 ℃、离心 10 min, 取上清液进行透析过夜、浓缩至所需体积即可。上清液则可直接进行透析过夜、浓缩至所需体积。等电点聚焦使用了 Bio-Rad 的 IPG 预制胶条, pH 为 3.0 ~ 10, pH 梯度为线性梯度, 通过 Bio-Rad PDQuest 2-D Analysis software 软件分析获得酶蛋白等电点 pI。第二向 SDS-PAGE 电泳对木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO₃发酵产酶高峰时的菌体及发酵液进行上样检测对比分析。并将表达量高的漆酶蛋白切下进行质谱测序分析(委托北京军事医学科学院完成)。

2 结果与分析

2.1 产漆酶发酵条件的研究

2.1.1 不同碳源对 SO₃产漆酶的影响

基础产酶培养基以麦麸加葡萄糖(CK)的碳源组合酶活相对较高, 为 10 966 U/L, 麦麸产酶活性为 1 326 U/L, 麦芽糖产酶活为 313 U/L; 添加蔗糖、甘油、葡萄糖、羧甲基纤维素钠、淀粉替代基础培养基中的麦麸加葡萄糖均未检测到酶活(图 1), 由此确定基础培养基 MF 中麦麸加葡萄糖的碳源组合为最佳。

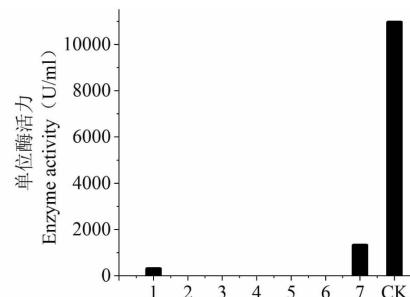


图 1 不同 C 源对 SO₃产漆酶的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on the production of SO₃ laccase

- 注:1. 麦芽糖;2. 蔗糖;3. 甘油;4. 葡萄糖;5. 羧甲基纤维素钠;
6. 淀粉;7. 麦麸;8. 对照。Note:1. Maltose;2. Sucrose;3. Glycerin;
4. Glucose;5. Carboxymethylcellulose sodium;
6. Starch;7. Wheatbran;8. CK.

2.1.2 不同氮源对 SO3 产漆酶的影响

添加酵母粉替代原培养基中的酒石酸铵时,酶活最高,为 7 566 U/L;其次为磷酸二氢铵,酶活为 4 994 U/L;再次为蛋白胨,酶活为 3 312 U/L;添加硝酸铵替代原培养基中的酒石酸铵时,酶活为 1 224 U/L;添加硫酸铵和干酪素替代原培养基中的酒石酸铵时,酶活分别为 1 155 和 1 080 U/L;而以酒石酸铵(CK)作为氮源时,酶活为 1 113 U/L,由此确定,SO3 产漆酶的最佳氮源为酵母粉,其次为 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (图 2)。

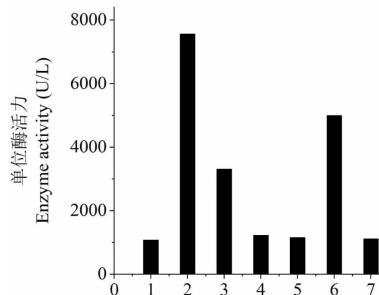


图 2 不同 N 源对 SO3 产漆酶的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources
on the production of SO3 laccase

注:1. 干酪素 (0.5%);2. 酵母粉;3. 蛋白胨;4. 硝酸铵;5. 硫酸铵;6. 磷酸二氢铵 (0.5%);7. 酒石酸铵。Note: 1. Casein (0.5%);2. Yeast extract powder;3. Peptone;4. Ammonium nitrate;5. Ammonium sulfate;6. Ammonium dihydrogen phosphate;7. Ammonium tartrate(CK)。

2.1.3 不同金属离子浓度对产漆酶的影响

以不添加金属离子组 (0 mmol/L) 为对照(图 3), Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的添加对 SO3 产漆酶有一定的促进作用,其中 0.1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、0.1 mmol/L 和 2 mmol/L Zn^{2+} 、0.2 mmol/L 和 0.5 mmol/L Ca^{2+} 的效果最明显。添加 0.1 mmol/L 的 Mg^{2+} 在第 7 d 所测得的酶活由对照组的 761 U/L 增加至 7 983 U/L, 0.1 mmol/L Zn^{2+} 在第 7 d 所测得的酶活由 4 809 U/L 增加到 9 870 U/L, Zn^{2+} 浓度在 2 mmol/L 时酶活由 4 809 U/L 增加到 9 774 U/L; Fe^{2+} 和 Co^{2+} 的添加,漆酶产量较低,对产酶影响不明显;不同浓度 Cu^{2+} 的添加都使酶活明显下降,说明 Cu^{2+} 对产酶具有抑制作用。

2.1.4 不同诱导剂对 SO3 产漆酶的影响

由图 4 可知,添加没食子酸和单宁酸可使产酶高峰期由对照的第 7 天提前到第 5 天;添加 ABTS 可使酶活由 6 736 U/L 提高至 8 470 U/L;而藜芦醇抑制产酶,愈创木酚对产酶无明显影响。

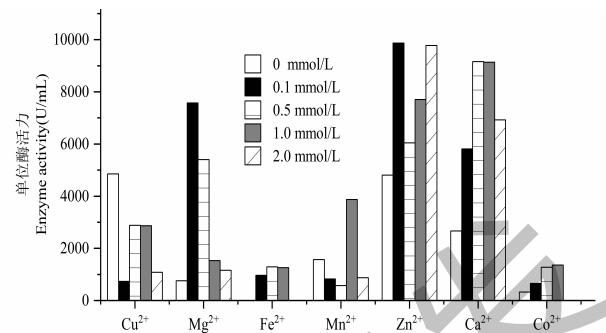


图 3 不同金属离子添加对 SO3 产漆酶的影响

Fig. 3 Effect of different metallic ion

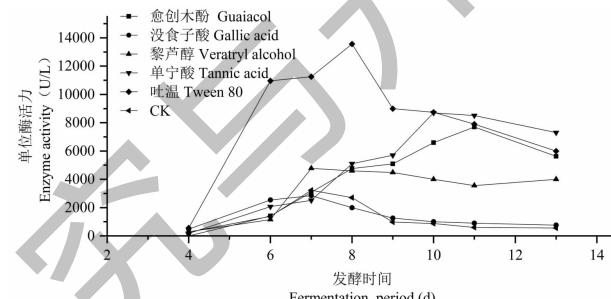


图 4 不同诱导剂对 SO3 产漆酶的影响

Fig. 4 Effect of different inducer

2.1.5 培养基的正交实验结果

从表 2 和表 3 的正交实验结果和方差分析可知,因素 A(酵母粉)的第二个水平最佳,因素 B(麦麸)的第三个水平最佳,因素 C(葡萄糖)和 D(磷酸二氢铵)最佳水平分别是第一和第二。因此最优培养基组分为 $A_2B_3C_1D_2$, 即酵母粉 0.5%、麦麸 2.5%、葡萄糖 0.5%、磷酸二氢铵 0.5%。极差(R)反映了不同因素对酶活影响的程度,其主次顺序为 A(酵母粉) > D(磷酸二氢铵) > B(麦麸) > C(葡萄糖)。通过此培养基进一步优化后,木蹄层孔菌 (*Fomes fomentarius*) SO3 漆酶活性达到 10 863 U/L。

2.2 漆酶部分酶学特性研究

2.2.1 SO3 菌漆酶的最适反应温度

在预试验基础上,设定在 50 °C 条件下测定的 SO3 漆酶活性为 100%, 20 到 80 °C 温度区间内测定的反应液酶活分别为 60.7%、79.6%、88.4%、100%、91%、98%、74%(图 5)。

2.2.2 SO3 菌漆酶的热稳定性

SO3 漆酶反应液继续保温 10 min 后,对比相同温度下起始酶活,计算剩余酶活百分比,结果表明,40 °C 时稳定性最好(图 6)。

表 2 木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)SO3 L₉(3⁴)产酶条件正交实验结果
Table 2 The L₉(3⁴) orthogonal results of *Fomes fomentarius* SO3 medium composition

实验编号 No.	A 酵母粉 Yeast powder (%)	B 麦麸 Wheat bran (%)	C 葡萄糖 Glucose (%)	D 磷酸二氢铵 Ammonium tartrate (%)	酶活 Enzyme activity (U/L)
1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	920
3	1	3	3	3	1 289
4	2	1	2	3	6 765
5	2	2	3	1	0
6	2	3	1	2	10 863
7	3	1	3	2	0
8	3	2	1	3	0
9	3	3	2	1	0
K1	2 209	6 765	10 863	0	
K2	17 628	920	7 685	11 783	
K3	0	12 152	1 289	8 054	
K1	736.3	2 255	3 621	0	
K2	5 876	306.7	2 561.7	3 927.7	
K3	0	4 050.7	429.7	2 684.7	
R	5 876	3 744	3 191.3	3 927.7	
最优水平 Optimal level	2	3	1	2	
最优组合 Optimal combination	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂				

表 3 方差分析表
Table 3 Variance analysis

方差来源 Variance	差异平方和 Sum of squares	自由度 df	F	P	显著性 Significance
A	92 228 604	2	3.87 868	<0.05	显著
B	31 556 936	2	1.32 713	<0.05	显著
C	23 778 329	2	1.00 000		
D	36 268 574	2	1.52 529	<0.05	显著

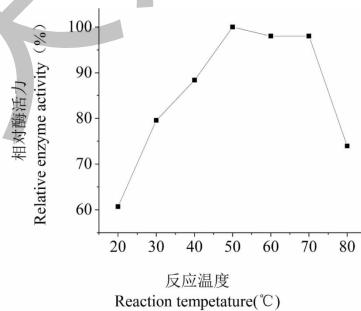


图 5 SO3 漆酶最适反应温度

Fig. 5 The optimum reaction temperature of SO3

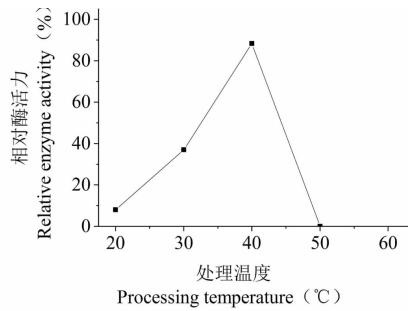


图 6 SO3 漆酶热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of SO3

2.2.3 SO3 菌漆酶的最适反应 pH

实验结果表明, pH 为 2.0 到 3.0 时所测定的酶活相对较高,pH 为 2.0 时酶活为 1 295 U/L, pH 4.0 时酶活为 897 U/L, pH 为 6.0 以上时所测酶活为 0(图 7)。

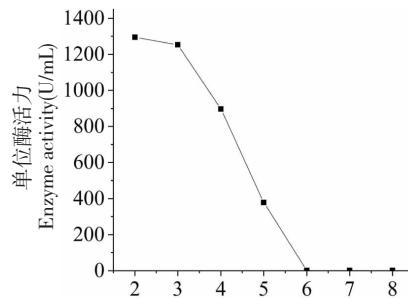


图 7 SO3 漆酶最适反应 pH

Fig. 7 Effect of optimal pH on SO3 laccase

2.2.4 SO3 菌漆酶 pH 稳定性

实验结果表明,漆酶在 40 °C 保温 24 h, pH 4.0 ~ 5.0 时酶活较稳定,pH 3.0 时相对酶活为 42.1%, pH 4.0 时为 73.6%, pH 5.0 时,酶活达到最大为 97.8%,随着 pH 值的升高酶活逐渐降低,超过 pH 6.0 时残留酶活为 0(图 8)。

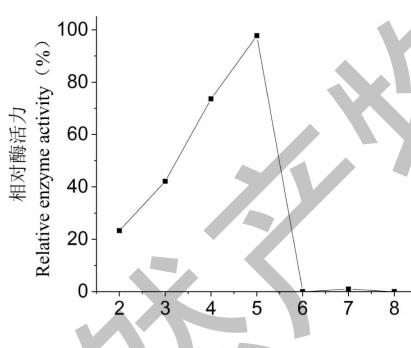


图 8 SO3 漆酶的 pH 稳定性

Fig. 8 Effect of pH on SO3 laccase stability

2.2.5 不同金属离子对漆酶稳定性的影响

结果表明,Mn²⁺ 和 Zn²⁺ 对酶稳定性有一定的促进作用,其中在含有 Zn²⁺ 的 pH 4.0 的 NaAc-HAc 缓冲液反应体系中,所测酶活为 955 U/L,为对照的 102%,Mg²⁺、Cu²⁺、Ba²⁺ 酶稳定影响不大;Co²⁺、Cd²⁺、Cr²⁺ 和 Pb²⁺ 对酶的稳定性具有明显的破坏作用,其中加入 Co²⁺ 时酶活为 28%, Cd²⁺ 为 47%, Pb²⁺ 为 54%;而 Fe²⁺ 对漆酶活性完全抑制(图 9)。

2.3 SO3 漆酶蛋白性质研究

2.3.1 不同纯化步骤的 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳结果如图 10 所示,发酵培养基

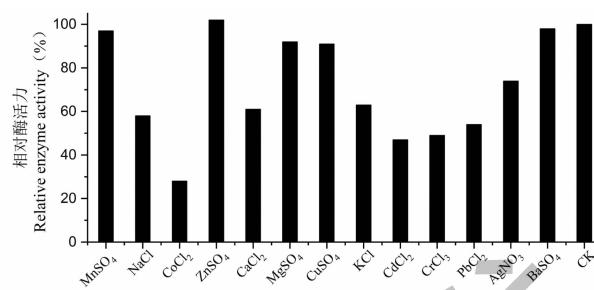


图 9 不同金属离子对 SO3 漆酶稳定性的影响

Fig. 9 Effect of different metal ion on SO3 laccase stability

中含有多种蛋白及多肽,发酵液上清在 61 KD 左右有较明显的蛋白带,经过离子交换层析后基本呈单一条带,经过凝胶过滤层析后,SDS-PAGE 电泳显示只有一条蛋白带。通过一系列的蛋白分离纯化实验,获得的漆酶已经达到了电泳纯级。应用 Bio-RAD quantity one 分析软件^[17],根据标准蛋白相对分子量,得出木蹄层孔菌漆酶相对分子量约为 61.5 KD。

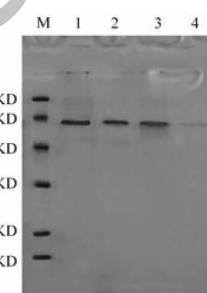


图 10 菌株不同纯化步骤的 SDS-PAGE 图

Fig. 10 SDS-PAGE of purification steps of *F. fomentarius*注:M. 蛋白相对分子量标样;1. 硫酸铵盐析(60%);2. 离子交换层析;3. 硫酸铵盐析(80%);4. 凝胶过滤层析。Note: M. protein markers; 1. Ammonium sulfate salting-out (60%); 2. Ion-exchange chromatography; 3. Ammonium sulfate salting-out (80%); 4. Gel filtration chromatography.

2.3.2 木蹄层孔菌(*F. fomentarius*)SO3 漆酶蛋白双向电泳及等电点

分别将以木蹄层孔菌(*F. fomentarius*)SO3 发酵产酶高峰时的菌体及发酵液蛋白样品用 pH 为 3.0~10 范围的 IPG 非线性胶条进行等点聚丙烯酰胺凝胶,然后用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行第二向分离。结果表明,菌体蛋白检测出较多蛋白质点,而发酵液蛋白点则主要在同一等电点区域,通过 Bio-Rad PDQuest 2-D Analysis software 软件分析,酶蛋白 pI 为 4.1,将菌体及发酵液表达量高的同一蛋白质点切下进行质谱分析。

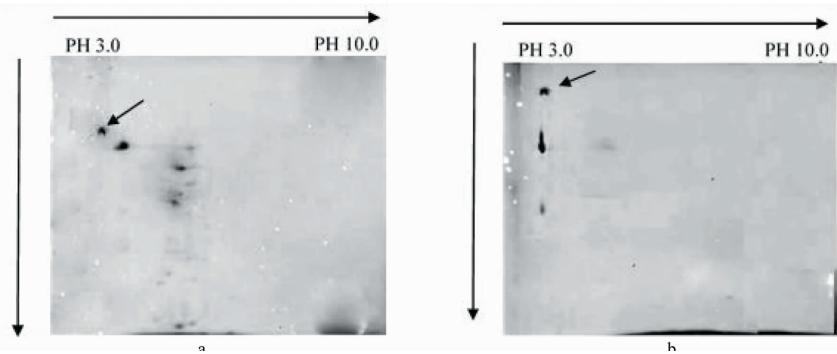


图 11 木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO3 菌体及发酵液的蛋白质双向电泳

Fig. 11 Protein two-dimensional electrophoresis

注:a. 菌体;b. 发酵液。Note :a. Ultrasonic disintegration sample cell;b. Upernsatant of fermentation liquor.

2.3.3 木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO3 漆酶质谱分析

对主要表达蛋白进行 MALDI TOF/TOF 质谱分析(图 11), 利用 GPS Explor 软件进行分析, MAS-

表 4 木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO3 漆酶质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列

Table 4 The basic information and match peptide sequences in mass spectrometry analysis of the laccase of *F. fomentarius* SO3

起始 Start	终止 End	观测值 Observed	分子量实验值 Mr(expt)	分子量计算值 Mr(cale)	得分 Score	氨基酸同源序列 The correspondence sequence of amino acid
9	102	721.339	1 440.66	1 440.67	51.5	R. GPMVVYDPSPDKH. S
16	214	855.741	2 564.20	2 564.20	64.5	R. SLYDVDDDTIITLADWSHTAAR. L
14	158	890.4178	1 778.821	1 778.832	72	TDLTIADGDVSPDGFTTR
23	156	935.0186	1 868.022	1 868.015	130	LGPAFPLGADSTLINGLGR
14	168	949.0291	1 896.043	1 896.046	89	AAILVNNQFPSPLITGNK
26	206	1 011.471	2 020.927	2 020.996	138	ANPNFGTTGFADGVNSAILR
19	206	674.6668	2 020.978	2 020.996	110	ANPNFGTTGFADGVNSAILR
14	160	1 024.004	2 045.994	2 045.984	103	YSFVLTADQDVGNWIR
46	208	742.4021	2 224.184	2 224.196	101	AAILVNNQFPSPLITGNKGDR
36	208	1 113.103	2 224.192	2 224.196	111	AAILVNNQFPSPLITGNKGDR

3 讨论与结论

漆酶是一种分布广泛的多酚氧化酶, 在食品、能源和环保等领域具有重要的应用价值。木蹄层孔菌可以合成分泌包括漆酶在内的多种木质纤维素降解酶, 这些酶的活性会随着发酵工艺的不同而不同, 所以对产酶发酵工艺进行优化, 对于提高漆酶产量和酶活具有重要意义。漆酶的合成和分泌受到营养水平、培养条件、生长阶段以及培养基中诱导剂的严格调控, 木质素或木质素相关的芳香类化合物、N 源和 C 源也能调节漆酶的合成^[18]。

微生物酶类分为组成酶和诱导酶。组成酶是指

COT 检索 NCBI Nr 蛋白质数据库, 成功鉴定 1 个蛋白点(蛋白质得分 > 50, 可信度 > 90)(表 4), 鉴定的蛋白为 LaccaseE (*Trametes* sp. 420), 其肽脂纹图谱中有 8 条序列均与 LaccaseE 蛋白匹配。

微生物无论在任何培养基中, 总是适量地存在的一些酶类; 诱导酶是依赖于酶作用底物或底物结构类似物的存在而合成的酶类^[19]。漆酶胞外组成酶产量较低, 当添加与木质素或木质素衍生物相关的芳烃类和酚类诱导物时, 能显著提高漆酶酶活。Hao^[20]研究发现, ABTS、甲苯胺和对苯二酚对新疆野生巴尔喀什蘑菇产漆酶有明显的促进作用, 而咖啡酸、没食子酸、邻苯二酚、2,6-二甲氧基酚和愈创木酸对产酶诱导不明显。Li 等^[21]利用 Cu²⁺ 和麦麸作为共同诱导剂使白腐菌产漆酶活性达到 51004 U/L。木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO3 漆酶对不同

种类、不同浓度的金属离子以及诱导剂的响应不尽相同,表明其具有较复杂的生理功能及调控机制,结果可为进一步阐明漆酶作用机制提供基础。

培养基是发酵工艺优化中的重要因素,本试验在基础产酶培养基的基础上,对碳氮源进行了进一步的筛选,并利用正交试验对筛选出的碳氮源进行组合,最终确定 0.5% 酵母粉、2.5% 麦麸、0.5% 葡萄糖、0.5% 磷酸二氢铵的最优组合,此时漆酶活性可达 10 863 U/L。Chen 等^[22]对产漆酶黄孢原毛平革菌的培养基进行筛选优化,最终确定乳糖和酵母粉为最佳碳、氮源,使该菌的产酶能力提高了 4.7 倍。Liu 等^[23]采用 20 g/L 蔗糖、2 g/L 酵母膏、3.2 g/L K₂HPO₄、0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O、3 mg/L SDS、6 mmol/L Cu²⁺、pH7.0 的优化培养基,使有柄树舌灵芝菌产漆酶活性达到 496.18 U/mL, 是优化前的 12.2 倍。

双向电泳的主要分泌蛋白质谱分析结果表明,木蹄层孔菌 (*F. fomentarius*) SO3 漆酶胞外分泌蛋白类型主要为 LaccaseE (*Trametes* sp. 420), 获得了该蛋白质的 10 个漆酶氨基酸序列片段,为后续差异基因表达序列的获得提供了依据。

参考文献

- 1 Liu L, Yang Q, Research progress and application of laccase [J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2019, 48 (3) :60-61.
- 2 Gong R, Song K, Xie DY. Applications of fungal laccase in green chemistry[J]. Biotech Bull(生物技术通报), 2018, 34(4) :24-34.
- 3 Feng X, Cheng JQ, Wang L, et al. Studies on fermentation process optimization of one *Trichoderma viride* strain for cellulase[J]. Food Fermt Tech(食品与发酵科技), 2012, 48 (3) :22-25.
- 4 Liu L, Shan SK, Zhang J, et al. Purification and properties of laccase from spent mushroom compost of *Pleurotus eryngii* [J]. Acta Agr Univ Jiangxi(江西农业大学学报), 2017, 39:989-995.
- 5 Ge F, Zhang HM, Ge Q, et al. Optimization of culture conditions of *Pleurotus eryngii* for laccase production and its degradation characteristics of phenanthrene[J]. Food Ind Sci Tech(食品工业科技), 2014, 35:221-224.
- 6 Chai XY, An SD, Sheng S, et al. Screening of laccase-producing wild macrofungi and optimization of production conditions[J]. Northwest Agr Fore Univ; Nat Sci(西北农林科技大学学报:自然科学版), 2015, 43:205-209.
- 7 Xue HT, Yuan H, Hu RP, et al. Optimization condition on laccase production by a white rot fungus *Trichaptum laricinum* under submerged fermentation with rice straw [J]. Cel Sci Tech(纤维素科学与技术), 2019, 27(2) :52-56.
- 8 Song ZL, Zhang W, Liao TG, et al. Highly laccase-yielding strains of *Pycnoporus sanguineus* and their activities on tobacco stem biodegradation[J]. Mycosystema(菌物学报), 2019, 38:381-392.
- 9 Hadibarata T, Kristanti R. Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorene[J]. Fungal Biol, 2014, 118:222-227.
- 10 Wirasnita R, Hadibarata T. Potential of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for degradation and transformation of fluoranthene[J]. Pedosphere, 2016, 26(1) :49-54.
- 11 Hu BY, Wang SN, Chen QJ, et al. Isolation, identification, culture conditions, and laccase production of white rot fungus [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2018, 24:367-373.
- 12 Guerb GK, Camu CC, Cate QO, et al. Effect of laccase from *Trametes versicolor* on the oxidative stability of edible vegetable oils[J]. Food Sci Hum Wel, 2019, 10:121-125.
- 13 Wang YJ, Liu J, Wang BX, et al. Optimization of enzyme-al-kali method extraction process of berberine from cortex phellodendri by orthogonal experiments[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 297:2092-2096.
- 14 Dou X. Characterization, application of laccase from *Ganoderma* and the expression of laccase gene in *Pichia pastoris*[D]. Wuxi:Jiangnan University(江南大学), 2019.
- 15 Wu Y, Ma HF, Cao YJ, et al. Advances on properties, production, purification and immobilization of fungal laccase [J]. Biotech Bull(生物技术通报), 2019, 35(9) :1-10.
- 16 Wu Y, Chen YY, Wei N. Biocatalytic properties of cell surface display laccase for degradation of emerging contaminant acetaminophen in water reclamation[J]. Biotechnol Bioeng, 2019, 117:342-353.
- 17 Du W, Sun CL, Wang J, et al. Isolation, identification of a laccase-producing fungal strain and enzymatic properties of the laccase[J]. 3 Biotech, 2018, 8(3) :20-25.
- 18 Wang L, Zhang Y, Tian QP, et al. Study on optimization of solid fermentation conditons for laccase produced by IMBH-2 and its enzymatic characterization[J]. Sci Tech Eng(科学技术与工程), 2018, 18:184-188.
- 19 Chen JJ, Liu LT, Cao XL. Study on screening of efficient lignin degrading bacteria and the conditions for laccase product [J]. J Gansu Agr Univ(甘肃农业大学学报), 2018, 53 (4) :130-136.
- 20 Hao JZ. Cultivation and domestication of Xinjiang wild

- Balkhash mushroom and its enzymatic characterization [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), 2018.
- 21 Li X, Li JK, Dong P, et al. White-rot fungus fermentation cultivation and effect of inducer on laccase production [J]. Food Ind Sci Tech(食品工业科技), 2013, 5: 160-163.
- 22 Chen JJ, Liu LT, Cao XL. Cloning, expression and enzyme production of laccase gene lac1680 in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biotech Bull(生物技术通报), 2018, 34 (4): 214-222.
- 23 Liu XD, Wang X, Yang XB, et al. Research on the lignin-degrading conditions optimization of *Ganoderma applanatum* strain with high laccase activity [J]. Edible Fungi China(中国食用菌), 2019, 38 (9): 37-41.

(上接第 277 页)

- 10 Uezu E. Effects of *Hemerocallis* on sleep in mice [J]. Psychiatr at Clin Neuros, 1998, 52: 136-137.
- 11 Hu YS, Yang JT, Yang P. Analysis of chemical composition of volatile oil from daylily [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31: 223-225.
- 12 Guo XY, Chen M, Zhang WL, et al. GC/MS analysis of volatile components of essential oils in daylily [J]. Agri Sci J Yanbian Univ(延边大学农学学报), 2016, 38 (1): 35-39.
- 13 Wang P, Wu Y, Ding JK. The volatile components of *Hemerocallis citrina* [J]. Plant Divers(云南植物研究), 1994, 16: 431-434.
- 14 Lin P, Cai JB, Li J, et al. Constituents of the essential oil of *Hemerocallis flava* daylily [J]. Flavour Frag J, 2003, 18: 539-541.
- 15 Lu HQ, Chen LZ, Zhang KH, et al. Analysis of volatile components and residue structure of daylily extracted by four methods [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2019, 7 (1): 1-13.
- 16 Chen L, Wang S, Sun JR. Principle and application of multiple head space solid-phase microextraction [J]. Fine Chem (精细化工), 2019, 12 (4): 1-8.
- 17 Zhang MM, Liu DC, Wang DJ, et al. Analysis and characterization of the chemical ingredients of *Lonicera japonica* by SPME-GC/MS Couple with HSDE-HPLC-DAD [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1390-1396.
- 18 Pan NL, Wang XR, Wu K, et al. Aroma components analysis of daylily dried by heat pump [J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34: 258-262.