

培养基种类和培养条件对白腐真菌生长和产酶特性的影响

王 灿, 胡洪营*, 于 茵, 文湘华

清华大学 环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084

摘要: 以白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 为研究对象, 比较了该菌种在人工合成培养基和天然培养基中的生长和产酶特性, 考察了竹子浸出液、pH、载体和抗生素等对白腐真菌在天然培养基中生长和产酶特性的影响。结果表明, 天然培养基中白腐真菌的生物量、菌丝小球直径和木质素过氧化物酶 (LiP) 活性均大于人工培养基。以天然培养基为基础培养基, 加入竹子浸出液可以促进白腐真菌的生长和提高木质素过氧化物酶活性; 较低 pH (4.5) 条件下菌丝小球直径较小; 载体的加入使得菌体以附着形式生长; 抗生素两性霉素 B 对白腐真菌的生长和产酶的影响存在阈值, 当 ρ (两性霉素 B) 超过 50 mg/L 时, 白腐真菌的生长和产酶受到明显的抑制。

关键词: 白腐真菌; 天然培养基; 生长特性; 竹子浸出液; 抗生素

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6929(2007)02-0009-05

Influence of Culturing Mediums and Conditions on Characterization of Growth and Enzyme Production of White Rot Fungi

WANG Can, HU Hong-ying, YU Yin, WEN Xiang-hua

Department of Environmental Science and Engineering, Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: The characterizations of growth and enzyme production of white rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium*) in the natural culturing medium were compared with that in the synthetical culturing medium. The effects of bamboo lixivium addition, pH, support and antibiotics on the growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium* were studied. The results indicated that the biomass, shape of mycelia and the lignin peroxidase (LiP) activity presented higher values in the natural culturing medium than that in the synthetical medium. The lixivium of bamboo promoted the growth and enhanced the LiP activity of white rot fungi. The shape of mycelia was affected by the pH and carriers. The mycelia were small under low pH (4.5) and grew in the form of adhesion with the addition of carrier. Further studies with antibiotics showed that amphotericin B could inhibit the growth and enzyme production of white rot fungi at the mass concentration of 50 mg/L.

Key words: white rot fungus; natural culturing medium; growth characterization; bamboo lixivium; antibiotic

白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 因能够引起木质腐烂而受到人们的普遍关注。从 20 世纪 70 年代开始, 国外研究者针对该类真菌的降解性能和生理特性进行了广泛研究。1978 年 Keyser 指出木质素过氧化物酶 (lignin peroxidation, LiP) 在白腐真菌降

解木质素过程中发挥着重要作用^[1]。此后, 建立适合白腐真菌生长和产酶的培养体系成为人们的研究热点。

在白腐真菌培养体系的研究中, 最为经典的是 Kirk 小组的研究工作, 以葡萄糖为碳源, 酒石酸铵为氮源, 以无机溶液和维生素等物质合成人工培养基, 并系统考察了黄孢原毛平革菌在该体系培养过程中 pH、氧气、培养方式等对 LiP 的影响^[2]。1981 年, 该组的 Jeffries^[3] 发表论文, 进一步提出 LiP 对木质素的降解过程是在氮源限制的情况下发生的。因此, Kirk

收稿日期: 2006-06-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2004AA601061)

作者简介: 王灿 (1981-), 男, 湖北阳新人, 博士研究生。

* 责任作者

培养基作为一种经典的合成培养基而被广泛应用.其后很多的研究者在研究白腐真菌胞外酶活性和降解特性时,常以 Kirk 培养基(氮源限制培养基)为基础进行改良^[4-6].另外,除了这种人工合成培养基外,还有一类由天然物质(如土豆和麦芽等)为原料制备的天然培养基.该类培养基的成分复杂,碳源和氮源丰富,因此也被称为富营养型培养基.

目前,人们对白腐真菌的研究大部分集中在提高 LiP 等胞外酶的产量和酶活性,以及酶对底物的降解性能方面,且多采用人工合成的氮源限制培养基^[7-8].而对天然培养基中白腐真菌的生长情况和产酶特性的研究相对较少.笔者比较了白腐真菌在人工合成培养基和天然培养基中的生物量、菌体形态和 LiP 酶活性等方面的差异;并以天然培养基为基础培养基,考察竹子浸出液, pH, 载体和抗生素对白腐真菌的生长和产酶特性的影响.

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用的白腐真菌菌种为清华大学保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BMK-F-1767.

人工合成培养基:以 Tien & Kirk 培养基为基础培养基^[9],缓冲液为 pH=4.4 的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液.天然培养基:取 200 g 土豆于 1 L 水中煮沸 30 min,用纱布过滤得到上清液,向上清液中投加 20 g 葡萄糖.

将一定量的竹片放入适量的去离子水中加热煮沸 15 min,用纱布过滤得到上清液, $\rho(\text{DOC})$ 为 327 mg/L.

称取适量的两性霉素 B 于无菌水中配成一定质量浓度的抗生素溶液.

1.2 培养条件与方法

固体培养:将菌种接种在平板,置于 37 °C 生化培养箱中静态培养.

液体培养:将菌种接种在装有液体培养基的锥形瓶内,置于 37 °C,转速 150 r/min 的摇床中培养.

1.3 分析方法

LiP 酶活性定义为 1 min 内氧化 1 μmol 藜芦醇的酶量为 1 个酶活性单位.测定方法:向 1.6 mL 去离子水中加入 2 mmol/L 的藜芦醇 0.8 mL, 4 mmol/L 的 H_2O_2 0.4 mL 和 50 mmol/L 的酒石酸-酒石酸钠缓冲溶液(pH=2.5) 0.2 mL 以及 1.0 mL 的粗酶液,用紫外分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU)测定在波长为 310 nm 处 2.5 min 内吸光度值的变化率.

MnP 酶活性定义为 1 min 内氧化 1 μmol Mn^{2+} 的酶量为 1 个酶活性单位.测定方法:向 1.8 mL 去离子水中加入 0.1 mmol/L 的 MnSO_4 0.4 mL, 1 mmol/L 的 H_2O_2 0.4 mL 和 0.1 mmol/L 的酒石酸-酒石酸钠缓冲溶液(pH=5.0) 0.4 mL 以及 1.0 mL 的粗酶液,用紫外分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU)测定在波长为 238 nm 处 1.0 min 内吸光度值的变化率.

总糖的测定采用苯酚硫酸法^[10].生物量测定采用干重测定法,在 110 °C 下烘干至恒重.

2 结果与分析

2.1 白腐真菌在人工合成和天然培养基中的生长特性

分别向 100 mL 的人工合成培养基和天然培养基中接入相同数量的白腐真菌孢子,培养基中初始孢子数约为 $8.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$.振荡培养 10 d 后发现,白腐真菌在人工合成培养基和天然培养基中的生长情况出现明显差异:天然培养基中生长的白腐真菌的生物量和菌丝小球的直径均明显大于人工合成培养基(见图 1).说明天然培养基中充足的营养物质可以有效刺激白腐真菌孢子的萌发和菌体的生长.因此,从收获菌体的角度来讲,在天然培养基中可以获得更多的白腐真菌菌体.

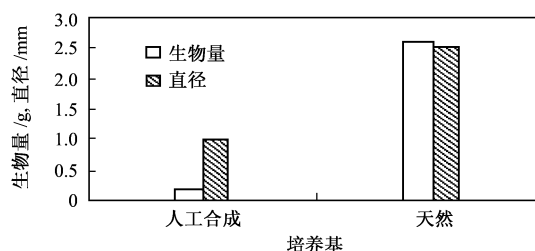
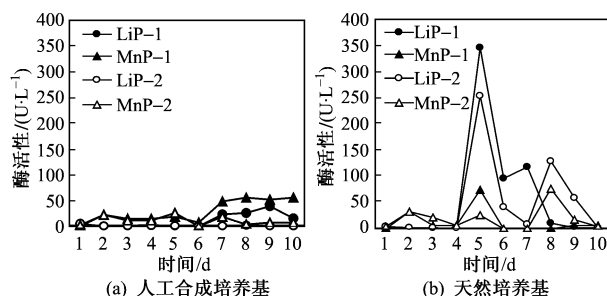


图1 白腐真菌在不同培养基内的生长情况

Fig. 1 Comparison of biomass and size of pellets of *P. chrysosporium* in different mediums

在培养过程中检测培养基液相中的 LiP 和 MnP 酶活性,结果见图 2.由图 2 可见,在人工合成培养基中, MnP 和 LiP 的酶活性均很小,在培养过程中未出现明显的酶活性.这一结果与其他研究者的试验结果有差异^[3].一般认为,白腐真菌木质素降解酶的产生具备营养调控的特征,即在氮源限制的培养条件下产生 LiP 和 MnP.而该研究中人工合成培养基中酶活性很低的原因,可能是由于培养基剧烈振荡产生的剪切力造成了酶活性的丧失.在天然培养基中, LiP 出现了较高的酶活性,所测试的 2 个平行样在第 5 天均出现了最大酶活性(345 U/L),这说明,

在天然培养基中,白腐真菌也能产生较高的 LiP. 与 LiP 不同,天然培养基中 MnP 的酶活性很低,在培养的 10 d 内没有出现较高的酶活性.



数字 1 和 2 表示平行样

图 2 白腐真菌在不同培养基内的产酶特性

Fig. 2 Enzyme activity of LiP and MnP of *P. chrysosporium* in different mediums

2.2 竹子浸出液对白腐真菌生长特性的影响

2.2.1 对白腐真菌生物量的影响

向一系列装有 100 mL 天然培养基的锥形瓶中接入数量相同的白腐真菌孢子(培养基中最终孢子数约为 $8.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$),向部分锥形瓶中加入 20 mL 竹子浸出液.培养 5 d 后,考察竹子浸出液对培养基和菌体生长的影响,结果见表 1.由表 1 可见,培养 5 d 后,加入竹子浸出液的培养基中糖类含量明显低于未加竹子浸出液的培养基.这说明,竹子浸出液的加入加快了培养基中营养物质(糖类)的消耗.同时,从生物量的数据来看,加入竹子浸出液后的培养基中白腐真菌生物量明显较高.这意味着竹子浸出液可以促进白腐真菌的生长.

表 1 竹子浸出液对白腐真菌生长的影响

Table 1 Effect of extraction of bamboo on the growth of *P. chrysosporium*

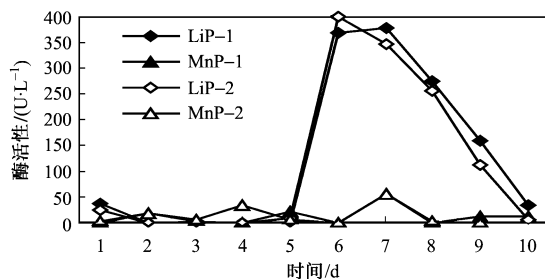
培养基	培养时间/d	$\rho(\text{糖类})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	生物量/g	菌丝小球平均直径/mm
原培养基		20.769	0	0
未加竹子浸出液	5	15.274	2.5	2.5
加入竹子浸出液	5	11.046	5.8	5.0

其他学者也得到了部分天然物质浸出液促进白腐真菌生长的结论.林刚等^[11]通过试验发现,在人工合成的氮源限制液体培养基中加入木材、玉米芯等物质的浸出液能明显提高白腐真菌的产量.一般认为,在真菌的生长过程中,有一类有机化合物在低浓度时对真菌的生长和发育有着重要的影响,该类物质被称为生长调节剂或生长因子.该调节剂的范围很广,包括脂肪酸、激素以及挥发性有机物等,但

它们对真菌的作用机制尚不清楚^[12].白腐真菌作为一种高等的腐生真菌,在其生长过程中需要特定复杂成分的外源生长因子,而人工合成培养基很难有效提供全面的营养成分.所以,在人工合成的培养基中,生长因子的缺乏使得白腐真菌处于一定的生态压力之下,极大限制了生物量的增长速度^[11].

2.2.2 对白腐真菌产酶的影响

图 3 为白腐真菌在加入竹子浸出液的天然培养基中的产酶情况.从图 3 可见,加入竹子浸出液后,培养基中 LiP 酶活性在第 6 天出现最大值(400 U/L),比未加竹子浸出液的自然培养基中的最大酶活性出现时间推迟 1 d(见图 2),但酶活性没有显著性差异.另外,从持续出现较高酶活性的时间来看,加入竹子浸出液的培养基,第 9 天的酶活性仍大于 150 U/L.说明竹子浸出液可以在较长时间内维持较高的 LiP 酶活性.与此不同,未加竹子浸出液的培养基在出现最大酶活性的第 2 天,就出现了酶活性快速消失的情况(低于 150 U/L).因此,竹子浸出液对天然培养基中白腐真菌产生 LiP 有促进作用,可以延长 LiP 的产酶时间.



数字 1 和 2 表示平行样

图 3 白腐真菌在加入竹子浸出液培养基中的产酶特性

Fig. 3 Enzyme activity of LiP and MnP of *P. chrysosporium* in the mediums with extract of bamboo

Zacchi 等^[13]认为纤维素对白腐真菌在浸没式培养条件下的产酶有促进作用,而纤维素是竹子和其他木材中的主要成分.张晶等^[14]的研究也表明,一些天然植物的浸出液能够促进另一株白腐真菌 F2 的 LiP 和 MnP 的产酶量.这说明在白腐真菌的产酶环境中,植物内部的某些物质对白腐真菌的产酶具有诱导和促进作用.

2.3 pH 对白腐真菌生长特性的影响

分别向 3 瓶装有 100 mL 天然培养基的锥形瓶中加入 1.8 mL 的 0.2 mol/L NaAc 和 8.2 mL 的 0.2 mol/L HAc;1.0 mL 的 15 mol/L Na_2HPO_4 和 9.0 mL 的

15 mol/L KH_2PO_4 ; 9.5 mL 的 15 mol/L Na_2HPO_4 和 0.5 mL 的 15 mol/L KH_2PO_4 . 调节各瓶培养基的起始 pH 分别为 7.5、6.0 和 4.5.

向上述培养基中接入数量相同的白腐真菌孢子(培养基中最终孢子数约为 $8.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$), 培养一段时间后白腐真菌菌丝小球形态如图 4 所示. 由图 4 可见, 随着 pH 的增加, 培养基中菌丝小球的直径也在不断增加, 同时菌丝小球的数量在不断减少.

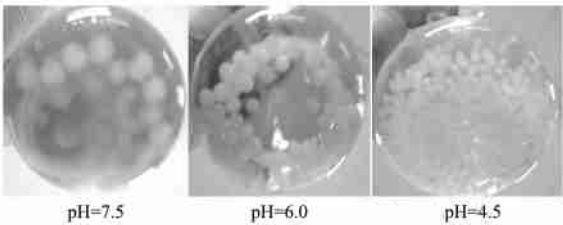


图 4 不同 pH 培养基中白腐真菌菌丝小球的形态
Fig. 4 Shapes of *P. chrysosporium* pellets in the mediums with different pH

从图 5 的生物量数据来看, 三者的生物量相差不大, 但低 pH 条件下的菌丝小球生物量略大于其他 pH 条件. 说明 pH 为 4.5~7.5 时不会对白腐真菌菌丝小球的生长产生根本性的影响. 但 pH 的不同导致了菌丝小球的直径产生差异. 对于大直径的菌丝小球而言, 其表面积相对较小, 限制了营养物质的传递. 因此, 直径较大的菌丝小球的生物量反而较小. 另外, 白腐真菌对环境的 pH 具有自调节能力. 上述 3 种 pH 的培养基在培养 10 d 后, 培养基的 pH 都降至白腐真菌最适的 pH(4.5)^[5] 附近.

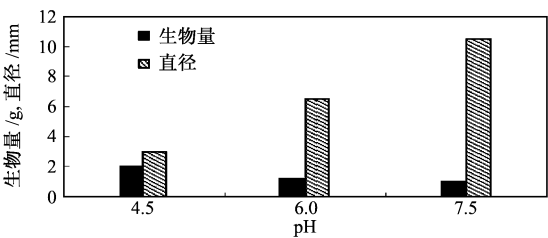


图 5 不同 pH 培养基中白腐真菌菌丝小球直径和生物量比较

Fig. 5 Comparisons of size of pellets and biomass in the mediums with different pH

2.4 载体对白腐真菌生长特性的影响

向天然培养基中加入 14 g 竹筒, 比较白腐真菌在加与不加竹筒的培养基中的生长情况, 结果见表 2. 从表 2 可以看出, 向液体培养基中加入载体后, 白腐真菌的生长形态和生物量均发生明显的变化.

载体的加入为白腐真菌提供了附着位点, 大量的菌体附着在载体表面形成一层较厚的菌膜.

Guimarães 等^[15] 比较了不同载体对白腐真菌生物量的影响, 结果表明, 适合菌体附着的载体可以有效减少水力剪切力的影响, 为白腐真菌的生长提供良好的环境. 笔者研究发现, 向白腐真菌的培养体系中加入合适的载体, 可以促进白腐真菌的生长.

表 2 载体对白腐真菌生长的影响

Table 2 Effect of addition of bamboo on the growth of *P. chrysosporium*

载体	生物量	生长形态	生长位置
不加竹筒	少	菌丝小球	液体中悬浮生长
加入竹筒	多	菌丝膜	竹筒内壁附着生长

2.5 抗生素对白腐真菌生长的影响

在白腐真菌生长和培养过程中, 经常会受到细菌和其他真菌的感染. 其中, 对于细菌的感染, 采用一般的细菌抑菌剂可以有效地防治, 而不影响白腐真菌的生长; 对于其他真菌的感染, 则需要选取合适的真菌抑菌剂. 而真菌抑菌剂对白腐真菌生长和产酶过程的影响鲜见报道. 因此, 笔者选取广谱真菌抗生素两性霉素 B 作为试用药剂, 考察在不同质量浓度下其对白腐真菌在天然培养基中的生长和产酶特性的影响(见图 6).

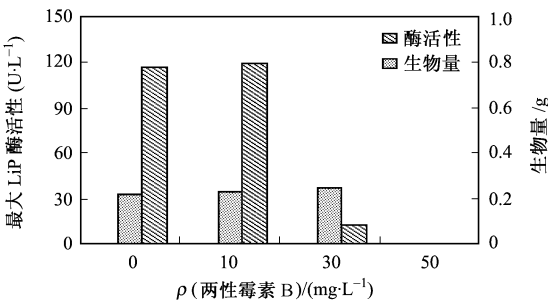


图 6 不同质量浓度两性霉素 B 下白腐真菌生物量和酶活性的比较

Fig. 6 Comparisons of biomass and maximum enzyme activity under different mass concentrations of amphotericin B

从图 6 可以看出, 当培养基中 ρ (两性霉素 B) 小于 10 mg/L 时, 白腐真菌的生长和产酶特性(最大 LiP 酶活性) 基本不受两性霉素 B 的影响; 当 ρ (两性霉素 B) 为 30 mg/L 时, 白腐真菌的酶活性明显减少; 当 ρ (两性霉素 B) 为 50 mg/L 时, 白腐真菌的生长和产酶过程基本停止.

3 结论

a. 白腐真菌在天然培养基中的生物量和菌丝小球直径均明显大于在人工合成培养基中,天然培养基中充足的营养物质可以有效刺激白腐真菌孢子的萌发和菌体的生长。

b. 白腐真菌在天然培养基中能够产生较高的LiP酶活性,最大酶活性可达345 U/L。

c. 竹子浸出液对天然培养基中白腐真菌的生长和LiP的产生均表现出促进作用;pH对天然培养基中白腐真菌菌丝小球的生长形态产生影响,低pH(4.5)条件下菌丝小球直径较小;向天然浸出液中加入载体,可改变白腐真菌的生长形态,提高菌体的生物量。

d. ρ (两性霉素B)小于10 mg/L对天然培养基中白腐真菌的生长和产酶影响较小; ρ (两性霉素B)为30 mg/L时,白腐真菌的产酶过程受到抑制; ρ (两性霉素B)为50 mg/L时,白腐真菌的生长和产酶过程基本停止。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Kirk T K, Schultz E, Connors W J, et al. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Archives of Microbiology*, 1978, 117: 277—285.
- [3] Jeffries T W, Choi S, Kirk T K. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42(2): 290—296.
- [4] Yu G C, Wen X H, Qian Y. Production of the ligninolytic enzymes by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in an air atmosphere [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21: 323—327.
- [5] 李慧蓉, 李华兵, 李文琼, 等. 黄孢原毛平革菌对6种染料的脱色降解[J]. *环境科学研究*, 1999, 12(3): 14—21.
- Li Huirong, Li Huabing, Li Wenqiong, et al. Decolorization and biodegradation of six kinds of dyes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(3): 14—21.
- [6] Bonnamy P, Jeffries T W. Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidases from lignin degrading white rot fungi [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 210—217.
- [7] 李翠珍, 文湘华. 白腐真菌 F2 的生长及产木质素降解酶特性的研究[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(2): 226—231.
- Li Cuizhen, Wen Xianghua. Characterization of growth and ligninolytic enzymes production of a white rot fungus F2 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 226—231.
- [8] Tonon F, Odier E. Influence of veraryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(2): 466—472.
- [9] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds [J]. *Sci*, 1983, 221(12): 661—663.
- [10] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. *食品工艺科技*, 2006, 27(2): 193—195.
- Zhang Zhijun, Liu Jianhua, Li Shufang, et al. Study on the analysis of ganoderma lucidum polysaccharides by phenol-sulfuric acid method [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(2): 193—195.
- [11] 林刚, 文湘华, 钱易. 液体培养基中添加天然成分对白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 生长的促进作用[J]. *环境科学*, 2004, 24(4): 41—47.
- Lin Gang, Wen Xianghua, Qian Yi. Enhance of reproduction of *Phanerochaete chrysosporium* by adding natural lixiviums in liquid medium [J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2004, 24(4): 41—47.
- [12] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 78—82.
- Xing Laijun, Li Mingchun. *General fungi* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001. 78—82.
- [13] Zacchi L, Burla G, Zuolong D, et al. Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase [J]. *Journal of Biotechnol*, 2000, 78(2): 185—192.
- [14] 张晶, 李翠珍, 文湘华. 天然浸出液对自分离白腐真菌产木质素降解酶的影响[J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 2005, 45(12): 1629—1632.
- Zhang Jing, Li Cuizhen, Wen Xianghua. Effect of natural lixiviums on ligninolytic enzyme production of white rot fungus [J]. *Journal Tsinghua University (Science and Technology)*, 2005, 45(12): 1629—1632.
- [15] Guimarães C, Matos C, Azeredo J, et al. The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(10): 795—800.

(编辑:孔 欣)