

藜芦醇和吐温 80 对白腐菌产木质素降解酶的影响 及在偶氮染料脱色中的作用

黄 荣* 汤必奎 张晓宾 何月梅

(安徽大学生命科学学院生物技术系,合肥 230039)

摘 要 担子菌 PM2 在限氮液体培养下,分泌木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶,藜芦醇、吐温 80 的补充,提高了该菌锰过氧化物酶的产生,获得的最大锰过氧化物酶 Mnp 酶活为 254.2u/L、190.2 u/L,分别是对照的 3.4 倍和 2.5 倍。选择三种偶氮染料,在染料体系下,进一步分析藜芦醇、吐温 80 对担子菌 PM2 产过氧化物酶及染料脱色的影响。结果表明,担子菌 PM2 分泌的锰过氧化物酶 Mnp 与染料脱色有关,脱色程度受其分子结构特征影响,吐温 80 的补充,更有利于染料的脱色降解,48h 后三种染料均可达到 80% 以上的脱色率。

关键词 藜芦醇,吐温 80,木质素过氧化物酶,锰过氧化物酶,偶氮染料,脱色率

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)02-0302-04

白腐菌是一类丝状真菌,它对难降解的污染物具有广谱降解作用,尤其是能降解多环芳香烃类和毒性较大的有机污染物,包括不同结构的多种染料^[1,2,3]。白腐菌在一些主要营养物(碳、氮、硫)受到限制时产生木质素降解酶系,包括木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, Lip)、锰过氧化物酶(Mn-dependent peroxidase, Mnp)和漆酶(Laccase)。Lip 和 Mnp 是木素降解酶系中起主要作用的两种过氧化物酶,它们是在白腐菌次生代谢过程中合成且被分泌到胞外,经 H₂O₂ 引发一系列自由基链反应,依靠氧化还原反应对染料进行脱色、降解和矿化^[4,5]。

担子菌 PM2 是一种具有木质素降解能力的白腐菌,在限氮液体培养下,分泌 Lip 和 Mnp。本研究通过藜芦醇、吐温 80 的补充,提高其过氧化物酶的产生;并在含染料体系下,进一步考察藜芦醇、吐温 80 对担子菌 PM2 产木质素降解酶及染料脱色的影响,旨在分析与确定染料脱色的关键因子,使其能在染料废水治理的实际应用中更好地发挥作用。由于释放到环境中的 80% 是偶氮染料^[1,4],且色多、结构复杂,因而以其为例进行研究。

1 材料与方 法

1.1 菌种

担子菌 PM2(多孔菌科 Polyporaceae)由本室分离、保存。

1.2 培养基

斜面培养基(/L):葡萄糖 20g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄·7H₂O

1.5g, VB₁ 2~10mg, 马铃薯 20g, 琼脂 20g, pH 自然。

限氮培养基(/L):葡萄糖 10.0g, 酒石酸铵 0.2g, KH₂PO₄ 2.0g, CaCl₂ 0.1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, BI 微量元素溶液 70mL, 0.1g/L VB₁ 10mL, 0.1mol/L 乳酸缓冲液(pH4.2)100mL。

BI 微量元素溶液(/L):MgSO₄·7H₂O 3g, MnSO₄·H₂O 0.5g, NaCl 1.0g, FeSO₄·7H₂O 0.1g, CoCl₂·6H₂O 0.185g, CaCl₂ 0.08g, ZnSO₄·7H₂O 0.18g, CuSO₄·5H₂O 0.1g, AlK(SO₄)·12H₂O 0.01g, H₃BO₃ 0.01g, NaMoO₄·2H₂O 0.012g, 氨基乙酸 1.5g。

1.3 菌体培养

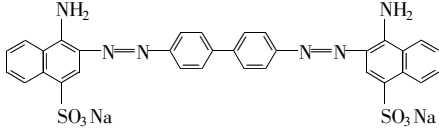
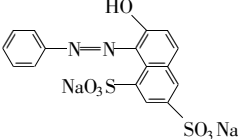
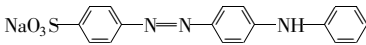
担子菌 PM2 接种于斜面培养基上,28℃、培养 3~4d,用无菌水洗净三角烧瓶中,匀浆器打匀成碎菌丝片段,分别吸取 5mL 等分到装有 95mL 的限氮培养液、补充藜芦醇(终浓度为 1.5mmol/L)和补充吐温 80(1% V/V)的限氮培养液烧瓶中,28℃、150r/min 摇床振荡培养,形成大小一致的菌丝球。

1.4 染料及脱色率的测定

刚果红、金橙 G 和橙黄 IV(购自上海试剂三厂),见表 1,分别用蒸馏水配成 0.5g/L 的染料溶液。在菌丝摇床培养 72h 时的摇瓶中取出部分上清液,然后分别加入 3 种偶氮染料(每瓶 3 个重复),使染料终浓度为 50mg/L,取出上清液离心,测 Lip 和 Mnp 酶活。每隔 24h 后,再次取培养液上清离心,测 Lip 和 Mnp 酶活,并分别在第 4、5、6 天测定脱色率。脱色率(%)=(A₀-A)×100/A₀

(注:A₀不接菌的染料培养液的吸收值,A样品吸收值。)

表 1 实验中的偶氮染料
Table 1 Azo dyes in experiments

Dye	Structural formula	Molecular weight	Absorbance _{max} /nm
Congo red		696.67	506
Orange G		452.37	474
Orange IV		375.38	440

1.5 木质素降解酶活力的测定

木质素过氧化物酶 Lip 测定^[6]: 0.2mol/L 酒石酸缓冲液 (pH4.0) 1.5mL, 15mmol/L 藜芦醇 1.0mL, 粗酶液 0.4mL, 15mmol/L H₂O₂ 0.1mL 启动反应, 25℃水浴 3min, 于 310nm 测其光密度, 以 1.0mL 缓冲液代替藜芦醇作空白对照, 定义每分钟使 1 μ mol 的藜芦醇氧化成藜芦醛所需的酶量为一个酶活力单位 (u)。

锰过氧化物酶 Mnp 测定^[7]: 0.11mol/L 乳酸钠缓冲液 (pH4.5) 3.4mL, 40mmol/L MnSO₄ 0.1mL, 粗酶液 0.4mL, 1.6mmol/L H₂O₂ 0.1mL 启动反应, 25℃水浴 5min, 于 240nm 测其光密度, 以 0.1 mL 缓冲液代替 MnSO₄ 作空白对照, 定义每分钟氧化 1 μ mol Mn²⁺ 成为 Mn³⁺ 所需的酶量为一个酶活力单位 (u)。

2 结果

2.1 藜芦醇、吐温 80 对过氧化物酶产生的影响

2.1.1 不加染料: 以限氮液体培养基作对照, 补加藜芦醇或吐温 80 对担子菌 PM2 产过氧化物酶的影响见表 2。表 2 可看出, 在培养时间内, 担子菌 PM2 分泌的木质素过氧化物酶 Lip 酶活很低, 藜芦醇或吐温 80 的补充, 对 Lip 酶活大小几乎无影响, 酶活值仍很低。锰过氧化物酶 Mnp 变化明显, 在对照即限氮液体培养基中, Mnp 酶活第 5 天达到最大值 75.8 u/L, 藜芦醇的加入, 使 Mnp 酶活明显增大, 且高酶活状态延长, 第 6 天达到高峰 254.2u/L; 吐温 80 也明显提高 Mnp 酶活, 第 6 天达到最高值 190.2 u/L。因此, 藜芦醇和吐温 80 的补充, 对担子菌 PM2 产生 Mnp 能力有明显促进作用, 获得的最大 Mnp 酶活分别是对照的 3.4 倍和 2.5 倍。

2.1.2 染料体系下: 菌体培养 72h, 加入刚果红染料。酶活结果显示, 担子菌 PM2 分泌的 Lip 酶活很低, 藜芦醇或吐温 80 的补充, Lip 酶活值仍然很低, 在 12.9u/L 左右。Mnp 酶活的结果见图 1(A), 藜芦醇的加入, 诱导了高 Mnp 酶活的产生, 第 6 天达到最大值 145.5u/L, 高于对照即限氮液体培养基中的最大值 44.3u/L, 但是远低于无染料体系(表 2)的 Mnp 酶活 254.2 u/L, 可能是染料的加入, 抑制了部分 Mnp 酶的合成与分泌, 吐温 80 的补充, 也极大地提高了 Mnp 酶活, 第 6

天为 198.8u/L, 与无染料体系(表 2)的最大 Mnp 酶活 190.2 u/L 相近, 说明吐温 80 的补充对 Mnp 酶活产生的促进作用不受染料加入的影响。

表 2 担子菌 PM2 在不同的条件下所产的 Lip 和 Mnp 酶活力 (u/L)

Culture time/d	Control		Veratryl		Tween 80	
	Lip	Mnp	Lip	Mnp	Lip	Mnp
3	8.6	3.4	14.6	71.1	6.73	10.5
4	7.3	27.7	7.5	149.5	7.9	67.1
5	5.9	75.8	5.0	202.5	10.8	88.4
6	4.6	12.3	4.3	254.2	5.7	190.2
7	0.3	5.3	3.5	84.9	0	94.2

菌体培养 72h, 分别加入金橙 G 和橙黄 IV 染料。结果表明, 与刚果红同样, 藜芦醇或吐温 80 的补充, Lip 酶活值变化不大 (11.0u/L 左右), 但 Mnp 酶活变化明显。金橙 G 染料体系下, 见图 1(B), 藜芦醇的补充提高了 Mnp 酶活, 第 5 天达到最大值 120.6u/L, 补充吐温 80, 第 4 天即升到 128.0u/L, 然继续延升, 第 6 天达到最大值 235.0 u/L。橙黄 IV 染料体系下, 补充藜芦醇或吐温 80, 获得的最大 Mnp 酶活分别为 161.9u/L 和 187.1u/L, 见图 1(C)。

2.2 藜芦醇、吐温 80 对染料脱色的影响

藜芦醇、吐温 80 的补充提高了担子菌 PM2 对刚果红染料的脱色率, 见图 2(A)。在限氮培养基中, 刚果红染料 24h 脱色率为 60.6%, 48h 脱色率为 65.5%, 藜芦醇补充后, 刚果红染料 24h 脱色率达到 70.1%, 48h 脱色率为 84.7%, 吐温 80 的增加, 染料脱色率大为提高, 24h 脱色率即达到 95.4%。

图 2(B)(C) 分别为金橙 G、橙黄 IV 染料的脱色结果。金橙 G 染料脱色率较高, 限氮培养基中, 24h 的脱色率为 80.0%, 藜芦醇补充后, 24h 达到 92.4%, 吐温 80 的补充, 24h 提高为 98.5%。橙黄 IV 脱色率较低, 在限氮培养基中, 24h 为 30%, 48h 为 30.8%, 藜芦醇补充后, 24h 达到 40.0%, 48h 达到 52.4%, 吐温 80 的补充, 48h 为 82.4%。

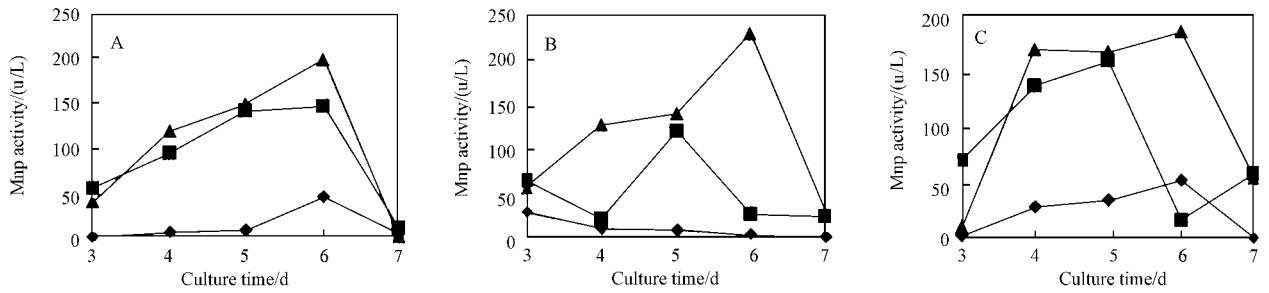


图 1 染料体系下, 补充藜芦醇或 Tween 80 对担子菌 PM2 分泌 Mnp 酶活的影响

Fig. 1 Mnp activities of basidiomycete PM2 in nitrogen-limiting medium supplemented with veratryl alcohol or Tween 80 in the presence of dye

A : Congo red ; B : Orange G ; C : Orange IV

◆ Control ; ■ Veratryl ; ▲ Tween 80

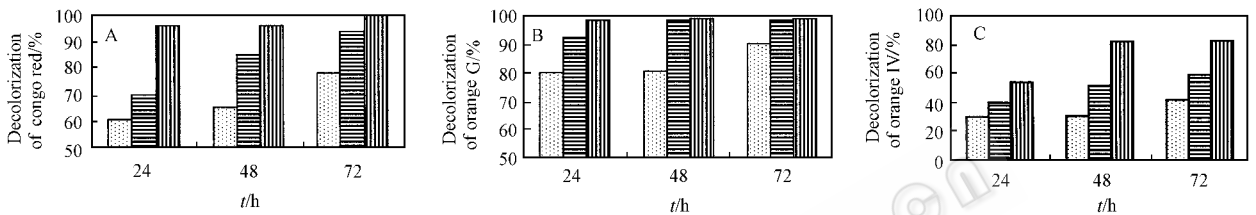


图 2 补充藜芦醇或 Tween 80 对担子菌 PM2 的染料脱色能力的影响

Fig. 2 The rates of dye decolorization of basidiomycete PM2 in nitrogen-limiting medium supplemented with veratryl alcohol or Tween 80

A : Congo red ; B : Orange G ; C : Orange IV

□ Control ; ▨ Veratryl ; ▨ Tween 80

3 讨论

Tonon and Odier^[8]和 Faison *et al.*^[9]研究表明, 藜芦醇可提高木质素降解酶活力。Arora and Gil^[10]指出藜芦醇对木质素过氧化物酶产生的影响随真菌种类和培养条件的不同而异。本实验表明, 无论是否在染料体系下, 限氮液体培养基中补充藜芦醇, 可促进担子菌 PM2 的 Mnp 产生, 尤其是在无染料体系, Mnp 酶活增加明显。实验中, 木质素过氧化物酶 Lip 活力(12u/L 左右)一直很低, 可能是担子菌 PM2 在此培养条件下产生某种物质或蛋白酶使 Lip 抑制或失活。

吐温 80 是非离子型表面活性剂, 表面活性剂的使用, 明显提高担子菌 PM2 的 Mnp 产生。尤其是在染料体系中的使用, 不仅使 Mnp 酶活很快上升, 且长时间稳定维持高酶活性状态。其机理可能是吐温 80 提高了细胞膜的渗透性^[11], 使细胞内的酶容易透过细胞膜分泌出来, 而且膜渗透性的提高也促进了化学底物进出细胞, 加强对染料的生物氧化能力; 另外, 吐温 80 的补充, 染料的溶解与吸收性能增强^[12], 促进了染料的脱色降解。本实验发现, 在限氮培养液中补充吐温 80, 增大刚果红浓度到 150mg/L, 48 至 72h 内, 脱色率仍然可达到 95%。因而, 吐温 80 更有利于染料的脱色降解。

藜芦醇、吐温 80 的补充, 增强了担子菌 PM2 对染料的脱色能力。脱色率的曲线与 Mnp 酶活一致, 而 Lip 酶活很低, 检测未发现有漆酶, 因此推测, 担子菌 PM2 分泌的锰过氧化物酶 Mnp 与染料脱色有关。然而, 结果显示, 染料脱色率的

高低并不完全取决于酶活的大小。较低的 Mnp 酶活可促发染料脱色的进行, 高 Mnp 酶活不一定能提高某种染料的脱色水平^[13, 14]。如图 2(B), 金橙 G 脱色率较高, 24h 即达到 80.0%, 但体系中 Mnp 酶活较低, 而橙黄 IV 的脱色率较低, 见图 1(C)和图 2(C), 藜芦醇的补加提高了 Mnp 酶活, 第 4 天 Mnp 酶活达到 139.1u/L, 第 5 天达 161.9u/L, 但 24h 橙黄 IV 的脱色率只有 40.0%, 48h 为 52.1%, 这种脱色程度的差异可能与染料的分子结构特征^[15, 16]有关。染料的分子结构特征包括: 染料芳环上取代基的种类、数量和位置等, 表 1 可知, 刚果红是双偶氮, 金橙 G 和橙黄 IV 是单偶氮, 都带有磺酸基团, 磺酸基团对染料的脱色降解起抑制作用, 属于难降解化合物。含萘环的染料比含苯环的染料易脱色, 金橙 G 和刚果红偶氮双键连接着一苯环和一萘环, 而橙黄 IV 偶氮双键上连有两苯环, 一苯环上又连有一苯氨基, 因此, 决定了橙黄 IV 的脱色难度加大, 金橙 G 的萘磺酸基团上连有羟基 - OH, 羟基是染料脱色促进基团, 相比之下, 可能造成金橙 G 脱色最易, 脱色率最大, 刚果红的萘磺酸上也连有脱色促进基团氨基 - NH₂, 但与金橙 G 相比, 它的双偶氮结构造成的多数取代基, 决定了它脱色相对的难度。

另外, 实验发现, 在限氮培养液中同时补充 1.5mmol/L 藜芦醇和 1% 吐温 80 两种因子, Mnp 酶活低于任一单因子的诱导, 尤其是在无染料体系下, Mnp 酶活远低于藜芦醇单因子的诱导, 但染料脱色率接近于 1% 吐温 80 的补充, 较藜芦醇高, 说明吐温 80 是促进染料脱色降解的主要影响因素。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cripps C , Bumpus JA , Aust SD. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* , 1990 **56** (4) : 1114 - 1118
- [2] Swamy J , Ramsay JA. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* , 1999 **24** : 130 - 137
- [3] Kirby N , Marchant R , McMullan G . Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters* 2000 , **188** 93 - 96
- [4] Martins MAM , Lima N , Silvestre AJD *et al* . Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere* 2003 **52** 967 - 973
- [5] Mester T , Tien M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 2000 **46** 51 - 59
- [6] Li YZ (李越中) , Gao PJ (高培基) , Wang ZN (王祖农) . Nutritional regulation of synthesis of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 1994 **34** (1) : 29 - 36
- [7] Wang CH (王彩华) , Yu HS (余惠生) , Fu SY (付时雨) . Comparison of lignocellulolytic enzyme profiles secreted by *Panus conchatus* and *Phanerochaete chrysosporium* during solid state cultures. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 1999 **39** (2) : 127 - 131
- [8] Toton F , Odier E. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* , 1988 **54** 466 - 472
- [9] Faison BD , Kirk TK , Farrell RL. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* , 1986 **52** 251 - 254
- [10] Arora DS , Gill PK. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* , 2001 **28** 602 - 605
- [11] Asther M , Corrieu G , Drapron R *et al* . Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme and Microbial Technology* , 1987 **9** 245 - 249
- [12] Acharya KR , Bhattacharya SC , Moulic SP. Effects of urea and thio-urea on the absorption and fluorescence behaviours of the dye safranine T in micellar medium. *Journal of Molecular Liquids* , 2000 **87** : 85 - 96
- [13] Moldes D , Couto SR , Cameselle C *et al* . Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. *Chemosphere* , 2003 **51** 295 - 303
- [14] Mielgo I , Lopez C , Moreira MT *et al* . Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnol Prog* 2003 **19** : 325 - 331
- [15] Du XM (杜晓明) , Liu HT (刘厚田) . Relationship between the molecular structure of azo-dyes and their biodegradability. *Environmental Chemistry* (环境化学) , 1991 **10** (6) : 12 - 18
- [16] Dai SQ (戴树桂) , Song WH (宋文华) , Zhuang YY (庄源益) *et al* . The study of quantitative structure-biodegradability relationships for azo dyes. *Environmental Chemistry* (环境化学) , 1998 **17** (2) : 115 - 119

Effects of Veratryl Alcohol and Tween 80 on Ligninase Production and Its Roles in Decolorization of Azo Dyes by White-rot Basidiomycete PM2

JIA Rong* TANG Bi-Kui ZHANG Xiao-Bin HE Yue-Mei

(Department of Biotechnology , College of Life Science , Anhui University , Hefei 230039 , China)

Abstract Basidiomycete PM2 , a lignin-degrading white rot fungus , produces lignin peroxidase (Lip) and manganese peroxidase (Mnp) in nutrient nitrogen limited liquid cultures. This fungus was selected for its ability to decolorize azo group of dyes. In order to improve production of the peroxidases and rapid dye decolorizing activity by basidiomycete PM2 , the addition of veratryl alcohol or Tween 80 to nutrient nitrogen limited liquid cultures were tested. It was found to have a large stimulatory effect on Mnp activities and decolorization rate of azo dyes. A maximum Mnp activities of 254.2u/L with veratryl alcohol and 192.2u/L with Tween 80 were achieved respectively. These values were about 3.4-fold and 2.5-fold higher than that obtained in the control cultures (without alcohol or Tween 80) , whereas the levels of Lip activity detected were very low (about 12u/L) in all the cultures. In further experiments using three kinds of azo dyes of congo red , orange G and orange IV , enzyme activities and dye decolorization were investigated in the above-mentioned cultures. The results showed that Mnp activities and decolorization were notably higher than those obtained in the control cultures in the presence of azo dyes. Cultures supplemented with Tween 80 were more adequate for dye decolorization. The rates of the decolorization with Tween 80 of congo red (95.4%) , orange G (98.5%) and orange IV (54.4%) after 24 hours of dye incubation were higher than that supplemented with veratryl alcohol. According to the results , Mnp activities secreted by basidiomycete PM2 play an essential role in the process of dye decolorization. Tween 80 was the main factor affecting the decolorization. The analysis of structure of the three kinds of azo dyes indicates that the extent of decolorization is affected by the dye molecular structure. The types and quantity of the substituted groups on the aromatic ring of azo dyes have effect on the percentage of biological decolorization.

Key words veratryl alcohol , Tween 80 , Lip , Mnp , azo dye , decolorization rate

Received : 08-07-2003

This work was supported by Grants from the Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 01043101) and the Anhui Provincial Education Committee (No. 2001KJ009) .

* Corresponding author. Tel 86-551-5107341 ; Fax 86-551-5107354 ; E-mail : jiarong@ah163.com