

文件编号 :1003-8701(2013)06-0090-05

高产漆酶菌株的筛选及其对秸秆降解初探

李 丹,张 波*,李 玉*

(吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心,长春 130118)

摘 要 :主要对 21 个隶属于担子菌门的菌株进行了漆酶活性的比较。通过平板培养进行初步筛选,液体发酵的方法进行复筛,培养 15 d 后得到高酶活的菌株(酶活达到 300U/mL 以上)3 株,依次是一色齿毛菌(*Cerre-na unicolor*);薄皮干酪菌(*Tyromyces chioneus*)和烟管菌(*Bjerkandera adusta*)。研究 3 种菌株对秸秆纤维素、半纤维素和木质素降解的能力,实验结果表明:*B. adusta* 和 *T. chioneus* 是较好的秸秆木质素降解菌株,对木质素降解率依次为 66.13%、61.92%。

关键词 :真菌;漆酶;木质素;纤维素;半纤维素

中图分类号 :Q935

文献标识码 :A

Screening of High Laccase-Producing Strains and Studies on the Degradation of Stalk

LI Dan, ZHANG Bo*, LI Yu*

(Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract :The laccase activity of 21 strains belong to basidiomycetes was compared. 3 high laccase-producing level strains were screened out using the plate cultivation and fluid fermentation method, which were *Cerre-na unicolor*, *Tyromyces chioneus* and *Bjerkandera adusta*. The laccase activity of the strains cultivated for 15 days were above 300 U/mL. Then the degradation effect of stalk by the 3 strains was studied. The result showed the effect of lignin degradation by *B. adusta* and *T. chioneus* were higher, the degradation rate were 66.13% and 61.92%.

Keywords :Laccase; Enzyme activity; Lignin; Cellulose; Hemicellulose

木质素是一种结构复杂、无规则的高分子聚合物,是仅次于纤维素的第二大碳素资源和再生有机资源。随着人口的不断膨胀,农业废弃物增多,包括谷物秸秆、稻草、甘蔗渣、动物粪便以及日常生活中废纸等纤维产品,这些废弃物中含有大量的纤维素和木质素,可作为一种潜在的可再生资源,但由于木质素结构复杂并且无规则性,使得很难被降解,因此关于木质素生物降解的研究成为当今世界生物物质利用和环境治理的研究热

点。白腐菌是一种腐朽木材能力很强的真菌,其产生的漆酶具有很强的催化降解木质素的能力。漆酶(Laccase EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化物^[1]。1983年日本人 Yoshida^[2]首次从漆树分泌物中发现,因而得名。现知其广泛存在于真菌特别是担子菌亚门层菌纲非褶菌目^[3]。近些年来研究表明,它的底物作用广泛,可以氧化降解包括单酚、邻苯二酚、对苯二酚等多种酚类氧化物,也有报道说其还可氧化一些含磷的有毒物质^[4-5],因此它具有较大的应用价值,如造纸^[6-7]、纺织业^[8-9]、食品业^[10-11]等方面,所以越来越受到人们的重视。目前,关于漆酶高活菌株筛选的报道比较集中于彩绒革盖菌,相当多的研究集中漆酶的微生物学、生物化学、酶学、分子生物学、遗传学等多个领域,包括菌株生长特征、漆酶的合成调控、酶蛋白的分离纯化、晶体结构和催化机制、相应基因的克隆、测序及异源

收稿日期 :2013-08-30

基金项目 :现代农业产业技术体系建设专项基金(CARS24);吉林省重大项目(10ZDGG003)

作者简介 :李 丹(1983-),女,实验员,硕士,主要从事菌物学相关科学研究。

通讯作者 :张 波,女,实验师,博士,E-mail: 3585260@qq.com;

李 玉,男,博士,教授,E-mail: yuli966@126.com

表达等^[12-15]。目前测定漆酶酶活的方法有测 O₂ 法^[16]、分光光度法^[17]、极谱法^[18]、高效液相色谱法^[19]、微量热法^[20]、脉冲激光光声分析法^[21]等,其中被广泛使用的是分光光度法^[22-26]。本文就液体培养方法下自选白腐真菌菌株筛选漆酶高活菌株进行了初步探索,以便为漆酶的工业应用提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基

1.1.1 菌种

菌种购自中科院微生物研究所,4℃保藏于PDA斜面。

1.1.2 培养基

复壮培养基:葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, V_{B1} 2 mg, 琼脂粉 15 g, 20%土豆汁 1 000 mL, pH 自然。

初筛培养基:葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, V_{B1} 2 mg, 琼脂粉 15 g, 20%土豆汁 1 000 mL, 检测物质 0.05 mol/L, pH 自然。

液体发酵培养基:葡萄糖 20 g, NaH₂PO₄ 3.5 g, K₂HPO₄ 5.0 g, NH₄Cl 2.0 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, 定容至 1 L, pH 6.0~7.0。

1.2 方法

1.2.1 产漆酶菌株的筛选

将 21 个菌种转到复壮培养基上进行活化,活化后转到初筛培养基上,25℃培养 3 d 后,观察菌落周围颜色的变化情况^[27]。将有颜色变化的菌株接种到复壮培养基培养,待长满平皿后用打孔器取 5 块接种到液体发酵培养基(150 mL 三角瓶中内装 50 mL 液体培养基),于 25℃,150 r/min 振荡培养 7 d 后,测定各菌种培养液中漆酶的活性。

1.2.2 漆酶活性测定

漆酶活性的定义:在一定条件下,每分钟氧化 1 μmol 的底物所需要的酶量为一个酶活单位(U)。本文以 2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)简称 ABTS 为底物,反应总体积为 4 mL,反应温度 25℃。取 50 mL 0.2 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 为 4.5),加入 0.027 5 g ABTS 混合液 2 mL,再加入 2 mL 适当稀释的酶液,测定 OD₄₂₀ 值^[22]。

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{10^6}{\varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}}} \times \frac{\Delta \text{OD}}{\Delta t}$$

V_总和 V_酶分别代表漆酶酶活测定反应体系的总体积及反应添加酶液体积,ε 为吸光系数。

1.2.3 秸秆降解

秸秆的处理:将秸秆剪成 1.0 cm 小段,在烘

箱中 80℃烘至恒重,称取 5.0 g,用无菌水浸泡 20 min 后,在高压锅中 121℃灭菌 20 min,待用。

降解瓶的制备:用打孔器分别取直径 5 mm 的菌块,接种于复壮培养基中,25℃培养 5 d 后,将灭菌后的秸秆无菌条件下放置到培养基上,继续于培养箱中 25℃培养。每个样品 3 个重复。

降解后的秸秆处理:培养适当的时间后,将秸秆取出,用毛刷将秸秆表面的菌丝刷掉,于烘箱中 60℃烘干至恒重,用电子天平称取重量,记录后用粉碎机 150 r/min 粉碎,待用。

1.2.4 木糖标准曲线的绘制

分别取 1 mg/mL 木糖标准浓度 0 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL, 0.7 mL 和 0.8 mL。依次加入到 8 支试管中,以蒸馏水补到 1 mL,再加入 4 mL 地衣酚试剂,于沸水浴中 20 min,在 660 nm 测量 OD 值,用空白管溶液 CK 作为对照,记录光密度值后作标准曲线(图 1)。

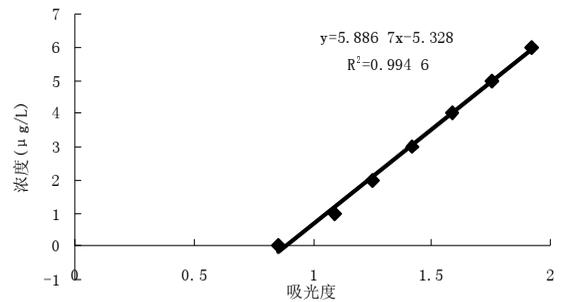


图 1 木糖的标准曲线

1.2.5 葡萄糖标准曲线的绘制

分别取 1 mg/mL 葡萄糖标准浓度 0 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL 和 0.7 mL。依次加入到 7 支试管中,以蒸馏水补到 1 mL,再加入 4 mL 蒽酮试剂,放入冰水中冷却,而后置于沸水浴中 10 min,取出用流水冷却,在 620 nm 测量 OD 值,用空白管溶液 CK 作为对照,记录光密度值后作标准曲线(图 2)。

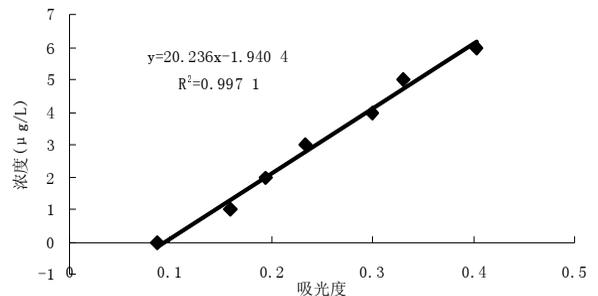


图 2 葡萄糖标准曲线

1.2.6 降解秸秆中纤维素、半纤维素和木质素含

量的测定^[28]

样品纤维素含量(%)=

$$\frac{OD_{660} \times \text{稀释倍数} \times 0.5 \times 0.9}{\text{空白对照纤维素浓度}} \times 100\%$$

菌株纤维素降解率(%)=

$$\frac{\text{空白对照纤维素含量} - \text{样品中纤维素含量}}{\text{空白对照纤维素浓度}} \times$$

100%

样品半纤维素含量(%)=

$$\frac{OD_{660} \times \text{稀释倍数} \times 0.5 \times 0.9}{\text{空白对照半纤维素浓度}} \times 100\%$$

菌株半纤维素降解率(%)=

$$\frac{\text{空白对照半纤维素含量} - \text{样品半纤维素含量}}{\text{空白对照半纤维素浓度}} \times$$

100%

样品木质素含量(%)=

$$\frac{\text{残渣衡重}(W_2 \text{ :g}) - \text{漏斗重加灰分}(W_1 \text{ :g})}{\text{空白对照木质素含量}} \times 100\%$$

木质素降解率(%)=1 - 样品木质素含量(%)

表 1 显色结果

菌种	颜色变化	颜色变化时间
<i>Stereum fasciatum</i> (S1)	变紫色	30 min
<i>Stereum insignne</i> (S2)	不变色	
<i>Hericium erinaceus</i> (H1)	变紫色	18 h
<i>Cerrena unicolor</i> (C1)	变紫色	12 h
<i>Grifola frondosa</i> (G1)	变紫色	2.6 d
<i>Laetiporus sulphureus</i> (L1)	变紫色	3 d
<i>Trametes palisoti</i> (T1)	变深紫色	3 d
<i>Irpex lacteus</i> (I1)	变紫色	2 d
<i>Tyromyces chioneus</i> (T2)	变紫色	16 h
<i>Ganoderma capense</i> (G2)	变紫色	16 h
<i>Ganoderma applanatum</i> (G3)	变紫色	14 h
<i>Ganoderma formosanum</i> (G4)	变紫色	20 min
<i>Bjerkandera adusta</i> (B1)	变紫色	6 h
<i>Ganoderma applanatum var. gibbosum</i> (G5)	变紫色	1 d
<i>Ganoderma lucidum</i> (G6)	变紫色	15 min
<i>Ganoderma neo-japonicum</i> (G7)	变紫色	3 d
<i>Ganoderma valesiacum</i> (G8)	变紫色	1 d
<i>Ganoderma resinaceum</i> (G9)	变紫色	16 h
<i>Microporus xanthopus</i> (M1)	变蓝色	3 d
<i>Phellinus igniarius</i> (P1)	变紫色	3 d
<i>Phellinus pomaceus</i> (P2)	不变色	-

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

2.1.1 初筛

将活化所得的 21 个菌株分别用打孔器取若干块接种到初筛培养基上 25℃培养,记录观察结果。结果显示培养基有颜色变化的,证明有漆酶产生(表 1)。从 21 株菌株初筛得到 19 株产漆酶的菌株。

2.1.2 复筛

将 19 株有颜色变化的菌株转接到液体培养基中,在摇床中 25℃,150 r/min 培养 7 d 后取样,测粗酶活性。结果筛选得到 *C. unicolor*, *T. chioneus*, *B. adusta* 3 株酶活达到 300 U/mL 以上的菌株(图 3)。

2.2 对纤维素、半纤维素和木质素降解

2.2.1 对秸秆中半纤维素降解

从表 2 可以看到 *B. adusta* 降解秸秆中半纤维素达到 21.44%,而 *T. chioneus*, *C. unicolor* 降解秸

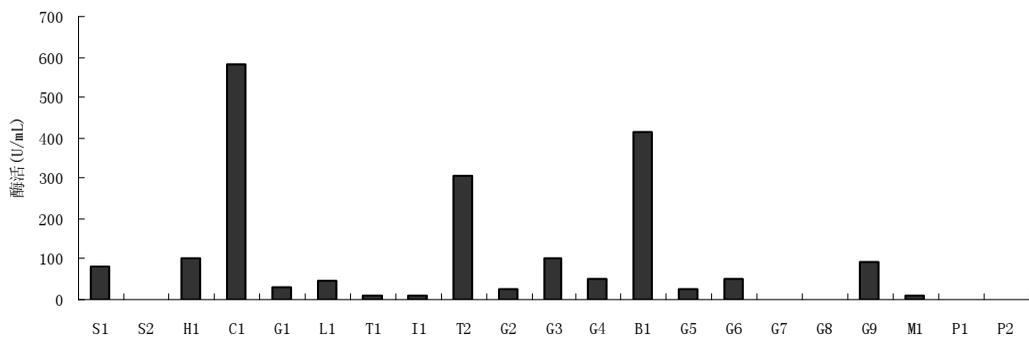


图 3 酶活测定

表 2 3 种菌株对秸秆中半纤维素降解

菌种	OD 值	糖的浓度(μg/L)	半纤维素的含量(%)	半纤维素降解率(%)
<i>Cerrena unicolor</i>	2.635	10.222 15	87.93%	12.07%
<i>Bjerkandera adusta</i>	2.451	9.133 16	78.56%	21.44%
<i>Tyromyces chioneus</i>	2.533	9.618 47	82.74%	17.26%
CK	2.872	11.624 82	100%	0%

注:CK 为未处理的秸秆。

秆中的半纤维素分别为 17.26% ,12.07%。其能力的强弱与菌株的半纤维素酶的活性有关 ,*B. adusta* 含有的半纤维素酶活性略高于其他 2 个菌株所含有的半纤维素酶活性。

2.2.2 对秸秆中纤维素降解

从表 3 可以看到 *C. unicolor* ,*B. adusta* 降解秸秆中纤维素分别为 27.75% ,27.73% ,降解纤维素的能力相差不大。而 *T. chioneus* 降解秸秆中的纤维素 13.95% ,稍低于 *C. unicolor* ,*B. adusta*。其能

力的强弱与其纤维素酶的活性有关 ,*C. unicolor* ,*B. adusta* 含有的纤维素酶活性略高。

2.2.3 对秸秆中木质素降解

从表 4 可以看到 *B. adusta* ,*T. chioneus* 降解秸秆中木质素达到 66.13% ,61.92%。而 *C. unicolor* 对木质素降解率只有 10.12%。可见 *B. adusta* ,*T. chioneus* 含有的木质素酶的活性较高。

3 讨 论

表 3 3 种菌株对秸秆中纤维素降解

菌种	OD 值	糖的浓度(μg/L)	纤维素的含量(%)	纤维素降解率(%)
<i>Cerrena unicolor</i>	0.562	9.482 16	72.25	27.75
<i>Bjerkandera adusta</i>	0.563	9.502 55	72.27	27.73
<i>Tyromyces chioneus</i>	0.652	11.317 55	86.05	13.95
CK	0.742	13.152 95	100	0

表 4 3 种菌株对秸秆中木质素降解

菌种	残渣衡重 W(g)	漏斗重加灰分 W ₁ (g)	木质素含量(%)	木质素降解率(%)
<i>Cerrena unicolor</i>	37.3959	36.9013	89.88	10.12
<i>Bjerkandera adusta</i>	35.8079	35.6215	33.87	66.13
<i>Tyromyces chioneus</i>	32.8108	32.6013	38.07	61.92
CK	33.5689	33.6186	100	0

从 21 株菌株中筛选得到 19 株产漆酶的菌株 ,进一步发酵培养得到 3 株产漆酶酶活较高的菌株 ,漆酶酶活力 *C. unicolor*>*T. chioneus*>*B. adusta*。通过秸秆降解的实验 ,得到 3 株菌株对秸秆的纤维素、半纤维素和木质素都有一定的降解能力 ,其中 *B. adusta* 对秸秆中半纤维素降解能力略高于 *T. chioneus* 和 *C. unicolor* ,降解率为 21.44% ,对纤维素降解能力 *C. unicolor*>*B. adusta*>*T. chioneus* ;而对木质素的降解能力 *B. adusta* ,*T. chioneus* 较高 ,降解率分别为 66.13% ,61.92% ,可见 *B. adusta* ,*T. chioneus* 是较好的木质素降解菌。测定漆酶酶活力采用液体发酵的方法 ,所得到的漆酶活力较高 ,而降解秸秆的实验环节使用复壮培养基 ,处于固体环境 ,所以得到的漆酶活力及秸秆中木质素的降解率与液态下稍有不同。

参考文献 :

- [1] 缪 静 ,姜竹茂 . 漆酶的最新研究进展[J] . 烟台师范学院学报 ,2001 ,17(2) :146-150 .
- [2] Yoshida H. Chemistry of Lacquer(Urusht) part1[J] . J. Chem. Soc. ,1883(43): 472-486 .
- [3] 许 影 ,兰 进 . 真菌漆酶研究进展 [J] . 食用菌学报 ,2005 ,12(1) :57-64 .

- [4] 林 鹿 ,张 干 . 白腐菌对芳香化合物的降解[J] . 环境化学 ,1999 ,18(5) :408-411 .
- [5] 李济吾 ,张 珍 . 真菌在含酚废水处理中的应用[J] . 环境工程学报 ,2007 ,1(2) :20-24 .
- [6] 赵德清 ,林 鹿 ,蒋李萍 ,等 . 白腐菌对纸浆漂白的研究进展 [J] . 微生物学通报 ,2003 ,30(6) :97-100 .
- [7] 张晓昱 ,王宏勋 ,黄 新 . 造纸废液的白腐菌处理及特性研究[J] . 华中科技大学学报(自然科学版) 2002 ,30(3) :110-113 .
- [8] 李剑凤 ,宏宇植 ,肖亚中 . 栓菌 420 漆酶 C 基因的克隆、高效表达及重组酶的染料脱色潜能[J] . 微生物学报 ,2007 ,47(1) :54-58 .
- [9] 常天俊 ,潘文维 ,赵 丽 ,等 . 白腐真菌对染料脱色的培养条件研究[J] . 环境工程学报 ,2007 ,1(2) :54-58 .
- [10] 张晓昱 ,黄慧艳 . 漆酶在食品工业中的研究与应用进展[J] . 食品科技 ,2003 ,A(2) :4-7 .
- [11] 励建荣 ,李 丹 . 漆酶在食品工业中的应用[J] . 现代食品科技 ,2006 ,22(4) :262-268 .
- [12] 李慧蓉 . 白腐真菌生物学和生物技术[M] . 北京 :化学工业出版社 ,2005 .
- [13] 池玉洁 . 木材腐朽与木材腐朽菌 [M] . 北京 :科学出版社 ,2003 .
- [14] Ullah ,M. A. ,C. T. Bedford ,C. S. Evans. Reactions of pentachlorophenol with Laccase from *Coriolus versicolor* [J] . Appl. Microbiol. Biotechnol. ,2000(53):230-234 .
- [15] A lexanda M.C.R.Alves ,Eric Record ,Anne Lomascolo. Highly Efficient Production of Laccase by the Basidiomycete *Pycnoporus*

- cinnabarinus [J]. Applied and Environmental Microbiology ,2004, 70(11):6379-6384. .
- [16] Fukushima Y , Kirk T K. Laccase Component of the Ceriporiopsis subvemisporea lignin - degrading system[J] . Appl Environ Microb , 1995 ,61(3):872-876. .
- [17] Huang Z Y ,Huang H P ,Cai R X ,et al. Organic solvent enhanced spectrofluorimetric method for determination of laccase activity [J] . Analytica Chimica Acta ,1998 ,374(1):99-103 .
- [18] Wood D A. Production , Purification and properties of extracellular laccase of Agaricus bisporus [J] . J. Gen Microb, 1980(117): 327-328 .
- [19] Badiani M ,Felici M , Luna M , et al. Laccase assay by means of high-performance liquid chromatography [J] . Anal Biochem , 1983 , 133(2):275-276. .
- [20] 望天志 ,李卫萍 ,万洪文 ,等 . 微量热法测定漆酶的活性[J] . 自然杂志 ,1997 ,19(6) :361 .
- [21] Yao Hongtao , Deng Yanzuo , Zeng Yuec. Pulsed laser-induced photoacoustic determination of laccase and blue multicopper protein [J]. Prog Biochem Biophys, 1989, 16(4): 306-309 .
- [22] 林俊芳 ,刘志明 ,陈晓阳 ,等 . 真菌漆酶的酶活测定方法评价 [J] . 生物加工过程 ,2009 ,7(4) :1-8 .
- [23] Quarantino D , Ciaffi M , Fedefici E , et al. Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures[J] . Biochem Eng J. , 2008, 39(2):236-245 .
- [24] Rosales E, Rodriguez Couto S. Sanroman M A. Increased laccase production by *Trametes himuta* grown on ground orange peelings[J]. Enzy Microb Tech, 2007, 40(5): 1286-1290 .
- [25] Wang J W, Wu J H ,Huang W Y ,et al. Laccase production by *Monotropa sp.*, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* [J] . Biores Tech ,2006 , 97(5): 786-789 .
- [26] Rancano G, Lorenzo M , Molares N , et al. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an air lift fermentor [J] . Proc Biochem , 2003, 39(4): 467-473 .
- [27] 彭红 ,罗开昆 ,高中洪 ,等 . 产漆酶真菌的筛选、培养及对苯酚的降解 [J] . 华中科技大学学报 (自然科学版) ,2005 ,33(7) :111-114 .
- [28] 王玉万 ,徐文玉 . 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的等量分析程序[J] . 生物技术 ,1985(2) :10-16 .



(上接第 67 页)

3.3 西门塔尔杂种牛架子牛比小公牛集中育肥可产生更高的经济效益。

参考文献：

- [1] 李刚 ,马志远 . 西门塔尔牛饲养管理应采取的几项措施[J] . 中国牛业科学 ,2011 ,37(1) :67-68 .
- [2] 伏中方 . 西门塔尔牛育肥饲养管理技术 [A] . 第七届牛业发展大会论文集[C] . 2012 .
- [3] 王丽斌 ,袁淑芹 ,卢景都 ,等 . 架子牛育肥三阶段[J] . 养殖技术顾问 ,2009 ,1(5) :24-25 .
- [4] 胡成华 ,李金龙 ,荣海林 ,等 . 不同肉牛品种杂交西门塔尔杂种牛效果的研究[J] . 黑龙江畜牧兽医 ,2012 ,8(上) :1-4 .
- [5] 滑留帅 ,陈宏 ,杨奇 ,等 . 固原地区秦川牛及其利杂群体屠宰性能的研究[J] . 中国牛业科学 ,2008 ,34(5) :1-4 .
- [6] 胡成华 ,牟忠生 ,赵玉民 ,等 . 不同肉牛品种杂交西门塔尔杂种牛肉质营养比较研究[J] . 吉林农业科学 ,2012 ,37(6) :47-50 .
- [7] 齐宝林 ,侯广军 ,郎洪彦 ,等 . 犊牛直线育肥效果影响因子研究[J] . 现代农业科技 ,2008(22) :216 .
- [8] 徐雁 . 架子牛短期育肥技术 [J] . 畜牧与饲料科学 , 2009 ,30(5) :79-80 .
- [9] 雒自全 ,张洁 ,何龙 ,等 . 架子牛不同体重阶段育肥效益分析[J] . 中国草食动物科学 ,2013 ,33(3) :74-77 .