

文章编号:1003-8701(2013)04-0092-02

氨基寡糖对侧耳菌株发酵液中漆酶活性的影响

李 军,章淑艳,赵从波,陈文杰

(河北省微生物研究所,河北 保定 071051)

摘 要:研究了在液体木屑培养基中添加 0.005、0.01、0.015 mg/mL 浓度的氨基寡糖对 3 株侧耳发酵液中漆酶活性的影响,结果表明:氨基寡糖对侧耳漆酶的产生有明显地促进作用,3 株侧耳菌株在氨基寡糖液体木屑培养基中均有漆酶活性,酶活随发酵时间和氨基寡糖浓度而变化,冀微 961 糙皮侧耳在 0.01 mg/mL 氨基寡糖浓度,第 10 d 时漆酶酶活达到最高 238 U/mL,比对照增加 49.7%。漆酶参与木质素的降解,对木腐菌的生长有着直接的影响,氨基寡糖通过促进漆酶活性,影响侧耳的生长发育。

关键词:氨基寡糖;侧耳菌株;漆酶

中图分类号:S646.1+4

文献标识码:A

Effects of Oligosaccharin on the Activity of Laccase in *Pleurotus* sp. . Fermented Liquid

LI Jun, ZHANG Shu-yan, ZHAO Cong-bo, CHEN Wen-jie

(Hebei Institute of Microbiology, Baoding 071051, China)

Abstract: The effects of adding 0.005, 0.01, 0.015 mg/mL oligosaccharin on activity of laccase in the liquid medium containing sawdust of three stains *Pleurotus* sp. were studied. The results showed that three concentration of oligosaccharin all had marked effects to the activity of laccase. The most obvious effect was to 'Jiwei 961' *P. ostreatus*, in which the activity of laccase in the fermented liquid reached to 238U/mL when added 0.01mg/mL oligosaccharin and cultivated for 10 days. That is 49.7% more than the contrast which no oligosaccharin was added. The laccase can accelerate the degradation of lignin, which have great effect on the growth of wood-rot fungi. Oligosaccharin can promote the growth of *P. sp.* by enhancing the activity of laccase.

Keywords: Oligosaccharin; *Pleurotus* sp.; Laccase

侧耳属(*Pleurotus*)食用菌是目前我国栽培量最大的菇类,近年来开发出来的珍稀侧耳种类如白灵菇、阿魏菇、杏鲍菇、鲍鱼菇等,多数为我国独有的食用菌菌种资源,经济价值很高,国内外市场前景广阔,极具发展潜力^[1]。

漆酶(Laccase 简称 Lac EC1.10.3.2)是很早就被认识的一类含铜的多酚氧化酶,广泛分布于真菌中,尤其是与木质素降解酶有关的担子菌中。目前较流行的看法是:漆酶、木质素氧化物酶(Lignin peroxidase)和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase)都是参与木质素降解的关键酶^[2]。据李辉

的研究,漆酶降解木质素,其降解的产物可为金针菇菌丝体的生长提供所需的营养,发酵液中漆酶活性越高,表明菌株的分解能力越强,菌丝生长越旺盛^[3]。

近年来国内外许多研究发现,寡聚糖类物质作为一种安全无毒的农药被证实可有效地诱导植物产生防御反应、提高植物抗逆能力、调节植物生长,其具有重要的研究价值^[4-6]。据报道氨基寡糖能促进平菇菌丝的生长,提高其产量^[7]。但氨基寡糖在发酵液中对侧耳漆酶活性的影响未见有报道,为此,笔者研究了氨基寡糖对发酵液中侧耳漆酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2012-10-17

作者简介:李 军(1962-),女,高级工程师,从事微生物发酵和农业微生物方面的研究。

1.1.1 菌种

白灵 1 号:白灵侧耳(*Pleurotus nebrodensis*)、冀微 961 糙皮侧耳(*P.ostreatus*)、杏鲍菇 2 号:刺芹侧耳(*P.erynjii*)。以上菌种由本所食用菌研究室提供。

1.1.2 试剂

氨基寡糖,大连中科格莱克生物科技有限公司生产,分子量小于等于 2 000。邻联甲苯胺,上海化学试剂总厂产,分析纯试剂。其他化学试剂,均为商品分析纯或化学纯试剂。

1.1.3 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

PDA 加富培养基:马铃薯 200 g、麸皮 50 g、葡萄糖 20 g、蛋白胨 2.0 g、硫酸镁 1.5 g、维生素 B₁ 10 mg、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

木屑培养基:马铃薯 200 g、麸皮 50 g、葡萄糖 20 g、木屑(粉碎过 60 目筛)50 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 氨基寡糖溶液的制备

称取 1 g 氨基寡糖定溶于 100 mL 蒸馏水中,制成 1%的氨基寡糖溶液,取一定量的溶液加到装有 100 mL 液体木屑培养基的三角瓶中,使培养基中氨基寡糖的浓度分别为 0.005、0.01、0.015 mg/mL,即处理 1、处理 2、处理 3,以不加氨基寡糖的木屑培养基为对照,每处理 3 次重复。

1.2.2 漆酶的制备和提取

将 PDA 斜面培养基保存的母种转接至 PDA 加富培养基平板中,25℃避光培养 5~6 d 后,用直径 1 cm 打孔器取 2 个活化菌块,转接入装有 100 mL 木屑培养基的 500 mL 三角瓶中,25℃,160 r/min 摇床上避光培养 4~5 d 后,开始测漆酶活性,直到 14~16 d 后结束。将培养液过滤,滤液即为含有漆酶的粗酶液,适当稀释备用。

1.2.3 漆酶的测定^[8]

1 mol/L pH4.6 的醋酸缓冲液 3.4 mL,加入 3.36 mmol/L 的邻联甲苯胺 0.5 mL,再加入适当稀释的粗酶液 0.1 mL,25℃保温 30 min,用 Beckman DU 700 紫外/可见分光光度计测 600 nm 处光密度(OD 值),同时以 0.1 mL 煮沸的粗酶液为对照,酶活力以样品与底物反应 30 min 后光密度的改变值表示,以每分钟光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位(U/mL)。

2 结果和分析

由图 1、2、3 可见,3 株侧耳菌在木屑培养基中培养 4 d 后,均能测到漆酶活性,三者之间没有明显的差别,冀微 961 糙皮侧耳稍高,其他二株基本相同;漆酶活性随着发酵时间和氨基寡糖浓度的增加而提高,其中冀微 961 糙皮侧耳在 0.01 mg/mL 氨基寡糖浓度,第 10 d 时漆酶活性达到最高 238 U/mL,比对照增加 49.7%,见图 1;氨基寡糖与侧耳菌株能否产漆酶无关,但氨基寡糖的浓度与菌株产漆酶的量有关,总的趋势是随着氨基寡糖浓度的增加,漆酶活性提高,产酶高峰提前;但是在氨基寡糖浓度增加到 0.015 mg/mL 时,酶活达到最高峰后下降较快,其他浓度时酶活稍有下降但不明显。

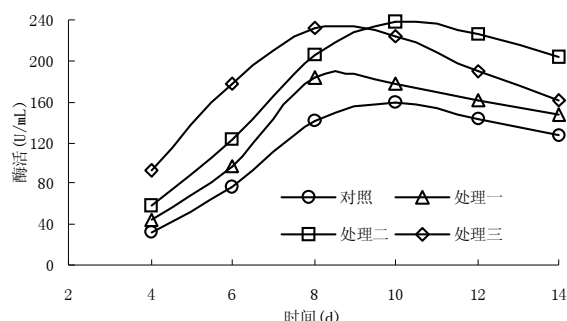


图 1 氨基寡糖对糙皮侧耳冀微 961 产漆酶的影响

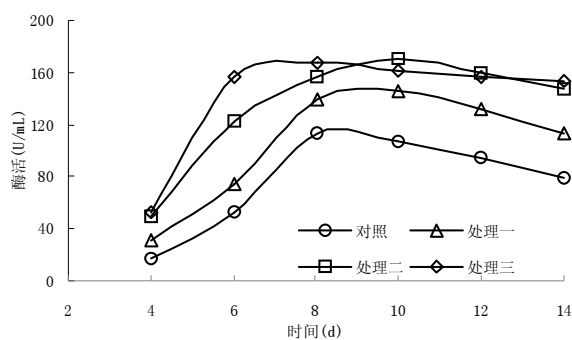


图 2 氨基寡糖对刺芹侧耳杏鲍菇 2 号产漆酶的影响

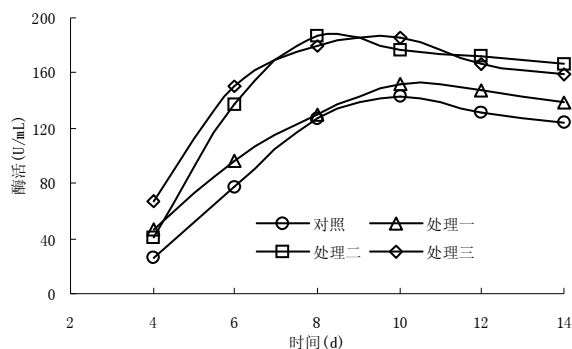


图 3 氨基寡糖对白灵侧耳白灵 1 号产漆酶的影响

还能抑制毛癣菌和白假丝酵母等人类病原真菌,可用于真菌引起的指甲及皮肤病的治疗。

3 药用植物内生菌研究中存在的一些问题

内生菌生活在药用植物体内,与药用植物在长期的协同进化过程中形成了特殊的生活环境,这就使内生真菌的体外培养实验中容易出现一些问题。(1) 由于某些专性寄生的内生菌不易在人工培养基上生长,因此还不能够分离出全部的内生菌。(2) 在培养中虽然有选择性地分离真菌、细菌或放线菌等菌类,但在长期培养中,往往受到污染,表面消毒不能达到消除污染的目的。如在分离培养中,虽然常采用组织块法分离真菌,但一些生长缓慢的真菌常被生长快的菌物所覆盖,同样增加了分离的难度和准确性。(3) 内生菌脱离了药用植物体内在体外继代培养过程中会出现退化,甚至死亡现象。(4) 不产孢菌株比例较高,此类菌无法用经典形态学方法进行鉴定。(5) 内生菌体外培养合成次生代谢产物的含量较低。目前虽然分离出不少能产生植物次生代谢产物的菌株,但应用于生产的几乎为零,如何使内生菌在体外大量繁殖,并提高其次代产物的合成能力是一个关键性问题,也是实现内生菌代替药用植物进行次生代谢产物工厂化生产的前提。

4 展 望

开发药用植物内生菌有着良好的前景,其中从内生菌的代谢产物中寻找新型活性物质,是内生菌目前研究的主流。利用药用植物内生菌资源,筛选药用活性物质或新型化合物,为研制新药解决我国某些药用植物资源缺乏、生态平衡破坏等问题提供了一条新的途径,丰富了药物的资源。

(上接第 93 页)

3 结 论

漆酶参与木质素的代谢,可促进木腐菌的生长,漆酶活性对食用菌发酵生产有着直接的影响,氨基寡糖对侧耳漆酶的产生有明显的促进作用,可促进侧耳的生长发育,这与刘尚旭等^[2]、王谦等^[7]的研究结论一致。但氨基寡糖对漆酶产生的影响机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 万鲁长,黄春燕,单洪涛,等. 11 个优良侧耳菌株的同工酶及可溶性蛋白综合分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, 37(4): 499-504.

参考文献:

- [1] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌的研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881.
- [2] Flsher PJ, Petrino, Seott H M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize [J]. New Phytol, 1992(122): 299-305.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Paific yew* (*taxus brevifolia*) [J]. Science, 1993, 260(5105): 214.
- [4] 庞 蕾,严铸云,郭晓恒,等. 厚朴内生真菌的研究:菌种分离及其鉴定[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 2013-2014.
- [5] 张集慧,王春兰,郭顺星,等. 兰科药用植物的 5 种内生真菌产生的植物激素[J]. 中草药, 1999, 21(6): 460.
- [6] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. Plant Sci, 2000(151): 67-73.
- [7] 张宝俊,张家榕,韩巨才,等. 梨树内生细菌 LP-5 的鉴定及其促生作用研究[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 249-253.
- [8] 江东福,马 萍,张玲琪,等. 龙血树真菌群及其对血竭形成的影响[J]. 云南植物研究, 1995(17): 79.
- [9] 江东福,马 萍,杨 靖,等. 9568D 镰孢霉作用于死态龙血树形成血脂的研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 477-478.
- [10] 陈晓梅,郭顺星,王春兰. 四种内生真菌对金钱莲无菌苗生长及多糖含量的影响[J]. 中国药杂志, 2005, 40(1): 13-16.
- [11] 戴传超,余伯阳,薛 菲,等. 药用植物大戟悬浮细胞的培养[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(2): 57-60.
- [12] Boller T. Chemopereception of microbial signal in plant cells [J]. Annu Rev Physiol Plant Biol, 1995(46): 189-214.
- [13] 宁 文,曹日强. 米曲霉中紫草色素诱导物对滇紫草细胞代谢的影响[J]. 植物生理学报, 1996, 22(1): 74-80.
- [14] Eilert U, Kurz W G, Constabel F. Stimulation of sanguinarine accumulation in *papaver somniferum* cell cultures by fungal elieitors [J]. J. plant physiol, 1984(119): 65-76.
- [15] 孙力军,陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 78.
- [16] Strobel G A, Miller R V, Miller C, et al. Cryptocandin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* [J]. Org. Lett, 2000(2): 767-770.
- [2] 刘尚旭,董佳里,张义正. 糙皮侧耳 *Ax3* 产漆酶条件及部分酶学性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(1): 160-163.
- [3] 李 辉. 壳聚糖对金针菇发酵液中三种胞外酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2001(2): 146-147.
- [4] 马 青,孙 辉,杜昱光,等. 氨基寡糖素对黄瓜白粉病菌侵染的抑制作用[J]. 菌物学报, 2004, 23(3): 423-428.
- [5] 邵素琴,李建中. 植物诱抗剂研究进展 [J]. 农药, 2002, 41(6): 12-14.
- [6] 孔繁祚. 寡糖类农药的研制 [J]. 环境化学, 2000, 19(4): 293-299.
- [7] 王 谦,王 璞,王士奎. 氨基寡糖素对两株侧耳营养及生殖生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(7): 1933, 1935.
- [8] 王宜磊,邓振旭,朱 陶,等. 彩绒革盖菌 CV-8 漆酶活性的初步研究[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(4): 60-62.