

Phanerochaete chrysosporium 降解碳质金矿中元素碳高关联度变量的筛选

刘倩¹, 杨洪英^{2*}, 佟琳琳²

1. 上海第二工业大学, 上海电子废弃物资源化协同创新中心, 上海 201209;

2. 东北大学冶金学院, 辽宁 沈阳 110819

摘要: 采用 Plackett–Burman 设计法对 *Phanerochaete chrysosporium* 降解碳质金矿中元素碳的高关联度变量进行筛选。通过前期的单因素试验确定影响真菌降解碳质物的 8 个变量, 分别为愈创木酚浓度、糊精浓度、吐温-80 浓度、草酸浓度、过氧化氢浓度、矿浆浓度、真菌浓度和作用时间。通过两水平的 Plackett–Burman 设计法确定影响真菌降解元素碳的高关联度变量, 分别为愈创木酚浓度、草酸浓度和矿浆浓度。愈创木酚是一种诱导剂。低浓度时, 愈创木酚通过提高酶活性和诱导一些酶产生, 促进元素碳的降解。高浓度时, 酶产生和酶活性受抑制, 不利于元素碳的降解。草酸通过调节降解体系的 pH 值影响菌体生长及酶活性。矿浆浓度会影响元素碳和真菌的有效接触面积以及降解体系的剪切力和传质效率。

关键词: *P.chrysosporium*; 元素碳; 高关联度变量; Plackett–Burman 设计法; 筛选; 碳质金矿

中图分类号: TF831 文献标志码: A 文章编号: 1005–2518(2017)05–0140–05 DOI: 10.11872/j.issn.1005–2518.2017.05.140

引文格式: LIU Qian, YANG Hongying, TONG Linlin. Screening of High Correlation Variables of Elemental Carbon Degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in Carbonaceous Gold Ores [J]. Gold Science and Technology, 2017, 25(5): 140–144. 刘倩, 杨洪英, 佟琳琳. *Phanerochaete chrysosporium* 降解碳质金矿中元素碳高关联度变量的筛选 [J]. 黄金科学技术, 2017, 25(5): 140–144.

由于硫化物的包裹作用和碳质物的“劫金作用”, 碳质金矿是一种双重难处理金矿。碳质金矿主要分布于美国的内华达州和中国的西南部^[1–2]。随着易处理金矿资源的日益消耗, 碳质金矿已成为黄金工业的重要原料。除碳酸盐矿物之外, 碳质金矿中的碳质物主要由元素碳、有机酸和烃类组成^[3]。其中元素碳作为最重要的“劫金”碳质物, 广泛存在于各种碳质金矿中。元素碳是晶态石墨与非晶态活性炭的混合物, 成熟度介于无烟煤与石墨之间, 其吸附 $\text{Au}(\text{CN})^2-$ 的行为类似于活性炭^[3–4]。有机酸具有羧基、酚和醇羟基和酮基等活性官能团, 其通过

这些官能团与金形成稳定的螯合物^[5]。研究发现, 烃类物质并不与 $\text{Au}(\text{CN})^2-$ 发生反应, 且大多存在于元素碳表面, 可降低元素碳的“劫金”活性^[6]。

为降低或消除碳质物对氰化浸金的干扰, 开展了碳质金矿预处理方面的研究。目前常用的预处理方法主要有焙烧法、生物氧化法、化学氧化法、竞争吸附法、覆盖抑制法和微波加热法等。与其他预处理方法相比, 生物氧化法具有条件温和、流程简单、能耗低、选择性氧化和环境友好等优势。杨凤等^[7]利用 HYK-2 菌群对广东某含碳高砷难浸金精矿进行处理, 细菌在氧化硫化物矿物的同时, 可释放出

收稿日期: 2017–07–11; 修訂日期: 2017–08–18

基金项目: 国家自然科学基金项目“含砷复杂金矿细菌氧化矿物界面能及其作用机制的基础研究”(编号: U1608254)、“难浸含砷金矿细菌氧化过程中 $[\text{AsS}]^{2-} \rightarrow \text{As}(\text{III}) \rightarrow \text{As}(\text{V})$ 转化机理研究”(编号: 51374066)、辽宁省自然科学基金项目“利用 ASH-07 浸矿菌从含铜浮选尾矿中高效绿色回收铜的新技术研究”(编号: 2014020037) 和上海第二工业大学 2017 校基金项目“黄孢原毛平革菌对废弃手机线路板中金属回收及作用机理研究”(编号: A01GY17EX19) 联合资助

作者简介: 刘倩(1984–), 女, 山东菏泽人, 讲师, 从事电子废弃物资源化研究工作。 liuqian@sspu.edu.cn

* 通讯作者: 杨洪英(1960–), 女, 河北张家口人, 教授, 从事生物冶金研究工作。 yanghy@smm.neu.edu.cn

大量的有机物质,细菌和呈胶体状态的菌液覆盖在碳质物表面使其钝化,金浸出率由 15.02% 提高至 94.41%。东北寨金矿是典型的双重难处理金矿,金的直接氰化浸出率几乎为零;王安等^[8]研究发现,细菌氧化前后,金矿的碳含量变化不大,但金浸出率>95%,这说明氧化亚铁硫杆菌对碳质物有钝化作用。目前关于铁硫氧化菌对碳质物的作用尚未形成共识,甚至有一些研究者认为这些浸矿菌并不能有效地氧化和钝化碳质物,且其生长所需的酸性环境还可能会激活碳质物^[9~10]。由于具有低含量(1.0%~3.6%)、细粒度(0.002~2.000 μm)、晶态和非晶态碳共存等特点^[11],碳质金矿中碳质物的分离和表征都较为困难。鉴于上述原因,一些研究者用褐煤、次烟煤、烟煤、无烟煤、木屑和活性炭作为碳质金矿中碳质物的替代物,研究 *Streptomyces setonii* 和 *P.chrysosporium* 对其降解转化和“劫金”能力的影响,结果表明这 2 种微生物对上述碳质替代物均具有良好的降解效果,并能明显降低其“劫金”能力^[12~13]。

P.chrysosporium 是白腐真菌和整个真菌体系的模式菌种,属担子菌门,层菌纲,非褶菌目,伏革菌科的原毛平革菌属。与其他微生物相比,*P.chrysosporium* 具有胞外降解、酶无需底物诱导、底物的非专一性和对其他微生物的拮抗效应等优势。*P.chrysosporium* 具有特殊的生化机制及强大的降解能力。研究表明,*P.chrysosporium* 不仅能降解碳质物,还能通过表面改性和催化氧化降解硫化物矿物^[14~16]。故以 *P.chrysosporium* 作为试验菌种,评估其对碳质物的降解能力已成为当前研究热点。由于降解条件是影响 *P.chrysosporium* 对元素碳降解效果的关键因素,故本研究采用 Plackett–Burman 设计法筛选出与降解有高关联度的变量,以优化降解条件。

1 材料与方法

1.1 材料

采用去矿化—密度分离法(QK-MF)从陕西某金矿金精矿中提取元素碳^[17~18]。元素碳化学分析结果见表 1。QK-MF 元素碳的碳含量高达 85.34%,这说明所提取元素碳的纯度较高。

试验菌种 *P.chrysosporium*-RF-G-511 购自中国典型培养物保藏中心。由于该菌的降解酶系统通常由营养限制所触发^[10,19],故本试验选择限氮培

表 1 元素碳的化学分析(%)

Table 1 Chemical analysis of elemental carbon(%)

元素	质量分数	元素	质量分数
C	85.34	Ca	0.23
Fe	0.34	Al	1.06
Si	2.78	H	2.89
S	0.76	N	0.28
As	0.12	O	0.12

养基^[20]。该培养基的成分包括:葡萄糖 10 g/L, KH₂PO₄ 0.20 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, 酒石酸铵 0.37 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, VB 10.004 g/L, 微量元素混合液 70 mL/L。上述微量元素混合液的成分包括:甘氨酸 0.586 g/L, NaCl 1 g/L, CuSO₄ 0.10 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.01 g/L, Na₂MoO₄ 0.01 g/L, H₃BO₃ 0.01 g/L, KAl (SO₄)₂ 0.01 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.10 g/L, CaCl₂ 0.082 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.10 g/L, MgSO₄·7H₂O 3 g/L, MnSO₄·7H₂O 0.50 g/L。培养基初始 pH 值为 5。

1.2 元素碳的真菌降解

将 200 mL 培养基和 10 g 元素碳置于 500 mL 锥形瓶中于 121 °C 高压灭菌 20 min。冷却后,将 0.50 mL 孢子悬液(1×10^5 个/mL)接种至已灭菌培养基中,在 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 14 d 后,过滤,得深褐色滤液。将 pH 值调至 12 以上,此时滤液中产生大量絮状沉淀,此即水溶性加碱沉淀物。用超声波清洗真菌降解渣以去除培养基和菌丝体,干燥、称重并计算元素碳的失重率(Y)。

1.3 Plackett–Burman 设计法

Plackett–Burman 设计法是一种经济有效的两水平试验设计方法。Plackett–Burman 设计以不完全平衡块为原理进行试验设计,可以用较少的试验从众多的考察变量中快速、有效地筛选出最为重要的几个变量,供进一步详细研究使用。该设计通过 N 次试验考察最多(N-4)个变量对目标值的贡献,有从 4 次至 100 次(以 4 递增)的多种试验设计表可供选择,每个设计表中至少需留 3 列作为虚构变量用于对试验误差的估计。每个变量取高、低 2 种水平,但对某个因素高低水平的差值不能过大,以防掩盖了其他因素的重要性。本研究采用 Design-Expert 8.0 进行 Plackett–Burman 试验设计,以 Y 作为评价指标。

2 结果与讨论

为了保持较高的酶活性,得到一个持续稳定的

降解环境,在菌体生长及降解阶段需要添加一些特殊的营养物质,即诱导剂。愈创木酚与吐温-80都是诱导剂。糊精和草酸是 *P.chrysosporium* 代谢的中间产物,也是重要碳源。由过氧化氢合成酶产生的 H₂O₂ 可作为最初的反应底物开启木质素降解酶系统。除上述因素之外,元素碳真菌降解过程中的菌液浓度、作用时间和矿浆浓度也对其降解效果有重要影响。通过前期大量的单因素试验,选择愈创木酚浓度(A)、糊精浓度(B)、吐温-80 浓度(C)、草酸浓度(D)、过氧化氢浓度(E)、矿浆浓度(F)、真菌浓度(G)和作用时间(H)共 8 个因素进行降解条件的优化。Plackett-Burman 设计的因子及其水平如表 2 所示。每个变量取高、低 2 种水平,分别用+1 和 -1 表示,其中高水平值是低水平值的 1.25~1.50 倍。

表 2 Plackett-Burman 设计的变量及其水平

Table 2 Variables and their levels of Plackett-Burman design

变量编号	变量名	单位	低水平(-1)	高水平(+1)
A	愈创木酚浓度	mmol/L	1.80	2.30
B	糊精浓度	g/L	4.50	5.60
C	吐温-80 浓度	mg/L	6	7.50
D	草酸浓度	mg/L	32	40
E	H ₂ O ₂ 浓度	mg/L	180	225
F	矿浆浓度	%	3	4
G	真菌浓度	mL	3	3.80
H	作用时间	d	12	15

P.chrysosporium 降解元素碳的 Plackett-Burman 试验设计方案和结果如表 3 所示。本研究通过 12 组试验对 8 个变量的重要性进行评估。以限氮培养基作为初始试验条件,再根据试验设计方案,将上述 8 个因素按所设不同水平加入到降解体系中。根据试验结果筛选出对真菌降解元素碳有显著影响的变量。

采用 SPSS 19.0 对表 3 试验结果进行回归分析,其统计分析结果有回归系数、标准误差、*t* 值和 *p* 值(表 4)。其中可通过 *p* 值分析各变量的显著性水平, *p* 值越小则影响越显著。当 *p* 值 < 0.05 时,即可认为该变量对 *Y* 有显著影响。当 *p* 值 < 0.01 时,说明该变量对 *Y* 有极显著影响。由 8 个变量的回归系数和 *t* 值可知,除 D 与元素碳的降解呈正相关之外,其他 7 个变量均与元素碳的降解呈负相关。A、D、F 和 G 是对试验结果有显著影响的变量,D 和 F 是对试验结果有极显著影响的变量。由于 A 的 *p* 值小于 G,

故 A、D 和 F 是对真菌降解元素碳有重要影响的 3 个变量。由于 B、C、E 和 H 的 *p* 值 > 0.05, 故可认为这 4 个变量对试验结果没有显著影响,因此,这 4 个变量将不出现在下一步的响应曲面优化试验中。

表 3 Plackett-Burman 试验设计方案和结果

Table 3 Test design schedule and results of Plackett-Burman design

序号	A	B	C	D	E	F	G	H	Y/%
1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	4.20
2	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	19.16
3	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	21.03
4	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	2.27
5	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	6.77
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	21.00
7	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	15.81
8	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	5.58
9	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	19.71
10	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	15.02
11	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	2.79
12	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	9.38

表 4 Plackett-Burman 设计的统计分析

Table 4 Statistical analysis of Plackett-Burman design

变量	回归系数	标准误差	<i>t</i> 值	<i>p</i> 值
A	-9.995	1.905	-5.270	0.030
B	-1.437	0.886	-1.660	0.196
C	-0.895	0.635	-1.409	0.253
D	0.730	0.119	6.129	0.009
E	-0.026	0.024	-1.088	0.356
F	-25.603	0.952	-26.880	< 0.001
G	-5.220	1.191	-4.384	0.022
H	-0.555	0.317	-1.751	0.178

研究发现,在 *P.chrysosporium* 生长及降解异生物质的过程中,需要添加诱导剂以诱导一些酶的产生和提高酶活性。愈创木酚是一种诱导剂,它既是诱导底物,又是代谢底物,因此能促进元素碳的降解。研究发现,愈创木酚的加入量与元素碳的降解率并非成正比关系。低浓度的愈创木酚能发挥诱导剂的作用,可提高酶活性和诱导一些酶的产生。高浓度的愈创木酚则会抑制酶的产生和酶活性的提高,从而不利于元素碳的降解。草酸是 *P.chrysosporium* 在次生代谢阶段产生的一种有机酸,也是一种碳源。草酸通过调节降解体系的 pH 值来影响菌体的生长及酶活性。矿浆浓度会影响元素碳和真菌的有效接触面积和降解体系的剪切力和传质效率。由于该试验是在 500 mL 锥形瓶中及振荡

条件下进行的,过大的剪切力会干扰真菌生长及其酶的合成和分泌,从而不利于元素碳的降解。此外,由于加入的元素碳可覆盖在菌体表面,过高的矿浆浓度会影响真菌与外界的传质效率,进而影响其对元素碳的降解。

3 结论

利用Plackett-Burman 试验设计法从 8 个变量中筛选出对 *P.chrysosporium* 降解元素碳有重要影响的 3 个高关联度变量,分别为愈创木酚浓度、草酸浓度和矿浆浓度。其中,草酸浓度和矿浆浓度对真菌降解元素碳有极显著影响。糊精浓度、吐温-80 浓度、过氧化氢浓度和作用时间因对试验结果无显著影响,故不对其进行优化试验。低浓度愈创木酚能促进元素碳的降解,高浓度愈创木酚则会对元素碳的降解产生抑制作用。草酸通过调节降解体系的 pH 值影响菌体生长及酶活性,进而影响真菌降解元素碳。矿浆浓度通过影响元素碳和真菌的有效接触面积以及降解体系的剪切力和传质效率的方式影响真菌对元素碳的降解。

参考文献(References):

- [1] Hu R Z,Su W C,Bi X X,et al.Geology and geochemistry of Carlin-type gold deposits in China[J].Mineralium Deposita, 2002,37(3/4):378–392.
- [2] Pu Chuanjie,Gao Zhenmin.A comparison study on Carlin-type gold deposits at home and abroad[J].Yunnan Geology,2003, 22(1):27–38.[普传杰,高振敏.国内外卡林型金矿对比研究[J].云南地质,2003,22(1):27–38.]
- [3] Tan H,Feng D,Luke G C,et al.The behaviour of carbonaceous matter in cyanide leaching of gold[J].Hydrometallurgy,2005, 78(3/4):226–235.
- [4] Ofori-Sarpong G,Amankwah R K,Osseo-Asare K.Reduction of preg -robbing by biomodified carbonaceous matter:A proposed mechanism [J].Minerals Engineering,2013,42(3): 29–35.
- [5] Uyguner C S,Bekbolet M.Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by UV-vis and fluorescence spectroscopy [J].Catalysis Today,2005,101(3/4):267–274.
- [6] Schmitz P A,Duyvesteyn S,Johnson W P,et al.Adsorption of aurocyanide complexes onto carbonaceous matter from preg-robbing Goldstrike ore[J].Hydrometallurgy,2001,61(2): 121–135.
- [7] Yang Feng,Xu Xiangbin,Zhao Junwei,et al.Experimental study on bacterial oxidation of carbon-bearing high arsenic refractory gold concentrates[J].Gold,2003,24(4):37–39.[杨凤,徐祥彬,赵俊蔚,等.含碳高砷型难浸金精矿细菌氧化试验研究[J].黄金,2003,24(4):37–39.]
- [8] Wang An,Zhang Yongkui,Liu Hanzhao.The property of carboniferous species and its effect on leaching of gold in Dongbeizhai gold mine[J].Multipurpose Utilization of Mineral Resources,2000(3):4–8.[王安,张永奎,刘汉钊.东北寨金矿碳质物的性质及其对金浸出的影响[J].矿产综合利用,2000(3):4–8.]
- [9] Amankwah R K,Yen W T,Ramsay J A.A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores[J].Minerals Engineering,2005,18(1):103–108.
- [10] Sato S,Liu F,Koc H,et al.Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates[J].Microbiology,2007,153(9):3023–3033.
- [11] Yang H Y,Liu Q,Song X L,et al.Research status of carbonaceous matter in carbonaceous gold ores and biooxidation pretreatment[J].Transactions of Nonferrous Metals Society of China,2013,23(11):3405–3411.
- [12] Ofori-Sarpong G,Tien M,Osseo-Asare K.Mycohydrometallurgy:Coal model for potential reduction of preg-robbing capacity of carbonaceous gold ores using the fungus,*Phanerochaete chrysosporium*[J].Hydrometallurgy,2010,102(1–4):66–72.
- [13] Liu Q,Yang H Y,Tong L L.Influence of *Phanerochaete chrysosporium* on degradation and preg-robbing capacity of activated carbon [J].Transactions of Nonferrous Metals Society of China,2014,24(6):1905–1911.
- [14] Ofori-Sarpong G ,Osseo-Asare K,Tien M.Fungal pretreatment of sulfides in refractory gold ores[J].Minerals Engineering,2011,24(6):499–504.
- [15] Yang Zhaohui,Deng Enjian,Zeng Guangming,et al.Desulfurization of coal by *Phanerochaete chrysosporium*[J].China Environmental Science,2006,26(2):192–196.[杨朝晖,邓恩建,曾光明,等.黄孢原毛平革菌用于煤炭脱硫的特性[J].中国环境科学,2006,26(2):192–196.]
- [16] Liu Q,Yang H Y,Qiao L L.Biotransformation of arsenopyrite by *Phanerochaete chrysosporium*[J].Advanced Materials Research,2013,825:309–313.
- [17] Stenebraten J F,Johnson W P,Brosnahan D R.Characterization of Goldstrike ore carbonaceous material.Part 1;Chemical characteristics [J].Minerals and Metallurgical Processing,

- 1999, 16(3):37–43.
- [18] Tafuri W J. Geology and Geochemistry of the Mercur Mining District , Tooele County , Utah [D]. Salt Lake: University of Utah, 1987.
- [19] Garg S K, Modi D R. Decolorization of pulp–paper mill efflu-
- ents by white–rot fungi[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2008, 19(2):85–112.
- [20] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in Enzymology, 1988, 161: 238–249.

Screening of High Correlation Variables of Elemental Carbon Degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in Carbonaceous Gold Ores

LIU Qian¹, YANG Hongying², TONG Linlin²

1. Shanghai Collaborative Innovation Centre for WEEE Recycling, Shanghai Polytechnic University, Shanghai 201209, China;

2. School of Metallurgy, Northeastern University, Shenyang 110819, Liaoning, China

Abstract: The high correlation variables of the elemental carbon degradation with *P.chrysosporium* were selected in carbonaceous gold ores by Plackett-Burman design method. Eight variables of fungal degradation of carbonaceous matter were confirmed by the previous single factor experiments, which were the guaiacol concentration, the dextrin concentration, the tween-80 concentration, the oxalic acid concentration, the hydrogen peroxide concentration, the pulp density, the fungal concentration and the reaction time. The high correlation variables influencing the fungal degradation of elemental carbon, as identified by a two-level Plackett-Burman design method, were the guaiacol concentration, the oxalic acid concentration and the pulp density. Guaiacol is a kind of inducer. The low concentration of guaiacol could promote the degradation of elemental carbon by improving the enzyme activity and inducing the production of enzymes. The high concentration of guaiacol was not conducive to the fungal degradation of elemental carbon because the generation of enzymes and the enzyme activity were inhibited. Oxalic acid could affect the fungal growth and the enzymes activity by adjusting pH value of the degradation system. The pulp density could influence the effective contact area between elemental carbon and fungi, the shear stress and the mass transfer efficiency of degradation system.

Key words: *P.chrysosporium*; elemental carbon; high correlation variables; Plackett-Burman design method; screening; carbonaceous gold ores

德国黄金市场蓬勃发展的 10 年

过去 10 年德国黄金投资市场得到了蓬勃发展。面对连续金融危机和宽松的货币政策,德国投资者转向投资黄金来争取财富。作为回应,新产品提供商进入市场,使人们更容易进行投资。去年,超过 60 亿欧元资金投入德国黄金投资市场,令人鼓舞的是,德国黄金市场还有进一步增长的空间,消费者研究表明仍存在潜在零售行业可以利用的需求。

过去 10 年中,德国投资市场发生了强劲转型。在

2008 年之前,德国投资市场微不足道。2007 年之前,德国没有上市的黄金交易所交易品(ETC)市场。到 2009 年,德国的黄金投资市场发展成为世界上最大的投资市场之一。随后,更多黄金支持的 ETC 产品进入市场,德国黄金投资市场蓬勃发展。发展到 2016 年,有 68 亿欧元用于德国黄金投资产品,充满活力的国内 ETC 市场在德国得到长足发展。2017 年第三季度,德国上市的 ETC 资产管理规模突破了 252.1 t,相当于 98 亿欧元的历史最高纪录。

来源 : <https://www.gold.org/research/market-update/market-update-german-investment-market>

《黄金科学技术》编译