

# 贝壳状革耳菌和黄孢平革菌固体培养酶系比较\*

王彩华 余惠生\*\* 付时雨

(中国科学院广州化学研究所 广州 510650)

**提 要** 白腐菌黄孢平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)与贝壳状革耳菌(*Panus conchatus*) 在类似自然状态的固体培养条件下酶的分泌情况有较大差异。*P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 的主要木素降解酶分别是漆酶和锰过氧化物酶,两种菌均产生较高水平的木聚糖酶;*P. conchatus* 在整个培养过程中所产生的内切葡聚糖酶、微晶纤维素酶和纤维二糖酶活力均比 *P. chrysosporium* 相应酶的活力低得多,尤其是内切葡聚糖酶。研究结果初步揭示了 *P. conchatus* 降解木素的主要酶系及选择性降解木素的原因。

**关键词** 白腐菌,木素降解酶,半纤维素酶,纤维素酶

**分类号** Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0127-31

木素的降解是植物纤维生物转化与利用的关键。迄今为止,降解天然木素最有效的微生物是白腐菌,但对木质纤维素生物降解的微观形态变化的研究表明,绝大多数白腐菌,如黄孢平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*),在降解木素的同时,也使纤维细胞壁变薄、纤维素被严重降解<sup>[1-2]</sup>。我们的前期工作表明,白腐菌贝壳状革耳菌(*Panus conchatus*)可以非常有效地降解草中的木素,同时选择性地进攻木素最集中的胞间层,使纤维保持完整地彼此分离。对脱木素后草中纤维素的聚合度测定也表明,没有明显的纤维素降解发生<sup>[3]</sup>。为探究 *P. conchatus* 能选择性降解木素的原因,同时了解该菌的主要木素降解酶,我们检测了此菌种在固体培养过程中酶的分泌情况,并与国际上研究最多的 *P. chrysosporium* 进行了对比。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

白腐菌 *P. conchatus* 从腐朽的松树分离,*P. chrysosporium* BMK-F-1767 由 Hattaka A. 赠送。两种菌经液体培养后制成菌丝悬浮液备用。

### 1.2 固体培养

经粉碎的稻草以每瓶 10g 分装于 300 mL 三角瓶内,在 120℃ 下灭菌 30min,接种,混匀后在 39.5℃ 静止培养。

### 1.3 酶液的制备

在稻草发酵过程中,取出不同时间发酵样品,挤出发酵液,然后用水洗三次,使酶液总

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39430020) 广东省自然科学基金(No. 960388) 制浆造纸工程国家重点实验室和纤维素化学开放实验室资助项目

\*\*通讯联系人

收稿日期:1997-04-14,修回日期:1998-07-17

体积约 100mL。经离心(3500r/min, 15min)后,取上清液用于测酶活。

## 1.4 酶活力的测定

1.4.1 木素降解酶活力测定 (1)漆酶:用等体积 0.5mmol/L 2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)简称 ABTS)溶液和酶液反应,测定反应前 3min 内反应液在 420nm 处吸光值的增加,每分钟使 1 $\mu$ mol ABTS 转化所需的酶量为一个活力单位(U)<sup>[4]</sup> (2)锰过氧化物酶:反应混合液包括 3.4mL 0.11mol/L 乳酸钠缓冲液(pH4.5) 0.1mL 40mmol/L MnSO<sub>4</sub> 溶液和 0.4mL 酶液,加入 0.1mL 1.6mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液启动反应,测定 240nm 处反应液的吸光值的增加,定义每分钟使 1 $\mu$ mol Mn<sup>2+</sup> 氧化成 Mn<sup>3+</sup> 所需的酶量作为一个酶活力单位<sup>[5]</sup>; (3)木素过氧化物酶:反应混合液含 0.125 mol/L 酒石酸钠-盐酸缓冲液(pH3.5) 2.5 mmol/L 藜芦醇 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和适量酶液,测定酶反应前 3min 内在 310nm 处吸光值的增加,定义每分钟使 1 $\mu$ mol 藜芦醇氧化所需的酶量为一个活力单位(U)<sup>[6]</sup>。

1.4.2 半纤维素酶活力测定:主要检测了木聚糖酶的活力,方法如下:取 0.1mL 适当稀释的酶液,加 1mL 用 0.1mol/L pH4.8 醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖(Sigma oat spelts xylan)溶液,50 $^{\circ}$ C 酶解 30min,用 DNS 法测定还原糖(以木糖计)<sup>[7]</sup>。定义每分钟释放 1 $\mu$ mol 还原糖(以木糖计)所需的酶量为一个活力单位(U)。

1.4.3 纤维素酶活力测定:内切葡聚糖酶(EG)活力以羧甲基纤维素(CMC)为底物测定<sup>[8]</sup>,微晶纤维素酶活力以微晶纤维素(Avicel)为底物测定<sup>[9]</sup>,纤维二糖酶(Cellobiase)活力测定遵照 IUPAC Biotechnology commission 推荐方法<sup>[10]</sup>进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 木素降解酶

白腐菌 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下产生木素降解酶的情况如图 1 所示。在三种木素降解酶(漆酶 Laccase、木素过氧化物酶 Lip 和锰过氧化物酶 MnP)中,漆酶在 *P. conchatus* 接种 3d 后的整个培养过程中都有产生,其活力在培养 22d 时达到最高,此后持续保持在较高水平,锰过氧化物酶则在培养至 8d 时才检测到,其活力相对很低,并在培养 26d 后降至零,木素过氧化物酶则在整个培养过程中都未检测到。这说明漆酶是 *P. conchatus* 在固体培养条件下的主要木素降解酶。而在 *P. chrysosporium* 培养过程中,检测到较高的锰过氧化物酶活力,但整个过程未能检测到漆酶与木素过氧化物酶。这一结果表明两种菌在固体培养条件下产生的木素降解酶系有很大差异。

### 2.2 半纤维素酶

因为稻草中半纤维素主要是木聚糖,所以检测半纤维素酶时主要检测了木聚糖酶。我们发现在两种菌的培养过程中均有大量木聚糖酶产生,其中 *P. chrysosporium* 产生的木聚糖酶活力较高(图 2)。由于稻草中大部分木素是与半纤维素有化学键连结,组成木素-碳水化合物复合体(LCC)<sup>[11]</sup>,半纤维素酶可催化水解复合体的碳水化合物部分,有利于复合体的溶出。因此,半纤维素酶(主要是木聚糖酶)在微生物脱木素过程中可能起着重要的作用。

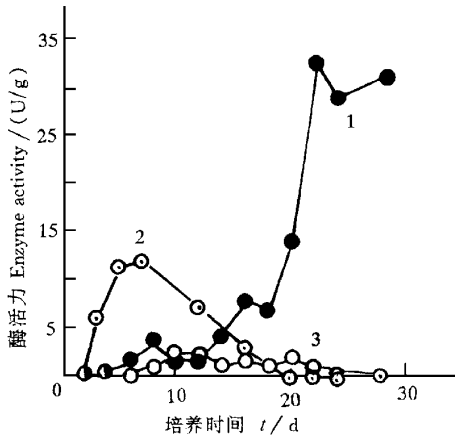


图 1 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下木素降解酶的产生

Fig. 1 Lignin-degrading enzymes produced by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* in solid state cultures

1. Laccase of *P. conchatus* ;
2. MnP of *P. chrysosporium* ;
3. MnP of *P. conchatus* .

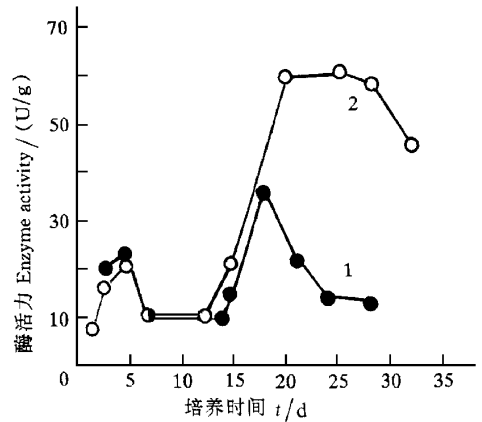


图 2 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下木聚糖酶的产生

Fig. 2 Xylanases Produced by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* in solid state cultures

1. Xylanase of *P. conchatus* ;
2. Xylanase of *P. chrysosporium* .

### 2.3 纤维素酶

*P. chrysosporium* 在降解植物中木素的同时也引起纤维素严重降解,而 *P. conchatus* 则能高效降解草类木素而很少损伤纤维,直到生物作用的后期,纤维次生壁木素被降解,而纤维乃至纤维中的微细纤维依然相当完整<sup>[3]</sup>。用纤维素酶、特别是内切葡聚糖酶处理纸浆,浆的粘度下降十分剧烈,纸张强度被严重破坏<sup>[12]</sup>。因此,在微生物脱木素过程中,纤维素酶,尤其是内切葡聚糖酶,其活力直接关系到纤维素的降解。

我们对两个菌种在整个培养过程的三种纤维素酶(内切葡聚糖酶、微晶纤维酶和纤维二糖水解酶)的酶活力进行了检测,发现两种菌在纤维素酶,特别是内切葡聚糖酶的产生上存在差异。*P. chrysosporium* 产生的内切葡聚糖酶(EG)的活力较高,特别是在后期(培养 18d 后),内切葡聚糖酶活力尤高。此时,木质纤维素物料(稻草)中的木素已经有较大的降解,纤维素裸露,内切葡聚糖酶对纤维的损伤更显严重;而与之相比,*P. conchatus* 在整个培养过程中分泌的内切葡聚糖酶活力均低得多,而且到培养后期酶活依然保持着很低的水平,这意味着对纤维素的降解和损伤非常低微(图 3)。另外,两种菌产生的微晶纤维酶和纤维二糖酶活力均较低,*P. conchatus* 分泌的此二种酶的活力更低(图 4、5)。

上述研究结果进一步证实了电子显微镜的观测结果,并从两种菌分泌纤维素酶的角度进一步说明白腐菌 *P. conchatus* 对木素降解有更强的选择性,同时显示了这株菌种所具有的应用前景。

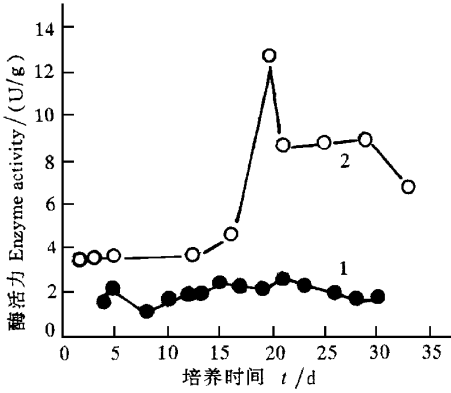


图3 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下内切葡聚糖酶的产生

Fig.3 Endo-glucanase(EG) produced by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* in solid state cultures

- 1. EG of *P. conchatus* ;
- 2. EG of *P. chrysosporium* .

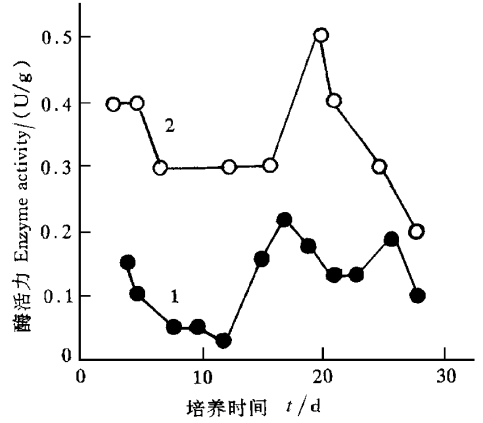


图4 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下微晶纤维素酶的产生

Fig.4 Avicelase produced by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* in solid state cultures

- 1. Avicelase of *P. conchatus* ;
- 2. Avicelase of *P. chrysosporium* .

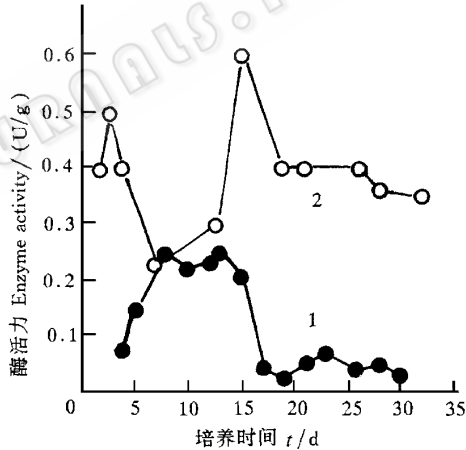


图5 *P. conchatus* 和 *P. chrysosporium* 在固体培养条件下纤维二糖酶的产生

Fig.5 Cellobiase produced by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* in solid state cultures

- 1. Cellobiase of *P. conchatus* ;
- 2. Cellobiase of *P. chrysosporium* .

木素降解酶属于次生代谢酶,在木质纤维中木素的降解,乃至木素降解酶的产生往往发生在接种培养后几天(图1),而纤维素酶及半纤维素酶则在培养后随即产生,且达到较高的水平(图2~5)。可以推断,白腐菌代谢木质纤维素首先利用一些容易利用的碳源,当简单的碳源及半纤维素和纤维素有一定的降解后,木素的存在开始阻碍半纤维素和纤维素进一步降解时,木素降解酶开始产生。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Eriksson K E , Grunewald A , Nilsson A *et al.* *Holzforschung* ,1980 **34** 207~213.
- [ 2 ] Ruel K , Barnound F , Eriksson K E. *Holzforschung* , 1981 **35** :157~171.
- [ 3 ] Yu H S , Cai Z Y , Huang X Y *et al.* Biological Degradation of Rice Straw. In : Kirk T K and Chang H M ed. *Applications of Biotechnology of Pulp and Paper Manufacture*. USA : Butterworth-Heinemann , 1990. 59~68.
- [ 4 ] Bourbonnais R , Paice M G. *FEBS Lett* , 1990 , **267** 99~102.
- [ 5 ] Glenn J K , Akileswaran L , Gold M H. *Arch Biochem Biophys* , 1986 **251** 688~696.
- [ 6 ] Yu H S , Xu H , Lu J *et al.* Factors Affecting Determination of Ligninase Activity. In : Proceedings of 1991 Symposium on cellulose and Lignocellulosics Chemistry. Guangzhou , China , Laboratory of Cellulose and Lignocellulosics Chemistry , Guangzhou Institute of Chemistry , Chinese Academy of Sciences , 1991. 147~150.
- [ 7 ] Miller G L. *Anal Chem* , 1959 **31** 426~428.
- [ 8 ] Wood T M , McCrase S I. *Biochem J* , 1972 **128** :1183~1188.
- [ 9 ] Wood T M , Bhat K M. Measurement of Cellobiohydrolase Activity Using Avicel. In : Wood W A , Scott T K ed. *Methods in Enzymology*. Vol. 160 ,Biomass ,Part A. San Diego :Academic Press Inc. ,1988. 99.
- [ 10 ] Wood T M , Bhat K M. Measurement of Cellobiohydrolase Activity Using Avicel. In : Wood W A , Scott T K ed. *Methods in Enzymology*. Vol. 160 ,Biomass ,Part A. San Diego :Academic Press Inc. ,1988. 111~112.
- [ 11 ] Yu H S , Shen B , Wen XVH *et al.* Studies of the Relations between Structure and Properties of Ligin-carbohydrate complexes in Rice Straw. In : Proceedings of the International Symposium on Fiber Science and Tehnology. Yokohama , Japan : The Society of Fiber Science and Technology ,1994. 266.
- [ 12 ] Pere , J , Siika-aho M , Buchert J *et al.* *Tappi J* , 1995 **78** :71~78.

## COMPARISON OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME PROFILES SECRETED BY *PANUS CONCHATUS* AND *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* DURING SOLID STATE CULTURES\*

Wang Caihua Yu Huisheng Fu Shiyu

(Guangzhou Institute of Chemistry ,Chinese Academy of Sciences ,Guangzhou 510650)

**Abstract** Most of white-rot fungi ,such as *Phanerochaete chrysosporium* ,can cause severe concomitant cellulose degradation during biodegradation of lignocellulose. *Panus conchatus* , a white-rot fungus , can cause efficient delignification of straw with only limited concomitant cellulose degradation. The results in comparison of lignocellulolytic enzyme profiles secreted by *P. conchatus* and *P. chrysosporium* during solid state cultures have shown that laccase and Mn-dependent peroxidase are main lignin-degrading enzymes of these two fungi respectively ,high activities of xylanase are secreted by both fungi ;and much lower activities of cellulases i. e. endo-glucanase ,avicelase and cellobiase , especially endo-glucanase , are produced by *P. conchatus* during the whole cultures. The results further confirm that *Panus conchatus* has ability of strong selective delignification of lignocellulose

**Key words** White-rot fungus ,Lignin-degrading enzyme , Hemicellulase ,Cellulase

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund( No. 39430020 ) ,Guangdong Province Science Foundation ( grant No. 960388 ) ,State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering Foundation , Laboratory of Cellulose and Lignocellulosic 's Foundation for support this research.