

棘托竹荪深层发酵胞外酶活性的研究

李 仲 芳, 李 冬 琳

(乐山师范学院, 峨眉山生物多样性保护与利用研究所, 四川 乐山 614000)

摘 要:以棘托竹荪菌株为试材,采用液体培养的方法研究棘托竹荪深层发酵过程中 6 种胞外酶的酶活性变化,并对菌丝生物量进行了测定。结果表明:酶活性与菌丝生物量增长有密切关系。菌丝生物量增加呈“S”曲线,第 4~6 天增长最快。棘托竹荪菌丝生物量达到最大值之前,羧甲基纤维素酶和淀粉酶活性出现峰值。过氧化物酶、漆酶、多酚氧化酶和蛋白酶的活性与菌丝生物量同步增加。说明发酵过程中棘托竹荪菌丝首先分解利用淀粉和纤维素,然后利用木质素和蛋白质作为碳源和氮源。要提高棘托竹荪深层发酵效率,缩短培养周期,就必须在其菌丝达到最大生物量之前保证碳源和氮源的均衡供给。可根据不同酶的分泌高峰期,确定菌丝的营养利用情况和发酵周期,以收获最大菌丝生物量。

关键词:棘托竹荪; 菌丝; 胞外酶

中图分类号: S 646.8 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)09-0197-05

棘托竹荪 (*Dictyophora echinovolvata*) 属担子菌亚

门腹菌纲鬼笔科竹荪属,是一种名贵的食药两用真菌,不仅香气浓郁,脆嫩爽口,还有降血脂、降胆固醇、延缓食品腐败等功效,主要分布于四川、湖南、贵州等南方地区^[1]。在自然条件下其生长发育所利用的主要原料是腐竹、腐木等不溶于水或难溶于水的纤维素、半纤维素、木质素等高分子物质,这些物质必须被竹荪产生的胞外酶降解才能吸收利用。所以,在竹荪人工培养过程中可

第一作者简介:李仲芳(1963-),女,教授,硕士生导师,现主要从事园艺方面的研究工作。E-mail: fangming9039@126.com
基金项目:乐山市科技重点研究计划资助项目(09N2D007)
收稿日期:2011-03-14

[8] 邓建军, 毕阳, 谢东锋, 等. 草酸处理对厚皮甜瓜采后病害及果实品质的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2008(1): 82-86.
[9] 张中海, 饶景萍, 李玲玲. 草酸对猕猴桃果锈清洗与贮藏效应的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006(7): 101-105.
[10] 曾长立, 张萍. 不同保鲜剂对非洲菊切花保鲜效果的研究[J]. 江汉大学学报, 2004(3): 66-69.

[11] 蔡英卿. 保鲜剂延缓非洲菊切花衰老的生理作用[J]. 泉州师范学院学报, 2001(6):
[12] Mutui T M, Emongor V E, Hutchinson M J. The effects of gibberellin₄₊₇ on the vase life and flower quality of *Alstroemeria* cut flowers[J]. Plant Growth Regulation, 2006, 48: 207-214.

Effect of Oxalic Acid on the Vase Life of *Gerbera jamesonii* Bolus Cut Flower

ZHANG Lin-qing

(Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223003)

Abstract: Taking stalk of *Gerbera jamesonii* Bolus cut flower as test materials, the effect of different concentrations of oxalic acid preservatives on the vase life and flowering quality of *Gerbera jamesonii* Bolus cut flowers were studied. The results showed that adding the concentrations of oxalic acid with 50 mg/L improved the flower diameter of *Gerbera jamesonii* Bolus cut flowers effectively, and delays the flower diameter to be max, maintains the water balance of cut flower. Meanwhile, it delays the decreasing of soluble carbohydrate content and soluble protein concentrations, inhibits the increasing of MDA content, and thus increased the vase life and postharvest quality of *Gerbera jamesonii* Bolus cut flowers.

Key words: oxalic acid; *Gerbera jamesonii* Bolus; vase life; preservation

向培养基中分泌多种胞外酶^[2], 胞外酶活性大小与食用菌种类、生长发育状态和培养基质等因素密切相关。

目前, 对于竹荪的研究大多集中在竹荪液体发酵所需的 C、N 源、无机盐等营养条件和理化条件的探索及多糖提取方面^[3,5], 其中对培养产物的抑菌作用也有研究报道^[6]。与香菇、侧耳等相比, 竹荪的液体发酵培养相对较难, 对竹荪液体发酵过程生理生化方面的基础研究较少, 尚未见到对竹荪液体培养胞外酶活性变化规律的研究。

现采用摇瓶对棘托竹荪进行深层发酵培养, 研究培养过程中羧甲基纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、漆酶、多酚氧化酶、过氧化物酶的活性大小和动态变化规律, 及其与竹荪菌丝体生物量的关系, 为提高竹荪深层液体发酵效率, 缩短培养周期提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 棘托竹荪菌株从四川绵阳食用菌研究所引进。

1.1.2 培养基 活化培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基; 种子培养基: 竹屑(过 40 目筛) 97%、白糖 1.2%、 K_2HPO_4 0.2%、 $MgSO_4$ 0.1%、石膏粉 1.5%、含水量 55%~60%, pH 自然; 深层发酵培养基: 葡萄糖 20 g、玉米粉(过 100 目筛) 30 g、 KH_2PO_4 2 g、 $MgSO_4$ 1 g、VB₁ 10 mg、水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 母种活化培养 将棘托竹荪菌接种于活化培养基试管斜面上, 28℃恒温黑暗培养 8 d, 菌丝长满培养基表面后待用。

1.2.2 种子培养基制作 将种子培养基按配方配制, 装入 250 mL 三角瓶至 2/3 处, 高压灭菌后接种已活化的竹荪母种, 长满三角瓶待用。

1.2.3 深层发酵培养 按发酵培养基配方配制液体培养基, 注入 250 mL 的三角烧瓶, 每瓶装 100 mL, 高压灭菌后, 将长满菌丝的种子培养基挖块, 充分压细碎, 每个培养瓶接种 1 小勺(约 10 mg), 接种后摇匀, 在 28℃恒温黑暗静置培养 24 h 后, 置摇床 28℃恒温黑暗培养, 振荡频率为 140 r/min。深层培养过程中, 每天测定菌丝体干重和菌球直径、发酵液 pH 值, 每 12 h 做相关酶活性测定。菌丝体干重的测定, 即每天随机抽取 1 瓶将菌丝体过滤, 清水洗涤数次, 80℃烘干至恒重, 称量; 菌球直径测定^[8], 培养第 1~2 天每天从摇瓶中吸取发酵液, 用测微

尺随机测定 1 个视野的菌球大小, 求平均值。从第 3 天开始随机抽取发酵液中 10 个菌球, 在培养皿中排成一行, 测总长度, 求平均值。

1.3 酶活性的测定

每 12 h, 取发酵液 10 mL, 4℃, 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液, 即为粗酶液。

1.3.1 淀粉酶活性测定^[7] 向试管中加入 0.5% 的可溶性淀粉溶液 0.5 mL, 样品管加粗酶液 0.5 mL, 混匀, 38℃恒温水浴保温 30 min, 取出立即加入 DNS 试剂 0.75 mL(对照管加入 DNS 后再加入 0.5 mL 酶液), 沸水浴 5 min, 取出立即冷却, 加蒸馏水 10 mL, 摇匀, 于 520 nm 测 OD 值, 依据葡萄糖标准曲线($Y = 406.47X + 13.58$, $R^2 = 0.95$)求得还原糖量。每组 3 次重复, 求平均值。定义每 30 min 内底物被水解生成 1 μ g 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.2 羧甲基纤维素酶(CMC 酶)活力测定^[8,9] 向试管中加入 0.5% 的 CMC-Na 溶液 0.8 mL, 样品管加粗酶液 0.2 mL, 50℃恒温水浴保温 30 min, 取出立即加入 DNS 试剂 0.75 mL(对照管加入 DNS 后再加入 0.2 mL 酶液), 沸水浴 5 min, 取出立即冷却, 加蒸馏水 10 mL, 摇匀, 于 520 nm 测 OD 值, 依据葡萄糖标准曲线($Y = 406.47X + 13.587$, $R^2 = 0.95$), 求得还原糖量。每组 3 次重复, 求平均值。定义每 30 min 内 CMC 酶水解生成 1 μ g 葡萄糖的所需的酶量为 1 个酶活力单位(U, $1U = \text{葡萄糖 } 1 \mu\text{g} \cdot (30 \text{ min})^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ 发酵液}$)。

1.3.3 过氧化物酶活性的测定^[10] 向样品管中加入粗酶液 1.0 mL, 对照管中加入煮沸的粗酶液 1.0 mL, 再分别加入过氧化物反应混合液 3.0 mL, 倒入比色皿, 立即开启秒表计时, 测定 470 nm 的 OD 值。以煮沸的酶液作对照, 每组 3 次重复, 求平均值。

1.3.4 多酚氧化酶活力测定^[11] 取 0.5 mL, 10 mM 邻苯二酚作为底物, 加入 pH 6.0 的 0.05 M 磷酸缓冲液 3.4 mL, 加入 0.1 mL 粗酶液, 28℃水浴准确保温 30 min 后, 410 nm 处测 OD 值, 以煮沸的酶液作对照, 每组 3 次重复, 求平均值。

1.3.5 漆酶活性测定^[12] 向试管中加入 3.36 mM 邻联甲苯胺 0.5 mL, pH 4.6 的 0.1 M 乙酸缓冲液 3.0 mL, 样品管中加入粗酶液 0.5 mL, 对照管中加入煮沸的粗酶液 0.5 mL, 28℃恒温水浴保温 30 min, 取出后立即于 600 nm 测 OD 值。每组 3 次重复, 求平均值。过氧化物酶、多酚氧化酶和漆酶活力以每分钟引起 0.001 个 OD 值改

变所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.6 蛋白酶活性的测定 蛋白酶活性的测定参照文献^[10]的方法, Tyr 标准曲线回归方程为: $Y=122.42X-2.1105$, $R^2=0.99$ 。取 4 支试管, 分别加入 1 mL 稀释酶液, 其中 1 支为空白管, 3 支为平行试验管。置入 40℃水浴中预热 3~5 min, 在 3 支平行试管中分别加入 1 mL 2%酪蛋白溶液, 准确计时保温 10 min。立即加入 2 mL 0.4M 三氯乙酸溶液, 摇匀并静置过滤。分别吸取 1 mL 上清液, 加 5 mL 0.4 M 碳酸钠溶液, 最后加入 1 mL Folin-酚试剂, 摇匀, 于 40℃水浴中显色 20 min, 于 660 nm 测 OD 值。对照试管测定方法同上, 在加酪蛋白之前先加 0.4 M 三氯乙酸 2 mL, 使酶失活, 再加入酪蛋白。定义每 10 min 催化蛋白酶水解生成 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(1 U = 酪氨酸 1 μg · (10 min)⁻¹ · mL⁻¹ 发酵液)。

2 结果与分析

2.1 棘托竹荪深层发酵过程生物量的变化

为了解棘托竹荪菌丝体在深层发酵过程中的生长变化情况, 连续测定 7 d 内菌球直径、菌丝体干重及发酵液的 pH 值, 结果见表 1 和图 1。由表 1 和图 1 可看出, 在深层发酵过程中, 棘托竹荪的菌球直径和干重随培养天数的增加而增加, 发酵液的 pH 则随着培养天数的增加而下降。菌丝体的干重增加呈 S 曲线, 表现出典型的适应期、对数增长期和稳定期。在初始培养的 1~3 d 增长缓慢, 4~6 d 快速增长, 7 d 趋于平缓, 但尚未开始衰亡。培养初期菌球表面致密光滑, 后期菌球表面呈星芒状(图 5)。培养后期, 发酵液 pH 值的不断下降对菌丝生物量的增加有抑制作用, 这可能是由于较低的 pH 影响棘托竹荪所分泌各种酶的活性, 加之培养基营养物质消耗而影响了棘托竹荪自身物质的合成, 使得菌丝干重达一定值时不再快速增加。

表 1 深层发酵过程生物量及 pH 的变化

培养天数/d	1	2	3	4	5	6	7
菌球直径/mm	0.35	0.87	2.27	3.46	4.59	5.60	6.12
菌丝体干重/g	0.0282	0.0439	0.1252	0.2641	0.3971	0.4748	0.5145
发酵液 pH	5.6	5.4	5.1	4.7	4.6	4.4	4.3

2.2 CMC 酶和淀粉酶活性变化

纤维素和淀粉都是作为棘托竹荪的碳源的大分子物质。CMC 酶属于纤维素酶系中的一种, 可以将纤维素分解为葡萄糖供菌体利用。同样, 淀粉在淀粉酶等一系列酶的作用下可水解为葡萄糖等小分子物质供菌体利用。在液体发酵过程中 CMC 酶和淀粉酶活性变化与

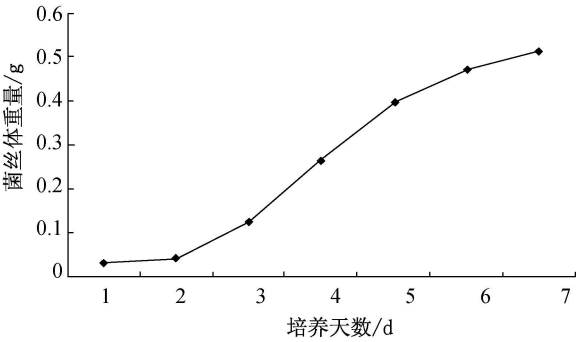


图 1 深层培养过程菌丝生物量的变化

棘托竹荪菌丝生物量的增加密切相关(图 2)。从总体酶活性趋势来看, CMC 酶和淀粉酶活性变化基本一致, CMC 酶活性相对于淀粉酶变化幅度小, 淀粉酶总体活性略高于 CMC 酶。棘托竹荪菌丝生物量的增加随 CMC 酶、淀粉酶的活性增强而增加, 即在生物量达到最大值之前, CMC 酶和淀粉酶的活性出现峰值。培养的 3 d 起活性明显增强, 4 d 时酶活性达到最大, 之后逐渐下降。这说明 CMC 酶和淀粉酶的大量分泌, 将纤维素和淀粉分解为葡萄糖, 为菌丝快速生长提供足够的碳水化合物。

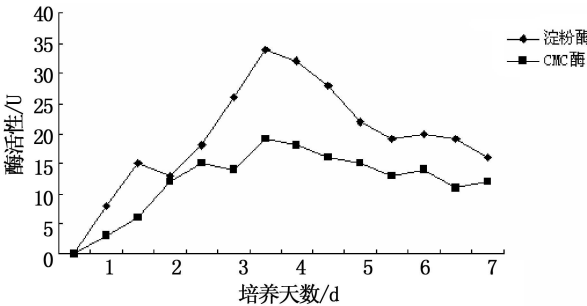


图 2 淀粉酶和 CMC 酶活性与培养天数的关系

2.3 过氧化物酶、漆酶和多酚氧化酶活性变化

过氧化物酶、漆酶、多酚氧化酶是木质素分解酶系的主要成员, 其活性大小可以用来衡量菌株对木质素的降解能力。在棘托竹荪深层发酵过程中, 3 种木质素分解酶的活性变化(图 3)。这 3 种酶的活性变化趋势较为一致, 在培养 2 d 起活性增加明显, 4~6 d 活性很强, 比 CMC 酶和淀粉酶的峰值出现稍晚, 这说明棘托竹荪菌丝首先利用的是淀粉和纤维素作为碳源, 然后才利用木质素。当培养 5~6 d, 淀粉和纤维素已被大量利用, 淀粉酶和 CMC 酶活性下降时, 漆酶等大量形成, 棘托竹荪开始利用液体培养基中的木质素作为碳源。

2.4 蛋白酶活性变化

蛋白酶的作用是分解蛋白质的肽键, 使其分解为小分子的蛋白胨、小肽或氨基酸。当培养基中氮源减少的

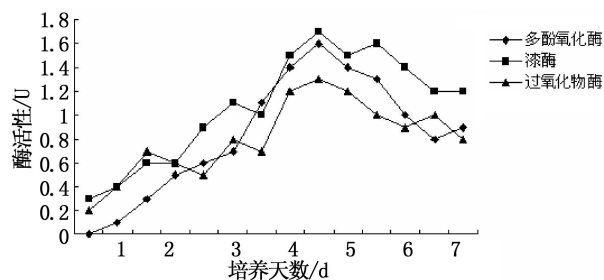


图3 漆酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的活性

情况下,食用菌为获得蛋白质中的氮素而分泌蛋白酶。随着氮源不断减少,蛋白酶会被大量诱导出来,故在菌丝生长阶段蛋白酶活性会呈现逐步升高的趋势^[13]。由图4可知,棘托竹荪在深层发酵培养2 d时就显示出较强活性,随着菌丝生物量的增加逐步增强,5 d时达到最大值,7 d时仍然保持相对较高的水平,这就为菌丝的快速生长提供充足的氮源。

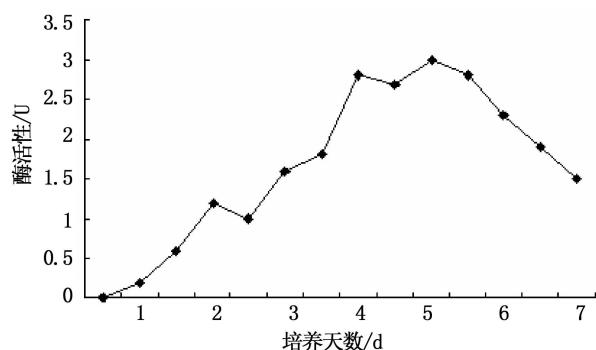


图4 蛋白酶活性与培养天数的关系

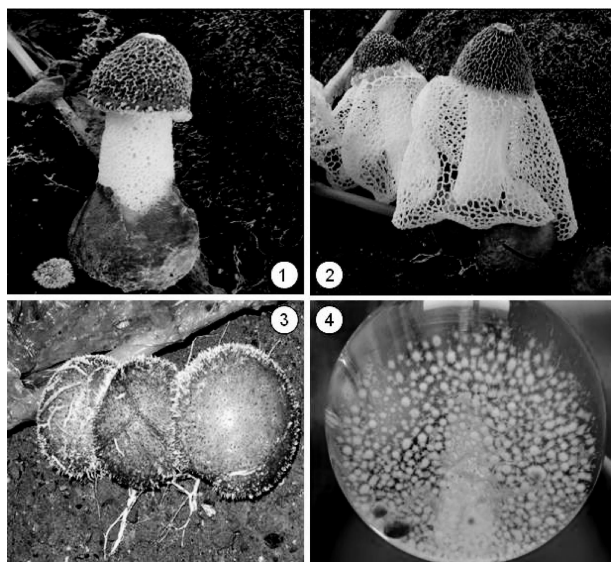


图5 棘托竹荪、深层培养过程

注:①突破菌蕾的棘托竹荪;②已撒裙的棘托竹荪;③棘托竹荪的菌蕾;④深层发酵过程中的棘托竹荪菌丝球

3 结论

棘托竹荪深层发酵过程中,6种胞外酶即羧甲基纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、漆酶、多酚氧化酶、过氧化物酶活性变化与菌丝生物量增长有密切关系。生物量增加呈S曲线,4~6 d时增长最快。棘托竹荪菌丝生物量的增加随CMC酶、淀粉酶的活性增强而增加,在菌丝生物量达到最大值之前,羧甲基纤维素酶和淀粉酶活性出现峰值。过氧化物酶、漆酶、多酚氧化酶和蛋白酶的活性与菌丝生物量同步增加。这说明发酵过程中棘托竹荪菌丝首先分解利用淀粉和纤维素,CMC酶和淀粉酶的大量分泌,将纤维素和淀粉分解为葡萄糖,为菌丝快速生长提供足够的碳源。当培养5~6 d,淀粉酶和CMC酶活性下降时,漆酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和蛋白酶大量形成,棘托竹荪开始利用液体培养基中的木质素和蛋白质作为碳源和氮源。因此,在棘托竹荪深层发酵过程中,要提高棘托竹荪菌丝生物量,就必须在液体培养的4~6 d时菌丝达到最大生物量之前保证碳源和氮源的均衡供给。这样才能提高深层液体发酵效率,缩短培养周期。还可以根据不同酶的分泌高峰期,确定菌丝的营养利用情况和发酵周期,以收获最大菌丝生物量。

4 讨论

试验在棘托竹荪深层培养过程中虽未在液体培养基中加入纤维素、木质素和蛋白质,但均能测出胞外羧甲基纤维素酶、蛋白酶、漆酶、多酚氧化酶、过氧化物酶的活性,这可能是由于液体培养基中添加玉米粉的缘故。

在试验中,培养到7 d时生物量仍持续增加,这可能是由于深层发酵用培养基接种的竹屑菌种分散性好,可以多点萌发,形成的菌球体积小、数量多,众多的菌丝球能增加外围生长区域体积,充分利用培养液中的营养物质,获得更大的菌丝生长量,且菌丝球内部不易积累过多的代谢产物或氧浓度过低而自溶。棘托竹荪深层发酵的最大效率期与发酵终点有待进一步研究。

发酵液的pH值随培养天数的增加而降低,菌丝干重增加减缓,这与竹荪菌丝体在培养过程中酸性代谢产物积累,发酵液中营养物质减少,pH值下降,胞外酶活性下降,培养环境恶化使菌丝体自身异化作用增强有关。

胞外酶是菌丝体在发酵过程分泌到液体培养基中的活性物质,它的变化一定程度上可以表明菌丝体分解利用营养物质的能力大小及其生长状况。羧甲基纤维

素酶、淀粉酶、漆酶、多酚氧化酶、过氧化物酶的活性变化反应棘托竹荪菌丝体对碳源的利用状况。蛋白酶活性的变化可以反应菌丝体对氮源的利用状况。这些酶的活性与棘托竹荪菌株深层发酵的高产性能有关。

该试验初步研究棘托竹荪深层培养胞外酶的活性, 对了解其胞外羧甲基纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、漆酶、多酚氧化酶、过氧化物酶分泌特点、活性大小及动态变化趋势, 推测棘托竹荪在液体培养不同生长发育阶段对培养基中天然木质素、纤维素、淀粉等大分子营养成分的降解动态, 提高深层培养效率有重要的意义。对于液体培养基中的营养物质组成、温度、pH 值等环境条件对棘托竹荪的胞外酶活性的影响有待进一步研究。

参考文献

[1] 袁德培. 竹荪的研究进展[J]. 湖北民族学院学报(医学版) 2006, 23 (4): 39.
[2] 刘祖洞 罗信昌. 食用蕈菌生物技术及应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
[3] 卢惠妮, 潘迎捷, 赵勇, 等. 长裙竹荪和棘托竹荪碳源、氮源、无机盐

的筛选[J]. 中药材, 2010, 33(1): 10-12.
[4] 杜昱光 卜宗式. 竹荪深层培养的理化因子研究[J]. 中国食用菌, 1999, 15(2): 37-39.
[5] 檀东飞 吴若菁. 棘托竹荪菌丝深层培养的研究[J]. 福建师范大学学报, 2002, 18(1): 63-66.
[6] 暴增海 周超, 夏振强, 等. 棘托竹荪发酵液的抑菌作用研究[J]. 北方园艺, 2010(3): 171-173.
[7] 王玉万 王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶的活性变化[J]. 微生物学通报, 1989, 16(3): 137-189.
[8] 张凤芹. 不同糖类对鸡腿菇胞外酶活性及多糖分泌的影响[J]. 食用菌, 1999, 21(4): 9.
[9] Mandels M, Hontz L, Nystrom J, et al. Enzymatic hydrolysis of waste cellulase[J]. Biotechnol Bioeng, 1974, 16: 1471-1493.
[10] 张志良. 植物生理实验指导[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
[11] 李忠光, 龚明. 植物多酚氧化酶活性测定方法的改进[J]. 云南师范大学学报, 2005, 25(1): 44-49.
[12] 潘迎捷, 陈明杰, 郑海歌. 香菇和平菇生长发育中漆酶、酪氨酸酶和纤维素酶活性的变化[J]. 上海农业学报, 1991, 7(2): 21-26.
[13] Lee S Y. Characterization and production of antitumor polysacchari de-form besi diomycetes[J]. Biotech. News, 2005, 3: 399-403.

Study on Extracellular Enzyme Activity from *Dictyophora echino-volvata* Zane during Submerged Fermentation

LI Zhong-fang, LI Dong-lin

(Institute of Biodiversity Conservation and Utilization in Mount Emei, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan 614000)

Abstract : Bacterial strain of *Dictyophora echino-volvata* Zane was used as test material, the activity variation of six extracellular enzymes from *Dictyophora echino-volvata* Zane during submerged fermentation was studied, by the methods of liquid culture, and the biomass of mycelium were determined. The results showed that the enzyme activity was closely related with the mycelium biomass. Increase in mycelum biomass was of ‘S’ curve, and the fastest growth of the mycelium occurred at earlier developmental stage, especially the first 4~6 days. The biomass of mycelium reaches its maximum after the enzyme activity peak of carboxymethyl cellulose enzyme and amylase, whereas the activity of other four enzymes increased simultaneously with that of the mycelial biomass of *D. echino-volvata*. Zana These findings demonstrated that the mycelium deomposed starch and cellulose first during fermentation, then lignin and protein were used as their C and N sources. To promote the fermentation efficiency and the reduction of culture period, sufficient C and N sources will be provided before the maximum biomass of mycelium came out. To achieve the maximum mycelium biomass, nutrition allocation and fermentation cycle of the mycelium should be considered based on the activity peak time of different enzymes.

Key words: *Dictyophora echino-volvata* Zane; mycelium; extracellular enzyme