

菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液对 3 种染料脱色效果的研究

王志慧, 芦光新*, 黄彩霞, 王英成, 刘炳炎, 潘宇睦, 郑文珺

青海大学, 青海 西宁

Email: 1492136345@qq.com, *lugx74@qq.com

收稿日期: 2021年2月25日; 录用日期: 2021年3月12日; 发布日期: 2021年3月30日

摘 要

为探索分离自青藏高原高寒草地产漆酶新真菌菌株 *Marasmius tricolor* 310b 对苯甲烷类、蒽醌类和偶氮类染料的脱色效果, 采用摇瓶发酵法获得漆酶粗酶液进行脱色实验。结果表明菌株 *Marasmius tricolor* 310b 漆酶发酵粗酶液都能够有效的降解溴甲酚绿(苯甲烷类)、茜素红(蒽醌类)、刚果红(偶氮类) 3 种染料, 但降解效果有所差异, 其中, 以苯甲烷类染料脱色作用最优。另发现菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液对 3 种染料的降解程度与波长和反应时间有直接关系, 随着反应时间的延长, 降解效率有不同程度提高。我们的研究初步揭示了新菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液对苯甲烷类、蒽醌类、偶氮类具有明显的脱色效果, 这一发现对于更新具有脱色效果的真菌资源库有一定的理论支持。

关键词

发酵粗酶液, 染料, 脱色, 菌株 *Marasmius tricolor* 310b

Study on Decolorization Effect of Three Dyes by Fermentation Crude Enzyme Solution of *Marasmius tricolor* 310b

Zhihui Wang, Guangxin Lu*, Caixia Huang, Yingcheng Wang, Bingyan Liu, Yumu Pan, Wenjun Zheng

Qinghai University, Xining Qinghai

Email: 1492136345@qq.com, *lugx74@qq.com

Received: Feb. 25th, 2021; accepted: Mar. 12th, 2021; published: Mar. 30th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 王志慧, 芦光新, 黄彩霞, 王英成, 刘炳炎, 潘宇睦, 郑文珺. 菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液对 3 种染料脱色效果的研究[J]. 微生物前沿, 2021, 10(1): 81-89. DOI: 10.12677/amb.2021.101010

Abstract

In order to explore the decolorization effect of a new laccase producing fungus, *Marasmius tricolor* 310b, isolated from the alpine grassland of Qinghai-Tibet Plateau on phenylmethane, anthraquinone and azo dyes, we used shaking flask fermentation method to obtain the crude laccase solution. The results showed the *Marasmius tricolor* 310b can have a good decolorization effect on the three dyes bromocresol green, alizarin red and Congo red, and the benzomethane dye had the best decolorization. In addition, we found that the degradation degree of the crude enzyme solution of *Marasmius tricolor* 310b was related to the wavelength and reaction time, and with the reaction time increases, the degradation efficiency increased to different degrees. Our study revealed that the crude enzyme solution of the new strain *Marasmius tricolor* 310b had obvious decolorization effect on phenylmethane, anthraquinones and azo. This finding provided some theoretical support for updating the fungus resource bank with decolorization effect.

Keywords

Fermentation Crude Enzyme Solution, Dye, Decolorization, *Marasmius tricolor* 310b

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

漆酶(Laccase)是一种含铜的多酚氧化酶, 漆酶广泛分布于多种植物、真菌、部分细菌和昆虫中, 在一些动物肾脏和血清中也有发现[1]。漆酶具有广泛的底物特异性, 因此漆酶可以催化氧化工业上常用的多数染料, 并不会产生有毒有害的物质, 且具有较高的稳定性, 多应用于工业染料脱色和纸浆漂白等领域[2] [3] [4] [5]。由于微生物产漆酶培养具有周期短、易繁殖等优势, 使得微生物产漆酶成为工业用途的重要来源[6]。

实现绿色发展, 加强生态文明建设, 是新时期各行业高质量发展的必然要求。漆酶本身可作为一种“绿色催化剂” [7], 其特有的性质可以被广泛应用于对染料的脱色和废水处理, 是解决污染问题的根本之策。对建设富强美丽的中国和清洁美丽的世界具有十分广阔的应用前景。本论文拟对实验前期分离筛选获得的产漆酶真菌菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵获得粗酶液, 研究用该酶液对溴甲酚绿、茜素红、刚果红等 3 种染料的脱色作用, 旨在探索和发现对染料具有脱色效果的新的真菌资源, 同时也为印染和纺织工业排放废水的生物治理技术奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 供试染料

选用溴甲酚绿、刚果红、茜素红等 3 种染料。染料的性质如下。

将表 1 的 3 种染料(溴甲酚绿、刚果红、茜素红)单独配制成终浓度为 20 mg/L 的溶液, 然后等体积混合, 摇匀、静置, 配置成混合染料溶液。

Table 1. Basic properties of 3 different dyes
表 1. 3 种染料的基本性质

序号 The serial number	染料名称 The name of the dye	英文名称 English names	分子式 Molecular formula	分子量 The molecular weight	类型 type
1	溴甲酚绿	Bromocresol Green	C ₂₁ H ₁₄ Br ₄ O ₅ S	698.01	苯甲烷类
2	茜素红	Alizarin red	C ₁₄ H ₇ NaO ₇ S·H ₂ O	360.28	蒽醌类
3	刚果红	Gongo red	C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂	696.68	偶氮类

2.2. 供试菌株

供试的菌株由本课题组从高寒草地土壤中分离筛选获得，菌株编号为：菌株 *Marasmius tricolor* 310b [8]存于 4℃ 冰箱。

2.3. 培养基

活化、复壮培养基[8]：采用 PDA 培养基进行菌株的活化和复壮。
液体产酶培养基[8]：NaNO₃ 2.5 g，KH₂PO₄ 1 g，CaCl₂·6H₂O 0.1 g，MgSO₄ 0.3 g，NaCl 0.1 g，FeCL₃ 0.01 g，油菜秸秆(粉) 0.5 g，蒸馏水 1000 mL，pH (用稀盐酸调制 6.0~7.0)。

2.4. 研究方法

2.4.1. 漆酶粗酶液的制备及酶活力检测方法

将活化的菌株分别接种于以 0.5 g 秸秆粉为底物，盛有 50 mL 液体产酶培养基 150 mL 的锥形瓶中，以不接菌为对照，每个处理重复 3 次。在 25℃ 150 r/min 条件下，置于摇床震荡培养，试验周期为 7 d。实验结束后，经尼龙丝网过滤的发酵液，用灭菌的 1000 μL 移液器枪头，吸取 2 mL 上清液，于 4℃，10,000 r/min，离心 10 min，取上清液制备粗酶液。

2.4.2. 染料脱色实验

脱色实验反应体系总体积为 20 mL，在带有刻度的试管中加入 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH = 4.5) 15 ml，再加入 5 ml 发酵粗酶液，混匀后在 30℃ 的水浴锅中预热 30 min。取出后在室温条件下放置 30 min，以灭活的粗酶液为空白对照体系。自加入 5 ml 染料溶液起开始反应并计时，分别在 2 h、24 h 和 48 h 后定时取样，采用分光光度计在 400~740 nm 范围内进行全波长扫描，测定反应体系的吸光值的变化，同时，测定各染料最大吸收波长处的吸光值，计算脱色率。脱色率(%) = (A₀ - A₁)/A₀ × 100。其中：A₀ 为染料溶液初始吸光度，A₁ 为染料溶液最终吸光度。

2.5. 数据处理及分析

所有数据均用 Microsoft Excel 录入并作图，采用 DPS 6.55 进行统计分析。

3. 结果与分析

3.1. 3 种染料的吸收峰及波长

在 340~740 nm 范围内，用分光光度计对 3 种染料溶液(终浓度为 20 mg/L)进行全波长扫描，测定不同波长的吸收峰，测定结果如下：溴甲酚绿有 3 个峰值(图 1)，分别是 405 nm、570 nm、620 nm；茜素红有 3 个峰值(图 2)，分别是 405 nm、485 nm、530 nm；刚果红有 2 个峰值(图 3)，分别是 405 nm、485 nm。

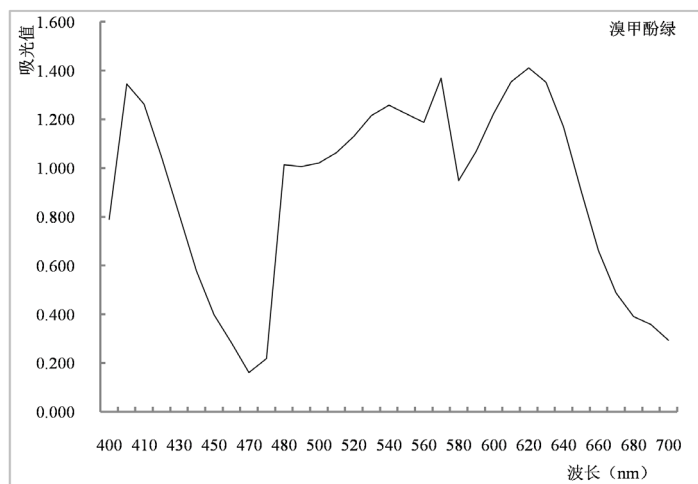


Figure 1. The wavelength of bromocresol green

图 1. 溴甲酚绿的波长

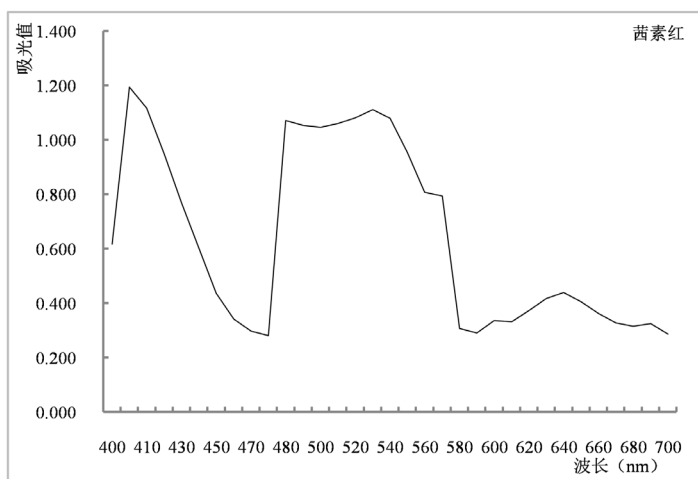


Figure 2. The wavelength of alizarin red

图 2. 茜素红的波长

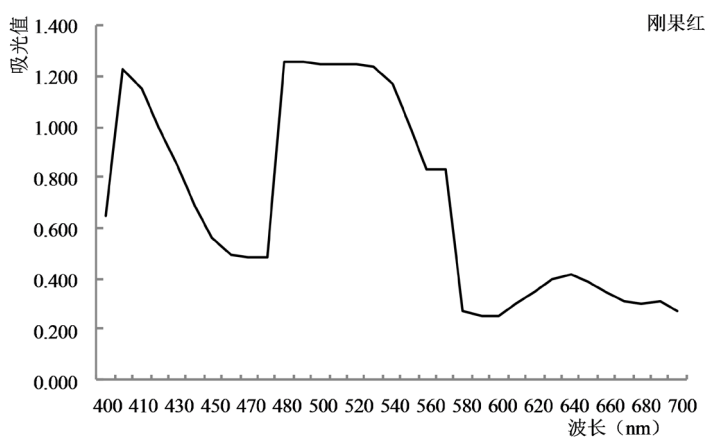


Figure 3. The wavelength of Congo red

图 3. 刚果红的波长

3.2. 对 3 种不同染料的脱色效果

对溴甲酚绿的脱色实验结果表明, 与对照相比, 加入发酵粗酶液后吸光值下降, 说明漆酶发酵液具有一定的脱色作用。但在不同波长范围内, 吸光值变化与反应时间有关(图 4(b)), 400~475 nm 和 475~580 nm 范围内, 在反应 2 h 后, 染料的吸光值明显下降, 590~700 nm 范围内, 与反应 2 小时的吸光值相比, 24 h 后吸光值下降明显, 说明目标菌株漆酶粗酶液对染料的脱色与波长有关, 400~475 nm 和 475~580 nm 范围内, 脱色所需的时间较短, 而在 590~700 nm 范围内脱色所需的时间较长。对溴甲酚绿的三个吸收峰吸光值的测定结果来看, 3 个吸收峰(405 nm、570 nm 和 620 nm)均有一定程度的降解(图 4(a)), 在 405 nm 处 2 h、24 h、48 h 后的降解率分别是 10%、12.1%、17.5%; 在 570 nm 处 2 h、24 h、48 h 后的降解率分别是 13.2%、11.3%、17.5%; 在 620 nm 处 2 h、24 h、48 h 后的降解率分别是 20%、27.55%、32.1%。由此可见, 在 620 nm 吸收峰的降解效果最好, 并且 48 h 后脱色效果较好。

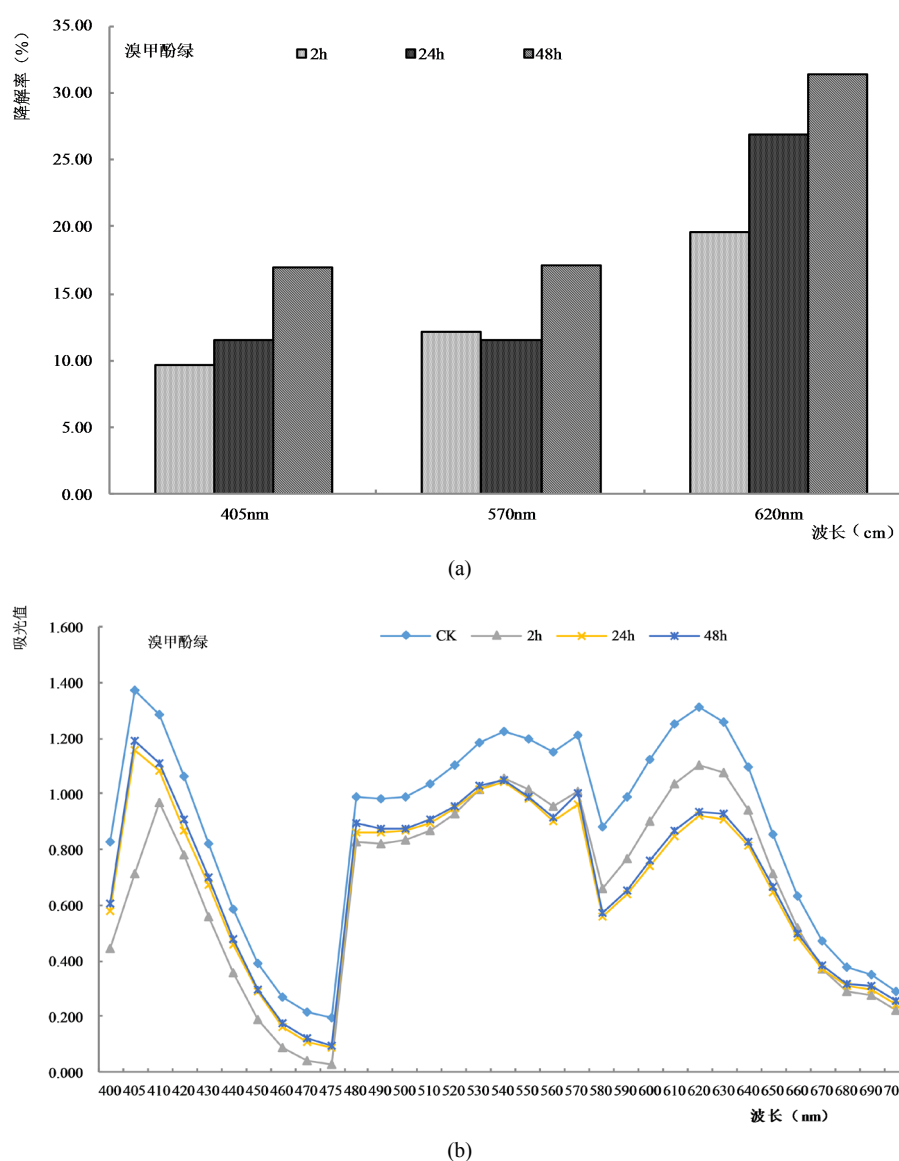
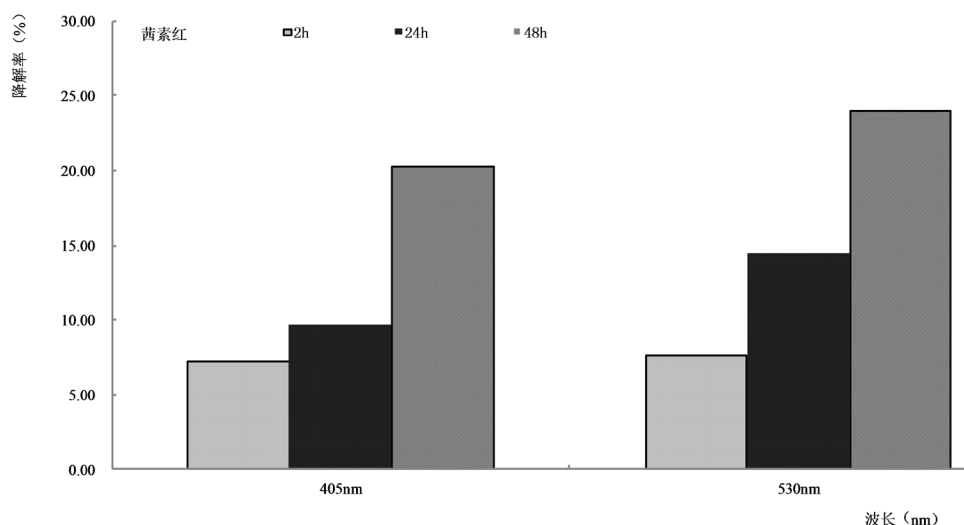


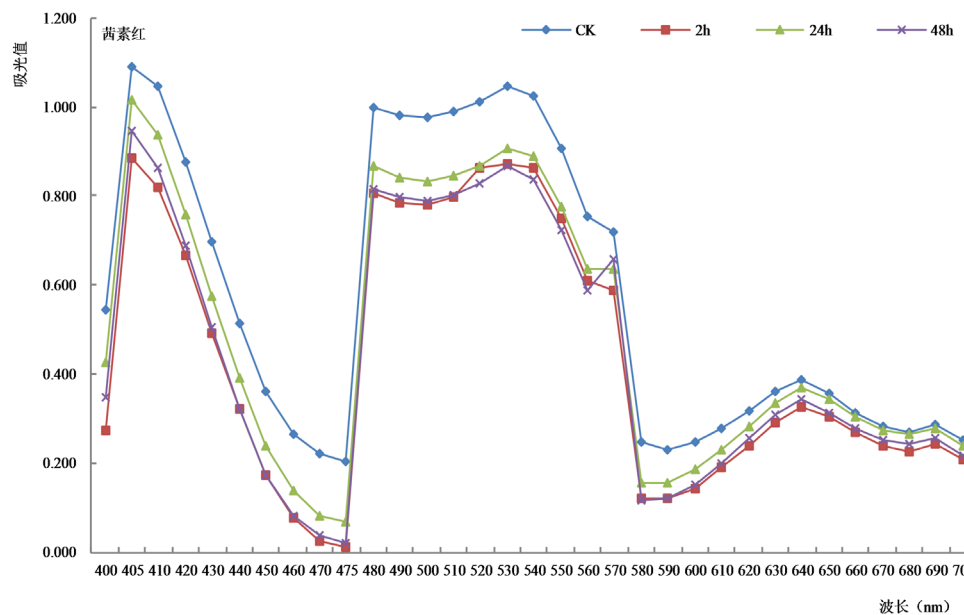
Figure 4. Decolorization efficiency of bromocresol green

图 4. 溴甲酚绿脱色效率

对茜素红的脱色实验结果表明, 与对照相比, 400~475 nm、475~580 nm 以及 590~700 nm 范围内, 反应 2 h 后, 染料的吸光值明显下降(图 5(b)). 说明目标菌株漆酶粗酶液在 2 h 内可以达到对茜素红的脱色效果。对茜素红的三个波长范围而言, 其中有两个波长即 405 nm、530 nm 降解效果较好(图 5(a)), 在 405 nm 处 2 h、24 h、48 h 后的降解率分别是 7.5%、9.8%、19.5%; 在 530 nm 处 2 h、24 h、48 h 后的降解率分别是 7.5%、14.3%、22.3%, 由此可见, 在 405 nm 和 530 nm 的吸收峰的降解效果较好, 且 48 h 后脱色效果较好。



(a)

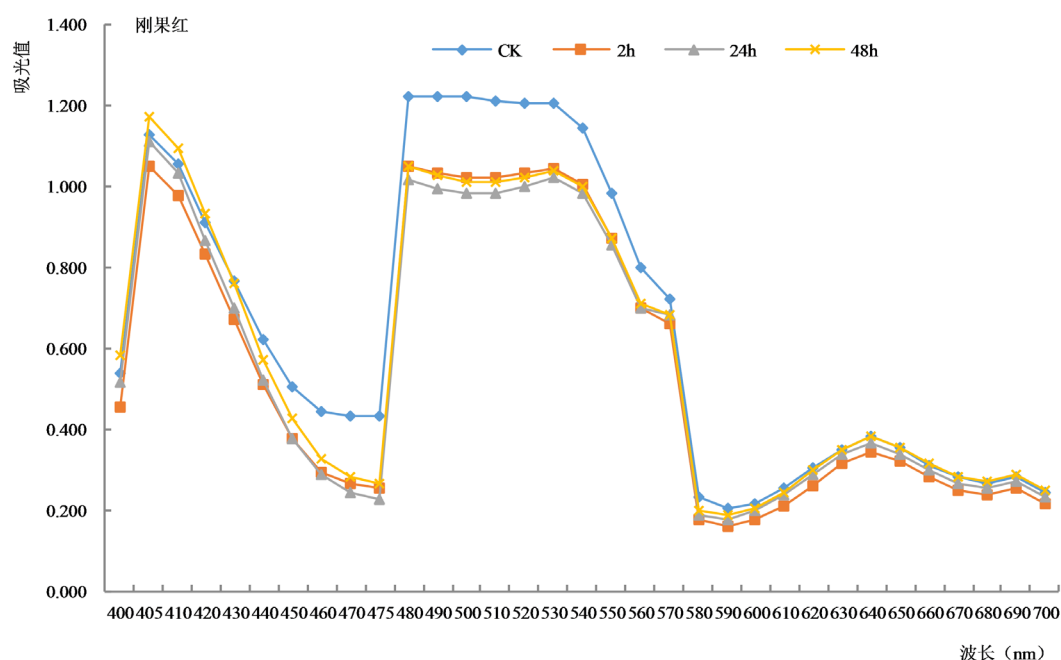


(b)

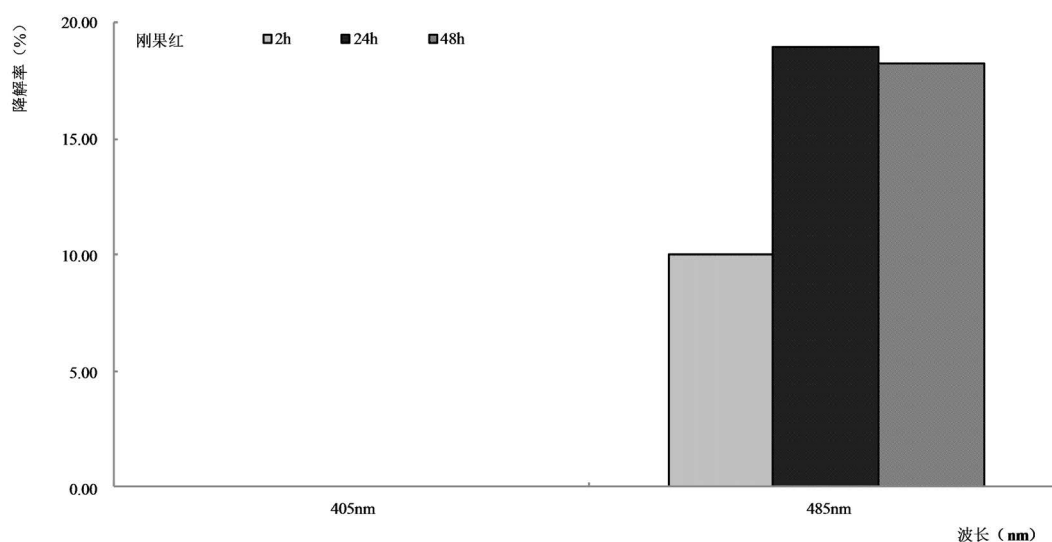
Figure 5. Decolorization efficiency of alizarin red
图 5. 茜素红的脱色效率

对刚果红的脱色实验结果表明, 与对照相比, 400~580 nm 范围内, 反应 2 h 就可以脱色, 590~700 nm 范围内, 脱色效果不明显(图 6(a)). 对刚果红的三个吸收峰而言, 其中有 1 个波长即 485 nm 降解效果较

好, 2 h、24 h、48h 后的降解率分别是 9.8%、18.5%、17%, 在 24 h 时脱色效果好, 其余两个吸收峰的降解率不明显(图 6(b))。



(a)



(b)

Figure 6. Decolorization efficiency of Congo red

图 6. 刚果红的脱色效率

3.3. 混合染料的降解效果

混合染料在 400~740 nm 范围内进行全波长扫描, 测定反应体系的吸光值。结果表明(图 7), 与对照相比, 在反应 2 h 后, 混合染料的吸光值下降, 说明漆酶酶液对混合染料具有脱色作用, 但随着时间延长, 脱色效果没有表现出明显的差异。

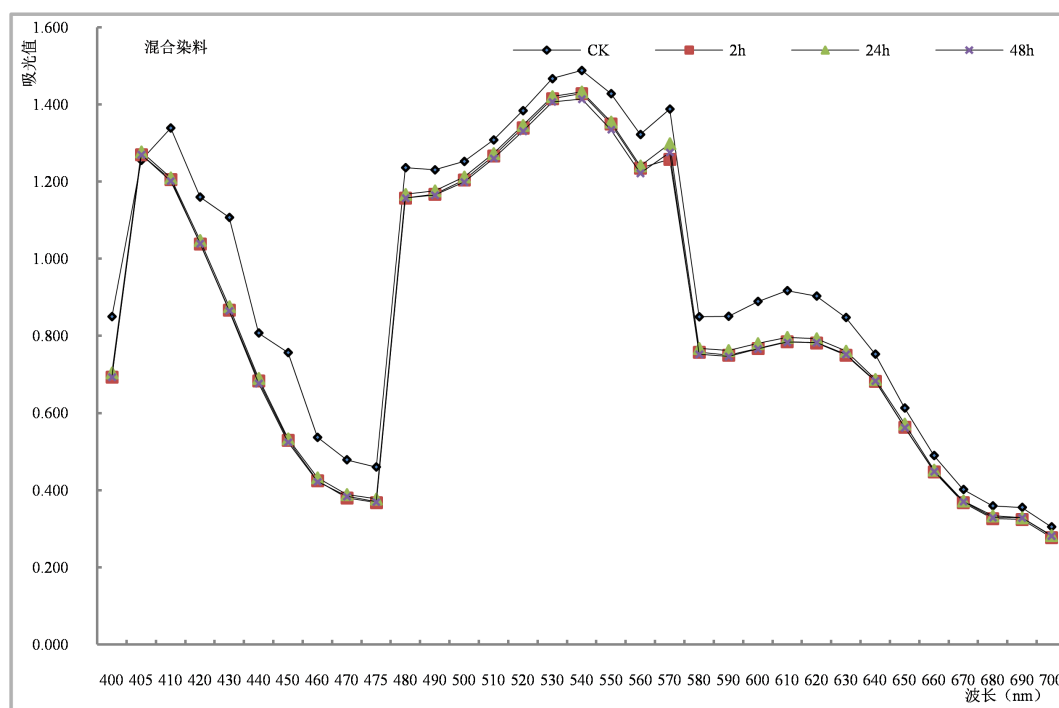


Figure 7. Degradation of mixed fuel
图 7. 混合染料的降解作用

4. 讨论

本研究通过检测粗酶液与不同染料溶液在不同反应时间吸光度值的变化，定量分析了漆酶粗酶液对不同染料及混合染料溶液的脱色效果。结果表明菌株 *Marasmius tricolor* 310b 漆酶发酵粗酶液都能够有效的降解溴甲酚绿、茜素红、刚果红以及 3 种染料的混合溶液的脱色，但降解效果有所差异，其中，对苯甲烷类染料脱色作用最好，其次是蒽醌类染料，再次为偶氮类染料。从不同染料的吸收峰的降解情况来看，菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液的底物范围较广，但对不同类型染料的不同吸收峰的降解效果不同，说明对同一类型染料中的底物具有一定的特异性。我们的研究也发现菌株 *Marasmius tricolor* 310b 发酵粗酶液对不同染料的降解程度与波长和反应时间有直接关系，随着反应时间的延长，降解效率有不同程度提高。

据报道，漆酶是一类特殊的氧化还原酶，对多种染料、木质素及其衍生物等都有良好的降解作用，现已成为微生物学等多领域的研究热点[9] [10]。以往的研究指明，漆酶所用的底物多为酚类、芳香类、多环类化合物及其衍生物，这些都具有复杂的多环结构[11]，且广泛应用于工业中。在本研究中我们使用蒽醌、偶氮、三苯甲烷类合成染料进行供试菌株对三类合成染料的脱色研究。已有的研究发现，白腐菌漆酶可以对芳香环化合物进行氧化这一特性，使得纺织染料的脱色及降解效果明显[12]。华煜[13]等人研究发现，酸性橙可以被米曲霉菌脱色，且金属离子 Mg^{2+} 对其有促进作用，随着漆酶与底物反应时间的延长，还可以降解萘环。利用漆酶具有特殊的催化特性，随着漆酶的氧化还原电势的增高，在介体的协助下，漆酶可以降解的底物范围也就越广泛，其催化反应速率和转化率也得以大幅提高[14]。Ranimol G [9] 等人使用愈创木酚为底物，在未优化的木霉中生产漆酶，发现其可以对纺织染料进行脱色。由此可见，不同真菌产漆酶对染料的降解效果与染料组成关系密切。到目前为止，利用高质量的工业化漆酶的途径较少，导致漆酶的产业化应用受到限制，在自然环境中继续寻找产漆酶的微生物资源仍然是人们努力的

方向。因此,对产漆酶真菌资源的发掘和漆酶的作用的深入研究,将对新时期印染和纺织工业排放废水处理提供新的思路。

基金项目

国家自然科学基金项目(31860103, 31770027)。

参考文献

- [1] 李欣,姚世庭,党宁,等. 漆酶生物转化酚类化合物的研究进展[J]. 微生物前沿, 2017, 6(3): 79-89.
- [2] 赵丹,那金,郭尚旭,等. *Myrothecium verrucaria* NF-08 产漆酶条件的响应面法优化及粗酶染料脱色研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(7): 2586-2593.
- [3] 吴怡,马鸿飞,曹永佳,等. 白腐真菌落叶松锈迷孔菌产漆酶液体培养基的优化及其对染料的脱色作用[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 45-59.
- [4] 张永,田乔鹏,任海燕,欧阳汀兰,胡琪,管政兵,蔡宇杰,廖祥儒. 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(7): 116-121.
- [5] 孙荣,刘建民,任明,等. 产漆酶菌株分离及发酵条件优化[J]. 生物技术, 2020(3): 280-284.
- [6] 徐鑫,张国庆,胡渤海,等. 真菌漆酶及其介体系统: 来源、机理与应用[J]. 生物技术进展, 2020, 10(1): 30-39.
- [7] 刘宁,贾慧,申琤,等. 真菌漆酶: 多样的生物学功能及复杂的天然底物[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(2): 333-341.
- [8] 李欣,芦光新,姚世庭,等. 高寒草地土壤产漆酶真菌的筛选及分子鉴定[J]. 草地学报, 2019, 27(1): 211-218.
- [9] Ranimol, G., Venugopal, T., Gopalakrishnan, S., *et al.* (2018) Production of Laccase from *Trichoderma harzianum* and Its Application in Dye Decolourisation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **16**, 400-404. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.003>
- [10] 任红艳,张瑞琴,张婷婷,等. 食用菌漆酶的提取与应用技术研究进展[J]. 中国食用菌, 2018, 37(6): 8-14.
- [11] Lettera, V., Pezzella, C., Cicatiello, P., *et al.* (2016) Efficient Immobilization of a Fungal Laccase and Its Exploitation in Fruit Juice Clarification. *Food Chemistry*, **196**, 1272-1278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.074>
- [12] 潘澄,茆婷,吴宇澄,等. 产漆酶真菌筛选及其对 PAHs 污染土壤修复的初步研究[J]. 土壤学报, 2011, 48(6): 125-1259.
- [13] 华煜,程耕,王营茹. 漆酶催化偶氮染料酸性橙脱色的研究[J]. 现代化工, 2020, 40(7): 183-186.
- [14] 张泽雄,刘红艳,邢贺,等. 漆酶可降解底物种类的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 97-102.