

# 一株木质素降解白腐菌的筛选、鉴定及其产漆酶培养基的优化

邓诗贵,杨晨军,冯加洲,吴晓玉\*

(江西农业大学生物科学与工程学院,南昌市发酵应用技术重点实验室,江西 南昌330045)

**摘要:**为筛选产木质素降解酶的菌株,采用苯胺蓝-PDA平板法和愈创木酚-PDA平板法从铁皮石斛生长的树皮中筛选到菌株 SHIHU-X2,经 ITS 测序分析将 SHIHU-X2 鉴定为白腐真菌白黄小脆柄菇(*Psathyrella candolleana*)。应用响应面法优化产漆酶培养基,结果表明 SHIHU-X2 菌株产漆酶的最优培养基是:去皮马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 1.24 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,酒石酸铵 0.02 g/L,  $\text{CuSO}_4$  0.01 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.56 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.057 g/L。漆酶活力从初始产酶培养基 1.11 U/mL 提高到响应面优化后的 2.32 U/mL,漆酶活力提高了 109%。

**关键词:**白黄小脆柄菇;木质素;漆酶;筛选;鉴定;培养基优化

## Screening and Identification of A Lignin-degrading White Rot Fungi and Optimization of Its Laccase-producing Medium

DENG Shi-gui, YANG Chen-jun, FENG Jia-zhou, WU Xiao-yu\*

(College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang Key Laboratory for Fermentation Application Technology, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

**Abstract:** In order to screen strains that could degrade lignin, the strain SHIHU-X2 was screened from bark growing from *Dendrobium officinale* using the aniline blue-PDA plate and guaiacol-PDA plate. By ITS sequencing analysis, SHIHU-X2 was identified as the white rot fungus - *Psathyrella candolleana*. In order to enhance the concentration of laccase with strain SHIHU-X2, response surface analysis methodology were used to optimize the fermentation medium. Results showed that the optimal culture medium for laccase production by strain SHIHU-X2 were peeled potato 200 g/L, glucose 20 g/L, peptone 1.24 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L, ammonium tartrate 0.02 g/L,  $\text{CuSO}_4$  0.01 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.56 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.057 g/L. The ability of laccase production increased from 1.11 U/mL in the initial medium to 2.32 U/mL after the response surface was optimized, and the ability of laccase production increased by 109%.

**Key words:** *Psathyrella candolleana*; lignin; laccase; screening; medium optimization

引文格式:

邓诗贵,杨晨军,冯加洲,等.一株木质素降解白腐菌的筛选、鉴定及其产漆酶培养基的优化[J].食品研究与开发,2019,40(16):178-184

DENG Shigui, YANG Chenjun, FENG Jiazhou, et al. Screening and Identification of A Lignin-degrading White Rot Fungi and Optimization of Its Laccase-producing Medium[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 178-184

木质素是植物细胞壁的重要组成部分,是一种非

多糖高分子物质,在自然界中的产量仅次于纤维素<sup>[1]</sup>。木质素主要由愈创木基丙烷单元、紫丁香基丙烷单元和对羟基苯丙烷单元通过碳碳键和醚键联接聚合而成<sup>[2]</sup>,分子量 600 kDa~1 500 kDa<sup>[3]</sup>。木质素主要存在于植物的木质结构中,使细胞壁硬化,增加细胞的刚性<sup>[4]</sup>。

作者简介:邓诗贵(1987—),男(汉),硕士研究生,从事微生物资源利用研究。

\*通信作者:吴晓玉,教授。

在植物细胞壁中,木质素和半纤维素之间相互作用形成牢固的结合层将纤维素包埋其中,由于木质素的非水溶性,使酶与纤维素不能良好接触,限制了消化酶对细胞壁及细胞内容物的分解功能<sup>[5]</sup>。木质素是所有天然有机产物中最难降解的物质<sup>[6]</sup>。

相关研究表明,木质素采用物理法、化学法处理时存在能耗高、“二次污染”等缺陷;而微生物降解木质素具有专一性强和无环境污染等特点,具有良好的应用前景<sup>[7]</sup>。自然环境下,木质素降解是由多种微生物共同作用的结果,降解能力由强到弱依次为真菌、放线菌和细菌。真菌中属白腐菌对木质素降解能力最强,可以将木质素完全降解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sup>[8]</sup>。白腐菌在降解天然木质纤维素时,先降解半纤维素,以产生大量的碳源供菌丝生长,然后开始降解木质素,最后半纤维素、木质素和纤维素三者同时被降解<sup>[9]</sup>。

木质素高聚物在微生物产生的木质素降解酶作用下,断裂结构单元间连接键,从而分解为低分子物质。木质素降解酶系主要包括漆酶(laccases, Lac)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, Mnp)和木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, Lip)。漆酶在降解木质素时,同时催化解聚和聚合反应;在 Lip 或 Mnp 等其他酶协同作用时,以抑制产物重新聚合,会提高木质素降解效率<sup>[10-11]</sup>。漆酶广泛用于染料脱色,纸浆漂白以及畜牧业生产中。本研究从铁皮石斛生长的树皮中筛选到 1 株产木质素降解酶的真菌——白黄小脆柄菇,并对其产漆酶条件进行优化,为后续白腐菌漆酶的工业化生产和应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基

PDA 培养基(g/L):去皮马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;苯胺蓝-PDA 培养基:灭菌后添加用无菌过滤器加入 0.1 g/L 苯胺蓝<sup>[12]</sup>;愈创木酚-PDA 培养基:灭菌加入 0.4% 的愈创木酚<sup>[13]</sup>;初始产酶培养基(g/L):去皮马铃薯 200,葡萄糖 20,蛋白胨 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, 酒石酸铵 0.02, CuSO<sub>4</sub> 0.01, MgSO<sub>4</sub> 0.3, MnSO<sub>4</sub> 0.03。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖、蛋白胨、乙酸、乙酸钠、酒石酸铵、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>:西陇化工股份有限公司,以上化学试剂皆为分析纯;ABTS:aladdin 公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂及扩增引物:湖南擎科生物技术有限公司;SW-CJ-1D 型超净工作台:江苏苏洁净化设备厂;SKY-2112B 型恒温双层摇床:上海苏坤仪器仪表有限公司。

### 1.2 菌种分离

取 1 g 铁皮石斛生长的腐木用研钵研碎,加入 9 mL 的无菌水稀释,放入 200 r/min 的振荡器中振荡 1 h,制成 10<sup>-1</sup> 腐木悬液,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,依次 10 倍递增系列稀释至 10<sup>-6</sup>,每个梯度的样品取 100 μL 接种到苯胺蓝-PDA 培养基上,置于 30 °C 培养箱中培养,培养 10 d,后挑取在苯胺蓝-PDA 平板上有退色变化的单一菌种再接种到愈创木酚-PDA 培养基上,置于 30 °C 培养箱中培养,培养 10 d。培养基中苯胺蓝和愈创木酚分别可以检测过氧化物酶和漆酶的产生与否,通过两种培养基可以得到同时产过氧化物酶和漆酶的菌株。

### 1.3 菌种的鉴定

在筛选培养基上培养选出的单一菌株转接至 PDA 培养基,30 °C 培养 5 d~7 d,挑取菌丝在显微镜下观察其菌丝形态。

挑取筛选出的菌株的菌丝采用 CTAB 法提取总 DNA,采用真菌通用引物 ITS1:TCCGTAGGTGAACCT-GCGG,ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR 反应体系(50 μL):PCR Mix 25 μL,ITS1 (10 μmol/L) 2 μL,ITS4 (10 μmol/L) 2 μL,Template 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 20 μL。反应条件:①98 °C,2 min,②98 °C,10 s,54 °C,10 s,72 °C,10 s,35 个循环,③72 °C,5 min。引物合成和 PCR 扩增产物测序由湖南擎科生物技术有限公司完成。菌株序列与 GenBank 数据库序列进行相似性分析,并加入 *Phanerochaete chrysosporium* (黄孢原毛平革菌——白腐真菌中对木质素降解研究最透彻的模式菌株<sup>[8,14]</sup>)的 rDNA-ITS 基因序列作为外参,并用 MEGA 6.06 软件包中 Neighbor-joining (kimura 2-parameter model, bootstrap 1000)法构建系统发育树。

### 1.4 菌株液体发酵

保藏于 PDA 斜面的菌株 SHIHU-X2,经新制的 PDA 培养基平板上活化,28 °C 下培养 7 d,在菌株活化后的平板上用无菌打孔器制造出直径为 5 mm×5 mm 菌塞块,将 10 个菌块转接到 50 mL 的产酶培养基中(250 mL 三角瓶),30 °C 摇床培养 5 d,5 000 r/min,离心 10 min 取上清液测定木质素降解酶活力。

### 1.5 木质素降解酶培养基的优化

对初始产酶培养基发酵液 Mnp、Lip 和 Lac 进行测定,比较 3 种木质素降解酶活的大小,确定以漆酶产量为评价指标来优化 SHIHU-X2 产木质素降解酶培养基。

#### 1.5.1 Plackett-Burman 试验设计

Plackett-Burman 试验可以快速地从中从众多的因素

中有效地确定最主要的几个因素,供进一步研究<sup>[15]</sup>。分别从蛋白胨、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、酒石酸铵  $\text{CuSO}_4$  6个因素中筛选出对菌株 SHIHU-X2 产漆酶影响最重要的几个因素。采用 Design-Expert 8.0.5 设计试验,进行 N=12 次试验,其中添加 5 组为虚拟变量,以漆酶产量为评价指标。试验设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平及编码

Table 1 The two levels of variables used in the Plackett-Burman design

变量	因素/(g/L)	低水平(-1)	高水平(1)
A	蛋白胨	2	3
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	1.5
C	$\text{MgSO}_4$	0.3	0.45
D	$\text{MnSO}_4$	0.03	0.045
E	酒石酸铵	0.02	0.03
F	$\text{CuSO}_4$	0.01	0.015
G, H, I, J, K	虚拟变量		

### 1.5.2 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验结果得到 3 个对白黄小脆柄菇产 Lac 关键因素为蛋白胨、 $\text{MgSO}_4$  和  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、酒石酸铵和  $\text{CuSO}_4$  取初始浓度,然后按梯度减少蛋白胨的浓度,并按梯度增加  $\text{MgSO}_4$  和  $\text{MnSO}_4$  的浓度,测定发酵液的 Lac 活力的变化,从而确定此 3 个因素的最适浓度范围。

### 1.5.3 Box-Behnken 设计

以 Plackett-Burman 试验筛选得到的对发酵液的 Lac 影响显著的因素作为设计因素,以最陡爬坡试验得出的浓度作为中心点,根据表 2 进行试验,进行三因素三水平,共 17 个试验组响应面设计,以发酵液的漆酶产量为响应值。

表 2 Box-Behnken 设计水平表

Table 2 Levels of variables used in the Box-Behnken design

水平	A 蛋白胨/(g/L)	B $\text{MgSO}_4$ /(g/L)	C $\text{MnSO}_4$ /(g/L)
-1	1	0.5	0.05
0	1.25	0.55	0.055
1	1.5	0.6	0.06

### 1.6 酶活的测定

取 1 mL 发酵液用蒸馏水稀释 10 倍后测定其木质素降解酶活力,以沸水浴 30 min 的酶液作空白对照。木质素过氧化物酶(Lip)活力测定用藜芦醇法<sup>[16]</sup>,锰过氧化物酶(Mnp)活力测定用  $\text{MnSO}_4$  法<sup>[17]</sup>,漆酶(Lac)活

力测定用 ABTS 法<sup>[18]</sup>。酶活力定义为每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

酶活的计算方法:酶活力(U/mL)=( $\Delta\text{OD} \times 10^6 \times n \times 10^{-3}$ )/( $\Delta t \times \xi$ )。式中:n 为发酵液稀释倍数; $\Delta\text{OD}$  为吸光度变化; $10^6$  为将 mol 换算成  $\mu\text{mol}$  的系数; $\Delta t$  为反应时间,min; $\xi$  为摩尔消光数,L/(M·cm);ABTS 氧化产物的摩尔吸光系数为  $3.6 \times 10^4$  L/(M·cm),三价锰离子的摩尔吸光系数为  $8.1 \times 10^3$  L/(M·cm),藜芦醇的摩尔吸光系数  $9.3 \times 10^3$  L/(M·cm)。

## 2 结果与分析

### 2.1 木质纤维素降解菌的筛选结果

苯胺蓝脱色法对检测降解木质素的过氧化物酶类专一性强,能有效的检测出木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶等过氧化物类型酶<sup>[9]</sup>。愈创木酚定性的测定菌株是否能降解木质素具有漆酶活性的菌株,可在菌落周围形成鲜艳而均匀的红棕色氧化圈,氧化圈的大小和颜色的深浅可以很好地反映出漆酶的活性大小<sup>[20-21]</sup>。菌株 SHI-X2 在苯胺蓝-PDA 平板上的退色和愈创木酚-PDA 平板显色反应见图 1。



图 1 苯胺蓝-PDA 平板褪色反应和愈创木酚-PDA 平板显色反应图

Fig.1 Fading reaction on aniline blue-PDA plates and color reaction on guaiacol-PDA plates

由图 1 可知,愈创木酚对 SHI-X2 有一定的抑制作用,在愈创木酚-PDA 平板上生长缓慢,但红棕色圈比菌落大很多,说明可以产漆酶能力较强;在苯胺蓝-PDA 平板生长正常,裸色圈直径大于菌落直径,说明具有良好的产降解木质素过氧化物酶的能力。

### 2.2 SHIHU-X2 的鉴定

显微镜观察菌丝状况如图 2 所示。

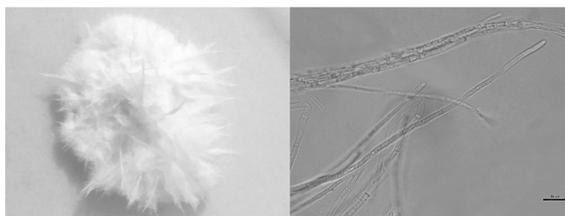


图 2 SHIHU-X2 的菌丝

Fig.2 The mycelium of SHIHU-X2

SHIHU-X2 形态结构观察:菌株 SHIHU-X2 在培养的过程,菌落中心突起,菌丝呈白色。

将菌株 ITS1~ITS4 序列测定结果与 2018 年 4 月

的 NCBI 中数据库进行 BLASTn 序列比对分析,选取结果中相似度最高的菌属作为对应菌株分类标准,绘制系统进化树,见图 3。

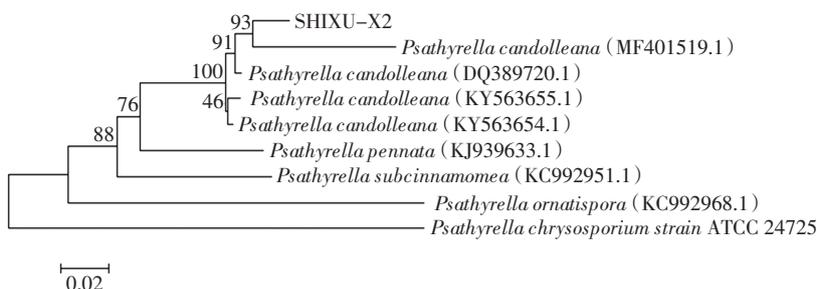


图 3 菌株 SHIHU-X2 基于 ITS1~ITS4 序列的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic position based on ITS1~ITS4 sequences of strain SHIHU-X2

利用 MEGA 6.06 构建菌株系统发育树,菌株 SHIHU-X2 的 ITS1~ITS4 序列基因序列与 *Psathyrella* 属的菌株 rDNA-ITS 基因序列相似度为 99%,与登入号 MF401519.1 的白黄小脆柄菇菌亲缘关系最为相近,Bootstrap 支持率达到 93%。因此将该菌株 SHIHU-X2 初步鉴定为白黄小脆柄菇。

2.3 液体发酵液酶活结果

测定初始产酶培养基发酵液的 3 种木质素降解酶 Mnp、Lip 和 Lac,结果发现 Mnp、Lip 的酶活为 2.47×

10<sup>-3</sup> U/mL, 1.86×10<sup>-3</sup> U/mL, Lac 的酶活是 1.11 U/mL,与傅恺<sup>[22]</sup>的研究类似,白黄小脆柄菇的 Mnp、Lip 产量较小,Lac 产量较大,所以将以 Lac 为指标优化 SHIHU-X2 产酶培养基。

2.4 Plackett-Burman 试验设计结果与分析

Plackett-Burman 试验设计结果见表 3,采用 Design-Expert 8.05 软件对表 3 中的 Lac 产量数据进行回归分析,见表 4。

由表 4 可知,在白黄小脆柄菇产 Lac 的过程中,在

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Plackett-Burman experiment design and response values

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Lac/(U/mL)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.44
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.98
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.80
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.68
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	2.10
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.90
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	0.80
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.62
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.34
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2.13
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.00
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.20

表 4 Plackett-Burman 试验显著性方差分析

Table 4 Analysis of variance of the Plackett-Burman tests

变量	回归系数	标准误差	F 值	p 值	贡献值/%	重要性
A 蛋白胨	-0.165 8	0.073	5.212	0.071 3	18.20	2
B KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.032 5	0.073	0.200	0.673 3	0.70	5
C MgSO <sub>4</sub>	0.225 8	0.073	9.666	0.026 6	33.75	1
D MnSO <sub>4</sub>	0.159 2	0.073	4.802	0.080 0	16.77	3
E 酒石酸铵	0.000 8	0.073	0.000	0.991 3	0.00	6
F CuSO <sub>4</sub>	0.140 8	0.073	3.759	0.110 2	13.13	4

a=0.10 的显著水平上,蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 对 Lac 产量影响显著。其中 MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 的浓度对产 Lac 是正效应,蛋白胨为负效应,因此将KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、酒石酸铵和 CuSO<sub>4</sub> 取低水平,以蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 作为主要因素进一步做优化试验。

### 2.5 爬坡试验设计与结果

最陡爬坡试验设计及其结果见表 5。

表 5 最陡爬坡试验设计及其结果

Table 5 Steepest ascent path design and results

试验号	蛋白胨/(g/L)	MgSO <sub>4</sub> /(g/L)	MnSO <sub>4</sub> /(g/L)	Lac/(U/mL)
1	2.00	0.40	0.040	2.09
2	1.75	0.45	0.045	2.17
3	1.50	0.50	0.050	2.28
4	1.25	0.55	0.055	2.32
5	1.00	0.60	0.060	1.73
6	0.75	0.65	0.065	1.70

如表 5 所示,随着蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 浓度的变化,发酵液的 Lac 酶活先升后降,当蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 浓度分别为 1.25、0.55 g/L 和 0.055 g/L 时,发酵液的 Lac 酶活达到最大值,以此浓度作为中心点,进行下一步响应面优化试验。

### 2.6 响应面优化试验

#### 2.6.1 Box-Behnken 试验结果

以蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 3 个重要因素为自变量,采用 Box-Behnken 试验设计对产 Lac 的发酵培养基进行优化,设计了 17 个试验组,各因素水平选择以及结果见表 6。

表 6 BOX-Behnken 试验设计和结果

Table 6 Experimental design and results of Box-Behnken tests

试验号	A 蛋白胨	B MgSO <sub>4</sub>	C MnSO <sub>4</sub>	Lac/(U/mL)
1	-1	-1	0	1.54
2	1	-1	0	1.59
3	-1	1	0	1.89
4	1	1	0	1.84
5	-1	0	-1	1.72
6	1	0	-1	1.51
7	-1	0	1	2.06
8	1	0	1	2.01
9	0	-1	-1	1.54
10	0	1	-1	1.76
11	0	-1	1	1.69
12	0	1	1	2.02
13	0	0	0	2.34
14	0	0	0	2.28
15	0	0	0	2.27
16	0	0	0	2.12
17	0	0	0	2.05

#### 2.6.2 模型的建立与显著性检验

利用 Design Expert 8.05 软件分析 Box-Behnken 试验结果,通过对数据进行二次多元回归拟合,得到自变量与粗纤维降解率(Y)对得到二次多项式方程: $Y=2.21-0.032A+0.14B+0.16C-0.025AB+0.040AC+0.028BC-0.21A^2-0.28B^2-0.17C^2$ ,此模型的方差分析见表 7。

表 7 模型回归方程方差分析

Table 7 Analysis of variance of regression equations

因素来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1.115 262	9	0.123 918	9.426 584	0.003 7	**
A	0.008 45	1	0.008 45	0.642 801	0.449 1	
B	0.165 313	1	0.165313	12.575 51	0.009 4	**
C	0.195 313	1	0.195 313	14.857 64	0.006 3	**
AB	0.002 5	1	0.002 5	0.190 178	0.675 9	
AC	0.006 4	1	0.006 4	0.486 855	0.507 8	
BC	0.003 025	1	0.003 025	0.230 115	0.646 1	
A <sup>2</sup>	0.190 082	1	0.190 082	14.459 74	0.006 7	
B <sup>2</sup>	0.341 933	1	0.341 933	26.011 25	0.001 4	
C <sup>2</sup>	0.128 906	1	0.128 906	9.806 057	0.016 6	
残差	0.092 019	7	0.013 146			
失拟项	0.031 875	3	0.010 625	0.706 636	0.596 3	
纯误差	0.060 144	4	0.015 036			

注:R<sup>2</sup>=0.923 8,R<sup>2</sup><sub>adj</sub>=0.825 8,\* 代表显著 (p<0.05),\*\* 代表极显著 (p<0.01)。

#### 2.6.3 响应面分析

图 4~图 6 是由响应值和试验因素构成间的三维响应面图,显示了蛋白胨、MgSO<sub>4</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 中任意 1 个变量取零水平时,其余两个变量对漆酶活力的影响。

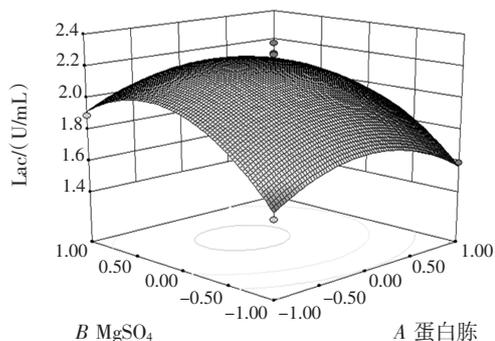


图 4 蛋白胨与 MgSO<sub>4</sub> 对漆酶产量的影响

Fig.4 Effect of peptone and MgSO<sub>4</sub> on laccase production

由图 4 可知,在试验水平范围内,当蛋白胨为某一固定值时,随着 MgSO<sub>4</sub> 的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,变化范围较大,特别是在到达 0 点之前上升趋势明显,超过 0 点之后下降较缓;当 MgSO<sub>4</sub> 浓度一定时,随着蛋白胨的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,变

化范围较小,结合等高线的疏密程度,说明  $MgSO_4$  比蛋白胨对漆酶活力的影响更显著。

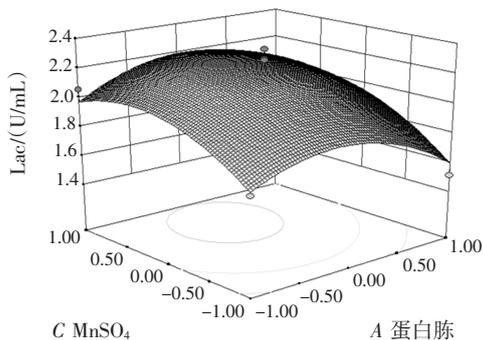


图5 蛋白胨与  $MnSO_4$  对漆酶产量的影响

Fig.5 Effect of peptone and  $MnSO_4$  on laccase production

由图5可知,在试验水平范围内,当蛋白胨为某一定值时,随着  $MnSO_4$  的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,上升时坡度较大,下降时坡度较缓;当  $MgSO_4$  浓度一定时,随着蛋白胨的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,变化范围较小,结合等高线的疏密程度,说明  $MgSO_4$  比蛋白胨对漆酶活力的影响更显著。

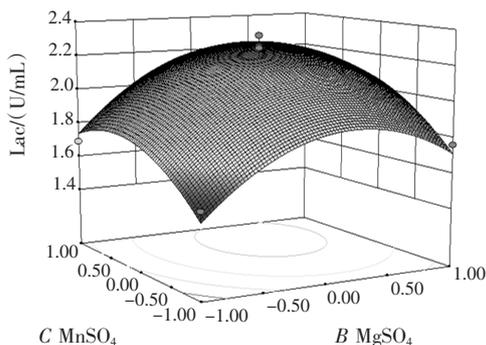


图6  $MgSO_4$  与  $MnSO_4$  对漆酶产量的影响

Fig.6 Effect of  $MgSO_4$  and  $MnSO_4$  on laccase production

由图6可知,在试验水平范围内,当  $MgSO_4$  为某一定值时,随着  $MnSO_4$  的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,且上升趋势明显;当  $MnSO_4$  浓度一定时,随着  $MgSO_4$  浓度的增大,漆酶活力呈现先上升后下降,变化的趋势更缓慢,结合等高线的疏密度,说明  $MnSO_4$  的主效应大于  $MgSO_4$ 。

#### 2.6.4 最佳培养基的确定及验证试验

通过 Design-Expert 软件对回归方程求解得到模型最大值,即蛋白胨 1.24 g/L,  $MgSO_4$  0.56 g/L,  $MnSO_4$  0.057 g/L,此时发酵液的漆酶活力最大值为 2.27 U/mL。

在预测最佳培养基配方条件下进行发酵试验,做3个重复,所得的实际发酵液漆酶活力为 2.32 U/mL,与预测值 2.27 U/mL 接近,说明该模型能较好的预测实际发酵情况。

### 3 结论与讨论

采用苯胺蓝-PDA 平板法和愈创木酚-PDA 平板法从铁皮石斛生长的树皮中筛选到菌株 SHIHU-X2,经 ITS 测序分析将 SHIHU-X2 鉴定为白黄小脆柄菇。采用 Plackett-Burman 法从6个因素中筛选对 SHIHU-2 产漆酶影响最重要因素,结果表明,蛋白胨、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$  和对白黄小脆柄菇液体发酵产漆酶活力影响较大。在此基础上,用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 设计进一步优化,利用 Design-Expert 软件进行二次回归分析,得到各因素的最佳浓度为蛋白胨 1.24 g/L,  $MgSO_4$  0.56 g/L,  $MnSO_4$  0.057 g/L,在此条件下实际发酵液漆酶活力可达到 2.32 U/mL,所得值与模型预测值 2.27 U/mL 相接近,较初始产酶培养基的漆酶活力提高了 109%。

傅恺<sup>[2]</sup>以去皮马铃薯 300 g/L,葡萄糖 20 g/L,  $KH_2PO_4$  3 g/L,  $MgSO_4$  3 g/L 为培养基,液体培养白黄小脆柄菇,其野生菌株培养至第6天漆酶活力达高峰 1.48 U/mL;经紫外诱变选育到的漆酶高产诱变菌株 U10-11 培养至第3天时漆酶活力高峰 4.63 U/mL。张丽等<sup>[23]</sup>以去皮马铃薯 300 g/L,葡萄糖 20 g/L,  $KH_2PO_4$  3 g/L,  $MgSO_4$  3 g/L 为培养基,液体培养白黄小脆柄菇,培养至第3天漆酶活力达高峰 31 525 IU/L。白腐菌白黄小脆柄菇可以产生少量锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶,尤其是产漆酶潜力巨大,若通过基因工程等手段选育出漆酶高产的工程菌株,则有望应用到漆酶大规模工业化生产中。

#### 参考文献:

- [1] 路璐,魏贤勇,宗志敏,等.木质素的结构研究与应用[J].化学进展,2013(5): 838-858
- [2] 蒋挺大.木质素[M].2版.北京:化学工业出版社,2009: 16-18
- [3] ROSS K, MAZZA G. Characteristics of Lignin from Flax Shives as Affected by Extraction Conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010,11(10): 4035
- [4] 陶用珍,管映亭.木质素的化学结构及其应用[J].纤维素科学与技术,2003(1): 42-55
- [5] 李国庆,王金宁,韩芹芹,等.高效降解棉秸秆木质素糙皮侧耳菌株的筛选[J].中国食用菌,2013(5): 16-20
- [6] 乔乔.木质素降解微生物的筛选及其降解特性的研究[D].合肥:合肥工业大学,2013
- [7] 刘云.生物降解木质素的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014(10): 3047-3051
- [8] 潘明凤,姜曼,祚万.木质素生物降解的最新研究进展[J].材料导报,2011(S2): 372-377
- [9] 吕世翔,王秋玉.白腐菌在木质纤维素降解中的应用进展[J].森林工程,2009(4): 26-31

- [10] 朱宁. 木质纤维素降解酶系在草本类物质上的协作机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2016
- [11] 吴坤, 张世敏, 朱显峰. 木质素生物降解研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2000(4): 349-354
- [12] 孙江慧, 张楠, 沈其荣, 等. 几种食用真菌降解稻草的潜力研究[J]. 南京农业大学学报, 2012(6): 49-54
- [13] 郭晓威, 王秀然, 解长睿, 等. 木质素降解菌株的分离及其降解玉米秸秆过程中产酶特点[J]. 微生物学报, 2017(12): 61-71
- [14] MACARENA S, FERNANDO L L, MÓNICA V, RAFAEL V, BERNARDO G. Incomplete processing of peroxidase transcripts in the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Fems Microbiology Letters, 2005,242(1): 37-44
- [15] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006(1): 38-41
- [16] TIEN M, KIRK T K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase[J]. Proc.natl.acad.sci.usa, 1983,81(8): 2280-2284
- [17] GLENN J K, GOLD M H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1985,242(2): 329-341
- [18] 高玉千, 高方, 张世敏, 等. 黑木耳漆酶高产菌株的筛选[J]. 中国农学通报, 2009(21): 301-304
- [19] 杨金水, 刘葳, 倪晋仁. 木质素降解菌的分离鉴定及木素过氧化物酶的纯化[J]. 环境科学, 2006(5): 981-985
- [20] 王宜磊, 朱陶, 邓振旭. 愈创木酚法快速筛选漆酶产生菌[J]. 生物技术, 2007(2): 40-42
- [21] 周菲. 产漆酶木霉 ZF-2 分离、发酵与初步应用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011
- [22] 傅恺. 一株新型白腐菌产漆酶规律及其酶学性质的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010
- [23] 张丽, 付时雨, 詹怀宇. 一株产漆酶白腐菌的鉴定及提高其漆酶产量的研究[J]. 造纸科学与技术, 2011(2): 41-45

收稿日期: 2018-10-13

## 欢迎订阅 2020 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产促进中心主办, 国内外公开发行的食品专业科技期刊, 1980 年创刊, 半月刊, 采用国际流行开本大 16 开。其专业突出, 内容丰富, 印刷精美, 是一本既有基础理论研究, 又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录, 并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。主要栏目有: 基础研究、应用技术、检测分析、生物工程、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS; 国际刊号 ISSN 1005-6521; 邮发代号: 6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2020 年定价: 30 元/册, 全年 720 元。

本编辑部常年办理邮购, 订阅办法如下:

(1) 邮局汇款。地址: 天津市静海县静海经济开发区南区科技路 9 号; 收款人: 《食品研究与开发》编辑部; 邮政编码: 301600。

(2) 银行汇款。开户银行: 工商银行静海支行, 行号: 102110000863。

账号: 0302095119300204171; 单位: 天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

www.tjfrad.com.cn

E-mail: tjfood@vip.163.com

电话(传真): 022-59525671