



# 白腐真菌 BZ103 的鉴定及产漆酶培养条件优化

任珂瑶<sup>1</sup>, 刘舒欣<sup>1</sup>, 徐海舟<sup>2</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 张殿朋<sup>3</sup>, 赵洪新<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 温州市乡村振兴发展中心, 温州 325000;

3. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

**摘要:** 白腐真菌代谢过程中产生的漆酶(EC 1.10.3.2)能够降解染料、酚类、木质素等大分子物质,挖掘高漆酶活性的白腐真菌菌株,对清除环境残留大分子污染物及防止环境污染具有重要意义。以一株分离自温州市郊的白腐真菌 BZ103 为材料,通过 ITS 序列与 18S rDNA 序列系统发育分析确定其分类归属,并采用单因素实验与响应面法优化其产漆酶培养条件。结果表明:菌株 BZ103 与黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)亲缘关系最近,为黄孢原毛平革菌的一株新菌株;初始 pH 值、碳源、氮源、Mn<sup>2+</sup> 浓度、Cu<sup>2+</sup> 浓度、碳氮比及接种量对漆酶产量均具有显著影响,当初始 pH 值在 3.5~4.5,碳源为葡萄糖、氮源为蛋白胨, Mn<sup>2+</sup> 浓度为 0.6~1.2 mmol/L, Cu<sup>2+</sup> 浓度在 0.1~0.2 mmol/L,碳氮比在 60~120、接种量体积分数为 6%~10%时均可提高漆酶产量;经 Box-Behnken 设计的响应面法优化,最优产酶培养基配方为葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、初始 pH 值 4.0、Mn<sup>2+</sup> 浓度 0.54 mmol/L、Cu<sup>2+</sup> 浓度 0.11 mmol/L、碳氮比 91.6 和接种量体积分数 8.4%,在该条件下漆酶活性最高达到 644.3 U/L,较优化前提高 14.98 倍。该研究可为漆酶的高效生产与环境污染的生物修复提供优良菌种资源,也为相关微生物的发酵工艺优化与应用开发提供了重要的理论依据。

**关键词:** 漆酶;白腐真菌;分子鉴定;培养基优化;响应面法

**中图分类号:** Q939.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2026)05-0352-11

**引文格式:** 任珂瑶, 刘舒欣, 徐海舟, 等. 白腐真菌 BZ103 的鉴定及产漆酶培养条件优化[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2026, 55(3): 352-362.

**Reference Format:** REN Keyao, LIU Shuxin, XU Haizhou, et al. Identification of a white-rot fungus BZ103 and optimization of laccase production medium[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(3): 352-362.

## Identification of a white-rot fungus BZ103 and optimization of laccase production medium

REN Keyao<sup>1</sup>, LIU Shuxin<sup>1</sup>, XU Haizhou<sup>2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, ZHANG Dianpeng<sup>3</sup>, ZHAO Hongxin<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Wenzhou Rural Revitalization and Development Center, Wenzhou 325000, China;

3. Institute of Plant Protection and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** Laccase (EC 1.10.3.2), produced during the metabolic processes of white-rot fungi, is capable of degrading macromolecular substances such as dyes, phenols, and lignin. Therefore, exploring white-rot fungal strains with high laccase activity is of significant importance for removing persistent macromolecular environmental pollutants and preventing environmental contamination. Using a white-rot fungal strain, BZ103, isolated from the suburbs of Wenzhou, this study determined its taxonomic status through phylogenetic analysis of ITS and 18S rDNA sequences and optimized its laccase production

收稿日期: 2025-03-04 网络出版日期: 2026-01-26

基金项目: 北京市农林科学院创新能力建设项目(KJCX20230102);浙江省省产业技术团队项目(浙农科发[2025]5号)

作者简介: 任珂瑶(2000—),女,四川乐山人,硕士研究生,主要从事应用微生物学方面的研究。

通信作者: 赵洪新, E-mail: bxxbj2003@gmail.com

conditions via single-factor experiments and response surface methodology. The results showed that strain BZ103 is most closely related to *Phanerochaete chrysosporium* and was identified as a novel strain of this species. Factors including initial pH, carbon source, nitrogen source,  $Mn^{2+}$  concentration,  $Cu^{2+}$  concentration, carbon-to-nitrogen (C/N) ratio, and inoculum size were all found to significantly influence laccase yield. Laccase production was enhanced when the initial pH was 3.5-4.5, glucose was used as the carbon source and peptone as the nitrogen source,  $Mn^{2+}$  concentration was 0.6-1.2 mmol/L,  $Cu^{2+}$  concentration was 0.1-0.2 mmol/L, C/N ratio was 60-120, and inoculum size was 6%-10%. Optimization using a Box-Behnken design-based response surface methodology yielded the optimal medium composition; glucose of 20 g/L, peptone of 5 g/L, an initial pH of 4.0,  $Mn^{2+}$  of 0.54 mmol/L,  $Cu^{2+}$  of 0.11 mmol/L, a C/N ratio 91.6, and an inoculum size of 8.4%. Under these optimized conditions, the highest laccase activity reached 644.3 U/L, representing a 14.98-fold increase compared to the pre-optimization level. This study provides a valuable microbial resource for efficient laccase production and the bioremediation of environmental pollution, while also offering important theoretical insights for the optimization of fermentation processes and the development of applications for related microorganisms.

**Key words:** laccase; white-rot fungi; molecular identification; media optimization; response surface methodology

## 0 引言

随着现代工业化的发展,难降解有机污染物(如多氯联苯、多环芳烃、合成染料等)大量释放到环境中,对生态系统和人类健康构成严重威胁。据世界卫生组织(World health organization, WHO)报告,全球每年约 900 万人死于与环境污染相关的疾病<sup>[1]</sup>,因此,环境污染物的清除已成为亟待解决的全球性问题。物理化学修复为传统有效的环境污染修复手段,但存在成本较高、能耗大、易产生二次污染等弊端<sup>[2]</sup>。因反应条件温和、环境友好、高效且可持续的特点,通过微生物的代谢活动降解污染物以实现环境净化的生物修复(Bioremediation)技术备受研究者关注<sup>[3]</sup>。白腐真菌(White-rot fungi)产生的漆酶能够高效降解多种环境污染物,在生物修复领域被公认为极具潜力的“自然清道夫”<sup>[4]</sup>。

白腐真菌是隶属于担子菌亚门(Basidiomycotina)的一类丝状木腐菌,通过担孢子进行有性生殖,也通过分生孢子等进行无性生殖<sup>[5]</sup>;该类真菌主要定殖于腐木与森林凋落物等富含木质纤维素的环境,其木质素分解酶系统以漆酶(Lac, EC 1.10.3.2)、木质素过氧化物酶(LiP, EC 1.11.1.14)和锰过氧化物酶(MnP, EC 1.11.1.13)为核心,协同多种辅助酶(如芳基醇氧化酶、乙二醛氧化酶等),形成高效降解木质素、废水中异生物质的代谢网络<sup>[6-8]</sup>。白腐真菌分泌的胞外酶能降解多种有毒化合物,如氯酚、多氯联苯、双酚 A、有机磷农药和多环芳烃及合成染料等<sup>[9-12]</sup>,并将成分复杂的工业环境污染物降解、矿化

为低毒或无毒的化合物<sup>[13-15]</sup>。基于上述特性,白腐真菌在化工有害产物降解、环境污染修复领域具有广阔的应用前景。

漆酶(Laccase)属于铜蓝氧化酶家族,是一类含 4 个铜离子的多酚氧化酶(EC 1.10.3.2)<sup>[16]</sup>,广泛分布于植物和真菌中,不同来源的漆酶活性与功能上存在明显差异<sup>[17]</sup>。植物漆酶能够催化木质素异位聚合,使植物组织木质化<sup>[18]</sup>;真菌漆酶具有降解木质素、解毒、介导植物病原体与宿主相互作用、胁迫防御和色素产生等活性<sup>[19-24]</sup>。作为白腐真菌分泌的主要降解活性酶之一,漆酶能通过夺取底物电子形成自由基,氧化邻苯酚、对苯酚、氨基酚、多酚、脂肪族及芳香族胺类化合物、降解木质素<sup>[25-28]</sup>,是环境污染生物修复领域中一类极具应用价值的生物酶。因此,挖掘高漆酶活性的白腐真菌一直是研究者关注的重点。

课题组从温州市郊的一株枯树上,采集到白腐真菌样品,由北京市农林科学院植物保护研究所分离纯化,命名为 BZ103。本文通过系统发育分析鉴定菌株 BZ103 的分类学归属,采用单因素实验探究碳源、氮源、初始 pH 值、接种量和金属离子诱导剂等对漆酶活性的影响及其适宜水平范围;采用响应面法(Response surface methodology, RSM)对显著影响因子进行优化,构建发酵产漆酶二次回归数学模型,筛选最佳发酵条件并通过实验验证,旨在为白腐真菌 BZ103 的开发应用提供重要的理论支撑,并为漆酶的高效生产以及高效产漆酶菌株的选育提供新的种质资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

白腐真菌从温州市郊的一株枯树上采集,由北京市农林科学院植物保护研究所分离纯化,命名为BZ103。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖液体(PDB)培养基:葡萄糖 20.00 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L, 维生素 B1 0.01 g/L, 马铃薯 200.00 g/L。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:在 PDB 培养基基础上,加入琼脂 20.00 g/L。

基础培养基:葡萄糖 10.00 g/L, 酒石酸铵 0.21 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.00 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.10 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.09 g/L。上述成分用 20 mmol/L 酒石酸钠缓冲液溶解,调节 pH 值至 4.5。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株形态观察

用 100 mL 的 PDB 培养基活化 BZ103 菌株, 30 °C、200 r/min 条件下培养 4 d;取少量菌丝体,转接到 PDA 培养基平板,30 °C 培养 7 d;收集平板上 BZ103 菌丝,用 2.5% 戊二醛(pH 值为 7.2, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液)25 °C 固定 1.5 h,并用磷酸缓冲液(PBS)漂洗 3 次(10 min/次);采用质量分数为 1%的锇酸溶液固定菌丝 1 h,再用 PBS 漂洗 3 次(10 min/次),依次用体积分数 50%、70%、80%和 90%乙醇溶液脱水菌丝,每个浓度处理 2 次,每次 10 min;最后采用体积分数 50%、70%、80%和 90%叔丁醇溶液依次脱水菌丝,每个浓度处理 2 次,每次 10 min;脱水后菌丝真空冷冻干燥,置于扫描电子显微镜 SU8010 型(日本日立公司)观察菌丝形态。

#### 1.3.2 菌株分子鉴定

采用柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司),提取 BZ103 基因组 DNA,具体操作按照试剂盒说明书进行。以 BZ103 基因组 DNA 为模板,采用通用引物 ITS1/ITS4(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')和 NS1/NS6(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'/5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3'),分别对 ITS 序列及 18S rDNA 片段进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:预变性 94 °C 3 min;34 个循环(变性 94 °C 30 s,退火温度 ITS 引物 55 °C、18S rDNA 引物 58 °C 30 s,延伸

72 °C 1 min);终延伸 72 °C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)回收 PCR 产物,PCR 回收产物双向测序;测序结果提交至 National Center for Biotechnology Information(NCBI)数据库,进行同源性比对,采用 MEGA 6.0 的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。

#### 1.3.3 漆酶活性测定

漆酶活性测定方法参考文献[29],具体如下:

a)粗酶液制备:制备浓度  $10^6$  个/mL 的 BZ103 孢子悬液,按体积比 10:1 接种于含 100 mL 的 PDB 培养基三角瓶中,200 r/min、30 °C,培养 6 d;将培养物 4500 r/min,4 °C 离心 5 min,取上清液,8000 r/min,4 °C 离心 10 min,获得的上清液即为 BZ103 发酵漆酶粗酶液。

b)漆酶活性测定:依次加入 0.5 mmol/L 的 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)0.1 mL、0.1 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值 5)2.7 mL、0.1 mL 粗酶液和 0.1 mL 浓度为 20 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,在 30 °C 反应 3 min,反应结束后,用紫外分光光度计测定吸光值,测定波长为 420 nm。酶活力 Y 定义为每分钟催化 1  $\mu\text{mol}$  ABTS 所需的酶量,单位 U/L,计算公式可用式(1)表示:

$$Y = \frac{\Delta OD_{420} \times V_{\text{总}} \times n}{\Delta t \times V_{\text{酶}} \times \epsilon \times 10^{-6}} \quad (1)$$

其中: $\Delta OD_{420}$  为 420 nm 处吸光度变化值; $V_{\text{总}}$  为反应体系总体积, mL; $n$  为稀释倍数; $\Delta t$  为反应时间, min; $V_{\text{酶}}$  为反应体系内稀释的酶液体积, mL; $\epsilon$  为消光系数, L/(mol·cm)。

#### 1.3.4 漆酶酶活曲线测定

取 2 mL 孢子悬液(浓度  $10^6$  个/mL)转接至 100 mL 的 PDB 培养基中,30 °C,200 r/min 培养 4 d 作为种子液;取 5 mL 种子液,接种至 100 mL 基础培养基中,30 °C,200 r/min 培养 9 d,测定漆酶酶活,绘制 BZ103 产漆酶曲线,每个时间点设定 3 个独立生物学重复,最终酶活数据取 3 个样品的平均值。

#### 1.3.5 单因素培养基优化

在基础培养基的基础上,单因素试验分别选取 pH 值(初始 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、碳源(葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘油、麦芽糖、乳糖)、氮源(酵母浸膏、蛋白胨、牛肉膏、氯化铵、

尿素、硫酸铵、硝酸钾)、 $Mn^{2+}$  浓度(0、0.6、1.2、2.0、6.0 mmol/L 和 8.0 mmol/L)、 $Cu^{2+}$  浓度(0、0.1、0.2、0.8、1.5 mmol/L 和 3.0 mmol/L)、碳氮比(C/N 比,10、30、60、90、120)和接种量(体积分数 4%、6%、8%、10%、12%)。除单因素为接种量外,每个处理接种体积分数 5% 种子液,并在最佳产酶时间下测定不同培养条件对漆酶活性的影响。

### 1.3.6 响应面法优化产漆酶培养基

采用 Box-Behnken 实验设计,探究  $Cu^{2+}$  浓度、 $Mn^{2+}$  浓度、碳氮比及接种量 4 个因素对菌株 BZ103 漆酶产量的影响,每个因素设置 3 个水平,采用 Design-Expert 软件进行响应面分析,构建二次回归预测模型以筛选最佳发酵条件,同时通过方差分析(ANOVA)验证模型可靠性,采用 3 次平行验证实验验证模型有效性,确定最优发酵条件下的最高漆酶活性。

### 1.3.7 数据统计分析

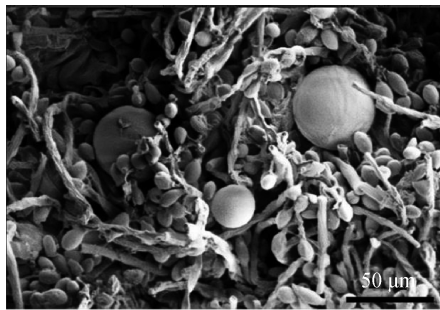
每次实验均为 3 个生物学重复组,取各重复组

测定数据的平均值作为实验值,采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异具有统计学显著性。

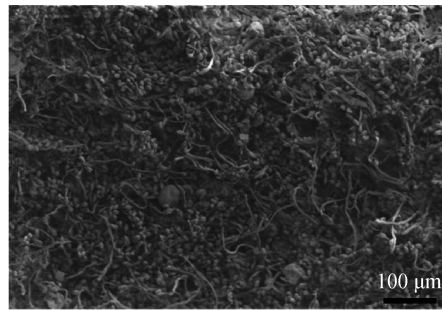
## 2 实验结果与分析

### 2.1 菌株的菌丝特征

菌落表面整体平坦,菌丝向培养基基内延伸,并在表层琼脂区域形成致密的菌丝层;随着培养时间的延长,菌丝逐渐向气相空间伸展,同时伴随大量孢子生成,菌落呈乳白色,质地为丝绒状,整个培养过程中未观察到渗出液及色素产生。为进一步明确其微观形态特征,对 BZ103 菌株的菌丝及孢子进行扫描电镜观察,扫描结果如图 1 所示。图 1 显示: BZ103 菌株菌丝整体错综盘绕,表面粗糙或具不规则褶皱;菌丝分枝丰富、角度多样,相邻菌丝密集交织形成网状菌丝体;部分菌丝体可分化并有序聚集,形成球形菌核;菌丝顶端及侧枝上着生大量孢子,孢子呈卵圆形或椭圆形米粒状。



(a) 1000×



(b) 300×

图 1 菌株 BZ103 菌丝形态的扫描电子显微镜照片

### 2.2 菌株的分子鉴定

将 BZ103 菌株的 ITS 与 18S rDNA 的测序结果输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,并选取与 BZ103 相似度较高的 10~14 个相关菌株序列,连同其近缘物种,共同构建系统发育树,结果如图 2 所示。图 2 显示:ITS 与 18S rDNA 的核酸序列与原毛平革菌属(*Phanerochaete* sp.)的菌株同源性最高,达 98%~99%;黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)与 BZ103 为单系群,遗传距离显著小于原毛平革菌属其他物种(如 *P. australis*、*P. sordida* 等),该分支节点 Bootstrap 支持率达 100%;BZ103 菌株与 *P. chrysosporium* 聚为一个分支,该分支与原毛平革菌属的其他菌株聚类。综上所述,ITS 与 18S rDNA 序列的同源性比对及系统发育树分析结果,可确定 BZ103 为黄孢原毛平革菌的一株新菌株。

### 2.3 菌株产漆酶过程

产酶曲线是菌株重要特征,也是评估其应用潜力的重要依据。图 3(a)显示:在基础培养基中,菌株 BZ103 培养前 6 d,漆酶活性随菌丝生物量的积累而显著升高,并于第 6 d 达到峰值 43.7 U/L,酶活开始缓慢下降,6 d 为菌株最佳产漆酶发酵周期。

### 2.4 单因素对菌株生长的影响

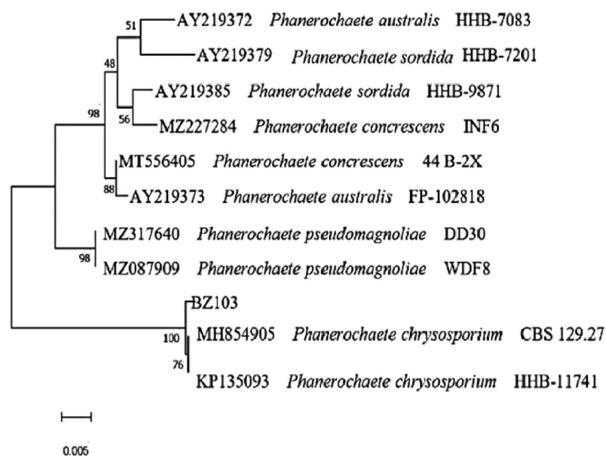
菌株产漆酶能力受多种因素如 pH 值、碳源、氮源、金属离子( $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ )、碳氮比及接种量等因素调控,通过测定上述单因素变量下的漆酶活性,探究各因素对产酶的影响规律并确定适宜水平范围,为后续发酵条件优化奠定基础。

#### 2.4.1 pH 值

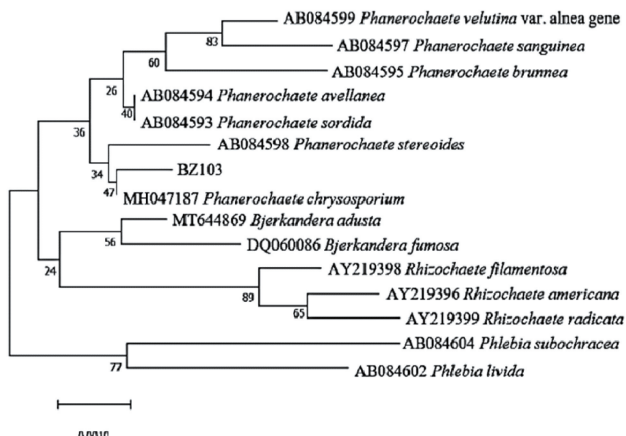
培养基初始 pH 对 BZ103 菌株的漆酶活性有显著影响。图 3(b)表明:菌株在发酵过程中表现出较强的酸性适应性,pH 值在 3.0~6.0 范围均可检测

到酶活, pH 值 3.5~4.5 区间内漆酶活性随 pH 值的升高显著增加, pH 值为 4.0 时达到峰值, 酶活可达 50.0 U/L, 较基础培养基初始 pH 值 4.5 时, 酶

活提升 16.3%; pH 值 > 4.5 后, 酶活性随着培养基 pH 的升高开始显著下降。综上所述, pH 值 4.0 为菌株 BZ103 发酵产漆酶的最优 pH 值。



(a) 基于ITS部分序列的NJ系统发育树



(b) 基于18S rDNA部分序列的NJ系统发育树

图2 菌株 BZ103 的系统发育树

## 2.4.2 碳源

碳源作为菌体代谢的碳骨架与能量供给源, 直接影响产酶效率。从图 3(c) 可以看出: 葡萄糖、可溶性淀粉、麦芽糖为碳源时酶活显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ), 葡萄糖 (51.3 U/L) 与可溶性淀粉 (48.6 U/L) 酶活差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 蔗糖、甘油、乳糖组酶活均低于 30.3 U/L。综合酶的活性与碳源成本, 选定葡萄糖为最优碳源, 保障产酶效率, 又符合实际生产成本。

## 2.4.3 氮源

氮源是菌株生长时合成蛋白质、氨基酸等含氮化合物所需的关键营养元素之一, 是菌株代谢活动的基础。图 3(d) 表明: 有机氮(酵母浸膏、蛋白胨、牛肉膏) 和无机氮(氯化铵、尿素、硫酸铵、硝酸钾) 对菌株 BZ103 漆酶活性影响不同, 有机氮源对漆酶合成的促进作用远远优于无机氮源, 蛋白胨为氮源时漆酶活性最高, 达到 346.0 U/L, 是无机氮源酒石酸铵 (46.3 U/L) 的 7.5 倍, 其原因可能是无机氮源成分单一, 不利于菌体产酶, 或者是有机氮源成分较复杂, 含有氨基酸、多肽等易被微生物利用氮源。综合考虑, 选择蛋白胨作为菌株 BZ103 后续漆酶发酵的最优氮源。

## 2.4.4 金属离子 $Mn^{2+}$ 和 $Cu^{2+}$

不同金属离子对真菌胞外漆酶合成的调控作用存在显著差异。从图 3(e) — (f) 可以看出:  $Mn^{2+}$  浓度在 0~0.6 mmol/L 区间时, 漆酶活性随浓度升高呈剂量依赖性显著提升, 于 0.6 mmol/L 时达峰值 (酶活 500.0 U/L); 0.6~1.2 mmol/L 区间酶活维持稳定; 浓度 > 1.2 mmol/L 时, 酶活性显著下降;

$Cu^{2+}$  对酶活调控更敏感, 0.1 mmol/L 时酶活达峰值 (422.2 U/L), 0.1~0.8 mmol/L 区间酶活逐渐回落, 浓度 > 0.8 mmol/L 时抑制效应显著增强。结合漆酶作为含 4 个铜离子的多酚氧化酶属性,  $Cu^{2+}$  浓度异常会影响酶的空间结构与活性, 后续发酵将外源添加 0.6 mmol/L  $Mn^{2+}$  和 0.1 mmol/L  $Cu^{2+}$ , 作为基础条件。

## 2.4.5 碳氮比

图 3(g) 显示: C/N 在 10~90 区间时, 酶活性随 C/N 升高显著上升, 于 C/N 90 时达峰值 (522.3 U/L); C/N > 90 后, 酶活性逐渐回落; C/N 60~120 区间内, 酶活性均维持在较高水平。较高的 C/N 会限制氮源供应, 促使菌体从营养生长转向次级代谢(漆酶为次级代谢产物), 有利于产酶, 鉴于 C/N 90 时酶活最高且能平衡碳氮代谢效率, 后续发酵固定 C/N 为 90。

## 2.4.6 接种量

接种量(种子液与发酵液的体积比)是发酵过程的核心控制参数, 直接影响菌体生长与代谢物合成。从图 3(h) 显示: 当接种量为体积分数 8%, 菌株产漆酶活性最高, 达到 500.0 U/L, 较体积分数为 4% (酶活 202.0 U/L) 提升了 147.5%; 接种量超过体积分数 10%, 酶活性显著下降, 体积分数 12% 接种量下酶活仅为 344.0 U/L。这可能是由于低接种量下, 菌体增殖慢、群体感应信号分子积累不足, 导致漆酶合成相关基因的表达延迟, 营养物质转化为漆酶的效率低; 高接种量会出现菌体团聚现象, 细胞间营养传质性缓慢和溶解氧竞争, 造成酶活下降。

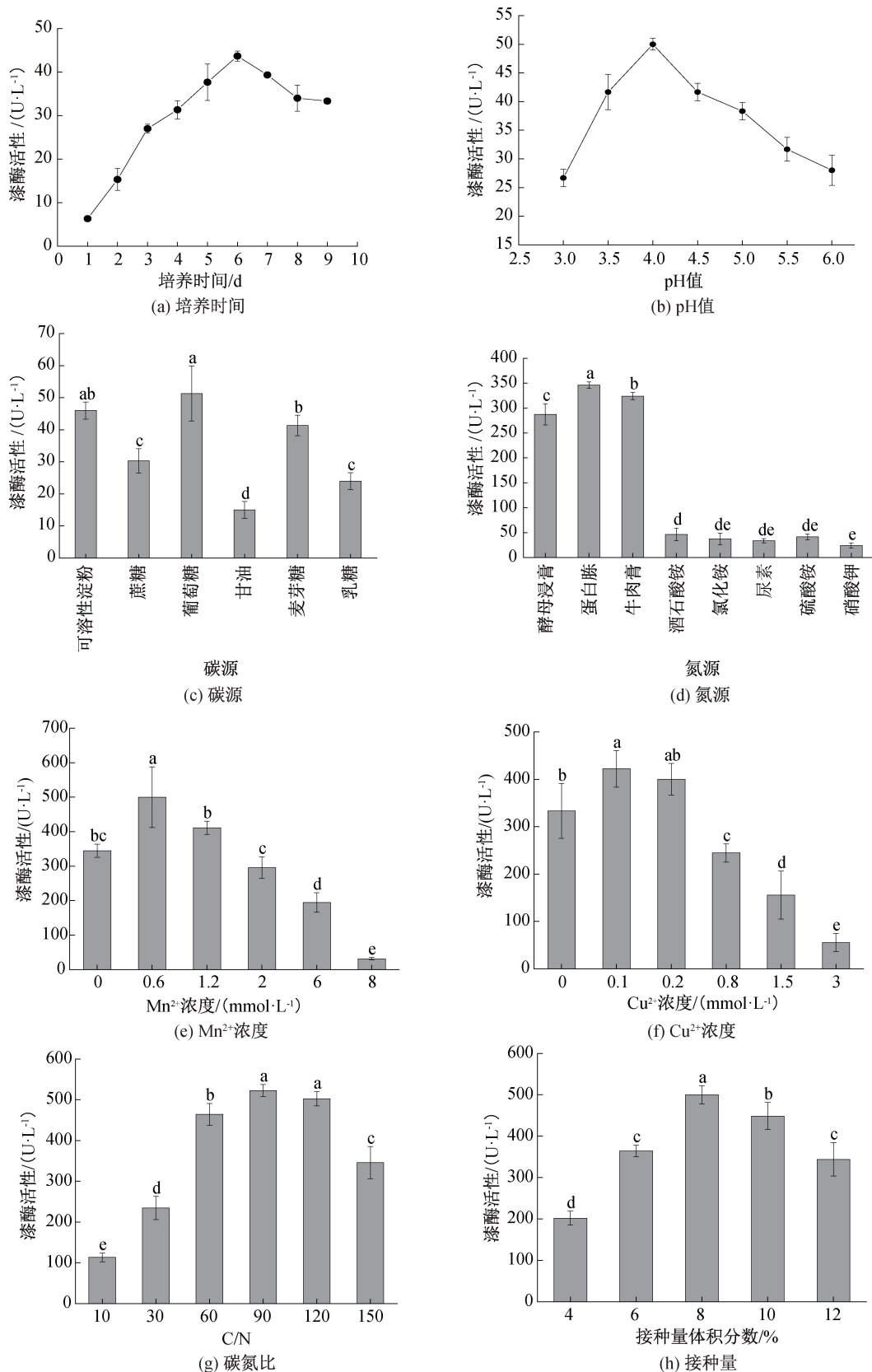


图 3 单因素对 BZ103 菌株产漆酶影响的柱状图

注:数据为平均值±标准差(n=3),不同小写字母表示漆酶活性有显著性差异(P<0.05)。

## 2.5 响应面分析

### 2.5.1 Box-Behnken 试验设计

基于单因素对 BZ103 菌株产漆酶影响的结果,选择 4 个对漆酶活性有显著性影响的单因素:  $Mn^{2+}$  浓度、 $Cu^{2+}$  浓度、碳氮比和接种量,并采用 Box-Behnken 设计 4 因素 3 水平响应面分析试验,优化 BZ103 菌株产漆酶的最适培养基条件,设计包含 29 组实验(24 个析因点+5 个中心点重复),因素水平编码见表 1,分析结果如表 2, A 为  $Mn^{2+}$ 、B 为  $Cu^{2+}$ 、C 为碳氮比、D 为接种量体积分数和 Y 为漆酶活性。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平

| 编码 | A: $Mn^{2+}$ /<br>( $mmol \cdot L^{-1}$ ) | B: $Cu^{2+}$ /<br>( $mmol \cdot L^{-1}$ ) | C: 碳氮比 | D: 接种量<br>体积分数/% |
|----|---|---|--------|------------------|
| -1 | 0   | 0   | 60     | 6                |
| 0  | 0.6                                       | 0.1                                       | 90     | 8                |
| 1  | 1.2                                       | 0.2                                       | 120    | 10               |

表 2 响应面试验设计及结果

| 序号 | A: $Mn^{2+}$ /<br>( $mmol \cdot L^{-1}$ ) | B: $Cu^{2+}$ /<br>( $mmol \cdot L^{-1}$ ) | C: 碳氮比 | D: 接种量<br>体积<br>分数/% | Y: 漆酶<br>活性/<br>( $U \cdot L^{-1}$ ) |
|----|---|---|--------|----------------------|--------------------------------------|
| 1  | 0   | 1   | 1      | 0                    | 510.798                              |
| 2  | 0   | 0   | 0      | 0                    | 641.639                              |
| 3  | -1  | 0   | -1     | 0                    | 560.358                              |
| 4  | 0   | 0   | -1     | 1                    | 505.512                              |
| 5  | 0   | 0   | 0      | 0                    | 621.152                              |
| 6  | 1   | 0   | -1     | 0                    | 493.618                              |
| 7  | -1  | 1   | 0      | 0                    | 525.336                              |
| 8  | 1   | 0   | 0      | -1                   | 470.490                              |
| 9  | 0   | -1  | 1      | 0                    | 473.133                              |
| 10 | -1  | -1  | 0      | 0                    | 461.899                              |
| 11 | 0   | 0   | -1     | -1                   | 508.155                              |
| 12 | 0   | 0   | 1      | -1                   | 461.238                              |
| 13 | 1   | 0   | 0      | 1                    | 545.821                              |
| 14 | 0   | 0   | 1      | 1                    | 563.002                              |
| 15 | -1  | 0   | 0      | -1                   | 531.283                              |
| 16 | -1  | 0   | 1      | 0                    | 539.874                              |
| 17 | 0   | -1  | 0      | -1                   | 441.414                              |
| 18 | 0   | 0   | 0      | 0                    | 629.742                              |
| 19 | 0   | 1   | -1     | 0                    | 496.922                              |
| 20 | 0   | 1   | 0      | -1                   | 479.080                              |
| 21 | 0   | 1   | 0      | 1                    | 516.746                              |
| 22 | 0   | -1  | 0      | 1                    | 522.693                              |
| 23 | 0   | -1  | -1     | 0                    | 490.314                              |
| 24 | 0   | 0   | 0      | 0                    | 624.456                              |
| 25 | -1  | 0   | 0      | 1                    | 533.926                              |
| 26 | 1   | 1   | 0      | 0                    | 473.133                              |
| 27 | 0   | 0   | 0      | 0                    | 624.456                              |
| 28 | 1   | 0   | 1      | 0                    | 519.389                              |
| 29 | 1   | -1  | 0      | 0                    | 481.723                              |

### 2.5.2 响应面试验结果方差分析

将表 2 中 Box-Behnken 设计实验数据,输入 Design-Expert 10.0.3 软件,进行回归拟合,得到二次多项回归方程: 漆酶活性  $Y = 628.289 - 14.042x_A + 10.9032x_B + 1.04627x_C + 24.6699x_D - 18.0068x_Ax_B + 11.564x_Ax_C + 18.172x_Ax_D + 7.7644x_Bx_C - 10.9032x_Bx_D + 26.1016x_Cx_D - 51.4488x_A^2 - 84.4062x_B^2 - 53.266x_C^2 - 58.635x_D^2$ , 模型决定系数  $R^2 = 0.9824$ , 根据表 2 设计的可视化曲面最优参数组合模型具有较好的拟合度,  $R^2_{adj} = 0.9648$ , 能够解释实验 96.48% 的响应值变异, 失拟项  $P > 0.05$ , 表明误差较小; 从回归方程进行方差分析可以看出, 4 种因素对漆酶活性的影响大小顺序为: 接种量(D)、 $Mn^{2+}$  浓度(A)、 $Cu^{2+}$  浓度(B)和碳氮比(C)(见表 3)。

### 2.5.3 响应面分析及验证

图 4—图 9 是  $Mn^{2+}$  浓度、 $Cu^{2+}$  浓度、碳氮比及接种量 4 个因素两两交互作用对 BZ103 菌株漆酶活性影响的响应曲面及等高线图。4 个因素两两交互作用对菌株 BZ103 产漆酶的酶活性影响趋势呈抛物曲面分布, 曲面整体纵向跨度较大且等高线呈现明显椭圆形, 各因素两两交互作用对漆酶活性影响显著。

当碳氮比固定为 90、接种量体积分数为 8%,  $Mn^{2+}$  与  $Cu^{2+}$  浓度对漆酶活性的交互影响效应结果如图 4 所示。图 4(a)响应面斜率较大, 表明  $Mn^{2+}$  与  $Cu^{2+}$  浓度变化对漆酶活性的影响较显著, 酶活随两因素浓度升高先上升后下降; 图 4(b)等高线呈倾斜椭圆形, 提示  $Mn^{2+}$  与  $Cu^{2+}$  对漆酶活性的交互作用显著, 二者对酶活的影响并非独立, 存在协同调控效应。

当  $Cu^{2+}$  浓度固定为 0.1 mmol/L、接种量为体积分数 8%,  $Mn^{2+}$  浓度与碳氮比的交互影响如图 5 所示。图 5(a)响应面呈拱形, 说明  $Mn^{2+}$  浓度、碳氮比与漆酶活性存在非线性关系, 存在漆酶活性最优的组合区间。曲面有明显最高点, 对应碳氮比、 $Mn^{2+}$  浓度的最优组合, 此时漆酶活性最大;  $Mn^{2+}$  浓度与碳氮比对漆酶活性的交互作用接近椭圆形(见图 5(b)), 说明两因素对漆酶活性的交互作用显著, 中心(616 U/L 等高线)是酶活性峰值区, 向外围(536 U/L 等高线)酶活逐渐降低。

当  $Cu^{2+}$  浓度固定为 0.1 mmol/L, 碳氮比固定为 90,  $Mn^{2+}$  浓度与接种量的交互影响效应见图 6。图 6(a)中响应面同样呈拱形, 说明  $Mn^{2+}$  浓度与接种量对漆酶活性的影响有明显非线性关系, 存在活

表 3 回归方程进行方差分析的结果

| 方差来源           | 平方和      | 自由度 | 方差       | F 值    | P 值     | 显著性 |
|----------------|----------|-----|----------|--------|---------|-----|
| 回归模型           | 86810.98 | 14  | 6200.78  | 55.75  | <0.0001 | **  |
| A              | 2366.13  | 1   | 2366.13  | 21.27  | 0.0004  | **  |
| B              | 1426.56  | 1   | 1426.56  | 12.83  | 0.0030  | **  |
| C              | 13.14    | 1   | 13.14    | 0.12   | 0.7362  |     |
| D              | 7303.23  | 1   | 7303.23  | 65.66  | <0.0001 | **  |
| AB             | 1296.98  | 1   | 1296.98  | 11.66  | 0.0042  | **  |
| AC             | 534.90   | 1   | 534.90   | 4.81   | 0.0457  | *   |
| AD             | 1320.89  | 1   | 1320.89  | 11.88  | 0.0039  | **  |
| BC             | 241.14   | 1   | 241.14   | 2.17   | 0.1630  |     |
| BD             | 475.52   | 1   | 475.52   | 4.28   | 0.0577  |     |
| CD             | 2725.17  | 1   | 2725.17  | 24.50  | 0.0002  | **  |
| A <sup>2</sup> | 17169.58 | 1   | 17169.58 | 154.36 | <0.0001 | **  |
| B <sup>2</sup> | 46212.35 | 1   | 46212.35 | 415.47 | <0.0001 | **  |
| C <sup>2</sup> | 18403.88 | 1   | 18403.88 | 165.46 | <0.0001 | **  |
| D <sup>2</sup> | 22300.94 | 1   | 22300.94 | 200.49 | <0.0001 | **  |
| 残差             | 1557.21  | 14  | 111.23   |        |         |     |
| 失拟项            | 1296.92  | 10  | 129.66   | 1.99   | 0.2646  |     |
| 纯误差            | 260.60   | 4   | 65.15    |        |         |     |
| 合计             | 88368.19 | 28  |          |        |         |     |

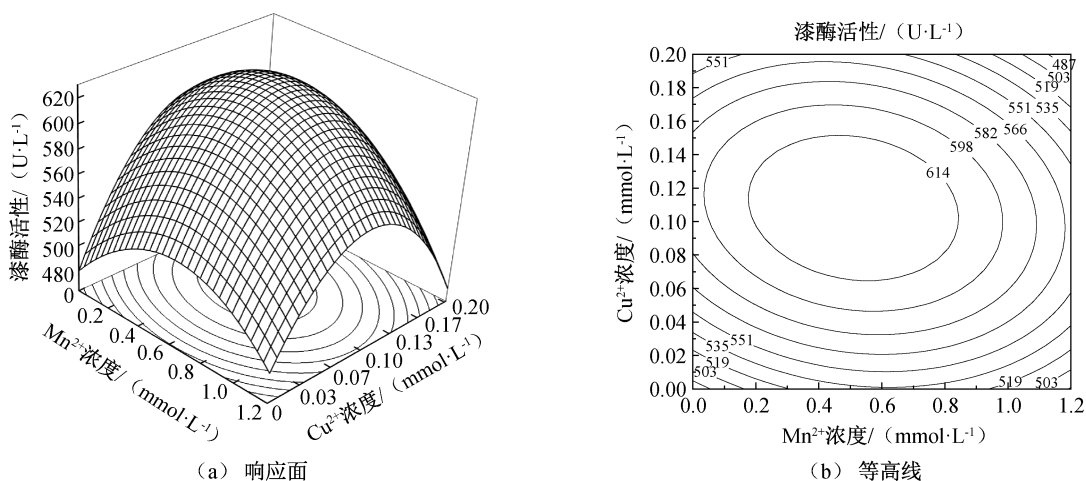


图 4 Mn<sup>2+</sup> 浓度与 Cu<sup>2+</sup> 浓度对酶活性的响应面与等高线

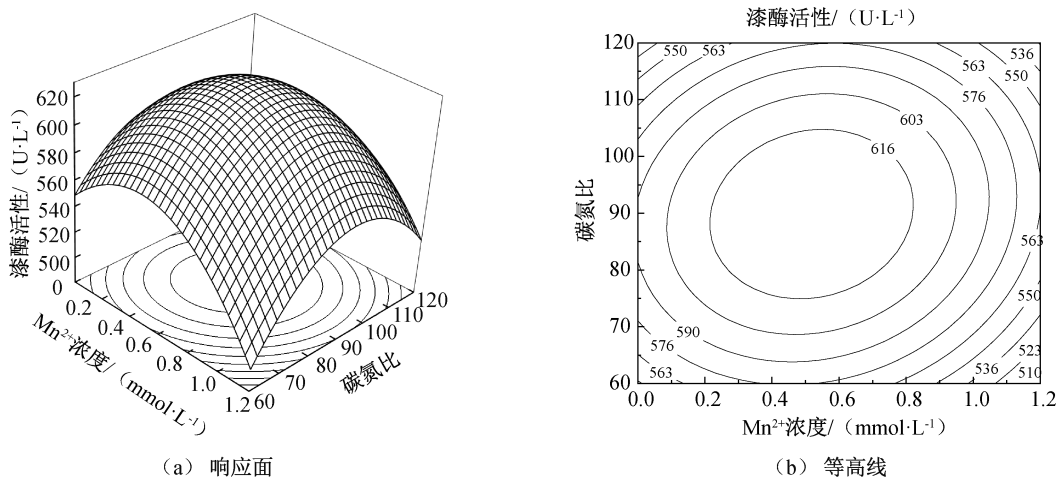


图 5 Mn<sup>2+</sup> 浓度与碳氮比对酶活性的响应面与等高线

性峰值区间(拱顶区);图6(b)中等高线呈现椭圆状等高线,中心(614 U/L圈)是活性最高点,向外圈(529 U/L圈)活性递减。当 $Mn^{2+}$ 浓度固定为0.6 mmol/L,接种量为体积分数8%, $Cu^{2+}$ 浓度与碳氮比的交互影响效应如图7所示。图7(a)中响应面

“拱顶”特征明显,表明 $Cu^{2+}$ 浓度与碳氮比协同影响活性,超过最优区间后,任一因素过高或过低都会导致酶活下降;图7(b)中等高线接近圆形等高线(中心613 U/L圈),说明两因素交互作用均衡,活性随因素组合向中心靠拢而提升。

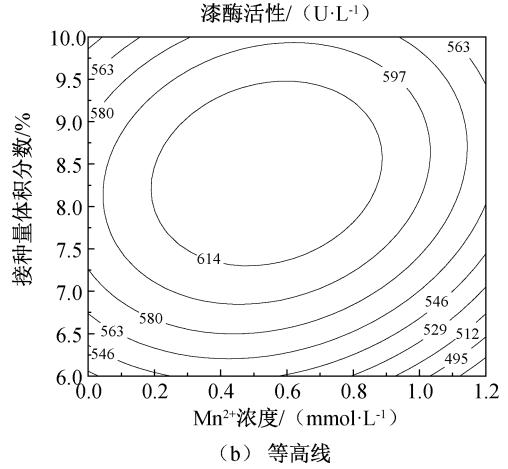
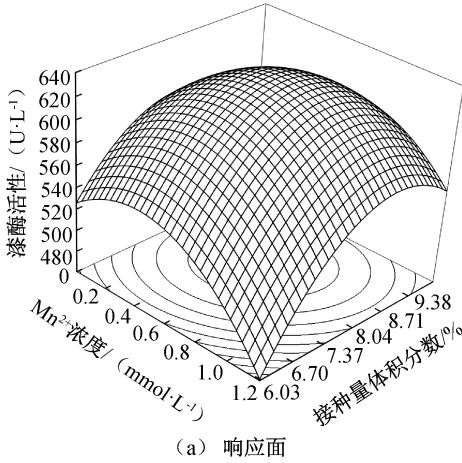


图6  $Mn^{2+}$ 浓度与接种量对酶活性的响应面与等高线

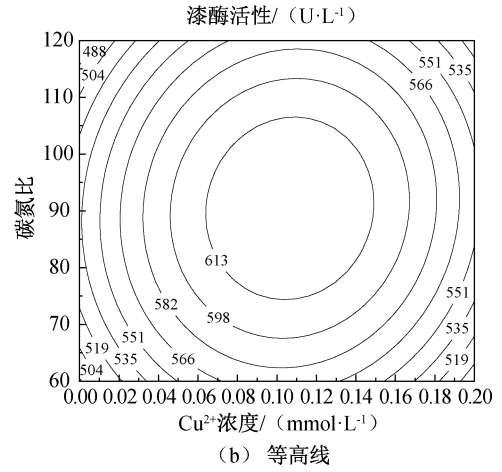
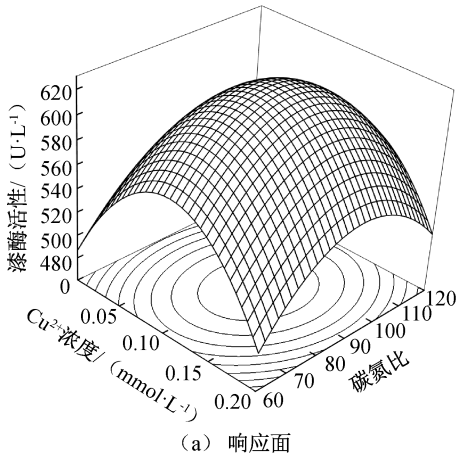


图7  $Cu^{2+}$ 浓度与碳氮比对酶活性的响应面与等高线

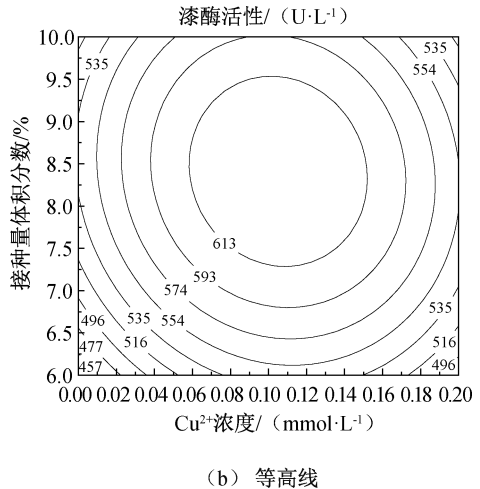
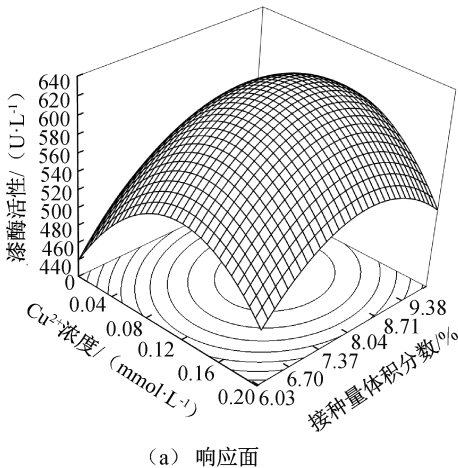


图8  $Cu^{2+}$ 浓度与接种量对酶活性的响应面与等高线

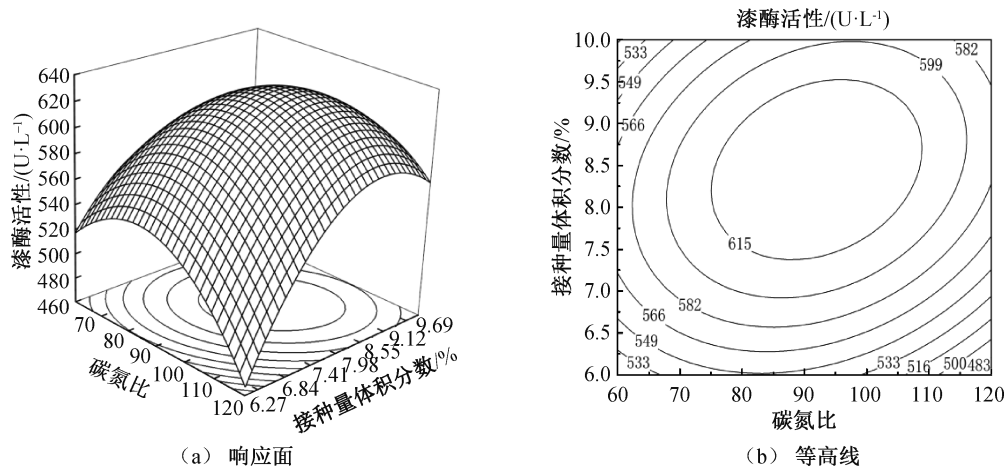


图 9 接种量与碳氮比对酶活性的响应面与等高线

当  $Mn^{2+}$  浓度固定为 0.6 mmol/L, 碳氮比固定为 90,  $Cu^{2+}$  浓度与接种量对的交互影响效应如图 8 所示。图 8(a) 中响应面的拱起幅度适中, 表明  $Cu^{2+}$  浓度与接种量对漆酶活性的增益存在上限, 并非越高越好; 图 8(b) 等高线呈椭圆形且长轴沿接种量方向分布, 说明接种量对活性的调控作用更强, 中心 613 U/L 是酶活峰值区。当  $Mn^{2+}$  浓度固定为 0.6 mmol/L,  $Cu^{2+}$  浓度固定为 0.1 mmol/L, 接种量与碳氮比对漆酶活性的交互影响效应如图 9 所示。图 9(a) 中响应面拱顶清晰, 说明接种量与碳氮比匹配度关键, 偏离最优组合会快速降低活性; 图 9(b) 中等高线呈椭圆形且长轴沿碳氮比方向分布, 表示碳氮比对酶活的影响幅度大于接种量, 中心 615 U/L 为活性最优区。

通过二次回归模型预测, 4 个因素协同作用下的最优产酶工艺条件为:  $Mn^{2+}$  浓度 0.536 mmol/L、 $Cu^{2+}$  浓度 0.107 mmol/L、碳氮比 91.551、接种量体积分数 8.40%, 在该条件下模型预测的漆酶活性为 631.881 U/L。考虑到实际操作可行性, 最优产酶工艺参数调整为:  $Mn^{2+}$  浓度 0.540 mmol/L、铜离子浓度 0.110 mmol/L、碳氮比 91.6 以及接种量体积分数 8.40%。基于响应面优参数组合得出的最优产酶条件, 采用 3 组生物学重复试验, 测得平均漆酶活性为 644.32 U/L, 与模型预测结果接近, 证明基于该响应面模型分析优化漆酶活性最佳处理工艺设计合理, 可信度较高具有实践意义。

### 3 结 论

本文以温州市郊自然腐木表面分离得到的白腐真菌 BZ103 为研究对象, 通过分子鉴定确定其分类归属, 以碳源、氮源、初始 pH 值及金属离子等为产

漆酶影响条件, 探究单因素对菌株产漆酶的影响, 并采用 4 因素 3 水平响应面法优化产漆酶条件, 主要结论如下:

a) 根据菌丝的形态学特征、ITS 序列和 18S rDNA 序列系统发育树聚类分析, 菌株 BZ103 为原毛平革菌属 (*Phanerochaete*) 黄孢原毛平革菌的一株新菌株, 命名为 *P. chryso sporium* BZ103。

b) 单因素优化菌株 BZ103 产酶条件表明, 当以葡萄糖为碳源、蛋白胨为氮源、初始 pH 值为 4.0、 $Mn^{2+}$  浓度为 0.6 mmol/L、 $Cu^{2+}$  浓度为 0.1 mmol/L、C/N 比为 90 和接种量体积分数为 8% 时, 菌株 BZ103 的漆酶活性达到最高 500.0 U/L。

c) 响应面法优化得到菌株 BZ103 最佳产漆酶培养基条件为: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、初始 pH 值 4.0、 $Mn^{2+}$  浓度 0.54 mmol/L、 $Cu^{2+}$  浓度 0.11 mmol/L、C/N 比 91.6 和接种量体积分数 8.4%, 在此条件下, 漆酶活性最高可达 644.3 U/L, 较优化前 (43.7 U/L) 提高 14.98 倍。

### 参考文献:

- [1] 何兴舟. 环境与疾病: 环境病因学研究中值得注意的问题[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 857-859.
- [2] Ugrina M, Jurić A. Current trends and future perspectives in the remediation of polluted water, soil and air: A review[J]. Processes, 2023, 11(12): 3270.
- [3] 季秀玲, 魏云林. 低温微生物环境污染修复技术研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(10): 6-11.
- [4] Torres-Farradà G, Thijs S, Rineau F, et al. White rot fungi as tools for the bioremediation of xenobiotics: A review [J]. Journal of Fungi, 2024, 10(3): 167.
- [5] Latif W, Ciniglia C, Iovinella M, et al. Role of white rot fungi in industrial wastewater treatment: A review [J]. Applied

- Sciences, 2023, 13(14): 8318.
- [6] Biko O D V, Viljoen-Bloom M, Van W H. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109669.
- [7] Zhang Y, Chen X X, Fang L X, et al. Fenton-reaction-aid selective delignification of lignocellulose by *Inonotus obliquus* to improve enzymatic saccharification [J]. Fuel, 2023, 333(1): 126355.
- [8] Chen J, Hong K, Ma L, et al. Effect of time series on the degradation of lignin by *Trametes gibbosa*: products and pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024; 281(1): 136236.
- [9] Arfin I, Suman S K, Vempatapu B P, et al. Pyrene remediation by *Trametes maxima*: an insight into secretome response and degradation pathway [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(29): 44135-44147.
- [10] 殷茹. 白腐真菌对双酚 F 的降解机制及应用研究 [D]. 广州: 广州大学, 2021: 5-11.
- [11] Patel A K, Singhanian R R, Albarico F P J B, et al. Organic wastes bioremediation and its changing prospects [J]. Science of the Total Environment, 2022, 824: 153889.
- [12] Kumar A, Kumar A P. Biotechnological applications of manganese peroxidases for sustainable management [J]. Frontiers in Environmental Science, 2022, 10: 875157.
- [13] Li Z X, Wang X, Ni Z J, et al. In-situ remediation of carbofuran-contaminated soil by immobilized white-rot fungi [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2020, 29(2): 1237-1243.
- [14] Asemoloye M D, Marchisio M A, Gupta V K, et al. Genome-based engineering of ligninolytic enzymes in fungi [J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 20.
- [15] Serbent M P, Gonçalves Timm T, Vieira Helm C, et al. Growth, laccase activity and role in 2, 4-D degradation of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. in a liquid medium [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2023, 50: 102682.
- [16] 兴勤鑫, 包月瑶, 彭静, 等. 漆酶在环境保护中的应用研究进展 [J]. 环境保护与循环经济, 2024, 44(4): 17-21.
- [17] Zhou W, Zhang W, Cai Y. Laccase immobilization for water purification: a comprehensive review [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 403: 126272.
- [18] Schuetz M, Benske A, Smith R A, et al. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem [J]. Plant Physiology, 2014, 166(2): 798-807.
- [19] Mohammadi M, Soleimani A, Lin Y, et al. Enzymatic depolymerization of lignin and electrocatalytic hydrodeoxygenation for the production of reduced aromatic compounds: a review and perspective [J]. Biotechnology Advances, 2025, 83: 108647.
- [20] Das S, Cherwoo L, Singh R. Decoding dye degradation: microbial remediation of textile industry effluents [J]. Biotechnology Notes, 2023, 4: 64-76.
- [21] Zhuo R, Fan F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants [J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146132.
- [22] Singh S, Nimse SB, Mathew DE, et al. Microbial melanin: recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications [J]. Biotechnology Advances, 2021, 53: 107773.
- [23] Kaur K, Sharma A, Capalash N, et al. Multicopper oxidases: biocatalysts in microbial pathogenesis and stress management [J]. Microbiological Research, 2019, 222: 1-13.
- [24] Guan ZB, Luo Q, Wang HR, et al. Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(19): 3569-3592.
- [25] 史开篇, 杨洋, 汪娟, 等. 固定化漆酶降解水中酚类污染物研究进展 [J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2023, 23(2): 54-61.
- [26] 唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 等. 真菌漆酶及其生产、固定化与应用 [J]. 菌物学报, 2023, 42(9): 1821-1837.
- [27] 岑庆静, 万辉, 刘薇, 等. 产漆酶真菌筛选、鉴定及酶促去除苯酚的条件优化 [J]. 南昌大学学报(理科版), 2022, 46(6): 621-629.
- [28] Janusz G, Pawlik A, Świdzka-Burek U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 966.
- [29] 陈中维, 杨锐, 李宁杰, 等. 黄孢原毛平革菌产漆酶优化培养及其对刚果红的脱色降解 [J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1538-1548.

## 团队介绍

赵洪新教授团队长期从事资源微生物的开发利用研究工作,在微生物代谢工程、基因工程、合成生物学、生物化工、微生物肥料等方面做了大量的研究工作。主持完成国家自然科学基金、省部级基金纵向项目及企业横向项目 20 余项,发表学术论文 50 余篇,其中 SCI 收录 40 余篇,作为核心人员获省部级科技奖励 2 项,参编专著 1 部,申请专利 18 项。团队与省内外十余家企业建立了深度合作关系,帮助企业攻克难题多项,取得了显著的社会、环境和经济效益。

(责任编辑:张会巍)