

## 阿魏蘑液体发酵过程菌体形态变化对产漆酶的影响

陈友枝<sup>1,2</sup>, 王璐<sup>3</sup>, 彭林<sup>1,2</sup>, 丁重阳<sup>1,2</sup>, 张梁<sup>1,2</sup>, 顾正华<sup>1,2</sup>, 石贵阳<sup>1,2</sup>, 章克昌<sup>1</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

3 无锡中粮工程科技有限公司, 江苏 无锡 214035

陈友枝, 王璐, 彭林, 等. 阿魏蘑液体发酵过程菌体形态变化对产漆酶的影响. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1701-1705.

Chen YZ, Wang L, Peng L, et al. Relationship between mycelium morphology and laccase production of *Pleurotus ferulae* in submerged cultivation. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1701-1705.

**摘要:** 本文旨在研究阿魏蘑菌体形态与漆酶产量之间的关系。结果显示, 玻璃珠的添加可改变发酵过程中菌体形态, 漆酶产量在球状菌体条件下高于丝状、絮状菌丝: 直径分布在 0.2~0.4 mm 范围的菌球对漆酶的合成具有明显的促进作用; 适合的葡萄糖、玉米粉和麸皮添加量, 对直径在 0.2~0.4 mm 范围的菌球形成具有重要影响。此外, 添加惰性载体同样可以控制菌球的直径分布, 但对漆酶的合成无促进作用。

**关键词:** 阿魏蘑, 形态, 漆酶, 液体发酵

## Relationship between mycelium morphology and laccase production of *Pleurotus ferulae* in submerged cultivation

Youzhi Chen<sup>1,2</sup>, Lu Wang<sup>3</sup>, Lin Peng<sup>1,2</sup>, Zhongyang Ding<sup>1,2</sup>, Liang Zhang<sup>1,2</sup>, Zhenghua Gu<sup>1,2</sup>, Guiyang Shi<sup>1,2</sup>, and Kechang Zhang<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Wuxi COFCO Engineering Science and Technology Co. Ltd., Wuxi 214035, Jiangsu, China

**Abstract:** In this study, the relationship between mycelium morphology and laccase production was studied. The results indicated that the morphology of *P. ferulae* pellets was changed when glass beads were added. Laccase production showed higher with spherical mycelium than with filamentous or flocculent mycelium. In addition, the spherical mycelium with a diameter of

**Received:** January 29, 2013; **Accepted:** March 25, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905), A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

**Corresponding author:** Zhongyang Ding. Tel/fax: +86-510-85918221; E-mail: biding\_jnu@yahoo.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100905), 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD) 资助。

网络出版时间: 2013-06-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130609.0857.002.html>

0.2-0.4 mm highly affected laccase production. Effect of the composition of culture medium on pellets was investigated and results indicated that various concentrations of glucose, corn meal and wheat bran were important to the formation of pellets in diameter of 0.2-0.4 mm. Besides nutrients, the addition of non-nutritional substrates influenced the distribution of *P. ferulae* pellets. However, the production of laccase was not promoted by non-nutritional substrates.

**Keywords:** *Pleurotus ferulae*, morphology, laccase, liquid fermentation

漆酶 (Laccase, EC 1.10.3.2) 又名对联苯酚氧化酶, 是一种含铜的多酚氧化酶。漆酶具有能够催化木质素的降解、去除芳胺类有毒化合物的毒性、促进真菌色素的合成等作用, 在食品工业、生物检测、环境保护、造纸等领域有广泛的应用潜力<sup>[1]</sup>。诸多微生物可合成漆酶, 最常见的是真菌漆酶, 尤其是白腐真菌中侧耳属漆酶的研究较为广泛。例如平菇、凤尾菇、佛罗里达侧耳、杏鲍菇和秀珍菇等<sup>[2-3]</sup>。阿魏蘑又名阿魏侧耳、阿魏菇, 属担子菌亚门层菌纲伞菌目侧耳科侧耳属, 主要分布于中国新疆的准格尔盆地。目前, 对于阿魏蘑的研究极少, 且主要集中于多糖的研究<sup>[4]</sup>, 利用阿魏蘑产漆酶的研究还未见报道。在之前的研究中, 作者已对阿魏蘑漆酶的发酵条件和酶学性质进行了初步探讨, 本文主要研究阿魏蘑在发酵过程中, 菌体形态与漆酶合成之间的关系, 以期通过控制菌体形态进一步提高漆酶产量, 加深对丝状真菌发酵的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

菌种阿魏蘑 *Pleurotus ferulae* JM30X 来自于新疆准格尔盆地, 保存于实验室。

斜面培养基: PDA 斜面培养基, 4 °C 保存。种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 玉米粉 10 g/L, 麸皮粉 10 g/L, pH 自然。基本培养基: 麸皮浸出汁代替麸皮粉, 其他成分同种子培养基。其中麸皮浸出汁是将麸皮粉加入 1 L 水中, 加热沸水 3 h 过滤后获得。121 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 分析方法

漆酶酶活测定: 参考文献[5]中的方法。

形态分析: 按照文献[6]中的方法。将菌球面积换算成当量直径 (D), 菌球按 D 分为 4 组。

### 1.3 液体发酵培养

种子培养: 取 4 块 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的菌种, 接种于 80 mL 种子培养基中, 120 r/min、25 °C 培养 7 d。发酵培养: 向 150 mL 基本培养基中加入 5% 的种子培养基, 120 r/min、25 °C 培养 7 d。

## 2 结果与讨论

### 2.1 玻璃珠对菌球形态和酶活的影响

向基础培养基中加入 5、10、20 颗玻璃珠, 以不加玻璃珠的培养基为对照, 观察 7 d 后菌体形态 (图 1) 和各组酶活, A、B、C 和 D 组的酶活分别为: 1 062.0、723.6、477.5 和 399.7 U/L。结果显示, 对照组中, 菌体形态为正常的球状, 当增加玻璃珠的个数时, 絮状菌体的比例不断增加。在加入 20 颗玻璃珠时, 培养基中的菌体已完全呈絮状。由此

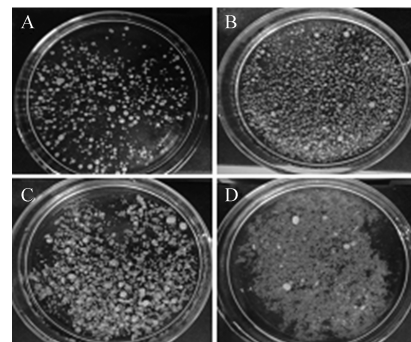


图 1 玻璃珠对菌球形态的影响 (A: 不添加玻璃珠; B: 5 颗玻璃珠; C: 10 颗玻璃珠; D: 20 颗玻璃珠)

Fig. 1 Effect of glass beads on morphology of *P. ferulae*. (A) No glass bead. (B) 5 glass beads. (C) 10 glass beads. (D) 20 glass beads.

可见,加入玻璃珠带来的外力对菌体形态有着重要的影响。而菌体形态的变化与酶活有一定关系,阿魏蘑的球状菌体形态更适于漆酶的合成。絮状菌体的增加提高了发酵液的黏度,降低了物质、氧气在发酵液中的传递效率。在一定程度上导致酶活的下降,但是过大的菌球同样会使内部传质、传氧发生困难,从而影响产物积累<sup>[7-8]</sup>,因此需要将菌球控制在一定范围内。

## 2.2 营养因子对菌球形态和酶活的影响

### 2.2.1 葡萄糖浓度对菌球形态和产漆酶的影响

在基本培养基中添加不同浓度的葡萄糖,随着葡萄糖浓度的增加,发酵液中漆酶酶活随之增加,同时直径分布在 0.2~0.4 mm 的菌球也有相同的变化趋势(图 2A)。在葡萄糖浓度为 40 g/L 时,漆酶酶活达到最高值 2 424.4 U/L,直径分布在 0.2~0.4 mm 的菌球比例也相应达到最高的 33%;当葡萄糖浓度为 10 g/L 时,酶活仅为 811.8 U/L,而直径为 0.2~0.4 mm 的菌球比例也维持在较低水平。推断直径分布在 0.2~0.4 mm 范围的菌球对漆酶的合成有重要影响。

与本研究结果相似,Papagianni 等报道葡萄糖浓度对黑曲霉的形态和产柠檬酸量有一定影响,降低初始葡萄糖浓度会导致柠檬酸产量下降,初始葡萄糖浓度不同,菌球的大小也不相同<sup>[9]</sup>。初始葡萄糖浓度会影响菌丝形态和产物合成,这种影响可能是通过影响菌丝的生长速度起作用的。在本研究中,较低的初始葡萄糖浓度会降低菌丝生长速率,菌体间相互作用力小,造成了 0.2~0.4 mm 直径的菌球比例降低,使漆酶合成能力降低,这与之前报道的相关丝状真菌的培养类似,即低浓度的葡萄糖易形成团块较大的菌体;而当葡萄糖浓度适当提高时,利于 M 型(直径为 0.8~2.5 mm)菌球的形成<sup>[6,9]</sup>。但过高的葡萄糖浓度同样不利于 0.2~0.4 mm 区间的菌球生成和漆酶的合成,Fang 等的研究也表明当葡萄糖浓度超过一定的范围,较高的渗透压促使菌体生长率和产物都降低<sup>[10]</sup>。

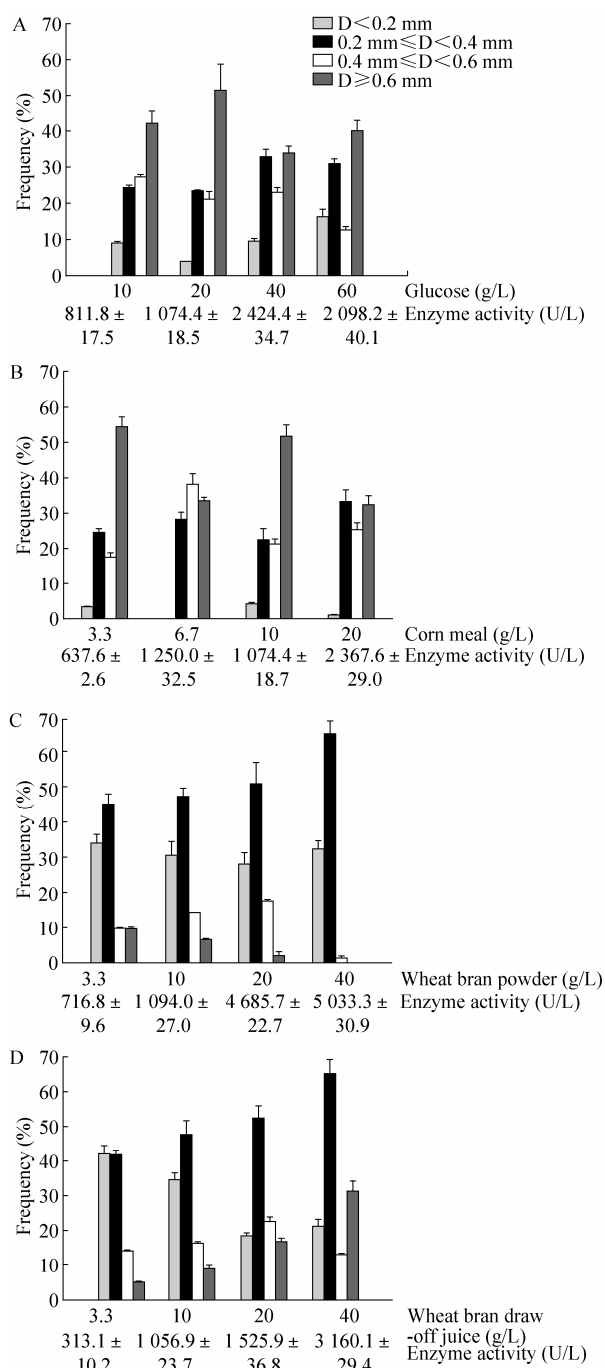


图 2 不同浓度的营养因子对阿魏蘑产漆酶的影响

Fig. 2 Effect of different concentration of nutritional factors on morphology and laccase of *P. ferulae*. (A) Glucose. (B) Corn meal. (C) Wheat bran powder. (D) Wheat bran draw-off juice.

### 2.2.2 玉米粉浓度对菌球形态和产漆酶的影响

玉米粉浓度对菌球直径分布和漆酶合成的影响见图 2B。当玉米粉浓度较低时, 菌球在 0.2~0.4 mm 的区间所占比例较小, 当玉米粉浓度为 20 g/L 时, 该区间的比例为 34%, 此时的漆酶酶活为 2 367.6 U/L。由结果得出, 阿魏蘑菌球的形态和漆酶酶活都受到玉米粉浓度的影响, 随玉米粉浓度的增加, 直径在 0.2~0.4 mm 范围内的菌球比例也有所增加。

### 2.2.3 麸皮粉及其汁对菌球形态和产酶的影响

向基础培养基中分别添加麸皮粉和麸皮浸出汁后发现, 均有助于 0.2~0.4 mm 区间菌球的形成, 随着添加浓度的增加, 0.2~0.4 mm 区间的菌球比例不断增加(图 2C, D)。同时, 漆酶酶活也相应提高, 在 40 g/L 浓度下的麸皮粉和麸皮浸出汁, 漆酶酶活分别达到 5 033.3 U/L 和 3 160.1 U/L。由此可见, 麸皮粉和麸皮浸出汁对于漆酶的合成和 0.2~0.4 mm 区间菌球的形成均具有促进作用, 这再次表明直径分布在 0.2~0.4 mm 范围的菌球对漆酶的合成有重要影响。

在灵芝液态发酵产多糖的研究中, 麸皮的添加有利于较小直径的菌球形成, 同时提高多糖的产量<sup>[11]</sup>。本研究中, 麸皮粉和麸皮浸出汁对阿魏蘑的菌体形态和漆酶合成同样有促进作用, 这可能是由于麸皮中含有的营养物质, 既有利于阿魏蘑的生长, 同时还有诱导漆酶合成的作用。虽然麸皮粉与麸皮浸出汁的营养成分相似, 但添加麸皮粉对漆酶合成的促进作用要优于麸皮浸出汁。而切开阿魏蘑菌球后发现, 菌球内部含有麸皮颗粒, 这表明麸皮粉不仅为阿魏蘑的生长提供营养物质, 而且还是菌球形成时的附着点, 促进了菌球的形成。

### 2.3 非营养载体对菌球形态和酶活的影响

将滑石粉和蒙脱石作为载体加入基础培养基中, 菌球直径分布和漆酶酶活结果见图 3A, B。结果显示, 滑石粉和蒙脱石的添加能使 0.2~0.4 mm 区间菌球的比例维持在较高水平, 但对阿魏蘑漆酶

酶活的影响不大。改变两种载体的浓度对 0.2~0.4 mm 区间菌球的比例影响不大, 对漆酶合成也无明显的促进作用。

对于丝状微生物而言, 其菌体形态对于调控目的产物的合成有着重要意义, van Wezel 等<sup>[12]</sup>学者由此提出了“形态工程 (Morphological Engineering)”的概念; Oncu 等<sup>[13]</sup>的研究表明, 外部环境如 pH、溶氧、搅拌转速等是影响酱油曲霉菌体形态的重要因素; 而 Driouch 等<sup>[14]</sup>的研究则发现通过添加滑石粉或氧铝土控制菌球直径的大小, 可以有效增加黑曲霉吡喃果糖苷酶的产量。

在本研究中, 通过营养物质的调控, 有效控制了阿魏蘑菌球的大小, 形成适合产漆酶的菌体形态。而在添加滑石粉和蒙脱石的实验中, 虽能够有

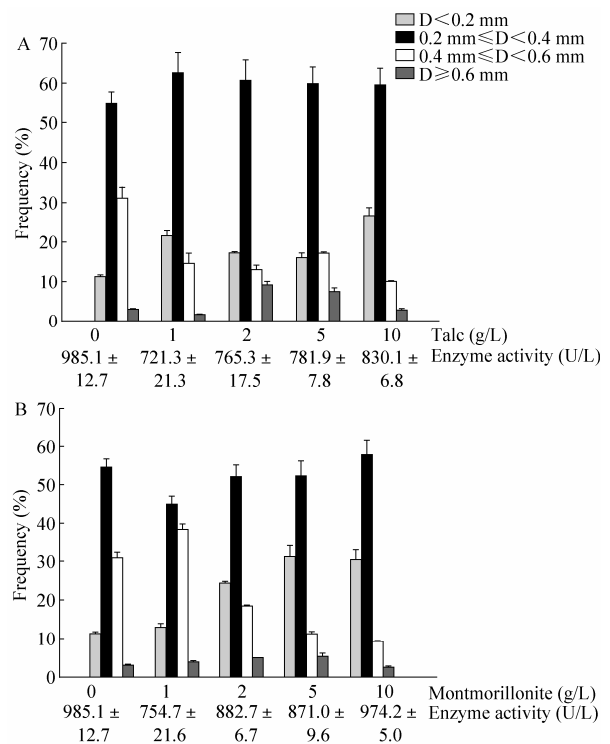


图 3 不同浓度的滑石粉和蒙脱石对阿魏蘑产漆酶的影响

Fig. 3 Effect of different concentration of talc and montmorillonite on morphology and laccase of *P. ferulae*. (A) Talc. (B) Montmorillonite.

效控制菌球直径,但并没有促进漆酶合成,推断滑石粉和蒙脱石作为刚性颗粒,在调控菌球大小的时候,在一定程度上造成菌丝体的损失,影响了正常的代谢。由此可以看出:1)“形态工程”的手段并不是促进目的产物合成的本质、内在因素,只有在不影响微生物正常生长代谢的前提下才能实现发酵水平的提高;2)虽然控制菌球形态的手段很多,但是针对特定的丝状微生物菌种,需要有特定的调控手段。这对我们今后在丝状真菌菌体形态控制的研究方面提供了很好的借鉴。

### 3 结论

在本研究中,通过添加玻璃珠发现,阿魏蘑液态发酵过程中菌体形态对漆酶的合成具有重要影响,表现为球状菌体产酶能力优于丝状和絮状菌体。培养基成分直接影响菌球直径的分布,直径在0.2~0.4 mm 区间菌球的比例对漆酶酶活具有一定的影响。研究表明虽然控制菌球形态的手段很多,但是针对特定的丝状微生物菌种,需要有特定的调控手段。

### REFERENCES

- [1] Madhavi V, Lele SS. Laccase: properties and applications. *BioResources*, 2009, 4: 1694–1717.
- [2] Rodriguez E, Nuero O, Guillen F, et al. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol Biochem*, 2004, 36: 909–916.
- [3] Palvannan T, Sathishkumar P. Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIM 1243 using Plackett-burman design and response surface methodology. *J Basic Microb*, 2010, 50: 325–335.
- [4] Gan Y, Lü ZZ. Studies on physical and chemical properties and immunological activities of polysaccharides from *Pleurotus ferulae*. *Mycosystema*, 2001, 20(2): 228–232 (in Chinese).
- 甘勇, 吕作舟. 阿魏蘑多糖理化性质及免疫活性研究. *菌物系统*, 2001, 20(2): 228–232.
- [5] Hou H, Zhou J, Wang J, et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem*, 2004, 39: 1415–1419.
- [6] Ding ZY, Wang Q, Peng L, et al. Relationship between mycelium morphology and extracellular polysaccharide production of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *J Med Plants Res*, 2012, 6(14): 2868–2874.
- [7] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*, 2004, 22: 189–259.
- [8] Xu Q, Huang H, Li S, et al. Strategy of pellet formation of filamentous fungi in submerge fermentation. *Food Sci Technol*, 2009, 34(2): 13–17 (in Chinese).  
徐晴, 黄和, 李霜, 等. 深层发酵中丝状真菌菌球形态控制的策略. *食品科技*, 2009, 34(2): 13–17.
- [9] Papagianni M, Matthey M, Kristiansen B. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* batch and culture. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 25: 710–717.
- [10] Fang QH, Zhong JJ. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J*, 2002, 10: 61–65.
- [11] Li PZ, Xu R, Zhang KC. Relationship between mycelia morphology and yield of extra polysaccharide in the culture of *G. lucidum*. *Indust Microbiol*, 2000, 30(3): 20–23 (in Chinese).  
李平作, 徐柔, 章克昌. 灵芝液体发酵过程中菌体形态与胞外多糖产量的关系. *工业微生物*, 2000, 30(3): 20–23.
- [12] van Wezel GP, Krabben P, Traag BA, et al. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 5283–5288.
- [13] Oncu S, Tari C, Unluturk S. Effect of various process parameters on morphology, rheology, and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in a batch bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2007, 23: 836–845.
- [14] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105: 1058–1068.

(本文责编 郝丽芳)