

刘海霞,张 力,乔 梁.白腐真菌发酵罐产漆酶条件的优化[J].江苏农业科学,2017,45(21):305-307.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.085

白腐真菌发酵罐产漆酶条件的优化

刘海霞,张 力,乔 梁

(江苏农牧科技职业学院动物科技学院,江苏泰州 225300)

摘要:选取黄孢原毛平革菌作为漆酶的生产菌株,分别研究搅拌转速、通气量、培养温度、接种量和培养基初始 pH 值对发酵罐发酵产漆酶的影响;并在单因素试验的基础上,采用正交试验研究黄孢原毛平革菌发酵产漆酶的最佳条件。结果表明,发酵罐搅拌转速对漆酶产量影响最大,产漆酶的最优条件如下:温度 28 ℃、转速 300 r/min、通气量 5 L/min(通气比 1.0 vvm)、培养基初始 pH 值 5、接种量 15%,得到最高产漆酶水平 14.86 U/mL。

关键词:白腐真菌;黄孢原毛平革菌;发酵罐;漆酶;工业化生产;优化条件

中图分类号: S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0305-03

农作物秸秆是一种来源广泛、成本低廉的饲料原料,但其中难以降解的木质素降低了其作为饲料的饲喂价值。因此在处理秸秆使其饲料化过程中,降解木质素成为了极为关键的一点。白腐真菌是一种能够释放木质素和其他木质组分的降解酶^[1]。目前,关于白腐真菌所产生的木质素降解酶研究最多的主要有锰过氧化物酶(mangane de peroxidase, MnP)、木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)和漆酶(laccase)^[2-3] 3 种。漆酶是一类多酚氧化酶,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,难以获得较高的产量,这也是限制漆酶广泛应用的主要原因。本研究选取对秸秆降解效果较好的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*),在 5 L 的机械搅拌式发酵罐中进行白腐真菌产漆酶试验,探究搅拌转速、通气量、温度、pH 值等主要因素对 2 种黄孢原毛平革菌的产漆酶影响,为工业化生产以及农作物秸秆的有效利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 黄孢原毛平革菌株由江苏农牧科技职业学院微生物实验室保存。

1.1.2 试验培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L,自然 pH 值。液体发酵培养基(1 L):去皮马铃薯 200 g,煮沸 30 min,纱布过滤,加入 20 g 蔗糖,融化后补水至 1 000 mL,自然 pH 值,加入 10 g 葡萄糖,100 mL 分装 250 mL 三角瓶,121 ℃间歇灭菌。

1.1.3 试验主要仪器和设备 高压灭菌器(上海博迅实业有限公司, YXQ-LS-50S II);生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司, SHP-160);数显恒温振荡器(上海梅香仪器有限公司, THZ-82A);发酵罐(江苏省镇江东方生物工程设备技术有限责任公司, GBJT-7C);无油空气压缩机(ZW-

0.05/7-X);储气罐(浙江省台州市富芳压缩机有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 取 4 株斜面种子管分别接种于 PDA 培养基上,28 ℃倒置培养 5 d。

1.2.2 种子液制备 选取菌丝长势旺盛的平板,取菌苔前端接种于液体种子培养基上,28 ℃恒温摇床(160 r/min)培养 3~5 d,至长出可见的白色菌丝球,即可作为种子液使用。

1.2.3 接种及发酵罐产酶培养 待液体培养基冷却后,在火焰保护下打开接种口,将培养好的种子液按比例投放入发酵罐内。按照试验设计条件,在发酵罐控制器触控板上设定搅拌转速、通气量、温度、pH 值等参数进行发酵培养。

1.2.4 漆酶活性的测定 每隔 24 h 取培养液,纱布过滤,4 000 r/min 条件下离心得粗酶液^[4],用紫外可见分光光度计测定酶活性^[5],观察各因素对漆酶分泌的影响。

1.2.5 多因素正交试验设计 在单因素试验的基础上,选取其中对黄孢原毛平革菌发酵罐中产漆酶活性影响较大的因素进行正交试验,分别测定不同因素水平组合条件下的酶活性,进行多因素共同作用下的优化组合。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵罐转速对漆酶分泌的影响结果 其他条件不变,测定发酵罐转速分别为 200、250、300、350、400 r/min 条件下的漆酶活性,结果见表 1。由表 1 可知,发酵罐中液体发酵过程中,搅拌速度以 300 r/min 较适合黄孢原毛平革菌进行漆酶的分泌,从发酵第 1 天起各因素间逐渐出现差异,第 4 天起其产酶活性相对其他水平有显著升高,最高在发酵的第 7 天出现,平均为 9.783 U/mL,并且较其他转速酶活性水平差异显著。试验分析发现,发酵罐在转速过低时,发酵过程中搅拌的剪切力较弱,导致菌丝体生长过度,菌液黏稠,影响发酵液内小环境,氧分和营养物质分布不均,从而影响菌体细胞正常的代谢分泌产酶;发酵罐转速过高时,发酵过程中产生的剪切力过强,会影响菌丝体的生长,甚至导致菌丝体细胞的破裂,不能正常进行酶的分泌,产酶水平下降,同时过高的搅拌转速,对于设备的要求高,且对于能源有过多的消耗,生产过程

收稿日期:2017-04-03

基金项目:江苏农牧科技职业学院项目(编号: NSFPT201601)。

作者简介:刘海霞(1974—),女,山东泰安人,博士,副教授,主要从事草食动物生产研究。E-mail:153558193@qq.com。

表 1 不同转速下漆酶分泌的变化

发酵罐转速 (r/min)	不同发酵时间下的漆酶活性(U/mL)							
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
200	1.230 ± 0.047bc	2.280 ± 0.656ab	3.560 ± 0.625a	4.930 ± 0.050a	5.813 ± 0.105a	6.350 ± 0.755a	7.130 ± 0.056a	5.953 ± 0.106a
250	1.253 ± 0.060bc	2.360 ± 0.095bc	3.733 ± 0.080b	5.523 ± 0.101c	6.223 ± 0.096b	7.163 ± 0.075c	8.067 ± 0.074d	7.540 ± 0.085d
300	1.317 ± 0.451c	2.863 ± 0.751d	4.257 ± 0.108d	6.177 ± 0.081d	8.343 ± 0.751d	9.613 ± 0.038d	9.783 ± 0.070e	8.667 ± 0.075e
350	1.133 ± 0.091b	2.150 ± 0.080a	3.680 ± 0.095ab	5.047 ± 0.067a	6.120 ± 0.105b	6.543 ± 0.117b	7.840 ± 0.080c	7.013 ± 0.065c
400	0.937 ± 0.751a	2.450 ± 0.070c	4.030 ± 0.050c	5.340 ± 0.889b	6.840 ± 0.090c	7.263 ± 0.080c	7.440 ± 0.076b	6.500 ± 0.139b

注:同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$),相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。

中成本过高,不利于规模化发酵工业生产。

2.1.2 通气量对发酵罐中漆酶分泌的影响结果 其他条件不变,分别在通气量为 3、4、5、6、7 L/min 条件下进行发酵试验,观察通气量对漆酶分泌的影响,结果见表 2。从表 2 可以看出,通气量相对转速对于产酶水平的影响略低,在发酵后第 4 天开始不同通气量间大部分表现出显著差异,其中发酵后第 5、第 6 天在通气量为 6、7 L/min 时产酶水平差异不显著。在通气量为 5 L/min 时,漆酶活性最高,第 7 天出现最高活性 9.180 U/mL,远高于在其他条件下的漆酶活性。不同通气量

的产酶水平在前 4 d 差异均不明显,证明通气量对产酶水平的影响小于转速对产酶水平的影响,其产酶的前低后高的特点也符合白腐真菌生产漆酶的时间顺序。黄孢原毛平革菌发酵过程是一个好氧发酵过程,因此当通气量过低时,会影响菌丝体在前期的生长,从而影响后期的产酶水平;当通气量过高时,会有大量泡沫产生,影响菌丝体后期安静产酶,同时通气装置的连续高强度运转,增加了整个发酵过程的能耗,对设备也提出了更高的要求,因此最适通气量为 5 L/min,转换为通气比为 1.0 vvm。

表 2 不同通气量漆酶分泌的变化

通气量 (L/min)	不同发酵时间下的漆酶活性(U/mL)							
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
3	1.043 ± 0.078a	2.553 ± 0.093a	4.187 ± 0.067a	5.670 ± 0.076a	6.823 ± 0.061a	7.193 ± 0.061a	7.533 ± 0.060a	6.963 ± 0.116a
4	1.133 ± 0.075a	2.673 ± 0.085ab	4.230 ± 0.080a	5.757 ± 0.065ab	7.087 ± 0.086b	7.917 ± 0.075c	8.637 ± 0.067c	8.027 ± 0.085c
5	1.437 ± 0.071b	2.910 ± 0.061d	4.550 ± 0.080c	6.047 ± 0.070c	7.650 ± 0.098d	8.370 ± 0.072e	9.180 ± 0.076e	8.667 ± 0.105d
6	1.357 ± 0.065b	2.743 ± 0.070bc	4.500 ± 0.080ab	5.857 ± 0.065b	7.353 ± 0.080c	8.087 ± 0.075d	8.850 ± 0.095d	7.630 ± 0.095b
7	1.337 ± 0.112b	2.847 ± 0.090cd	4.403 ± 0.101bc	5.843 ± 0.085b	7.363 ± 0.117c	7.543 ± 0.075b	8.017 ± 0.095b	6.906 ± 0.751a

2.1.3 温度对发酵罐中漆酶分泌的影响结果 其他条件不变,分别在温度为 26、28、30、32、34 ℃ 条件下进行发酵试验,观察温度对漆酶分泌的影响,结果见表 3。从表 3 可以看出,与转速和通气量相比,温度对于产酶的影响相对较小,不同温度下的产酶水平始终有不显著差异存在。当温度为 28 ℃ 时,发酵的第 7 天漆酶活性达到最高,为 8.880 U/mL;其次为 30 ℃,达到 8.770 U/mL;34 ℃ 条件下产酶水平最低,为

7.640 U/mL,说明 28 ℃ 为黄孢原毛平革菌的最适发酵温度。但有研究报道,在南方地区夏季比较炎热,当设定发酵温度为 28 ℃ 时,发酵设备须要供应冷水进行发酵液的降温处理,增加生产成本,同时对设备也提出了更高的要求,因此在实际生产过程中应从适合于大规模工业化生产水平的效率上综合考虑。

表 3 不同温度下漆酶分泌的变化

发酵温度 (℃)	不同发酵时间下的漆酶活性(U/mL)							
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
26	1.030 ± 0.076a	2.653 ± 0.100c	4.047 ± 0.075b	5.717 ± 0.080c	6.470 ± 0.076b	7.640 ± 0.066b	8.517 ± 0.070c	7.337 ± 0.106b
28	1.237 ± 0.049bc	2.867 ± 0.093d	4.253 ± 0.067e	5.930 ± 0.085d	6.730 ± 0.095c	7.853 ± 0.101c	8.880 ± 0.046d	8.037 ± 0.083d
30	1.313 ± 0.076c	2.863 ± 0.070d	4.187 ± 0.067de	5.887 ± 0.086d	6.553 ± 0.116b	7.917 ± 0.081c	8.770 ± 0.053c	7.983 ± 0.075d
32	1.150 ± 0.105ab	2.353 ± 0.083b	4.070 ± 0.085bc	5.390 ± 0.062ab	6.433 ± 0.097b	7.680 ± 0.115b	8.040 ± 0.105b	7.363 ± 0.087b
34	1.110 ± 0.090ab	2.140 ± 0.095a	3.843 ± 0.065a	5.060 ± 0.070a	6.163 ± 0.070a	7.187 ± 0.065a	7.640 ± 0.066a	6.913 ± 0.075a

2.1.4 pH 值对发酵罐中漆酶分泌的影响结果 其他条件不变,分别在培养基初始 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 条件下进行发酵试验,观察培养基 pH 值对漆酶分泌的影响,结果见表 4。表 4 表明,培养基的初始 pH 值对于漆酶的分泌影响并不大,不同水平间产生的差距不明显。当培养基初始 pH 值为 5.0 时,黄孢原毛平革菌活性在发酵后第 7 天达到最高水平,为 9.253 U/mL,较其他产酶水平差异显著,pH 值过高或过低均会使产酶水平降低。培养基 pH 值过小时,酸度过大,菌体生长困难,影响产酶水平;当培养基的初始 pH 值为弱酸

性时,菌体生长不受影响。

2.1.5 接种量对发酵罐中漆酶分泌的影响 其他条件不变,分别在接种量为 5%、10%、15%、20%、25% 条件下进行发酵试验,观察黄孢原毛平革菌接种量对漆酶分泌的影响,结果见表 5。由表 5 得知,当接种量为 15% 时,发酵后第 7 天产酶水平达到了最高,为 9.657 U/mL,较其他产酶水平差异显著。在发酵的第 5 天,各水平间开始出现相互的显著性差异。试验分析发现,菌种接种量过低,不能充分利用培养基中的养分,无法达到最高产酶水平;接种量过高,空间和营养的匮乏

表 4 不同 pH 值下漆酶分泌的变化

pH 值	不同发酵时间下的漆酶活性 (U/mL)							
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
4.0	0.807 ± 0.075a	2.127 ± 0.085b	3.457 ± 0.065a	5.133 ± 0.071a	6.013 ± 0.075a	6.943 ± 0.070a	8.130 ± 0.080a	7.280 ± 0.066a
4.5	1.067 ± 0.060b	2.530 ± 0.082c	4.017 ± 0.070c	5.640 ± 0.066b	6.417 ± 0.075c	7.517 ± 0.070c	8.343 ± 0.096b	8.030 ± 0.072b
5.0	1.347 ± 0.075c	2.750 ± 0.066d	4.277 ± 0.065d	5.957 ± 0.080c	6.683 ± 0.070d	8.090 ± 0.080e	9.253 ± 0.091d	8.460 ± 0.080c
5.5	1.237 ± 0.070c	2.650 ± 0.072cd	4.120 ± 0.076c	5.753 ± 0.071b	6.517 ± 0.080c	7.673 ± 0.080d	8.813 ± 0.075c	8.037 ± 0.070b
6.0	0.953 ± 0.080b	1.987 ± 0.065a	3.843 ± 0.065b	5.237 ± 0.087a	6.240 ± 0.105b	7.307 ± 0.035b	8.027 ± 0.076a	7.357 ± 0.070a

表 5 不同接种量漆酶分泌的变化

接种量 (%)	不同发酵时间下的漆酶活性 (U/mL)							
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
5	1.040 ± 0.076a	2.130 ± 0.085a	3.670 ± 0.076a	5.073 ± 0.093a	6.267 ± 0.071a	6.887 ± 0.075a	8.827 ± 0.067b	7.980 ± 0.056b
10	1.360 ± 0.070c	2.640 ± 0.070b	4.150 ± 0.072b	5.553 ± 0.071b	6.660 ± 0.082b	7.827 ± 0.080b	9.130 ± 0.057c	8.340 ± 0.070c
15	1.533 ± 0.071d	2.957 ± 0.075c	4.533 ± 0.071c	6.030 ± 0.090c	7.157 ± 0.070d	8.843 ± 0.065e	9.657 ± 0.083e	8.970 ± 0.066e
20	1.237 ± 0.070bc	2.583 ± 0.232b	4.263 ± 0.061b	5.667 ± 0.071b	6.890 ± 0.076c	8.227 ± 0.067d	9.327 ± 0.067d	8.530 ± 0.062d
25	1.173 ± 0.055b	2.537 ± 0.083b	4.227 ± 0.067b	5.520 ± 0.066b	6.740 ± 0.070b	8.037 ± 0.070c	8.643 ± 0.061a	7.550 ± 0.076a

反而影响了菌丝体的生长,从而使产酶水平降低。

2.2 多因素正交试验结果

结合单因素影响的试验结果,选取搅拌转速、通气量、pH 值、接种量作为影响白腐真菌发酵罐中产漆酶活性的主要因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,因素水平见表 6,试验结果见表 7。

表 6 发酵罐中产漆酶活性优化条件 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

水平	因素			
	A: 转速 (r/min)	B: 通气量 (L/min)	C: pH 值	D: 接种量 (%)
1	250	4	4	10
2	300	5	5	15
3	350	6	6	20

表 7 发酵罐中产漆酶活性优化条件 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

水平	因素				漆酶活性 (U/mL)
	A: 转速	B: 通气量	C: pH 值	D: 接种量	
1	1	1	1	1	10.36
2	1	2	2	2	12.57
3	1	3	3	3	11.69
4	2	1	2	3	12.69
5	2	2	3	1	12.89
6	2	3	1	2	13.64
7	3	1	3	2	10.67
8	3	2	1	3	11.24
9	3	3	2	1	10.81
k_1	11.54	11.24	11.75	11.35	
k_2	13.07	12.23	12.02	12.29	
k_3	10.91	12.05	11.75	11.87	
R	2.16	0.99	0.27	0.94	

从表 7 可以看出,多因素正交优化试验最优组合为 $A_2B_2C_2D_2$,即转速为 300 r/min、通气量为 5 L/min (通气比 1.0 vvm)、pH 值为 5、接种量为 15%,此结果与单因素结果相符合。从极差分析来看,影响最大的因素为转速,其次为通气量,pH 值对产酶水平的影响相对最小,该结果符合单因素试验结果。

3 讨论与结论

本研究通过单因素和多因素正交试验对黄孢原毛平革菌在发酵罐中液体发酵生产漆酶的条件进行优化,综合考虑产酶水平与大规模生产的实际条件和成本,得出黄孢原毛平革菌最佳发酵生产漆酶条件:温度 30 ℃、转速 320 r/min、通气量 5 L/min (通气比 1.0 vvm)、pH 值 5、接种量 15%。由试验结果分析发现,发酵罐的旋转搅拌和通气改善了摇瓶发酵氧气量少和菌液不均匀的缺点,使培养基得到充分的养分,白腐真菌液体发酵前期主要是菌丝体生长,产酶水平较低,后期为产酶时期,产酶水平上升且不同条件下差异显著。这与近年来研究报道相符合,通过最优条件进行发酵罐发酵培养,最终得到黄孢原毛平革菌最高产漆酶水平,为 14.86 U/mL,与前期韦丽敏等摇瓶优化试验结果^[6]相比提高 32.0%。

目前漆酶的产量及生产成本在实际生产中还不乐观,绝大多数都是在摇瓶中或规模很小的反应器中利用微生物生产漆酶,难以大规模地生产,因此发酵罐试验条件的好坏决定了规模生产的成败。

参考文献:

- [1] Zadrzil F, Grinsberg J, Gonzales A. “Palo – podrido” – decomposed wood, which was used as feed [J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1982, 15 (3): 167 – 171.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 傅 恺, 付时雨, 李雪云, 等. 产漆酶白腐菌的诱变选育及其液体发酵的研究 [J]. 造纸科学与技术, 2009, 28 (5): 21 – 24, 71.
- [5] 唐 媛, 谢 冰, 吕宝一, 等. 白腐真菌处理难降解有机物的培养条件及应用研究 [J]. 世界科技研究与发展, 2008, 30 (1): 60 – 65.
- [6] 韦丽敏, 乔 梁, 张 力, 等. 利用白腐真菌处理稻草秸秆的研究进展 [J]. 中国饲料, 2013 (1): 43 – 45.