

高产漆酶菌的筛选及对污水中萘降解的研究

李丹, 张波*, 李玉* (吉林农业大学, 食药菌教育部工程研究中心, 吉林长春 130118)

摘要 [目的] 筛选出高产漆酶菌株, 研究菌株产漆酶对污水中萘是否有降解能力。[方法] 采取液体发酵法和气相色谱法。[结果] 主要对 21 个隶属于担子菌的菌株进行了漆酶活性的比较。首先, 平板培养进行比较, 之后液体发酵的试验方法培养 15 d 后得到高酶活的菌株, 漆酶酶活高 (酶活达到 1 000 U/ml 以上) 的菌株有 3 个, 依次是香栓菌 (*Trametes suaveolens*)、灰管层孔菌 (*Fomes lignosus*) 和彩绒革盖菌 (*Trametes versicolor*)。进一步对香栓菌的漆酶性质进行研究, 其最适 pH 为 4.5, 最适温度为 35 ℃, 最适碳源为乳糖, 氮源为蛋白胨。通过对其中 8 种产漆酶菌株对污水中萘 (含量) 的降解处理, 结果表明菌株香栓菌和硬毛栓菌 (*Trametea trogii*) 产生的漆酶对污水中的萘降解率均为 100%, 而一色齿毛菌 (*Cerrena unicolor*) 和烟管菌 (黑管菌) (*Bjerkandera adusta*) 对污水中的萘降解均能达到 50% 以上。[结论] 得到 3 株产漆酶酶活较高的菌株。菌株产漆酶对污水中萘具有一定的降解能力。

关键词 真菌; 漆酶; 污水; 萘; 降解

中图分类号 S188+.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)22-09179-04

Screening of High Laccase-producing Strains and Studies on Degradation of Naphthalene in Sewage

LI Dan et al (Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] High laccase-producing strains were screened and the degradation of naphthalene in sewage was studied. [Method] Liquid fermentation and gas chromatography were used. [Result] The laccase activity of 21 strains belonged to basidiomycetes was compared. 3 high laccase-producing level strains were screened out using the plate cultivation and fluid fermentation method, which were *T. suaveolens*, *F. lignosus* and *T. versicolor*. The laccase activity of the strains on 15th days were above 1 000 U/ml. Then the laccase properties of *T. suaveolens* was studied. The optimum pH was 4.5, the optimum temperature was 35 ℃, the optimum carbon source was lactose, and nitrogen source was peptone. The results of degradation of naphthalene of the 8 strains were as follows: the naphthalene degradation rate of *T. suaveolens* and *T. trogii* were all 100%, and the naphthalene degradation rate of *C. unicolor* and *B. adusta* were more than 50%. [Conclusion] 3 high laccase-producing level strains were screened out, and the laccase-producing strains could degrade the naphthalene in sewage.

Key words Fungi; Laccase; Sewage; Naphthalene; Degradation

漆酶 (Laccase EC1. 10. 3. 2) 是一种含铜的多酚氧化酶^[1]。它广泛存在于真菌特别是担子菌亚门层菌纲非褶菌目^[2]。近年来研究表明, 它的底物作用广泛, 可以氧化降解单酚、邻苯二酚、对苯二酚等多种酚类氧化物。也有报道说, 它还可以氧化一些含磷的有毒物质^[3-4], 因此, 它具有较大的应用价值, 在造纸业^[5]、纺织业^[6]、食品业^[7]等领域越来越受到人们的重视。多环芳烃 (PAHs) 是一类具有致癌、致畸、致突变作用的有机物^[8], 且生物难降解^[9], 在环境中分布广泛, 天然水体中的浓度为 0.001 ~ 10 μg/ml, 工业废水中约 1 mg/L^[10]。在上海黄浦江某江段, 检测出包括苯并(a)芘在内的多种 PAHs^[11]。所以, 利用菌对污水的治理和生物修复越来越受到人们的关注, 为工程应用提供理论依据, 以期达到治废的目的。从野外分离得到 8 种产漆酶白腐真菌。目前, 关于这 8 种菌株的降解污水中萘的能力研究国内外未见相关的报道, 笔者首次研究这 8 个菌株对污水中萘的降解。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。 菌种均采集于吉林省白山市露水河, 鉴定后分离纯化, 4 ℃ 保藏于 PDA 斜面。

1.1.2 培养基。

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项基金 (CARS24); 吉林省重大项目 (10ZDGG003)。

作者简介 李丹 (1983 -), 女, 吉林长春人, 实验员, 硕士, 从事菌物学方面的研究。* 通讯作者: 张波, 实验师, 博士, 从事菌物学方面的研究, E-mail: 3585260@qq.com; 李玉, 教授, 博士, 从事菌物学方面的研究, E-mail: yuli966@126.com。

收稿日期 2013-07-24

1.1.2.1 斜面培养基 (PDA)。 葡萄糖 20 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, VB₁ 2 mg, 琼脂粉 15 g, 浓度 20% 土豆汁 1 000 ml。

1.1.2.2 初筛平板培养基 (PDA)。 葡萄糖 20 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, VB₁ 2 mg, 琼脂粉 15 g, 浓度 20% 土豆汁 1 000 ml, 检测物质 0.05 mol/L。

1.1.2.3 液体发酵培养基。 葡萄糖 20 g, NaH₂PO₄ 3.5 g, K₂PO₄ 5.0 g, NH₄Cl 2.0 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, 定容至 1 L, pH 6.0 ~ 7.0。

1.1.3 污水降解样品来源。 8 株产漆酶菌株为彩绒革盖菌 (*T. versicolor*)、硬毛栓菌 (*T. trogii*)、香栓菌 (*T. suaveolens*)、灰管层孔菌 (*F. lignosus*)、一色齿毛菌 (*C. unicolor*)、烟管菌 (黑管菌) (*B. adusta*)、血红孔菌 (*Pycnoporus sanguineus*)、薄皮干酪菌 (*Tyromyces chioneus*)。污水样取自吉林省长春市大成淀粉厂。

1.2 方法

1.2.1 产漆酶菌株的筛选方法。 将 21 个菌种转到平面培养基上活化, 接着转到初筛平板培养基 (PDA) 上, 25 ℃ 培养 3 d 后观察菌落周围颜色的变化^[12]。将有颜色变化的菌种挑出, 再转到 PDA 上培养, 待长满平皿后用打孔器取 5 块接种到液体发酵培养基 (150 ml 三角瓶内装 50 ml 液体培养基), 于 25 ℃, 150 r/min 振荡培养 7 d 后, 测定各菌种培养液中漆酶的活性。

1.2.2 漆酶活性测定方法。 在一定条件下, 每分钟氧化 1 μmol 底物所需要的酶量为 1 个酶活单位 (U)。以 2, 2'-连氮一二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 简称 ABTS 为底物, 反应总体积为 4 ml, 反应温度 25 ℃。取 50 ml 0.2 mol/L 的醋酸缓

冲液(pH为4.5),加入0.0275g ABTS混合液2ml,再加入2ml适当稀释的酶液,测定 OD_{420} 值^[13]。

$$\text{酶活力(U/ml)} = \frac{10^6}{\varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V(\text{酶})} \times \frac{\Delta OD}{\Delta t}$$

式中, $V_{\text{总}}$ 和 $V(\text{酶})$ 分别代表漆酶酶活测定反应体系的总体积及反应添加酶液体积; ε 代表吸光系数。

1.2.3 漆酶粗酶液的制备。将产漆酶的培养液经8层纱布过滤,于25℃,3000 r/min离心5min,取上清液为粗酶液,放入冰箱保存备用。

1.2.4 产酶条件的研究。在相同条件下,对香栓菌、彩绒革盖菌、灰管层孔菌比较了静止培养和摇瓶振荡培养2种方式对漆酶活性的影响。摇床转速是发酵液通氧的另一选择指标。在其他条件相同时,摇床转速不同,试验菌株发酵产酶情况也有明显差异。将以上3种菌株在PDA培养中28℃振荡培养1、3、5、7、9、11、13、15、17d后,分别测定培养液漆酶活性。

1.2.5 香栓菌粗漆酶性质的研究。分别配制pH为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0的50mmol/L缓冲溶液,分别加入不同的粗酶液中稀释,30℃,测定酶活。

在pH为4.5的缓冲溶液中,分别在25、30、35、40、45、50、55、60℃测定粗酶酶活,研究最适反应温度^[16-17]。

在液体培养基中,分别用待测碳源(麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖)代替葡萄糖,在转速150 r/min摇床上培养8d后测定酶活,以研究最适碳源。

由于香栓菌以乳糖为碳源时更有利于漆酶的分泌,氮源试验以乳糖作固定碳源,待测氮源(酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、干酪素、尿素)代替马铃薯,在转速150 r/min摇床上培养8d后,测定酶活,以研究最适氮源。采用精密酸度计法测定pH。

1.2.6 菌株降解污水样的方法。将菌种接到产酶培养基,30℃培养箱中培养7d,用打孔器在菌落边缘取5个直径为10mm的菌块,转接到50ml装有稀释一定体积污水样的250ml三角瓶中,在30℃,120 r/min的摇床上培养7d后,3000 r/min离心5min,取上清液于低温冰箱中保存。每个处理3个重复。

1.2.7 气相色谱法检测萘的含量。

1.2.7.1 萘的萃取与测定。含萘的样品50ml,用50ml环己烷萃取3次,浓缩定容至1ml,备用。

1.2.7.2 色谱条件。DB-5MS色谱柱,30.00m×0.25mm×0.25mm;进样口温度270℃;程序温度80℃保持3min,以每分钟15℃升到150℃,然后以每分钟2.5℃升到270℃并保持3min。

1.2.8 不同白腐菌降解萘的比较。将分离得到的各种真菌,处理含萘的样品50ml,经7d发酵后,用50ml环己烷萃取3次,浓缩定容至1ml,检测萘浓度,计算降解率。

2 结果与分析

2.1 菌株的平板筛选

2.1.1 初筛。将活化得21个菌株分别用打孔器取若干块

接种到初筛平面培养基上,25℃培养。由表1可知,21株菌株中有19株可以初步鉴定产漆酶。将19菌株接种到液体发酵培养基上进行培养。

表1 显色结果

菌种	现象	颜色变化时间//h
<i>Stereum fasciatum</i> (S ₁)	变紫色	0.50
<i>Trametes trogii</i> (T ₁)	变紫色	72.00
<i>Stereum insignis</i> (S ₂)	不变色	-
<i>Bjerkandera adusta</i> (B ₁)	变紫色	6.00
<i>Hericium erinaceus</i> (H ₁)	变紫色	18.00
<i>Grifola frondosa</i> (G ₁)	变紫色	62.40
<i>Laetiporus sulphureus</i> (L ₁)	变紫色	72.00
<i>Trametes suaveolens</i> (T ₂)	变紫色	24.00
<i>Trametes versicolor</i> (T ₃)	变紫色	15.00
<i>Tyromyces chioneus</i> (T ₄)	变紫色	16.00
<i>Plyporus squamosus</i> (P ₁)	变紫色	72.00
<i>Trametes palisoti</i> (T ₅)	变黑紫色	72.00
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (P ₂)	变紫色	20.00
<i>Fomes lignosus</i> (F ₁)	变紫色	16.00
<i>Trametes versicolor</i> (T ₆)	变紫色	15.00
<i>Irpex lacteus</i> (I ₁)	变紫色	48.00
<i>Ganoderma capense</i> (G ₂)	变紫色	16.00
<i>Cerrena unicolor</i> (C ₁)	变紫色	12.00
<i>Ganoderma formosanum</i> (G ₃)	变紫色	0.33
<i>Microporus xanthopus</i> (M ₁)	变蓝色	72.00
<i>Phellinus igniarius</i> (P ₃)	变紫色	72.00
<i>Phellinus pomaceus</i> (P ₄)	不变色	-

2.1.2 复筛。将上部有颜色变化的菌株转接到液体培养基中,在摇床中30℃,150 r/min培养7d后取样,测定粗酶活性,结果筛选得到3株香栓菌、彩绒革盖菌、灰管层孔菌酶活达到1000U以上的菌株(图1)。

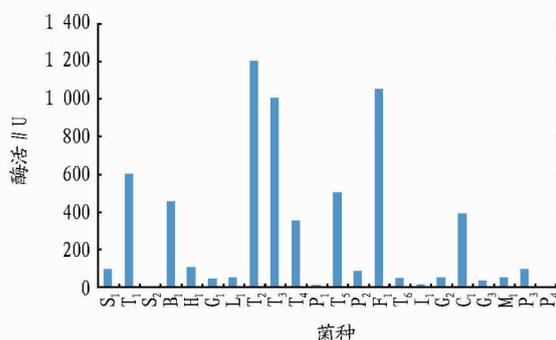


图1 酶活测定结果

2.2 产漆酶条件的研究

2.2.1 培养方式的选择。静止和摇床振荡结果表明,静止培养酶活峰值高,但发酵周期长,约15d;振荡培养酶活峰值稍低,但生产时间短,4~5d。因此,选择生产周期较短的摇瓶振荡培养方式进行其他产酶影响条件研究。

2.2.2 摇床转速的选择。当摇床转速在150 r/min以下时,酶活水平随转速的升高而增加;150 r/min时酶活水平最高,达2000 IU/L;当转速超过150 r/min时,酶活水平不升反而略有下降。这也说明试验菌株漆酶合成需要一定量氧,但过量氧对产酶不利。因此,应用该菌株进行漆酶生产时选择150 r/min为宜。

2.2.3 发酵产酶时间的选择。由图2可知,随着营养物质的消耗,菌丝生物量不断增大,漆酶产量也不断地提高,而在

第9天漆酶的含量最高,其活性也最大,但随着培养时间的进一步延长,培养液中的营养物质逐渐的匮乏,氧气的浓度也不断下降,同时漆酶的活性降低。

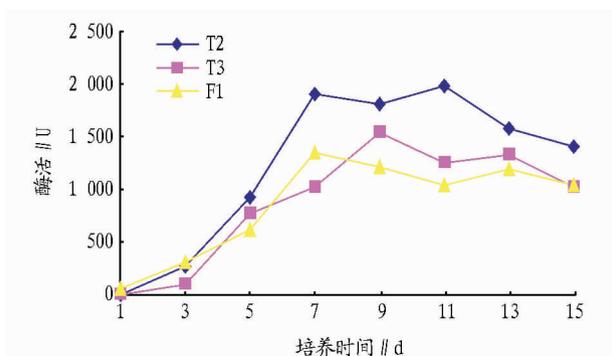


图2 培养时间对酶活的影响

2.3 香栓菌粗漆酶性质的研究

2.3.1 香栓菌粗漆酶的最适 pH。由图3可知,香栓菌酶活在 pH 为 4.5 时达到最高值,当 pH 达到 6 时,该酶失去活性,即香栓菌粗漆酶的最适 pH 为 4.5。

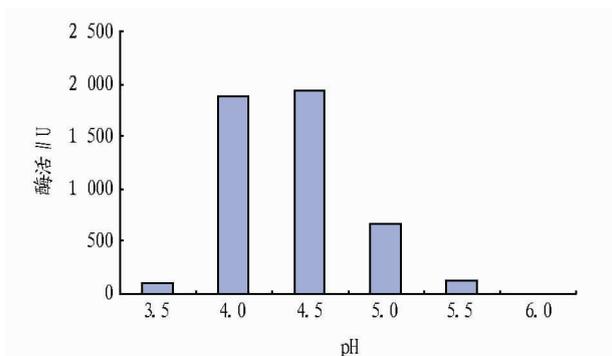


图3 最适 pH 测定结果

2.3.2 香栓菌粗漆酶的最适温度。由图4可知,香栓菌酶活在 35 °C 时达到最高值,当温度高于 60 °C 时,该酶几乎失去活性,即香栓菌粗漆酶的最适温度为 35 °C。

2.3.3 香栓菌粗漆酶最适碳氮源。由表 2、3 可知,对于香栓菌,以可溶性淀粉和葡萄糖为碳源时虽能促进菌丝的生长,但不能促进漆酶的分泌;以乳糖为碳源,菌丝生长量虽低,但具有较高的漆酶活性,而以蛋白胨作氮源时,菌丝生长量和酶活性都很高。由此可知,菌丝体的生长量、酶的分泌不呈正相关。

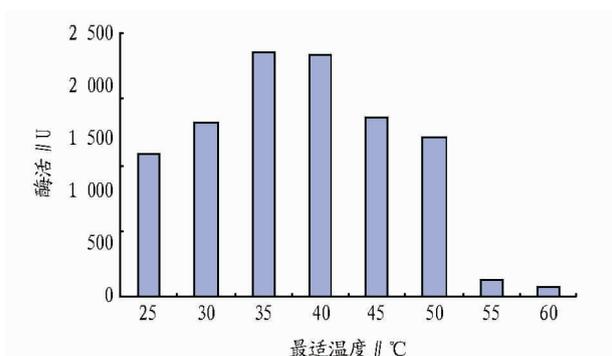


图4 最适温度测定结果

表2 碳源测定结果

碳源	菌丝湿重//g	漆酶活力//U
麦芽糖	5.9	894
葡萄糖	9.3	1 190
蔗糖	6.9	1 657
可溶性淀粉	10.9	1 297
乳糖	6.3	1 963

表3 氮源测定结果

碳源	菌丝湿重//g	漆酶活力//U
酵母膏	9.1	1 699
蛋白胨	10.2	1 826
牛肉膏	8.6	1 325
干酪素	10.2	1 569
尿素	7.1	986

2.4 苯含量的测定 将原水样及 8 种菌株降解处理后的水样,通过气象色谱法检测苯的含量,得到谱图,见图 5 ~ 13。

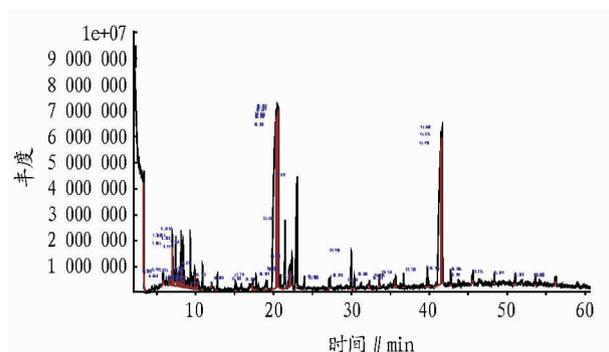


图5 原水样的 GC 谱图

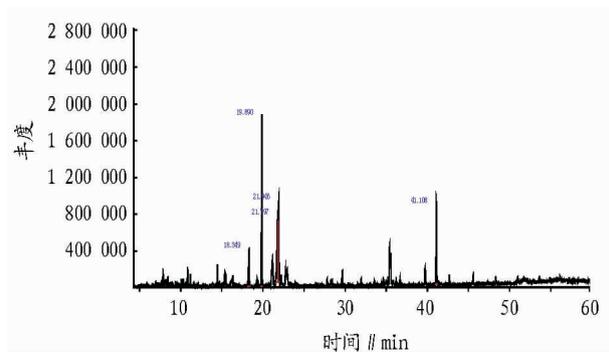


图6 香栓菌菌种降解处理后水样

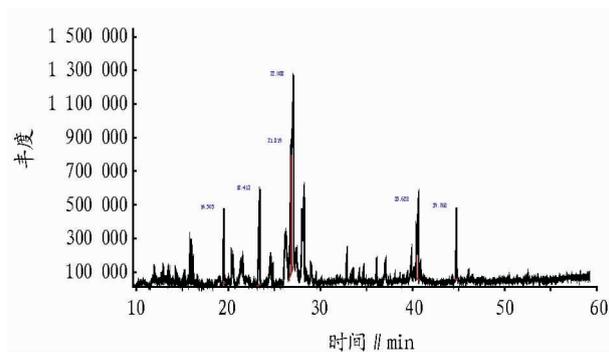


图7 一色齿毛菌菌种降解处理后水样

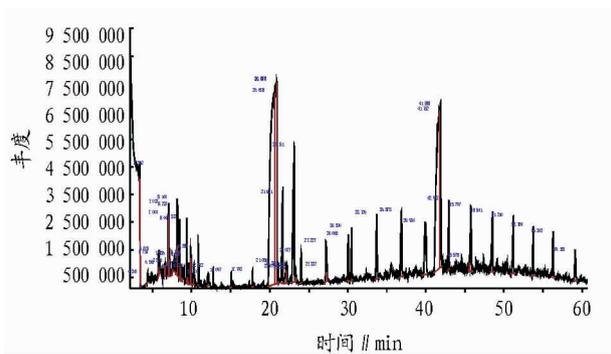


图 8 彩绒革盖菌种降解处理后水样

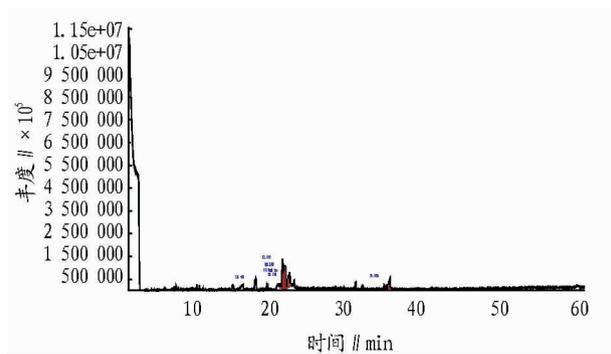


图 12 硬毛栓菌种降解处理后水样

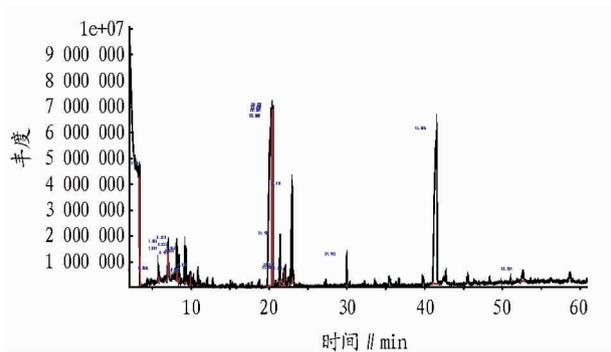


图 9 烟管菌(黑管菌)菌种降解处理后水样

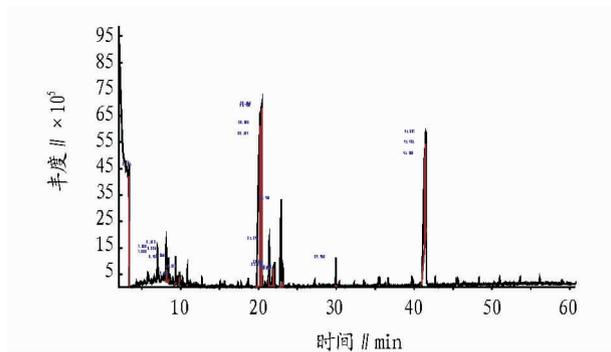


图 13 血红孔菌种降解处理后水样

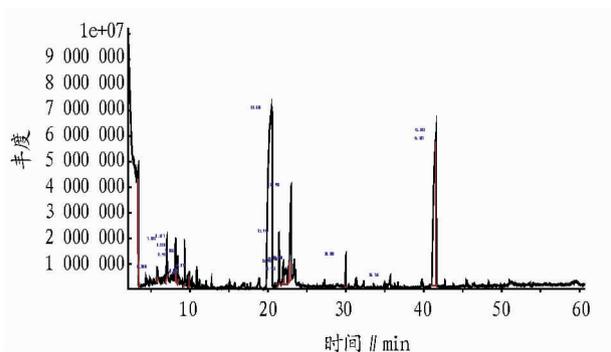


图 10 薄皮干酪菌种降解处理后水样

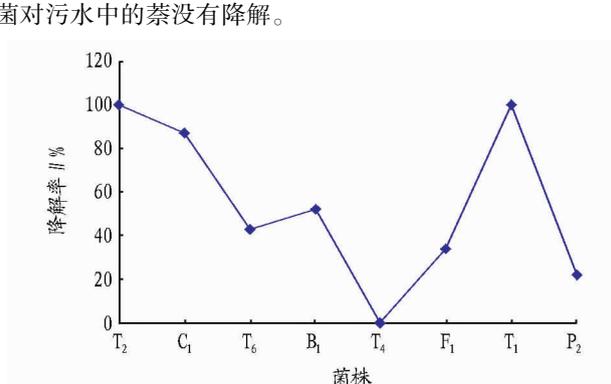


图 14 8 种菌株对污水中萘的降解率

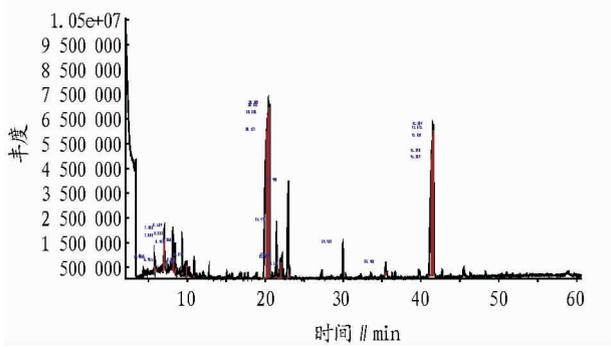


图 11 灰管层孔菌种降解处理后水样

2.5 8 种菌株对污水中萘的降解率 通过 GC 谱图, 经过分析得到 8 种真菌的降解率。由图 14 可知, 菌株香栓菌和硬毛栓菌产生的漆酶对污水中的萘降解率均为 100%, 而一色齿毛菌和烟管菌(黑管菌)对污水中的萘降解均能达到 50% 以上, 彩绒革盖菌、灰管层孔菌和血红孔菌对污水中的萘均有降解能力, 只是降解率未能达到 50% 以上, 薄皮干酪

菌对污水中的萘没有降解。

3 讨论

从 21 株菌株中筛选得到 19 株产漆酶的菌株, 进一步发酵培养得到 3 株产漆酶酶活较高的菌株, 漆酶酶活力香栓菌 > 灰管层孔菌 > 彩绒革盖菌, 对高产漆酶菌株香栓菌的漆酶性质进行了详细研究, 得出其最适生产条件; 通过 8 种菌株对污水中萘的降解试验, 得到 7 株菌株对污水中萘都有一定的降解能力, 其中香栓菌和硬毛栓菌产生的漆酶对污水中的萘降解率均为 100%, 而一色齿毛菌和烟管菌(黑管菌)对污水中的萘降解均能达到 50% 以上, 说明香栓菌和硬毛栓菌产生漆酶对萘降解的能力较强, 而彩绒革盖菌、灰管层孔菌、血红孔菌对污水样中的萘的降解不高, 薄皮干酪菌对污水中的萘没有降解。这可能与木质素降解的酶系组成的复杂性有关, 如早期研究得较多的木质素降解菌模式种黄孢原毛平革菌就不能产生漆酶^[12], 今后在漆酶对污水中萘降解后的成分有待进一步研究。该研究证明漆酶对萘有一定的降解作

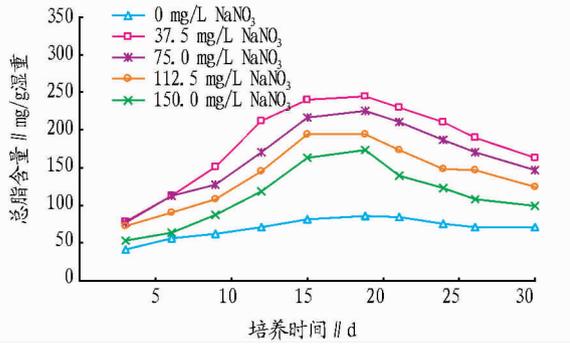


图4 氮含量对等鞭金藻总脂含量的影响

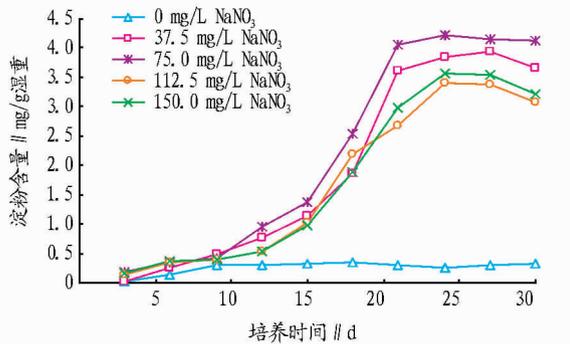


图5 氮含量对等鞭金藻淀粉含量的影响

致,即在含 150 mg/L 硝酸钠的培养液中,培养至后期的等鞭金藻的生物量和蛋白质含量较高;当体系中硝酸钠含量较低(37.5 mg/L)时,等鞭金藻培养至中期即能合成较多的总脂;当培养液中含 75 mg/L 的硝酸钠时,等鞭金藻细胞内的可溶性总糖和淀粉分别在培养中后期和培养后期达到最大值。

等鞭金藻生长需要合适的氮源,然而其细胞内生化组分的含量明显与培养液中的氮含量有关。这可能是由不同氮浓度时等鞭金藻的代谢途径不同所致。因此,在兼顾等鞭金藻生物量的同时十分有必要深入研究不同营养盐时代谢途径的改变,从而为利用等鞭金藻获取生物活性物质或生物能

源资源提供有益的参考和重要依据。

参考文献

- [1] AMANO M HELENA, GUEDES CATAEINA, MALCATA XAVIER F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel [J]. Applied Energy, 2011, 88: 3402 - 3410.
- [2] MATA T M, MATINS A A, CAETANA N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14: 217 - 232.
- [3] LI X, HU H Y, GAN K, et al. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources [J]. Ecological Engineering, 2010, 36(4): 379 - 381.
- [4] HUANG C C, HUNG J J, PENG S H, et al. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: influences of CO₂ and nitrogen sources on the accelerated growth [J]. Bioresource Technology, 2012, 112: 228 - 233.
- [5] LI Y Q, MARK H, BEI W, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochlorisoleo abundans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81: 629 - 636.
- [6] FIDALGO J P, CID A, TORRES E, et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana* [J]. Aquaculture, 1998, 166(1/2): 105 - 116.
- [7] 蔡卓平, 肖群, 黄伟伟, 等. 2 种海洋微藻对氮含量生长响应的研究 [J]. 水产科学, 2010, 29(11): 629 - 633.
- [8] LIN Q, LIN J D. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *scenedesmus rubescens* like microalga [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1615 - 1621.
- [9] 吴电云, 邹宁, 常林, 等. 球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* Parke) 的培养研究进展及应用前景 [J]. 科技信息, 2010(33): 28 - 29.
- [10] 李永函, 赵文. 水产饵料科学 [M]. 大连: 大连出版社, 2002: 282.
- [11] THOMAS RAUSCH. The estimation of microalgal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of extracting protein [J]. Hydrobiologia, 1981, 78(3): 237 - 251.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 12 - 13.
- [13] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37: 911 - 915.
- [14] 徐婷, 杨海波, 孟迎迎, 等. 一种海洋微藻细胞内淀粉含量的测定方法: CN, ZL201110218633.6 [P]. 2012 - 01 - 18.
- [15] 杨凯, 王涌, 史全良, 等. 不同质量浓度 NaNO₃ 对 3 种微藻生长及总脂脂肪酸含量和组成的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 43 - 49.
- [7] 张晓昱, 黄慧艳. 漆酶在食品工业中的应用研究进展 [J]. 食品科技, 2003, 4(2): 4 - 7.
- [8] VOICE T C, WEBER W J Jr. Sorption of hydrophobic compounds by sediment, soil and suspended solids - I [J]. Water Res, 1983, 17(10): 1433 - 1441.
- [9] SORREL R. K. A review of occurrences and treatment of polynuclear aromatic hydrocarbons in water [J]. Environment International, 1980, 4(12): 245 - 254.
- [10] ANDELMAN J C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment [J]. World Health Org, 1970, 43: 479 - 508.
- [11] 王兆同, 王郁, 胥峥, 等. 黄浦江底泥对多环芳烃的吸附过程模拟 [J]. 华东理工大学学报, 1999, 25(2): 156 - 159.
- [12] 彭红. 产漆酶真菌的筛选、培养及对苯酚的降解 [J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(7): 111 - 114.
- [13] 张鹏. 以 ABTS 为底物测定漆酶活力的办法 [J]. 印染助剂, 2007, 24(1): 43 - 45.

(上接第 9182 页)

用,为进一步制定污水处理的工艺及菌株产漆酶的大规模工业化应用奠定了基础。

参考文献

- [1] 缪静, 姜竹茂. 漆酶的最新研究进展 [J]. 烟台师范学院学报, 2001, 17(2): 146 - 150.
- [2] 许影, 兰进. 真菌漆酶研究进展 [J]. 食用菌学报, 2005, 12(1): 57 - 64.
- [3] 林鹿, 邓耀杰, 詹怀宇. 白腐菌对芳香化合物的降解 [J]. 环境化学, 1999, 18(5): 408 - 411.
- [4] 李济吾, 张珍. 真菌在含酚废水处理中的应用 [J]. 环境工程学报, 2007, 1(2): 20 - 24.
- [5] 赵德清, 林鹿, 蒋李萍. 白腐菌对纸浆漂白的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 97 - 100.
- [6] 常天俊, 潘文维, 赵丽, 等. 白腐真菌对染料脱色的培养条件研究 [J]. 环境工程学报, 2007, 1(2): 54 - 58.