文章编号:1673-1689(2010)06-0952-07

Paecilomyces sp. S152胞外漆酶的合成调控

刘志钰[1,2], 张东旭[1,2], 堵国成[1,2], 陈 坚[1,2]

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘 要:探索了不同碳氮源营养条件下,*Paecilomyces* sp. S152胞外漆酶的分泌情况,发现麦芽糖(20 g/L)、大豆蛋白胨(10 g/L)及酵母粉(1 g/L)最适于*Paecilomyces* sp. S152胞外漆酶的合成,发酵7~8 d后,漆酶酶活达到5 064 U/L。研究发现*Paecilomyces* sp. S152漆酶在细胞内及细胞外均有分布,添加1.5 g/L的Tween 80可促进胞内漆酶的释放,提高胞外漆酶酶活,缩短发酵周期(6 d),生产强度提高至946 U/(L·d)。

关键词:拟青霉;胞外漆酶;营养条件;同工酶;分布;表面活性剂

中图分类号:Q 814 **文献标识码**: A

Improvement of Extracellular Laccase Production by *Paecilomyces* sp. S152

LIU Zhi-yu[1,2], ZHANG Dong-xu[1,2], DU Guo-cheng*[1,2], CHEN Jian[1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The culture medium containing maltose (20 g/L), bean peptone (10 g/L) and yeast extract (1 g/L) was found to favor laccase production by *Paecilomyces* sp. S152 with an enzyme activity of 5064 U/L. The intra- and extra- cellular location of laccases were detected in the cells of *Paecilomyces* sp. S152. To improve cell permeability, Tween 80 (1.5 g/L) was added to culture broth and an enhanced extracellular laccase activity was detected with the shortened fermentation period (6 days) and improved (946 U/(L·d).

Key words: *Paecilomyces* sp., extracellular laccase, nutrition conditions, isozyme, location, surfactant

漆酶(EC 1.10.3.2)属于一种多铜氧化酶,最初在日本漆树*Rhus vernicifera*中检测到,因此被命名为漆酶[1]。随后,又陆续在某些昆虫、真菌及细菌内发现漆酶的存在,其中真菌漆酶是最常见的一大类漆酶[2-7]。目前,已在多种真菌中检测到漆酶的存在,包括担子菌、子囊菌和半知纲菌,其中来源最为广泛的为白腐真菌担子菌及子囊菌,如栓菌(*Trametes species*)、侧耳菌(*Pleurotus species*)、多

收稿日期:2010-01-05

基金项目:国家杰出青年基金项目(20625619);教育部长江学者和创新团队计划项目(IRT0532);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0378,NCET-05-0488)。

作者简介:刘志钰(1981-),女,安徽淮南人,发酵工程专业博士研究生。Email: liuzhiyu@jiangnan.edu.cn

*通信作者:堵国成(1965-),男,江苏常州人,工学博士,教授,博士生导师,主要从事发酵工程方面的研究。Email: gcdu@jiangnan.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

孔菌(*Polyporus species*)及及密孔菌(*Pycnoporus species*)等[3, 5−6, 8−9]。由于其广泛的底物特异性，漆酶在食品、纺织、造纸、化工及环境等行业中的应用已吸引了越来越多的关注。然而，多数真菌漆酶发酵周期较长、产酶效率较低，限制了漆酶的工业化应用。

真菌漆酶发酵是一个非常复杂的过程，它既与菌种本身的产酶能力相关，同时也受到营养和环境条件的调控[5−6, 10−11]。已有大量工作表明，不同来源的真菌漆酶对发酵培养基组成的需求存在很大差别[5−6, 11−12]。营养条件的差别不仅影响了微生物的生长和分泌漆酶的能力，同时对漆酶同工酶的种类和分泌比例、应用等方面也有显著影响[11]。此外，由于真菌漆酶一般在次级代谢阶段合成，导致发酵周期长，生产强度较低，增加了能耗和发酵成本，从而限制了漆酶的生产和应用。在 *Termitomyces clypeatus* 发酵过程中，在发酵培养初期，在微生物细胞内即可检测到漆酶酶活的存在，但胞外漆酶酶活较低；当微生物进入次级代谢后，由于细胞裂解，胞内漆酶释放到培养环境中，表现为胞外漆酶酶活的显著提高[13]。因此通过研究漆酶在细胞中的定位，进而改善细胞通透性、使胞内漆酶快速分泌到培养环境中，有望提高胞外漆酶酶活，缩短发酵周期。同时更易于进一步的分离纯化，节约发酵和提取费用。

在前期的研究中，通过低能离子注入法选育获得一株产漆酶突变菌株 *Paecilomyces* sp. S152[14−15]。目前为止关于拟青霉产漆酶的报导较少[16−17]，而开发新的产酶菌种，研究其产酶特征和调控方法，将进一步加深对漆酶的认识，扩大其应用领域。作者主要针对影响真菌漆酶发酵的主要因素，如碳氮源种类及浓度等，选取适宜的 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶发酵的营养条件。同时，在确定漆酶在 *Paecilomyces* sp. S152 细胞中定位的基础上，寻找调节 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的方法，提高胞外漆酶的生产强度。

1　材料与方法

1.1　菌株

Paecilomyces sp. S152：由作者所在实验室筛选诱变，并保藏于中国典型微生物保藏中心(CCTCCM209240)。

1.2　试剂与仪器

1.2.1　主要试剂　ABTS：购于 Sigma 公司；SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒：购自碧云天生物技术研究所；胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母粉、豆饼粉、玉米浆及糖蜜：工业级；马铃薯、麸皮、玉米芯粉及细草粉：市购；其它试剂：均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司(上海)。

1.2.2　主要仪器　超声波细胞破碎仪 UP200H：Dr. hiescher GembH 提供；真空干燥箱(BPH-6123LC)：上海一恒科技有限公司制造；垂直电泳仪及 GelDoc 凝胶成像系统：美国 Bio-Rad 公司制造；紫外可见光分光光度计(UV2450)：日本岛津公司制造。

1.3　培养基

1.3.1　斜面培养基(PDA)　马铃薯浸出液 200 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 20 g/L。

1.3.2　产酶培养基　葡萄糖 20 g/L，胰蛋白胨 5 g/L，酵母粉 2 g/L，$CuSO_4$ 100 μmol/L。以 2 mol/L NaOH 或 2 mol/L HCl 溶液调初始 pH 6.5 后分装，每 250 mL 三角瓶倒入 100 mL 培养基。

1.4　培养条件

1.4.1　斜面培养　菌种接入斜面培养基，30 ℃恒温培养 6 d，4 ℃保藏备用。

1.4.2　摇瓶培养　将培养好的斜面，用无菌生理盐水制成孢子悬液(10^6～10^7个/mL)。取 2 mL 孢子悬液接入到新鲜产酶培养基中，回转式摇床转速 150 r/min，30 ℃培养。

1.5　*Paecilomyces* sp. S152 漆酶在细胞中的定位

1.5.1　胞外漆酶的检测　发酵液 8 000 *g* 离心 10 min 后，收集上清液即为胞外粗酶液。

1.5.2　胞内漆酶的检测　发酵液离心后，收集湿菌体，用去离子水充分清洗后，溶于 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0，0.4 g 湿菌体/mL)，加入少量石英砂，于冰水浴中超声波破碎细胞(振荡幅度为 60%，工作 1 s，停 1 s，工作时间为 10 min)，细胞破碎液于 8 000 *g* 离心 10 min，收集上清液，即为胞内产物。

1.6　调节 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性对漆酶发酵的影响

1.6.1　不同表面活性剂及渗透压对细胞通透性及漆酶酶活的影响　*Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的调节以促进胞内漆酶的释放、提高胞外漆酶酶活表征。为了考察不同种类的表面活性剂和 NaCl 溶液对 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的调节作用，将发酵液 8 000 *g* 离心 10 min 后，收集菌体，用去离子水充分清洗，分别溶于各种溶液中，室温培养过夜，测定体系中漆酶酶活的变化。体系中漆酶酶活越高表明，*Paecilomyces* sp. S152 细胞通

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

透性越佳，有益于胞内漆酶释放到培养环境中。以加入等体积去离子水的样品为对照。

为了考察不同表面活性剂和NaCl溶液对*Paecilomyces* sp. S152漆酶酶活的影响，将粗酶液与等体积的表面活性剂或NaCl溶液混合，室温培养过夜，检测体系中漆酶酶活的变化。对照加入等体积去离子水。

1.6.2 *不同表面活性剂及渗透压对Paecilomyces* sp. S152 *漆酶分泌的影响* 将*Paecilomyces* sp. S152接种到发酵培养基(麦芽糖20 g/L，大豆蛋白胨10 g/L，酵母粉1 g/L，$CuSO_4$ 100 μmol/L，初始pH 6.5)中，于30 ℃、150 r/min振荡培养3 d后分别添加不同质量浓度的Triton 100、Tween 80、SDS和NaCl溶液，继续培养，定时取样并测定发酵液中漆酶酶活。

1.7 Native-PAGE电泳

Native-PAGE电泳参见文献[15]，采用10 g/dL的分离胶和5 g/dL的浓缩胶。电泳采用pH 8.8的Tris-甘氨酸缓冲体系。电泳后，凝胶分别以含0.2 mmol/L ABTS的0.1 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.4)活性染色。

1.8 分析方法

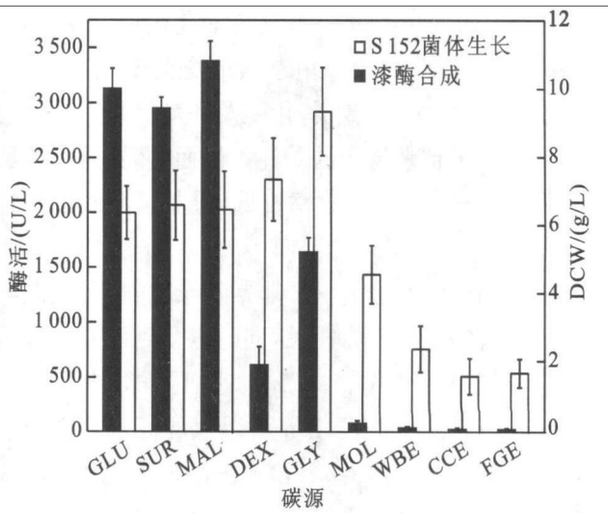
1.8.1 *漆酶酶活的测定* 采用比色法测定漆酶活性，即0.1 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.4)，1 mmol/L ABTS及酶液样品，混合均匀后，置于30 ℃反应3 min，于420 nm处测定吸光值的变化[14]。定义为每分钟氧化1 μmol ABTS所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.8.2 *菌体生长的测定* 采用细胞干重法(DCW)。发酵液用定性滤纸过滤后，湿菌体于70 ℃烘干至恒重，称重。

2 结果与讨论

2.1 碳源对*Paecilomyces* sp. S152生长及产酶的影响

碳源是菌体合成自身骨架的主要物质来源，是影响菌体生长和代谢产物合成的关键因素。由于漆酶是一类木质素降解酶，可催化木质素的降解，因此在考察不同碳源对*Paecilomyces* sp. S152生长和产酶能力的影响时，除了选用速效碳源如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、糊精、甘油和糖蜜外，同时考察了木质素含量较高的麸皮浸出液、玉米芯浸出液及细草粉浸出液对*Paecilomyces* sp. S152菌体生长和漆酶合成的影响，结果见图1。



GLU：葡萄糖；SUR：蔗糖；MAL：麦芽糖；DEX：糊精；GLY：甘油；MOL：糖蜜；WBE：麸皮浸出液；CCE：玉米芯粉浸出液；FGE：细草粉浸出液

图1 不同种类碳源对*Paecilomyces* sp. S152菌体生长和漆酶合成的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on cell growth and laccase production by *Paecilomyces* sp. S152

与Hao等报道相似[12]，在*Paecilomyces* sp. S152漆酶发酵培养过程中，添加葡萄糖和麦芽糖为碳源，不仅有利于微生物的生长，而且可提高漆酶分泌的能力，最高酶活分别达到3 127、3 380 U/L，菌体干重分别为6.35、6.44 g/L。糊精和甘油有利于菌体的生长，但却阻碍了*Paecilomyces* sp. S152漆酶的分泌；添加麸皮浸出液、玉米芯浸出液及细草粉浸出液时，微生物的生长受抑制，且几乎无漆酶合成，其原因可能是由于营养条件的缺乏，限制了菌体生长，从而导致漆酶产量的降低。

在进一步的实验中，分别采用质量浓度为10～80 g/L的葡萄糖和麦芽糖为碳源，考察两种碳源质量浓度对漆酶合成的影响，见图2。当麦芽糖质量浓度为20 g/L和40 g/L时，发酵液中*Paecilomyces* sp. S152漆酶酶活较高。综合考虑底物转化率和原料价格，选用20 g/L的麦芽糖为最适碳源。

2.2 氮源对*Paecilomyces* sp. S152生长及产酶的影响

氮源是构成菌丝体细胞物质和含氮目的产物的主要元素之一，其种类和质量浓度对真菌漆酶发酵都有着重要影响。氮源的差异不仅可以调节真菌漆酶的分泌过程，同时也会影响真菌漆酶各个同功酶的表达[10-11]。在担子菌NIOCC #2a培养过程中，添加不同种类的氮源，最终发酵液中同工酶的种类及表达量也有所不同，进而影响对污水的脱色作用[11]。由于不同微生物在漆酶的发酵培养过程中对氮源的需求不同，因此，首先考察了不同种

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

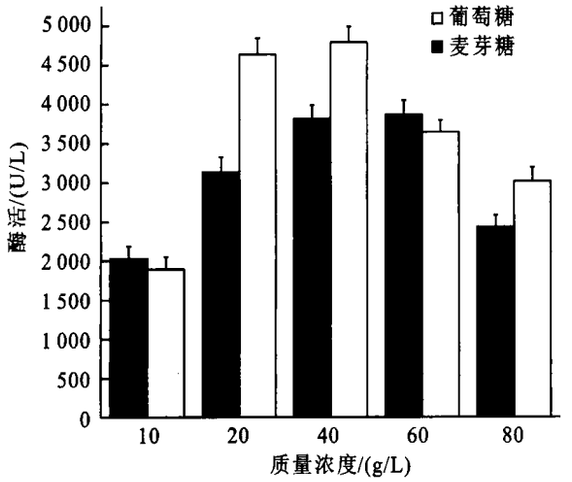
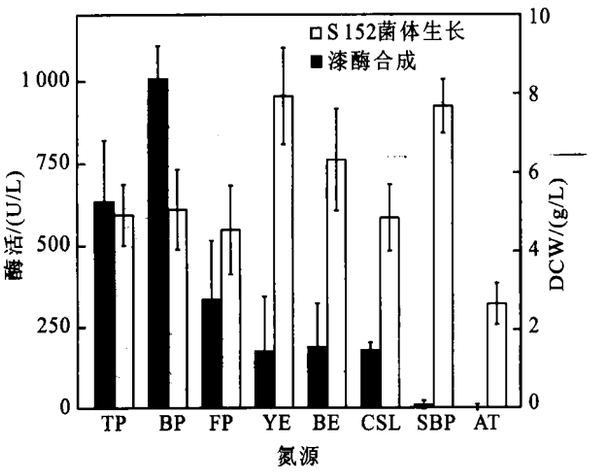


图 2　葡萄糖和麦芽糖质量浓度对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶合成的影响

Fig. 2　Effect of glucose and maltose concentration on laccase production by *Paecilomyces* sp. S152

类的氮源对 *Paecilomyces* sp. S152 生长和产酶的影响，见图 3。在以蛋白胨（胰蛋白胨、大豆蛋白胨及鱼粉）为惟一氮源时，漆酶活性普遍较高，其中当以大豆蛋白胨为惟一氮源时，最利于 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶的分泌；酵母粉、牛肉膏、玉米浆及豆饼粉虽然有益于菌体的生长，但漆酶合成量较低；与赤芝菌（*Ganoderma lucidum*）不同[7]，*Paecilomyces* sp. S152 不能有效地利用无机氮源酒石酸铵，菌体生长及漆酶合成均受到了显著抑制。



TP：胰蛋白胨；BP：大豆蛋白胨；FP：鱼粉；YE：酵母粉；BE：牛肉膏；CSL：玉米浆；SBP：豆饼粉；AT：酒石酸铵

图 3　不同种类氮源对 *Paecilomyces* sp. S152 菌体生长和漆酶合成的影响

Fig. 3　Effect of nitrogen source on the cell growth and laccase production by *Paecilomyces* sp. S152

为了更好的实现菌体生长与发酵产酶，在以 20 g/L 的麦芽糖为碳源的条件下，考察复合氮源——大豆蛋白胨和酵母粉在不同质量浓度配比下对 *Paecilomyces* sp. S152 发酵产酶的影响，结果见表 1。很多研究者认为，限制氮源供应有利于木质素降解酶的合成[18]，但也有研究发现在非限制氮源质量浓度的条件下，才能大量合成木质素降解酶[7]。作者发现，在 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶发酵培养过程中，较丰富的氮源（大豆蛋白胨 10 g/L，酵母粉 1 g/L）更利于 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶的合成；而在低氮条件下（0.5 g/L 氮源）不仅限制了菌体生长，同时漆酶酶活亦较低。

表 1　复合氮源对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶合成的影响

Tab. 1　Effect of complex nitrogen on the synthesis of laccase by *Paecilomyces* sp. S152

实验号	氮源		漆酶酶活 (U/L)
	大豆蛋白胨质量浓度/(g/L)	酵母粉质量浓度/(g/L)	
1	5.0	1.0	4 272
2	5.0	2.0	4 496
3	5.0	4.0	3 236
4	10.0	1.0	5 064
5	10.0	2.0	4 217
6	10.0	4.0	3 143
7	15.0	1.0	3 980
8	15.0	2.0	3 098
9	15.0	4.0	2 654

2.3　*Paecilomyces* sp. S152 漆酶在细胞中的定位

目前，关于漆酶在细胞中的定位尚不完全清楚。绝大多数木质素降解酶类，包括真菌漆酶，多分布于细胞外，参与木质素的降解[19-20]，但在某些微生物细胞质、细胞壁及细胞膜上也检测到漆酶的存在，并与细胞色素、孢子的生成及微生物自我防御相关[13, 19, 21]。Bose 等人认为 *Termitomyces clypeatus* 漆酶以胞内酶的形式存在，在发酵培养末期，由于细胞裂解释放至培养环境中[13]；*Neurospora crassa* 和 *Pleurotus ostreatus* 漆酶在胞内和胞外均有分布[9, 22]；*Cryptococcus neoformans* 漆酶则存在于细胞壁中，并认为与细胞的免疫能力相关[21]。

在本研究中，*Paecilomyces* sp. S152 发酵上清液和细胞破碎悬浮液中均可检测到漆酶酶活，表明漆酶在 *Paecilomyces* sp. S152 胞外和胞内均有分布。由于胞外蛋白更易收集提取，因此，进一步考察了调节 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的方法，以促进 *Paecilomyces* sp. S152 胞内漆酶的释放，提高胞外漆酶的产量和生产强度。

2.4　*Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的调节

常见改善细胞通透性的方法包括有机溶剂、表面活性剂处理法、渗透压法、冻融法及电渗透等[24]。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由于冻融法和电渗透法不易在微生物培养过程中实现，此外在前期研究中发现有机溶剂乙醇等不利于漆酶的合成，因此，作者主要考察了不同表面活性剂和渗透压法对 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的调节。

2.4.1 *不同表面活性剂及渗透压对细胞通透性和漆酶酶活的影响* 适宜的调节细胞通透性的方法不仅要求可以克服细胞壁和细胞膜的渗透壁障，促进胞内产物的释放，同时对目的产物本身不应具有抑制作用，见表2。

表2 不同表面活性剂/NaCl对细胞通透性的调节和漆酶酶活的影响

Tab. 2 Effect of surfactants and NaCl on cell permeability and laccase activity

类型		质量浓度/(g/L)	酶活	
			通透性[a]/(U/g湿菌体)	酶活性/%
非离子表面活性剂	Triton 100	1.5	2.01	100.67
		3.0	2.87	115.83
		6.0	0.60	1 025
	Tween 80	1.5	0.54	102.19
		3.0	1.16	113.59
		6.0	1.10	106.02
阴离子表面活性剂	SDS	0.15	0.69	100.68
		0.30	0.91	97.34
		0.60	0.95	96.43
阳离子表面活性剂	CTAB	0.03	0.09	106.24
		0.06	0.05	98.68
		0.12	0.04	97.21
渗透压	NaCl	5	0.43	88.34
		10	1.29	89.35
		15	1.24	91.76
对照[b]		—	0.03	100

[a]细胞通透性的调节以每克湿菌体中胞内漆酶的释放程度表征；[b]以加入等体积去离子水的样品为对照

在所选用的4类试剂中，非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂及NaCl溶液对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶酶活均无明显抑制作用，具有潜在的调节 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性和促进胞内漆酶释放的能力。阳离子表面活性剂CTAB对细胞通透性的调节作用相对较差，同时阳离子表面活性剂会影响培养环境的表面张力，抑制细胞的生长代谢。因此，作者主要考察了非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂和渗透压变化对发酵培养过程中对 *Paecilomyces* sp. S152 细胞通透性的调节作用和产酶影响。

2.4.2 *不同表面活性剂和渗透压对 Paecilomyces sp. S152 漆酶发酵的影响* 在初步的研究中发现，*Paecilomyces* sp. S152 细胞生长速率在发酵培养前3天较快；培养5 d时，胞内漆酶酶活达到最高；进入发酵培养中后期，胞外漆酶酶活快速提高。为了降低表面活性剂和NaCl对细胞生长和代谢的毒害作用，在获得较高的菌体量且胞内漆酶有一定的积累后(培养第3天)，分别加入不同浓度的Triton 100、Tween 80、SDS和NaCl溶液，考察上述各种物质对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶发酵的影响，结果见表3。在所考察的4种物质中，添加Triton 100和NaCl后，菌体量和漆酶酶活均无明显改善；SDS的添加对菌体生长不利，对应较低的漆酶酶活；添加Tween 80后，*Paecilomyces* sp. S152 的生长和漆酶酶活均得到改善，其中当Tween 80添加质量浓度为1.5 g/L时，漆酶酶活较高，为5 676 U/L，同时发酵周期缩短至6 d，生产强度提高至946 U/(L·d)。

表3 不同表面活性剂和渗透压对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶发酵的影响

Tab. 3 Effect of surfactants and NaCl on the laccase production by *Paecilomyces* sp. S152

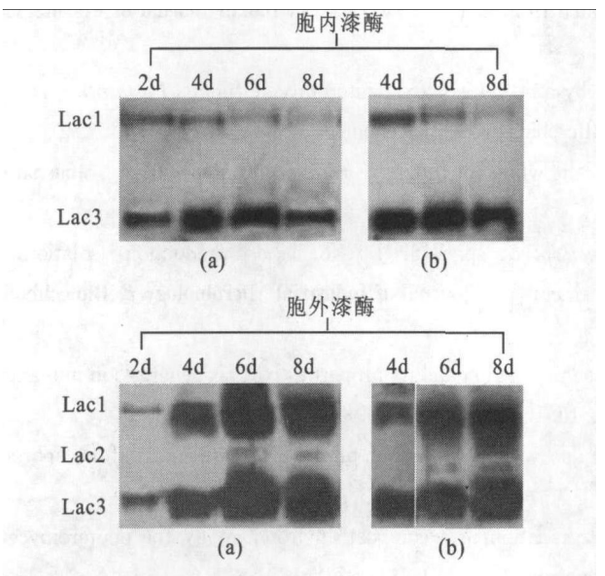
	添加质量浓度/(g/L)	漆酶酶活/(U/L)	DCW/(g/L)	发酵周期[a]/d	生产强度/(U/(L·d))
Triton 100	0.75	4 558	7.75	7	651.14
	1.5	4 718	7.92	7	674
	3	4 600	7.86	6	766.67
Tween 80	0.75	5 176	8.73	6	862.67
	1.5	5 676	8.94	6	946
	3	5 125	9.36	6	854.17
SDS	0.15	1 913	5.38	6	318.83
	0.3	1 275	5.09	5	255
	0.6	980	4.49	5	196
NaCl	5	4 742	7.86	8	592.75
	10	4 577	7.35	8	572.12
	15	4 814	6.94	7	687.72
对照[b]	0	5 036	8.67	7	629

[a]漆酶酶活达到最高值时所对应的培养天数；[b]以不添加表面活性剂和NaCl溶液的样品为对照

2.4.3 *Tween 80 对 Paecilomyces sp. S152 胞内、胞外漆酶同工酶分泌的影响* *Paecilomyces sp.* S152 胞内、胞外漆酶同工酶酶谱见图4。分析表

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明，*Paecilomyces* sp. S152 胞内漆酶主要存在两种同工酶：Lac 1 和 Lac 3。在发酵培养过程中，Lac 1 先释放至胞外，随后 Lac 3 逐渐分泌到发酵液中。与对照相比，添加 Tween 80 后，胞内漆酶 Lac 1 和 Lac 3 可更早更快地分泌至胞外。胞外漆酶在初始培养阶段活性较低，存在两种同工酶 Lac 1 和 Lac 3；培养 4 d 后，Lac 1 和 Lac 3 条带均明显增强，与对照相比，添加 Tween 80 后，胞外同工酶 Lac 1 比例增大，可能是由于在 Tween 80 的作用下，胞内漆酶 Lac 1 快速释放至胞外导致；培养 6～8 d，Lac 1 和 Lac 3 活性继续增加，表现为 Native-PAGE 凝胶电泳条带的加深，同时可以观察到同工酶 Lac 2 条带的出现。



(a) 添加 Tween 80；(b) 不添加 Tween 80

图 4　*Paecilomyces* sp. S152 胞内、胞外漆酶同工酶酶谱分析

Fig. 4　Zymogram analysis of intracellular and extracellular laccase from *Paecilomyces* sp. S152

由图 4 可见，添加 Tween 80 后，胞内、胞外同工酶蛋白质条带粗细变化加快，表明 Tween 80 在一定程度上调节了细胞通透性，促进了胞内漆酶的释放。但同时发现，在胞内样品 Native-PAGE 凝胶图中未发现同工酶 Lac 2 条带的存在，Lac 2 仅在发酵后期发酵上清液中检测出，由此推测在发酵中后期，胞外漆酶酶活的快速升高不仅是由于细胞裂解使胞内漆酶释放至培养环境中导致，同时也存在着 *Paecilomyces* sp. S152 胞外漆酶的合成。

3　结　语

1）考察了不同碳氮源对 *Paecilomyces* sp. S152 漆酶分泌的影响。当以 20 g/L 的麦芽糖、10 g/L 的大豆蛋白胨和 1 g/L 的酵母粉为碳氮源时，*Paecilomyces* sp. S152 漆酶酶活最高，为 5 064 U/L。

2）在 *Paecilomyces* sp. S152 细胞内和细胞外均有漆酶分布。添加 1.5 g/L 的 Tween 80 有利于提高胞外漆酶酶活，发酵培养 6 d，胞外漆酶酶活达到 5 676 U/L，生产强度提高至 946 U/(L·d)。*Paecilomyces* sp. S152 胞内和胞外漆酶酶谱分析表明，添加 Tween 80 可以有效促进胞内漆酶的释放，其中同工酶 Lac 1 首先释放至培养环境中；发酵培养后期，胞外漆酶酶活的提高主要是由于胞内漆酶的释放和胞外漆酶的合成导致。

参考文献(References)：

[1] Malmstrom B G, Reinhammar B, Vanngard T. The state of copper in stellacyanin and laccase from the lacquer tree *Rhus vernicifera*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1970, 205 (1): 48－57.

[2] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria [J]. **Trends in Biotechnology**, 2000, 18: 41－42.

[3] 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.

[4] Hattori M, Konishi H, Tamura Y, et al. Laccase-ype phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*[J]. **Journal of Insect Behavior**, 2005, 51: 1359－1365.

[5] 王志新，蔡宇杰，李颜颜，等. 培养基及培养条件对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响 [J]. 食品与生物技术学报，2009，28 (6)：832－839.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

WANG Zhi-xin, CAI Yu-jie, LI Yan-yan, et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus sp.* SYBC-L1[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 832－839. (in Chinese)

[6] 范文霞，蔡友华，刘学铭，等. 毛云芝菌产漆酶液体培养条件的优化[J]. 食品与生物技术学报，2008，27(3)：88－93.
FAN Wen-xia, CAI You-hua, LIU Xue-ming, et al. Optimization of liquid culture conditions for laccase production by *Coriolus hirsutus*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(3): 88－93. (in Chinese)

[7] D'souza T M, Merritt C S, Reddy C A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, 65: 5407－5313.

[8] Ryu S H, Lee A Y, Kim M. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycete fungus *Polyporus brumalis* [J]. **Journal of Microbiology**, 2008, 46(1): 62－69.

[9] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(3): 920－924.

[10] Dong J L, Zhang Y W, Zhang R H, et al. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2005, 45(3): 190－198.

[11] D'souza-Ticlo D, Verma A K, Mathew M, et al. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood [J]. **Indian Journal of Marine Sciences**, 2006, 35(4): 364－372.

[12] Hao J J, Song F Q, Huang F, et al. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2007, 34(3): 233－240..

[13] Bose S, Mazumder S, Mukherjee M. Laccase production by the white-rot fungus *Termitomyces clypeatus*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2007, 47(2): 127－131.

[14] Liu Z Y, Zhang D X, Hua Z Z, et al. A newly isolated *Paecilomyces* sp. WSH-L07 for laccase production: isolation, identification, and production enhancement by complex inducement [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2009, 36: 1315－1321.

[15] Liu Z Y, Zhang D X, Hua Z Z, et al. Improvement of laccase production and its properties by low－energy ion implantation[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2009: DOI: 10.1007/s00449-00009-00389-00447.

[16] Liang Z Q, Han Y F, Chu H L. A new thermotolerant *Paecilomyces* species which produces laccase and a biform sporogenous structure[J]. **Fungal Divers**, 2007, 27: 95－102.

[17] Kluczek-Turpeinen B, Tuomela M, Hatakka A. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, 61(4): 374－379.

[18] Kapich A N, Prior B A, Botha A, et al. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidasees in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004, 24: 187－195.

[19] Hölker U, Dohse J, Höfer M. Extracellular laccase in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum* [J]. **Folia Microbiologica**, 2002, 47(2): 423－427.

[20] Quaratino D, Federici F, Petruccioli M, et al. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79 [J]. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, 2007, 91(1): 57－69.

[21] Zhu X D, Gibbons J, Garcia-Rivera J, et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor [J]. **Infection and Immunity**, 2001, 69(9): 5589－5596.

[22] Linden R M, Schilling B C, Germann U A, et al. Regulation of laccase synthesis in induced *Neurospora crassa* cultures [J]. **Current Genetics**, 1991, 19(5): 375－381.

[23] Chen R R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 74(4): 730－738.

（责任编辑：李春丽）

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net