

# 桑黄深层发酵胞外酶活性的测定与分析

谢丽源<sup>1,2</sup>, 邓科君<sup>3</sup>, 张勇<sup>3,\*</sup>, 彭卫红<sup>2</sup>, 甘炳成<sup>2,\*</sup>, 李洪军<sup>1</sup>

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400716;

2.四川省农业科学院土壤肥料研究所, 四川成都 610066;

3.电子科技大学生命科学与技术学院, 四川成都 610054)

**摘要:**以不同的桑黄菌株为材料,通过胞外淀粉酶、滤纸纤维素酶、羧甲基纤维素酶、漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶活性测定,筛选较优菌株,并对该菌株胞外酶活性进行动态分析。结果表明:菌株 ZKY 的淀粉酶、羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶的活性均高于其它菌株,木质素降解酶中愈创木酚酶和多酚氧化酶活性较低,但胞外蛋白质含量明显高于其它菌株;ZKY 对碳水化合物利用顺序为淀粉、纤维素、木质素,其淀粉酶、羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶、漆酶,活性高峰分别出现在发酵的第 4、6、8d,愈创木酚酶和多酚氧化酶在发酵过程中均出现两个峰,第一个峰出现在发酵的第 10d,之后均有第二个峰出现。

**关键词:**桑黄,深层发酵,胞外酶,高峰期

## Analysis of extracellular enzyme activities of *Phellinus baumii* by submerged fermentation

XIE Li-yuan<sup>1,2</sup>, DENG Ke-jun<sup>3</sup>, ZHANG Yong<sup>3,\*</sup>, PENG Wei-hong<sup>2</sup>, GAN Bing-cheng<sup>2,\*</sup>, LI Hong-jun<sup>1</sup>

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2.Soil and Fertilizer Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;

3.School of Life Sciences and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chendu 610054, China)

**Abstract:** The activity of amylase, cellulase, carboxymethyl cellulose, laccase, guaiacol oxidase, polyphenol oxidase of *Phellinus baumii* under submerged culture were determined, and based on this, excellent strain was filtrated. Dynamic variation of extracellular enzyme activity of the excellent strain was investigated. The results showed that the activity of amylase, carboxymethyl cellulose and cellulase of ZKY were the higher than others, and the activity of guaiacol oxidase and polyphenol oxides were low, but the content of extracellular protein of ZKY was evidently higher than others, which showed ZKY was a excellent strain. The maximum activity of amylase, cellulose and laccase appeared on the 4, 6, 8d respectively during the fermentation. The activity of guaiacol oxidase and polyphenol oxidase showed two peak values, of which the first peak appeared on the 10d, and the second peak appeared subsequently.

**Key words:** *Phellinus baumii*; submerged fermentation; extracellular enzyme; peak stage

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)07-0183-04

桑黄 (*phellinus linteus*, *Phellinus baumii*) 属层菌纲、多孔菌目、锈革菌科、层孔菌属,是近年来发现的一种具有显著抗肿瘤作用的药用真菌。桑黄属腐生菌,它的生存环境中主要是以淀粉、纤维素、木质素等大分子物质作为碳源,因此,必须依赖生长发育过程中菌丝细胞分泌的多种胞外酶,水解环境中的大分子有机物质,来维持其生命过程,桑黄菌株能否分泌胞外酶以及不同时期各种胞外酶活性大小对其生

长发育有重要影响,不同菌株分泌酶能力的大小及酶量的多少,很大程度上决定了菌株的生长快慢、好坏及子实体的形成发育等情况,因此胞外酶含量差异可以为快速准确鉴别菌株的生产性能提供初步的理论依据<sup>[1-2]</sup>。桑黄在自然界形成的子实体非常稀少,人工驯化栽培是获得桑黄子实体的另一重要途径,但在我国桑黄的人工驯化栽培一直是难点,对桑黄的营养生理条件动态分析的研究,有利于菌种优化改良,更好地分解利用各种成分,为桑黄驯化栽培奠定基础。本实验采用摇瓶对桑黄进行深层发酵,研究不同桑黄菌株发酵液中的胞外酶活性,分析比较不同菌株间的生物降解能力,并对胞外酶活性变化进行分析,为桑黄的驯化栽培、优良菌株的选育以及进一步地研究开发提供一定的理论基础。

收稿日期: 2009-07-16 \* 通讯联系人

作者简介: 谢丽源 (1977-), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 农产品加工。

基金项目: 四川省青年基金项目 (2008-42-382); 四川省科技支撑项目 (2008FZ0157)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

菌株 通过种质鉴定后的桑黄菌株 11 株如表 1 所示;邻苯二酚、3,5-二硝基水杨酸、羧甲基纤维素钠、愈创木酚、柠檬酸、乙酸、可溶性淀粉、邻联甲苯胺 均为分析纯,购于长征化学试剂公司。

表 1 桑黄菌株来源

菌株	来源
ZYL	武汉周玉麟食用菌研究所
ZKY	中科院微生物研究所菌种保藏中心
SDGD	山东济宁市光大食用菌科研中心
HZND	华中农业大学菌种实验中心
WHXY01	武汉市新宇食用菌研究所
WHXY02	武汉市新宇食用菌研究所
SDJX	山东省金乡真菌研究所
HLJYC	黑龙江伊春市食用菌研究所
NYWSW	中国农业微生物菌种保藏管理中心
SCNKY01	四川省农科院微生物研究中心
SCNKY02	四川省农科院微生物研究中心

LDZX 立式电热压力蒸气灭菌锅 上海申安医疗器械厂;UV-1240 紫外分光光度计 日本岛津仪器公司;LRH-250-II 生化培养箱 广东省医疗器械厂;HZP-250 全温振荡培养箱 上海精宏实验设备有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 液体深层发酵 500mL 三角瓶分装 100mL 液体 PDA 培养基,灭菌后接种 10% 种子培养基,于 28℃ 120r/min 振荡培养 8d。

1.2.2 粗酶液制备 离心取发酵液,并在 5000r/min 离心 10min 后,取上清液为粗酶液。

1.2.3 淀粉酶活性测定<sup>[3]</sup> 取 0.5mL 1% 可溶性淀粉作为底物,加入 0.1mL 粗酶液,40℃ 水浴保温 30min 取出后,立即加入 DNS 试剂 3.0mL,冷却后加蒸馏水 16.4mL,混匀,于 520nm 处测 OD 值。

1.2.4 滤纸纤维素酶活性测定<sup>[4]</sup> 在试管中放入一条新华 1 号滤纸(1×6cm),加入 1mL 0.1mol/L pH4.0 的柠檬酸缓冲溶液,再加入粗酶液 1.0mL 后,50℃ 保温 60min,取出,立即加入 DNS 试剂 1.5mL,煮沸 5min,冷却至室温加蒸馏水 25mL,混匀,于 520nm 处测 OD 值。

1.2.5 羧甲基纤维素酶活性测定<sup>[5]</sup> 取 0.9mL 1% 羧甲基纤维素钠溶液作为底物,加入 0.1mL 粗酶液,50℃ 水浴保温 30min 取出后,立即加入 DNS 试剂 0.75mL,煮沸 5min 取出,冷却至室温加蒸馏水 8.2mL,混匀,于 520nm 处测 OD 值。

1.2.6 漆酶活性测定<sup>[6]</sup> 取 0.5mL 1mmol/L ABTS 作为底物,加入 2mL pH4.6 0.1mol/L 的乙酸盐缓冲溶液,0.2mL 粗酶液,28℃ 水浴保温 30min,600nm 处测 OD 值。

1.2.7 愈创木酚酶活性测定<sup>[7]</sup> 取 0.5mL 80mmol/L 愈创木酚(用 pH4.6 0.1mol/L 的乙酸盐缓冲溶液配制)为底物,加入 3.0mL pH4.6 0.1mol/L 的乙酸盐缓冲溶液,0.5mL 粗酶液,28℃ 水浴保温 30min,490nm 处测 OD 值。

1.2.8 多酚氧化酶活性测定<sup>[8]</sup> 取 2.0mL 0.1mmol/L 的邻苯二酚(用蒸馏水配制,用 5% NaOH 调 pH 到 6.0,于棕色瓶放 4℃ 冰箱保存备用)作为底物,加入 2.0mL pH6.0 0.05mol/L 的乙酸盐缓冲溶液,0.1mL 粗酶液,28℃ 水浴保温 30min,400nm 处测 OD 值。

酶活力单位定义:每毫升样品与底物反应时间内光密度值增加 0.1 所需酶量为一个酶活力单位。

1.2.9 蛋白质测定<sup>[6]</sup> 取粗酶液 1mL,加入 5.0mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白质试剂,混匀后,立即于 595nm 处测 OD 值。蛋白质标准曲线回归方程: $y = 0.1211x + 0.0299$ ,  $R^2 = 0.9976$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同桑黄菌株胞外酶活性比较

胞外酶是菌体在发酵过程中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利用营养物质及其生长状况,胞外淀粉酶、滤纸纤维素酶、羧甲基纤维素酶均为多糖降解酶,它们分别是降解淀粉和纤维素的重要催化剂,在酶的作用下,降解为低聚糖为菌体吸收。漆酶、多酚氧化酶、愈创木酚酶是木质素降解有关的酚氧化酶类,它能加速木质素等芳香族高分子化合物的分解,产生代谢产物醌,为桑黄菌丝提供丰富营养的同时,还能增强菌株的抗病能力,抑制杂菌污染。通过比较不同桑黄菌株六种胞外酶活性大小,ZKY 的多糖降解酶类中淀粉酶、纤维素酶和羧甲基纤维素酶的活性均高于其它菌株,说明 ZKY 有较强的降解淀粉、纤维素的能力;从木质素降解酶来看,菌株 ZKY 漆酶酶活低于 SDJX 和 HLJYC,但相差不明显,在 5% 和 1% 水平均没有显著性差异,ZKY 多酚氧化酶活和愈创木酚酶活稍低(表 2),由于 11 个桑黄菌株的多酚氧化酶活和愈创木酚酶活相对于多糖降解酶均比较低,整体影响不大。

### 2.2 不同桑黄菌株胞外蛋白质含量比较

粗酶液中的胞外蛋白质主要是菌体在生长过程中分泌到外界环境中的各种水解酶,其中包括了淀粉酶、纤维素酶、木质素降解酶和其它没有测定的酶类,其含量差异表明了菌丝体生长过程中胞外酶种类及数量变化,也说明了菌丝体生长过程中对外界有机营养物质分解利用程度差异<sup>[9]</sup>。从蛋白质含量分析,ZKY 的蛋白质含量明显高于其它 10 个桑黄菌株,达到 8.325mg/mL(图 1),也说明在一定程度上 ZKY 对外界营养物质的利用程度及降解能力显著高于其它菌株。

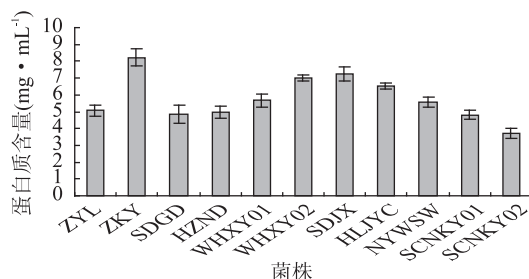


图 1 不同桑黄菌株胞外蛋白质含量比较

### 2.3 桑黄 ZKY 菌株不同胞外酶活性变化

通过测定 16d 内 ZKY 号菌株发酵液中多糖降解

表2 不同桑黄菌株胞外酶活性比较

酶	菌株	活性(U)	显著性		菌株	活性(U)	显著性	
			5%	1%			5%	1%
淀粉酶	ZYL	73.266 ± 1.651	a	AB	SDJX	45.766 ± 3.872	cd	CDEF
	ZKY	78.600 ± 4.441	a	A	HLJYC	52.633 ± 0.636	bc	CDE
	SDGD	47.166 ± 3.604	cd	CDEF	NYWSW	43.700 ± 5.853	cd	DEFG
	HZND	40.766 ± 3.375	de	EFG	SCNKY01	37.066 ± 1.576	de	FG
	WHXY01	59.733 ± 3.837	b	BC	SCNKY02	30.866 ± 3.593	e	G
滤纸纤维素酶	WHXY02	57.900 ± 0.520	b	CD				
	ZYL	28.000 ± 6.951	de	BC	SDJX	11.366 ± 0.987	g	E
	ZKY	47.666 ± 0.426	a	A	HLJYC	16.933 ± 0.273	fg	DE
	SDGD	31.466 ± 2.569	cde	BC	NYWSW	30.966 ± 2.583	cde	BC
	HZND	38.433 ± 0.240	bc	AB	SCNKY01	17.433 ± 0.348	fg	DE
羧甲基纤维素酶	WHXY01	32.566 ± 0.706	cd	BC	SCNKY02	24.233 ± 0.376	ef	CD
	WHXY02	44.033 ± 0.869	ab	A				
	ZYL	34.266 ± 0.606	a	AB	SDJX	26.600 ± 0.451	cd	CDEF
	ZKY	38.600 ± 1.358	a	A	HLJYC	19.666 ± 0.418	bc	CDE
	SDGD	29.366 ± 0.418	cd	CDEF	NYWSW	23.800 ± 0.153	cd	DEFG
漆酶	HZND	28.366 ± 3.983	de	EFG	SCNKY01	21.466 ± 0.601	de	FG
	WHXY01	10.433 ± 0.484	b	BC	SCNKY02	24.500 ± 0.751	e	G
	WHXY02	28.733 ± 1.517	b	CD				
	ZYL	11.800 ± 0.954	e	D	SDJX	21.166 ± 0.533	a	A
	ZKY	20.100 ± 0.462	a	A	HLJYC	21.233 ± 0.918	a	A
愈创木酚酶	SDGD	17.266 ± 0.564	b	B	NYWSW	15.183 ± 0.423	c	BC
	HZND	14.833 ± 0.578	cd	BC	SCNKY01	12.783 ± 0.599	e	CD
	WHXY01	16.250 ± 0.465	bc	B	SCNKY02	13.216 ± 0.627	de	CD
	WHXY02	13.250 ± 0.362	de	CD				
	ZYL	9.707 ± 0.295	cd	CDE	SDJX	10.826 ± 0.415	bc	ABCD
多酚氧化酶	ZKY	8.013 ± 0.358	e	E	HLJYC	11.080 ± 0.401	bc	ABC
	SDGD	10.700 ± 0.541	bc	ABCD	NYWSW	9.880 ± 0.507	cd	BCDE
	HZND	8.907 ± 0.585	de	DE	SCNKY01	7.927 ± 0.826	e	E
	WHXY01	12.580 ± 0.153	a	A	SCNKY02	8.173 ± 0.123	e	E
	WHXY02	11.813 ± 0.128	ab	AB				
多酚氧化酶	ZYL	20.100 ± 2.719	a	A	SDJX	16.333 ± 2.224	ab	AB
	ZKY	11.833 ± 1.267	bcd	ABC	HLJYC	13.600 ± 2.524	abc	ABC
	SDGD	20.667 ± 3.421	a	A	NYWSW	14.800 ± 2.122	ab	ABC
	HZND	14.033 ± 2.288	abc	ABC	SCNKY01	5.700 ± 1.637	d	C
	WHXY01	16.133 ± 2.224	ab	AB	SCNKY02	6.833 ± 1.299	cd	BC
WHXY02	9.233 ± 2.677	bcd	BC					

注: X: 平均值 ± 标准误差 (Mean ± Standard Error); 邓肯氏多重比较 (Duncan's new multiple range test)。

酶活性变化发现,在整个发酵实验期内,淀粉酶、纤维素酶、羧甲基纤维素酶均有活性,发酵液中胞外淀粉酶分泌量在2d内迅速上升,到4d达到最大值,随后淀粉酶活性迅速下降;羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶的活性高峰在淀粉酶活性高峰之后出现,均出现在第6d,说明桑黄最早利用的是淀粉类物质,利用纤维素比淀粉晚,并且淀粉酶的活性较滤纸纤维素酶和羧甲基纤维素酶高,这可能与培养基中含有大量的淀粉酶诱导物有关(图2)。

桑黄液体发酵培养过程中(16d),木质素降解酶的活性变化研究发现,在整个发酵期内,漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶均有活性,但产酶量较多糖降解酶低。漆酶在前2d分泌很少,2d后发酵液中漆酶开始大量产生,并迅速上升,到第8d到达最大值;多酚氧化酶和愈创木酚酶均出现了两个活性峰,多酚氧化酶在第2d和第4d测到的值都较低,4d后分泌量增加明显,愈创木酚酶在发酵第2d并未检测

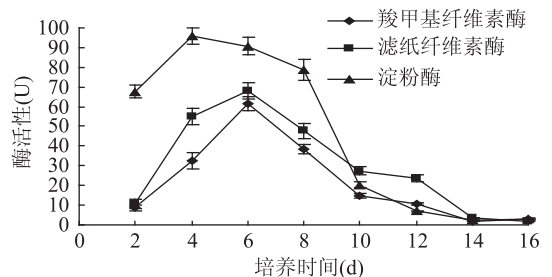


图2 多糖降解酶活性变化曲线

到,2d后才开始产生,4d后开始加速分泌,但两种酶活性第一次高峰均出现在第10d,多酚氧化酶活性在发酵培养的第14d又出现了一个小高峰,其值与第一个峰相当,之后酶活性趋于平缓,愈创木酚酶在第一个活性高峰后先下降,之后又开始攀升,到发酵培养的第16d最后一次取样时,它的活性仍在上升(图3)。

### 3 讨论

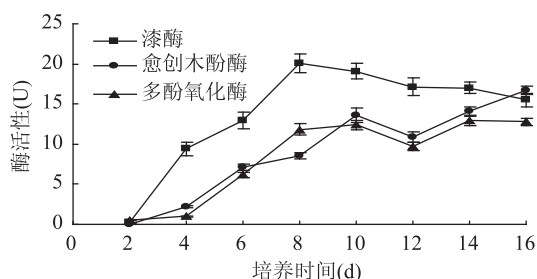


图3 木质素降解酶活性变化曲线

大型真菌在生长发育过程中不断向外分泌胞外酶,用以分解外界复杂的有机物,获取有机营养物质。胞外酶中重要的是与多糖降解相关的酶,如淀粉酶、纤维素酶以及分解木质素的漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶,这是其异氧生长中获取有机碳源的主要方式<sup>[9]</sup>。本实验选择了6种胞外酶,淀粉酶、羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶、漆酶、愈创木酚酶、多酚氧化酶,研究发现,桑黄的6种胞外酶均具有活性,其强弱表明了菌丝体生长过程中对外部营养的生物利用度,同时较完整的胞外酶系也表明桑黄具备人工栽培子实体所需的条件。

菌株间不同胞外酶活性的差异,表现在分解基质中营养物质的速度和分解能力有差异,其实验结果可作为品种筛选或菌株优劣的生化指标,并可为快速准确鉴别菌株的生产性能提供初步的理论依据。从11个桑黄菌株6种胞外酶活性和蛋白质含量的分析,多糖降解酶含量高于木质素降解酶,说明桑黄对木质素的代谢能力较弱,同时结果表明,ZKY菌株多糖降解酶和胞外蛋白质含量高于其它桑黄菌株,说明ZKY对营养物质利用程度优于其它菌株,其菌丝生长速度及产量可能较其它菌株好。

ZKY菌株动态分析表明,漆酶、愈创木酚酶和多酚氧化酶的活性高峰出现在淀粉酶、羧甲基纤维素酶和滤纸纤维素酶之后,这说明桑黄是先利用多糖类物质,后利用木质素类物质,这与金针菇、金耳等胞外酶活性有类似之处<sup>[7,10]</sup>。多糖降解酶中淀粉酶

活性高峰出现最早,且含量最高,说明桑黄菌丝最早利用淀粉作为碳源,这可能与液体培养基中淀粉比例较高有关。ZKY出现两次愈创木酚酶和多酚氧化酶的活性高峰,推测桑黄在生长过程中分泌的胞外愈创木酚酶和多酚氧化酶中可能含有同工酶,多酚氧化酶两种同工酶活性相当,而愈创木酚酶的同工酶活性存在差异,后一种酶活性比前一种酶活性更强。但这两种同工酶对分解木质素降解酶的相互作用及其出现原因需要进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 张雪岳.食用菌学[M].重庆:重庆大学出版社,1988,72.
- [2] 李艳辉.桑黄生物学特性及主要活性成分研究[D].吉林农业大学,2003.
- [3] 周景祥,王佳平,余涛.蛋白酶和淀粉酶活性检测方法探讨[J].山东饲料,2002(5):22-23.
- [4] 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):58-63.
- [5] 王福荣.生物工程分析与检验[M].北京:中国轻工业出版社,2005:210-212.
- [6] 王宗泽.生物化学实验技术原理与方法[M].北京:中国农业出版社,2002:172-174.
- [7] 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.
- [8] 王宜磊,刘兴坦.彩绒革盖菌漆酶及多酚氧化酶活性研究[J].生物技术,2000,10(6):15-18.
- [9] 胡景江,王俊明,张高伟,等.皱马鞍菌液体培养过程中胞外酶及还原糖的动态变化[J].西北农林科技大学学报,2005,33(11):94-98.
- [10] 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.
- [11] 马琼,周毅峰,张明英.香菇深层发酵胞外酶活力的研究[J].食品科学,2008,19(8):430-432.
- [12] 李守勉,李明,田景花,等.八个杏鲍菇菌株胞外酶活性及蛋白质含量的研究比较[J].食用菌,2007,29(6):21-22.

(上接第182页)

- Worms[M].Tokyo:Seibundo Shikosha,1994,230.
- [2] Li CR, Li ZZ, Fan MZ, et al. The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(8): 800-805.
  - [3] Chung EJ, Choi K, Kim HW, et al. Analysis of Cell Cycle Gene Expression Responding to Acetoxyscirpenol Isolated from *Paecilomyces tenuipes* [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(1): 32-36.
  - [4] Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, et al. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614 [J]. Planta Medica, 2000, 66(8): 756-758.
  - [5] Shin KH, Lim SS, Lee SH, Lee YS, et al. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp [J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 928: 261-273.
  - [6] 金丽琴,吕建新,袁谦.细脚拟青霉总多糖对大鼠非特异

- 性免疫调节作用[J].科技通报,2002,18(4):276-280.
- [7] Takano F, Yahagi N, Yahagi R, et al. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llund) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo [J]. Int Immunopharmacology, 2005, 5(5): 903-916.
- [8] Tang YJ, Zhong JJ. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid [J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 32: 478-484.
- [9] Yao MH, Tian YC, Tade MO, et al. Variations and modelling of oxygen demand in amino acid production [J]. Chem Eng Process, 2001, 40: 401-409.
- [10] 黄红兵,江英桥.赤芝子实体总核苷的含量测定及薄层色谱鉴别[J].植物资源与环境学报,2000,9(3):61-62.