

灵芝固态发酵三七渣产漆酶工艺优化

吉栗漫, 谭显东*, 乔翊嵩, 魏 琨, 陈 楠
(成都信息工程大学, 四川 成都 610225)

摘要: 目的 优化灵芝固态发酵三七渣产漆酶工艺。方法 在单因素试验基础上, 以发酵时间、发酵温度、接种量为影响因素, 漆酶活性为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化发酵工艺。结果 最佳条件为发酵时间 14 d, 发酵温度 28.09 ℃, 接种量 26.65%, 漆酶活性为 3.612 U/g。结论 该方法稳定可靠, 可为灵芝固态发酵三七渣产漆酶后期开发和应

用提供依据。

关键词: 灵芝; 三七渣; 漆酶; 固态发酵工艺; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: TQ92 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)03-0958-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.037

漆酶是一种多功能的含铜氧化还原酶^[1-2], 在自然界中分布于多种植物^[3]、真菌^[4-5]、细菌^[6-7]和少数昆虫中, 它能催化多种芳香族化合物发生氧化反应, 在反应中分子氧作为电子受体被还原成水。目前, 漆酶可分为真菌漆酶、细菌漆酶和植物漆酶。其中, 真菌漆酶具有更好的热稳定性、金属离子耐受性和更高的底物催化氧化性, 在食品、制浆造纸、纺织工业以及环境保护领域有着广泛的应用^[8-11]。

三七渣是三七经乙醇提取有效成分三七皂苷后产生的残渣, 其中含有大量的粗纤维、粗多糖、淀粉、粗蛋白、粗脂肪等有机物和磷、钙、镁等矿质元素以及一些微量元素^[12], 可作为原料发酵用于生产蛋白饲料、生防制剂、红色素、灵芝菌质等产品^[13-16]。为了降低漆酶的生产成本, 本研究以三七渣为基质, 以金地灵芝为菌种固态发酵产漆酶, 并通过响应面分析法优化发酵工艺条件, 提高产酶效率, 以期为其深入研究提供参考。

1 材料

1.1 药材 三七渣购自成都市某中成药厂, 经过晾晒、粉碎、过筛等工艺后置于干燥器中保存, 其主要成分为总糖 48.87%、淀粉 30.35%、粗纤维 27.45%、粗蛋白 12.28%、真蛋白 9.97%、还原糖 2.19%^[17]。金地灵芝(审定编号川审菌 2003008)由四川省农业科学院土壤肥料研究所微生物室提供。

1.2 试剂 酵母浸出粉、葡萄糖、蛋白胨、硫酸铜、硫酸镁、吐温 80、藜芦醇、磷酸二氢钠均为分析纯, 购自成都市科龙化工试剂厂; ABTS 为分析纯, 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.3 仪器 PYX-250H-C 恒温恒湿培养箱购自韶关市科力实验仪器有限公司; THZ-92A 气浴恒温振荡器购自上海博

迅医疗生物仪器股份有限公司; BSA224S 电子分析天平购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; WFJ7200 分光光度计购自尤尼柯(上海)仪器有限公司; LDZX-50KB 高压灭菌锅购自上海申安医疗器械厂。

2 方法

2.1 培养基培养

2.1.1 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 取马铃薯 20.00 g、葡萄糖 2.00 g、酵母粉 0.30 g、蛋白胨 0.20 g、磷酸二氢钾 0.10 g、硫酸镁 0.06 g、琼脂粉 2.0 g, 置于 100 mL 蒸馏水中混匀, 121 ℃灭菌 30 min, 即得。

2.1.2 种子液培养基 取马铃薯 20.00 g、葡萄糖 2.00 g、酵母粉 0.30 g、蛋白胨 0.20 g、磷酸二氢钾 0.10 g、硫酸镁 0.06 g, 置于 100 mL 蒸馏水中混匀, 即得。

2.1.3 三七渣固体培养基 取三七渣 10.0 g, 过 60 目筛, 加入酵母浸出粉 8%、硫酸铜 0.07%、磷酸二氢钠 0.4%、硫酸镁 0.4%、吐温 80 0.05%、藜芦醇 0.025%、水 60%, 121 ℃灭菌 30 min, 即得。

2.2 种子液制备 将金地灵芝菌种接入 PDA 培养基中, 于 28 ℃下恒温培养 5~6 d, 用打孔器在培养菌种的培养皿边缘打取 0.25 cm² 菌丝块, 接入装有 150 mL 种子液培养基的锥形瓶中, 置于气浴恒温振荡器上, 在 180 r/min、28 ℃下培养 6 d。

2.3 漆酶粗酶液制备 待培养结束后将发酵物剪碎, 向锥形瓶中加入 150 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液, 在 40 ℃下水浴振荡 1 h, 结束后用纱布过滤, 滤液置于高速离心机中, 5 000 r/min 离心 15 min, 离心后取上清液, 即得。

2.4 漆酶活性测定 参考文献[18-19]报道, 采用 ABTS 法。将 0.05 mL 漆酶粗酶液与 1 mL 1 mmol/L ABTS、2.95 mL 缓冲液混合后加入试管中, 35 ℃水浴 3 min, 在 420 nm

收稿日期: 2023-03-04

基金项目: 四川省重点研发计划项目(2021YFG0263); 成都市重点研发支撑计划项目(2019-YF05-02457-SN)

作者简介: 吉栗漫(1997—), 女, 硕士生, 从事三废处理及资源化研究。E-mail: 1208173114@qq.com

* 通信作者: 谭显东(1973—), 男, 博士, 教授, 从事三废处理及资源化研究。E-mail: jacktxd@sina.com

波长处测定吸光度，平行3次，取平均值。

2.5 单因素试验

2.5.1 发酵温度 将金地灵芝种子液接入三七渣固体培养基的锥形瓶中进行恒温培养，接种量20%，发酵时间13 d，装样量10.0 g，发酵温度分别为24、26、28、30、32℃，按“2.4”项下方法测定漆酶活性。由图1可知，发酵温度为28℃时漆酶活性最高；低于28℃时金地灵芝生长缓慢，产漆酶效果较差；高于28℃时漆酶活性降低，这主要是因为固体发酵过程中的聚热现象容易引起菌体死亡。Pablo等^[20]研究发现，在28℃时以稻谷和农业残余物固态发酵灵芝菌产漆酶酶活最高。

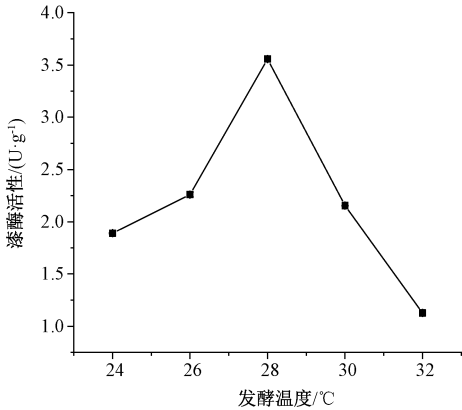


图1 发酵温度对漆酶活性的影响

2.5.2 接种量 将金地灵芝种子液接入三七渣固体培养基的锥形瓶中进行恒温培养，发酵温度28℃，发酵时间13 d，装样量10.0 g，接种量分别为10%、15%、20%、25%、30%、35%，按“2.4”项下方法测定漆酶活性。接种量大小会直接影响菌种在培养基中的发酵速度和产酶效率^[21]。由图2可知，接种量为25%时漆酶活性最高；为10%时漆酶活性较低，这可能是因为接种量偏小致使菌丝量较少，漆酶的合成减少；大于25%时漆酶活性随接种量的增大而降低，说明过高的接种量不利于分泌漆酶，可能是接种量过大使培养基中生物量大，致使营养物质消耗过快，灵芝代谢提前进入衰亡期，漆酶活性随之降低。

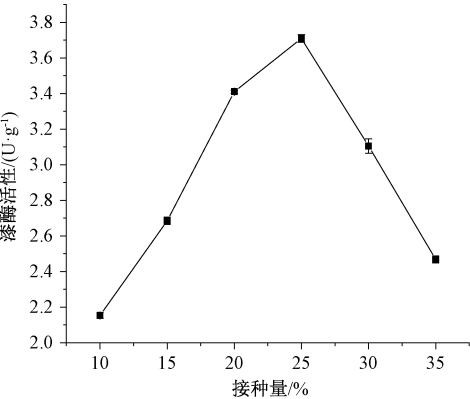


图2 接种量对漆酶活性的影响

2.5.3 发酵时间 将金地灵芝种子液接入三七渣固体培养基的锥形瓶中进行恒温培养，发酵温度28℃，接种量

20%，装样量10.0 g，发酵时间分别为6、8、10、12、14、16、18、20 d，按“2.4”项下方法测定漆酶活性。由图3可知，发酵时间为12 d时漆酶活性最高；随着发酵时间延长，发酵体系中的微生物逐渐由适应期、对数生长期、稳定期步入衰亡期，所以其代谢产物漆酶的酶活也随之呈现先逐渐升高，而后又降低的趋势，这是由于随着发酵时间的增加，灵芝代谢产物在培养基中不断积累，产生抑制作用，影响了漆酶的分泌^[21]。

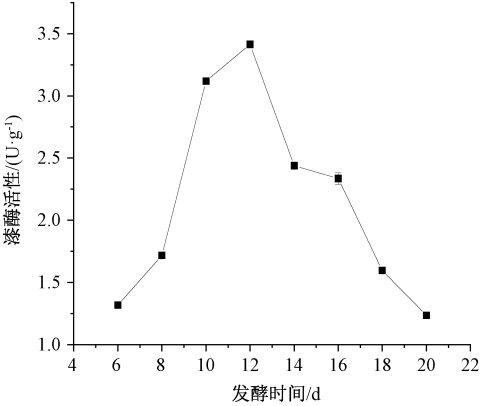


图3 发酵时间对漆酶活性的影响

2.6 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，以发酵温度(A)、接种量(B)、发酵时间(C)为影响因素，漆酶活性(Y)为评价指标，采用Design-Expert 8.0.6软件建立三因素三水平试验，因素水平见表1，结果见表2。

表1 Box-Behnken 响应面法因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵温度/℃	26	28	30
B 接种量/%	20	25	30
C 发酵时间/d	10	12	14

表2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

试验号	A	B	C	Y 漆酶活性/(U·g ⁻¹)	
				实验值	预测值
1	-1	-1	0	2.38	2.39
2	1	-1	0	2.56	2.59
3	-1	1	0	2.87	2.84
4	1	1	0	2.59	2.58
5	-1	0	-1	2.52	2.52
6	1	0	-1	2.32	2.30
7	-1	0	1	3.04	3.06
8	1	0	1	3.22	3.22
9	0	-1	-1	2.58	2.57
10	0	1	-1	2.60	2.63
11	0	-1	1	3.16	3.14
12	0	1	1	3.51	3.52
13	0	0	0	3.36	3.35
14	0	0	0	3.35	3.35
15	0	0	0	3.31	3.35
16	0	0	0	3.38	3.35
17	0	0	0	3.36	3.35

将表 2 数据导入 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元二次回归拟合,得方程为 $Y=3.35-0.016A+0.11B+0.36C-0.11AB+0.095AC+0.081BC-0.47A^2-0.28B^2-0.11C^2$, 方差分析见表 3。由此可知,接种量和发酵时间对漆酶活性的影响极显著 ($P<0.01$),发酵温度不显著 ($P>0.05$); F 值

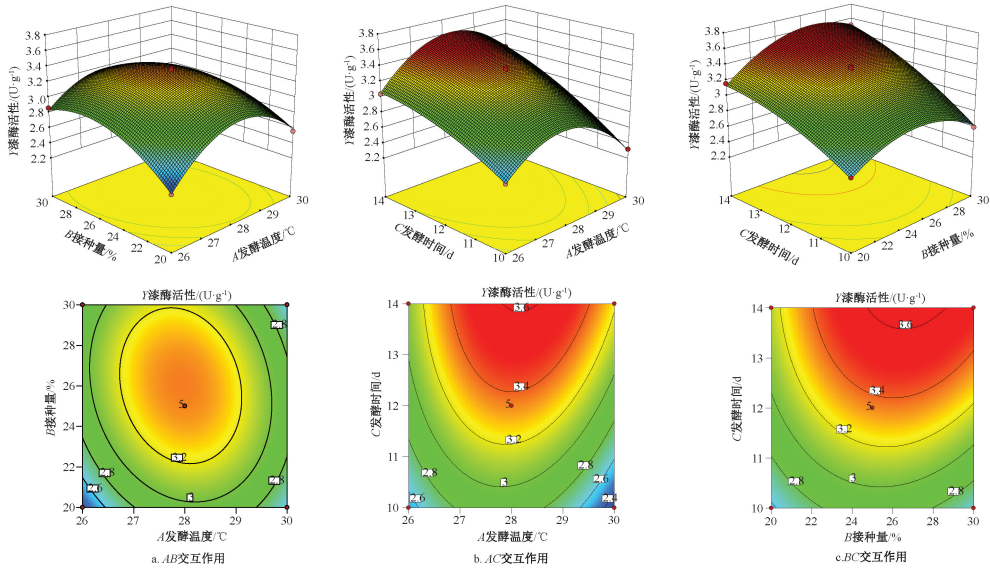
越大,对响应值的影响越大^[22-23],各因素影响程度依次为发酵时间 (C) >接种量 (B) >发酵温度 (A);模型 $P<0.0001$,具有高度显著性;失拟项 $P=0.2286$,表明模型拟合度较高,误差较小,可用于预测分析;因素 AB 、 AC 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对漆酶活性影响呈极显著程度 ($P<0.01$)。

表 3 Box-Behnken 响应面方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	2.690 0	9	0.300 0	320.53	<0.000 1
<i>A</i>	0.002 0	1	0.002 0	2.13	0.188 2
<i>B</i>	0.096 0	1	0.096 0	102.50	<0.000 1
<i>C</i>	1.060 0	1	1.060 0	1 139.20	<0.000 1
<i>AB</i>	0.051 0	1	0.051 0	54.71	0.000 1
<i>AC</i>	0.036 0	1	0.036 0	38.26	0.000 5
<i>BC</i>	0.026 0	1	0.026 0	28.28	0.001 1
<i>A</i> ²	0.930 0	1	0.930 0	993.13	<0.000 1
<i>B</i> ²	0.340 0	1	0.340 0	359.97	<0.000 1
<i>C</i> ²	0.048 0	1	0.048 0	51.17	0.000 2
残差	0.006 5	7	0.000 9	—	—
失拟项	0.004 1	3	0.001 4	2.22	0.228 6
纯误差	0.002 5	4	0.000 6	—	—
总误差	2.700 0	16	—	—	—

响应面分析见图 4。参考文献 [24-26] 报道,当发酵时间固定时,随着接种量的增加和发酵温度的升高,漆酶活性呈现先升高后降低的趋势,等高线图呈椭圆形且响应面呈凸形,表明发酵温度和接种量有较显著的交互作用;当接种量固定时随着发酵时间的延长,漆酶活性呈现逐渐

升高的趋势,而随着发酵温度的升高,漆酶活性呈现先升高后降低的趋势;当发酵温度固定时,接种量和发酵时间存在极显著的交互作用,而随着发酵时间和接种量的增加,漆酶活性呈现逐渐升高的趋势。



注：上方 3 张图为三维曲面图，下方 3 张图为等高线图。

图 4 各因素响应面图

3 结论

最佳条件为发酵时间 14 d,发酵温度 28.09 ℃,接种量 26.65%,在此条件下进行发酵培养时漆酶活性为 3.644 U/g。因此表明,利用响应面法优化灵芝固态发酵三七渣非常有效,可为后续三七渣固态发酵的工业化提供基础依据。

参考文献:

[1] Garrido-Bazán V, Téllez-Téllez M, Herrera-Estrella A, et al. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged

fermentation[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 93.

[2] Hernández C, Farnet Da Silva A M, Ziarelli F, *et al.* Laccase induction by synthetic dyes in *Pycnoporus sanguineus* and their possible use for sugar cane bagasse delignification[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(3): 1189-1201.

[3] Mayer A M, Staples R C. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(6): 551-565.

[4] Preeti N, Rao R S, Chander K R. Laccase production by *Coriopsis caperata* RCK2011: optimization under solid state fermentation by Taguchi DOE methodology[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1386.

[5] Brijwani K, Rigdon A, Vadlani P V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing[J]. *Enzyme Res*, 2010, 2010: 149748.

[6] Santhanam N, Vivanco J M, Decker S R, *et al.* Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(10): 480-489.

[7] Leontievsky A A, Vares T, Lankinen P, *et al.* Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 156(1): 9-14.

[8] Couto S R, Herrera J L T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review[J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24(5): 500-513.

[9] Bhattacharya S S, Karmakar S, Banerjee R. Optimization of laccase mediated biodegradation of 2, 4-dichlorophenol using genetic algorithm[J]. *Water Res*, 2009, 43(14): 3503-3510.

[10] Jadhav U U, Dawkar V V, Ghodake G S, *et al.* Biodegradation of Direct Red 5B, a textile dye by newly isolated *Comamonas* sp. UVS[J]. *J Hazard Mater*, 2008, 158(2-3): 507-516.

[11] Hao J J, Song F Q, Huang F, *et al.* Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(3): 233-240.

[12] 杨 智, 傅梅红, 杨立新, 等. 三七残渣营养成分分析[J]. *人参研究*, 1994(2): 28-29.

[13] 谭显东, 卢上飞, 胡 伟, 等. 三七渣固态发酵生产灵芝菌质的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(18): 130-134.

[14] 谭显东, 黄 凡, 林巧玉, 等. 培养基特性对三七渣发酵产红曲色素的影响[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(7): 4293-4297.

[15] 谭显东, 王君君, 胡 伟, 等. 三七渣固态发酵生产产真菌康宁木霉[J]. *环境科学与技术*, 2014, 37(4): 62-67.

[16] 谭显东, 段娅宁, 胡 伟, 等. 三七渣混菌发酵生产蛋白质饲料的工艺条件研究[J]. *中国饲料*, 2014(2): 20-23.

[17] 谭显东, 吉栗漫, 陈 楠, 等. 灵芝固态发酵三七渣产漆酶的培养基配方优化[J]. *中国酿造*, 2021, 40(5): 153-156.

[18] Drozd R, Rakoczy R, Wasak A, *et al.* The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 462-470.

[19] Ma J, Xu Z S, Wang F, *et al.* Isolation, purification and characterization of two laccases from carrot (*Daucus carota* L.) and their response to abiotic and metal ions stresses[J]. *Protein J*, 2015, 34(6): 444-452.

[20] Pablo D P, Silvia E D, Nestor R C. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom[J]. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2014, 93: 25-32.

[21] 李彩联, 郭艳丽, 张铁鹰, 等. 高产漆酶菌株的筛选、鉴定和固态发酵条件优化[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(11): 6501-6509.

[22] 刘媛洁, 张 良. 响应面法优化复合酶辅助超声波提取柚子皮总黄酮工艺[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 143-150.

[23] 张 良, 刘媛洁, 肖勇生, 等. 响应面法优化柑橘复合生物保鲜剂配方[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(16): 340-345; 356.

[24] Sehrawat R, Panesar P S, Swer T L, *et al.* Response surface methodology (RSM) mediated interaction of media concentration and process parameters for the pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid state fermentation[J]. *Pigm Resin Technol*, 2017, 46(1): 14-20.

[25] 井月欣, 乔瑞光, 张 健, 等. 响应面试验优化盐渍仿刺参脱盐工艺[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(18): 160-164; 172.

[26] 吴 静. 花椒精油的提取工艺、化学成分分析与抗菌活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.