

五种羊肚菌液体培养过程胞外酶活性变化研究

陈国梁, 张向前, 贺晓龙, 任桂梅, 陈宗礼

(延安大学 生命科学学院, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘要: 检测了编号为 M1、M2、M7、M8、10 号羊肚菌菌丝体在液体培养基中生长时胞外酶的活性及培养液中糖与蛋白质的含量, 同时观察了菌丝体生长情况。结果表明: 菌丝体生长情况各不相同, 10 号在菌丝片的产生及菌丝成团最早, 依次为 10 号 > M8 > M7 = M2 > M1; 与碳水化合物降解相关的酶(纤维素酶、淀粉酶)活性变化趋势基本相同, 在发酵的第 2~3 天出现第 1 个峰值, 并于第 6 天出现第 2 个峰值, 且第 1 个峰值大于第 2 个峰值; 在整个培养期内漆酶、愈创木酚酶、蛋白酶均有活性, 产酶高峰也不尽相同; 蛋白质、糖含量随时间变化且与酶活力相关。

关键词: 羊肚菌; 菌丝体; 液体培养; 胞外酶

中图分类号: S 646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)10-0210-04

羊肚菌属于子囊亚纲(Acomycotina)盘菌目(Pezizales)羊肚菌科(Morchellaceae)羊肚菌属(*Morchella* spp.), 又称羊肚蘑、羊肚菜, 具有很高的营养和药用价值, 风味鲜美, 深受国内外消费者的喜爱。由于羊肚菌

野生资源匮乏, 满足不了市场需求, 许多食用菌工作者对其进行了人工栽培方面的研究, 但至今羊肚菌子实体仍不能进行生产化的人工栽培^[1]。该研究以编号为 M1、M2、M7、M8、10 号羊肚菌为材料, 采用液体培养的方法, 研究其在液体培养基中培养时胞外酶活性变化规律与生长发育之间的关系, 旨在探讨其营养生理特性, 为羊肚菌的人工驯化培养及开发利用提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 陈国梁(1974), 男, 陕西定边县人, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: gl9359@163.com。

通讯作者: 陈宗礼(1952), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为遗传学。E-mail: zongli_chen@yahoo.com.cn。

基金项目: 延安大学专项科研基金资助项目(YDK2008-17)。

收稿日期: 2010-02-10

Studies on the Property of Some *Agaricus* spp. Strains in Degradation Rice Straw

LI Yan-rong^{1,2}, ZHOU Guo-ying², HU Qing-xiu¹, ZHAO Liang-liang³

(1. College of Life Science, Central South University of Forest and Technology, Changsha, Hunan 410006; 2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. College of Environmental and Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: To promote the yield of *Agaricus bisporus* and improve efficiently using of farmland straw, 5 *Agaricus bisporus* strains(2796, A5, Az, A3 and Ar) was investigated about the function of degradation rice straw. In this experiment, Bavendamm chromogenic reaction, RB bright blue flat color reaction, Eriksson discoloration circle test and Woodiness degradation test was finished. The results showed that A5 and 2796 had higher relevant lignin degrading enzymes including lignin degradation enzyme, lignin peroxidase, manganese dependence peroxidase vitality through the Bavendamm chromogenic reaction and RB bright blue flat color test; then all the strains by Eriksson discoloration circle test and Woodiness degradation test appeared that 2796 and A3 strains were selective degradation of cellulose in the beginning of the experiment, however the others was selective degradation of lignin, and the highest degradation rate of lignin of 2796 was 39.82%, A5 was 20.91% just only, those results explained to us that there was no correlation between the selectivity of lignin and degradation rate of it. Finally we can selected that 2796 and A5 were the most efficient degradation of rice straw stains.

Key words: *Agaricus bisporus*; Bavendamm chromogenic reaction; RB bright blue flat color test; Eriksson discoloration circle test; degradation of rice straw

1.1.1 供试菌种及试剂 M1、M2、M7、M8 菌株由延安大学生命科学学院微生物学教研组提供, 10 #菌株由四川微生物研究所提供, 化学药品均为分析纯或化学纯试剂。

1.1.2 培养基 每升液体培养基中含玉米 60.0 g、蔗糖 10.0 g、磷酸二氢钾 3.0 g、硫酸镁 1.5 g、维生素 B₁ 100.0 mg。用 NaOH 将 pH 值调至 6.5, 每瓶装 50 mL, 灭菌备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝培养 向装有液体培养基的三角瓶中接入 2 mL 已培养好的菌种母液, 25℃, 120 r/min, 恒温震荡培养。

1.2.2 粗酶液制备 每天定时观察, 取 5 mL 样, 4℃、4 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液。

1.2.3 酶活测定 以下酶活力均以样品与底物反应 30 min 后光密度的改变值表示, 以煮沸 15 min 的酶液作对照, 每组做 3 个重复。羧甲基纤维素酶活力测定^[2]: 往试管中加入 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液(用 pH 4.6, 0.1M 柠檬酸盐缓冲液配制)1.5 mL, 加稀释 1 000 倍的粗酶液 0.5 mL, 50℃水浴准确保温 30 min 后, 取出立即加入 DNS 试剂 1.5 mL, 煮沸 10 min, 取出后加蒸馏水 21.5 mL, 混匀测 520 nm 处 OD 值。淀粉酶活力测定^[3]: 往试管中加入 0.5% 的可溶性淀粉溶液(用 pH 5.8, 0.1M 乙酸盐配制)1.5 mL, 加稀释 100 倍的粗酶液 0.5 mL, 38℃水浴准确保温 30 min 后。蛋白酶活力测定^[4]: 取 1.0 mL 0.5% 酪蛋白(预热至 30℃)于试管中, 加入 0.5 mL 粗酶液摇匀, 30℃保温 10 min, 加入 1.0 mL 10.0% 三氯乙酸摇匀, 4℃4 000 r/min 离心 15 min, 取 0.5 mL 上清液, 加 0.55M NaCO₃, 0.5 mL Folin-酚试剂摇匀, 30℃保温 15 min。测其 650 nm OD 值。愈创木酚酶活力测定^[3]: 取 80 mmol/L 愈创木酚 0.5 mL 作为底物, 加入 0.10 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.6)3.0 mL, 加入 0.5 mL 粗酶液, 28℃水浴准确保温 30 min 后, 测 490 nm 处 OD 值。

1.2.4 漆酶活力测定^[5] 取 13.36 mmol/L 联苯胺(用 95% 的乙醇溶解)0.5 mL 作为底物, 加入 0.10 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.6)3.4 mL, 加入 0.1 mL 粗酶液, 28℃水浴准确保温 30 min 后, 测 600 nm 处 OD 值。

1.2.5 糖含量测定^[6] 取上述粗酶液 0.10 mL, 加蒸馏水 1.90 mL, DNS 试剂 1.5 mL, 混匀, 煮沸 10 min, 测 520 nm 处 OD 值。

1.2.6 蛋白质含量测定 参照文献[6] 考马斯亮蓝染色法, 取上述粗酶液 0.25 mL, 加蒸馏水 0.75, 再加 3 mL 考马斯亮蓝 G-250 混匀, 静置 10 min, 测其 595 nm OD 值。

2 结果与分析

2.1 菌丝体生长情况

5 种菌除 M7 与 M2 的生长情况基本相同外, 其它

的均不同。10 #在培养到第 2 天时, 培养液变得较粘稠并出现少许菌片, 第 4 天时培养液较清并出现大量菌块, 第 5 天时培养液变清, 菌块已团成菌团。而其它几种菌的菌丝片的出现及菌丝成团均迟于 10 #, 依次为 10 #> M8> M7=M2> M1。

表 1 羊肚菌菌丝体生长情况

时间/d	菌种				
	M1	M2	M7	M8	10 #
1	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊
2	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液粘稠 有少量菌丝片
3	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液浑浊	培养液粘稠 有少量菌丝片	培养液粘稠 菌丝片增多
4	培养液浑浊	培养液粘稠 有极少量菌 丝片	培养液粘稠 有少量菌丝片	培养液较透明 菌丝片增多	培养液渐变清 有大量菌块
5	培养液粘稠 有极少量 菌丝片	培养液粘稠 有少量菌丝片	培养液渐变清 有少量菌块	培养液较透明 有菌团出现	培养液较透明 有菌团出现
6	培养液粘稠 有少量菌丝片	培养液较透明 有大量菌块	培养液较透明 菌块增多	培养液透明 出现大菌团	培养液透明 出现大菌团
7	培养液粘稠 有少量菌丝片	培养液较透明 有菌团出现	培养液透明出 有菌团出现	培养液透明 出现菌球	培养液透明 出现菌球

2.2 胞外酶活性变化

2.2.1 羧甲基纤维素酶活性变化 纤维素是一种超分子结构的高分子, 在纤维素酶的作用下能够分解为纤维二糖, 再水解为葡萄糖, 被菌丝吸收。纤维素酶活性对食用菌增产潜力有重要影响作用^[5]。羊肚菌可分解基质中的纤维素来满足其繁殖所需要的营养。图 1 可知 5 个菌株纤维素酶活性都于培养的第 2 天出现峰值, 其中 M8、10 #菌株酶活力最高且接近, M2、M7 菌株酶活力次之且接近, M1 菌株最低。随后(除 M1 外)迅速下降, 于第 6 天 M8、10 #菌株酶活力又出现 1 个小峰。表明 M8、10 #菌株分解纤维素能力最强, M1 菌株最差。这与 5 种菌株快速生长期的出现及其生长情况十分吻合。第 6 天, M8、10 #菌株纤维素酶酶活力又出现 1 个小峰, 极有可能是在培养过程中, 有另一种纤维素酶产生^[7]。

2.2.2 淀粉酶活性变化 由图 2 可知, 在整个培养过程中, M2、M7、M8、10 #菌株淀粉酶活性高峰均在培养的第 2 天出现而 M1 出现在第 3 天, 此时 M2、M7 菌株淀粉酶活性已降至与 M1 接近, 而 M8、10 #菌株淀粉酶活性虽有降低但还远高于 M1 菌株。在培养的第 4 天, 5 种菌株淀粉酶活性降至低谷随后(第 6 天)又略有升高。说明 M8、10 #菌株分解淀粉能力最强, M1 菌株最差。淀粉酶活性变化与菌丝体快速生长期的出现及其生长情况一致。这与韩建荣^[9]报道的不同羊肚菌菌株在降解淀粉能力上存在显著差异相吻合, 至于可否将测定羊肚菌的淀粉酶活性作为鉴定羊肚菌属不同种的一项指标或特征以及为何在第 6 天淀粉酶活性又出现 1 个小峰, 有待于进一步探讨。

2.2.3 蛋白酶活性变化 从蛋白酶活性测定结果(图3)可看出,5种菌株蛋白酶活性从培养开始相继出现高峰,即M7于第2天,M2、M8、10#于第3天,M1于第4天,且M7于第5天、M8、10#于第6天蛋白酶又出现1个活性高峰且M8、10#活性较第1次高。蛋白酶通常认为是在培养料中氮源有限的情况下,为了获得蛋白质中的氮素而产生的。在菌丝生长过程中,一般是氮源先于碳源用完,而胞外蛋白酶是在这些用完氮素的菌丝体

中被大量诱导出来的^[8];但是除了M7蛋白酶活性出现2个峰且第1个峰与羧甲基纤维素酶与淀粉酶活性高峰出现时间相同外,其它均出现1个蛋白酶活性高峰且均迟于羧甲基纤维素酶与淀粉酶活性,特别是M8、10#菌株在第6天才表现出高活性,表明M1、M2、M7、M8、10#在利用碳源、氮源的时间与能力方面有显著差异。

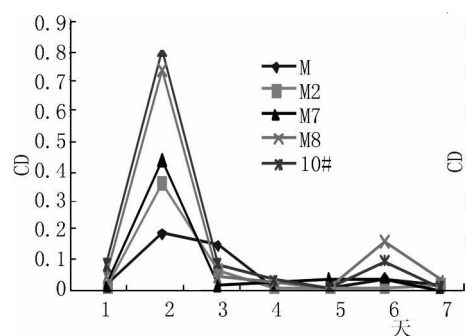


图1 羧甲基纤维素酶活性变化曲线

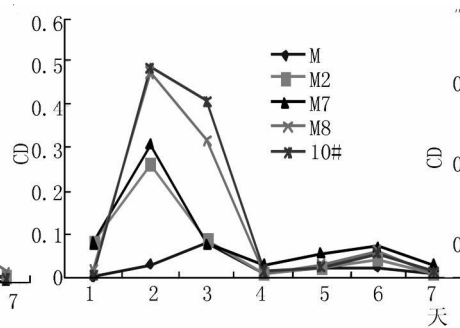


图2 淀粉酶活性变化曲线

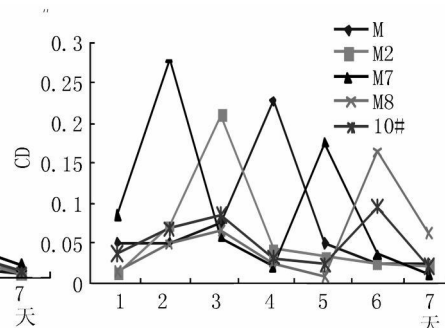


图3 蛋白酶活性变化曲线

2.2.4 愈创木酚酶与漆酶活性变化 由图4可知,除M8外,其它几种菌株在不同时间段愈创木酚酶均有一定的活性,且随培养时间而变化。M2分别在第4、6天出现2个峰值,M7在第2天出现峰值,M1、10#在第4天出现峰值且随后降低。漆酶活性测定结果见图5,除M1外,其余4菌种在培养的第2天漆酶活性就出现峰值,活性大小依次为M8、10#、M7及M2,在随后的几天里M8、M2及10#又先后出现1个小峰值,M7基本下降至某一水平几乎不变。M1在第3天出现一个小峰值随后活性降至很低水平。虽然M8几乎没有愈创木酚酶活性但其漆酶活性峰值很高且出现较早,综合评价愈创木酚酶与漆酶活性整体活性其大小应依次为10#、M8、M7、M2及M1。而愈创木酚酶与漆酶是与木质素等大分子物质降解有关的主要酚氧化酶,它能加速木质素芳香族高分子化合物的分解,为菌丝提供丰富营养,胞外愈创木酚酶与漆酶活性越高,菌株分解木质素能力就越

强。由此推测这5种菌株分解木质素能力的强弱应依次为其10#、M8、M7、M2及M1,这也与其生长情况相符合,其原因可能是由于愈创木酚酶与漆酶活性强,底物分解快,菌丝生长速度加快,缩短了培养时间。因此栽培这5种菌株时,培养基中除其它物质质量有所不同外,木质素的添加量也要注意区别。

2.2.5 糖含量变化 由图6可知,M8、10#、M7及M2菌丝体在培养至第2天时糖含量均出现峰值且随后又逐渐降低,在第5、6天程度不等的又出现1个小峰值。而M1菌丝体在整个培养过程糖含量变化较小。在前2天糖含量高,这可能是从第2天起菌丝体分泌大量羧甲基纤维素酶、淀粉酶将培养基中的纤维素、淀粉类物质分解成糖的速度远远大于菌丝体此时快速生长所需碳源,即培养基中糖的形成远远超过糖的消耗,从而使培养基中的糖在第2天迅速升高,而随后糖含量迅速下降,可能是菌丝体此时快速生长所需碳源所致,这与

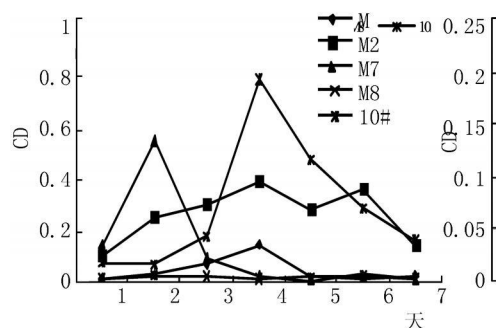


图4 愈创木酚酶活性变化曲线

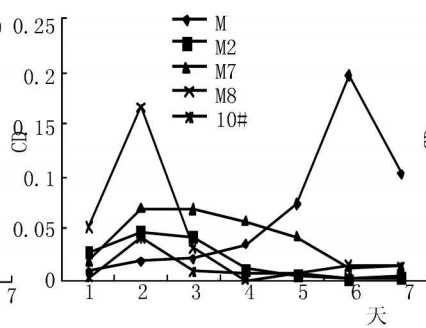


图5 漆酶活性变化曲线

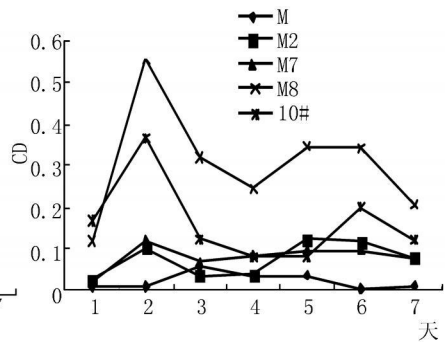


图6 糖含量变化曲线

M8、10 #、M7 及 M2 菌丝体生长情况是相符合的。在第 5、6 天糖含量又有所上升, 这是由于菌丝体生长基本成型而变缓, 同时由于愈创木酚酶与漆酶酶活性出现高峰所引起的, 随后由于相关与糖形成的酶活性相继下降, 所生成的糖小于菌丝体生长消耗所引起。由此可见, 还原糖含量与胞外多糖类水解酶的关系十分密切。

2.2.6 蛋白质含量变化 由图 7 可知, 培养基中蛋白质含量在培养的第 2 天都有所提高且 M8、10 #、M7 及 M2 出现峰值而 M1 则在第 3 天出现峰值。这几乎与羧甲基纤维素酶及淀粉酶活性出现峰值处在同一时间段, 由此推测发酵液中的蛋白质主要为酶蛋白(如羧甲基纤维素酶及淀粉酶), 所以蛋白含量的变化也基本上反应了总酶活力的变化, 其含量一般随酶活力升高而增大。而 M7 在第 5 天出现 1 个高值, 可能是由于其产生的蛋白酶还是有新的酶蛋白或非酶蛋白生成所致, 有待于进一步探讨。

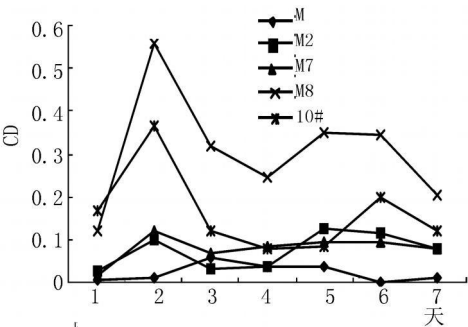


图 7 蛋白质含量变化曲线

3 结论与讨论

从糖含量变化, 纤维素酶与淀粉酶的活性高低及其活性高峰期出现的时间, 并结合菌丝体生长情况看, 羊肚菌的生长与纤维素酶、淀粉酶的活性及其分泌高峰期

有一定的相关性, 即纤维素酶、淀粉酶的活性大菌丝体生长快, 酶的活性高峰期出现早, 可缩短菌丝体生长发育过程, 同时增强其对营养物质的摄取能力, 可抑制其它杂菌的生长。因此在羊肚菌栽培时如何提高纤维素酶、淀粉酶的活性及加速其酶活高峰期较早的出现, 有利于菌丝体的迅速形成。

该研究表明, M8、10 #羊肚菌菌丝体具有生长最好, 能在短时间内形成菌球, 且所产酶类对培养基营养物质分解能力强、利用率高等优点, 可作为栽培菌种进一步培养开发利用。5 种菌株中, 除 M8、10 #羊肚菌外其它 3 种生长情况较差, 相应的酶活性也较低, 特别是 M1, 5 种酶除蛋白酶在第 4 天、漆酶在第 6 天表现出较强活性外, 其它酶活均处于活性极地水平, 说明 M8、10 #羊肚菌菌丝体较适合在该培养基中生长, 而适合于 M1、M2、M7 羊肚菌菌丝体生长的培养基有待于进一步筛选。

参考文献

[1] 曹娟云, 任桂梅, 张雪. 羊肚菌液体培养菌丝体产量与培养液 pH 值的关系[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 176-177.

[2] 王宜磊. 金针菇液体培养特征及胞外酶研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 34-35.

[3] 王宜磊, 邓振旭. 糙皮侧耳多糖分解酶和木质素酶活性研究[J]. 食用菌, 1998, 20(5): 7-8.

[4] 胡开辉, 陈体强, 黄志龙. 巴西蘑菇不同菌株胞外酶活性的测定与分析[J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(5): 96-99.

[5] 宋爱荣, 郭立志, 刘作亭等. 七个白色金针菇菌株发酵液中四种胞外酶活性的测定与分析[J]. 中国食用菌, 2000, 18(4): 31-32.

[6] 林加涵, 魏文玲, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 2001.

[7] 俞苓, 刘民胜, 陈有荣. 杏鲍菇液体中胞外酶活性的变化[J]. 食用菌, 2003, 25(1): 7-8.

[8] 郑海歌, 顾向红, S-Pi 对香菇酸性蛋白酶的抑制机理及其促进菇的生化解释[J]. 真菌学报, 1994, 13(3): 223-228.

[9] 韩建荣. 四种羊肚菌在固体发酵条件下的菌丝生物量和降解淀粉作用[J]. 菌物系统, 1998, 17(4): 312-317.

Study on Active Charge of Various Exocellular Enzyme from Five *Morchella esculentas* in Liquid Culture Medium

CHEN Guo-liang, ZHANG Xiang-qian, HE Xiao-long, REN Gui-mei, CHEN Zong-li

(College of Life Science Yan'an University, Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conversation and Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an Shaanxi 716000)

Abstract: Activities variations of five extracellular enzymes, protein content, and sugar content from *Morchella esculenta* by liquid culture were studied. And the relation ship between mycelium growth of *Morchella esculenta* and activities of the enzymes was investigated. The results showed that mycelium growth of different, 10 hyphae into the first group followed by 10 # > M8 > M7 = M2 > M1; The changing trends of activities of the enzymes degrading carbohydrate were similar basically. Activities of all the enzymes showed two peak values during the whole fermentation, and the first peak value is higher than the second one. During the whole culture the three enzymes had activities. And their production peaks were also different. Protein and sugar content change over time and with the enzyme activity-related.

Key words: *Morchella*; mycelium; liquid culture; exocellular enzyme