

文章编号: 1001-1498(2010)04-0574-07

灰树花的系统发育分析和主要木质素降解酶的测定

尹立伟, 池玉杰, 王雪童

(东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 对灰树花菌株迁西二号进行了 ITS 序列扩增与测序 (GenBank 登录号为 GU584099), 并对灰树花及相关白腐菌进行了基于 ITS 序列的系统发育分析, 结果表明灰树花与 *Grifola sordulenta* (Mont.) Singer 等白腐菌的亲缘关系较近。采用 LNAS (低氮天冬酰胺-琥珀酸) 培养基添加 4 种不同底物, 对菌株迁西二号在 25 ℃ 恒温下静置培养, 得到了不同时间内的培养液, 用紫外可见分光光度计分别检测了在 470、420、310 nm 处对于 2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-DMP)、2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS)、3,4-二甲氧基苯甲醇/藜芦醇 (VA) 的氧化作用后光密度值的变化情况, 作为锰过氧化物酶 (MnP)、漆酶 (Laccase) 和木质素过氧化物酶 (LiP) 产生和活性大小的依据, 从而获得了灰树花木质素降解酶系统的主要酶系及其与培养基的成分和酶作用底物的基本关系。结果表明, 灰树花可产生 MnP 和漆酶, 但不产生 LiP; 对比 4 种成分不同的培养液酶活力测定结果, 未添加底物的培养液 MnP 最大酶活仅为 $2.96 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 漆酶最大酶活仅为 $4.49 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。添加底物木屑和 2,6-DMP 后 MnP 最大酶活为 $8.06 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 漆酶最大酶活为 $9.85 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明在培养液内添加酶的底物木屑后能轻微地提高两种酶的分泌量。

关键词: 灰树花; ITS 序列; 木质素降解酶系统; 锰过氧化物酶; 漆酶

中图分类号: S718.81

文献标识码: A

Phylogenetic Analysis and Detection on the Major Ligninolytic Enzymes System of *Grifola frondosa*

YIN Li-wei, CHI Yu-jie, WANG Xue-tong

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: ITS sequence of *Grifola frondosa* strain qx2 was amplified and sequenced (GenBank accession number: GU584099), a phylogenetic analysis was performed on *G. frondosa* qx2 and its related white-rot fungi. The results showed that *G. frondosa* and *G. sordulenta* had the closest genetic relationship, and *G. frondosa* was closer to other several white-rot fungi. The strain was stillly cultured at 25 ℃ under 4 different kinds of LNAS (Low Nitrogen Asparagine Succinic acid) culture solution, the extracellular enzyme solutions were sampled at different interval, OD values of the solutions, representing manganese peroxidase (MnP), Laccase and lignin peroxidase (LiP) activities, were measured spectrophotometrically by monitoring the oxidation of 2,6-DMP at 470 nm, ABTS at 420 nm and veratryl alcohol (VA) at 310 nm, the lignin-degrading enzymes of the fungus and the relationships between enzyme activities and medium composition and substrates were gained. Results indicated that *G. frondosa* could produce MnP and Laccase simultaneously, but no Lip. Substrates wood sawdust could slightly enhanced MnP and Laccase activities. The biggest MnP and Laccase activity were $2.96 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4.49 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ when no substrates were added, and $8.06 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ and $9.85 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ when substrates added.

Key words: *Grifola frondosa*; ITS sequences; ligninolytic enzymes; manganese peroxidase; Laccase

收稿日期: 2010-02-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30671700)。

作者简介: 尹立伟 (1981—), 女, 黑龙江双鸭山人, 硕士, 主要研究方向真菌生物学。E-mail: kaixinliwei@163.com

通讯作者: 池玉杰, 女, 辽宁葫芦岛人, 教授, 主要研究方向林木病理学。E-mail: chiyujienefu@126.com

国内外的白腐菌研究者已对一些白腐菌的木质素降解酶系统及其分子生物学进行了研究,包括酶活性与降解能力、产酶条件的优化、酶的纯化与蛋白结构和功能研究、基因的克隆及表达等方面,所研究的白腐菌主要包括金孢展齿革菌 *Phanerochaete chrysosporium* Burds、虫拟蜡菌 *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden、糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.、云芝栓菌 *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Quél.、射脉菌 *Phlebia radiata* Fr.、粗毛栓菌 *Trametes gallica* Fr.、好食脉孢菌 *Neurospora sitophila* Shear & B. O. Dodge、偏肿栓菌 *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. 等菌种^[1-8]。白腐真菌漆酶基因的克隆、表达研究较为深入,目前已有金针菇 *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer、粗糙脉孢菌 *N. crassa* Shear & B. O. Dodge 等几种白腐菌的漆酶基因得到了克隆^[9-10],而多种其它白腐菌 MnP 的酶学和分子生物学研究也正在进行中。

灰树花 *G. frondosa* (Dicks.) Gray 既是一种营养丰富的珍稀食药菌,又是一种白腐菌,生长在多种阔叶树基部。已在日本和我国河北、浙江等省有较大规模的人工栽培。目前已对该菌种的栽培技术、多糖的纯化和结构、保健功能和抗肿瘤效应以及相关基因等有了较深入的研究^[11-15]。对于其系统发育分析,Shen 等^[16]曾对绝大多数来源于北美东部、亚洲的 51 个灰树花菌株进行基于 ITS 序列和 β -微管蛋白基因的系统发育分析,结果表明这些菌株可以明确地分为北美和亚洲 2 大类群;张美彦等^[17]也利用 ITS-RFLP 及 SRAP 标记对不同来源的 25 个灰树花菌株进行了种质评价。本文中所述的灰树花菌株迁西二号购自河北省迁西县食用菌研究所,该所拥有 3 个灰树花菌株:迁西一号、迁西二号、迁西三号。其中迁西二号朵型中等,菌盖灰黑色,子实体分化好,柄短,菇型好,适宜保鲜,也比较适合北方低温地区栽培。目前还没有包括迁西二号菌株在内的多个灰树花菌株的 ITS 序列分析及与其他相关白腐菌的系统发育分析,对灰树花降解木质素的酶学和分子生物学也没有具体研究。由于灰树花既有食药价值,又有潜在的可降解木质素及多环芳烃类物质的能力,因此,研究其分子系统发育及降解木质素的酶和基因具有意义,例如国外已有对既是食药菌又是白腐菌的扁芝 *Elfvigia applanata* (Pers.) P. Karst.、双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach、香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 等的锰过

氧化物酶及其基因进行了研究^[18-20]。在真菌酶活性研究中,不同的真菌菌种和同种真菌不同菌株之间存在着酶活性的差异;对于同一真菌菌株,培养基的成分、不同的培养条件也会影响到酶的产生和活性的大小。本文对灰树花菌株迁西二号进行了 ITS 序列扩增和测序,并对灰树花及相关白腐菌进行了基于 ITS 序列的系统发育分析;在以 LNAS(低氮天冬酰胺-琥珀酸)培养基为基础培养基并分别添加 4 种不同的酶作用底物条件下,对其锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶的活性进行了测定,目的是搞清灰树花与其它白腐菌的亲缘关系,及木质素降解酶系统的主要酶系与培养基的成分和酶作用的底物等条件的关系,为深入研究灰树花分解木质素的酶系统作用机理,以及分解木质素的酶基因表达调控等分子生物学机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

灰树花菌株迁西二号 [*G. frondosa* (Dicks.) Gray] qx2 于 2002 年从河北省迁西县购入,保存在东北林业大学森林保护学科森林病虫害病理实验室。

1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g,琼脂 20 g,葡萄糖 20 g,加水定容至 1 000 mL, pH 值自然。

马铃薯加富培养基:马铃薯 200 g,琼脂粉 20 g,葡萄糖 20 g, MgSO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 3.0 g, VB₁ 0.04 g,酵母膏 2.5 g,加水定容至 1 000 mL, pH 值自然。

产酶基础培养基:低氮天冬酰胺-琥珀酸培养基 (LNAS, Low Nitrogen Asparagine Succinic acid)^[21-22],是一种营养成分有限的基础产酶培养基。

1.3 ITS 序列扩增与系统发育分析

将在 PDA 培养基上保存的灰树花斜面菌种切取 5 mm² 的小块,接种在马铃薯加富平板培养基的中心,在 25℃ 下静置培养 12 天,此时菌种接近生长到平板边缘,刮取菌落边缘的新鲜菌丝用于基因组 DNA 的提取。使用 TIANGEN 公司的 DNAquick_快捷型植物基因组 DNA 提取系统及相关方法提取真菌基因组 DNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和大小,然后将 DNA 稀释到终浓度为 10 ng · μL⁻¹ 用于 PCR 反应。应用真菌通用引物对 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增含有 ITS1 和 2 及 5.8s rRNA 基因片段的核 rDNA 序列。ITS

PCR 扩增体系如下: 10 ×PCR Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL, ITS1 和 ITS4 引物(10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U · μL) 0.25 μL, 模板 DNA 1 μL, 用 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增参数如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 S, 55 °C 退火 45 S, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 终止温度在 4 °C。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物直接测序获得 ITS 区序列, 将获得的灰树花菌株迁西二号的 ITS 区序列提交到 NCBI 的 GenBank 中去, 与其中已有的序列进行 BLAST 比对, 从比对结果中选取相关性的菌种并下载其 ITS 序列, 采用 ClustalX 1.83 对这些基因序列进行比对, 运用分析软件 MEGA 4.1 中的 UPGMA 聚类法构建系统发育树。

1.4 产酶培养方式

在 250 mL 三角瓶中加入 70 mL LNAS 培养基, 分别添加 4 种不同底物进行菌种培养: A. LNAS 培养基不含 Mn²⁺, 即矿物元素溶液中不添加 MnSO₄ · H₂O; B. LNAS 培养基含 Mn²⁺ (2.67 × 10⁻³ mmol · L⁻¹), 即矿物元素溶液中添加 MnSO₄ · H₂O; C. LNAS 培养基含 Mn²⁺ (2.67 × 10⁻³ mmol · L⁻¹), 并加入 2 g 青杨 (*Populus ussuriensis* Kom.) 木屑为产酶底物; D. LNAS 培养基含 Mn²⁺ (2.67 × 10⁻³ mmol · L⁻¹), 并加入 10 mmol · L⁻¹ 2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-DMP) 0.1 mL 为产酶底物。

所有的培养液高压灭菌 15 min, 接菌前向每个灭菌的三角瓶中加入 5 mL 除菌的 15% 葡萄糖溶液。将保藏在马铃薯加富培养基上的灰树花菌种^[15] 先接种至 PDA 平板培养基 (9 cm) 上, 25 °C 培养 10 天, 8 mm 打孔器于培养皿菌丝边缘打孔, 将菌饼转接至灭菌后的三角瓶中, 每个三角瓶加入 5 块菌饼, 25 °C 静止培养, 每项试验设 3 个重复。培养至 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 天提取培养液即胞外酶液, 每个三角瓶中每次提取酶液 1.3 mL, 将提取的粗酶液离心 (13 200 r · min⁻¹, 室温) 5 min, 取上清液进行酶活测定后冷藏于 -20 °C 冰箱。

1.5 酶活测定方法

利用紫外可见分光光度计 (Ultrospec 4 300 pro, Amersham) 检测一定光波下光密度值的变化情况作为酶活性大小的依据。漆酶以 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并 唑-6-磺酸) (ABTS) 法^[23], 测定体系 1 mL, 其中丙二酸钠缓冲液 (50 mmol · L⁻¹) 850 μL, 酶液样品 100 μL, ABTS (20 mmol · L⁻¹) 50 μL, 于 420

nm 处测定吸光度在 3 min 内的变化值。MnP 以 2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-DMP) 法^[24], 测定体系 1 mL, 其中丙二酸钠缓冲液 (50 mmol · L⁻¹) 840 μL, MnSO₄ (10 mmol · L⁻¹) 50 μL, 2,6-DMP (10 mmol · L⁻¹) 50 μL, 酶液样品 50 μL, H₂O₂ (10 mmol · L⁻¹) 10 μL 启动反应, 于 470 nm 处测定吸光度在 1 min 内的变化值。Lip 以 藜芦醇 (VA) 法^[25], 测定体系 1 mL, 其中酒石酸钠缓冲液 (100 mmol · L⁻¹, pH 值 3.0) 340 μL, 藜芦醇 (20 mmol · L⁻¹) 100 μL, 酶液样品 550 μL, H₂O₂ (54 mmol · L⁻¹) 10 μL 启动反应, 于 310 nm 处测定吸光度在 1 min 内的变化值。空白对照不加酶液以 1 mL 的去离子水在相同条件下进行。所有测量均设 3 组重复取平均值。酶活单位 (U · L⁻¹): 上述条件下, 每分钟催化 1 μmol 2,6-DMP、ABTS 或 VA 所需的酶量。计算中的 $\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $\epsilon_{470} = 49\ 600\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $\epsilon_{310} = 9\ 300\ 000\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。计算酶活值后绘制出产酶活时间曲线图, 并利用 PASW 软件数据处理系统对 4 种不同的培养液产生 MnP 的活性进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 灰树花菌株迁西二号的 ITS 序列与系统发育分析

灰树花菌株迁西二号 (*G. frondosa* qx2) ITS 区域的 PCR 产物测序得到了 508 bp 的核苷酸序列, 将该序列提交到 GenBank (NCBI accession number: GU584099) 中后的鉴定结果表明, 1 鹧 189 bp 为 ITS1 序列, 190 鹧 346 bp 为 5.8S rDNA 序列, 347 鹧 508 bp 为 ITS2 序列。在 GenBank 中, *G. frondosa* qx2 与 100 个菌株的 BLAST 比对结果表明, 该 100 个菌株中有 61 个 *G. frondosa* 不同菌株, *G. frondosa* qx2 与其中的 26 个菌株同源性达 99%, 与 32 个菌株同源性达 98%, 与 3 个菌株同源性达 97%。在另外 39 个非同种的不同菌株中, *G. frondosa* qx2 与 *G. sordulenta* (Mont.) Singer G01 同源性达 89%, 与 *G. sordulenta* PDD: 86931 的同源性达 88%; 与密孔菌属 *Pycnoporus* Karst.、栓菌属 *Trametes* Fr.、革孔菌属 *Coriolopsis* Murr.、多孔菌属 *Polyporus* Mich. ex Fr.、革褶菌属 *Lenzites* Fr.、迷孔菌属 *Daedalea* Pers. ex Fr.、小薄孔菌属 *Antrodia* Ryv. & Johan. 等木腐菌的 37 个菌株的同源性均为 86%。另外, 在上述 100 个菌株之外, *G. frondosa* qx2 与猪苓 (*G. umbellata* (Pers.

ex Fr.) Pilát) 的两个菌株 GUB 和 GUF 同源性的 85%。从 100 个菌株中选取 35 个相关性菌株, 再加上猪苓的两个菌株 GUB 和 GUF, 与 *G. frondosa* qx2 按照 UPGMA 聚类法进行菌株间遗传距离分析, 构建的系统发育树见图 1。从图 1 可以看出, 图中的 38 个菌株分为 2 大类群, 36 个菌株聚成 1 个大类群, 2 个猪苓菌株聚成类群。大类群下又聚成 2 个较大的亚类群。亚类群包括密孔菌属、栓菌属、革孔菌属、多孔菌属、迷孔菌属、革褶菌属、小薄孔菌属、奇果菌属 *Grifola* Mich. ex S. F. Gray 的 20 个菌株。亚类群中来自于不同地区的 *G. frondosa* 的 16 个菌株聚为 2 个小类, 其中来自挪威 *G. frondosa* isolate WC493 菌株聚为小类(1), 其他的 15 个菌株

聚为小类(2)。 *G. frondosa* qx2 与我国台湾的 *G. frondosa* isolate M021 关系最密切, 与其他 13 个菌株的关系也很近, 包括我国的 *G. frondosa* isolate M035、*G. frondosa* isolate M036、*G. frondosa* isolate M037、*G. frondosa* isolate M038、*G. frondosa* isolate M039; 巴勒斯坦 *G. frondosa* isolate WC248; 马里兰州 *G. frondosa* isolate WC483; 洛杉矶 *G. frondosa* isolate M009; 韩国 *G. frondosa* isolate WC557; 日本 *G. frondosa* isolate WC835; 纽约州 *G. frondosa* isolate M008; 丹麦 *G. frondosa* isolate M003 和来源不详的 *G. frondosa* strain HMY, 它们之间的 ITS 序列同源性均达到 99%, 遗传距离很接近, 可以认为是同一菌种分布于不同地区的菌株。

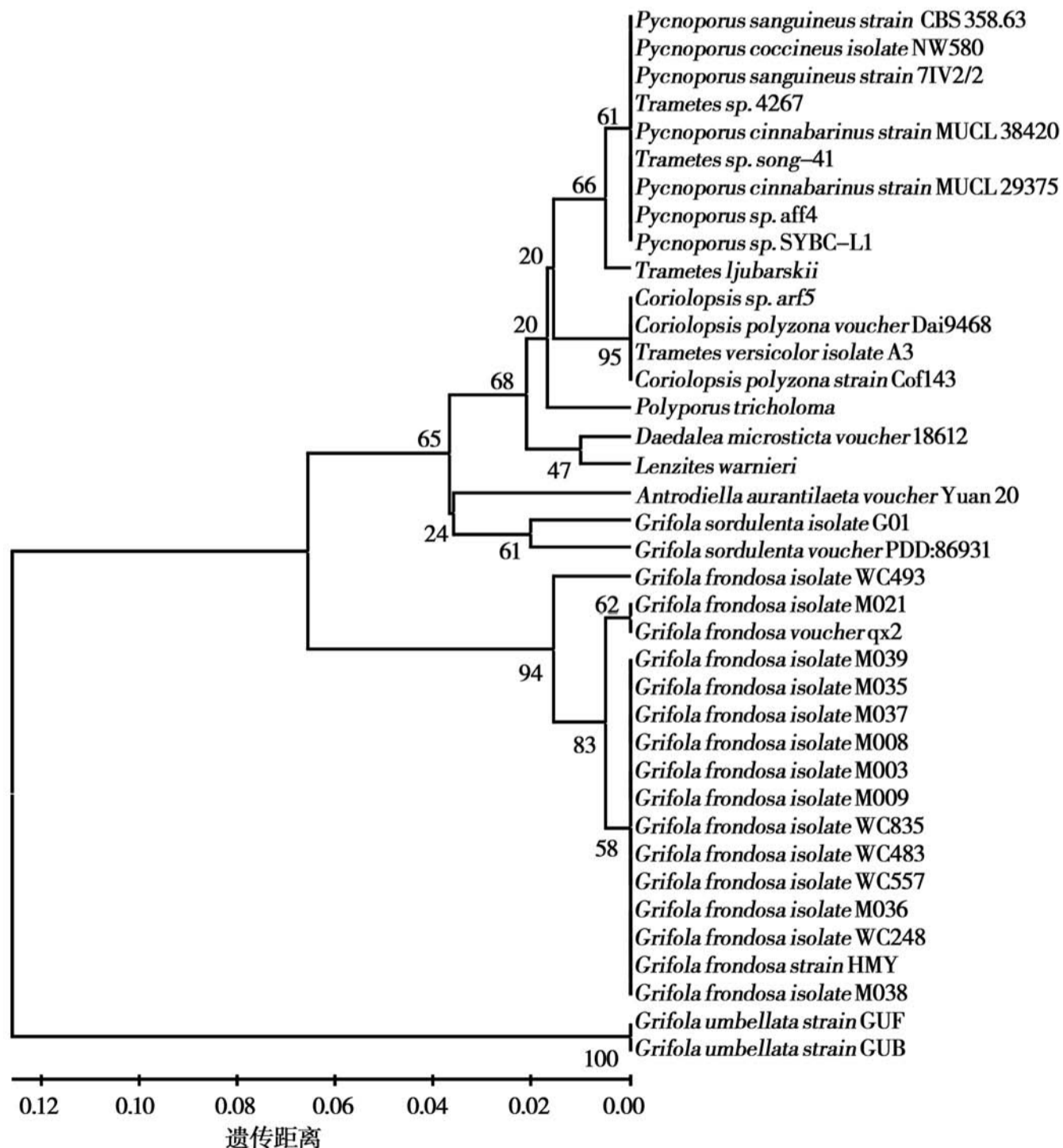


图 1 基于 ITS 序列的灰树花及相关白腐菌 UPGMA 聚类法系统发育树 (树枝上的数字表示 Bootstrap 验证中该树枝的可信度)

2.2 灰树花 4 种培养液中 LiP 的酶活测定

在 4 种不同的培养液中分别对 LiP 的酶活进行检测, 但在 310 nm 处均未检测到吸光值的变化, 表明灰树花不产生 LiP。

2.3 灰树花在 4 种不同的培养液中 MnP 酶活性变化

在 21 天的培养过程中, 灰树花在不含 Mn^{2+} 的

LNAS培养基不加底物条件下,提取的酶液未检测到 MnP 的活性;在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中不加底物条件下,提取的酶液可以检测到 MnP 的活性变化,但活性很低,15 天达到分泌高峰,最大酶活力仅为 $2.96 U \cdot L^{-1}$ 。对比 A、B 两种培养液的检测结果表明, Mn^{2+} 是灰树花产生 MnP 的必要因子,在诱导产生 MnP 的过程中起着关键作用。在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中加入木屑为底物条件下,提取的酶液检测到 MnP 的活性变化,MnP 在 15 天达到最大分泌量,酶活力为 $8.06 U \cdot L^{-1}$;在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中加入 2,6-DMP 为底物的条件下,提取的酶液也检测到 MnP 的活性变化,MnP 在 13 天达到最大分泌量,酶活力为 $3.89 U \cdot L^{-1}$ 。对比 C、D 两种培养过程中 MnP 的产生结果,表明在培养过程中添加木屑和 2,6-DMP 为底物都可以提高 MnP 的产生量,底物对于灰树花木质素降解酶系统可产生诱导作用。在以 2,6-DMP 为底物时 MnP 达到最大分泌量的时间也有缩短。以木屑为底物 MnP 的产量要高于以 2,6-DMP 为底物的 MnP 产生量,其吸收峰在 470 nm 处有明显的峰值变化,而其它 3 种培养方式的 MnP 吸光度和吸收峰表现为不明显的变化。21 天内灰树花在 4 种培养液中产生 MnP 的情况见图 2。3 组重复数据的误差线标注其上。

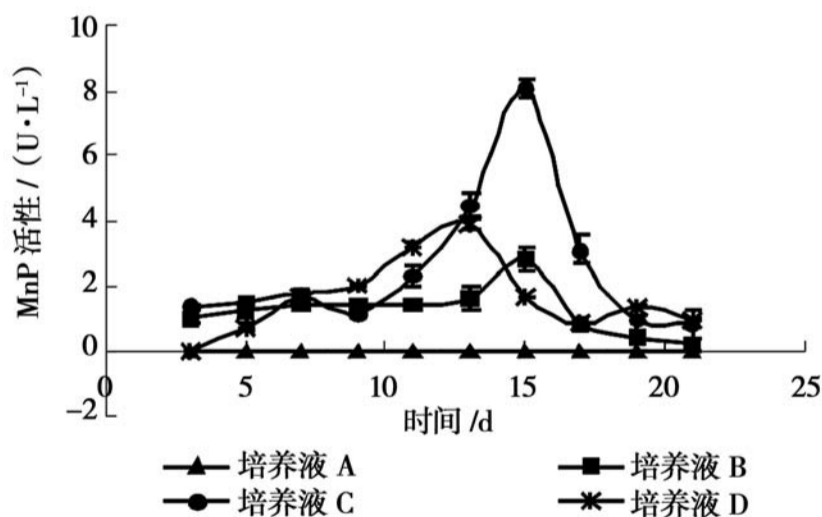


图 2 4 种培养液中 MnP 活性随时间的变化

方差分析结果表明,培养液与培养时间的 *Sig.* 值都小于 0.05,表明培养液之间、不同培养时间之间的 MnP 活性差异都显著(见表 1)。4 种不同的培养液 MnP 的活性差异显著,其中培养液 C 与 A 均值差值最大;培养液 C 随着时间的变化 MnP 在 15 天的均值与 3 天的均值差值最大。

2.4 灰树花在 4 种不同的培养液中漆酶酶活性变化

在 21 天的培养过程中,灰树花在不含 Mn^{2+} 的

表 1 MnP 方差分析

来源	平方和	df	均方	F	Sig. (P=0.05)
校正模型	291.916a	39	7.485	14.624	0.000
截距	223.891	1	223.891	437.438	0.000
培养液	105.612	C	35.204	68.782	0.000
时间	80.591	9	8.955	17.495	0.000
培养液 * 时间	105.712	27	3.915	7.650	0.000
误差	40.946	80	0.512		
总计	556.752	120			
校正的总计	332.861	119			

LNAS培养基不加底物条件下,提取的酶液可以检测到的漆酶的活性,在 9 天达到最大分泌量,酶活力仅为 $2.99 U \cdot L^{-1}$;在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中不加底物条件下,提取的酶液可以检测到漆酶的活性,也在 9 天时达最大分泌量,酶活力达 $4.49 U \cdot L^{-1}$ 。对比 A、B 两种培养液的检测结果表明,漆酶的产生不受 Mn^{2+} 的制约,但在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中漆酶的活性略有提高。在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中加入木屑为底物条件下,提取的酶液检测到漆酶的活性变化,漆酶在第 11 天达到最大分泌量,酶活力为 $9.85 U \cdot L^{-1}$;在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中加入 2,6-DMP 为底物的条件下,提取的酶液也检测到漆酶的活性变化,在 9 天达到最大分泌量,酶活力为 $6.38 U \cdot L^{-1}$ 。对比 C、D 两种培养过程中漆酶的产生结果,表明在培养过程中添加木屑和 2,6-DMP 为底物都可以提高漆酶的产生量,底物对于灰树花木质素降解酶系统可产生诱导作用。在以 2,6-DMP 为底物时漆酶达到最大分泌量的时间也有缩短。以木屑为底物漆酶的产量要高于以 2,6-DMP 为底物的漆酶产生量,其吸收峰在 420 nm 处有明显的峰值变化,而其它 3 种培养方式的漆酶吸光度和吸收峰表现为不明显的变化。21 天内灰树花在 4 种培养液中产生漆酶的情况见图 3。3 组重复数据的误差线标注其上。

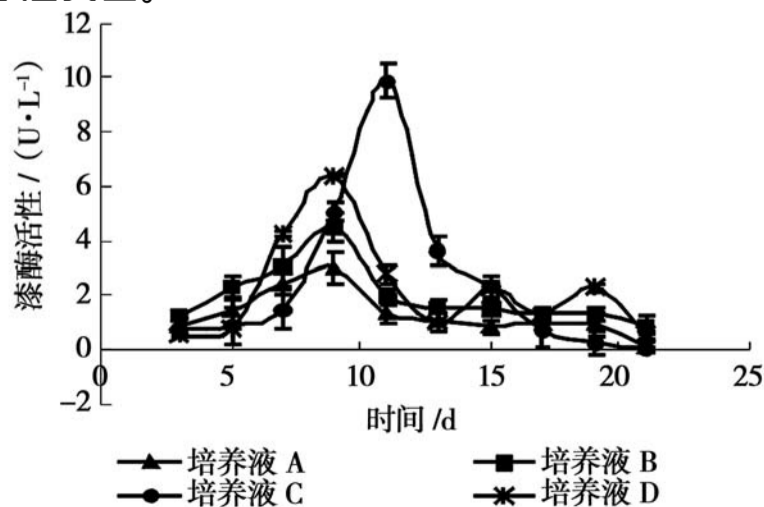


图 3 4 种培养液中漆酶活性随时间的变化

方差分析的结果表明,培养液、培养液与时间的 *Sig.* 值都大于 0.05,表明培养液之间的漆酶活性差异不显著;而培养时间的 *Sig.* 值小于 0.05,表明差异显著(见表 2)。4 种培养液随着时间的变化漆酶在 9 天的均值与 3 天的均值差值最大。

表 2 漆酶方差分析

来源	平方和	<i>df</i>	均方	<i>F</i>	<i>Sig.</i> (<i>P</i> =0.05)
校正模型	419.403	39	10.754	2.096	0.003
截距	526.378	1	526.378	102.618	0.000
培养液	10.210	C	3.403	0.663	0.577
时间	233.634	9	25.959	5.061	0.000
培养液 × 时间	175.559	27	6.502	1.268	0.207
误差	410.360	80	5.129		
总计	1356.140	120			
校正的总计	829.763	119			

3 讨论

本文对灰树花菌株迁西二号进行了 ITS 序列扩增,并对灰树花及相关白腐菌进行了基于 ITS 序列的系统发育分析,结果表明灰树花与奇果菌属、小薄孔菌属等白腐菌聚类成群,其中与 *G. sordulenta* (Mont.) Singer 白腐菌的亲缘关系最近,与 *A. aurantilaeta* (Coker) T. Hatt. & Ryvarden、*D. microsticta* Cooke、*L. warnieri* Durieu & Mont. 等白腐菌的亲缘关系较近。聚类分析结果也表明迁西二号与来自我国台湾和我国大陆等地的 16 个灰树花菌株的遗传距离很接近,它们之间的 ITS 序列同源性均达到 99%。由于亲缘关系相近、分类地位相同的生物种的生物学特性也相似,那么对于灰树花及相关白腐菌进行系统发育分析,可以推测它们至少某些生物学特性也可能相似,这还有待进一步的试验去证明。今后可进行这些系统发育相近种分解木质素能力的测定,以鉴别它们在分解木质素能力方面是否有相似性。

本文采用 LNAS 培养基在 4 种不同培养液中对白腐菌灰树花木质素降解酶系统的主要酶系锰过氧化物酶(MnP)、漆酶和木质素过氧化物酶(LiP)的活性进行了检测,为研究灰树花产生的木质素降解酶系统作用机制提供了基础酶学依据。结果表明,灰树花可同时产生 MnP 和漆酶。但不产生 LiP,两种酶的活性变化是有规律的。漆酶都是在 3 天之后产生,随之迅速地升高,在第 9 天达到最高,以后迅速下降,11 天之后就变得较低,15 天之后趋向消

失。MnP 也是在 3 天之后产生,只是活性很低,随之逐渐升高,在第 13 天达到最高,以后又逐渐下降,17 天之后接近为 0。通过两种酶活性的检测,也获得了酶与培养基的成分和酶作用的底物等条件的关系。对比 4 种成分不同的培养液酶活力测定结果可以看出, Mn^{2+} 也是灰树花产生 MnP 的必要因子,而漆酶的产生则不受该条件的制约。在培养液内添加酶作用的底物木屑和 2,6-DMP 后,可以轻微地提高 MnP 和漆酶的分泌量,表明底物对于灰树花木质素降解酶系统产生的诱导作用。底物不同对于培养过程中酶的产生影响也不同,添加木屑为底物比添加 2,6-DMP 为底物的菌丝生长速度快、生物量高, MnP 和漆酶的产量也稍高,原因可能是 2,6-DMP 本身对灰树花菌丝的生长具有一定的抑制作用,从而阻碍了酶的分泌。以上两种酶的活性规律与其他白腐菌的研究结果相似^[26]。在 4 种培养过程中均未观察到培养液颜色的变化。

从酶活性的检测结果还可以看出,尽管灰树花能够产生分解木质素结构的酶系统,但是对比以往的白腐菌分解木质素酶系统的酶活力,灰树花的 MnP 和漆酶的活性都较低,表明不同白腐菌之间酶的活性差异很大,而灰树花是一种产生分解木质素酶系统活性较低的白腐菌。首先,在限制营养型 LNAS 基础培养基的培养条件下,灰树花表现出较低的 MnP 和漆酶活性,如灰树花在含 Mn^{2+} 但未添加底物的培养液 MnP 最大酶活仅为 $2.96 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活仅为 $4.49 U \cdot L^{-1}$;而在相同培养条件下,红平菇的 MnP 最大酶活为 $5 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活仅为 $36 U \cdot L^{-1}$;偏肿栓菌的 MnP 最大酶活为 $13 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活仅为 $38 U \cdot L^{-1}$ 。在含 Mn^{2+} 的 LNAS 培养基中加入木屑为底物条件下,灰树花 MnP 最大酶活为 $8.06 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活为 $9.85 U \cdot L^{-1}$;而在相同培养条件下,红平菇的 MnP 最大酶活为 $69 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活为 $205 U \cdot L^{-1}$;偏肿栓菌的 MnP 最大酶活为 $165 U \cdot L^{-1}$,漆酶最大酶活为 $445 U \cdot L^{-1}$ ^[18, 27]。其次,在添加两种底物后,两种酶的活性增加都不高。再者,两种酶活性在最大值前后都表现出波动起伏的现象,也体现了酶活力较弱和不稳定的特征。

本文对 MnP、漆酶和 LiP 的酶活检测,采用了 LNAS 液体培养基,这是一种营养成分有限的基础产酶培养基,虽然可以检测菌种是否能够产生 MnP、漆酶和 LiP,但是酶活力并不是很高。如需提高酶活

力、缩短产酶时间, 还需进一步选择加富营养型培养基并对产酶条件进行优化。

参考文献:

- [1] Lic M, Akileswaran L, Gold M H. Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1338: 1 - 7
- [2] Tello M, Corsini G, Larrondo L F, *et al.* Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvemisporea* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1490: 137 - 144
- [3] Irie T, Honda Y, Ha H C, *et al.* Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* [J]. *J Wood Sci*, 2000, 46: 230 - 233
- [4] Johansson T, Nyman P O, Cullen D. Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 2077 - 2080
- [5] Hildén K, Martínez A T, Hatakka A, *et al.* The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42: 403 - 419
- [6] 孙 迅. 粗毛栓菌的木质纤维素降解酶及其基因克隆 [D]. 成都: 四川大学, 2004
- [7] 官 敏. 好食脉孢菌产锰过氧化物酶培养条件的优化、酶的纯化以及酶学性质的分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2006
- [8] 闫洪波. 偏肿拟栓菌锰过氧化物酶 cDNA 基因克隆及在毕赤酵母中的表达 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009
- [9] 张银波, 姜 琼, 江木兰, 等. 金针菇漆酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究 [J]. *微生物学报*, 2004, 44 (6): 775 - 779
- [10] 谌 斌, 唐雪明, 沈 微. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达 [J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25 (4): 43 - 54
- [11] Cui F J, Tao W Y, Xu Z H, *et al.* Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801 [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 395 - 401
- [12] Lee B C, Bae J T, Pyo H B, *et al.* Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 574 - 581
- [13] 王海燕. 灰树花 GPD 启动子及药效相关基因的克隆 [D]. 海口: 华南热带农业大学, 2004
- [14] 崔凤杰. 灰树花深层发酵条件优化及其菌丝体抗肿瘤糖肽的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2006
- [15] 池玉杰, 李俊涛, 刘智会. 灰树花的培养特性与液体菌种栽培技术 [J]. *东北林业大学学报*, 2007, 35 (3): 49 - 52, 58
- [16] Shen Q, Geiser D M, Royse D J. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates [J]. *Mycologia*, 2002, 94 (3): 472 - 482
- [17] 张美彦, 尚晓冬, 李 玉, 等. ITS2 RFLP 及 SRAP 标记在灰树花种质评价中的应用 [J]. *食用菌学报*, 2009, 16 (3): 5 - 10
- [18] Maeda Y, Kajiwara S, Ohtaguchi K. Manganese peroxidase gene of the perennial mushroom *Elfvigia applanata*: cloning and evaluation of its relationship with lignin degradation [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 103 - 109
- [19] Lankinen P, Hilden K, Aro N, *et al.* Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66: 401 - 407
- [20] Nagai M, Sakamoto Y, Nakade K, *et al.* Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes* [J]. *Mycoscience*, 2007, 48: 125 - 130
- [21] Kirk T K, Schultz E, Conors W J, *et al.* Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Arch Microbiol*, 1978, 117: 277 - 285
- [22] Hatakka A, Uusi-r A K. Degradation of ¹⁴C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi [J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 198, 17: 235 - 242
- [23] Eggert C, Temp U, Eriksson K E. The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1151 - 1158
- [24] Wariishi H, Valli K, Gold M H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (33): 23688 - 23695
- [25] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238 - 249
- [26] Chi Y J, Hatakka A, Majjala P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2007, 59 (1): 32 - 39
- [27] 池玉杰, 闫洪波. 红平菇木质素降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的检测 [J]. *林业科学*, 2009, 45 (12): 154 - 158