

白腐真菌组合培养提高漆酶酶活的作用机制研究

何荣玉^{1,2}, 刘晓凤¹, 闫志英¹, 袁月祥¹, 廖银章^{1*}, 李旭东¹

(1. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 采用白腐真菌组合培养的方式提高漆酶酶活, 并对组合后菌株相互作用机制进行了研究. 菌株 55 (*Trametes troglitii*) 和菌株 m-6 (*Trametes versicolor*) 组合后漆酶酶活较菌株 55 和 m-6 分别提高了 24.13 倍和 4.07 倍. 组合后菌株间不存在抑制作用; 平板培养时, 两菌株菌丝生长止于菌丝交界处, 该处漆酶酶活最高并分泌褐色色素. 液体培养时, 菌株 m-6 对组合后漆酶酶活的提高起着更为重要的作用. 向菌株 55 的培养物中添加菌株 m-6, 其酶活比向菌株 m-6 培养物中添加菌株 55 时的酶活高 7.03 倍, 并且菌株 m-6 胞外物对菌株 55 的漆酶分泌也有明显的刺激作用, 其中加入 20 mL 过滤灭菌胞外物可使菌株 55 漆酶酶活提高 6.79 倍, 而且胞外物高温灭菌后仍能刺激菌株 55 的漆酶分泌, 加入 20 mL 后酶活比对照高 4.60 倍. Native-PAGE 活性染色结果表明组合后同工酶种类未发生变化, 但有 3 种同工酶的浓度升高.

关键词 漆酶; 组合白腐真菌; 胞外物; 同工酶

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0250-3301(2010)02-0465-07

Enhancement of Laccase Activity by Combining White Rot Fungal Strains

HE Rong-yu^{1,2}, LIU Xiao-feng¹, YAN Zhi-ying¹, YUAN Yue-xiang¹, LIAO Yin-zhang¹, LI Xu-dong¹

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The method of combining white rot fungal strains was used to enhance laccase activity, and the interaction mechanism between strains was also studied. The laccase activity of combined fungi of strain 55 (*Trametes troglitii*) and strain m-6 (*Trametes versicolor*) were 24.13 and 4.07-fold higher than that of strain 55 and strain m-6, respectively. No inhibitory effect was observed when the two strains were co-cultivated. On plate cultivation, there was hyphal interference in the contact area, where laccase activity was the highest followed by brown pigmentation. In liquid cultivation, strain m-6 played much more important role on enhancement of laccase activity, and the laccase activity of strain 55 by adding strain m-6 was 7.03-fold higher than that of strain m-6 by adding strain 55, furthermore, filter sterilized- and high temperature autoclaved-extracellular substances of strain m-6 could also stimulate strain 55 to excrete more laccase, which led to 6.79-fold and 4.60-fold increase in laccase activity by adding 20 mL, respectively. The native staining results of Native-PAGE showed that the types of laccase isozymes were not changed when strains were co-cultured, but the concentration of three types increased.

Key words laccase; combined white rot fungi; extracellular substances; isozymes

漆酶(laccase, EC1.10.3.2)是一种含铜的酚氧化酶, 能降解各种酚类化合物^[1-3], 在适宜的介质存在时亦能催化非酚类物质^[4,5], 因此被广泛应用于污染物降解、生物制浆、印染脱色等领域. 自然界中白腐真菌是漆酶的主要生产者, 并且大部分白腐真菌都能分泌漆酶, 酶活较高的种属有 *Trametes versicolor*、*Coriolus versicolor*、*Lentinus edodes*、*Pycnoporus* 等.

正是由于漆酶有着如此广泛的用途, 于是大幅提高漆酶酶活成为目前研究的一个重要方向. 许多学者在提高漆酶酶活方面做了不少研究, 如采用紫外诱变^[6], 添加金属诱导剂 CuSO_4 ^[7], 添加芳香族或酚类化合物 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)^[8]、2,5-二甲基苯胺 (DMA)^[9] 等. 但是由于紫外诱变其操作较为繁琐, 而漆酶诱导物往往是些重金属或有毒有机物, 会对

环境造成污染, 有学者将白腐真菌和真菌或细菌进行组合, 通过菌株之间的相互作用来提高漆酶酶活, 相比而言, 这种方法更为简便, 同时安全环保. 目前研究主要集中在白腐真菌与褐腐真菌、霉菌、土壤微生物组合^[10-15], 但是将白腐真菌和白腐真菌进行组合研究则较少.

本实验采用将白腐真菌进行组合的方式提高漆酶酶活, 并分别从平板培养、液体培养以及组合前后漆酶同工酶的变化情况等方面着手对组合后菌株相互作用机制进行研究, 以期对白腐真菌组合提高

收稿日期 2009-03-24 修订日期 2009-06-19

基金项目 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA1007002); 中国科学院知识创新工程重大项目 (KSC2-YW-G-008); 国家科技支撑技术项目 (2006BAD07A02)

作者简介 何荣玉 (1983~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为生物质能及环境微生物技术, E-mail: mimihry1987@163.com

* 通讯联系人, E-mail: liaoyz@cib.ac.cn

漆酶的方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

实验室分离得到的 3 株分泌漆酶的白腐真菌,编号分别为 55、m-6、m-8,其中菌株 55 属于毛栓菌属(*Trametes troglia*),菌株 m-6 属于杂色栓菌属(*Trametes versicolor*)。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 培养基^[16]

去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,补水至 1 000 mL, pH 自然, 115℃ 灭菌 30 min。

1.2.2 液体产酶培养基^[17]

葡萄糖 20 g,酒石酸铵 0.2 g, KH_2PO_4 2 g, MnSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.1 g,微量元素液 70 mL,补水至 1 000 mL, pH 5.0, 115℃ 灭菌 30 min。其中微量元素液: MgSO_4 3.0 g, MnSO_4 0.5 g, NaCl 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{SO}_4$ 0.1 g, CoCl_2 0.1 g, CuSO_4 0.1 g, H_3BO_3 0.01 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,氨三乙酸 1.5 g,补水至 1 000 mL。

1.3 漆酶酶活测定方法^[18]

酶活定义为每 min 氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量。

1.4 试验方法

1.4.1 组合白腐真菌的筛选

将菌株 55、m-6、m-8 分别按单株菌、2 株菌组合及 3 株菌组合,各接种 1 块直径 10 mm 的菌块至液体产酶培养基, 32℃ 130 r/min 振荡培养,从第 5 d 开始隔天取样,将样品经 4 800 r/min 离心 10 min 后取上清液进行漆酶酶活测定,每组各设 3 个平行。

1.4.2 组合菌平板培养相互作用研究

将菌株 55、m-6 各接种 1 块菌块($\phi = 10$ mm)至同一 PDA 平板,两菌块间隔 4 cm, 32℃ 下静置培养,为了进行对照,另外还接种 2 块菌株 55 至同一 PDA 平板以及 2 块菌株 m-6 至同一 PDA 平板中进行培养,观察菌丝的生长变化情况,并对平板中漆酶酶活进行测定。其中采用愈创木酚显色法对漆酶酶活进行定性检测:在两菌菌丝交界处、接种菌块两旁分别滴入 1% 愈创木酚醇溶液,观察显色时间及颜色深浅,以颜色深浅定性判断漆酶酶活的高低。进行漆酶定量检测的具体方法为:用无菌小刀分别在菌丝交界处、接种菌块两旁取样 5 mm $\times$ 20 mm 菌块

条至无菌离心管中,加入 2 mL pH 5.0 HAc-NaAc 缓冲液, 200 r/min 振荡 1 h 提取酶液,进行酶活测定。

1.4.3 组合菌液体培养相互作用研究

(1) 一菌株对另一菌株漆酶酶活的影响

向菌株 55 培养至第 11 d 的液体产酶培养基中加入 1 块菌株 m-6 菌块($\phi = 10$ mm),相反向菌株 m-6 培养至第 13 d 的液体产酶培养基中加入 1 块菌株 55 菌块,继续在 32℃ 130 r/min 摇床中振荡培养 17 d,同时设对照组(CK),即不加菌块的产酶组,每组各设 3 个平行,从第 3 d 开始隔天取样测定漆酶酶活。

(2) 一菌株胞外物对另一菌株漆酶酶活的影响

① 菌株胞外物的制取方法

将菌株 55、m-6 分别在液体产酶培养基中培养 11 d 和 13 d,经滤纸过滤去除菌丝后,再经 0.45 μm 滤膜过滤,所得滤液转入 Millipore 超滤管(10 $\times$ 10³ u) 5 000 r/min 超滤 40 min,得到的下层滤液即为菌株胞外物。

② 过滤灭菌胞外物对菌株漆酶酶活的影响

将菌株 55 胞外物经 0.25 μm 滤膜过滤灭菌后加入到菌株 m-6 的液体产酶培养基中,反之,将菌株 m-6 过滤灭菌胞外物加入到菌株 55 的液体产酶培养基中, 32℃ 130 r/min 下振荡培养 10 d,其中胞外物的加入量分别为 5、10、15、20 mL,并同时设对照组(CK),即不加过滤灭菌胞外物的产酶组,每组各设 3 个平行,取样测定漆酶酶活。

③ 高温灭菌胞外物对菌株漆酶酶活的影响

将一菌株胞外物在 115℃ 下灭菌 30 min,冷却后加入至另一菌株的液体产酶培养基中,胞外物的加入量及培养方法同②,过滤灭菌胞外物对漆酶酶活的影响。

1.4.4 拮抗试验

采用牛津杯法研究菌株 55 和 m-6 之间的相互关系。具体方法为:在一菌株的培养平板中放置 2 个牛津杯,每杯中加入 200 μL 另一菌株的液体培养上清液, 32℃ 静置培养,同时设置对照组(CK),即添加无菌水,每组各设 3 个平行,观察是否出现抑菌圈,并测量抑菌圈直径。

1.4.5 漆酶同工酶研究

首先将菌株 55、m-6 及组合菌 55 + m-6 分别在液体产酶培养基中培养 11、13、13 d 后的粗酶液,依次经 90% 硫酸铵沉淀、超滤进行浓缩。再将浓缩后的粗酶液进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(Native-PAGE),其中分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度

4%,电泳完毕后采用 0.5mM ABTS 染色剂对胶体进行活性染色,考察组合前后菌株漆酶中同工酶的变化情况.

2 结果与分析

2.1 组合白腐菌的筛选

图 1 为在液体产酶培养基中组合白腐真菌的筛选结果.从图 1 中各条产酶曲线的产酶峰值来看,以漆酶酶活高低顺序排序依次为 55 + m-6 > 55 + m-6 + m-8 > 55 + m-8 > m-6 > m-6 + m-8 > 55 > m-8,除了组合菌 m-6 + m-8 的产酶高峰低于单菌 m-6 外,其他组合菌酶活均高于 3 株单菌.其中组合菌 55 + m-6 在第 13 d 的酶活最高,为 1 838.88 U/L,分别比单菌株 55、m-6 高 24.13 倍和 4.07 倍,且进一步对该组合进行产酶条件优化,其产酶峰值可达 9 395.85 U/L,酶活较未优化前提高了 4.11 倍(具体产酶条件优化步骤未列出),说明将白腐真菌进行组合是一种提高漆酶酶活的有效方法.而在单菌株中,菌株 m-6 在第 13 d 时的漆酶酶活最高,比第 11 d 的菌株 55 酶活高 3.96 倍,比菌株 m-8 第 15 d 酶活高 11.27 倍.

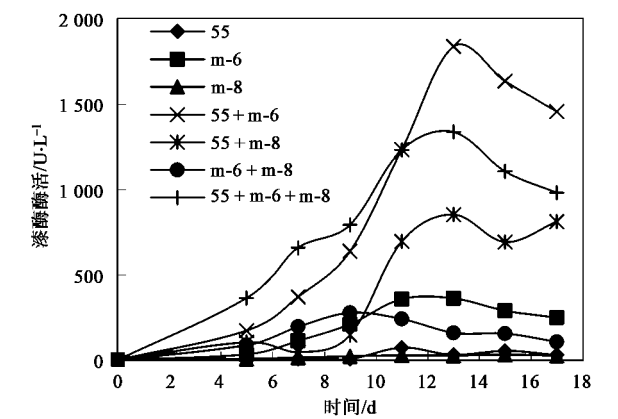


图 1 组合白腐真菌的筛选

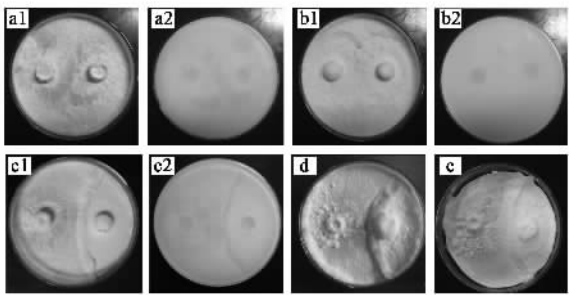
Fig. 1 Screening of combined white-rot fungi for high laccase activity

2.2 组合菌 55 + m-6 平板培养相互作用研究

2.2.1 组合菌 55 + m-6 在 PDA 平板上菌丝分布关系

从图 2 中可以看出,各菌株在 PDA 平板上组合培养的菌丝生长情况不尽相同.同菌株进行组合后,菌丝在平板上均匀生长,且可以相互渗透不产生界线(图 2 中 a1、a2、b1、b2 所示).然而将菌株 55 和菌株 m-6 接种至同一平板上培养,两菌株的菌丝不能相互渗透生长,第 3 d 时在菌丝接触处形成一条白色

界线,两菌株菌丝生长相止于此界线,并且从第 4 d 起白色界线开始分泌浅褐色色素,随后形成一条褐色界线,且培养时间越长颜色越深.图 2 中 c1、c2 所示即是组合菌 55 + m-6 培养 5 d 时的情况,其中可以清楚地看到在平板中央靠菌株 m-6 侧有一条界线,这是由于菌株 55 菌丝在平板上的生长速度($v = 2.08 \text{ cm/d}$)快于菌株 m-6 ($v = 1.48 \text{ cm/d}$),而且从平板背面可以看见一条褐色界线.继续培养,在菌丝界线处形成较厚的菌丝结,而在该菌丝结上菌株 55 占明显优势(图 2 d),但是培养至第 30 d,菌株 55 的菌丝并没有跨越界线(图 2 e),说明两菌株菌丝的竞争能力相当.



a1、a2 分别为组合菌 55 + 55 培养 7 d 正面、背面图;
b1、b2 分别为组合菌 m-6 + m-6 培养 7 d 正面、背面图;
c1、c2 分别为组合菌 55 + m-6 培养 5 d 正面、背面图;
d、e 分别为组合菌 55 + m-6 培养 10 d、30 d 正面图;
其中 c1、c2、d、e 图中左侧菌块为菌株 55,右侧为菌株 m-6

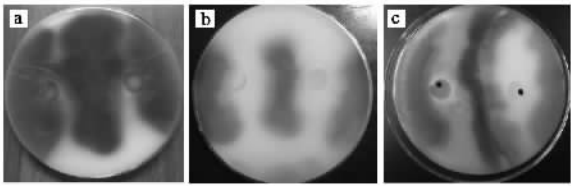
图 2 PDA 平板上组合菌菌丝生长情况

Fig. 2 Fungal hyphae of combined fungi cultivated on PDA agar

2.2.2 组合菌 55 + m-6 在 PDA 平板上的漆酶分布

在培养平板上滴入愈创木酚醇溶液对漆酶酶活进行定性测定,如图 3 所示.从图 3 a 和 3 b 可以看出,组合菌 55 + 55 和组合菌 m-6 + m-6 平板中各处颜色深浅相近,表明各处漆酶酶活相同,这说明同种菌株进行共同培养对菌株漆酶的分泌无影响.然而菌株 55 和 m-6 共同培养后,平板各处的显色情况有所不同,从图 3 c 可见,菌丝交界处的颜色最深,其次为 55 侧,而 m-6 侧颜色最浅,并且交界处 55 侧的颜色也明显深于 m-6 侧,说明交界处的漆酶酶活最高,其次为 55 侧和 m-6 侧.于是进一步对组合菌 55 + m-6 进行漆酶酶活定量分析,由图 4 所示的漆酶分泌规律可见,两菌交界处的酶活明显高于单菌两侧,并且随着培养时间的推进,酶活增加速率越快,至第 8 d,交界处漆酶酶活比 55 侧和 m-6 侧分别高 20.30 倍和 19.01 倍,但是 55 侧和 m-6 侧的漆酶酶活差异不明显.综合对组合菌 55 + m-6 的漆酶定性和定量

分析结果可以得出,菌株 55 和 m-6 组合后能促进漆酶分泌.



a 组合菌 55 + 55 显色 60 min ;b 组合菌 m-6 + m-6 显色 30min ;
c 组合菌 55 + m-6 显色 30min,左侧为菌株 55,右侧为菌株 m-6

图 3 PDA 平板上组合菌愈创木酚显色图

Fig. 3 Colour development of guaiacol on PDA agar

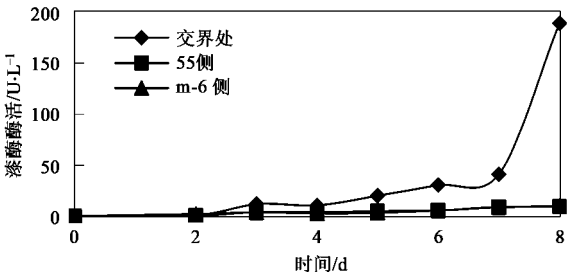


图 4 组合菌 55 + m-6 平板漆酶分泌规律

Fig. 4 Laccase activity of combined fungi 55 + m-6
cultivated on PDA agar

2. 3 组合菌 55 + m-6 液体培养相互作用研究

2. 3. 1 一菌株对另一菌株漆酶的影响

向培养至第 11 d 的菌株 55 液体培养物中加入菌块 m-6,反之,向培养至第 13 d 的菌株 m-6 液体培养物中加入菌块 55,继续培养 17 d,结果如图 5 所示.由图 5 可见,加入菌块后的漆酶酶活均高于对照,其中加入菌块 m-6 的漆酶酶活最高,继续培养至第 17 d 时,漆酶酶活为1 829.16 U/L,比单菌株 55 的漆酶峰值酶活高出 22.23 倍,同时也比加入菌块 55 的漆酶酶活高 7.03 倍.

2. 3. 2 过滤灭菌胞外物对漆酶酶活的影响

一菌株过滤灭菌胞外物添加至另一菌株液体培

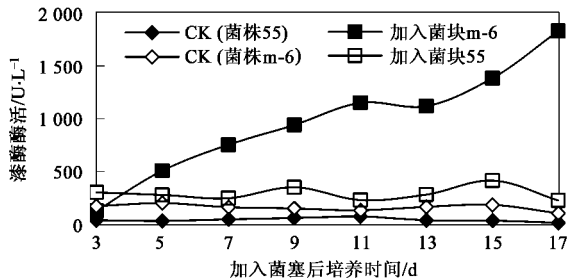


图 5 一菌株对另一菌株漆酶酶活的影响

Fig. 5 Effects of one fungus on laccase activity
of the other fungus

养基中,培养至第 10 d,不同加入量对漆酶酶活的影响如图 6 所示.可以看出,菌株 m-6 胞外物能明显刺激菌株 55 的漆酶分泌,且随着加入量的增加,刺激效果越好,当加入量为 20 mL 时,漆酶酶活比对照高 6.79 倍.而菌株 55 胞外物对菌株 m-6 的漆酶分泌无明显刺激作用,加入量为 20 mL 时,漆酶酶活仅比对照高 9.61%,并且当加入量低于 20 mL 时,漆酶酶活反而不及对照高.

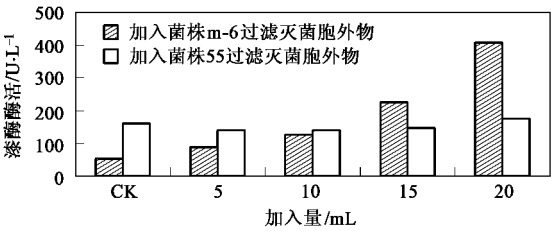


图 6 过滤灭菌胞外物对漆酶酶活的影响

Fig. 6 Effects of filter sterilized extracellular substances
on laccase activity

2. 3. 3 高温灭菌胞外物对漆酶酶活的影响

一菌株高温灭菌胞外物添加至另一菌株液体培养基中,培养至第 10 d,不同加入量对漆酶酶活的影响如图 7 所示.可以看出,菌株 m-6 胞外物高温灭菌后仍能刺激菌株 55 的漆酶的分泌,且随加入量增加而漆酶酶活增加,当加入量为 20 mL 时,漆酶酶活比对照高 4.60 倍.相反,菌株 55 的高温灭菌胞外物对菌株 m-6 漆酶分泌无刺激效果,且酶活随着加入量的增加而降低.

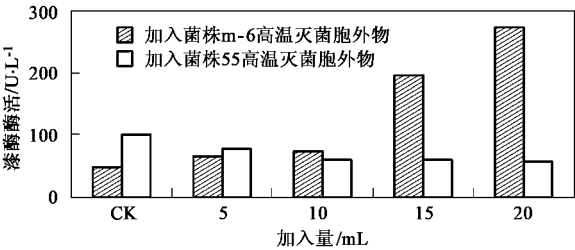


图 7 高温灭菌胞外物对菌株漆酶酶活的影响

Fig. 7 Effects of high temperature autoclaved extracellular
substances on laccase activity

2. 3 拮抗试验

结合图 8 及表 1 结果可见,菌株 55 和 m-6 在 PDA 平板中的菌丝生长均不受另一菌株的液体培养物的影响,牛津杯试验中均不产生抑菌圈,说明两菌株间不存在抑制作用.

2. 4 漆酶同工酶研究

对组合菌 55 + m-6、菌株 m-6、55 浓缩后粗酶

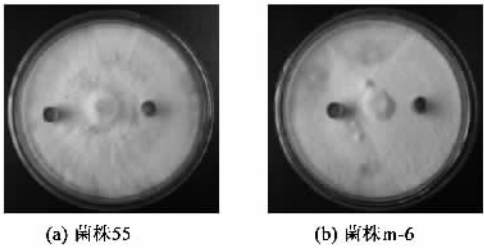


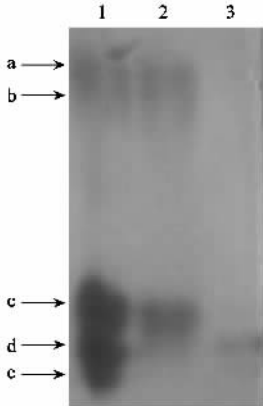
图 8 菌株液体培养物对另一菌株在 PDA 平板上菌丝生长的影响

Fig. 8 Hyphae growth on PDA agar with addition of the other fungal liquid culture

表 1 菌株液体培养物对另一菌株的抑制效果/mm
Table 1 Inhibiting effect of fungal liquid culture on the other fungus/mm

抑菌圈直径	菌株 55	菌株 m-6
对照	0	0
菌株 55	—	0
菌株 m-6	0	—

液进行 Native-PAGE 分析, ABTS 活性染色后结果如图 9 所示. 从图中可见, 菌株 m-6 (泳道 2) 可分泌 3 种同工酶(同工酶 a、b、c), 菌株 55 (泳道 3) 分泌 2 种同工酶(同工酶 d、e), 且两菌所分泌的同工酶种类不相同; 而组合菌 55 + m-6 (泳道 1) 同工酶是菌株 55 和 m-6 同工酶的总和(同工酶 a、b、c、d、e), 说明将两菌进行组合同工酶的种类并未发生增减, 但是组合菌的同工酶 a、b、c、d、e 颜色均比菌株 55 的漆酶同工酶 d、e 和菌株 m-6 的同工酶 a、b、c 颜色深, 这表明组合后漆酶同工酶浓度提高了.



其中 1、2、3 泳道分别代表组合菌 55 + m-6、菌株 m-6、菌株 55 所含的同工酶, 箭头 a、b、c、d、e 分别代表不同种类的同工酶

图 9 Native-PAGE 图

Fig. 9 Laccase isozymes of Native-PAGE

3 讨论

将菌株 55 和 m-6 在 PDA 平板上进行组合培养时, 两菌株在菌丝接触处互相争夺营养物质, 并且两者竞争能力相当, 从而使得两菌株菌丝生长止于接触处, 同时为了更好地进行空间及营养物质的竞争, 各菌株在菌丝接触处分泌更多的漆酶进行代谢^[19], 随着竞争的日趋剧烈, 最终导致接触处的漆酶酶活明显高于单菌一侧的酶活, 另外由于菌株代谢能产生一些酚类物质, 而这些酚类物质在一定程度上也可以提高漆酶酶活. 接下来随着营养物质的消耗或者其他相关因素, 造成接触处菌丝的生长受阻, 并促使接触处分泌的漆酶参与二次代谢活动^[20], 催化酚类物质进一步形成酚自由基, 这些自由基作用菌丝表面, 与一些多肽物质反应生成疏水性物质, 从而改变菌丝的疏水性质, 使菌株免受亲水性酶的侵害, 并且生成的疏水性物质在两菌株菌丝接触的地方聚集形成菌丝结^[21, 22]. 另外, 漆酶催化真菌二次代谢形成的醌类物质可以进一步聚合形成黑色素(melanin)或者类似黑色素的物质^[23], 这也是菌株 55 和 m-6 在 PDA 平板中组合培养时在菌丝交界处分泌褐色色素的原因所在.

液体培养时, 菌株 55 和 m-6 组合的漆酶酶活明显高于各菌株单独培养的酶活. 向菌株 55 的培养物中添加菌块 m-6, 其酶活高于向菌株 m-6 培养物中添加菌块 55 时的酶活, 这说明菌株 m-6 对两菌株组合培养漆酶酶活的提高起着更为重要的作用. 进一步对菌株胞外物进行研究, 发现菌株 m-6 过滤灭菌后的胞外物对菌株 55 的漆酶分泌有着明显的刺激作用, 这与有些研究者的研究结果相似, Savoie 等^[10]发现 *Trichoderma* sp. 的胞外物能有效诱导 *L. edodes* 的漆酶产生; Zhang 等^[13]也发现 *Trichoderma* sp. ZH1 的胞外物刺激 *Trametes* sp. 的漆酶分泌. 并且, 菌株 m-6 胞外物高温灭菌后仍可提高菌株 55 的漆酶酶活, 但是高温灭菌后的刺激效果不及过滤灭菌时好, 这说明菌株 m-6 胞外物中能刺激菌株 55 漆酶分泌的物质大部分具有热稳定性, 但是高温仍会破坏一部分刺激物质, 从而影响整体刺激效果. 相反, 菌株 55 胞外物对菌株 m-6 的刺激作用较小, 只有当加入量较大时(20 mL), 胞外物的刺激作用才可以掩盖反应体积增大造成的稀释作用, 表现出一定的刺激作用, 但高温灭菌后菌株 55 胞外物则不能提高菌株 m-6 的漆酶酶活. 但是, 对于存在菌株胞外物中的这些刺激物质的特性仍不明确, 需进一步试

验进行确定并对其刺激漆酶分泌的途径进行研究。

虽然两菌株菌丝关系在 PDA 平板上为接触处相互阻止^[24],但是从牛津杯试验中发现,两菌株之间并不存在抑制作用。

进一步对组合前后菌株的漆酶同工酶进行分析,发现组合后同工酶种类未发生变化,组合菌的同工酶数量上是单菌株的同工酶之和,但是其中 3 种同工酶的浓度高于单菌株,这与组合后漆酶酶活提高的现象相符。Velázquez-Cedeño 等^[25]也发现, *Trichoderma longibrachiatum* 刺激 *Pleurotus ostreatus* 漆酶的分泌,但是两者共培养后,漆酶的同工酶种类未发生变化,只是组合后同工酶浓度发生变化,并且他们从基因水平上对该现象做出了解释,这是由于 *Trichoderma longibrachiatum* 的分泌物影响了 *Pleurotus ostreatus* 中有关基因的表达调控,造成 *poxalb/poxl* 的相对表达量随培养时间的变化,从而影响了同工酶在不同时间下的浓度。

4 结论

(1) 采用液体产酶的筛选方法,筛选得到一组漆酶酶活较高的组合菌 55 + m-6,其酶活较单菌株分别提高 24.13 倍和 4.07 倍。

(2) 组合菌 55 + m-6 菌株之间不存在抑制作用,在平板上培养时,两菌株菌丝生长止于菌丝交界处,该处漆酶酶活最高并分泌褐色色素,在液体培养时,菌株 m-6 对组合后漆酶酶活的提高起着更为重要的作用。菌株 m-6 的菌块、过滤灭菌胞外物以及高温灭菌胞外物均能明显刺激菌株 55 的漆酶产生,而菌株 55 胞外物对菌株 m-6 漆酶的刺激作用不明显。

(3) Native-PAGE 活性染色结果表明,菌株 55、m-6 进行组合后,同工酶种类未发生增减,但有 3 种漆酶同工酶浓度有所提高。

参考文献：

[1] Aktas N, Cicek H. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol [J]. *Biores Technol*, 2001, **80** (1) :29-36.

[2] Koschorreck K, Richter S M, Swierczek A, *et al.* Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, **474** :213-219.

[3] Takamiya M, Magan N, Warner P J. Impact assessment of bisphenol A on lignin-modifying enzymes by basidiomycete *Trametes versicolor* [J]. *J Hazard Mater*, 2008, **154** :33-37.

[4] Campos R, Kandelbauer A, Robra K H, *et al.* Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsute* and

Sclerotium rolfsii [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, **89** :131-139.

[5] Soares G M B, Amorim M T P, Costa-Ferreira. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R [J]. *J Biotechnol*, 2001, **89** :123-129.

[6] 黄乾明, 谢君, 张寒飞, 等. 漆酶高产菌株的诱变选育及其产酶条件 [J]. *菌物学报*, 2006, **25** (2) :263-272.

[7] D'Souza D T, Tiwari R, Sah A K, *et al.* Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthesis dyes [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38** :504-511.

[8] Jang M Y, Ryu W Y, Cho M H. Enhanced production of laccase from *Trametes* sp. by combination of various inducers [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2006, **11** (2) :96-99.

[9] Ferreira Gregorio A P, Da Silva I R, Sedarati M R, *et al.* Changes in production of lignin degrading enzymes during interactions between mycelia of the tropical decomposer basidiomycetes *Marasmiellus trojanus* and *Marasmius pallascens* [J]. *Mycol Res*, 2006, **110** :161-168.

[10] Savoie J M, Mata G, Billette C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and *Shiitake*, *Lentinula edodes* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49** :589-593.

[11] Savoie J M, Mata G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1999, **15** :369-373.

[12] Tokimoto K, Komatsu M. Effect of carbon and nitrogen sourced in media on the hyphal interference between *Lentinula edodes* and some species of *Trichoderma* [J]. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1979, **45** :261-264.

[13] Zhang H, Hong Y Z, Xiao Y Z, *et al.* Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73** :89-94.

[14] Baldrian P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **50** :245-253.

[15] Chi Y J, Hatakka A, Maijala P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes ? [J]. *Int Biodeter Biodegra*, 2007, **59** :32-39.

[16] 赵斌, 何绍红. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 251-253.

[17] Faison B D, Kirk T K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, **49** (2) :299-304.

[18] Robert B, Michael G P. Demethylation and Delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36** (3) :823-827.

[19] Boddy L. Interspecific combative interactions between wood-

- decaying basidiomycetes[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, **31** : 185-194.
- [20] Rayner A D M, Griffith G S, Wildman H G. Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi[J]. Biochem Soc Trans, 1994, **24** :389-393.
- [21] Score A J, Palfreyman J W, White N A. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions [J]. Inter Biodeter Biodegra, 1997, **39** :225-233.
- [22] Wessels J G H. Gene expression during fruiting in *Schizophyllum commune* [J]. Mycol Res, **96** :609-620.
- [23] Peiris D, Dunn W B, Brown M, *et al.* Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus mixaxeus* and *Coprinus disseminatus* [J]. Metabolomics, 2008, **4** :52-62.
- [24] Molla A H, Ahmadun F R, Suraini A A, *et al.* In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2001, **17** (9) :849-856.
- [25] Velázquez-Cedeño M, Farnet A M, Billette C, *et al.* Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions based on the production of laccase isozymes [J]. Biotechnol lett, 2007, **29** : 1583-1590.