

# 培养温度和侧耳子实体形成对胞外纤维分解酶活性的影响

王 玉 万

(辽宁本溪师范专科学校生物系)

王 云

(中国科学院沈阳应用生态研究所)

**摘要** 研究了培养温度及糙皮侧耳子实体形成对基物中胞外 CMC 酶、FP 酶、半纤维素酶活性的影响。实验结果表明,于 25℃ 培养 0—100 天期间,基物上无子实体形成,基物中 FP 酶活力为 0—1 u, CMC 酶和半纤维素酶的活力为 0—8 u 左右。于 11—13℃ 培养,基物上有子实体形成,并且在子实体迅速生长阶段基物中有该 3 种酶的活性高峰出现,高峰期 FP 酶、CMC 酶和半纤维素酶的活力分别为 7u, 60u 和 70u 左右。由此可见,上述 3 种酶活性的增加与培养温度和子实体形成有十分密切的关系。

**关键词** 糙皮侧耳;培养温度;子实体形成;纤维素酶;半纤维素酶

关于低温诱导侧耳子实体形成的研究多有报道。但是关于低温对侧耳生理生化代谢方面的影响,很少有人研究。我们最近的研究发现,在低温诱导糙皮侧耳子实体形成的同时,基物中的 FP 酶、CMC 酶和半纤维素酶的活性显著增加。在侧耳属的其它种(美味侧耳,长柄侧耳等)和光帽鳞伞(*Pholiosa nameko*)的研究中也发现了这种现象。本文着重报道培养温度对糙皮侧耳子实体形成和 CMC 酶、FP 酶及半纤维素酶活性的影响。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种和培养

供试菌株为糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*) 19 号(保存于中国科学院沈阳应用生态研究所)。培养基组成为:木屑 70%,麦芽根(啤酒厂制造麦芽时的副产物) 30%。含水量调至 67%。将拌好的培养料装入罐头瓶中,1 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 2 小时。接种后于 25℃ 培养到菌丝长满基物后在不同温度下进行培养。

### (二) 酶活性测定

1. 酶液制备: 培养不同阶段取培养物 2.0

g,加水 16 ml,于 17℃ 浸 4 小时,用 4 层纱布过滤即得粗酶液。

2. CMC 酶活力测定<sup>[1,2]</sup>: 在酶解管中加入 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液(用 pH4.5, 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配制) 1.5 ml,之后加入粗酶液 0.5 ml(在子实体成熟期左右提取的酶液要稀释 1 倍后才能用于活性测定),于 50℃ 水浴中准确保温 30 分钟,取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 ml,于 100℃ 水浴中保温 5 分钟,取出冷却后加入蒸馏水 21.5 ml,混匀,用 751 G 型分光光度计测 E<sub>520nm</sub> 值,由标准曲线求得含糖量。对照管在加入 DNS 试剂后,再加入 0.5 ml 酶液,其它操作与酶解管相同。酶解管糖量减去对照管糖量即为 0.5 ml 酶液 30 分钟水解羧甲基纤维素钠产生的还原糖量。酶活力单位为: 1u = 1 mg 葡萄糖/30 min·g 干培养物。

3. 滤纸纤维素酶(FP 酶)活性测定<sup>[1,2]</sup>: 于酶解管和对照管各加入一条新华 1 号滤纸(1×6 cm),而后各加入柠檬酸缓冲液(pH 4.5, 0.1 mol/L) 1.0 ml,再向酶解管中加入粗酶液 1 ml,于 50℃ 准确保温 60 分钟,其后操作与 CMC 酶活性测定相同。酶活力单位: 1u = 1

mg 葡萄糖/60 min·g 干培养物。

4. 半纤维素酶活性测定<sup>[2,3]</sup>: 在酶解管中加入 0.5% 的玉米芯半纤维素溶液(用 pH4.8、0.1 mol/L 的乙酸盐缓冲液配制) 1.5 ml, 而后加入粗酶液(适当稀释) 0.5 ml, 于 50℃ 水浴中保温 30 分钟, 其后操作与 CMC 酶活性测定相同。酶活力单位: 1u = 1mg 木糖/30 min·g 干培养物。

### 结果与讨论

#### (一) 在 25℃ 培养时基物中酶活性

0—100 天期间在 25℃ 培养, 基物上无子实体形成, 基物中 FP 酶、CMC 酶和半纤维素酶的活力很低, 介于 0—8 u (图 1)。

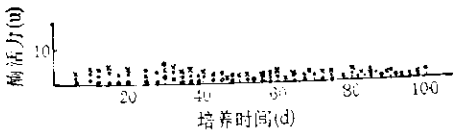


图 1 糙皮侧耳于 25℃ 培养时基物中胞外酶活性  
○ FP 酶; ● CMC 酶; × 半纤维素酶

#### (二) 在 11—13℃ 培养时基物中酶活性

图 2 展示出, 19 号菌株于低温 (11—13℃)

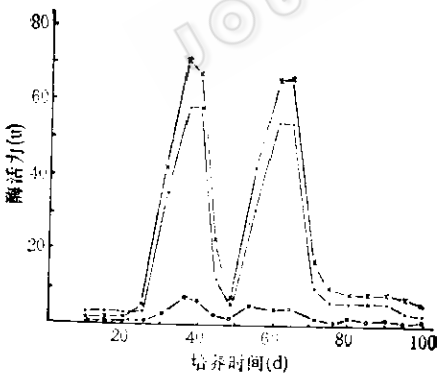


图 2 糙皮侧耳于 11—13℃ 培养时子实体形成和基物中酶活性变化

0—20 天于 25℃ 培养, 20—100 天于 11—13℃ 培养。第 20 天基物长满菌丝, 第 25 天头潮菇原基形成, 第 36—38 天子实体成熟。第 48 天二潮菇原基形成, 第 60 天子实体成熟

○ FP 酶; ● CMC 酶; × 半纤维素酶

培养时, 基物上有子实体形成, 并且基物中的 3 种酶活性在幼菇阶段 (菌盖直径达 2 cm 左右)

开始显著增加, 在子实体释放担孢子时基物中出现酶活性高峰, 高峰期 FP 酶、CMC 酶和半纤维素酶的活力分别为 7 u、60 u 和 70 u 左右。在原基期、菇潮间期及二潮菇收获后, 基物中的酶活力均很低, 介于 5—10 u 左右。

#### (三) 利用培养温度控制子实体在不同时间形成时基物中的酶活性变化规律

如果 0—35 天在 25℃ 培养, 35—60 天在 11—13℃ 培养, 61—100 天再置于 25℃ 培养。这样, 仅在 35—60 天期间有子实体形成和酶活性高峰出现(图 3), 其它培养期间无子实体形成, 基物中也无酶峰出现 (FP 酶活力为 0—1 u、CMC 酶和半纤维素酶的活力介于 0—8 u, 图 3 中均未绘出)。

如果 0—67 天于 25℃ 培养, 67—91 天于 11—13℃ 培养, 实验结果是: 在 67—91 天期间基物上有子实体形成, 基物中有酶活性高峰出现(图 3: 用“----”表示), 而 0—67 天期间基物上无子实体形成, 基物中酶活性很低(图 3 中没有绘出: 0—35 天 FP 酶活力为 0—1 u, CMC 酶和半纤维素酶的活力为 0—8 u; 35—67 天, 3 种酶活力均介于 0—3 u 左右)。

上述实验结果十分明显的告诉我们, 低温可诱导糙皮侧耳子实体形成, 并且基物中的 FP 酶、CMC 酶和半纤维素酶的活性高峰仅在子

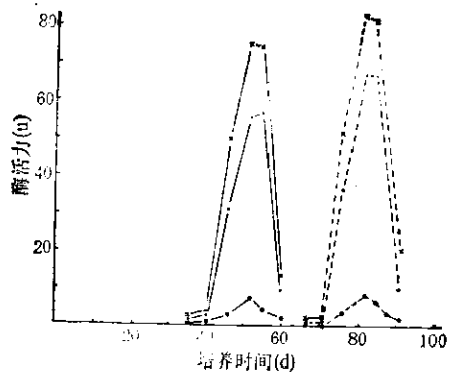


图 3 温度对糙皮侧耳子实体形成和胞外酶活性的影响

—: 0—35 天于 25℃ 培养, 35—60 天于 11—13℃ 培养, 61—100 天于 25℃ 培养, 第 40 天原基形成, 第 52—54 天子实体成熟 ……: 0—67 天于 25℃ 培养, 67—91 天于 11—13℃ 培养, 第 71—72 天原基形成, 第 82—84 天子实体成熟

实体生长阶段出现。从头潮菇采收后酶活性即下降,而在二潮菇发育期间酶活性再次增加(图2)。可见,酶活性增加与子实体发生有十分密切的关系。我们正在进行的实验初步展示出:(1)在25℃培养“19号”菌株,菌丝细胞内的醋酸可溶性多糖和醇溶性糖(可溶于80%热乙醇)的含量在25—38天期间无明显变化。在低温诱导子实体形成过程中(25—38天),菌丝细胞内这两种糖的含量明显减少,并且在醋酸可溶性糖的含量减少30%左右(以原基期含量为100%计)、醇溶性糖含量减少50%左右时(子实体发育已进入菌盖迅速生长期),基物中的胞外CMC酶和半纤维素酶的活性开始迅速增加。(2)如果在原基刚一出现就用刀片切去原基,这样基物上就不会有子实体生长,基物中也没有CMC酶和半纤维素酶的活性高峰出现,并且菌丝细胞内的两种糖亦减少的不多(大约减少5—10%左右)。这些结果暗示出:子实体代谢是调节侧耳菌丝体胞外纤维素酶和半纤维素酶活性的一个重要因素,并且这种调节作用依赖于低温刺激,还与菌丝细胞内的糖代谢有密切的关系。从低温诱导子实体形成过程中

菌丝细胞内醋酸可溶多糖(主要是糖原类物质)含量明显减少这一现象还可看出:很可能“CAMP-蛋白质激酶系统”也参与了上述代谢调节过程<sup>[4]</sup>。由此可见,在低温诱导子实体形成和纤维素酶活性增加的过程中,有更多的生物化学现象发生。也就是说:低温刺激和子实体发育都不是影响胞外纤维素酶活性的“直接因素”。因此,进一步剖析这一问题:(1)有助于揭示侧耳纤维素酶基因表达的调控机制。(2)可为深入探索子实体代谢对菌丝体代谢的影响提供新的研究思路。(3)可为深入研究子实体阶段菌体细胞内的糖代谢与胞外木质纤维素基质中的多糖分解代谢的关系及调节机制提供新的资料。(4)对于探讨侧耳子实体分化的生化机制和利用侧耳选择性脱木素等方面都有一定的意义。

### 参 考 文 献

1. Mandels M et al.: *Biotech. Bioeng.* **15**: 1471, 1974.
2. Miller G L: *Anal. Cham.*, **31**: 426, 1959.
3. Shamala T R and K R Sreekantiah: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**(3): 178—182, 1986.
4. 石川辰夫,宇野功: *应用微生物*, **5**: 43—50, 1981.