

2 种野外采集白腐真菌分离及其产漆酶液体培养基优化

李环明¹, 杨洪升¹, 薛春梅^{1,2*}

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学应用微生物研究所, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的] 优化 2 种野外采集白腐真菌菌丝产漆酶液体培养基。[方法] 对 2 种采集的白腐真菌轮纹韧革菌(*Stereum ostrea*) 和朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*) 通过分离纯化得到白腐真菌菌丝, 应用 ABTS 法测定其产漆酶活性, 研究碳源、氮源、金属阳离子、pH、温度、转速对白腐真菌产漆酶的影响。[结果] 轮纹韧革菌最佳培养基是葡萄糖 20.00 g、硝酸钾 5.00 g、NaH₂PO₄ 5.00 g、CuSO₄ 1.00 g、初始 pH 6、温度 25 ℃、转速 170 r/min, 在第 11 天其产漆酶活性达到最大, 为 1.557 U/mL, 是 PDA 液体培养基产漆酶活性的 2.7 倍。朱红密孔菌最佳培养基是麦芽糖 25.00 g、酵母膏 5.00 g、NaH₂PO₄ 1.00 g、KCl 2.00 g、初始 pH 7、温度 30 ℃、转速 200 r/min, 在第 9 天其产漆酶活性达到最大, 为 1.478 U/mL, 是 PDA 液体培养基产漆酶活性的 2.3 倍。[结论] 筛选出 2 种野外白腐真菌产漆酶最佳培养基, 为漆酶的进一步研究提供了参考。

关键词 白腐真菌; 漆酶; 培养基; 筛选

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)03-0001-03

Isolation of Two Species of Field Acquisition White Rot Fungi and Optimization of Liquid Culture Medium of Their Produce Laccase
LI Huan-ming¹, YANG Hong-sheng¹, XUE Chun-mei^{1,2*} (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Applied Microbiology Research Institute, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the liquid culture medium of two species of field acquisition white rot fungi. [Method] By isolating and purifying two species of white rot fungi, *Stereum ostrea* and *Pycnoporus cinnabarinus*, white rot fungus hyphae were collected, and the liquid culture medium of laccase was screened. ABTS method was applied to measure the activity of laccase. Effects of carbon sources, nitrogen sources, metal cations, pH, temperature and rotational speed on laccase produced by white rot fungi were studied. [Result] The optimum medium of *Stereum ostrea* was glucose 20.00 g, potassium nitrate 5.00 g, NaH₂PO₄ 5.00 g, CuSO₄ 1.00 g, the initial pH 6, temperature 25 ℃, rotational speed 170 r/min, and the laccase activity reached the maximum on the 11th day the maximum value reached 1.557 U/mL which was 2.7 times of the laccase activity of PDA liquid culture. The optimum medium of *Pycnoporus cinnabarinus* was maltose 25.00 g, yeast extract 5.00 g, NaH₂PO₄ 1.00 g, KCl 2.00 g, the initial pH 7, temperature 30 ℃, rotational speed 200 r/min, and the laccase activity reached the maximum in the 9 d, the maximum value 1.478 U/mL which was 2.3 times of the laccase activity of PDA liquid culture. [Conclusion] The optimal liquid culture medium of two species of field acquisition white rot fungi is obtained so as to provide reference for further study of laccase.

Key words White rot fungus; Laccase; Culture medium; Screen

白腐真菌是一类使木材呈白色腐朽的真菌, 可在特定条件下产各种酶系^[1], 包括漆酶、木质素过氧化氢酶和锰过氧化氢酶等^[2-3]。在白腐真菌产的酶系中, 漆酶的应用非常广泛。在染料脱色方面, 马利^[4]、傅恺^[5]、张丽^[6]、王天女等^[7]对重组血红密孔菌产漆酶对活性蓝等染料进行脱色结果分析, 其脱色率达 93%。在环境污染的处理方面, 彭丹对黄孢原毛平革菌在固态发酵体系产真菌漆酶对五氯酚(PCP)降解进行研究, 结果表明在没有氧化还原介体时粗漆酶液能降解 PCP, 反应 6 h 降解率为 37.8%, 粗酶液中加入 5 mmol/L 氧化还原介体 (ABTS) 能获得更高的降解率, 达 97.0%; 将粗漆酶液用 (NH₄)₂SO₄ 盐析纯化, 用提纯后漆酶降解 PCP, 6 h 后降解率为 81.8%^[8-9]。在农药处理方面, 程科^[11]对白腐菌漆酶纯化分离并对阿特拉津进行降解研究, 结果表明, 在最优降解条件下, 阿特拉津降解率响应预测值为 52.41%, 验证值为 52.32%, 最适条件下的降解率提高了 10%~15%。此外, 漆酶能选择性地催化木质素降解, 这一特性可用于纸浆生产。漆酶还可用来测定食品中抗坏血酸的总含量, 该方法已应用于白酒、啤酒、奶粉等食品检测^[10]。笔者研究了 2 种

野外采集的白腐真菌液体粗酶液中漆酶的活性, 对产漆酶的液体培养基进行优化, 以期得到最佳的培养基配方。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂。恒温水浴锅、YXQ-LS-立式压力蒸汽灭菌锅、KA-1000 低速离心机、BS-2F 振荡培养箱、ZHWY-2102 全温摇床振荡器、SPX-250B-G 型恒温光照培养箱。呋喃西林、ABTS、KNO₃、MgSO₄、NaH₂PO₄、H₂O₂、CuSO₄、CaCl₂、KCl、ZnSO₄、醋酸-醋酸钠缓冲液。

1.1.2 供试菌种。菌种采于佳木斯市四丰乡小桦山, 根据真菌鉴定图谱鉴定为轮纹韧革菌、朱红密孔菌。

1.1.3 培养基。PDA 选择培养基: 土豆 100.00 g, 葡萄糖 5.00 g, 呋喃西林 0.25 g, 琼脂 10.00 g, 定容至 500 mL。斜面培养基: 称去皮马铃薯 200.00 g, 切成小块, 加适量 (完全浸没马铃薯) 蒸馏水, 煮 20~30 min, 用 9 层纱布过滤出马铃薯浸出液, 加入葡萄糖 20.00 g、NaH₂PO₄ 3.00 g、MgSO₄·7H₂O 1.50 g、琼脂 20.00 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL^[11]。液体标准培养基: 马铃薯 200.00 g, 煮 20~30 min, 用 9 层纱布过滤, 加入葡萄糖 20.00 g、NaH₂PO₄ 3.00 g、MgSO₄·7H₂O 1.50 g、蛋白胨 5.00 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离及扩大培养。先用 75% 乙醇擦拭 1 次, 用剪刀剪开菌体, 在中间剪一小块菌体接种到 PDA 选择培养

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目 (12531696); 佳木斯大学研究生科技创新项目 (YM2016_002)。

作者简介 李环明 (1989—), 男, 内蒙古五原人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。* 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 从事应用微生物学研究。

收稿日期 2016-11-11

基上,当菌丝萌发至长2 cm时,切取菌丝尖端1 mm左右,接入新配制PDA母种培养基上,重复3~5次,以不长杂菌为分离成功^[1]。

1.2.2 液体菌种的制备。在每瓶PDA液体培养基中接种3块10 mm的菌片,25℃、110 r/min培养13 d。

1.2.3 培养基的筛选。

1.2.3.1 碳源筛选。以不加马铃薯的液体标准培养基为基准,设置葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、蔗糖5个不同碳源处理,另设不加碳源为对照,筛选最佳碳源。

1.2.3.2 氮源筛选。设置硝酸钾、硫酸铵、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨5个氮源处理,以不加氮源为对照,筛选最佳氮源。

1.2.3.3 金属阳离子筛选^[6]。设置 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Cu^{2+} 5个因素,以不加金属阳离子为对照。

1.2.3.4 营养因素正交试验。试验因素与水平见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平

水平 Level	碳源(A) Carbon sources	氮源(B) Nitrogen sources	NaH_2PO_4 (C)	金属阳离子(D) Metal cations
1	15.0	2.0	1.0	1.0
2	20.0	5.0	3.0	1.5
3	25.0	8.0	5.0	2.0

1.2.3.5 温度的筛选。以营养因素正交试验筛选出来的最佳组合为基础培养基,分别设置15、20、25、30、35、40℃共6个不同温度处理。

1.2.3.6 初始pH的筛选。用5% NaOH和0.2 mol/mL HCl将发酵培养基的初始pH分别设置为4、5、6、7、8、9。

1.2.3.7 摇床转速筛选。设置110、140、170、200、230 r/min,以不设转速为对照。

1.2.3.8 培养时间的筛选。根据对2种白腐真菌培养基营养因素及条件的筛选,最后得出最佳培养基配方,并且进行培养,测定1、3、5、7、9、11、13、15 d等不同时间段产漆酶活性。

1.2.4 漆酶活性测定。

1.2.4.1 胞外酶的提取。对液体培养基进行纱布过滤,冰箱冷藏24 h后4 000 r/min离心15 min,上清液即为胞外提取液^[12-13]。

1.2.4.2 漆酶活性测定。采用ABTS法。空白样(4.0 mL):2.0 mL 0.2 mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)+0.4 mL 0.3 mol/L ABTS+1.2 mL去离子水+0.4 mL失活酶液。样品(4.0 mL):2.0 mL 0.2 mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)+0.4 mL 0.3 mol/L ABTS+1.2 mL去离子水+0.4 mL酶液。在40℃下应用可见分光光度计检测420 nm波长处吸收值变化,30 s间隔读数,记录240 s内吸收值变化,定义1 min内氧化1 μ mol ABTS所需要的酶量为1个漆酶活力单位(U),已知420 nm波长处ABTS摩尔消光系数 $\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4$ L/(mol·cm)。

2 结果与分析

2.1 营养因素对白腐真菌产漆酶的影响 5种碳源中,轮纹

韧革菌产漆酶液体培养基中最佳碳源是葡萄糖,其产漆酶最大值为0.578 U/mL;朱红密孔菌产漆酶液体培养基中最佳碳源是麦芽糖,其产漆酶最大值为0.642 U/mL(图1)。

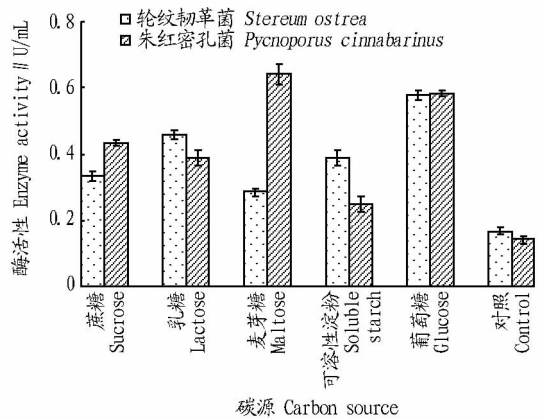


图1 碳源对白腐真菌菌丝产漆酶的影响

Fig.1 Effects of carbon source on laccase produced by white rot fungi

5种氮源中,轮纹韧革菌产漆酶液体培养基中最佳氮源是硝酸钾,其产漆酶最大值为1.069 U/mL;朱红密孔菌产漆酶液体培养基中最佳氮源是酵母膏,其产漆酶最大值为0.752 U/mL(图2)。

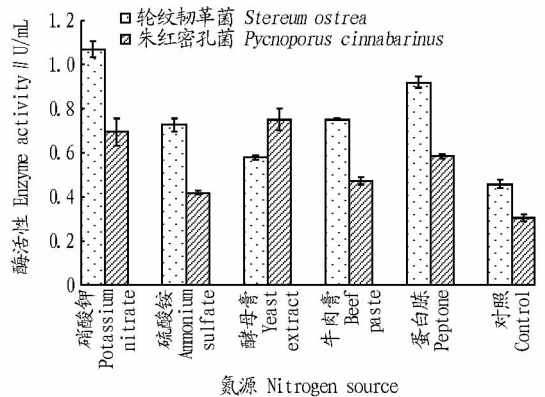


图2 氮源对白腐真菌菌丝产漆酶的影响

Fig.2 Effects of nitrogen source on laccase produced by white rot fungi

2.2 金属阳离子对白腐真菌产漆酶的影响 由图3可知,金属阳离子 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对轮纹韧革菌产漆酶都有促进作用, Cu^{2+} 对轮纹韧革菌促进最大,在添加了 Cu^{2+} 的液体培养基中,其产漆酶最大值为1.349 U/mL。而 Ca^{2+} 对其有抑制作用,添加了 Ca^{2+} 的液体培养基产漆酶值为0.389 U/mL, Zn^{2+} 、 K^{+} 影响不大,和不加金属离子产漆酶相差不多。

金属阳离子 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对朱红密孔菌产漆酶都有促进作用, K^{+} 对朱红密孔菌促进作用最大,在添加了 K^{+} 的液体培养基中,其产漆酶最大值为0.931 U/mL。而 Ca^{2+} 对其有抑制作用,添加了 Ca^{2+} 的液体培养基产漆酶值为0.056 U/mL, Zn^{2+} 对朱红密孔菌产漆酶影响不大。

2.3 不同营养因素正交试验结果 综合评价,轮纹韧革菌液体培养基最优组合为 $A_2B_2C_3D_1$,此时获得的菌丝产漆酶为1.386 U/mL。即优化后的最适培养基为:葡萄

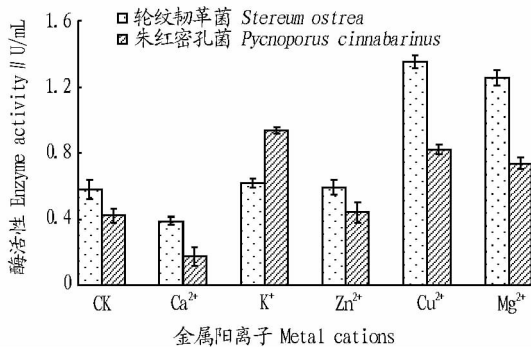


图3 金属阳离子对产漆酶的影响

Fig.3 Effects of metal cations on laccase produced by white rot fungi

糖 20.00 g, 硝酸钾 5.00 g, NaH₂PO₄ 5.00 g, CuSO₄ 1.00 g。由极差 *R* 值可知, 影响菌丝体产漆酶的因素大小顺序为葡萄糖、硝酸钾、CuSO₄ 和 NaH₂PO₄, 葡萄糖和硝酸钾对试验结果有极显著影响(表 2)。

表 2 轮纹韧革菌不同营养因素正交试验设计方案与结果

Table 2 Design scheme and result of orthogonal test for different nutritional factors of *Stereum ostrea*

试验号 Test No.	因素 Factors				酶活性 Enzyme activity U/mL
	葡萄糖 Glucose	硝酸钾 Potassium nitrate	NaH ₂ PO ₄	CuSO ₄	
1	1	1	1	1	0.747 ± 0.016
2	1	2	2	2	0.873 ± 0.037
3	1	3	3	3	0.866 ± 0.029
4	2	1	2	3	1.167 ± 0.007
5	2	2	3	1	1.386 ± 0.017
6	2	3	1	2	1.330 ± 0.014
7	3	1	3	2	1.038 ± 0.025
8	3	2	1	3	1.176 ± 0.012
9	3	3	2	1	1.190 ± 0.023
<i>k</i> ₁	0.829	0.984	1.084	1.108	
<i>k</i> ₂	1.294	1.145	1.077	1.080	
<i>k</i> ₃	1.135	1.129	1.097	1.070	
<i>R</i>	0.465	0.161	0.020	0.038	

朱红密孔菌液体营养因素培养基最优组合为 A₃B₂C₁D₃, 此时获得的菌丝产漆酶为 0.940 U/mL。即优化后的最适培养基为: 麦芽糖 25.00 g, 酵母膏 5.00 g, NaH₂PO₄ 1.00 g, KCl 2.00 g。由极差 *R* 值可知, 影响菌丝体产漆酶的因素大小顺序为麦芽糖、酵母膏、NaH₂PO₄ 和 KCl, 麦芽糖和酵母膏对试验结果有极显著影响(表 3)。

2.4 培养条件对白腐真菌产漆酶的影响

2.4.1 pH 对白腐真菌产漆酶的影响。由图 4 可知, 轮纹韧革菌在 pH 6 的液体培养基中产漆酶量最大, 为 1.395 U/mL, 且偏碱的培养基不适合菌丝体产漆酶。朱红密孔菌产漆酶最适 pH 为 7, 产漆酶最大值为 0.940 U/mL, 偏碱的培养基对其有抑制作用。

2.4.2 温度对白腐真菌产漆酶的影响。由图 5 可知, 轮纹韧革菌最适温度为 25 °C, 产漆酶最大值为 1.386 U/mL, 朱红密孔菌最适温度为 30 °C, 产漆酶最大值为 0.972 U/mL。温度过高和过低, 2 种白腐真菌漆酶活性都降低。

表 3 朱红密孔菌营养因素正交试验设计方案与结果

Table 3 Design scheme and result of orthogonal test for different nutritional factors of *Pycnoporus cinnabarinus*

试验号 Test No.	因素 Factors				酶活性 Enzyme activity U/mL
	麦芽糖 Maltose	酵母膏 Yeast extract	NaH ₂ PO ₄	KCl	
1	1	1	1	1	0.317 ± 0.011
2	1	2	2	2	0.386 ± 0.021
3	1	3	3	3	0.454 ± 0.022
4	2	1	2	3	0.723 ± 0.023
5	2	2	3	1	0.887 ± 0.024
6	2	3	1	2	0.893 ± 0.032
7	3	1	3	2	0.903 ± 0.023
8	3	2	1	3	0.940 ± 0.017
9	3	3	2	1	0.913 ± 0.021
<i>k</i> ₁	0.386	0.648	0.717	0.706	
<i>k</i> ₂	0.834	0.738	0.674	0.727	
<i>k</i> ₃	0.919	0.753	0.748	0.706	
<i>R</i>	0.533	0.105	0.074	0.021	

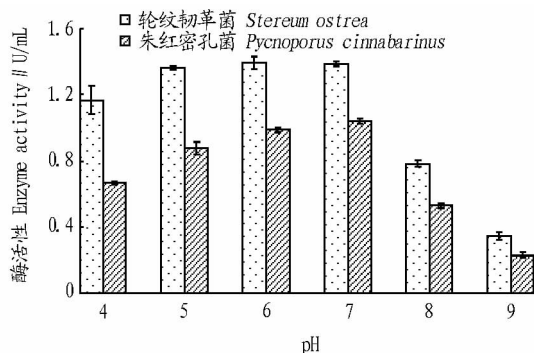


图 4 pH 对菌丝产漆酶的影响

Fig.4 Effects of pH on laccase produced by white rot fungi

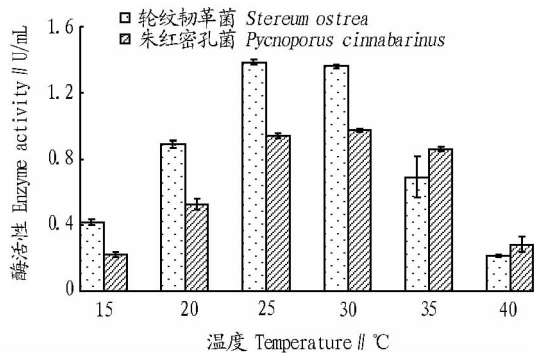


图 5 温度对菌丝产漆酶的影响

Fig.5 Effects of temperature on laccase produced by white rot fungi

2.4.3 转速对白腐真菌产漆酶的影响。由图 6 可知, 轮纹韧革菌最佳转速为 170 r/min, 产漆酶最大值为 1.482 U/mL, 朱红密孔菌最佳转速为 200 r/min, 产漆酶最大值为 1.117 U/mL, 在静置状态下 2 种白腐真菌产漆酶活性都非常低。

2.5 培养时间对产漆酶的影响 结果表明, 轮纹韧革菌在最佳培养基培养下, 开始 1~5 d 漆酶活性较低, 在第 7 天有所下降, 7~11 d 快速增长并且达到最大, 在第 11 天其产漆酶活性为 1.557 U/mL, 13~15 d 漆酶活性稍有下降, 并且达到平

(下转第 18 页)

2.4 不同培养基对玉米花药出愈率的影响 培养基成分不同,则玉米花药的出愈率也会不同^[7],用郑单 958、先玉 335、大丰 30、晋单 87 和丰乐 742 进行激素配比筛选试验。在基本培养基 N6 上加入 2 mg/L 2,4-D 及不同浓度的 KT 和 6-BA。结果显示,同样浓度的 2,4-D 条件下,加入分裂素能促进愈伤组织的形成,且 KT 的作用优于 6-BA。该试验中,2 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L KT 促进愈伤组织形成的效果最佳,出愈率最高,与郭新梅等的研究一致^[8]。而晋单 87 在 N6 培养基上全部褐化死亡,即使加入激素仍不能缓解其褐化死亡,说明 N6 培养基不适合该基因型。

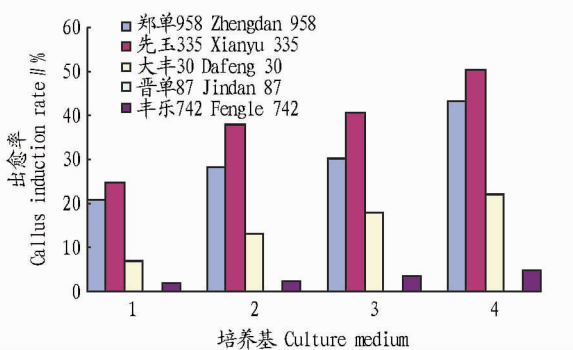


图3 不同培养基对玉米花药出愈率的影响

Fig. 3 Effects of culture medium on the callus induction rate of maize anther

3 结论

培养基是外植体的主要营养来源,不同的培养基出愈率

具有较大的差异。该试验利用 4 种不同的培养基,观察诱导期间花药的形态变化,并统计其水渍愈伤率、褐化率、膨大率和死亡率,得出 N6 培养基更适用于花药培养的结论。同时,生长素 2,4-D 和分裂素 KT 能有效促进愈伤组织的形成,而 6-BA 效果较不明显。此外,基因型是影响玉米花药培养的重要因素之一,该试验利用 5 种不同基因型材料进行花药离体培养,其出愈率有明显差异,其中先玉 335 出愈率最高,为 23.15%,而晋单 87 未形成愈伤组织,说明选择正确的基因型对愈伤组织的诱导及获得单倍体玉米材料至关重要。

参考文献

- [1] 中国科学院遗传研究所组织培养实验室四室一组. 诱导玉米花粉植株的初步研究[J]. 遗传学报,1975(2):138-142.
- [2] 北京海淀区东北旺公社试验站,中国科学院北京植物研究所玉米单倍体育种协作组. 玉米花药培养的研究初报[J]. 植物学报,1975,18(2):180-182.
- [3] 广西壮族自治区玉米研究所,北京市海淀区东北旺公社试验站,中国科学院北京植物研究所. 玉米花药培养的研究[J]. 植物学报,1977,19(2):89-94,169.
- [4] 吴甲林,钟秋兰,农方红,等. 花药培育成玉米纯系及其杂交组合的试种[J]. 中国科学,1983,13(2):154-161.
- [5] 金航,张金渝,张智慧. 影响花药培养的主要因素[J]. 现在中药研究与实践,2006,20(3):61-64.
- [6] 原玉香,耿建峰,张晓伟,等. 影响玉米花药培养效率的因素研究[J]. 华北农学报,2001,16(3):12-16.
- [7] 郭奕明,杨映根,郭仲琛. 玉米花药培养和单倍体育种的研究新进展[J]. 植物学通报,2001,18(1):23-30.
- [8] 郭新梅,叶克苾,裴玉贺,等. 影响玉米花药培养特性关键因素的研究[J]. 玉米科学,2013,21(4):83-88.

(上接第3页)

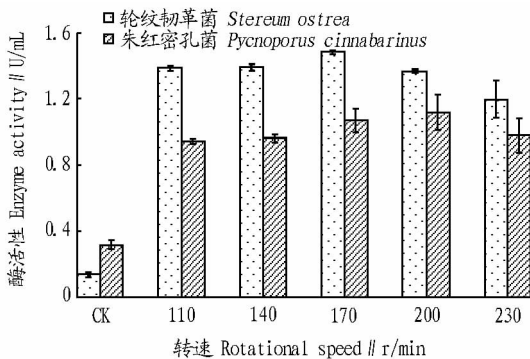


图6 转速对菌丝产漆酶的影响

Fig. 6 Effects of rotational speed on laccase produced by white rot fungi

稳。朱红密孔菌在最佳培养基培养下,开始 1~3 d 漆酶活性较低,3~7 d 平稳增长,并且在 7~9 d 快速增长,达到最大,在第 9 天其产漆酶活性为 1.478 U/mL,在 11 d 有下降,11~13 d 产漆酶活性变化不大,到 15 d 又有下降。

3 结论

轮纹韧革菌最佳培养基是葡萄糖 20.00 g、硝酸钾 5.00 g、 NaH_2PO_4 5.00 g、 CuSO_4 1.00 g、初始 pH 6、温度 25 °C、转速 170 r/min,在第 11 天其产漆酶活性达到最大,为 1.557 U/mL,是 PDA 液体培养基产漆酶活性的 2.7 倍。朱红密孔菌最佳培养基是麦芽糖 25.00 g、酵母膏 5.00 g、

NaH_2PO_4 1.00 g、KCl 2.00 g、初始 pH 7、温度 30 °C、转速 200 r/min,在第 9 天其产漆酶活性达到最大,为 1.478 U/mL,是 PDA 液体培养基产漆酶活性的 2.3 倍。通过对 2 种白腐真菌产漆酶培养基的筛选,得出最佳培养基配方,为后期的漆酶研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 程科. 白腐菌漆酶分离纯化、酶学性质及其对阿特拉津最适降解条件的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [2] 刘苹,唐志红,李梦玉,等. 金针菇漆酶活性测定的最佳反应条件及液体培养胞外酶的研究[J]. 食品科技,2012(6):14-17.
- [3] 徐腾飞,卢磊,赵敏,等. 一株产漆酶细菌的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 微生物学通报,2013,40(3):434-442.
- [4] 马利. 白腐真菌及其漆酶对不同结构染料的降解研究[D]. 武汉:华中科技大学,2013.
- [5] 傅恺. 真菌漆酶高产菌株的发酵产酶及酶促降解有机染料的动力学研究[D]. 广州:华南理工大学,2013.
- [6] 张丽. 铜离子诱导白腐菌高产漆酶及其用于降解染料的研究[D]. 广州:华南理工大学,2013.
- [7] 王天女,李国富,赵敏,等. 重组血红密孔菌漆酶在染料脱色中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2016,40(1):92-96.
- [8] 彭丹. 黄孢原毛平革菌和黄孢原毛平革菌漆酶对五氯酚降解的研究[D]. 长沙:湖南大学,2008.
- [9] 张博. 东北白腐真菌高效产酶及降解多环芳烃特征研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2014.
- [10] 王鼎,曾东方,池汝安,等. 3,3'-二甲基联苯胺法测定香菇漆酶活性研究[J]. 江苏林业科技,2008,35(5):12-16.
- [11] 范寰,廖伟,刘文思,等. 白腐真菌液体发酵培养基的优化研究[J]. 饲料研究,2010(10):31-33.
- [12] 蒋冬冬,李莉,赵新海,等. 产漆酶真菌的筛选及其固态发酵条件研究[J]. 微生物学杂志,2010,30(6):55-59.
- [13] 刘禹,兰进,徐新然,等. 灵芝属不同菌株漆酶活性的比较[J]. 中药材,2016(8):1692-1695.