

# 棘孢木霉高产漆酶诱变菌株选育及发酵条件优化

朱利霞\*, 王桂端, 麻益歌, 谭伟, 马雯婧, 倪雯珂, 李鑫, 陈居田, 李俐俐  
(周口师范学院生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

**摘要:**以棘孢木霉为出发菌株,利用微波和盐酸羟胺诱变,采用愈创木酚法筛选高产漆酶突变株。采用单因素试验和正交试验确定最佳发酵条件,借助模拟培养试验验证诱变菌株的漆酶活力。结果表明,微波诱变 15 s,盐酸羟胺 0.9 g/L 时致死率为 90%,此条件下得到一株高产菌株 MP1-1,其漆酶活力提高 70.8%。菌株最佳发酵条件为:葡萄糖为碳源(1%)、硝酸铵为氮源(1%)、pH 6.0、Cu<sup>2+</sup>浓度 0.09 mmol/L、接种量 1 mL、培养温度 28℃,此时菌株 MP1-1 漆酶活力达 54.51 U/L。以 MP1-1 处理聚乙烯 14 d,失重率达 0.77%,聚乙烯表面有明显凹痕与坑洞,并且引入了活性官能团羰基与醚键。微波-盐酸羟胺复合诱变结合发酵条件的优化能提高棘孢木霉产漆酶的能力,为棘孢木霉的工业化应用奠定了良好的基础。

**关键词:**棘孢木霉;漆酶;诱变;发酵条件优化

中图分类号:TQ920.6

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2025)12-0134-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.12.023

## Optimization of breeding and fermentation conditions for highly laccase-producing *Trichoderma asperellum* mutagenesis strains

ZHU Li-xia\*, WANG Gui-duan, MA Yi-ge, TAN Wei, MA Wen-jing, NI Wen-ke, LI Xin, CHEN Ju-tian, LI Li-li

(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

**Abstract:** *Trichoderma asperellum* is taken as a start strain to be mutagenized by microwave and hydroxylamine hydrochloride, and highly laccase-producing mutagenesis strains are screened out through guaiacol method. The optimum fermentation conditions are determined via single factor tests and orthogonal tests, and the laccase activity of the mutagenesis strains is verified by simulated culture test. Results show that a high-yield strain, MP1-1, is obtained under the conditions that microwave mutagenesis has performed for 15 s, the concentration of hydroxylamine hydrochloride is 0.9 g/L, and the lethal rate is 90%. The laccase activity of MP1-1 increases by 70.8%. The optimum fermentation conditions for the strains are as follows: glucose is used as carbon source with a dosage of 1%, ammonium nitrate is used as nitrogen source with a dosage of 1%, pH=6.0, Cu<sup>2+</sup> concentration is 0.09 mmol/L, inoculation amount is 1 mL, and culture temperature is 28℃. Under these conditions, the laccase activity of MP1-1 reaches 54.51 U/L. The weight loss rate of polyethylene, which has been treated by MP1-1 for 14 days, is 0.77%. There are obvious pits and holes on the surface of polyethylene, and the active functional groups such as carbonyl and ether bonds are introduced there. Optimizing the microwave-hydroxylamine compound mutagenesis combined with fermentation conditions can enhance the laccase-producing capacity of *Trichoderma asperellum*, which lays a good foundation for the industrial application of *Trichoderma asperellum*.

**Key words:** *Trichoderma asperellum*; laccase; mutagenesis; optimization of fermentation conditions

聚乙烯价格低廉、热力学性能优越、稳定性好,被广泛应用于各行各业中,这也使其因不易降解而对环境造成极大的威胁<sup>[1]</sup>。部分真菌能够将聚乙烯作为碳源,进而将聚乙烯彻底降解为二氧化碳和水,漆酶则是聚乙烯降解过程的关键酶。漆酶是一类含铜氧化酶,可以催化氧化酚类、羟基吡啶类的酚羟基化合物形成苯氧基自由基,再通过氧化偶联、化学结构重排、键的断裂与生成等形成最终的聚合物<sup>[2]</sup>。漆酶还可以催化氧分子产生唯一副产物—

水,是一种天然环保的绿色催化剂<sup>[3]</sup>。真菌漆酶通常为胞外酶,有较好的热稳定性、金属耐受性和底物催化性,被广泛应用于食品、制浆造纸、纺织工业及环保等领域<sup>[4]</sup>。然而,菌株产漆酶能力普遍偏低,紫外、微波等物理方法或亚硝基胍等化学物质诱变手段常被用于选育高产漆酶菌株。易小畅等<sup>[5]</sup>以红芝菌株为出发菌株,经过紫外-亚硝基胍诱变后菌株的漆酶活性较出发菌株提高 187%且产酶稳定。杨创明等<sup>[3]</sup>对紫芝菌株 Gs-1 液体产酶培养基进行优

收稿日期:2025-03-14;修回日期:2025-10-01

基金项目:河南省科技研发计划联合基金(245101610081;225101610054);国家自然科学基金(32201414);省部共建小麦玉米国家重点实验室开放基金(SKL2023KF08);河南省本科高校青年骨干教师培养计划(2025GGJS120)

作者简介:朱利霞(1990-),女,博士,副教授,研究方向为微生物应用,通讯联系人,justin2118@163.com。

化,优化后菌株漆酶活力为优化前的 26.46 倍。

鉴于此,为获得高产漆酶菌株,本研究以实验室保藏的产漆酶菌株棘孢木霉 MP1 为出发菌株,通过微波-盐酸羟胺诱变,筛选出一株漆酶活力较高的菌株,利用单因素实验和正交实验进行突变株发酵条件的优化,并利用高产漆酶菌株开展模拟发酵池降解聚乙烯试验,以期为漆酶的应用提供基础数据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

菌株:实验室保藏的产漆酶菌株棘孢木霉 MP1。

葡萄糖、愈创木酚、琼脂粉、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、七水合硫酸镁、硝酸铵、氯化钠、七水合硫酸亚铁、七水合硫酸锌、一水合硫酸锰、硫酸铜均为分析纯。

HWS250 型恒温恒湿培养箱;LDZX50KBS 型高压灭菌锅;SWCJ2FD 型洁净工作台;H1850 型台式冷冻高速离心机;Tescan Mira 3 型原位拉伸扫描电子显微镜;Nicolet iS50 型光谱仪;UV-2600 型紫外-可见分光光度计。

### 1.2 培养基制备

马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA)。马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 自然,121℃灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)。马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 自然,分装锥形瓶后 121℃灭菌 20 min。

无机盐液体培养基。K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.7 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g、NaCl 0.005 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 g、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 g、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001 g、蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。

愈创木酚—马铃薯葡萄糖固体培养基。马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g、愈创木酚 0.4 mL、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 自然,121℃灭菌 20 min。

漆酶选择发酵培养基。葡萄糖 10 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.25 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.04 g、CuSO<sub>4</sub> 0.016 g、蒸馏水 1 000 mL,分装锥形瓶后 121℃灭菌 20 min。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 菌株活化

制备萌动孢子。将棘孢木霉 MP1 接种于 PDA 上,于 28℃培养箱中培养 3 d 后,以蒸馏水冲洗培养基表面使孢子从培养基表面脱落,获得孢子悬液。

调节孢子浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL。按 1:20 的比例将孢子悬液 2.5 mL 接入 50 mL 的限量培养液,30℃、150 r/min 培养数小时,使孢子萌动而尚未生长。

每隔 2 h 吸取孢子悬液 10 μL 于载玻片上观察孢子的萌动情况(每个视野内 10~20 个孢子),计算萌动孢子数与原孢子数的比值,计算孢子萌动率并记录萌动时间。萌动率在 20%~30% 较好。

#### 1.3.2 诱变处理

微波诱变。将上述孢子悬液以 1:50(体积比)接种于 PDB 中,置于微波炉(700 W,2 450 MHz)中分别辐照处理 0(对照)、5、10、15、20 s。处理后于 28℃、150 r/min 下培养 48 h。观察孢子萌发情况,根据致死率确定最佳微波诱变时间。

盐酸羟胺诱变。取 1 mL 上述孢子悬液分别接入盐酸羟胺浓度为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 g/L 的 PDB 中,在 28℃、150 r/min 条件下培养 48 h。以盐酸羟胺浓度为 0 g/L 的孢子萌发情况为对照,计算致死率确定最佳诱变浓度。

复合诱变。取 1 mL 经微波辐照过的孢子悬液,接种到不同盐酸羟胺浓度的 PDB 中,28℃、150 r/min 条件下培养 48 h,以未进行诱变处理的孢子悬液为对照,计算致死率。

诱变致死率(%) = [(未经处理孢子萌发数 -

处理后孢子萌发数)/未经处理孢子萌发数] × 100%

#### 1.3.3 优势菌株的筛选

将诱变菌株接种至 PDB 中,在 28℃、150 r/min 条件下培养 5 d,测定菌株漆酶活力。将筛选得到的优势菌株连续传代培养 5 次,每代分别接种至产酶培养基中,培养 5 d 后测定漆酶活力。

## 1.4 发酵条件优化

### 1.4.1 单因素实验

采用单因素法依次探究 1%(质量比)碳源(乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖)、1%(质量比)氮源(硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨、酵母膏和牛肉膏)、Cu<sup>2+</sup>浓度(0、0.03、0.06、0.09、0.10、0.12 mmol/L)、pH(4.5、5.0、5.5、6.0、7.0)、温度(20℃、25℃、28℃、35℃、40℃)、接种量(0.5、1、2、2.5、3 mL/50 mL)对突变菌株漆酶活力的影响。

### 1.4.2 正交实验

在单因素实验的基础上,确定合适的碳源和氮源,并选取对产漆酶有影响的其余 4 个关键因子即 Cu<sup>2+</sup>浓度、接种量、初始 pH 值、培养温度为自变量,进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 实验设计。根据因素设计表配制发酵培养基,将活化的菌种接种于发酵培养基中培养 5 d

后测定漆酶活力,优化菌株产漆酶条件。

### 1.5 模拟发酵池验证试验

采用模拟发酵池探究扩繁工艺优化前与扩繁工艺优化后诱变菌株对聚乙烯的降解效能,同时设置接种出发菌株的对照组和不接种菌株的空白处理组,每个重复处理 3 次。根据聚乙烯塑料的失重率、微观形态变化和官能团变化判断菌株的产漆酶能力。

### 1.6 漆酶活力测定

采用愈创木酚法测定漆酶活力<sup>[7]</sup>。将 1 mL 漆酶粗酶液与 3 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液、1 mol 愈创木酚混合后在 25℃ 下孵育 30 min,测定反应体系在波长 465 nm 处的吸光度。酶活力定义为每分钟内水解 1 mmol 愈创木酚的量定义为一个酶活力单位 (U)。

## 2 结果与讨论

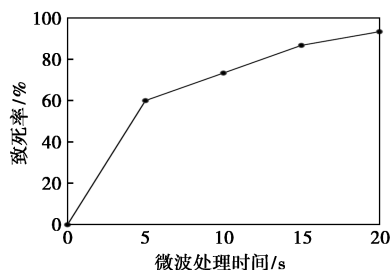
### 2.1 产漆酶菌株的筛选

根据漆酶与愈创木酚反应产生棕红色物质这一原理,结合变色圈直径和漆酶活力大小确定产漆酶能力较高的菌株。固体发酵体系中菌株的变色圈直径达到  $(4.5 \pm 0.1)$  cm,液体发酵体系中漆酶活力为 5.83 U/L。因此,可以以 MP1 为出发菌株,进行后续诱变处理。

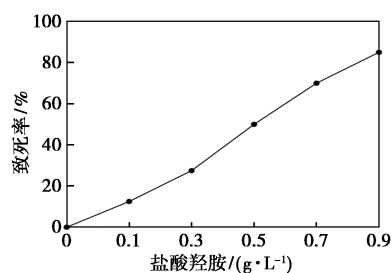
### 2.2 菌株诱变及遗传稳定性分析

#### 2.2.1 菌株诱变

一般而言,致死率在 85%~90% 之间时正突变率较高<sup>[8]</sup>。微波诱变时间和盐酸羟胺浓度对菌株 MP1 致死率的影响见图 1。由图 1(a) 可知,随微波处理时间的延长,菌株致死率增加。微波诱变 5 s 时致死率为 60.0%,10 s 时致死率为 73.3%,15 s 时致死率为 86.7%,20 s 时致死率为 93.3%。如图 1(b) 所示,随着盐酸羟胺浓度的升高,菌株 MP1 的孢子萌发量逐渐减少。当盐酸羟胺浓度为 0.9 g/L 时,致死率达到 85%。因此,选择微波诱变 15 s、0.9 g/L 的盐酸羟胺为菌株 MP1 的最佳诱变条件。



(a) 微波诱变

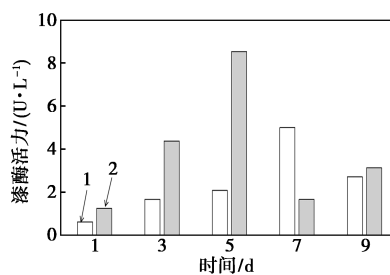


(b) 盐酸羟胺诱变

图 1 微波诱变时间和盐酸羟胺浓度对菌株 MP1 致死率的影响

以微波突变株为出发菌株,将微波辐照处理后得到的最优性状突变株制成菌悬液,准备盐酸羟胺诱变,观察菌丝生长量并计算致死率,经计算致死率为 90%,复合诱变比单一诱变的效果好。经过复合诱变筛选共得到 20 株高产漆酶的菌株,根据菌落周围变色圈的大小挑选出 10 株菌发酵培养,其中 4 株菌的漆酶活力高于初始菌株 (5.83 U/L),这 4 株诱变菌株中又以 MP1-1 菌株的漆酶活力最高。

以 MP1 为对照,对 MP1-1 进行摇瓶发酵培养,测得发酵液漆酶活力,如图 2 所示。第 5 d 时菌株 MP1-1 漆酶活力最大 (8.54 U/L),比出发菌株 MP1 提高 70.8%,证实了 MP1-1 为优势菌株。然而超过 5 d 后菌株漆酶活力降低,这可能是由于随培养时间的延长,菌丝出现老化且培养基中营养成分逐渐耗尽<sup>[6-7]</sup>。李阳等<sup>[9]</sup>发现云芝 Tv-1 漆酶活性在第 8 天时最高,为 235.20 U/L,高于本研究菌株漆酶活性,且与本研究培养时间不同,可能是由于不同菌株之间的差异导致的。



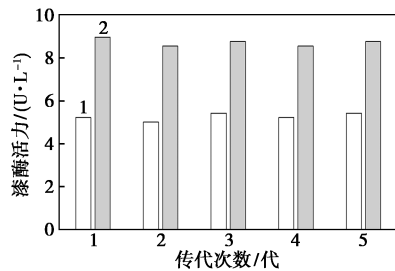
1—出发菌株 MP1;2—优势菌株 MP1-1

图 2 高产漆酶菌株 MP1-1 的产酶动态

#### 2.2.2 优势菌株 MP1-1 的遗传稳定性

菌株遗传稳定性是工业化应用的前提,连续传代培养可能会导致高产突变菌株性能降低<sup>[10]</sup>。为评估优势突变株的遗传稳定性,将菌株 MP1-1 连续培养 5 代后,每代进行摇瓶发酵 5 d 后测定漆酶活力。由图 3 可知,菌株 MP1-1 漆酶活力介于 8.54~

8.96 U/L,产酶特性稳定,因此,复合诱变产生的菌株 MP1-1 遗传稳定性好。



1—出发菌株 MP1;2—优势菌株 MP1-1

图 3 菌株 MP1-1 的遗传稳定性

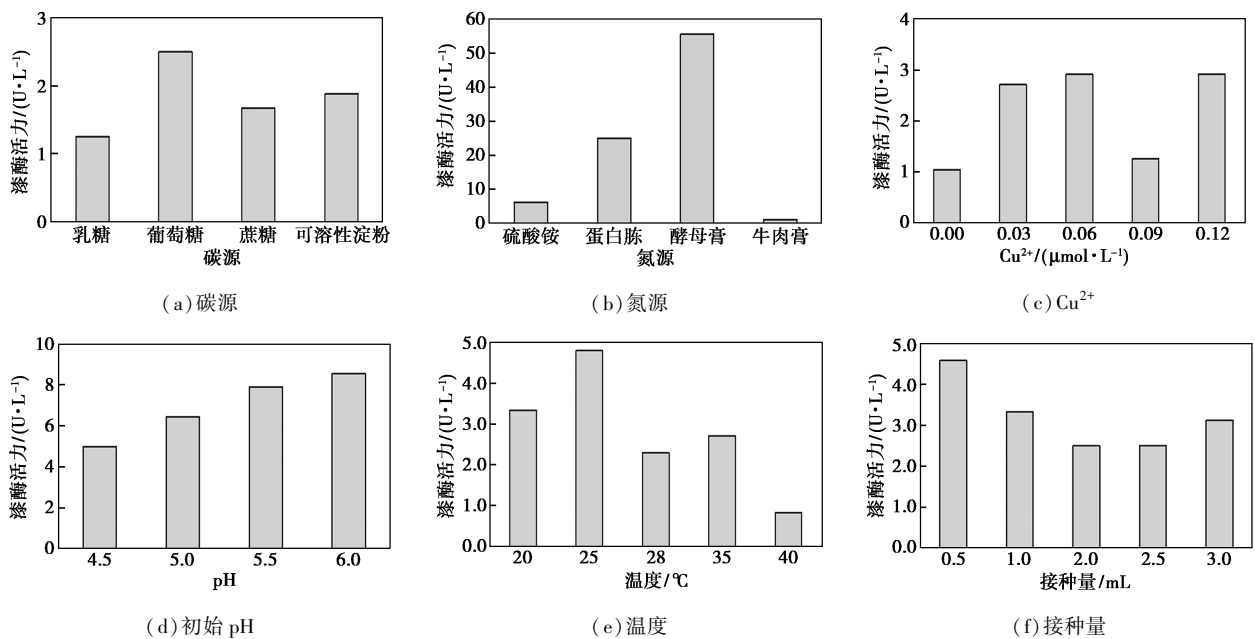


图 4 不同因素对 MP1-1 漆酶活力的影响

以酵母膏和蛋白胨为氮源时,培养基颜色明显变深,测定漆酶活力发现,以酵母膏为唯一氮源时菌株产酶水平最高,漆酶活力可达 184.03 U/L;以蛋白胨为氮源时,测得的菌株漆酶活力为 81.94 U/L,这与二者作为氮源时培养基颜色明显变深的现象一致,这种高酶活力可能是由于培养基本身的颜色对愈创木酚显色的掩盖,不能真实地反映这两种培养基中漆酶活力水平。以硝酸铵为氮源时,菌株漆酶活力为 22.22 U/L。因此,该菌株可以硝酸铵为最佳产漆酶的氮源。徐春燕等<sup>[13]</sup>发现以硝酸铵为氮源时,端梗霉 Z45 漆酶活力最高,这与本研究结果一致,表明该菌株更倾向于利用无机氮源。这可能是由于无机氮源更利于菌株生长利用,而牛肉膏提供的氮源属于有机氮源,不能快速被微生物转化利用。

漆酶属于多铜蛋白家族,其活力和产量受  $\text{Cu}^{2+}$  影响<sup>[14]</sup>。铜离子浓度为 0 mmol/L 培养时菌株产酶

### 2.3 单因素试验

对于异养微生物木霉菌而言,碳源即能源,对其生长代谢有重要作用。不同碳源培养条件下,菌株漆酶活力有明显差异,如图 4 所示。以乳糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉为碳源时菌株均可产漆酶,其中葡萄糖为碳源时菌株产酶水平最高,漆酶活力可达 8.33 U/L,葡萄糖为单糖,更利于菌株利用,因此葡萄糖作为碳源最利于漆酶合成。王慧冬等<sup>[11]</sup>发现蔗糖对于枯草芽孢杆菌的促生作用最为明显,然而毛栓孔菌以可溶性淀粉为碳源时对漆酶活力的促进最为显著<sup>[12]</sup>,这可能是由于不同菌株的最适碳源不同。

水平最低,印证了铜离子对漆酶的诱导作用<sup>[11]</sup>;  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 0.1 mmol/L 时菌株漆酶活力为 6.94 U/L。  $\text{Cu}^{2+}$  为 0.06 mmol/L 时菌株酶活力最高(9.72 U/L),该浓度最利于漆酶合成。由此,过量的  $\text{Cu}^{2+}$  可能对木霉菌的生长和漆酶的合成产生抑制作用<sup>[15]</sup>。

微生物的生长、繁殖需要合适的酸碱度,pH 对菌株生长代谢和产酶量有重要作用<sup>[16]</sup>。由于发酵过程中培养基 pH 会随时间的延长而改变,因此,本研究研究的是菌体发酵时初始 pH 对菌株产酶量的影响。菌株 pH 升高至 7.0 时,培养基颜色出现质的变化由无颜色跃变为黄褐色,这时葡萄糖可能发生了氧化反应,也可能是构象上发生了变化<sup>[17]</sup>。黄褐色的出现会直接影响酶活性的测定,导致漆酶活力的高估。此外,pH 为 7.0 时,菌株生长状况不佳,这可能与葡萄糖发生变化活性降低,菌株难以吸收利用有关<sup>[17]</sup>。因此,在后续测定菌株漆酶活性时,

舍弃 pH 为 7.0 时酶活性的测定。当 pH 为 5.5 时菌株产酶水平最高,其漆酶活力可达 26.39 U/L,发酵培养基初始 pH 为 5.5 时最利于漆酶合成。

适宜的温度能够促进菌株生长和产酶,该菌株漆酶活力随温度的增加先增加后降低,以培养温度为 28℃ 时其产酶水平最高,酶活力可达 19.44 U/L;培养温度为 40℃ 时产酶水平最低。可知,培养温度为 28℃ 时最利于漆酶合成。这与 Othman 等<sup>[18]</sup>的研究结果一致,高温会抑制木质素降解酶的产生,其主要是由于高温会破坏细胞膜的结构,改变蛋白质的代谢过程<sup>[19]</sup>。

接种量的多少也直接影响菌株漆酶活力<sup>[20]</sup>。随接种量的增加,菌株漆酶活力先增加后降低。接种量过少时菌体浓度过低,发酵产酶周期延长,进而单位时间内酶的产量减少;接种量过大时,菌株的大量繁殖导致培养基消耗过快,正常的代谢受到阻碍,从而也使得酶的产量减少。当接种量为 2.0 mL 时菌株产酶水平最高,其漆酶活力可达 11.11 U/L,因此,接种量为 2.0 mL 时最利于漆酶合成。

## 2.4 发酵条件验证

### 2.4.1 正交试验结果分析

各因素间的交互作用对棘孢木霉诱变菌株 MP1-1 的影响见表 1,按照极差  $R$  值确定各因素对菌株漆酶活力的影响大小顺序为  $C(\text{温度}) > A(\text{Cu}^{2+} \text{浓度}) > B(\text{pH}) > D(\text{接种量})$ ,菌株 MP1-1 产漆酶的最优组合为  $A_3B_3C_2D_1$ ,各因素最佳值分别为  $\text{Cu}^{2+}$  浓度 0.09 mmol/L、pH 6.0、温度 28℃、接种量 1 mL。优化条件下菌株 MP1-1 漆酶活力显著高于其他条件,漆酶活性为 54.51 U/L。陈守菊等<sup>[21]</sup>发现棘孢木霉漆酶活力最高达到 571.32 U/L,远高于本研究结果,这可能是不同地区同一菌株间出现了变异。相比之下,本研究中的菌株产漆酶能力还有待提高,可以考虑通过定点饱和突变的方法提高酶的活性;或者通过基因改造,在不影响漆酶作用机制的前提下,提高菌株产酶稳定性。

表 1 正交试验结果

编号	A( $\text{Cu}^{2+}$ 浓度)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	B(pH)	C(温度)/ ℃	D(接种 量)/mL	漆酶活力/ (U·L <sup>-1</sup> )
1	0.03	5.0	25	1.0	9.03±0.98g
2	0.03	5.5	28	2.0	35.42±0.98b
3	0.03	6.0	35	2.5	19.44±0.00d
4	0.06	5.0	28	2.5	15.63±0.49f
5	0.06	5.5	35	1.0	14.58±0.00f

6	0.06	6.0	25	2.0	18.4±0.49de
7	0.09	5.0	35	2.0	17.36±0.00e
8	0.09	5.5	25	2.5	30.56±0.00c
9	0.09	6.0	28	1.0	54.51±0.49a
K1	63.89	42.01	57.99	78.13	
K2	48.61	80.56	105.56	71.18	
K3	102.43	92.36	51.39	65.63	
k1	21.30	14.00	19.33	26.04	
k2	16.20	26.85	35.19	23.73	
k3	34.14	30.79	17.13	21.88	
R	12.85	3.94	18.06	2.31	

注:表中酶活性为 3 次测定的均值±标准差,不同小写字母表示不同处理间的显著差异性( $p < 0.05$ )。

### 2.4.2 回归模型方差分析

回归模型方差分析结果如表 2 所示,模型  $F$  值为 4 029.714、 $P < 0.001$ ,说明该模型设置合理,可以预测  $\text{Cu}^{2+}$  浓度、温度、pH 和接种量对漆酶活力的影响。模型决定系数  $R^2 = 0.999$ (调整后  $R^2 = 0.999$ ),说明模型预测值与试验值相关性较好。通过比较  $\text{Cu}^{2+}$  浓度、温度、pH 和接种量的  $F$  值可知,各因素对漆酶活力的影响有显著性差异,并且 4 个因素对漆酶活力的影响主次顺序为  $C(\text{温度}) > A(\text{Cu}^{2+} \text{浓度}) > B(\text{pH}) > D(\text{接种量})$ ,此结果与正交试验计算结果一致。

表 2 正交试验结果方差分析

来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	4 750.281	8	593.785	4 029.714	0.000
A	1 538.472	2	769.236	5 220.408	0.000
B	1 386.559	2	693.280	4 704.931	0.000
C	1 746.804	2	873.402	5 927.329	0.000
D	78.446	2	39.223	266.187	0.000

## 2.5 模拟发酵池验证试验

### 2.5.1 聚乙烯失重率

由于漆酶是一种聚乙烯降解过程中的关键酶,采用聚乙烯失重率评估各处理中菌株漆酶活力。在培养 14 d 时取样清洗并烘干后测定聚乙烯的失重率,结果如表 3。测得扩繁工艺优化后诱变菌株 MP1-1 处理的聚乙烯膜片失重率高达 0.77%,是未接种菌株处理的 10.8 倍,是出发菌株 MP1 处理的 2.89 倍,是扩繁工艺优化前诱变菌株 MP1-1 处理

的 1.98 倍。这也说明了菌株 MP1-1 具有较高的漆酶活力。

表 3 不同菌株处理下聚乙烯失重率的变化

接种菌株	失重率/%
未接种菌株	0.07±0.002d
出发菌株 MP1	0.27±0.003c
扩繁工艺优化前诱变菌株 MP1-1	0.39±0.002b
扩繁工艺优化后诱变菌株 MP1-1	0.77±0.002a

注:失重率为 3 次重复的平均值±标准差,同列不同字母表示差异达到显著性水平( $p < 0.05$ )。

### 2.5.2 聚乙烯表面微观特征变化

如图 5 所示,未接种菌株处理的聚乙烯膜片表面光滑平整,而出发菌株处理与扩繁工艺优化后的诱变菌株 MP1-1 处理的聚乙烯膜片表面都有明显凹痕与坑洞,且扩繁工艺优化后的诱变菌株 MP1-1 处理的聚乙烯表面比出发菌株 MP1 处理的膜片表面更为粗糙。该结果印证了菌株 MP1-1 漆酶活力高于其他菌株。

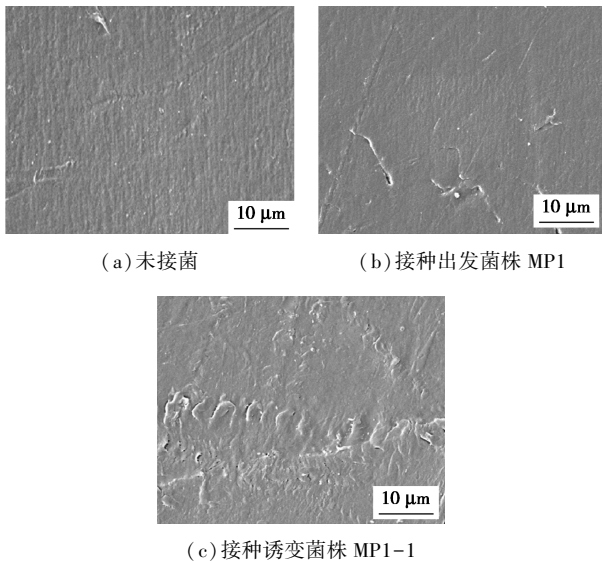
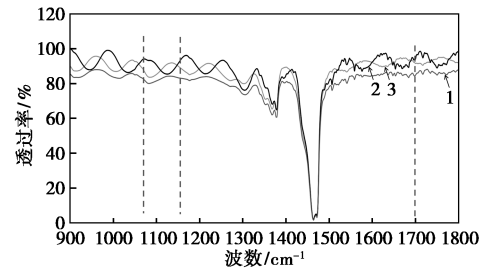


图 5 聚乙烯膜片的表面微观特征

如图 6 所示,与未接种菌株处理的聚乙烯方片相比,出发菌株 MP1 处理的聚乙烯方片在  $1\ 020 \sim 1\ 275\ \text{cm}^{-1}$  范围出现的吸收峰对应醚键 C—O—C,  $1\ 550 \sim 1\ 610\ \text{cm}^{-1}$  处羧基振动有明显吸收,  $\sim 1\ 716\ \text{cm}^{-1}$  处羰基振动也有明显吸收,诱变菌株 MP1-1 处理后聚乙烯方片的吸收峰则在出发菌株 MP1 处理后聚乙烯方片吸收峰的基础上发生偏移。这表明在菌株作用下,聚乙烯引入了新的极性官能团羰基(C=O)与醚键(C—O—C)。



1—对照(未接种);2—接种出发菌株 MP1;  
3—接种诱变菌株 MP1-1

图 6 聚乙烯膜片表面的官能团变化

## 3 结论

以棘孢木霉 MP1 为出发菌株,采用微波-盐酸羟胺诱变,筛选得到遗传稳定性好的突变株 MP1-1,其漆酶活性较出发菌株提高 70.8%。

通过单因素和正交设计试验,确定菌株 MP1-1 的最佳发酵条件为葡萄糖 1%、硝酸铵 1%、 $\text{Cu}^{2+}$  浓度  $0.09\ \text{mmol/L}$ 、pH 6.0、温度  $28\ ^\circ\text{C}$ 、接种量  $1\ \text{mL}$  (2%)。在此条件下,菌株漆酶活力达到  $54.51\ \text{U/L}$ 。

该菌株能够以聚乙烯为唯一碳源进行生长,14 d 后可使聚乙烯失重率为 0.77%,膜片表面有明显坑洞和裂痕,并向聚乙烯中引入活性官能团羰基(C=O)与醚键(C—O—C),证实诱变菌株 MP1-1 能够产漆酶并可用于聚乙烯的降解。

## 参考文献

- [1] 段亚良. 聚乙烯微塑料降解菌的筛选和降解机理研究[D]. 郑州:河南工业大学,2024.
- [2] 丁洪,金川淑,吴艳,等. 灵芝漆酶对茶多酚染色羊毛织物性能的影响[J]. 印染,2023,49(11):12-15,32.
- [3] 杨创明,姜海伟,李阳,等. 紫芝菌株 Gs-1 液体培养产漆酶的培养基优化研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2023,44(4):74-83.
- [4] 吉栗漫,谭显东,乔翹嵩,等. 灵芝固态发酵三七渣产漆酶工艺优化[J]. 中成药,2024,46(3):958-961.
- [5] 易小畅,蒋智,李娜,等. 红芝漆酶高产菌株的诱变选育[J]. 食品研究与开发,2014,35(24):139-142.
- [6] 湛斌,赵亮亮,聂小琦,等. 组成型漆酶高产菌株的筛选及其产酶条件研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2009,27(2):76-79.
- [7] 徐安民,李力,马森,等. 白腐菌木质素降解酶高产菌株的筛选[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2020,41(4):78-82,89.
- [8] 何国庆,贾英民,丁立孝. 食品微生物学(2版)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2009:95-120.
- [9] 李阳,高颖,赵玉,等. 云芝产漆酶培养基优化及发酵液对玉米赤霉烯酮降解活性检测[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2024. <https://doi.org/10.16433/j.1673-2383.202401300001>.

(下转第 146 页)

- [7] Sahil S, Singh R, Masakapalli S K, *et al.* Biomass pretreatment, bioprocessing and reactor design for biohydrogen production: A review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2024, 22(4): 1665–1702.
- [8] Aslam A, Bahadar A, Liaquat R, *et al.* Recent advances in biological hydrogen production from algal biomass: A comprehensive review[J]. *Fuel*, 2023, 350: 128816.
- [9] 钟家伟, 谭涛, 谢君, 等. 生物质高值能源转换技术[J]. *化工进展*, 2025, 44(5): 2524–2528.
- [10] Jiang Q, Li Y, Wang M, *et al.* Light energy utilization and microbial catalysis for enhanced biohydrogen: Ternary coupling system of triethanolamine-mediated Fe@C-Rhodobacter sphaeroides[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 401: 130733.
- [11] Guo S, Lu C, Wang K, *et al.* Effect of citrate buffer on hydrogen production by photosynthetic bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 347: 126636.
- [12] Budiman P M, Wu T Y. Role of chemicals addition in affecting biohydrogen production through photofermentation[J]. *Energy Conversion and Management*, 2018, 165: 509–527.
- [13] 屈皓, 李玉霞, 刘玉香. 生物质光发酵制氢技术研究进展[J]. *现代化工*, 2025, 45(1): 56–61.
- [14] Zhang T, Jiang D, Li Y, *et al.* Lignin removal, reducing sugar yield and photo-fermentative biohydrogen production capability of corn stover: Effects of different pretreatments[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126437.
- [15] Zhang C, Zhang L, Ma Y, *et al.* Improving photofermentative hydrogen productivity of photosynthetic bacteria using a formulated Fe and Mo metal supplemented lignocellulosic substrate[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2024, 49: 516–531.
- [16] 程晓娇, 刘玉香, 张松涛. 环保酵素应用的研究进展[J]. *现代化工*, 2023, 43(1): 67–70, 76.
- [17] 苏本营, 周美华, 李晶, 等. 农业废弃物生产环保酵素及其应用研究进展[J]. *北方园艺*, 2024, (8): 119–125.
- [18] Gao Y, Liu P. Research progress in application of garbage enzyme in soil improvement, agricultural production and environmental management[J]. *Advances in Environmental Protection*, 2020, 10(4): 541–548.
- [19] 屈皓, 刘玉香, 李玉霞. 菠萝皮渣发酵液光发酵制氢工艺参数优化[J]. *农业环境科学学报*, 2025, 44(2): 491–498.
- [20] 张文璐, 李海明, 于光, 等. LiBr 辅助球磨预处理提升玉米芯木糖渣酶解转化葡萄糖效率的研究[J]. *中国造纸*, 2024, 43(1): 7–14.
- [21] 路朝阳, 王毅, 荆艳艳, 等. 基于 BBD 模型的玉米秸秆光合生物制氢优化实验研究[J]. *太阳能学报*, 2014, 35(8): 1511–1518.
- [22] 杜涓安, 刘娜, 王园. 酶解玉米芯制备及其水提物体外酵解特性研究[J]. *饲料研究*, 2021, 44(11): 61–64.
- [23] 时有明, 晏翠琼, 孙艳琳, 等. 五种杂交玉米籽粒品质的 FT-IR 光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(11): 2945–2948.
- [24] Zhang T, Jiang D, Li Y, *et al.* Study of the interrelationship between nano-TiO<sub>2</sub> addition and photo-fermentative bio-hydrogen production of corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 338: 125549.
- [25] Wang H, Xing D, Jin C, *et al.* Cooperation of rhamnolipid and thermophilic bacteria modifies proteinic structure, microbial community, and metabolic traits for efficient solubilization and acidogenesis of mariculture solid wastes[J]. *Water Research*, 2025, 268: 122634.
- [26] Pei Y, Zhang J, Zhou C, *et al.* Hydrothermal carbon microspheres and their iron salt modification for enhancing biohydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 385: 129371. ■

(上接第 139 页)

- [10] 薛莹莹, 林福兴, 别小妹, 等. ARTP 诱变联合抗生素抗性选育纳豆激酶高产菌株[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 93–97.
- [11] 王慧冬, 修建龙, 黄立信, 等. 一株采油枯草芽孢杆菌发酵条件优化[J]. *应用化工*, 2021, 50(12): 3223–3226, 3239.
- [12] 武艳芳, 甄静, 郭光光, 等. 毛栓孔菌 XYG422 产木质素降解酶的固体发酵工艺研究[J]. *饲料研究*, 2023, (15): 93–97.
- [13] 徐春燕, 贾晨波, 郭洋, 等. 干旱土壤中产漆酶真菌的分离、鉴定与生长特性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, (3): 1163–1170.
- [14] 叶婷婷, 张建芬, 陈虹. 一株血红栓菌的分离鉴定及其产漆酶发酵条件与脱色研究[J]. *食品工业科技*, 2020, (20): 104–108, 115.
- [15] Salem M M, Mohamed T M, Shaban A M, *et al.* Optimization, purification and characterization of laccase from a new endophytic *Trichoderma harzianum* AUMC14897 isolated from opuntia Ficus-Indica and its applications in dye decolorization and wastewater treatment[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 266.
- [16] 闫忠杰, 王俊明, 刘新利, 等. ARTP 法改良变色栓菌 ATCC20869 发酵漆酶[J]. *齐鲁工业大学学报*, 2024, 38(5): 47–57.
- [17] 吴家和, 罗晓丽, 李淑君, 等. pH 值对培养基颜色的影响研究[J]. *中国棉花*, 1999, (11): 7–8.
- [18] Othman A M, Mahmoud M, Abdelraof M, *et al.* Enhancement of laccase production from a newly isolated *Trichoderma harzianum* S7113 using submerged fermentation: Optimization of production medium via central composite design and its application for hydroquinone degradation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 219–231.
- [19] Nyanhongo G S, Gomes J, Gübitz G, *et al.* Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes Modesta*[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 84(3): 259–263.
- [20] 邢宏博, 郑玉娇, 蔡汉聪, 等. 红色红曲菌 BM0321 液态发酵产莫纳可林 K 发酵条件探究[J]. *饲料研究*, 2025, 48(1): 157–162.
- [21] 陈守菊, 李松, 陈阿娜, 等. 一株产漆酶真菌的筛选、鉴定及发酵研究[J]. *安徽工程大学学报*, 2015, 30(2): 6–11. ■