

中药药渣发酵生产毛云芝菌漆酶培养基的工艺研究

Optimization on culture medium for laccase production from *Coriolus hirsutus* by residues of traditional Chinese medicine

岳 鹏 潘志恒 孙勇民

YUE Kun PAN Zhi-heng SUN Yong-min

(天津现代职业技术学院, 天津 300350)

(Tianjin Modern Vocation Technology College, Tianjin 300350, China)

摘要:为充分利用中药药渣,该研究探索不同中药药渣对毛云芝菌漆酶产酶效果的影响。结果表明:大黄、麻黄和芍药药渣可有效促进毛云芝菌漆酶的产量。在选择大黄药渣的基础上,优化药渣培养基的组成为麸皮3%,蛋白胨0.2%,大黄药渣12%, MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH值5.0,该培养基产酶酶活可达到4 828.2 U/mL,约是优化前培养基产酶酶活的1.4倍。

关键词:中药渣;毛云芝菌;漆酶

Abstract: In order to make full use of residue from traditional Chinese medicine, the different kinds of residues of traditional Chinese Medicine for laccase production by *Coriolus hirsutus* were investigated. It is capable of producing laccase with the three kinds of residues of traditional Chinese Medicine. The result showed that the optimal medium composition was as follows: wheat bran 3%, peptone 0.2%, residues of Chinese rhubarb 12%, MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH value 5.0. Enzyme activity under the optimal culture conditions was 4 828.2 U/mL, which was 1.4 fold of that of the original medium.

Keywords: residue of traditional Chinese medicine; *Coriolus hirsutus*; laccase

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2)是一类含铜多酚氧化酶,真菌漆酶因其来源广泛、催化活性强而具有广泛应用前景和价值^[1,2],但真菌漆酶通常为次级代谢酶,产酶周期长且产酶量低,严重限制了漆酶的工业化生产^[3,4]。

中国是中药资源消耗大国,中成药生产、中药饮片炮制、含中药成分轻化工产品生产过程中均有大量药渣产生。中

药药渣种类多样、湿度高、处理难度大,目前大部分均采用焚烧或填埋方式进行处理,既造成了中药资源的浪费,又造成了水体、大气的污染。由于中药药渣中含有较丰富的营养成分,如多糖、木质素、氨基酸及微量元素等,部分研究^[5,6]表明一些中药药渣可显著促进真菌生长及次级代谢酶的产生,目前仅有利用白芍药药渣固体发酵亮菌产漆酶的研究^[7],未见利用药渣进行液体发酵的相关研究报道。本试验拟以常见中药药渣为研究对象,筛选获得合适中药药渣诱导漆酶产量提高的同时,发挥真菌生物降解作用,充分利用中药渣的生物物质资源,使其变废为宝。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*):由安徽大学生命科学学院提供,4℃下保存于PDA斜面培养基中;

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、溶性淀粉、酵母膏、蛋白胨、牛肉浸膏:生化试剂,天津市化学试剂一厂;

五水合硫酸铜、硫酸镁、磷酸二氢钾:分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司;

2,2'-联氮二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸盐)(ABTS):分析纯,Aladdin Chemistry Co. Ltd.

1.1.2 主要仪器设备

立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-75KBS型,上海申安医疗器械厂;

恒温培养振荡器:ZWYR-2102C型,上海智诚分析仪器制造有限公司;

紫外可见分光光度计:T6系列,北京普析通用仪器有限责任公司;

洁净工作台:HCB-1800H型,海尔集团;

电子天平:ME104E型,梅特勒-托利多国际贸易有限公司。

基金项目:天津市科研院所技术开发项目(编号:ysk2011-29)

作者简介:岳鹏(1981—),男,天津现代职业技术学院副教授,硕士。
E-mail: yue30219859@126.com

通讯作者:孙勇民

收稿日期:2015-07-05

1.2 方法

1.2.1 培养基组成及培养条件

(1) 液体种子培养基: 马铃薯汁 30% (m/V), 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 1 g/L, MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 自然。

(2) 摇瓶培养基: 小麦麸皮 3% (m/V), 蛋白胨 0.2% (m/V), MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 自然。

(3) 基础培养条件: 在 250 mL 三角瓶中, 装液量 50 mL, 接种量 10 mL, 培养温度 30 °C, 转速 200 r/min, 振荡培养 12 d^[8]。

1.2.2 培养时间对毛云芝菌生长及产酶酶活的影响 采用摇瓶培养基, 在接种量 20%, 培养温度 30 °C, 转速 200 r/min 的条件下对毛云芝菌进行培养, 每 24 h 取 50 mL 发酵液, 分析毛云芝菌生长及产酶酶活随培养时间的变化情况。

1.2.3 中药药渣对产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在摇瓶培养基中分别加入 10% (m/V) 防风、川芎、当归、芍药、大黄、麻黄、连翘及苍术 8 种中药渣, 比较不同类型中药药渣对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.4 碳源对产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在蛋白胨 0.2% (m/V), MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 自然的条件下, 分别以 3% (m/V) 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉及麸皮为碳源, 比较不同碳源对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.5 氮源对产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在小麦麸皮 3% (m/V), MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 自然的条件下, 分别以 0.2% (m/V) 的酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、花生粉、黄豆粉和尿素为氮源, 比较不同氮源对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.6 中药药渣添加量对产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在摇瓶培养基中分别加入 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% (m/V) 大黄药渣, 比较不同药渣添加量对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.7 碳氮比对产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在小麦麸皮 3% (m/V), MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 自然的条件下, 分别加入 0.16%, 0.18%, 0.20%, 0.22%, 0.24%, 0.26%, 0.28% (m/V) 蛋白胨, 考察不同 C/N 比对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.8 pH 值对毛云芝菌产酶的影响 采用基础培养条件, 以摇瓶培养基为基础, 在蛋白胨 0.2% (m/V), 小麦麸皮 3% (m/V), MgSO_4 3 g/L, KH_2PO_4 3 g/L 的条件下, 分别在 pH 为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 下进行培养, 比较不同 pH 值对毛云芝菌生长及其产酶酶活的影响。

1.2.9 理化分析方法

(1) 菌丝干重的测定: 采用干燥称重法^[9]。

(2) 漆酶活力的测定: 采用分光光度法^[10]。

2 结果与分析

2.1 培养时间对毛云芝菌生长及产酶酶活的影响

由图 1 可知, 在初始无药渣添加的摇瓶培养基中, 1~3 d

时毛云芝菌处于调整期, 此阶段毛云芝菌产酶能力较弱; 3~9 d 时毛云芝菌进入指数生长期, 伴随着毛云芝菌的快速生长, 其产酶能力也迅速增强; 9~12 d 时毛云芝菌生长逐步进入稳定期, 此阶段毛云芝菌产酶能力及酶活逐步达到峰值; 培养 12 d 后, 毛云芝菌产酶能力随着菌丝体进入衰亡期而逐步降低。因此, 根据培养变化曲线确定菌种培养时间为 12 d。

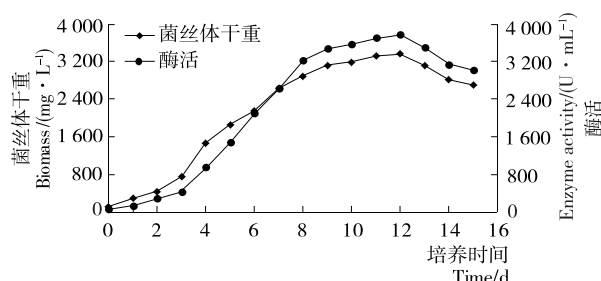


图 1 培养时间对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响
Figure 1 Effects of culture time on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

2.2 毛云芝菌药渣培养基的优化

2.2.1 中药药渣对产酶的影响 由图 2 可知, 8 种中药药渣对毛云芝菌培养影响效果存在明显差异。毛云芝菌漆酶是一种诱导酶, 研究^[11]表明, 漆酶的合成与菌丝体的生长没有明显的相关性, 在毛云芝菌生产过程中通常需要添加诱导剂促进漆酶的分泌。常见的诱导剂有小分子芳香化合物、木质素、糖苷类物质及酚类物质等^[12]。试验^[13]表明, 大黄药渣中的土大黄甙、麻黄药渣中的鼠李糖甙及芍药药渣中的芍药甙均能有限促进漆酶的分泌; 防风、连翘及苍术药渣中富含的色酮、内酯类物质对漆酶分泌影响不明显; 当归、川芎药渣对漆酶的分泌存在明显的抑制作用, 这可能是由于当归、川芎药渣中富含的萜本内酯、川芎酐内酯等挥发性油性成分具有明显的抑制真菌活性作用造成的。综合考虑, 试验选择大黄药渣作为添加中药药渣。

2.2.2 碳源对产酶的影响 由图 3 可知, 毛云芝菌利用天然碳源的能力较强, 能够生长的基质广泛。从毛云芝菌菌丝体生长情况上看, 可溶性淀粉、葡萄糖及蔗糖等作为碳源时, 虽促进了毛云芝菌菌丝体生物量的提高, 但产酶酶活却很低,

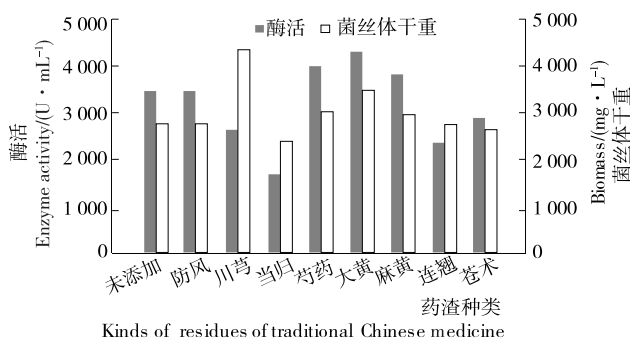


图 2 中药药渣对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响
Figure 2 Effects of different medicine slag on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

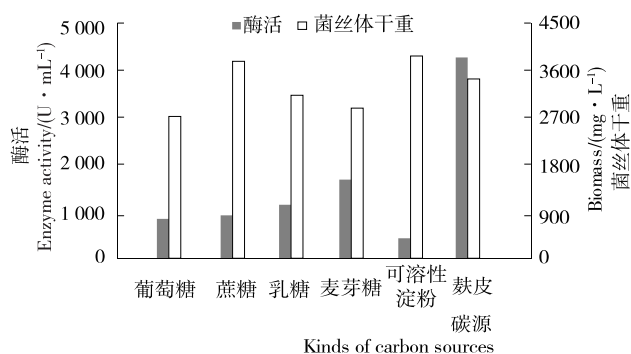


图 3 碳源对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响

Figure 3 Effects of different carbon sources on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

这表明毛云芝菌产酶与其菌丝体的生长没有明显的正相关性,选择合适的诱导剂及其用量是漆酶优化工艺中非常重要的步骤。从产酶酶活上比较,麸皮作为碳源的效果明显优于其他碳源,这可能是由于麸皮中富含的木质素类似物、维生素(尤其是B族维生素)均是毛云芝菌漆酶分泌的诱导剂,有效促进了毛云芝菌产酶能力的提高^[14]。综合考虑,选择麸皮作为培养基中的碳源。

2.2.3 氮源对产酶的影响 由图4可知,生长在不同氮源培养基上的毛云芝菌菌丝体具有一定差异,毛云芝菌对黄豆粉、蛋白胨及酵母膏的利用能力要优于尿素、牛肉膏和花生粉,这可能是因为蛋白胨、黄豆粉中的部分营养物质可作为碳源被利用,促进了营养平衡和物质转化。

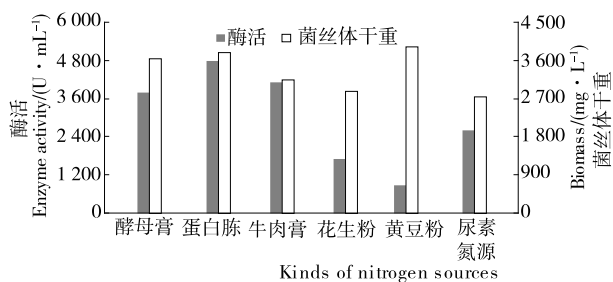


图 4 氮源对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响

Figure 4 Effects of different nitrogen sources on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

但从产酶酶活上比较,蛋白胨、酵母膏及牛肉膏3种氮源的效果要优于其他3种氮源,这主要是由于花生粉、黄豆粉作为慢速氮源,使用时毛云芝菌前期生长速度受到了明显的影响,菌体积累不足,抑制了漆酶的产生。因此,快速氮源——蛋白胨作为培养基的氮源更为合适。

2.2.4 中药药渣添加量对产酶的影响 由图5可知,毛云芝菌生长受大黄药渣添加量的影响不显著;但产酶酶活受到大黄药渣添加量的影响,呈现先增大后减小的趋势,造成这种现象是大黄药渣除了含有诱导漆酶分泌的糖苷类物质,同时还含有一定的抑制真菌活性的有机酸(酯)类挥发性成分,当大黄药渣添加量不断增大时,糖苷类物质的诱导作用逐步达到峰值,继续增加药渣添加量,其中挥发性成分抑制真菌活性的作用逐渐显现,漆酶产量又逐渐下降^[15]。因此,综合考虑产酶酶活和药渣添加量,大黄药渣的添加量选择为12%。

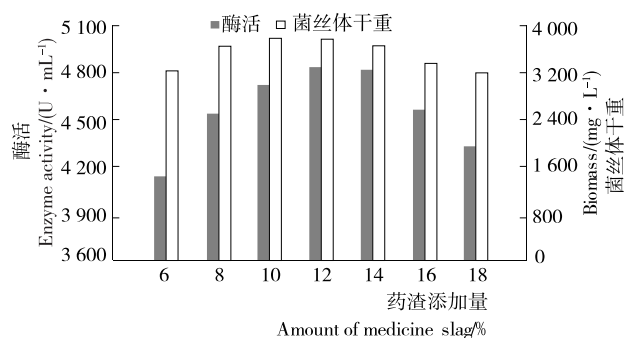


图 5 药渣添加量对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响

Figure 5 Effects of different amount of medicine slag on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

2.2.5 碳氮比对产酶的影响 由图6可知,培养基的C/N是毛云芝菌产酶的重要影响因素。漆酶作为一种代谢产物,一般在培养基中氮源物质耗尽时才开始分泌;当C/N较小时,毛云芝菌生长过于旺盛,培养基中氮源充足,抑制了漆酶的分泌;当C/N较大时,培养基中氮源不足,毛云芝菌生长不良,不利于漆酶的发酵生产;当C/N为20时,漆酶活力达到最高值。因此,本试验C/N比选择为20。

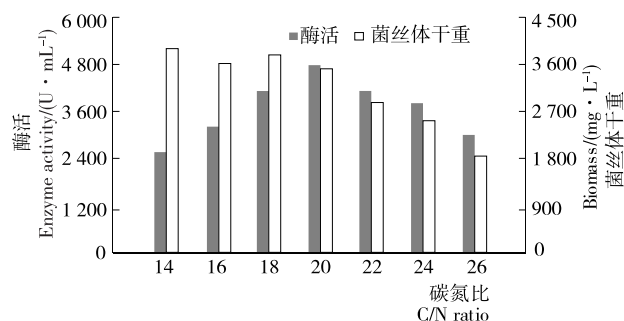


图 6 碳氮比对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响

Figure 6 Effects of different C/N ratio on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

2.2.6 pH值对产酶的影响 由图7可知,当底物的初始pH值为4.5时,漆酶活力达到最高;继续升高初始pH值,漆酶活力也逐渐降低,这主要是由于当pH值小于4.0时,毛云芝菌生长困难,产酶能力也相应降低;pH值超过5.0也出现降低趋势,其原因主要是酸性条件可以抑制细菌的生长,有益于真菌的生长,促进真菌漆酶的分泌。考虑到底物在略偏酸条件下可以抑制细菌的污染,因此云芝菌液体发酵产酶的初始pH值以4.5~5.0为宜。

2.3 优化培养基与原培养基的比较试验

将上述试验优化所得的结果进行组合,初步得到的毛云芝菌药渣培养基的组成为:碳源麸皮3%(m/V),氮源蛋白胨0.2%(m/V),大黄药渣12%(m/V),MgSO₄ 3 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, pH 5.0。利用此培养基与初始摇瓶培养基,在相同培养条件下同时培养12 d,比较添加药渣前后毛云芝菌的生长及产酶酶活的差异。

由表1可知,添加了大黄药渣的培养基与初始摇瓶培养基相比,毛云芝菌的生物生长量及产酶酶活均有显著的提高,大黄药渣对毛云芝菌发酵产漆酶存在明显的促进作用。

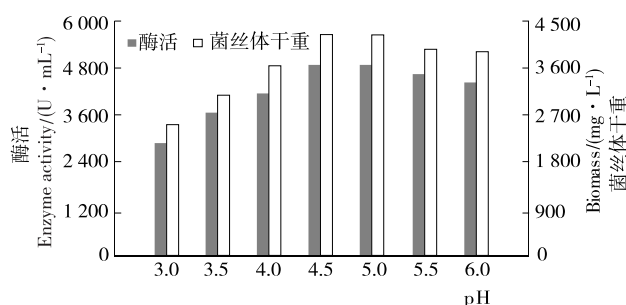


图7 pH值对毛云芝菌生物量及其产酶酶活的影响

Figure 7 Effects of pH on biomass of *Coriolus hirsutus* and the activity of laccase

表1 优化培养基与原培养基的酶活比较

Table 1 Comparison of enzyme activity of laccase cultured in original and optimized medium

试验组	菌丝体干重/(mg · L ⁻¹)	酶活/(U · mL ⁻¹)
优化前培养基	3 104.2	3 446.1
优化后培养基	4 254.5	4 828.2

3 结论

本试验开展了利用中药药渣促进毛云芝菌漆酶产酶效果的影响研究,通过比较多种常见中药药渣,发现大黄药渣促进毛云芝菌产酶能力及产酶酶活的提高效果最为明显。试验结果表明,毛云芝菌在初步优化的大黄药渣培养基中的产酶酶活较原培养基产酶酶活提高了1.4倍。

中药药渣是中药提取生产过程中的废弃物,处置不当易造成污染环境。然而,中药药渣尤其是根茎类中药药渣中含有大量的木质素、纤维素和功能性成分,具有较大的开发利用价值。目前,中药药渣用于固体发酵技术的研究相对较多,本试验结果表明中药药渣用于液态发酵也同样能取得较好的效果,为中药药渣的综合应用探索了新途径。

本试验目前只初步对各种常见中药药渣进行了筛选,并针对大黄药渣培养基进行了初步优化,后续还将对微量元素、

维生素对毛云芝漆酶药渣培养条件的影响进行深入研究,以期获得更高的产酶酶活。

参考文献

- 司静,李伟,崔宝凯,等. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(2): 48~55.
- 刘忠川,王刚刚. 真菌漆酶结构与功能研究进展[J]. 生物物理学报, 2013, 29(9): 629~645.
- 王锋,刘英,汪印,等. 漆酶及其应用[J]. 生物加工过程, 2012, 10(4): 70~76.
- 赵玉萍,陈晓旺. 产漆酶培养基条件的优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 226~230.
- Liu Zhi-yu, Zhang Dong-xu, Hua Zhao-zhe, et al. Improvement of laccase production and its properties by low-energy ion implantation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33(5): 639~646.
- 刘海新,马浩,黄海娟,等. 中药药渣的综合利用研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2014, 43(1): 30~32.
- 杨丽红,叶选怡,凌庆枝,等. 中药渣固体发酵亮菌产漆酶研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2 396~2 398.
- 朱友双. 杂色云芝液态和固态发酵产漆酶及离子液体对生物质预处理的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 78~83.
- 林俊芳,刘志明,陈晓阳,等. 真菌漆酶的酶活测定方法评价[J]. 生物加工过程, 2009, 7(4): 1~8.
- 朱雄伟,胡道伟,梅运军,等. 通过碳源与氮源研究白腐菌产漆酶和菌丝体生长的相关性[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 12~14.
- 刘家扬,蔡宇杰,廖祥儒,等. 漆酶高产菌的筛选及产酶优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 10~14.
- 刘华钢,申庆荣,刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 215~217.
- 赵亮亮. 红芝发酵产漆酶及其在染料脱色中的应用研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2010.
- 费娜,杨俊杰. 大黄等四种中草药体外抑菌活性比较[J]. 黑龙江医药科学, 2010, 33(1): 18~19.

信息窗

澳大利亚:食品标识新规强调原产 分梯度标示澳洲制造

7月21日,澳总理阿博特(Tony Abbott)、农业部长乔伊斯(Barnaby Joyce)及工业部长麦克法兰(Ian Macfarlane)联合公布食品标识改革方案。按照新的标识方案,食品生产商必须在标签上标明食品原产、制造生产和包装的详细地址。

澳联邦政府表示,对消费者而言在详细了解食品信息的基础上进行明智购物非常重要。澳大利亚民众极力呼吁加强原产地标识,而政府也将着力落实相关规定。

阿博特表示,在政府开展食品标识社区调查中,超过17 800位受访者表示钟爱绿色三角形底纹加金色袋鼠图案。新标签将继续沿用原有三角形袋鼠图案,另外还需配以金色标尺,用以标识产品所含本土原料的成分百分比。例如,“100%澳大利亚原料制造”、“澳大利亚包装,加拿大制造”、“澳大利亚制造,原料为澳洲胡萝卜和法国豌豆”等。消费者不仅无需通过小号印刷字体苦苦寻找食品来源

信息,还能快速比较货架上各种食品间的差异。目前相关人员正着力推进标签数字化,旨在为消费者提供更多更为详尽的食品信息。

按照规定,企业将在标签上添加必要信息,如关键原料来源。按照新的标识制度,如果某种澳洲食品产自海外,在重新包装过程中,标签上必须注明原产地信息。

此类改革还将进一步阐明澳大利亚“xx制造”的定义。对进口原料进行简单切割处理的产品不可归于“澳洲制造”范畴以内。

阿博特指出,如果各州及领地主动通过新方案,也许在今年下半年消费者就将看到改变。为给食品生产商提供充足准备时间,政府强制使用措施将于2016年开始启动。小型企业将分阶段落实标识新规。

(来源:www.cifst.org.cn)