



青島農業大學

学士学位论文

题 目	白腐真菌对染料脱色的研究
姓 名	朱祥祥
学 号	20170205532
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术
班 级	201702
指导教师	于浩

二〇二一年五月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

白腐真菌对染料脱色的研究

摘要：纺织印染行业在生产过程中会产生大量具有高浓度染料的废水，染料属于生物难降解有机污染物会对生物和环境造成危害。与物理法和化学法相比较，微生物降解纺织染料具有低成本、高效率、生物友好性和环境兼容性等特点，是处理染料废液去除染料的有效方法之一。本实验从白腐真菌中挑选 16 种常见真菌，通过液体深层发酵后测定 Lac、MnP、LiP 酶活，并加入不同种类的染料进行降解，从中筛选出酶活高且可以高效降解不同染料的菌株。最终筛选出长根菇，白灵菇，平菇，秀珍菇，松茸粗酶液活力相对较高的菌株。对降解率较好的长根菇、秀珍菇液体深层发酵的氮源和碳源进行优化，最终确定长根菇的最优培养基是 PDB 培养基，秀珍菇的最优培养基为以蛋白胨为氮源的 BM 培养基。通过对长根菇降解的底物谱及酶谱的研究发现，长根菇能够对酸性绿 25 进行高效降解，并且分泌蛋白中存在多个染料降解酶，分子量大小分布在 KDa20~KDa35 之间。

关键词：白腐真菌；染料降解；木质素降解酶

Decolorization of dyes by white rot fungi

Abstract: Textile printing and dyeing industry will produce a large amount of wastewater with high concentration of dyes in the production process. Dyes are biological refractory organic pollutants, which can cause serious harm to the environment and human health. Compared with physical and chemical methods, microbial degradation of textile dyes has the advantages of low cost, high efficiency, bio friendliness and environmental compatibility. It is one of the effective methods to remove dyes from dye wastewater. In this experiment, 16 kinds of common fungi were selected from white rot fungi, LAC, MNP, lip enzyme activities were determined after submerged fermentation, and different kinds of dyes were added for degradation. The strains with high enzyme activity and high efficiency for degradation of different dyes were selected. Finally, the strains with relatively high crude enzyme activity were screened out, including *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus Xiuzhen* and *Tricholoma matsutake*. The nitrogen and carbon sources of submerged fermentation of *Pleurotus nebrodensis* and *Pleurotus xiuzhenensis* with high dye degradation rate were optimized. The optimal medium for *Pleurotus nebrodensis* was PDB medium, and the optimal medium for *Pleurotus xiuzhenensis* was BM medium with peptone as nitrogen source. The results showed that acid green 25 could be efficiently degraded by *Pleurotus nebrodensis*, and there were several dye degrading enzymes in the secreted protein, with molecular weight ranging from 20 to 35 kDa.

Key words: white rot fungi; Dye degradation; lignin-degrading enzyme

目 录

1 前言.....	1
2 实验材料与方法.....	2
2.1 实验材料.....	2
2.1.1 仪器.....	2
2.1.2 试剂.....	3
2.1.3 培养基.....	6
2.1.4 菌种.....	6
2.2 实验方法.....	6
2.2.1 菌种活化.....	6
2.2.1.1 平板活化.....	7
2.2.1.2 液体菌株的活化.....	7
2.2.2 酶活测定.....	7
2.2.2.1 漆酶 (Lac) 酶活的测定.....	7
2.2.2.2 锰过氧化物酶 (MnP) 活性测定.....	8
2.2.2.3 木质素过氧化物酶 (LiP) 活性测定.....	8
2.2.3 染料降解.....	9
2.2.4 培养基优化.....	9
2.2.5 底物谱制作.....	10
2.2.6 酶谱制作.....	11
3 结果与分析.....	13
3.1 筛选菌株酶活测定.....	13
3.2 16 种白腐真菌对染料的降解率.....	15
3.3 培养基筛选结果.....	17
3.3.1 长根菇培养基筛选结果.....	17
3.3.2 秀珍菇培养基筛选结果.....	21
3.4 长根菇底物谱.....	25
3.5 长根菇酶谱.....	26
展望.....	27
参考文献.....	28
致谢.....	29

1 引言

工业染料广泛应用于纺织品，食品，纸张等工业过程，通常有致癌性，致突变性，以及致畸性的特性，对环境和生物会造成巨大危害。

第一，染料的污染量巨大。众所周知，我国染料废水的排放量在污水排放量中占很大的比重，印染工业已成为严重污染生态环境的产业。约有 15%左右的染料随着废水被排入环境^[1]，这在染料的生产使用中基本是不可避免地的。从我国目前的国情来说，我国在染料和纺织的产业十分发达，而这些产业正是造成染料废水污染严重的主要源头。染料废水排放量大、治理难度高，是目前工业染料废水处理面临的棘手问题。如果继续对染料废水不加管制处理的排放到环境中，造成的污染是不可逆转的，甚至会严重影响到人类的生活以及物种多样性。

第二是作为环境污染物的染料种类多、结构复杂^[2]。染料依据发色基团的化学结构分为偶氮类、蒽醌类、三苯甲烷类、杂环类等，80%以上的染料为偶氮类、蒽醌类、三苯甲烷类染料^[3]。

第三是染料本身的毒性，染料属于有毒的难以降解难以处理的有机物，会导致生物癌变、畸形、突变，对于人类以及其他生物危害巨大^[4]。

现在主要有三种方法处理废水。物理法和化学法这两种方法^[5]在使用上花费巨大而且复杂的操作也注定这两种方法不能大力推广。而处理的过程如果不够严谨还会导致更进一步的污染。微生物法相比来说更加环保^[6]。许多细菌、丝状真菌、酵母菌以及藻类等均具有吸收和或降解纺织染料的功能^[7]。

在去除工业染料的技术里，从废水中吸附染料已被公认为是最有效的，实践证明是最实用的，且成本低，具有很高的性价比。不过，有报道称最有效的吸附剂如活性炭在吸附染料方面存在代价高昂的问题。因此，低成本的染料降解剂鼓励研究人员研究无毒，价格低廉，可生物降解，环保的生物吸附材料^[8]。

白腐真菌是最常见的生物处理研究中使用，广泛应用于微生物处理废物与环境生物技术领域。白腐真菌是一种丝状真菌的总称，这类真菌普遍具有使木料呈现白色腐烂状的特点^[9]。

白腐真菌的种类十分丰富^[10]。近来对白腐真菌的研究热度只增不减。柳学逵等利用白腐真菌去除低碳源废水中双酚 A^[11]，李兆兴等研究白腐真菌对磺酰脲类除草剂降解性能^[12]，王新等研究白腐真菌降解农药^[13]，宋自力等研究漆酶复合酶^[14]。

白腐菌可以通过生物吸附和酶降解两种方式去除污染环境中的染料^[15]。适用

范围广，能适用于大多底物，在降解时效率快但是消耗低，对于各种环境的适应性也十分优秀，在目前的废水处理应用中具有光明的前景。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.2.1 仪器

表 2.1 仪器名称

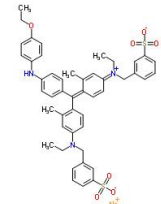
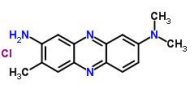
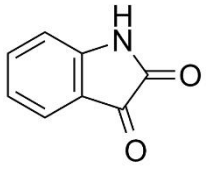
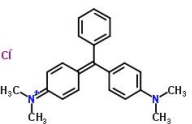

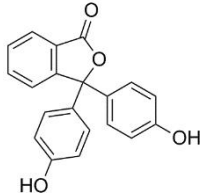
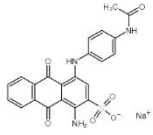
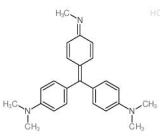
仪器名称	型号	厂家
自动蒸汽高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司
高效液相	2998 Waters	
紫外可见光谱扫描	MV2310II Techcomp	
核酸蛋白测定仪	BioPHotometer pLus Eppendorf	

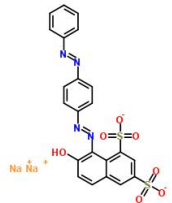
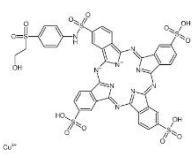
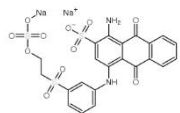
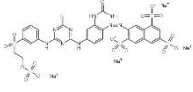
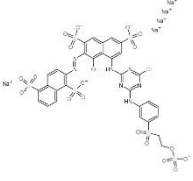
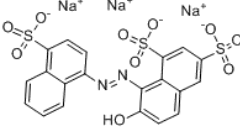
2.1.2 试剂

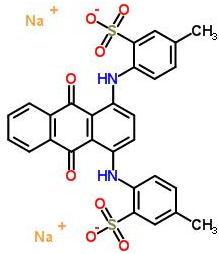
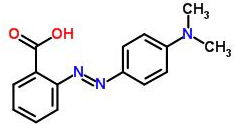
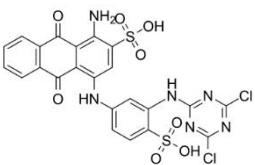
2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (ABTS)、丙二酸、丙二酸钠、藜芦醇、酒石酸、酒石酸钠、2,6-二甲氧基苯酚、FeSO₄、CuSO₄、MnSO₄、葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、KH₂PO₄、MgSO₄、琼脂、玉米浆粉、蔗糖、麦芽糖、果糖、淀粉、氯化铵。

表 2.2 实验所用染料

染料名称	分子式	分子量	结构	CAS 号
甲基橙	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ NaO ₃ S	327.33		547-58-0

考马斯亮蓝 G250	2	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S$	0	854.02		1	6104-58-
中性红		$C_{15}H_{17}CLN_4$	5	288.77			553-24-2
靛红		$C_8H_5NO_2$	1	147.13			91-56-5
孔雀石绿		$C_{23}H_{25}CLN_2$	1	364.91			569-64-2
溴酚蓝		$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	1	669.96			115-39-9
酚酞		$C_{20}H_{14}O_4$	3	318.32			77-09-8
酸性蓝-40	S	$C_{22}H_{16}N_3NaO_6$		473.434			6424-85-7
结晶紫		$C_{24}H_{28}CLN_3$		393.952		4	603-47-

酸性 红 GR	2	$C_{22}H_{14}N_4Na_2O_7S$	556.479		5413-75-2
活性 翠蓝 KNG	5	$C_{40}H_{25}CuN_9O_{14}S$	1079.55 0		12236-86- 1
活性 蓝 KNR	3	$C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S$	626.544		2580-78-1
活 性 黄 3R	5	$C_{28}H_{20}CLN_9Na_4O_{16}S$	1026.25 0		93050-80- 7
活 性 红 3B	6	$C_{31}H_{19}CLN_7Na_5O_{19}S$	1136.31 0		93050-79- 4
酸 性 红 18	3	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S$	604.47 0		2611-82- 7

酸性绿 25	2	$C_{28}H_{20}N_2Na_2O_8S$	0	622.57		1	4403-90-
甲基红		$C_{15}H_{15}N_3O_2$		269.300		7	493-52-
活性艳蓝	2	$C_{23}H_{14}Cl_2N_6O_8S$	9	637.42		4	13324-20-

2.1.3 培养基

PDB 液体培养基：土豆 200 g/L，葡萄糖 20 g/L，蒸馏水 1000 mL，pH 值自然。

将 200 g 土豆削皮洗干净，切成 1 cm^3 大小的方块，放到不锈钢盆中。加入蒸馏水，使水没过土豆。100 °C，煮 20 min，直到可以轻松用玻璃棒将土豆捻碎为止。将煮好的土豆用 8 层纱布过滤，固体丢弃。向过滤好的土豆汁中加入 20 g 葡萄糖，用蒸馏水定容至 1 L。如果配置 PDA 固体培养基需要加入 2% 的琼脂。

2.1.4 菌种

羊肚菌、猴头菇、茯苓、白灵菇、姬松茸、槐耳、田头菇、香菇、松茸、秀

珍菇、长根菇、桦褐孔菌、荷叶离褶伞、元蘑、韩国香菇、小平菇。

2.2 实验方法

2.2.1 菌种活化

2.2.1.1 平板活化:

挑去菌丝块接种于 PDA 培养基上, 每个平板接种 3~5 个菌丝块, 每种白腐真菌接种 3 个平板。将平板正放于 25℃ 培养箱培养。当菌丝长满三分之二平板时, 开始液体菌株的活化。

2.2.1.2 液体菌株的活化

无菌环境下, 用打孔器打孔后接种菌丝块于 PDB 液体培养基中 25℃ 培养, 125 r/min 的摇床中培养。将菌株活性培养 7 d 左右, 进行第二次液体菌株的活化。超净工作台中, 将 PDB 培养基和菌球一起倒入灭过菌的 50 mL 离心管中, 加入灭过菌的玻璃珠, 用力摇晃, 将菌球打碎。每种白腐真菌接种两瓶, 一瓶用于实验, 一瓶做为种子备用。将接种好的培养基放在摇床中培养一周左右。

2.2 酶活测定

对菌液上清进行酶活测定。

2.2.2.1 漆酶 (Lac) 酶活的测定

表 2.3 Lac 反应体系

溶液	体积
100 mM 丙二酸缓冲液	475 μL
0.5 mM ABTS	475 μL
待测酶液	50 μL

在 420 nm 下测定吸光值, 每隔 30 s 记录 1 次吸光值, 共 5 次, 取平均值, 计算出每分钟的吸光度变化。产物摩尔吸光系数为 36,000 mol⁻¹·L·cm⁻¹。

Lac 酶活公式: $A \cdot B \cdot 10^6 / C$

(A: 吸光值差值/36,000 B: 酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.2.2 锰过氧化物酶 (MnP) 活性测定

表 2.4 MnP 反应体系

溶液	体积
100 mM 丙二酸缓冲液	490 μ L
10 mM MnSO ₄	100 μ L
10 mM 2,6-DMP	100 μ L
待测酶液	50 μ L
水	250 μ L
10 mM H ₂ O ₂	10 μ L

468 nm 处测定吸光值，注意最后加 10 mM/LH₂O₂ 启动反应，记录反应 1~3 min 内的吸光值变化。形成的产物摩尔吸光系数(468 nm)为 49,600 moL⁻¹·L·cm⁻¹。

MnP 酶活公式: $A*B*10^6/C$

(A: 吸光值差值/49,600 B: 酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.2.3 木质素过氧化物酶活性测定

表 2.5 LiP 反应体系

溶液	体积
200 μ M 酒石酸缓冲液	490 μ L
40 mM 藜芦醇	100 μ L
待测酶液	50 μ L
水	350 μ L
10 mM H ₂ O ₂	10 μ L

在 310 nm 处测定吸光值，加入过氧化氢溶液启动反应，后迅速测定吸光度值，每分钟记录一次数据。一个单位 Lip 被定义为每分钟 1 nmoL 的藜芦醇氧化为藜芦醛。产物在 310 nm 下的摩尔吸光系数为 9,300 moL⁻¹·L·cm⁻¹。

Lac 酶活公式: $A*B*10^6/C$

(A: 吸光值差值/9,300 B: 酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.3 染料降解

经过预实验，挑选出 Lac 酶活最高的五种真菌，分别是长根菇，白灵菇，小平菇，秀珍菇，松茸。把每种真菌的菌球和培养基均匀的分成八份，每份加入不同的染料，分别是中性红，甲基橙，酸性红 18，结晶紫，溴酚蓝，活性蓝 4，酸性绿 25，活性翠蓝。这 8 种染料为不同结构染料。其他酶活较低的真菌加入酸性红 18 和活性蓝 4 进行降解。使染料的最终浓度为 50 mg/L。将加入不同结构染料的菌球和培养基放入摇床中。观察染料的降解程度。60 h 后，在各种染料的特殊吸收峰下测吸光度值。计算降解率。

2.2.4 培养基优化

表 2.6 筛选培养基配方

编号	试剂 1	试剂 2	试剂 3	试剂 4
1	葡萄糖 20 g/L	蛋白胨 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
2	葡萄糖 20 g/L	土豆 200 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
3	葡萄糖 20 g/L	酵母粉 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
4	葡萄糖 20 g/L	玉米浆 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
5	蔗糖 20 g/L	蛋白胨 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
6	麦芽糖 20 g/L	蛋白胨 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
7	果糖 20 g/L	蛋白胨 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L
8	淀粉 20 g/L	蛋白胨 6 g/L	KH ₂ PO ₄ 2 g/L	MgSO ₄ 1 g/L

注：配置好培养基后，加入 CuSO₄, MnSO₄, FeSO₄ 溶液, 终浓度为 50 μ M/L。

按照表 2.7 配方配置 8 种培养基，将 50 mL 培养基分装到 250 mL 的锥形瓶中，在 115 °C 下，灭菌 30 min，冷却至室温后，进行接种。为了保证菌丝状态的一致，接种前需要对长根菇、秀珍菇菌丝分别打碎，将菌株转移至 50 mL 离心管中，并同时加入无菌的玻璃珠，摇晃，将打碎的菌丝装到无菌的三角瓶中，按照 8% 接种量把菌液移入培养基中。每种培养基接种 5 瓶，接种完成后，放置 25 °C 摇床培养。预实验第五天菌丝生长状态好，酶活较高，所以培养 5 天后进

行后续实验，培养过程，定期检查菌株是否被污染。

待长根菇、秀珍菇生长至第 5 天时，将其全部拿出，每瓶取 6 mL 上清，9,000 r/min 离心 3 min。把上清慢慢加入到 5 个 1.5 mL 的离心管中，每个离心管加入上清 1 mL。向 4 管上清中分别加入活性蓝 KNR、酸性红 18、溴酚蓝、酸性绿 25，染料的终浓度为 50 mg/L。将 1.5 mL 的离心管横放在 25 °C，125 r/min 的摇床中。在加入染料后，30 min、1 h、2 h、4 h 各用酶标仪测一次吸光值，计算各种染料的降解率。计算公式如下： $A = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$

式中：A 为染料脱色率，A₀ 为染料标品吸光值，A₁ 为脱色液吸光值。

用最后 1 mL 上清测定 Lac、MnP 和 LiP 酶活。记录吸光值，算出酶活。

完成染料降解和酶活测定后，进行长根菇、秀珍菇菌球干重的称量。将每个 250 mL 三角瓶中的培养基和菌球全部倒出，分别用 200 目的筛网过滤，用自来水反复冲洗，把培养基和杂质冲洗干净。用吸水滤纸吸去水分。用分析天平称量干净的平板的重量并记录。将过滤后的菌球小心转移至称量过的平板中，作好编号，将平板放入 56 °C 的烘箱中烘干。在烘干过程中，经常检查菌球是否被烘干。将平板自烘箱中移出，用分析天平称量平板和菌球的总重量，记录下来。称量完将菌球再次放入烘箱中，3 h 后，再称量平板和菌球的总重量。若两次称量的数据相同，则可以确定菌球已经完全烘干，数据可靠。

2.2.5 长根菇底物谱制作

根据 Lac、MnP、LiP 的酶活高低、染料的降解效率和干重来确定最优培养基。根据表 2.3 配方大量配置最优培养基，根据 2.2.4 的方法进行接种和培养。

培养五天后，取出五瓶生长状况最好的长根菇。分别用 200 目的筛网过滤，留取上清。每瓶取 18 个 2 mL 离心管，将 1.6 mL 上清移入离心管中。用转速 9,000 r/min 的离心机室温离心 3 min。离心后，小心的将 1.5 mL 上清移入到干净的 2 mL 离心管中。加入染料。将所有 2 mL 离心管横放在摇床中。将加入染料的上清加到 96 孔板里，每个小孔点样 200 μL，用酶标仪在各种染料的特殊吸收峰下测吸光值。6 h、12 h、24 h、48 h 各测一次。

将不加染料的上清小心加入到 96 孔板中，每个小孔点样 200 μL，用酶标仪在各种染料的特殊吸收峰下测吸光值。计算染料的降解率时可以排除培养基上清自身吸光值对染料降解率的影响。

2.6 酶谱制作

用最优培养基培养长根菇、秀珍菇，待其生长至第五天，用筛网过滤得到上清。将上清移到超滤离心管中离心，离心机的转速为 9,000 r/min，离心 7 min，留上清，获得浓缩液。取 100 μ L 的浓缩液于滚水中灭活 15 min。取未灭活的浓缩液和灭活的浓缩液各 20 μ L 举行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

分离胶制作

表 2.7 分离胶配方

胶浓度	12.5%
30%聚丙烯酰胺/mL	2.5 mL
三蒸水/mL	2 mL
4X 分离胶 buffer/mL pH 8.8	1.5 mL
10%(w/v) SDS/ μ L	60 μ L
10%(w/v) APS/ μ L	30 μ L
Temed/ μ L	6 μ L
总体积/mL	6 mL

浓缩胶制作

表 2.8 浓缩胶配方

胶浓度	12.5%
30%聚丙烯酰胺/mL	0.38 mL
三蒸水/mL	1.87 mL
4X 分离胶 buffer/mL pH 6.8	0.75 mL
10%(w/v) SDS/ μ L	30 μ L
10%(w/v) APS/ μ L	15 μ L
Temed/ μ L	3 μ L
总体积/mL	3 mL

SDS-PAGE 凝胶电泳

a.胶体的配置：将玻璃板清洗干净后组装，用胶条密封，使用蒸馏水检漏，确

定密封后，按照表 2.8 的配方配置分离胶。将各种试剂迅速混匀，快速用移液枪将 4.5 mL 的液体分离胶移到两块玻璃板之间的空隙中，再加入 1 mL 蒸馏水把胶压平，等待胶凝固。在这个过程中，按照表 2.9 的配方配置浓缩胶。等分离胶凝固之后，用滤纸把蒸馏水吸干，马上将浓缩胶加入并插入样品梳。

b.电泳系统的组装：浓缩胶凝固后，缓慢拔掉样品梳，注意胶孔的大小一致。把板块取下，反装板块，小板块在内。组装完成后加入缓冲液，液面超过小板块。

c.点样：将灭活的样品与 Loading Buffer 按照 4: 1 的体积比混匀，将未灭活的样品与 25% 的甘油按照 4: 1 的体积比混匀。然后用 20 μ L 的移液枪取 20 μ L 混匀的样品缓慢精确地滴加到胶孔中，注意不要将样品溢到别的胶孔。

d.电泳：把电泳装置置于低温环境中防止样品失活，连接电源等电压恒定，并维持电压恒定，等指示剂移动至胶底时，电泳结束。

e.染色与脱色：电泳结束后，染色 0.5h，进行脱色，等到胶上出现清晰的带条时停止脱色。

f.观察：在光线充足的地方，在白色背景下对比 Marker 和条带大小，拍照记录。

3 结果与分析

3.1 筛选菌株酶活测定结果

培养 8 天，反应体系：2850 μ L 酶活试剂+150 μ L 待测酶液

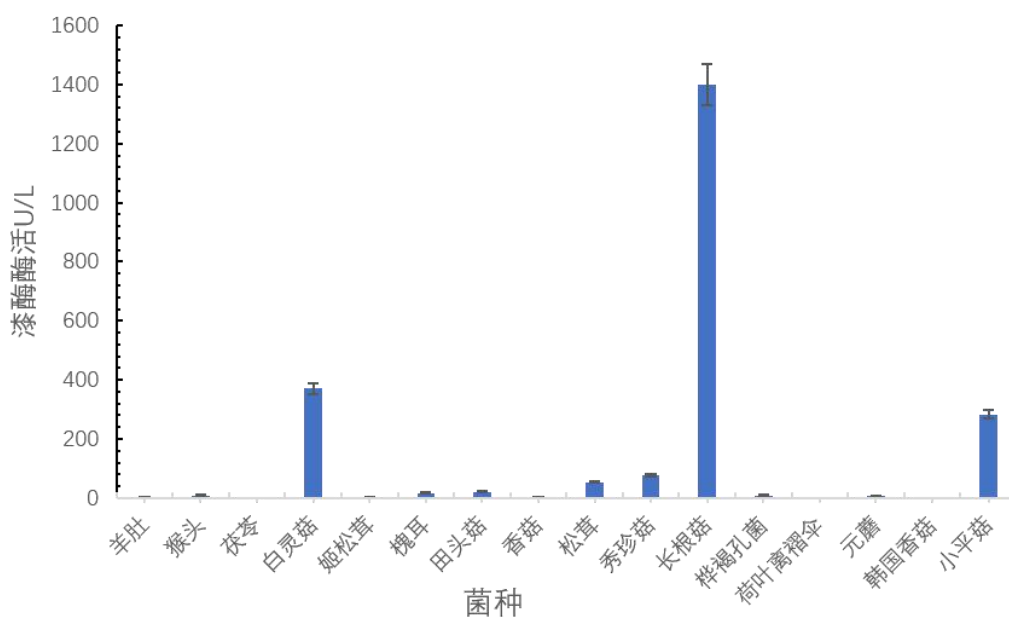


图 3.1 16 种白腐真菌的 Lac 酶活

从图 3.1 中可以看出，筛选的菌株中 Lac 酶活最高的五种真菌分别是：白灵菇、松茸、小平菇、秀珍菇、长根菇。其中 Lac 酶活性数值最高的为长根菇，数值为 1398.9 U/L，远超其他真菌。

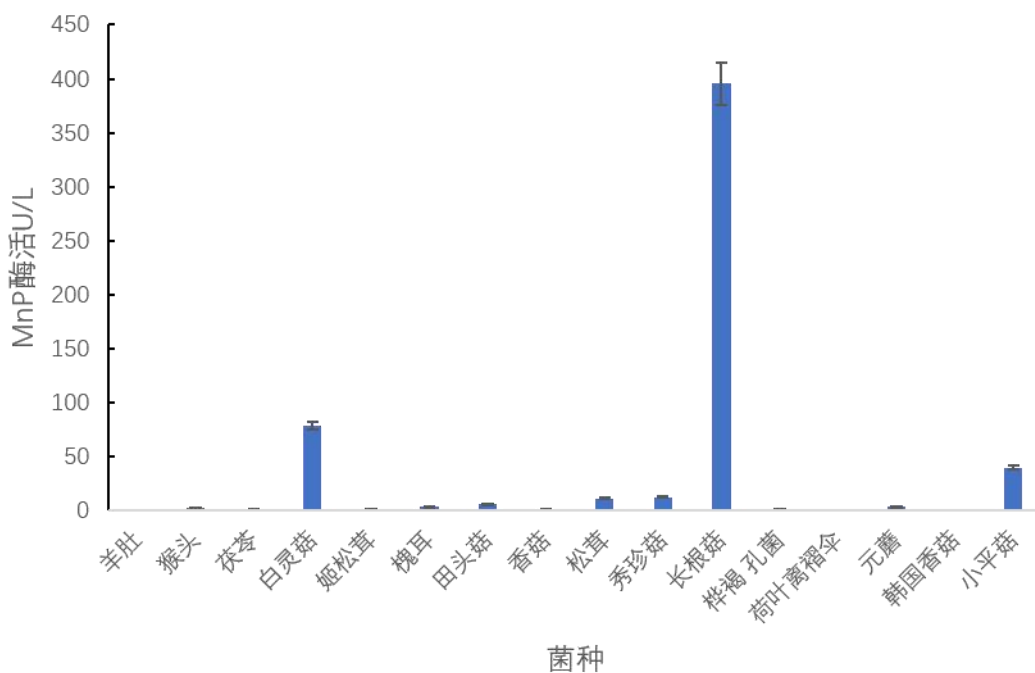


图 3.2 16 种白腐真菌的 MnP 酶活

从图 3.2 中可知，筛选菌株中 MnP 酶活最高的五种菌株分别是：白灵菇、松茸、小平菇、秀珍菇、长根菇。MnP 酶活性数值最高的为长根菇为 395.6 U/L。

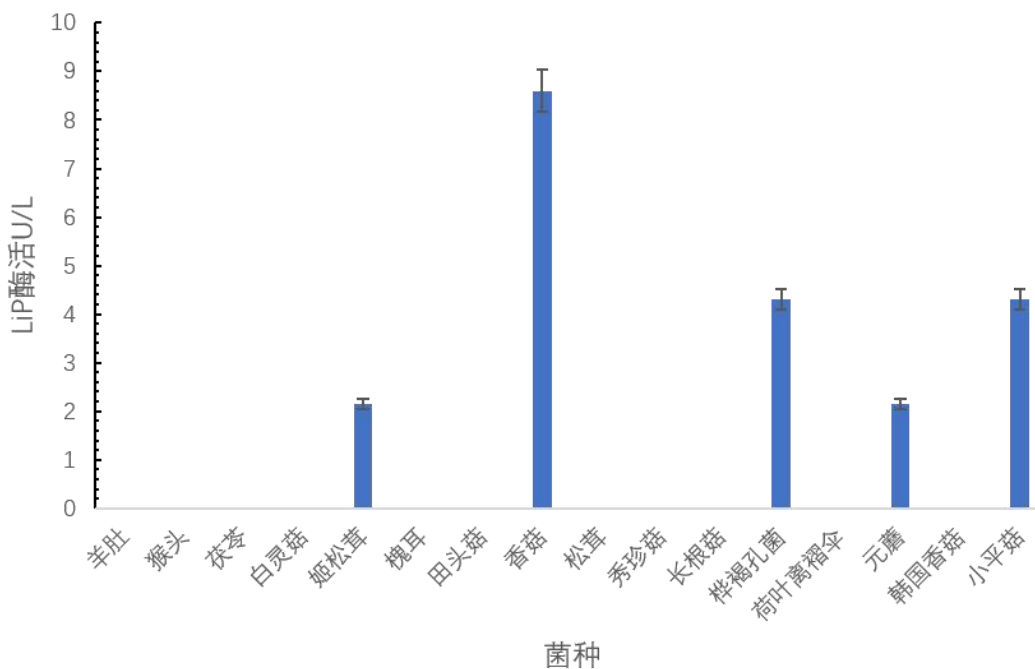


图 3.3 16 种白腐真菌的 LiP 酶活

由图 3.3 可知，筛选菌株中 LiP 的酶活都不高。LiP 酶活最高的香菇也才达到 8.6 U/L。可能是因为这些真菌本来 LiP 酶活就不高，或培养条件没有达到产生 LiP 酶的标准。

综合 Lac、MnP、LiP 三种酶活的数据来看，酶活最高的五种菌株分别是：白灵菇、松茸、小平菇、秀珍菇、长根菇。长根菇的 Lac、MnP 酶活数值都远远超过其他真菌。而其他的真菌的酶活性普遍偏低，可能原因有以下几个方面：1. 其余真菌自身的产酶能力并不强，2. 培养条件不合适，3. 需要底物的诱导。

3.2 16 种白腐真菌对染料的降解率

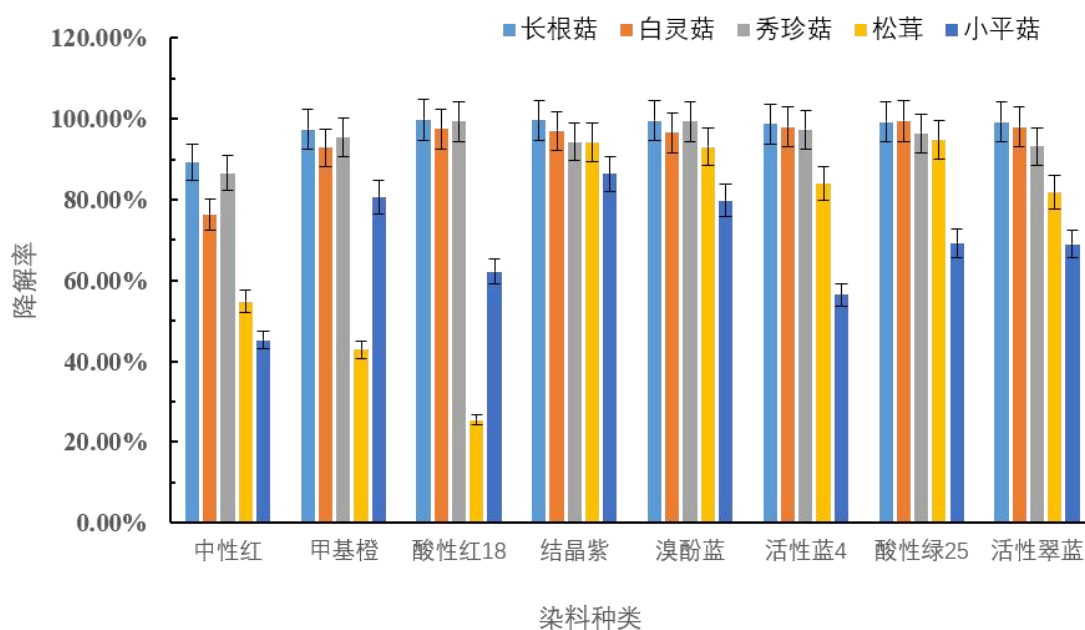


图 3.4 五种高酶活白腐真菌对 8 种染料的降解率

由图 3.4 可知长根菇对各种染料的降解率最高，松茸对 8 种染料的降解率最低。长根菇对中性红的降解率最低，达到 89%，对酸性红-18 的降解率最高，为 99.8%，长根菇对其他染料的降解率都在 97% 以上。白灵菇对中性红的降解率较低，为 76%，对酸性绿 25 的降解率最高，为 99.4%，对其余染料的降解率也都在 92% 以上。秀珍菇对中性红的降解率最低，为 86.5%，对酸性红 18 的降解率最高，99.4%，对其余染料的降解率都在 95% 左右。松茸对酸性红 18 的降解率最低，为 25.4%，对酸性绿 25 的降解率最高，为 94.7%。小平菇对对中性红的

降解率最低，为 45.3%，对结晶紫的降解率（86.3%）最高。这五种高酶活白腐真菌对中性红的降解最低，对酸性红 18、酸性绿 25 的降解最好。

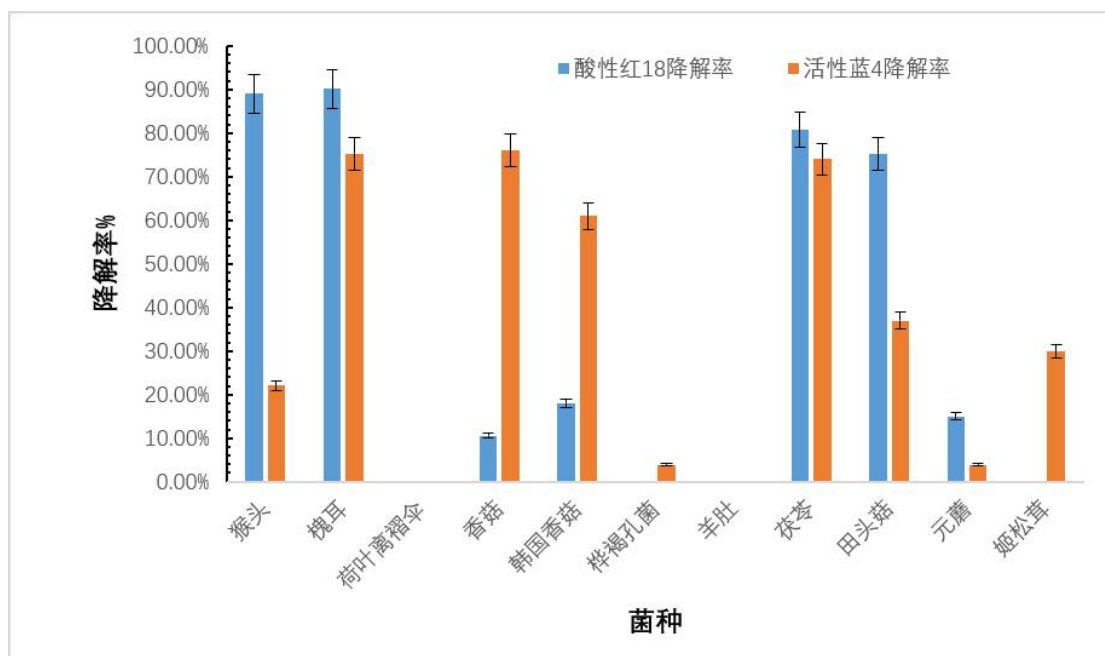


图 3.5 11 种低酶活白腐真菌对 2 种染料的降解率

11 种低酶活白腐真菌对酸性红 18 和活性蓝 4 的降解并不理想，除槐耳和茯苓可以对两种染料都降解外，其他真菌大多只能对一种染料进行降解，或者都不降解。

结合两批真菌降解染料的情况来看，酶活高的菌株对染料的脱色效果更好。

3.3 培养基优化结果

3.3.1 长根菇培养基筛选结果

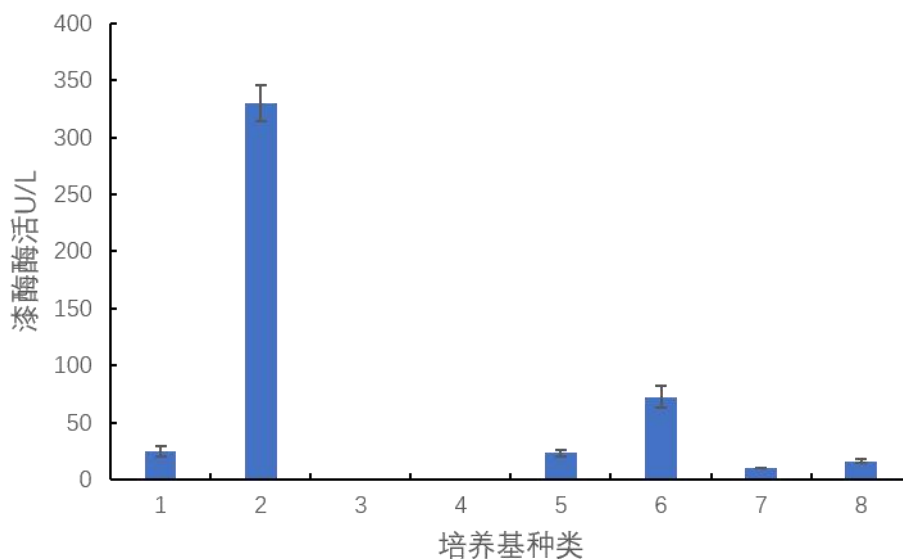


图 3.6 不同培养基下长根菇 Lac 酶活

2 号培养基培养出来的长根菇 Lac 酶活最高，为 330 U/L，其他培养基对长根菇的 Lac 酶活提升影响不大。

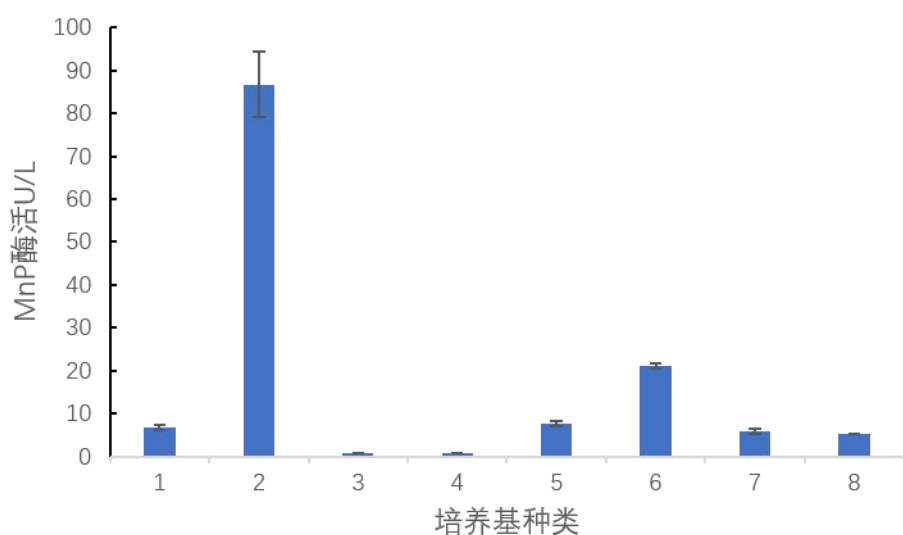


图 3.7 不同培养基下长根菇 MnP 酶活

2号培养基培养出来的长根菇 MnP 酶活最高，为 86.69 U/L。其他培养基并没有使长根菇的 MnP 酶活提升，反而使其降低。

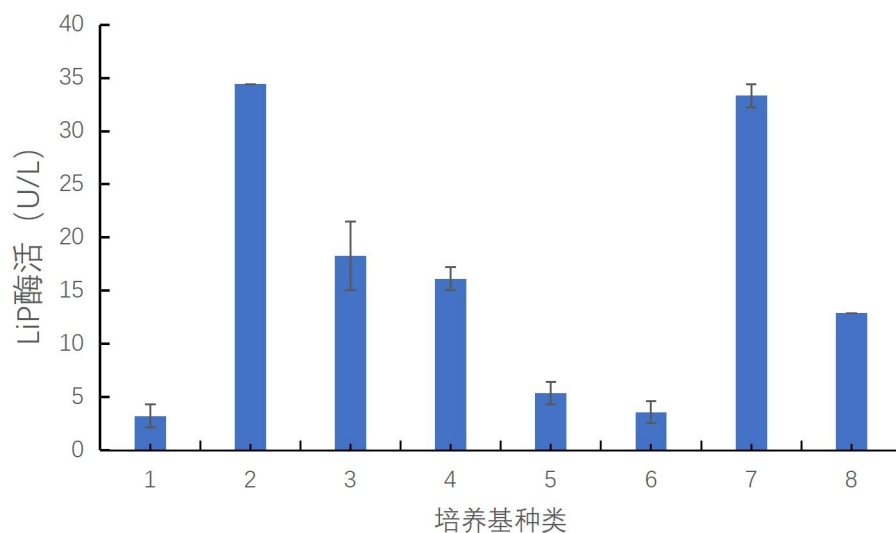


图 3.8 不同培养基下长根菇 LiP 的酶活

2号培养基培养出来的长根菇 LiP 酶活最高，为 34.4 U/L。其他培养基培养的长根菇 LiP 酶活也有所提高。

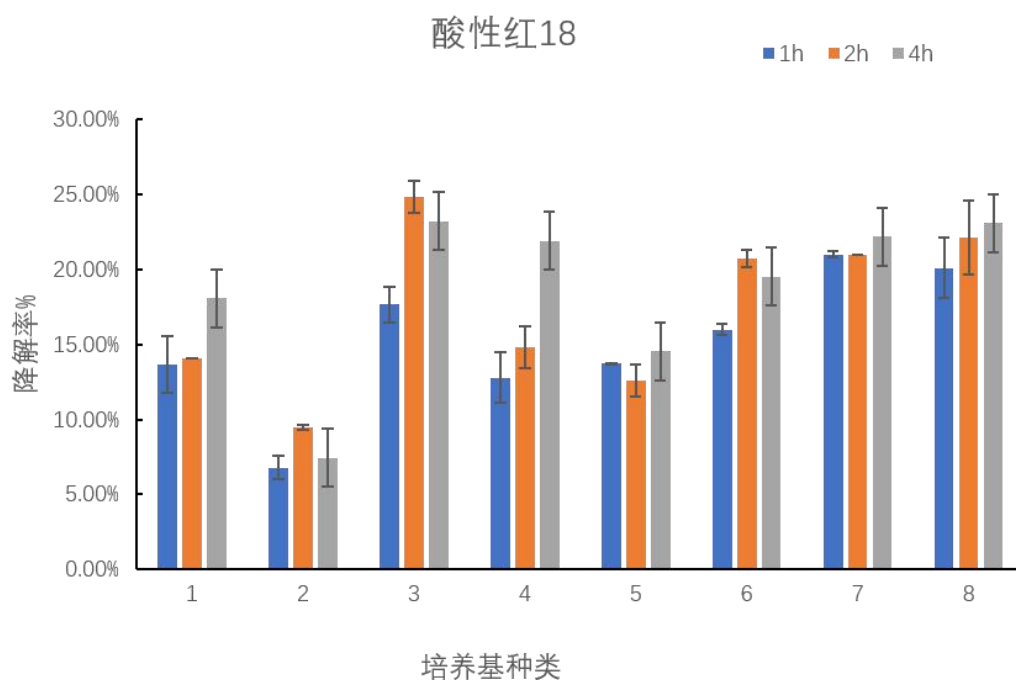


图 3.9 不同培养基下长根菇对酸性红 18 的降解率

从图 3.9 中可以看出，在 3 号培养基中酸性红 18 的降解效率很高。但所有培养基下长根菇对酸性红 18 的降解效果并不理想。

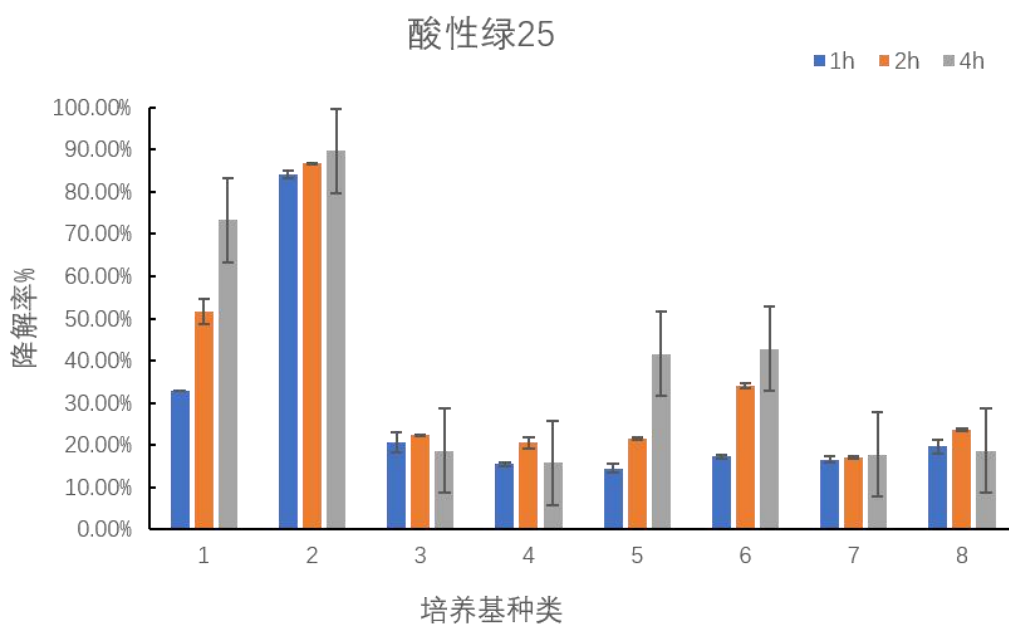


图 3.10 不同培养基下长根菇对酸性绿 25 的降解率

2 号培养基对酸性绿 25 的降解效果最佳，在 1 h 内基本完成了降解。其他培养基则次之。

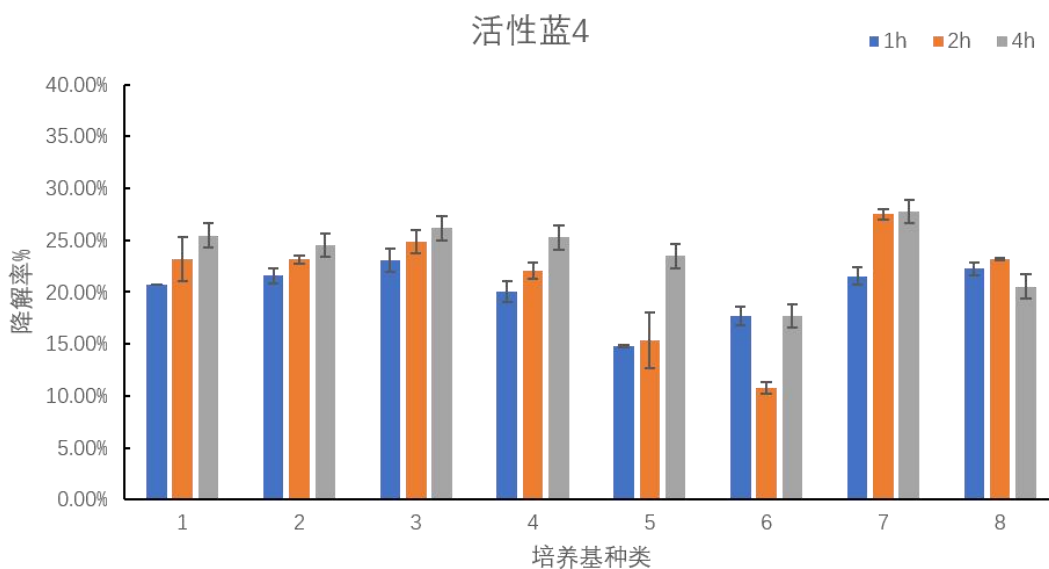


图 3.11 不同培养基下长根菇对活性蓝 4 的降解率

不同培养基下长根菇对活性蓝 4 的降解率相差不大，都没有超过 30%，说明氮源和碳源的替换并没有使长根菇对活性蓝 4 的降解效果明显提升。

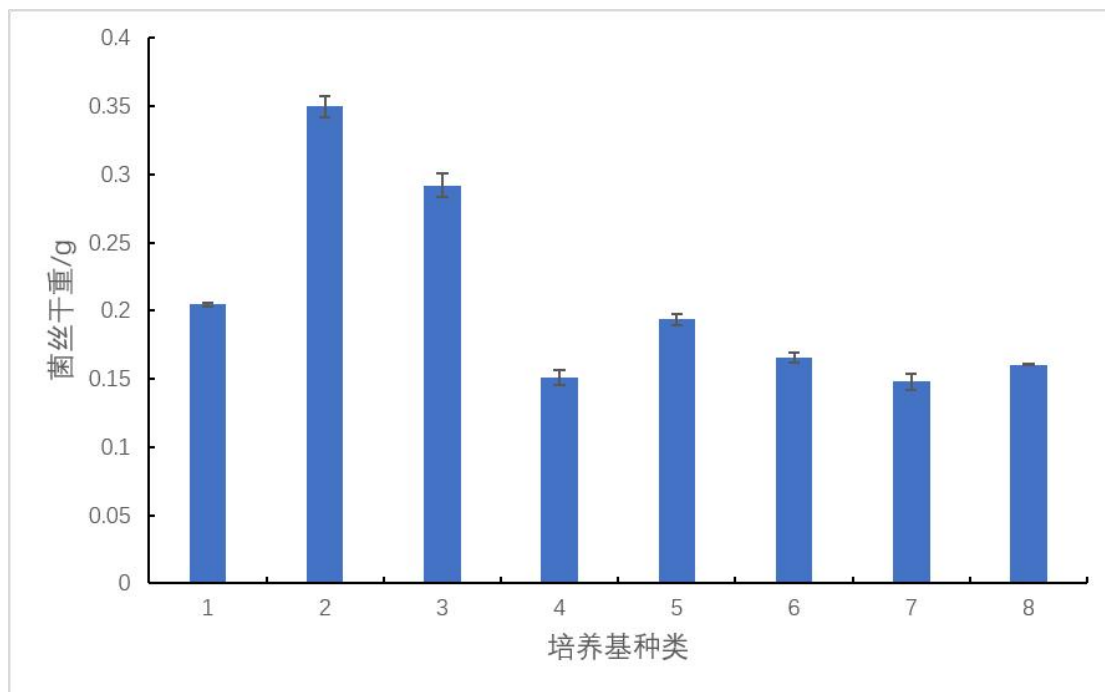


图 3.12 不同培养基下长根菇菌丝干重

2 号培养基的长根菇长势最好，产酶最多，酶活最高，但是对染料的降解效果没有达到理想效果。3 号培养基的长根菇长势较好，但酶活不高，对染料的降解率也不高，说明 3 号培养基可以促进菌丝生长，对染料降解没有帮助。其余培养基的长根菇干重相差不大，远低于 2 号培养基，且酶活和降解率率都不高，说明蔗糖、麦芽糖、果糖、淀粉可能并不是长根菇的合适碳源。

3.3.2 不同培养基下秀珍菇筛选结果

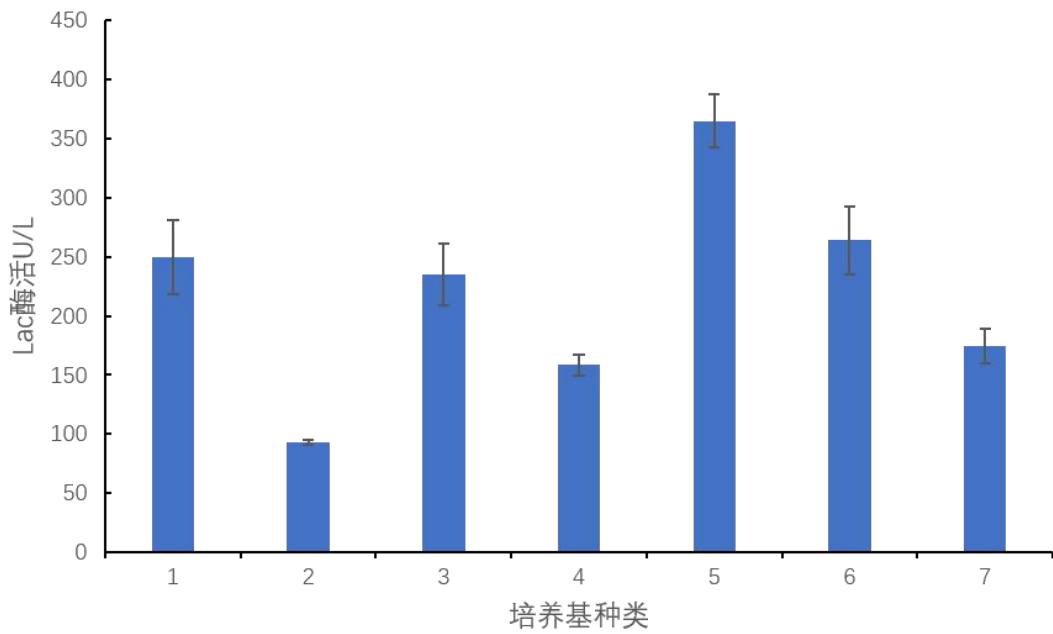


图 3.13 不同培养基下秀珍菇 Lac 酶活

5号培养基下秀珍菇的Lac酶活最高，为365 U/L，2号培养基的酶活最低，为93 U/L。说明麦芽糖为碳源可能会大大提高秀珍菇的Lac酶活。所有培养基里的秀珍菇的Lac酶活系数都有所提高。

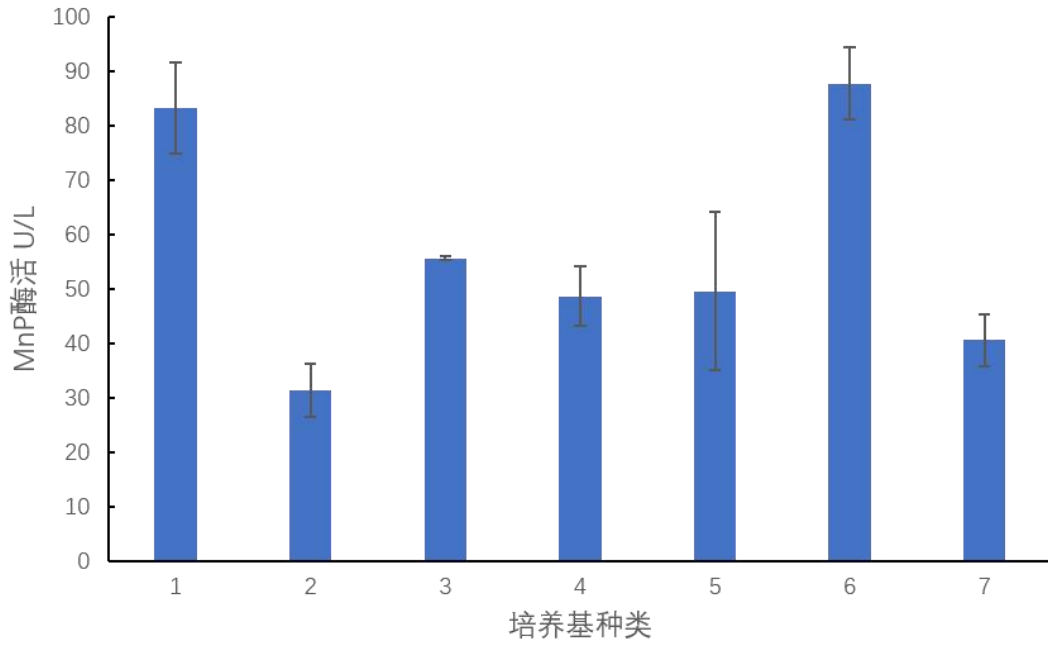


图 3.14 不同培养基下秀珍菇 MnP 酶活

在 6 号培养基中的 MnP 酶活性最好，达到了 87.8 U/L，而在别的培养基中的 MnP 酶活较低。果糖可能为最优碳源。

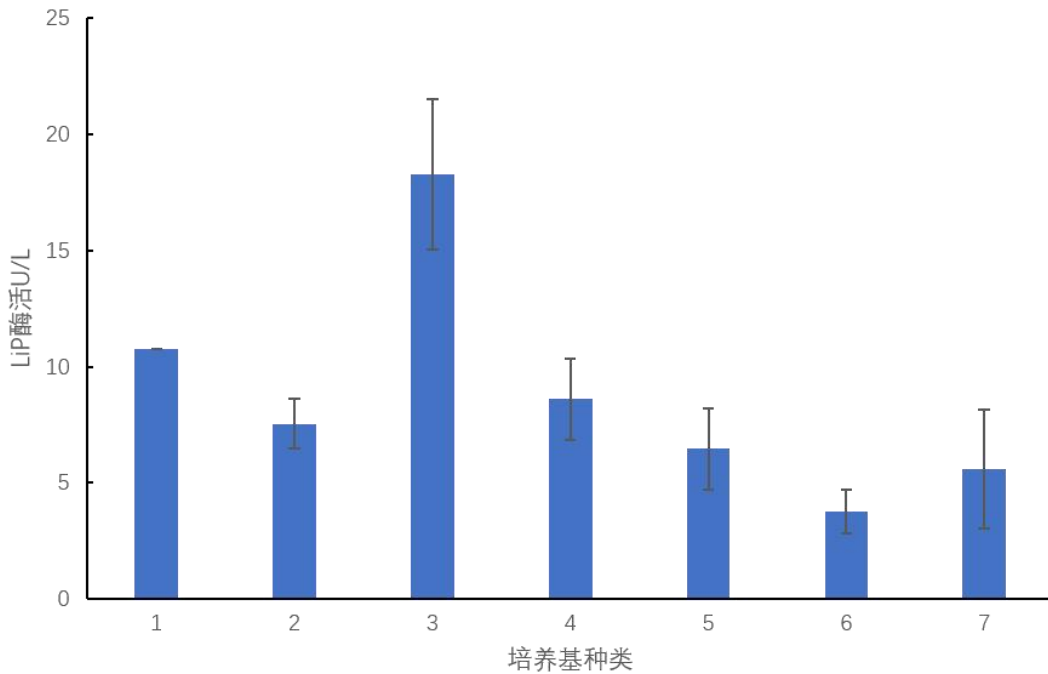


图 3.15 不同培养基下秀珍菇 LiP 酶活

在不同培养基下秀珍菇 LiP 酶活略有提高，但提高的十分有限。这些氮源、碳源的替换无法使 LiP 酶活大幅提高。

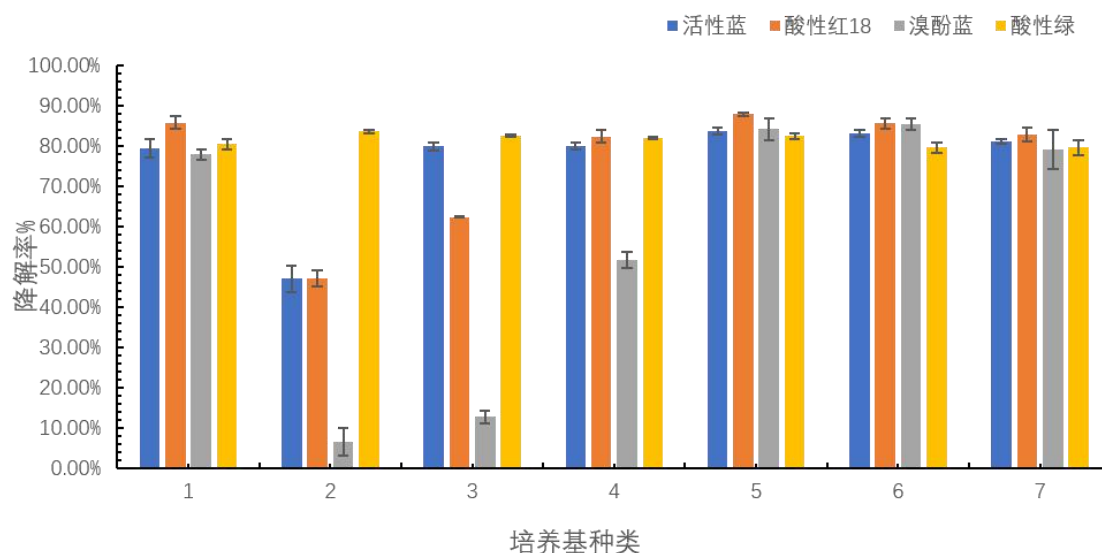


图 3.16 不同培养基下秀珍菇对 4 种染料 1h 的降解率

除 2 号培养基外,其余不同培养基下秀珍菇对活性蓝 4 的降解是十分高效的, 2 号培养基下秀珍菇对活性蓝 4 的降解率只有其他培养基降解率的一半。2 号、3 号培养基对酸性红 18 的降解率略低, 其他培养基在 1 h 时基本将酸性红 18 降解完。2 号、3 号培养基下秀珍菇对溴酚蓝的降解率很低, 4 号培养基的降解效果也明显低于其余培养基, 其他培养基秀珍菇对溴酚蓝的降解非常明显。所有培养基下的秀珍菇都可以十分高效地降解酸性绿 25。

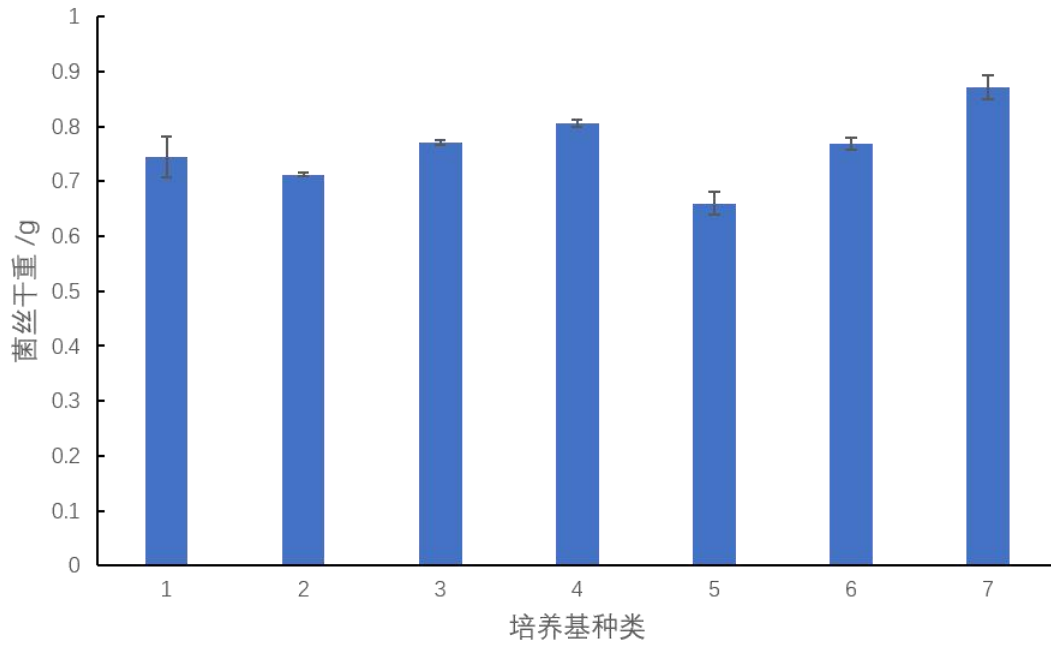


图 3.17 不同培养基下秀珍菇菌丝干重

不同培养基下秀珍菇的菌丝干重相差无几，说明不同的氮源、碳源对秀珍菇菌丝的生长状况影响不大，但会促进菌丝产生不同的酶，从而对染料的降解效率不同。

3.4 长根菇底物谱

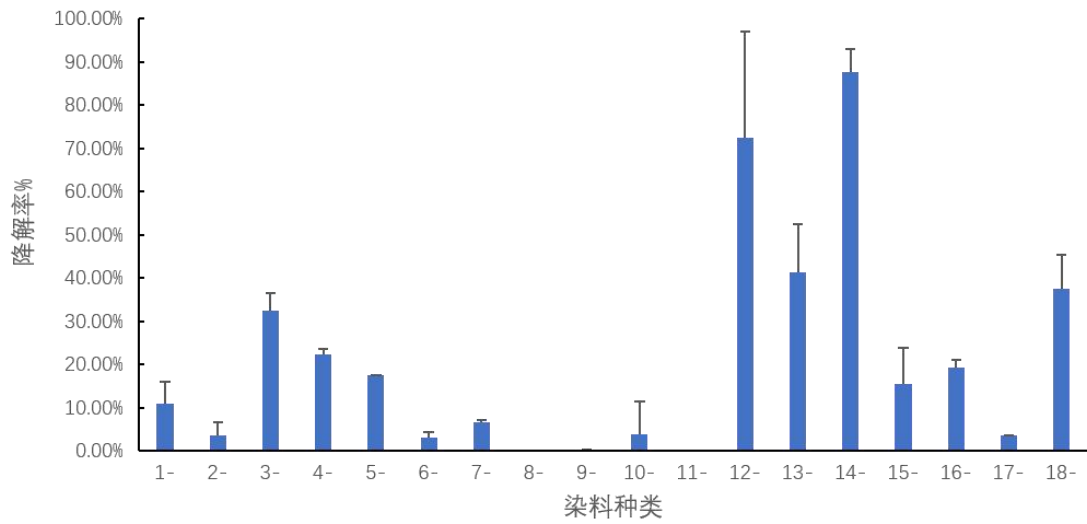


图 3.18 长根菇底物谱

由图 3.18 可知，长根菇对酸性绿 25 的降解率最高，达到 87.65%。

3.5 长根菇酶谱

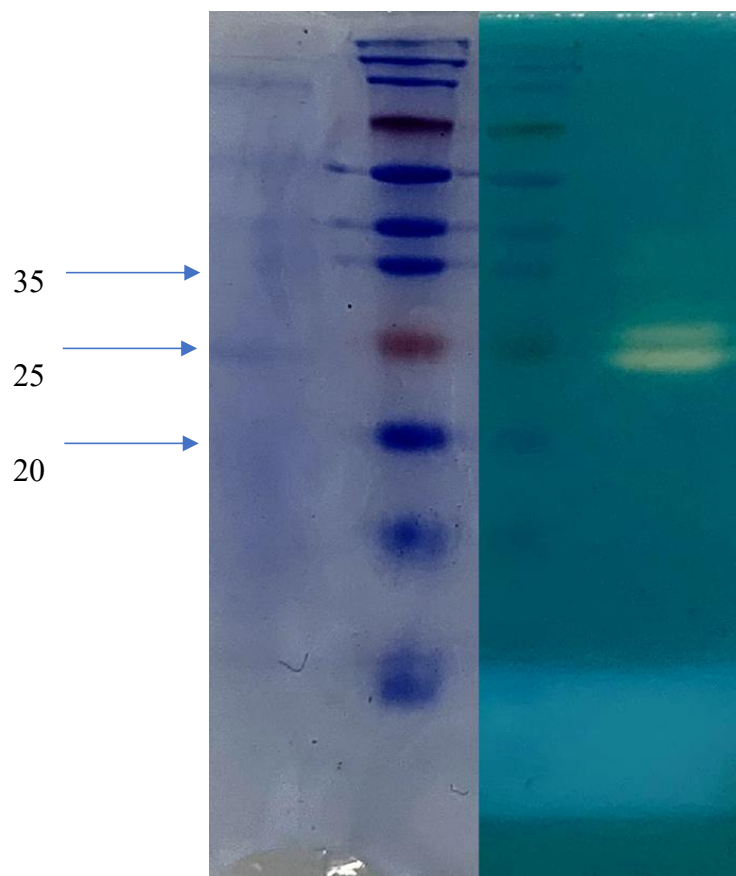


图 3.19 长根菇酶谱

由图 3.19 可知，长根菇分泌蛋白中存在多个染料降解酶，分子量大小分布在 KDa 20~KDa 35 之间。

4 展望

白腐真菌在自然界分布十分广泛，也是研究染料降解的热门。不过目前大多研究 Lac 对染料的降解，以及优化降解条件。研究 MnP、LiP 降解染料的实验很少，随着越来越多的研究人员加入到对白腐真菌的研究，降解条件、降解机制被研究地更加透彻，白腐真菌处理染料废水被更多地应用，工业染料对环境的危害日益减少。

参考文献

- [1]杜万根,谢东宝,陆亚洁,姜东,赵世光.白腐真菌共培养脱色降解罗丹明 B 的研究[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2020,35(03):84-92.
- [2]宋朝霞,付佳,王艳,黄锋.白腐真菌对甲基蓝的脱色[J].河南工程学院学报(自然科学版),2020,32(02):26-29.
- [3]Dai YC. Hymenochaetaceae (Basidiomycotain) China [J] . Fungal Diversity, 2010, 45(1):131-343.
- [4]Wu J, Zhang T, Chen C, Feng L, Su X, Zhou L, Chen Y, Xia A, Wang X. Spent substrate of *Ganodorma lucidum* as a new bio-adsorbent for adsorption of three typical dye[J]. Bioresource Technology. 2018,266(1):134-8.
- [5]吴怡,马鸿飞,曹永佳,司静,崔宝凯,真菌漆酶的性质、生产、纯化及固定化研究进展[J].生物技术通报,2019,35(9):1-10.
- [6]徐鑫,张国庆,胡渤海,刘子璐,孙悦,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]余昭琴,贾红华,王婷婷,周华,韦萍,杂色云芝漆酶对溴酚蓝的高效降解[J].化工环保, 2015,35(2): 137-141.
- [8]吕鹏.微生物降解纺织染料研究进展[J].价值工程,2016,35(18):217-221.
- [9]Biodegradation of Bisphenol A and Decolorization of synthetic dyes by Laccase from White-Rot Fungus, *Trametes polyzona*. [J]. Appl Biochem Biotechnol 2013,169(2):539-545.
- [10]Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process[J]. Process Biochemistry 2007, 42(10):1429-1435.
- [11]柳学鏊,梅炜清,李珏婵,卢政安,李雪晴.白腐真菌对低碳源废水中双酚 A 的去除研究[J].广东化工,2021,48(08):197-199.
- [12]宋雨轩,宋鑫龙,张晓丽,等.白腐真菌处理对难降解有机物污染物的研究进展[J].辽宁农业科学, 2019, 000(005):51-54.
- [13]王新,李兆兴,倪子钧,宋磊.白腐真菌降解农药研究进展[J].农药学学报,2020,22(03):405-412.
- [14]徐圣东,周金洋,王丽,朱孟娟.猴头菌和金针菇漆酶对不同染料的降解[J/OL].菌物学报:2021,14(5):1-13.
- [15]Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain[J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2004,31(3):127-132.

致谢

大学四年马上就要结束了，在最后这段时间里在实验室的生活十分充实多彩，学到了许多东西也认识到许多人，在他们的帮助下我的毕业设计顺利完成。

感谢于浩导师的淳淳教导，为我的实验指点方向。

感谢赵书雪师姐的耐心指点，让我学会了许多新知识。

感谢李晓航师兄的细心讲解，帮我完成了实验。

感谢我的同学陈显磊、朱陆陆的帮助、支持和鼓励。

感谢实验室的所有人使我大学最后一段时光充满欢声笑语。