

技术与方法

几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法

蔡磊 尹峻峰 杨丽萍 张克勤

(云南大学省工业微生物发酵工程重点实验室 昆明 650091)

摘要: 简要介绍几种在前人基础上作了较大改进的木质素降解真菌的定性筛选方法, 列出了每种方法的具体步骤并作了讨论。

关键词: 木质素, 降解, 真菌, 筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0067-03

SEVERAL QUALITATIVE METHODS FOR THE SCREENING OF FUNGI TO DECOMPOSE LIGNIN

CAI Lei YIN Jun-Fen YANG Li-Ping ZHANG Ke-Qin

(Key Lab of Microbial Fermentation, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: Several methods for the qualitative screening of fungi to degrade lignin were introduced in this paper, with detailed protocols and discussing for each assay.

Key words: Lignin, Decomposing, Fungi, Screening

1838 年 A. Payen 用硝酸处理木材, 发现除剩下像纤维状物质之外, 还有一部分含碳量比纤维状物质还要高的物质, 前者他定义为“Cellulose”(纤维素), 后者 1857 年由 F. Schuze 定义为“Lignin”(木质素)。木质素是由苯丙烷类似物为单元构成的一大类生物多聚体, 是自然界最难降解的生物高聚物。它构成木材成分的 20% - 30%, 仅次于纤维素, 其降解成为自然界碳素循环的决速步骤^[1]。且木质素与纤维素和半纤维素的结合非常紧密, 从而阻碍了对纤维素和半纤维素的利用。世界上每年产生 1.5×10^8 t 以上的纸浆, 在此过程中产生约 5.0×10^7 t 的木质素^[2]。另外, 有研究表明, 很多水体污染物的结构与木质素有着比较类似的结构, 因此, 对木质素降解作用的研究对造纸, 环保等都具有重要意义。

目前已知的常见于白腐真菌的 3 类木质素降解酶是: LiP (木质素过氧化物酶)、MnP (锰依赖过氧化物酶) 和 Laccase (漆酶), 木质素的降解也与这些酶的产生密切相关, 本文介绍的方法对于定性检测这些酶的产生有很好的效果。

在前人的研究中, 已经报道了一些木质素酶定性检测的方法^[3,5,7,8], 本文在总结前人方法的基础上作了较大的改进, 使检测方法更加简洁, 更加实用, 成本更低。

1 材料与方法

1.1 材料

基本培养基 (以下简记为 BM 培养基): 酵母膏 0.01g, 葡萄糖 0.2g, 定容 1mL, 自然 pH 值 (如待测的是海洋真菌, 则用海水线性与海水盐分相同的水配制)。

1.2 方法

1.2.1 Poly-R 琼脂平板脱色圈法: Poly-R (sigma 478) 是一种多聚染料, LiP, MnP 及 Laccase 的产生都会使其脱色^[3], 是木质素降解酶定性检测的最直接方便的方法之一, 它在不使用 H_2O_2 的情况下就可检测到 LiP 的产生, 但 Laccase 漆酶的检测会有一点问题, 因为并不是所有的 Laccase 都能降解 Poly-R^[4]。

步骤: (1) 在 BM 培养基中加入 0.02g/100mL 的 Poly-R 和 1.8g/100mL 的琼脂灭菌后铺平板; (2) 接种待测真菌, 25℃避光培养 10d, 每天检查; (3) 在紫罗兰色平板上有脱色圈者表明有木质素降解酶产生。

1.2.2 丁香醛连氮法: 有许多试剂都可以用作检测木质素酶的产生如: α -萘酚, 邻苯三酚, 愈创木酚, 联苯胺, 丁香醛连氮等, 而联苯胺有致癌作用, 愈创木酚反应则对木质素酶的专一性不高, α -萘酚和邻苯三酚则不易得到, 因此, 推荐使用丁香醛连氮法^[5,6], 但此法只可以检测到 LiP 和 Laccase 的产生, 此法的另一个缺点是结果较难观察确认。

步骤: (1) 在 BM 培养基中加入 1.8g/100mL 的琼脂灭菌后铺平板; (2) 接种待测真菌, 25℃避光培养 5~10d; (3) 在菌落边缘用打孔器打一个约 5mm 直径的小孔; (4) 测 Laccase 活性, 滴数滴 0.1% 的丁香醛连氮 (用 95% 的乙醇配制) 于孔中; (5) 测 LiP 活性, 滴数滴 0.1% 的丁香醛连氮 (用 95% 的乙醇配制) 后再加数滴 0.5% 的 H_2O_2 溶液在孔中; (6) 用只滴加 95% 乙醇的作为对照; (7) 在 40min 内所滴加的位置周围显现紫色表明有酶产生, 但在测 LiP 时只有在步骤 4 中显示无 Laccase 活性或反应很弱的情况下才表明有过氧化物酶活性。

1.2.3 苯胺兰平板脱色法: 染料苯胺兰 (Azure-B) 的脱色与 LiP (不用加入 H_2O_2) 及 MnP 的产生有关, 但不反映 Laccase 的产生^[7]。这种方法适用于过氧化类型的木质素酶的检测, 可以得到很好的结果。

步骤: (1) 在 BM 培养基中加入 0.01g/100mL 的 Azure B 和 1.8g/100mL 的琼脂灭菌后铺平板; (2) 接种待测真菌, 25℃避光培养 10d, 每天检查; (3) 以蓝色培养基中菌落周围的脱色圈的可来定性检测 LiP 及 MnP 的产生与否。

1.2.4 鞣酸平板法: 这种方法最早由 Bavendamm (1928)^[8]报道并被广泛运用, 但由于许多现代染料的使用, 这种方法已逐渐被淘汰, 因为这种方法产生的实验结果反映的是所有的多酚氧化酶的产生而不是专门针对木质素降解酶的产生, 实验过程中要注意与自然条件下产生的色素相区分。方法中的鞣酸也可用五倍子酸代替。

步骤: (1) 在 BM 培养基中添加的 1.8g/100mL 的琼脂灭菌; (2) 培养基灭菌后无菌地加入已单独灭菌的鞣酸至终浓度为 0.01g/100mL, 混匀, 铺平板; (3) 接种待测真菌, 25℃下避光培养 10d, 每天检查; (4) 菌落周围的棕色氧化带显示酶的产生。

1.2.5 木质素平板染色法: 在实验中可以采用文献 [9] 报道的方法自制木质素或购买, 但购买的木质素与天然状态下的木质素可能不完全相同, 由于有许多更方便的木质素类似物的存在, 木质素本身在筛选中并不常用。尽管如此, 仍然可以用染色的方法来检测木质素中的酚组分的氧化作用。但此法仅显示木质素中酚组分的氧化作用, 而木质素中其它的非酚组分的降解作用则无法显示, 因此, 其在使用中存在一定的局限性。

步骤: (1) 在 BM 培养基中加入 0.25g/100mL 的木质素和 1.8g/100mL 的琼脂灭菌后铺平板; (2) 接种待测的真菌, 25℃避光培养 5~10d (注意不要让菌丝长满整个平板); (3) 用 1% 的 $FeCl_3 + K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液 (现配现用) 覆盖平板, 外围未降解的木质素中的酚被染成蓝色, 而在菌落周围的无色带 (如有) 则显示酚已被氧化。

2 小结

在营养充足的生长环境中木质素降解酶的产生会被抑制^[11], 另外, 对许多真菌来说, 培养基中氧化还原介质的存在可显著加强木质素降解酶的产生^[12], 因此, 在筛选中应避免加入这类物质。另外, 在接种过程中要尽量采用较统一的接种方法, 一般截取生长旺盛的菌落边缘的琼脂小块。至此, 本文介绍了 5 种定性初筛木质素降解真菌的方法, 但具体方法的选择要视具体情况而定。

参考文献

- [1] Claudia E, Ulrike T, Eriksson K L. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 1151 ~ 1158.
 - [2] Call H P. *Journal of Biotechnology*, 1997, **53**: 163 ~ 202.
 - [3] Boominathan K, Redd C A. *Handbook of Applied Mycology*. New York: Academic Press, 1992, 763 ~ 822.
 - [4] Pointing S B, Vrijmoed L L P, Jones E B G. *Botanica Marina*, 1998, **41**: 293 ~ 298.
 - [5] Harkin J M, Larsen M J, Obst J R. *Mycologia*, 1974, **66**: 469 ~ 476.
 - [6] Niiu-paavola M L, Raaska L, Itavaara M. *Mycological Research*, 1990, **94**: 27 ~ 31.
 - [7] Archibald F S. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 3110 ~ 3116.
 - [8] Bavendamm W. *Pilkrankh Schulz*, 1928, **38**: 257 ~ 276.
 - [9] 管筱武, 张甲耀, 罗宇煊, 等. 化学通报网络版, 1999.
 - [10] Buswell J A, Cai Y J, Chang S T, *et al*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996, **12**: 537 ~ 542.
 - [11] Reddy C A, Souza T M. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **13**: 137 ~ 152.
 - [12] Eggert C, Temp U, Eriksson K E L. *FEBS Letters*, 1996, **388**: 144 ~ 148.
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>