杏鲍菇菌渣产漆酶及其在染料脱色中的应用

张 永， 田乔鹏， 任海燕， 欧阳汀兰， 胡 琪， 管政兵， 蔡宇杰， 廖祥儒*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：以杏鲍菇菌渣为原料，探讨了其固态发酵产漆酶的条件，并对粗酶液在染料脱色中的应用进行了初步探索。结果表明，当添加质量分数4% 甘蔗渣、质量分数1.2%硝酸铵、质量分数1.0%碱木素时，杏鲍菇菌渣产酶能力最强，达到386.9 U/gds。相对于杏鲍菇菌渣初始漆酶酶活18.6 U/gds，优化后提高了20倍以上。最适条件下，发酵粗酶液在无介体存在下对甲基红、活性艳蓝K3R、酸性蓝209、活性艳蓝KNR的脱色率分别达到85.8%、85.6%、68.3%、71.2%，在添加介体的条件下活性艳蓝K3R、酸性蓝209、活性艳蓝KNR的脱色率分别达到88.8%、93.4%、89.7%。显示出杏鲍菇菌渣漆酶良好的环保应用前景。

关键词：菌渣；漆酶；发酵条件；脱色

中图分类号：Q 81　**文章编号**：1673-1689(2019)07-0116-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.016

Laccase Production by Spent Compost of *Pleurotus eryngii* and Its Application in Dye Decolorization

ZHANG Yong， *TIAN Qiaopeng*， *REN Haiyan*， *OUYANG Tinglan*， *HU Qi*，
GUAN Zhengbing， *CAI Yujie*， *LIAO Xiangru**

（Key Laboratory of Industrial Biotechnoloy，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The condition for laccase production of spent compost of Pleurotus eryngii under solid fermentation and the application in dye decolourization by crude enzyme were preliminarily investigated in this study. The results showed that，when added 4% bagasse，1.2% ammonium nitrate，1.0% alkali lignin，the spent compost displayed the strongest enzyme production capacity，reaching 386.9 U/gds. Relative to the initial laccase activity 18.9 U/gds ，the optimized condition improved by more than 20 times. Under optimal conditions，the crude enzyme solution without mediate caused 85.8%、85.6%、68.3%、71.2% decolourization for methyl red，reactive brilliant blue K3R，acid blue 209，reactive blue KNR，respectively，and 88.8%，93.4%，89.7% decolourization for reactive brilliant blue K3R，acid blue 209，reactive blue KNR when added with mediates，which means a good prospect in environmental applications of laccase from spent compost of *Pleurotus eryngii*.

Keyword：spent mushroom compost，laccase，fermentation condition，decolourisation

收稿日期：2016-03-07

基金项目：江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28)；无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310)。

* **通信作者**：廖祥儒(1964—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生化与分子生物学与发酵工程方面的研究。
E-mail：liaoxiangru@163.com

引用本文：张永，田乔鹏，任海燕，等. 杏鲍菇菌渣产漆酶及其在染料脱色中的应用[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(07)：116-121.

随着人们对动物性制品的抵制和对高蛋白食品需求的提高,食用菌产业得到了快速发展,并产生了越来越多没有得到充分利用的副产品——食用菌菌渣。2014 年食用菌产量 3 270 万 t,其中杏鲍菇产量 125 万 t,按照食用菌平均生物学效率 40% 计算,杏鲍菇菌渣超过 300 万 t[1-2]。焚烧、堆积、填埋等传统处理方式不仅会造成资源浪费也会带来环境隐患[3]。

合成染料广泛应用于纺织、造纸、印刷和化妆品行业。然而由于低效的印染工艺,大量含有染料的工业废水被直接排放到了环境中[4],由于很多染料具有生物毒性甚至致癌作用,染料废水给生态环境带来了很大隐患。目前处理工业染料废水的方法主要包括物理吸附、光降解、化学降解等方法。但需要很大的资金和技术投入且容易带来二次污染等问题[5]。生物修复的高效、不产生二次污染、费用低、应用范围广等优点,已经得到越来越多的重视[6]。

漆酶是一种含铜多酚氧化酶,对酚类及其衍生物和非酚类化合物的氧化具有良好的催化作用[7-8]。由于底物的广泛特异性,漆酶可以催化氧化工业上常用的绝大多数染料,且氧化过程的副产物只有水,因此在染料脱色和工业废水处理等领域具有广阔的应用前景[9]。

杏鲍菇属于白腐菌类,具有很强的漆酶分泌能力,但目前尚未见到利用食用菌菌渣生产漆酶并利用发酵得到的粗酶液进行染料脱色的报道。为进一步开发杏鲍菇菌渣的利用,作者研究了碳源、氮源、诱导物对杏鲍菇菌渣产酶的影响,并利用发酵粗酶液探讨了杏鲍菇漆酶在甲基红、活性艳蓝 K3R、酸性蓝 209 和活性艳蓝 KNR 脱色中的应用,旨在为杏鲍菇菌渣在染料废水的生物修复上提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 杏鲍菇菌渣和试剂 杏鲍菇菌渣:当地企业提供的采收一周内的新鲜无杂菌生长的菌渣;甘蔗渣和稻秆:市售;其他有机和无机试剂:均为国产分析纯试剂。

1.1.2 初始培养基(g/L) 酵母膏 4.0,KH_2PO4 0.8,$K_2HPO_4·7H_2O$ 0.75,$ZnSO_4·7H_2O$ 0.002,$MgSO_4·7H_2O$ 0.5,$FeSO_4·7H_2O$ 0.005,$CuSO_4·7H_2O$ 0.02,$CaCl_2·2H_2O$ 0.06,$MnSO_4·H_2O$ 0.05;pH 6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 杏鲍菇菌渣预处理 将采收后的菌渣经粉碎后过 20 目筛,收集备用。

1.2.2 固态发酵培养 称取 50 g 菌渣置于 500 mL 的培养瓶中,加入 75 mL 发酵初始培养基,在 28 ℃ 黑暗条件下培养 5 d。分别添加不同碳源(质量体积分数 1%的纤维二糖、木糖、海藻糖、甘露糖、甘露醇、半乳糖、4%甘蔗渣和 4%稻秆)、不同氮源(0.4% 的酵母膏、尿素、胰蛋白胨、牛肉膏、大豆蛋白胨、硝酸铵、硫酸铵、乙酸铵、草酸铵、钼酸铵)和诱导物(1 mmol/L 的邻苯二酚、没食子酸、香兰素、愈创木酚、对氨基苯甲酸、0.5 g 碱木素、0.5 g 钠木素和 0.5 g 木质素)至发酵初始培养基诱导杏鲍菇菌渣产漆酶。取 10 g 培养物加入 90 mL 水,在 28 ℃、200 r/min 摇床上振荡 2 h 进行混匀提取。取 1 mL 提取液在室温下 10 000 r/min 离心 5 min,得到的上清液即为粗酶液。每个样品进行 3 次重复。

1.2.3 漆酶酶活测定 以 DMP(2,6—二甲氧基酚)为底物测定漆酶活性,3 mL 反应体系中含有 10 mmol/L DMP 0.5mL,0.1 mL 粗酶液和 2.4 mL 50 mmol/L pH 值 3.0 的磷酸—柠檬酸钠缓冲液。在 469 nm (DMP 的 ε=4.96×10^4 mol/(L·cm))下测定反应液 1 min 内的吸光值变化,1min 氧化 1 μmol DMP 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。以每克干基料含有的酶活力 U/gds 表示固态发酵培养物的酶活[10]。

1.2.4 发酵粗酶液对染料的降解以及脱色率的计算 用紫外分光光度计对甲基红、活性艳蓝 K3R、酸性蓝 209 和活性艳蓝 KNR 溶液在 200~800 nm 内进行扫描确定最大吸收峰。随后将以上 4 种染料作为漆酶粗酶液降解对象,探索合适的脱色条件,包括对介体(HBT、ABTS、1-对羟基苯甲酸、丁香醛)、pH 值 (2.0~6.0 间隔 1.0) 和染料质量浓度 (300~700 mg/L 间隔 100)的选取。若无特定说明,脱色条件为:4 mL 脱色反应体系含 3.3 mL、0.1 mol/L pH 值 3.0 磷酸-柠檬酸钠缓冲液、0.1 mL 介体、0.1 mL 染料(初始质量浓度均为 400 mg/L)、0.5 mL 粗酶液 (10 U/mL),在 40 ℃条件下处理 12 h 后,测定染料最大吸收波长处的吸光度 A_t。以添加了热灭活酶液的脱色体系作为对照组,测得其吸光值 A_0。染料脱色率的计算公式:

$$脱色率=(A_0-A_t)/A_0\times100\%$$

其中,A_0为对照组吸光值;A_t为脱色t时间后溶液的吸光值[10]。

2 结果与讨论

2.1 添加物对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响

2.1.1 碳源对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响 碳源为菌株的生长以及漆酶的合成提供碳骨架和能量。以不加碳源为对照组，选择质量分数为1%的纤维二糖、木糖、海藻糖、甘露糖、甘露醇、半乳糖和质量分数4%的甘蔗渣和稻秆考察碳源对漆酶合成的影响,结果见图1。单糖类对漆酶的合成有抑制作用,甘蔗渣和稻秆均能促进漆酶产量的提高,其中加入甘蔗渣时漆酶活力最高,达73.6 U/gds。Daljit Singh Arora[11]和吴丽洁[12]等也发现甘蔗渣对白腐菌分泌漆酶有促进作用。

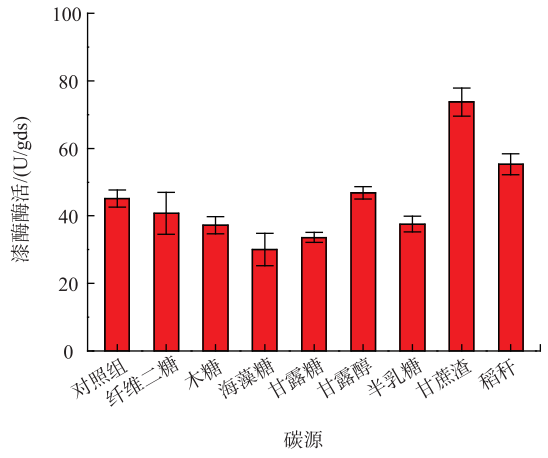


图1 碳源对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on laccase production

2.1.2 氮源对杏鲍菇菌渣合成漆酶的影响 氮源对菌体的代谢过程有显著的影响。以甘蔗渣为碳源,不加氮源为对照组,加入等质量浓度的酵母膏、尿素、胰蛋白胨、牛肉膏、大豆蛋白胨、硝酸铵、硫酸铵、乙酸铵、草酸铵、钼酸铵考察氮源对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响,结果见图2。氮源的加入对杏鲍菇菌渣有明显的促进作用。其中以硝酸铵为氮源时,杏鲍菇菌渣漆酶活力达到最高,为180.2 U/gds。说明氮源对漆酶的合成有很大的影响[13]。

2.1.3 诱导物对杏鲍菇菌渣合成漆酶的影响 许多诱导物能够促进漆酶的合成。在已优化碳氮源基础上,以不加诱导物为对照组,选择小分子诱导物如邻苯二酚、没食子酸、香兰素、愈创木酚、阿魏酸、对氨基苯甲酸和高分子诱导物如钠木素、碱木素和木质素考察各种化合物对杏鲍菇菌渣产漆酶的诱导作用,结果见图3。钠木素、碱木素和木质素对漆酶合成的诱导作用明显,其中碱木素作诱导物时酶活力达到386.9 U/gds,但此浓度下邻苯二酚和没食子酸对菌渣产漆酶没有促进作用。Munoz[14]等此前也发现碱木素对杏鲍菇发酵生产漆酶有良好的诱导作用。

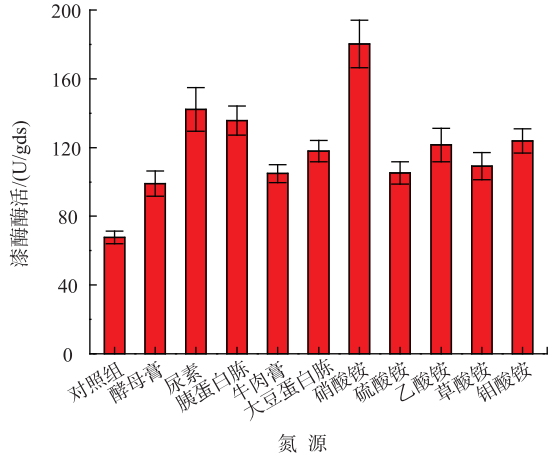


图2 氮源对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen sources on laccase production

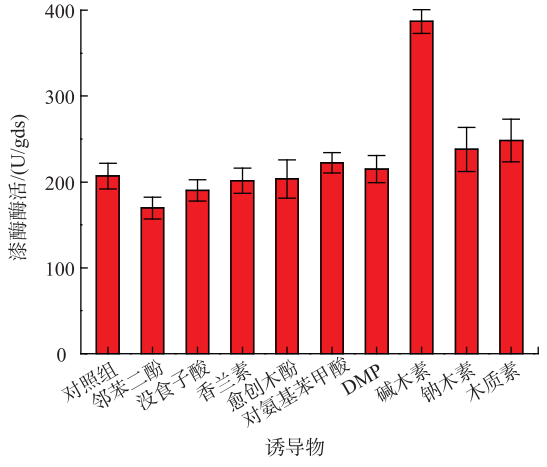


图3 诱导物对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响

Fig. 3 Effects of inducers on laccase production

2.2 漆酶粗酶液对染料的脱色降解

2.2.1 染料最大吸收波长的确定 通过全波长扫描发现,甲基红、活性艳蓝K3R、酸性蓝209和活性艳蓝KNR分别在490、607、610、589 nm处具有最大吸收波长,且重现性较好。

2.2.2 小分子介体对染料脱色的影响 加入不同

介体后测定各个染料的脱色率,以研究不同介体对染料脱色的影响,结果见图 4。HBT、ABTS、1-对羟基苯甲酸、丁香醛 4 种介体对甲基红和活性艳蓝 K3R 的降解无明显提高,而 ABTS、1-对羟基苯甲酸分别对酸性蓝 209 和活性艳蓝 KNR 的降解有很大促进作用,使二者的脱色率分别达到 80.5%和 85.0%。在无介体存在的条件下,各染料脱色率均超过 60%,其中甲基红达到 78.3%,要高于添加介体组。甲基红属于偶氮类染料,在没有介体参与的情况下很难被漆酶直接脱色,可能是因为粗酶液中含有小分子真菌代谢物充当介体的作用[15]。

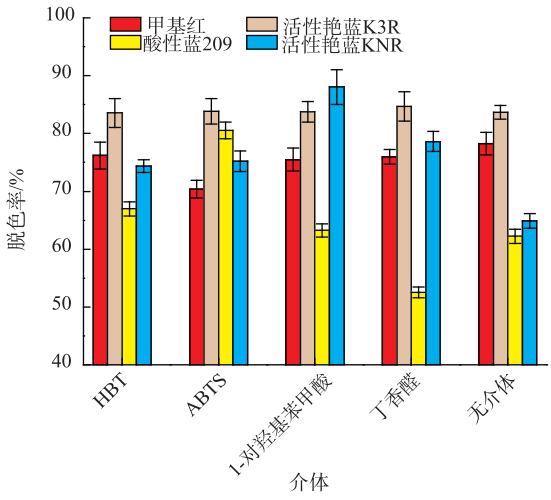


图 4　小分子介体对染料脱色的影响

Fig. 4　Effects of small molecule mediators on decolorization

2.2.3　*反应体系 pH 对染料脱色的影响*　将甲基红和添加了最适介体的活性艳蓝 K3R、酸性蓝 209 和活性艳蓝 KNR 分别置于不同 pH 值下反应,探索不同 pH 值对染料脱色的影响,结果见图 5。甲基红最适降解 pH 为 2.0,活性艳蓝 K3R、酸性蓝 209 最适降解 pH 范围分别为 2.0~4.0、2.0~3.0,此范围内染料降解率均超过 85%。而活性艳蓝 KNR 在 pH 值 2.0~6.0 范围内脱色率均超过 68%。杏鲍菇漆酶在 pH 3~10 范围内活性比较稳定[14],当 pH 超过合适范围时,脱色率有明显下降。可能是因为不同 pH 值会影响酶与染料的亲和力,从而影响脱色效果[16]。

在无介体条件下,活性艳蓝 K3R、酸性蓝209 和活性艳蓝 KNR 最适 pH 范围与介体存在的条件相同。其中活性艳蓝 K3R 在 pH 3、酸性蓝 209 在 pH 2、活性艳蓝 KNR 在 pH 4 时脱色率达到最大,分别为 82.7%、66.3%、69.6%。

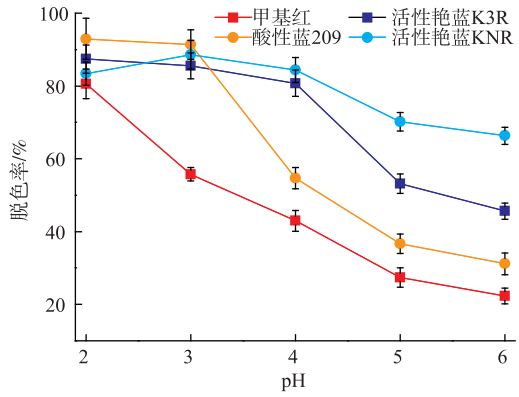


图 5　反应体系 pH 对染料脱色的影响

Fig. 5　Effects of pH of the reaction system on decolorization

2.2.4　*染料浓度对脱色的影响*　在最优条件下的反应体系中添加不同浓度的染料,测定脱色率,研究不同染料浓度对染料降解的影响,结果见图 6。4 种染料质量浓度在 300~700 mg/L 范围内的降解率均超过 80%。其中酸性蓝 209 在 300 mg/L 时降解率为 92.7%,说明在此质量浓度范围内,10 U/mL 漆酶均可以起到良好的脱色作用。

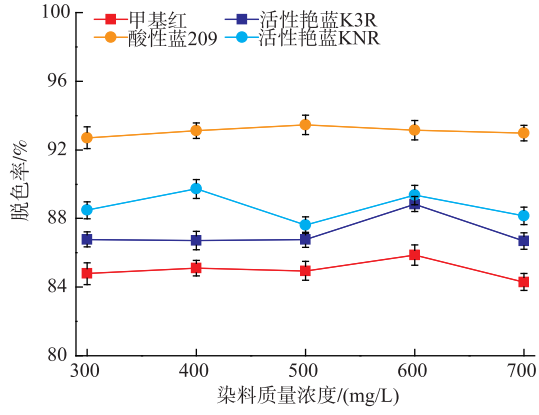


图 6　染料质量浓度对脱色影响

Fig. 6　Effects of dye concentration on decolorization

在没有添加介体存在的情况下,在 300~700 mg/L 范围内活性艳蓝 K3R 的脱色率均超过 80%,在 300 mg/L 时达到 85.6%;酸性蓝 209 和活性艳蓝 KNR 脱色率均超过 65%,其中酸性蓝 209 在 500 mg/L 时脱色率达 68.3%,活性艳蓝 KNR 在 300 mg/L 时脱色率最高,为 71.2%。

3　结　语

食用菌能够分泌木质纤维素酶,在生物修复过程中扮演着重要的角色,虽然在栽培过程中只能少

量产生,但碳源、氮源及其他诱导物可以明显影响酶的分泌[17-19]。此外,杏鲍菇在生产过程中一般只收获一茬,相对于其他菌类的栽培过程,杏鲍菇菌渣残留大量成熟的能够分泌木质纤维素酶的菌丝[20]。本实验首次以杏鲍菇菌渣发酵生产漆酶,研究了营养条件以及诱导物的加入对杏鲍菇菌渣产漆酶的影响。结果表明,甘蔗渣和硝酸铵分别作为杏鲍菇菌渣产漆酶的碳源和氮源时效果最好,最佳诱导物是碱木素。发酵粗酶液脱色实验表明,4 种小分子介体中 ABTS 对酸性蓝 209、1-对羟基苯甲酸对活性艳蓝 KNR 的脱色具有最好的促进作用。甲基红最适降解 pH 值为 2.0,活性艳蓝 K3R、酸性蓝 209 在 pH 大于 4.0 时脱色率明显下降, 活性艳蓝 KNR 在 pH 2~6 范围内受 pH 值影响较小。在合适的介体和 pH 值下,4 种染料质量浓度在 300~700 mg/L 区间范围内的降解率均超过 80%。活性艳蓝K3R、酸性蓝 209 和活性艳蓝在不添加介体的条件下脱色率均超过 65%, 其中活性艳蓝 K3R 脱色率达到 85.6%,显示出漆酶对染料废水良好的生物修复潜力。

食用菌菌渣除了对印染废水进行脱色处理,在其他生物学修复领域也有巨大潜力[3],提高菌渣漆酶含量可以有效地提高食用菌菌渣的生物修复效率。

参考文献:

[1] 耿建利. 对 2014 年度全国食用菌统计调查结果的分析 [EB/OL]. http://www.cefa.org.cn/2015/12/17/ 9168.htmL,2015-12-17/2016-02-01.

[2] WEI Zhitao,ZHOU Guoying,HU Qingxiu. Research and utilization of edible fungi residue[J]. **Edible Fungi of China**,2010,29(5):3-6,11.(in Chinese)

[3] PHAN C W,VIKINESWARY S. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2012,96:863-873.

[4] MCMULLAN G,MEEHAN C,CONNEELY A,et al. Microbial decolourization and degradation of textile dyes[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2001,56:81-87.

[5] SUN Xiao,CAI Yujie,LIAO Xiangru,et al. Laccase production under solid-state fermentation of rice straw by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 and its decolorization of synthetic dyes[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(3):240-249.(in Chinese)

[6] LI Fei,XIA Wenjing,ZANG Ling. Induction production of laccase from *Pleurotus eryngii* and dye decolorization by the laccase [J]. **Journal of Henan Agricultural Sciences**,2015,44(10):136-140.(in Chinese)

[7] LIU Wenhua,CAI Yujie,LIAO Xiangru. Study of *Trametes hirsuta* SYBC-L19 liquidstate fermentation for laccase production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(12):1252-1261.(in Chinese)

[8] PETR B. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2006,30(2):215-242.

[9] SUSANA R C,JOSE L T H. Industrial and biotechnological applications of laccases:a review [J]. **Biotechnology Advances**,2006,24:500-513.

[10] ZENG X K,CAI Y J,LIAO X R. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2011,187:517-525.

[11] DALJIT S A,PARAMJIT K G. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi[J]. **Bioresource Technology**,2001,77:89-91.

[12] WU Lijie,LIN Lianbing,CHEN Keli,et al. Effect of several inducers on laccase production of white rot fungus strain XG8[J]. **Journal of Kunming University of Science and Technology:Science and Technology**,2008,6(37):94-97.(in Chinese)

[13] STAJIC M,PERSKY L,FRIESEM D,et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleurotus species[J]. **Enzyme Microbial Technology**,2006,38:65-73.

[14] MUNOZ C,GUILLEON F,MARTINEZ A T,et al. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus*

eryngii[J]. **Current Microbiology**,1997,34:1-5.

[15] JOHANNES C,MAJCHERCZYK A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems[J]. **Appl Environ Microb**,2000,66(2):524-528.

[16] YANG Bo,FENG Lidong,ZHANG Liyuan. Decolorization of wastewater containing reactive brilliant blue dyes by laccase[J]. **Chinese Journal of Environmental Engineering**,2012,6(10):3514- 3518.(in Chinese)

[17] GADD G M. Fungi in bioremediation[M]. Cambridge:Cambridge University Press,2001:18-20.

[18] BOLLAG J M,LEONOWICZ A. Comparative studies of extracellular fungal laccases[J]. **Appl Environ Microbiol**,1984,48:849-854.

[19] VLADIMIR E,EVA K. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes[J]. **Journal of Biotechnology**,2009,144:37-42.

[20] ALMA E R E,MARIA d M J G,DANIEL J R. Improvement of yield of *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* by substrate supplementation and use of a casing overlay[J]. **Bioresource Technology**,2009,100:5270-5276.

科 技 信 息

欧盟批准一种酿酒酵母作为猪饲料添加剂

据欧盟官方公报消息,2019 年 5 月 29 日,欧盟委员会发布(EU)2019/892 号条例,批准酿酒酵母 CNCM I-1079 作为所有猪(除断奶仔猪、母猪以及所有小型猪种以外)的饲料添加剂。

根据附件中规定的条件,此种添加剂被授权作为动物营养添加剂。所属添加剂类别为“动物技术添加剂”,功能组别为“肠道菌群稳定剂”。最小用量为 1×109 CFU/kg 全价饲料,含水量 12%。授权日期至 2029 年 6 月 18 日。本条例自发布之日起第二十天生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准一种酿酒酵母作为猪饲料添加剂[EB/OL]. (2019-5-31). http://news.foodmate.net/2019/05/520623.html