

不同搅拌器类型对齿毛菌发酵产漆酶的影响

余孙靖^{1,2} 王国增^{1,2} 叶秀云^{1,2} 吕橄^{1,2} 林娟^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

(2. 酶高效表达国家工程实验室 福建 福州 350002)

摘要: 【目的】白腐菌 *Cerrena unicolor* Y-G07 是一种不产孢子的丝状真菌, 其漆酶合成与生长相偶联。应用于单细胞微生物发酵的搅拌器并不适用于白腐真菌。在此, 综合考虑溶氧效果和剪切力作用, 研究不同搅拌器类型对白腐菌 *Cerrena unicolor* Y-G07 发酵生产漆酶产量的影响。【方法】针对 Y-G07 菌株生长过程需氧量大, 且对剪切力敏感的特性, 订制 5 种不同类型的搅拌器(径向流、轴向流等), 在通气已控制在设备最大量程及转速优化的前提下, 研究 Y-G07 在发酵生产过程中使用不同类型搅拌器对菌丝生长形态、生长速度、溶氧情况、糖代谢和漆酶合成的影响。【结果】*Cerrena unicolor* Y-G07 菌株对不同类型搅拌器产生的发酵液流态性质和剪切力敏感, 表现在菌丝体的生长形态、细胞浓度差异较大, 且生长周期改变, 从而影响漆酶的合成。采用六折叶 DT602 搅拌器最有利于该菌株形成致密度合适的网状菌丝体, 菌丝体细胞浓度高, 断裂少、生长状况好, 漆酶的单位产量可达 690 U/mL, 相对于普通使用的六叶平直叶搅拌器(448 U/mL)提高了 54%。【结论】选择合适的搅拌器类型有利于好氧但对剪切力敏感的微生物发酵。

关键词: 一色齿毛菌, 丝状真菌, 漆酶, 剪切力, 搅拌器

Effects of different stirrers on laccase production with *Cerrena unicolor*

YU Sun-Jing^{1,2} WANG Guo-Zeng^{1,2} YE Xiu-Yun^{1,2} LÜ Gan^{1,2} LIN Juan^{1,2*}

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)
(2. National Engineering Laboratory for Highly Efficient Enzyme Expression, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: 【Objective】To study the effects of different stirrers on laccase production with white-rot fungus *Cerrena unicolor* Y-G07 during fermentation. 【Methods】Y-G07 is a non-spore forming filamentous fungus, whose laccase synthesis is coupled with its cell growth. Considering the aerobic nature and shear force sensitivity of the strain, five different stirrers were designed to compare the effects on hyphal morphology, growth rate, dissolved oxygen, glycometabolism and laccase production. 【Results】Different stirrers resulted in the difference in hyphal morphology, cell concentration, growth cycle, and thus affected laccase production. The six-hinge-blade DT602 impeller formed reticular mycelia with appropriate density, high concentrations of mycelium cells and less hypha frac-

基金项目: 福建省发改委生物产业技术开发专项资助项目; 福州市科技计划项目(No. 2012-G-125); 海洋公益性行业科研专项项目(No. 201305015)

*通讯作者: ✉: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-19; 接受日期: 2014-02-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-26

ture during fermentation. The laccase production was increased up to 690 U/mL, which is 54% higher than that by using usual Six-flat-blade impeller. **[Conclusion]** Proper design of agitator in fermentor can be favorable for aerobic and shear-force sensitive microorganisms.

Keywords: *Cerrena unicolor*, Mycelial fungus, Laccase, Shear force, Stirrer

漆酶(Laccase, EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶,属于蓝多铜氧化酶家族成员之一,主要分布在高等植物和真菌中,动物、细菌体内发现相对较少,其中最重要的产生菌是担子真菌中的白腐菌^[1]。漆酶作为白腐菌胞外木质素氧化三大酶系中的一种,其作用底物广泛,能够催化酚类、芳胺类、生物色素、羧酸类、金属有机物、甾体类激素和许多其他非酚类物质的氧化,使之生成相应的羰基化合物、醌类化合物^[2]。漆酶在催化底物氧化时,铜离子作为辅基团参与电子传递,伴随氧分子一步四电子还原反应生成水,不会产生有害的活性氧和过氧化氢等中间产物,是一种非常绿色的生化反应,其本质上是一种环保型酶。

目前国内对漆酶的研究仍主要集中在菌种选育、酶学性质、摇瓶条件优化和应用等方面的研究,对于漆酶的发酵罐生产工艺的研究仍很少,尤其是发酵生产过程中使用不同型式搅拌器对漆酶发酵产酶的影响则更为罕见。对于具有细长菌丝的生产菌株,在深层液体通气培养过程中,搅拌器对菌丝生长和产酶有着重要影响^[3];搅拌器产生的剪切力还可能导致微生物的变异,从而影响目标产物产量^[4]。因此合适的搅拌器应具有较好的气液混合与分散能力以及固相物质悬浮能力。本研究用于生产漆酶的菌株是一色齿毛菌,是一种无孢子、以菌丝断裂进行生长繁殖的白腐真菌,对剪切力作用相当敏感,剪切力过强会导致菌丝断裂,影响菌体生长、代谢。因此,对发酵生产过程中剪切力的控制和氧气量的供应是提高漆酶产量的关键工艺参数^[5]。在保证发酵体系中搅拌达到气液固均匀分散的前提下,应选择较小剪切力或低剪切高流动性的搅拌器型式^[6]。本文主要比较了发酵过程中采用四直

叶圆盘涡轮搅拌器、抛物线凹叶涡轮搅拌器、宽叶曲面轴流搅拌器、四窄叶曲面搅拌器和六折叶DT602 涡轮搅拌器对生产菌株发酵生产漆酶的影响^[7]。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和设备

针对菌株特性订制 5 种搅拌器类型,如图 1 所示。

1.2 菌种

一色齿毛菌(*Cerrena unicolor*) Y-G07 菌株由本课题组选育获得。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基(液体 PDA 培养基, g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 水 1 000 mL, pH 自然。方法: 马铃薯去皮,切成小方块,称 200 g,加水 1 000 mL 煮沸 30 min, 四层纱布过滤除渣。加 20 g 葡萄糖使之完全溶解,补水至 1 000 mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 30 min 备用。

1.3.2 发酵培养基(g/L): 麦芽糊精 70, 蛋白胨 15, 酒石酸铵 1.6, pH 4.5-4.8。

1.4 漆酶的发酵生产

种子培养: 装液量 240 mL/500 mL, 30 °C、200 r/min 振荡培养 48 h。

发酵: 5 L 发酵罐, 装液量 60% (体积比), 接种量 8% (体积比), 培养温度 25 °C, 发酵周期 170-180 h。

发酵罐中安装 2 档搅拌器(图 2), 移除消泡桨叶, 搅拌器设计了 5 种组合。A 组: 2 档四直叶圆盘涡轮搅拌器; B 组: 2 档抛物线凹叶搅拌器; C 组: 2 档宽叶曲面轴流搅拌器; D 组: 2 档四窄叶曲面搅拌器; E 组: 2 档六折叶 DT602 搅拌器。

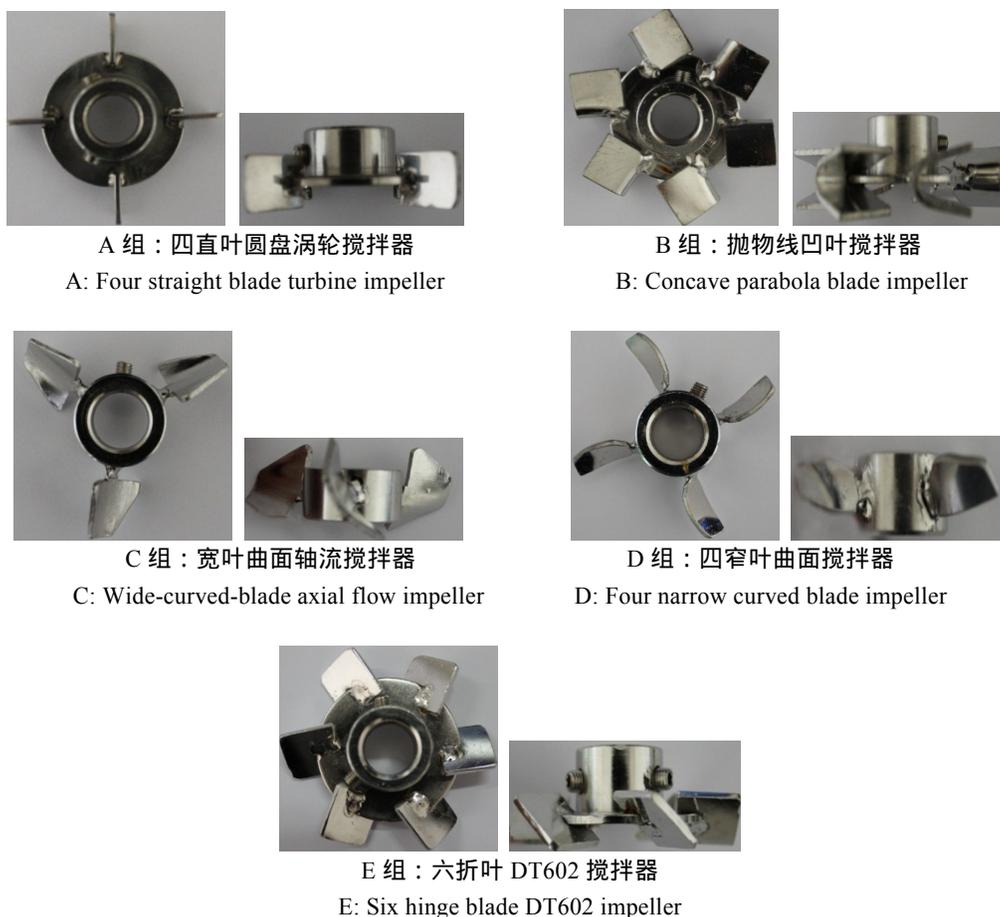


图 1 不同搅拌器类型
Figure 1 Different kinds of impellers



图 2 搅拌器安装形式
Figure 2 Installation of impellers

1.5 发酵液成分的检测

1.5.1 还原糖含量测定：采用 DNS 法测定发酵液中还原糖的含量^[8]。

1.5.2 菌体浓度测定：将一定体积发酵液经抽滤泵抽滤，取滤渣，70 °C 烘干至恒重后称重，从而计算单位体积发酵液的菌体干重。

1.5.3 漆酶活力测定^[9]：采用 ABTS 为底物。反应体系 4.0 mL，其中含 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.0) 1.95 mL、0.5 mmol/L ABTS 溶液 2.00 mL 和酶液 50 μL。30 °C 恒温水浴反应，测定反应前 5 min 反应体系在 420 nm 处吸光度的增加值 ΔOD 。以灭活的酶液作为空白对照。酶活定义：在上述条件下，每 min 催化氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

漆酶活力计算公式:

$$\text{漆酶活力(U/mL)} = N \times \Delta OD \times 10^3 / (\xi \times t)$$

其中 N 为稀释倍数; ΔOD : 5 min 时反应液在 420 nm 处吸光度增加值; ξ : ABTS 氧化态的摩尔吸光系数 36 000 L/(mol·cm); t : 反应时间 5 min。

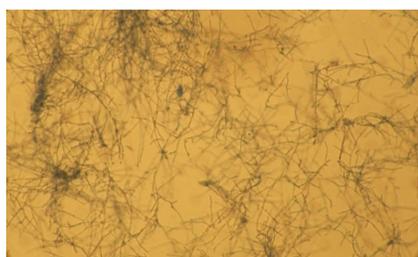
2 结果与分析

2.1 不同类型搅拌器对菌体形态的影响

一色齿毛菌(*Cerrena unicolor*) Y-G07 在不同搅拌器组合下的菌丝形态有较大的差别, 如图 3 所示。

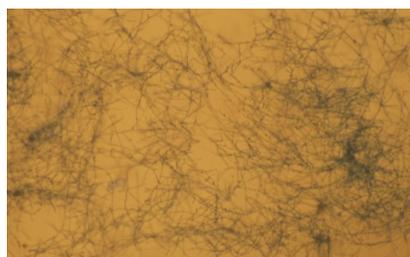
A 组属于涡轮径向搅拌器类型, 剪切力高, 导致菌丝在搅拌器周围持续受到高剪切力作用, 菌丝断裂、松散, 菌丝间隙增大^[10]; B 组搅拌器由于抛物线凹叶设计, 让气体分散和传质能力维持较高水

平, 同时一定程度上降低了剪切力作用, 部分菌丝聚集, 密度增大, 有缠绕形成小菌团的趋势; C 组宽叶曲面设计属轴向搅拌器, 混合效果好, 剪切力更低, 形成的菌丝断裂较少, 继续生长聚集成较致密菌丝团^[6]; D 组四窄叶曲面的轴流浆设计, 是相对其他组合剪切力最小的搅拌器, 大量未断裂菌丝生长, 聚集形成条状菌丝团^[6]; E 组是在径向流浆的基础上加入订制的折叶设计, 相比 A、B 组降低了剪切力, 又保证较好的搅拌混合效果, 使菌丝体形成较为分散又呈网状相连的结构, 菌丝间空隙较小^[11-12]。综上所述, 在发酵过程中使用不同类型的搅拌器对菌体的生长状态有明显的影响。在漆酶的摇瓶发酵实验过程中, 也发现在发酵体系中加入不同个数的玻璃小球时, 菌丝的形态差异也较大。



A 组: 四直叶圆盘涡轮搅拌器

A: Four straight blade turbine impeller



B 组: 抛物线凹叶搅拌器

B: Concave parabola blade impeller



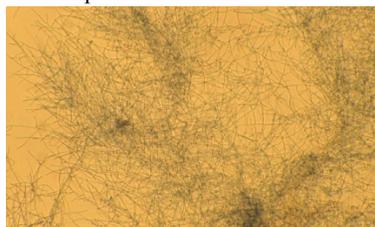
C 组: 宽叶曲面轴流搅拌器

C: Wide-curved-blade axial flow impeller



D 组: 四窄叶曲面搅拌器

D: Four narrow curved blade impeller



E 组: 六折叶 DT602 搅拌器

E: Six hinge blade DT602 impeller

图 3 不同搅拌器类型对一色齿毛菌 Y-G07 菌丝形态的影响(发酵 72 h)(40×)

Figure 3 Effects of different kinds of impellers on hyphae shapes of *Cerrena unicolor* Y-G07 at 72 h (40×)

2.2 不同类型搅拌器对菌体生长的影响

不同搅拌器型式对菌体浓度(以干重计)的影响如图4所示,A、B组进入对数生长期后菌体生长速度较快,较早进入稳定期,C、D、E组次之。这主要是由于A、B组搅拌器属于径向流搅拌器,气体分散能力较强,能提供较好的溶氧效果,促进耗氧真菌快速生长繁殖^[8];但A、B组相对较强的剪切力也加强了菌丝的机械损伤,使菌丝衰老加快,发酵后期菌丝分散自溶,菌体浓度下降。C、D组属轴向流搅拌器,剪切力低,对菌丝的伤害小;但由于其溶氧效果较差,不能满足菌体快速生长对氧气的需求,所以菌体生长较为缓慢。E组中DT-602搅拌器的折叶设计加强了轴向循环能力,既具有较好的混合作用,又在保证了一定径向作用力的前提下降低了剪切力,有利于真菌菌丝的营养吸收和生长繁殖^[5]。

2.3 不同类型搅拌器对菌体糖代谢的影响

在漆酶的发酵生产过程中,不同类型搅拌器对菌体糖代谢的影响如图5所示。结果表明,在5组不同桨叶情况下,菌丝体皆从24 h开始进入糖快速消耗阶段,这是因为在24 h后菌体进入对数生长期(图4)。A组糖消耗最快,72 h前还原糖浓度变化曲线斜率最大,168 h发酵结束时残糖浓度为6.9 g/L;B组前期耗糖速率仅次于A组,在84 h后进入稳定期,耗糖速率减慢;而D组耗糖速率最慢,发酵至168 h残糖浓度仍为10.9 g/L;C组耗糖趋势则介于B、D组之间;E组由于在相对较低剪切力下又具有良好的混合效果,菌丝形态是一种均匀致密的网状结构,营养的传递阻力较小,糖的利用效果最好,发酵168 h残糖浓度仅为3.5 g/L。这是因为不同类型搅拌器影响了菌体的生长速度,从而影响菌体对糖的消耗速率。

2.4 不同类型搅拌器对溶氧的影响

由图6可知,在0-96 h,不同搅拌器作用下的溶氧变化曲线基本一致,但在96 h后溶氧含量出现差异。A组在96 h后进入衰亡期,菌体浓度下降(图4),呼吸代谢速率也快速下降,体系中溶氧

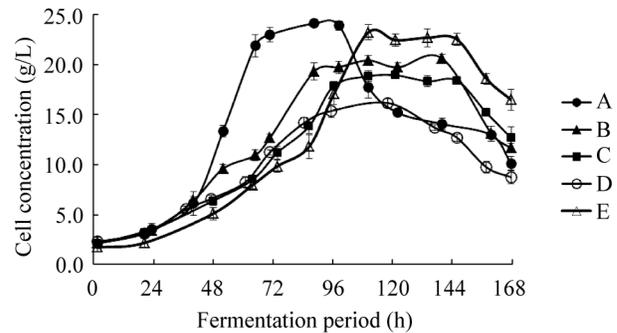


图4 不同类型搅拌器作用下一色齿毛菌 Y-G07 的生长曲线

Figure 4 Growth curves of *Cerrena unicolor* Y-G07 by using different kinds of impellers

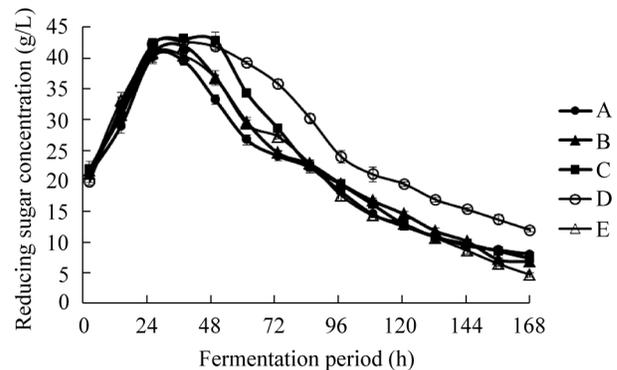


图5 不同类型搅拌器作用下一色齿毛菌 Y-G07 的耗糖速率变化

Figure 5 Curves of reductive sugar consumption of *Cerrena unicolor* Y-G07 by using different kinds of impellers

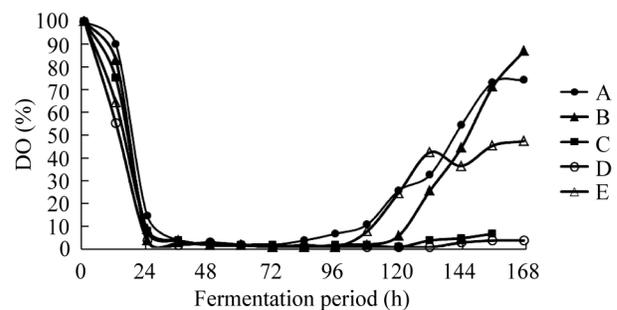


图6 不同类型搅拌器作用下发酵过程中溶氧的变化

Figure 6 DO curves during fermentation period by using different kinds of impellers

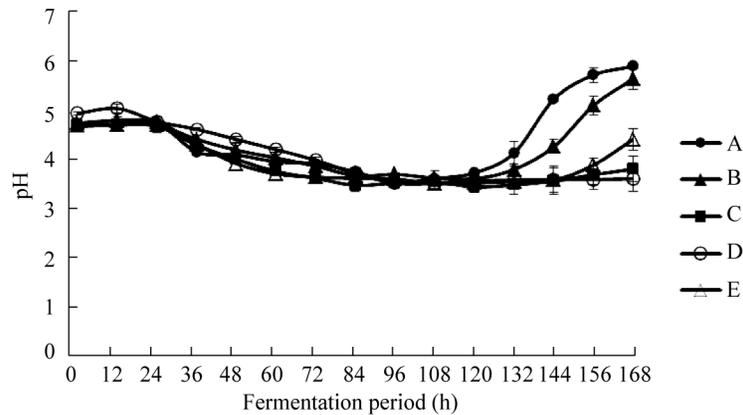


图7 不同类型搅拌器作用下发酵过程中的 pH 变化

Figure 7 pH curves during fermentation period by using different kinds of impellers

含量迅速增大; B组与A组情况相似,但由于其相对较弱的剪切力,对菌体机械损伤小,使得稳定期能维持较长时间;E组在96h后进入稳定期,呼吸代谢减弱,耗氧速率下降,且由于其菌体形态分散呈网状分布,更有利于溶氧在发酵液中的扩散,使得溶氧量较快上升;C、D组菌体虽然也在96h左右进入稳定期,但由于其搅拌器属于轴向流,溶氧效果较差,因而在发酵后期维持较低的溶氧水平^[13-14]。可见,不同类型搅拌器产生的剪切力和气体分散能力不同,可引起发酵体系溶氧的变化。

2.5 不同类型搅拌器对发酵体系pH的影响

在24h时菌体进入对数生长期(图4),这时pH值开始下降(图7),但pH下降速率变化不大;pH约为3.5时不再下降,可能由于更低的pH不适合菌体生长,此时菌体生长进入稳定期。稳定期(96h)后,A组菌丝体最早开始衰亡,大量菌体自溶,使得pH快速上升,B组次之;C、D组稳定期后仍处于较低的溶氧环境,菌体衰亡速率缓慢,pH维持较低状态;E组由于其特殊的桨叶设计,溶氧和混合效果介于B、C组之间,使得发酵后期菌体自溶速度也介于二者之间。综上所述,由于不同类型的搅拌器溶氧和混合效果不同,影响菌丝体生长代谢过程,从而造成发酵液pH值的差异。

2.6 不同类型搅拌器对漆酶产量的影响

在发酵24h时,菌体进入对数生长期(图4),漆酶也进入快速合成阶段(图8),直到进入衰亡期漆酶活力仍处于上升阶段,说明该漆酶的合成模式属于延续合成型;发酵72h之后,各组的漆酶合成情况开始出现差异。E组在156h之前酶活保持快速增长速率,酶活最大值可达690 U/mL;而A、B和C组酶活在84h后增长速率有所减缓,D组的酶合成速率相对其他组较低。这表明漆酶的合成受菌体生长状况(图4)和糖代谢速率(图5)的影响,而菌体生长状况和糖代谢速率又受到不同类型搅拌器产生的剪切力、溶氧的影响。

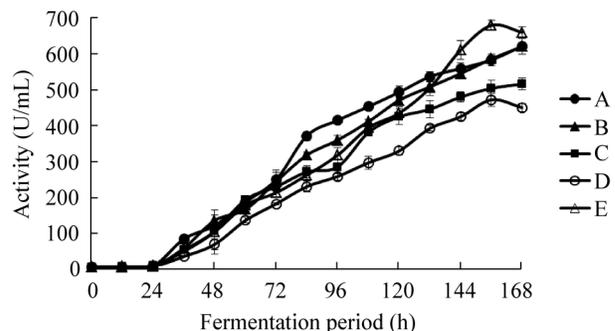


图8 不同类型搅拌器作用下发酵过程漆酶活力变化曲线

Figure 8 Curves of laccase activity during fermentation period by using different kinds of impellers

3 结语

在发酵生产过程中,需要考虑体系中气体分散溶氧能力、固液悬浮混合和传热传质对菌丝生长和产酶的影响。剪切力是设计生物反应器和放大的重要参数,是影响细胞的机械力的总指标^[15]。深层液体发酵过程中,丝状真菌可形成菌丝球、菌丝团和自由丝状形式。呈自由丝状形态下,菌丝的缠绕导致发酵液的高黏度及拟塑性,使得传质和混合效果变差^[11];在菌丝团形态下,发酵液黏度较低,传质和混合效果较好,但菌丝团内部菌丝可能由于供氧不足而逐步衰亡。剪切力对菌丝形态有明显的影响,剪切力太小会造成菌丝结球过度,导致产物合成速率下降;剪切力过大则对菌丝损伤较大,造成菌丝断裂同样减缓产物合成^[15]。所以,发酵生产中应选择对传质、混合效果都有利的菌丝形态。

综合考虑耗氧丝状真菌对剪切力作用敏感及提高最终酶活力等因素,本研究在控制低转速、高通气量的条件下,采取5组不同搅拌器组合(每个发酵罐安装2档相同搅拌器)进行发酵试验,六折叶DT602搅拌器效果最好。使用六折叶DT602搅拌器进行了多组重复试验,漆酶活力始终维持在最高水平。究其原因,与纯径向流和轴向流搅拌器相比,采用特殊折叶设计的搅拌器,在较高传质系数和气体分散能力下,加强了轴向循环能力,降低了剪切力作用,从而有利于提高漆酶合成产量。

参考文献

- [1] 任大军. 白腐菌对氮杂环化合物的降解及机理研究[D]. 武汉: 华中科技大学博士学位论文, 2006.
- [2] 吴晴. 白腐真菌及其漆酶的应用研究[J]. 安徽科技, 2010(3): 47-48.
- [3] 梁世中. 生物工程设备[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 23-27.
- [4] Jung JY, Park JK. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(3): 347-354.
- [5] 张雄. 好氧发酵罐的新型搅拌器的应用[J]. 发酵科技通讯, 2006, 35(1): 51-52.
- [6] 胡建成. 搅拌器优化组合在大型发酵罐中的应用[J]. 化工机械, 2004, 31(1): 37-39.
- [7] 黄志坚, 虞培清, 苏扬, 等. 发酵罐用搅拌器的工业应用进展[J]. 医药工程设计杂志, 2004, 25(1): 1-4.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 浙江: 浙江大学出版社, 1999: 38.
- [9] 黄乾明. 漆酶高产菌株的诱变选育及其酶的分纯化、性质和基因克隆研究[D]. 四川: 四川农业大学博士学位论文, 2006.
- [10] 陈万河, 王普, 刘亮, 等. 不同搅拌器型式对阿维菌素发酵的影响[J]. 浙江工业大学报, 2009, 37(3): 284-287.
- [11] 武斌, 李涛. 发酵中剪切环境与菌体形态和代谢[J]. 化学工程报, 1997, 48(1): 108-109.
- [12] 杨海龙, 吴天祥. 丝状真菌发酵生产中形态的影响与发酵罐设计[J]. 生物技术, 2003, 13(1): 45-47.
- [13] 高安秀, 刘九羊, 黄少萌. 溶氧对发酵的影响及控制[J]. 农家科技, 2012(5): 153-154.
- [14] 张智, 滕婷婷. 溶氧对发酵的影响及控制[J]. 决策管理, 2008, 21: 63-64.
- [15] 张元兴, 许学书. 生物反应器工程[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 122-136.