

用紫外分光光度法测定木腐菌 木素分解酶活力的研究*

刘秀英 王 正

(中国林业科学研究院木材工业研究所)

摘要 利用木素特有的紫外吸收波长,通过定量测定含木素溶液中酶作用前后木素物质(底物)的变化量,测定木腐菌木素分解酶的活力,具有操作步骤简单、测定速度快等优点,为高木素代谢能力菌株的筛选研究,提供了一个较好的测试方法。

关键词 木素酶;紫外分光光度法;木腐菌

木质素(简称木素)是目前世界上未被较好利用的生物资源之一。我国每年有大量木素物质作为制浆造纸的废弃物被排入江河,严重污染环境。因此,木素利用的研究已成为各国化学及生物化学工作者致力解决的问题之一。在木质素利用的研究中,把它作为某些微生物(如各种木腐菌类)的碳源,进行木素的生物转化是一个重要方面。在此类研究中,首先要做的是高木素代谢能力菌株的筛选及菌株代谢调节控制等研究,其中测定菌株木素分解酶活力则是不可缺少的手段之一。

木腐菌木素降解酶活力,可以根据酶作用后底物减少量或产物生成量的测定结果来确定(一般有 ^{14}C 标记法^[1]和官能团缺失测定法^[2~4])。这些测定方法需要特殊的设备和手段,或操作程序繁杂,测定周期长。本文采用紫外分光光度法测定木腐菌木素降解酶活力,使操作程序大为简化,所用仪器目前也基本普及。其原理是利用木素特有的紫外吸收波长,通过定量测定含木素溶液中酶分解前后底物(木素物质)的变化量来测定菌体中木素分解酶活力。

1 材料和方法

1.1 仪器

751G型紫外分光光度计,上海分析仪器厂出品,选用波长203 nm。

1.2 菌种及其来源

彩绒革盖菌 *Coriolus versicoior* (L.ex Fr.) Quél. 是一种白腐菌,简称 C.v. 棉腐卧孔菌 *Poria placenta* (Fr.) Cooke. 是一种褐腐菌,简称 P.p. 菌种由中国林科院木材所防护室保藏。

将菌种接入麦芽糖琼脂培养基上,在温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 时培养40天后开始测定。

本文于1991年1月5日收到。

*本项研究为中国林科院基金项目“木腐菌三种主要木材分解酶活力测定方法的研究和评价”部分内容。

1.3 培养基制备

麦芽糖液(波梅氏比重1.03)1 000 ml, 琼脂20 g, 1.1 kg/cm²蒸汽灭菌 30 min, 在无菌条件下制成琼脂平皿培养基, 20 ml/皿。

1.4 溶液配制

将已知浓度的木素原液(由中国林科院木材所人造板室化学组提供)按一定比例加入到 pH 值5.5的磷酸盐缓冲液中制成测试液。配制后的测试液中木素浓度需要精确测定。

1.5 标准曲线绘制

将已知浓度的木素原液 pH 值5.5的磷酸盐缓冲液精确稀释, 在木素含量 1.00~10.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内取0.72、1.44、2.88、4.33、7.20 $\mu\text{g/ml}$ 的 5 个浓度, 以稀释剂为空白对照分别测定上述不同浓度稀释液在 203 nm 处的 OD 值, 绘制出 OD-浓度曲线。

1.6 测定步骤

1.6.1 酶作用前后测定中木素浓度测定 将配好的测试液用稀释剂(pH 值5.5磷酸盐缓冲液)稀释到可测浓度范围, 以稀释剂为空白测定测试液在 203 nm 处的 OD 值, 从标准曲线中查出稀释后测试液浓度。

酶解前测试液中木素浓度按下式计算: $E = A \cdot C$

E : 酶解前测试液中木素浓度($\mu\text{g/ml}$); A : 稀释倍数; C : 从标准曲线中查出的木素溶液浓度($\mu\text{g/ml}$)。

本文中配制的测试液中木素浓度分别为34.00、66.00、130.00、365.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.6.2 测试操作 精确称取定量培养的木腐菌菌丝体放入 200 ml 摇瓶中, 用移液管加入 25 ml 测试液, 另取一摇瓶加相同量的菌丝体与测试液量相同的稀释剂制成空白液。用12层纱布封口, 放入摇床中振荡培养, 转速为 200 rpm, 培养温度为 38 ± 2 $^{\circ}\text{C}$, 培养时间为 48 h。

1.6.3 酶作用后测试液和空白液木素浓度 用稀释液以相同的稀释倍数稀释, 以稀释后的空白液为空白, 测定酶作用后测试稀释液的 OD 值, 按下式计算木素浓度: $E' = A' \cdot C'$ 。

E' : 酶解后测试液中木素浓度($\mu\text{g/ml}$); A' : 稀释倍数; C' : 稀释液木素浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

1.7 酶活力计算

计算公式为: $U = (BE - B'E') / WS$

U : 酶活力单位($\mu\text{g/g} \cdot \text{h}$), 单位时间内每克干菌体分解木素的微克数;

E, E' : 酶作用前后测试中木素浓度($\mu\text{g/ml}$); B, B' : 酶作用前后测试液量 (ml);

W : 测试液中菌体干重(g); S : 酶作用时间(h)。

2 试验结果

2.1 实验条件的选择

2.1.1 底物浓度 从表 1 看出: 在酶浓度一定的前提下, 底物浓度越高, 酶活力越高, 但到一定范围时酶活力即不再提高。对于 C.v 菌测试液中, 底物浓度在 130 $\mu\text{g/ml}$ 时, 酶活力即达到恒定, 而 P.p 菌则需要更高一些的底物量。因此, 在本文给定的条件下, 选用 300 $\mu\text{g/ml}$ 左右的底物浓度为木素酶活力测

表 1 不同底物浓度下的木素降解酶活力

(单位: $\mu\text{g/g} \cdot \text{h}$)

菌 种	底 物 浓 度 ($\mu\text{g/ml}$)			
	34.00	66.00	130.00	365.00
C. v	203.50	223.00	784.50	746.00
P. p	88.00	29.00	152.00	479.00

注: 酶作用时间 48 h。

试液。

2.1.2 反应温度 反应温度高, 酶促反应速度加快, 但较高的温度易导致酶的失活, 测试用酶促反应温度以不超过40℃为宜。因此, 本文选用38℃为测试温度。

2.1.3 pH值 为了使不同批次间的酶促反应条件一致, 数据有可比性, 在整个测试过程中pH值应保持恒定。因此, 本文选用pH 5.5磷酸盐缓冲溶液为测试介质。

2.1.4 反应时间 从表2看出两种木腐菌在不同的反应时间内木素酶活力的变化: C.v菌酶活力随着酶作用时间的延长下降得很快, 而P.p菌则稍有下降。出现这种情况是由于C.v菌酶解速度较快, 使测试液中底物消耗较多, 从而导致酶活力不能充分发挥, 随着振荡反应时间的延长, 酶发生失活等原因。本文选用酶作用48h为活力测定时间。

表2 酶作用反应时间对木素酶活力的影响

菌种	测试液 底物含量 (μg)	48 h		96 h		120 h	
		底物分解 (μg)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)	底物分解 (μg)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)	底物分解 (μg)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)
C.v	9 125	3 723	746	4 343	124	4 677	134
P.p	9 125	701	479	2 823	316	3 548	408

2.1.5 振荡与静止试验 木素降解过程为一需氧过程, 介质中溶解氧含量的多少对木素酶活力的影响较大。

从表3看出除P.p菌(2)外, 其它三株菌在静止条件下木素降解酶的活力都低于振荡条件(本实验选用200ml摇瓶, 加液量25ml, 振荡转数200rpm)。

2.1.6 失活与未失活处理试验 从表4看出, 经失活处理后C.v菌的木素降解酶活力急剧下降, 进一步证实了溶液木素含量减少为酶分解所致。

表3 介质在振荡与静止条件下对木素降解酶活力的影响

测试菌	振荡时酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)	静止时酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)
C.v(1)	533	226
C.v(2)	746	微量
P.p(1)	479	157
P.p(2)	4	91

表4 失活与未失活对C.v菌木素降解酶活力影响

处理方法	失			活			
	1	2	平均	1	2	3	平均
菌号							
酶活力 ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)	470.73	235.44	351.09	1 080.30	1 141.43	978.57	1 066.77

2.2 测试结果

两种木腐菌在上述固定的测试条件下木素酶对木素分解测试结果(见表5)表明: 在一定的测试条件下, 测试液被两种菌处理后木素的浓度及含量都有减少, 其中C.v菌作用后木素减少量比P.p菌更为明显。显示出白腐菌比褐腐菌有更强的木素酶活力, 这一结果与其它文献^[6]相一致。因此, 该方法作为一种木腐菌木素降解酶活力测定方法是可行的。

表5 两种木腐菌木素酶活力测试结果

菌种	酶作用前			酶作用后			酶活力 ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
	底物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	木素总量 (μg)	菌液比 ($\text{g}(\text{干})/\text{ml}$)	底物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	木素剩余量 (μg)	木素分解量 (μg)	
C. v	365	9 125	0.42	232	5 429	3 696	746
P. p	365	9 125	0.30	320	7 424	1 701	479

3 结论与讨论

木腐菌使木素分解的过程是一个较为复杂的代谢过程,目前还有一些环节没有搞清楚。根据一些文献报道,认为漆酶、纤维二糖氧化还原酶、过氧化氢酶及其他一些加氧酶等酶系都对木素的降解起作用^[8-9]。因此,从木腐菌中直接制备出可使木素降解的酶制剂是比较复杂的,而单一或某几种酶系的制取并不能体现整个生物体对木素分解的实际能力(其中有些酶系不仅参与木素的分解,还参与木素的合成^[9])。本研究不追求某一种酶系对木素的作用机理,而是测定被测生物体所产生的对木素分解的总体酶的结果。因此,本文采用紫外分光光度法用于木腐菌木素降解酶活力的测定,并具有操作步骤简单、测定速度快等优点,此方法如用于高木素代谢能力菌种的筛选及菌种代谢条件的选择与控制等研究,可以节省经费和时间。

参 考 文 献

- [1] Kadam, K. L. et al., 1986, Study of Lignin Biotransformation by *Aspergillus Fumigatus* and White-rot Fungi Using ¹⁴C-Labeled and Unlabeled Kraft Lignins, *Biotechnol. and Bioeng.*, 28(6), 394~404.
- [2] Kirk, T. K. 1980, Lignin Biodegradation, Microbiology, Chemistry and Potential Applications, CRC Press, Florida.
- [3] Erickson, M. et al., 1973, Zur Struktur des Lignins des Druckholzes Von Pinus Mugo, *Acta Chem. Scand.*, 27(5), 1673~1678.
- [4] Wu, L. C. F. et al., 1979, Utility of Oxidative Lignin Determination Methods for Biodegraded Lignocellulosic Substrates, *Biotechnol. and Bioeng.*, 21(10), 1679~1683.
- [5] 金重为等, 1989, 天然耐腐木材的抗腐力及其在腐朽过程中化学成份的变化, *林业科学*, 25(5), 447~452.
- [6] Crawford, D. L. et al., 1980, Microbial degradation of Lignin, *Enzyme Microb. Technol.*, 2(1), 11.
- [7] Tiem, M. et al., 1983, Lignin-degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete Chrysosporium* Burds, *Science.*, 221(4611), 661.
- [8] Tiem, M. et al., 1984, Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete Chrysosporium*, Purification, Characterization and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase, *Proc. Natl. Sci.*, 81(8), 2280~2284.
- [9] Aloys Hüttermann et al., 1980, Polymerization of Water-Insoluble Lignins by *Fomes annosus*, *Holzfoorschung.*, 34(2), 64~66.

*Determination of Lignolytic Activity in Wood-rot
Fungi by Ultraviolet Spectrophotometry*

Liu Xiuying Wang Zheng

(The Research Institute of Wood Industry CAF)

Abstract Under the special absorptive wavelength of lignin, the lignin contents in the solution containing lignin and mycelial are determined by ultraviolet spectrophotometry before and after the enzymer actings. The lignolytic activity of wood-rot fungi can be detected by this method. The method can also be used in the screening of lignin-degrading fungi.

Key words ultraviolet spectrophotometry; wood-rot; lignolytic activity

国际柚木会议简讯

由林业部主持的中国/亚太经社会/粮农组织亚太区域柚木研究与发展研讨会于1991年3月20~27日在广州召开。出席会议的有中国、孟加拉国、丹麦、法国、印度、印度尼西亚、老挝、缅甸、菲律宾、斯里兰卡、泰国和越南共12个国家的31名代表与官员。会议选出洪菊生教授(中国)为主席, Ratan Lal Banik先生(孟加拉国)与 Mehn Ko Ko Gyi 先生(缅甸)为副主席。中国林业部外事司司长杨禹畴代表中国致欢迎词。S. Z. Khan 先生与 Y. S. Rao 博士分别代表亚太经社会与亚太地区粮农组织致词。广东省林业厅厅长梁星权向会议代表致欢迎词。接着各国代表分别作了柚木研究与发展报告和专题报告。会议强调要为发展提供遗传品质优良的种子, 干形圆满度与装饰花纹的改良, 对种子播种前的处理、育苗密度、菌根、固氮、混农作业、装饰薄板和小规格原木加工技术等开展研究。会议注意到世界市场对柚木异乎寻常需求的吸引力, 大规模栽培的同时要发展小农户栽培或作庭院种植, 以视作为一家一户在20年内提供一笔可观现金以满足意外之需。会议通过接受“建立亚太区域柚木研究与发展网络, 第一期秘书处设在中国”的建议。会后, 代表们赴海南省对中国的柚木研究与发展基地进行考察。热林所受林业部委托正积极筹备建立“柚木研究与发展网络”。这次会议的成功召开, 将对亚太地区和我国柚木的研究发展产生重要的影响。

(邝炳朝)