

木质素降解菌 L₁ 原生质体的形成和再生

郭爱莲, 徐金贵, 杨琳

(西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:从自然界筛选出一株降解木质素高的白腐真菌 L₁, 对其原生质体的形成和再生进行了研究。在 OS 培养基中生长的菌丝体, 原生质体数量较高。在液体培养条件下, 于 OS 培养基中培养 60 h 的菌丝体, 用 0.3% β-巯基乙醇与酶液同时处理菌丝体, 采用 pH5.0 的混合酶(蜗牛酶: 纤维素酶: 溶菌酶的最佳浓度比为 5:4:1); 在 30℃ 酶解 4 h; 用 0.4 mol/L NH₄Cl, 10 mmol/L MgSO₄ 作渗透压稳定剂时, 原生质体数量达到 4.32×10⁵ 个/mg。OS 双层再生培养基最适于原生质体再生。

关键词:木质素降解; 白腐真菌 L₁; 原生质体; 形成; 再生

中图分类号: Q344 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2002)04-0393-04

我国是一个农业大国, 农作物播种面积居世界第一。每年秸秆总产量达 5.7×10⁸ t, 占世界秸秆总产量的 20%~30%, 而目前用于饲料部分还不足 10%^[1]。所以, 如何处理秸秆提高其饲用价值是发展畜牧业、提高人民生活水平的重点课题。秸秆焚烧给环境带来了很大的污染。木质素是天然高分子聚合物, 占生物物质总量的 50%, 属于难降解物质。秸秆因其细胞壁中含有木质素, 很难作为工业原料和饲料, 因而研究木质素降解的工作具有重要意义和应用前景。国内外的研究多集中在一些菌的机理和酶学性质上^[2~4], 而在选育具有高木质素降解率的菌种方面研究较少。我们从自然界大量样品中筛选出一株木质素降解率高(28.64%)的野生白腐真菌 L₁, 为了选育出更高木质素降解率的变异菌株, 加强木质素的降解, 对它的原生质体的形成和再生进行了研究, 以期得到进一步的开发利用。

1 材料和方法

1.1 主要培养基

1.1.1 斜面保藏培养基 PSA 培养基。

1.1.2 制备原生质体用菌丝生长培养基 ① P-麸-Y 培养基(加有 2% 麸皮, 1% 酵母膏的马铃薯蔗糖培养基); ② OS 培养基^[5](洋葱汁加蔗糖等)。

1.1.3 原生质体再生培养基 ① PSA 培养基; ② PSA-愈创木酚培养基; ③ P-麸-Y 培养基; ④ OS 培养基。

1.2 L₁ 菌株原生质体的制备和再生方法

1.2.1 菌丝培养方法 取 PSA 斜面上生长旺盛的菌丝, 接种于液体培养基中, 30℃ 培养 2~4 天。

1.2.2 不同酶系及酶浓度制备 所用蜗牛酶(S)、纤维素酶(C)、溶菌酶(L)。称取所需的混合酶, 其中蜗牛酶(5 mg/mL)、纤维素酶(4 mg/mL)、溶菌酶(1 mg/mL), 以 pH5.0 的 0.4 mol/L NH₄Cl-0.3% β-巯基乙醇 0.2 mol/L 磷酸缓冲液溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌后使用。

1.2.3 原生质体分离 将已培养好的菌丝置于离心管中, 2 000 r/min 离心 20 min, 去上清液, 用渗透压稳定剂洗涤。按每 300 mg 湿菌丝加 1 mL 酶液计算, 酶解时取样在显微镜下观察^[6]。

1.2.4 不同菌丝生长培养基对原生质体的影响 采用 OS 及 P-麸-Y 液体培养基, 30℃ 培养 60 h 的菌丝酶解, 3 h 时用血球计数板计数。

1.2.5 β-巯基乙醇的不同预处理方式 方式一: 用 0.3% β-巯基乙醇预先浸泡菌丝 1.5 h, 然后离心除去 β-巯基乙醇, 再用高渗溶液洗涤。方式二: 将 0.3% β-巯基乙醇按每 1 mL 酶液、0.05 mL β-巯基乙醇的量加入。

收稿日期: 2001-01-08

基金项目: 陕西省教育厅专项基金资助项目(00JK138)

作者简介: 郭爱莲(1945-), 女, 山东日照人, 西北大学教授, 从事微生物学研究。

1.2.6 不同高渗缓冲液的配制 高渗缓冲液 A:蔗糖 0.4 mol/L, NH_4Cl 0.06 mol/L, MgSO_4 10 mmol/L;高渗缓冲液 B: NH_4Cl 0.4 mol/L, MgSO_4 10 mmol/L。

1.2.7 酶液的 pH 值对原生质体制备的影响 用不同 pH 值的磷酸缓冲液配制混合酶液酶解菌丝。pH 值采用 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 和 8.0, 选取最适 pH 值。

1.2.8 不同菌龄及酶解时间对原生质体制备的影响 用不同时间液体培养的菌丝体制取原生质体, 酶解时间每隔 1 h(即采取酶解 2, 3, 4h) 取样镜检。

1.2.9 酶解温度对原生质体制备的影响 用混合酶液在不同温度下酶解菌丝体, 温度采用 28, 30, 35℃。

1.2.10 原生质体的纯化 将酶解液用灭过菌的 4 层高级擦镜纸过滤。4 000 r/min 离心 10 min, 收集原生质体, 用渗透压稳定剂洗涤和稳定, 血球计数板计数。

1.2.11 原生质体的再生 用双层平板法再生: 在培养皿中倒一层固体再生培养基, 冷凝后, 将制备的原生质体用渗透压稳定剂适当稀释, 将原生质体悬液与预热的半固体再生培养基混匀, 倾注于固体培养基底层平板上, 30℃ 培养 4 天。将原生质体悬液经无菌蒸馏水稀释, 倒于双层平板作为对照。

1.2.12 原生质体再生率的计算 再生率(%) = (再生培养基上生长的菌落数 - 无菌蒸馏水稀释样品的再生培养基上菌落数) × 100% 显微镜下计数的原生质体数

2 结果和讨论

2.1 不同培养方式对原生质体制备的影响

在液体培养基中培养菌丝体。培养液中加少量无菌玻璃珠, 培养中轻微振荡, 将菌丝打散, 能提高原生质体数量。如果振荡太快而又无玻璃珠时, 摇瓶培养形成菌丝球, 减少了与酶接触的面积。

2.2 不同酶系对原生质体制备的影响

利用 S(5 mg/mL) 及不同比例的混合酶液(S : C : L 分别为 3 : 4 : 1, 4 : 6 : 1 和 5 : 4 : 1) 酶解 3 h, 30℃ 培养 48 h 的菌丝, 结果见表 1。

从表 1 可看出: 该菌制备原生质体的最佳酶组合, 即蜗牛酶 : 纤维素酶 : 溶菌酶为 5 : 4 : 1。

2.3 不同菌丝培养液对原生质体制备的影响

在不同培养液中, 30℃ 培养了 60 h 的菌丝, 酶

解 3 h 时的原生质体制备率相差较大。OS 培养的菌丝的原生质体制备率为 3.03×10^5 个/mg, 而 P-麸-Y(加有 2% 麸皮, 1% 酵母膏的马铃薯蔗糖培养基) 培养的菌丝酶解时的原生质体数量为 0.05×10^5 个/mg, 采用不同的培养基会明显影响原生质体制备, 可能是由于在不同培养基上生长的菌丝对于酶的敏感性不同, 与已知报道相近^[7], 故采用 OS 培养基较好。

表 1 酶对原生质体数量的影响

Tab. 1 The effect of enzyme on the L_1 protoplast yield

酶	比例	原生质体数量/ $10^5 \cdot \text{mg}^{-1}$
S	5	0.53
S : C : L	3 : 4 : 1	2.75
S : C : L	4 : 6 : 1	1.71
S : C : L	5 : 4 : 1	2.87

2.4 不同预处理方式对原生质体制备的影响

β -巯基乙醇能还原细胞壁中蛋白质的二硫键, 使分子链切开, 酶分子易渗入, 从而促进细胞壁的水解及原生质体的释放。通过探索, 对该菌采用 0.3% β -巯基乙醇与酶液同时处理菌丝体比单纯用相同浓度的 β -巯基乙醇预处理效果好。同时处理时, 原生质体制备率可为单独处理时的 2.5 倍, 故同时处理效果较好。

2.5 不同高渗缓冲液对原生质体制备的影响

原生质体由于脱去了细胞壁, 对外界环境变得非常敏感, 特别是对渗透压。如果把它悬浮在蒸馏水中, 则容易膨胀破裂, 因而必须在一定浓度的高渗溶液中进行酶解、破壁, 才能形成和保持稳定的原生质体。渗透压稳定剂作为复合酶系统溶解和作用环境, 对原生质体的存在环境和制备都很重要, 实验中选择 A 和 B 两种配方作为渗透压稳定剂。采用 B 得到的原生质体制备率比用 A 的提高了 1.7 倍, 表明 B 更有利于原生质体的形成, 形成的原生质体易与其他残存碎片菌丝分离开来。

2.6 pH 值对原生质体制备的影响

不同的 pH 值影响酶的活性。其他条件相同, 而采用不同的 pH 值, 结果见图 1。

从图 1 可看出, pH 值为 5.0 时, 可得到最大的原生质体制备率。

2.7 不同菌龄及酶解时间对原生质体制备的影响

菌丝不同培养时间和酶解时间对该菌原生质体制备的影响见图 2。

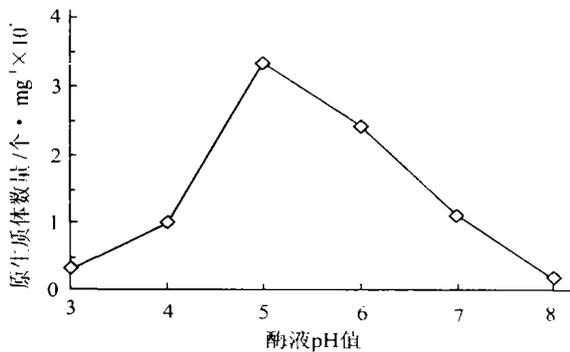


图1 酶液 pH 值对原生质体数量的影响

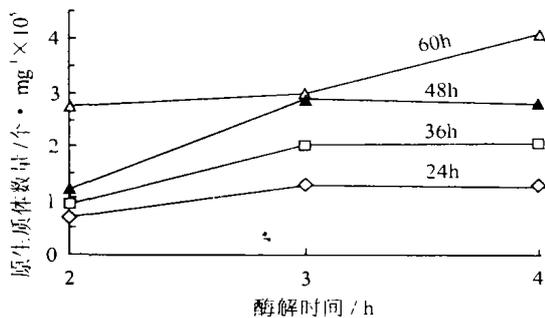
Fig. 1 The effect of enzyme pH on the L_1 protoplast yield

图2 菌龄和酶解时间对原生质体数量的影响

Fig. 2 The effect of cell age and enzymolysis time on the L_1 protoplast yield

在培养 60 h 的菌丝体酶解 4 h 时,可得到最大的原生质体数量。在显微镜下观察:在酶解 2, 3 h 时,看到不少未被酶解的菌丝体;在酶解 4 h 时,原生质体数量最多,几乎看不到未被酶解的菌丝体;继续酶解不仅不能增加原生质体的数目,反而造成原生质体数量的下降,故采用培养 60 h 的菌丝体酶解 4 h。

2.8 酶解温度对原生质体制备的影响

用不同温度:28, 30, 35 °C 酶解菌丝 4 h, 温度对原生质体制备率的影响结果见图 3。从图 3 可以看出, 30 °C 酶解菌丝体 4 h 可得最大原生质体制备率,

达 4.32×10^5 个/mg。

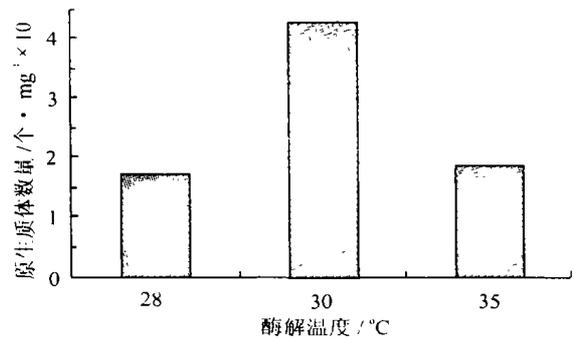


图3 酶解温度对原生质体数量的影响

Fig. 3 The effect of enzymolysis temperature on the L_1 protoplast yield

2.9 原生质体释放过程的观察

酶解反应进行 15 min 时,在显微镜下可观察到原生质体开始释放:首先菌丝顶端膨大,细胞壁水解,细胞内容物自尖端孔冒出,并逐渐脱离菌丝,形成游离的原生质体,接着在离尖端菌丝较远部位,也有原生质体冒出。酶解 1.5 h 后,有的菌丝开始形成断片,细胞壁呈现模糊状态,细胞内容物膨大缢缩成串球状,而形成一串串的原生质体。原生质体刚刚释放时,体积较小,经过 2~3 h 后,体积变大。

2.10 原生质体的纯化

酶解液用灭过菌的 4 层高级擦镜纸进行过滤,经 4 000 r/min 离心 10 min 后,去上清液,用渗透压稳定剂洗涤两次,在显微镜下观察,原生质体已纯化。

2.11 原生质体的再生

用 4 种不同的再生培养基:PSA-愈创木酚, PSA, P-麸-Y, OS 培养基对 L_1 菌原生质体再生进行了试验,通过双层平板培养进行对比,OS 培养基最适于 L_1 菌原生质体的再生,PSA-愈创木酚次之, P-麸-Y 较差,PSA 最差。在原生质体稀释成相同浓度后,用双层平板法再生,原生质体再生率平均达 6.93%。

参考文献:

- [1] 曹玉凤,李英,刘荣昌. 生物技术在处理农作物秸秆饲料中的应用[J]. 饲料研究,1999,(1):26-27.
- [2] GALLIANO H, GAS G. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes[J]. Enzyme Microb Technol,1991,13:478-480.
- [3] HIROYUKI W, KHADAR V. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Biological Chemistry,1992,33:23 688-23 689.
- [4] JEFFRY R. BORGMEYER. Production and characterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different *Streptomyces* sp[J]. Applied and Environmental Microbiology,1985,2:273-278.

- [5] 朱铭富,张志才,郭守玉. 双孢蘑菇原生质体的制备[J]. 食用菌, 1992, (4): 6-7.
 [6] 李刚,李保健. 灵芝原生质体分离与再生研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 79-88.
 [7] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1991. 232-233.

(编辑 徐象平)

Formation and regeneration from lignin degradation fungus L₁ protoplast

GUO Ai-lian, XU Jin-gui, YANG Lin

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: White rot fungus L₁ with high ability to degrade lignin was isolated from nature, and the formation and regeneration of L₁ protoplast was studied. By using the mycelia growing in the OS media, the higher yield of L₁ protoplast can be obtained. There was the highest yield of L₁ protoplast, up to 4.32×10^5 /mg, when the mycelia growing in the OS media on the condition of liquid culture for 60 hours were dealt with 0.3% β -mercaptoethanol and compound enzyme together by using the osmotic pressure stabilizer (0.4 mol/L NH₄Cl, 10 mmol/L MgSO₄) for 4 hours in 30°C. The compound enzyme was composed of snailase, cellulase, lysozyme at the best concentration ratio of 5 : 4 : 1, pH value 5.0. The OS double layer regeneration media was the best media for L₁ protoplast regeneration.

Key words: lignin degradation; white rot fungus L₁; protoplast; formation; regeneration

· 学术动态 ·

李岚清副总理、李学勇副部长分别视察我校生物芯片研发中心

2001年12月8日,国务院副总理李岚清同志在科技部徐冠华部长、教育部陈至立部长及陕西省委书记李建国、省长程安东、省科技厅厅长孙海鹰等人的陪同下,对我校生物芯片研发中心进行了视察并作了重要指示。

李岚清副总理在认真听取了我校孙勇校长和生物芯片研发中心主任陈超博士分别介绍的我校发展历史和现状以及生物芯片技术国际、国内最新成果和发展趋势、西北大学生物芯片研发中心自成立以来所取得的成绩和所处的学术地位、生物芯片产品的研究开发将带来的巨大社会效益和经济效益等等,李岚清副总理对我校生物芯片研发中心所取得的成绩给予了充分肯定,并对中心今后的工作给予厚望。他认为我校研发中心“工作很有特色”,并指示科技部、教育部“对西北大学生物芯片研发中心的工作给予支持”。

2002年2月22日,国家科技部李学勇副部长和综合计划司申茂向司长、陕西省科技厅、西安市科委和市高新技术开发区领导在我校党委书记李军锋、校长孙勇的陪同下,来到我校生物芯片研发中心及实验室视察并指导工作。

在听取了研发中心主任陈超博士的工作汇报之后,李学勇副部长综合全国生物芯片领域发展的现状,认为西北大学生物芯片研发中心与北京、上海相比,“具有自身的特色和一定的优势”,认为目前研发中心所确立的研究工作和项目有比较明确的产业化方向和目标,具有较清晰的应用及市场前景,同时赞赏了我校生物芯片研发中心拥有一支难得的专家和学者团队,特别是他们“在美国接受了系统的专业学习,既有在国外知名大学从事科学研究的经验,又有在世界五百强企业从事产业化的经历,是难得的综合型人才”。李学勇副部长还表示,“十五”期间国家工程技术研究中心建设规划政策将向西部倾斜,在西部组建国家工程技术研究中心,可“特事特办”,成熟一个,审批一个。

(薛 鲍)