

## 影响白腐真菌 AH28-2 菌株漆酶合成的因子和发酵条件

肖亚中<sup>1,2\*</sup> 张敏<sup>1</sup> 吴涓<sup>1</sup> 王怡平<sup>1</sup> 杭俊<sup>2</sup> 曾王勇<sup>2</sup> 施蕴渝<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(安徽大学生命科学学院 合肥 230039) <sup>2</sup>(中国科技大学生命科学院 合肥 230026)

关键词 白腐真菌 AH28-2, 漆酶, 发酵条件

中图分类号 Q93.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0579-05

真菌漆酶(p-diphenol oxygen oxidoreductase, EC1.10.3.2) 是重要的木素分解酶之一,为含铜的糖蛋白,它能催化氧化酚类化合物脱去羟基上的电子或质子,形成自由基,导致酚类及木素类化合物裂解<sup>[1-3]</sup>。由于其在木素降解、生物制浆、生物漂白、废弃植物材料资源化和生物修复等方面有重要的生产应用价值,近年来引起了国内外学者广泛关注,多种不同来源的真菌漆酶及其生产菌株被研究<sup>[4-7]</sup>。白腐真菌是最重要的漆酶产生菌,白腐真菌漆酶多在菌体次级生长代谢阶段合成,易受营养条件和某些理化因素影响,酚类化合物和蛋白质抑制剂对真菌漆酶合成有诱导作用,而彼此之间有明显差异。目前,虽然人们对白腐真菌产酶机制有较多了解,但与实际需要相比,多数试验菌株在人工和天然培养基上生长时合成漆酶水平偏低,因此,不断选育优良产酶菌株,深入研究菌株生长和酶合成代谢的影响因子及其作用规律,对于改进发酵条件、提高漆酶产量具有重要意义。

白腐真菌 AH28-2 菌株为本室自行筛选保藏的产漆酶优良菌株。前期研究表明,在静置液体培养条件下,其漆酶合成于第 15~16 天达到高峰,而振荡培养可使酶活高峰提前至第 5~6 天,且该菌株生长快速,纤维素酶活很低,在生物制浆、木质素降解和有毒酚类污染物质的处理等领域具有潜在应用价值。本文探索了营养条件及某些小分子化合物对白腐真菌 AH28-2 菌株胞外漆酶合成调控机制,并对研究结果进行了分析讨论。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌种

白腐真菌 AH28-2 菌株(暂定编号)系作者从合肥郊区腐木上分离、筛选、纯化,继代 15 代以上所得,4℃ 保藏于 CPDA 斜面。

#### 1.2 培养基

1.2.1 斜面保藏培养基:综合马铃薯培养基(CPDA)(g/L): 葡萄糖 20, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3, VB1 0.002, 琼脂粉

15, 20% 土豆汁 1000mL。

1.2.2 液体发酵基本培养基(g/L): 葡萄糖 20, 天冬酰胺 2.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, CaCl<sub>2</sub> 0.01, VB1 0.05, Adenosine 0.275, Kraft Logmin 1。

#### 1.3 培养方法

1.3.1 种瓶:取保藏斜面,挑取菌丝块接种于 150mL 三角烧瓶中(内装 50mL 液体培养基),于 28℃, 150r/min 振荡培养 4d,匀浆菌悬液备用。

1.3.2 发酵培养:接种量为 5%,所有发酵培养均在 300mL 三角烧瓶中进行,根据需要改变培养条件。

#### 1.4 分析方法

1.4.1 粗酶液的制备:发酵混合物经纱布过滤,滤液于 4℃, 12 000r/min 转速下离心 30min,取上清液,适当稀释后用于酶活测定。

1.4.2 漆酶(Laccase):以 2,2'-连氮二-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(简称为 ABTS)为底物时,测定反应前 3min 内反应液在 420nm 处吸光度值的增加。定义每分钟氧化 1μmol ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位<sup>[6]</sup>。每样品至少做 3 个重复,结果取其平均数值,标准偏差小于 10%(下同)。

1.4.3 锰过氧化物酶(Manganese peroxidase):将 3.4mL 110mmol/L 乳酸钠缓冲液(pH4.5),0.1mL 40mmol/L MnSO<sub>4</sub> 溶液及 0.4mL 酶样品液依次加入反应试管中,加入 0.1mL 1.6mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液启动反应,测定 238nm 处吸光值的增加,对照管以 0.1mL 缓冲液代替 MnSO<sub>4</sub> 溶液。每分钟氧化 1μmol Mn<sup>2+</sup> 成为 Mn<sup>3+</sup> 所需的酶量为一个酶活力单位<sup>[8]</sup>。

1.4.4 木素过氧化物酶(Lignin peroxidase):反应混合液含有 0.125mol/L 酒石酸钠-盐酸缓冲液(pH3.5), 2.5mmol/L 藜芦醇, 0.5mmol/L 过氧化氢和适量的酶液,在 310nm 处测定吸光

收稿日期:2001-02-13,修回日期:2001-06-20。

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(98212411)和教委自然科学基金资助项目(2000J1013)。

\* 通讯作者, Tel:86-551-5107341~8005, 5107354; Fax:86-551-5107354; E-mail: yzxiao@mars.ahu.edu.cn, xiaoyazh@sina.com

蒲春雷和赵萍同学参加了部分实验工作。

值的增加。每分钟使  $1\mu\text{mol}$  藜芦醇氧化成藜芦醛所需的酶量为一个酶活力单位<sup>[9]</sup>。

1.4.5 酪氨酸酶(Tyrosinase): 参见文献[10]。

1.4.6 总糖测定: 采用蒽酮-硫酸法, 以葡萄糖为标准溶液, 用分光光度计测定反应液  $A_{620}$  值, 计算样品中总糖含量。

1.4.7 活性聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[11]</sup>: 使用凝胶浓度为 12%, 配胶及电泳系统不含 SDS、DTT 等变性剂, 样品不煮沸变性。使用 BIO-RAD 微型蛋白电泳槽 (Mini-Protean II system), 电泳后进行底物活性染色。

1.4.8 生物量测定: 发酵培养物经过滤脱水, 用蒸馏水洗涂 2 次, 转移至干燥箱中  $80^\circ\text{C}$  恒温干燥 24h 后, 在电子分析天平测定菌丝体干重。

## 2 结 果

### 2.1 木素含量对漆酶合成的影响

改变液体发酵基本培养基中 Kraft Lignin (碱溶木素) 成分含量, 使其终浓度分别为 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 和 2.0g/L, 考察木素含量对实验菌株合成漆酶的影响。如图 1 所示, 当发酵培养基中不添加 Kraft Lignin 时, 几乎检测不到漆酶活性; 在 0~2.0g/L 范围内, 伴随 Kraft Lignin 含量增加, 漆酶酶活亦不断升高, 但当达到 1.0g/L 以上时, 随木素含量的继续增加, 酶活增加趋于缓和。说明白腐菌 AH28-2 菌株漆酶是一种诱导合成酶, Kraft Lignin 作为诱导剂对漆酶的产生极为重要。

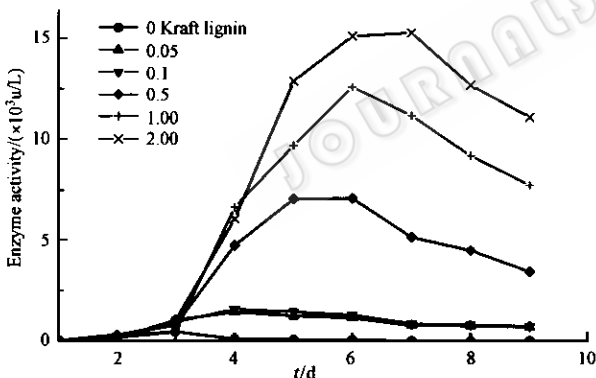


图 1 培养时间和 Kraft lignin 含量对白腐菌 AH28-2 菌株漆酶合成的影响

Fig. 1 Effects of culture time and quantity of kraft lignin on laccase production in suspension cultures of white-rot fungus AH28-2

### 2.2 小分子芳香化合物等对试验菌株产酶及生长的影响

分别用阿魏酸、香兰素、邻甲苯胺及丁香酸等 9 种小分子芳香化合物和吐温 80 试剂替代液体发酵基本培养基中 Kraft Lignin 成分, 考察对菌株生长及漆酶合成的影响。与对照相比 (图表未显示), 愈创木酚、3,5-二羟基甲苯、阿魏酸、邻甲苯胺、香兰素和丁香酸对该菌株漆酶合成均有诱导作用, 邻甲苯胺和丁香酸诱导效果显著; 没食子酸和吐温 80 促进漆酶合成作用不明显, 而二苯胺则抑制菌体生长, 不利于漆酶合成。

### 2.3 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度对漆酶合成的影响

$\text{Cu}^{2+}$  浓度对 AH28-2 菌株产漆酶有显著影响 (见图 2)。发酵培养基中不添加  $\text{Cu}^{2+}$  时, 漆酶活力极低; 在 0~ $5\mu\text{mol/L}$  范围内, 酶活水平随  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加迅速提高;  $\text{Cu}^{2+}$  浓度在 5~ $10\mu\text{mol/L}$  范围内, 产漆酶达到峰值; 当大于  $10\mu\text{mol/L}$  时, 测试漆酶活力水平反而降低。说明漆酶作为一种含铜的多酚氧化酶, 培养基中含有适量的  $\text{Cu}^{2+}$  对菌株漆酶合成及活性是必不可少的, 但过多的  $\text{Cu}^{2+}$  又抑制菌株漆酶表达分泌。已经对该菌株产漆酶进行了分离纯化, 纯酶组分分析表明, 其蛋白质分子结构组分中含有铜元素, 为含多个铜原子的糖蛋白 (详见另文报道)。

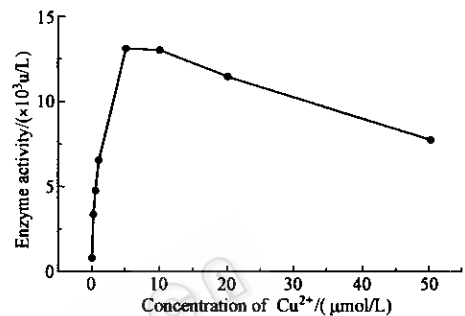


图 2 铜离子对实验菌株合成漆酶的影响

Fig. 2 Effects of the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  on enzyme activity in culture of white-rot fungus AH28-2

### 2.4 $\text{Mn}^{2+}$ 对漆酶合成的影响

培养基中  $\text{Mn}^{2+}$  浓度对 AH28-2 菌株产漆酶也有明显影响 (如图 3), 当培养基中  $\text{Mn}^{2+}$  浓度为零时, 漆酶酶活最高; 加入  $\text{Mn}^{2+}$ , 并逐步提高其浓度, 酶活水平显著降低, 当  $\text{Mn}^{2+}$  浓度增加到  $20\mu\text{mol/L}$  时, 其酶活仅为对照的 72%, 下降了近 1/3; 再继续增大  $\text{Mn}^{2+}$  浓度, 抑制作用降低。总之,  $\text{Mn}^{2+}$  存在不利于菌株产生漆酶, 但不影响菌体生长。

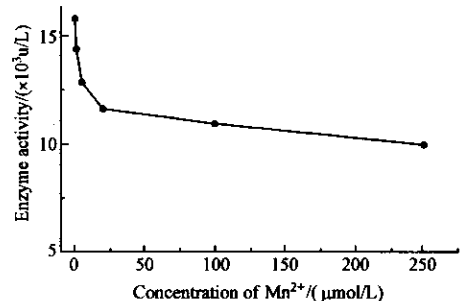


图 3 锰离子对实验菌株产漆酶的影响

Fig. 3 Effects of  $\text{Mn}^{2+}$  on enzyme activity in culture of white-rot fungus AH28-2

### 2.5 营养条件对实验菌株生长及产酶的影响

将基本培养基中碳源和氮源含量分别按 (1) 2% 葡萄糖 +  $12\text{mmol/L}$  天冬酰胺; (2) 2% 葡萄糖 +  $1.2\text{mmol/L}$  天冬酰胺; (3) 0.2% 葡萄糖 +  $12\text{mmol/L}$  天冬酰胺和 (4) 0.2% 葡萄糖 +  $1.2\text{mmol/L}$  天冬酰胺配制, 保持其他成分不变, 并以 2% 葡萄糖 +  $20\text{mmol/L}$  天冬酰胺为对照组, 接种实验菌株进行发酵培养, 测试菌体生物量和发酵液漆酶酶活, 结果见图 4。由图

可以看出,营养条件对白腐真菌 AH28-2 菌株生长及漆酶合成极为重要。当发酵培养液中含有较丰富的碳源时,其漆酶合成随氮源浓度提高而显著增加,如应用 20mmol/L 的氮源比采用 12 和 1.2mmol/L 漆酶产量分别提高了 2.1 倍和 6.5 倍,因此,限制氮源不利于实验菌株漆酶生成;碳源显然是菌体生长和漆酶合成的限制因素,在采用限制碳源的所有试验组中,均不能获得较好的菌体生物量和漆酶产量。

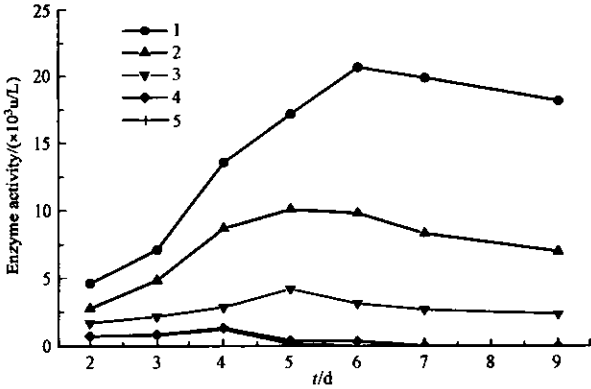


图4 营养条件对实验菌株漆酶合成的影响

Fig.4 Effects of nutrition conditions on laccase activity in culture of white-rot fungus AH28-2

1. 2% Glucose + 20mmol/L L-Asparagine;
2. 2% Glucose + 12mmol/L L-Asparagine;
3. 2% Glucose + 1.2mmol/L L-Asparagine;
4. 0.2% Glucose + 12mmol/L L-Asparagine;
5. 0.2% Glucose + 1.2mmol/L L-Asparagine

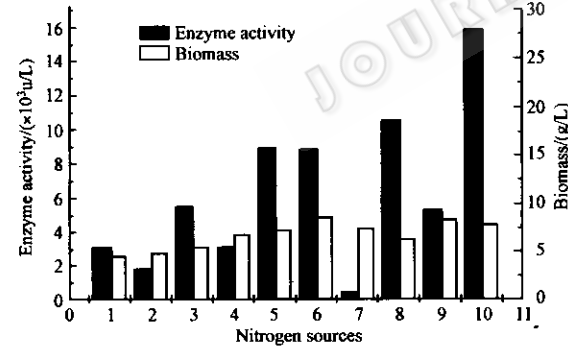


图5 不同氮源对实验菌株生物量及漆酶合成的影响

Fig.5 Effects of different nitrogen sources on the biomass and laccase activity

1.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ;
4.  $(\text{NH}_4)_2$ -tartrate; 5.  $(\text{NH}_4)_3$ -citrate;
6. L-Asparagine; 7. L-Lysine; 8. L-Phenylalanine;
9. Yeast extract; 10. Tryptone

2.6 氮源和碳源对菌体生长和漆酶合成的影响

分别用酵母抽提物、赖氨酸、酒石酸铵和硝酸铵等 9 种氮源取代基本培养基中的天冬酰胺,采用丰富的碳源(2%)和氮源条件(均为 33.3mmol/L),研究其对漆酶合成的影响。结果显示(图 5),胰蛋白胍为产酶最适氮源,测试酶活达 15895.9u/L;使用苯丙氨酸、天冬酰胺和柠檬酸铵,也能检测

到较高的酶活(分别为 10564.4,8866.0,8933.4u/L)。无机氮源中以  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  相对较好,但总的来说漆酶产量不高,这可能是由于基本培养基中缺少缓冲剂,而  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等为强酸弱碱盐,随着菌体生长过程中 N 的消耗,培养基 pH 值迅速降低至 2.5~3.5,不利于漆酶合成与稳定。

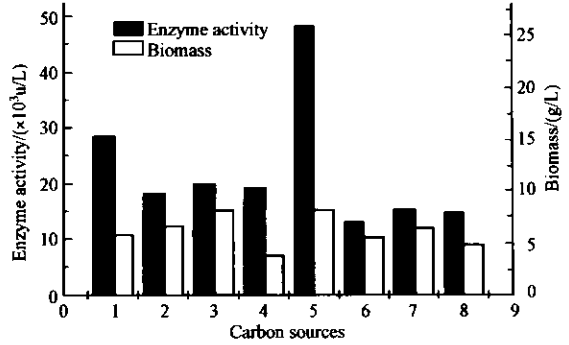


图6 不同碳源对实验菌株生长及合成漆酶的影响

Fig.6 Effects of different carbon sources on the biomass and laccase activity

1. Glycerol(1%); 2. Xylose(1.67%);
3. Glucose(2%); 4. Sorbose(2%);
5. Cellobiose(2%); 6. Sucrose(2%);
7. Melitose(2%); 8. Dextrin(1%)

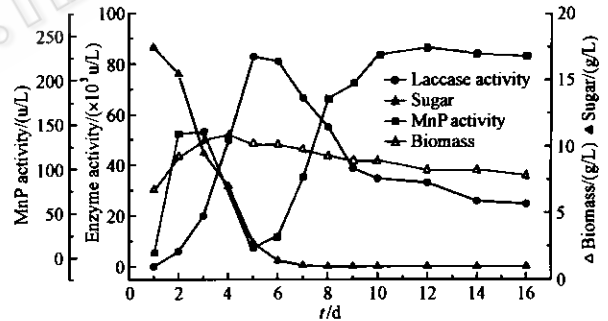


图7 白腐真菌 AH28-2 菌株生长及产酶动态曲线

Fig.7 The course of growth and enzyme production of white-rot fungus AH28-2

选用 8 种不同碳源分别取代基本培养基中的葡萄糖,固定其余成分不变。各碳源的浓度分别为:甘油 1.0%,D-木糖 1.67%,糊精 1.0%,其余均为 2.0%,接种发酵培养,考察不同碳源对实验菌株合成代谢的影响。结果表明(图 6),以纤维二糖为唯一碳源时,漆酶酶活水平极大提高,达 48288.2u/L,是葡萄糖为唯一碳源时的 2.4 倍;以甘油为碳源时,酶活达 28370.4u/L,是葡萄糖为碳源时的 1.4 倍。因此,纤维二糖为实验菌株合成漆酶的最适碳源;甘油也是一种良好的碳源;虽然木糖、棉子糖、蔗糖和糊精等作碳源时菌体生长良好,但仅检测到较低的漆酶酶活,不宜用于实验菌株发酵生产漆酶。

以纤维二糖为碳源,Tryptone 为氮源进行漆酶生产,28℃ 100r/min 转速下发酵培养至第 5~6 天时漆酶合成达到高峰,以 ABTS 为底物时测定酶活为 82923.7u/L,与此同时,培养液

中的碳源基本耗尽,生物量趋于减少。另外,培养过程中还检测到一定数量的锰过氧化物酶活性(图7),但未见有木素过氧化物酶和酪氨酸酶活性。

### 3 讨 论

木素是一类由苯丙烷单元通过醚键和碳-碳键连接复杂的无定型高分子聚合物,是植物材料中仅次于纤维素的最丰富和重要的组份。木素的降解、转化和利用在当今关系到制浆造纸工业清洁化生产、有毒酚类化合物的无害化处理及污染环境的生物修复等。白腐真菌是自然界中最有效的木素降解微生物,其分解转化木素主要依赖生长代谢过程中产生的木素降解酶系完成,尽管目前尚不完全清楚真菌分解木素的分子机理,但多数学者认为木素过氧化物酶(Lip)、锰过氧化物酶(Mnp)和漆酶(Laccase)是最重要的木素降解酶<sup>[1,2,3]</sup>。我们考察了白腐真菌 AH28-2 菌株在液体培养条件下的生长和产酶合成代谢情况,前期研究显示,该菌株在葡萄糖为碳源、门冬酰胺为氮源添加诱导剂的合成培养基上静止培养时,检测到的木素降解酶主要为漆酶,约于接种后 15~16d 达到峰值;采用振荡通气培养,可以缩短产酶周期 10d 左右,但峰值酶活有所降低。为进一步提高产酶效率,深入探讨菌株生长代谢的影响因素及其作用规律是非常必要的。

文献报道一些木素及其亚结构类似物和其它芳香化合物是木素降解酶生成的有效诱导剂<sup>[12]</sup>。有些学者认为,真菌受诱导分泌酶类可能是用于从培养基中消除(如通过漆酶对其降解、转化或聚合)某些有害芳香物的毒害作用<sup>[13]</sup>,故可依此用于提高木素降解酶产量。白腐真菌 AH28-2 菌株在液体培养条件下漆酶合成明显受 Kraft Lignin 和一些小分子芳香化合物诱导,与 *Pycnoporus cinnabarinus* 不同<sup>[6]</sup>,丁香酸和邻甲苯胺比阿魏酸能取得更好的诱导效果,其检测酶活分别高出 3.4 和 3.2 倍(图未显示)。吐温 80 通常能改善细胞膜的通透性,添加在培养基中用于减少细胞内酶合成的抑制作用,但并不能提高菌株漆酶分泌产量,可见不同的菌株有各自的最适诱导剂。生物量是酶合成的重要物质前提,酶活水平高,相应的菌体生物量也较高;然而,对照及添加吐温 80 的试验组中虽然收获了较高的生物量,但并未得到较高的酶活,说明生物量与酶活高低之间无明显的相关性。

铜是漆酶结构组份,依据光吸收特性不同,可将漆酶结构组份中 4 个铜离子划分为 3 种类型,即一个 I 型,一个 II 型和二个 III 型,其中, I 型铜由于在 600nm 左右有光吸收而使漆酶呈现“蓝色”。测试数据表明,培养基中低浓度铜离子的存在对 AH28-2 菌株漆酶活性是必须的,至终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$  时达最大值,酶活比对照提高 16.4 倍,但大于 10 $\mu\text{mol/L}$  时不利于获得高的漆酶活性水平。文献报道铜离子对 *Aspergillus nidulans* 的漆酶产生也有相似影响, Kurtz 等学者认为可能是漆酶基因转录合成漆酶蛋白时需要铜离子,缺铜和限铜均不利于漆酶合成。二价锰离子对不同菌株产木素降解酶的调控作用不尽相同,在 *Dichomitus squalens*, 锰过氧化物酶的活性表达依赖于二价锰离子,但其不影响漆酶水平<sup>[13]</sup>;高浓度

的二价锰离子强烈抑制 *Phlebia tremellosa* 木素过氧化物酶酶活,而能增加漆酶活性水平<sup>[14]</sup>,与其相反,二价锰离子对实验菌株发酵合成漆酶有明显抑制效应(见图3)。另外,铜和锰的加入均不影响菌株生长曲线和对营养的消耗。

营养条件是真菌生长代谢的物质基础,在报道的某些模型木素分解菌中,碳氮源的营养限制可用于刺激木素降解酶合成,如 Kantelinen 等人应用低氮培养条件进行 *Phlebia radiata* 的漆酶生产<sup>[15]</sup>,但限碳限氮培养也同时制约了真菌生长,提高漆酶的产量是有限的,很难成为获取漆酶高产的有效方法。多数菌株采用富营养的培养条件获得了较高的漆酶产量<sup>[6]</sup>。研究表明,实验菌株合成漆酶宜采用富氮培养条件,尤以 Tryptone 等有机氮源为佳(图5)。在试验的八种碳源中,以纤维二糖为唯一碳源时检测漆酶酶活最高,约为葡萄糖的 2.4 倍;甘油也是漆酶生成的良好碳源,用其发酵培养可明显提高漆酶产量(图6)。采用优化的碳源氮源在 28 $^{\circ}\text{C}$ , 100r/min 条件下进行漆酶生产,以 ABTS 为底物测定酶活高达 82923.7u/L,比初始发酵条件下提高了 30 多倍,也比国际上近年报道的高产菌株 *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 的漆酶合成水平高 2.9 倍<sup>[6]</sup>。

实验菌株 AH28-2 具有生长快速,抗污染能力强,产漆酶水平高,峰值到达快,纤维素分解酶活低等特点,除漆酶外,还具有一定的 MnP 的合成能力,是一株很有潜力的漆酶生产菌株,本研究为该菌株的工业化应用及漆酶生产提供了理论依据。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Eggert C, Temp U, Eriksson K-E L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett*, 1997, 53: 163 ~ 202
- [2] Youn H-D, Hah Y C, Kang S-O. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol*, 1995, 132: 183 ~ 188
- [3] Luisa M, Goncalves C, Steiner W et al. Use for bleaching of pulps and treatment of effluents. *Enzym Pulp Paper Process*, 1996, 655: 197 ~ 206
- [4] Decos V, Brzozowski A M, Wilson K S et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprius cinereus* at 2.2A resolution. *Nat Struct Biol*, 1998, 5: 310 ~ 316
- [5] DeVries O M H, Kooistra W H C F, Wessels J G H. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *J Gen Microbiol*, 1986, 132: 2817 ~ 2826
- [6] Herpoel I, Moukha S, Lesage-Messen L et al. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiol*, 2000, 183: 301 ~ 306
- [7] Rama R, Moubin C, Boyer F D. Biotransformation of benzo [a] pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bio-technol Lett*, 1998, 20: 1101 ~ 1104
- [8] Paszczynski A, Huynh V B, Crawford R. Comparison of ligninase-I and peroxidase -M2 from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 1986, 244: 750 ~ 765
- [9] Tien M, Krik T K. Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chry-*

- sosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique  $H_2O_2$  requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 2280 ~ 2284
- [10] Kanda K, Sato T, Ishii S *et al*. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**: 1273 ~ 1278
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage  $T_4$ . *Nature*, 1970, **227**: 680 ~ 685
- [12] Rogalski J, Leonowicz A. *Phlebia radiata* laccase forms induced by veratric acid and xylydine in relation to lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase. *Acta Biotechnol*, 1992, **12**: 213 ~ 221
- [13] Perie F H, Gold M H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2240 ~ 2245
- [14] Vares T, Niemenmaa O, Hatakka A. Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of  $^{14}C$ -ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 569 ~ 575
- [15] Kantelinen A, Hatakka A, Viikari A. Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**: 234 ~ 239

## Factors of Laccase Producing and Fermentation Conditions by A New White-rot Fungus AH28-2

XIAO Ya-Zhong<sup>1,2\*</sup> ZHANG Min<sup>1</sup> WU Juan<sup>1</sup> WANG Yi-Ping<sup>1</sup>  
HANG Jun<sup>2</sup> ZENG Wang-Yong<sup>2</sup> SHI Yun-Yu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China)

<sup>2</sup> (School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** White-rot fungus AH28-2, a newly isolated strain, produced effectively laccase by induction when grown on a synthetic medium. Aromatic compounds of low molecular weight had an inducing influence on laccase production and its isoenzyme compositions. The using of o-toluidine or syringic acid had the best inducing effect.  $Cu^{2+}$  concentration in medium had distinguished effect on laccase production. Enzyme activity was notably increased by  $Cu^{2+}$  and reached the maximum when  $Cu^{2+}$  final concentration was  $5\mu\text{mol/L}$ .  $Mn^{2+}$  inhibited the synthesis of laccase. Carbon and nitrogen limitation were not beneficial to laccase synthesis, while high nutrient organic medium was beneficial to the growth of cell and the synthesis of laccase. Using cellobiose as the sole carbon source, the highest level enzyme activity reached  $82923.7\text{u/L}$  under the condition of optimum fermentation with ABTS as substrate. This enzyme activity was 2.9-fold higher compared to the reported data on international references in recent years.

**Key words** white-rot fungus AH28-2, laccase, fermentation conditions

Received: February 13, 2001

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of Anhui Province (98212411) and the Anhui Provincial Education Committee (2000J1013).

\* Corresponding author. Tel: 86-551-5107341 ~ 8005, 5107354; Fax: 86-551-5107354; E-mail: yzxiao@mars.ahu.edu.cn, xiaoyazh@sina.com