

# 利用细胞外酵素活性分析进行灵芝属菌株 分类之研究 (续)

许瑞祥 (国立台湾大学农业化学系 台北)

## 3-2. 灵芝属菌株漆氧化酶同功酵素图谱分析结果:

3-2-1 标准漆氧化酶 (laccase, L-5510) 之活性分析, 以 Sigma L-5510 漆氧化酶经系列稀释后活性分析结果如图 (3-3) 中所示。由图 (3-3) 中的结果显示波长 525 nm 的吸光值与 L-5510 漆氧化酶所标示之活性单位 1221.6, 814.8, 610.8 间呈直线关系, 但其吸光值与原标示活性之吸光值相差很大, 约只有原标示活性的 4%, 可能在运送及保存期间处理不当而使酵素活性丧失。

## 3-2-2 灵芝 (*G. lucidum*) 的细胞外漆

氧化酶活性与反应温度的关系, 以灵芝的培养液测定反应温度与漆氧化酶活性之关系如图 (3-4) 中所示。由图 (3-4) 中的测定结果显示在 32℃ 时有最高的  $\Delta A_{525}$  值, 显示灵芝的细胞外漆氧化酶在 32℃ 时有最高的活性。在其他的担子菌如 *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* 等的漆氧化酶活性最适温度为 24℃ (De Vries et al, 1986, Leatham, et al, 1981)。而灵芝之最适温度为 32℃, 可能与灵芝菌株本身的最佳生长温度在 30-34℃ (Adaskaveg et al, 1986) 间有关。

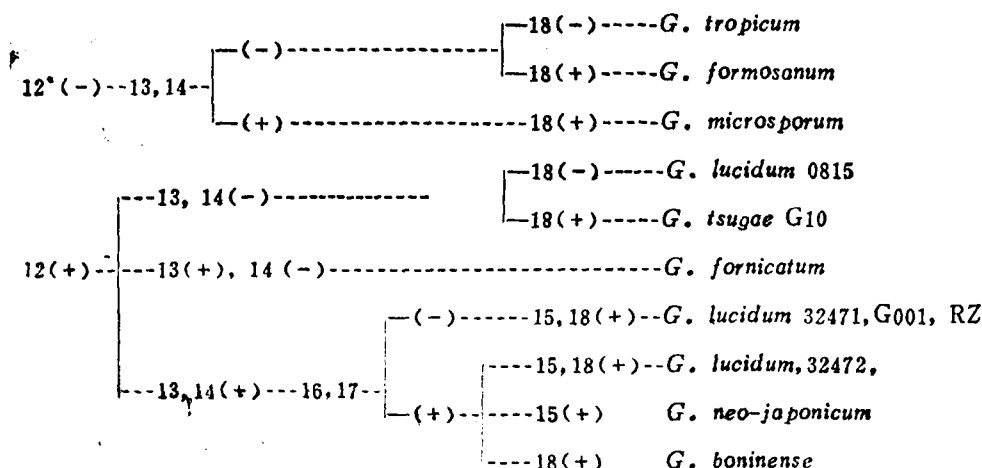


Fig. 3-2 Classification of *Ganoderma* species by the API-ZYM enzyme testing system.

\* API-ZYM enzyme code number

图 3-2 灵芝属菌株经 API-ZYM 分析结果所得的类缘关系图

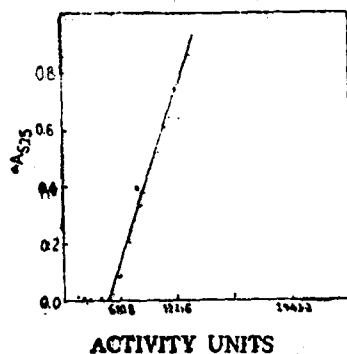


图 3-3 Sigma L-5510 漆氧化酶的活性分析结果  
Fig. 3-3 Assay of Sigma L-5510 laccase activity

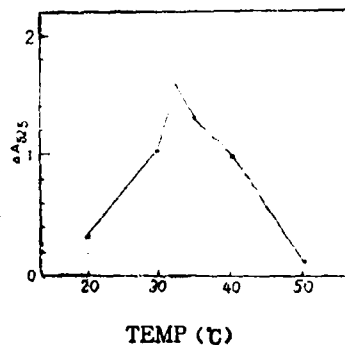
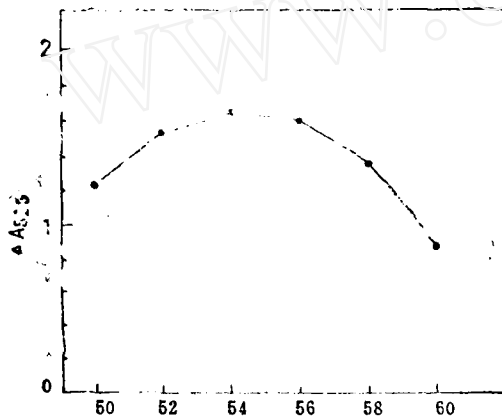


图 3-4 灵芝菌株细胞外漆氧化酶活性最适温度

Fig. 3-4 Optimum temperature of the extracellular laccase activity of *Ganoderma lucidum*

3—2—3 灵芝的细胞外漆氧化酶活性与反应系中酸碱值的关系：以灵芝培养液在不同酸碱值 pH5.0—6.0 的 0.2M citrate-phosphate 缓冲溶液中，测定其漆氧化酶活性与酸碱值之关系，结果如图(3—5)所示。由图(3—5)可知灵芝的细胞外漆氧化酶在 pH=5.4 的 citrate-phosphate 缓冲溶液中有较高的活性。1984 年 Bollag 等的实验结果亦显示一些担子菌菌株的细胞外漆氧化酶活性分析的最适 pH 值在 5.0—5.7 之间，如 *Fomes annosus* 5.0, *Lentinus edodes* 5.0, *Pholiota mutabilis* 5.2, *Pleurotus ostreatus* 5.7。而本实验中所得的灵芝细胞外漆氧化酶最适反应 pH 值为 5.4 亦在此范围内。



3—5 灵芝菌株细胞外漆氧化酶活性之最适酸碱值  
fig. 3—5 Optimum pH value of the extracellular  
laccase activity of *Ganoderma lucidum*.

表 3—4

灵芝属菌株培养液中细胞外漆氧化酶活性之测定

Table 3—4 The extracellular laccase activity in the cultured medium of *Ganoderma* spp.

| $\Delta A_{525}$ days   | 7    | 9    | 12   | 15   | 17   | 22   | 26   | 30   | 34   |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Species                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>G. applanatum</i>    | 0.90 | 0.92 | 0.81 | 0.88 | 0.78 | 0.85 | 0.88 | 0.82 | 0.94 |
| <i>G. boninense</i>     | 0.77 | 0.82 | 0.73 | 0.69 | 0.62 | 0.45 | 0.30 | 0.32 | 0.40 |
| <i>G. formosanum</i>    | 0.85 | 0.89 | 0.84 | 0.89 | 0.85 | 0.73 | 0.86 | 0.77 | 0.78 |
| <i>G. fornicatum</i>    | 0.01 | 0.01 | 0.23 | 0.45 | 0.23 | 0.76 | 0.83 | 0.81 | 0.91 |
| <i>G. lucidum</i> RZ    | 0.79 | 0.79 | 0.85 | 0.80 | 0.81 | 0.85 | 0.86 | 0.83 | 0.93 |
| <i>G. lucidum</i> G001  | 0.24 | 0.89 | 0.83 | 0.77 | 0.76 | 0.80 | 0.86 | 0.80 | 0.87 |
| <i>G. microsporum</i>   | 0.51 | 0.83 | 0.78 | 0.88 | 0.81 | 0.78 | 0.85 | 0.77 | 0.84 |
| <i>G. neo-japonicum</i> | —    | 0.01 | 0.05 | 0.09 | 0.28 | 0.50 | 0.74 | 0.67 | 0.82 |
| <i>G. tropicum</i>      | 0.75 | 0.91 | 0.84 | 0.82 | 0.86 | 0.82 | 0.89 | 0.88 | 0.94 |
| <i>G. tsugae</i>        | 0.82 | 0.90 | 0.81 | 0.86 | 0.76 | 0.83 | 0.73 | 0.76 | 0.86 |

表 3—5

灵芝属菌株细胞外漆氧化酶出现稳定活性( $\Delta A_{525} > 0.6$ )的培养天数Table 3—5 Minimum growing days required for the appearance of extracellular  
laccase activity of *Ganoderma* strains ( $\Delta A_{525} > 0.6$ )

| Dikaryon strains        | Days | Monokaryon strains      | Days |
|-------------------------|------|-------------------------|------|
| <i>G. applanatum</i>    | 7    | <i>G. lucidum</i> RZ—2  | 10   |
| <i>G. boninense</i>     | 7    | <i>G. lucidum</i> RZ—3  | 4    |
| <i>G. formosanum</i>    | 7    | <i>G. lucidum</i> RZ—4  | 4    |
| <i>G. fornicatum</i>    | 22   | <i>G. lucidum</i> RZ—31 | 4    |
| <i>G. lucidum</i> RZ    | 7    | <i>G. lucidum</i> RZ—34 | 10   |
| <i>G. lucidum</i> G001  | 9    |                         |      |
| <i>G. microsporum</i>   | 9    |                         |      |
| <i>G. neo-japonicum</i> | 26   |                         |      |
| <i>G. tropicum</i>      | 7    |                         |      |
| <i>G. tsugae</i>        | 7    |                         |      |

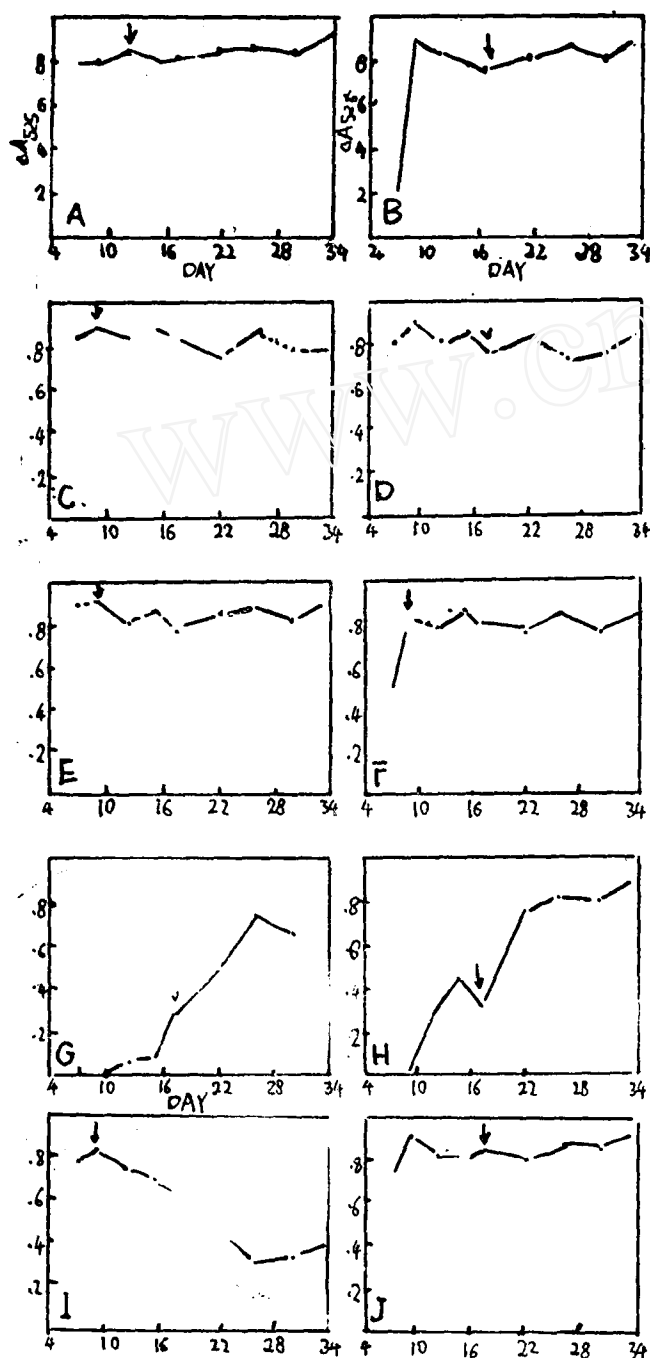


图 3—6 不同的灵芝属菌株细胞外漆氧化酶活性与生长时期的关系。箭头表示菌丝长满培养液表面的培养天数

Fig. 3—6 Relationship between extracellular laccase activity and growth of different strains of *Ganoderma* spp. Arrows indicate that mycelia having grown full of the surface of liquid cultures.  
 A. *G. lucidum* RZ E. *G. applanatum* I. *G. boninense*  
 B. *G. lucidum* G001 F. *G. microsporum* J. *G. tropicum*  
 C. *G. formosanum* G. *G. neo-japonicum*  
 D. *G. tsugae* H. *G. fornicatum*

3—2—5 灵芝单核体菌株细胞外漆氧化酶活性分析结果, 以不同交配型之灵芝 *G. lucidum* RZ 单核体菌株经培养后分析其培养液中细胞外漆氧化酶之活性, 其结果如图 (3—7) 所示。图 (3—7) 之结果显示单核体的灵芝菌株在液体培养基中亦能产生细胞外之漆氧化酶, 且其中的 *G. lucidum* RZ—3, *G. lucidum* RZ—4, *G. lucidum* RZ—31 在培养 4 天即具明显  $\Delta A_{525} > 0.6$  的细胞外漆氧化酶活性, 较其亲代之 *G. lucidum* RZ 更早出现, 而 *G. lucidum* RZ—2, *G. lucidum* RZ—34 则要在培养 10 天后才有较明显的漆氧化酶活性出现, 此结果显示在经减数分裂的子代与其亲代间已有差异性。有关异种间, 双核体和单核体灵芝菌株在细胞外漆氧化酶活性差异, 与其组成构造上差异的关系更需深入的探讨。

3—2—6 不同培养时期灵芝菌株细胞外漆氧化酶电泳图谱: 以灵芝 (*G. lucidum* RZ) 菌株于 30℃ 下培养六周, 经连续取电泳分析及活性染色后所得之紫红色应带。经计算各反应带之移动 (Rf) 比值后, 以其相对位置而得之同功酵素图谱如图 (3—8) 所示。由图 (3—8) 中结果显示灵芝菌株在接种培养 7 天后已出现 2 条漆氧化酶同功酵素之反应带, 培养 10 天后出现 3 条反应带, 在 14—21 天的培养期间维持稳定而明显的 3 条反应带, 28 天后开始减少至 42 天时仅维持一条反应带。由此结果可知灵芝菌株之细胞外漆氧化酶之活性及其同功酵素之组成随培养时间而变化, 在 2—3 周的培养期间其漆氧化酶之电泳图谱较具多样性, 故在不同菌株间之比较时, 皆以 2—3 周培养之取样样品为主。并与 1988 年曾等分析灵芝菌株的 esterase 电泳图谱时, 在培养初期有较多的同功酵素反应带而后减少的情形相似。

3—2—7 灵芝菌株细胞内外漆氧化酶之电泳图谱: 以灵芝 *G. lucidum* RZ 菌株在 30℃ 下培养, 每隔 3 天取样分析其中 3 瓶。菌丝体经离心回收、无菌水清洗后, 以连续结冻、解冻打破细胞壁后, 置于研钵中加 pH 值 5.4, 0.2M citrate-phosphate 缓冲液研磨后萃取细胞内酵素。将各不同培养时期所得的

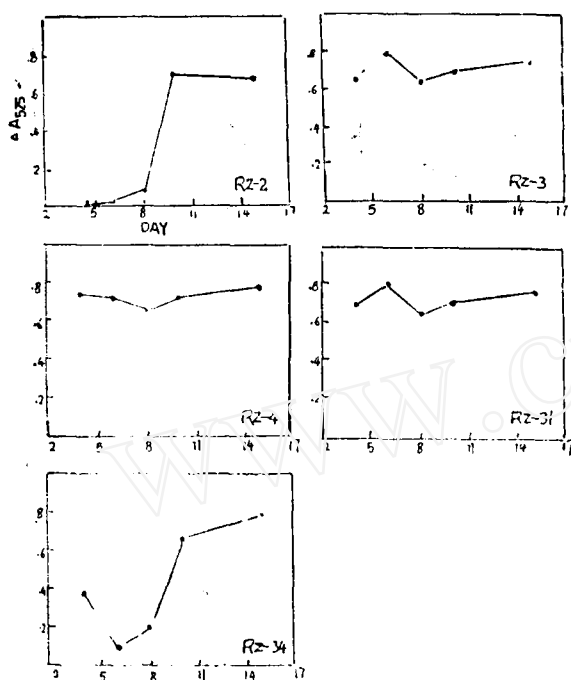


图3—7 灵芝单核体菌株细胞外漆氧化酶活性与生长时期的关系

Fig. 3—7 Relationship between extracellular laccase activity and growth of monokaryotic strains of *Ganoderma lucidum*.

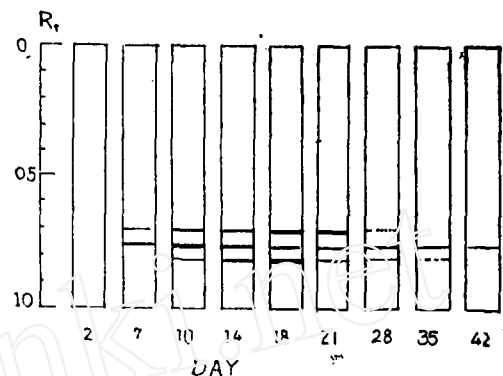
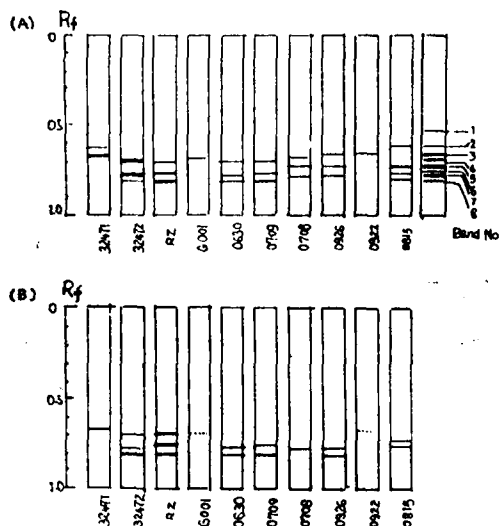


图3—8 灵芝 (*G. lucidum* RZ) 菌株在不同生长时期细胞外漆氧化酶电泳分析图谱

Fig. 3—8 Diagrammatic illustration of zymograms of extracellular laccase at various growth stages of *Ganoderma lucidum* RZ.



3—10 灵芝菌株经2周(A)及3周(B)培养后细胞外漆氧化酶电泳分析图谱

Fig. 3—10 Diagrammatic illustration of zymograms of extracellular laccase after 2 weeks of grow (A) and after 3 weeks of growth (B) cultural media of *Ganoderma lucidum* isolates.

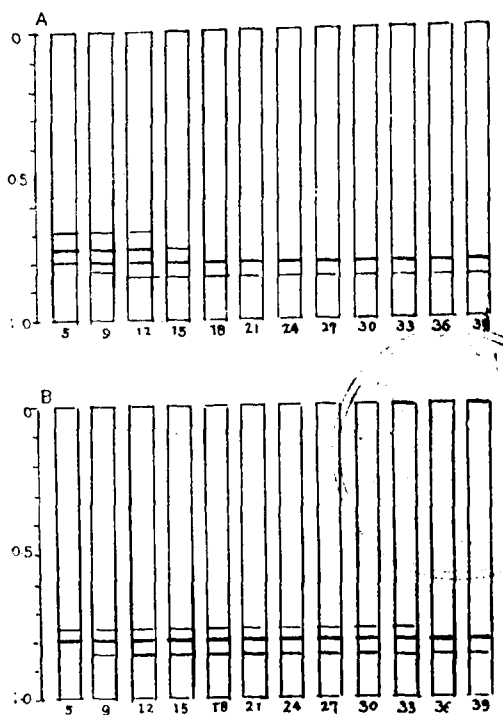


图3—9 *Ganoderma lucidum* RZ 菌株在不同生长时期细胞内(A),外(B)漆氧化酶电泳分析结果

Fig. 3—9 Diagrammatic illustration of zymograms of intracellular (A), and extracellular (B) laccase at various growth stages of *G. lucidum* RZ.

培养液和萃取液经电泳分析及活性染色后所得结果如图(3—9)所示。图(3—9)中可见在灵芝菌丝体培养初期(12天内),细胞内有较多的漆氧化酶同工酶反应带,而至第18天后即维持2条反应带。在细胞外则于第9天后出现稳定的3条反应带,至第36天后与胞内维持相同的2条反应带。此

结果显示在取样分析的39天中漆氧化酶同功酵素图谱在菌丝体内外皆可维持3—4周稳定的结果,且细胞外所出现的图谱较细胞内多1条反应带且稳定时间较长。故在本实验中皆以细胞外漆氧化酶为电泳分析样品来源。

3-2-8 灵芝菌株细胞外漆氧化酶之电泳分析结果,10株不同来源的灵芝(*G. lucidum*)菌株于30℃下培养于第2,3周取样经电泳分析其漆氧化酶之电泳图谱(3-10)所示。由图(3-10)中结果显示不同分离来源的灵芝菌株其漆氧化酶电泳图谱具差异性,在经3周培养后其漆氧化酶之反应带已有减少的情形。由图(3-10)中各组反应带之相对位置次序而得表(3-6)。由表(3-6)中结果显示在2周的培养液中各组皆具较多的同功酵素反应带,而在*G. lucidum* RZ和*G. lucidum* G001的杂交后代中*G. lucidum* 0630与*G. lucidum* RZ皆具3条相同位置的反应带而*G. lucidum* 0708, *G. lucidum* 0926却出现不相同位置反应带,此结果与1981年Toyomasu等发现在*L. edodes*的杂交后代中出现其亲代更复杂的esterase同功酵素图谱的结果相似。由于同种间杂交产生的多样性,可能有助于解释同种灵芝菌株间在漆氧化酶电泳图谱上之差异。

表3-6 灵芝菌株细胞外漆氧化酶经聚丙烯酰胺电泳分析结果

Table 3-6 Polyacrylamide disc gel electrophoretic analysis of extracellular laccase in *Ganoderma lucidum* isolates

| Isolates                | 2weeks  | 3weeks |
|-------------------------|---------|--------|
| <i>G. lucidum</i> 32471 | 2.3*    | 3      |
| <i>G. lucidum</i> 32472 | 4.7.8   | 4.7.8  |
| <i>G. lucidum</i> RZ    | 4.7.8   | 4.7.8  |
| <i>G. lucidum</i> G001  | 4       | 4      |
| <i>G. lucidum</i> 0630  | 4.7.8   | 7.8    |
| <i>G. lucidum</i> 0709  | 4.7.8   | 6.8    |
| <i>G. lucidum</i> 0708  | 4.5.7   | 7      |
| <i>G. lucidum</i> 0926  | 3.5.7   | 7.8    |
| <i>G. lucidum</i> 0922  | 3       | 3      |
| <i>G. lucidum</i> 0816  | 2.6.7.8 | 5.6    |

\* Band no. in Fig (3-10)

3-2-9 灵芝属菌株细胞外漆氧化酶之电泳分析结果,12株灵芝属菌株于30℃下静置培养,于第2,3周时经取样及电泳分析活性染色后所得之电泳图谱如图(3-11)所示。由图(3-11)中结果显示在2周的培养液中各组皆出现较多的同功酵素反应带,与图(3-10)中灵芝菌株的结果相似。由图(3-11)中各组反应带之相对位置而得表(3-7)。由表(3-7)中显示灵芝菌株异种间在漆氧化酶电泳图谱上有明显的差异,此结果与形态分类上的特性配合将更有助于菌种之判定。而在供试的菌株中如*G. applanatum*, *G. formosum*等在不同分离来源的菌株间亦具差

异,对于同种同品系之辨认可为参考之佐证。由第3周之培养液取样分析结果得知其漆氧化酶电泳图谱中反应带皆明显减少,而已无法用于分类之比较。故在以漆氧化酶同功酵素电泳图谱进行菌株间化学特性分类时,其培养条件与取样时期须标准化。

表3-7 灵芝菌株细胞外漆氧化酶经聚丙烯酰胺电泳分析结果

Table 3-7 Polyacrylamide disc gel electrophoretic analysis of extracellular laccase in *Ganoderma* isolates

| Isolates                |      | 2weeks  | 3weeks |
|-------------------------|------|---------|--------|
| <i>G. applanatum</i>    | 1206 | 1.4.7*  | 7      |
| <i>G. applanatum</i>    | 0705 | 1.2.4.7 | 7      |
| <i>G. boninense</i>     | RS   | 7       | 7      |
| <i>G. formosum</i>      | BZ   | 6.7     | 6.8    |
| <i>G. formosum</i>      | 0109 | 6       | 6      |
| <i>G. fornicatum</i>    | 0814 | 7.8     | 7.8    |
| <i>G. microsporum</i>   | 0821 | 7       | 7      |
| <i>G. neo-japonicum</i> | VZ   | 4.7     | 4      |
| <i>G. neo-japonicum</i> | 0813 | 4.7     | 7      |
| <i>G. tropicum</i>      | 1111 | 3.4     | 4      |
| <i>G. tsugae</i>        | BLC  | 8       | 8      |
| <i>G. tsugae</i>        | 1109 | 8       | 8      |

\* Band no. in Fig (3-11)

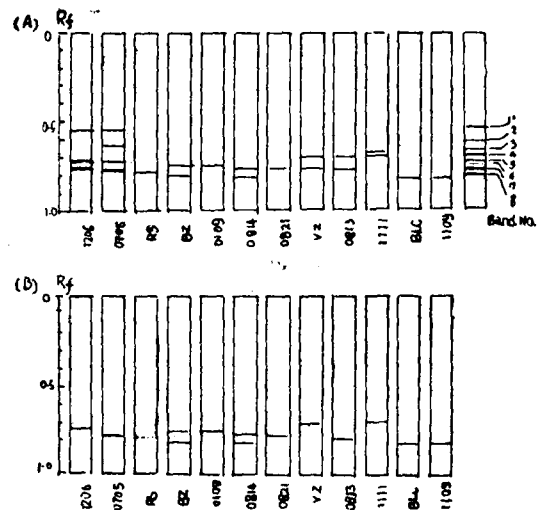


图3-11 灵芝属菌株经2周(A)及3周(B)培养后细胞外漆氧化酶电泳分析图谱

Fig. 3-11 Diagrammatic illustration of zymograms of extracellular laccase after 2weeks of growth(A) and after 3weeks of growth (B) cultural media of *Ganoderma* species.

由图(3-10, 3-11)中之结果显示灵芝属菌株间在其漆氧化酶同功酵素电泳图谱上有明显的差异性。由表(3-6, 3-7)中经2周培养之培养液以电泳分析结果整理而得图(3-12)中,以漆氧化酶同功酵素电泳分析后反应带之有无做为供试之22株灵芝属菌株分类标准时,可将各菌株做明确而有效的区别。对于未来灵芝属菌株间鉴定时应有帮助,并可被利用于遗传育种研究时之标记。

# 室温条件下药用真菌菌种的保藏

王淑芳 徐贵祥 杨永春 (中国医学科学院药物研究所 北京 100060)

为了能在室内自然温度条件下, 寻找供试药用真菌菌种存活3年以上的保存方法, 我们进行了以下四种保藏法比较。

## 材料与方法

一、供试菌种: 本所原冰箱保藏的继代斜面部分菌种, 详见后表, 每种选一株。

二、试验材料: 磷酸盐试剂: CP级, 蒸馏水配制成0.2 mol/L, pH 7.0的缓冲液。石蜡油: 北京化工厂产液体石蜡, 用前高压灭菌两次。琼脂培养基: 麦麸5%煮汁1000 ml, 加蔗糖10 g, 葡萄糖10 g, 硫酸镁及磷酸二氢钾各1 g, 琼脂粉12 g, pH自然, 为6.5。棉籽壳培养基: 干净无霉, 有短绒新鲜棉籽壳180 g, 新鲜麦麸60 g, 混匀加水300 ml。试管: 18×180 mm。白胶塞: 1号规格。

三、试验方法: 将准备保存的菌株, 分别转接于制备好的琼脂及棉籽壳培养基上, 22--24℃培养10天, 分别按下述方法保藏。

(一) 磷酸盐缓冲液灌入每支试管10 ml, 灭菌后将生长好的各菌株斜面, 分别挑取绿豆大小的菌块, 无菌操作移入缓冲液中。每管6块, 每株3管。均换去棉塞, 改为灭过菌的白胶塞。外用融化的固体蜡封, 立置保存。

(二) 将灭菌石蜡油灌入菌苔已生长好的琼脂试管斜面上, 以浸没斜面并稍高出1 cm为准。用灭菌白胶塞换去棉塞, 封蜡立置保存。

(三) 生长好的琼脂斜面菌种, 以白胶塞换去棉塞, 封蜡保存。

(四) 生长好的棉籽壳麦麸基质菌种,

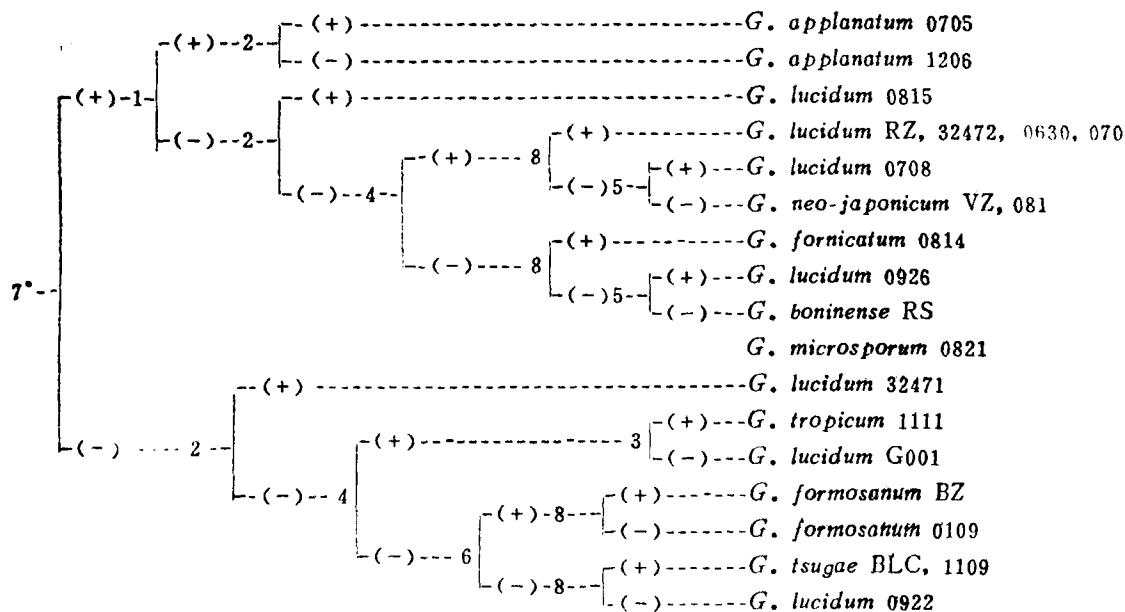


图3—12 灵芝属菌株以细胞外漆酶之聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析结果所得之类群关系

Fig. 3—12 Classification of *Ganoderma* spp. by extracellular laccase polyacrylamide gel electrophoresis separation patterns.

• Band No. in table 3—6, 3—7