

白腐真菌对染料脱色的培养条件研究

常天俊¹ 潘文维¹ 赵 丽¹ 胡道伟² 杨 英¹

(1. 河南理工大学资源环境学院, 焦作 454000; 2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘 要 对贝壳状革耳菌高产漆酶条件及其对染料脱色条件进行了研究。结果得到高产漆酶的最佳条件为: 葡萄糖 10 g/L, 酒石酸铵 0.5 g/L, pH 3.0, 转速 120 r/min; 脱色效果最佳的培养条件是: 葡萄糖 10 g/L, 酒石酸铵 0.5 g/L, pH 3.0, 温度 30 ℃。由此可知漆酶在染料脱色中起重要作用; 实验也表明: 随着培养基中碳源、氮源量的增加, 菌体生物量逐渐增加, 但体系中高碳氮比对菌体对染料的脱色是不利的; 菌体生物量与对染料的脱色作用不呈正相关。

关键词 贝壳状革耳菌 染料 脱色 漆酶

中图分类号 Q7 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2007)02-0054-05

Studies on culture conditions of decolorizaion by *Panus conchatus*

Chang Tianjun¹ Pan Wenwei¹ Zhao Li¹ Hu Daowei² Yang Ying¹

(1. Institute of Resources & Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000;

2. School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract The optimum conditions for producing laccase and decoloring dyes by *Panus conchatus* were studied. The results showed that the optimum culture conditions were gulcose 10 g/L, ammonium tartrate 0.5 g/L, pH 3, temperature 30 ℃. It was the same to the optimum culture of producing laccase by *Panus conchatus*, and the decolorizaion rate was positively correlative with the laccase activity. With the increasing concentration of carbon and nitrogen sources, there was a corresponding increase of the biomass. However, the decolorization rate was not related to the biomass of panus conchatus directly.

Key words *Panus conchatus*; dyes; decolorization; laccase

随着纺织工业的迅速发展, 染料的品种和数量不断增加。目前, 我国已是染料生产大国, 每年约有 10% ~ 15% 的染料随着废水直接排放到水体中, 这些人工合成的染料, 多是芳香族化合物, 结构复杂、难降解、具有潜在毒性; 而染料废水有机含量高, 生化性差, 而且色度高, 成分复杂, 有毒性, 成为危害环境的一个重要因素^[1]。

白腐菌处理染料废水是近几年来新兴的有效处理方法^[2]。它能通过白腐菌所分泌的特殊的降解酶系(包括木质素过氧化酶、锰过氧化酶、漆酶)或其他机制将各种人工合成的染料彻底降解为 CO₂ 和 H₂O, 具有良好的脱色效果。Elithbeth 等^[3]试验了白腐菌对 23 种工业染料的脱色效果, 结果表明只有漆酶活力和染料的脱色效果呈现正相关, 说明漆酶在染料脱色中起重要作用。贝壳状革耳菌是一株迅速并具有选择性降解木素的优良白腐菌^[4], 能产生漆酶和锰过氧化酶等降解酶系^[5]。本文作者针对贝壳状革耳菌, 研究了葡萄糖、酒石酸铵、pH 值作为影响因子对其产漆酶的影响, 并通过单因子实

验对 3 种不同染料降解脱色条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

贝壳状革耳菌 (*Panus conchatus*, 菌号 5.154) 购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 实验试剂与仪器

ABTS(2,2'-连氮-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 购自 SIGAMA 公司, 其他为常规分析纯试剂。

LDZ4-0.8 自动平衡微量离心机, 岛津 UV-240 紫外-可见分光光度计, THZ-82 型恒温振荡器。

1.1.3 培养基

PDA 培养基: 土豆汁 20% (v/v), 葡萄糖 20 g/L, MgSO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, V_{B1} (微量),

基金项目: 河南理工大学青年基金资助项目 (Z050401)

收稿日期: 2005-11-01; 修订日期: 2006-07-10

作者简介: 常天俊 (1979 ~), 男, 讲师, 研究方向: 环境生物技术。

E-mail: changtj@hpu.edu.cn

琼脂 12 g/L, pH 6.0。

产漆酶优化培养基:葡萄糖 10 g/L, 酒石酸铵 0.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.075 g/L, Tween80 0.4 g/L, V_{BI} 1×10^{-4} g/L, pH 3.0, 微量元素溶液 10 mL。

微量元素溶液配制参照 Buswell 等人的方法^[6]。

1.1.4 染料

偶氮染料:酸性大红 G; 蒽醌染料:酸性蓝 R; 金属络合染料:中性灰 2BL。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体制备

将 28 ℃ 固体培养条件下培养 5 d 的菌体接种到 PDA 液体培养基中, 摇瓶装液量为 100 mL/250 mL, 120 r/min、28 ℃ 恒温培养 5 d 备用。

1.2.2 菌体生物量的测定

抽滤过的菌体在 70 ℃ 下干燥至恒重, 测定其生物量。

1.2.3 漆酶酶活的测定

在柠檬酸钠缓冲液 (0.2 mol/L, pH 4.5) 中配制 0.5 mmol/L ABTS 溶液, 取 2 mL 该 ABTS 溶液作底物, 28 ℃ 下加入 1 mL 漆酶液, 在 1 cm 的比色皿中反应。以失活的酶液作空白对照, 在 $\lambda = 420 \text{ nm}$ 处测定反应 3 min 内吸光度随时间的变化值, 取其线性部分, 将每分钟吸光度值变化 0.001 个单位定义为一个酶活力单位^[7]。

1.2.4 产漆酶的碳、氮源确立

以酒石酸铵为氮源, 分别以 10 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、木质素作碳源, 其他培养基成分同产漆酶优化培养基, 120 r/min、28 ℃ 恒温培养 10 d, 测定漆酶的活性。

以葡萄糖为碳源, 分别以 0.5 g/L 的氯化铵、硝酸铵、酒石酸铵、尿素、玉米粉、酵母膏作为氮源, 同上培养 10 d 后, 测定漆酶的活性。

1.2.5 产漆酶最佳条件确立

按 $L_{16}4^5$ 设计正交实验, 将葡萄糖、酒石酸铵、pH、转速作为重要的影响因子通过正交试验对产漆酶培养基进行了优化 (如表 1 所示)。

1.2.6 贝壳状革耳菌对染料的降解脱色

将制备的菌丝体悬浮液接种到 90 mL 含酸性大红 G、酸性蓝 R、中性灰 2BL 3 种染料 (浓度均为 20 mg/L) 的液体培养基中, 按照 10% (v/v) 向 250 mL 的三角瓶中接种, 120 r/min、28 ℃ 恒温培养 10 d。

表 1 影响因子及水平

Table 1 Factors and levels

水平	影响因子			
	葡萄糖 (g/L)	酒石酸铵 (g/L)	pH	转速 (r/min)
1	2	0.2	2.5	80
2	5	0.5	3.0	100
3	10	1.0	4.0	120
4	15	2.0	5.0	160

1.2.7 影响贝壳状革耳菌对染料脱色的因素

在产漆酶优化培养基中, 其他条件不变的情况下, 分别改变氮源浓度 (0 g/L、0.2 g/L、0.5 g/L、1 g/L)、碳源浓度 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L) 和 pH 值 (2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0), 处理 20 mg/L 的酸性大红 G、酸性蓝 R、中性灰 2BL 3 种染料, 120 r/min、28 ℃ 恒温摇床培养 10 d。

1.2.8 染料废水脱色率测定

将处理过的染料废水抽滤, 再经离心分离 (6000 r/min, 20 min), 用蒸馏水作对照, 测定染料废水的吸光度值。在低浓度时, 染料的浓度与其最大吸收波长的吸光度值成正比, 可用染料该处的吸光度变化来反映染料浓度的变化。染料脱色率 (Γ) 的计算公式:

$$\Gamma(\%) = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 、 A_t 分别表示初始时刻和 t 时刻染料在特征波长处的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 贝壳状革耳菌产漆酶的碳源、氮源研究

由表 2 可以知, 产漆酶的最佳碳源是葡萄糖, 其次是麦芽糖; 产漆酶最优氮源是酒石酸铵, 其次是氯化铵, 其中尿素作为氮源漆酶活力最低。

表 2 碳源、氮源对漆酶活性的影响

Table 2 Effects of sources of carbon and nitrogen on laccase activity

碳源	漆酶活力 (U/mL)	氮源	漆酶活力 (U/mL)
葡萄糖	785.3	氯化铵	864.5
蔗糖	461.7	硝酸钠	56.8
麦芽糖	574.6	酒石酸铵	1035.1
乳糖	392.1	尿素	123.6
可溶性淀粉	487.2	玉米粉	437.2
木质素	213.5	酵母膏	785.3

2.2 贝壳状革耳菌产漆酶最佳条件研究

按 $L_{16}4^5$ 设计正交实验结果及方差分析如表 3、表 4 所示。计算分析表明 $F_{0.99}(3, 6) = 27.9$, $F_{0.95}(3,$

6) = 8.94,故碳源、氮源作用显著,pH 作用高度显著。由试验结果确定产漆酶的最佳条件为:葡萄糖 10 g/L,酒石酸铵 0.5 g/L,pH 3.0,转速 120 r/min。图 1 为优化培养基中漆酶酶活变化曲线。

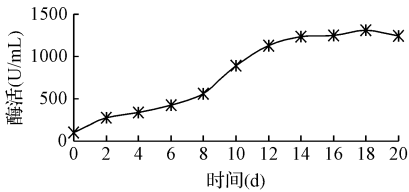


图 1 漆酶分泌曲线

Fig.1 The curve of laccase producing

表 3 实验及结果

Table 3 The experiment and results

试验号	碳源 水平	空白	氮源 水平	pH	转速 水平	漆酶活力 (U/mL)
1	1	1	1	1	1	981.7
2	1	2	2	2	2	996.7
3	1	3	3	3	3	995.3
4	1	4	4	4	4	754.3
5	2	1	2	3	4	927
6	2	2	1	4	3	804.9
7	2	3	4	1	2	1154.7
8	2	4	3	2	1	1190.6
9	3	1	3	4	2	968.9
10	3	2	4	3	1	1079.4
11	3	3	1	2	4	1127.4
12	3	4	2	1	3	1194.8
13	4	1	4	2	3	1056.1
14	4	2	3	1	4	1176.4
15	4	3	2	4	1	631.7
16	4	4	1	3	2	860.7
K_1	3728.4	3933.7	3922.1	4507.6	3883.4	
K_2	4077.2	4057.4	3650.2	4370.8	3981	
K_3	4370.5	3909.1	4331.2	4057.8	4051.1	
K_4	3724.9	4000.7	4044.8	3160.1	3985.4	
R_1	932.1	983.4	943.7	1126.9	970.9	
R_2	1019.3	1014.4	937.6	1092.7	995.3	
R_3	1092.6	977.3	1082.8	1014.5	1012.8	
R_4	9321.2	1000.2	1011.2	790	996.4	
R (极差)	645.6	148.3	681	1347.5	167.7	

表 4 正交试验的方差分析

Table 4 Analysis of variance

变差分析	s_j	自由度 f_j	F_j	显著性
碳源	72 549.3	3	20.8	*
氮源	46 236.36	3	13.3	*
pH	277 839	3	79.8	**
转速	3577.68	3		
误差	6960.9	6		

2.3 贝壳状革耳菌对染料脱色的影响因素

2.3.1 氮源浓度对贝壳状革耳菌染料废水脱色的影响

Matthew 等^[8]利用黄孢原毛平革菌降解刚果红时发现,限氮条件能进一步促进对染料降解,Kirk 等^[9]的研究也表明,低氮能够促进 *Phanerochaete chrysosporium* 对木质素的降解,杨晓宽等^[10]发现黄孢原毛平革菌在限氮培养基中具有较高的锰过氧化物酶生产能力。

本文讨论了不同浓度的酒石酸铵作为氮源对贝壳状革耳菌生物量、染料脱色及漆酶活力的影响,结果如图 2~图 4 所示。

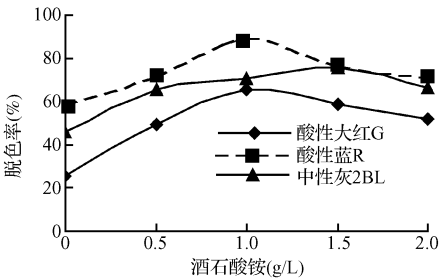


图 2 酒石酸铵浓度对染料脱色率的影响

Fig.2 Effect of ammonium tartrate on decolorization rate

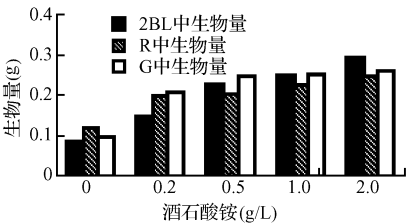


图 3 酒石酸铵浓度对生物量(干重)的影响

Fig.3 Effect of ammonium tartrate on biomass

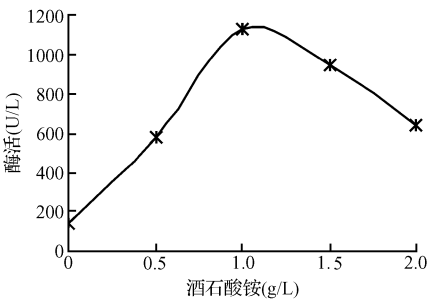


图 4 酒石酸铵浓度对漆酶活力的影响

Fig.4 Effect of ammonium tartrate on laccase activity

由图2可知,不同浓度的酒石酸铵对染料脱色有较大的影响。当培养基中不添加酒石酸铵时,贝壳状革耳菌对3种染料酸性大红G、酸性蓝R和中性灰2BL脱色率分别为25.2%、58.1%和45.7%,当酒石酸铵的浓度为0.2 g/L时,3种染料脱色率有不同程度的上升,脱色率达到48.4%、70.8%和65.2%,当酒石酸铵浓度为0.5 g/L时,酸性大红G和酸性蓝R的脱色率达到最大值,分别为65.2%和89.1%,当酒石酸铵浓度增加到1 g/L,中性灰2BL脱色率达到最大值75.4%,其他2种染料脱色率都有不同程度的下降,随着酒石酸铵的浓度进一步的增大,达到2 g/L时,3种染料的脱色率都有所下降,分别为51.9%、71%和66.5%。由上面的结果可知,培养基中适量的氮能促进贝壳状革耳菌对染料的降解脱色,过高的氮又会强烈抑制贝壳状革耳菌对染料的降解。但从图3可知,随着氮源浓度的增加,生物量明显呈上升趋势。比较图2和图3可知,菌体生物量与菌体对染料的脱色并不呈正相关。图4显示了培养基中一定浓度的氮有利于漆酶的分泌,而高浓度的氮反而抑制了菌体胞外漆酶的分泌,结合图2和图4可推测漆酶在染料的降解脱色中起着重要的作用。

2.3.2 碳源对贝壳状革耳菌染料脱色率的影响

图5~图7显示了葡萄糖作为碳源对贝壳状革耳菌降解脱色染料、生物量及酶活的影响。

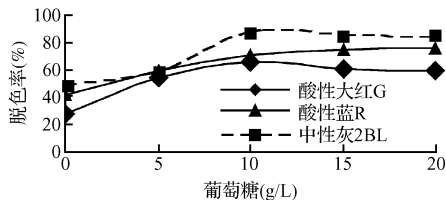


图5 葡萄糖浓度对染料脱色率的影响

Fig.5 Effect of glucose on decolorization

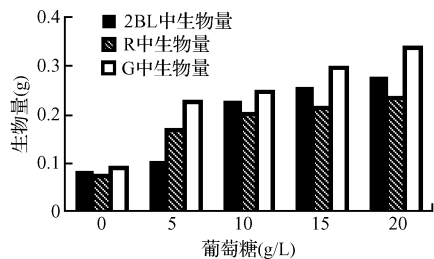


图6 葡萄糖浓度对生物量的影响

Fig.6 Effect of glucose on biomass

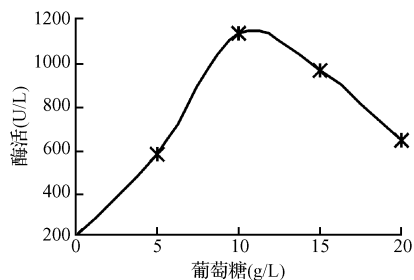


图7 葡萄糖浓度对漆酶活力的影响

Fig.7 Effect of glucose on laccase activity

图5表明,当培养基中葡萄糖的浓度由0 g/L增加到10 g/L时,贝壳状革耳菌对酸性大红G、酸性蓝R和中性灰2BL 3种染料都有明显的降解脱色效果,而且随着葡萄糖量的增加,对比效果十分显著,分别为不加葡萄糖的2.4倍、1.8倍和1.7倍。当培养基中葡萄糖进一步增加,由10 g/L增加到20 g/L时,只有中性灰2BL降解脱色率略有增加,其他两种染料的降解脱色效果都略有下降。可能是因为培养基中高浓度的葡萄糖改变了贝壳状革耳菌产漆酶的碳氮比,抑制了漆酶的产生,所以培养基中高碳氮比不利于漆酶的产生。图6表明,当培养基中葡萄糖的含量由0 g/L增加到20 g/L时,菌体生物量呈现逐步上升的趋势。图7表明,当培养基中葡萄糖较低浓度范围内变化时,酶活逐步上升;浓度达到10 g/L时,酶活达到最大,葡萄糖浓度进一步增大时,酶活下降。这一现象与通过正交试验得出的结果一致。

2.3.3 pH值对贝壳状革耳菌染料脱色率的影响

pH值在很大程度上影响了酶的活力,进而影响了酶对整个反应体系的催化作用^[11]。本实验讨论了pH值对贝壳状革耳菌降解脱色染料的作用、生物量以及漆酶活力的影响。

由图8可知,pH值的变化对贝壳状革耳菌的降解脱色作用有相当显著的影响,当pH值在3.0~3.5范围内变化时,菌体的降解脱色效果较好。pH 3.0时,贝壳状革耳菌对酸性大红G、酸性蓝R、中性灰2BL的降解脱色作用都达到最大,分别为72.2%、89.1%和71.3%,随着pH值的增大,贝壳状革耳菌的降解脱色率逐渐减小,当pH值达到6.0时,贝壳状革耳菌的降解脱色率达到最低,分别为19.9%、54.3%和47.6%,这与图10所示pH值对漆酶酶活影响一致,由此推测漆酶在染料脱色中起着重要的作用。而由图9可知,贝壳状革耳菌的最

适生长 pH 值为 3.0 ~ 3.5, 过高或过低的 pH 值都不利于菌体的生长。比较图 8 ~ 图 10 可知, 控制培养

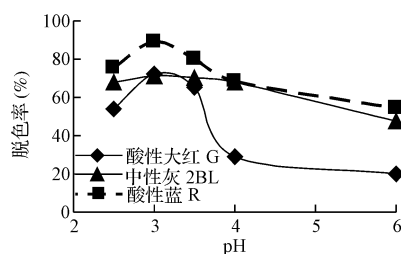


图 8 不同的 pH 对染料脱色率的影响

Fig. 8 Effect of pH on decolorization

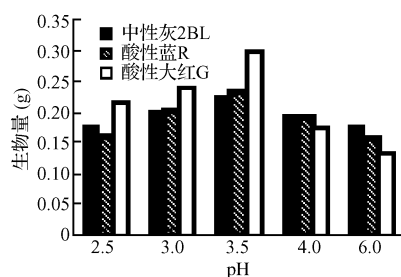


图 9 不同的 pH 对生物量的影响

Fig. 9 Effect of pH on biomass

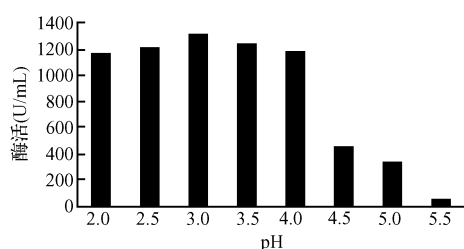


图 10 pH 对酶活的影响

Fig. 10 Effect of pH on laccase activity

基适宜的 pH 值有利于染料的降解脱色, 而且有利于菌体的生长。综上所述, 在 pH 值为 3.0 ~ 3.5 时, 贝壳状革耳菌的降解脱色作用、漆酶酶活、生物量都可以得到较为理想的效果。

3 讨论

对贝壳状革耳菌降解脱色染料条件的研究结果表明: (1) 贝壳状革耳菌高产漆酶优化培养基与染料脱色的最佳培养基一致, 说明在染料的降解方面漆酶起到了至关重要的作用; (2) 从染料降解脱色的单因子实验中可知, 过高或过低的碳源、氮源对贝壳状革耳菌脱色染料都是不利的; (3) 本研究也表明, 染料脱色与菌体生物量不呈正相关, 因此菌体的吸附作用在染料脱色方面不占主导地位。

虽然漆酶等对白腐菌的染料代谢都起了重要的

作用, 但由于染料分子本身及酶学机制的复杂性, 除黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 外, 其他白腐菌对染料的详细降解机理及途径还未弄清楚^[12], 因此需要进一步研究其他菌株基础代谢, 通过代谢调控的手段, 改善白腐菌对染料的脱色效果。郭梅等^[13]的研究表明通过遗传操作技术获得高效表达漆酶酶活的基因工程菌, 也将成为白腐菌应用于印染废水处理的重要研究方向。

参考文献

- [1] 李华钟, 章燕芳. 白腐菌与染料废水的处理. 工业水处理, 2001, 21(5): 1 ~ 5
- [2] 金敏, 李君文. 白腐菌处理染料废水的研究进展. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(3): 54 ~ 58
- [3] Elithbeth R., Michael A. P., Rafael V. D. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Current Microbiology, 1999, 38: 27 ~ 32
- [4] Yu H. S., Cai Z. Y., Hung X. Y., et al. Biological degradation of rice straw. In: Kirk T. K., Chang H. M., ed. Applications of Biotechnology of Pulp and Paper Manufacture. USA: Butterworth-Heinemann, 1999. 59 ~ 68
- [5] 王彩华, 余惠生, 付时雨. 贝壳状革耳菌和黄孢平革菌固体培养酶系比较. 微生物学报, 1999, 39(2): 127 ~ 131
- [6] Buswell J. A., Mollet B., Odier E. Ligninolytic enzyme production by *phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency. FEMS Microbiol. Lett., 1984, 25: 295 ~ 299
- [7] Bourbonnais R., Paice M. G. Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role of for laccase in biodegradation. FEBS Microbiol. Lett., 1990, 267: 99 ~ 102
- [8] Matthew Tatarko, et al. Biodegradation of congo red by *phanerochaete chrysosporium*. Wat. Res., 1998, 32(5): 1713 ~ 1717
- [9] Kirk T. K., Schulta, Connors W. J., Lorenz L. F., Zeikus J. G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol., 1978, 117: 277 ~ 285
- [10] 杨晓宽, 杜连祥, 路福平. 白腐菌产锰过氧化物酶培养基的优化. 生物技术, 2004, 14(3): 49 ~ 50
- [11] 吴坤, 朱显峰, 张世敏, 等. 杂色云芝杆菌的发酵条件研究. 菌物学报, 2001, 20(2): 207 ~ 213
- [12] Smyth W. F., McClean S., et al. Application of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of Remazol textile dyes. J. Chromatogr., 1999, 854: 259 ~ 274
- [13] 郭梅, 蒲军, 杜连祥, 等. 杂色云芝漆酶基因 (*Lcc1*) 的克隆及在甲醇毕赤酵母中的表达. 菌物学报, 2005, 24(2): 221 ~ 226