

血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 固态发酵小麦秸秆产漆酶及其对小麦秸秆的降解作用

范晶晶, 马德丽, 席艳茹, 蔡宇杰, 孙 啸, 管政兵, 廖祥儒*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以小麦秸秆为基本培养基质, 漆酶活力为指标, 对其培养条件——包括碳源、氮源、起始含水量和秸秆粒度进行了初步的优化, 得到了较佳产酶条件。在此过程中测定了发酵后还原糖的质量分数, 探究了白腐菌在小麦秸秆降解过程中的作用。另外, 测定了添加氮源发酵后的麦草秸秆与未发酵麦草秸秆的组成, 并进行了比较。

关键词: 漆酶; 小麦秸秆; 固态发酵; 还原糖; 血红密孔菌

中图分类号: Q 81 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)02—0128—06

Laccase Production under Solid-State Fermentation of Wheat Straw and Its Degradation by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

FAN Jingjing, MA Deli, XI Yanru, CAI Yujie, SUN Xiao, GUAN Zhengbing, LIAO Xiangru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Wheat straw was used as basic substrate and supporter for laccase production under solid-state fermentation (SSF) in this essay and optimized its best suitable cultural conditions for laccase production including carbon and nitrogen sources, initial moisture and physical size of wheat straw. Meanwhile, the reduced sugar generated during the SSF was measured and the function of the white-rot fungi in wheat straw degradation. Furthermore, we compared the consistence of wheat straw before and after SSF containing nitrogen sources.

Keywords: laccase, wheat straw, SSF, reduced sugar, *Pycnoporus sanguineus*

漆酶(p-苯二酚:氧化还原酶, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶, 广泛存在于担子菌、半知菌和子囊菌中, 但其中最主要的生产者担子菌中的白腐菌^[1]。大量研究表明, 白腐菌对木质素有良好的

降解效果^[2-4]。但从自然界分离、筛选出的天然菌株往往产酶能力较弱, 因此有必要对其发酵产酶条件进行优化, 通过改变培养条件来提高酶的产量^[5]。

我国农作物秸秆年产量约 6 亿 t, 是一种资源

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(21176106); 国家重大科技支撑与自主创新专项引导资金项目(BY2010117); 无锡市科技支撑计划社会发展项目(CSE01N1210)。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西南康人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学方面的研究。

Email: liaoxiangru@163.com

丰富的可利用再生资源^[6]。但由于木质素是秸秆细胞壁的主要成分,一般微生物很难降解,因而大部分秸秆以堆积、烧荒等形式直接进入环境,造成极大的资源浪费和环境污染^[7]。用小麦秸秆进行固态发酵产漆酶不仅模拟了白腐菌生长的自然条件,使其更易生长,而且相对于液态发酵具有耗能少、污染小、操作方便等的优点,发酵处理后的小麦秸秆由于其木质素部分被降解以及附加营养物质亦可用做造纸原料^[8]、燃料乙醇^[9]的生产原料和动物饲料^[10]等。因此,作者考虑应用小麦秸秆进行漆酶固态发酵,不仅可以对小麦秸秆进行综合利用,而且还可以带来更高的经济价值。

作者所在研究室从江苏无锡惠山的朽木上筛选出一株具有较好漆酶分泌能力的菌株——*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12,并初步研究了其利用小麦秸秆固态发酵产漆酶的条件,以及测定了不同条件下发酵液中还原糖的质量分数,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

菌株 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12:由作者所在实验室筛选自江苏无锡惠山,并于 4℃ 保藏。

1.2 主要材料及试剂

水稻秸秆:宜兴金和生物技术公司提供,烘干后切碎;2,6-二甲氧基酚(2,6-Dimethoxyphenol, DMP)、愈创木酚:购自 Sigma 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 显色培养基 PDA 琼脂培养基,添加愈创木酚,终浓度为 0.5 mmol/L。

1.3.2 种子培养基 PDA 液体培养基。

1.3.3 固态发酵基础培养基 小麦秸秆(粒度 10~15 mm)25 g/dL,含水量 75%,pH 自然。

以上培养基均在 121℃ 下蒸汽灭菌 20 min。

1.4 菌株生长特性研究

菌株 SYBC-L12 点接于 PDA 显色培养基平板,30℃ 恒温培养,观察菌落形态。菌株 SYBC-L12 接种到固态发酵基础培养基中,30℃ 恒温培养,观察菌体生长状态。

1.5 粗酶液的制备

将发酵后的酶曲加入去离子水,搅拌将其打

散,在 30℃、200 r/min 摇床振荡 6 h,将混合物用真空泵抽滤后用冷冻离心机以转速 10 000 r/min 离心 10 min,得到的上清液即为粗酶液。

1.6 漆酶活力的测定方法

反应体系 3 mL,包括 0.5 mL DMP、2.4 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液(20 mmol/L, pH 3)、0.1 mL 酶液,在 470 nm 处测定 OD 吸收值。以 1 min 氧化 1 μmol 的 DMP 生成 3,5,3',5'-四甲氧基二苯醌($\epsilon_{470\text{ nm}}=49.6\text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$)所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[11]。

1.7 发酵液中还原糖质量分数的测定

1.7.1 DNS 试剂的制备 将 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸(DNS)和 262 mL、2 mol/L 氢氧化钠加到 500 mL 含有 182 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加上 5 g 苯酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加水定容到 1 000 mL,即制成 3,5-二硝基水杨酸试剂,贮于棕色瓶中备用。

1.7.2 葡萄糖标准曲线的绘制 分别取葡萄糖标准液(1 mg/mL) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 比色管中,再准确加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水浴加热 2 min,流水冷却,用蒸馏水补足至 25 mL,在 540 nm 下测定吸光值。然后,利用葡萄糖含量(x)和吸光值(y)作图,确定两者之间的曲线关系,即标准曲线。

1.7.3 发酵液中还原糖质量分数的测定 适当稀释发酵液,使还原糖质量浓度为 0.1~1.0 mg/mL,取稀释后的糖液 1.0 mL 于 25 mL 比色管中,加 DNS 试剂 2.0 mL,煮沸 2 min,冷却后用水补足到 25 mL 比色管,在 540 nm 下测定吸光值。从标准曲线查出对应的葡萄糖质量浓度(mg/mL),求出样品中还原糖质量分数^[12]。

1.8 小麦秸秆固态发酵产漆酶条件的优化

1.8.1 碳源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 在固态发酵培养基中分别用不同的碳源(葡萄糖、柠檬酸、蔗糖、麦芽糖、淀粉、果糖、乳糖),初始添加量为 1.3 g/dL,以及对照(不加碳源),其它条件不变,30℃ 下静置培养 8 d,提取粗酶液并测定漆酶活力。

1.8.2 氮源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 在固态发酵培养基中分别用不同的氮源(酵母膏、牛肉膏、干酪素、硫酸铵、磷酸二氢铵、酒石酸铵、鱼粉),初始添加量为 1 g/dL,以及对

照(不加氮源),其它条件不变,30℃下静置培养8 d,提取粗酶液并测定漆酶活力。

1.8.3 起始含水量对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 固态培养基的含水量分别调整为料水质量体积比 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,其它条件不变,培养8 d,提取粗酶液并测定漆酶活力。

1.8.4 秸秆粒度对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 将秸秆分别粉碎成粒度(mm)为 0~5、5~10、10~15、15~20 及 80 目粉末,其它条件不变,培养8 d,提取粗酶液并测定漆酶活力。

1.9 小麦秸秆固态发酵产还原糖

1.9.1 氮源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产还原糖的影响 在固态发酵培养基中分别用不同的氮源(酵母膏、牛肉膏、干酪素、硫酸铵、磷酸二氢铵、酒石酸铵、鱼粉),初始添加量为 1 g/dL,以及对照(不加氮源),其它条件不变,30℃下静置培养8 d,测定还原糖质量分数。

1.9.2 起始含水量对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产还原糖的影响 固态培养基的含水量分别调整为料水质量体积比 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,其它条件不变,培养8 d,测定还原糖质量分数。

1.9.3 秸秆粒度对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产还原糖的影响 将秸秆分别粉碎成粒度为 0~5、5~10、10~15、15~20 min,其它条件不变,培养8 d,测定还原糖质量分数。

2 结果与讨论

2.1 SYBC-L12 生长特性的研究

将选用的白腐菌 SYBC-L12 接种到愈创木酚平板,结果见图 1a 所示。SYBC-L12 菌丝为洁白绒毛状,菌落四周及底部均有红色变色圈产生,表明漆酶氧化特征底物,产生显色的氧化反应,从而可以初步判断其在生长过程中分泌了胞外漆酶。

对 SYBC-L12 进行固态发酵,发酵 10 d,结果见图 1b。固态培养基上长满了 SYBC-L12 菌丝,表明此菌株对秸秆具有良好的适应性。

2.2 水稻秸秆固态发酵产漆酶条件优化

2.2.1 碳源和氮源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 对于产酶培养基,碳源和氮源是必不可少的组成部分。本研究中,秸秆作为支撑物同时也作为提供少量碳源的底物,在此基础上添加其它碳源和氮源,考察其对漆酶产量的影响。从

图 2 可看出,碳源的添加极大地提高了 L12 产漆酶的量。而且在所添加的碳源中柠檬酸最有利于白腐菌产漆酶。氮源分为有机氮源和无机氮源,从图 3 可以看出,有机氮源和无机氮源中,除了磷酸二氢铵具有完全抑制作用外对漆酶的产量均有所提高,其中有机氮源中的牛肉膏对漆酶产量具有显著的提高,提高了 2 倍。有机氮源比无机氮源能更好的提高白腐真菌产漆酶的能力。

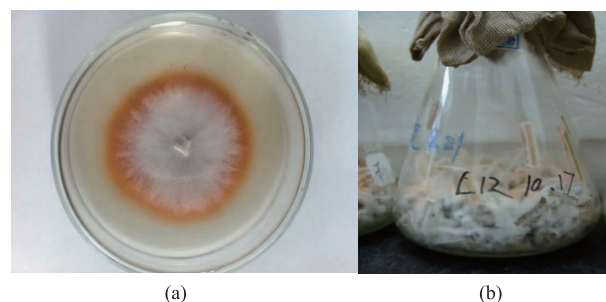
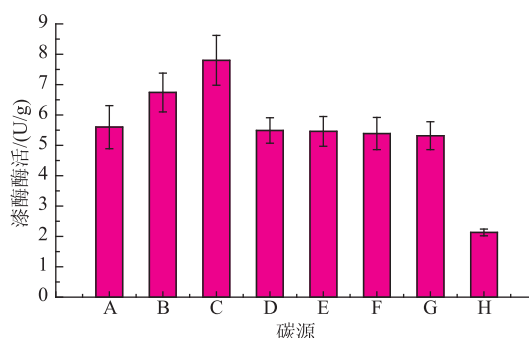


图 1 SYBC-L12 平板生长特征(a)和固态发酵生长特征(b)
Fig. 1 Morphological character of SYBC-L12 on PDA plate (a) and under solid-state fermentation of wheat straw(b)

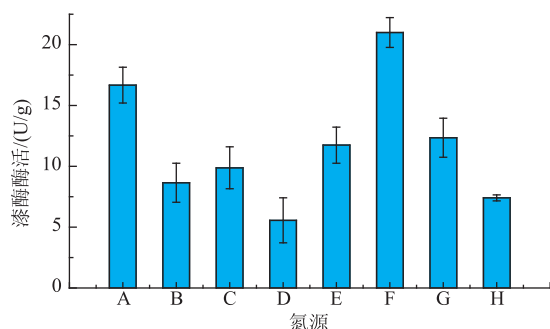


A~H 分别为: 果糖、麦芽糖、柠檬酸、葡萄糖、乳糖、淀粉、蔗糖和对照

图 2 碳源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

2.2.2 起始含水量和秸秆粒度对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响 含水量在固态发酵过程中对菌体的影响较大,结果见图 4。含水量在 1:2 与 1:3 之间漆酶产量最高。固态发酵过程中需要适宜的水分含量,含水量过高或过低都将菌体的生长代谢,漆酶产量低。



A~H: 干酪素、酵母膏、酒石酸铵、磷酸二氢铵、硫酸铵、牛肉膏、鱼粉和对照

图3 氮源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 产漆酶的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen on laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

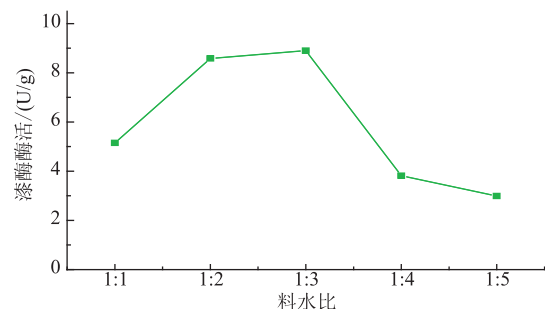


图4 培养基含水量对白腐菌产漆酶的影响

Fig. 4 Effect of solid-to-liquid ratio on laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

固态发酵过程中需要适宜的秸秆粒度。在培养基量相同的情况下,秸秆粒度的大小直接决定了白腐菌能有效利用的秸秆表面积的大小。粒度越小,表面积越大,但同时秸秆之间的空隙变小,影响培养基的透气性。如图5所示,漆酶的产量随秸秆粒度的增加而提高,当秸秆长度为0.5~1 cm时,漆酶活力达到最大,进一步增加秸秆长度,产酶反而下降。

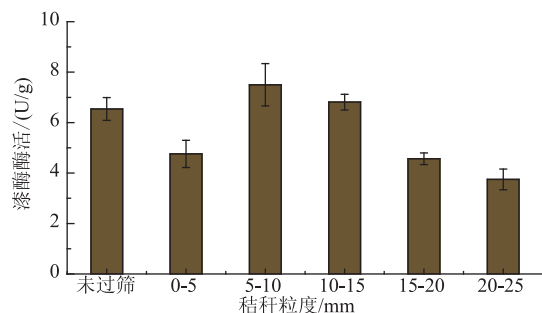


图5 秸秆粒度对白腐菌产漆酶的影响

Fig. 5 Effect of particle size on laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

2.3 小麦秸秆固态发酵产还原糖

2.3.1 氮源对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产还原糖的影响 从表1中可以看出,有机氮源和无机氮源均能提高白腐菌降解秸秆产还原糖的能力,而且有机氮源较无机氮源更有利于发酵液中还原糖质量分数的提高,其中有机氮源中的牛肉膏对还原糖产量具有显著的作用($P < 0.01$),提高了2倍;但干酪素对发酵液中还原糖质量分数的提高不明显。

表1 氮源对发酵产还原糖的影响

Table 1 Effects of nitrogen sources on reduced sugar production

氮源	还原糖质量分数/(mg/g)
对照	17.25±4.16
硫酸铵	28.53±2.93
酒石酸铵	37.15±3.16
磷酸二氢铵	45.05±3.90
酵母膏	51.86±2.61
干酪素	31.84±3.60
牛肉膏	52.34±3.04
鱼粉	50.81±4.69

2.3.2 起始含水量和秸秆粒度对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产还原糖的影响 起始含水量对发酵产还原糖的影响非常显著。从图6可以看出,随着水分的增加,还原糖的质量分数也随之增加。含水量的增加更有利于白腐真菌降解纤维素产还原糖。

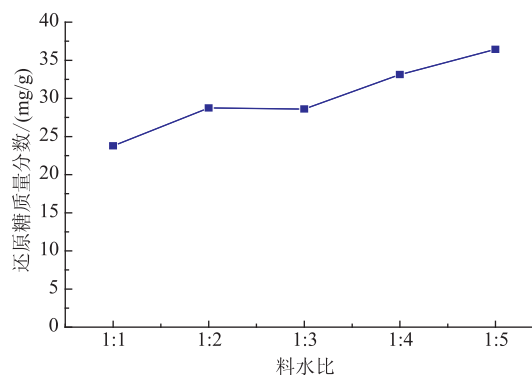


图6 起始含水量对发酵产还原糖的影响

Fig. 6 Effect of solid-to-liquid ratio on reduced sugar production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

如图7所示,还原糖质量分数随秸秆粒度的增加而提高,当秸秆长度为0.5~1 cm时,还原糖质量

分数达到最大, 进一步增加秸秆长度, 还原糖质量分数反而下降。

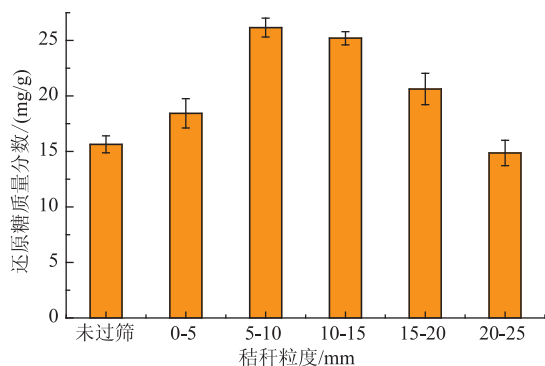


图7 秸秆粒度对发酵产还原糖的影响

Fig. 7 Effect of particle size on reduced sugar production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

2.4 秸秆粒度对 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 发酵产漆酶及还原糖的影响

秸秆粒度对发酵产漆酶与还原糖的影响是一致的。如图8所示, 秸秆长度为0.5~1 cm时, 发酵产漆酶与还原糖的质量分数达到最高峰。这说明漆酶对秸秆的降解, 特别是秸秆中纤维素的降解起重要作用。

2.5 加氮源发酵后小麦秸秆组成与未发酵小麦秸秆组成的比较

加氮源发酵后的秸秆中粗蛋白质量分数增加, 水分、粗纤维及粗灰分的质量分数都有所下降, 其中粗灰分质量分数降低的最明显, 见表2。这充分说明白腐真菌在秸秆降解方面起到了显著的作用。

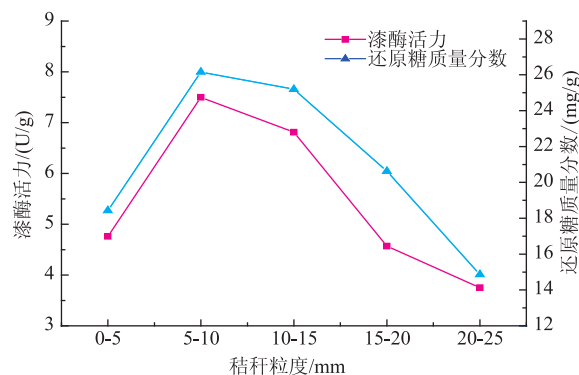


图8 秸秆粒度对发酵产漆酶及还原糖的影响

Fig. 8 Effect of particle size on laccase and reduced sugar production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12

表2 秸秆组成成分及含量

Table 2 Composition and content of the wheat straw

组成成分	未发酵小麦秸秆	加氮源小麦秸秆
水分质量分数/%	9.9	8.3
粗蛋白质量分数/%	3.11	3.92
粗纤维质量分数/%	39.5	36.2
粗灰分质量分数/%	8.4	5.4

3 结 语

经研究确定, 白腐真菌能够促进小麦秸秆的降解, 并且产生还原糖。通过对固态发酵条件的优化, 找到了最优的碳源、氮源、起始含水量及秸秆粒度, 为进一步探究白腐菌发酵小麦秸秆提供了参考。固态发酵后的秸秆可用于饲料加工, 提高秸秆利用率。而漆酶在白腐菌降解小麦秸秆中的作用及机理还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王佳玲, 余惠生, 付时雨, 等. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 233-236.
WANG Jialing, YU Huisheng, FU Shiyu, et al. Research progress of laccase in white rot fungus [J]. *Microbiology China*, 1998, 25(4): 233-236. (in Chinese)
- [2] 刘文华, 蔡宇杰, 孙付宝, 等. 白腐菌 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 液态发酵水葫芦产漆酶[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(12): 1252-1261.
LIU Wenhua, CAI Yujie, SUN Fubao, et al. Study of *Trametes hirsuta* SYBC-L19 liquidstate fermentation for laccase production [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(12): 1252-1261. (in Chinese)
- [3] 王志新, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 18S rDNA 序列分析及其固态发酵水葫芦产漆酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 832-839.
WANG Zhixin, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. 18S rDNA sequence analysis of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 and studies of laccase production on hyacinth solid-state fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(8): 832-839. (in Chinese)
- [4] 王志新, 蔡宇杰, 李颜颜, 等. 培养基及培养条件对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 832-839.

- WANG Zhixin, CAI Yujie, LI Yanyan, et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L1[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 832-839. (in Chinese)
- [5] 燕红, 张晓甜, 刘明. 木质素降解菌种产木质素降解酶的研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2011, 28(6): 845-847.
YAN Hong, ZHANG Xiaotian, LIU Ming. Studies on Ligninase production by Lignin-degrading fungus [J]. **Journal of Natural Science of Heilongjiang University**, 2011, 28(6): 845-847. (in Chinese)
- [6] 孙啸, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 固态发酵水稻秸秆产漆酶及其对染料的脱色作用[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(3): 240-249.
SUN Xiao, LIAO Xiangru, LIU Jiayang, et al. Laccase production under solid-state fermentation of rice straw by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 and its decolorization of synthetic dyes [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(3): 240-249. (in Chinese)
- [7] 刘坤, 李会宣, 李敬. 白腐真菌菌株共培养降解玉米秸秆的研究[J]. 安徽农业科学, 2003, 36(4): 1327-1329.
LIU Kun, LI Huixuan, LI Jing. Studies on the co-culture of white rot fungi for degrading corn stalk [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2003, 36(4): 1327-1329. (in Chinese)
- [8] 石海强, 何北海, 徐晓峰, 等. 白腐菌对造纸原料树脂成分的降解[J]. 中国造纸, 2006, 25(2): 16-19.
SHI Haiqiang, HE Beihai, XU Xiaofeng, et al. Resin degradation of masson pine with white rot fungus[J]. **China Pulp & Paper**, 2006, 25(2): 16-19. (in Chinese)
- [9] 徐春燕, 章毅君, 余洪波, 等. *Pleurotus ostreatus* BP 连续开放与处理玉米秸秆的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 6-9.
XU Chunyan, ZHANG Yijun, YU Hongbo, et al. Continuous pretreatments of corn stalk with *Pleurotus ostreatus* BP under non-sterile condition[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2008, 34(5): 6-9. (in Chinese)
- [10] 刘晓牧, 李福昌, 王中华, 等. 白腐真菌与秸秆饲料的有效利用[J]. 饲料研究, 2000, 1: 42-43.
LIU Xiaomu, LI Fuchang, WANG Zhonghua, et al. Effective use of white rot fungus and straw feed [J]. **Feed Research**, 2000, 1: 42-43. (in Chinese)
- [11] 胡艳, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄菌液态发酵产漆酶培养条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(5): 773-778.
HU Yan, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Optimization of *Shiraia bambusicola* liquid-state fermentation for laccase production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 773-778. (in Chinese)
- [12] Miller G L. Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar[J]. **Analytical Chemistry**, 1959, 31(3): 426-428.

科技信息

会议名称(中文): The 7th International Symposium on Autophagy 2015

开始日期: 2015-03-19

结束日期: 2015-03-23

所在城市: 安徽省 黄山市

主办单位: 中国生物物理学会、中国科学院生物物理研究所

会议主席: Hong Zhang Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences

联系电话: +86-10-6488-7226

传真: +86-10-6488-9892

E-MAIL: mali@moon.ibp.ac.cn, findwayfrom@163.com 会议网站: <http://7thisa.csp.escience.cn/dct/page/1>

会议背景介绍: On behalf of the organizing committee, it is my great pleasure to invite you to the 7th International Symposium on Autophagy which runs from March 19-23 2015 in Huangshan, China. Over 30 prominent invited international speakers will talk about the latest progress in this exciting and quickly expanding field.

The meeting venue, the Smoky Willow resort, is located within one of the most famous scenic areas of China and is about 40 minutes from Huangshan (also known as yellow mountain, approximately 1100 km from Beijing and 400 km from Shanghai). Huangshan City, previously known as HuiZhou, is a famous ancient city. An old Chinese saying goes that "there will be no town if there is no Huizhou-style building and there will be no business if there is no merchant from Yixian County" (part of old HuiZhou). The meeting venue is also very close to Hongcun-Xidi village, a world cultural heritage site which is widely regarded as the traditional "village in a Chinese painting". Other famous scenic sites nearby include Qiyun Mountain (one of four Taoist Holy Lands), Tunxi old street (built 1400 years ago in the Northern and Southern Dynasties) and the Tangyue memorial arch group. Most excitingly, three giant pandas are just a few hundred METERS away from the meeting venue!