

红芝固态发酵产漆酶条件研究

赵亮亮^{1,2} 李燕荣¹ 傅宏兵¹ 叶红¹ 谌斌²

(1.江苏洋河酒厂股份有限公司,江苏 宿迁 223800;2.广西环境工程与保护评价重点实验室,广西 桂林 541004)

摘要: 对红芝固态发酵产漆酶的培养基和培养条件进行了研究。结果表明,适宜的固态发酵培养基为:以 1.5:1 甘蔗渣和麦麸为基质,葡萄糖 0.5%、硫酸铵 5%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、培养基含水率 73%,适宜的固态培养条件为:初始 pH 值 4.0,接种量 20%(V:W),28℃静置培养 8 d,酶活达到最高 23803 U/g 干曲。

关键词: 红芝; 漆酶; 固态发酵

中图分类号:Q93-3;Q815;TS261.1;TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)04-0025-04

Research on Solid Fermentation of *Ganoderma lucidum* to Produce Laccase

ZHAO Liang-liang^{1,2}, LI Yan-rong¹, FU Hong-bin¹, YE Hong¹ and CHEN Bin²

(1.Yanghe Distillery Co.Ltd., Suqian, Jiangsu 223800; 2. Key Lab of Environmental Engineering & Protection and Assessment, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: The culture mediums and culture conditions of solid fermentation of *G.lucidum* to produce constitutive laccase were investigated. The optimum culture mediums were composed of substrate (the ratio of bagasse to wheat bran appropriate was 1.5:1), 0.5 % glucose, 5 % ammonium sulfate, 0.01 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 73 % moisture content of substrate. The best culture conditions were summed up as follows: the initial pH value was 4.0, inoculating quantity was 20%(V:W), and culture at 28℃ for 8 d. The activity of the produced laccase could reach 23803 U/g dry starter eventually.

Key words: *Ganoderma lucidum*; laccase; solid fermentation

漆酶(Laccase)是一类含铜的多酚氧化酶,可催化氧化多种芳香类化合物,具有作用底物广泛和不需要 H_2O_2 参与反应等优点^[1]。在食品、造纸、纺织、环保、新能源开发等诸多领域具有潜在的应用价值。在酿酒工业中,漆酶能减少酿酒酵母酒精发酵材料中的酚类抑制物,提高酒精产量;漆酶处理过的葡萄酒、啤酒,在品质、色度、稳定性方面都较传统方法好,有利于长期贮存并保持澄清^[2]。同时漆酶可加快酒体中醇醛的氧化,可用于白酒催陈。

固态发酵是在没有或几乎没有游离水的状态下,微生物利用自然基质或惰性基质作为营养成分和支持物的发酵过程^[3]。与液态深层发酵相比,固态发酵具有原料来源广泛、生产工艺简单、设备投资小、生产效率高、产物易分离、环境污染小及易于放大培养等特点^[4]。因此,固态发酵受到发酵行业的广泛研究与应用。

本文对红芝固态发酵的产漆酶工艺条件进行研究,旨在通过对固态发酵培养基和培养条件的优化,缩短发酵周期,提高产酶效率,降低生产成本,为漆酶的工业生

产开发与应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

红芝(*G. lucidum*),广西师范大学微生物研究所保藏菌种。

1.2 原料

甘蔗渣、木屑、玉米芯、稻草、稻壳、麦麸烘干,用植物粉碎机粉碎,过 20 目筛。

1.3 培养基

1.3.1 菌种保藏培养基

PDA 斜面培养基。

1.3.2 种子培养基

在 PDA 培养基中不加琼脂,加入 KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, VB_1 0.01 g/L,调节 pH 为 4.5,加玻璃珠,121℃灭菌 20 min。

1.3.3 固态发酵培养基^[5]

基金项目:广西环境工程与保护评价重点实验室基金资助项目(桂科能 0702Z022);广西环境工程与保护评价重点实验室平台建设项目[桂科研(2008)27号]。

收稿日期:2011-02-14

作者简介:赵亮亮(1983-),男,江苏宿迁人,助理工程师,硕士,从事发酵工程和酶工程研究。

优先数字出版时间:2011-03-11;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110311.1053.001.html?uid=>。

木质纤维废弃物(甘蔗渣、木屑、玉米芯、稻草、稻壳) 57.3 %, 麦麸 38.2 %, 葡萄糖 0.5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 %, CaCl_2 0.48 %, KH_2PO_4 0.5 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %, CuSO_4 0.02 %, 物料充分混匀后加入 2 倍的水, 于 121 °C 灭菌 60 min。

1.4 培养方法

1.4.1 种子液制备

取 5 块直径为 10 mm 的菌块, 接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、120 r/min 恒温振荡培养 5 d, 制成种子液。

1.4.2 固态发酵培养

在 250 mL 三角瓶中装入 10 g(干重)固态发酵培养基, 接入 10%(V:W)的种子液, 置于 28 °C 条件下静置培养, 定时用打孔器在不同部位取样测定酶曲的漆酶活力。

1.4.3 放大培养

将 200 g(干重)的固态产酶培养基装入聚丙烯塑料袋中(15×30 cm), 中间打孔, 用棉花封口, 灭菌后, 按 20%(V:W)的接种量接入种子液。置于 28 °C 的培养箱中静置培养。定时用打孔器在不同部位取样, 测定漆酶活力和含水率。

1.5 分析测定方法

精确称取 1 g 湿曲, 加入 99 mL 蒸馏水, 充分搅匀, 在 25 °C、120 r/min 恒温振荡器中振荡 3 h, 再取滤液于 4000 r/min, 离心 5 min, 取上清液稀释后测定漆酶活力, 测定方法与文献[6]漆酶活力测定方法相同。

同时称取 1 g 湿曲置于 50 °C 烘箱中烘干至恒重, 计算含水率 β :

$$A=B \times N \times 100$$

$$C=A/(1-\beta)$$

式中: A 为湿曲漆酶活力 (U/g), B 为酶曲液的漆酶活力 (U/mL), N 为酶曲液稀释倍数, C 为干曲漆酶活力 (U/g), β 为含水率 (%)。

2 结果与分析

2.1 不同纤维原料对固态发酵产酶的影响

分别选用甘蔗渣、木屑、玉米芯、稻草、稻壳等纤维废弃物作为固态发酵基质, 28 °C 条件下静置培养, 定时取样测定漆酶活力。不同纤维原料对产酶的影响结果见表 1。以木屑作为纤维原料漆酶酶活最高, 以甘蔗渣作为原料产酶周期最短, 综合考虑, 选择甘蔗渣作为固态发酵的纤维原料, 达到最高酶活的时间为 8 d。而且甘蔗渣透气性好, 有利于菌丝体的生长代谢及漆酶的积累。

2.2 甘蔗渣和麦麸的比例对产酶的影响

调整固态发酵培养基中甘蔗渣与麦麸的比例分别为 0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1 和 3:1, 于 28 °C 条件下静置培

表 1 不同纤维原料对产酶的影响

纤维原料	漆酶活力 (U/g)	周期 (d)
甘蔗渣	8849	8
木屑	8560	10
玉米芯	9237	12
稻壳	7692	15
稻草	9069	15

养 8 d, 测定不同物料比例对产漆酶的影响, 结果见图 1。

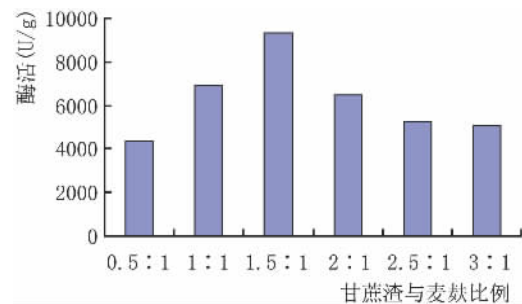


图 1 甘蔗渣与麦麸的比例对产漆酶的影响

图 1 结果表明, 当甘蔗渣和麦麸的比例为 1.5:1 时, 漆酶活力最高。在固态发酵培养基中添加麦麸, 有利于菌体生长, 麦麸营养成分丰富, 除了含有微生物生长所必需的碳源、氮源外, 还含有大量的微量元素和生长因子。当麦麸较少时, 菌种生长缓慢, 漆酶活力较低, 麦麸过量时, 菌体生长过旺, 不利于漆酶的积累^[7]。甘蔗渣和麦麸加入量的不同比例, 导致培养基的营养成分和透气性发生改变, 影响菌体的生长代谢, 从而影响漆酶的产生。

2.3 葡萄糖用量对产酶的影响

在固态发酵培养基中分别添加 0、0.5 %、1 %、1.5 % 和 2 % 的葡萄糖, 于 28 °C 条件下静置培养 8 d, 考察葡萄糖含量对产漆酶的影响, 结果见图 2。

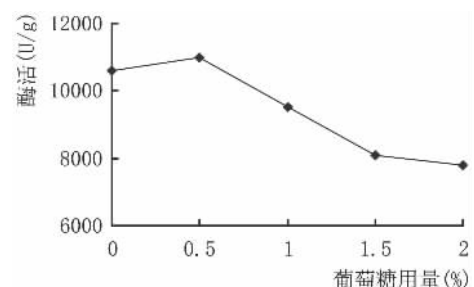


图 2 葡萄糖用量对产酶的影响

从图 2 可知, 葡萄糖浓度为 0.5 % 时, 漆酶活力达到最高, 葡萄糖浓度过高时, 抑制漆酶的分泌, 添加适量的小分子碳源有利于促进菌丝体的生长, 但是当小分子碳源浓度过高时菌丝初始积累过多, 反而不利于漆酶的分泌^[8]。

2.4 硫酸铵用量对产酶的影响

在固态发酵培养基中添加不同浓度的硫酸铵, 使其含量分别为: 0、2.5 %、5 %、7.5 % 和 10 %, 28 °C 条件下静

置培养 8 d,考察硫酸铵用量对产酶的影响,结果见图 3。

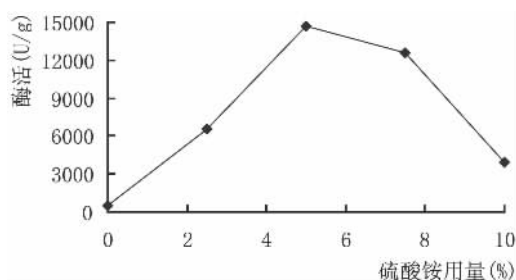


图 3 硫酸铵用量对产酶的影响

由图 3 可知,增加硫酸铵可以促进漆酶的产生,当其浓度为 5 % 时,漆酶酶活力达到最高,当其浓度大于 5 % 时,漆酶活力逐渐下降,而其浓度大于 7.5 % 时,漆酶活力下降明显。

2.5 培养基含水量对产酶的影响

固态发酵中,培养基含水量直接关系到氧的传递和发酵热的散失,从而影响到菌体的生长和漆酶的形成^[9]。调节固态发酵培养基的含水量,在 28 °C 条件下静置培养 8 d,考察培养基含水量对漆酶合成的影响,结果见图 4。

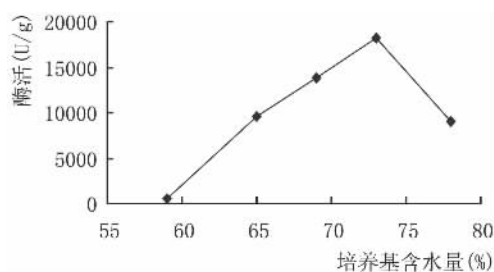


图 4 培养基含水量对产酶的影响

由图 4 可知,培养基中的含水量对固态发酵产酶影响较大,最适含水量为 73 %。培养基含水量过高和过低都不利于漆酶的产生,含水量过低,不利于营养物质传递与溶解,抑制了菌体的生长;含水量过高,培养基的透气性较差,导致培养基中的溶氧不足,同样会影响菌体的生长,从而导致漆酶酶活力的下降。

2.6 培养基初始 pH 值对产酶的影响

用 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH,调节固态发酵培养基的初始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0,28 °C 条件下静置培养 8 d,考察 pH 值对产酶的影响,实验结果见图 5。

由图 5 可知,培养基初始 pH 在酸性条件下有利于红芝漆酶的合成,初始 pH 值为 4.0 时,漆酶活力达到最高,之后随着 pH 值的增大,漆酶活力下降。pH 值是通过影响细胞膜所带的电荷,影响细胞对营养物质的吸收和代谢产物的分泌,从而影响菌丝体的生长代谢,同时不同 pH 值也影响漆酶稳定性。

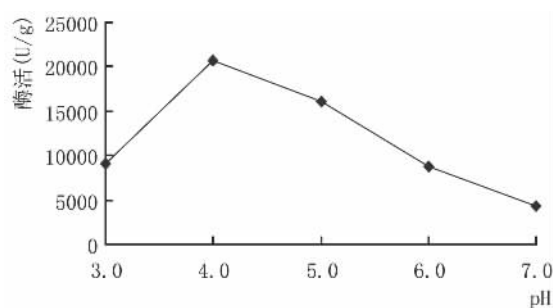


图 5 培养基初始 pH 值对产酶的影响

2.7 培养温度对产酶的影响

将固态发酵培养基分别置于 25 °C、28 °C、31 °C 和 35 °C 条件下恒温培养 8 d,考察温度对固态发酵产酶的影响,结果见图 6。

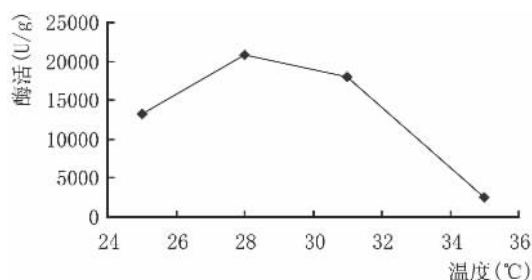


图 6 培养温度对产酶的影响

图 6 结果表明,随着温度的升高,漆酶活力先上升后下降,28 °C 时,漆酶酶活力达到最高,之后随着温度升高酶活迅速下降,培养温度为 35 °C 时,酶活仅为最高酶活的 10 % 左右。温度升高改变了微生物的生理生化过程,从而影响漆酶的合成。

2.8 Cu²⁺ 对产酶的影响

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,微量的铜离子有利于漆酶的合成,在固态发酵培养基中加入 CuSO₄·5H₂O,使其浓度分别为:0、0.01 %、0.02 %、0.03 %、0.04 % 的 CuSO₄·5H₂O,在 28 °C 恒温静置培养 8 d,考察 Cu²⁺ 浓度对固态发酵产酶的影响,结果见图 7。图 7 结果表明,微量的 Cu²⁺ 有利于漆酶的合成,当 CuSO₄ 浓度为 0.01 % 时,漆酶活力达到最高,过高的 Cu²⁺ 抑制漆酶的合成。

2.9 接种量对产酶的影响

在固态发酵培养基中分别接入 5 %、10 %、15 %、20 %、25 % (V/W) 的液体种子液,28 °C 恒温静置培养 8 d,考察不同的接种量对漆酶合成的影响,结果见图 8。

图 8 表明,随着接种量的增加,漆酶酶活逐渐提高,接种量为 20 % 时,漆酶活力达到最高(23803 U/g),之后随着接种量增加酶活下降。当接种量较少时,菌体生长缓慢,营养物质得不到有效利用,不利于漆酶的合成;而接种量过大时,菌体生长旺盛,同样会抑制漆酶分泌。

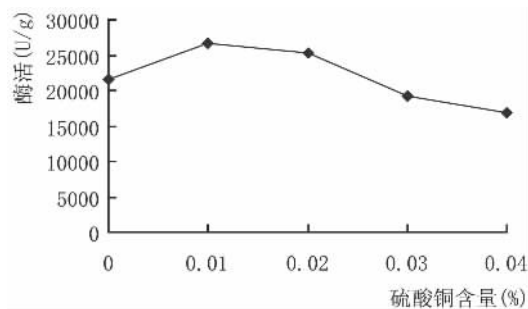
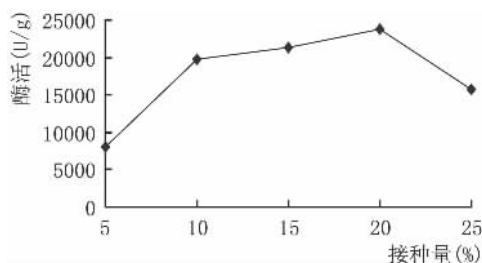
图7 Cu²⁺浓度对产酶的影响

图8 接种量对产酶的影响

3 结论

3.1 红芝固态发酵产漆酶, 纤维原料以甘蔗渣为宜, 固态发酵必须添加麦麸, 甘蔗渣与麦麸的适宜比例为 1.5:1。

3.2 在固态培养基中添加适量的小分子碳源葡萄糖和无机氮源硫酸铵, 有利于促进漆酶的合成, 葡萄糖和硫酸铵的适宜浓度分别为 0.5 %和 5 %。

3.3 对发酵条件的研究表明: 以甘蔗渣和麦麸作为基

质, 适宜含水量为 73 %, 适宜的初始 pH 值为 4.0, 培养温度为 28 ℃。

3.4 在培养基中添加微量的 Cu²⁺ 能够促进漆酶的合成, Cu²⁺ 的适宜浓度为 0.01 %。

3.5 固态发酵的适接种量为 20 % (V:W), 最高漆酶活力达 23803 U/g。

参考文献:

- [1] 彭丹, 谢更新, 曾光明, 等. 黄孢原毛平革菌固态发酵产漆酶的研究及应用[J]. 环境科学, 2008, 29(12): 3568-3573.
- [2] Brenna O. Immobilized laccase used for removal of hydroxybenzene in wine[J]. Biotechnol Lett, 1994, 16(1): 237-238.
- [3] Pandey A, Selvakumar P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes[J]. Current Science, 1997, 7: 149-162.
- [4] 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.
- [5] 施晓燕. Phellinus sp. SYBC-L2 固态发酵产漆酶条件的优化及其酶学性质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [6] 赵亮亮, 谌斌, 李燕荣, 等. 红芝组成型漆酶酶学性质的研究[J]. 北方园艺, 2010, (5): 138-140.
- [7] 卢蓉. Coriolus versicolor 产漆酶及其对染料脱色的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [8] 高恩丽, 仲伟佳, 付小兰. 云芝菌固态发酵产漆酶及其对二氯酚脱氯作用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(6): 32-36.
- [9] 孙芹英, 葛春梅, 张洁. 灵芝固态发酵产漆酶及对秸秆木质素的降解[J]. 合肥学院学报, 2007, 17(3): 6-9.

(上接第 24 页)

提供前驱物质。经多轮次循环, 酒醅逐步形成明显的复合酱香香气。

3.3 酱香型白酒的基酒有酱香、醇甜、窖底香之分, 窖底香基酒比例高低, 影响着酱香型白酒产品质量, 窖底香酒中己酸乙酯含量适当, 可克服酱香型白酒后尾苦涩感。通过复合产酸菌培养底窖泥, 应用于窖池, 使窖底香基酒提高近 2 %左右, 且己酸乙酯含量有明显升高。

3.4 通过微生物技术在酱香型白酒生产中系统应用, 所生产的各轮次各类型酒贮存组合、勾调后的综合样, 微黄透明, 酱香突出, 酒体丰满, 幽雅细腻, 醇和绵柔, 空杯留香持久。

参考文献:

- [1] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 35-38.
- [2] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 48-49.
- [3] 刘洪晃, 冯树仙. 几种酒曲中游离氨基酸的测定[J]. 酿酒, 1991, (5): 16-18.
- [4] 赵东, 李扬华, 向双全等. 顶空固相微萃取气相色谱-质谱法测定曲药中的香味成分[J]. 酿酒科技, 2006, 143(5): 92-94.
- [5] 余晓, 尹建军, 胡国栋. 白酒中含氮化合物的分析研究[J]. 酿酒, 1992, (1): 71-74.

团结酿酒八方人士 传播科技四海知识