

文 婷,管 维,周国英. 复合菌固体发酵降解木质素的条件优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):506-508.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.150

复合菌固体发酵降解木质素的条件优化

文 婷¹,管 维²,周国英¹

(1. 中南林业科技大学,湖南长沙 410004;2. 衡阳市南岳区食品药品监督管理局,湖南衡阳 421900)

摘要:以降解率和选择系数为主要指标,采用单因素优化、均匀设计及正交设计试验,对白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)固体发酵降解竹材木质素条件进行优化。结果表明,复合菌适宜的降解条件为酒石酸铵 0.2 g/L、葡萄糖 14 g/L、Ca²⁺ 0.8 mmol/L、Mn²⁺ 0.6 mmol/L、接种量 6%、含水量 50%、温度 32 ℃、pH 值 5.0,固体发酵时间 25 d 时,竹材木质素降解率为 60.29%,选择系数为 12.79。

关键词:复合菌;固体发发酵;木质素;降解率;选择系数

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0506-03

我国竹质资源丰富,竹纤维具有绿色环保、吸湿透气、天然抗菌和抗紫外线等特性,具有极大的市场潜力和附加值。竹纤维中的木质素严重影响了竹纤维产业化开发进程,而微生物降解木质素是解决这一问题的有效途径之一。因此,本研究以木质素降解率和选择系数为主要指标,采用单因素优化、均匀设计及正交试验,对白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)固体发酵降解木质素条件进行优化,从而提高木质素的降解率和选择专一性,为实现微生物固体发酵降解竹材木质素产业化打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)由中南林业科技大学微生物学实验室分离、筛选并保藏。

1.1.2 试剂与培养基 固体平板培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、pH 值 6、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄·7H₂O 1.5 g、维生素 B₁ 8 mg、蒸馏水 1 L,于 121 ℃、0.1 MPa 湿热灭菌 30 min。

液体发酵培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄·7H₂O 1.5 g、维生素 B₁ 8 mg、蒸馏水 1 L,于 121 ℃、0.1 MPa 湿热灭菌 30 min。

固体发酵培养基:竹粉(40 目)15.0 g、料液比 1 g:3 mL,合成培养液^[1],拌匀,于 121 ℃、0.1 MPa 湿热灭菌 30 min。

1.1.3 仪器 HZQ-C 型恒温振荡器、HPS-280 型生化培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;AR2140 型电子天平,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司;UV-1600 紫外/可见分光光度计、北京瑞利分析仪器公司。

1.2 方 法

收稿日期:2015-10-28

基金项目:湖南省科技重大专项(编号:2011FJ1006)。

作者简介:文 婷(1985—),女,湖南衡阳人,硕士,主要从事微生物选育及发酵工程研究。E-mail:282637170@qq.com。

通信作者:周国英,博士,教授,博士生导师,主要从事林业微生物研究。E-mail:gyzhou2118@163.com。

1.2.1 制备种子液 用打孔器取直径为 8 mm 的白腐菌菌落 1 块于液体发酵培养基中,28 ℃、装液量为 400 mL/L、150 r/min 摇床培养 3 d。

1.2.2 固态发酵培养 将种子液按 10% 接种量(菌悬液浓度 0.1 亿 CFU/mL)接种至已灭菌的固体发酵培养基中,在温度 28 ℃、湿度 80% 的恒温箱中静置培养 30 d。

1.2.3 样品木质素含量的测定 采用 Klason 法^[2-3]测定木质素含量。

1.2.4 样品纤维素含量的测定 参考董荣莹等的方法^[4]测定纤维素含量。

1.2.5 木质素降解选择性系数 木质素降解选择性系数 = 木质素降解率/纤维素降解率。

1.2.6 固体发酵降解木质素培养基组分的确定 保持固体培养基其他组分不变,依次改变培养基的氮源、碳源和金属离子种类,等量接种白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)菌悬液进行固体发酵。

确定最佳氮源、碳源和金属离子后,利用 DPS 9.50 软件进行均匀试验设计^[5]。根据预试验结果及试验可行性确定考察因素范围,对筛选出的培养基组分进行优化,然后通过二次多项式逐步回归分析试验数据,建立回归方程,通过指标最大预测值确定发酵培养基各组分的适合配比,并进行试验验证。

1.2.7 确定固体发酵降解木质素的培养条件 采用优化后的固体培养基,以接种量、含水量、初始 pH 值、培养温度、培养时间等因素为对象,通过正交试验来确定最佳的固体发酵培养条件,如表 1 所示。

表 1 木质素降解条件正交试验的因素水平

水平	A:接种量 (%)	B:含水量 (%)	C:温度 (℃)	D:pH 值	E:时间 (d)
1	4	30	24	3	20
2	6	40	28	4	25
3	8	50	32	5	30
4	10	60	36	6	35

1.2.8 最佳发酵条件的验证 将白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)分别按照优化前后的降解条件进行固体发酵,分别测定

竹材木质素的降解率及选择系数。

2 结果与分析

2.1 固体发酵降解木质素的培养基

2.1.1 碳源 分别在基础培养基中添加浓度为 1.0% 的不同碳源,以葡萄糖为碳源时,白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)的降解能力明显优于蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉,对木质素的降解率达到了 40.21%,选择性系数为 5.26;以竹粉为碳源时,木质素降解率最低,为 20.69%(表 2),这可能是因为木质素本身并不能充当碳源^[6],自身的降解更依赖于培养基中新增加的底物碳源。因葡萄糖易于利用,既能提供菌株生长发育所需的碳源,又能提供促进菌株生长发育和降解竹材木质素所需的能量,因此选择葡萄糖为碳源。

表 2 不同碳源对木质素降解率 and 选择系数的影响

碳源	降解率(%)	选择系数
蔗糖	33.53	3.99
葡萄糖	40.21	5.26
乳糖	24.54	3.13
可溶性淀粉	25.39	3.27
麦芽糖	29.19	3.59
竹粉	20.69	2.21

2.1.2 氮源 分别在基础培养基中添加浓度为 0.5 g/L 的不同氮源。由表 3 可见,以酒石酸铵为氮源时,发酵后木质素降解能力最高,降解率为 41.91%,选择系数为 6.16。这说明添加酒石酸铵时,复合菌(HY-YY-ZYS)的降解能力优于添加其他几种氮源。其中以酵母膏作氮源时,木质素降解率为 38.31%,略低于酒石酸铵,但明显高于其他 3 种氮源,且选择系数为 4.36。由于酒石酸铵是木质素降解菌发酵工业中最常用的无机氮源,价格便宜,而且是合成木质素降解酶系中的重要氮源,能诱导该白腐菌种产木质素降解酶系,综合考虑效果与原料成本,因此选择酒石酸铵为氮源。

表 3 不同氮源对木质素降解率 and 选择系数的影响

氮源	降解率(%)	选择系数
蛋白胨	34.57	4.18
酵母膏	38.31	4.36
酒石酸铵	41.91	6.16
(NH ₄) ₂ SO ₄	22.39	2.12
NH ₄ Cl	25.98	2.96

2.1.3 金属离子 分别在基础培养基中添加浓度为 0.5 mmol/L 的金属离子 Fe³⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺。由表 4 可见,Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 有利于菌种生长,对产酶有一定的促进作用,木质素降解率分别为 43.58%、42.19%,大于其他金属离子,选择系数分别为 7.26、6.78,均高于其他金属离子。可能由于金属离子中 Mn²⁺ 是酶的辅酶或激活剂^[7-8];Ca²⁺ 能影响细胞膜的通透性,既能促进菌体的基础代谢,又能影响许多代谢产物的生物合成,因此选用 Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 作为金属离子组合,添加到培养基中进行下一步优化试验。

2.1.4 均匀设计法优化培养基 培养基中各组分之间有一定的内在联系,在单因素试验基础上,考察培养基中碳源、氮源及金属离子的含量对木质素降解率及选择系数的影响,以寻求培养基中各组分的最佳配比。采用 4 因素 15 水平,对筛选出的碳源、氮源及金属离子组分进行优化(表 5)。

表 4 不同金属离子对降解率 and 选择系数的影响

金属离子	降解率(%)	选择系数
Fe ³⁺	39.68	5.03
Mn ²⁺	43.58	7.26
Ca ²⁺	42.19	6.78
Mg ²⁺	36.99	4.82
Cu ²⁺	29.21	3.32
Zn ²⁺	33.59	4.25

表 5 固体发酵降解木质素培养基的均匀设计试验与结果

水平	x ₁ :酒石酸铵(g/L)	x ₂ :葡萄糖(g/L)	x ₃ :Ca ²⁺ (mmol/L)	x ₄ :Mn ²⁺ (mmol/L)	降解率(%)	选择系数
1	0.1	7	0.40	1.80	35.58	4.96
2	0.4	15	1.00	1.00	42.89	6.36
3	0.6	9	2.80	2.00	39.14	5.48
4	0.9	2	2.60	0.60	30.96	3.57
5	1.3	10	0.60	0.20	24.68	3.20
6	0.7	6	1.60	0	26.16	2.91
7	0.2	12	0.80	0.40	44.58	8.96
8	1.5	8	2.00	1.20	32.87	4.19
9	1.4	3	1.20	2.20	22.16	2.51
10	1.2	14	2.40	1.60	37.58	5.13
11	0.8	13	0.20	2.40	26.56	3.21
12	1.0	11	1.40	2.80	34.12	4.56
13	1.1	5	0	0.80	25.59	3.01
14	0.5	1	1.80	1.40	20.14	2.62
15	0.3	4	2.20	2.60	28.68	3.27

采用 DPS 9.50 软件,对各因素水平对木质素降解率的影响结果,进行二次多项式逐步回归分析,得到方程: $y = 15.08 - 2.68x_1 + 3.85x_2 + 25.01x_3 + 21.92x_4 + 0.40x_1^2 - 0.11x_2^2 - 4.59x_3^2 - 85.96x_4^2$ 。

相关系数 $r = 0.928\ 9$, $F = 4.861\ 3$, $P = 0.035\ 1$, 剩余标准差 $s = 2.096\ 2$, 调整后的相关系数为 0.876 4, 查表 $F_{0.05}(4, 10) = 3.24$, $F > F_{0.05}(4, 10)$, 回归方程显著。

根据回归方程求 y_{\max} , 当 $x_1 = 0.2\ \text{g/L}$ 、 $x_2 = 14\ \text{g/L}$ 、 $x_3 = 0.8\ \text{mmol/L}$ 、 $x_4 = 0.6\ \text{mmol/L}$ 时, $y_{\max} = 46.18$, 预测区间为 [43.50, 51.68]。根据优化条件,进行 3 次固体发酵降解竹材木质素试验验证,最终平均结果为 46.29,选择系数为 10.72,试验结果均在预测范围内,且有明显提高。

2.2 固体发酵降解木质素的培养条件

根据表 1 设计正交表,考察 5 个因素 4 个水平,找出木质素最佳降解条件(表 6)。按照优化后的培养条件,将白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)按正交表所列的试验需要接种到竹材固体培养基上,然后测定木质素降解率(表 7)。

由表 7 可见,因素 C(温度)有显著性差异,5 个因素对降解率的影响由大到小依次为 C > D > B > E > A;由表 6 可见,因素 C 的关系为 C3 > C2 > C1 > C4,因此当温度为 32 ℃ 时,复合菌可以达到降解木质素的最适合状态;因素 D(pH 值)的关系为 D3 > D2 > D4 > D1,当固体发酵初始 pH 值为 5 时,木质素降解的效果最适合;因素 B(含水量)的关系为 B3 > B2 > B4 > B1,当含水量为 50% 时,复合菌可以达到降解木质素的最适合状态;因素 E(时间)的关系为 E4 > E3 > E2 > E1,当固体发酵时间在 35 d 时,木质素降解率最大,由于在固体发酵 30 d 之后木质素降解率变化不明显,因此为了节约时间,选择了 E2,即当发酵 25 d 时,木质素降解率为最适固

表 6 复合菌固体发酵降解木质素优化条件的 L₁₆(5⁴) 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	E	降解率 (%)
1	1	1	1	1	1	18.65
2	1	2	2	2	2	37.46
3	1	3	3	3	3	49.11
4	1	4	4	4	4	16.69
5	2	1	2	3	4	42.59
6	2	2	1	4	3	35.86
7	2	3	4	1	2	18.95
8	2	4	3	2	1	39.67
9	3	1	3	4	2	32.96
10	3	2	4	3	1	25.69
11	3	3	1	2	4	43.42
12	3	4	2	1	3	32.48
13	4	1	4	2	3	18.67
14	4	2	3	1	4	33.59
15	4	3	2	4	1	29.27
16	4	4	1	3	2	41.97
k ₁	30.477	28.218	34.975	25.917	28.320	
k ₂	34.267	33.150	35.450	34.805	32.835	
k ₃	33.638	35.188	38.833	39.840	34.030	
k ₄	30.875	32.703	20.000	28.695	34.073	
R	3.790	6.970	18.833	13.923	5.753	

表 7 复合菌固体发酵降解木质素优化条件的正交试验方差分析				
变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	F _{0.05}
A	44.045	3	0.142	2.490
B	103.553	3	0.334	2.490
C	844.163	3	2.726 *	2.490
D	467.433	3	1.510	2.490
E	89.042	3	0.288	2.490
误差	1 548.240			

注：* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

体发酵时间;而因素 A(接种量)的关系为 A₂ > A₃ > A₄ > A₁, 即当接种量为 6% 时,木质素降解率最适合。

综合分析,选择的最优组合为 A₂B₃C₃D₃E₂,即当复合菌(HY-YY-ZYS)在固体发酵条件为接种量 6%、含水量 50%、温度 32℃、pH 值 5、固体发酵时间 25 d 时,木质素降解效率最好。

2.3 最佳降解条件的验证

将复合菌(HY-YY-ZYS)按照优化前后的降解条件固体发酵,分别测定竹材木质素降解率及选择系数。结果表明,在原始条件下,白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)竹材木质素降解率为 38.54%,选择系数为 3.64;经过降解条件优化后,白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)竹材木质素降解率为 60.29%,选择系数为 12.79,降解率增加了 21.75 百分点,选择系数增加了 9.15,降解时间缩短 5 d,竹材木质素降解率、选择系数,生产效率明显提高,且降低了生产成本。

3 结论与讨论

白腐菌降解木质素主要是在次生代谢期间产木质素降解酶,从而达到降解木质素的作用。影响木质素降解酶生物合成的培养基成分主要因素有碳源、氮源、金属离子、初始 pH

值、诱导剂和表面活性剂等,为菌株营造一个有利于木质素降解酶系形成和运行的发酵环境,是生物降解木质素研究的重要内容^[9-12]。本研究以降解率和选择系数为主要指标,采用单因素优化方法结合均匀设计试验,对白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)固体发酵降解竹材木质素培养基条件进行了优化:酒石酸铵 0.2 g/L、葡萄糖 14 g/L、Ca²⁺ 0.8 mmol/L、Mn²⁺ 0.6 mmol/L 时,降解率为 46.29%,选择系数为 10.72。

白腐菌固体发酵降解木质素培养条件主要因素有接种量、氧气浓度、温度、含水量等^[13]。本研究以降解率和选择系数为主要指标,采用正交设计试验,对白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)固体发酵降解竹材木质素培养条件进行优化,得到最优组合为 A₂B₃C₃D₃E₂,即当复合菌(HY-YY-ZYS)的固体发酵条件为接种量 6%、含水量 50%、温度 32℃、pH 值 =5,固体发酵时间 25 d 时,木质素降解率最高。将复合菌(HY-YY-ZYS)分别按照优化前后的降解条件固体发酵,分别测定竹材木质素降解率及选择系数,进行最佳降解条件的验证。结果表明,在原始条件下,白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)竹材木质素降解率为 38.54%,选择系数为 3.64;经过降解条件优化后,白腐真菌组合(HY-YY-ZYS)竹材木质素降解率为 60.29%,选择系数为 12.79,降解率增加了 21.75 百分点,选择系数增加了 9.15,降解时间缩短 5 d,竹材木质素降解率、选择系数、生产效率均得到了明显提高,且降低了生产成本。

参考文献:

[1]王宏勋,杜甫佑,张晓昱. 白腐菌选择性降解秸秆木质纤维素研究[J]. 华中科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):97-100.

[2]陈为健,程贤甦,陈跃先,等. 硫酸法测定花生壳中木质素的含量[J]. 闽江学院学报,2002,23(2):72-74.

[3]苏同福,高玉珍,刘霞,等. 木质素的测定方法研究进展[J]. 河南农业大学学报,2007,41(3):356-362.

[4]董荣莹,王志坤,周昌平,等. 紫竹不同变异类型的竹材化学成分分析[J]. 竹子研究汇刊,2009,28(4):45-49.

[5]郑晓婷,赵新淮. 毛霉的产蛋白酶发酵条件优化[J]. 微生物学通报,2009,36(2):193-197.

[6]徐勇,朱均均,叶汉玲,等. 白腐菌液体发酵合成漆酶的培养条件研究[J]. 林产化工通讯,2004,38(3):1-5.

[7]李华钟,章燕芳,华兆哲,等. 黄孢原毛平革菌选择性合成木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶[J]. 过程工程学报,2002,2(2):137-141.

[8]李华钟,章燕芳,华兆哲,等. 黄孢原毛平革菌合成锰过氧化物酶的工艺[J]. 食品与生物技术,2002,21(1):48-52.

[9]张洪生,梁军锋,张克强,等. 两株侧耳属真菌对小麦秸秆化学组分及瘤胃消化率的影响[J]. 农业环境科学学报,2009,28(10):2185-2188.

[10]段传人,朱丽平,姚月良. 三种白腐菌及其组合菌种木质素降解酶比较研究[J]. 菌物学报,2009,28(4):577-583.

[11]陈耀宁,曾光明,喻曼,等. 与黄孢原毛平革菌协同降解稻草的混合菌筛选[J]. 中国环境科学,2007,27(2):189-193.

[12]蒋荣清,袁兴中,曾光明,等. 一组高效木质素降解复合菌的筛选[J]. 应用与环境生物学报,2010,16(2):247-251.

[13]黄茜,黄凤洪,江木兰,等. 木质素降解菌的筛选及混合菌发酵降解秸秆的研究[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(2):66-70.