

DOI:10.11937/bfyy.201602035

七株贵州蜜环菌胞内多糖得率及胞外酶活性研究

黄万兵^{1,2}, 桂阳^{1,2}, 龚光禄^{1,2}, 杨通静^{1,2}, 刘朝贵³, 朱国胜^{1,2}

(1. 贵州省现代中药材研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550006;

3. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要:以 7 株贵州蜜环菌为试材, 采用苯酚-硫酸法测定多糖得率、DNS 法测定蜜环菌发酵液中木聚糖酶和羧甲基纤维素酶的活性、丁香醛连氮测定发酵液中漆酶活性, 研究了不同蜜环菌在发酵过程中漆酶等胞外酶活性变化规律及菌丝胞内多糖提取率。结果表明: 各菌株间多糖得率存在显著差异; 各菌株胞外酶活性变化趋势均是先升后降; 各酶在不同菌株间达到最大酶活的时间、最大酶活性值存在明显差异; 优良菌株 DJ1 第 4 天就能结束发酵, 达到最大酶活时间最短、持续时间长。蜜环菌液体发酵时最早分泌的是 CMC 酶、漆酶, 然后是木聚糖酶, 但起主要作用的是木聚糖酶。

关键词:蜜环菌; 木聚糖酶; 羧甲基纤维素酶(CMC 酶); 漆酶; 胞内多糖

中图分类号:S 646.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0134-05

蜜环菌(*Armillarilla*)属担子菌门、伞菌纲、膨瑚菌科、蜜环菌属, 目前全球共有生物种约 30 种, 中国约 15 种^[1-2]。作为天麻的主要营养源, 蜜环菌是促进天麻生长发育的重要共生真菌, 同时自身又是重要的药食用真菌^[3]。

第一作者简介:黄万兵(1988-), 男, 湖北荆州人, 硕士, 研究实习员, 研究方向为应用微生物。E-mail: huangwb1012@qq.com.

责任作者:朱国胜(1971-), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 现主要从事中药材及食药真菌等研究工作。E-mail: zgsah@163.com.

基金项目:贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金资助项目(黔科合人字(2011)35 号); 贵州省科技计划资助项目(黔科合院所创能(2010)4002); 中央补助地方科技基础条件专项基金资助项目(黔科条中补地(2010)4002); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合中药字[2011]5035 号); 贵州省农业科学院研究生创新基金资助项目(黔农科合(创新基金)2011016 号); 贵州省农业科学院专项资金资助项目(黔农科院院专项[2012]020 号, 黔农科院院专项[2014]035 号); 贵州省农业科学院博士科研启动资助项目(黔农科院人才启动项目[2009]006 号)。

收稿日期:2015-09-24

蜜环菌多糖从其子实体、菌丝体、发酵液中被提取出来, 它是蜜环菌的主要活性成分, 主要包括胞内多糖和胞外多糖。蜜环菌多糖药理作用广, 具有抗辐射、抗眩晕症、促进造血、抑制肿瘤生长、调节免疫等药理作用^[4-5]。蜜环菌的生长与胞外酶活性有着密切关系。蜜环菌为木腐菌, 木材中 90% 的主要成分为半纤维素、纤维素、木质素, 其分泌的胞外酶可降解半纤维素、纤维素、木质素等来满足自身生长繁殖所需的营养^[6-7]。该试验以 7 株贵州蜜环菌为试材, 研究了不同生物种的蜜环菌菌丝体胞内多糖得率, 拟为研究贵州本土蜜环菌的多糖药用价值研究打下基础; 同时研究了贵州蜜环菌发酵液中漆酶等胞外酶活性变化规律, 探索了液体发酵中胞外酶与蜜环菌生长势的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 供试蜜环菌菌株由贵州省现代中药材研究所重点实验室分离保存, 详细信息见表 1。

1.1.2 主要试剂与仪器 木聚糖(Aladdin); 丁香醛连

Abstract: In order to compare the storage characteristics of peach and flat peach, two cultivars of 'Meixiang' and 'Galaxy' were used to analyze the changes of fruit color, flesh firmness, soluble sugar and organic acid content. The results showed that the color change of 2 cultivars had big difference during low temperature storage, the pericarp color of the 'Galaxy' became darker. The fruit firmness of 2 cultivars decreased significantly. The soluble sugar content varied complicatedly among them, the total soluble sugar contents showed little change and the sucrose content decreased significantly. The content of total organic acid and citric acid of 'Meixiang' and 'Galaxy' decreased during the early stage then increased during the late stage.

Keywords: peach; flat peach; fruit quality; low temperature storage

表 1

蜜环菌参试菌株

Table 1

The information of 7 *Armillaria* strains

菌株 Strain	种名 Species name	GenBank 编号 GenBank accession NO.	采集点 Collection site	分离来源 Source
HZ2	<i>Armillaria cepistipes</i>	JN657449	赫章县 Hezhang	菌索 Rhizomorph
SB4	<i>Armillaria cepistipes</i>	JN657449	施秉县 Shibing	菌索 Rhizomorph
DJ1	<i>Armillaria gallica</i>	AJ250054	德江县 Dejiang	菌索 Rhizomorph
LS3	<i>Armillaria gallica</i>	AJ250054	雷山县 Leishan	子实体 Fruit body
KY4	<i>Armillaria mellea</i>	AB510880	开阳县 Kaiyang	子实体 Fruit body
KY5	<i>Armillaria mellea</i>	AB510880	开阳县 Kaiyang	子实体 Fruit body
SY1	<i>Armillaria mellea</i>	AB510880	绥阳县 Suiyang	菌索 Rhizomorph

氮(Sigma-Aldrich);羧甲基纤维素钠(科龙化工);木糖(北京鼎国);DNS试剂;培养箱(天津泰斯特);无菌匀质器(SCIENTZ);恒温摇床(ThermoFisher Max 484P);恒温水浴锅 XMTD-204(上海梅香仪器有限公司);超声波细胞粉碎仪(SCIENTZ-IIID);离心机(ThermoFisher Fresco21);紫外分光光度计(尤尼科 4802)。该试验使用的试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基 固体培养基成分为蛋白胨 2 g,硫酸镁 0.5 g,葡萄糖 20 g,琼脂 7 g, KH_2PO_4 0.46 g, K_2HPO_4 1 g,水 1 000 mL;液体培养基成分为葡萄糖 46 g,无水乙醇 24 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 13 g,硫酸镁 2 g,磷酸二氢钾 1 g,维生素 B_1 0.01 g,维生素 B_2 0.03 g,水 1 000 mL^[8]。其中维生素是在培养基灭菌后(121℃、30 min)冷却至 40~50℃时加入。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备 以不同浓度的葡萄糖溶液与苯酚-硫酸反应,在 490 nm 处测 OD 值、制作葡萄糖标准曲线^[9]。以不同浓度的木糖溶液、葡萄糖溶液与 DNS 试剂反应,在 530 nm 处测 OD 值、制作木糖、葡萄糖标准曲线^[10-11]。

1.2.2 液体菌种的制备 将各蜜环菌母种接入含固体培养基的平皿中,22℃暗培养 15 d 后,切取 0.5 cm 长的菌索尖端 3 块转接入含有 150 mL 液体培养基的容积为 250 mL 的三角瓶。然后 180 r/min、22℃暗培养至菌丝球长满三角瓶(约 15 d)即为一级液体菌种^[12]。取一级液体菌种一瓶于无菌匀质器中,每秒 9 次拍击,匀浆 8 min 后吸取 3 mL 转接入含有 150 mL 液体培养基的容积为 250 mL 的三角瓶。然后 180 r/min、22℃暗培养至菌丝球长满三角瓶(约 7 d)即为二级液体菌种。

1.2.3 菌丝体胞内多糖的提取与测定 抽滤一级液体菌种,并 50℃烘干至恒重,称取各蜜环菌菌丝干粉 1 g 放入 50 mL 离心管中,加 30 mL 蒸馏水混匀,超声破碎(300 Hz,35 min),3 000 r/min 离心 30 min,取上清液。用 80%乙醇沉淀,去上清液,沉淀即为粗多糖^[13]。在每支试管中加蒸馏水至 2 mL,然后加入 1.0 mL 5%苯酚溶液,5.0 mL 浓硫酸,摇匀,置沸水中煮沸 30 min,冷却。在 490 nm 波长下用测其 OD 值,每组设置 3 次重复。

1.2.4 粗酶液的制备 在二级液体菌种摇瓶培养过程中,每天吸取 2 mL 发酵液作为粗酶液。

1.2.5 木聚糖酶活性测定 往具塞刻度试管中加入 1%的木聚糖溶液(用 pH 4.8,0.05 mol/L 柠檬酸盐缓冲液配制) 1.5 mL,加稀释 5 倍的粗酶液 1 mL 混匀,50℃超级水浴准确保温 30 min,取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL,具塞摇匀立即煮沸 10 min,取出,冷却后加入蒸馏水补足 25 mL,轻轻上下摇匀,用 4802 型分光光度计测 530 nm 处的 OD 值。以煮沸灭活的酶液为对照,每组 3 次重复^[14]。

1.2.6 CMC 酶活性测定 往具塞刻度试管中加入 0.5%的羧甲基纤维素钠溶液(用 pH 4.6,0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液配制) 1.5 mL,加稀释 5 倍的粗酶液 0.5 mL 混匀,50℃超级水浴准确保温 30 min,取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL,具塞摇匀立即煮沸 10 min,取出,冷却后加入蒸馏水补足 20 mL,轻轻上下摇匀,用 4802 型分光光度计测 530 nm 处的 OD 值。以煮沸灭活的酶液为对照,每组 3 次重复^[15-16]。

1.2.7 漆酶活性测定 取 0.5 mmol/L 丁香醛连氮 100 μL 放入 2 mL 离心管,加入酶液 50 μL 和 1.5 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液混匀,25℃恒温水浴 5 min 后立即冰浴终止反应,用 4802 型分光光度计测 525 nm 处的 OD 值。以煮沸灭活的酶液为对照,每组 3 次重复^[17]。

1.2.8 酶活性计算 在特定条件下,1 min 内转化 1 μmol 底物,或是转化底物中 1 μmol 相关基团所需的酶量,称为一个国际单位(U)。酶活性以 x 表示,单位为 U/L。木聚糖酶、CMC 酶活性按式(1)计算,漆酶活性按式(2)计算^[18]。

$$x = \frac{m}{M \times V_{\text{酶}} \times t} \times n \quad (1),$$

$$x = \frac{10^6}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}}} \times \frac{\text{OD}}{t} \quad (2).$$

式(1)、(2)中: m 是根据标准曲线方程计算测得 OD 值对应的葡萄糖或木糖的质量,单位为 μg ; M 是葡萄糖或木糖的摩尔质量; $V_{\text{酶}}$ 是反映添加的酶液体积,单位是 L; $V_{\text{总}}$ 为反应总体积,单位是 L; t 是酶反应时间,单位是 min; n 为酶液稀释倍数; ϵ 是丁香醛连氮的摩尔消光系

数, $65\ 000\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; OD 为漆酶吸光度。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 进行整理和计算, 用软件 SPSS 17.0 进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

苯酚-硫酸法测定的葡萄糖标准曲线为 $y = 0.0151x + 0.0028$, $R^2 = 0.9997$ (葡萄糖浓度 $\mu\text{g/mL}$)。DNS 法测定的葡萄糖标准曲线为 $y = 0.0047x + 0.0093$, $R^2 = 0.9997$ (葡萄糖浓度 $\mu\text{g/mL}$)。DNS 法测定的木糖标准曲线为 $y = 0.0012x + 0.0034$, $R^2 = 0.9996$ (木糖浓度 $\mu\text{g/mL}$)。

2.2 多糖得率

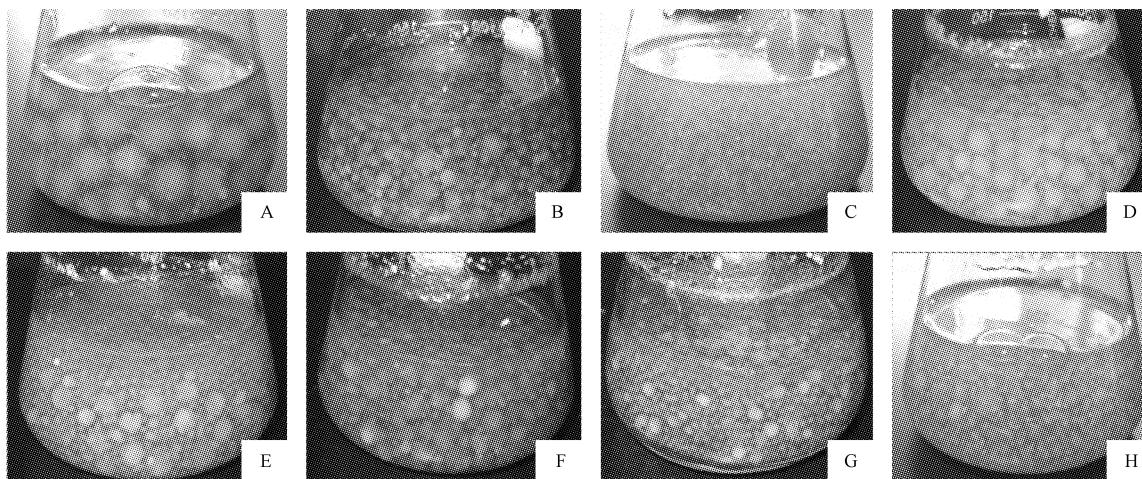
由表 2 可知, 各菌株的多糖提取中, 菌株 KY5 的多

糖提取率明显高于其它菌株, KY4 次之。由于试验设置重复 3 组, 所得数据满足正态分布及方差齐性, 可进行方差分析。除 DJ1 与 SY1, SY1 与 HZ2、LS3 的多糖提取率之间没有显著差异, 其它菌株两两之间均有显著差异。

表 2 菌株的多糖提取

Table 2 The polysaccharide extraction of *Armillaria*

菌株名	含量	提取率	显著性差异(5%)
Strain	Content/g	Extraction rate/%	Significant difference(5%)
SB4	0.0587	5.87	a
DJ1	0.0631	6.31	b
SY1	0.0663	6.63	bc
HZ2	0.0673	6.73	c
LS3	0.0677	6.77	c
KY4	0.0832	8.32	d
KY5	0.0915	9.15	e



注: A、D、E、F、G 是菌株 HZ2、LS3、KY4、KY5、SY1 第 7 天的发酵情况; B 是菌株 SB4 第 8 天的发酵情况; C、H 是菌株 DJ1 第 6 天、第 4 天的发酵情况。

Note: A, D, E, F, G were strain HZ2, LS3, KY4, KY5, SY1 on the seventh day of fermentation. B was strain SB4 on the eighth day of fermentation. C, H were strain DJ1 on the sixth day and the fourth day of fermentation.

图 1 各菌株的发酵终点

Fig. 1 The end point of fermentation about *Armillaria*

2.3 木聚糖酶活性

由图 2 可知, 依据各菌株的发酵情况确定的发酵终点中, 除菌株 SB4、DJ1 在第 8 天、第 6 天结束发酵, 其余均为第 7 天。发酵过程中, 各菌株的木聚糖酶活性均是先升高再下降, 且发酵终点的酶活性远大于发酵第 1 天的酶活性。各菌株的木聚糖酶活性除菌株 SB4 是在第 5 天达到最大值外, 其余菌株均是第 4 天。各菌株的木聚糖酶活性最大值满足正态分布, 可进行菌株间两两比较。其中菌株 SY1 的木聚糖酶活性最高, 其次 HZ2, 二者间没有显著性差异。紧随其后的依次是菌株 LS3、KY4、SB4、KY5、DJ1, 其中 LS3 与 KY4、SB4 与 KY5 没有显著性差异, 其余菌株间均有显著性差异。

2.4 CMC 酶活性

由图 3 可知, 发酵过程中, 各菌株的 CMC 酶活性均

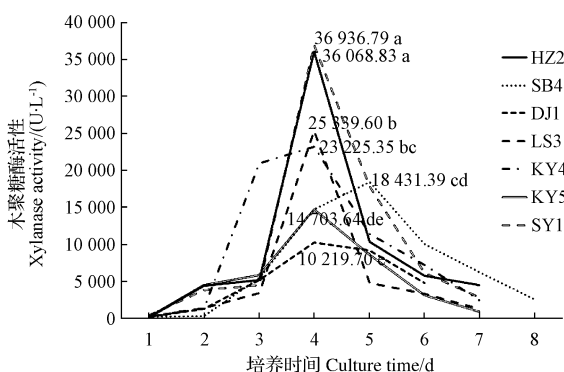
是先升后降, 发酵终点的酶活性除菌株 DJ1、SY1 外, 其余均远低于发酵第 1 天的酶活性。各菌株中 SB4、DJ1、HZ2 的木聚糖酶活性是在第 3 天达到最大值外, 其余菌株均是第 4 天。各菌株的 CMC 酶活性最大值满足正态分布, 可进行菌株间两两比较。其中菌株 LS3 的 CMC 酶活性最高, 其次是 SB4, 二者间没有显著性差异。紧随其后的依次是菌株 DJ1、SY1、KY5、HZ2、KY4, 其中 DJ1、SY1、KY5、HZ2 两两之间没有显著性差异, 其余菌株间均有显著性差异。

2.5 漆酶活性

由图 4 可知, 发酵过程中各菌株的漆酶活性也是先升高再下降, 且发酵终点的酶活性大于发酵第 1 天的酶活。各菌株中 DJ1 的漆酶活性在第 3 天达到最大, LS3 是第 5 天, 其余均是第 4 天。各菌株的漆酶活性最大值

满足正态分布,可进行菌株间两两比较。其中菌株 KY4 的漆酶活性最高。紧随其后的依次是菌株 SY1、KY5、DJ1、LS3、SB4、HZ2,其中 SY1、KY5、DJ1; KY5、DJ1、LS3;

LS3、SB4、HZ2 两两之间没有显著性差异,其余菌株间均有显著性差异。



注:不同小写字母表示 0.05 水平的显著性,数值表示最大酶活。下图同。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level. Numerical value said the biggest enzyme activity. The same as following Figures.

图 2 各菌株发酵过程中木聚糖酶活性均值变化曲线

Fig. 2 The curve represent the change rule of the mean of xylanase activity during the process of *Armillaria* fermentation

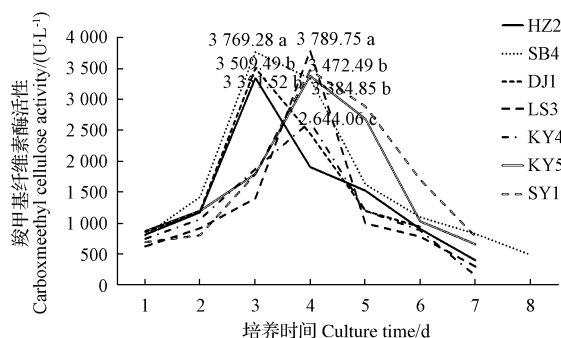


图 3 各菌株发酵过程中 CMC 酶活性均值变化曲线

Fig. 3 The curve represent the change rule of the mean of carboxymethyl cellulose activity during the process of *Armillaria* fermentation

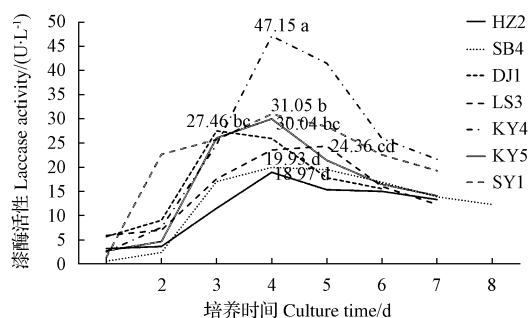


图 4 各菌株发酵过程中漆酶活性均值变化曲线

Fig. 4 The curve represent the change rule of the mean of laccase activity during the process of *Armillaria* fermentation

3 讨论

多糖提取中,各菌株的多糖得率基本都有显著性差异。但依据 ITS 的分子鉴定种属来看,*Armillaria mellea*

的多糖得率普遍较高,*Armillaria gallica* 的多糖得率较低。天麻种植采用的高产蜜环菌多为 *Armillaria gallica*^[19-20],可知在贵州天麻主产区筛选多糖产量较高的蜜环菌基本不可行。但是关于蜜环菌多糖的医疗保健有效成分尚不清楚,至于多糖产量较高的蜜环菌是否药理作用强还需进行下一步研究。

该研究发酵过程中,不同蜜环菌的木聚糖酶、CMC 酶、漆酶的酶活大小在同一时期存在明显差异,木聚糖酶是万位级、CMC 酶是千位级、漆酶是十位级。蜜环菌液体发酵时起主要作用是木聚糖酶,作用最小的是漆酶。漆酶活性小可能与发酵液的成分有关,发酵液中基本不含木质素,只有葡萄糖和蛋白类物质,不能有效的促进漆酶的分泌。从 3 种酶的变化规律来看,蜜环菌液体发酵时最早分泌的是 CMC 酶、漆酶,然后是木聚糖酶,但是木聚糖酶后来居上能短时超过前面 2 种酶。这估计与蜜环菌的自身属性有关,作为一种木腐菌,它的

第一营养物质可能是木质素或是纤维素,其次是半纤维素。液体发酵中,蜜环菌首先分泌的可能是与木质素、纤维素相关的胞外酶,当发酵环境中不存在木质素、纤维素时,它再分泌降解半纤维素的相关酶,并迅速适应环境提高酶分泌量。

液体发酵时,不同蜜环菌的木聚糖酶、CMC 酶、漆酶的酶活最大值基本出现在第 4 天,但最大酶活与蜜环菌的生长速度基本没有相关性。菌株 DJ1 生长速度最快,4 d 就能结束发酵。但在不同蜜环菌的木聚糖酶活最大值中,菌株 DJ1 的最低;CMC 酶活最大值中,菌株 DJ1 排第 3,并与 SY1、KY5、HZ2 均没有显著差异。菌株 SB4 生长速度最慢,需要 8 d 多才能结束发酵,但是其各酶活的最大值在不同菌株中并不是最低的,有些值甚至和最高菌株没有显著差异。蜜环菌的生长速度与最大酶活的持续时间相关,持续时间长的菌株生长快,如菌株 DJ1。其次,蜜环菌的生长速度可能与其自身细胞膜通透性、主动运输能量供应相关。

参考文献

- [1] 孙立夫,张艳华,杨国亭,等.蜜环菌生物种和地理分布概况综述[J].菌物学报,2007,26(2):306-315.
- [2] COETZEE M P A, WINGFIELD B D, BLOOMER P, et al. Biogeography and possible origin of *Armillaria* species[C]. Book of Abstracts of the 7th International Mycological Congress (IMC7), 2002-11-17:112.
- [3] 郭顺星,徐锦堂.蜜环菌的化学成分及应用研究[J].微生物学通报,1996,23(4):239-240.
- [4] 虞磊,沈业寿,缪化春.天麻多糖与蜜环菌多糖抗眩晕症作用研究[J].中国中医药信息杂志,2006,13(8):29.
- [5] 王惠国,冯宝民.蜜环菌多糖免疫调节活性的实验研究[J].陕西科技大学学报(自然科学版),2009,27(2):62-64.
- [6] 焦迎春,余梅,唐达.黄绿蜜环菌液体培养几种胞外酶的测定[J].食用菌,2010(3):6-7.
- [7] 李福后,王伟霞.5 株蜜环菌产几种胞外酶活性比较[J].淮海工学院学报,2006,15(3):58-61.
- [8] 彭述敏,陈玉惠,雷然,等.蜜环菌培养条件的响应面分析优化[J].西南大学学报(自然科学版),2011,33(8):68-73.
- [9] 陈杨琼,伍春莲,侯怡铃,等.松乳菇多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J].西华师范大学学报(自然科学版),2012,33(2):135-138.
- [10] 张捷,黄荣花,张书华.标准曲线法测定茯神中多糖的含量[J].中国药业,2013,22(16):15-16.
- [11] 董国强,张孟白.半纤维素酶的 DNS 液显色法测定[J].浙江农业科学,1989(2):88-89.
- [12] 刘景圣.蜜环菌催眠功能优良菌株筛选和发酵工艺优化研究[D].长春:吉林农业大学,2005.
- [13] 武录平,陈晓平.蜜环菌多糖提取工艺的优选[J].食品科技,2011,36(8):166-169.
- [14] 回晶,赵文静,邹志远,等.金耳液体培养过程中几种胞外酶活性的变化规律[J].食用菌学报,2007,14(3):29-32.
- [15] 段学辉,颜淑芳,高鹤.几株纤维素酶产生菌的分离鉴定及其产酶能力[J].南昌大学学报(工科版),2010,32(2):134-139.
- [16] 余志坚,陈传红,赵晋宇.DNS 法检测食用菌多糖含量条件优化研究[J].江苏农业科学,2012,40(1):259-260.
- [17] 吴涓,李清彪,等.蜜环菌胞外漆酶活力的分光光度法测定[J].厦门大学学报(自然科学版),2001,40(4):893-898.
- [18] 林俊芳,刘志明,陈晓阳,等.真菌漆酶的酶活测定方法评价[J].生物加工过程,2009,7(4):1-8.
- [19] KIM H J. Selection of superior strains of *Armillaria* species for the cultivation of *Gastrodia elata* [J]. FRI Journal of Forest Science, 1997, 56:44-51.
- [20] CHA J Y, IGARASHI T. *Armillaria* species associated with *Gastrodia elata* in Japan [J]. European Journal of Forest Pathology, 1995, 25(6-7):319-326.

Research on Intracellular Polysaccharide Yield and Extracellular Enzyme Activity Change of *Armillarilla* Strains Isolated From Guizhou

HUANG Wanbing^{1,2}, GUI Yang^{1,2}, GONG Guanglu^{1,2}, YANG Tongjing^{1,2}, LIU Chaogui³, ZHU Guosheng^{1,2}

(1. Institute of Morden Chinese Medicinal Materials of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550006; 2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006; 3. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: Taking *Armillarilla* strains isolated from Guizhou as test material, using phenol-sulfuric acid method to determine the content of total polysaccharide, the DNS method and syringaldazine were applied to measure the enzyme activity of xylanase, carboxymethyl cellulose enzyme and laccase, the change rule of extracellular enzyme activity and intracellular polysaccharide yield of different *Armillarilla* hyphae came from liquid fermentation were studied. The results showed that, there were significant differences between polysaccharide yield of different strains. The change rule of the extracellular different enzyme activity were same. They all rose at first and lowered later. The maximum enzyme activity and the time when enzyme activity reach maximum between different strains were also obvious difference. The fine strain DJ1 could end fermentation on the fourth day. Its maximum enzyme activity was always the earliest to appear and at the latest to disappear. When liquid fermentation, *Armillaria* prior secreted CMC enzyme and laccase, then secreted xylanase. But xylanase played a main role.

Keywords: *Armillarilla*; xylanase; CMCase; laccase; intracellular polysaccharide