

粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*) D2 固态发酵山核桃 蒲壳产漆酶的营养条件研究

杨柳* 吕丹丹 邓杰勇 曹焕英 叶明

(合肥工业大学 生物与食品工程学院 安徽 合肥 230009)

摘要:【目的】为提高漆酶产量,降低生产成本,以山核桃蒲壳作为基质,对粗毛栓菌 D2 固态发酵产漆酶的营养条件进行研究。【方法】对不同碳源、氮源、碳氮比、蒲壳含量对漆酶产量的影响进行分析。【结果】山核桃蒲壳是粗毛栓菌生长的良好载体,能够促进漆酶的合成。粗毛栓菌 D2 漆酶固态发酵培养基干物质组成为:山核桃蒲壳 40% (质量比),玉米粉 24% (质量比),菜籽饼粉 36% (质量比)。发酵 6 d 时,漆酶活性为 126.8 U/g 干基。【结论】粗毛栓菌固态发酵山核桃蒲壳产漆酶具有效率高,生产成本低等优点,具有潜在的工业化应用前景。

关键词:粗毛栓菌, 固态发酵, 漆酶, 山核桃蒲壳

Nutritional conditions for laccase production by *Trametes hirsuta* D2 in solid-state fermentation using hickory hull

YANG Liu* LÜ Dan-Dan DENG Jie-Yong CAO Huan-Ying YE Ming

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China)

Abstract: [Objective] In order to increase the laccase productivity and reduce the production cost, solid-state fermentation (SSF) (using hickory hull) medium for *Trametes hirsuta* D2 has been studied. [Methods] The effects of supplementation with carbon and nitrogen sources, ratio of carbon and nitrogen source and the content of hickory hull on laccase production were investigated. [Results] The hickory hull was a good support for mycelial growth during laccase fermentation, and the corn flour and rapeseed meal were found efficient and selected as additional nutrition for laccase fermentation. The optimum solid materials in medium were consisted of 40% (W/W) hickory hull, 24% (W/W) corn flour and 36% (W/W) rapeseed meal. Under these conditions, the highest laccase activity (126.8 U/g dry substrate) was achieved after 6 days of cultivation. [Conclusion] The higher laccase productivity and lower production cost could facilitate industrial application of laccase.

Keywords: *Trametes hirsuta*, Solid-state fermentation, Laccase, Hickory hull

基金项目: 安徽省科技攻关计划重大项目(No. 09010301022)

*通讯作者: Tel: 86-551-62919368; ✉: yangliu199@163.com

收稿日期: 2013-12-26; 接受日期: 2014-01-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是含铜的多酚氧化酶,能氧化多酚、氨基苯酚、木质素、色素等生成醌类化合物、羰基化合物和水,因此被广泛地应用在工业废水的脱毒、多氯化合物的降解、纸浆废弃物的利用等方面^[1]。

漆酶主要由白腐真菌产生,如香菇^[2]、栓菌^[3-4]、黄孢原毛平革菌^[5]等。真菌漆酶在次级代谢阶段产生,限碳、限氮、限硫等条件能促进漆酶的合成^[6]。合理的培养基组成是提高漆酶生产效率的重要条件,研究表明合成培养基不利于漆酶的产生,但在合成培养基中添加栗子壳^[7]、甘蔗渣^[2]、豆秸^[8]等含木质素的原料能显著提高漆酶产量。真菌在固态基质中的生长接近其自然生长状态,所产生的漆酶具有酶活高、酶系全的优点^[2,9],因此固态发酵日益受到重视。固态发酵中原料成本占总成本的比例较大,选择廉价原料提高漆酶产量已成为研究热点。

山核桃(*Carya cathayensis* sarg)蒲壳是山核桃的外果皮,主要成分是木质纤维素,并富含多酚类单宁^[10]、苷、生物碱^[11]等化合物,许多微生物在其中难以生长,山核桃蒲壳在自然界中难以被降解,已成为山核桃产区的重要污染物。本课题组分离到一株能在山核桃蒲壳中生长并能分泌漆酶的菌株 D2,经过形态观察和 ITS 序列分析,确定菌株 D2 属于粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)。因仅使用山核桃蒲壳作为漆酶发酵基质,漆酶活性很低,本文研究了外加营养对 *Trametes hirsuta* D2 固态发酵山核桃蒲壳产漆酶的影响,以期今后的研究和工业应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*) D2,从安徽宁国市山核桃种植区朽木上筛选得到,NCBI 提交其 ITS 区序列获得登录号为 KF366913,现保藏于合肥工业大学微生物资源与应用研究室。

1.2 主要材料和试剂

山核桃蒲壳从安徽省宁国市南极乡山核桃种植基地收取,风干粉碎过 40 目筛;菜籽饼粕、玉米粉为市售,粉碎过 40 目筛;2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)购自上海生工公司;其它试剂为国产分析纯。

1.3 马铃薯-愈创木酚培养基

20% 马铃薯浸汁 100 mL,愈创木酚 0.04 mL,琼脂 2.00 g, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 固态发酵产酶与酶液制备

将保藏菌种接种至马铃薯-愈创木酚平板上,30 °C 培养 5 d。打孔器接种直径 8 mm 的菌块于装有 50 g 物料的 250 mL 三角瓶中 30 °C 培养。

粗酶液的制备:准确称取 1 g 发酵物料,加入 100 mmol/L pH 4.5 的乙酸缓冲液,30 °C、180 r/min 振荡 2 h,过滤后滤液即为漆酶粗酶液。

1.5 营养条件对产漆酶的影响

将外加碳源或氮源物质加水配成一定浓度,加入到山核桃蒲壳中,使水分含量为 60% (质量比),研究外加碳源、氮源种类和添加量对产酶的影响;将菜籽饼粉与玉米粉按一定比例混合,调节含水量为 50% (质量比),研究不同配比的玉米粉和菜籽粕对产酶的影响;将玉米粉与菜籽饼按 3:2 的比例混合后,加入山核桃蒲壳,使蒲壳分别占固体物料质量的 0、20%、40%、60%、80%、100%,调节水分含量分别为 50%、50%、60%、60%、70%、70%,研究山核桃蒲壳含量对产酶的影响。每个处理设置 5 个重复。

1.6 漆酶活力测定^[12]

10 mL 反应总体积中含 1 mL 适当稀释的粗酶液,8 mL 100 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.5),加入 1 mL 50 mmol/L ABTS 溶液以启动反应,30 °C 测定前 3 min 的 OD_{420} 变化,以沸水处理 5 min 的粗酶液作为对照。酶活力单位(U)定义为:每分钟氧化 1 μ mol ABTS 的酶量为 1 个酶活单位。

1.7 可溶性糖测定

采用苯酚-硫酸法^[13]测定。

2 结果与分析

2.1 外加碳源对粗毛栓菌 D2 固态发酵产漆酶的影响

分别向马铃薯-愈创木酚显色平板添加不同种类的碳源,比较葡萄糖、木糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、糊精、可溶性淀粉、玉米粉、羧甲基纤维素钠等对粗毛栓菌 D2 菌丝平板生长和产酶(观察变色情况)的影响,发现对粗毛栓菌 D2 平板生长和产酶最有利的单糖、双糖和多糖分别是葡萄糖、蔗糖和玉米粉。向山核桃蒲壳中添加葡萄糖、蔗糖和玉米粉,使其质量分别占培养基干重的 2%、5%和 10%,空白对照不添加任何碳源,各条件下的最高漆酶活力如表 1 所示。

从表 1 可知,玉米粉最有利于漆酶合成,其次是蔗糖,而葡萄糖对漆酶活性无明显促进作用,一般认为简单的糖有利于菌体生长,而代谢较为缓慢的多糖利于漆酶的合成^[4]。观察菌丝体在各培养基的生长状态,发现加入糖类物质后,都促进了菌丝体的生长,这与山核桃蒲壳中缺乏容易利用的碳源物质有关。外加碳源对漆酶活性的影响与碳源的添加量有关系,10% (质量比)的碳源添加量对漆酶生产有一定的抑制作用,这是因为山核桃蒲壳含氮量较低(凯氏定氮法测得氮含量约为 1%),较高的碳氮比有利于菌丝生长但不利于漆酶的合成^[14]。

2.2 外加氮源对粗毛栓菌 D2 固态发酵产漆酶的影响

在前期实验中,在马铃薯浸汁液体培养基中加

入终浓度为 1% (质量体积比)的硫酸铵、硝酸钠、氯化铵、酒石酸钠、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、菜籽饼粕、米糠、麸皮、豆饼粉等有机氮源以考察不同氮源对粗毛栓菌 D2 产酶的影响,实验发现对产酶最有利的无机氮源、可溶性有机氮源和不可溶的有机氮源分别是硫酸铵、酵母膏和菜籽饼粕。在预实验的基础上选择了向山核桃蒲壳中加入不同量的硫酸铵、酵母膏和菜籽饼粕考察其对粗毛栓菌 D2 固态发酵产漆酶的影响,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,氮源种类和浓度对漆酶产量影响较大。

少量添加硫酸铵对漆酶合成无明显促进作用,但随着硫酸铵添加量的增加,漆酶合成受到抑制,1.0% (质量比)的硫酸铵使漆酶活性较对照减少 17.6%,且发现加入硫酸铵对菌丝生长无明显促进作用。添加酵母膏可以促进漆酶合成,添加 7%酵母膏比未添加的漆酶活性提高了 180%,但酵母膏含量为 10% (质量比),漆酶活性急剧下降。添加 10% (质量比)菜籽饼粕的漆酶活性最高,较对照提高 250%。实验中发现酵母膏和菜籽饼粕能促进菌丝的生长,有机氮源添加量越高,菌丝生长越好。有机氮源浓度对漆酶产量的影响主要与其含氮量有关,酵母膏中含氮量为 8.5%,菜籽饼粕中含氮量为 2.5%,因过量的氮会抑制漆酶的合成^[15],所以漆酶合成受酵母膏浓度的影响较大。

表 1 外加碳源对粗毛栓菌 D2 固态发酵山核桃蒲壳产漆酶活力的影响		
Table 1 Effect of supplemental carbon sources on laccase production by <i>Trametes hirsuta</i> D2 under SSF using hickory hull		
碳源	浓度	漆酶活力
Carbon source	Content (% , W/W)	Laccase activity (U/g ds)
Control		12.714±2.609
Glucose	2	13.831±1.730
	5	15.528±2.273
	10	11.827±0.659
Sucrose	2	22.327±3.433
	5	28.117±3.980
	10	26.861±2.892
Corn flour	2	31.177±3.744
	5	36.377±0.272
	10	28.624±1.339

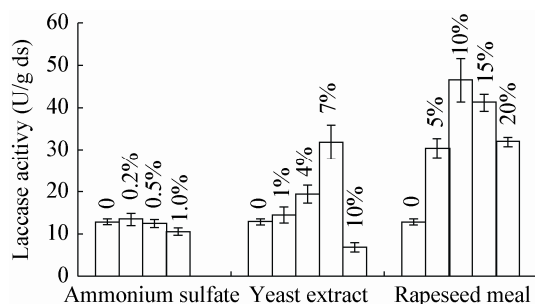


图 1 外加氮源对粗毛栓菌 D2 固态发酵山核桃蒲壳产漆酶活力的影响

Figure 1 Maximum laccase activities obtained by *T. hirsuta* D2 grown on hickory hull under SSF with different amounts of initial nitrogen supplementation

注：柱中数字为各氮源的添加量(质量比).

Note: Numbers on bars indicate initial nitrogen percentages (W/W).

2.3 不同菜籽饼与玉米粉比例对漆酶合成的影响

山核桃蒲壳中可利用的碳、氮都较缺乏,需要同时添加碳、氮源,合理的营养组成才能有效促进漆酶的合成^[14]。因山核桃蒲壳含量对产酶有影响,这部分实验培养基不加入山核桃蒲壳。发酵培养基由玉米粉、菜籽饼粕和水组成,水分含量为 50%。在含不同菜籽饼/玉米粉的培养物中,菌丝均生长旺盛,生物量没有明显差别,但不同玉米粉与菜籽饼粉配比对产酶影响较大,如图 2 所示。当菜籽饼/玉米粉为 6:4 (质量比)时,漆酶活性最高,为 39.368 U/g 干基。当培养基为玉米粉或菜籽饼粉时,酶活非常低,调节菜籽饼/玉米粉比例,改变了培养基的碳氮比,说明合理的碳氮比能够促进漆酶的合成,这与 D'Agostini 的研究一致^[14]。

2.4 山核桃蒲壳含量对漆酶合成的影响

在菜籽饼/玉米粉为 6:4 (质量比)的混合物料中加入不同量的山核桃蒲壳进行漆酶发酵,定时测定漆酶活性和可溶性糖含量,结果见图 3、4。

从图 3 可知,山核桃蒲壳含量对漆酶高峰出现时间和高峰数值均有明显影响。从图 4 可知,培养基中初始可溶性糖随山核桃蒲壳量增加而减少,可溶性糖的减少量与生物量增加有密切关系。从菌丝的生

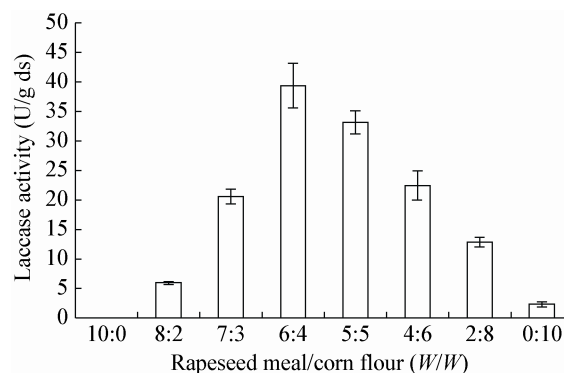


图 2 菜籽饼粕/玉米粉比例对粗毛栓菌 D2 产漆酶的影响

Figure 2 Effect of ratio of rapeseed meal and corn powder on laccase production by *T. hirsuta* D2

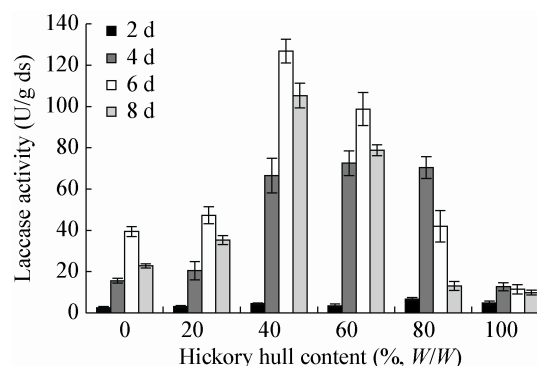


图 3 山核桃蒲壳含量对粗毛栓菌 D2 产漆酶的影响

Figure 3 Effect of hickory hull contents on laccase production by *T. hirsuta* D2

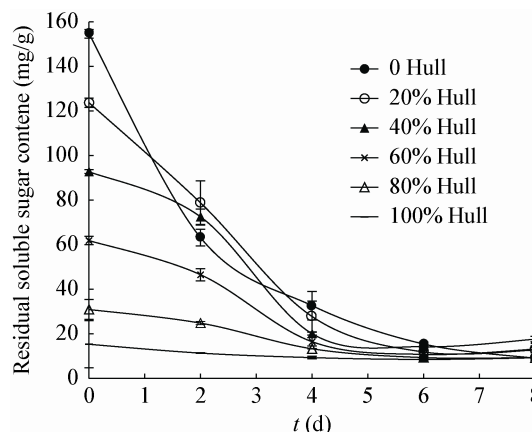


图 4 漆酶发酵过程中可溶性糖变化曲线

Figure 4 Changes of soluble sugar contents during laccase fermentation by *T. hirsuta* D2

长情况来看,菌丝浓密程度随山核桃蒲壳量增加而减少。培养前4天,可溶性糖被快速消耗,4 d后漆酶活性增加很快。山核桃蒲壳能显著提高漆酶活性,漆酶活性从无山核桃蒲壳的39.4 U/g提高至40%山核桃蒲壳下的126.8 U/g。因蒲壳中易利用的营养物质贫瘠,蒲壳提高漆酶产量原因不是调节了营养物质的碳氮比,可能的原因是:(1)山核桃蒲壳中含有没食子酸、胡桃醌等多酚物质,多酚物质可能会促进漆酶的分泌^[16];(2)蒲壳提供了真菌生长的良好载体。为弄清山核桃蒲壳中的多酚物质对产酶的影响,进行了如下两个实验:(1)用乙醇提取法除去蒲壳中的多酚^[17],发现除去多酚的山核桃蒲壳较未脱除多酚的蒲壳更能提高漆酶活性;(2)按1:2料液比将山核桃蒲壳在40℃浸泡水中2 d,将浸泡液加入到玉米粉-菜籽饼粉中进行发酵,发现漆酶活性无明显增加。以上两个实验说明山核桃蒲壳中的多酚不是提高漆酶活性的原因。山核桃蒲壳中纤维素含量为27.14%,木质素含量为48.17%,结构疏松,是丝状菌生长的良好载体,同时加入蒲壳减少了生物量,合适的生物量能够促进漆酶的合成^[8]。

综上,漆酶产量受到生物量和山核桃蒲壳促进作用的双重影响,在山核桃蒲壳含量低于40%的时候,蒲壳对漆酶的促进作用占主导;而在山核桃蒲壳含量高于40%后,生物量因营养贫瘠而明显减少,造成漆酶活性降低,但产酶高峰因营养贫瘠而提前。

3 讨论

对山核桃蒲壳的研究主要集中在其中的活性成分上^[10-11],尚未有利用山核桃蒲壳作为固态发酵基质的报道,本研究首次报道了粗毛栓菌D2固态发酵山核桃蒲壳产漆酶的情况。山核桃蒲壳木质纤维素含量高,易被粗毛栓菌利用的物质很少,粗毛栓菌在其中生长缓慢。合理添加营养物质能够促进真菌的生长和产酶。在含木质纤维素原料的漆酶固态发酵中,外加碳、氮源对产酶的影响因菌种、木

质纤维素原料不同而有较大差异。如在糙皮侧耳(*P. ostreatus*) 2191以树叶为基质时,硝酸钠最有利于产酶,而以麦秸为基质,则是硫酸铵最为有利^[2]。王欣等报道杂色栓菌(*Trametes versicolor*) SYBCL3以木屑为基质时,1.0%麦芽糖、2.5%硝酸钠和15%豆粕最有利于漆酶的产生^[18]。本实验中粗毛栓菌D2在以山核桃蒲壳为基质进行漆酶固态发酵时,外加玉米粉和菜籽饼粉显著提高了漆酶产量。在发酵培养基中加入木质纤维素提高漆酶产量的原因因木质纤维素原料不同而有较大差异,如橄榄叶中的酚化合物是漆酶的良好诱导剂^[3],葡萄籽中高含量的木质素减缓了还原糖的释放速度从而维持培养基中的低糖浓度^[19],橘子皮因含营养而促进漆酶产生^[4]。研究发现固态发酵漆酶的产量和生物量有一定关系^[8],但过于旺盛的生长并不适合漆酶的产生,合适的生物量是提高漆酶产量的重要因素。本实验中发现山核桃蒲壳中含有的多酚对漆酶生产无促进作用,但山核桃蒲壳质地疏松,内表面大,是丝状真菌良好的载体,添加山核桃蒲壳能够减少粗毛栓菌的生长,合适的生物量与生长状态是山核桃蒲壳提高漆酶产量的主要原因。

影响漆酶工业化生产和应用的主要因素是酶的生产效率和生产成本。真菌产漆酶一般需要8~20 d^[2,4-5,7-9,15,19],且长时间的固态发酵易受杂菌污染。缩短发酵时间、减少染菌率是提高漆酶生产效率的重要手段。本实验中漆酶发酵周期是6 d,发酵周期短;同时山核桃蒲壳富含胡桃醌、多酚等抑菌物质,发酵过程不易染菌。本实验用到的山核桃蒲壳和菜籽饼粉都是农林副产物,价格低廉。较高的生产效率和较低的生产成本使其具有重要的工业生产和实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] Desai SS, Nityanand C. Microbial laccase and their application: a review[J]. Asian Journal of Biotechnology, 2011, 3(2): 98-124.
- [2] Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, et al. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition[J].

- Bioresource Technology, 2008, 99(3): 457-462.
- [3] Aydinoglu T, Sargin S. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(2): 215-222.
- [4] Mikiashvili N, Elisashvili V, Wasser S, et al. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(13): 955-959.
- [5] 邱爱莲, 李文燕, 范晓静, 等. 黄孢原毛平革菌突变株抗碳氮营养阻遏产漆酶碳氮生理调控机理[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 334-344.
- [6] Elisashvili V, Kachlishvili E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(1): 37-42.
- [7] Gomez J, Pazos M, Rodrigue S, et al. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriopsis rigida* under solid-state conditions[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 68(3): 315-319.
- [8] Philippoussis A, Diamantopoulou P, Papadopoulou K. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2011, 27(2): 285-297.
- [9] Silverio SC, Moreira S, Milagres AMF, et al. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(3): 365-373.
- [10] 吴峰华, 罗自生, 何志平, 等. 山核桃外果皮总酚的微波辅助提取工艺优化及其抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(8): 109-113.
- [11] 姜著英, 宣贵达, 李林林. 山核桃蒲壳化学成分定性鉴定及总生物碱提取工艺研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2009, 36(4): 442-444, 449.
- [12] Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, et al. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4627-4632.
- [13] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅, 等. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 54-59.
- [14] D'Agostini EC, Mantovani TRD, do Valle JS, et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation[J]. Scientia Agricola, 2011, 68(3): 295-300.
- [15] Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(11): 1531-1538.
- [16] Elisashvili V, Kachlishvili E, Khardziani T, et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(10): 1091-1096.
- [17] 赵国建, 王向东, 王焕. 提取方法对核桃青皮多酚提取效果的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(增刊1): 351-355.
- [18] 王欣, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 培养条件对 *Trametes versicolor* SYBC L3固态发酵产漆酶的影响[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 174-179.
- [19] Moldes D, Gallego PP, Couto SR. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(6): 491-495.