

桑黄液体培养胞外酶产生及变化规律的研究

许谦 (菏泽学院生命科学系, 山东菏泽 274000)

摘要 [目的]采用适当的培养基液体培养药用真菌桑黄,每天固定时间测定培养液中7种胞外酶酶活,以了解不同酶的变化规律,从而推测桑黄对培养基中营养物质利用的能力。[方法]利用分光光度计,采用不同酶的显色反应对各种酶的活性进行测定。[结果]在液体培养过程中,桑黄不同胞外酶变化规律有所不同,淀粉酶、羧甲基纤维素酶、纤维素酶、果胶酶的酶活峰值分别出现在第8、9、10、9天,漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶的酶活峰值分别出现在第10、10、11天。[结论]桑黄对不同营养物质的利用高峰不同。利用不同营养物质的先后顺序分别为淀粉、半纤维素、果胶、纤维素及木质素。这对桑黄培养基成分、含量的确定及酶的获得具有一定的指导意义。

关键词 桑黄;液体培养;胞外酶;酶活

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)35-13472-02

Formation of Exoenzyme and Changing Laws in Liquid Culture of *Phellinus igniarius*

XU Qian (Department of Life Sciences, Heze University, Heze, Shandong 274000)

Abstract [Objective] To adopt moderate culture for *Phellinus igniarius*, test activity of 7 exoenzymes in liquid culture at a regular time, obtain change laws of different enzymes, and infer the capacity of *P. igniarius* using nutrients in liquid culture. [Method] Use spectrophotometer, and chromogenic reaction of different enzymes to test activity of the enzymes. [Result] In liquid culture, different exoenzymes show different changing laws, activity peak value of amylase, carboxymethyl cellulase, cellulase and pectase appears in the 8th day, 9th day, 10th day, and 9th day, that of laccase, guaiacol and polyphenoloxidase appears in the 10th day, 10th day, and 11th day. [Conclusion] *P. igniarius* uses nutrients in different periods, and the sequence is starch, hemicellulose, pectin, cellulose, and lignin. The study is significant for defining composition, content of liquid culture of *P. igniarius*, and enzyme acquisition.

Key words *P. igniarius*; Liquid culture; Exoenzyme; Enzyme activity

桑黄菌(*Phellinus igniarius*)属于担子菌亚门层菌纲非褶菌目刺革菌科针木层孔菌属^[1]。桑黄含有多糖、黄酮、三萜类等生物活性成分^[2]。中医用以治疗血崩、血淋、带下、脾虚泄泻等^[3-4]。它具有抑制肿瘤的生长、转移且低毒等药理活性^[5-11]。桑黄提取物具有抗流感病毒的作用^[12]。桑黄由于其特殊的生物学特性,自然状态下生长周期长,产量较低,人工栽培技术要求也相对较高,所以市场上桑黄子实体及其相关产品出现供不应求的局面。相关研究表明,桑黄液体培养的菌丝体与桑黄子实体有相似的营养成分^[13],菌丝体粗多糖含量是子实体的22.48倍^[14]。所以,液体发酵生产桑黄菌丝体成为桑黄研究利用的一个重要方向。在桑黄液体培养过程中各种胞外酶的产生及变化规律在一定程度上反映桑黄对培养基中各种营养成分的利用规律。研究桑黄各种胞外酶的产生及变化规律对桑黄各种培养基成分的确定及对各种酶的准确提取具有一定的指导意义。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 菌种。桑黄菌,菏泽学院微生物实验室保藏。

1.1.2 培养基。PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂18 g,蒸馏水1 000 ml,pH自然。液体培养基:玉米粉25 g,麸皮35 g,硫酸镁0.5 g,磷酸二氢钾1 g,pH自然。

1.2 培养方法和样品制备

1.2.1 菌种活化。将桑黄菌种接种在PDA固体培养基平板上,在28℃恒温培养箱中连续培养15 d。

1.2.2 菌丝培养。在250 ml三角瓶内装100 ml液体培养基,向其中接入28℃培养15 d的平板菌饼2片($d=1$ cm),160 r/min,恒温振荡培养。共设7个重复,分别从不同的重复中取样。

1.2.3 粗酶液制备。每天用5 ml离心管定时取培养液4 ml,封口,放入离心机中以3 500 r/min离心10 min,上清液为粗酶液。把粗酶液均分为2份,一份直接用于酶活测定;另一份在沸水中水浴15 min灭活,冷却后作为空白对照。

1.3 酶活的测定

1.3.1 淀粉酶酶活的测定。向试管中加入1.5 ml浓度0.5%的用pH 5.8、0.1 mol/L乙酸缓冲液配制的可溶性淀粉溶液,加0.5 ml粗酶液(稀释10倍),混匀,38℃水浴30 min,取出后立刻加入1.5 ml DNS试剂^[15],煮沸5 min,取出后冷却,加蒸馏水21.5 ml,混匀,迅速用723型分光光度计在520 nm处测OD值,以沸水灭活15 min的粗酶液为对照,共设3个重复,最后求平均值。酶活用样品与底物反应30 min后OD的改变值来表示。

1.3.2 羧甲基纤维素酶酶活的测定。向试管中加入1.5 ml浓度0.5%的用0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 4.6)配制的羧甲基纤维素钠溶液,加0.5 ml粗酶液(稀释10倍),50℃水浴30 min,之后步骤同淀粉酶酶活的测定。

1.3.3 纤维素酶酶活的测定。用滤纸测定纤维素酶的酶活,在试管内放入一条新华1号滤纸,然后加入1.0 ml 0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0),加1.0 ml粗酶液,50℃水浴60 min,取出后立刻加入1.5 ml DNS试剂^[15],煮沸5 min,取出后冷却,加蒸馏水至25 ml,混匀,迅速用723型分光光度计在520 nm处测OD值,以沸水灭活15 min的粗酶液为对照,共设3个重复,最后求平均值。酶活用样品与底物反应60 min后OD的改变值来表示。

基金项目 菏泽学院科研基金科技计划项目(xy10sw01);菏泽市科技发展计划项目(2012N002)。

作者简介 许谦(1971-),女,福建闽侯人,副教授,从事食药菌开发应用及微生物遗传育种方面的研究。

收稿日期 2013-11-20

1.3.4 果胶酶酶活的测定。向试管中加入 1.5 ml、浓度 1% 的用 0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 4.5) 配制的果胶溶液,加 0.5 ml 粗酶液 (稀释 10 倍),50 °C 水浴 30 min,之后步骤同淀粉酶酶活的测定。

1.3.5 漆酶酶活的测定。向试管中加入 0.5 ml 3.36 mmol/L 邻联甲苯胺溶液、3.4 ml 0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 4.6) 和 0.1 ml 粗酶液 (稀释 10 倍),28 °C 水浴 30 min 后,迅速用 723 型分光光度计在 600 nm 处测 OD 值,以沸水灭活 15 min 的粗酶液为对照,共设 3 个重复,最后求平均值。酶活用样品与底物反应 30 min 后 OD 的改变值来表示。

1.3.6 愈创木酚酶酶活的测定。向试管中加入 0.5 ml、80 mmol/L 愈创木酚溶液、3.0 ml 0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 4.6) 和 0.5 ml 粗酶液 (稀释 10 倍),28 °C 水浴 30 min 后,迅速用 723 型分光光度计在 490 nm 处测 OD 值,以沸水灭活 15 min 的粗酶液为对照,共设 3 个重复,最后求平均值。酶活用样品与底物反应 30 min 后 OD 的改变值来表示。

1.3.7 邻苯二酚氧化酶酶活的测定。向试管中加入 2.0 ml 0.1 mmol/L 邻苯二酚溶液、2.0 ml 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 和 0.1 ml 粗酶液 (稀释 10 倍),28 °C 水浴 30 min 后,迅速用 723 型分光光度计在 400 nm 处测 OD 值,以沸水灭活 15 min 的粗酶液为对照,共设 3 个重复,最后求平均值。酶活用样品与底物反应 30 min 后 OD 的改变值来表示。

2 结果与分析

2.1 淀粉酶、羧甲基纤维素酶、纤维素酶、果胶酶酶活的变化 基于桑黄特殊的生物学特性,桑黄液体培养的生长速度较慢。该试验先将桑黄培养 6 d,从第 7 天开始取样测酶活。

由图 1 可知,培养液中淀粉酶、羧甲基纤维素酶、纤维素酶、果胶酶的酶活峰值分别出现在第 8、9、10、9 天,淀粉酶的酶活峰值出现最早,其次出现的是羧甲基纤维素酶和果胶酶,最后出现的是纤维素酶,纤维素酶除了在第 10 天出现一次高峰外,在第 12 天又出现一次小的高峰。这表明在对桑黄进行液体培养的过程中,淀粉最早被利用。这可能与培养基中含有大量的淀粉类诱导物有关^[16]。羧甲基纤维素酶、果胶酶和纤维素酶的酶活峰值随后出现,说明桑黄对淀粉的利用比对纤维素、果胶类物质的利用早。

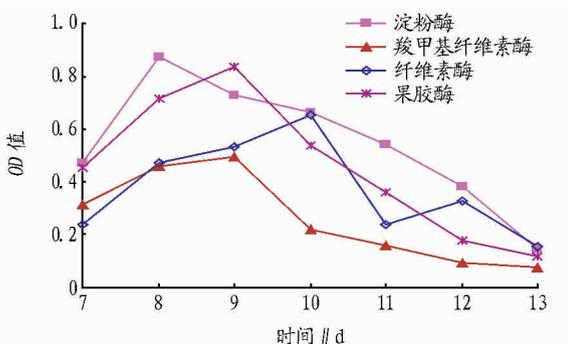


图 1 淀粉酶、羧甲基纤维素酶、纤维素酶、果胶酶酶活的变化

2.2 漆酶、愈创木酚酶、邻苯二酚氧化酶酶活的变化 由图 2 可知,漆酶、愈创木酚酶、邻苯二酚氧化酶的酶活峰值分别出现在第 10、10、11 天,漆酶、愈创木酚酶的酶活峰值刚好出

现在分解多糖的淀粉酶、羧甲基纤维素酶以及果胶酶之后,与纤维素酶的酶活峰值衔接起来,说明桑黄对多种营养物质的利用高峰具有一定的顺序性,即先利用淀粉、果胶、纤维素,然后利用木质素。

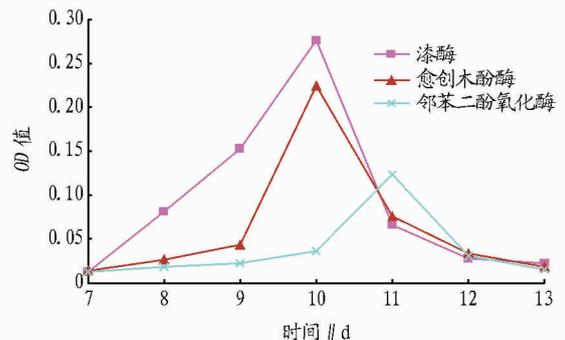


图 2 漆酶、愈创木酚酶、邻苯二酚氧化酶酶活的变化

3 讨论

研究表明,桑黄在进行液体培养的过程中会产生多种胞外酶,酶活性反映菌丝生长过程中对培养基中营养物质的吸收利用情况。淀粉酶酶活说明桑黄具有降解多糖类物质的能力;羧甲基纤维素酶、纤维素酶酶活说明桑黄具有降解纤维素的能力;果胶酶酶活说明桑黄具有降解果胶的能力;漆酶、愈创木酚酶及多酚氧化酶的酶活说明桑黄具有降解木质素的能力^[17]。7 种酶的酶活高峰先后出现,酶活变化明显,淀粉酶、羧甲基纤维素酶、果胶酶和纤维素酶的酶活峰值出现在漆酶、愈创木酚酶和多酚氧化酶之前,表明桑黄先利用多糖类、果胶类物质,然后利用木质素类物质。这个结果与金针菇、姬菇、鲍鱼菇等胞外酶酶活变化规律^[18-19]有相似之处。淀粉酶酶活峰值最早出现,表明桑黄菌丝生长时最早利用淀粉。这或许与桑黄液体培养基中较高的淀粉含量有关。

纤维素酶有 2 个酶活峰值,可能是由桑黄液体发酵时产生多种纤维素酶所致。纤维素酶是一个复杂酶系,由多种水解酶组成,习惯上将其分为 C1 酶、Cx 酶和 β 葡糖苷酶 3 类。C1 酶是最初对纤维素起作用的酶,对纤维素链的结晶结构起破坏作用;Cx 酶是对经 C1 酶活化的纤维素起作用,对 β -1,4-糖苷键进行分解的纤维素酶; β 葡糖苷酶对纤维二糖、纤维三糖及其他低分子纤维糊精起作用,将它们分解为葡萄糖。纤维素酶 2 个酶活峰值出现的原因可能与多种纤维素酶在不同的时间出现有关。

对桑黄菌进行液体和固体培养时,其生长速度都较慢,所以该试验在酶活测定时延长其培养天数到 13 d,测得完整的酶活数据。测定酶活的时间与其他生长速度较快的真菌如双孢菇、平菇测定酶活的时间有所不同。该试验各种酶活峰值出现时间均晚于秦俊哲等^[20]试验结果中所出现的时间,具体原因可能与接种量、培养条件等有关。该试验结果对于确定桑黄培养基的成分具有一定的指导意义,对于适时分离、收集各种桑黄胞外酶也具有一定的指导作用。

参考文献

- [1] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学[M]. 北京:中国林业出版社, 1996:228-231. (下转第 13509 页)

4.5.4.1 捕杀成虫。利用成虫群集越冬习性,早春在越冬场所可捕杀大量越冬成虫。在田间,可利用成虫的假死性,进行人工捕杀。露地栽培可采用杀虫灯以及性诱剂诱杀害虫。保护地栽培可采用防虫网或银灰膜避虫、黄板(柱)以及性诱剂诱杀害虫。

4.5.4.2 处理残株及摘除卵块。及时处理收获后的马铃薯、茄子等残株,可消灭部分卵、幼虫和蛹。成虫产卵及时摘除卵块可减轻危害。

4.5.5 化学防治。应对症下药,适期用药,交替使用适当浓度与药量的不同的适用药剂,合理混配药剂,并确保农药施用的安全间隔期。生育期内经常检查,及时发现清除晚疫病中心病株,采用甲霜灵锰锌灌塘并全田喷雾防治,病株烧毁或远离深埋。根据各点的虫情监测和田间系统调查情况,及时采用10%吡虫啉等药剂防治蚜虫。马铃薯田间主要病虫害药剂防治方法见表2。马铃薯生产中,禁止施用的高毒、剧毒

表2 马铃薯田间主要病虫害防治

| 防治对象 | 药剂及剂量 | 防治时期、方法 |
|------|-----------------------------|-------------------------------|
| 蚜虫 | 40%乐果乳油、威力特、万灵等按产品说明交替使用 | 出苗后若植株有蚜虫出现及时喷药防治,每隔7~10 d喷1次 |
| 晚疫病 | 甲霜灵锰锌、克露、抑快净、甲霜铜等按产品说明交替使用 | 发病初期开始用药,每隔7~10 d喷1次 |
| 螨类 | 尼索朗、阿巴丁、浏阳霉素、阿维哒螨等按产品说明交替使用 | 初见虫或卵时用药,每隔7~10 d喷1次 |
| 块茎蛾 | 万灵+阿维哒螨或威力特等按产品说明使用 | 09:00以前用药,每隔7~10 d喷1次 |

毒、高残留和具有“三致”(致癌、致畸、致突变)副作用的所有农药分别为甲胺磷、甲基对硫磷、对硫磷、久效磷、磷胺、甲拌磷、甲基异柳磷、特丁硫磷、甲基硫环磷、治螟磷、内吸磷、克百威、涕灭威、灭线磷、硫环磷、蝇毒磷、地虫硫磷、氯唑磷、苯线磷等。

4.6 收获、包装、贮存 严格按照“3.4”有关规定执行。

参考文献

- [1] 敖毅,黄吉美,王朝武,等.低纬度高海拔地区马铃薯脱毒种薯标准化生产技术[J].中国马铃薯,2009(4):240-242.
- [2] 黄吉美,敖毅,钟文翠,等.滇东高原马铃薯脱毒种薯标准化生产技术[J].中国种业,2009(8):71-72.
- [3] 虎彦芳.滇东高原马铃薯脱毒种薯标准化生产技术[J].现代农业科技,2009(15):105-106.
- [4] 吴慧中.脱毒微型马铃薯生产技术研究[J].天津农林科技,2010(5):5-7.
- [5] 黄吉美,陈兴龙,饶彦章,等.滇马铃薯5号无公害栽培技术[C]//中国作物学会马铃薯专业委员会.2006年中国作物学会马铃薯专业委员会年会暨学术研讨会论文集.中国作物学会马铃薯专业委员会,2006:2.
- [6] 刘卫平.马铃薯脱毒原原种的生产技术[J].中国农村小康科技,2006(8):32,50.
- [7] 丁俊杰.佳木斯地区脱毒马铃薯原原种生产技术[J].农业与技术,2006(4):120-121.
- [8] 王丽红.网室脱毒马铃薯原原种生产管理技术[J].农村实用技术,2008(1):34-35.
- [9] 王正周.“会—2号”脱毒马铃薯原原种生产技术[J].农村实用技术,2006(5):22-23.
- [10] 颜谦,雷尊国,黄萍,等.贵州马铃薯脱毒原原种高效生产技术[J].贵州农业科学,2009(11):30-31.
- [11] 刘慧萍,李莉,温淑萍.脱毒马铃薯原原种网室生产技术[J].甘肃农业科技,2004(6):18-19.
- [12] 孔德鹏.脱毒马铃薯原原种栽培基质的研究与应用[D].石河子:石河子大学,2011.

(上接第13473页)

- [2] 齐欣.珍稀药用真菌——桑黄[M].天津:天津科技翻译出版公司,2009.24-30.
- [3] HUR J M, YANG C H, HAN S H, et al. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against sthethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Fitoterapia, 2004, 75(6):603-635.
- [4] AJITH T A, JANARDHANAN K K. Cytotoxic and an titum or activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 84(2):157.
- [5] KIM H M, HAN S B, OH G T, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus* [J]. Int J Immunopharmacol, 1996, 18:295-304.
- [6] HAN S B, LEE C W, JEON Y J, et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis [J]. Immunopharmacology, 1999, 41:157-164.
- [7] LI G, KIM D, KIM T, et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces 2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells [J]. Cancer Lett, 2004, 216:75-181.
- [8] KIM G Y, LEE J Y, LEE J O, et al. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70:1218-1226.
- [9] SLIVA D, KAWASAKI J, STANLEY G, et al. *Phellinus linteus* inhibits growth and invasive behavior of breast cancer cells through the suppression of Akt signaling [J]. FASEB J, 2006, 20:559-560.
- [10] MORADALI M F, MOSTAFAVI H, GHODS S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macrofungi (macrofungi)

[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7:701-724.

- [11] DONG W, NING L, LI W D, et al. Tumor-inhibitory and liver-protective effects of *Phellinus igniarius* extracellular polysaccharides [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, (25):633-638.
- [12] LEE S, KIM J, HEO J, et al. The anti-influenza virus effect of *Phellinus igniarius* extract [J]. Journal of Microbiology, 2013, 51(5):676-681.
- [13] XIAO J H, CHEN D X, WAN W H, et al. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions [J]. Process Biochemistry, 2006, 41:1887-1893.
- [14] 王英辉,许泓瑜,敖宗华,等.桑黄发酵菌粉与桑黄子实体成分分析比较[J].食品与发酵工业,2008,34(2):126-129.
- [15] 张龙翔.生化实验方法和技术[M].北京:人民教育出版社,1983:9-11,371-375.
- [16] 谢丽源,邓科君,张勇,等.桑黄深层发酵胞外酶活性的测定与分析[N].食品工业科技报,2010-11-07.
- [17] SHON Y H, NAM K S. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenesis phase II enzymes by basidiomycetes [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 77:103-109.
- [18] 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):34-35
- [19] 初洋,倪新江,桂桂文,等.姬菇和鲍鱼菇生长期间8种胞外酶活性变化比较[J].烟台大学学报:自然科学与工版,2008,21(2):138-141.
- [20] 秦俊哲,师斌.桑黄液体培养中胞外酶活力变化的研究[J].陕西科技大学学报,2009,27(3):72-75.