

文章编号: 1003- 8701(2008)02- 0043- 05

白腐真菌产木质素降解酶的条件及酶学性质的研究

崔艳红, 张海棠, 孟庆辉, 王艳荣

(河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 本研究以酶活力为评价指标, 通过产酶条件的优化, 选择出白腐真菌的最适培养条件, 并对其部分酶作用特性进行了研究。试验结果表明: 白腐真菌产锰过氧化物酶的最适培养条件是: 最佳碳源是麸皮, 葡萄糖(碳源)对酶活力影响不大; 最佳氮源是牛肉膏; 最佳培养时间是 96 h。该菌产漆酶的最适培养条件是: 最佳碳源是麸皮; 最佳氮源是牛肉膏; 最佳培养时间是 96 h。锰过氧化物酶的最适 pH 范围是 4.4~4.8, 最适底物浓度是 1.2 mmol/L, 最适反应温度是 35~40℃; 漆酶的最适 pH 为 4.8, 最适底物浓度是 1.2 mmol/L, 最适反应温度是 40℃。金属离子 Cu^{2+} , Co^{2+} 对锰过氧化物酶和漆酶有激活作用, Fe^{2+} 对两种酶活力有一定的抑制作用, 而 Ag^+ 则完全抑制漆酶的活性, Mg^{2+} 对两种酶活力影响不大。

关键词: 白腐真菌; 木质素降解酶; 锰过氧化物酶; 漆酶; 产酶条件; 酶作用特性

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

Studies on Production Conditions and Properties of Ligninolytic Enzymes from White Rot Fungi

CUI Yan-hong, ZHANG Hai-tang, MENG Qing-hui, WANG Yan-rong

(College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Taking enzyme vitality as evaluation criterion, the culture conditions of white rot fungi were optimized and parts of function character of enzyme were studied. The results showed that the optimal conditions for White rot fungi to produce manganese peroxidase was as follows: Bran was the best source of carbon, glucose has not distinct effect to enzyme vitality; beef cream was the optimal source of nitrogen; and the best time to culture was 96 hours. The optimal conditions for white rot fungi to produce laccase were as similar as that of manganese peroxidase. The optimal pH range for manganese peroxidase was 4.4-4.8, the optimal concentrations of substrates was 1.2 mmol/L, the optimal temperature for reaction was 35℃. The optimal pH for Laccase was 4.8, the optimal concentrations of substrates was 1.2 mmol/L, the optimal temperature for reaction was 40℃. Cu^{2+} and Co^{2+} have activation to manganese peroxidase and Laccase, Fe^{2+} has some inhibition to them. However, Ag^+ completely inhibit the vitality of Laccase, Mg^{2+} has little effect to the vitality of two enzymes.

Key words: White-rot-fungi; Ligninolytic enzymes; Manganese peroxidase; Laccase; Enzyme-producing conditions; Function character of enzyme

目前我国饲料原料资源不足的状况日趋严重, 因而开发和有效利用各种资源, 不断降低配合饲料中常规饲料原料的比重, 对缓解饲料资源紧缺、降低饲料成本具有重要意义。木质素资源丰

富, 来源广泛, 其有效利用不仅可以缓解饲料原料紧缺, 而且还可以减少环境污染^[1-2]。但动物体内缺乏降解木质素的酶类, 因此很难将其作为有效的饲料来源, 当前, 降解木质素最行之有效的方法是在畜禽饲料中添加木质素降解酶类, 以破坏其大分子结构, 降解、释放小分子物质, 提高整个营养物质的消化利用率, 从而提高其饲用价值^[1-4]。随着生物技术的发展, 酶制剂尤其是纤维素酶和

收稿日期: 2007- 10- 29

基金项目: 河南科技学院重点科研项目资助基金(4018)

作者简介: 崔艳红(1975-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术在饲料中的应用研究。

蛋白酶在饲料行业中得到广泛应用,木质素酶尚处在实验研究阶段,离商业化应用还有很大的距离,再加上对饲料资源开发的紧迫性和重要性,所以近几年木质素酶类的研究逐渐受到重视。

本文选用白腐真菌中能产生较强锰过氧化物酶和漆酶活力的菌株 5.776,研究了不同温度、碳源、氮源、培养时间对菌株 5.776 产锰过氧化物酶和漆酶的影响,以确定其最优培养条件,并对锰过氧化物酶和漆酶的部分作用特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养条件

1.1.1 菌种

白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 5.776,购自微生物菌种保藏中心经实验室保存。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 综合 PDA 培养基 (用于白腐真菌 5.776 扩大培养和菌种分离纯化)

马铃薯提取液 1 000 mL、 KH_2PO_4 1.0g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 15.0 g、维生素 B_1 微量 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, pH6.0。

1.1.2.2 基础液体产酶培养基(L-1)

葡萄糖 10.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、维生素 B_1 50 μg 、Mandel's 无机营养液 1 L。

1.1.3 Mandel's 无机营养液

常量元素液: KH_2PO_4 2.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、 CaCl_2 0.3 g, 加蒸馏水 600 mL 使之溶解。

微量元素液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg/L、 CoSO_4 2.0 mg/L, 加蒸馏水 200 mL 使之溶解。

Mandel's 无机营养液: 将常量元素液与微量元素液混合后,用 HCl 调 pH 5.5,再以蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 主要仪器及试剂

722-型光栅分光光度计(山东高密分析仪器厂)、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、分析天平 AB240-N(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)、恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)、电热鼓风干燥箱(上海实验仪器有限公司)、802-型离心机(江苏金坛大地自动化仪器厂)、愈创木酚及其他药品均为分析纯或化学纯、小麦秸(新乡郊区采购)。

1.3 方法

1.3.1 孢子悬液的制备^[5]

PDA 培养基培养 5d 的菌丝体加入到无菌水中,玻璃珠打碎后,进行孢子计数,然后按照不同的量接入到 250 mL 三角瓶中,三角瓶装液量 100 mL,接种量(以孢子计) 1.0×10^6 个/mL(培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 转速 3 000 r/min 培养 5 d)。

1.3.2 液体静置培养^[6]

取 30 mL 液体基础培养基装入 150 mL 三角瓶中,121 $^{\circ}\text{C}/30\text{min}$ 灭菌,冷却,接 5.776 原种,每瓶接种量 1.0×10^6 个孢子/mL,3 个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 d。

1.3.3 粗酶液制备

离心机 3 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.4 锰过氧化物酶活力测定

取 1.5 mL 浓度为 50 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[7](pH4.5),1 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的愈创木酚,1 mL 粗酶液和 0.5 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 ,放在 25 mL 试管中振荡混匀,预热至 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,反应结束 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸灭活 5 min,立即冷却然后加蒸馏水至 20 mL 混匀,用 722-型光栅分光光度计 465 nm 下测定 10 min 内 OD。定义每分钟使 OD465 值改变 0.01 为一个酶活力单位(u/mL)。

1.5 漆酶活力测定

取 1.5 mL 浓度为 50 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[8](pH4.5),1 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的愈创木酚和 1 mL 粗酶液,放在 25 mL 试管中振荡混匀,预热至 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,反应结束 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸灭活 5 min,立即冷却然后加蒸馏水至 20 mL 混匀,用 722-型光栅分光光度计 465 nm 下测定 10 min 内 OD。定义每分钟使 OD465 值改变 0.01 为一个酶活力单位(u/mL)。

2 结果

2.1 优化产酶条件的建立

2.1.1 不同碳源对产酶的影响

分别以葡萄糖、甘露糖、蔗糖、可溶性淀粉、麸皮为基础液体发酵产酶培养基中唯一碳源,分别接种菌株于不同碳源的基础液体产酶培养基中^[9],于 37 $^{\circ}\text{C}$,静置培养 5 d,进行酶活力的测定。试验结果(图 1):在以麸皮为碳源时锰过氧化物酶活力最高达到 220 u/mL;以麸皮作为碳源,该菌分泌锰过氧化物酶的酶活比葡萄糖为碳源时的高 1.22

倍,比甘露糖为碳源时的高 1.19 倍,比蔗糖为碳源时的高 1.29 倍,比可溶性淀粉为碳源时的高 1.31 倍;所以,麸皮是产锰过氧化物酶最适碳源。

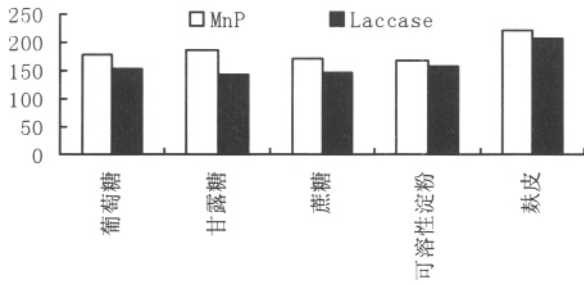


图 1 不同碳源对产酶的影响

漆酶活力也是以麸皮为碳源时最高,达到208 u/mL,麸皮为最佳碳源。以麸皮作为碳源,该菌分泌漆酶的酶活比葡萄糖为碳源时的高1.37倍,比甘露糖为碳源时的高1.44倍,比蔗糖为碳源时的高1.41倍,比可溶性淀粉为碳源时的高1.33倍,由此可见,以麸皮为碳源漆酶的合成最好。

综上所述结果表明,不同碳源对产锰过氧化物酶和漆酶的效果各异,同一碳源对产锰过氧化物酶和漆酶的作用效果也不同。麸皮是合成产锰过氧化物酶和漆酶最适培养基碳源。

2.1.2 不同氮源对产酶的影响

分别以牛肉膏、蛋白胨、尿素、硫酸铵、草酸铵作为基础液体产酶培养基中唯一氮源,分别接种菌株于不同氮源的基础液体产酶培养基中^[10],于 37℃,静置培养 5 d,进行酶活力测定。

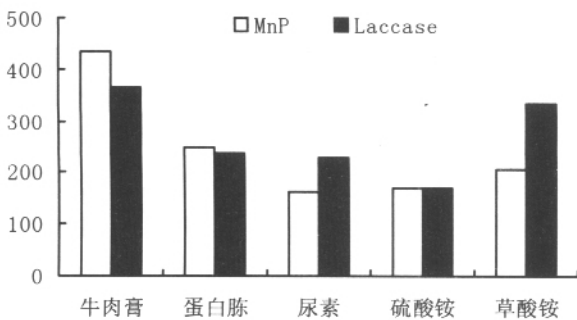


图 2 不同氮源对产酶的影响

改变基础液体培养基中氮源种类,由图 2 可见,在以牛肉膏作为氮源时锰过氧化物酶活力最高达到 436 u/mL,以不同氮源,该菌分泌锰过氧化物酶的酶活从高到低顺序依次为牛肉膏、蛋白胨、草酸铵、硫酸铵、尿素。牛肉膏作氮源时漆酶活力也最高,达到 364 u/mL,以不同氮源,该菌分泌漆酶的酶活顺序是牛肉膏、草酸铵、蛋白胨、尿素、硫

酸铵。所以,牛肉膏是合成锰过氧化物酶和漆酶最适培养基氮源。

2.1.3 培养时间对产酶的影响

在基础液体产酶培养基中培养,培养至 24 h 开始取样,以后每 12 h 取样测定一次,菌株 5.776 在 84~96 h 达到产锰过氧化物酶的高峰,这与培养基中限量氮源耗尽有关,锰过氧化物酶活在 96 h 酶活力高达 448 u/mL;在 120~144 h 酶活力下降迅速,但在 156~168 h 时又出现酶活的急剧上升,是否会出现新的产酶高峰,有待进一步研究。漆酶从 72 h 酶活开始提高,96 h 出现产酶高峰,酶活力达到 196 u/mL,且从第 5 d 到第 8 d 酶活均维持在较高水平上,而且在整个生长周期内酶活的变化不大(图 3)。

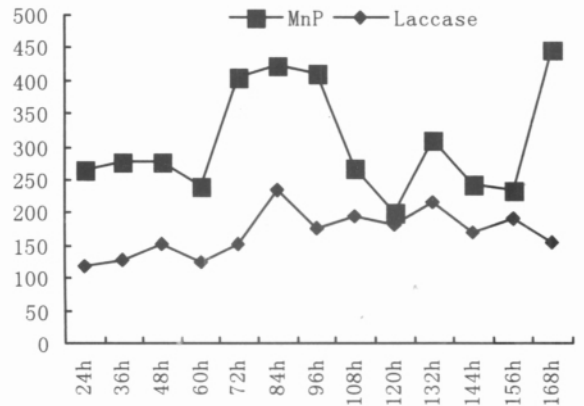


图 3 培养时间对产酶的影响

2.2 酶作用特性研究

2.2.1 酶作用最适温度

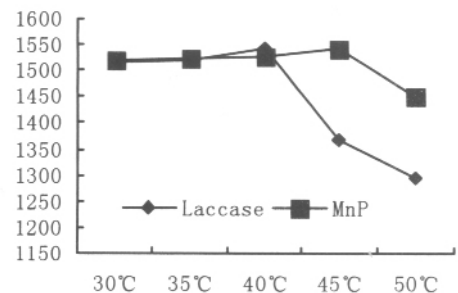


图 4 酶作用最适温度

于不同温度^[11]下进行酶解反应。锰过氧化物酶的最适反应温度为 35~45℃,超过 45℃ 酶活急剧下降,可能与温度超过 45℃ 酶被灭活有关。漆酶的最适反应温度约为 40℃。温度对漆酶酶解的影响较大,在实验条件下最适酶解温度为 35℃,和其它报道相比略低,可能是不同菌株之间有所

差异(图 4)。

2.2.2 酶作用最适 pH 值

分别于 pH3.0、4.0、4.4、4.8、5.0、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[12]中进行酶解反应, 锰过氧化物酶的最适反应 pH 为 4.8, 达到最适 pH 后酶活急剧下降呈正态分布。漆酶从 pH4.0~5.0 都表现出较高活力, 在 pH4.8 达到最高活力, 4.8 为其最适反应 pH。漆酶在 pH4.0~4.8 时酶活力表现很强的稳定性, 该漆酶为适酸酶。和秦小琼报道的红栓菌漆酶最适 pH4.0 相近, 但和秦小琼报道的彩绒革盖菌漆酶最适 pH4.6 略有区别。秦小琼等曾作了不同来源漆酶的最适酶解 pH 值方面的研究, 不同来源的漆酶其最适 pH 值确有差别, 这说明不同来源漆酶虽能作用于同一底物, 但酶的组成、结构可能有所差异(图 5)。

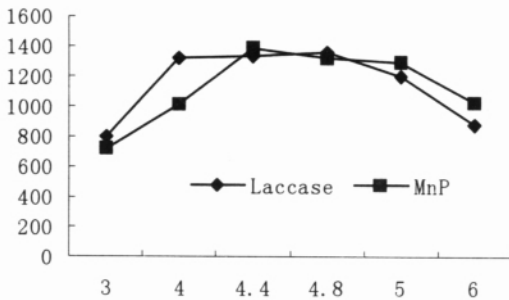


图 5 酶作用最适 pH

2.2.3 酶作用最适底物浓度

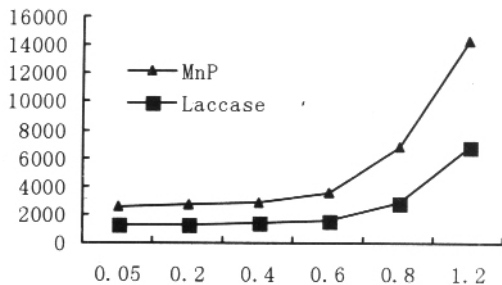


图 6 酶作用最适底物浓度

底物浓度分别为 0.05、0.2、0.4、0.8、1.2 mmol/L 的愈创木酚, 结果显示, 底物浓度在 0.05~0.8 mmol/L 酶活变化不大, 底物浓度在 0.8~1.2 mmol/L 酶活急剧提高(图 6)。

2.2.4 金属离子对酶作用特性影响

在粗酶液分别加入 1 mmol/L 的 AgNO_3 、 FeSO_4 、 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 CoSO_4 1 mL, 结果表明, Cu^{2+} 、 Co^{2+} 对锰过氧化物酶和漆酶有激活作用, 但 Cu^{2+} 在 pH4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中对漆

酶没有激活作用, 反而有一定的抑制作用, 这和大多数报道^[13]有所不同; Fe^{2+} 对锰过氧化物酶和漆酶的酶活有一定的抑制作用; 而 Ag^+ 则完全抑制漆酶的活性, Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 对漆酶影响不大(图 7)。

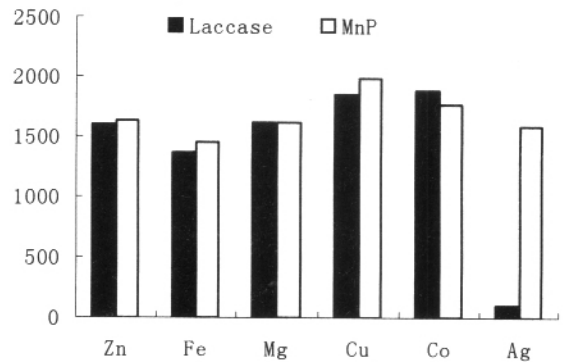


图 7 金属离子对酶作用特性的影响

3 小结与讨论

通过优化产酶条件, 确定了白腐真菌 5.776 最适培养条件和培养方法, 在此条件培养测定酶活力: 锰过氧化物酶为 1560 u/mL, 漆酶为 1350 u/mL。在优化条件下锰过氧化物酶和漆酶的产量均有了较大的提高分别均达到了优化前的 8~10 倍。

酶作用特性研究表明, 锰过氧化物酶的最适 pH 范围是 4.4~4.8, 最适底物浓度是 1.2 mmol/L, 最适反应温度是 35~40; 漆酶的最适 pH 为 4.8, 最适底物浓度是 1.2 mmol/L, 最适反应温度是 40。金属离子 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 对锰过氧化物酶和漆酶有激活作用, Fe^{2+} 对两种酶活力有一定的抑制作用, 而 Ag^+ 则完全抑制漆酶的活性, Mg^{2+} 对两种酶活力影响不大。

在培养时间对产酶的影响中, 锰过氧化物酶在 96 h 酶活力高达 448 u/mL; 在 120~144 h 酶活力下降迅速, 但在 156~168 h 时又出现酶活的急剧上升, 其原因可能是: 培养时间过短, 随后又出现新的产酶高峰, 据莫佳琳报道^[14]培养时间为 7 d 时, 4 d 会出现一个产酶高峰; 培养时间为 1 个月时, 15 d 会出现新的产酶高峰。

酶作用最适底物浓度中底物浓度在 0.05~0.8 mmol/L 酶活变化不大, 底物浓度在 0.8~1.2 mmol/L 酶活急剧提高。本实验没有测出其最佳底物浓度, 今后有待进一步研究。

一般认为漆酶为含铜的酶^[14], Cu^{2+} 对漆酶有较明显的激活作用, 但作者多次试验证明, Cu^{2+} 在

pH4.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中对漆酶没有激活作用,具体原因尚有待于进一步探明。

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].重庆教育报,2001,14(3):64-67.
- [2] Moreira M T, Sanroman A, Feijoo G, et al. Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 19(4): 261- 266
- [3] ZHEN Z. Stresses on immobilized *Phanerochaete chrysosporium* hyphae in submerged cultures for ligninase production[M]. Can J Chem Eng, 2003, 76: 784- 789
- [4] YOUNGL. Ligninase-catalyzed decolorization synthetic dyes[M]. Water Res, 2002, 31: 1187- 1193
- [5] 丁少军.云芝漆酶的培养和分离纯化的研究[J].纤维素科学与技术,2003,6(3):16-20.
- [6] 李宗义,刘国生,李学梅,等.微生物学实验技术[M].郑州:气象出版社,2002:654-656.

- [7] 杨晓宽,杜连祥,路福平.白腐菌产锰过氧化物酶培养基的优化[J].生物技术,2004,14(14):35-42.
- [8] 段新源,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,2002,3(1):91-94.
- [9] 王宜磊,朱 陶.漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J].生态学杂志,2002,21(2):27-29.
- [10] 邵 强,郭伟云,姚朝阳,等.碳源氮源对白腐真菌漆酶合成的影响[J].河南师范大学学报,2005,5(2):94-96.
- [11] 胡道伟,朱雄伟,梅云军,等.白腐真菌产漆酶培养条件的研究[J].华中科技大学学报,2003,4(4):111-113
- [12] 康从宝,刘 巧,李清心,等.白腐菌产漆酶的纯化及部分酶学性质 [J].中国生物化学与分子生物学报,2002,18(5):638-642.
- [13] 高从文,章燕芳,华兆哲,等.黄孢原毛皮革菌合成锰过氧化物酶的工艺[J].食品与生物技术,2002,21(1):48-52.
- [14] 莫佳琳,文湘华,钱 易,等.白腐菌培养条件对其分泌木质素降解酶的影响[J].中国环境科学,2005,25(5):572-575.

(上接第42页)

对照组相比差异极显著($P < 0.01$)^[16]。苜蓿草粉中含有类胡萝卜素为100~500 mg/kg,因此苜蓿草粉是蛋黄的天然着色剂^[17]。

4 苜蓿的应用前景

苜蓿作为“牧草之王”,为动物提供营养均衡,是比较全面的优质粗饲料。同时填补了畜牧业中蛋白质饲料的不足。种植紫花苜蓿不仅可以促进畜牧业发展,增加收入,同时苜蓿作为草产业发展的首选草种,在调整种植业结构、推动草业产业化,保证草业的持续、稳定、协调发展方面发挥巨大作用。并且随着科学技术的发展,苜蓿产品的类型和形式更加广泛和多样化,用苜蓿开发生产功能性食品前景看好,市场潜力巨大。这样就扩大了草产业发展的领域和范围,为苜蓿的发展带来更广阔的市场前景,取得更高、更好的生态、经济和社会效益。

参考文献:

- [1] 王成章.饲料生产学[M].郑州:河南科技出版社,1998.
- [2] 陈光耀,曹兵海.牧草对奶牛的生理营养作用[J].中国乳业,2003(3):20-21.
- [3] 康爱民,龙瑞军,等.苜蓿的营养及饲用价值[J].草原与草坪,2002(3):31-33.
- [4] 刘 凯.苜蓿皂甙对血胆固醇和LDL清除非受体途径的影响[J].徐州医学院报,1995,15(2):118.
- [5] 曾 兵,张新全,等.浅论优质牧草在肉牛饲养中的利

- 用[J].草业科学,2005(8):50-54.
- [6] 王运亨,张震山,等.苜蓿是饲喂奶牛的好饲料[J].中国奶牛,2000(6).
- [7] 李胜利.优质粗饲料-苜蓿干草和鲁梅克斯对奶牛产奶性能的影响[A].首届中国苜蓿发展大会论文集[C].2001,140-143.
- [8] Christensen D A, MI Cochran Alfalfa cubes for dairu cattle [M].University of Saskatchewan Greenbrae Dairy Herd Report, Saskatoon, Canada, 1990.
- [9] 李治强.利用苜蓿青干草育肥小尾寒羊效果试验[J].甘肃畜牧兽医,2005(2):16-17.
- [10] 陈万福,杨永军,等.苜蓿草块饲喂育肥羔羊的试验[J].草食动物,2004(5):26-27.
- [11] 齐凤林,等.苜蓿草饲喂肉牛最佳经济量试验[J].辽宁畜牧兽医,2001(5):9-11.
- [12] 郑家明.紫花苜蓿草粉饲喂肉猪效果试验[J].养猪,1999(2):23.
- [13] Malinow MR, Connor WE, McLaughlin P, et al. Effects of alfalfa saponins of clinical investigation [J]. 1981, 67(1): 156-162.
- [14] 雷祖玉,等.苜蓿总甙对AA肉仔鸡脂类代谢及生产性能的影响[J].中国饲料,2002(18):9-10.
- [15] 张润宏.添加苜蓿草粉及定量脂肪对母猪繁殖性能的影响及其机理的初步研究[D].山西农大硕士论文,2001,6.
- [16] 何 欣,王晓霞,等.苜蓿草粉对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J].当代畜牧,2001(2):33-33.
- [17] 刑明明,刑玉亭,等.蛋黄颜色与色素[J].山东畜牧兽医,2002(6):9-10.