

文章编号:1000-5641(2009)02-0072-06

## 白腐真菌产木质素降解酶及固定化载体研究

高尚<sup>1</sup>, 陈诚<sup>1</sup>, 陶芳<sup>1</sup>, 戴兴春<sup>1</sup>, 黄民生<sup>1</sup>, 施华宏<sup>1</sup>, 王国华<sup>2</sup>

(1. 华东师范大学资源与环境科学学院, 上海 200062;

2. 上海市市政工程设计研究总院研究所, 上海 200092)

**摘要:** 从四种白腐真菌中优选出最适产酶菌株黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*), 并对其在不同载体的附着及产酶情况进行了相关研究. 试验结果表明, 白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的锰过氧化物酶 (MnP) 及木质素过氧化物酶 (LiP) 活性最高分别可达 225.67 U/L、110.35 U/L, 较其它三种菌株要高; *Phanerochaete chrysosporium* 对尼龙纤维、厨用金刚砂尼龙、纤维海绵、玉米芯及海绵有较好的附着能力, 但以厨用金刚砂尼龙、纤维海绵和玉米芯为最佳, 而以玉米芯为载体所产生的 MnP 和 LiP 活性为最高, 分别可达 244.94 U/L 和 263.71 U/L, 较未加载体的酶活有所提高且持续时间较长. 实验优选出白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium*, 且其以玉米芯为载体时所产 MnP 及 LiP 活性为最高.

**关键词:** 白腐真菌; 黄孢原毛平革菌; 固定化; 载体

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A

### Ligninolytic enzymes production in white rot fungi and the usage of immobilized carriers

GAO Shang<sup>1</sup>, CHEN Cheng<sup>1</sup>, TAO Fang<sup>1</sup>, DAI Xing-chun<sup>1</sup>,  
HUANG Min-sheng<sup>1</sup>, SHI Hua-hong<sup>1</sup>, WANG Guo-hua<sup>2</sup>

(1. School of Resource and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. Shanghai Municipal Engineering Design Institute, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** The adherence performance and enzymes-producing of four species of white rot fungi to different support materials were studied. The results indicated that the MnP and LiP of *Phanerochaete chrysosporium* were higher than the other white rot fungi, with the maximum activities up to 225.67 U/L, 110.35 U/L respectively. It could adhere well to the surfaces of nylon fibre, carborundum nylon, fibre sponge, corn cob and sponge. But the carriers of carborundum nylon, fibre sponge and corn cob were better than other carriers. The enzyme activity of the corn cob is higher and sustains longer. The peak activities of MnP and Lip were 244.94 U/L and 263.71 U/L, respectively.

**Key words:** white rot fungi; *Phanerochaete chrysosporium*; immobilization; carrier

收稿日期:2008-02

基金项目:国家科技部 863 计划项目(2006AA06Z331)

第一作者:高尚,男,博士研究生. E-mail:Lofty0210033@163.com.

通讯作者:黄民生,教授,研究方向为废水生物处理工艺技术. E-mail:mshuang@des.ecnu.edu.cn.

## 0 引言

白腐真菌(white rot fungi)是一类能够降解木质素的丝状真菌,因其对多种难降解物具有强大的降解功能而倍受人们关注.近年来,不断有学者将其应用于环境领域中,挖掘其在去除难降解污染物方面的巨大潜能.区别于一般的细菌系统,白腐真菌对于污染物的降解,主要依靠其胞外的过氧化物酶(木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP))的催化.目前,利用不同的生物反应器<sup>[1-3]</sup>对各种难降解物进行降解已成为国内外研究的热点,而在反应器的设计和运行中,白腐真菌菌体的附着及固定化技术成为白腐真菌应用的关键,它将为菌体的良好生长和正常工作、控制生物量在反应器中的分布以及实现反应器的连续运行提供保障.且细胞固定化技术在废水生物处理领域的研究及应用,正成为高效的新兴技术的开发热点之一,固定化微生物则具有更强的降解有毒化合物的能力<sup>[4]</sup>,处理难降解有机废水有一定的优越性.因此,研究白腐真菌的产酶及其在不同载体上的附着和生长性能具有很重要的意义.

国内外学者研究发现,多孔陶瓷、聚氨酯泡沫和烧结玻璃<sup>[5-7]</sup>等物质可作为黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)优良的固定化载体.本文选取了几种常见的载体且含有农业废弃物,比较研究了菌体对不同载体的附着性能,同时考察了其产酶能力,旨在为实现白腐真菌酶制剂的经济、高效生产提供一定的技术依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

*P. chrysosporium* 由本实验室提供保存.先接种至 PDA 固体培养基斜面上,37 ℃培养 7 d 后,放入 4 ℃冰箱中保存,每月转接一次.其余 3 种白腐真菌分别为紫芝、韩芝和云芝,均购自于上海市农业科学研究院,接种和保存方法同 *P. chrysosporium*.

### 1.2 培养基

固体培养基采用 PDA 培养基(L<sup>-1</sup>):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g, 维生素 B<sub>1</sub> 0.01 g, 琼脂 20 g, pH 6.5~7.0.

限氮培养基参照文献[8],限氮培养基(L<sup>-1</sup>):葡萄糖 10 g,酒石酸铵 0.2 g,苯甲醇 0.54 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.56 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.71 g, 维生素 B<sub>1</sub> 0.001 g, 微量元素液 70 mL, 10 mmol/L 醋酸缓冲液调节 pH 至 4.5. 微量元素液(L<sup>-1</sup>):氨基乙酸 0.6 g, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 1 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CoCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.19 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.56 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.1 g, KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.01 g, HBO<sub>3</sub> 0.01 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01 g.

### 1.3 实验过程与条件

选择紫芝、韩芝、云芝及 *P. chrysosporium* 4 种白腐真菌,在限氮培养条件开展摇瓶产酶实验(温度为 37 ℃,起始 pH 4.5,装液量 250 mL/500 mL,接种量 1.3 × 10<sup>6</sup> 个孢子/mL,转速为 140 r/min),跟踪监测 LiP 和 MnP 活性的动态变化情况,通过比较实验结果,优化筛选出高产 LiP 和 MnP 的白腐真菌菌种.以上述研究结果为基础,在限氮、摇瓶培养条件下(同上),选择 5 种不同的多孔载体(尼龙纤维、厨用金刚砂尼龙、纤维海绵、玉米芯和海绵,尺寸均为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm,每个摇瓶投加 10 个载体)并高温高压灭菌 20 min,投加当天记为第 0 d,跟踪监测 20 d LiP 和 MnP 的活性,考察并分析不同载体对产酶的影响.

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 木素过氧化物酶

根据 Tien M<sup>[8]</sup> 等人研究方法,于1 mL培养液含2 mmol·L<sup>-1</sup>的藜芦醇,50 mmol·L<sup>-1</sup>的酒石酸(pH 2.5),加入0.4 mmol·L<sup>-1</sup>的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,30℃下反应1 min,测310 nm处吸光值的变化.反应以每分钟形成1 μmol藜芦醛为一个酶活力单位.藜芦醛的摩尔吸光系数为300 mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

### 1.4.2 锰过氧化物酶

根据 Kuwahara M<sup>[9]</sup> 等人研究方法,于1 mL反应液含25 mmol·L<sup>-1</sup>乳酸锂,0.01%苯酚红,100 mol·L<sup>-1</sup>的MnSO<sub>4</sub>,0.1%白蛋白,50 mmol·L<sup>-1</sup>的酒石酸缓冲液(pH 4.5),加入100 mol·L<sup>-1</sup>的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,30℃下反应5 min,用1滴1 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH溶液中止反应.以不加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的反应液作空白,测定在610 nm处的吸光值.定义吸光值每升高0.001为一个酶活力单位.

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种优化筛选

限氮、摇瓶条件下4种白腐真菌于培养4~6 d时MnP和LiP活性达到最大,并分别于9~11 d停止产酶(见图1).而在4种白腐真菌中以*P. chrysosporium*的MnP和LiP酶活为最高,分别于3 d和4 d(均以接种时为0 d,下同)出现MnP及LiP酶活,且MnP酶活于5 d达到最大值(225.67 U/L),LiP酶活于6 d达到最大值(110.35 U/L),并分别于10 d和11 d消失.

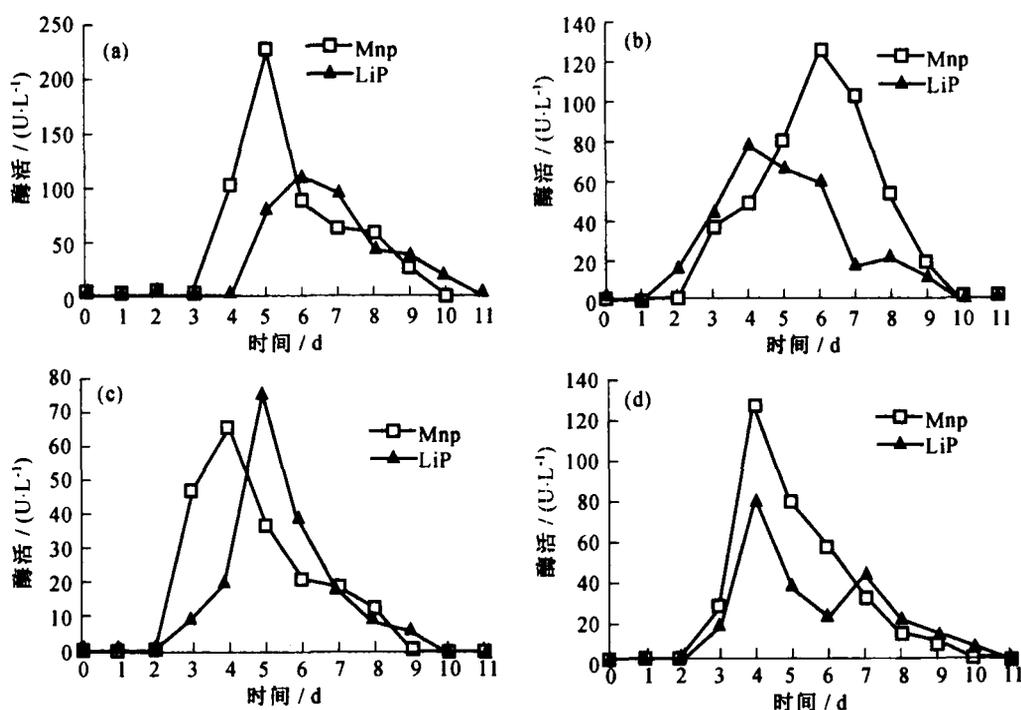


图1 限氮摇瓶培养条件下4种白腐真菌MnP, LiP活性动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of MnP and LiP of four white rot fungi under N-limited condition

注: a 黄孢原毛平革菌, b 紫芝, c 云芝, d 韩芝

而其它几种白腐真菌中以韩芝较好,它于2 d 开始出现 MnP 和 LiP 酶活,并分别于4 d 达到最大值(79.35 U/L、126.83 U/L),于10 d 和11 d 消失,但均低于 *P. chrysosporium*. 这是由于其它3种白腐真菌体内的主要酶系并不是过氧化物酶系<sup>[10-12]</sup>. 于是,在后续实验中均以 *P. chrysosporium* 为菌种深化开展后续研究.

## 2.2 白腐真菌在限氮培养基中对载体的附着性能

将等量的 *P. chrysosporium* 孢子接种到5瓶装有250 mL限氮培养基和载体的锥形瓶中,培养5 d后白腐真菌菌丝附着情况如图2所示.

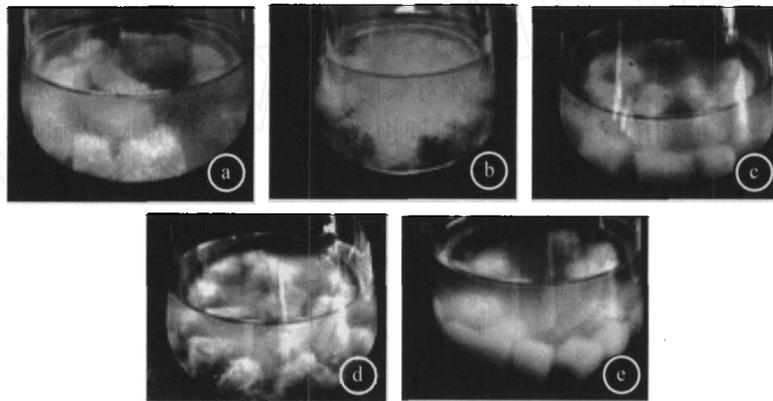


图2 限氮摇瓶培养条件下 *P. chrysosporium* 在不同载体表面的附着情况

Fig. 2 Adhesion of *P. chrysosporium* to the surfaces of different supports in N-limited liquid medium

注:a 尼龙纤维; b 厨用金刚砂尼龙; c 纤维海绵; d 玉米芯; e 海绵

*P. chrysosporium* 在不同的载体表面的附着情况有明显的差异,以厨用金刚砂尼龙(见图2b)、纤维海绵(见图2c)和玉米芯(见图2d)为最佳,其中在厨用金刚砂尼龙和玉米芯表面附着有大量的白色菌丝体,菌体以膜状(见图3b和3d)附着于载体表面且载体孔隙内均长有菌丝,而载体纤维海绵在实验开始前10天时附着较好,但由于放置于摇床中有一定剪切力至实验结束时纤维海绵已全部解体,因此并未获得20天后其附着情况图片. 在以海绵(见图2e)为载体的培养基中,出现菌丝小球,但菌丝体附着情况较差. 而在尼龙纤维(见图2a)为载体的培养基中,培养液较清但载体孔隙中附着有菌丝(见图3a),但表面并未出现菌膜. 由此可知,不同的载体对白腐真菌的生长状况与形态有一定的影响,当载体表面较粗糙且孔隙较大时,菌丝体较易附着在载体表面,且主要以菌膜(见图3b和3d)形式生长,在不易附着的载体上,则只能以菌丝球的形式生长,因此菌丝的生长附着情况与载体的孔隙及粗糙程度有关,与王灿<sup>[13]</sup>等人研究结果相一致.

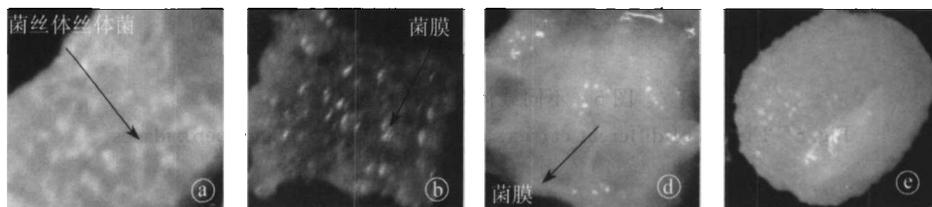


图3 20 d后 *P. chrysosporium* 在不同载体表面的附着情况

Fig. 3 Adhesion of *P. chrysosporium* to the surfaces of different supports after 20 days

注:a 尼龙纤维, b 厨用金刚砂尼龙, d 玉米芯, e 海绵

### 2.3 不同载体对产酶的影响

不同的载体对 *P. chrysosporium* 产酶有一定的影响,以玉米芯为载体获得的 MnP、LiP 酶活最高(见图 4 和 5),分别于第 11 天和第 12 天达到最大的 244.94 U/L, 263.71 U/L,较未加载体有所提高且 LiP 酶活最高时是未加载体的 2 倍以上,并且酶活持续时间较长,优于同行研究水平<sup>[14]</sup>,其原因主要是由于玉米芯不仅是白腐真菌固着生长的良好载体而且还能有效的提供一定的碳源供 *P. chrysosporium* 所利用,从而使其酶活维持在一个较高的水平且持续时间较长,像玉米芯这类植物材料,可兼作菌的固定载体和代谢底物之用<sup>[15]</sup>,在节约物料方面,具有一定的实际应用意义。

其它载体获得的酶活较玉米芯要低,但加入载体后其酶活最高出现时间会有所延迟,主要是由于加入载体后一定时间内会影响菌体对氧的利用,待 *P. chrysosporium* 在载体表面附着完全后,又能较好的利用氧且酶活能长时间内维持在一个较高的水平,届此,选择玉米芯做为 *P. chrysosporium* 的最佳载体。

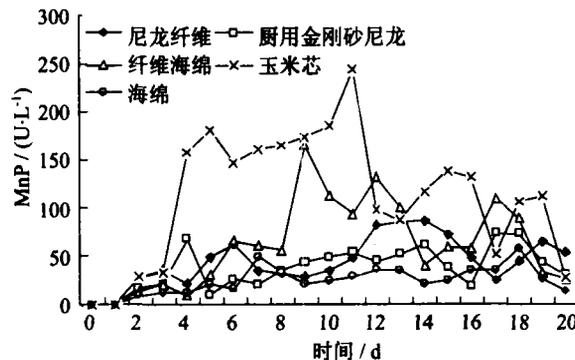


图 4 不同载体对 MnP 的影响

Fig. 4 Effects of different carriers on the activities of Mn-dependent peroxidases

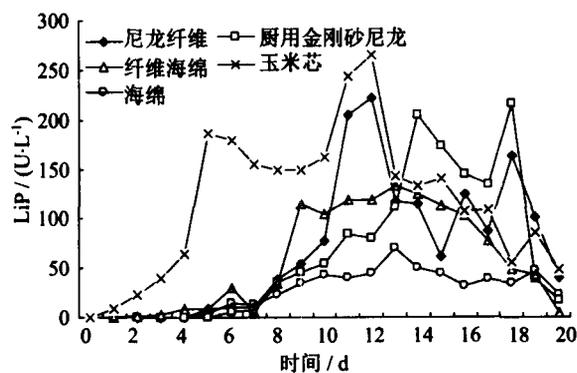


图 5 不同载体对 LiP 的影响

Fig. 5 Effects of different carriers on the activities of lignin peroxidases

## 3 结 论

(1) 白腐真菌中 *P. chrysosporium* 为产酶最佳菌株,其 MnP 和 LiP 酶活较其它菌株要高,且分别于第 5 天和第 6 天达到最大值 225.67 U/L 和 110.35 U/L。

(2) 当载体表面较粗糙且孔隙较大时,菌丝体较易附着在载体表面,且主要以菌膜形式生长,而在不易附着的载体培养基中,则只能以菌丝球的形式生长。

(3) 以玉米芯为载体获得的 MnP 和 LiP 酶活较高,分别于第11天和第13天达到最大的244.94 U/L和263.71 U/L,较未加载体有所提高且酶活持续时间较长,但其最高酶活较未加载体有所延迟。

### [参 考 文 献]

- [1] DOMINGUEZ A, RODRIGUEZ C S, SANROMAN A. Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors [J]. *Biotechnol Letters*, 2001, 23(6): 451-455.
- [2] GUIMARAES C, MATOS C, AZEREDO J, et al. The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Biotechnol Letters*, 2002, 24(10): 795-800.
- [3] 张朝晖,邵红,周晓云,等. 三相鼓泡塔生物反应器培养黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶系[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(3): 288-292.  
ZHANG Z H, SHAO H, ZHOU X Y, et al. Production of ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* in three-phase bubble column bioreactor[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2003, 9(3): 288-292.
- [4] GODJEVAGOVA T, IVANOVA D, ALEXIEVA Z, et al. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(6): 915-920.
- [5] ALLEMAN R C, LOGAN B E, GILBERTSON R L. Degradation of pentachlorophenol by fixed film of white rot fungi in rotating tube bioreactors [J]. *Water Research*, 1995, 29(1): 61-67.
- [6] ROGALSKI J, SZCZODRAK J, JANUSZ G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii* [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(3): 469-476.
- [7] VENKATADRI R, IRVINE R L. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactor system; hollow fiber reactor and silicone membrane reactor [J]. *Water Research*, 1993, 27(4): 591-596.
- [8] TIEN M, KIRK T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238-249.
- [9] KUWAHARA M, GLENN J K, MORGAN M A, et al. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *FEBS Letters*, 1984, 169(2): 247-250.
- [10] DINMER J K, PATEL N J, DHAWALE S W, et al. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 149 (1): 65-90.
- [11] SRINIVASAN C, D'SOUZA T M, BOOMINATHAN K, et al. Demonstration of Laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61, (12): 4274-4277.
- [12] 段新源,卢雪梅,王蔚,等. 黄孢原毛平革菌合成漆酶能力的研究 [J]. *山东大学学报*, 2002, 37(1): 91-94.  
DUAN X Y, LU X M, WANG W, et al. The study of Laccase production conditions of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2002, 37(1): 91-94.
- [13] 王灿,席劲瑛,胡洪营,等. 气液环境下白腐真菌在载体表面的附着性能研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(1): 53-58.  
WANG C, XI J Y, HU H Y, et al. Production of ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* to the support materials in gas and liquid phases[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(1): 53-58.
- [14] YU G C, WEN X H, QIAN Y. Production of the ligninolytic enzymes by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in an air atmosphere [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21: 323-327.
- [15] 李慧蓉,谭晓莲,凌瑞峰. 黄孢原毛平革菌细胞固定化技术的比较研究[J]. *环境科学研究*, 2001, 14(1): 41-44.  
LI H R, TAN X L, LING R F. Comparative investigation on cell-immobilization technique in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2001, 14(1): 41-44.