

一种白腐真菌的分离、鉴定、培养及产漆酶条件*

胡渤洋¹ 王寿南¹ 陈青君² 张国庆^{1**} 杨佳玥¹ 徐鑫¹ 韩鹏¹ 张宇轩¹ 李兵¹

¹北京农学院生物科学与工程学院, 农业部华北都市农业重点实验室 北京 102206

²北京农学院植物科学技术学院 北京 102206

摘要 白腐真菌是一类降解木质素使木材形成白色腐朽的担子菌, 往往具有高产胞外漆酶的活性. 从北京农学院校园内分离到一株高温型、高产漆酶白腐真菌菌株, 编号为BUA-01. 结合形态学特征与ITS序列分析, 确定其分类学地位; 进一步研究其菌丝生长的最适碳源、氮源、碳氮比(C/N)、生长因子、最适温度和最适pH值; 利用不同浓度Cu²⁺ (CuSO₄) 的诱导, 探讨液体发酵条件下对胞外漆酶产量的影响; 通过向发酵液中加入3种偶氮染料(依文思蓝、甲基橙和铬黑T), 研究菌株对染料的降解效果. 结果表明, 该菌株与毛栓菌(*Trametes hirsuta*)的同源性最高, 为100%, 遗传距离为0, 确定BUA-01菌株为栓菌属(*Trametes*)真菌. 菌丝体生长的最适碳源为淀粉, 最适氮源为黄豆粉、酵母浸粉, 最适C/N值为40/1和10/1, 最适温度为37℃, 最适pH为6.0-7.0, 供试生长因子对菌丝生长无显著促进作用. 0.25 mmol/L的Cu²⁺对胞外漆酶产量有极显著的促进作用, 在96 h时, 发酵液的活性达到最高, 为1081.33 ± 6.3 U/mL, 是对照组的26倍. BUA-01菌株对偶氮染料降解效果显著, 12 h对依文思蓝、甲基橙和铬黑T的脱色率分别为93.31% ± 0.16%、92.37% ± 0.42%和79.25% ± 0.64%. 本研究表明菌株BUA-01在产胞外漆酶和染料降解方面具有潜在应用价值. (图3 表7 参42)

关键词 栓菌; 鉴定; 培养条件; 漆酶; 染料降解

CLC Q939.99 : X172

Isolation, identification, culture conditions, and laccase production of white rot fungus*

HU Boyang¹, WANG Shounan¹, CHEN Qingjun², ZHANG Guoqing^{1**}, YANG Jiayue¹, XU Xin¹, HAN Peng¹, ZHANG Yuxuan¹ & LI Bing¹

¹ College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Key Laboratory of Urban Agriculture (North China) of Ministry of Agriculture, Beijing 102206, China

² Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract The white rot fungi are members of Basidiomycota, which can degrade lignin and form white rot. They are high producers of extracellular laccases. In the present study, pure culture strain of high-temperature and high-laccase production types (numbered as BUA-01) was isolated from the fruiting bodies of a white rot fungus collected in the campus of Beijing University of Agriculture. The taxonomic characteristic was determined based on morphological and ITS sequence analysis. Furthermore, the optimal culture conditions for the mycelia were determined, including carbon source, nitrogen source, C/N ratio, growth factors, temperature, and pH. Extracellular laccase production was investigated in liquid fermentation with different concentrations of Cu²⁺ (CuSO₄) as inducer. Decolorizing activity of the fermentation broth was assayed using three azo dyes: Evans blue, methyl orange, and eriochrome black T. The results showed that the strain possessed the highest homology toward *Trametes hirsuta*, with the homology ratio of 100% and the genetic distance of 0, suggesting that the strain BUA-01 belonged to the genus *Trametes*. The culture condition investigated revealed that the optimal condition for mycelia growth included the following: carbon source, starch; nitrogen source, soybean powder and yeast extract; C/N ratio, 40/1 and 10/1; temperature, 37℃; and pH, 6.0-7.0. The assayed growth factors had no significant effect on mycelial growth. It demonstrated high laccase activity in liquid fermentation. The highest extracellular laccase activity of 1 081.33 ± 6.3 U/mL was observed in the broth with a Cu²⁺ adjunction concentration of 0.25 mmol/L after a 96-h culture period. It was about 26-fold

收稿日期 Received: 2017-05-18 接受日期 Accepted: 2017-07-06

*北京市自然科学基金项目(5162006)、北京市科技新星计划项目(xx2015B025)、农业部华北都市农业重点实验室开放课题(kf2017012)和北京市本科生物科学研究计划项目资助 Supported by the Natural Science Foundation of Beijing, China (5162006), the Beijing NOVA Program (xx2015B025), the Opening Foundation of Key Laboratory of Urban Agriculture (North China) of Ministry of Agriculture of China (kf2017012), and the Supporting Project of the Undergraduate Research Program of Beijing

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhangqbua@163.com)

higher than that of the control group. The isolated strain exhibited significant decolorizing activity toward the azo dyes Evans blue, methyl orange, and eriochrome black T, with the decolorization rate at 12 h of $93.31\% \pm 0.16\%$, $92.37\% \pm 0.42\%$, $79.25\% \pm 0.64\%$, respectively. This suggests that the strain possesses potential applications in laccase production and dye degradation.

Keywords *Trametes*; identification; culture condition; laccase; dye degradation

白腐真菌 (White rot fungi) 是生长在多种阔叶树的倒木、腐朽木和树桩上, 主要降解木质素从而形成木材白色纤维状腐朽的一类高等担子菌^[1-2]。常见的白腐真菌有栓菌属 (*Trametes*)、纤孔菌属 (*Inonotus*)、层孔菌属 (*Phellinus*)、木耳属 (*Auricularia*)、侧耳属 (*Pleurotus*)、革盖菌属 (*Coriolus*) 和卧孔菌属 (*Poria*) 等^[3]。白腐真菌通过分泌胞外水解酶来实现对木质素的生物降解, 是自然界生态系统碳素循环的关键步骤^[4]。另一方面, 木质素是重要的可再生生物资源, 仅我国每年林木生物质 (地上部分) 产量超过14亿 t, 但由于木质素是结构复杂的芳香族天然高分子聚合物, 一直以来没有得到有效的利用^[5]。在化石能源日渐匮乏和全球暖化背景下, 生物质资源的高效利用, 已成为当前国际的研究热点之一。

参与白腐真菌木质素分解的胞外酶主要包括漆酶 (Laccase, p-benzenediol : oxygen oxidoreductase, Lac, 苯二酚: 氧氧化还原酶, EC 1.10.3.2)、木素过氧化物酶 (Lignin peroxidase, LiP) 和锰过氧化物酶 (Manganese peroxidase, MnP), 其中又以漆酶研究最为深入^[6]。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶, 与植物的抗坏血酸氧化酶、哺乳动物的血浆铜蓝蛋白一样, 属蓝色多铜氧化酶家族^[7]。漆酶最早是在1883年从日本漆树 (*Rhus vernicifera*) 的分泌物中发现, 后来研究表明漆酶广泛存在于自然界中, 包括真菌、细菌、植物及昆虫等, 其中以真菌漆酶研究最为深入, 具有良好的应用价值^[8-9]。自然界中, 真菌是漆酶的主要产生菌, 其中包括担子菌、子囊菌及半知菌等, 其中以是担子菌门的白腐真菌为主^[10]。漆酶对不同类型的底物进行单电子氧化, 同时传递电子, 最终将作为第二底物的氧气还原成水, 因而被认为是一种“绿色催化剂”^[11]。漆酶催化底物广泛, 除木质素之外还包括酚类、芳香类化合物等, 如化工染料、农药残留等, 因而漆酶在造纸、皮革、环境污染治理等方面具有巨大的应用潜力和广阔的市场前景^[12]。

偶氮染料是一类在偶氮基两端连接芳基的有机化合物, 广泛用于服装印染、油漆着色等, 在一定条件下能分解产生多种致癌芳香胺类, 如未经处理即而排放到环境中, 会导致严重的环境问题。目前, 微生物降解法被认为是最为有效且对环境无害的方法, 其中白腐真菌及其漆酶生物降解被认为是最为降解方式之一^[13-14]。本研究前期以实验自主分离的26种野生真菌为材料, 筛选出高产漆酶和高效降解偶氮染料的BUA-01菌株, 进一步利用形态学鉴定与ITS鉴定的手段确定其分类学地位, 从碳源、氮源、碳氮比 (C/N)、温度、pH值和生长因子方面研究菌株最适培养条件, 利用Cu²⁺诱导研究液体发酵最佳产漆酶条件以及发酵液染料降解特性, 为其开发利用奠定理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BUA-01菌株子实体采集自北京农学院毛白杨 (*Populus tomentosa*) 腐木树桩上, 由北京农学院生物科学与工程学院分离与保藏。

1.2 培养基

PDA培养基: 主要用于菌株分离与保藏。配方: 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂20 g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水定容至1 L。

液体发酵培养基: 主要用于液体发酵培养。配方: 马铃薯200 g, 蔗糖20 g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水定容至1 L。

基础培养基: 用于最适培养条件实验。配方: 葡萄糖20 g, 硫酸镁0.5 g, 磷酸二氢钾1 g, 胰蛋白胨2 g, 维生素B₁ 10 mg, 琼脂20 g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水定容至1 L。

1.3 菌株的分离、培养与保存

菌株纯培养的获得采用组织分离法^[15]。分离的菌株于25℃避光培养, 于4℃保藏。

1.4 菌株的形态鉴定

菌丝纯培养经PDA平板活化后以直径5 mm的菌饼转接到新鲜的PDA平板中央, 并在距离菌饼1.5cm左右的四周以30°左右斜插入灭菌的盖玻片, 置于25℃恒温培养箱中避光培养, 待菌丝体边缘刚刚蔓延至盖玻片时, 取出盖玻片进行光学显微镜观察并拍照。

1.5 ITS鉴定

菌株分子鉴定采用ITS (Internal Transcribed Spacer) 鉴定法。利用新型植物DNA提取试剂盒 (天根) 提取新鲜菌丝体总DNA。引物采用真菌ITS通用引物ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') 和ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 引物及序列均由上海生工生物工程有限公司合成并检测^[16]。目标序列经用NCBI在线BLAST比对分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 并利用MEGA 7.0进行Clustal X多序列比对、Neighbor-Joining (NJ) 构建系统发育树, 分析同源关系, 确立分类学地位^[17]。

1.6 不同碳源的利用

以相同含碳量的不同碳源替代基础培养基中20 g葡萄糖, 测定BUA-01菌株对不同碳源的利用情况^[17]。在各平板中央接种直径为5 mm的新鲜菌饼一块, 25℃恒温培养箱中避光培养, 待任一处理中菌丝体最先长满或培养14 d后, 停止培养。观测菌落形态, 测量菌落直径, 计算菌丝体日均生长速度 (菌丝生长速度=菌落半径增长度/培养天数) (单位: mm/d)。供试碳源分别为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、山梨醇和羧甲基纤维素钠, 对照为基础培养基不加碳源, 每个处理设3次重复。下同。

1.7 不同氮源培养基的利用情况

以相同含氮量的不同氮源替代基础培养基中2 g胰蛋白

脲,氮源分别为胰蛋白胨、酵母浸粉、黄豆粉、牛肉浸膏、硫酸铵、尿素的培养基,对照为基础培养基中不加氮源。

1.8 不同C/N培养基的利用情况

以供试基础培养基为基础,通过添加不同质量的大豆蛋白胨,配制成C/N值分别为10/1、20/1、30/1、40/1、50/1和60/1的不同培养基^[18]。

1.9 不同生长因子培养基的利用情况

以不同的生长因子替代基础培养基中10 mg维生素B₁,生长因子分别为维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、维生素C、肌醇的培养基,对照为基础培养基中无生长因子。

1.10 不同pH值下的菌丝体生长情况

配制PDA培养基,灭菌后调pH值分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0。

1.11 不同温度下的菌丝体生长情况

配制PDA培养基,接种后分别在20、24、26、28、30、32和37℃恒温培养箱中避光培养。

1.12 Cu²⁺对液体发酵漆酶产量的影响

以新鲜BUA-01菌株接种于PDA平皿(9 cm)上,28℃避光培养至刚刚长满(约5 d)。无菌条件下将整皿菌落取出,置于无菌组织匀浆器中,加无菌水适量,充分匀浆,并补入无菌水(最终量为50 mL/皿)制备成种子液。按5%(V/V)接种量将种子液添加在含有0、0.25、0.50、1.00和2.00 mmol/L CuSO₄的发酵培养基中,28℃、180 r/min振荡培养,分别在接种的第24、48、72、96、120、144和168 h时收集发酵液,测定其漆酶活性。漆酶活性测定采用ABTS法^[19]。将5 μL漆酶样品与195 μL ABTS溶液混合,37℃水浴反应5 min后,以200 μL 5% TCA终止反应,在波长420 nm处测定吸光值,以蒸馏水代替酶液进行反应作为对照。酶活单位(U)定义:每分钟内催化1 μmol ABTS生成产物所需的酶量(A_{420 nm}处ABTS的摩尔吸光系数为3.6 × 10⁴ L mol⁻¹ cm⁻¹)^[20]。

1.13 BUA-01菌株对偶氮染料的降解作用

以5%(V/V)接种量接种上述种子液于液体发酵培养基

中,28℃、180 r/min振荡培养3 d后,分别向培养基中加入过滤除菌的终浓度为400 mg/L、28 mg/L和20 mg/L的铬黑T、依文思蓝和甲基橙3种偶氮染料,以不加入染料为空白对照。在0 h、12 h和24 h分别取样,且分别在波长为540 nm、610 nm和460 nm处测量吸光值,并计算脱色率。

1.14 统计学分析

所有数据采用SPSS18.0统计软件进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定

BUA-01菌株子实体形态见图1A。子实体具有典型栓菌属真菌特征,菌盖无柄,覆瓦状叠生,硬革质。菌盖扁平,半圆形,菌盖半径达10 cm左右,菌盖表面浅棕黄色,被长硬毛和细微绒毛,具有明显的同心环纹和环沟,与《中国真菌志》中毛栓菌[*Trametes hirsuta* (Wulf.: Fr.) Pilat]子实体描述特征一致^[21]。PDA平板培养条件下菌落形态见图1B。菌丝稠密浓白,菌落会形成明显的辐射状同心纹。菌丝显微形态见图1C,生殖菌丝透明,壁薄,有大量锁状联合。

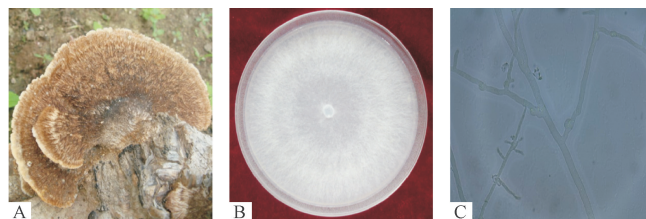


图1 BUA-01菌株形态特征。(A)子实体;(B)菌落;(C)菌丝体。

Fig. 1 Morphological characteristics of the strain BUA-01. (A) Fruiting bodies; (B) Colony; (C) Mycelia.

2.2 基于ITS序列的系统发育分析

经PCR扩增和序列测定,获得BUA-01菌株ITS序列片段,长度为605 bp, GenBank登录号为KX056103。经Blast在线比对,与相近种菌株构建系统发育树(图2)。聚类分析结果表

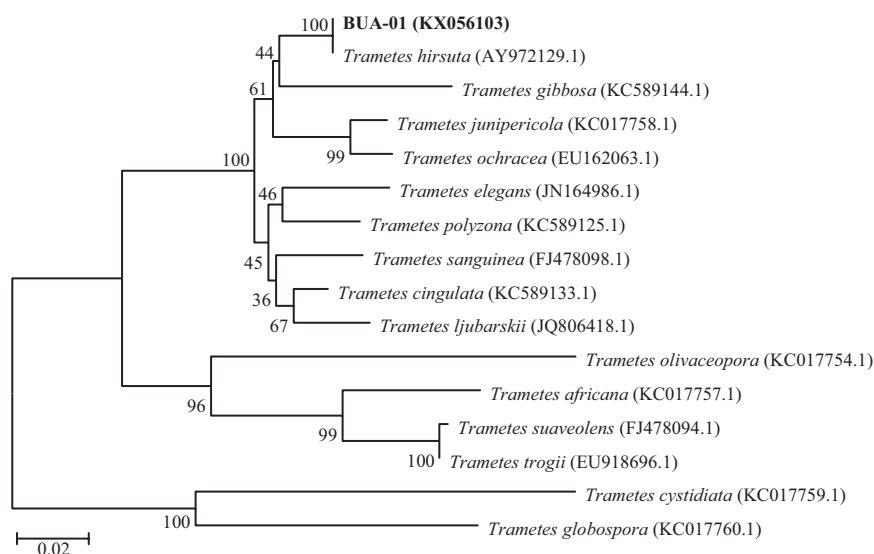


图2 基于ITS序列的BUA-01菌株与其他栓菌属真菌的系统发育分析。

Fig. 2 Polymeric analysis of strain BUA-01 and other *Trametes* strains based on ITS sequences.

明, BUA-01菌株与毛栓菌 (AY972129.1) 的相似性最高, 为100%, 遗传距离为0, 确定该菌株为栓菌属 *Trametes*。

2.3 不同碳源培养基的利用情况

在最适碳源实验中, 菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产生。菌丝在以淀粉为碳源的培养基上生长速率最快 (8.32 ± 0.35 mm/d)、长势最佳、菌丝稠密浓白, 蔗糖、葡萄糖和麦芽糖次之。在以乳糖为碳源的培养基上生长速率最慢 (3.43 ± 0.63 mm/d)、长势最弱 (表1)。综合菌丝生长速率及菌丝长势, BUA-01菌株体最适碳源为淀粉。

表1 碳源对BUA-01菌株菌丝体生长的影响
Table 1 Effect of the carbon sources on mycelial growth of strain BUA-01

碳源 Carbon source	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
淀粉 Starch	8.32 ± 0.35 a	+++
蔗糖 Sucrose	7.61 ± 0.12 b	+++
葡萄糖 Glucose	7.53 ± 0.93 b	+++
麦芽糖 Maltose	7.36 ± 1.15 b	+++
山梨醇 Sorbitol	5.78 ± 1.22 c	++
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	5.95 ± 1.13 cd	++
对照 CK	5.58 ± 0.16 d	+
乳糖 Lactose	3.43 ± 0.63 e	+

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
+: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.4 不同氮源培养基的利用情况

在最适氮源实验中, 菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产生。菌丝在以黄豆粉 (7.41 ± 0.09 mm/d)、酵母浸粉 (7.2 ± 0.45 mm/d) 为氮源的培养基上生长速率最快、长势最佳, 菌丝稠密浓白。在无氮源的培养基上生长速率最慢 (5.44 ± 0.3 mm/d)、长势最弱 (表2)。综合菌丝生长速率及菌丝长势, BUA-01菌株体最适氮源为黄豆粉和酵母浸粉。

表2 氮源对BUA-01菌株菌丝体生长的影响
Table 2 Effect of the nitrogen sources on mycelial growth of stain BUA-01

氮源 Nitrogen source	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
黄豆粉 Soybean meal	7.41 ± 0.09 a	+++
酵母浸粉 Yeast extract	7.20 ± 0.45 ab	+++
胰蛋白胨 Casein tryptone	6.94 ± 0.24 bc	+++
牛肉膏 Beef extract	6.87 ± 0.20 c	++
尿素 Urea	6.34 ± 0.24 d	++
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.57 ± 0.47 e	+
对照 CK	5.44 ± 0.30 e	+

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
-: No mycelia growth; +: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.5 不同C/N培养基的利用情况

在最适C/N实验中, 菌落在不同C/N的培养基中均可生长。菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产

生。菌丝在C/N比为40/1 (8.53 ± 0.16 mm/d)、10/1 (8.5 ± 0 mm/d) 的培养基中生长速率最快、长势最佳, 菌丝稠密浓白。在C/N比为20/1的培养基上生长速率最慢 (6.67 ± 0.3 mm/d)、长势最弱 (表3)。综合菌丝生长速率及菌丝长势, BUA-01菌株体最适C/N为40/1和10/1。

表3 C/N比对BUA-01菌株菌丝体生长的影响
Table 3 Effect of the C/N ratios on mycelial growth of strain BUA-01

C/N比 C/N ratio	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
40/1	8.53 ± 0.16 a	+++
10/1	8.50 ± 0.00 a	+++
50/1	8.12 ± 0.22 b	++
60/1	8.12 ± 0.22 b	++
30/1	8.08 ± 0.37 b	++
20/1	6.67 ± 0.30 c	+

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
+: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.6 不同生长因子培养基的利用情况

在最适生长因子实验中, 菌落在不同生长因子培养基上均可生长。菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产生。菌丝在CK、VB₁、VB₂和肌醇的培养基上生长速率较快、长势最佳, 菌丝稠密浓白。在V_C的培养基上生长速率最慢 (4.97 ± 0.82 mm/d)、长势最弱 (表4)。综合菌丝生长速率及菌丝长势, VB₁、VB₂和肌醇对BUA-01菌株体生长无显著影响, 而VB₆和V_C对其生长有显著抑制作用。

表4 生长因子对BUA-01菌株菌丝体生长的影响
Table 4 Effect of growth factors on mycelial growth of strain BUA-01

生长因子 Growth factor	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
对照 CK	7.17 ± 0.31 a	+++
VB ₂	6.90 ± 0.38 a	+++
VB ₁	6.60 ± 0.33 a	+++
肌醇 Inositol	6.33 ± 0.11 a	+++
VB ₆	5.33 ± 0.39 b	++
V _C	4.97 ± 0.82 c	+

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
+: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.7 不同pH值下的菌丝体生长情况

在最适pH值实验中, 菌落在pH 5.0-9.0的条件下均可生长。菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产生。菌丝在pH 6.0-7.0的培养基上生长速率最快、长势最佳, 菌丝稠密浓白。在pH 9.0的培养基上生长速率最慢 (4.83 ± 0.17 mm/d)、长势最弱 (表5)。综合菌丝生长速率及菌丝长势, BUA-01菌株体最适pH值在6.0-7.0之间。

2.8 不同温度下的菌丝体生长情况

在最适温度实验中, 菌落在20-37 ℃下均能生长。菌落均出现明显的辐射状同心圆, 生长过程中无色素产生。菌丝在以温度为37 ℃的培养基上生长速率最快 (7.8 ± 0.14 mm/d)、长势最佳, 菌丝稠密浓白。在温度为20 ℃的培养基上生长速

表5 pH值对BUA-01菌株菌丝生长的影响

Table 5 Effect of pH values on mycelial growth of strain BUA-01

pH	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
7.0	7.18 ± 0.28 a	+++
6.0	7.14 ± 0.19 a	+++
6.5	7.01 ± 0.51 a	+++
7.5	6.72 ± 0.21 b	++
8.0	6.54 ± 0.44 bc	++
5.5	6.54 ± 0.17 bc	++
5.0	6.51 ± 0.12 bc	+
8.5	6.29 ± 0.33 c	+
9.0	4.83 ± 0.17 d	+

-, 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

-, No mycelia growth; +: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

率最慢 (3 ± 0.13 mm/d)、长势最弱 (表6). 综合菌丝生长速率及菌丝长势, BUA-01菌株最适温度是37℃.

表6 温度对BUA-01菌株菌丝生长的影响

Table 6 Effect of temperature on mycelial growth of strain BUA-01

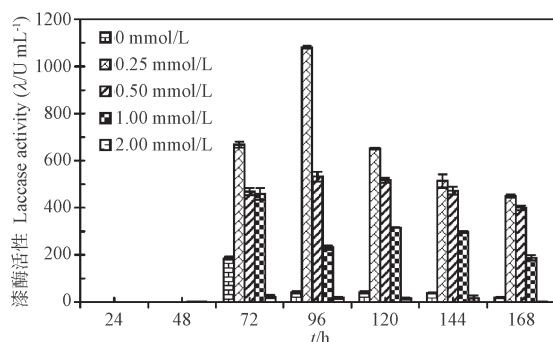
温度 Temperature (°C)	菌丝生长速率 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth
37	7.80 ± 0.14 a	+++
30	7.00 ± 0.21 b	+++
32	6.60 ± 0.54 b	+++
28	6.50 ± 0.27 c	+++
24	5.17 ± 0.28 d	++
26	4.83 ± 0.30 d	++
20	3.00 ± 0.13 e	+

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

+: Mycelial growth weak; ++: Mycelial growth ordinary; +++: Mycelial growth strong. Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.9 Cu²⁺对BUA-01发酵液产漆酶量的影响

不同剂量的Cu²⁺实验结果如图3所示. 3种浓度的Cu²⁺对BUA-01漆酶都具有促进作用, 其中, 0.25 mmol/L Cu²⁺对BUA-01产胞外漆酶具有明显的促进作用, 在96 h时, 发酵液的活性达到最高, 为1081.33 ± 6.30 U/mL, 是对照组的26倍. 实验表明, 0.25 mmol/L Cu²⁺对BUA-01液体发酵漆酶具有显著的促进作用, 而添加2.00 mmol/L Cu²⁺的发酵液对菌丝体有明显的抑制作用.

图3 Cu²⁺浓度对BUA-01发酵液产漆酶量的影响.Fig. 3 Effect of Cu²⁺ concentrations on laccase production in BUA-01 fermentation broth.

2.10 BUA-01对偶氮染料的降解

BUA-01发酵液对偶氮染料的降解效果见表7. BUA-01菌株发酵液对3种偶氮染料降解效果显著, 12 h时, 对依文思蓝、甲基橙和铬黑T的脱色率分别为93.31% ± 0.16%、92.37% ± 0.42%和79.25% ± 0.64%; 24 h时, 脱色率分别为98.64% ± 0.28%、93.36% ± 0.15%和90.25% ± 0.47%.

表7 BUA-01对偶氮染料的降解效果

Table 7 Decolorization activity of BUA-01 towards azo dyes.

染料 Dyes	$\lambda_{\max}$ /nm	浓度 Concentration (ρ /mg L ⁻¹)	脱色率 Decolorization rate (r/%)	
			12 h	24 h
依文思蓝 Evans blue	610	28	93.31 ± 0.16	98.64 ± 0.28
甲基橙 Methyl orange	460	20	92.37 ± 0.42	93.36 ± 0.15
铬黑T Eriochrome black T	540	400	79.25 ± 0.64	90.25 ± 0.47

3 讨论与结论

据报道, 毛栓菌又称毛栓孔菌, 多生于槭、榆、杨、柳、柞、桦、胡桃等阔叶树的倒木、枯立木、原木、伐桩及活立木上, 广泛分布于中国各地^[22]. BUA-01菌株子实体分离自杨柳科杨属植物毛白杨, 其子实体为无柄盖形, 覆瓦状叠生, 硬革质, 菌盖表面浅棕黄色, 被硬毛和细微绒毛, 具有明显的同心环纹和环沟, 与《中国真菌志》^[21]描述一致. 目前关于毛栓菌对应的拉丁文名称比较混乱, 往往将毛栓菌 (*T. hirsuta*) 和硬毛栓菌 (*T. trogii*) 的中文和拉丁文相互混用的现象, 如卯晓岚先生《中国大型真菌》中称 *T. trogii* 为毛栓菌^[22], 杨柳等称 *T. hirsuta* 为粗毛栓菌^[23]. 根据赵继鼎先生《中国真菌志》, *T. hirsuta* 子实体具有明显同心环纹结果, 而 *T. trogii* 则不具有相应结构^[21]. 另外, 基于ITS的系统发育树表明, BUA-01菌株与 *T. hirsuta* (AY972129.1) 的相似性为100%, 遗传距离为0, 而与 *T. trogii* 遗传距离较远, 为0.143. 本文根据赵继鼎先生《中国真菌志》并结合ITS鉴定和形态特征, 确定BUA-01菌株为毛栓菌 (*T. hirsuta*).

毛栓菌是一种常见白腐真菌, 前人对不同毛栓菌菌株培养条件进行了广泛研究, 主要围绕其胞外产漆酶条件及其对染料和农药等降解研究^[24-27]. 本研究前期筛选出高产胞外漆酶的BUA-01菌株, 开展了菌丝最适培养条件研究. 该菌株菌丝生长的最适条件分别为最适碳源淀粉、最适氮源为黄豆粉和酵母浸粉、最适C/N值40/1和10/1, 最适温度37℃, 最适pH 6.0-7.0. 关于毛栓菌菌丝体培养条件研究较少, 已有文献主要以开展 *T. trogii* 研究^[28-29]. 前人报道主要围绕 *T. trogii* 培养的最适碳源和氮源. 其最适碳源主要有蔗糖、淀粉和壳聚糖, 其中尤以蔗糖为最适碳源较多; 最适氮源有酵母膏、黄豆粉等; 与本文结果基本一致^[29-30]. 一般真菌最适温度在25-28℃, BUA-01菌株最适培养温度达到37℃, 属于高温型真菌, 更有利于发酵条件下的菌丝培养与开发利用.

毛栓菌是重要的产漆酶菌株, 而不同产地、不同时期采集的菌株, 往往在胞外产酶方面表现出不同的特性. BUA菌株在前期筛选过程中表现出优越的产酶活性. 液体发酵研究显示, 72 h、以ABTS为底物, 胞外漆酶活性即达到最高, 为185.78 U/mL, 并且在0.25 mmol/L Cu²⁺诱导条件下, 胞外漆酶在96 h时达到最高, 为1081.33 U/mL, 是同时空白对照组的

26倍,是无诱导条件下最高酶活的5.8倍,显著高于前人报道。Dhakar和Pandey报道, *T. hirsuta* (MTCC 11397) 培养12d、以ABTS为底物,最高酶活394.5 U/L^[24]。Rodriguez等报道毛栓菌发酵液漆酶活性在第26天达到最高,以ABTS为底物酶活为19.4 U/mL^[31]。Liu等报道,毛栓菌液体发酵8 d胞外漆酶活性达到最高,以2,6-二甲氧基苯酚(DMP)为底物,酶活为11 U/mL^[24]。BUA-01菌株是一个最适培养温度37℃的高温型菌株,可能为其提供了更高效的木质纤维素降解酶系,从而表现出更高的胞外漆酶活性。

结果还发现, Cu^{2+} 诱导条件下,胞外活性最大值出现延后,从对照组的72 h延后至0.25 mmol/L Cu^{2+} 处理的96 h。同时随着 Cu^{2+} 浓度的升高促进效果逐渐减低,并且 Cu^{2+} 浓度达到2.00 mmol/L时,发酵液中菌丝体基本不再生长,漆酶活性几乎为0。结果表明, Cu^{2+} 虽然能够显著诱导BUA-01菌株胞外漆酶的分泌,但同时高浓度时显著抑制菌丝生长。漆酶是含铜的多酚氧化酶, Cu^{2+} 对胞外漆酶诱导作用有大量的报道。Dhakar和Pandey报道, *T. hirsuta* MTCC 11397菌株在添加0.4 mmol/L Cu^{2+} 时漆酶活性达到最高(394.5 U/L),约为对照组酶活的两倍^[24]。Ling等报道2.0 mmol/L Cu^{2+} 对 *Trametes sanguinea* 胞外漆酶发酵有显著促进作用,在72 h达到243.7 U/mL,并且在96-144 h维持在250 U/mL以上,较之空白对照组192 h最高活性122.8 U/mL,时间缩短62.5%、活性提高了98.5%^[32]。司静等报道,向 *Trametes orientalis* 培养基中添加终浓度为2.0 mmol/L Cu^{2+} 且接种后第3天时,漆酶诱导酶活最高,为17.628 U/mL^[33]。1.0-2.0 mmol/L的 Cu^{2+} 对 *Lepista nuda* 胞外漆酶分泌有显著的促进作用,其活性达到对照组的149.2%-196.4%^[18]。漆酶结构中一般有4个铜离子结合位点,因此 Cu^{2+} 往往对漆酶诱导表达有促进作用。但另一方面,铜作为重金属元素,对真菌菌丝生长有抑制作用。本研究中BUA-01菌株需要低浓度 Cu^{2+} (0.25 mmol/L) 即达到高的产酶活性,既降低了发酵成本,同时避免了重金属元素对环境的污染。另外, Tapia-Tussell等报道,分离自墨西哥的毛栓菌Bm-2菌株在以10% (V/V) 酒糟诱导下,胞外漆酶活性达到2 543.7 U/mL^[34]。结果表明,不同菌株、不同产酶条件,真菌漆酶产量存在极大差异。因此,不断分离筛选高产菌株具有极其重要的意义。

前人报道表明,真菌漆酶对化工染料特别是偶氮类染料具有良好的降解效果^[35]。本研究中, BUA-01菌株对依文思蓝、甲基橙和铬黑T的降解效果显著,脱色率分别为98.64%、93.36%和90.25%。Couto等人报道, *T. hirsuta*在24 h时对偶氮染料(SSB 4GL和DC NBS)的脱色率在80%以下,第72 h时对偶氮染料(Methyl Orange)的脱色率为81.4%^[26, 36]。Levin等报道, *T. troglit*漆酶在24 h对偶氮染料Methyl Orange和Xyldine的降解率分别为75%和96%^[37]。另外, *Pleurotus sajor-caju*漆酶对偶氮染料Reactive Black 5在36 h时的脱色率为84.4%^[38]。本研究实验中, BUA-01菌株胞外漆酶发酵液具有良好的染料脱色效果,其纯化的漆酶或者直接利用发酵液,对环境染料污染降解,具有良好现实意义和应用价值。

综上,本研究筛选高产漆酶的高温型栓菌,经鉴定为毛栓菌(*T. hirsuta*),并进行了培养条件、 Cu^{2+} 对胞外产漆酶的影响,以及发酵液对偶氮染料降解效果研究,为BUA-01菌株的开发与利用奠定了基础。

参考文献 [References]

- 1 郑飞, 孟歌, 安琪, 吴雪君, 司静, 刘红霞. 白腐真菌东方栓孔菌在两种液体培养基中产漆酶过程的生理学研究[J]. 菌物学报, 2016, **35** (10): 1-16 [Zheng F, Meng G, An Q, Wu XJ, Si J, Liu HX. Physiological studies on laccase-producing process of white rot fungus *Trametes orientalis* incubated with two kinds of liquid media [J]. *Mycosystema*, 2016, **35** (10): 1-16]
- 2 袁海生, 戴玉成, 曹云, 杨建. 白腐真菌染料脱色菌株的筛选及一色齿毛菌脱色条件的研究[J]. 菌物学报, 2010, **29** (3): 429-436 [Yuan HS, Dai YC, Cao Y, Yang J. Screening of white-rot fungi for decolorizing synthetic dyes and investigation on factors affecting decolorizing capacity of *Cerrena unicolor* [J]. *Mycosystema*, 2010, **29** (3): 429-436]
- 3 张伟, 冯俊, 杨超, 王淑芳, 宋存江. 白腐真菌的广谱生物降解性研究进展[J]. 环境污染与防治, 2012, **34** (1): 64-71 [Zhang W, Feng J, Yang C, Wang SF, Song CJ. Broad-spectrum degradation capability of the white rot fungus [J]. *Environ Pollut Control*, 2012, **34** (1): 64-71]
- 4 Floudas D, Binder M, Riley R. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes [J]. *Science*, 2012, **336**: 1715-1719
- 5 匡廷云, 白克智, 杨秀山. 我国生物质能发展战略的几点意见[J]. 化学进展, 2007 (Z2): 1060-1063 [Kuang TY, Bai KZ, Yang XS. Suggestions on the development strategy of bioenergy in China [J]. *Progr Chem*, 2007 (Z2): 1060-1063]
- 6 刘家扬, 焦国宝, 有小娟, 廖祥儒, 孙利鹏. 真菌漆酶的性质、生产及应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, **32** (4): 24-33 [Liu JY, Jiao GB, You XJ, Liao XR, Sun LP. A review on properties, production and application of fungal laccases [J]. *Biotechnol Bull*, 2016, **32** (4): 24-33]
- 7 Thurston CF. The structure and function of fungal laccase [J]. *Microbiology*, 1994, **140**: 19-26
- 8 Yoshida H. Chemistry of lacquer (urushi) part 1 [J]. *Chem Soc*, 1883, **43**: 472-486
- 9 Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, **28**: 63-72
- 10 Couto SR, Toca-Herrera JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi [J]. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**: 558-569
- 11 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 [Liu ZC, Wang GG. Fungal laccases: structure-based function and mechanism [J]. *Acta Biophys Sin*, 2013, **29** (9): 629-645]
- 12 Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents [J]. *Biotechnol Adv*, 2003, **22** (1/2): 161-187
- 13 Acuner E, Dilek FB. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris* [J]. *Process Biochem*, 2004, **39**: 623-631
- 14 常天俊, 潘文维, 赵丽, 胡道伟, 杨英. 白腐真菌对染料脱色的培养条件研究[J]. 环境工程学报, 2007 (2): 54-58 [Chang TJ, Pan WW, Zhao L, Hu DW, Yang Y. Studies on culture conditions of decolorization by *Panus conchatus* [J]. *Chin J Environ Eng*, 2007 (2): 54-58]
- 15 王寿南, 陈青君, 张国庆, 李兵, 李伟聪, 赵天健. 一种野生多孔菌的分离、鉴定、培养条件及抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (1): 82-88 [Wang SN, Chen QJ, Zhang GQ, Li B, Li WC, Zhao TJ. Isolation, identification, optimal cultivation conditions and antioxidant activity of a wild polypore [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (1):

- 82-88]
- 16 胡渤海, 王寿南, 陈青君, 王宗义, 李伟聪, 赵天健, 张国庆. 4种常见农药的耐受真菌筛选、鉴定及降解作用初探[J]. 北京农学院学报, 2017, **32** (1): 7-14 [Hu BY, Wang SN, Chen QJ, Wang ZY, Li WC, Zhao TJ, Zhang GQ. Studies on screening, identification, and degrading activities of resistant fungi against four common pesticides [J]. *J Beijing Univ Agric*, 2017, **32** (1): 7-14]
- 17 秦改娟, 马济丰, 陈青君, 管博文, 吴凡, 卫莹, 张国庆. 一种田头菇属真菌新记录种的生物学与产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (1): 148-151 [Qin GJ, Ma JF, Chen QJ, Guan BW, Wu F, Wei Y, Zhang GQ. Biological characteristics and enzyme production of a newly recorded species of *Agrocybe* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (1): 148-151]
- 18 刘悦萍, 王子健, 崔凯, 张国庆. 一种野生香蘑的分离、鉴定、培养条件与产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18** (5): 804-809 [Liu YP, Wang ZJ, Cui K, Zhang GQ. Isolation, identification, culture conditions, and enzyme production of a wild mushroom *Lepista* sp. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, **18** (5): 804-809]
- 19 Wang HX, Ng TB. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72** (3): 508-513
- 20 Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation [J]. *FEBS Lett*, 1990, **267**: 99-102
- 21 赵继鼎. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 363-364, 384-385 [Zhao JD. Chinese Flora [M]. Beijing: Science Press, 1998: 363-364, 384-385]
- 22 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000: 450 [Mao XL. The Macrofungi in China [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000: 450]
- 23 杨柳, 吕丹丹, 邓杰勇, 曹焕英, 叶明. 粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)D2 固态发酵山核桃蒲壳产漆酶的营养条件研究[J]. 微生物学通报, 2014, **41** (10): 1955-1960 [Yang L, Lü DD, Deng JY, Cao HY, Ye M. Nutritional conditions for laccase production by *Trametes hirsuta* D2 in solid-state fermentation using hickory hull [J]. *Microbiol China*, 2014, **41** (10): 1955-1960]
- 24 Dhakar K, Pandey A. Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397) [J]. *Enzyme Res*, 2013 (2): 869062
- 25 Haibo Z, Yinglong Z, Feng H, Peiji G, Jiachuan C. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta* [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, **31**: 837-843
- 26 Couto SR. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta* [J]. *J Hazard Mater*, 2007, **148**: 768-770
- 27 刘文华, 蔡宇杰, 范晶晶, 廖祥儒. 毛栓菌产漆酶条件优化及该酶对合成染料脱色的特性[J]. 微生物学通报, 2013, **40** (5): 727-738 [Liu WH, Cai YJ, Fan JJ, Liao XR. The optimization on laccase production from *Trametes hirsuta* and its property in the decolorization of synthetic dyes [J]. *Microbiology China*, 2013, **40** (5): 727-738]
- 28 邓振旭, 王宜磊. 碳源和氮源对毛栓菌菌丝体生长和漆酶分泌的影响[J]. 微生物学杂志, 2000 (2): 60-61 [Deng ZX, Wang YL. Effects of carbon source and nitrogen source on mycelial growth and laccase secretion of *Trametes trogii* [J]. *J Microbiol*, 2000 (2): 60-61]
- 29 王宜磊. 培养条件对毛栓菌漆酶分泌的影响[J]. 微生物学杂志, 2003 (5): 28-30 [Wang YL. Effects of culture conditions on laccase production from *Trametes trogii* [J]. *J Microbiol*, 2003 (5): 28-30]
- 30 毕旺华, 田雪梅, 孙效乐, 秦丹, 宋爱荣. 毛栓菌菌丝体生长营养条件的优化研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2012, **29** (1): 51-54. [Bi WH, Tian XM, Sun XL, Qin D, Song AR. Optimization of cultural medium for cell growth of *Trametes hirsuta* [J]. *J Qingdao Agric Univ (Nat Sci)*, 2012, **29** (1): 51-54]
- 31 Rodriguez CS, Rodriguez A, Paterson RR. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, **42** (6): 612-616
- 32 Ling ZR, Wang SS, Zhu MJ, Ning YJ, Wang SN, Li B, Yang AZ, Zhang GQ, Zhao XM. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, **93**: 837-842
- 33 司静, 崔宝凯, 戴玉成. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (3): 405-416 [Si J, Cui BK, Dai YC. Primary screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production [J]. *Microbiol China*, 2011, **38** (3): 405-416]
- 34 Tapia-Tussell R, Perez-Brito D, Torres-Calzada C, Cortes-Velazquez A, Alzate-Gaviria L, Chable-Villacis R, Solis-Pereira S. Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2 [J]. *Molecules*, 2015, **20**: 15147-15157
- 35 Liu J, Liu W, Cai Y. Laccase production by *Trametes hirsuta*, characterization, and its capability of decoloring chlorophyll [J]. *Pol J Microbiol*, 2014, **63** (3): 323-333
- 36 Couto SR, Rosales E, Sanroman MA. Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors [J]. *Chemosphere*, 2006, **62** (9): 1558-1563
- 37 Levin L, Grassi E, Carballo R. Efficient azoic dye degradation by *Trametes trogii* and a novel strategy to evaluate products released [J]. *Int Biodeter Biodegr*, 2012, **75**: 214-222
- 38 Murugesan K, Dhamija A, Nam IH, Kim YM, Chang YS. Decolourization of reactive black 5 by laccase: optimization by response surface methodology [J]. *Dyes Pigments*, 2007, **75**: 176-184