

• 药材与资源 •

灵芝液体发酵产漆酶最佳培养基和培养条件研究

许颖, 兰进*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:目的 研究灵芝液体发酵产漆酶的最佳培养基和培养条件。方法 以灵芝 S₃ 菌株为试验材料, 以灵芝漆酶活性为衡量指标, 通过正交试验分别对灵芝液体发酵培养基及培养条件进行优化筛选。结果 筛出最佳培养基组成为葡萄糖 30 g/L、棉花 0.2%、磷酸氢二铵 0.66 g/L、干酪素 0.5%、聚山梨酯-80 0.15%; 优化培养条件为初始 pH 5.5、装液量 75 mL、接种量 12.5%、菌龄 5×24 h、培养时间 9×24 h。结论 优化培养基及培养条件后, 发酵液中灵芝漆酶活性显著提高。

关键词: 灵芝; 漆酶; 培养基; 培养条件

中图分类号: R282.15

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1707-04

Optimum culture media and liquid conditions in shaking flasks for laccase production by *Ganoderma lucidum*

XU Ying, LAN Jin

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To study the optimum culture media and liquid conditions in shaking flasks for laccase production by *Ganoderma lucidum*. **Methods** Taking S₃ strain of *G. lucidum* as test materials and laccase activity of *G. lucidum* as measurement index to optimize the culture media and liquid conditions through orthogonal test. **Results** The optimum culture components of media were: Glucose 30 g/L, cotton 0.2%, (NH₄)₂HPO₄ 0.66 g/L, casein 0.5%, Tween-80 0.15 mL; the optimum conditions were: initial pH value of medium was 5.5, 75 mL medium was in 250 mL-flask, inoculation was 12.5%, mycelium age was 5×24 h for 9×24 h culture. **Conclusion** Laccase activity of *G. lucidum* has been improved remarkably in the optimum culture media and liquid conditions.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst; laccase; culture media; culture condition

漆酶(benzenediol: oxygen oxidoreductase)是一种含铜的多酚氧化酶,与抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同源,都属于蓝色多铜氧化酶家族^[1]。1883年日本学者吉田(Yoshida)^[2]首次从日本紫胶漆树 *Rhus verniciflua* Stokes 漆液中发现一种可催化漆固化过程的蛋白质,1894年 Bertrand 将这种蛋白质命名为漆酶(laccase)。漆酶在自然界中分布于多种植物、真菌、少数昆虫和细菌中。分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌亚门(Basidiomycotina)、子囊菌亚门(Ascomycotina)及半知菌亚门(Deuteromycotina)等高等真菌,其中最主

要的是担子菌亚门的白腐真菌^[3]。漆酶研究已有一百多年的历史,是人类研究最早的酶之一,但人们对这种酶的认识还很不完整。随着漆酶功能逐渐被发现,有关漆酶的研究已备受关注^[4]。目前,漆酶的研究内容涉及微生物学、生物化学、酶学、分子生物学、遗传学等多个领域,包括菌株生长特征、漆酶的合成调控,酶蛋白的分离纯化,晶体结构和催化机制研究,相应基因的克隆、测序及异源表达等^[5]。灵芝由于其广泛的药用价值和保健作用受到人们的青睐,资料表明漆酶参与灵芝菌丝体及子实体的生长和发育过程。目前,对灵芝漆酶的研究相关报道较少,本

收稿日期:2006-02-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271587);卫生部资助项目

作者简介:许颖(1982-),女,江苏省盐城市人,在读硕士研究生,从事灵芝生理生化研究工作。

*通讯作者 兰进 Tel:(010)62899723 E-mail:lanjin60@hotmail.com

实验运用正交试验法对灵芝产漆酶的培养基和培养条件进行了优化筛选,为深入研究漆酶在灵芝生长发育过程中的生理生化作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株:实验用神州一号宇宙飞船搭载的灵芝 S₃ 号菌株,由中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所生物发酵实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(1 L):麦麸 50 g,葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, VB₁ 10 mg, 琼脂 18 g, 初始 pH 5.5, 121 ℃ 灭菌 30 min。平皿培养基和液体发酵培养基的灭菌条件与此相同。

1.2.2 平皿培养基(1 L):配方同斜面培养基。

1.2.3 筛选和产酶基础培养基(1 L):麦麸 25 g, 葡萄糖 10 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g, 琥珀酸 1.18 g, 酒石酸铵 1.84 g, VB₁ 10 mg, 聚山梨酯-80 0.05%, 微量元素溶液 70 mL, 初始 pH 5.5。

微量元素溶液组成(1 L):MgSO₄ · 7H₂O 3.0 g, MnSO₄ · H₂O 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CuSO₄ · 7H₂O 0.1 g, KAl(SO₄)₂ · 12H₂O 10 mg, H₃BO₃ 10 mg, Na₂MnO₄ · 2H₂O 10 mg。

1.2.4 液体发酵培养基(1 L):用不同的碳源和氮源组合替代筛选和产酶基础培养基中的葡萄糖和酒石酸铵,以发酵液中漆酶的活性为衡量指标对培养基进行优化实验。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面菌种培养:在无菌条件下,接种斜面培养基,25 ℃ 避光培养 7 × 24 h,置于 4 ℃ 保存,备用。

1.3.2 平皿培养:在无菌条件下,用斜面培养所得菌种接种平皿培养基,25 ℃ 避光培养 7 × 24 h,置于 4 ℃ 保存,备用。

1.3.3 液体发酵培养条件:250 mL 摇瓶装 100 mL 液体发酵培养基,初始 pH 5.5,在无菌条件下用打孔器定量取平皿培养基的菌丝块接种至摇瓶,置于 28 ℃ 旋转式摇床、160 r/min 避光培养 7 × 24 h。所有试验均重复 3 次。

1.4 不同培养基组合对灵芝漆酶活性的影响:对不同碳源和氮源组合进行 L₂₅(5⁴)正交试验,正交表设计见表 1。试验以筛选和产酶基础培养基作为对照。发酵液稀释 100 倍测灵芝漆酶活性。分别测定不同培养基组合对灵芝 S₃ 产漆酶活性的影响(试验均为质量浓度)。

表 1 培养基组合正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of culture media combination of orthogonal test

水平	因 素			
	A 小分子碳源 (1%)	B 高分子碳源 (0.5%)	C 无机氮源 (0.2%)	D 有机氮源 (0.5%)
1	无	无	无	无
2	葡萄糖	甲基纤维素	硫酸铵	酵母浸粉
3	蔗糖	淀粉	磷酸二氢铵	蛋白胨
4	麦芽糖	麦麸	硝酸铵	干酪素
5	甘油	棉花	酒石酸铵	大豆粉

1.5 不同培养基对比对灵芝漆酶活性的影响:对 1.4 项中筛选出的较优组合进行配比优化实验,对碳、氮源的不同配比组合进行 L₂₅(5⁵)正交试验,其中,葡萄糖和磷酸二氢铵的量是按照所含碳、氮元素的摩尔浓度进行确定的。发酵液稀释 300 倍测灵芝漆酶活性。分别测定不同培养基对比对灵芝 S₃ 产漆酶活性的影响。见表 2(棉花和干酪素质量浓度,聚山梨酯-80 为体积浓度)。

表 2 培养基配比组合正交设计

Table 2 Orthogonal design of matching combination in culture media

水平	因 素				
	A 葡萄糖/ (g · L ⁻¹)	B 棉花/ %	C 磷酸二氢铵/ (g · L ⁻¹)	D 干酪素/ %	E 聚山梨 酯-80/%
1	6.0	0.1	0.66	0.1	0
2	12.0	0.2	1.32	0.2	0.05
3	18.0	0.3	1.98	0.3	0.10
4	24.0	0.4	2.64	0.4	0.15
5	30.0	0.5	3.30	0.5	0.20

1.6 培养条件优化试验:在优化培养基前提下,进一步进行培养条件的优化试验,分别对不同的初始 pH 值、装液量、接种量、菌龄和培养时间进行 L₂₅(5⁵)正交试验。发酵液稀释 500 倍测灵芝漆酶活性。分别测定不同培养条件对灵芝 S₃ 产漆酶活性的影响。见表 3。

表 3 培养条件正交设计

Table 3. Orthogonal design of culture condition

水平	因 素				
	A 初始 pH	B 装液量/ mL	C 接种量/ %	D 菌龄 (×24 h)	E 培养时间 (×24 h)
1	4.5	50	5.0	5	5
2	5.0	75	7.5	7	7
3	5.5	100	10.0	9	9
4	6.0	125	12.5	11	11
5	6.5	150	15.0	13	13

1.7 漆酶活性测定方法:漆酶可催化 ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate)]发生氧化,生成的氧化型 ABTS 在 420 nm 处有还原

型 ABTS 所没有的强吸收峰,所以可通过检测 420 nm 处的吸光度的增加来测定漆酶的活性。

酶活性测定方法:3 mL 酶活反应体系中,0.2 mL 3 mmol/L 的 ABTS,1.8 mL 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠(pH 4.5)缓冲液和 1 mL 稀释酶液。先将缓冲液和底物 ABTS 混匀,再加入酶液启动反应,25 ℃ 反应 5 min 后,于 420 nm 测定吸光度。以灭活酶液的相同处理作为对照。酶活定义:1 个酶活力单位(U)是指在一定条件下,反应体系中每分钟催化 1 μmol ABTS 氧化所需的酶量。

2 结果

2.1 不同培养基组合对灵芝漆酶活性的影响:碳源和氮源是影响灵芝菌丝生长的重要因子,以筛选和产酶基础培养基为基础,分别以小分子碳源:葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油;高分子碳源:甲基纤维素、淀粉、麦麸、棉花;无机氮源:硫酸铵、磷酸氢二铵、硝酸铵、酒石酸铵;有机氮源:酵母浸粉、蛋白胨、干酪素、大豆粉的不同组合取代相应的碳源和氮源,测定不同培养基组合对灵芝漆酶活性的影响。比较极差,确定各因子对结果的影响,极差由大到小依次为:有机氮源>高分子碳源>小分子碳源>无机氮源,有机氮源是影响灵芝漆酶活性的关键因子,其他 3 种都有一定的影响。见表 4。方差分析表明,有机氮源对灵芝漆酶活性的影响显著高于其他因子。

表 4 培养基组合正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test on combination of culture media

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{0.10}	显著性
小分子碳源	0.355	4	0.802		
高分子碳源	0.655	4	1.480		
无机氮源	0.180	4	0.407	2.190	
有机氮源	0.991	4	2.239		*P<0.10
误差	2.660	24			

水平选优与组合选优:根据各试验因子的总计数或平均值可以看出:A 取 A₂,B 取 B₅,C 取 C₃,D 取 D₄,即漆酶活性最高的培养基组合为:A₂B₅C₃D₄——葡萄糖、棉花、磷酸氢二铵、干酪素。该组合不在正交试验的 25 个组合之中,因此对该组合进行补充试验。结果表明,筛选培养基组合是灵芝漆酶活性最高的培养基组合。

将筛选培养基 A₂B₅C₃D₄ 组合与筛选和产酶基础培养基进行比较,见图 1。筛选培养基组合液体发酵液中漆酶活性是筛选和产酶基础培养基的 14.23 倍。

2.2 不同培养基配比对灵芝漆酶活性的影响:对不同培养基组合实验得到的筛选培养基组合进行不同

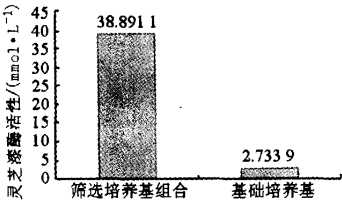


图 1 培养基组合优化前后发酵液中灵芝漆酶活性比较

Fig. 1 Comparison of laccase activity of *G. lucidum* before and after culture medium combinations

配比水平的正交试验,以获得其最优的组合。试验以未筛选的配比、筛选和产酶基础培养基为对照。正交试验方差分析结果见表 5。

表 5 培养基配比组合正交试验方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal test on matching combination of culture media

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{0.05}	显著性
葡萄糖	0.178	4	1.014		
棉花	0.056	4	0.319		
磷酸氢二铵	0.025	4	0.142	2.780	
干酪素	0.651	4	3.709		*P<0.05
聚山梨酯-80	0.071	4	0.405		
误差	1.050	24			

对正交试验结果进行极差与方差分析,结果表明:干酪素极差最大,是在液体发酵培养过程中灵芝漆酶活性的主要影响因素,其他依次为葡萄糖、聚山梨酯-80、棉花和磷酸氢二铵。磷酸氢二铵的变化对灵芝漆酶活性的影响最小。

水平选优与组合选优的各试验因子的总计数或平均值可以看出:A 取 A₅,B 取 B₂,C 取 C₁,D 取 D₅,E 取 E₄ 即漆酶活性最高的培养基组合为:A₅B₂C₁D₅E₄——葡萄糖 30.0 g/L、棉花 0.2%、磷酸氢二铵 0.66 g/L、干酪素 0.5%、聚山梨酯-80 0.15%,是正交试验所有组合中活性最高者。

将筛选培养基 A₅B₂C₁D₅E₄ 组合分别与未经筛选时的培养基、筛选和产酶基础培养基进行比较,如图 2 所示。经筛选后培养基液体发酵液中漆酶活性是筛选前培养基的 1.86 倍,是筛选和产酶基础培养基的 25.72 倍。

2.3 不同培养条件对灵芝漆酶活性的影响:通过实验已得到了以灵芝漆酶活性为衡量指标的优化培养基,在此培养基的基础上进一步对培养条件进行优化筛选实验。培养条件的优化试验仍是选用正交试验的方法。

从表 6 中可见菌龄极差最大,是在液体发酵培养过程中灵芝漆酶活性的主要影响因素,其他依次为初始 pH 值、培养时间、接种量和装液量。后 3 个

因素的变化对灵芝漆酶活性的影响均较小,其中装液量的影响可以忽略不计。

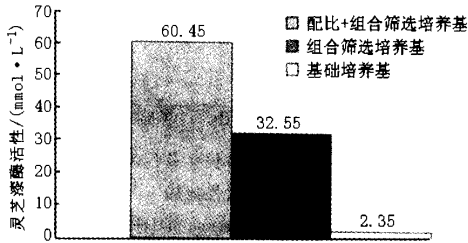


图 2 培养基配比优化前后发酵液中灵芝漆酶活性比较

Fig. 2 Comparison of laccase activity of *G. lucidum* before and after optimum culture medium matching

表 6 培养条件正交试验方差分析

Table 6 Variance analysis of orthogonal test on culture condition

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{0.05}	显著性
初始 pH	1.227	4	2.188		
装液量/mL	0.129	4	0.230		
接种量/%	0.151	4	0.269	2.780	
菌龄(×24 h)	1.587	4	2.831		* P<0.05
培养时间(×24 h)	0.208	4	0.371		
误差	3.360	24			

水平选优与组合选优的结果表明:A 取 A₃,B 取 B₂,C 取 C₄,D 取 D₁,E 取 E₃,即漆酶活性最高的培养基组合为:A₃B₂C₄D₁E₃—初始 pH5.5、装液量 75 mL、接种量 12.5%、菌龄 5×24 h、培养时间 9×24 h,是正交试验所试组合中活性最高者。

将最终的优化组合 A₃B₂C₄D₁E₃ 分别与经配比优化后的培养基、经培养基组合优化后的培养基以及筛选和产酶基础培养基进行比较,见图 3。优化条件下培养基液体发酵液中漆酶活性是经配比优化后培养基的 2.12 倍,是经培养基组合优化后培养基的 3.76 倍,是筛选和产酶基础培养基的 49.26 倍。

3 讨论

灵芝的液体深层发酵培养基及培养条件经优化后,发酵液中灵芝漆酶的活性显著提高。灵芝产漆酶的优化培养基为:葡萄糖 33.0 g/L、棉花 0.2%、磷酸氢二铵 0.66 g/L、干酪素 0.5%、聚山梨酯-80 0.15%。在未优化培养条件下,优化培养基发酵液中漆酶活性是筛选和产酶基础培养基的 25.72 倍。在优化培养基的基础上进行培养条件的优化试验,得出最佳培养条件为:初始 pH5.5、装液量 75 mL、接种量 12.5%、菌龄 5×24 h、培养时间 9×24 h。在优化培养基和优化培养条件下,液体发酵液中的灵芝漆酶活性是筛选和产酶基础培养基的 49.26 倍。

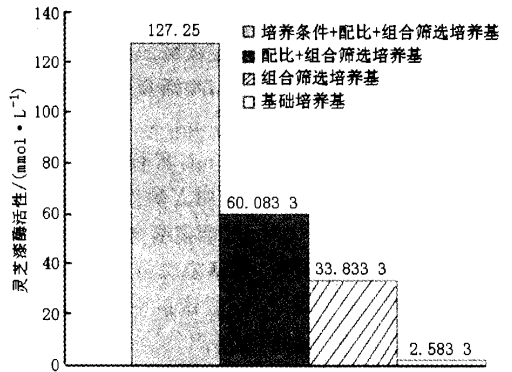


图 3 培养条件优化前后发酵液中灵芝漆酶活性比较

Fig. 3 Comparison of laccase activity of *G. lucidum* in liquid before and after optimum culture conditions

多数研究采用单因子试验的方法对最适培养基和培养条件进行筛选。通过单因子试验可分析比较不同因子的影响,但不能确定这些因子不同水平的组合中哪个是最好的,同时,用正交试验的方法具有准确、高效的特点,因此本试验中对灵芝菌种的最适培养基和培养条件的筛选均采用正交试验法。

菌丝体生长过程中,碳、氮源的利用是首先利用小分子有机碳源和无机氮源,其次是高分子有机碳源和有机氮源。大多文献中的碳、氮源筛选都选择单因子试验,从而得到一种最适的碳源或氮源。本研究中将碳源中的小分子有机碳源与高分子有机碳源区分,将氮源中的无机氮源与有机氮源相区分,分别作为影响因素进行试验,既考虑到单个碳源或氮源的影响,又考虑到小分子有机碳源和高分子有机碳源、无机氮源和有机氮源之间不同组合的影响,可使得到的优化培养基营养更为均衡,更有利于菌种的生长。将得到的最适培养基组合与基础培养基相比较,前者的氮源的量远小于后者,可见,氮源的相对限制可能利于灵芝漆酶的分泌。

References:

[1] Nina H, Laura-Leena K, Kristiina K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site [J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(8): 601-605.

[2] Yoshi H. Chemistry of Lacquer (Urusht) part 1 [J]. *J Chem Soc*, 1883, 43: 472-486.

[3] Wang J L, Yu H S, Fu S Y, et al. Advances in white-rot fungal laccase [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 1998, 25(4): 233-236.

[4] Zhu T, Zhao Y F. Induction, isolation and analysis of extracellular laccase from *Trametes gallic* Fr. [J]. *J Wuhan Univ: Sci Ed* (武汉大学学报:理学版), 2002, 48(2): 209-212.

[5] Zhang M, Xiao Y Z, Pu C L, et al. Preliminary studies on laccase production by a white-rot fungus AH28-2 [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2002, 29(3): 37-42.