

# 彩绒革盖菌愈创木酚氧化酶活性研究

王宜磊 邓振旭 赵良田

(菏泽高等师范专科学校生物系 山东菏泽 274015)

**摘要** 本文测定了彩绒革盖菌在 PDY 液体培养基中的愈创木酚氧化酶活性。在 30 °C, 110 r/min 恒温振荡培养条件下, 第 16 天达产酶高峰, 酶活性 218.0 u, 酶作用的最适 pH 为 4.0, 最适温度 30 °C, Ba<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 等离子对愈创木酚氧化酶有激活作用, Ag<sup>+</sup> 离子对酶活性有明显的抑制作用。

**关键词** 彩绒革盖菌, 愈创木酚氧化酶

## Study on the Guaiccal Oxidase Activites of *Corilus versicolor*

WANG Yi-Lei DENG Zhen-Xu ZHAO Liang-Tian

( Biology Department of Heze Teacher 's College , Heze , Shandong 274015 )

**Abstract** The guaiccal oxidase activity of *Corilus versicolor* was studied when it was cultured in PDY fluid medium. The peak of the enzyme production appeared in the 16th days under the castant temperature of 30 °C and vibration( 110 r/min ), the maxmum enzyme activity was 218.0 u. The optimum temperature was 30 °C and the optimum pH was 4.0 , Mn<sup>2+</sup> , Ba<sup>2+</sup> , Mg<sup>2+</sup> , Cu<sup>2+</sup> were activators for guaiccal oxidase , whereas Ag<sup>+</sup> obviously inhibited the enzyme activity.

**Key words** *Corilus versicolor* , Guaiccal oxidase

彩绒革盖菌(*Corilus versicolor*)是一种具有木质素降解能力的白腐菌,其降解木素的能力主要取决于木素过氧化物酶、漆酶、多酚氧化酶和愈创木酚氧化酶活力高低(Orth 等, 1993; Durrant 和 Mollo, 1992; Kirk 和 Farrell, 1987; Johannes 等, 1996; Shi 等, 1997), 所以研究其活力和分泌情况对木质素的生物降解、生物制浆和环境保护具有重要的意义。国外仅见彩绒革盖菌漆酶(Kirk 和 Chang, 1975; Archibald 和 Fand, 1992)和多酚氧化酶(Leatham 和 Stahmann, 1981)的有关报道, 未见愈创木酚氧化酶活性分析等方面的报道。国内仅有两篇漆酶(周金燕等, 1993; 方自若等, 1985)和 1 篇多酚氧化酶(王宜磊, 赵良田, 1999)的研究报道。本文测定了彩绒革盖菌在 PDY 培养基中生长时愈创木酚氧化酶活性的变化, 酶作用的最适条件(pH 值、温度、金属离子等对酶活性的影响), 以便为木质素的生物降解研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 彩绒革盖菌** (王宜磊等, 1998)由作者自山东菏泽市枯杨树桩上分离、纯化、筛选而得, 经测定发现具有较强的木质素降解酶活性。

**1.1.2 化学试剂** 愈创木酚为上海试剂总厂生产的分析纯试剂, 其余试剂均为分析纯或

① 作者简介: 王宜磊, 男, 副教授, 现从事微生物学、食用菌学的教学与科研工作, 已发表论文 40 篇。  
收稿日期: 1999-07-09 接受日期: 1999-09-16 责任编辑: 姜联合

化学纯试剂。

## 1.2 培养基

1.2.1 PDA 固体培养基 马铃薯 20% ,葡萄糖 2% ,琼脂 2%。

1.2.2 PDY 液体培养基 马铃薯 20% ,葡萄糖 2% ,酵母膏 1%。

## 1.3 培养方法

1.3.1 接种母液制备 250 ml 三角瓶中装液体培养基 50 ml ,接入一定量 7 日龄斜面(或平板)菌种 ,110 r/min ,30 ℃ ,恒温振荡培养 5 d。

1.3.2 液体培养 50 ml PDY 培养基装入 250 ml 三角瓶中 ,灭菌后接入 2 ml 接种母液 ,30 ℃ ,110 r/min ,恒温振荡培养。

## 1.4 酶活性测定方法

1.4.1 粗酶液制备 将上述液体培养的试样 ,每天取样 ,4000 r/min 离心 15 min ,上清液即为粗酶液。

1.4.2 愈创木酚氧化酶活性测定 (曾荣鉴 ,1992 ;潘迎捷等 ,1990 ;略有改动)在反应管中加入 0.1 mol/L pH 4.6 醋酸盐缓冲液 3.4 ml ,80 mmol/L 愈创木酚 0.5 ml ,粗酶液(或稀释液) 0.1 ml ,30 ℃ 恒温水浴保温 30 min ,在 756MC 型紫外可见分光光度计上测 490 nm 处光密度(OD 值) ,以煮沸灭活的酶液为比色对照 ,以每分钟光密度值增加 0.1 定义为一个酶活性单位(u)。

1.4.3 温度对酶活性的影响 分别在 0、5、10、15、20、25、28、30、32、35、40、50、60、70 ℃ 的水浴中按 1.4.2 法测定愈创木酚氧化酶活性。

1.4.4 pH 对酶活性的影响 分别用柠檬酸盐、醋酸盐或磷酸盐配制成 pH 为 3.0、3.6、4.0、4.2、4.6、4.8、5.0、5.2、5.6、6.0、7.0、8.0 的缓冲液 ,按 1.4.2 法测定不同 pH 下的愈创木酚氧化酶的酶活性。

## 2 实验与讨论

### 2.1 愈创木酚氧化酶活性测定

由图 1 可见 ,愈创木酚氧化酶在培养第 2 天即能测到酶活性 ,第 16 天达产酶高峰 ,最高酶活性为 218.0 u 。就彩绒革盖菌而言 ,愈创木酚氧化酶产生较漆酶和多酚氧化酶为晚(作者也曾测定该菌漆酶和多酚氧化酶活性 ,他们分别在第 9 天和第 14 天达产酶高峰) ,但从曲线上看 ,产酶维持时间较长 ,这样可能更有利于木质素的降解。

### 2.2 温度对酶活性的影响

图 2 表明 ,愈创木酚氧化酶作用的最适温度为 30 ℃ 和其它文献相同或相近 ,其对高温的适应性一般 ,40 ℃ 时酶活性仍较高 ,超过 50 ℃ 则酶活性明显降低。这和漆酶有相似之处(周金燕等 ,1993 ;王宜磊等 ,1998) ,但与多酚氧化酶有明显不同(王宜磊和赵良田 ,1999) 。说明它们虽然同为木素分解酶 ,但其对环境温度的要求不同。

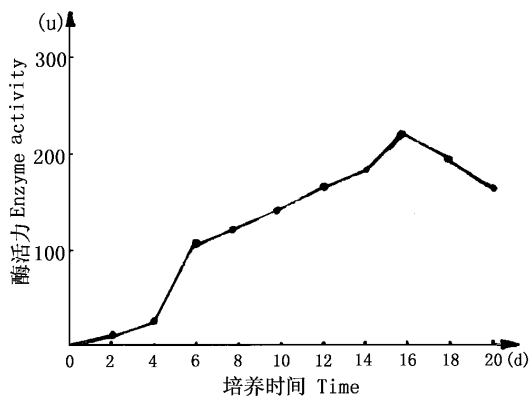


图1 *Corilus versicolor* 愈创木酚氧化酶产酶曲线  
Fig.1 The curve on guaiacol oxidase production of *corilus versicolor*

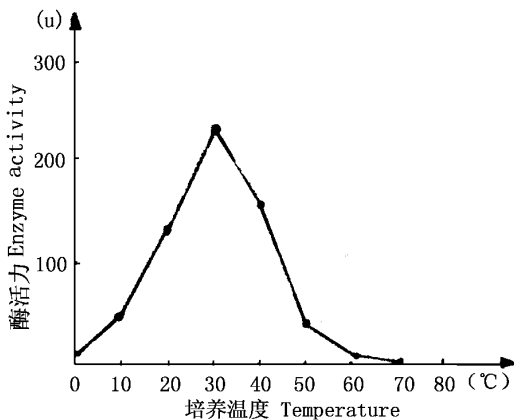


图2 温度对愈创木酚氧化酶活性的影响  
Fig.2 Effect of temperature guaiacol oxidase activity

## 2.3 pH 对酶活性的影响

表1 pH 对酶活性的影响

Table 1 Effect of pH value on enzyme activity

| pH  | 酶活性(u)<br>Enzyme activity | pH  | 酶活性(u)<br>Enzyme activity | pH  | 酶活性(u)<br>Enzyme activity |
|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|
| 3.6 | 205                       | 4.6 | 188                       | 5.6 | 78                        |
| 3.8 | 219                       | 4.8 | 143                       | 5.8 | 47                        |
| 4.0 | 229                       | 5.0 | 136                       | 6.0 | 29                        |
| 4.2 | 211                       | 5.2 | 110                       | 7.0 | 11                        |
| 4.4 | 193                       | 5.4 | 83                        | 8.0 | 0                         |

由表1可以看出,愈创木酚氧化酶最适 pH 为 4.0,比前人的 pH 4.6 略低(曾荣鉴, 1992; 潘迎捷等, 1990),是菌株之间有所差异,还是其它原因尚有待于进一步研究;同时由表中数字可以看出,该酶在中性环境(pH 7.0)时酶活性已很低, pH 达 8.0 时酶活性已测不到,说明该酶不耐碱。

表2 金属离子对酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ion on enzyme activity

| 试剂 Reagent<br>(1.5 mg/ml)            | 相对酶活性(%)<br>Correspond activity | 试剂 Reagent<br>(1.5 mg/ml)            | 相对酶活性(%)<br>Correspond activity |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 对照 Control                           | 100                             | MgSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O | 142                             |
| NaCl                                 | 94                              | ZnCl <sub>2</sub>                    | 131                             |
| KCl                                  | 118                             | CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 141                             |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 120                             | MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 144                             |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 98                              | MnCl <sub>2</sub>                    | 140                             |
| BaCl <sub>2</sub>                    | 136                             | AgNO <sub>3</sub>                    | 0                               |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 111                             |                                      |                                 |

由表 2 可以看出,当酶反应液内盐浓度为 1.5 mg/ml 时, $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  等离子对愈创木酚氧化酶有激活作用, $Ag^+$  离子能明显抑制酶活性,其它离子对酶活性影响较小。

### 参 考 文 献

- 方自若,侯文英,郑美媛,1985. 几种担子菌胞外漆酶同功酶谱的研究. 真菌学报, **4**(3):174 ~ 179
- 王宜磊,邓振旭,朱陶,孙迅,朱启忠,1998. 彩绒革盖菌 CV-8 漆酶活性的初步研究. 微生物学杂志, **18**(4):60 ~ 62
- 王宜磊,赵良田,1999. 彩绒革盖菌多酚氧化酶活性研究. 植物学通报, **16**(4):454 ~ 456
- 周金燕,张发群,桑原正等,1993. 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶的研究. 微生物学报, **33**(5):387 ~ 391
- 曾荣鉴,1992. 碳源和氮源对平菇菌丝胞外酶的诱导作用. 食用菌, (1):17 ~ 18
- 潘迎捷,陈明杰,汪昭月,1990. 香菇菌丝生长中多酚氧化酶的动态变化. 食用菌, (3):4 ~ 6
- Archibald, Fand Roy B,1992. Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, **58**(5):1496 ~ 9
- Durrant L R, Mollo A B, 1992. Ligninolytic enzymes produced by two white rot fungi. *Biochem Soc Trans*, **20**(2):225
- Johannes C, Majeherczyk A, Huttermann A, 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**:313 ~ 317
- Kirk T K, Chang H, 1975. Decomposition of lignin by white-rot fungi. I Isolation of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforchung*, **29**:56
- Kirk T K, Farrell R, 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol*, **41**:465 ~ 505
- Leatham G F, Stahmann M A, 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes* specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J Gen Microbiol*, **125**:147 ~ 157
- Orth A B, Royse D J, Tien M, 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl Environ Microbiol*, **59**(12):4017 ~ 23
- Shi Y F, Hui S F, Tohn A Buswell, 1997. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajorajju*. *FEMS Microbiol lett*, **147**:133 ~ 137

### 欢迎订阅《云南植物研究》

《云南植物研究》由中国科学院主管,中国科学院昆明植物研究所主办。创刊于 1979 年,是创刊较早的植物学专业学术期刊。现已成为植物科学研究发表论文的主要学术性刊物之一,中国自然科学核心期刊,我国生命科学的常用期刊。

国内外二次文献收录《云南植物研究》摘要的有:中国科学引文索引(CSCI),中国生物学文摘(CBA),中国药学文摘(CPA),中国农业文摘(ZNW)和中国林业文摘(ZLW),美国的 CA,BA,科学引文索引的 CI 部分,英国的生物科学的当代进展(CABS)及俄罗斯文摘杂志(РЖ)等。1996 年 11 月加入中国学术期刊(光盘版)2000 年加入中国期刊网。

《云南植物研究》主要刊登植物学各学科具有创新性或较高学术水平的原始论文和简报,植物学领域的新发现及重大应用价值的新成果快报,结合本人工作,反映本学科重要领域的国内外最新研究进展的综述等。

《云南植物研究》为季刊,季中月 25 日出版,2001 年每期定价 12 元,需要的单位或个人请到当地邮局订阅。若错过订阅时间的,可将款直接汇至编辑部,我部将按期定时给您邮寄。联系地址:云南昆明市北郊黑龙潭 中国科学院昆明植物研究所,邮政编码 650204 E-mail: BianJi@mail.kib.ac.cn, Telephone 0871-5150660-2422