

应用 *Coriolus versicolor* 菌丝球脱色染料及 印染废水的研究*

吴绵斌 夏黎明

(浙江大学化学工程与生物工程系 杭州 310027)

摘 要 对白腐真菌(*Coriolus versicolor*)产生漆酶进行了研究。发现该菌产漆酶的最适初始 pH 值为 4.5。提高微量元素浓度或添加藜芦醇都可使 *C. versicolor* 的产酶能力增加,添加 Tween80 会有一定的抑制作用。采用 *C. versicolor* 菌丝球进行重复分批产酶试验,结果表明菌丝球的稳定性很好,同一批菌丝球可连续利用 14 次,平均每批酶活力可保持在 6.72U/mL,产酶能力优于聚氨酯泡沫固定化菌丝。将粗酶液用于染料的脱色降解试验,在酶活力为 3.3IU/mL,酸性橙浓度为 500mg/L 条件下,经过 24h 反应,脱色率达到 98.5%,对含弱酸大红和卡布龙红的印染废水进行脱色试验,脱色率也达到了 93%。

关键词 漆酶,白腐真菌,自凝絮菌丝球,重复分批培养

中图分类号:Q815 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)03-0364-06

木质素是地球上含量最丰富的可再生资源,它的降解是地球上碳素循环的关键之一。木质素是由三种芳香醇杂合而成的高分子化合物,它在自然界中的降解主要依赖于白腐真菌产生的酶系。目前发现主要有三种酶与木质素的降解有关,其中漆酶(Laccase)的降解作用由于不需要有过氧化氢参与,因而引起了人们的高度重视^[1]。

由于许多芳香族染料的分子结构与木质素有某些相似性,漆酶可以通过对染料分子中的偶氮键的作用而降解这些染料^[2,3],因此利用白腐真菌产生的漆酶处理印染废水,降解染料化合物的研究在环境保护中具有十分重要意义。本文对白腐真菌(*Coriolus versicolor*)产生漆酶的培养条件及利用粗酶液脱色染料进行了系统研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

彩绒革盖菌(*Coriolus versicolor*)来自新西兰木材防腐研究中心,该菌又名杂色云芝,是一种著名的白腐真菌。菌丝体于 4℃ 下保存于 YMS 斜面上。

1.2 培养基(YMS)

葡萄糖 20g,麦芽汁 20g,蛋白胨 1g,琼脂 20g(用于液体菌种培养时不加琼脂),用水定容到 1L, pH4.5。

1.3 产酶培养基(Dodson 培养基)

葡萄糖 2.2g,酒石酸铵 0.94g, NaH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.5g,微量元素 1mL,用水定

* 国家自然科学基金资助项目(29976038)

作者简介:吴绵斌(1969-)男,浙江宁波人,博士,讲师,主要从事生物工程的研究工作。

收稿日期:2001-08-28,修回日期:2001-11-30

容到 1L pH4.5。微量元素溶液组成(L^{-1}):维生素 B1 100mg, $CaCl_2$ 100mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 100mg, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 20mg。

1.4 菌丝球的制备

在 500mL 摇瓶中加入 200mL YMS 液体培养基,接入液体菌种 5mL,180r/min,30℃ 培养 5~6d。利用 *Coriolus versicolor* 自凝絮特性制成直径为 2~3mm 的菌丝球。菌丝球用生理盐水清洗后,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.5 固定化菌丝的制备

将 2.5g 左右的多孔聚酯载体(大小为 0.5cm × 0.5cm × 0.4cm)加入到 500mL 三角瓶中,再加入 200mL YMS 液体培养基,180r/min,30℃ 培养 5~6d。菌丝固定完全后,用生理盐水清洗,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.6 自凝絮菌丝球产酶试验

1.6.1 分批培养:在 500mL 摇瓶中加入 100mL 的产酶培养基和 20g(湿重)的菌丝球,180 r/min,30℃ 震荡培养。

1.6.2 重复分批培养:在 500mL 摇瓶中加入 100mL 的产酶培养基和 20g(湿重)的菌丝球,180r/min,30℃ 震荡培养。每当漆酶的活力达到顶峰时,移去培养液,加入新的产酶培养基 100mL,进行重复产酶试验。

1.7 固定化菌丝产酶

在 500mL 摇瓶中加入 100mL 的产酶培养基和 23g(湿重)的已固定了菌丝的多孔聚酯载体,180r/min,30℃ 震荡培养。

1.8 染料和印染废水的脱色

染料和印染废水的脱色在 500mL 三角瓶中进行,将待脱色液和粗酶液在掏瓶中混合,置于恒温的水浴摇床中,摇床转速为 120r/min,温度为 60℃。

1.9 分析测定方法

1.9.1 还原糖:采用 DNS 法^[4]。

1.9.2 漆酶活力^[5]:将样品稀释 10 倍,稀释液和 ABTS 溶液(0.0275g ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]溶解在 50mL pH4.5 的 0.2mmol/L 柠檬酸钠缓冲液中,现配现用)首先分别在 30℃ 水浴中预热 5min。在 1cm 的比色皿中先加 1mL 稀释液,再加 1mL ABTS 溶液启动反应。反应 5min 后,测定在 420nm 下的吸光值变化。取线性部分,每分钟吸光值变化 1 个单位即为 1 个酶活单位。由于样品稀释了 10 倍,所以酶活力应该乘以 10。

1.9.3 菌丝重量:用三层纱布过滤待测三角瓶内的所有菌球,放置于 85℃ 烘箱中,烘干至恒温,用分析天平称量。

1.9.4 理论吸光值:将染料溶液或印染废水稀释到吸光值同溶液浓度成线性的范围内。在可见光区内用分光光度计测量最大的吸收峰的吸光值,再乘以稀释倍数,成为该样品的理论吸光值。

1.9.5 脱色率 $(1 - A_{前}/A_{后}) \times 100\%$

2 结果和讨论

2.1 分批培养的产酶进程

图 1 是一个比较典型的菌丝球分批培养产酶过程。从图 1 中可以看到 糖在 5d 后基本耗光,由于采用营养限制性培养基,菌球重量变化不大,培养液内漆酶酶活在 6d 达到高峰,随后开始下降。

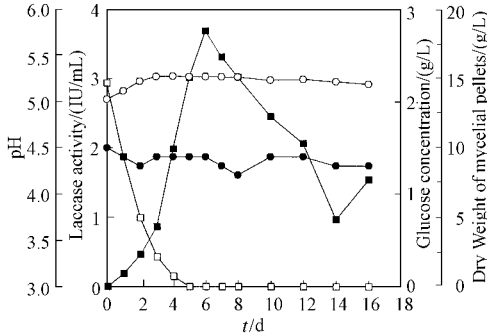


图 1 一个典型的间歇培养产生漆酶的过程
Fig.1 Time-course of laccase production with batch culture

■-■ Laccase activity; □-□ Glucose;
●-● pH; ○-○ Dry weight of mycelial pellets.

从图 2 中可以看出,泡沫固定化菌丝产酶的效果不及自絮凝菌丝球。固定化细胞在许多菌种的发酵过程中占有很大优势,如可以增加菌体密度、延长细胞寿命以及重复利用菌体等。*C. versicolor* 本身在摇瓶震荡培养中会形成菌丝球,菌丝球同样具有固定化细胞的特征。采用菌丝球生产漆酶对 *C. versicolor* 是较为经济、方便的培养方式。

2.2 影响产酶的主要因子

2.2.1 pH 对产酶的影响:图 3 是不同初始 pH 对漆酶产生的影响。从图中可以发现,初始 pH 为 4.5 时产酶效果最好。

2.2.2 微量元素对于产酶的影响:实验中发现微量元素浓度提高到 10 倍以后,对酶活力提高有比较明显的作用,而微量元素浓度提高到 30 倍和 50 倍时,与加入 1 倍浓度微量元素产酶结果相差不大。

2.2.3 添加藜芦醇对产酶的影响:在培养液中添加了 0.5mmol/L 的藜芦醇,8d 以后取样,发现添加了藜芦醇的培养液呈浅黄色,而且藜芦醇浓度越高,颜色也越深。添加藜芦醇对于 *C. versicolor* 产漆酶有一定的促进作用。当藜芦醇的浓度达到 5mmol/L 时,漆酶产量可提高 30.8%,这与 Kawai 等人^[7]的结果不同,而与丁少军等人^[8]的研究结果相一致。

在培养过程中,pH 值基本稳定在 4.5 左右,培养液始终保持清澈。通过显微镜观察,菌丝球在外观上也没有散落、自溶现象,这说明重复利用菌丝球是完全可行的。葡萄糖的耗尽与漆酶活力迅速增大的时间相近。

据张朝晖等报道^[6],对剪切力敏感的另一种白腐真菌—黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)采用固定化方法培养对产酶有较明显的提高。因此,本工作对采用多孔聚酯载体固定化菌丝产酶与自絮凝菌丝球产酶情况进行了比较,结果见图 2。

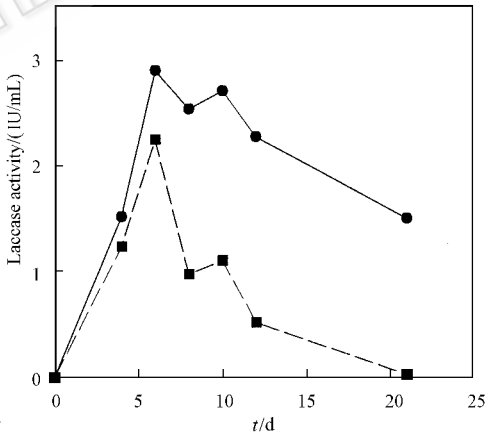


图 2 多孔载体固定菌丝与菌丝球产酶的对比 (初始菌量均为 15g/L 左右)

Fig.2 Comparison of laccase production using porous support with using self-flocculent mycelial pellets
●-● Mycelial pellets;
■-■ Immobilized mycelia.

2.2.4 Tween 80 对产酶的影响 :Tween 80 作为一种常用的表面活性剂,可以促进许多胞外酶的产量。但本研究的结果表明,Tween 80 对 *C. versicolor* 产漆酶并无明显的促进作用,反而产生了一定的抑制作用。

2.2.5 不同菌球量的影响 :从图 4 可以看出,菌球的接入量有一最佳范围,即 12.5g/L(干重)左右。菌球量再提高,可能由于受到摇瓶内氧供应的限制,漆酶活力反而有所下降。

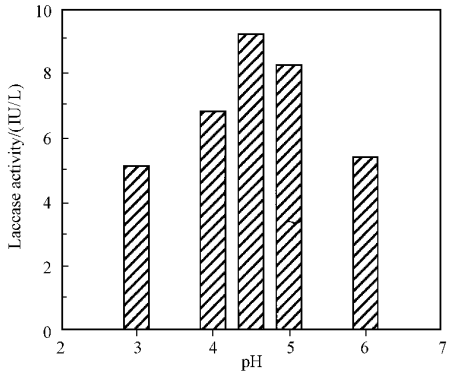


图 3 初始 pH 对产酶的影响

Fig.3 Effect of initial pH on laccase production

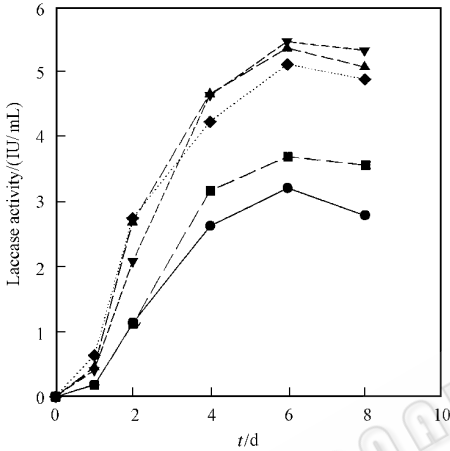


图 4 菌球量对产酶的影响

Fig.4 Effect of pellet amount on laccase production

●-●5g/L ; ■-■7.5g/L ; ▲-▲10g/L ;
▼-▼12.5g/L ◆-◆15g/L

2.4 粗酶液对染料的脱色研究

2.4.1 酸性橙溶液的脱色试验

采用菌丝球培养得到的粗酶液对酸性橙进行了降解研究。图 5 是一个典型的酸性橙降解从紫外至可见光范围内的吸收光谱图,在可见光范围内,酸性橙在 484nm 处有一最大吸收峰,也就是其中偶氮键的吸收峰。反应的 pH 为 5.0,温度为 60℃,初始酶活力为 3.3IU/mL,酸性橙浓度为 500mg/L。随着反应的进行,该峰越变越

2.3 重复分批培养

表 1 是摇瓶中的重复分批培养产酶的结果。*C. versicolor* 菌丝球的重复利用率很高,在重复间歇培养产酶过程中,漆酶活力保持相对稳定,自凝絮细胞性能稳定,可重复利用 14 批。这种方法不但省去了接种、菌丝球形成所需的时间,产酶时间明显缩短,而且不易染菌,充分显示了经济、高效的优越性。

采用间歇培养来获得漆酶在实际应用中存在着周期长、成本高等问题。利用已形成的菌丝球进行重复分批式产酶试验可以省去液体菌种的培养时间和消耗,对于简化产酶工艺,提高生产效率等均具有重要的指导意义。

表 1 重复分批培养试验结果

Table 1 The results of repeated batch processes using *C. versicolor* pellets

Batch	Laccase (IU/mL)	Laccase productivity (IU/L·d)	End pH of each batch	Time-course of laccase production/d
1	5.36	0.68	5.4	6
2	4.82	0.66	5.3	6
3	4.35	0.56	5.3	6
4	2.98	0.50	5.5	5
5	4.52	0.57	5.5	6
6	3.91	0.60	5.6	5
7	6.89	1.02	5.8	5
8	5.40	0.81	5.6	5
9	6.02	0.92	5.4	5
10	5.05	0.76	5.6	5
11	11.67	2.11	6.8	4
12	12.25	2.74	7.2	3
13	12.67	3.01	7.5	3
14	8.21	2.84	7.8	2

小,直至基本消失。按照理论吸光值计算,经过 24h 左右的降解,脱色率达到 98.5%。

2.4.2 印染废水的脱色 本试验所用的印染废水取处杭州丝绸印染厂染色车间,主要含两种染料:卡布龙红 37mg/L 和弱酸大红 20mg/L,另外还含有较高浓度的无机盐离子。

酶液的初始活力为 2.6IU/mL,脱色结果见图 6。*C. versicolor* 所产的漆酶粗酶液对印染废水具有较好的脱色效果,经过 4h 的降解脱色率就达到 60.8%,经过 24h 左右的反应,脱色率达到 93%,印染废水在 526nm 处的偶氮键的吸收峰,已基本消失。另外,紫外区内的几处峰形、峰值也有明显变化。这都表明印染废水中的染料被降解了。

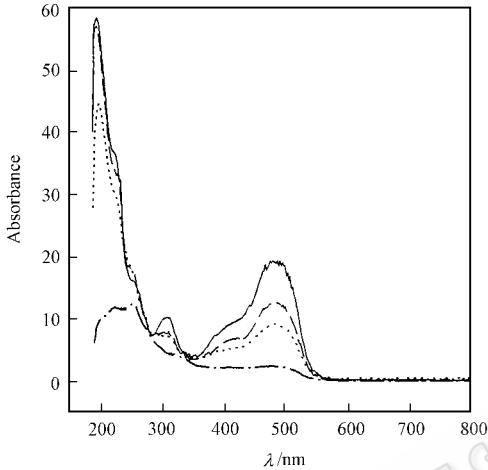


图 5 酸性橙降解过程的吸收光谱图

Fig.5 Spectrum of acid orange solution degradation time-course
—0h; - - 4h;8h; - - - 24h.

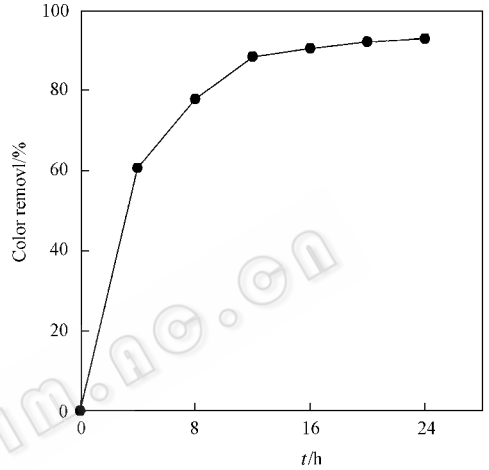


图 6 漆酶酶液脱色印染废水的进程

Fig.6 Time-course of dyeing waste water decolorization

在工业废水中,印染废水由于其水量大,色度深,污染物不易降解等问题,在净化处理上难度很大,目前也没有很好的工业化处理方法。本研究的结果表明,由 *C. versicolor* 产生的漆酶制剂在印染工业废水治理中具有巨大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Crecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo M D. *Biotech Bioeng*, 1995 **48** 585 ~ 591.
- [2] Kawai S, Umezawa T, Higuchi T. *Arch Biochem Biophys*, 1988 **262** 99 ~ 110.
- [3] Lundquist K, Kristersson P. *Biochem J*, 1985 **229** 277 ~ 279.
- [4] Miller G L. *Ana Chem*, 1959 **3** 426 ~ 428.
- [5] Evans S. *FEMS Microb Lett*, 1985 **27** 339 ~ 343.
- [6] 张朝晖, 夏黎明, 柯世省, 等. 高校化学工程学报, 1999, **13** (2) :135 ~ 140.
- [7] Kawai Y, Umezawa T, Higuchi T. *Arch Biochem Biophys*, 1988 **262** 99 ~ 110.
- [8] 丁少军, 王传槐. 纤维素科学技术, 1994, **2** (2) 36 ~ 46.

Decolorization of Dyestuff and Dying Waste Water by Laccase Solution with Self-flocculent Mycelial Pellets of *Coriolus versicolor*

Wu Mianbin Xia Liming

(Department of Chemical and Biochemical Engineering , Zhejiang University , Hangzhou 310027 , China)

Abstract : Both laccase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* and decolorization of dyestuff and dying waste water with crude solution of laccase were studied in this work . Laccase production meets the definition of secondary metabolism . For laccase production the optimum initial pH is 4.5 . Addition of veratryl alcohol or elevated trace metals could both enhance the laccase activity , while Tween80 showed some inhibition . The immobilized mycelia of *C. versicolor* in polyurethane foam had less laccase production ability than mycelial pellets . A repeated batch cultivation process was found to be a very economical way for laccase harvest . The same pellets could be used for at least 14 times and average laccase activity of each batch could maintain 6.72 IU/mL . This method reduces the enzyme production course , medium consumption and the possibility of contamination , showing high efficient and great economic benefit . Good results were also obtained in decolorization experiments with the crude solution of laccase . With 3.3IU/mL initial laccase activity , color removal of Acid Orange reached 98.5% after 24h reaction . Also with 2.6IU/mL initial laccase activity , color removal of dying waste water reached 93% after 24h reaction .

Key words : laccase , *Coriolus versicolor* , Self-flocculent mycelial pellets , Repeated batch process

* Project Granded by National Natural Science Fundation of China(29976038)

(上接《微生物学报》投稿须知)

图书 [4] Sambrook J ,Frisch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual .2nded. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.4.39~4.50.

[5] 董志扬 ,张树政 ,方宣钧 ,等.海藻糖的生物合成及抗逆机理.见 :华 珞等.核农学研究进展.北京 :中国农业科技出版社 ,1996.115~120.

[6] Peijnenburg A ,Venema G ,Bron S. Structural plasmid stability in *Bacillus stbtilis* .In :Butler L O ,et al. Genetic Transformation and Expression. UK :Interecept Limited ,1989.221~229.

6 稿件修改

凡退作者修改的稿件 ,作者必须认真修改 ,微机打字。1 个月内将修改稿、待修稿和软盘一并寄回编辑部。两次退修仍不符合发排要求者 ,一律按退稿处理 ;无特殊情况超过两个月寄回本部的 ,一律作新稿处理。

7 其它

对采用的稿件 编辑部有权进行必要的删改和加工。凡经审查同意刊登的稿件 ,一律酌收版面费。文章发表后酌致稿酬 ,并赠送单行本 30 份。

来稿请寄 :100080 北京海淀区中关村 中国科学院微生物研究所内《微生物学报》编辑部

电 话 010-62630422 E-mail :actamicro@sun.im.ac.cn ;gesg@sun.im.ac.cn