

灵芝属木质素降解高效菌株筛选

张金萍, 王敬文, 姜景民, 杨卫东

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 漆酶; 木质素降解酶; 锰过氧化物酶; 灵芝菌

中图分类号: S759.81 文献标识码: A

Comparison on Lignin-degrading Enzymes of *Ganoderma-lucidum* Fungi

ZHANG Jin-ping, WANG Jing-wen, JIANG Jing-min, YANG Wei-dong

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The diagnostic methods of extracellular oxidase were used to select lignin-degrading enzymes producers among nineteen *Ganoderma lucidum* fungal strains. The results showed that the producing laccase activity of *G. sp. var. Tianzhi* was the highest, followed by that of *G. lucidum* 10 and *G. lucidum* 8. The producing lignin peroxidase activity of *G. sp. var. Tianzhi* was the highest, and the producing Manganese peroxidase activity of *G. sp. var. Yuanzhi* 6 and *G. lucidum* G 8 were the highest, followed by that of the *G. sp. var. Tianzhi* and *G. lucidum* 10. It was found that *G. sp. var. Tianzhi*, *G. sp. var. Yuanzhi* 6, *G. lucidum* 8 and *G. lucidum* 10 showed the highest lignin-degrading enzymes activity.

Key words: laccase; lignin peroxidase; manganese peroxidase; *Ganoderma* fungi

木质素是人类可再生的纤维资源之一, 是植物纤维中蕴藏太阳能极大的物质, 是石油最大的代用品。目前, 在纺织和制浆造纸等方面, 木质素作为废弃物被排放, 近 20 多年的研究证明了白腐菌是主要的木质素降解酶产生菌, 最终能将木质素矿化为 CO₂ 和水。已知的白腐菌有数千种, 但目前用于木质素研究的仅有 10 余种, 主要有栓菌属(*Trametes*)、烟管菌属(*Bjerkandera*)、平革菌属(*Phanerochaete*)、侧耳属(*Pleurotus*)、香菇属(*Lentinula*) 等^[1]。自然界中灵芝菌的菌丝只能利用木质素及其它小分子的碳水化合物, 留下纤维素和半纤维素, 使朽木呈现白色腐朽, 因此在森林病理学中将灵芝属(*Ganoderma*) 划归在白腐菌种类。关于灵芝属木质素降解酶的研究少见报道。本文从 16 种食用灵芝菌中筛选出高活性木质素降解酶产生菌, 并比较了 3 种主要木质素降解酶即漆酶(Laccase, 简称 Lac)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, 简称 Lip) 和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, 简称 Mnp) 的活性, 其目的是从灵芝属

中筛选出对木质素降解能力较强菌株, 为进一步开发利用木质素提供更多种类的菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验用菌株共 18 株(包括 2 株对照菌), 2 株购自中科院微生物研究所, 4 株购自中国农科院上海食用菌研究所, 4 株购自武汉华中农业大学, 8 株购自山东省济宁。这些菌株包括: 紫灵芝(*Ganoderma sinense* J. D. Zhao, L. W. Hsu et X. Q. Zhang)、韩国灵芝 1 号(*G. koreanese* 1)、韩国灵芝 2 号(*G. koreanese* 2)、红灵芝(*G. applanatum* (Pers.) Pat.)、赤芝 G8(*G. lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. 8)、甜芝(*G. sp. var. Tianzhi*)、台湾血芝(*G. formosanum* Chang et Chen)、黑芝(*G. atrum*)、圆芝 6 号(*G. sp. var. Yuanzhi* 6)、灵芝 10 号(*G. lucidum* 10)、泰山仙芝(*G. sp. var. Taishan* 野生选育种)、赤芝 12 号(*G. lucidum* 12)、白边灵芝(*G. albimarginatum* He)、南韩灵芝(*G. sp.*)、日本红芝(*G. japonicum* (Fr.)

收稿日期: 2004-05-18

基金项目: 浙江省自然科学基金项目“酶法降解木质素的研究”(项目编号 202112)

作者简介: 张金萍(1971-), 女, 山西翼城人, 助理研究员。

Lloyd)、大仙 823(*G. sp. var. Dakian* 野生选育)。以黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) 简称 P. C) (CK₁) 和云芝(*Coriolus versicolor*) 菌(CK₂)^[2] 作对照菌。

1.2 培养基

PDA 培养基(1 L): 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 3 g, 琼脂 15 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, VitB₁ 微量。

MS 液体培养基(1 L): 葡萄糖 20 g, NH₄NO₃ 1.65 g, KNO₃ 1.9 g, CaCl₂·2H₂O 0.44 g, MgSO₄·7H₂O 0.37 g, KH₂PO₄ 0.17 g, 微量元素液配方(1 L): KT 0.83 mg, H₃BO₃ 6.2 mg, MnSO₄·4H₂O 22.3 mg, ZnSO₄·7H₂O 8.6 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25 mg, CuSO₄·5H₂O 0.025 mg, CoCl₂·6H₂O 0.025 mg, Na₂EDTA 37.3 mg, FeSO₄·7H₂O 27.8 mg。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养方法 将待试菌斜面接种于灭菌后的 PDA 固体培养基上活化培养, 将活化了的菌种接种于平板上, 25 °C 恒温培养 5~11 d, 进行显色能力检测。在 250 mL 三角瓶中装入 50 mL MS 培养液, 灭菌冷却后接入 7 d 龄菌丝, 28 °C, 110 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 7 d 备用。

1.3.2 显色反应^[3] 漆酶检测法: 将 0.5 g 愈创木酚加入到 30 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶液中, 用此溶液滴定在培养 5、8、11 d 的菌落边缘, 滴定区变红褐色, 表示有漆酶产生, 依据显色程度目测其产酶能力。

过氧化物酶检测法: 将等体积的体积分数分别为 0.4% 过氧化氢和 0.1% 联苯胺混合液滴定菌落边缘, 当有过氧化物酶存在时, 滴下区显黄褐色。

1.3.3 粗酶液制备 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 液体培养基, 115 °C 下灭菌 30 min, 冷却后接入 2 mL 接种母液, 每菌种 3 个重复, 110 r·min⁻¹, 28 °C 恒温振荡培养, 于 6、8、10、12、14 d 各取样 1 次, 过滤制得粗酶液, 冰箱保存备用。

1.3.4 酶活性测定方法 (1) 漆酶活性: 按周金燕等^[4]方法进行, 酶的单位定义为每分钟吸光值增加 0.1 的酶液量为一个活力单位; (2) 木质素过氧化物酶活性测定方法见文献^[5]; (3) 锰过氧化物酶活性测定方法见文献^[5](略有改动)。

2 结果与分析

2.1 不同灵芝菌显色结果的差异

由平板显色结果看出, 在相同的条件下, 参试的 16 株菌中有 10 株菌在 5、8、10 d 时分别有不同程度

的产漆酶和过氧化物酶能力(表 1), 说明这些菌具有一定降解木质素的能力。在变色实验观察中, 培养温度会影响菌丝生长, 菌丝生长与变色区有一定的关系: 有 18% 的菌株的变色区域超过菌丝生长, 说明该菌分泌木质素降解酶的能力强, 有 12% 的菌株菌丝生长区超过变色区, 说明该菌分泌降解木质素酶的能力弱, 其余菌丝生长处都显色。

平板显色结果表明: 漆酶活力检测中, 甜芝、赤芝 G8、灵芝 10 号和对照 CK₂ 生长最快, 显色最快, 圆芝 6 号次之, 另一株对照菌 CK₁ 不显色, 已知该菌在静置条件下不产生漆酶^[6], 因此该结果与之相吻合。木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶被认为是过氧化物酶降解木质素时的重要组成酶。通过对 16 株灵芝菌过氧化物酶活性的检测, 间接反映了其产木质素降解酶的能力, 在过氧化物酶活力检测中甜芝、圆芝 6 号、赤芝 G8 和 2 株对照菌生长最快, 显色最快, 灵芝 10 号、黑芝、紫芝、韩芝等次之。

表 1 漆酶和过氧化物酶平板检测产酶菌种

菌种名称	漆酶			过氧化物酶		
	5 d	8 d	11 d	5 d	8 d	11 d
赤芝 G8	+++	+++	+++	±	+++	+++
圆芝 6 号	+	+	++	++	++++	++++
灵芝 10 号	++	++	+++	+	++	++
甜芝	+++	+++	++++	+++	+++	++++
日本红芝	-	-	±	+	+	+
黑芝	-	+	+	++	++	++
紫灵芝	-	±	+	++	++	++
白灵芝	+	+	+	-	±	+
韩国灵芝	-	-	±	++	++	++
泰山仙芝	+	+	+	-	-	±
云芝(CK ₂)	++	+++	++++	±	++	+++
P. C.(CK ₁)	-	-	-	++	+++	++++

注: - 不变色; ± 开始变色; +、++、+++ 变色能力渐增; ++++ 全变色。

2.2 漆酶活性比较

漆酶作为一种含铜的多酚氧化酶, 它在木质素的生物降解中, 在各种酚类和丁香醛型化合物的反应中发挥一定的作用^[7]。对用平板显色法选出的 10 株有显色反应的菌株(表 1)和 2 株对照菌进行了漆酶活性的比较。结果显示: 几乎所有菌株在第 14 天都表现出最大漆酶活性, 甜芝、灵芝 10 号和赤芝 G8 的漆酶活性相对较高, 其中甜芝在第 12、14 天时漆酶活性超过对照 CK₂, 其余 3 株的漆酶活性略低于对照 CK₂(图 1)。另一对照 CK₁ 几乎没有漆酶活性(图中未显示)。

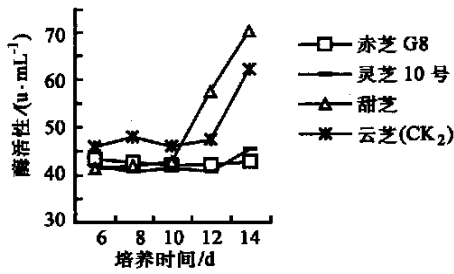


图 1 漆酶活性的比较

(图中仅列最高酶活性的 3 株菌和 1 株对照菌)

2.3 木质素过氧化物酶活性比较

木质素过氧化物酶(Lip)是自然界中唯一依赖 H₂O₂ 为供体的氧化还原酶,是含血红素辅基的酶类,能将木质素降解为芳香醛、醌、酸等有用物质^[7]。对选出的产过氧化物酶能力较高的 9 株菌(甜芝、赤芝 G8、灵芝 10 号、圆芝 6 号、日本红芝、黑芝、紫灵芝、白灵芝、韩国灵芝)和 2 个对照菌(P.C 和云芝)进行活性测定,结果表明:它们都具有较好的木质素过氧化物酶活性,第 12、14 天时有 4 株菌出现高酶活,第 12、14 天时,甜芝是对照 CK₁ 的 1.4 和 1.6 倍,是对照 CK₂ 的 3.2 和 2.3 倍(图 2)。

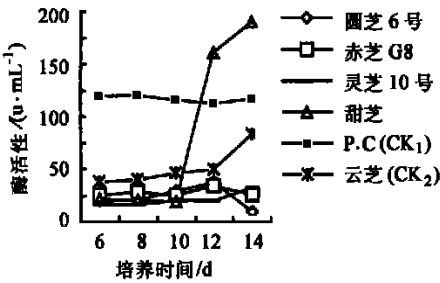


图 2 木质素过氧化物酶活性的比较

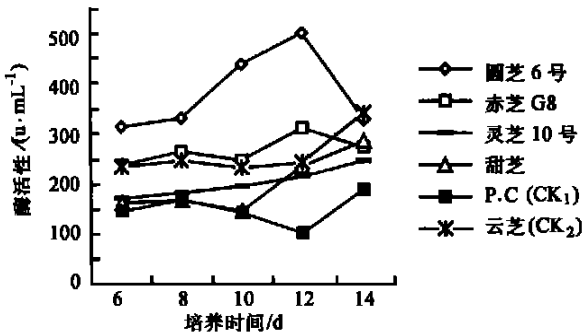


图 3 锰过氧化物酶活性的比较

2.4 锰过氧化物酶活性比较

锰过氧化物酶(Mnp)催化木质素降解,使 Mn²⁺ 变成 Mn³⁺^[8]。锰过氧化物酶活性测试结果表明:第 12

天时圆芝 6 号和赤芝 G8 出现高酶活性;第 14 天时,甜芝和灵芝 10 号及 2 株对照菌出现高酶活性。产锰过氧化物酶活性最高的圆芝 6 号是对照 CK₁ 的 4.8 倍,是对照 CK₂ 的 2 倍。赤芝 G8 的酶活性除第 14 d 略低于对照 CK₂ 外,均高于 2 株对照菌,甜芝和灵芝 10 号的酶活性高于对照 CK₁ 而低于对照 CK₂(图 3)。

3 讨论

实验结果表明:在给定实验条件下的 16 个灵芝菌株中,甜芝、圆芝 6 号、赤芝 G8 和灵芝 10 号为产木质素降解酶最好的菌株,在平板显色试验中,有 10 株菌在漆酶和过氧化物酶检测中显色,这种显色试验仅为简单判断,只能做初步筛选。图 1~3 的酶活性测定结果显示,前述酶活性较高的 4 菌株和 2 对照菌株的酶活性高低及变化趋势与平板显色结果基本一致。本次试验虽然有 3 株菌(甜芝、圆芝 6 号赤芝 G8)的 3 种胞外木质素降解酶活性比 2 株对照菌的高,但此酶活性仅为一般条件下的初步筛选,不能说明是每株菌的最高酶活性。液体培养基(MS)与 Kirk^[9]、Gold^[10]、周金燕^[4]等人的相比,在试验条件和方法上存在差异。3 种胞外木质素降解酶是次生代谢过程中,在 C、N 源几乎耗尽的情况下分泌的,因此,被筛选出来的菌株需进一步优化产酶条件及产酶性质研究,有关试验及对最好菌株进行直接降解木质素的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 刘尚旭,赖寒.木质素降解酶的分子生物学研究进展[J].重庆教育学院学报,2001,14(3):64~67
- [2] 陈敏忠,王伟槐,甘习华,等.白腐菌云芝腐朽杨木的超微结构研究[J].南京林业大学学报,1996,20(1):48~52
- [3] 王亚珍,吴代禹,池玉杰,等.针叶树上主要多孔菌培养特性[J].东北林业大学学报,1998,26(5):26~29
- [4] 周金燕,张发群,桑原正章.真菌产锰过氧化物酶和漆酶的研究.1.富氮培养基筛选产酶的真菌[J].微生物学报,1993(5):387~391
- [5] 丁少军,王传槐.不同培养条件对云芝(*Coridus versicolor*)木质素降解酶产酶影响的研究[J].纤维素科学与技术,1994,2(2):36~46
- [6] 段新浙,卢雪梅,王蔚,等.黄孢原毛平革菌合成漆酶能力的研究[J].山东大学学报,2002,37(1):91~94
- [7] 刘尚旭.P. *ostreatus* 8101 菌株木质素降解酶的研究[J].重庆教育学院学报,2002,15(6):45~48
- [8] Childs R E, Bardsley W G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino di(3-ethyl benzothiazoline 6-sulphonic acid) as chromogen[J]. Biochem J, 1975, 145: 93~103
- [9] Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin[J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 465~505
- [10] Gold M H, Glenn J K. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[A]. In: Wood W A, Kellog S T. Methods enzymology San Diego[M]. CA: Academic Press, 1988: 258~264