

彩绒革盖菌固体发酵生产木质素酶工艺优化研究*

靖德兵^{1,2} 李培军^{1**} 台培东¹ 刘宛¹ 巩宗强¹

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110016)¹ (中国科学院研究生院 北京 100039)²

摘要: 采用均匀设计 $U_{15}(5^8)$ 和双温度培养法进行彩绒革盖菌固体发酵生产木质素酶, 对漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶的活力进行回归分析。结果表明: 应用双温度培养法进行彩绒革盖菌固体发酵生产木质素酶时, 在自然补给氧气, 培养基 pH 自然 (约 6.5), 并保持环境湿度约 60% 的条件下, 20 d 是适宜的发酵周期; 玉米浆、麸皮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、水分适宜作为固体培养基的成分; 少量的 Tween-80 有利于木质素酶的生产。

关键词: 彩绒革盖菌, 固体发酵, 漆酶, 愈创木酚酶, 多酚氧化酶

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0019-05

Study on the Optimization of Solid Fermentation for Ligninase Production from *Coriolus versicolor*

JING De-Bing^{1,2} LI Pei-Jun^{1**} TAI Pei-Dong¹ LIU Wan¹ GONG Zong-Qiang¹

(Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016)¹

(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)²

Abstract: In this experiment, solid fermentation of *Coriolus versicolor* with uniform design $U_{15}(5^8)$ had been performed at two different temperature degrees. The activities of laccase, guaiacolase, and polyphenol oxidase were regarded as dependent variables in Multivariate Regression Analysis by SPSS, and then the mathematical model of overall ligninase activity was constructed by adding activity equations of laccase, guaiacolase, polyphenol oxidase together with weights which were the quotients of corresponding total correlation coefficients and average enzyme activity values. Furthermore, the solutions to the maximal ligninase model were figured out by constraint mathematical programming. It is revealed that in ligninase production by solid fermentation with at temperature degrees from *Coriolus versicolor*, 20 days is proper fermentation time for ligninase production under the condition of natural aeration, natural substrate pH (about 6.5) and an environmental humidity of 60%. Furthermore, corn syrup, wheat bran, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and water are proper substrate ingredients and a little Tween-80 is helpful for ligninase production.

Key words: *Coriolus versicolor*, Solid fermentation, Laccase, Guaiacolase, Polyphenol oxidase

异生物质的结构难于被现存的生物降解性酶所识别, 因此易在生物体及环境中积累。白腐真菌对于异生物质具有独特的降解机制, 其分泌的漆酶、愈创木酚酶和多酚氧化酶等木质素酶有能力对多环芳烃化合物、氯化芳烃化合物、农药、染料、炸药及氯化木质素、叠 N 化合物等污染物进行代谢, 并且是最主要的木质素降解微生物^[1]。白腐真菌主要依靠细胞外的氧化过程对上述异生污染物进行降解, 一般需要有氧条件, 但这往往给实际生产带来杂菌干扰, 竞争性抑制白腐菌生长, 从而限制了白腐菌

* 国家计委西部开发高新技术产业化项目 (No. 计高技 2001-1868)

中国科学院沈阳应用生态研究所创新项目 (No. SCXZY0108)

** 联系人 Tel: 024-83970367, E-mail: lipeijunzh@sina.com.cn

收稿日期: 2003-10-16, 修回日期: 2003-11-24

的推广应用^[1]，因此利用白腐菌生产木质素降解酶具有十分广阔的前景。

白腐菌对污染物的降解机制极其复杂，其木质素降解系统在次生代谢期间形成，C源、N源、硫化物等营养限制是触发该系统形成的主要原因^[2]。生产中，培养基组成、C/N、pH值、温度、通风情况等发酵因子都会显著影响到漆酶的合成和分泌^[3]。影响因素多，对调控策略要求也高，引起操作上的难度增大，因此必须对调控条件进行完善和优化。白腐真菌能在固体、液体培养基中生长，利用廉价的农业废弃物营养源，如木屑、木片等即可进行有效的培养^[1]。世界各国早已积极地对白腐真菌及木质素酶制品进行了研究，许多大学和公司正在探索酶制品工业化生产的最优工程规划，并已开始进行酶制品的工业化生产^[1]，其中黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）已成为研究木质素生物降解的模式菌。

固体发酵产酶可以选用任何的天然纤维素废弃物，而且产量一般比液体发酵高出2~3倍，因此可以大幅降低成本^[4]，采用固体发酵的酶制剂工业化生产体系较适合我国国情。我国对白腐菌及其酶制品的研究刚起步，现有的研究多针对彩绒革盖菌（*Coriolus versicolor*）进行，现阶段迫切需要对彩绒革盖菌产酶固体发酵生产体系开展优化研究。本文将选择成本低、来源丰富的原料，通过均匀实验对产酶培养基各种成分以及工艺条件进行优化，以为其工业化生产做出初步探索。

1 材料与方法

1.1 菌株

彩绒革盖菌（*Coriolus versicolor*）菌株，由中国科学院沈阳应用生态研究所保藏。

1.2 培养基及培养方法

斜面培养：在装有PDA（马铃薯20%，葡萄糖2%，琼脂2%）培养基的试管中接入彩绒革盖菌，30℃静置培养7d。

孢子悬浮液的制备：将斜面培养基上的彩绒革盖菌孢子用无菌水洗下，制成孢子悬浮液。

摇瓶培养：在装有PDY培养基（马铃薯20%，葡萄糖2%，酵母膏1%）100 mL的500 mL摇瓶中以10%的量接入彩绒革盖菌孢子悬浮液，在28℃、120~150 r/min条件下培养3~5d。

固体产酶培养基：培养基成份配比采用均匀设计U15(58)，pH自然（约6.5），见表1，表2。

表1 均匀实验因素水平表

因素	玉米浆 (g)	CMC-Na (g)	稻草 (g)	水量 (mL)	T80 (g)	时间 (d)	麸皮 (g)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)
1	0	0	0	50	0	14	4	0.2
2	0.3	0.2	4	57.1	0.01	17	6	0.4
3	0.6	0.4	8	66.7	0.02	20	8	0.6
4	0.9	0.6	12	80	0.03	23	10	0.8
5	1.2	0.8	16	100	0.04	26	12	1.0

表2 彩绒革盖菌固体发酵产酶均匀实验

编号	培养基构成 (g)						酶活 (U/g)					
	玉米浆	CMC-Na	稻草粉	水分	T80	时间 (d)	麸皮	(NH ₄) ₂ SO ₄	漆酶	愈创木酚酶	多酚氧化酶	
1	0	0	8	66.7	0	14	10	0.6	4.1	7.3	17.9	
2	0	0.4	4	100.0	0.02	23	8	0.2	8.5	10.9	45.1	
3	0	0.6	12	66.7	0.03	17	6	1	4.1	6.6	17.1	
4	0.3	0.2	0	50.0	0.02	17	4	0.4	21.2	42.4	59.5	
5	.3	0.2	16	80.0	0.03	26	10	0.4	3.8	7.0	19.2	
6	0.3	0.8	12	50.0	0.01	23	12	0.8	3.3	7.4	19.9	
7	0.6	0	0	80.0	0.04	23	6	0.8	21.5	35.6	46.0	
8	0.6	0.6	4	57.1	0.04	20	12	0.2	6.4	12.5	24.1	
9	0.6	0.6	16	100	0	20	4	0.6	6.0	10.2	25.1	
10	0.9	0.4	4	57.1	0	26	8	1	9.8	17.3	31.1	
11	0.9	0.4	16	50.0	0.04	14	8	0.8	4.2	9.0	21.4	
12	0.9	0.8	0	80.0	0.01	14	10	0.4	6.4	11.4	21.9	
13	1.2	0	12	57.1	0.01	20	6	0.2	6.3	13.3	27.6	
14	1.2	0.2	8	100.0	0.02	17	12	1	8.2	13.0	25.4	
15	1.2	0.8	8	66.7	0.03	26	4	0.6	6.9	10.2	25.6	
Aver.	0.6	0.4	8	70.76	0.02	20	8	0.6	8.04	14.27	28.47	

固体发酵产酶：将上述培养基高压灭菌后，以2mL摇瓶悬浮液/处理的量接种，而后采用双温度培养法，前3d 37℃，以后30℃；自然补给氧气，环境湿度控制在约60%。

1.3 粗酶液制备

取发酵成熟曲2g，加20mL蒸馏水，40℃、130 r/min振荡浸提1h，滤纸过滤，3,000 r/min离心15 min，4℃保存备用。

1.4 酶活力测定^[5,6]

将各试剂以下述比例配合，在28℃的黑暗条件下反应30 min，将反应后的样品在分光光度计上进行吸光度OD值测定。

表3 木质素酶活力测定

木质素酶	底物 (2mL)	缓冲液 (5mL)	酶液	测定波长 (nm)
漆酶	3.36mmol/L 邻联甲苯胺	醋酸 0.1mol/L, pH4.6	1 mL	600
愈创木酚酶	80mmol/L 愈创木酚	醋酸 0.1 mol/L, pH4.6	1 mL	490
多酚氧化酶	10mmol/L 邻苯二酚	磷酸 0.05 mol/L, pH6.0	1 mL	400

1.5 酶活力定义

漆酶 (laccase) 活力定义：以邻联甲苯胺为底物，在28℃，pH4.6，恒温30 min的条件下，以每分钟使吸光度值 OD_{600} 增加1所需的酶量为1个酶活力单位U ($U = \Delta OD_{600}/min$)。

愈创木酚酶 (guaiacolase/guaiacal oxidase) 活力定义：以愈创木酚为底物，在28℃，pH4.6，恒温30 min的条件下，以每分钟使吸光度值 OD_{490} 增加1所需的酶量为1个酶活力单位U ($U = \Delta OD_{490}/min$)。

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase) 活力定义: 以邻苯二酚为底物, 在 28℃, pH6.0, 恒温 30 min 的条件下, 以每分钟使吸光度值 OD_{400} 增加 1 所需的酶量为 1 个酶活力单位 U ($U = \Delta OD_{400}/\text{min}$)。

1.6 试验设计与数据分析

均匀试验采用 8 因素 5 水平设计 (见表 1), 数据处理时运用 SPSS 进行回归分析, 而后约束规划求解。

2 结果与分析

2.1 酶活测定

见表 2。

2.2 数据处理及模型建设

对表 2 数据进行中心化处理, 应用 Regression 过程进行回归分析, 可得到各酶活回归方程。鉴于各酶活平均值相差较大, 将木质素酶总活力定义为上述 3 种酶活加权之和, 即: $\text{Ligninase} = \text{laccase}/8.04 \times 0.999 + \text{guaiacolase}/14.27 \times 0.993$

$$+ (\text{polyphenol oxidase}) / 28.47 \times 0.995$$

则各酶活对应数学模型如表 4 所示。

表 4 酶活回归及模型建设

木质素酶	数学模型	R ²	Sig.
Laccase	$4.752 - 1.798x_1x_2 + 0.402x_1x_3 - 2.077x_2 + 2.518x_2x_3 - 4.336x_3 + 2.907x_3^2 + 1.05x_3x_4 + 0.707x_3x_5$	0.999	0.000
Guaiacolase	$20.774 - 4.445x_1^2 - 5.08x_3 + 5.404x_3x_7 + 3.985x_4x_8 + 1.946x_4^2 - 1.452x_6^2 - 4.818x_7 - 2.906x_7^2$	0.993	0.000
Polyphenol oxidase	$35.336 - 0.914x_1 + 8.6x_1x_8 - 2.066x_2 + 5.797x_2x_7 - 2.885x_3 - 2.746x_4^2 - 2.284x_5^2 - 3.574x_6^2 - 8.984x_7$	0.995	0.000
Ligninase	$3.271 - 0.0319x_1 - 0.3093x_1^2 - 0.2234x_1x_2 + 0.045x_1x_3 + 0.3006x_1x_8 - 0.3303x_2 + 0.3129x_2x_3 + 0.2026x_2x_7 - 0.9931x_3 + 0.3612x_3^2 + 0.1305x_3x_4 + 0.0878x_3x_5 + 0.376x_3x_7 - 0.0394x_4^2 + 0.2773x_4x_8 - 0.0798x_5^2 - 0.226x_6^2 - 0.6493x_7 - 0.2022x_7^2$	-	-

注: $x_1 = (\text{玉米浆} - 0.6) / 0.439155$, $x_2 = (\text{CMC-Na} - 0.4) / 0.29277$, $x_3 = (\text{稻草粉} - 8) / 5.85540$, $x_4 = (\text{水} - 70.76) / 18.36774$, $x_5 = (\text{Tween80} - 0.02) / 0.01464$, $x_6 = (\text{时间} - 20) / 4.39155$, $x_7 = (\text{麸皮} - 8) / 2.92770$, $x_8 = ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0.6) / 0.29277$, R² = 全相关系数, Sig. = 显著水平

2.3 方程求解

在实验条件范围内对上述酶活方程求解, 木质素酶活极大时培养基各成份的取值情况如表 5 所示。

表 5 木质素酶总活力极值对应的培养基构成水平

因素	玉米浆 (g)	CMC-Na (g)	稻草粉 (g)	水量 (g)	T80 (g)	时间 (d)	麸皮 (g)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	极值
下限	0	0	0	50	0	14	4	0.2	
上限	1.2	0.8	16	100	0.04	26	12	1	
Ligninase	0.454	0	0	50	0.009	20	4	0.2	8.686

由表 5 知, 在用上述培养基进行彩绒革盖菌固体发酵生产木质素酶时: (1) 木质素酶总活力在 20 d 最高, 说明彩绒革盖菌固体发酵的最佳产酶周期是 20 d^[6,7]。研究中

漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶实测酶活力的极值可以分别达到 $21.5 \triangle OD_{400}/\text{min}$ 、 $35.6 \triangle OD_{400}/\text{min}$ 、 $59.5 \triangle OD_{400}/\text{min}$ ，而相关文献报道彩绒革盖菌在同样测定方法下漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶活力峰值仅达到 $3.95 \triangle OD_{400}/\text{min}$ 、 $5.49 \triangle OD_{400}/\text{min}$ 、 $5.49 \triangle OD_{400}/\text{min}$ ^[5,6]，因此本研究应该有较好的应用前景。(2) N源和C源是微生物产酶的极为重要的影响因素^[1,3]。大多数研究认为加入N源可以刺激菌丝在固体培养基内的繁殖和蔓延，因而对真菌分泌木质素降解酶有促进作用^[7]，其中玉米粉、酵母膏等是彩绒革盖菌生产漆酶较理想的N源^[6]；而用单一木质素作C源白腐菌不能生长，葡萄糖等营养碳源已被证明对真菌过氧化物酶、漆酶的合成有利^[6]。表5表明玉米浆对木质素酶总活力有明显的促进作用，CMC-Na促进作用不明显。这说明麸皮已含有丰富营养，可以充当碳源^[6]，但N源的耗尽或受限是启动次生代谢及木质素降解系统形成的主要原因^[2]，因此在菌丝生长初期还需额外补充玉米浆、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等有机和无机N源以促进菌丝生长，但N源量要适宜，否则过量易影响真菌下一阶段木质素酶的分泌。同时由于木质素酶不被木质素或纤维素等大分子诱导^[5]，因此稻草粉的诱导作用没有得到体现，反而会抑制过氧化物酶的表达^[8]。(3) 木质素酶是组成型酶，但结构和木质素有关的低分子芳香化合物或木质素降解的碎片化合物可诱导过氧化物酶、漆酶产生并提高其产酶量^[5]，其中表面活性剂以 Tween-80 效果最佳^[9]。这里 Tween-80 中间水平对木质素酶总活力有明显的促进作用，说明适当浓度的 Tween-80 可提高细胞膜的渗透性，使酶更多地从细胞内释放，排除已合成酶在细胞内对酶基因转录或酶 mRNA 翻译的阻遏作用，从而提高了酶活^[8]。(4) 木质素酶活性还受到麸皮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及加水量的影响^[6]，从构成比例来看，彩绒革盖菌发酵需水量较少，因此对氧气的需求量会较多。

3 结论与验证

应用双温度培养法（前3 d 恒温 37℃，以后恒温 30℃）进行彩绒革盖菌固体发酵生产木质素酶时，在自然补给氧气，培养基 pH 自然（约 6.5），并保持环境湿度约 60% 的条件下，对培养基及培养条件的优化结果如下：(1) 适宜的发酵周期是 20 d；(2) 玉米浆、麸皮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、水分适宜作为固体培养基的基本成分；(3) 少量的 Tween-80 有利于高活力木质素酶的生产。

配制含有玉米浆 5.40 g，麸皮 14.16 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.58 g，Tween-80 1.96 g，水分 23.9 mL 的固体培养基（pH 自然，约 6.5），在自然补给氧气、并保持环境湿度约 60% 的条件下，经过 20 d 的发酵，将发酵曲风干、粉碎、室温贮藏。加工后所得粗酶粉的漆酶活力可以达到 12.6 (U/g)。

参考文献

- [1] 李慧蓉. 环境科学进展, 1996, 4 (6): 69~77.
- [2] Maria D P C, Annica A, Paul A, *et al.* Word Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 627~633.
- [3] In-Young L, Kyung-Hee J, Choong-Hwan L, *et al.* Biotechnology Letters, 1999, 21: 965~968.
- [4] Byoo D, Murphy V G, Karim M N. Biotechnol Techniques, 1999, 5: 19~24.
- [5] 张敏, 肖亚中, 蒲春雷, 等. 微生物学通报, 2002, 9 (3): 37~42.
- [6] 王宜磊, 刘兴坦. 生物技术, 2000, 10 (6): 15~18.
- [7] 胡平平, 付时雨, 余惠生. 纤维素科学与技术, 2001, 9 (1): 1~7.
- [8] 李越中, 高培基, E祖农. 微生物学报, 1994, 34 (1): 29~36.
- [9] Chiyomi M, Kandan S, Phyllis H, *et al.* Cellulose, 2002, 9: 83~89.