

以糖蜜为碳源在真菌灰盖鬼伞中高效表达碱性漆酶 PIE5

孟新悦^{1,2}, 王先华^{1,2}, 赵慧芳^{1,2}, 刘娟娟^{1,2}, 方泽民^{1,2*}

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥

2 生物催化与现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥

孟新悦, 王先华, 赵慧芳, 刘娟娟, 方泽民. 以糖蜜为碳源在真菌灰盖鬼伞中高效表达碱性漆酶 PIE5[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4151-4161.

MENG Xinyue, WANG Xianhua, ZHAO Huifang, LIU Juanjuan, FANG Zemin. Efficient expression of the alkaline laccase PIE5 in *Coprinopsis cinerea* with molasses as a carbon source[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4151-4161.

摘要: 【目的】利用廉价糖蜜替代葡萄糖作为碳源, 在真菌灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)中高效表达碱性真菌漆酶 PIE5。【方法】通过外源添加蔗糖酶 GspInv 或在 *C. cinerea* 中共表达 GspInv 分解糖蜜中的蔗糖; 以漆酶活力为参考, 优化菌株发酵条件。【结果】以 40 g/L 糖蜜为碳源时, 菌株 CcPIE5-14 表达漆酶活力为(11.9±1.2) U/mL, 发酵液中蔗糖未被利用。添加外源蔗糖酶 GspInv 后, 发酵液中的蔗糖被水解为果糖与葡萄糖, 菌株 CcPIE5-14 在 30 g/L 糖蜜条件下漆酶活力最高, 达到(14.8±0.7) U/mL。在 CcPIE5-14 中共表达 GspInv 获得菌株 CcPIE5-14-GspInv-12, 在 mKjalke 培养基中最高漆酶活性为(28.1±2.4) U/mL。利用糖蜜为碳源发酵制备漆酶时, 共表达菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的最高漆酶活性为(20.1±2.7) U/mL, 较出发菌株 CcPIE5-14 提高了 2.24 倍。发酵条件优化后, 菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的最高漆酶活性为(44.6±2.6) U/mL, 是优化前的 2.22 倍。【结论】本研究成功构建了漆酶和蔗糖酶共表达菌株, 菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 能以廉价糖蜜为碳源高效表达碱性真菌漆酶 PIE5。

关键词: 灰盖鬼伞; 糖蜜; 蔗糖酶; 碱性真菌漆酶; 高效表达

资助项目: 国家自然科学基金(32370133); 安徽省杰出青年基金(2008085J12)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370133) and the Science Fund for Distinguished Young Scholars of Anhui Province (2008085J12).

*Corresponding author. E-mail: zemin_fang@ahu.edu.cn

Received: 2025-03-05; Accepted: 2025-05-06; Published online: 2025-06-20

Efficient expression of the alkaline laccase PIE5 in *Coprinopsis cinerea* with molasses as a carbon source

MENG Xinyue^{1,2}, WANG Xianhua^{1,2}, ZHAO Huifang^{1,2}, LIU Juanjuan^{1,2}, FANG Zemin^{1,2*}

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei, Anhui, China

2 Anhui Key Laboratory of Biocatalysis and Modern Biomufacturing, Hefei, Anhui, China

Abstract: [Objective] To achieve efficient expression of the alkaline laccase PIE5 in *Coprinopsis cinerea* with molasses as a substitute for glucose as the carbon source. **[Methods]** We enhanced the laccase production in *C. cinerea* by either exogenous addition of the invertase GspInv or endogenous co-expression of GspInv to hydrolyze sucrose in molasses. The fermentation conditions were optimized based on the laccase activity. **[Results]** With 40 g/L molasses as the carbon source, strain CcPIE5-14 achieved the laccase activity of (11.9±1.2) U/mL, while sucrose remained unutilized in the fermentation liquid. Upon addition of exogenous GspInv, sucrose in the fermentation liquid was hydrolyzed into fructose and glucose, and strain CcPIE5-14 exhibited the peak laccase activity of (14.8±0.7) U/mL in the medium with 30 g/L molasses. Co-expression of GspInv in CcPIE5-14 generated the engineered strain CcPIE5-14-GspInv-12, which demonstrated the maximum laccase activity of (28.1±2.4) U/mL in the mKjalke medium. When using molasses as the carbon source for laccase production, strain CcPIE5-14-GspInv-12 achieved the peak laccase activity of (20.1±2.7) U/mL, which represented a 2.24-fold increase over that of the parental strain CcPIE5-14. Following fermentation condition optimization, strain CcPIE5-14-GspInv-12 attained the maximum laccase activity of (44.6±2.6) U/mL, which marked a 2.22-fold enhancement over the pre-optimization level. **[Conclusion]** The engineered strain CcPIE5-14-GspInv-12, co-expressing laccase and invertase, demonstrates efficient production of the alkaline laccase PIE5 in *C. cinerea* with cost-effective molasses as the carbon source.

Keywords: *Coprinopsis cinerea*; molasses; invertase; fungal alkaline laccase; efficient expression

漆酶(EC 1.10.3.2), 是一类能够催化酚类与非酚类化合物氧化的含铜多酚氧化酶, 属于多铜氧化酶家族(multicopper oxidases, MCOs)中最大的群体^[1]。真菌、植物、细菌和昆虫等的基因组中均包含漆酶基因, 但已发现的漆酶超过80%来自真菌和细菌^[2]。目前已从平菇(*Pleurotus ostreatus*)^[3-4]、变色栓菌(*Trametes versicolor*)^[3-4]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[5]等微生物中克隆、纯化并表征了超过100个漆酶蛋白。其中, 真菌漆酶主要在酸性条件下发挥活性(pH 3.5-5.5), 具有氧化还原电势高、比活力高、底

物范围广等优势^[6-7]。细菌漆酶主要在中性及碱性条件下具有良好催化活性(pH>6.0), 具有热稳定性好的特性, 但催化比活力低、底物范围窄^[3-4]。基于不同来源漆酶的优缺点, 获得在碱性条件下具有良好催化性能的真菌漆酶一直是漆酶研究的主要方向之一。

漆酶在众多领域具有应用价值^[8-9]。例如, Selina等^[10]发现漆酶可用于污染土壤中毒性化合物及传统油田和化石燃料中多环芳烃的分解; Pramanik等^[11]利用漆酶降解了一些有毒偶氮染料(如酚红、亚甲蓝、结晶紫等); Gutiérrez-

Escobar 等^[12]发现在葡萄酒酿造中添加固定化的漆酶能够提取酚类副产物, 改善葡萄酒的颜色与口感。然而, 漆酶产量不足一直是限制其大规模应用的主要瓶颈。野生菌株分泌漆酶活性低、产酶真菌培养时间长、产酶效率低、生产成本高等均是限制因素^[13]。通过基因异源高效表达、菌株选择与改良、培养基成分优化、发酵条件优化等策略是提高漆酶产量和降低生产成本的关键步骤^[14]。

糖蜜是从甘蔗中提取蔗糖后产生的下游副产物^[15], 主要由水(20%–28%)、总糖(57%–71%)、粗蛋白(5%–9%)、有机酸(3%–9%)和无机盐(2%–8%)组成^[16], 可作为微生物发酵的良好廉价碳源。Yan 等^[17]在制备生物柴油时使用糖蜜替代葡萄糖, 使制备成本降低了 60%。据统计, 我国每年生产约 400 万 t 糖蜜, 其中大部分被直接丢弃, 导致了大量资源的浪费和环境污染^[17]。

真菌漆酶 PIE5 是 Yin 等^[18]在灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)来源漆酶 Lcc9 基础上, 通过定向进化获得的第一个在碱性条件下(pH 8.5)具有良好催化活性的真菌漆酶。在以 20 g/L 葡萄糖为碳源、*C. cinerea* FA2222 为宿主细胞同源过表达 PIE5 时, 菌株 CcPIE5-14 的漆酶活力达到 24.2 U/mL, 获得的漆酶在染料废水处理中具有潜在应用价值^[15]。本研究使用廉价糖蜜代替葡萄糖, 以期通过对过表达菌株 CcPIE5-14 的改造和发酵优化实现真菌漆酶 PIE5 的高效表达。

1 材料与方法

1.1 菌株

PIE5 表达菌株 CcPIE5-14 保存于本实验室。菌株在 37 °C 培养。

1.2 培养基

Yeast malt glucose 培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 葡萄糖 4.0, 麦芽浸膏 10.0, 用于菌株培养。mKjalke 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 20.0, 磷酸二氢钾 2.0, 二水氯化钙 0.5,

七水硫酸镁 0.05, 用于菌株液体发酵种瓶制备和漆酶发酵。

1.3 主要试剂和仪器

2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS] 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 糖蜜购自广西博宣食品有限公司; 质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 真菌基因组快速抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

发酵罐购自上海保兴生物设备工程有限公司。

1.4 蔗糖酶(*Gongronella* sp. invertase, GspInv)的表达、纯化及糖蜜的预处理

GspInv 在毕赤酵母 GS115 中的过表达制备及纯化参照 Zhou 等^[19]的方法进行。纯化的 GspInv 保存于 4 °C 备用。糖蜜预处理时向不同浓度糖蜜发酵培养基中加入 60 U GspInv, 在 37 °C、120 r/min 条件下培养 CcPIE5-14 一周。

1.5 蔗糖酶 GspInv 过表达载体的构建

载体 pYSK7 主要由双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*) *gpd* II 启动子、*C. cinerea* 的 *lcc1* 编码序列和 *lcc1* 启动子组成^[20]。将载体中的 *lcc1* 序列替换成 *GspInv* 序列, 构建 GspInv 过表达载体。*GspInv* 的克隆及其与 pYSK7 载体酶切片段的同源重组连接参照 Zhou 等^[19]的方法进行, 最终获得 pYSK7-*GspInv* 过表达载体。为研究 GspInv 胞内和胞外过表达对漆酶 PIE5 表达的影响, 在 *GspInv* 序列上游添加了信号肽序列 ATGTCCAGGAAACTTTTCTCTCTCGCCTACT TGGCTGTTGTACTGGTCAGT, 获得过表达载体 pYSK7-*GspInv*-s。酿酒酵母 Y1H 的转化及阳性克隆验证参考 YeastmarkerTM Yeast Transformation System 2 User Manual^[21]。获得的阳性克隆在 YPDA 液体培养基(参考 YeastmarkerTM Yeast Transformation System 2

User Manual 配制)^[21]中 30 °C 恒温培养 2 d 后, 参考 TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit 提取重组质粒并转入大肠杆菌 JM109 中扩增, 用于菌株 CcPIE5-14 的转化。

1.6 GspInv 过表达 CcPIE5-14 菌株的构建

菌株 CcPIE5-14 原生质体的制备以及 GspInv 过表达质粒与潮霉素筛选标记质粒的共转化参考王先华等^[20]的方法。转化后的原生质体涂布于固体再生培养基中, 在 37 °C 培养 24 h 后, 向培养皿中添加 5 mL 含有 100 µg/mL 潮霉素的再生培养基, 继续在 37 °C 培养 3 d。随后, 挑取活性生长的单菌落, 接种至 YMG 固体培养基中培养至菌落直径 > 1 cm。将菌株的菌丝刮取至无菌 EP 管中, 按照真菌基因组快速抽提试剂盒的方法提取真菌基因组。以提取的真菌基因组为模板, 使用引物 GspInvF (5'-ATGGTGCTTGCTGATCCT-3') 和 GspInvR (5'-TCAAGGCGATTGAACG-3'), 通过 PCR 反应进行阳性转化子的鉴定, 并计算阳性转化率。PCR 反应体系 (20 µL): 2×ApexHF FS PCR Master Mix 10 µL, 上、下游引物 (10 µmol/L) 各 1 µL, DNA 模板 5 µL, ddH₂O 3 µL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 68 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。引物合成、测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.7 *C. cinerea* 菌株的培养

挖取 4 块大小约为 0.5 cm² 的 *C. cinerea* 菌块接种至 YMG 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 培养 4 d。在无菌环境下, 通过高速均浆制备发酵种子液。将种子液按照 5% 的体积分数接种至 mKjalke 液体培养基或不同浓度糖蜜培养基 (将 mKjalke 培养基中的葡萄糖替换为糖蜜) 中, 37 °C、120 r/min 连续培养 7 d, 每隔 24 h 取样并监测目标酶蛋白活力的变化。

1.8 漆酶、蔗糖酶活力测定

漆酶活力测定采用 ABTS 法, 在 1 mL 反应

体系中添加 950 µL 酒石酸钠缓冲液 (pH 4.0)、33 µL ABTS (终浓度 500 µmol/L) 和 17 µL 适当稀释的酶液, 涡旋振荡 3 s, 30 °C 水浴中反应 3 min 后立即置于冰上 30 s 以终止反应, 测定 OD₄₂₀。漆酶活力计算如公式 (1) 所示。酶活 (enzyme activity, *E*) 单位定义为 1 min 内转化 1 µmol/L 底物所需的酶量。

$$E \text{ (U/L)} = OD_{420} \times \text{稀释倍数} \times 555.56 \quad (1)$$

蔗糖酶活力测定步骤如下: 在 0.6 mL 反应体系中添加 430 µL 乙酸-乙酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.0)、120 µL 1 mol/L 蔗糖溶液和 50 µL 适当稀释的酶液, 混匀后在 45 °C 水浴中孵育 5 min, 利用葡萄糖试剂盒 (葡萄糖氧化酶法) 测定反应体系中生成的葡萄糖量, 进而计算蔗糖酶的酶活力。酶活单位 (U) 定义为 1 min 内转化 1 µmol/L 底物所需的酶量。

1.9 发酵液残糖的 HPLC 测定

不同时刻发酵液中残糖的测定使用 HPLC 法, 使用示差检测器进行检测, 色谱柱型号为 Aminex HPX-Ca (9 µm, 7.8 mm×300 mm), 柱温 80 °C, 检测器温度 55 °C, 流动相为超纯水, 流速 0.5 mL/min, 进样量 20 µL。配制不同浓度的葡萄糖、果糖和蔗糖标准品, 制备相应的标准曲线。通过标准曲线计算不同时刻发酵液中残糖的含量。

1.10 发酵条件优化

以 mKjalke 培养基为基础, 采用单因素法对发酵培养基进行优化。具体优化条件如下: (1) 氮源种类 (A 玉米浆、B Aobox 酵母浸粉、C 工业酵母浸粉、D 大豆蛋白胨、E 工业蛋白胨、F 多聚蛋白胨、G 牛肉膏); (2) 氮源浓度 (5、8、10、12、15 g/L); (3) 发酵温度 (25、29、34、37 °C); (4) 培养基初始 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.7)。

1.11 PIE5 的 1 L 发酵罐发酵制备

使用 1.10 节优化获得的发酵培养基开展 PIE5 的发酵制备。1 L 的发酵罐初始装液量为

650 mL。种子液按照 1.7 节方法制备, 并以 5% 的接种量接种至发酵罐内。发酵初始阶段, 设定发酵温度为 37 °C, 通气量为 5 m³/h, 搅拌叶轮转速为 150 r/min, 待发酵设备各参数稳定后, 设定发酵罐内溶氧(dissolved oxygen, DO)为 100%。当 DO 降至 40% 以下时, 启动溶氧关联, 自动控制压缩空气和氧气的通气量, 使罐内的 DO 稳定在 30%–40% 之间。每 12 h 取发酵上清液测定漆酶活力。

2 结果与分析

2.1 CcPIE5-14 以蔗糖酶处理糖蜜为碳源时表达漆酶 PIE5 活力

糖蜜是微生物发酵的良好碳源和氮源。本研究考察了糖蜜浓度对 PIE5 表达的影响。当糖蜜浓度为 40 g/L 时 CcPIE5-14 表达的漆酶活力最高, 达到(11.9±1.2) U/mL。当糖蜜浓度超过 40 g/L 时漆酶表达活力迅速下降(图 1A)。对发酵体系中的主要糖组分及浓度进行分析, 发现培养基中蔗糖浓度维持在(22.3±0.6) g/L。随着培养时间的延长, 葡萄糖和果糖浓度逐渐下降, 在发酵的第 4 天降低至 0 g/L (图 1B)。这些结果表明 CcPIE5-14 不能利用蔗糖, 因此对糖蜜中的

蔗糖进行水解预处理可能有效提高漆酶表达活力。

来自卵形孢球托霉菌(*Gongronella butleri*) W5 的高效蔗糖酶 GspInv 可以高效水解蔗糖为葡萄糖和果糖^[19]。向培养 CcPIE5-14 体系中加入 60 U GspInv 以促进蔗糖分解。结果显示, 当糖蜜浓度为 30 g/L 时漆酶活力最高, 达到(14.8±0.7) U/mL, 而此时未添加蔗糖酶 GspInv 的培养体系中漆酶活力仅为(6.2±0.4) U/mL (图 1A)。与直接使用糖蜜相比, 经 GspInv 预处理后发酵体系中的最高漆酶活性提高了 1.39 倍。发酵体系中的蔗糖在 GspInv 作用下浓度逐渐下降, 而葡萄糖和果糖浓度逐渐升高(图 1C)。上述结果说明添加的蔗糖酶有效水解了糖蜜中的蔗糖为葡萄糖和果糖, 后者被 CcPIE5-14 利用, 用于菌体生长和漆酶的合成与分泌。

2.2 蔗糖酶 GspInv 表达载体的转化及阳性转化子的验证

为了在菌株 CcPIE5-14 中实现 GspInv 的共表达, 将表达载体 pYSK7-GspInv-s 和 pYSK7-GspInv 分别与潮霉素抗性筛选载体 *PCRII-hygB* 共转化至 CcPIE5-14 原生质体中。经潮霉素筛选最终获得 pYSK7-GspInv-s 和 pYSK7-GspInv 转化

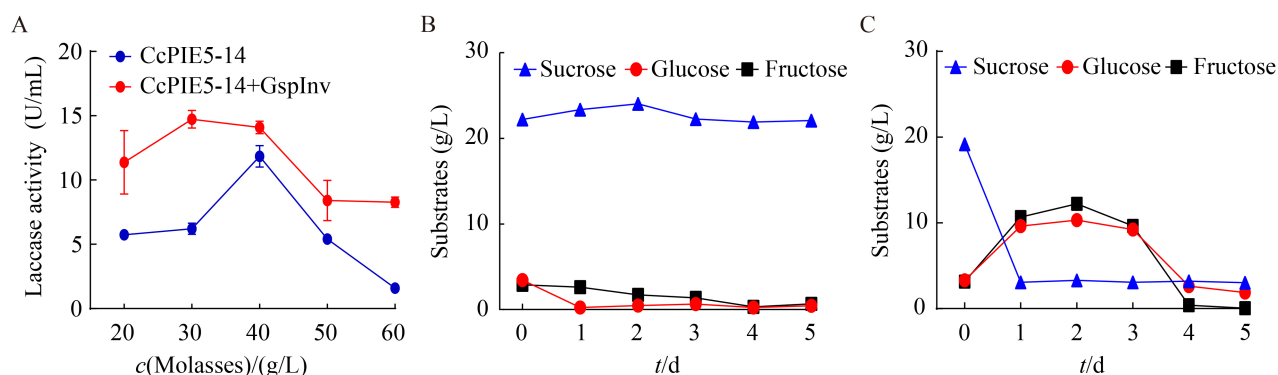


图1 不同处理糖蜜为碳源时菌株CcPIE5-14合成漆酶活力及发酵液上清残糖分析。A: 漆酶活力; B: 对照组发酵液残糖浓度; C: GspInv处理组发酵液残糖浓度。

Figure 1 Laccase activity and analysis of residual sugar in fermentation supernatant. A: Laccase activity; B: Residual sugar in fermented supernatants in control group; C: Residual sugar in fermented supernatants in GspInv pretreatment group.

子 10 株和 54 株。经 PCR 验证, 分别获得 7 株和 38 株阳性转化子, 阳性率分别为 70.0% 和 70.4%。

随机挑选阳性转化子菌株, 在 mKjalke 培养基中培养以验证蔗糖酶蛋白的表达能。结果显示(图 2), CcPIE5-14-GspInv-s 阳性转化子菌株的最高蔗糖酶活性为(25.3±2.3) U/mL, 最低为(11.0±0.5) U/mL; CcPIE5-14-GspInv 阳性转化子菌株的最高蔗糖酶活性为(46.5±2.5) U/mL, 最低为(12.8±1.9) U/mL。结果表明, 2 种类型的 *gspinv* 表达载体均成功转入菌株 CcPIE5-14 并正确表达, 然而信号肽的加入并未有效增加胞外蔗糖酶活力。

2.3 共表达菌株的漆酶活力测定

重组菌株在 mKjalke 培养基中的漆酶合成能力研究结果显示, 重组菌株与 CcPIE5-14 的发酵周期一致, 均在第 7 天达到最高漆酶活性(图 3A)。其中, 共表达菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的漆酶活力最高, 达到 (28.1±2.4) U/mL; CcPIE5-14-GspInv-3 的活力为(25.8±0.4) U/mL。与出发菌株的最高酶活力(21.3±1.0) U/mL 相比,

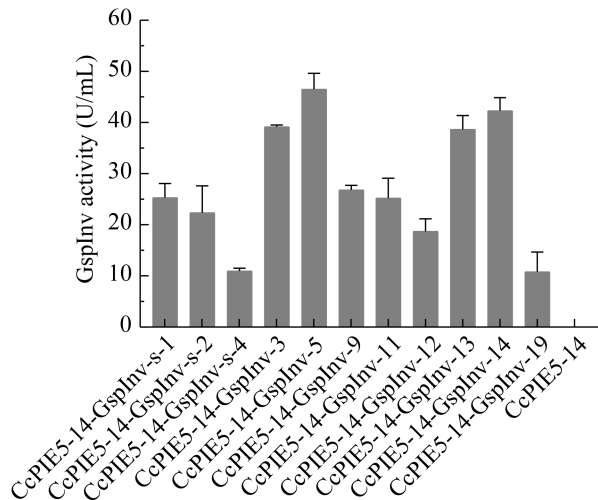


图2 共表达菌株在mKjalke培养基中的蔗糖酶活力分析

Figure 2 Invertase activity of co-expressed strains in mKjalke medium. The result represents the mean±SD of three replicates.

分别提高了 0.32 倍和 0.21 倍。

使用 30 g/L 糖蜜替代 mKjalke 培养基中的葡萄糖(图 3C), 共表达菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的最高漆酶活性为(20.1±2.7) U/mL, CcPIE5-14-GspInv-s-1 的最高漆酶活性为(14.8±0.4) U/mL。与 CcPIE5-14 的酶活力(6.2±0.4) U/mL 相比, 分别提高了 2.24 倍和 1.39 倍。

对共表达菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 发酵液上清中残糖含量的测定结果显示, 发酵液中的蔗糖已逐步被转化为葡萄糖和果糖, 且葡萄糖和果糖进一步被重组菌株利用(图 3B)。对发酵终点的菌丝体干重分析结果显示(图 3C), 蔗糖酶 GspInv 转入 CcPIE5-14 菌株后, PIE5 表达菌株的生物量均有不同程度的提高。然而生物量与漆酶活力并不呈正比例关系, 表明合适的蔗糖酶表达量对于平衡菌体生物量和漆酶表达是必需的。

2.4 碳源、氮源、pH 以及温度优化

以 CcPIE5-14-GspInv-12 为出发菌株, 以 mKjalke 培养基为基础, 将碳源替换为糖蜜进行发酵培养基成分的优化。结果显示(图 4A), 当糖蜜浓度为 40 g/L 时 PIE5 发酵酶活性最高, 达到(25.1±1.9) U/mL。随着糖蜜浓度的增加菌体的干重逐渐增加, 而酶活性逐渐降低。因此选用 40 g/L 的糖蜜作为最终碳源浓度进行后续的优化实验。

氮源种类优化结果显示, 以工业酵母浸粉和工业蛋白胨作为单一氮源时效果最佳, 漆酶活力分别为(30.3±1.5) U/mL 和(31.0±1.0) U/mL (图 4B)。使用玉米浆、Aobox 酵母浸粉和多聚蛋白胨作为单一氮源时也获得了较高的漆酶活力, 分别为(24.7±2.3)、(26.3±1.9)、(23.3±0.1) U/mL。因此选择工业蛋白胨和工业酵母浸粉 2 种氮源进行最适浓度优化。当 2 种氮源的浓度为 10 g/L 时漆酶活性最高。其中, 以工业蛋白胨为氮源时漆酶活性为(28.3±1.1) U/mL (图 4C), 而以工业酵母浸粉为氮源时漆酶活性为(30.2±1.2) U/mL (图 4D)。

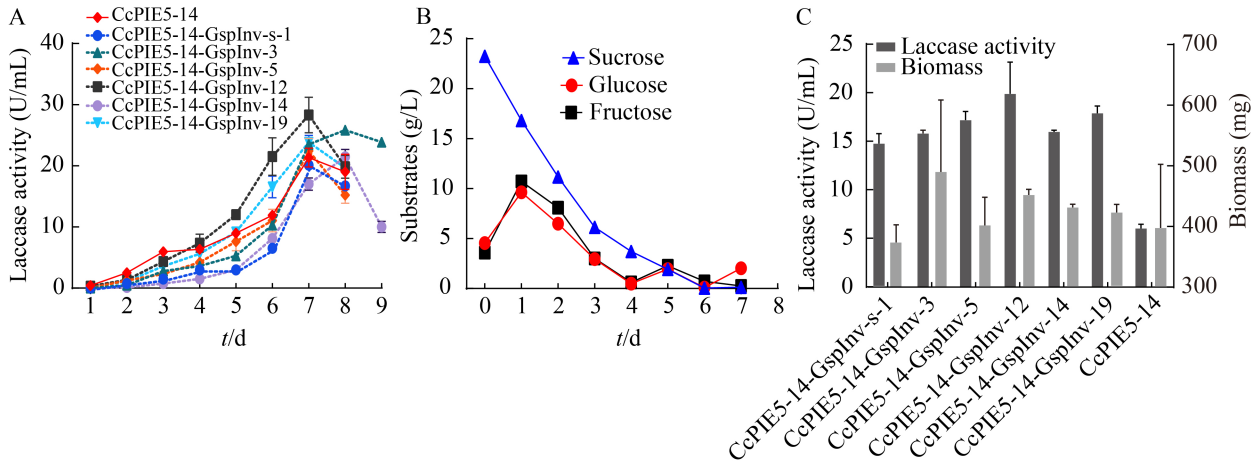


图3 重组菌株的摇瓶发酵。A: 共表达菌株在mKjalke培养基中的漆酶活力; B: 发酵液残糖分析; C: 共表达菌株在糖蜜中的漆酶活力及生物量。数据为3组重复的平均值±标准差。

Figure 3 Shake flask fermentation of recombinant strains for laccase production. A: Laccase activity of co-expressed strains in mKjalke medium; B: Analysis of residual sugar content in fermentation supernatant; C: Laccase activity and biomass of co-expressed strains in molasses. The data are the mean±SD of the three replicates.

本研究表明, 使用复合氮源有利于菌体生长和漆酶表达。因此继续保持总浓度在 10 g/L, 使用工业酵母浸粉和工业蛋白胨作为复合氮源, 对二者的添加比例进行优化。结果显示, 当工业酵母浸粉与工业蛋白胨的比例为 2:1 和 3:1 时漆酶活性最高, 分别为 (34.9±0.2) U/mL 和 (34.4±0.5) U/mL, 高于单一氮源时的酶活性(图 4E)。由于工业酵母浸粉与工业蛋白胨的比例为 2:1 和 3:1 时, PIE5 的产量相差不大, 为了降低培养基的成本, 在后续的研究中使用工业酵母浸粉:工业蛋白胨=2:1 的复合比例, 即 6.7 g/L 工业酵母浸粉和 3.3 g/L 工业蛋白胨进行后续实验。

不同初始 pH 对 PIE5 表达的影响显著(图 4F)。随着 pH 的升高, PIE5 酶活力呈先上升后下降的趋势。当初始 pH 为 6.0 时漆酶活性达到最高点, 为(44.6±2.6) U/mL。当初始 pH 值超过 6.5 后, 漆酶活性和生物量均有所降低, 说明在偏酸性的环境更有利于菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的培养, 并且也更有利于 PIE5 的表达。

培养温度对漆酶 PIE5 表达的影响研究结果

显示(图 4G), 当发酵温度为 37 °C 时漆酶活性最高, 为(40.8±3.3) U/mL; 其次是 25 °C, 酶活为 (32.0±0.6) U/mL。在 29 °C 和 34 °C 发酵时酶活较低, 分别为(22.2±3.4) U/mL 和(24.6±0.6) U/mL。当菌体在 37 °C 下培养时, 由于温度适宜菌体生物量快速积累并且表达大量漆酶, 在第 6 天即达到最高酶活。在 25 °C 下培养时, 虽然单个菌丝球表达漆酶的效率较高, 但总体生物量增长速度缓慢, 在第 8 天才达到最高酶活。因此 37 °C 培养时发酵周期更短, 为了减少发酵成本, 在后续的优化实验中选用 37 °C 作为 PIE5 的发酵温度。

2.5 1 L 发酵罐中发酵验证重组菌株的 PIE5 合成能力

为了进一步验证重组菌株 CcPIE5-14-GspInv-12 的漆酶 PIE5 合成能力, 在基于摇瓶优化获得的最佳培养基配方和培养条件下, 利用 1 L 发酵罐进行发酵验证。漆酶活性在 37 °C 培养发酵至 84 h 时达到最高点, 为(38.2±2.9) U/mL (图 5A)。在发酵过程中, 由于菌株代谢以及部

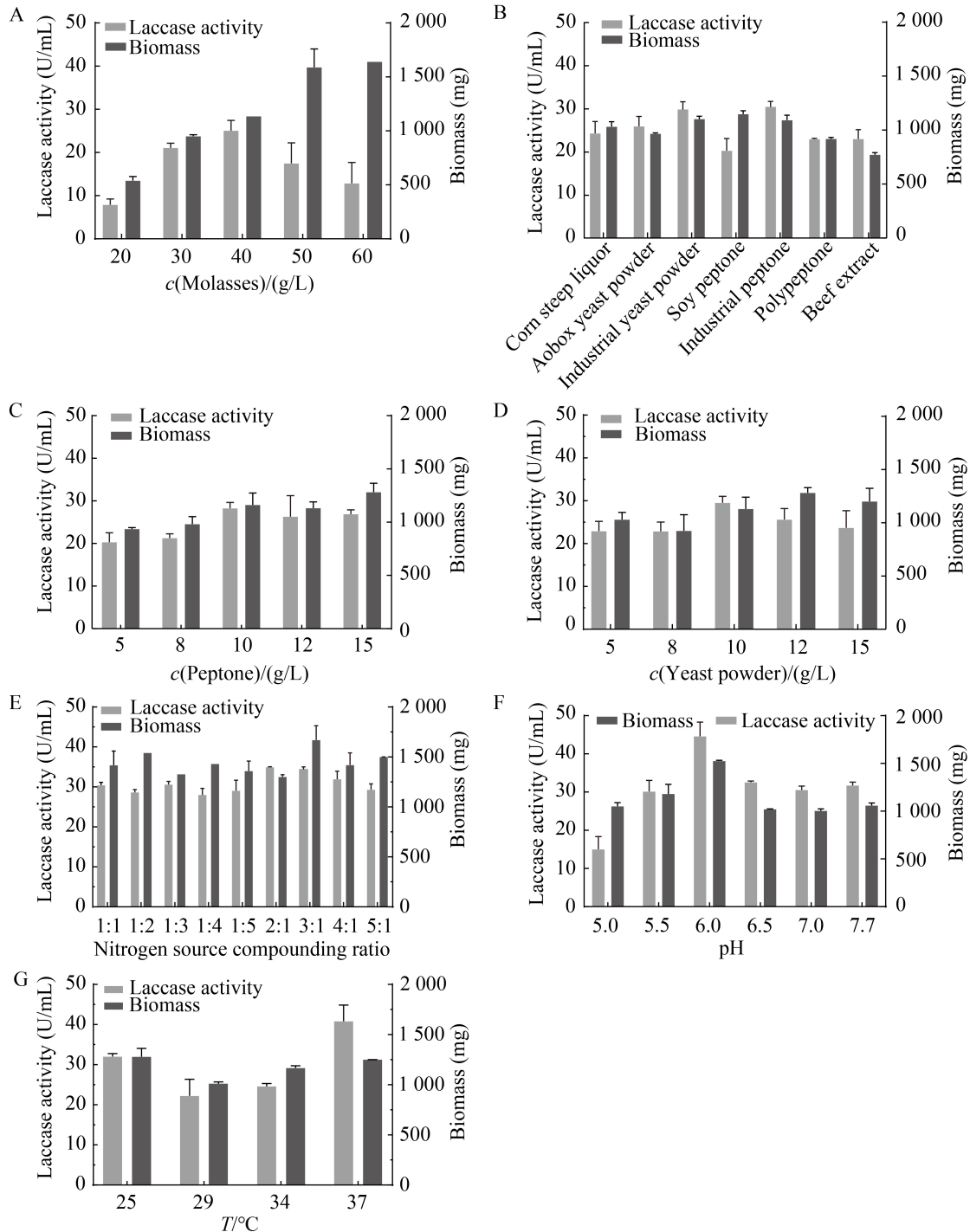


图4 发酵条件优化。A: 糖蜜浓度; B: 氮源种类; C: 工业蛋白胨浓度; D: 工业酵母浸粉浓度; E: 氮源复配比例; F: 初始pH; G: 发酵温度。

Figure 4 Optimization of fermentation conditions. A: Molasses concentration; B: Types of nitrogen sources; C: Industrial peptone concentration; D: Industrial yeast powder concentration; E: Nitrogen source compounding ratio; F: Initial pH; G: Fermentation temperature. The data were the mean \pm SD of the three replicates.

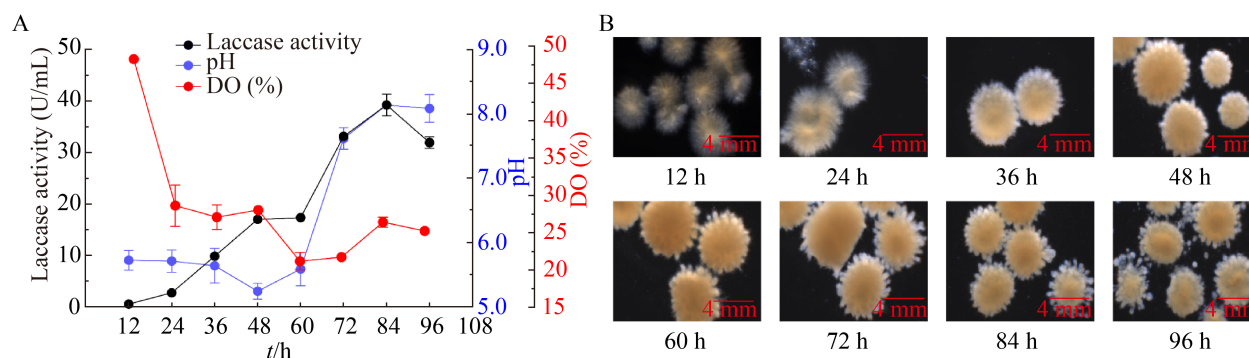


图5 1 L发酵罐中制备漆酶PIE5。A: 漆酶活力; B: 菌球状态。

Figure 5 Preparation of laccase PIE5 in a 1 L bioreactor. A: Laccase activity; B: Mycelial pellet disruption.

分菌丝球的裂解(图 5B), 导致发酵液的 pH 逐渐上升。菌丝球的形态变化与发酵液 pH 增长趋势一致。

3 讨论与结论

糖蜜中的糖主要是蔗糖(48.8%), 只有少量的葡萄糖(5.29%)和果糖(8.07%)^[22]。当以蔗糖作为碳源时, *C. cinerea* 生长状况不佳^[23]。与这一现象一致, 本研究中残糖浓度测定结果显示, CcPIE5-14 不能利用蔗糖。因此在这种生长不良的条件下仅检测到极少量的漆酶活性是合理的, 同时也提示对糖蜜中的蔗糖进行水解预处理可能有效提高漆酶表达活力。通过 GspInv 水解糖蜜中的蔗糖为果糖和葡萄糖, 漆酶发酵活力提高至(14.8±0.7) U/mL。进一步通过在菌株中共表达 GspInv 降低外源添加蔗糖酶的成本, 最终筛选获得的菌株漆酶活力达到(20.1±2.7) U/mL, 比对照提高了 2.24 倍。Ma 等^[24]在利用糖蜜生产二十二碳六烯酸的过程中, 在裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)中表达了高效蔗糖酶后产物产量提高了 2.57 倍。

目前, 灰盖鬼伞产漆酶的最高酶活因培养条件和优化策略的不同而有所差异。通过基因编辑或异源表达技术^[25], 灰盖鬼伞的漆酶产量可能进一步提升。Bao 等^[26]在毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)中异源表达漆酶 Lac1 时, 漆酶活力在

第 6 天达到 0.55 U/mL。蔗糖酶在 *C. cinerea* 中异源表达, 可能从碳源利用、代谢调控、基因表达调控、协同作用等方面促进漆酶酶活^[27]。蔗糖酶基因 *gspinv* 在灰盖鬼伞胞内和胞外表达, 对漆酶活力的影响可能因基因整合位点的不同而有所差异^[28-29]。蔗糖酶在胞内表达可以改变代谢途径, 蔗糖的水解产物果糖可以调节苯丙烷代谢途径, 更快地激活漆酶合成的上游通路^[29]。胞内表达蔗糖酶影响次级代谢产物的合成(如对羟基苯甲酸), 进而诱导漆酶基因表达, 提高漆酶产量^[30]。胞内表达蔗糖酶得到的水解产物葡萄糖和果糖, 为菌株提供更多可利用的碳源, 促进菌体生长和代谢活动, 从而间接提高漆酶的合成与分泌^[31]。此外, 蔗糖酶会受到最终产物葡萄糖和果糖的抑制。本研究表明, 蔗糖酶的胞内表达可显著提高漆酶活性, 该结果与已有文献报道相吻合。

本研究构建了高效蔗糖酶 GspInv 表达载体, 并将其转入 CcPIE5-14 中, 成功获得了共表达 GspInv 的重组菌 CcPIE5-14-GspInv-12。重组菌以糖蜜发酵漆酶时, 最高漆酶活性达到(20.1±2.7) U/mL, 相较于 CcPIE5-14 提高了 2.24 倍。通过发酵条件优化, PIE5 的表达量进一步提高, 达到(44.6±2.6) U/mL, 是优化前的 2.22 倍。通过对重组菌株的改造, 实现了 CcPIE5-14 以廉价糖蜜为碳源条件下 PIE5 的高水平表达。

作者贡献声明

孟新悦：文稿撰写；王先华：实验操作；赵慧芳：数据收集与分析；刘娟娟：数据分析及文稿审阅；方泽民：实验设计及文稿审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] VAHSEN N, CANDÉ C, BRIÈRE JJ, BÉNIT P, JOZA N, LAROCLETTE N, MASTROBERARDINO PG, PEQUIGNOT MO, CASARES N, LAZAR V, FERAUD O, DEBILI N, WISSING S, ENGELHARDT S, MADEO F, PIACENTINI M, PENNINGER JM, SCHÄGGER H, RUSTIN P, KROEMER G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation[J]. *EMBO Journal*, 2004, 23(23): 4679-4689.
- [2] RANJIT D, LI GY, MAI BX, AN TC. Spore cells from BPA degrading bacteria *Bacillus* sp. GZB displaying high laccase activity and stability for BPA degradation[J]. *Science of The Total Environment*, 2018, 640: 798-806.
- [3] NGUYEN DH, DANG TTH, KUAN SK, PHAM TNL, HOANG TQ, NGUYEN HL, SEUNG MP, ASHOKKUMAR V, PAU LS. Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 19: 101027.
- [4] LEONOWICZ A, CHO N, LUTEREK J, WILKOLAZKA A, WOJTAS-WASILEWSKA M, MATUSZEWSKA A, HOFRICHTER M, WESENBERG D, ROGALSKI J. Fungal laccase: properties and activity on lignin[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2001, 41(3/4): 185-227.
- [5] GULHAN Y, UNZILE GG, ELIF G, FATIH A. Partial purification and characterization of the novel halotolerant and alkalophilic laccase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, 37(4): 268-277.
- [6] 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯. 真菌漆酶的性质、生产、纯化及固定化研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 1-10.
WU Y, MA HF, CAO YJ, SI J, CUI BK. Advances on properties, production, purification and immobilization of fungal laccase[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 1-10 (in Chinese).
- [7] 刘宁, 贾慧, 申坤, 曹志艳, 董金皋. 真菌漆酶: 多样的生物学功能及复杂的天然底物[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(2): 333-341.
LIU N, JIA H, SHEN S, CAO ZY, DONG JG. Fungal laccase: multi-biofunction and complicated natural substrates[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(2): 333-341 (in Chinese).
- [8] ELHAM J, ISABELL T, AGNES S, BETTINA S, HUBERT C, DIETMAR S. Characterisation of electron beam irradiation-immobilised laccase for application in wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 624: 309-322.
- [9] PABLO A, SUSANA C. Fungal laccases: fundamentals, engineering and classification update[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1716.
- [10] SELINA MB, IAN S. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2005, 80(7): 723-736.
- [11] PRAMANIK S, CHAUDHURI S. Laccase activity and azo dye decolorization potential of *Podoscypha elegans*[J]. *Mycobiology*, 2018, 46(1): 79-83.
- [12] GUTIÉRREZ-ESCOBAR R, ALIAÑO GONZÁLEZ MJ, CANTOSVILLAR E. Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: a review[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 718.
- [13] SENTHIVELAN T, KANAGARAJ J, PANDA RC. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach: a review[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, 21(1): 19-38.
- [14] VALIZADEH S, REZAEI S, MOHAMADNIA S, RAHIMI E, TAVAKOLI O, FARAMARZI MA. Elimination and detoxification of phenanthrene assisted by a laccase from halophile *Alkalibacillus almallahensis*[J]. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2022, 20(1): 1-13.
- [15] SHAHZAD K, REHAN M, RASHID MI, ALI N, SUMMAN AS, ISMAIL IMI. Sustainability evaluation of polyhydroxyalkanoate production from slaughterhouse residues utilising emergy accounting[J]. *Polymers*, 2021, 14(1): 118.
- [16] PALMONARI A, CAVALLINI D, SNIFFEN CJ, FERNANDES L, HOLDER P, FAGIOLI L, FUSARO I, BIAGI G, FORMIGONI A, MAMMI L. Short communication: characterization of molasses chemical composition[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 6244-6249.
- [17] YAN D, LU Y, CHEN YF, WU QY. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(11): 6487-6493.
- [18] YIN Q, ZHOU G, PENG C, ZHANG YL, KÜES U, LIU JJ, XIAO YZ, FANG ZM. The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 151.
- [19] ZHOU G, PENG C, LIU XS, CHANG F, XIAO YZ, LIU JJ, FANG ZM. Identification and immobilization of an invertase with high specific activity and sucrose tolerance ability of *Gongronella* sp. w5 for high fructose syrup preparation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 633.
- [20] 王先华, 朱雪玲, 林嘉钊, 谷贤富, 彭齐霞, 肖亚中, KÜES U, 方泽民. 灰盖鬼伞中过表达的碱性真菌漆酶在高盐染料废水中的应用潜力[J]. *微生物学报*, 2024, 64(8): 3014-3029.

- WANG XH, ZHU XL, LIN JY, GU XF, PENG QX, XIAO YZ, KÜES U, FANG ZM. An alkaline fungal laccase overexpressed in *Coprinopsis cinerea* shows application potential in treating high-salt dye wastewater[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(8): 3014-3029 (in Chinese).
- [21] 张晶娜, 周刚, 刘娟娟, 方泽民, 肖亚中. 漆酶Lcc9在灰盖鬼伞中的同源过表达[J]. *生物学杂志*, 2022, 39(6): 47-48.
- ZHANG JN, ZHOU G, LIU JJ, FANG ZM, XIAO YZ. Homologous overexpression of laccase Lcc9 in *Coprinopsis cinerea*[J]. *Journal of Biology*, 2022, 39(6): 47-48 (in Chinese).
- [22] RÜHL M, LANGE K, KÜES U. Laccase production and pellet morphology of *Coprinopsis cinerea* transformants in liquid shake flask cultures[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(18): 7849-7863.
- [23] MOORE D. Sources of carbon and energy used by *Coprinus lagopus sensu* Buller[J]. *Journal of General Microbiology*, 1969, 58(1): 49-56.
- [24] MA W, ZHANG ZY, YANG WQ, HUANG PW, GU Y, SUN XM, HUANG H. Enhanced docosaheptaenoic acid production from cane molasses by engineered and adaptively evolved *Schizochytrium* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 376: 128833.
- [25] XU GF, WU YW, ZHANG YL, FANG W, XIAO YZ, FANG ZM. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(5): 518-524.
- [26] BAO SY, TENG Z, DING SJ. Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(2): 1927-1936.
- [27] HU J, ZHANG YL, XU Y, SUN QY, LIU JJ, FANG W, XIAO YZ, KÜES U, FANG ZM. *Gongronella* sp. w5 elevates *Coprinopsis cinerea* laccase production by carbon source syntrophism and secondary metabolite induction[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 411-425.
- [28] FANG JN, ZHOU G, ZHAO HF, XIE DD, ZHANG JN, KÜES U, XIAO YZ, FANG ZM, LIU JJ. An apoptosis-inducing factor controls programmed cell death and laccase expression during fungal interactions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 135.
- [29] HOEGGER PATRIK J, KILARU S, JAMES TIMOTHY Y, THACKER JASONR, KÜES U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences[J]. *The FEBS Journal*, 2006, 273(10): 2308-2326.
- [30] De LOS SANTOS MONDRAGÓN AI, AGUILAR BARRAGAN BA, SÁNCHEZ UR, CALLEJA CAL, MILLÁN-CHIUI BE, LOSKE AM, LIM MAG. Metabolic engineering of *Aspergillus niger* to enhance production of ethanol[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(3): 1176-1188.
- [31] WANG F, HU JH, GUO C, LIU CZ. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 602-605.