

降烟秆木质素粗毛栓菌液态发酵工艺研究

杨 亮¹, 宋丹丹¹, 李 琼¹, 时 伟¹, 陈守文², 马 昕^{2*}

(1. 茅台学院酿酒工程系, 贵州 仁怀 564501; 2. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘 要: 为了提高降烟秆木质素粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*) S13 液态发酵生物量, 获得菌龄整齐、特性稳定的菌丝体, 采用正交设计及单因素分析技术优化了粗毛栓菌 S13 培养基及发酵条件。获得最佳培养基配方为: 蔗糖 20 g/L, 玉米粉 20 g/L, 豆粕 60 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L; 最佳发酵工艺参数为: 初始 pH 5.0, 接种 3 块菌塞, 500 mL 三角瓶装液量 80 mL, 180 r/min, 30℃ 发酵 5 d。在此发酵工艺条件下, 粗毛栓菌 S13 液态发酵生物量得到显著提高, 可达 49.83%(V/V)。该液态发酵工艺为粗毛栓菌 S13 在工业上的应用奠定了理论基础和技术支持。

关键词: 粗毛栓菌; 木质素降解菌; 液态发酵; 烟秆

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)04-0076-05

Optimization of Liquid Fermentation Conditions for the Tobacco Stalks Lignin Degrading Strain of *Trametes hirsuta*

YANG Liang¹, SONG Dandan¹, LI Qiong¹, SHI Wei¹, CHEN Shouwen², MA Xin^{2*}

(1. Department of Brewing Engineering, Maotai College, Renhuai 564501; 2. College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To improve the liquid fermentation biomass and obtain regular ages and stable characteristics of tobacco stalks lignin degrading strain *Trametes hirsuta* S13, the fermentation medium and cultivation conditions were optimized for *T. hirsuta* S13 in flasks used orthogonal and single factor analysis test. The optimum fermentation medium of *T. hirsuta* S13 contains sucrose 20 g/L, corn flour 20 g/L, soybean meal 60 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KCl 0.5 g/L. The optimal cultivation conditions was as following: temperature 30℃, initial pH 5.0, inoculum amount 3 fungus plugs, 180 r/min, broth content 80 mL/500 mL flask. Under the optimal fermentation medium and conditions, the biomass of *T. hirsuta* S13 was 49.83% (V/V). The liquid fermentation technology can provides experimental basis for industrial application.

Key words: *Trametes hirsuta*; Lignin degradation microorganisms; Liquid fermentation; Tobacco stalk

烟草是我国重要的农作物, 在每年带来巨大经济效益的同时, 却产生了约 650 万 ~ 700 万 t 的烟草秸秆^[1]。但由于这些农业废料中含有丰富的生物活性物质及微量元素^[2-3], 综合利用这些植物资源现已受到了广泛关注^[4]。如施用烟草秸秆制备的生物炭, 以改善植物对土壤中镉和锌的利用率^[5]; 采用水热碳化处理烟秆转化成高热能的

固态燃料^[6]; 利用烟秆制备可生物降解的植物苗圃托盘^[7]等。然而这些方法因其成本较高或影响环境而不能应用于大规模烟秆的处理。

目前, 生物法降解木质纤维素被认为是低成本且环境友好的处理烟草秸秆的方法^[8-9]。其中, 采用添加外源菌种堆肥腐熟烟秆制备有机肥是大规模利用秸秆资源、减少环境污染的有效手段, 且已进入工业化生产阶段^[10-11]。通过添加外源微生物提升堆肥降解效率、增加烟秆有机肥肥效^[12], 较典型的外源菌有: 降解木质素的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)^[13]和粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)^[14]、降解尼古丁的假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)^[15]、拮抗烟草青枯病的链霉菌(*Streptomyces sp.*)^[16]等等。

烟秆中高含量的木质素是制约烟秆堆肥腐熟

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 贵州省教育厅科技拔尖人才支持项目(黔教合 KY 字[2018]082); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]442)

作者简介: 杨 亮(1988-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为微生物学、白酒风味。

通讯作者: 马 昕, 女, 硕士, 高级工程师, E-mail: maxin@hubu.edu.cn

速度及程度的关键因素,工业上多以添加固态发酵培养的白腐菌以促进其降解,特别是粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*),因其良好的降解能力,近年来在工业应用、酶学、基因工程等领域受到热捧^[17-19]。然而固态法发酵粗毛栓菌因污染率高、生长周期长、菌龄不一致等问题制约着产业化应用。而液态法发酵可在短期内获得大量菌龄整齐的菌丝体且发酵液特性稳定,有利于规模化的工业生产,然而现阶段未见有对粗毛栓菌液体发酵的相关报道。本研究基于研究现状及工业需求,对粗毛栓菌 S13 液态发酵工艺进行研究,旨在优化得到粗毛栓菌 S13 的液态摇瓶发酵产菌丝最佳工艺,为粗毛栓菌 S13 工业液态深层发酵提供理论参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验材料

粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*) S13 由华中农业大学生命科学技术学院微生物工程实验室分离鉴定保藏,粗毛栓菌 S13 在烟秆中纯培养,25 d 可降解 40.54% 的烟秆木质素。

1.1.2 试剂

NaNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄、KCl、FeSO₄ 等试剂均为国产分析纯(AR)。

1.1.3 仪器

SGSP-02 水隔式恒温培养箱:湖北黄石医疗器械厂;HQL300B 柜式恒温冷冻摇床:武汉中科仪技术发展有限责任公司;Legend Micro17R 高速冷冻离心机:美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.4 培养基

PDA 培养基(g/L):去皮马铃薯 200.0 g,蔗糖 20.0 g,琼脂 18.0 g,pH 自然。

查氏培养基(g/L):NaNO₃ 3.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,MgSO₄ 0.5 g,KCl 0.5 g,FeSO₄ 0.01 g。

1.2 方法

1.2.1 种子制备及培养

(1)菌种活化:将-80℃保存的菌种接种到 PDA 固体平板上,30℃恒温培养箱培养 5 d,再转接到 PDA 斜面上,30℃恒温培养 5 d,于 4℃保存。

(2)种子培养:无菌条件下,挑取 4℃保存的菌种接种到 PDA 平板上,30℃恒温培养箱培养 5 d。

(3)生长曲线测定:采用内径 6 mm 牛津杯制作菌塞,每瓶接种 3 块菌塞,查氏培养基装液量 100 mL/500 mL,30℃、180 r/min 的恒温摇床中培养 6 d。

1.2.2 发酵培养基优化

碳氮源配方优化:保持查氏培养基无机盐成分不变,选择蔗糖作为碳源^[20],玉米粉^[21]、豆粕为氮源,设计三因素三水平的正交实验,进行摇瓶发酵,发酵结束后取发酵液测定生物量。

表 1 碳氮源因素的正交实验设计

因素	水平		
	蔗糖 (g/L)	玉米粉 (g/L)	豆粕 (g/L)
1	10.0	20.0	20.0
2	20.0	30.0	40.0
3	30.0	40.0	60.0

无机盐浓度的优化:选择不同浓度的 K₂HPO₄、MgSO₄、KCl、FeSO₄ 设计四因素三水平正交实验,进行摇瓶发酵,取发酵液测定生物量,从而确定优选的无机盐种类及其浓度。

表 2 无机盐的正交实验设计

因素	水平			
	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	KCl (g/L)	FeSO ₄ (g/L)
1	0.00	0.25	0.25	0.00
2	1.00	0.50	0.50	0.01
3	2.00	1.00	1.00	0.02

1.2.3 发酵条件优化

初始 pH 优化:在初始 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的条件下,进行摇瓶发酵实验,发酵结束后取菌液测定生物量。

接种量优化:在接种量为 2 块、3 块、4 块、5 块菌塞的条件下,进行摇瓶发酵实验,发酵结束后取菌液测定生物量。

初始装液量优化:在初始装液量为 60 mL、80 mL、100 mL、120 mL 的条件下,进行摇瓶发酵实验,发酵结束后取菌液测定生物量。

1.2.4 发酵液检测

按照优化方法进行摇瓶发酵,发酵结束后取发酵液测定生物量和 pH。生物量测定方法:将生长良好、无污染的摇瓶培养物装入带刻度的离心管中,于 4 000 r/min 下离心,根据所得固形物对应离心管的刻度所示体积,除以发酵液体积,计算出固形物占发酵液体积分数,即为菌丝体生物量(%),各实验处理均重复 5 次^[22]。

2 结果与分析

2.1 粗毛栓菌 S13 深层发酵生长曲线

粗毛栓菌 S13 在查氏培养基中的生长曲线及 pH 变化如图 1 所示。由图 1 可知, S13 在第 5 天达到菌丝体积累的最大值, 但生物量仍然较低, 只有 6.73%, 这主要是由于无机碳氮源不足以提供真菌生长所需养分导致。根据粗毛栓菌 S13 在液

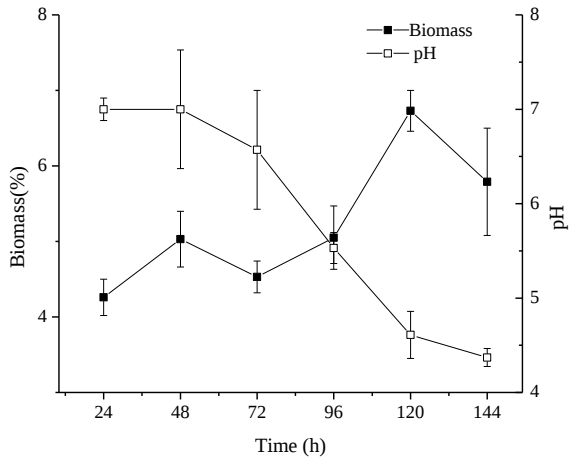


图 1 粗毛栓菌 S13 的生长曲线及 pH 变化

体培养基中的生长趋势, 在后续优化过程中取样检测点均选在发酵第 5 天。

2.2 粗毛栓菌 S13 深层发酵培养基优化

2.2.1 碳氮源浓度优化

以蔗糖作为碳源, 玉米粉、豆粕为氮源, 设计三因素三水平的正交实验, 对粗毛栓菌 S13 分别进行摇瓶发酵, 发酵结果如表 3 所示。

由表 3 中碳氮源正交实验设计对粗毛栓菌 S13 生物量影响的极差分析可知, 各因素影响粗毛栓菌 S13 生物量的主次顺序为 C>A>B, 即豆粕>蔗糖>玉米粉, 最优组合为 A₂B₁C₃。由正交实验结果可以得到优化碳氮源后粗毛栓菌 S13 的发酵培养基为: 蔗糖 20 g/L, 玉米粉 20 g/L, 豆粕 60 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, 起始 pH 7.0, 装液量 100 mL/500 mL, 180 r/min, 30℃ 发酵 5 d 后生物量为 32.00%±0.74%, pH 4.47±0.24。

表 3 碳氮源对 S13 生物量的影响

	A. 蔗糖(g/L)	B. 玉米粉(g/L)	C. 豆粕(g/L)	生物量(%)	pH
1	1	1	1	16.79	6.06
2	1	2	2	23.09	4.44
3	1	3	3	23.09	5.73
4	2	1	2	27.28	4.50
5	2	2	3	32.00	4.21
6	2	3	1	22.04	4.80
7	3	1	3	32.00	4.47
8	3	2	1	14.69	5.73
9	3	3	2	21.51	4.92
k1	20.99	25.36	17.84		
k2	27.11	23.26	23.96		
k3	22.73	22.21	29.03		
R	6.12	3.14	11.19		

2.2.2 无机盐浓度优化

在优化发酵培养基碳氮源的基础上, 采用四因素三水平正交实验, 考察无机盐浓度对液体发酵木屑素降解菌生物量的影响。发酵粗毛栓菌 S13 的无机盐正交设计实验的发酵结果如表 4 所示。

在无机盐正交实验设计的条件下, 各因素影响粗毛栓菌 S13 生物量的主次顺序为 A>B>C>D, 即 K₂HPO₄>MgSO₄>KCl>FeSO₄, 最优组合为 A₂B₂C₂D₁。由正交实验优化无机盐浓度后, 粗毛栓

菌 S13 的发酵培养基为: 蔗糖 20 g/L, 玉米粉 20 g/L, 豆粕 60 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.00 g/L, 起始 pH 7.0, 装液量 100 mL/500 mL, 180 r/min, 30℃ 发酵 5 d 后 S13 生物量可达 33.79%±1.65%, 发酵结束后 pH 4.82±0.34。通过无机盐正交实验可以看出, 高 FeSO₄ 含量并不利于粗毛栓菌 S13 的生长, 这可能是由于 Fe²⁺ 会与真菌代谢的有机酸产生一定的螯合作用, 改变了适宜白腐菌生长的酸环境导致的^[23]。

表 4 无机盐对 S13 生物量的影响

	A. K_2HPO_4 (g/L)	B. $MgSO_4$ (g/L)	C. KCl (g/L)	D. $FeSO_4$ (g/L)	生物量(%)	pH
1	1	1	1	1	29.13	4.73
2	1	2	2	2	29.72	4.51
3	1	3	3	3	26.80	4.66
4	2	1	2	3	33.21	4.92
5	2	2	3	1	33.79	4.82
6	2	3	1	2	30.30	4.44
7	3	1	3	2	32.63	4.31
8	3	2	1	3	32.63	4.89
9	3	3	2	1	30.88	4.51
k1	28.55	31.66	30.69	31.27		
k2	32.43	32.05	31.27	30.88		
k3	32.05	29.33	31.07	30.88		
R	3.88	2.72	0.58	0.39		

2.3 粗毛栓菌 S13 深层发酵条件优化

2.3.1 发酵初始 pH 优化

大量报道表明,白腐菌适合在偏酸性条件下生长,发酵培养基的初始 pH 会严重影响菌丝的生长。木质素降解菌在不同初始 pH 条件下发酵结果如图 2 所示。当培养基初始 pH 值为 5.0 时,粗毛栓菌 S13 生物量积累达到最大,为 44.00%。随着初始 pH 的提高,白腐菌的生物量随之降低,因此粗毛栓菌 S13 的液体培养基初始 pH 值选择 5.0。

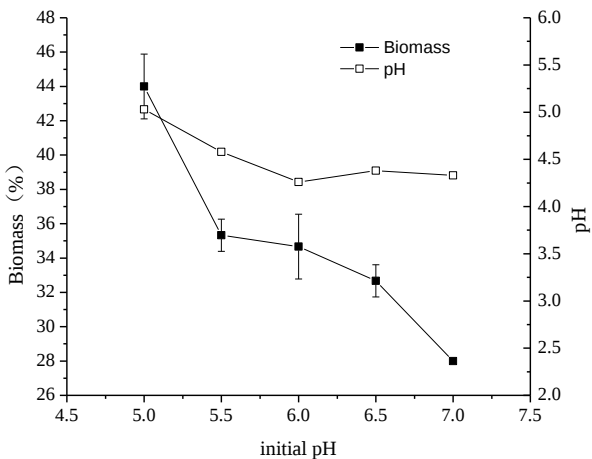


图 2 培养基初始 pH 对 S13 生物量的影响

2.3.2 发酵接种量优化

由图 3 可以看出,液体发酵粗毛栓菌 S13 的初始接种量为 3 块菌塞时,可使发酵达到最大的生物量,为 44.20%。

2.3.3 发酵初始装液量优化

装液量的多少会影响发酵过程中微生物对氧气的利用。装液越少,培养基中溶氧浓度越高,菌丝生长越快,但有时由于营养基质消耗过快,

后期养分不足,导致菌丝易于衰老甚至自溶;装液越多,溶氧相对越少,有可能导致菌体生长缓慢或生长不良等现象。装液量对粗毛栓菌 S13 的

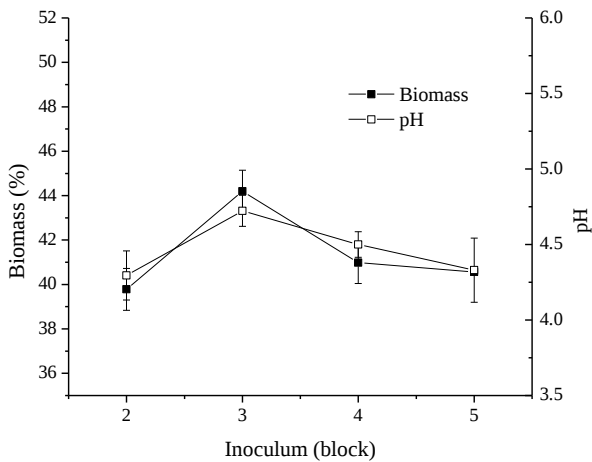


图 3 初始接种量对粗毛栓菌 S13 生物量的影响

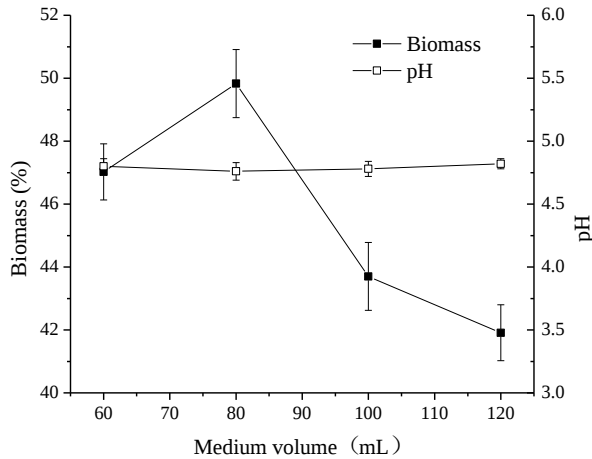


图 4 装液量对粗毛栓菌 S13 生物量的影响

生物量影响见图4,当摇瓶装液量为80 mL时,粗毛栓菌S13的菌丝体生物量最高,为49.83%。

3 结 论

粗毛栓菌在降解烟秆木质素方面的价值亟待开发,而现阶段对粗毛栓菌的培养尚停留在粗放的固态培养阶段,其产量及菌体特性制约着产业化的应用。本研究在实验室水平对木质素降解菌粗毛栓菌S13进行了发酵工艺优化,优化后的粗毛栓菌发酵工艺为:蔗糖20 g/L,玉米粉20 g/L,豆粕60 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L,起始pH 5.0,接种3块菌塞,500 mL三角瓶装液量80 mL,180 r/min,30℃发酵5 d后粗毛栓菌S13生物量可达49.83%(V/V)。采用优化后的发酵工艺进行发酵,粗毛栓菌S13的生物量显著提高,为粗毛栓菌S13的工业发酵及应用奠定了理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Shakhjes J, Marandi M A B, Zeinaly F, et al. Tobacco residuals as promising lignocellulosic materials for pulp and paper industry[J]. Bio Resources, 2011, 6: 4481-4493.
- [2] Kayıkçıoğlu H H, Okur N. Evolution of enzyme activities during composting of tobacco waste[J]. Waste Manage Res, 2011, 29: 1124-1133.
- [3] 沙洪林,佟 时,张维友,等.我国农作物秸秆产生及综合利用现状分析[J].吉林农业科学,2010,35(4):51-55.
- [4] 冯海萍,杨冬艳,谢 华,等.农业生物质资源木质纤维素及基质化利用研究进展[J].贵州农业科学,2017,45(5):144-147.
- [5] Xing Y, Lu K, Mcgrouter K, et al. Bioavailability of Cd and Zn in soils treated with biochars derived from tobacco stalk and dead pigs[J]. Journal of Soils & Sediments, 2017, 17(3): 751-762.
- [6] Cai J, Li B, Chen C, et al. Hydrothermal carbonization of tobacco stalk for fuel application[J]. Bioresour Technol, 2016, 220: 305-311.
- [7] Qin Z, Sun M, Luo X, et al. Life-cycle assessment of tobacco stalk utilization[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 119.
- [8] Wan C, Li Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(6): 1447-1457.
- [9] 熊 娟,龚玉杰,程志强,等.三种不同天然木质纤维原材料降解过程中物种种类、组成和多样性的对比分析[J].东北农业科学,2018,43(5):31-37.
- [10] 伍良伟.降解烟碱微生物的筛选及在烟秆腐熟发酵中的应用[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [11] 陈春岚,苏辉兰,黄广上,等.腐熟堆肥与落叶堆中纤维素降解菌的筛选及其环境适应性分析[J].西南农业学报,2016,29(6):1366-1370.
- [12] 陈 霞,罗友进,程玥晴,等.不同微生物菌剂对中药渣堆肥过程及理化性质的影响[J].西南农业学报,2017,30(12):2756-2763.
- [13] 苏玉龙.高效降解烟秆菌株筛选及其特性研究[D].北京:中国农业科学院,2016.
- [14] Su Y, Xian H, Shi S, et al. Biodegradation of lignin and nicotine with white rot fungi for the delignification and detoxification of tobacco stalk[J]. Bmc Biotechnology, 2016, 16(1): 81.
- [15] Zhong W, Zhu C, Shu M, et al. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 6935-6941.
- [16] 孙立广,张洪春,赵秀云,等.烟草青枯病拮抗菌在有机肥中的定殖效率及田间防治效果[J].中国烟草科学,2016,37(4):48-53.
- [17] Mao J Z, Zhang X, Li M F, et al. Effect of Biological Pretreatment with White-rot Fungus *Trametes hirsuta* C7784 on Lignin Structure in *Carex meyeriana* Kunth [J]. Bioresources, 2013, 8(3): 3869-3883.
- [18] Bhatt I M, Pramod S, Koyani R D, et al. Anatomical changes in the cell-wall structure of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit as caused by the decay fungi *Trametes versicolor* and *Trametes hirsuta* [J]. Journal of the South African Forestry Association, 2015, 77(4): 297-303.
- [19] Zhang H, Yang S, Sun X Y, et al. Biological Treatment of Poplar Wood with White-rot Fungus *Trametes hirsuta* C7784: Structural Elucidation of the Whole Lignin in Treated Wood [J]. Bioresources, 2016, 11(3): 7305-7321.
- [20] 黄春燕,单洪涛,刘传富,等.糙皮侧耳液体菌种培养条件的初步研究[J].食用菌学报,2004,11(4):44-50.
- [21] 赵 华,齐 刚,代 彦.白腐菌液体深层培养条件的研究[J].生物技术,2003(6):21-24.
- [22] 张仕琦,屯妮萨·麦提赛伊迪,刘红菊,等.阿魏侧耳液体发酵及产木质素降解酶培养基的优化[J].北方园艺,2018(9):153-159.
- [23] 谭丽泉,黄 敏,余 梅,等.铁·镁·钙元素对白腐真菌生长及降解石油的影响[J].安徽农业科学,2012,40(15):8713-8716.