

# 皱马鞍菌液体培养过程中胞外酶 及还原糖的动态变化

胡景江<sup>a</sup>, 王俊明<sup>a</sup>, 张高伟<sup>a</sup>, 曹支敏<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院; b. 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 对皱马鞍菌(*Helvella crispa*)液体培养过程中不同胞外酶活性和还原糖含量的动态变化进行了研究。结果表明,在28℃、110 r/min恒温振荡培养条件下,皱马鞍菌菌丝体生物量在第13天达峰值(9.40 g/L);发酵液pH值逐渐上升,从第9天(8.24)后基本保持平稳;胞外蛋白含量于第6天达峰值(8.30 mg/mL);胞外还原糖含量急剧上升,至第3天达峰值(20.43 mg/mL),之后迅速下降,到第8天降为1.38 mg/mL,此后一直维持在1 mg/mL水平。皱马鞍菌对碳水化合物的利用顺序为淀粉、纤维素、木质素。淀粉酶的活性高峰出现在第3天,并一直保持在较高水平;CMC酶6 d后急剧分泌,第7天达峰值,之后又急速下降;愈创木酚氧化酶和多酚氧化酶活性高峰出现最晚,均在第14天。酸性蔗糖转化酶活性在培养期间始终很低,而中性蔗糖转化酶活性呈阶梯上升趋势。

**[关键词]** 皱马鞍菌;液体培养;还原糖;蔗糖酶;淀粉酶;CMC酶;愈创木酚氧化酶

**[中图分类号]** S646.701

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)11-0094-05

皱马鞍菌又称皱柄白马鞍菌,属于子囊亚门(Ascomycotina)、盘菌纲(Discomycetes)、盘菌目(Pezizales)、马鞍菌科(Helvellaceae)、马鞍菌属(*Helvella*)<sup>[1]</sup>。《中国真菌总汇》共记载了18种马鞍菌,其中皱马鞍菌[*Helvella crispa* (Scop.) Fr]是最常见的、惟一可食用的马鞍菌。皱马鞍菌子实体较小,菌盖初始呈马鞍形,之后张开呈不规则瓣片状,2~4 cm,白色到淡黄色;子实层生于菌盖表面,柄白色,圆柱形,有纵生深槽,形成纵棱;大多生于落叶林中,单生或群生,在我国分布较广<sup>[1~3]</sup>。

目前,国内对马鞍菌的研究很少,还没有人工驯化培养的报道。本文采用液体培养的方法,研究了皱马鞍菌在液体培养过程中多糖降解酶活性的变化规律,以及菌丝体生物量、pH值、胞外还原糖的动态变化,旨在探讨其营养生理特性,以为马鞍菌的人工驯化培养及开发利用提供理论依据和技术指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 皱马鞍菌菌种 由采自火地塘地区的马鞍菌子实体分离获得。

1.1.2 培养基 固体培养基:PGA培养基,其组成

为葡萄糖20 g/L,蛋白胨2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, V<sub>B1</sub> 0.5 mg/L, 琼脂20 g/L。

液体发酵培养基:察氏(Czapek)培养基,其成分为蔗糖30 g/L, NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L<sup>[4]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种的纯化 将经过表面灭菌的皱马鞍菌菌体接入固体培养基,28℃恒温培养。

1.2.2 种子培养 将配制好的液体发酵培养基分装于75 mL/250 mL三角瓶中,灭菌冷却后接入已经纯化的直径0.5 cm、菌龄7 d的平板菌种3片,28℃、110 r/min恒温摇床培养7 d。

1.2.3 液体培养 在装有100 mL/250 mL的液体发酵培养基中接入体积分数5%的菌种培养液,28℃、110 r/min恒温摇床培养<sup>[5,6]</sup>。

1.2.4 胞外粗酶液制备 每隔24 h取样1次,用脱脂滤纸过滤2次,3 000 r/min离心10 min,取上清液4℃保存备用。

1.2.5 菌丝体生物量的测定 过滤后的菌丝体用蒸馏水冲洗数次后,在60℃恒温干燥至恒重,用分

**[收稿日期]** 2005-03-28

**[基金项目]** 教育部优秀博士论文基金项目(200057)

**[作者简介]** 胡景江(1957-),男,陕西定边人,教授,主要从事植物逆境生理及生态学研究。

析天平称重。

1.2.6 pH 值的测定 采用雷磁 PHS-3C 精密 pH 计测定。

1.2.7 胞外蛋白含量的测定 用双缩脲法<sup>[7]</sup>。3 mL 适当稀释的酶液加 2 mL 双缩脲试剂,摇匀,测定 OD<sub>540</sub>,以蒸馏水为对照。

1.2.8 还原糖含量的测定 用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定<sup>[8]</sup>。

1.2.9 淀粉酶活性的测定 用 DNS 法。1.0 mL 适当稀释的酶液加 10 g/L 可溶性淀粉(用 pH 5.6 的柠檬酸缓冲液配制)2 mL,37 °C 保温 30 min,然后沸水浴 10 min,冷却后取反应液 0.5 mL,加 DNS 试剂 1.5 mL,煮沸 5 min,加水 8 mL,冷却后测定 OD<sub>540</sub>,以煮沸灭活的酶液为对照,以 OD<sub>540</sub> 每增加 0.01 为 1 个酶活单位(U)<sup>[7]</sup>。

1.2.10 CMC 酶活性的测定 2 mL 酶液加 1 mL 50 g/L CMC-Na(羧甲基纤维素钠, pH 5.0 柠檬酸缓冲液配制),50 °C 保温 1 h,取反应液 0.5 mL 加 DNS 试剂 1.5 mL,煮沸 5 min,加水 8 mL,冷却后测定 OD<sub>540</sub>,以煮沸灭活的酶液为对照,以 OD<sub>540</sub> 每增加 0.01 为 1 个酶活单位(U)<sup>[9]</sup>。

1.2.11 愈创木酚氧化酶活性的测定 0.1 mol/L pH 4.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液 3.0 mL,粗酶液 0.5 mL,80 mmol/L 愈创木酚 0.5 mL,摇匀,28 °C 保温 30 min,测定 OD<sub>465</sub>,以煮沸灭活的酶液为对照,以

OD<sub>465</sub> 每增加 0.01 为 1 个酶活单位(U)<sup>[4,10]</sup>。

1.2.12 多酚氧化酶活性的测定 pH 6.0 的磷酸缓冲液 3.0 mL,粗酶液 0.5 mL,10 mmol/L 邻苯二酚 0.5 mL,摇匀,28 °C 保温 30 min,测定 OD<sub>400</sub>,以煮沸灭活的酶液为对照,以 OD<sub>400</sub> 增加 0.01 为 1 个酶活单位(U)<sup>[4,11]</sup>。

1.2.13 酸性和中性蔗糖转化酶活性的测定 酶液 0.5 mL,加 10 g/L 蔗糖溶液 2.5 mL(酸性和中性蔗糖溶液分别用 pH 4.6 和 pH 7 的磷酸缓冲液配制),37 °C 保温 30 min,取反应液 0.5 mL,加 DNS 试剂 1.5 mL,煮沸 5 min,加水 8 mL,测定 OD<sub>540</sub>,以煮沸灭活的酶液为对照,以 OD<sub>540</sub> 增加 0.01 为 1 个酶活单位(U)<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌丝体生物量的变化

皱马鞍菌在整个液体培养过程中菌丝体生物量的变化曲线如图 1 所示。由图 1 可见,1~7 d 皱马鞍菌菌丝体生物量急速增长,质量浓度从 1.30 g/L 增加到 8.70 g/L,8~13 d 增长速度明显减缓,到第 13 天达到峰值,为 9.40 g/L,之后缓慢下降,到第 20 天已降为 7.30 g/L。培养 13 d 后菌丝体生物量的降低与液体培养过程中营养物质消耗、代谢物积累、pH 值变化等因素有关。

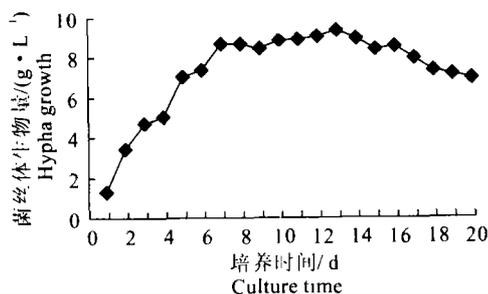


图 1 皱马鞍菌液体培养过程中菌丝体生物量的变化曲线

Fig.1 Growth curve of hypha

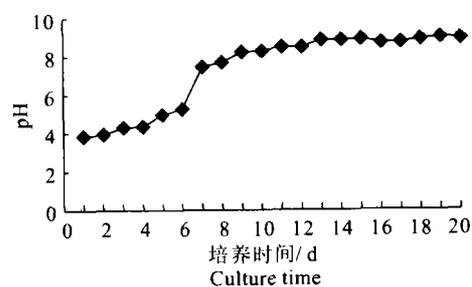


图 2 皱马鞍菌液体培养过程中发酵液 pH 值的变化曲线

Fig.2 pH curve of fluid medium

### 2.2 发酵液 pH 值的变化

图 2 为皱马鞍菌液体培养过程中发酵液 pH 值的变化曲线。由图 2 可见,1~9 d pH 值从 3.86 升高到 8.24,此后的 11 d 内 pH 值稳定在 8~9。说明皱马鞍菌在液体培养过程中产生了碱性物质。真菌生长一般喜欢偏酸的环境,而皱马鞍菌在培养过程中一直向环境中分泌碱性物质,使发酵液向偏碱性

方向发展。

### 2.3 胞外蛋白含量的变化

由图 3 可以看出,皱马鞍菌液体培养过程中胞外蛋白含量在 1~6 d 时由 0.44 mg/mL 迅速增加至 8.30 mg/mL,之后逐渐下降,第 12 天后趋于稳定。胞外蛋白质是菌丝体生长过程中产生并分泌到外界环境中的各种水解酶,如淀粉酶、纤维素酶、蛋

白酶以及木质素降解酶等。因此,液体培养过程中胞外蛋白质浓度的变化表明了菌丝体生长过程中胞外

酶的种类及数量的变化,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能力的变化。

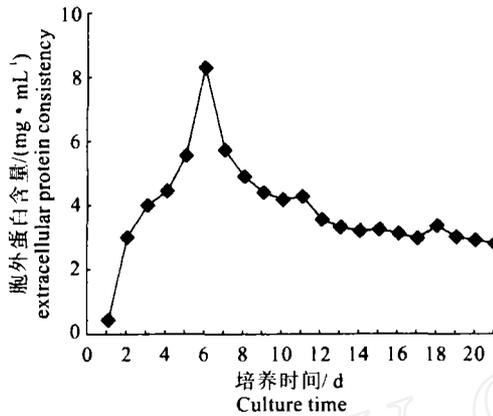


图 3 皱马鞍菌液体培养过程中胞外蛋白含量的变化

Fig. 3 Changes of extracellular protein consistency in the submerged culture of *Helvella crispa*

#### 2.4 胞外还原糖含量的变化

皱马鞍菌液体培养过程中胞外还原糖含量有一个明显的消长过程(图 4)。1~3 d 迅速增高并达到峰值(质量浓度由 5.85 mg/mL 增加至 20.43 mg/mL),之后迅速下降,到第 8 天降为 1.38 mg/mL,此后(9~11 d)一直维持在 1 mg/mL 水平。胞外还原糖是由菌丝体产生的蔗糖酶以及多糖降解酶分解外界碳水化合物而产生的,其含量的变化表明,菌丝体生长过程中对外界碳水化合物的分

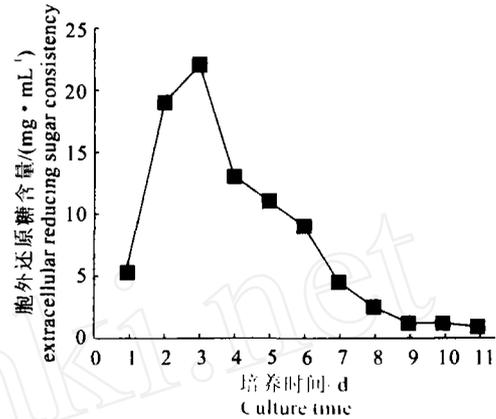


图 1 皱马鞍菌液体培养过程中胞外还原糖含量的变化

Fig. 1 Changes of extracellular reducing sugar consistency in the submerged culture of *Helvella crispa*

解及利用能力。3 d 后还原糖含量迅速降低,说明随菌丝体的迅速生长,大量的还原糖被吸收利用。还原糖的这种变化规律与俞苓等<sup>6</sup>对杏鲍菇研究中还原糖的变化一致。

#### 2.5 愈创木酚氧化酶及多酚氧化酶活性的变化

由图 5 可见,皱马鞍菌液体培养过程中愈创木酚氧化酶活性在液体培养 3 d 后出现并迅速增高,到第 14 天时达到峰值,其活性从 3 U 增至 52 U,此后酶活性急速下降,到第 19 天 时降至 2 U。

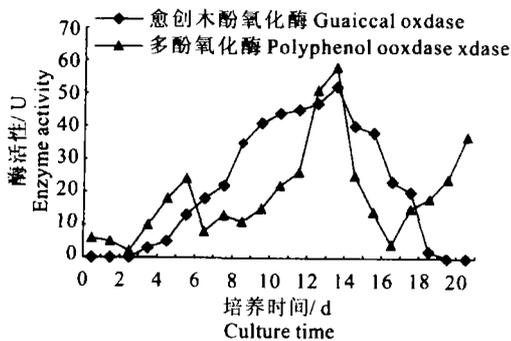


图 5 皱马鞍菌液体培养过程中愈创木酚氧化酶及多酚氧化酶活性的变化曲线

Fig. 5 Enzyme activity curve of guaiacol oxidase and polyphenol oxidase in the submerged culture of *Helvella crispa*

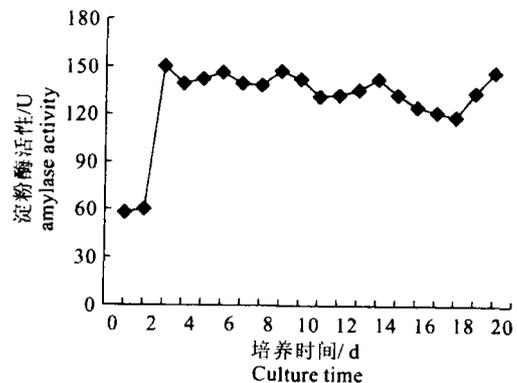


图 6 皱马鞍菌液体培养过程中淀粉酶活性的变化曲线

Fig. 6 Enzyme activity curve of amylase in the submerged culture of *Helvella crispa*

多酚氧化酶活性在整个液体培养过程中出现了 3 次高峰,周期约为 8 d,分别在第 6,14,21 天,活性分别为 24,58,37 U,第 14 天为最大峰值。在整个液体培养过程中,与木质素降解相关的愈创木酚氧化酶及多酚氧化酶的活性并不高,最高不超过 58 U,说明皱马鞍菌在液体培养过程中分泌的这两种酶较少,对木质素的降解能力弱。

## 2.6 淀粉酶活性的变化

淀粉酶是真菌生长过程中分解利用外界碳水化合物的主要酶类之一,其活性的变化与胞外蛋白酶浓度以及胞外还原糖含量的变化存在较好的相关性。皱马鞍菌液体培养过程中淀粉酶活性的变化如图 6 所示。由图 6 可见,培养 2 d(60 U)后淀粉酶活

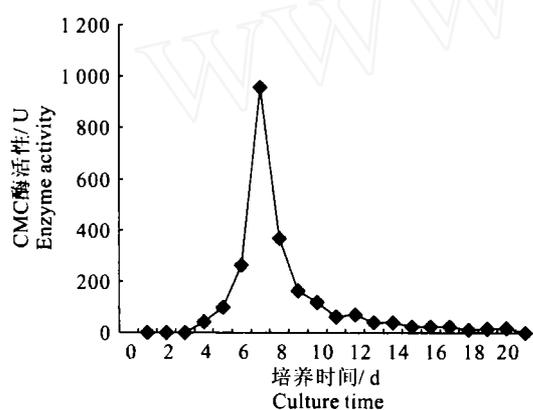


图 7 皱马鞍菌液体培养过程中 CMC 酶活性的变化曲线

Fig. 7 Enzyme activity curve of CMCase in the submerged culture of *Helvella crispa*

## 2.8 蔗糖转化酶活性的变化

皱马鞍菌液体培养过程中两种蔗糖转化酶活性的变化规律明显不同(图 8),酸性蔗糖转化酶活性始终很低,不超过 88 U,且略呈下降趋势;中性蔗糖转化酶活性呈阶梯上升趋势,活性从第 1 天的 71 U 增加到第 20 天的 1 532 U。这种现象与培养过程中培养液 pH 值上升并维持碱性有关,这种碱性环境抑制了酸性蔗糖转化酶活性,但促进了中性蔗糖转化酶活性。

## 3 讨论

大型真菌在其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愈创木酚氧化酶、多

酚氧化酶等,这是其异养生长中获取有机碳源的主要方式。胞外酶活性的强弱反映了菌丝体生长过程中对外部营养的分解及利用能力。胞外还原糖是由胞外酶分解多糖碳源产生的,它的变化也与菌丝体对碳源的利用有关。

## 2.7 羧甲基纤维素(CMC)酶活性的变化

由图 7 可见,液体培养过程中 CMC 酶活性出现了明显的消长变化过程。开始 3 d 检测不到 CMC 酶活性,第 4~6 天酶活性缓慢增加,从 42~263 U。产酶高峰出现在第 7 天(957 U),且维持的时间很短,只有 1 d 左右,此后迅速降低,在 10~20 d 内酶活性一直很低,在 8~153 U。CMC 酶的这个变化规律与俞苓等<sup>[6]</sup>对杏鲍菇研究中 CMC 酶的变化十分相似。

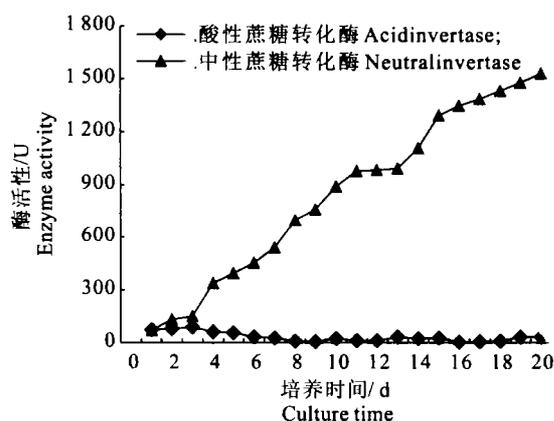


图 8 皱马鞍菌液体培养过程中蔗糖转化酶活性的变化曲线

Fig. 8 Enzyme activity of invertase in the submerged culture of *Helvella crispa*

酚氧化酶等,这是其异养生长中获取有机碳源的主要方式。胞外酶活性的强弱反映了菌丝体生长过程中对外部营养的分解及利用能力。胞外还原糖是由胞外酶分解多糖碳源产生的,它的变化也与菌丝体对碳源的利用有关。

皱马鞍菌液体培养过程中能够产生并分泌多种胞外酶,用以分解外界复杂的有机物,获取有机营养物质。本研究中分解碳水化合物的几种降解酶的活性高峰期以淀粉酶最早,其次是羧甲基纤维素酶,最后是愈创木酚氧化酶和多酚氧化酶,这表明皱马鞍菌对培养基中碳水化合物的利用顺序为淀粉、纤维素、木质素。从几种降解酶活性的绝对值来看,纤维素酶活性显著高于其他几种酶,因此人工培养皱马鞍菌时应以纤维素为主要碳源。愈创木酚氧化酶和多酚氧化酶活性很低,表明皱马鞍菌对木质素的降解能

力很弱。

从皱马鞍菌在液体培养过程中的生长曲线可知,若以获得菌丝体生物量为目的,发酵周期应控制

在 13 左右。若以获得还原糖为目的,发酵周期应控制在 5 d 以内。若以获得各种相关酶为目的的产物,则应根据不同酶的分泌高峰期确定相应的发酵周期。

#### [参考文献]

- [1] [美]阿历索保罗 C J,明斯 C W,布莱克韦尔 M. 菌物学概论[M]. 姚一建,李 玉,译. 北京:中国农业出版社,2002. 370—371.
- [2] 吴俊奎,贺游利,李静丽. 陕西大型真菌资源的初步研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),1996,26(5):435—438.
- [3] 上海农业科学院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- [4] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2002.
- [5] 王俊明,周白云,胡景江,等. 云芝液体培养过程中胞外酶与胞外多糖的变化[J]. 西北林学院学报,2004,19(2):22—24.
- [6] 俞 苓,刘民胜,陈有容. 杏鲍菇液体培养中胞外酶活性变化[J]. 食用菌,2003,(1):7—8.
- [7] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [8] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000.
- [9] 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,(3):137—140.
- [10] 王宜磊,邓振旭,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,2002,17(5):462—465.
- [11] 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,2002,10(6):15—18.
- [12] 郭 倩,何庆邦. 四孢蘑菇生长过程中四种胞外酶活性和木质纤维素降解的变化规律[J]. 食用菌学报,1998,5(2):13—17.

## Changes of extra-cellular enzyme activity and reducing sugar consistency during the submerged culture of *Helvella crispa*

HU Jing-jiang<sup>a</sup>, WANG Jun-ming<sup>a</sup>, ZHANG Gao-wei<sup>a</sup>, CAO Zhi-min<sup>b</sup>

(a. College of Life Sciences; b. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Dynamic variation of extra-cellular enzyme activity and reducing sugar concentration during the submerged culture of *Helvella crispa* were investigated. The results showed that the maximum of hyphostroma was 9.40 g/L, and appeared on 13th day, pH of the fluid medium went up gradually and kept smooth after the 9th day. The maximum of extra-cellular protein consistency was 8.30 mg/mL and appeared on the 6th day. During the submerged culture, reducing sugar concentration increased rapidly and come to the maximum (20.43 mg/mL) on the 3th day, and later the concentration decreased gradually. Amylum were decomposed earliest by *Helvella crispa*, next were cellulose and lignin. The peak of amylase activity appeared on the 3th day and kept the peak from beginning to end. The peak of CMCase (CMC; carboxymethyl cellulose) activity appeared on the 7th day while enzyme production of guaiacol oxidase and polyphenol oxidase reached the peak on the 14th day. The activity of acid invertase was very low and activity of neutral invertase increased steadily during submerged culture.

**Key words:** *Helvella crispa*; submerged culture; reducing sugar; invertase; amylase; CMCase; guaiacal oxidase