

几种木腐菌漆酶活性的研究^①

杨启青¹， 曹支敏¹， 胡景江²

(1.西北农林科技大学 林学院 陕西 杨陵 712100 2.西北农林科技大学 生命科学学院 陕西 杨陵 712100)

摘 要 对 18 种木腐菌胞外漆酶活性的测定结果表明,腐木生侧耳的漆酶活力最高,为 605.0 u·mL⁻¹,其次是多毛栓菌和云芝,其漆酶活力分别为 440.0 u·mL⁻¹和 400.0 u·mL⁻¹,其余菌株活性低于 336.7 u·mL⁻¹。腐木生侧耳漆酶作用的最适 pH 值为 4.6,Cu²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Co²⁺对漆酶活力有激活作用,Ag⁺、K⁺、Ca²⁺、Hg²⁺、Fe²⁺、Cl⁻和 Zn²⁺对其漆酶活力有明显抑制作用。

关键词 大型真菌;漆酶活力;腐木生侧耳

中图分类号 Q949.32 文献标识码 A 文章编号 1001-7461(2003)02-0058-03

Study on Laccase Activities of Wood-rot Fungi

YANG Qi-qing¹, CAO Zhi-min¹, HU Jing-jiang²

(1. College of Forestry, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi, 712100, China;
2. College of Life Sciences, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract In this paper, the laccase activities of 18 wood-rot fungi were studied. The results showed that the maximum activity of laccase of *Pleurotus lignetilis* was 605.0 u·mL⁻¹, then the maximum activity of laccase of *Trametes trogii* and *Corilus versicolor* were 440.0 u·mL⁻¹ and 400.0 u·mL⁻¹. Different pH values and inorganic ions had different effects on laccase activities of *Pleurotus lignetilis*. The optimum pH value of laccase of *Pleurotus lignetilis* was 4.6, Cu²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Co²⁺ increased laccase activities whereas Ag⁺、K⁺、Ca²⁺、Hg²⁺、Fe²⁺、Cl⁻ and Zn²⁺ significantly inhibited it.

Key words wood-rot fungi; laccase activity; *Pleurotus lignetilis*

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,广泛地存在于担子菌、半知菌和子囊菌中。其中最主要的是担子菌中的白腐菌,因其具有降解木质素,可与有毒的酚类作用,对苯氧基类除草剂、石油工业废物等造成环境污染的物质有去毒作用,使之在制浆造纸工业,尤其是纸浆生物漂白方面得到重要的研究和应用,在环保方面具有很大的应用潜力。

国外关于漆酶的研究涉及的真菌菌种范围很广,但多集中在黄孢原毛平革菌^[1]和杂色云芝^[2]方面的研究,国内周金燕^[3]、秦小琼^[4]、王宜磊^[5~7]等曾对真菌漆酶进行了研究。本文对采自太白山的 18 种木腐菌进行了漆酶活力的测定,并对应用较广的漆酶的一些基本性质进行了研究,其目的是筛选出对木质素分解能力较强的菌种,为木腐菌的综合

利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2002 年 9 月在太白山采集木腐菌标本,经分离纯化后得到 18 种菌株的纯菌丝体(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 组织分离及纯化 配制综合马铃薯培养基(马铃薯 20%,葡萄糖 2%,琼脂 2%,KH₂PO₄ 0.3%,MgSO₄ 0.15%,维生素 B₁ 10 mg),在灭菌后的固体培养基上接入经表面消毒的菌体组织或基物组织,25℃ 恒温培养。

1.2.2 接种母液制备 配制液体培养基(上述培养基去掉琼脂,加入 0.5% 的酵母膏,灭菌),250 mL

① 收稿日期 2002-09-12
基金项目 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目“秦岭大型真菌物种多样性及其生态功能研究”资助(200057)
作者简介 杨启青(1968-)女,青海湟中人,工程师,在职研究生,研究方向为森林病理。

三角瓶中接入 50 mL 液体培养基 ,用灭菌打孔器接入 10 cm 7 日龄平板菌种 3 片 ,30℃ ,110 r·min⁻¹恒温振荡培养 5 d。固体培养基和液体培养基经高温灭菌后 pH 值均为 6。

表 1 供试菌株及来源

Table 1 The tested isolates and their origins

菌 株	采集地	海拔/m	寄 主
粉迷孔菌 <i>Abortiporus biennis</i> (Bull. Fr.)Sing	放羊寺	3 000	针叶树朽木
云芝 <i>Corilus versicolor</i> (L. Fr.)Qeul.	上白云	1 300	阔叶树朽木
拟迷孔菌 <i>Daedaleopsis</i> sp.	大殿上	2 350	桦树倒木
大孔菌 <i>Favolus</i> sp.	骆驼寺上	1 600	阔叶树活立木
树舌 <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.)Pat	二道梁	1 800	鹅耳栎枯立木
半胶孔菌 <i>Gloeoporus</i> sp.	下白云	1 550	阔叶树枯立木
红锈刺革菌 <i>Hymenochaete mougeotii</i> (Fr.)Cke	明星寺	2 830	杜鹃枯立木
截头炭球菌 <i>Hypoxylon anuulatum</i> (Schw.)Mont	大殿上	2 350	桦树倒木
皱孔菌 <i>Merulius</i> sp.	大殿下	2 000	阔叶树倒木
毛边刺皮菌 <i>Odontia fimbriata</i> Pers. ex Fr.	下白云	1 550	阔叶树枯枝
刺皮菌 <i>Odontia</i> sp.	骆驼寺上	1 600	阔叶树倒木
白环粘奥德蘑 <i>Oudemansiella mucida</i> (Schrad. Fr.)Hohnel	下白云	1 550	栎树活立木
宽褶奥德蘑 <i>Oudemansiella platyphylla</i> (Pers. Fr.)Moser	下白云	1 550	阔叶树倒木
腐木生侧耳 <i>Pleurotus lignetilis</i> Fr.	大殿上	2 350	阔叶树倒木
卧孔菌 <i>Poria</i> sp.	骆驼寺上	1 600	阔叶树倒木
轮纹硬革 <i>Stereum fasciatum</i> Schw	大殿下	2 000	桦树倒木
栓菌 <i>Trametes</i> sp.	大殿下	2 000	阔叶树朽木
多毛栓菌 <i>Trametes trogii</i> Berkeley.	骆驼寺下	1 500	阔叶树倒木

1.2.3 胞外酶粗酶液的制备 250 mL 三角瓶中装液体培养基 50 mL ,接入 2 mL 接种母液 ,每菌种 3 个重复 ,110 r·min⁻¹ ,30℃ 恒温振荡培养 ,第 5、8 d 各取样 1 次 ,4 000 r·min⁻¹离心 15 min ,上清液即为粗酶液 ,冰箱保存备用。

1.2.4 漆酶活性的测定 试管中加入 3.36 mmol·L⁻¹邻联甲苯胺 0.5 mL、0.1 mol·L⁻¹pH4.6 的醋酸缓冲液 3.5 mL 和粗酶液 0.1 mL ,25℃ 保温 30 min ,以煮死酶液为对照 ,测定 600 nm 处光密度值 ,酶活力以样品与底物反应 30 min 后光密度值的改变值表示 ,以每分钟引起 0.01 吸光度值的增加所需的酶液量为一个酶活力单位(u·mL⁻¹)。每菌种 3 个重复。

1.2.5 漆酶性质分析 选择其中漆酶活性较高的菌株 ,测定其在不同 pH 值和化学试剂条件下的漆酶活力 ,测定按上述方法进行。不同 pH 配制方法 :

表 2 真菌的漆酶活力

Table 2 The laccase activities of macrofungi

菌 种	漆酶活力/u·mL ⁻¹		菌 种	漆酶活力/u·mL ⁻¹		菌 种	漆酶活力/u·mL ⁻¹	
	5 d	8 d		5 d	8 d		5 d	8 d
白环粘奥德蘑	175.0	28.3	腐木生侧耳	185.0	605.0	云 芝	180.0	400.0
拟迷孔菌	0.0	0.0	毛边刺皮菌	8.3	91.7	树 舌	121.7	136.7
宽褶奥德蘑	96.6	41.7	粉迷孔菌	10.0	16.7	刺皮菌	246.7	38.3
轮纹硬革菌	111.7	246.7	半胶孔菌	56.7	233.3	卧孔菌	25.0	10.0
红锈刺革菌	30.0	3.3	多毛栓菌	440.0	251.7	栓 菌	336.7	85.0
截头炭球菌	151.7	188.3	皱孔菌	93.3	120.0	大孔菌	118.3	186.7

2.2 pH 值对腐木生侧耳漆酶活力的影响

由表 3 看出 ,在醋酸盐缓冲液中 ,腐木生侧耳的漆酶酶解 pH 值范围较广 ,在 pH3.0~7.0 之间均有较高的活性 ,但最适酶解 pH 值为 4.6。

表 3 pH 值对漆酶活力的影响

Table 3 Effect of pH value on laccase activity

pH	漆酶活力/u·mL ⁻¹	pH	漆酶活力/u·mL ⁻¹
3.0	170.0	5.0	368.3
3.6	233.3	5.2	273.3
4.0	375.0	5.6	248.3
4.2	468.3	6.0	153.3
4.6	590.0	7.0	146.7
4.8	481.7	8.0	60.0

2.3 无机离子对酶活力的影响

由表 4 可以看出 ,当酶反应液内盐质量浓度为 1.5 mg/mL 时 ,Cu²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Co²⁺ 对腐木生侧耳的漆酶有激活作用 ,Ag⁺、K⁺、Ca²⁺、Hg²⁺、Fe²⁺、Cl⁻ 和 Zn²⁺ 能明显抑制其漆酶活性。

表 4 无机离子对漆酶活力的影响

Table 4 Effect of inorganic ions on activities of laccase

试 剂	相对活力/%	试 剂	相对活力/%
对照	100	KCl	34
MgSO ₄	480	CaCl ₂	31
NaCl	23	HgCl ₂	39
ZnSO ₄	18	CuSO ₄	452
Na ₂ SO ₄	305	FeSO ₄	23
AgNO ₃	0	CoCl ₂	512

3 小结

本研究的 18 个菌种中 17 种有一定的漆酶活力 ,但在相同的条件下不同菌种的漆酶活力有较大的差异。其中以腐木生侧耳酶活力为最高。同一种木腐菌在不同的 pH 条件下漆酶活力不同 ,腐木生侧耳在 pH4.6 的缓冲液中漆酶活力最高。

本文仅对腐木生侧耳的漆酶性质进行了部分研究 ,不同菌种、不同底物、不同温度和不同培养条件及通气量等的研究有待进一步进行。

参考文献：

[1] Srinivasan C ,Souza T M ,Boominatathan K ,et al. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F 1767[J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1995 ,61 (12) :4274-4277.

[2] Brian P R , Frederick A. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism[J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1993 ,59 (6) :1855-1963.

[3] 周金燕 ,张发群. 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶的研究[J]. 微生物学报 ,1993 ,33 (5) :387-391.

[4] 秦小琼 ,傅挺治 ,曹幼琴 ,等. 红栓菌胞外漆酶的诱导、纯化及部分性质研究[J]. 微生物学报 ,1996 ,36 (5) :360-366.

[5] 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.

[6] 王宜磊 ,邓振旭. 彩绒革盖菌漆酶活性的初步研究[J]. 微生物学杂志 ,1998 ,18 (4) :60-62.

[7] 王宜磊. 侧耳液体培养特性及胞外酶活性研究[J]. 中国食用菌 ,2000 ,19 (4) :33-34.

“ 西部林业生态环境建设 ” 专栏征稿启事

为了及时报道西部开发中的西部林业生态环境建设研究的新成果、新技术、新动态 ,加快西部林业生态建设的发展 ,我刊将从 2003 年第 4 期开始 ,设立“ 西部林业生态环境建设 ” 专栏 ,刊登内容主要包括西部的林业生态、森林资源现状调查、林业工程建设、林业发展战略及生态环境安全、林业法规等。

欢迎投稿！