

白腐真菌 F-9 的产酶研究

戴 珅, 林书欣, 刘洪涛, 索 凡, 朱启忠, 张小葵

(山东大学威海分校, 山东 威海 264209)

摘 要:白腐真菌 F-9 是新分离得到的一株白腐真菌, 分别采用 PDA 固体培养基、液体天然培养基和液体人工培养基对它进行培养, 并对它的产酶情况进行研究。研究表明: F-9 在 PDA 培养基中的生长速率较快, 可达到 8 mm/d; 在液体天然培养基中的生长速率和产酶情况也比较理想, LiP 酶活力可达到 341 U/L, MnP 可达到 264 U/L; 在液体人工培养基中 LiP 和 MnP 活性达到最大的时间比在天然培养基中晚 2~3 d, 但酶的活力都有很大提高, LiP 酶活力可达到 619 U/L, MnP 酶活力可达到 443 U/L。

关键词:白腐真菌; 生长; 产酶; 木质素

中图分类号: Q 949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0072-04

木质素是植物细胞壁的重要组成成分, 是地球上仅次于纤维素的最为丰富的生物资源, 它是以苯丙烷为基本结构单元的复杂芳香族高分子化合物, 具有难降解的特性。随着人类可利用资源的越来越紧缺, 木质素的微生物降解成为当今研究的热点。白腐菌是具有较强木质素降解能力的真菌, 早先人们对它的研究主要集中在黄孢原毛平革菌^[1-4], 发现它能产生降解木质素的酶系, 主要包括木质素过氧化物酶 (Lignin peroxidase, 简称 LiP) 和锰过氧化物酶 (Mn dependent peroxidase, 简称 MnP)。近几年国内的学者也进行了一些相关方面的研究^[5-7], 取得了一定进展, 并逐渐侧重开发适宜我国本土生长的白腐真菌。

白腐真菌 F-9 是新分离得到的白腐真菌, 目前国内还少见对它研究的文献。现初步对白腐真菌 F-9 进行生长情况研究, 并对它在液体天然培养基和人工培养基的生长情况进行了对比, 为进一步优化产酶条件的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

白腐真菌 F-9, 转接自山东大学菌库。

1.2 主要仪器设备

752 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司), PB-10 型精密 pH 计 (Sartorius), SPX-250B-Z 型生

化培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), YXQ-LS-50S II 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), SHZ 型水浴恒温振荡器 (龙口先科仪器有限公司)。

1.3 培养基

1.3.1 PDA 培养基 土豆制成土豆汁 200 g/L, 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂, 灭菌备用。

1.3.2 液体培养基 液体培养基 I (天然培养基): 配方同 PDA 培养基, 土豆煮的土豆汁 200 g/L, 20 g/L 葡萄糖。液体培养基 II (人工限氮培养基): 以 Tien & krik 经典培养基配方为基础, 葡萄糖 (碳源) 10 g/L、酒石酸铵 (氮源) 1.2 mmol/L、醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.4) 0.2 mol/L、KH₂PO₄ 2.0 g/L、CaCl₂ 0.132 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L、VB₁ 1 mg/L、吐温-80 0.5 g/L、VA 0.4 mmol/L 及少量微量元素。微量元素混合液: MnSO₄ 2.9 mmol/L、CaCl₂ 0.9 mmol/L、NaCl 0.17 mmol/L、ZnCl₂ 0.348 mmol/L、FeSO₄ 0.359 mmol/L、CuSO₄ 0.4 mmol/L、CoCl₂ · 6H₂O 20.775 mmol/L、KAl(SO₄)₂ · 12H₂O 0.021 mmol/L、HBO₃ 0.16 mmol/L、NaMoO₄ · 2H₂O 20.041 mmol/L。

取 250 mL 锥形瓶若干, 按照每瓶加入 100 mL 液体培养基的量, 一部分加入液体培养基 I, 另一部分加入液体培养基 II。

1.4 研究内容

1.4.1 固体平板生长特性研究 将白腐真菌 F-9 接种到确定无杂菌的 PDA 培养基上, 把接种好的平板一部分放在 30℃ 恒温培养箱培养, 一部分放在 37℃ 恒温培养箱培养, 每天记录菌落半径, 直至长满整个平板。

1.4.2 培养基对产酶活力的影响 在 2 种液体培养基摇瓶中每瓶接入 3 个直径为 10 mm 的菌塞, 把接种好的

第一作者简介: 戴珅 (1987-), 女, 山东济南人, 硕士, 现主要从事木质素降解酶研究工作。E-mail: nuannuandekede@163.com。

通讯作者: 朱启忠 (1957-), 男, 山东单县人, 本科, 教授, 硕士生导师, 现从事酶工程学和壳聚糖应用方面的研究工作。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

收稿日期: 2009-02-15

锥形瓶放在 30℃、120 r/min 的摇床中进行培养。自第 3 天 开始定期从各瓶取出菌液 4 mL, 30℃、4 000 r/min、15 min 离心, 所得上清液即为粗酶液。LiP 的活力测定: 1.6 mL 去离子水、2 mmol/L 藜芦醇 0.8 mL、4 mol/L H₂O₂ 0.4 mL 和 50 mmol/L 酒石酸-酒石酸钠缓冲溶液 (pH 2.5) 0.2 mL 以及 1 mL 粗酶液, 用紫外可见分光光度计检测 310 nm 处在 0~2.5 min 内 OD 值的变化。定义每 1 min 氧化 1 μmol 藜芦醇所需的酶量为 1 个酶活单位。MnP 的活力测定: 1.6 mmol/L MnSO₄ 0.1 mL、1.6 mmol/L H₂O₂ 0.1 mL、50 mmol/L 酒石酸-酒石酸钠缓冲液 (pH 5) 2 mL 以及 0.4 mL 粗酶液。用紫外可见分光光度计检测 240 nm 处 2 min 内的 OD 值变化。定义 1 min 使 1 μmol Mn²⁺ 转化为 Mn³⁺ 所需的酶量为 1

个酶活力单位。
2 结果与分析

2.1 F-9 固体平板生长特性

F-9 接种至 PDA 培养基后分别放置于 30℃和 37℃的恒温培养箱培养, 生长情况(如图 1)有一定相似之处: ①第 2 天出现少量白色菌丝, 菌丝向上生长长度约有 5 mm 左右, 开始形成圆形菌落。②随着菌落的不断扩大, 菌落中心部位的菌丝开始变短, 伏于平板上, 整个菌落呈现四周高起中部低陷的白色圆盘状。③长满平板的 F-9 菌丝长度约为 1~2 mm。
从图 1 可看出, 白腐真菌 F-9 在 PDA 固体平板上呈近似指数型增长, 在 30℃条件下白腐真菌 F-9 生长较快。

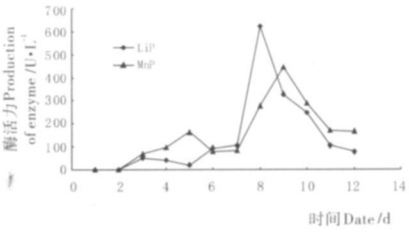
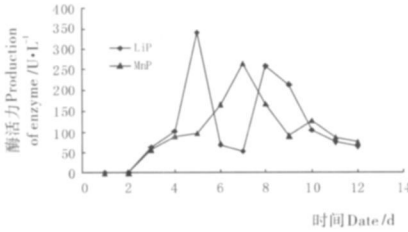
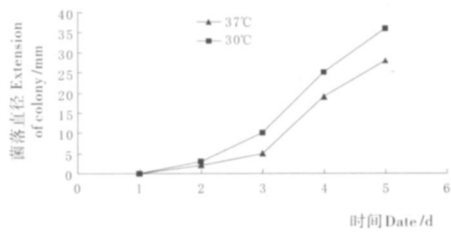


图 1 F-9 在固体平板上的生长情况
Fig. 1 Extension of the colony of F-9 on the plate

图 2 F-9 在液体天然培养基的产酶情况
Fig. 2 Production of enzyme by F-9 in the natural culture medium on liquid

图 3 F-9 在液体人工培养基中的产酶情况
Fig. 3 Production of enzyme by F-9 in the artificial culture medium on liquid

2.2 F-9 液体培养产酶特性

2.2.1 液体培养基 I (天然培养基) F-9 在液体天然培养基中生长情况很好, 第 2 天就可出现少量菌丝球, 直径约有 2 mm 左右, 到第 6 天左右菌丝球直径可达 6~8 mm。由于天然培养基颜色略微发黄, 菌丝球也呈微黄色。用天然培养基培养的 F-9 在第 3 天均出现了 LiP 和 MnP 活力(如图 2), 并且 2 种酶活力在起始阶段相差不大。第 5 天 LiP 可达到最大酶活, 为 341 U/L, 第 8 天

LiP 又出现一酶活峰值为 258 U/L。MnP 在第 7 天最大, 为 264 U/L。
2.2.2 液体培养基 II (人工培养基) F-9 在液体人工培养基中生长较缓慢, 第 3 天有少量菌丝球出现, 第 7~8 天菌丝球达到最大, 直径约为 3~5 mm 左右。菌丝球为白色, 表面较光滑。在第 8 天时 LiP 活力达到最大, 为 619 U/L。第 9 天时 MnP 活力达到最大, 为 443 U/L。

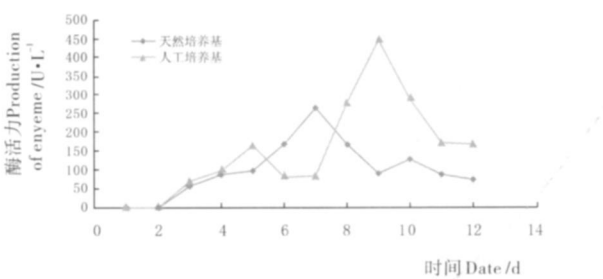
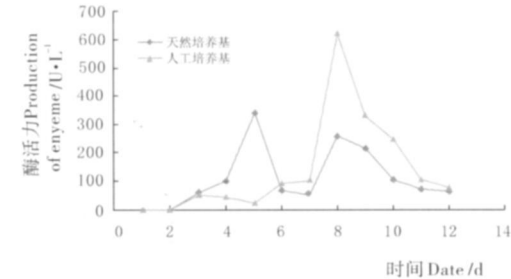


图 4 F-9 产 LiP 的情况
Fig. 4 Production of LiP by F-9 in the liquid culture

图 5 F-9 产 MnP 的情况
Fig. 5 Production of MnP by F-9 in the liquid culture

2.2.3 2 种培养基产酶情况的比较 与人工培养基相比 F-9 在液体天然培养基中生长速度比较快, 形成的菌丝球也比较大, 在第 5 天和第 7 天分别出现了 LiP 和 MnP 的酶活峰值。虽然 F-9 在人工培养基中的生长速

度较缓慢,酶活力峰值出现的也较晚(峰值出现延迟约2~3 d),但如图4和图5所示,在人工培养基中培养的F-9产生的LiP和MnP活力明显高于在天然培养基中生长产生的同种酶,LiP活力高出278 U/L,MnP活力高出179 U/L。

3 讨论

白腐真菌F-9在PDA固体天然培养基上生长良好,尤其是温度在30℃时较适宜其生长,平均扩展速率为8 mm/d,第7天可以长满整个平板,可见天然培养基中蕴含的丰富营养完全可以满足F-9生长的需求。用液体天然培养基对F-9进行摇床培养,菌丝球生长迅速,第5天最大直径可达6~8 mm,LiP酶活力峰值在第5天和第8天达到2个峰值,分别为341、258 U/L,MnP的活力出现在第7天,为264 U/L。和F-9在PDA固体天然培养基中的生长情况相比较可以看出,除了天然培养基中丰富的营养可以为F-9提供良好的生长条件,振荡培养是促使F-9快速生长的另一个有利条件。振荡培养时水流产生的剪切力等水力因素使菌丝易形成球状,同时也加速了营养物质和氧气在细胞间的传递效率,这样就使菌丝球单位表面积获取氧气和营养物质的量增多,产酶活力应该也有提高^[8]。出现2次产LiP酶活高峰说明F-9在生长过程中分泌的胞外LiP可能有同工酶,其中一个为合成型LiP酶,另一个为诱导型LiP酶^[9],具体情况仍需要进一步研究。

F-9在液体人工培养基中生长比在液体天然培养基中缓慢,酶活峰值出现的时间也比在人工培养基中培养的晚2~3 d,但酶的活力比在天然培养基中高很多,LiP活力高出278 U/L,MnP活力高出179 U/L。这或许是因为人工培养基的碳源和氮源相对于天然培养基较少。很多文献^[10-12]都涉及到了碳源和氮源浓度对白腐真菌产酶有较大影响,研究表明碳源和氮源浓度的改变对白腐真菌的产酶情况有很大影响,对某些菌种来说在限氮和限碳条件下有利于其产生木质素降解酶(LiP和MnP)。F-9是否符合以上原理需要进一步试验的验证。

在液体天然培养基和人工培养基中,LiP的酶活高峰出现的时间均比MnP出现得早,这一现象说明F-9产生这2种酶的机制应该是非偶联的。

白腐真菌产生的胞外氧化酶可以直接参与各种难降解有机污染物和毒性物质的降解,在环境保护、重金属修复、生物制浆、生物废水处理等领域都可以做出很

大贡献^[13-16]。

从白腐真菌F-9的初步研究结果可以看出它是一株有发展潜力的白腐真菌,因此有必要在下一步的研究中利用正交试验法优化培养条件,寻找一个更加快速、低价、高效的培养方法,为日后的工业应用打下良好基础。

参考文献

- [1] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burdsq[J]. *Science*, 1983, 221(12): 661-663.
- [2] Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin[J]. *Ann Rev Microbiol*, 1987, 41: 465-505.
- [3] Pasti M B, Paszczynski A, Goszczynski S, et al. Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo Dye degradability by *Streptomyces* Sp. and *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl. Environ. Microbiol*, 1992, 58(11): 3605-3613.
- [4] Ruckenstein E, Wang X. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly(styrene-divinyl benzene) carrier and its application to the degrading 2-chlorophenol[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 79.
- [5] 张朝晖, 夏黎明, 林建平, 等. 黄孢原毛平革菌培养合成木质素过氧化物酶研究[J]. *浙江大学学报*, 1999, 33(2): 132-136.
- [6] 喻国策, 文湘华, 李东锋. 黄孢原毛平革菌在多种氮浓度下木质素降解酶的产生[J]. *环境科学学报*, 2003, 23(3): 802-806.
- [7] 卢雪梅, 李越中, 王蔚, 等. 黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶类在天然木质素降解中作用的研究[J]. *菌物系统*, 1998, 17(2): 179-184.
- [8] 高大文, 文湘华, 钱易. 白腐真菌培养条件对其分泌木质素降解酶的影响[J]. *中国环境科学*, 2005, 25(5): 572-575.
- [9] 杜海萍, 宋瑞清, 王钰祺. 几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J]. *林业科技*, 2006, 31(4): 20-24.
- [10] Keyser P, Kirk T K, Zeikus J G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 135: 790-797.
- [11] Dosoretz C G, Chen A H-C, Gethlein H E. Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 34: 131-137.
- [12] 董旭杰, 曹福祥, 陈静, 等. 3种白腐菌木质素降解酶的比较[J]. *中南林业科技大学学报*, 2007, 27(3): 131-135.
- [13] 吴林林, 阮宇鹰, 武琳慧, 等. 白腐真菌在环境保护中研究与应用进展[J]. *上海化工*, 2006, 31(1): 8-10.
- [14] 蒋晓云, 曾光明, 黄国和, 等. 白腐真菌的研究进展及其在重金属修复中的展望[J]. *中国生物工程杂志*, 2005(增): 118-121.
- [15] Granit T. Humic acid bleaching by white-rot fungi isolated from biosolids compost Soil[J]. *Biology & Biochemistry*, 2007, 39(5): 1040-1046.
- [16] 唐媛, 谢冰, 吕宝一, 等. 白腐真菌处理难降解有机物的培养条件及应用研究[J]. *世界科技研究与发展*, 2008, 30(1): 60-65.

卵孢白僵菌与农药的复配剂对甜菜夜蛾的毒力测定

李 春 香¹, 崔 也 平², 张 英 英¹

(1. 唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院 临床医学系 河北 唐山 063000)

摘 要:比较 6 种杀虫剂和 3 种杀菌剂与卵孢白僵菌的相容性,筛选出 4 种杀虫剂甲维盐、除尽、铁沙掌和康夫,用这 4 种杀虫剂的亚致死剂量和次亚致死剂量分别与 1×10^7 个孢子/mL 的菌悬液复配后对甜菜夜蛾进行室内毒力测定。结果表明:第 2 天,含甲维盐和除尽的亚致死剂量的复配剂校正防效分别达到了 59.9%和 90.7%,到第 10 天均达到了 97%以上;含甲维盐和除尽次亚致死剂量的复配剂的校正防效在第 2 天时分别为 49.9%和 67.8%,第 10 天时均达到 95%以上。

关键词:卵孢白僵菌;化学杀虫剂;生物相容性;复配

中图分类号:S 433.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2009)07—0075—04

甜菜夜蛾[*Spodoptera exigua* (Hübner)] 隶属于鳞翅目、夜蛾科,是一种世界性分布、间歇性大发生的以危害蔬菜为主的杂食性害虫,现已成为制约我国农业发展的一种重要害虫。目前,我国对甜菜夜蛾的防治仍以化学防治为主,但甜菜夜蛾对常规农药如有机磷及除虫菊酯类农药已经产生较强的抗性^[1]。随着环境意识的增强,人们越来越关注生物农药的使用,其中对白僵菌的研究最为广泛。已有报道白僵菌可用于防治松毛虫^[2]、玉米螟^[3]、桃蚜^[4]、舞毒蛾^[5]等,并取得较好的经济效益和环境效益。而有关使用常用农药与白僵菌复配对甜菜夜蛾进行防治的报道不多。

第一作者简介:李春香(1968-),女,河北乐亭人,理学硕士,副教授,研究方向为植物生物防治。
基金项目:唐山市重点实验室资助项目(04360701B-4)。
收稿日期:2009-02-15

该试验应用浓度为 1.0×10^7 个/mL 的卵孢白僵菌孢悬液与农药的亚致死量和次亚致死量进行复配,对甜菜夜蛾进行室内毒力测定,初步测评其毒性特点及效果,以确定能与卵孢白僵菌复配并达到较好杀伤效果的农药的种类及剂量,制备出高效、低毒生物制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 卵孢白僵菌 ACCC30290 由中国农业菌种保藏中心提供,甜菜夜蛾由中国农业科学院植保所提供。

1.1.2 供试农药 康夫 4 000~6 000 倍,250 μ L/100mL,日本佳田化学(株)中国有限公司;除尽:500~750 mL/hm²,2 mL/100mL,巴斯夫(中国)有限公司;甲维盐:2 000~4 000 倍,330 μ L/100mL,河北维可特益农化工有限公司;农地乐:30~60 mL/667m²,2 mL/100mL,美国陶氏益农公司;强棒 41~55 g/667m²,400 μ L/100mL,台湾圣丰科技(河南)有限公司;铁沙掌

Characterization of Ligninolytic Enzymes Production of a White-rot Fungus F-9

DAI Shen, LIN Shu-xin, LIU Hong-tao, SUO Fan, ZHU Qi-zhong, ZHANG Xiao-kui
(Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

Abstract: White-rot fungus F-9 was the fungus isolated newly. Used the PDA culture medium, the natural culture medium on liquid and the artificial culture medium on liquid carries on the raise on F-9 separately, and studied the production of enzyme. The study illustrated that its growth rate in PDA culture medium was quick, may reach 8 mm/d; and its growth rate and production of enzyme in natural culture medium on liquid quit to be also ideal, LiP was 341 U/L, MnP was 264 U/L; the peak activities of LiP and MnP produced by F-9 in the artificial culture medium on liquid appear later than the fungus in natural culture medium on liquid about 2~3 d, but the activities of the two enzyme were both greatly improved, LiP was 619 U/L, MnP was 443 U/L. Judging from the result, if optimize the train condition of F-9 further, it ought to get much better lignin degradation effect.

Key words: White-rot fungus F-9; Growth; Enzyme; Lignin