

白腐真菌木质素降解酶的反应器发酵

高大文, 文湘华, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 为了获得更高的白腐真菌木质素降解酶的产量和相应的控制策略, 应用 5L 搅拌罐生物反应器对氮限制下 ($C/N = 56/2.2$) *P. chrysosporium* 产木质素降解酶进行了放大研究. 结果表明, 在分批发酵试验中, 锰过氧化物酶 (MnP) 和漆酶 (Lac) 分别在培养第 6d 和第 7d 达到峰值, 其酶活随时间的变化规律与摇瓶试验基本相同; 而采用氮限制液体培养基进行补料没有获得更高的酶活, 因此, 可以得出采用发酵液体培养基作为补料液不利于白腐真菌持续产酶. 另外, 在分批发酵和分批补料发酵过程中, 均发现体系 pH 值变化与白腐真菌生长和次生代谢产酶具有较好的相关性, 当白腐真菌进入次生代谢阶段开始产酶时, 体系 pH 值开始下降, 随着发酵后期酶活的降低, pH 值下降的幅度也逐渐变小, 当体系酶活接近为 0.00U/L 时, pH 值基本不再变化. 因此, 在实际发酵过程中, 可以依据体系 pH 的变化间接了解白腐真菌的生长和产酶情况, 而分批补料策略还有待于进一步研究.

关键词: 白腐真菌; 黄孢原毛平革菌; 木质素降解酶; 分批补料; 生物反应器

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)02-0333-05

Production of Ligninolytic Enzymes in Bioreactor

GAO Dawen, WEN Xiang-hua, QIAN Yi

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Production of ligninolytic enzymes under nitrogen limited conditions ($C/N = 56/2.2$) was studied in a 5-L stirred tank bioreactor with a working volume of 2 L for obtaining higher production of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 and its control strategy. Results show that the manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) reached peak at the sixth day and the seventh day, respectively, and the variation of them with time in a batch cultivation are similar to the results by agitated Erlenmeyer flasks; however higher enzyme activity was not achieved by applying a fed-batch strategy, in which nitrogen limited medium was fed to the reactor. In addition, variation of pH during cultivation was related to the growth of *P. chrysosporium* and enzymes production during both batch and fed-batch cultivation. The pH value of liquid medium began to decline when the enzyme activity occurred in the system, and the decline became more and more slow along with the decrease of enzyme activity at the end of fermentation. So, pH would be as a control parameter to find out the growth of *P. chrysosporium* and enzymes production during incubating *P. chrysosporium*. However, fed-batch strategy still need further study.

Key words: white rot fungus; *P. chrysosporium*; ligninolytic enzyme; fed-batch; bioreactor

木质素降解酶的实际生产有赖于成熟的生物反应器发酵技术, 生物反应器发酵是木质素降解酶从研究走向应用的关键环节. 目前白腐真菌木质素降解酶的生物反应器发酵, 主要采用菌体细胞自由悬浮和细胞固定化 2 种培养方式. 但从文献来看, 有关白腐真菌反应器发酵的技术还不够成熟. 1988 年 Janshekar 等^[1]应用 42L 搅拌罐反应器研究 *P. chrysosporium* 悬浮培养分泌木质素降解酶时, 考察了接种量、菌球大小、某些有机化合物、培养条件和培养基成分的影响, 这是所见较早的旨在进行木质素降解酶大规模发酵的研究. Herpoel 等^[2]在气升式反应器中采用不锈钢网固定化培养 *P. chrysosporium* 生产 MnP 时, 当反应器规模从 2.5L 放大到 100L 时, MnP 产率增大为原来的 2 倍, 达到 6 600U/L. Bosco 等^[3]应用直径为 5cm, 高

83cm 的滴滤床反应器研究了表观液体流速对 *P. chrysosporium* 木质素过氧化物酶的影响, 结果表明, 表观液体流速影响 LiP 的产生和活性, 并得出 $0.02 \sim 0.04 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 的表观液体流速可以大大提高 LiP 的活性. Dominguez 等^[4]设计了一种新型转鼓反应器进行 *P. chrysosporium* 木质素降解酶的发酶, 得出半固态发酵有利于 MnP 和 LiP 的产生; 此外, 还应用气升式反应器尝试培养 *P. chrysosporium*, 并考察了自由悬浮培养和惰性载体固定化培养 2 种方式下的木质素降解酶产生情况^[5].

收稿日期: 2005-01-14; 修订日期: 2005-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50478010); 中国博士后科学基金项目 (2004035035)

作者简介: 高大文 (1967~), 男, 博士, 副教授, 主要从事环境生物技术与水污染控制研究, E-mail: gdw@mail.tsinghua.edu.cn

由于木质素降解酶往往是在白腐真菌受碳、氮或硫营养限制的次生代谢阶段产生的,在生长受限时,酶产率也较低。因此,为了克服底物的阻遏效应,人们尝试采用底物流加策略进行分批补料发酵和连续发酵以进一步提高酶的产量和产率。Moreira 等^[6]在 10L 搅拌罐反应器中培养 *Bjerkandera* sp. BOS55 时,发现分批补料方式能够重新激活酶的产生,使酶活维持较长时间。Galhaup 等^[7]采用 20L 搅拌罐生物反应器培养 *Trametes pubescens* MB 89 生产漆酶(Lac),在分批培养中最大 Lac 活力约为 330U/mL,通过采用分批补料策略控制反应器内葡萄糖浓度不超过某一低的临界值,从而避免葡萄糖抑制效应,使得 Lac 产量几乎达到分批培养的 2 倍(740U/mL)。

目前我国应用生物反应器研究白腐真菌发酵技术的还很少,特别在分批补料发酵策略的研究上基本没有。基于此,本课题在前期摇瓶发酵试验的基础上,选择氮限制培养基(C/N = 56/2.2)开展了白腐真菌木质素降解酶生物反应器放大研究。采用反应器批发酵和分批补料发酵 2 种方式考察白腐真菌在生物反应器中生长和木质素降解酶发酵的特征,为实现木质素降解酶发酵的有效放大提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

采用的白腐真菌菌种是由本实验室保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基

采用 PDA 培养基,即马铃薯浸出液 200g/L,葡萄糖 20g/L,琼脂 20g/L。

1.2.2 发酵培养基

参照 Tien & Kirk^[8] *P. chrysosporium* 基础培养基配制,其中用 0.02mol/L 乙酸缓冲液(pH 4.4)代替丁二酸二甲酯缓冲液。选择氮限制(C/N = 56/2.2)液体培养基进行试验,另外添加终浓度 2mmol/L 藜芦醇^[9]。接种前无菌过滤加入 VB₁ 溶液,使其浓度为 1mg/L。

1.3 反应器

采用德国 B. Braun Biotech International/Sartorius Groups 生产的 5L 全自动发酵罐(配置有 pH 和溶氧电极)作为白腐真菌生长和产酶反应器。

1.4 实验方法

1.4.1 种子培养方法

将斜面上的菌种接种到 PDA 种子培养基平板上于 37℃下培养 3~4d。

1.4.2 发酵培养方法

用接种针从培养 3~4d 的种子培养基上剥取适量孢子入无菌水中制成孢子悬浊液,然后接入含 2L 发酵液体培养基的 5L 生物反应器中,使得反应器内接入的孢子量近似等于 1×10^5 个/mL。然后通过与反应器相联的控制器控制反应器内温度恒定在 37 ± 0.5 ℃,搅拌速度为 160 r/min,每 L 液体培养基的通气速率为 0.5L/min。培养过程中每天定时取样,测定 MnP、Lac、葡萄糖、总氮和总磷,并且定时记录培养过程中体系的 pH 值变化情况。

1.5 分析方法

1.5.1 主要仪器和试剂

可见光分光光度计(UV-1 200V, SHIMADZU),可见紫外光分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU)。

藜芦醇 2,2-连氮-二-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(简称 ABTS)和次氨基三乙酸盐均为 Fluka 公司产品,其余药品均为分析纯试剂。

1.5.2 粗酶液制备

样品经离心(9000r/min, 10min)得到上清液,用于酶活测定。

1.5.3 酶活测定

锰过氧化物酶(MnP)采用 Paszczynski 方法^[10],定义每 1min 氧化 $1\mu\text{mol Mn}^{2+}$ 为 Mn^{3+} 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

漆酶(Lac)采用 Bourbonnais 和 Paice 方法^[11],定义每 1min 氧化 $1\mu\text{mol}$ 2,2-连氮-二-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(简称 ABTS)所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5.4 葡萄糖测定

采用葡萄糖氧化酶法进行测定(葡萄糖试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司)。

1.5.5 氨氮测定

纳氏试剂分光光度法^[12]。

1.5.6 总氮测定

过硫酸钾氧化-紫外分光光度法^[12]。

1.5.7 总磷测定

氯化亚锡还原光度法^[12]。

1.5.8 菌体生物量测定

实验结束时将生物反应器内的菌丝小球取出、过滤,并在 105℃下烘干至恒重。

2 结果与讨论

2.1 白腐真菌分批发酵

首先在 5L 生物反应器内进行了白腐真菌间歇培养, 实验结果如图 1 和图 2 所示. 从图 1 可以看出, 锰过氧化物酶在第 4d 时开始出现, 第 6d 达到峰值(155.06U/L), 然后活性急剧下降, 至第 8d 时已基本检测不到锰过氧化物酶; 而漆酶较锰过氧化物酶出现得早, 但培养初期酶活很低, 第 6d 时才达到 11.3U/L, 第 7d 达到峰值(68.00 U/L). 从锰过氧化物酶和漆酶出现的时间以及达到最大酶活的时间来看, 生物反应器发酵实验的结果与前期摇瓶实验结果是相一致的^[13], 仅是放大后酶活的绝对值降低, 这一结果与 Hess 等人所得结果相同^[14]. 造成酶活降低的原因可能与生物反应器内存在与摇瓶迥异的流体力学、混合和传质特点有关. 另外, 由于实验初期采用渔泵向反应器内供气造成供气量不足, 也影响白腐真菌次生代谢阶段分泌木质素降解酶.

另外, 从发酵过程中 pH 的变化来看(图 2), 在

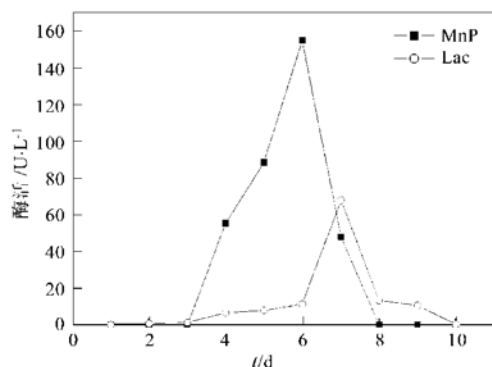


图 1 白腐真菌发酵培养阶段 MnP 和 Lac 随时间的变化

Fig. 1 Variation of MnP and Lac with time during incubating white rot fungus

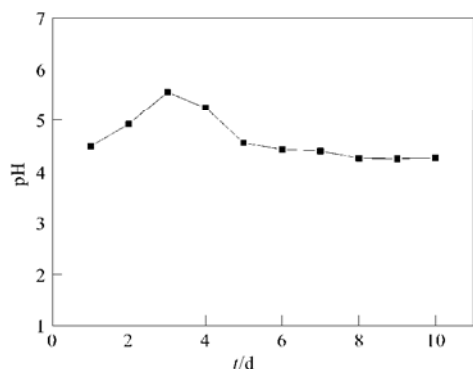


图 2 白腐真菌发酵培养阶段 pH 的变化

Fig. 2 Variation of pH during incubating white rot fungus

发酵初期, 也就是白腐真菌生长期, 发酵液 pH 是上升的, 至第 3d 时达到峰值, 随后开始下降. 结合图 1 和图 2, 还可以看出, 生物反应器内 pH 的变化与白腐真菌木质素降解酶的产生是具有相关性的, 当白腐真菌进入次生代谢阶段开始产酶时, 体系 pH 值开始下降, 随着发酵后期酶活的降低, pH 值下降的幅度也逐渐变小, 当体系酶活接近为 0.0U/L 时, pH 值基本不再变化. 因此, 可以得出, 根据发酵过程中体系 pH 值的变化间接了解反应器内木质素降解酶的产生情况.

2.2 白腐真菌分批补料发酵

由于在白腐真菌分批发酵试验中出现了锰过氧化物酶酶活比摇瓶发酵培养低的问题, 一方面是由于发酵罐本身的水力条件和机械搅拌强度与摇瓶培养相差较大, 另一方面可能是气泵功率太小引起氧气供给不足造成的(充气速率小于 0.1L/min; $O_2 = 20\% \sim 23\%$). 因此, 在反应器分批补料试验中, 采用空气压缩机来解决氧气供给问题(保证充气速率稳定在 0.5L/min; $O_2 = 80\% \sim 85\%$). 依据前期白腐真菌分批发酵试验得到的结果, 计划在锰过氧化物酶酶活出现峰值的第 6d 开始补料, 补料液选择与初始液体培养基组成完全相同的营养液. 但是, 更换气源以后, 由于溶氧浓度有很大提高($O_2 = 80\% \sim 85\%$), 使得木质素降解酶出现的时间有明显的提前, 第 4d 就出现锰过氧化物酶和漆酶的酶活峰值(MnP= 206.8U/L; Lac= 30U/L), 并且锰过氧化物酶酶活有了显著升高(是采用渔泵发酵培养的 1.33 倍), 如图 3 所示. 因此, 第 5d 发现锰过氧化物酶酶活降低以后, 于当天马上进行补料, 补料体积为 200mL, 同时, 从反应器内排出 200mL 粗酶液. 培养第 7d 下午发现锰过氧化物酶酶活接近 0U/L 时, 开

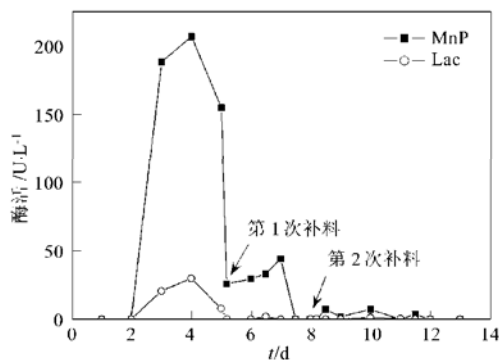


图 3 白腐真菌补料发酵培养时 MnP 和 Lac 随时间的变化

Fig. 3 Variation of MnP and Lac with time during incubating white rot fungus with medium feeding

始进行第2次补料,补料体积为500mL培养基。由于此时没有酶活收获,这批试验没有从反应器提取酶液。

从图3可以看出,补料以后,酶活随有上升,但幅度很小。第1次补料后,锰过氧化物酶酶活2d仅升高18.5U/L;而第2次补料后,酶活增加得更少,2d锰过氧化物酶仅增加7.4U/L。从图3还可以看出,补料对漆酶影响不大,2次补料后漆酶均未增加,始终在0U/L附近波动。因此,从补料策略上,进行培养基补料不能很好地刺激白腐真菌分泌次生代谢产物。结合前期摇瓶试验结果,探索采用碳源补料策略是今后的研究方向。

图4显示了2次补料前后反应体系内营养物的变化情况。从图4中可以看出,补料前反应器内葡萄糖和总磷浓度还剩余较多,分别为41.3mmol/L和312.6mg/L,比初始浓度仅减少29.5%和12.6%;而总氮消耗较快,培养第2d在反应器内就检测不出总氮浓度,总氮的变化与木质素降解酶的产生是相对应的(图3)。因为试验中选择的液体培养基是氮限制培养基($C/N=56/2.2$),所以当体系内氮氮耗尽时,白腐真菌进入次生代谢阶段,开始产酶。但这种次生代谢产酶现象在第2次补料时并不明显。图4b显示第10d时体系内总氮已耗尽,但第10d和第11d所检测出的锰过氧化物酶很少,其酶活仅为7.3U/L。另外,从补料后营养物的消耗速率上也可以看出,第2次补料后葡萄糖、总氮和总磷的消耗速率明显低于第1次补料,这也间接反映体系内白腐真菌的生理活性下降。由此说明,白腐真菌次生代谢产酶机理是复杂的,并不完全是在某一限制底物耗尽时产酶,而与白腐真菌菌体生物活性和体系内的代谢产物的量有关。因此,在白腐真菌分批补料发酵策略方面还有许多问题有待于进一步深入探究。

白腐真菌分批补料发酵过程中体系pH变化如图5所示。从图5中可以看出,白腐真菌在发酵培养过程中pH变化还是有一定规律的,与前期白腐真菌分批发酵培养试验相似,在白腐真菌生长阶段体系pH会逐渐升高,到次生代谢产酶阶段时体系pH开始下降。并且当体系酶活降低时,pH下降的幅度也逐渐减小,至酶活接近0U/L时体系pH变化也趋于稳定。2次补料后体系pH变化不完全一致的原因是由于2次补料体积不同造成的,第1次补料仅向反应体系投加200mL液体培养基,占总体积的10%,如此低浓度的底物很快被白腐真菌所利用,这一变化从营养物的消耗速率上也可以得出。另外,从

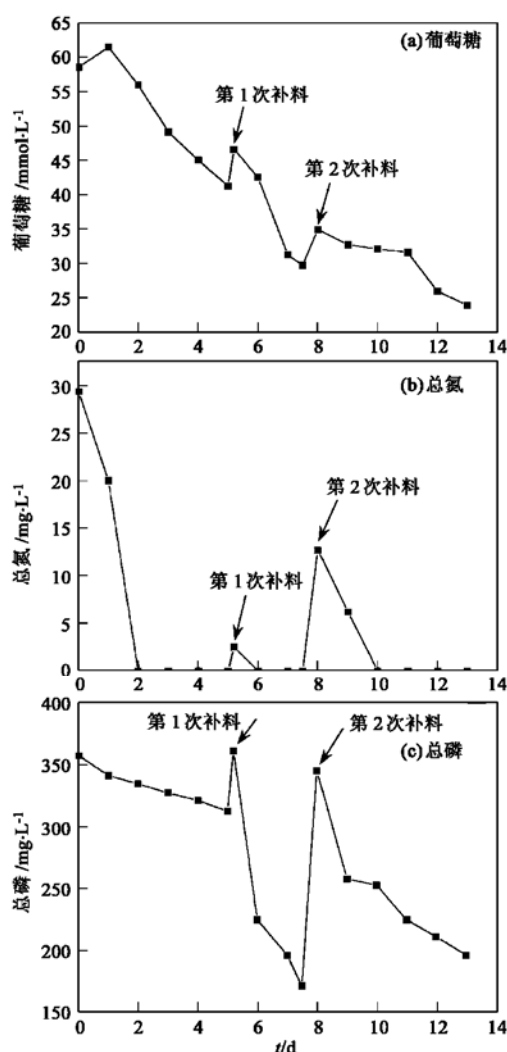


图4 白腐真菌补料发酵培养时营养物随时间的消耗

Fig. 4 Variation of the nutrient with time during incubating white rot fungus with medium feeding

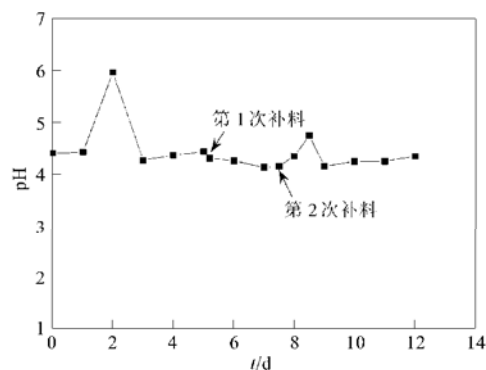


图5 白腐真菌补料发酵培养时pH的变化

Fig. 5 Variation of pH during incubating white rot fungus with medium feeding

第1次补料后体系的锰过氧化物酶酶活变化也可以看出,补料后酶活仍然增加。因此,第1次补料后体

系 pH 并没有上升而是继续下降. 而由于第 2 次补料体积是 500mL, 是第 1 次补料的 2.5 倍, 而且补料时锰过氧化物酶酶活已接近 0U/L, 因此, 体系内白腐真菌首先利用补加的营养物生长, 这就使得第 2 次补料后体系 pH 有缓慢上升的趋势.

综上, 在白腐真菌的发酵阶段, 体系 pH 值变化与其生长和产酶具有一定的相关性. 因此, 可以依据发酵过程中体系 pH 的变化间接了解白腐真菌的生长和产酶情况.

3 结论

(1) 初步实现了白腐真菌在生物反应器内的放大培养, 其酶活随时间的变化规律与摇瓶试验基本相同, 只是由于反应器本身的水力条件和机械搅拌强度与摇瓶试验相差较大, 使得酶活峰值有所降低.

(2) 初步得出采用发酵液体培养基做为补料液不利于白腐真菌持续产酶, 建议在后续研究中采用单纯碳源补料, 有关碳源的种类和补料体积还有待于进一步深入研究.

(3) 在白腐真菌发酵过程中, 体系 pH 值变化与白腐真菌生长和次生代谢产酶具有较好的相关性, 当白腐真菌进入次生代谢阶段开始产酶时, 体系 pH 值开始下降, 随着发酵后期酶活的降低, pH 值下降的幅度也逐渐变小, 当体系酶活接近为 0.0U/L 时, pH 值基本不再变化. 因此, 在实际发酵过程中, 可以依据体系 pH 的变化间接了解白腐真菌的生长和产酶情况.

参考文献:

- [1] Janshekar H, Fiechter A. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors[J]. J. Biotechnol., 1988, **8**: 97~ 112.
- [2] Herpoel I, Asther M, Sigoillot J C. Design and scale up of a process for manganese peroxidase production using the hypersecretory strain *Phanerochaete chrysosporium* F1512[J]. Biotechnol. Bioeng., 1999, **65**(4): 468~ 473.
- [3] Bosco F, Ruggeri B, Sassi G. Performances of a trickle-bed reactor (TBR) for exoenzymes production by *Phanerochaete chrysosporium*: influence of superficial liquid velocity [J]. Chemical Engineering Science, 1999, **54**(15~ 16): 3163 ~ 3169.
- [4] Dominguez A, Rivela I, Couto S R, *et al.* Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support[J]. Process Biochem., 2001, **37**(5): 549~ 554.
- [5] Dominguez A, Couto S R, Sanroman A. Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors[J]. Biotechnol. Letts., 2001, **23**(6): 451 ~ 455.
- [6] Moreira M T, Torrado A, Feijoo G, *et al.* Manganese peroxidase production by *Bjerkandera* sp. BOS55 [J]. Bioprocess Eng., 2000, **23**(6): 663~ 667.
- [7] Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, *et al.* Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, **30**(4): 529~ 536.
- [8] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Methods in Enzymology, 1988, **161**: 238 ~ 249.
- [9] Rodriguez S, Santoro R, Cameselle C, *et al.* Effect of the different parts of the corn cob employed as a carrier on ligninolytic activity in solid state cultures by *P. chrysosporium* [J]. Bioprocess Eng., 1998, **18**(4): 251~ 255.
- [10] Paszczynski A, Crawford R L, Huynh V B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification[J]. Methods in Enzymology, 1988, **161**: 264~ 270.
- [11] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation [J]. FEBS Letts., 1990, **267**: 99~ 102.
- [12] 国家环保局. 水和废水监测分析方法(第三版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 252~ 286.
- [13] Gao D W, Wen X H, Qian Y. Effect of nitrogen concentration in culture mediums on growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Journal of Environmental Science, 2005, **17**(2): 190~ 193.
- [14] Hess J, Leitner C, Galhaup C, *et al.* Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white rot fungus *Trametes multicolor*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, **98**: 229~ 241.