

壳聚糖对金针菇发酵液中三种胞外酶活性的影响

李 辉

(衡水学院 生物系, 河北 衡水 053000)

摘 要:研究了在金针菇液体培养基中添加 0.0125、0.0083、0.0063、0.005 mg/mL 的壳聚糖对金针菇菌丝体发酵液中羧甲基纤维素酶、漆酶和蛋白酶 3 种胞外酶的影响。结果表明:4 种浓度的壳聚糖对金针菇菌丝体中的羧甲基纤维素酶、漆酶和蛋白酶都有明显的促进作用。其中壳聚糖稀释浓度为 0.0083 mg/mL 的促进作用最明显。

关键词:壳聚糖;金针菇;胞外酶

中图分类号:S 646.1⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0146-02

近年来,有关壳聚糖作为植物生长调节剂应用于食用菌生长发育方面的研究已有报道,但壳聚糖对金针菇液体发酵中胞外酶影响的相关研究报道很少。鉴于此,现就不同浓度的壳聚糖对金针菇发酵液中 3 种胞外酶的影响进行研究,目的在于寻找一种可提高金针菇品质的生长调节剂,为工厂化生产提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种:白雪金针由中国农业大学食用菌研究室提供;供试壳聚糖:壳聚糖(80 目 $\text{DAC} \geq 85\%$)由济南海得贝海洋生物工程有限公司生产。供试培养基:斜面培养基:PDA 培养基^[1]。液体培养基:葡萄糖 3%,蛋白胨 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.15%, VB_1 0.01%,pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 壳聚糖溶液的制备 取 0.5 g 的壳聚糖,用 0.5 mol/L HCl 进行溶解,并不断搅拌,直到壳聚糖完全溶解,再用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 5.5~6.0,最后定容至 100 mL,得到 0.5%的壳聚糖溶液。

1.2.2 液体摇瓶的制备 分别取一定体积的壳聚糖溶液,加入到 250 mL 三角瓶装有 100 mL 液体发酵培养基中,使三角瓶中壳聚糖的浓度分别为 0.0125、0.0083、0.0063、0.005 mg/mL,以不添加壳聚糖的液体培养基作为对照组,每个试验组设 4 次重复,共做 3 次。然后取平板活化菌种,分别定量接种到上述液体培养基中,接种量为 10%,于 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$,150 r/min 培养 10 d。

1.2.3 指标测定 发酵液中羧甲基纤维素(CMC)酶活性测定:取 2.0 mL 10 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液为底物,在 50°C 水浴锅中加热 2~3 min,再加入

0.1 mL 发酵液,在 50°C 下保温 30 min,取出用 3,5-二硝基水杨酸法测定羧甲基纤维素(CMC)酶的活性^[2],在 550 nm 处测 OD 值。同时以 0.1 mL 煮沸的发酵液作空白对照。发酵液中羧甲基纤维素酶活性单位定义为 $1 \text{ U} = 1 \text{ mg 葡萄糖} \cdot (30 \text{ min})^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。发酵液中漆酶活性测定^[3]:取 0.5 mL、13.36 mM 的联苯胺作为底物,加入 3.4 mL、0.1 M、pH 4.6 的 HAC 缓冲液^[4],加入 0.1 mL 发酵液,于 28°C 下反应 30 min,在 600 nm 处测 OD 值。同时以 0.1 mL 煮沸的发酵液作空白对照。发酵液中漆酶活性单位定义为 $1 \text{ U} = \Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[5]。发酵液中蛋白酶活性测定:用 Worthington 法测定蛋白酶活性^[5]。称取 50.0 mg 底物放入试管,用移液管添加 4.9 mL Tris 缓冲液,混合,置于水浴中调温至 37°C 。添加 0.1 mL 稀释过的发酵液,摇动,并按动秒表。在 20 min 保温过程中定时摇动试管。添加 0.5 mL 三氯醋酸溶液后使反应终止,过滤此混合液。用分光光度计于 280 nm 处以空白值为参比测定吸光度,(1 cm 比色皿)。空白值方面的试液包括:4.9 mL Tris 缓冲液,0.1 mL 稀释过的发酵液和 0.50 mL 三氯醋酸溶液。发酵液中蛋白酶活性单位定义为 $1 \text{ U} = 1 \text{ mg 酪蛋白} \cdot (15 \text{ min})^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的壳聚糖培养液中羧甲基纤维素酶活性的变化

由图 1 可知,不同浓度的壳聚糖对羧甲基纤维素酶活性的变化有明显的促进作用。培养初期,培养液中的羧甲基纤维素酶活性都较低,第 4 天后,相比较可得,壳聚糖浓度为 0.0083 mg/mL 的培养液中羧甲基纤维素酶活力增加得最快,到第 6 天,其羧甲基纤维素酶活力达到峰值,随后其酶活力逐渐下降。当培养液中的还原糖被消耗尽时,金针菇必须分解、利用其它的碳源来提供能量^[6]。金针菇能利用其自身分泌的羧甲基纤维素酶来分解纤维素成可利用的还原糖,纤维素是一种多糖,植物体中多含有这种物质。可见,羧甲基

作者简介:李辉(1984-),女,河北衡水人,硕士,现主要从事微生物研究工作。

收稿日期:2011-08-31

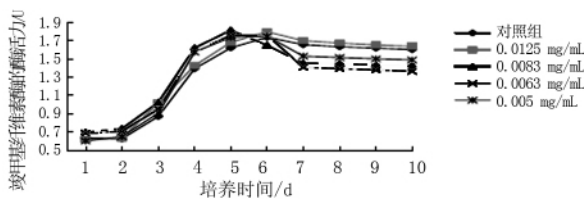


图1 不同浓度的壳聚糖培养液中羧甲基纤维素酶活力变化

纤维素酶活性的强弱可反映菌株生长的快慢^[7]。

2.2 不同浓度的壳聚糖培养液中漆酶活性的变化

由图2可以看出,不同浓度的壳聚糖对漆酶活性的变化有明显的影响。培养初期,漆酶活性比较低,且增长缓慢,几乎没有变化,壳聚糖浓度为0.0083 mg/mL的培养液中漆酶活力增加的较快,到第8天,其漆酶活力达到峰值,随后其酶活力缓慢下降。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶,能够催化氧化木质素,木质素是一种高度复杂的由苯丙烷为基本结构单元构成的芳香族高分子化合物,其降解的产物可为金针菇菌丝体的生长提供所需的营养^[4]。发酵液中漆酶活性越高,表明菌株的分解能力越强,菌丝体的生长越旺盛。因此漆酶活性可作为反映金针菇菌丝体细胞活性的指标^[6]。此外漆酶代谢产生的醌类物质的积累,还可增强菌种的抗病能力,抑制杂菌的生长^[7]。由于该试验所制培养基中未加入木质素类物质,故漆酶活性变化不明显。

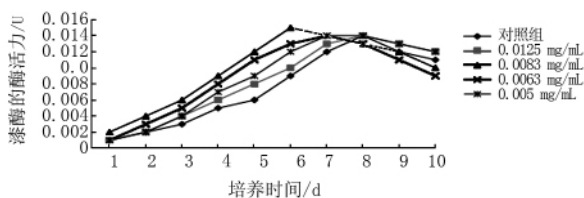


图2 不同浓度的壳聚糖培养液中漆酶活力的变化

2.3 不同浓度的壳聚糖培养液中蛋白酶活性的变化

由图3可知,不同浓度的壳聚糖对蛋白酶活性的变化有明显的影响。在培养过程中,蛋白酶的活性变化很小,增长趋势平缓。这说明金针菇菌丝体生长过

程中对氮源的需求量较低。但不同浓度的壳聚糖对蛋白酶活性的影响较明显。其中壳聚糖浓度为0.0083 mg/mL的培养液中蛋白酶活性的增长趋势比其它浓度壳聚糖培养液中的蛋白酶活性明显。蛋白酶是菌丝体在缺乏可利用氮源条件下自身合成和分泌的一种酶类,可把大分子的蛋白质分解成小分子的多肽或游离的氨基酸,为菌丝体的生长提供可利用的氮源^[5]。

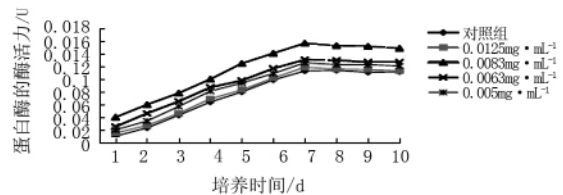


图3 不同壳聚糖浓度的培养液中蛋白酶活力的变化

3 结论

该试验表明,壳聚糖可提高金针菇的品质。4种浓度的壳聚糖对金针菇菌丝体中的羧甲基纤维素酶、漆酶和蛋白酶都有明显的促进作用。其中壳聚糖稀释浓度为0.0083 mg/mL的促进作用最明显。通过对金针菇液体培养过程中的3种胞外酶的测定,可为金针菇高品质工业化生产提供比较可靠的技术参数。

参考文献

- [1] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:6.
- [2] 顾赛红,赵志辉,陈海燕,等.底物和酶液稀释对黑曲霉纤维素酶活性测定的影响[J].中国饲料,2006(7):9-12.
- [3] 李碧芳,刘素兰,杨晓晖,等.联苯胺法检测大便隐血试剂的改进[J].川北医学院学报,2000,12,15(4):1.
- [4] 朱启忠,王宜磊.毛栓菌胞外漆酶的纯化及部分性质研究[J].生物技术,1999,10(2):11-14.
- [5] 秦俊哲,魏颖杰,陈合,等.金针菇液体菌种培养过程监测指标的研究[J].食用菌学报,2003,10(1):12-16.
- [6] 李蕤,吴克,骆军,等.金针菇固体培养几种胞外酶活力变化的研究[J].中国食用菌,2001,21(1):12-14.
- [7] 王宜磊.金针菇液体培养特性及胞外酶研究[J].微生物学杂志,2002,22(1):34-36.

Effects of Chitosan on Three Extracellular Enzymes of *Flammulina velutipes* Fermented Liquid

LI Hui

(Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: The effects of adding 0.0125, 0.0083, 0.0063, 0.005 mg/mL chitosan to the liquid medium of *Flammulina velutipes* on carboxymethyl cellulase, laccase, protease of *Flammulina velutipes* fermented liquid were studied. The results showed that four concentration of chitosan all had marked effects to the activity of three extracellular enzymes, and the effect of the chitosan concentration 0.0083 mg/mL was the most obvious.

Key words: chitosan; chitosan; *Flammulina velutipes*; extracellular enzyme