

## 稻曲病菌厚垣孢子壁多糖的提取方法优选

王娜<sup>1</sup> 任佐华<sup>1</sup> 邓林伟<sup>2</sup> 毛莹<sup>1</sup> 陈娟芳<sup>3</sup> 刘二明<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学 生物安全科学技术学院 湖南 长沙 410128)

(2. 湖南农业大学 生物科学技术学院 湖南 长沙 410128)

(3. 湖南农业大学 东方科技学院 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 探究稻曲病菌 *Ustiloginoidea virens* (Cooke) Takahashi 厚垣孢子壁多糖的最佳提取方法, 为孢壁多糖含量和组成的研究提供基础。采用 5 种方法提取该病菌黑色厚垣孢子壁多糖, 用苯酚-硫酸法测定多糖含量。经研究比较, 最佳提取方法为复合酶-热水浸提-sevag 法, 最佳提取条件是复合酶量 4%, pH 4, 浸提温度 70 °C, 浸提时间 120 min, 物料比 1:75 (V/V); 在优选的方法和条件下, 测定稻曲病菌黑色厚垣孢子壁粗多糖相对得率 21.2%, 多糖含量 72.3%; 黄色厚垣孢子壁粗多糖相对得率 17.5%, 多糖含量 66.7%, 前者明显高于后者。研究表明复合酶-热水浸提-sevag 法的工艺简单、可行, 适宜稻曲病菌厚垣孢子壁多糖的测定。

**关键词:** 水稻, 稻曲病菌, 厚垣孢子, 多糖

## Optimization extraction methods of polysaccharide of chlamydospores wall in *Ustiloginoidea virens*

WANG Na<sup>1</sup> REN Zuo-Hua<sup>1</sup> DENG Lin-Wei<sup>2</sup> MAO Ying<sup>1</sup> CHEN Juan-Fang<sup>3</sup>  
LIU Er-Ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(3. College of Orient Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** To reveal the content and composition of polysaccharide in chlamydospore wall of *Ustiloginoidea virens*, a study of the optimum method to extract polysaccharide of the chlamydospore wall was conducted. Five different methods were adopted to extract polysaccharide of its black chlamydospore wall, and the contents of polysaccharide were determined by phenol-sulfuric acid method. The results showed that the optimum extracting method was the complex enzyme-hot water extraction-sevag and the most appropriately extracting conditions were that the complex enzyme, pH 4 extracting temperature extracting time and the material ratio were 4%, 70 °C for 120 min, 1:75 (V/V), respectively. Based on above the optimum method, the relatively crude polysaccharide and polysaccharides rates in the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30871615)

\* 通讯作者: Tel: 86-731-84618163; ✉: emliu08@126.com

收稿日期: 2011-02-23; 接受日期: 2011-04-11

black and yellow chlamydospore wall were separately 21.2% and 72.3%, and 17.5% and 66.7%. Consequently, the complex enzyme-hot water extraction-sevag and its optimizing conditions among the five different methods were simple, efficient and particularly suitable to the determination polysaccharide in chlamydospores wall of *U. virens*.

**Keywords:** Rice, *Ustilaginoidea virens*, Chlamydospores, Polysaccharide

水稻稻曲病又称伪黑穗病、绿黑穗病、青粉病, 它是由稻曲病菌 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi 引起的水稻穗部真菌性病害。该病菌不仅影响水稻产量, 而且产生的毒素能够直接危害人畜的健康<sup>[1]</sup>。

真菌细胞壁作为细胞与外界环境的中介, 胞壁不同组分间通过各种相互作用(氢键疏水键共价键)联结成细胞壁的整体结构, 它具有多种生物学功能, 而细胞壁的主要成分为多糖, 其次为蛋白质、类脂。多糖主要作为细胞能源和结构组分存在于生物体内, 分子量在数万或数百万, 与免疫功能的调节、细胞与细胞的识别、细胞间物质的运输等有着密切的关系, 在不同类群的真菌中, 细胞壁多糖的类型不同<sup>[2]</sup>。真菌孢子的休眠主要有 2 个类型<sup>[3-4]</sup>, 即内源(结构)性休眠和外源(诱导)性休眠, 稻曲病菌的休眠在植物病原真菌中具有很典型的代表性。已有研究表明, 子囊菌中 *Talaromyces macrosporus* 的子囊孢子属于结构性休眠, 它具有极强的抗热性(85 °C 处理 100 min 才失活)、耐高压( $1.0 \times 10^5$  Pa 压力下可存活 5 min)、抗干旱和冷冻, 其原因是子囊孢子的海藻糖含量极高, 水含量低<sup>[5]</sup>, 这表明孢子内糖分的含量和组成可能与其休眠有关。

目前, 还没有稻曲病菌厚垣孢子壁多糖提取的报道。因此, 本研究探究适当的方法将孢壁的多糖有效提取, 以期为进一步研究多糖的组成与结构, 揭示稻曲病菌厚垣孢子的休眠机制的研究提供有效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 超声波细胞破碎机(JY92 型), 显微成像仪(OLYMPUS、SZX12), 紫外可见分光光度计(752E), 真空干燥箱(DZF-6020AB), 高速冷冻离心机(H-1850R); 复合酶(中性蛋白酶:纤维素

酶:果胶酶=3:1:1, V/V/V), 购于远见生物公司。

**1.1.2 实验材料:** 典型的稻曲病菌黑色和黄色厚垣孢子, 于湖南农业大学水稻试验基地采集, 用小刀剥下不同颜色厚垣孢子粉末保存于-80 °C 冰箱备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 稻曲病菌厚垣孢子预处理:** 选取典型的黑色和黄色厚垣孢子分别进行液氮研磨-超声破壁<sup>[6]</sup>后置 45 °C 真空干燥箱内干燥, 得到破壁后的厚垣孢子壁粉末。

**1.2.2 多糖的提取:** (1) 热水浸提法。称取预处理后的黑色厚垣孢子壁粗提取物适量→1:50 (V/V)物料比加入蒸馏水, 混匀→80 °C 水浴 120 min, 2 次→合并滤液→离心, 过滤, 蒸发浓缩→95%乙醇沉淀→4 °C 冰箱静置 24 h→8 000 r/min 离心 10 min, 得沉淀→45 °C 真空干燥箱干燥→得粗多糖→苯酚-硫酸法测定多糖得率。

(2) 复合酶-热水浸提-sevag 法。参照(1), 2% 复合酶预处理后热水浸提, 上清液用 sevag 法<sup>[7]</sup>去蛋白。

(3) 高浓度酸预处理-酸提取<sup>[8]</sup>。参照(1)和文献[8]。

(4) 碱提法。参照(1), 2% NaOH 提取。

(5) 复合酶-碱提法<sup>[9]</sup>。(2)与(4)相结合。

**1.2.3 多糖的测定:** 苯酚-硫酸法<sup>[10]</sup>: (1) 标准曲线的绘制。准确称取分析纯葡萄糖 25 mg, 定容到 250 mL 容量瓶中, 摇匀。分别吸取葡萄糖对照溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 用蒸馏水补充至 1.0 mL, 加入 5%苯酚 1.0 mL、浓硫酸 5.0 mL, 室温放置 30 min, 于 490 nm 测吸光度。

(2) 样品测定。准确称取样品 2.5 mg, 定容到 25 mL 容量瓶中, 摇匀。吸取样品溶液 1 mL, 以蒸馏水做对照, 每样品重复测试 3 次, 参照(1)的方法测定吸光度。

(3) 多糖的计算<sup>[10]</sup>。

粗多糖相对得率(%)=粗多糖质量/孢壁粗提物质量×100%

粗多糖样品中多糖含量(%)=CDF/W

C: 粗多糖中葡萄糖的浓度(g/L)

D: 粗多糖样品稀释倍数

F: 换算因子

W: 粗多糖样品质量(mg)

**1.2.4 复合酶-热水浸提-sevag 法条件优化:** 根据单因素预备实验, 酶量、pH、提取温度、物料比对多糖的提取影响较大, 因此选取这 4 个因素, 设计了 4 因素 3 水平正交实验(表 1)。

**1.2.5 不同颜色厚垣孢子壁多糖含量的比较:** 选取典型的黑色和黄色厚垣孢子经预处理后, 参照 1.2.2 中(2)的方法提取多糖, 采用 1.2.3 的方法测定多糖。

**1.2.6 统计分析:** 采用 DPS 软件对样品测试数据用单因素试验 Duncan 新复极差法进行统计分析<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的绘制

以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线如图 1 所示。葡萄糖浓度与吸光度线性回归方程为  $Y=8.6371X-0.0009$ , 相关系数  $R^2=0.9994$ 。此结果表明, 葡萄糖对照品溶液的浓度在 0.02–0.10 g/L 范围内符合朗伯-比尔定律, 且在 95% 置信度,  $Y$  的置信区间为 0–1.07 时, 吸光度与对照品的浓度符合上述线性回归方程的关系。

### 2.2 多糖提取方法的比较

5 种方法提取黑色厚垣孢子壁多糖的 3 次重复实验结果统计分析表明(表 2), 在 5% 和 1% 显著水平下, 除方法 2 和 3 提取的粗多糖相对得率无明显差异外, 其他方法提取的粗多糖相对得率及粗多糖

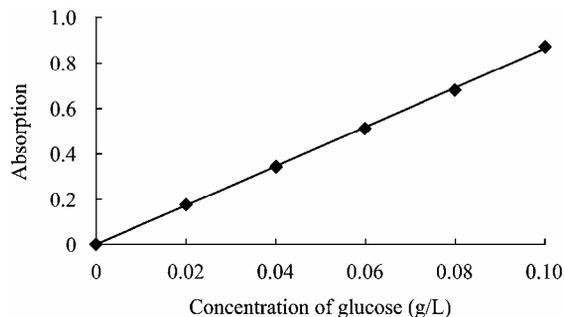


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

样品中多糖的含量差异显著, 粗多糖得率依次为: 4>5>2>3>1; 样品中多糖含量依次为: 2>1>5>4>3。在前 4 种方法中, 碱提法的粗多糖相对得率高达 37.5%, 但样品含糖量很低, 复合酶-热水浸提-sevag 法提取的粗多糖含糖量高达 71.4%, 因此, 将这两种方法相结合, 设计了方法 5 即复合酶-碱提法, 用此方法提取的粗多糖, 含糖量虽略有上升, 但还是远远低于复合酶-热水浸提-sevag 法, 且粗多糖得率较碱提法而言, 略有下降。鉴于后期对多糖结构研究, 选择复合酶-热水浸提-sevag 法。

### 2.3 复合酶-热水浸提-sevag 法条件优化

比较 5 种提取多糖的方法后, 得出以复合酶-热水浸提-sevag 法为佳, 仍以黑色厚垣孢子壁为材料进行  $L_9(3^4)$  实验, 结果如表 3。从表 3 中的极差  $R$  值可知, 4 个因素对多糖提取的影响由大到小依次为:  $D>A>B>C$ , 最佳提取工艺为  $A_3B_1C_1D_2$ , 即酶量为 4%, pH 4, 浸提温度 70 °C, 物料比 1:75 (V/V)。

### 2.4 不同颜色厚垣孢子壁多糖含量的比较

用复合酶-热水浸提-sevag 法的优化条件测定黑色和黄色厚垣孢子壁多糖的含量, 3 次重复实验及统计分析表明(表 4), 在 5% 和 1% 显著水平下, 黑色和黄色厚垣孢子壁粗多糖相对得率及粗多糖样品中多

表 1  $L_9(3^4)$  正交实验设计  
Table 1  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental design

水平 Level	A 酶量 The amount of the enzyme (%)	B pH	C 浸提温度 The extracting temperature (°C)	D 物料比 The material rate (V/V)
1	2	4	70	1:50
2	3	5	80	1:75
3	4	6	90	1:100

**表 2 不同方法提取的粗多糖相对得率及粗多糖样品中多糖含量**  
**Table 2 The Relatively crude polysaccharide rate and Polysaccharide of crude polysaccharide sample in the different extraction methods**

方法 Method	粗多糖相对得率 <sup>1</sup> Relatively crude polysaccharide rate (%)					粗多糖样品中多糖含量 <sup>2</sup> Polysaccharide of crude polysaccharide sample (%)						
	重复实验 Repeat experiments			平均值±标准差 <i>x</i> ± <i>s</i>	显著水平 Significant level	重复实验 Repeat experiments			平均值±标准差 <i>x</i> ± <i>s</i>	显著水平 Significant level		
	I	II	III			5%	1%	I			II	III
1. 热水浸提 The method of hot-water	6.5	5.5	6.0	6.0±0.5	d	D	49.8	53.6	52.1	51.8±1.9	b	B
2. 复合酶-热水浸提-sevag法 The method of complex enzyme-hot-water extraction-sevag	15.5	14.0	14.0	14.5±0.9	c	C	71.7	69.5	73.1	71.4±1.8	a	A
3. 高浓度酸预处理硫酸提法 The method of modified sulfuric acid hydrolysis	11.5	12.0	13.5	12.3±1.0	c	C	11.5	14.8	13.8	13.3±1.7	e	E
4. 碱提法 The method of alkali extraction	34.0	38.5	40.0	37.5±3.1	a	A	17.2	17.8	18.7	17.9±0.8	d	D
5. 复合酶-碱提法 The method of complex enzyme-alkali extraction	21.5	24.0	21.0	22.2±1.6	b	B	20.5	23	22	21.8±1.3	c	C

注: <sup>1</sup>: 差异极显著( $F=152.095, P=0.00<0.01$ ); <sup>2</sup>: 差异极显著( $F=796.817, P=0.00<0.01$ ).

Note: <sup>1</sup>: Extremely significant difference ( $F=152.095, P=0.00<0.01$ ); <sup>2</sup>: Extremely significant difference. ( $F=796.817, P=0.00<0.01$ ).

**表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验厚垣孢子壁多糖含量得率**  
**Table 3 Relatively crude polysaccharide rate and polysaccharide contents of the chlamydospor wall in L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment**

标号 Number	A	B	C	D	粗多糖相对得率 Relativ crude polysaccharide rate (%)	粗多糖样品中多糖含量 Polysaccharide of crude polysaccharide sample (%)
1	1	1	1	1	18.5	59.4
2	1	2	2	2	21.0	54.0
3	1	3	3	3	22.0	36.0
4	2	1	2	3	16.0	50.4
5	2	2	3	1	13.0	61.2
6	2	3	1	2	20.5	57.6
7	3	1	3	2	25.5	69.3
8	3	2	1	3	19.0	63.0
9	3	3	2	1	10.0	61.2
K <sub>1</sub>	35.15	39.85	39.67	37.22		
K <sub>2</sub>	36.45	38.53	35.43	41.32		
K <sub>3</sub>	41.33	34.55	37.83	34.40		
R	6.18	5.30	4.23	6.92		

注: K 代表某一个水平下, 对应因素的试验结果之和, 其下标数字为表 1 中的水平; R 代表极差。

Note: K: The corresponding test results and factors at a certain level, the subscript numbers represents the level in the table 1; R: The sample range.

表 4 不同颜色厚垣孢子壁粗多糖相对得率及粗多糖样品中多糖含量  
Table 4 Relatively crude polysaccharide rate and polysaccharide contents of the different color chlamyospore wall

不同颜色的厚垣孢子 The different colour chlamyospore	粗多糖相对得率 <sup>1</sup>						粗多糖样品中多糖含量 <sup>2</sup>					
	重复实验			平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	显著水平		重复实验			平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	显著水平	
	Repeat experiments				Significant level		Repeat experiments				Significant level	
I	II	III		5%	1%	I	II	III		5%	1%	
黑色 Black	20.5	21.0	22.0	21.2±0.8	a	A	72.3	71.9	72.8	72.30±0.45	a	A
黄色 Yellow	18.5	17.5	16.5	17.5±1.0	b	B	67.3	66.7	66	66.7±0.7	b	B

注: <sup>1</sup>: 差异极显著( $F=25.474, P=0.0072 < 0.01$ ); <sup>2</sup>: 差异极显著( $F=796.817, P=0.00 < 0.01$ ).

Note: <sup>1</sup>: Extremely significant difference ( $F=25.474, P=0.0072 < 0.01$ ); <sup>2</sup>: Extremely significant difference ( $F=796.817, P=0.00 < 0.01$ ).

糖含量都有显著差异。黑色厚垣孢子壁粗多糖相对得率为 21.2%，多糖含量 72.3%，黄色厚垣孢子壁粗多糖相对得率为 17.5%，多糖含量 66.7%，前者明显高于后者。研究也表明提取条件优化后的复合酶-热水浸提-sevag 法其提取多糖的效果优于优化前。

### 3 讨论

本研究比较了 5 种提取多糖的方法，其中热水浸提法条件简单，但粗多糖相对得率低，一般不宜采用。采用酸碱法提多糖，虽粗多糖相对得率较高，但稀酸稀碱易使多糖发生糖苷键的断裂，特别是用碱提法时，提取物浓稠，不易于过滤，不利于后期对多糖结构的研究。采用由果胶酶、纤维素酶及中性蛋白酶按一定比例组成的复合酶提取多糖，有利于细胞壁的进一步分解以及杂质的去除，特别是将复合酶法与 sevag 法相结合，即可有效脱蛋白质，又避免多糖降解的损失，可以选择性释放产物，且提取条件温和，不会破坏多糖的生物活性，便于后期对多糖的分离纯化及结构研究。马淑凤<sup>[12]</sup>等利用复合酶法提取白灵菇深层发酵菌丝体多糖，粗多糖得率可达 8.23%，本研究利用复合酶-热水浸提-sevag 法提取不同颜色厚垣孢子壁多糖，相对粗多糖得率均在 17% 以上，多糖含量均在 66% 以上，明显高于前人的研究，这可能是本研究的多糖为孢壁结构性的，且实验材料是非营养体菌丝。由于孢壁粗提取物中除细胞壁外，还含有少量其他物质，因此定义为粗多糖相对得率。基于多糖相对得率和含量考虑，

在本研究的 5 种方法中，以复合酶-热水浸提-sevag 法为优，最佳提取条件：复合酶量 4%，pH 4，浸提温度 70 °C，浸提时间 120 min，物料比 1:75 (V/V)，此法较简便易行。

采用复合酶-热水浸提-sevag 法提取稻曲病菌黑色和黄色厚垣孢子壁多糖，黑色孢壁多糖高于黄色。黄色厚垣孢子是厚垣孢子发育的前阶段，萌发率高，属非休眠型孢子，而黑色厚垣孢子是由黄色厚垣孢子进一步发育转化而来的，它们的萌发率显著下降或不能萌发，属于休眠型的孢子<sup>[13]</sup>。由此，可以初步说明多糖含量的提高有利于稻曲病菌厚垣孢子抵抗不良环境和进入休眠越冬。多糖的组成和结构对稻曲病菌厚垣孢子休眠有何影响，则有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 黄世文, 余柳青. 国内稻曲病的研究现状[J]. 江西农业学报, 2002, 14(2): 45-51.
- [2] Freimund S, Sauter M, Käppeli O, et al. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(2): 159-171.
- [3] Fungi Online <http://www.gungionline.org.uk/2spores/2dormancy.html>.
- [4] Reproduction of fungi <http://www.microbiologybytes.com/introduction/myc2.html>.
- [5] Dijksterhuis J, Nijssse J, Hoekstra FA, et al. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores[J]. Eukaryotic cell, 2007, 6(2): 157-170.

- [6] 燕玮婷, 刘二明, 邓林伟, 等. 稻曲病菌厚垣孢子不同破壁方法的比较[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(2): 14-17.
- [7] Staub AM. Removal of proteins from polysaccharides methods[J]. Carbohydrate Chemistry, 1965, 5(5): 5-6.
- [8] 刘晓永, 王强, 刘红芝, 等. 酿酒酵母  $\beta$ -D-葡聚糖测定方法的研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(2): 150-157.
- [9] 田春华, 竹磊, 朱海华, 等. 啤酒酵母泥中酵母多糖提取工艺研究[J]. 江西农业学报, 2010, 22(7): 103-104.
- [10] 于瑞涛, 周鹏程, 陶燕铎, 等. 苯酚硫酸法测定迷果芹多糖的含量[J]. 分析实验室, 2008, 27(增刊): 222-224.
- [11] 唐启义. DPS 数据处理系统[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2010: 82-87.
- [12] 马淑凤, 王利国, 胡志超, 等. 酶法提取白灵菇深层发酵菌丝体多糖的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9): 198-201.
- [13] 陆凡, 陈志谊, 陈琉苓, 等. 稻曲病菌的生物学特性及其侵染循环中某些未确定要点的研究[J]. 江苏农业学报, 1996, 12(4): 35-40.

### 2011 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第九届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	150	陕西西安	梁华 010-58900644
2	第三届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	9 月	150	甘肃兰州	阮志勇 13301101231
3	病原菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	9-10 月	100	湖北武汉	陈铁 <a href="mailto:tiechen2005@yahoo.com">tiechen2005@yahoo.com</a>
4	第十九届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9-10 月	100	四川雅安	张忠明 <a href="mailto:zmzhang@mail.hzau.edu.cn">zmzhang@mail.hzau.edu.cn</a>
5	2011 年中国微生物学会学术年会暨第十次全国会员代表大会	中国微生物学会	10 月	500	福建福州	王旭 010-64807200
6	第十四次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	500	福建厦门	朱建春 <a href="mailto:microb@njau.edu.cn">microb@njau.edu.cn</a>
7	CBS-中国医学真菌学高级培训班	中国微生物学会真菌学专业委员会	11 月	80	江苏南京	刘维达 13605178767
8	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	150	广东广州	金城 010-64807425
9	第五届芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	50	湖北武汉	孙明 027-87283455