

桑黄菌发酵过程中酶活性的变化

祝子坪*, 李 娜

台州学院生命科学学院, 浙江 台州 318000

摘 要: **目的** 研究桑黄菌发酵过程中酶活性的变化及其和胞外多糖量的关系。**方法** 在发酵过程中测定原始菌株和变异菌株的羧甲基纤维素酶、滤纸酶、木质素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)、漆酶(Lac)活性变化及培养基中胞外多糖量变化。**结果** 2菌株的羧甲基纤维素酶和滤纸酶的活性变化呈单峰曲线, 分别在第4天和第6天达到峰值; 原始菌株和变异菌株的LiP、锰过氧化物酶和漆酶活性的变化呈双峰曲线, 且原始菌株和变异菌株LiP的酶促反应米氏常数(K_m)分别为25.96、27.07 $\mu\text{g/mL}$; MnP的 K_m 分别为13.28、13.49 mmol/mL; Lac的 K_m 分别为0.12、0.21 mmol/mL; 培养基中多糖量前期快速下降, 10 d后趋于稳定。**结论** 桑黄菌发酵时能产生较全面的分解木质素和纤维素的酶系统, 原始菌株和变异菌株产生的LiP和MnP为同种酶, Lac为同工酶。桑黄菌胞外酶活性变化和培养基中胞外多糖量变化有一定关系。

关键词: 桑黄菌; 发酵过程; 酶活性; 羧甲基纤维素酶; 滤纸酶; 木质素过氧化物酶; 锰过氧化物酶; 漆酶

中图分类号: R282.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)03-0420-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.022

Changes of enzyme activity during fermentative process of *Phellinus igniarius*

ZHU Zi-ping, LI Na

School of Life Science, Taizhou University, Taizhou 318000, China

Abstract: **Objective** To study the changes of enzyme activity and its relationship with the content of extracellular polysaccharide during the fermentative process of *Phellinus igniarius*. **Methods** The enzyme activities of carboxymethyl cellulase (CMC), filter paper enzyme (FPE), lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), laccase (Lac), and medium extracellular polysaccharide content during the fermentative process of the original strains and mutant strains were investigated. **Results** The results showed that the changes of CMC and FPE activities of two strains showed a single-peak curve, peaks of which appeared in days 4 and 6, respectively, but the changes of LiP, MnP, and Lac activities showed a double-peak curve, and the Michaelis constant K_m values of LiP in the original strains and mutant strains were 25.96 and 27.07 $\mu\text{g/mL}$. At the same time, the K_m values of MnP were 13.28 and 13.49 mmol/mL, and K_m values of Lac were 0.12 and 0.21 mmol/mL, respectively. Medium extracellular polysaccharide content declined rapidly and then tended stable after 10 d. **Conclusion** *P. igniarius* could produce a comprehensive enzyme system which could decompose lignin and cellulose during the fermentative process. LiP and MnP produced by the original strains and mutant strains are the same enzyme respectively, but Lac is isoenzyme. The activity changes of extracellular enzyme in *P. igniarius* have the relationship with the content of medium extracellular polysaccharide.

Key words: *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel; fermentation process; enzyme activity; carboxymethyl cellulase; filter paper enzyme; lignin peroxidase; manganese peroxidase; laccase

桑黄菌 *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel 为传统药用真菌, 多年生, 在我国大部分地区均有分布^[1], 由于受生物特性和外部环境的制约, 野生桑黄菌子实体稀少, 且栽培不易成功。研究发现, 桑黄菌多糖是桑黄菌主要药效成分, 具有较好的抗肿瘤效果^[2]; 发酵所得菌丝多糖与子实体多糖功效一致^[3]。因发

酵培养周期短, 不受季节和环境的限制, 可以大幅度降低桑黄作为新药开发的成本, 所以现在桑黄菌生产研究主要是发酵生产^[4-6]。

发酵工业就是利用生物的生命活动产生的酶, 对无机或有机原料进行酶加工, 获得产品的工业^[7-9]。桑黄菌生长发育过程中向培养基中分泌多种胞外

收稿日期: 2013-04-19

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ12C02001)

作者简介: 祝子坪 (1975—), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然产物活性成分研究。E-mail: zhuzp123@sohu.com

酶, 这些胞外酶可将培养基中的淀粉、纤维素、木质素等大分子物质水解成小分子物质供菌丝吸收利用, 可见酶在发酵过程中起着重要作用。本实验研究了在发酵过程中桑黄菌产纤维素酶和木质素酶活性的变化, 对于进一步研究桑黄菌的营养生理奠定了基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

菌株: 原始菌株(CK), 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌株编号为 5.95; 变异菌株(PV), 原始菌株经激光-紫外线复合诱变后筛选的菌株, 经鉴定发生了变异。

磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锰、亚甲基蓝、酒石酸钠、愈创木酚、琥珀酸钠、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、醋酸钠、冰醋酸等均为国产分析纯。

培养基: 液体种子培养基, 由葡萄糖 35 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.5 g 组成, 加自来水配制至 1 000 mL。发酵培养基, 由小麦粉 51.6 g、米糠 13.8 g、磷酸二氢钾 0.94 g、硫酸镁 0.54 g 组成, 加自来水配制至 1 000 mL。

1.2 仪器

WFJ7200 型可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; LD5—2A 型离心机, 北京医用离心机厂; SPX—250B 生化培养箱, 常州国华电器有限公司; SHZ—88A 型恒温水浴振荡器, 江苏太仓市实验设备厂; PHS—2C 型精密酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; YC—211 恒温培养摇床, 上海福玛实验设备有限公司。

2 方法

2.1 菌种的发酵

发酵菌种培养, 500 mL 三角瓶中装 200 mL 种子培养基, 接活化后的斜面菌种, 于培养箱中 28 ℃ 静止培养, 早晚各摇动 1 次, 待培养基中均匀布满絮状洁白菌丝时停止培养, 放在 4 ℃ 冰箱中备用。

发酵条件为 250 mL 三角瓶装 120 mL 发酵培养基, 接液体菌种 17 mL, 在温度 26 ℃、转速 135 r/min 条件下发酵培养。发酵过程中每 2 天取样 1 次, 取样发酵液 4 ℃ 冷冻离心(8 000 r/min, 15 min), 上清液为粗酶液, 测酶活性和多糖量, 连续测 10 次, 每次 3 次重复, 取平均值。

2.2 羧甲基纤维素酶(CMC)活性的测定

取 0.2 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.8)配制的 CMC-Na 溶液 1 mL, 加入 1 mL 适当稀释的酶液,

于 50 ℃ 反应 30 min, 然后加入 2 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min, 于 530 nm 比色^[10], 测定吸光度(*A*)值, 以 *A* 值的变化来表示酶活性的变化。

2.3 滤纸纤维素酶(FPE)活性的测定

试管中加 50 mg 滤纸、1 mL 适当稀释的粗酶液和 1 mL 0.2 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 4.8), 于 50 ℃ 反应 60 min 后加入 2 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min, 于 530 nm 比色^[9], 测定 *A* 值, 以 *A* 值的变化来表示酶活性的变化。

2.4 木质素过氧化物酶(LiP)活性的测定

取 1.2 mmol/L 的亚甲基蓝(MB) 0.1 mL、0.5 mol/L 的酒石酸钠缓冲液(pH 4.0) 0.6 mL、酶液 2.2 mL 混匀, 加 2.7 mmol/L 的 H₂O₂ 0.1 mL 混匀启动反应。基本原理是在 LiP 的催化下, MB 发生脱甲基反应, 转化为天青, 在 664 nm 处测定 *A* 值的减少^[12]。酶活测定用何为等^[13]提供的方法并加以改进, 启动反应后每分钟纪录 1 次 *A* 值, 连续纪录 6 min, 作 *A* 值随时间变化的曲线, 用曲线最初部分的斜率求酶活力, 1 个酶活力单位(U)是指在上述条件下, 每分钟催化 1 mmol MB 氧化所需的酶量。

2.5 锰过氧化物酶(MnP)活性的测定

在 0.1 mol/L 的酒石酸钠缓冲液(pH 4.5)内加入 0.1 mmol/L H₂O₂ 和 1 mmol/L MnSO₄, 以愈创木酚(DMP)为底物, 加入酶液后于 469 nm, 30 ℃ 条件下测定其 *A* 值在单位时间内的变化, 上述各试剂浓度均为终浓度^[14]。酶活性测定方法与“2.4”项相同, 1 U 是指在上述条件下, 每分钟催化 DMP 氧化生产 1 mmol 产物所需的酶量。

2.6 漆酶(Lac)活性的测定

10 mL 反应液中含 5 mmol/L 琥珀酸钠缓冲液(pH 4.5) 1 mL, 4 mmol/L DMP 1 mL 和 0.5 mL 粗酶液。于 469 nm, 30 ℃ 条件下测定 *A* 值在单位时间内的变化^[15]。酶活测定方法与“2.4”项相同, 1 U 是指在上述条件下, 每分钟催化 DMP 氧化生产 1 mmol 产物所需的酶量。

2.7 胞外多糖的测定

发酵液取样后离心, 取上清液, 按文献方法^[16]测定发酵液中多糖量。

3 结果与分析

3.1 CMC 活性的变化

从图 1 可知, 桑黄菌在发酵培养初期便能检测到 CMC 的活性, 此后酶活性迅速升高, 第 4 天达

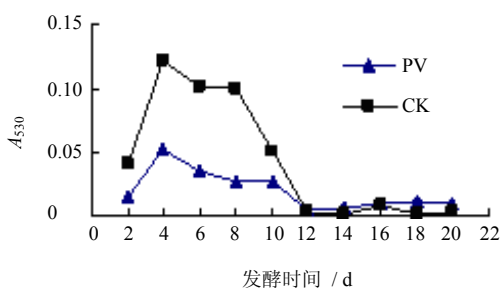


图 1 发酵过程中 CMC 的活性变化

Fig. 1 Changes of CMC activity in fermentation process

到峰值,此后酶活性降低,到第 12 天时基本降到最低值,以后酶活性很弱。这可能是因为,一方面发酵 4 d 后,菌丝逐渐衰老,向胞外分泌酶的能力减弱;另一方面纤维素酶催化分解培养基中的纤维素在持续进行,导致酶活性不断降低。两菌株比较,CK 菌株产酶活性高于 PV。

3.2 FPE 活性的变化

从图 2 可知,发酵过程中 CK 产 FPE 的活性达到峰值时间是在第 6 天, PV 是在第 4 天。第 6 天以后两菌株的酶活性迅速下降, PV 下降的较快,到第 10 天酶活性基本降到最低值,而 CK 酶活性下降较慢,到第 16 天时降到最低值,这可能是因为 CK 衰老较慢的原因。

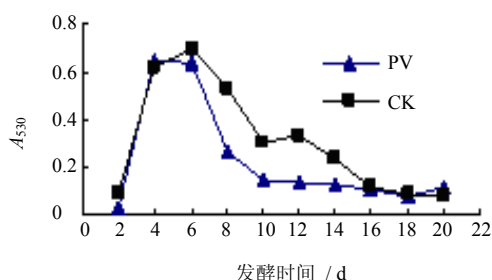


图 2 发酵过程中 FPE 活性的变化

Fig. 2 Changes of FPE activity in fermentation process

3.3 LiP 活性的变化及动力学参数测定

从图 3 可知,在发酵过程中 CK 的 LiP 活性在第 8 天时达到最大值,以后呈总体下降趋势; PV 在第 4 天时达到最大值,以后酶活性降低,但保持了一段平稳期,到第 14 天后酶活性才明显下降。LiP 最初是从黄孢原毛平革菌中发现,但黄孢原毛平革菌产酶是在主要营养物质(如氮、碳、硫)受限制时产生^[17],对于别的白腐菌产 LiP 的报道较少,本实验

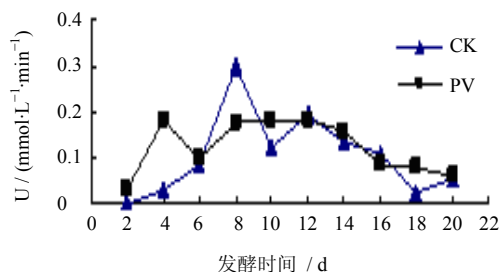


图 3 发酵过程中 LiP 活性的变化

Fig. 3 Changes of LiP activity in fermentation process

在正常发酵条件首次检测到 LiP 活性。发酵 8 d 时用双倒数做图法对 CK 和 PV 产生的 LiP 测动力学,计算酶促反应米氏常数 (K_m) 分别为 25.96、27.07 $\mu\text{g/mL}$,可见两菌株产生的 LiP 的 K_m 基本一致,因此可以推测两菌株产生 LiP 是同种酶。

3.4 MnP 活性的变化及动力学参数测定

从图 4 可知,在发酵过程中两菌株产生的 MnP 活性变化趋势基本相同。PV 在第 4 天时达到峰值,以后酶活性处于动态变化之中,总的来说呈下降趋势;CK 在第 2 天到第 4 天时酶活性增加较快,第 4 天到第 8 天酶活性增加缓慢,第 8 天时达到峰值,此后酶活性降低,两菌株在 14 d 时都有酶活性增高现象,以后又迅速降低。发酵 4 d 时对两菌株的 MnP 动力学研究, PV 与 CK 产生的 MnP 的 K_m 分别为 13.49、13.28 mmol/mL,两值基本一致,可以推测为同种酶。

3.5 Lac 活性变化及动力学参数测定

Lac 是一类可降解木质素的多酚氧化酶,存在于担子菌、半知菌和子囊菌中,但其中最主要的生产者是担子菌中的白腐菌^[18],所以桑黄菌也是生产 Lac 的主要菌种。从图 5 可知,在发酵过程中, PV 从第 2 天到第 4 天 Lac 活性迅速升高,第 4 天时即达到峰值,此后酶活性降低,到 14 d 后突然升高,第 18 天时已检测不到酶活性;CK 的 Lac 活性在 8 d 时达到峰值,变化趋势和 PV 基本一致。对两菌株

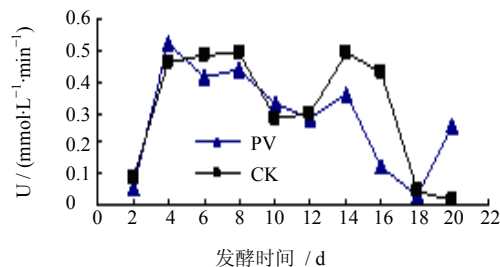


图 4 发酵过程中 MnP 活性的变化

Fig. 4 Changes of MnP activity in fermentation process

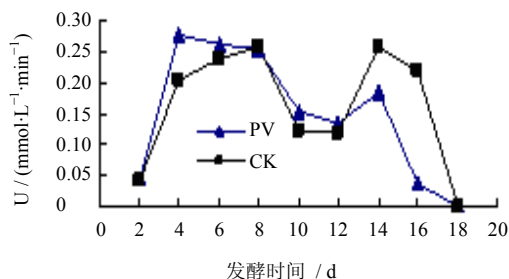


图 5 发酵过程中 Lac 活性的变化

Fig. 5 Change of Lac activity in fermentation process

Lac 动力学研究, PV 与 CK 发酵 4 d 时该酶的 K_m 分别为 0.21、0.12 mmol/mL, 两值略有差异, 可能是同功酶。

3.6 多糖量变化

从图 6 可知, 在发酵过程中, 发酵液中多糖量呈下降趋势。这可能是因为开始时培养基中米糠和小麦粉溶在发酵液中多糖较多, 随着发酵进行, 发酵液中的培养基多糖作为碳源被消耗, 同时菌丝也向发酵液释放桑黄菌多糖, 但量较少, 所以总多糖量呈下降趋势。PV 到第 8 天、CK 到第 10 天后发酵液中多糖量趋于稳定, 这可能是因为这时菌丝生物产量基本达到最大值, 对培养基中碳源消耗减少, 部分菌丝开始衰老溶解, 往发酵液释放多糖较多, 致使培养基中多糖量趋于稳定。

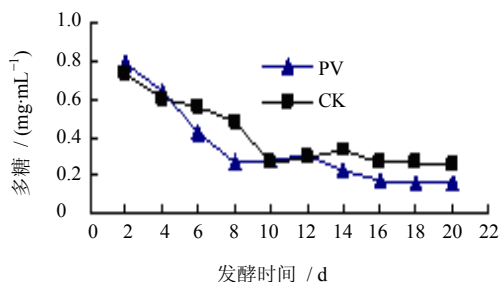


图 6 发酵过程中发酵液多糖量的变化

Fig. 6 Changes of polysaccharides content in fermentation liquid in fermentation process

4 讨论

从实验可知, 桑黄菌具有较全面的分解木质素和纤维素的酶系统, 尤其是分解木质素的 3 种酶, 桑黄菌在正常发酵过程中都能够产生, 这可能和桑黄菌具有忍耐和抵抗能力生长策略, 能在野外广泛分布, 普遍生长在许多种阔叶树上的原因有关。

在摇瓶发酵过程中, LiP、MnP、Lac 及纤维素酶均能检测到活性且活性处于动态变化之中。PV

和 CK 菌株的这几种酶活性基本上都在第 4 天或第 8 天达到峰值, 且 PV 达到峰值的时间与 CK 菌株相比一般较短。对 LiP、MnP、Lac 的酶动力学参数进行了测定, PV 产酶能力和 CK 相比虽然发生了变化但米氏常数基本一致, 可见 PV 这 3 种酶的特性基本没有产生明显变化。

发酵培养基中的多糖量变化反映了桑黄菌碳代谢情况, 同时和胞外酶活性也有密切关系。胞外酶活性较高的时期是桑黄菌自身多糖合成旺盛时期, 此时培养基多糖作为碳源被快速消耗。比较各图可知, 发酵时间 4~8 d 是桑黄菌各胞外酶活性比较高的时期, 同时也是培养基中多糖量下降较快的时期, 此时培养基多糖向桑黄菌多糖快速转化。10 d 后桑黄菌各胞外酶活性总体呈下降趋势, 同化能力降低, 桑黄菌自身菌体多糖的合成与释放达到平衡, 培养基中总多糖量虽然趋于稳定, 但培养基中多糖成分发生了很大变化, 培养基中原有多糖大都转化为桑黄菌多糖。

参考文献

- [1] 戴玉成. 药用担子菌-鲍氏层孔菌 (桑黄) 的新认识 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 94-95.
- [2] Kim G Y, Choi G S, Lee S H, et al. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(1): 69-76.
- [3] 郑立军, 王 清, 季俊虬, 等. 药用真菌-桑黄的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(3): 61-64.
- [4] Hwang H J, Kim S W, Choi J W, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190 [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33: 309-319.
- [5] 胡文彬, 马海乐, 周存山. 桑黄菌液体发酵培养基及发酵条件研究 [J]. 中国食用菌, 2006, 25(3): 49-52.
- [6] 陈瑞蕊, 施亚琴, 林先贵, 等. 珍稀药用真菌桑黄菌液体培养条件的初步研究 [J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 41-44.
- [7] 李 艳. 发酵工业概论 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] Mandels M, Hontz L, Nystrom J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1974, 16: 1471-1493.
- [9] 都晓伟, 牟晋超, 孟凡佳, 等. 内生真菌固体发酵提高穿山龙中薯蓣皂苷元的研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 179-181.

- [10] 于建兴, 沈洁, 陆筑凤, 等. 竹黄菌的液体发酵及生物学活性研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 26-29.
- [11] 燕红, 杨谦, 王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究 [J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 83-86.
- [12] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [13] 何为, 詹怀宇, 王习文, 等. 一种改进的漆酶酶活检测方法 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2003, 31(12): 46-50.
- [14] Martinez M J, Ruiz F J, Guillen F, *et al.* Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Plwuratus eryngii* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 237: 424-432.
- [15] 张龙翔. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1985.
- [16] 祝子坪, 李娜. 桑黄菌胞外多糖产量的测定 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 112-114.
- [17] Bumpus J A, Tien M, Wright D, *et al.* Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus [J]. *Science*, 1985, 228: 1434-1436.
- [18] 王佳玲, 余惠生, 付时雨, 等. 白腐菌漆酶研究进展 [J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 233-236.