

粗糙脉孢菌突变菌株合成漆酶的发酵条件研究

谌 斌^{1,2}, 唐雪明¹, 沈 微¹, 方惠英¹, 诸葛健¹

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036;

2. 广西师范大学资源与环境学系, 广西 桂林 541004)

摘 要: 研究了影响粗糙脉孢菌突变菌株合成漆酶的一些摇瓶发酵条件, 包括通气量、培养温度、甲醇浓度、 Cu^{2+} 浓度等。结果表明, 在 500 mL 三角瓶中装入含 150 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 浓度的发酵培养基 BMMY 50 mL, 接种后于 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养 7 d, 用 0.5 % 甲醇诱导, 在第 5 天时漆酶酶活最高可达 3.88 u/mL。

关键词: 粗糙脉孢菌; 突变菌株; 漆酶; 发酵条件

中图分类号: TQ920.814 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)10-0023-03

Study on Fermentation Conditions in Laccase Synthesis by *Neurospora crassa* Mutant Strain

CHEN Bin^{1,2}, TANG Xue-ming¹, SHEN Wei¹, FANG Hui-ying¹ and ZHUGE Jian¹

(1. Industry Biotech Key Lab of Education Ministry, Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036; 2. Resource & Environmentology

Department of Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: The fermentation conditions influencing laccase synthesis in shake flask by *Neurospora crassa* mutant strain including ventilatory capacity, culture temperature, methanol concentration and Cu^{2+} concentration etc. were studied. And the results indicated that the detailed operations were as follows: 50 mL BMMY with Cu^{2+} concentration as 150 $\mu\text{mol/L}$ filled in 500 mL Erlenmeyer flask, then 7 d culture at 30 $^{\circ}\text{C}$ and 200 r/min after inoculation, and then 0.5 % methanol used as inducer, and 5 d later, the enzyme activity of laccase reached the highest as 3.88 u/mL. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *Neurospora crassa*; mutant strain; laccase; fermentation conditions

漆酶 (laccase) 又称苯二酚、氧化还原酶 (EC1.10.3.2), 是一类含铜的多酚氧化酶, 具有广泛的底物作用范围, 可以氧化降解单酚、邻苯二酚和对苯二酚等多种酚类化合物及其衍生物, 也可以氧化降解一些不含酚羟基的酚类类似物^[1-2]。因此在许多方面有较大的应用价值, 除了在环保、废水处理、纸浆漂白、生物免疫检测等方面应用外, 还可应用在食品相关领域上, 比如用漆酶预处理麦芽汁, 使其中的酚类物质氧化, 可提高啤酒的质量和透明度, 经过固定化漆酶处理的葡萄汁和葡萄酒, 去除其中的酚类物质后, 能长期贮存, 且保持澄清状态。在发酵工业, 漆酶能减少酵母酒精发酵材料中的酚类抑制物, 提高酒精产量^[3]。

粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 是一种很重要的研究微生物遗传学的模式子囊菌^[4], 是少数能产生漆酶的子囊菌。粗糙脉孢菌漆酶是一种诱导型漆酶, 其合成易

受环境条件 (特别是诱导物) 的影响, 在无诱导剂存在的条件下, 它几乎不产漆酶, 在有诱导剂存在的条件下, 它可以产生一定量的漆酶^[5-7]。我们尝试进行粗糙脉孢菌漆酶合成的诱导研究, 虽然经过 6~7 d 诱导培养后可得到 4~5 u/mL 的漆酶产量, 但这一过程太长, 培养时易被污染, 很难工业化生产, 而利用基因工程技术则有可能获得漆酶的高产菌株。为此, 我们利用了基因工程技术及定点突变技术成功构建粗糙脉孢菌产生漆酶的突变菌株, 突变酶的最适作用 pH 比亲本酶提高了 2 个单位, 突变酶的 pH 稳定性范围也比亲本酶有所扩大, 而其他的酶学性质则没有变化, 为了进一步开发应用这种突变酶, 还对突变菌的发酵条件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

收稿日期: 2005-05-27

作者简介: 谌斌 (1967-), 男, 副研究员, 在读博士, 在广西师范大学资源与环境学系工作, 研究方向是微生物酶工程。

粗糙脉孢菌漆酶合成的突变菌株:重组毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*)

1.2 培养基

MD 平板培养基:1.34 % YNB (Difco 酵母氮基 W/O, 不含 His, Trp, Met) 4×10^{-5} % 的生物素 2 % 的葡萄糖 1.5 % 的琼脂。

MGY 培养基:1.34 % YNB, 1 % 甘油 4×10^{-5} % 生物素。用作种子培养基。

BMMY 培养基:100 mmol/L pH6.0 的磷酸钾缓冲溶液, 1.34 % YNB, 1 % 酵母膏, 2 % 蛋白胨, 0.5 % 甲醇, 4×10^{-5} % 生物素, 含有不同浓度的 CuSO_4 。用作摇瓶发酵培养基。以上培养基均按 Invitrogen 公司的推荐使用。

1.3 主要仪器和试剂

回转式恒温调速摇瓶柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司生产; WFT7200 型可见分光光度计, 尤尼柯上海有限公司生产。

试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.4 漆酶活性测定

以愈创木酚为底物, 取 4 mL 含 1 mmol/L 愈创木酚的 50 mmol/L 琥珀酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 4.5) 和 1 mL 酶样液, 混匀后于 25 °C 水浴反应 30 min, 测 OD_{465} 值。对照管中加 4 mL 不含底物的上述缓冲液和 1 mL 酶样液。愈创木酚的消光系数 $\epsilon = 12000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。定义 1 min 氧化 1 μmol 底物所需的酶量为一个酶活力单位 (u)。

1.5 摇瓶发酵方法

将粗糙脉孢菌漆酶合成的突变菌株先接种到 MGY 培养基中, 30 °C 200 r/min 培养至 $\text{OD}_{600}=2$ 左右, 然后转入液体培养基 BMMY 中, 30 °C 200 r/min 振荡培养, 每天补加一定量的甲醇进行诱导并测定发酵液中漆酶的酶活。

2 结果与讨论

2.1 通气量对突变菌株产酶活力的影响

通气量对粗糙脉孢菌漆酶合成的突变菌株产酶活力的影响见图 1。

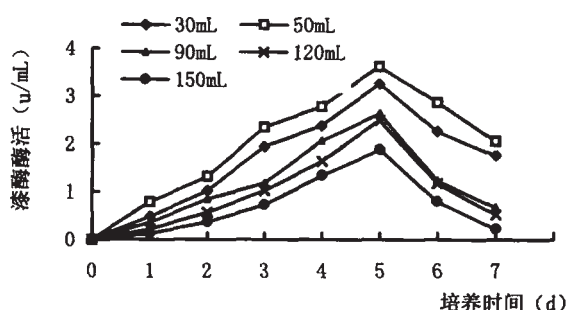


图 1 不同装液量对产酶的影响

图 1 表明, 在 500 mL 三角瓶中分别装发酵培养基

BMMY 30 mL, 50 mL, 90 mL, 120 mL 和 150 mL, 接种后于 30 °C 200 r/min 培养 7 d, 用 0.5 % 甲醇诱导。图 1 结果表明, 以 50 mL 的摇瓶装液量最佳, 其发酵酶活最高可达 3.62 u/mL, 而装液量为 150 mL 时, 其最高酶活仅 1.89 u/mL, 说明突变菌漆酶合成需要较高的溶氧。

2.2 培养温度对产酶活力的影响

对突变菌株的培养温度进行了研究, 结果见图 2。

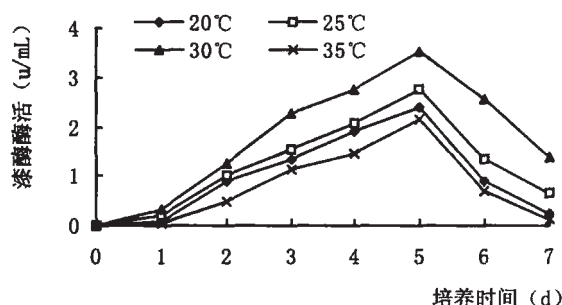


图 2 不同培养温度对产酶的影响

图 2 表明, 不同温度培养, 突变菌株达到最高产酶活力的时间是一致的, 均在第 5 天达到最高; 但最高产酶活力则不一样, 30 °C 培养的突变菌最高产酶活力为 3.52 u/mL, 高于 35 °C, 25 °C 和 20 °C 时培养的产酶活力。温度对不同蛋白异源表达的影响是不同的, 通常情况下, 毕赤酵母培养温度为 28~30 °C, 大多数漆酶蛋白在毕赤酵母中表达的培养温度也为 30 °C。不过也有报道称 16 °C, 20 °C 低温培养的毕赤氏酵母工程菌产漆酶活力高于在 25 °C 和 30 °C 时培养的产酶活力, 这可能是由于培养温度影响了酵母菌合成蛋白的速率, 或影响蛋白酶对外源蛋白的降解活性, 或影响表达产物的正确折叠和修饰 (如糖基化, 二硫键形成), 以及影响表达产物的有效分泌等情况而造成的^[8-9]。

2.3 甲醇浓度对产酶活力的影响

在培养过程中用不同浓度的甲醇诱导, 突变菌产酶活力见图 3。

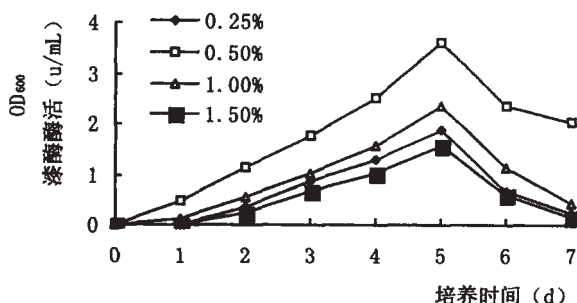


图 3 不同甲醇浓度对产酶的影响

图 3 表明, 在一定的甲醇浓度范围内, 随着甲醇浓度的增加酶活也增加。0.5 % 的甲醇浓度是最佳的诱导浓度, 其产酶活力最高, 最高时达到 3.61 u/mL; 当甲醇浓度高于 0.5 % 时, 随着甲醇浓度的升高酶活反而降低,

当用 1.5 % 的甲醇诱导时,产酶活力仅为用 0.5 % 的甲醇诱导时的 43.7 %。

甲醇营养型毕赤酵母的主要特征之一是以甲醇作为唯一碳源和能源,其中醇氧化酶启动子 P_{AOX} 在转录水平上受到严格的双重调控,在碳源饥饿状态下,只有甲醇才能诱导 AOX 合成后启动 P_{AOX} 进行转录和翻译。甲醇过量时将对菌体代谢产生严重干涉,即中毒现象,严重时,转录和翻译中止。所以甲醇浓度高于 0.5 % 时,酶活表达受到影响,酶活降低。

2.4 Cu^{2+} 浓度对产酶活力的影响

将重组工程菌接种到含不同浓度 Cu^{2+} 的 BMMY 中,于 30 ℃ 200 r/min 培养 7 d,用 0.5 % 的甲醇诱导,第 5 天取样测定培养液中 Cu^{2+} 浓度对酶活力的影响,结果见图 4。

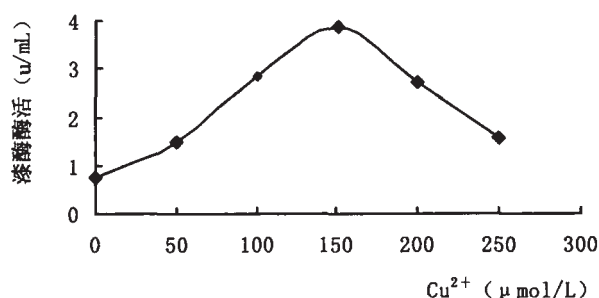


图 4 Cu^{2+} 浓度对产酶的影响

由图 4 可知,当溶液中不加入 Cu^{2+} 时,培养液中酶活力不高,随着加入的 Cu^{2+} 浓度增加,酶活力也有所增加。当培养液中加入的 Cu^{2+} 浓度达到 150 μmol/L 时,培养液中漆酶活力达到最高 (3.88 u/mL)。由于漆酶是含铜的金属蛋白,所以培养基中添加一定浓度的外源铜可

增加漆酶的活性表达。

3 结论

由实验初步得到粗糙脉孢菌突变菌株漆酶合成的摇瓶发酵的适宜条件:在 500 mL 三角瓶中装入含 150 μmol/L Cu^{2+} 浓度的发酵培养基 BMMY 50 mL,接种后于 30 ℃ 200 r/min 培养 7 d,用 0.5 % 甲醇诱导,在第 5 天时漆酶酶活最高可达 3.88 u/mL。

参考文献:

- [1] 肖亚中.真菌漆酶研究[D].中国科技大学博士论文,2002. 6-7,31-32.
- [2] 钞亚鹏,叶军,等.担子菌组成型漆酶产生特性的研究[J].微生物学报,2000,40(6):628-632.
- [3] 张晓昱,黄慧艳.漆酶在食品工业中的研究与应用进展[J].食品科技,2003,(4):4-7.
- [4] 周小玲.粗糙脉孢菌一种新植酸酶基因的克隆、鉴定和重组酶的生化特性[D].江南大学硕士论文,2004.5-8.
- [5] STANLEY C. FROEHNER, KARL-ERIK ERIKSSON. Induction of *Neurospora crassa* Laccase with Protein Synthesis Inhibitors[J]. J. OF BACTERIOLOGY, 1974, 120 (1): 450-457.
- [6] STANLEY C. FROEHNER, KARL-ERIK ERIKSSON. Purification and Properties of *Neurospora crassa* Laccase [J]. J. OF BACTERIOLOGY, 1974, 120 (1): 458-465.
- [7] Ursula A. Germann, Grazia Muller et al. Characterization of Two Allelic Forms of *Neurospora crassa* Laccase [J]. The J. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1988, 263 (2): 885-896.
- [8] 张敏,肖亚中,等.野生革菌漆酶 cDNA 在巴斯德毕赤酵母中的表达[J].中国科学技术大学学报,2004,34(6):757-762.
- [9] 刘卫晓,钞亚鹏,等.漆酶工程菌株的构建及其培养条件的研究[J].微生物学报,2004,44(5):596-599.

茅台的竞争优势

本刊讯:贵州茅台酒股份有限公司总经理乔洪认为茅台的竞争优势体现在以下几方面:

首先,公司董事会正确决策,把发展作为兴企、强企的第一要务,坚定不移地树立和落实科学发展观。

其次,公司积极发挥在白酒行业技术上的领先和质量管理的优势,巩固和发展贵州茅台酒作为“国酒”所独有的由著名的品牌、卓越的品质、悠久的历史、独有的环境、特殊的工艺等五大优势所组成核心竞争力。

公司产品是国内白酒市场上唯一获“绿色食品”、“有机食品”称号并受原产地域保护的天然优质白酒产品,拥有悠久的历史,深受消费者喜爱和信赖。

再者,公司坚持以顾客和市场为中心,制定了一套适合茅台发展的市场战略。主要有以下几方面:

1. 根据市场需求,公司对消费群体进行细分,针对性地调整和丰富产品结构,大力开展个性化营销,产品销售量逐年提高;

2. 公司大力建设和发展营销网络,加强市场营销管理,不断推进市场信息化的进程。

3. 在“酿造高品位生活”经营理念的指导下,公司以挖掘和宣传国酒文化为主线,加大了对长期适量饮用贵州茅台酒有利健康的宣传,倡导绿色、健康、文明的生活方式,强化了公司经营理念和企业文化在广大消费者中的认知度。

4. 不断改革和完善市场服务质量和水平,建立和健全了市场服务质量体系。(江源)