

## 侧耳菌与粗毛栓菌在麦草培养基中产生木质纤维素降解酶的研究

谢君 孙迅 任路 张义正\*

(四川大学生命科学学院分子生物学实验室 成都 610064)

关键词 侧耳菌, 粗毛栓菌, 木质纤维素降解酶, 生物质降解

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0575-04

草本植物,包括农作物秸秆的木质素主要是由松柏醇、芥子醇和对香豆醇的脱氢聚合物和对香豆酸组成<sup>[1,2]</sup>,是结构复杂、稳定、多样的生物大分子物质。虽难于被一般微生物降解,但自然界中仍存在一些可降解木质素的微生物种类,白腐真菌是最重要的一类,它们通过分泌漆酶(Laccases, Lac)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidases, LiP)、锰过氧化物酶(Manganese-dependent peroxidases, MnP)、纤维素酶(Cellulases, Cel)和半纤维素酶(Hemicellulases, Hcel)等降解植物生物物质。由于白腐菌在造纸工业中的生物制浆和纸浆生物漂白、环境保护等方面<sup>[4]</sup>有着很好的应用前景,因此倍受关注。

本研究选用在液体培养基中产酶能力强且产酶较快的白腐真菌侧耳 *sp2* 和粗毛栓菌<sup>[5]</sup>进行固体培养,研究它们产生木质纤维素降解酶类和降解植物生物物质的能力。研究结果报道如下。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株

本研究采用根据 RB 亮蓝变色反应和液体培养试验选出

的两株木质纤维素降解酶高产菌株<sup>[5]</sup>。

其中一株由 *Pleurotus ostreatus* 经原生质融合技术选育获得能在植物秸秆或废弃物上栽培,表现出较强的木质纤维素降解能力,经鉴定为侧耳属,定名为侧耳 *sp2* (*Pleurotus sp2*)。另一株是由本课题组成员从木材腐朽菌所筛出,经鉴定为粗毛栓菌 (*Trametes gallica*)。

#### 1.2 菌株的培养

PDA 培养基<sup>[6]</sup>,菌种的培养与保存:将菌种接种于 PDA 斜面和平板上,28℃培养 1 周。短期保存,将平板置于 4℃;长期保存,在斜面上加灭菌矿物油后,置于 4℃。

液体培养基<sup>[5]</sup>:LM2 是低氮高碳高无机盐培养基,LM3 是高氮低碳高无机盐培养基,其组成列于表 1。

其中,酒石酸铵(22.0g/L)为氮源,葡萄糖(200g/L)为碳源,大量元素每升含 20g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、13.8g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g  $\text{CaCl}_2$  和 0.6g  $\text{NaCl}$ ,微量元素每升含 0.35g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、60mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、110mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、60mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、95mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、6mg  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、6mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  和 6mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,VB1 的浓度为 100mg/L,pH 为 4.2。

表 1 培养基组成

Table 1 The components of liquid media

Media	Ammonium tartrate	Glucose	Macroelement	Microelement	VB1	dd H <sub>2</sub> O
LM2	1	7.5	15	15	3	Add H <sub>2</sub> O to 50 mL
LM3	10	2.5	15	15	3	Add H <sub>2</sub> O to 50 mL

固体培养实验<sup>[7]</sup>:精确称取 2.000g60 目麦草粉于 100mL 锥形瓶中,分别加入 8.0 mL 的 LM2、LM3 液体培养基(不含葡萄糖),构成固体培养基 SM2 和 SM3,121℃灭菌 25 min。每瓶装入  $3 \times 0.8\text{cm}^2$  PDA 平板 7 日龄菌丝塞(尽量除尽培养基),于 28℃和空气相对湿度为 70%下静置培养 60 d。三个平行

样,未接种者在同样条件下培养,作为对照。

#### 1.3 酶活测定方法

固体培养物中酶液的提取,参照文献[8],并作了改进。每 10d 取一组 3 瓶平行样和对照,每瓶分别用 12.0mL 双蒸水于 4℃浸提麦草粉固体培养过夜,200r/min 振荡提取 1h,转移

收稿日期:2001-02-19,修回日期:2001-06-18。

基金项目:国家自然科学基金项目(39430020),国家教育部博士点基金。

\*联系作者。Tel:86-28-5412738, E-mail: nic3602@scu.edu.cn

提取液;沉淀物再用 4.0mL 双蒸水,200r/min 振荡提取 15min,合并提取液。用于测定 Lac、LiP、MnP、Cel、Hcel 等 5 种酶活性。残渣烘至恒重用于测定干重和木质素、纤维素、半纤维素的含量。

漆酶活性的测定采用 ABTS 法<sup>[9]</sup>;木质素过氧化物酶活性的测定采用蒽酚法<sup>[6]</sup>;锰过氧化物酶活性的测定见文献<sup>[10]</sup>;纤维素酶活性测定<sup>[11]</sup>以 RB 亮蓝染色的微晶纤维素<sup>[12]</sup>为底物进行测定;半纤维素酶活测定则以木聚糖为底物进行测定<sup>[13]</sup>。

#### 1.4 化学分析<sup>[14,15]</sup>

失重的测定,采用恒重差减法。将生长的菌膜和子实体与固体培养用的试料分离,再将试料置于 105℃ 烘箱中烘至恒重,计算出与接种前麦草粉干重之差,即为失重。

纤维素的测定,采用硝酸-乙醇法。用硝酸加热降解纤

维素,以乙醇溶出后,称量测定试样失重。半纤维素测定,采用 NaSSO<sub>3</sub> 滴定法。

木质素测定,采用 Goering-Van Soest 法结合 Klason 法。

## 2 结 果

### 2.1 *T. gallica* 固体发酵条件

麦草粉与液体培养基的比例是固体发酵的重要影响因素,按不同料液比将 *T. gallica* 培养 30d,麦草粉各组分分析结果列于表 2。

### 2.2 *P. sp2* 和 *T. gallica* 固体培养基中的产酶能力

将 *P. sp2* 和 *T. gallica*,按 1.2 中的固体培养实验条件,分别接种于 SM2 和 SM3 中,每 10d 测定 1 次 Lac、LiP、MnP、Hcel 和 Cel 等 5 种酶的活性和草粉失重率,结果绘于图 1、2、3(*P. sp2*-SM2,即 *P. sp2* 培养于 SM2 中,*T. g*-SM2 和 *T. g*-SM3 类推)。

表 2 不同料液比对 *T. gallica* 降解麦草木质纤维素的影响

Table 2 The effects on *T. gallica* degrading wheat straw with different contents of liquid media

Ratio of <sup>①</sup> Straw powder to liquid media	Weight loss <sup>②</sup> of wheat straw powder	Absolute <sup>③</sup> bioefficiency	Product <sup>④</sup> coefficient	Cellulose		Hemicellulose		Lignin	
				content <sup>⑤</sup>	loss <sup>⑥</sup>	content	loss	content	loss
1:2	36.11	4.96	13.73	45.84	26.26	25.23	38.66	20.67	36.06
1:3	36.65	5.11	13.94	44.23	29.46	24.40	41.17	20.89	35.96
1:4	40.13	5.67	14.12	42.74	35.57	24.08	45.13	20.57	40.37

注:①料液比,麦草粉质量(g)与液体培养基 LM3 体积(mL)的比例;②草料失重(%)=(A-B)×100;③绝对生物学效应(%)=C/A×100;④产量系数(%)=C/(A-B)×100(A.接种前草料干重;B.培养后基质干重;C.子实体干重);⑤培养后基质中的含量(%);⑥培养前后基质中该种成分的含量变化(%)。

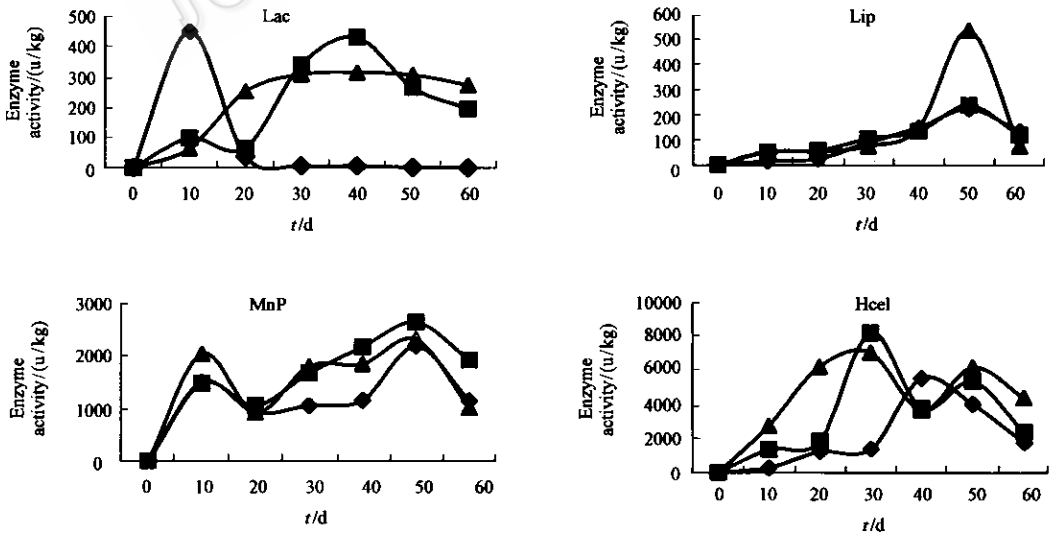


图 1 *P. sp2* 在 SM2 培养基中及 *T. gallica* 在 SM2、SM3 培养基中产生 4 种酶的特征

Fig.1 Characteristics of *P. sp2* producing four enzymes in SM2 and *T. gallica* producing four lignocellulolytic enzymes in SM2, SM3.

◆—*P. sp2*-SM2; ■—*T. g*-Sm2; ▲—*T. g*-SM3

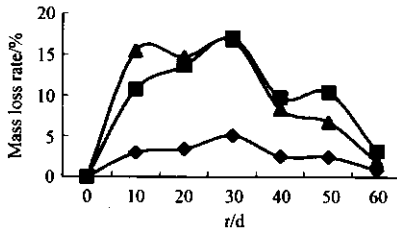


图2 *P. sp2* 在 SM2 中及 *T. gallica* 在 SM2、SM3 中培养时草粉失重率的变化

Fig.2 Variations of wheat straw loss rate produced by *P. sp2* and *T. gallica* in SM2, SM3  
—●—*P. sp2*-SM2; —■—*T. g.*-SM2; —▲—*T. g.*-SM3

实验结果表明, *P. sp2* 在 SM2 培养基中培养 10d, Lac 活性即达峰值; *T. gallica* 在 SM2 和 SM3 培养基中, 则要在培养 40d 后 Lac 活性才达峰值; *P. sp2* 产 Lac 活性最高, 但液体培养时 *T. gallica* 产生 Lac 活性最高。两株菌在固体基质中的 LiP 活性, 在培养期间持续增加, 50d 达峰值后下降; 两株菌种固体培养的 MnP 活性, 均在培养 10d 达峰值, 培养 20d 时又下降到最低值, 然后活性持续增加, 50d 再次达峰值后下降; *T. gallica* 产生 MnP 活性普遍比 *P. sp2* 要高。

Cel 的酶活采用微晶纤维素法未检出, 采用滤纸条法测得值很小, 表明这两株菌在本实验条件下可能产生的 Cel 酶活低。 *P. sp2* 在 SM2 培养基中, 培养 40d Hcel 达峰值; *T. gallica* 在 SM2 和 SM3 培养基中, 都在培养 30d Hcel 活性已达峰值; *T. gallica* 在 SM2 中所产 Hcel 活性最高。

### 2.3 *P. sp2* 和 *T. gallica* 降解麦秆物质的能力

由失重结果可知, 两株菌都是在 20~30d 期间降解生物质速度达峰值。 *P. sp2* 降解生物质的峰值比其产生的 Lac 峰值迟 20d, 而 *T. gallica* 降解生物质的峰值比其产生的 Lac 峰值早 10d。但是, 这两株菌降解生物质的峰值都比它们的 LiP、MnP 和 Cel 峰值早 20d; 而与它们的 Hcel 达峰值时间一致。

由以上结果可知, *T. gallica* 在 SM2 中对麦草木质纤维素的降解能力较强, 故采用 SM2 培养 *T. gallica*, 每 10d 测定一次麦草的干重和木质素、纤维素及半纤维素的含量。其结果见图 3。 *T. gallica* 在固体培养基中经过 60d 的培养, 对半纤维素的降解达 71.96%, 对纤维素的降解达 66.21%。 *T. gallica* 具有很强的分解麦草木质素的能力, 在 20d 和 30d 麦草中 34.37% 和 46.71% 的木质素被降解, 到 60d 麦草中 70.14% 的木质素被降解。

## 3 讨论

### 3.1 *P. sp2* 和 *T. gallica* 固体培养基的选择

从表 2 可以看出, 当料液比为 1:4 时, 绝对生物学效率最高, 达 5.67%, 同时纤维素、半纤维素和木质素减少也都是相对最高, 表明该料液比更适合于 *T. gallica* 的生长。 *P. sp2* 在 LM2 液体培养基中 4 种酶产生能力最强<sup>[5]</sup>, 因此该菌株采用 SM2 固体培养基。 *T. gallica* 在 LM2 中 MnP 和 Hcel 产生能

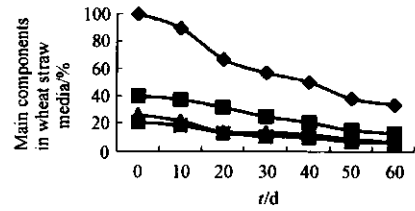


图3 *T. gallica* 的培养时间与麦草中各主要成分含量的关系

Fig.3 The relations between the incubation time and the contents of main components in wheat straw  
—●—mass loss rate; —■—cellulose  
—▲—hemicellulose; —◆—lignin

力最强, 而 Lac 和 LiP 则在 LM3 中产生能力最强<sup>[5]</sup>, 该菌株采用 SM2 和 SM3 固体培养基。

### 3.2 *P. sp2* 和 *T. gallica* 的半纤维素酶在麦草降解中的作用

固体培养 *P. sp2* 和 *T. gallica* 产酶和麦草粉失重的结果显示, Lac、LiP、MnP 是参与生物质降解重要的酶, 而降解生物质速度达峰值时间与它们的 Hcel 达峰值时间相吻合, 表明 Hcel 是不可缺少的, 它与生物质降解速度密切相关。可见要有效地降解生物质, 必须首先降解半纤维素。

由图 2 可知, *Psp2* 在 60d 内使试料的总失重率为 17.6%; 而 *T. gallica* 在 SM2 和 SM3 中使试料总失重率分别为 64.8% 和 64.1%, 约是 *P. chrysosporium* 的 1.5 倍<sup>[7]</sup>, 表明它们对木质纤维素具有很强的降解能力, 与本实验室已有的研究结果吻合<sup>[16]</sup>。

### 3.3 *T. gallica* 固体发酵降解植物生物质的特征

由图 3 可知, 虽然 *T. gallica* 在本实验条件下产 Cel 很少, 但是它却对纤维素也有很强的降解作用, 这可能是该菌株产纤维素氧化酶的结果。

由图 3 可知, *T. gallica* 在同一时间内对木质素和半纤维素的降解率均高于纤维素, 而在其生长过程中纤维素的减少, 基本上平行地伴随着半纤维素和木质素的减少。这表明, 该菌株对木质素的降解, 同时伴有半纤维素和纤维素的消失, 该菌株对木质素降解是以对半纤维素和纤维素等化合物利用为前提。或者说, 该菌株在降解和利用半纤维素和纤维素的同时, 对木质素的降解是必然伴随的辅助过程, 这是该菌株在长期进化过程中对环境适应的结果。另由图 3 可以看出, 在 0~10d 期间, *T. gallica* 对草粉纤维素的降解约 1.8%, 而对木质素的降解大于 2%; 在 10~20d 期间, 该菌株对草粉纤维素的降解较慢约 4%, 而对木质素的降解却很快约 6%; 在 20~60d 期间, 该菌株对草粉纤维素和木质素的降解速度基本平行。因此, *T. gallica* 对麦草生物质具有很强的降解能力, 且优先降解木质素, 是生物制浆中原料预处理的候选菌株。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Higuchi TH. Biodegradation of lignin: biochemistry and potential applications. *Experia*, 1982, 38: 159~166

- [ 2 ] Zimmermann W, P Broda. Conventional and high-performance size-exclusion chromatography and gramineous lignin-carbohydrate complex. *Method Enzymol*, 1988, **161**(B): 191 ~ 199
- [ 3 ] Zeikus JG. Lignin metabolism and the carbon cycle: polymer biosynthesis, biodegradation, and environmental recalcitrance. *Advances in Microbiol Ecology*, New York: Plannum Press, 1981, **5**: 211 ~ 243
- [ 4 ] WANG J L(王佳玲), YU H S(余惠生), FU S Y(付时雨) *et al.* Advances in laccases of white rot fungi. *Microbiol*(微生物学通报), 1998, **25**(4): 233 ~ 236
- [ 5 ] XIE J(谢君), REN L(任路), ZHANG Y Z(张义正) *et al.* Studies on white rot fungi producing ligninocellulose-degrading enzymes in liquid state fermentation. *Journal Sichuan University (Natural science edition)*[四川大学学报(自然科学版)], 2000, **37**(Suppl.): 161 ~ 166
- [ 6 ] Tien M, Kirk TK. Lignin degrading enzyme from *P. chrysosporium*. Purification, Characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzymes. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, **81**: 2280 ~ 2284
- [ 7 ] Camarero S, Barrase JM, Pelgoy M *et al.* Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw Biopulping. *J Pul Pape Sci*, 1998, **24**(7): 197 ~ 203
- [ 8 ] Camarero S, Sarkart S, Ruiz-Duenas FJ. Description of a Versatile peroxidase Involved in the natural Degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal Biology Chemistry*, 1999, **274**(15): 10324 ~ 10339
- [ 9 ] Childs R, WG Bardsley. The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-Sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J*. 1975, **145**: 93 ~ 103
- [ 10 ] Glod MH, Glenn JK. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Method Enzymol*, 1988, **161**B: 258 ~ 264
- [ 11 ] Leisola M, M Linko. Determination of the solubilizing activity of a cellulase complex with dyed substrates. *Anal. Biochem*, 1976, **70**(2): 592 ~ 599
- [ 12 ] Leisola M Linko M Karvonen E. *Proc Symp Enzymatic Hydrolysis Cellulose*, New York: Plannum Press, 1965, pp. 297 ~ 302
- [ 13 ] Namori T, Watanabe T, Shinke R *et al.* Purification and properties of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 6669 ~ 6672
- [ 14 ] The National Standard of The People Republic of China(中华人民共和国国家标准)GB745 - 78
- [ 15 ] The National Standard of The People Republic of China(中华人民共和国国家标准)GB2677.8 - 81
- [ 16 ] LIU S X(刘尚旭), DONG J L(董佳里), ZHANG Y Z(张义正). Comparison of Lignin-degrading enzymes from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)*[四川大学学报(自然科学版)], 2000, **37**(4): 594 ~ 598

## Studies on Lignocellulolytic Enzymes Production and Biomass Degradation of *Pleurotus sp2* and *Trametes gallica* in Wheat Straw Cultures

XIE Jun SUN Xun REN Lu ZHANG Yi-Zheng\*

(Molecular Biology Laboratory, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract** *Pleurotus sp2* and *Trametes gallica* were selected in this assay because of their high activities of lignocellulolytic enzymes and the enzyme peaks appeared at the early stage of liquid state fermentation. Solid state fermentation was also investigated for their abilities and behaviors of enzyme-production. The capabilities and characteristics of the two strains in degrading biomass were studied. When *Pleurotus sp2* was incubated in wheat straw powder containing the liquid medium of low-nitrogen, no-carbon and high inorganic salt, the activities of MnP and Lac reached the peaks on the tenth day, but the activities of hemicellulases reached the peak on the 40th day. *Pleurotus sp2* caused 17.6% of biomass loss. When *T. gallica* was incubated in wheat straw powder containing the liquid medium of high-nitrogen, or low-nitrogen, no-carbon and high inorganic salt, the activities of MnP reached the peaks on the tenth day, the lac and hemicelluloses on the 40th day, and the lignin peroxidases reached the peaks on the 50th day, and it caused more than 64% of biomass loss. Among them the hemicellulose was degraded by 71.96%, and the cellulose 66.21%. *T. gallica* was very capable of degrading lignin of wheat straw and caused 34.37% loss during 20 days, 46.71% loss during 30 days and 70.14% loss during 60 days. It was interesting that *T. gallica* degraded lignin preferentially with respect to cellulose, which was very beneficial to biopulping of paper industry.

**Key words** *Pleurotus sp2*, *Trametes gallica*, lignocellulolytic enzymes, degradation of biomass

Received: February 19, 2001

This work was supported by Grant from National Fund Committee of Natural Science (39430020) and State Education Committee.

\* Corresponding author. Tel: 86-28-5412738, E-mail: nic3602@scu.edu.cn