

假大白菇深层发酵过程中胞外酶活性的变化

王培军^{1,3} 涂作菊², 周白云³, 胡景江³

(1. 太原市园林科研所, 山西 太原 030012; 2. 陕西省紫阳县植保站 725300; 3. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:本文首次对假大白菇深层发酵过程中的5项生理指标与6种胞外酶的活性进行了测定,结果表明,菌丝生物量在第10 d达到最大值;pH值先降后升;胞外还原糖与蛋白质浓度分别于第5 d、第6 d达到峰值;胞外多糖含量在第6 d出现峰值;淀粉酶、CMC酶、纤维素脱脂棉酶与滤纸酶的酶活变化趋势相近;愈创木酚氧化酶与邻苯二酚氧化酶的酶活性很小。

关键词:假大白菇;深层发酵;胞外蛋白质;胞外还原糖;淀粉酶;纤维素酶

中图分类号:S718.81 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2007)01-0026-05

Changes of Extracellular Enzyme Activity During the Submerged Culture of *Russula pseudodelica* Lange

WANG Pei-jun¹, TU Zuo-ju², ZHOU Zi-yun³, HU Jing-jiang³

(1. Landscape Gardening Institute of Taiyuan, Taiyuan, Shanxi 030012, China; 2. Plant Protecting Station of Ziyang, Shaanxi 725300, China; 3. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Dynamic variations of 5 physiological indices and activities of 6 kinds of extracellular enzymes during the submerged culture of *Russula pseudodelica* Lange. were investigated. The results showed that the maximum of hypha growth was $6.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, appeared in the 10th day; pH of fluid medium decreased, then increased; the peak times of extracellular protein and deoxioized saccharide were in the 5th day, the 6th day; extracellular polysaccharide appeared its maximum in the 6th day; dynamic variation of diastase, CMC enzyme, ellulose during the submerged culture were quite similar; the activities of guaiacol oxidase and polyphenol oxidase were very low during the submerged culture.

Key words: *Russula pseudodelica* Lange; submerged culture; extracellular protein; extracellular deoxioized saccharide; cellulase

假大白菇(*Russula pseudodelica* Lange)又叫假美味红菇,属红菇科红菇属,属树木的外生菌根菌,其子实体中等较大,菌盖直径6.5~14 cm之间,菌盖半球形且中部下凹,后变为漏斗形。假大白菇可以食用,有研究表明它含有抗癌物质,对小白鼠肉瘤180和艾氏癌的抑制率均为80%^[1,2]。

假大白菇作为一种有食用药用价值的大型经济真菌,其开发利用方面的研究还处于起步阶段,目前国内外还没有看到有关这方面的报道,本文首次对假大白菇深层发酵过程中的菌丝生物量、胞外蛋白含量、胞外还原糖含量等11项指标进行了连续17 d的定时测定,旨在了解假大白菇液体培养过程中的各种生理生化指标的动态变化,为假大白菇的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

假大白菇菌种:本校实验室保藏菌种。

母种培养基:葡萄糖20 g、蛋白胨2 g、琼脂20 g、磷酸氢二钾1 g、磷酸二氢钾0.5 g、硫酸镁0.5 g、维生素B1 0.5 mg、水1 000 mL, pH值6.5。

液体培养基(查氏培养基):硝酸钠2 g、磷酸氢二钾1 g、氯化钾0.5 g、硫酸镁0.5 g、硫酸亚铁0.01 g、蔗糖30 g、水1 000 mL, pH值自然。

1.2 培养方法

1.2.1 菌种的纯化 将经过表面消毒的假大白菇子实体用解剖刀从菌盖中部纵切一刀,切取一小块组织,移接到斜面培养基上,加上棉塞,置恒温培养

箱内,25℃培养,数天后可见组织块上长出绒毛状菌丝。待菌丝长满斜面后,可扩大培养,即得斜面母种,将斜面母种放置4℃冰箱保存待用。

1.2.2 种子培养 将配制好的液体培养基分装与250 mL的三角瓶中,每瓶75 mL,灭菌冷却后接经过活化的斜面母种(0.5 cm×0.5 cm)3片,25℃下,100 r·min⁻¹转速恒温摇床振荡培养一周。

1.2.3 液体培养 250 mL三角瓶装液体培养基100 mL,接入5%的液体菌种(液体种子菌龄7 d),25℃下,100 r·min⁻¹转速恒温摇床振荡培养。

1.3 分析方法

1.3.1 胞外酶粗酶液的制备 每间隔24 h取样一次,3 500 r·min⁻¹离心10 min,取其上清液及为粗酶液。

1.3.2 菌丝体生物量的测定 离心后的菌丝体经蒸馏水冲洗数次后,60℃下干燥至恒重,用分析天平称量。

1.3.3 pH值的测定 采用数字pH仪测定。

1.3.4 胞外蛋白含量的测定^[3] 考马斯蓝染色法,取1 mL粗酶液,加入5 mL考马斯亮蓝溶液,混匀后于595 nm处测OD值,做3个平行,求平均值。以牛血清白蛋白为对照品求蛋白质含量。

1.3.5 胞外还原糖含量测定^[4] 取经适当稀释的粗酶液0.5 mL,加入DNS试剂1.5 mL,于100℃水浴中煮沸10 min,冷却后加蒸馏水3 mL,540 nm处测OD值,以加蒸馏水的处理为对照,每组3个重复,求平均值。

1.3.6 羧甲基纤维素酶(CMC酶)活力测定^[5] 在试管中加入0.5%的羧甲基纤维素钠溶液(用pH4.6,0.1 M醋酸缓冲液配制而成)1.5 mL,再加适当稀释的粗酶液0.5 mL,50℃水浴保温30 min,取出后立即加入DNS试剂1.5 mL,煮沸10 min,取出,冷却后加入蒸馏水3 mL,混匀,分光光度计测540 nm处的OD值;以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。定义1U = 葡萄糖0.01 mg/30 min·mL发酵液。

1.3.7 纤维素滤纸酶活力测定^[5] 在试管中加入pH4.6,0.1 M醋酸缓冲液2 mL,再加入经适当稀释的粗酶液1 mL,在加入一条新华一号滤纸(1×6 cm)后,50℃水浴保温60 min,取出后从反应体系中取0.5 mL,加DNS试剂1.5 mL,于100℃水浴中煮沸10 min,冷却后加蒸馏水3 mL,混匀,540 nm处测定OD值,以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。定义1U = 葡萄糖0.01 mg·h⁻¹·mL⁻¹发酵液。

1.3.8 纤维素脱脂棉酶活力测定^[5] 在试管中加

入pH4.6,0.1 M醋酸缓冲液2 mL,再加入经适当稀释的粗酶液1 mL,在加入脱脂棉0.5 g后,50℃水浴保温60 min,取出后从反应体系中取反应液0.5 mL,加DNS试剂1.5 mL,于100℃水浴中煮沸10 min,冷却后加蒸馏水3 mL,混匀,540 nm处测定OD值,以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。定义1U = 葡萄糖0.01 mg·h⁻¹·mL⁻¹发酵液。

1.3.9 淀粉酶活力测定^[6] 取4 mL 0.5%可溶性淀粉(用pH5.8,0.1 M乙酸盐缓冲液配制)作为底物,加入1 mL经适当稀释的粗酶液,37℃水浴准确保温30 min,取出后从反应体系中取反应液0.5 mL,加DNS试剂1.5 mL,于100℃水浴中煮沸10 min,冷却后加蒸馏水3 mL,混匀,540 nm处测定OD值,以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。定义1U = 葡萄糖0.01 mg/30 min·mL⁻¹发酵液。

1.3.10 愈创木酚酶活力测定^[7] 取0.5 mL 80 mM愈创木酚为底物,加入3.0 mL pH4.6,0.1 M的乙酸盐缓冲溶液,加入0.5 mL经适当稀释的粗酶液,28℃水浴准确保温30 min,465 nm处测OD值,以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。以每分钟光密度值增加0.01定义为一个酶活单位(u)。

1.3.11 多酚氧化酶活力测定^[7] 取0.5 mL,10 mM邻苯二酚作为底物,加入3.4 mL pH6.0,0.05 M的磷酸缓冲溶液,加入0.1 mL粗酶液,28℃水浴准确保温30 min后,400 nm处测OD值,以煮沸灭活15 min的同种酶液作对照,每组3个重复,求平均值。以每分钟光密度值增加0.01定义为一个酶活单位(u)。

1.3.12 胞外多糖的测定^[8] 取离心后的液体培养液50 mL,60℃下浓缩到原体积的20%,加3倍于浓缩液的95%的乙醇,4℃下醇析18 h,沉淀于60℃干燥至恒重,称量。

2 结果与分析

本实验对假大白菇深层发酵过程中的11项指标进行了连续17 d的定时测定,其中菌丝生物量的变化可以直接反映假大白菇在深层发酵过程中的生长状况;胞外蛋白是菌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体胞外总的酶活力的变化;胞外还原糖是由胞外酶分解碳源产生的,它的变化与菌体对碳源的利用情况有关;实验中共选择6种胞外酶,其中淀粉酶为淀粉类物质的生物降解酶,CMC酶、纤维素滤纸酶

和纤维素脱脂棉酶为纤维素的主要生物降解酶,愈创木酚氧化酶、多酚氧化酶为木质素类物质的生物降解酶,这6种酶活性的强弱可以反映菌丝体生长过程中对外部营养的生物利用情况。此外实验中还测定了发酵液 pH 值与胞外多糖的动态变化情况。

2.1 菌丝体生物量的变化

图1为假大白菇在发酵过程中菌丝体生物量的动态变化曲线,由图可以看出,在整个发酵过程的前10 d 菌丝体生物量一直在增加,在第10 d 菌丝生物量达到最大值 $6.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,之后随着深层培养时间的增加菌丝生物量逐渐减小,第14 d 以后菌丝生物量趋于平稳,在 $3.29 \sim 3.54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。

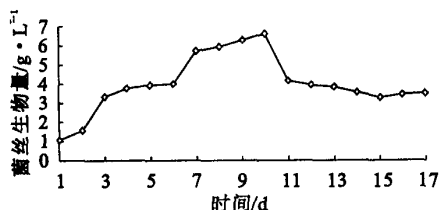


图1 假大白菇菌丝生物量随发酵时间的变化

Fig.1 Hypha growth of *Russula pseudodelica* Lange

万方数据 during the submerged culture

2.2 发酵液 pH 值的变化

从图2可以看出,在发酵开始的第2天,发酵液的 pH 值降低,此后的深层培养过程中发酵液的 pH 值处于一种缓慢上升的过程中,经过第2~9 d 的线形增高,第10 d pH 值略有下降,之后的 pH 值依然保持上升,在深层培养的第16 d,发酵液 pH 值达到最大值9.01,第17 d 又有所下降。从 pH 值的变化曲线可以知道,在深层培养的开始几天菌体向发酵液分泌了酸性物质,使得 pH 值下降,这可能与发酵液中糖类的分解有关。在后来的培养过程中 pH 值一直在上升,这是由于假大白菇菌丝体向发酵液分泌碱性物质的结果。

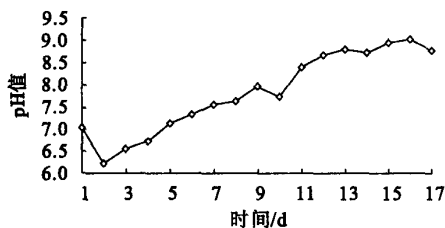


图2 发酵液 pH 值变化

Fig.2 pH of fluid medium

2.3 胞外蛋白质与还原糖浓度的变化

由图3可知,在深层培养的前5 d 里,胞外还原糖浓度迅速增加,并于第5 d 达到最大值 $12.212 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,之后胞外还原糖浓度开始下降,到第16 d 降到最低值 $0.067 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;胞外蛋白质浓度的变

化趋势与还原糖的很相似,在开始的前5 d 中胞外蛋白质浓度平缓上升,在第6 d 迅速升高到了最大值 $10.017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,此后胞外蛋白质浓度一直下降,在第8~12 d 出现了一个小的波峰,峰值是第10 d 时的 $5.535 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,到最后3 d,胞外蛋白质浓度降到 $2.329 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,并趋于平缓。

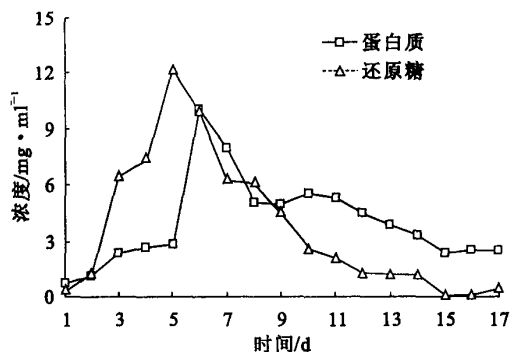


图3 胞外蛋白质与还原糖浓度的变化

Fig.3 Changes of extracellular protein and deoxioized saccharide

在整个深层发酵过程中,发酵液中的蛋白质及还原糖含量变化都比较大。胞外蛋白质浓度的变化可以反映发酵液中总酶活性的高低;还原糖浓度与胞外糖类分解酶类的活性直接相关;所以还原糖浓度与蛋白质浓度变化趋势相近的可能原因是假大白菇菌丝体在发酵过程中分泌的蛋白质(酶类)主要是与糖类分解相关的酶。

2.4 淀粉酶、CMC 酶、纤维素滤纸酶、纤维素脱脂棉酶活性的变化

从图4可知,在整个发酵过程中淀粉酶、CMC 酶、纤维素滤纸酶、纤维素脱脂棉酶的活性的变化趋势非常相似。在深层培养的开始4 d 里4种酶的活性基本平稳,略有升高;从第5 d 开始酶活开始上升;在第6 d 淀粉酶、CMC 酶和纤维素脱脂棉酶的酶活性达到最大值;第7 d 三者的酶活迅速下降;从第8 d 又开始回升,第9 d 达到第2个峰值,但比第6 d 的值低;之后酶活迅速下降,到第12 d 几种酶的活性都已趋于平稳,且值都很小。纤维素滤纸酶在开始的5 d 中酶活基本平稳,第6天开始迅速上升,并于第7 d 达到最大值,此后酶活性一直下降,第12 d 以后也趋于平稳,与纤维素脱脂棉酶相比,两者的酶活性相近,变化趋势也基本趋同,以纤维素脱脂棉酶活性略高。

整体来看这4种酶的活性变化趋势基本相同,在开始几天中酶活平稳,之后迅速上升,并于第6~7 d 达到最大值之后开始下降,12 d 以后酶活已经基本稳定,且酶活值都小。在淀粉酶、CMC 酶、纤维素滤纸酶、纤维素脱脂棉酶这4种多糖降解酶中,活

性以 CMC 酶活性最高,之后是淀粉酶,纤维素滤纸酶的活性最小。淀粉酶活性上升阶段出现最早,说明菌体对淀粉类物质利用相对较早。

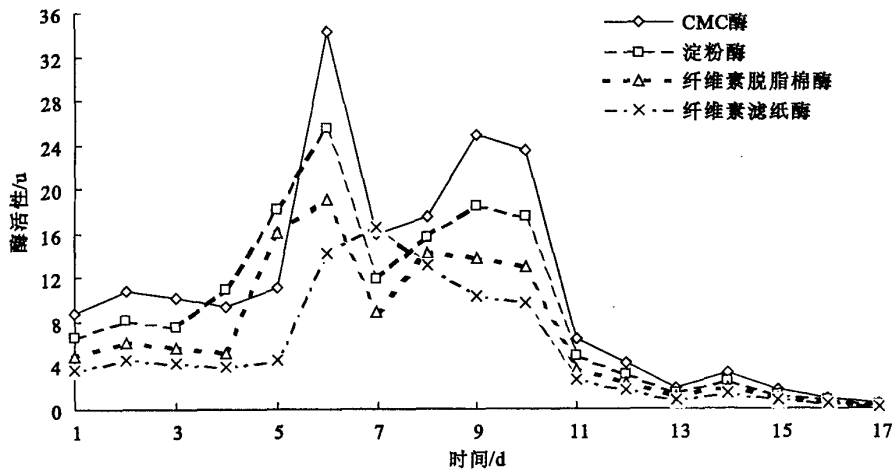


图4 发酵过程中淀粉酶、CMC 酶、纤维素滤纸酶、纤维素脱脂棉酶活性的变化
Fig.4 Activities of diastase, CMC enzyme, cellulase during the submerged culture

2.5 愈创木酚氧化酶与邻苯二酚氧化酶活性的变化

由图 5 可看出,在深层发酵开始的前 4 d,发酵液中愈创木酚氧化酶活性很小,之后酶活迅速上升,并于第 8 d 达到最大值 61.3U,后开始迅速下降,到 11 d 时酶活性已经很小,只有 5.6267 U,以后的愈创木酚氧化酶活性趋于平稳,且酶活都很小。

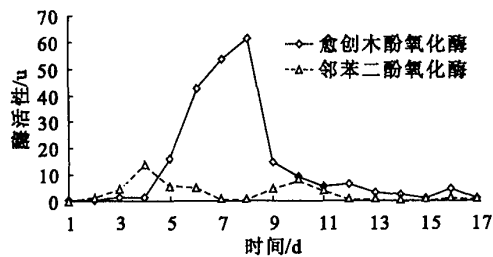


图5 发酵过程中愈创木酚氧化酶与邻苯二酚氧化酶活性的变化
Fig.5 Activities of guaiacol oxidase and polyphenol oxidase during the submerged culture

邻苯二酚氧化酶的酶活性总体来说比愈创木酚氧化酶要小,在开始的几天中邻苯二酚氧化酶的活性上升速度较快,在 4 d 达到了第一个峰值,酶活为 13.9 U,之后酶活下降,在第 8 d 降到最小值后酶活又开始上升,在第 10 d 又达到一个小的峰值,酶活只有 8.333 U,之后邻苯二酚氧化酶的酶活性一直下降。

邻苯二酚氧化酶与愈创木酚氧化酶的活性可以反映木质素分解酶类活性的高低,与多糖类物质分解酶相比,邻苯二酚氧化酶与愈创木酚氧化酶的总酶活性要相对小些,愈创木酚氧化酶在发酵过程的第 5~9 d 出现了短时间的高酶活,但总体来说二者

的酶活性不是很高。这说明在假大白菇的深层发酵过程中利用木质素类物质相对较难。

2.6 发酵过程中胞外多糖含量的变化

由图 6 可知,胞外多糖含量在深层发酵开始的几天中迅速上升,在第 6 天达到最大值 11.66 mg · L⁻¹,此后胞外多糖含量开始下降,在第 13 d 降到最小值 2.16 mg · L⁻¹,最后的几天中胞外多糖含量略有上升,在第 15 d 出现了一个小峰值,含量为 4.12 mg · L⁻¹。这可能与菌丝体自身的降解有关。

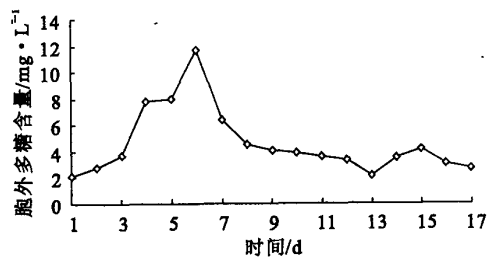


图6 发酵过程中胞外多糖含量的变化
Fig.6 Variation of extracellular polysaccharide content during the submerged culture

3 结论与讨论

总体来看,在整个发酵过程中,菌丝体生物量表现出先升后降的变化规律,在第 10 d 达到最大值,这符合一般微生物发酵的生长规律;发酵液 pH 值在发酵过程中先降后升,并在后期一直上升,这说明假大白菇在发酵后期一直向发酵液分泌碱性物质;胞外还原糖浓度与胞外多糖的变化趋势较为相似,两者之间是否存在相关性有待进一步的研究;淀粉酶、CMC 酶、纤维素脱脂棉酶、纤维素滤纸酶这四种

与纤维素分解相关的酶,其酶活变化趋势与胞外蛋白质浓度的变化趋势非常相近,而与分解木质素相关的愈创木酚氧化酶、邻苯二酚氧化酶活性很小,这说明假大白菇在发酵过程中向发酵液分泌的胞外蛋白质主要为与分解纤维素相关的酶类。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京:科学出版社,1998. 503.
- [2] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 河南:河南科学技术出版社,2000.
- [3] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版西安公司,2000. 137-138.
- [4] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社.

2002.

- [5] 倪新江,潘迎捷. 袋栽香菇生长期不同料层中木质纤维素的降解及有关酶活性的变化[J]. 食用菌学报,1998,5(1):13-17.
- [6] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999. 124.
- [7] 王玉万,徐文玉. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物学通报,1989,16(3):137-140.
- [8] 王宜磊,邓振坦,赵良田. 彩绒革盖菌愈创木酚氧化酶活性研究[J]. 植物学通报,2000,17(5):462-465.
- [9] 刘祖同,罗信昌. 食用菌菌生物技术及应用[M]. 北京:清华大学出版社,2002.

(上接第14页)

3 小结与讨论

柠条叶片在阳光充足的夏季晴天,其 P_n 日进程是一条单峰曲线, P_n 在 11:00 时左右达到最大值,约为 $8.092 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 柠条 $TRAN$ 的日变化也为单峰曲线,但柠条 $TRAN$ 日变化峰值出现在 13:00~15:00 时,约为 $9.392 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

柠条叶片的光合作用和蒸腾作用表现出不同的变化特征,说明植物的光合作用主要受其自身的生理代谢作用,而蒸腾作用不仅与植物自身的生理活动有关,而且受环境条件的影响较大。

对柠条光合速率及其同步测得的 11 项内外影响因子光量子密度、相对湿度、水汽压亏缺、大气 CO_2 浓度等指标进行相关分析,并应用逐步多元回归分析的方法,建立回归方程: $Y_{P_n} = 0.162X_{Ca} - 0.166X_{CINT} - 0.257X_{VPD} + 0.320X_{EAIR} + 0.809, Y_{TRAN} =$

$0.563X_{EAIR} - 4.91 \times 10 - 3X_{CINT} + 1.824$, 相关系数分别为 1.000 和 0.999。

参考文献:

- [1] 牛西午. 柠条研究[M]. 北京:科学出版社,2003. 1. 123.
- [2] 刘国谦,张俊宝,刘东庆. 柠条的开发利用及草粉加工饲喂技术[J]. 草业科学,2003,(7):26-32.
- [3] 程米亮,罗新书,杨新洪,等. 田间苹果叶片光合速率日变化的研究[J]. 园艺学报,1992,19(2):111-116.
- [4] 冯金朝,刘新民. 干旱环境与植物的水分关系[M]. 北京:中国环境科学出版社,1998. 54-59.
- [5] 冯金朝,江天然,刘新民,等. C_3 和 C_4 植物的水分利用效率[J]. 西北植物学报,1997,17(6):27-30.
- [6] 冯金朝,周宜君,李国刚,等. 沙漠常绿植物沙冬青气体交换特性的初步研究[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2001,10(1):38-41.
- [7] 金则新,柯世省. 云锦杜鹃叶片光合作用日变化特征[J]. 植物研究,2004,24(4):447-452.