

张 力, 韦丽敏, 张君胜, 等. 2 株白腐真菌产漆酶条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 322–324.

2 株白腐真菌产漆酶条件的优化

张 力¹, 韦丽敏², 张君胜¹, 杨晓志¹, 何桂霞²

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:采用液体摇瓶培养方法, 探讨了碳源、氮源、pH 值、培养温度等各种因素对白腐真菌分泌漆酶能力的影响, 采用单因素和正交试验对主要的影响因素进行了优化。研究得出菌株的最佳产漆酶培养基为: 200 g/L 马铃薯 + 20 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 酵母膏 + 1.5 g/L MgSO_4 + 0.1 g/L 维生素 B_1 + 0.05 g/L ZnSO_4 + 0.05 g/L MnSO_4 + 3.0 g/L KH_2PO_4 。优化后的培养基最适发酵条件为: 起始 pH 值 6, 转速 130 r/min, 装液量 70 mL, 在 32 ℃ 条件下摇床培养发酵 10 d 左右时, 粗酶液的酶活力达到 12.7 U/g。

关键词:白腐真菌; 漆酶; 培养条件; 酶活力

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)07–0322–03

木质素生物降解的突破研究始于 20 世纪 80 年代初, Kirk 和 Gold 领导的 2 个小组分别从白腐菌模式菌株——黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 中发现了木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶, 在后期又发现了漆酶, 这 3 种酶共同构成了白腐菌的木质素降解酶系^[1–2]。不同白腐菌木质素降解酶系的组成大不相同, 而且不同比例的降解酶系成分将会直接影响木质素的降解效果, 因此木质素降解酶系的研究与木质素降解的研究密切相关。

漆酶是一类多酚氧化酶, 多数白腐真菌都能分泌漆酶^[3]。很多研究表明, 漆酶产生于白腐菌的次生代谢阶段, 是木质素降解过程中的关键酶^[4], 当营养物条件(如碳、氮源)受到限制时, 漆酶进行合成并分泌到细胞外^[5]。由于白腐菌种类多样、参与降解活动的酶种类不一致、降解底物不同等原因, 使得不同白腐菌种类的降解发生条件表现出一定程度的区别, 因而要根据试验菌株自身的特性来确定具体的工艺参数^[5]。近年来国内外学者对多种真菌漆酶及其产生菌株进行了广泛的研究, 发现采用白腐真菌发酵农作物秸秆, 不仅可以提高秸秆的利用率, 还可以从中提取漆酶用于工农业生产^[6]。本试验分别采用单因素试验和正交试验对产漆酶条件进行优化, 旨在确定最佳的产漆酶培养条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 本研究所选的白腐真菌有 2 种: 灵芝 (*Ganoderma*), 购自武汉食用菌栽培研究所; 黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*), 由中国科学院北京植物研究所提供。

1.1.2 试验培养基 试验用的培养基为: 综合马铃薯固体培养基(配方为: 200 g/L 马铃薯 + 20 g/L 葡萄糖 + 1.5 g/L MgSO_4 + 0.1 g/L 维生素 B_1 + 0.05 g/L ZnSO_4 + 0.05 g/L

MnSO_4 + 3.0 g/L KH_2PO_4 + 20 g/L 琼脂); 液体培养基(综合马铃薯固体培养基中去琼脂)。

1.2 试验方法

1.2.1 扩大培养 在综合马铃薯固体培养基上接种白腐真菌, 28 ℃ 恒温培养。

1.2.2 液体产酶培养 在 250 mL 三角瓶中装入 70 mL 液体培养基, 接入 4 片培养 9 d 的平板菌种(直径 8 mm), 120 r/min, 28 ℃ 条件下摇床培养。

1.2.3 粗酶液的制备 在液体培养至第 9 天时, 用 6 层纱布过滤培养液, 4 000 r/min 条件下离心, 上清即为粗酶液。

1.2.4 酶活测定 将 0.5 mL 3.36 mmol/L 邻联甲苯胺、3.4 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液(pH 值 4.6)、0.1 mL 酶液混合后于 28 ℃ 反应 10 min, 用 TU–1810 型紫外可见分光光度计测定 600 nm 下的吸光度。酶活力用吸光度的增值($\Delta D_{600\text{nm}}$)表示, $\Delta D_{600\text{nm}} = 0.1$ 规定为 1 个相对酶活力单位^[7]。

2 结果与分析

2.1 碳源、氮源对漆酶分泌的影响

2.1.1 碳源对漆酶分泌的影响 在液体培养基中分别以 20 g/L 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、麸皮作为碳源, 其他成分保持不变, 按装液量 70 mL, 真菌接种量 4 片, 于 28 ℃、120 r/min 条件下进行摇床发酵培养。培养第 9 天时测定漆酶的酶活力。由图 1 可以看出: 当以可溶性淀粉、麸皮作为碳源时, 虽然有利于菌丝体的生长, 但不利于漆酶的分泌; 以葡萄糖为碳源时, 2 种真菌产漆酶的酶活力最高。

2.1.2 氮源对漆酶分泌的影响 以 20 g/L 葡萄糖为碳源, 分别加入 5 g/L NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母膏、蛋白胨、尿素, 装液量 70 mL, 真菌接种量 4 片, 于 28 ℃、120 r/min 条件下进行摇床发酵培养, 培养第 9 天时测定酶活。由图 2 可以看出, 以酵母膏作为氮源时最有利于漆酶的分泌, 黄孢原毛平革菌的漆酶活力最高, 硝酸铵作为氮源也较有利于漆酶的分泌。综合以上因素, 确定最佳的产酶培养基配方为: 200 g/L 马铃薯 + 20 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 酵母膏 + 1.5 g/L MgSO_4 + 0.1 g/L 维生素 B_1 + 0.05 g/L ZnSO_4 + 0.05 g/L MnSO_4 + 3.0 g/L KH_2PO_4 。

收稿日期: 2012–12–25

基金项目: 江苏畜牧兽医职业技术学院院级课题(编号: YB1202)。

作者简介: 张 力(1956—), 男, 河北定州人, 研究员, 硕士生导师, 从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: zhangli2118@sohu.com。

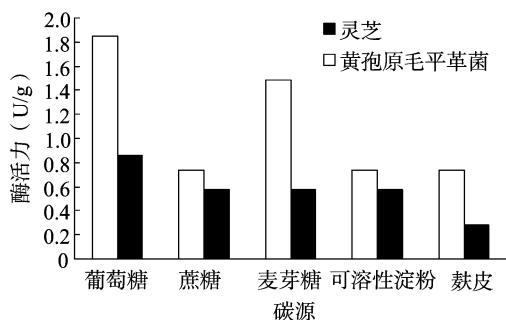


图1 不同碳源对白腐真菌产漆酶活力的影响

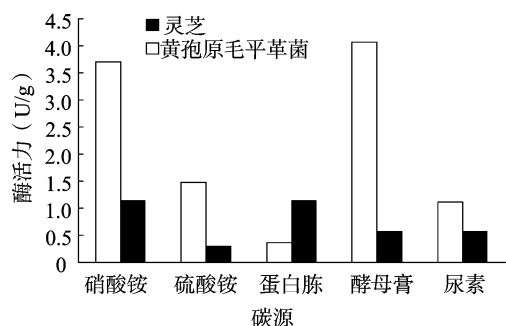


图2 不同氮源对白腐真菌产漆酶活力的影响

2.2 环境条件对漆酶分泌的影响

2.2.1 装液量对漆酶分泌的影响 在 5 个 250 mL 三角瓶中分别加入 50、60、70、80、90 mL 液体培养基,真菌接种量为 3 片,于 28 ℃、120 r/min 条件下摇床发酵培养,培养第 9 天时测定酶活^[8]。由图 3 可以看出,装液量为 70 mL 最有利于漆酶的分泌,此时的酶活力最高;随着装液量的增加,酶活力也迅速降低,因此最佳装液量为 70 mL。

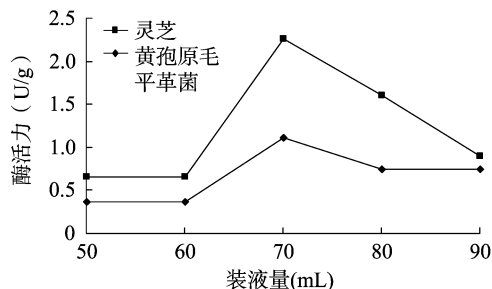


图3 装液量对白腐真菌产漆酶活力的影响

2.2.2 接种量对漆酶分泌的影响 设 250 mL 的三角瓶装液量为 70 mL,分别接入 2、3、4、5、6 片直径 8 mm 的菌片,于 28 ℃、120 r/min 条件下摇床发酵培养,培养第 9 天时测定酶活,结果见图 4。从图 4 可以看出,真菌接种量为 4 片最有利于漆酶分泌;接种量过大反而不利于漆酶分泌。

2.2.3 发酵温度对漆酶分泌的影响 设 250 mL 三角瓶的液体培养基装液量为 70 mL,真菌接种量 4 片,转速 120 r/min,分别在温度 20、25、28、32、37 ℃ 的条件下进行摇床发酵培养,培养第 9 天时测定酶活,结果见图 5。从图 5 可以看出,培养温度在 28~32 ℃ 之间的真菌产酶活力比较高;温度过高或过低均不利于漆酶分泌,所以最适的发酵温度为 28 ℃。

2.2.4 转速对漆酶分泌的影响 设 250 mL 三角瓶的液体培

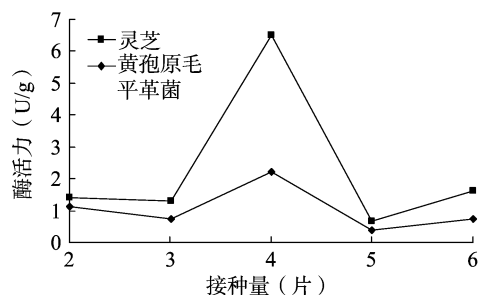


图4 接种量对白腐真菌产漆酶活力的影响

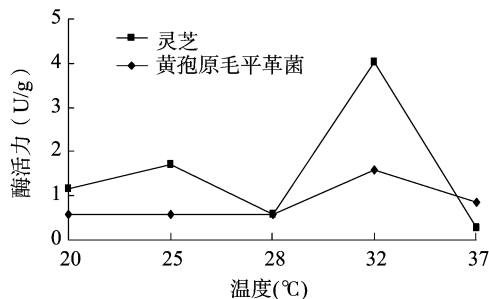


图5 温度对白腐真菌产漆酶活力的影响

培养基装液量为 70 mL,真菌接种量为 4 片,培养温度 28 ℃,分别以 100、110、120、130、140 r/min 的转速进行摇床发酵培养,培养第 9 天时测定酶活,结果见图 6。从图 6 可以看出,当转速为 130 r/min 时真菌的产酶活力最高;当转速过快或者过慢时,均不利于漆酶的产生。

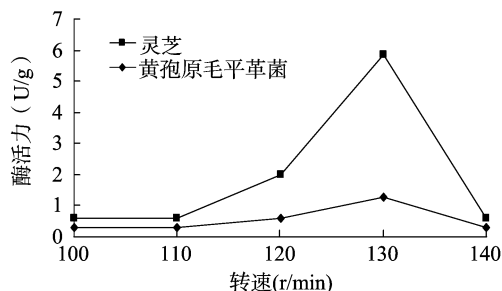


图6 转速对白腐真菌产漆酶活力的影响

2.2.5 培养基初始 pH 值对漆酶分泌的影响 分别设置培养基的初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10,在 250 mL 三角瓶装液量为 70 mL、真菌接种量为 4 片、培养温度 28 ℃、转速 120 r/min 的条件下进行摇床发酵培养,培养第 9 天时测定酶活,结果见图 7。从图 7 可以看出,这 2 种白腐真菌在较广泛的 pH 值条件下均可产漆酶,即便是在碱性条件下仍具有产漆酶的能力;最有利的产酶 pH 值在 6 附近。

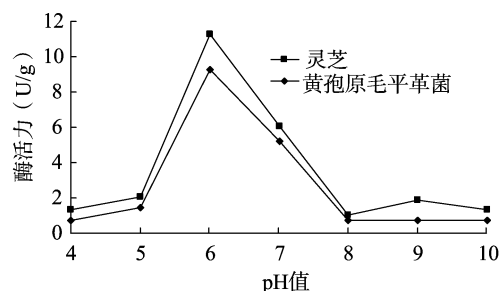


图7 pH值对白腐真菌产漆酶活力的影响

2.3 多因素优化试验

试验选取葡萄糖浓度、酵母膏浓度、pH 值、装液量作为影响白腐真菌产漆酶活力的因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,对不同因素水平组合条件下的酶活力分别进行测定,进行多因素共同作用下的优化组合。因素水平见表 1,试验结果见表 2、表 3。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素			
	A:葡萄糖 浓度(g/L)	B:酵母膏 浓度(g/L)	C:pH 值	D:装液量 (mL)
1	15	3	6	60
2	20	4	8	70
3	25	5	10	80

表 2 培养基碳源、氮源、pH 值和装液量的正交试验结果(灵芝)

水平	因素				酶活力 (U/g)
	A:葡萄糖 浓度	B:酵母膏 浓度	C:pH 值	D:装液量	
1	1	1	1	1	3.70
2	1	2	2	2	0.74
3	1	3	3	3	2.59
4	2	1	2	3	2.22
5	2	2	3	1	2.59
6	2	3	1	2	7.40
7	3	1	3	2	1.48
8	3	2	1	3	3.70
9	3	3	2	1	3.33
k_1	2.34	2.47	4.93	3.21	
k_2	4.07	2.34	2.10	3.21	
k_3	2.84	4.44	2.22	2.84	
R	1.73	2.10	2.83	0.37	

表 3 培养基碳源、氮源、pH 值和装液量的正交试验结果(黄孢原毛平革菌)

水平	因素				酶活力 (U/g)
	A:葡萄糖 浓度	B:酵母膏 浓度	C:pH 值	D:装液量	
1	1	1	1	1	2.59
2	1	2	2	2	1.11
3	1	3	3	3	3.34
4	2	1	2	3	0.93
5	2	2	3	1	1.30
6	2	3	1	2	6.30
7	3	1	3	2	1.48
8	3	2	1	3	4.44
9	3	3	2	1	0.74
k_1	2.35	1.67	4.44	1.54	
k_2	2.84	2.28	0.93	2.96	
k_3	2.22	3.46	2.04	2.90	
R	0.62	1.79	3.51	1.42	

2.4 最佳产酶条件的优化分析

在真菌接种量为 4 片、培养温度 28 ℃、转速 120 r/min 的

条件下,针对碳源、氮源、装液量、初始 pH 值设计 $L_9(3^4)$ 进行正交试验和极差分析。结果表明,pH 值、氮源、碳源对酶活力影响较大,尤其以 pH 值的影响最大,装液量的影响最小。综合 2 种白腐真菌的正交试验结果,优化后的组合为 $A_2B_3C_1D_2$,即 20 g/L 葡萄糖,5 g/L 酵母膏,pH 值 6,装液量 70 mL。此结果与前文的单因素试验结果较为一致。

2.5 最佳产酶条件下的产酶进程曲线

通过单因素试验和正交试验,得到最适培养基为:200 g/L 马铃薯 + 20 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 酵母膏 + 1.5 g/L $MgSO_4$ + 0.1 g/L 维生素 B_1 + 0.05 g/L $ZnSO_4$ + 0.05 g/L $MnSO_4$ + 3.0 g/L KH_2PO_4 。培养条件为:pH 值 6,转速 130 r/min,装液量 70 mL,温度 32 ℃,摇床培养。漆酶产量从培养第 7 天开始迅速上升,培养第 9、第 10 天时达到最高,最高可达 12.7 U/g,随后产酶能力逐渐降低。

3 结论

采用单因素试验结合多因素正交试验研究白腐真菌灵芝和黄孢原毛平革菌的产漆酶条件,得出最适产酶条件为:培养基配方 200 g/L 马铃薯 + 20 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 酵母膏 + 1.5 g/L $MgSO_4$ + 0.1 g/L 维生素 B_1 + 0.05 g/L $ZnSO_4$ + 0.05 g/L $MnSO_4$ + 3.0 g/L KH_2PO_4 ,pH 值 6,转速 130 r/min,装液量 70 mL,培养温度 32 ℃,发酵到第 10 d 左右时的粗酶液酶活力达到 12.7 U/g。

由于本试验所用菌种的来源为从外购买或由他人赠送,其生理生化试验还有待进一步进行。同时由于时间缘故,关于金属离子等其他因素对 2 种白腐真菌菌种产酶影响及所产漆酶酶学性质的研究尚未进行,这些工作有待在今后逐步完成。

参考文献:

[1] 黄丹莲,曾光明,黄国和,等. 白腐菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望[J]. 微生物学通报,2004,31(2):112-116.
[2] 范文霞,刘学铭. 漆酶的生产和应用研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2007(5):15-17,84.
[3] 王祎宁,赵国柱,谢响明,等. 漆酶及其应用的研究进展[J]. 生物技术通报,2009(5):35-38.
[4] 艾良,朱启忠,李文静,等. 白腐真菌 F9 产漆酶发酵条件的优化[J]. 北方园艺,2010(4):144-146.
[5] 张力,韩大勇,邵喜霞. 白腐真菌木素质降解酶系研究进展[J]. 中国牧业通讯,2008(23):6-8,45.
[6] 池玉杰,闫洪波. 红平菇木素质降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木素质过氧化物酶的检测[J]. 林业科学,2009,45(12):154-158.
[7] Kulys J, Vidziunaite R. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination[J]. Biosensors and Bioelectronics,2003,18(2/3):319-325.
[8] 张明珠. 秸秆分解菌的分离和筛选[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008.