

利用细胞外酵素活性分析进行灵芝属菌株 分类之研究

许瑞祥 (国立台湾大学农业化学系 台北)

1. 前言

传统以形态为基础的分类中常因形态特性受环境影响而造成困扰。对于寄生性真菌分类研究时,以生化反应鉴定其菌种间生理异化性(Physiologic specialization)为其主要的分类依据,而以生理特性为分类基础的化学分类模式在1970年起成为真菌分类的热门课题。在有关真菌分类文献中以同功酵素及可溶性蛋白质的电泳分析图谱作为分类标准者最为常见。1974年Snider等以pH8.0 0.05M Tris-glycine缓冲液萃取可溶的蛋白质电泳图谱进行*Taphrina*属菌株分类时,显示在种内(Intraspecies)的相似性较种间(Interspecies)为高。1985年Seviour等分析孢子囊孢子中可溶性蛋白质图谱作为*Rhizopus*属菌株分类的依据。1985年Tariq等报告分析菌核(sclerotia)中蛋白质图谱可作为*sclerotinia*属菌株分类的指标。在有关同功酵素图谱分析中,选择分析的酵素种类常随菌种而异,一般较常见的有: Esterase, Malate dehydrogenase, Peroxidase, Cataloxidase, Polyphenoloxidase等。

1973年Shannon等分析结果显示在*Polyporus*属中同种间的同功酵素图谱相似性较高。1981年May等利用19种同功酵素图谱鉴别双孢蘑菇(*A. bisporus*)及香菇(*L.edodes*)菌株的来源是由自然采集或人工杂交育种而得。1981年Toyomasu等则用于探讨香菇菌株经交配育种后亲代与子代间的关系。1982年Zuber等利用同功酵素图谱做为5株不同的水稻病原菌(*Rhizoctonia salani*)间判断其来源的标准。1982年May等利用同功酵素确认在*A. brunnescens*经同核体交配后产生的异核体其电泳图谱与同核体的不同,做为判断交配与否的指标。1982年Royse等则将野生及栽培品系的双孢蘑菇异核体菌株由其同功酵素图谱分成27种基因类型(genotypic classes),作为育种时的参考指标。1986年Park等报告以菌丝体内的esterase进行16株不同来源*G. lucidum*间类缘关系的比较。1986年Ohmasa等在分析40株香菇菌株的结果中发现在不同培养基组成及培养时期下,同功酵素的图谱会有变化。1987年陈都珍等在比较不同栽培条件,采收时期及采收部位的风尾菇子实体中esterase的同功酵素图谱基本上相同皆具10条反应带,但在活性高

低上会差异。1988年曾等以esterase的图谱分析可区别*G. lucidum*和*G. tsugae*菌株。

在木质素的分解时,漆氧化酶(Laccase, p-diphenol oxygen oxidoreductase, E.C. 1,10,3,2)被视为重要的酵素之一(Molitoris, 1978)。漆氧化酶是一种需氧,含铜的醌蛋白,其分子量约为100,000。可催化monophenols, o-, p-diphenols, aminophenol等的氧化反应(Mayer et al, 1979)。在*A. bisporus*(Turner, et al. 1975, Wood, 1980), *S. commune*(De Vries et al, 1986), *L.edodes*(Leatham et al, 1981)等子实体形态分化初期,会有漆氧化酶活性增加的现象。1975年Blair等以漆氧化酶的同功酵素图谱作为白腐型真菌分类模式时认为在异种间可行。1988年Kerrigan等利用其同功酵素图谱分析16株*Agaricus*属菌株时显示在同种间具明显的相似性。

1977年Humble等提出利用API-ZYM分析系统快速测定细菌水解酵素活性种类作为分类的指标后,同年Tharagounet等利用API-ZYM进行嫌气性革兰氏阴性菌分类及鉴定。1984年Bridge等首先利用API-ZYM分析青霉属(*Penicillium*)细胞外酵素活性,进行菌株分类结果显示和形态分类相符合。1989年Mugenai等在其*Beauveria*属的菌株分类系统中亦包括API-ZYM的酵素分析项目。

由于灵芝属为典型的白腐型真菌,且亦经证实*G. lucidum*菌丝体能产生漆氧化酶(Lee et al, 1986)。本试验中将利用API-ZYM酵素分析系统和漆氧化酶同功酵素电泳图谱,作为灵芝属菌株化学分类系统之指标。

2. 材料与方 法

2-1. 试验菌株及保存、前培养方法如第二章所述。

2-2. API-ZYM分析细胞外酵素活性部分。

2-2-1 API-ZYM分析用液体培养基之配制:以Y.M.培养基(麦芽抽出物0.3%,酵母抽出物0.3%,蛋白胨0.5%,葡萄糖1%)和Czapek培养基(Difco, Czapek Box. Broth)分别配制的液体培养基,各取25ml分装于50ml的三角瓶中,在121℃杀菌15分钟后备用。

2-2-2 接种:将前培养所得的菌落,以打孔器沿菌落边缘切下直径5mm的菌块,分别接

种一块于Y.M.和Czapek的液体培养基中,在28℃下静置培养。

2-2-3 API-ZYM分析方法:API-ZYM 2520酵素分析系统购自法国API-system。将经培养后的各组菌液,在振荡均匀后吸取上澄液分别滴入API-ZYM的各项样品槽位置,各项中分析的酵素如表(3-1)所示。将此酵素反应置于37℃下进行4小时后先加入1滴ZYM-A溶液停止酵素作用后,再加一滴ZYM-B溶液照光显色后,以标准色卡对照其颜色的相对数值并记录其结果。

2-3 漆氧化酶同功酵素电泳图谱分析部分:

2-3-1 标准酵素活性分析:取0.1ml的标准漆氧化酶(laccase, Sigma L-5510)酵素溶液,加入0.3ml的0.4mM Syringaldazine (Sigma S-1130)溶液和1.1ml pH6.5的0.2M citrate-phosphate缓冲液后,于30℃之水浴中反应15分钟,以Hitachi (100-10) spectrophotometer测量波长525nm的吸光值为 A_{525} 值。而对照组是以漆氧化酶溶液先经100℃的水浴加热30分钟后,再经相同程序所测定的吸光值为 A_{525}° 值。漆氧化酶之活性以 $\Delta A_{525} = A_{525} - A_{525}^{\circ}$ 值表示。漆氧化酶(L-5510)的活性单位为每分钟产生 ΔA_{525} 值0.001时为1活性单位。

表3-1 API-ZYM 2520 所分析的各项酵素*
Table 3-1 Enzymes in the API-ZYM 2520 enzyme testing system

酵素编号	分析酵素	酵素编号	分析酵素
1	Control	12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase
2	Phosphatase alkaline	13	α -galactosidase
3	Esterase (C4)	14	β -galactosidase
4	Esterase lipase (C8)	15	β -glucuronidase
5	Lipase (C14)	16	α -glucosidase
6	Leucine arylamidase	17	β -glucosidase
7	Valine arylamidase	18	N-acetyl- β -glucosaminidase
8	Cystine arylamidase	19	α -mannosidase
9	Trypsin	20	α -fucosidase
10	Chymotrypsin		
11	Phosphatase acid		

* API-ZYM 2520 was from API System, S.A. La Balme-les-Grottes 38390 Montalieu-Vercieu France.

2-3-2 实验菌株培养方法:供试菌株先接种于含马铃薯葡萄糖洋葱培养基之培养皿中,于30℃下前培养7天,以直径5mm的不锈钢打孔器沿菌落边缘切下菌块,等量接种于含20ml液体培养基的50ml三角瓶中。液体培养基组成为每公升中含有: yeast ext. (Difco) 5g, peptone 10g, glucose 20g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005g。接菌后的各试验组于30℃下静置培养,每组三重复。

2-3-3 灵芝属菌株细胞外漆氧化酶活性分析方法(Leonowicz, et al, 1981):以灭菌之微量吸管每2-3天取样一次,每次每瓶取样培养液0.3ml,置于1.5ml的离心管中于-20℃下保存。漆氧化酶活性分析时,取0.1ml的培养液加0.30.4m的Syringaldazine溶液和1.1ml的pH5.4 citrate-phosphate缓冲液,于32℃的水浴中反应15分钟,测定525nm波长的吸光值为 A_{525} 。对照组取0.1ml之培养液先经100℃水浴加热30分钟后,再以相同程序所测定的吸光值为 A_{525}° 。细胞外漆氧化酶之活性以 $\Delta A_{525} = A_{525} - A_{525}^{\circ}$ 表示。

每组之计算值为三重重复之平均值。

2-3-4 灵芝属菌株细胞外漆氧化酶同功酵素图谱分析方法:

2-3-4-1 取样分析方法:以灭菌之微量吸管自各试验组取样培养液0.5ml,每3-5天取样一次,置于1.5ml之离心管中于-20℃下保存。

2-3-4-2 电泳分析系统(庄等,1987):以迷你电泳分析装置进行操作,主要包括:电源供应器(Hoefler, PS-5000X),迷你型电泳槽(Hoefler, SE-250),及胶片铸造器(Hoefler, SE-200)。分析样品采用pH 6.8 0.5M Tris buffer中含4.0%丙烯酰胺(Acrylamide)的焦集胶(Stacking gel)和pH 8.8, 1.5M tris buffer中含8.5%丙烯酰胺的分离胶(Separation gel)之胶片进行。

2-3-4-3 电泳分析条件:待分析之培养液加入追踪染料Bromophenol Blue (Sigma, B-0126)混合均匀后,分别取样20 μ l注入胶片的凹槽中,以100 Volt.的电压下进行80min。

2-3-4-4 活性染色方法:经电泳分析后之胶片置于含60ml pH=5.4的0.2M citrate-phosphate buffer和10ml, 0.4mM Syringaldazine溶液中,于32℃下反应20分钟后,含漆氧化酶同功酵素处可见紫红色的反应带,以游标尺测量出现反应带的位置计算移动比值 R_f 值。

$$R_f \text{ 值} = \frac{\text{活性染色后反应带之距离}}{\text{追踪染料移重之距离}}$$

最后再将胶片以Coomassie Blue (Bio-Rad) 染色标定蛋白质之位置。

3. 结果与讨论

3-1 ABI-ZYM酵素分析系统测定细胞外酵素活性之结果:

3-1-1 最适当培养基和培养时期之决定:以*G. microsporum* 0821菌株分别接种于Y.M.和Czapek液体培养基中,每组各15瓶。在28℃的培养箱中静置培养。于不同的培养时期各取样3瓶以API-ZYM分析,结果如表(3-2)所示。接种于Czapek培养基的各瓶皆生长不良,故只在培养160和260小时后取样分析。表(3-2)中的数值

表示呈色反应的结果,数值愈大表示颜色愈深,亦即酵素的活性较高。由表中的结果可知*C. microsporum* 0821菌株在Y.M.培养基中生长较佳,且于接种培养160小时后,具有较多且较明显的酵素活性。和培养260小时的上澄液分析结果相同,显示在160小时至260小时的培养期间,酵素的产生是相

当稳定的。而在接种于Czapek培养基的各瓶生长不良,于160小时和260小时的培养液中亦不具有明显的酵素活性。故决定以Y.M.液体培养基和28℃培养7天(168小时)的上澄液做为API-ZYM分析灵芝属的标准。

表3-2 *Ganoderma microsporum* 0821菌株在Y.M.和Czapek培养时期上澄液经API-ZYM酵素活性分析结果

Table 3-2 Enzyme reactions of the supernatants of *Ganoderma microsporum* 0821 in the substrate of the API-ZYM enzyme testing system

培养时期 (小时)	API-ZYM 酵素 编号***																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
40°	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
80°	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	0	0
160°	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	1	2	4	0	0
260°	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	1	2	4	0	0
160°	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
260°	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2	0	0

*表示在Y.M.培养基中生长。

**表示在Czapek培养基中生长。

***API-ZYM酵素编号所表示的各项酵素如表(3-1)所示。

表3-3 灵芝属菌株上澄液经API-ZYM酵素分析结果

Table 3-3. Enzyme reactions of the supernatants of *Ganoderma* species in the substrate of the API-ZYM enzyme testing system

菌种	API-ZYM 酵素 编号																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<i>Ganoderma applanatum</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	2	2	0	0
<i>G. boninense</i>	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	4	1	2	3	3	0	0
<i>G. formosanum</i>	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	1	1	1	1	4	2	3	3	0	0	
<i>G. lucidum</i> 32471	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	0	0	3	0	0	
<i>G. lucidum</i> 32472	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	4	4	2	2	3	0	0
<i>G. lucidum</i> (G001)	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	0	0	2	0	0	
<i>G. lucidum</i> (RZ)	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	4	0	0	3	0	0	
<i>G. lucidum</i> (0815)	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	0	0	0	0	0	
<i>G. microsporum</i> (0821)	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	1	2	4	0	0	
<i>G. neo-japonicum</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	2	4	2	3	1	0	0
<i>G. tropicum</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	
<i>G. tsugae</i> (G.10)	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	

表中的数字表示呈色反应的结果,数值愈大颜色愈深,酵素活性愈高。

“丝” (考)

李寿星

(湖北农学院 湖北荆州 434103)

摘要 “丝”为忽米的通称，是一个早已废除了的计量单位。有的书刊广告用米制长度单位标示塑料袋厚，但此漏甚多，且均不符合法定计量单位的使用规则。根据有关条文，宜以微米表示塑料袋厚度。

关键词 食用菌 塑料袋厚度 法定计量单位

食用菌制种与生产所用的塑料袋常以“丝”表示厚度，“丝”是什么计量单位？相当于米制（公制）长度单位的多少米？一般出版物中查不到，新近出版的计量工具书中也没有。在食用菌专著中，笔者仅见

3-1-2 灵芝属菌株培养上澄液经API-ZYM分析结果：将各组供试菌株分别接种于Y.M.液体培养基中，每组3重复。在28℃静置培养7天后取上澄液经API-ZYM分析，结果如表（3-3）所示。为减少因Y.M.培养基的颜色造成观察结果的误差，将表（3-3）中有明显呈色反应的各项（即其呈色反应结果数值≥2）整理成图（3-1）。由表（3-3）图（3-1）的结果显示，以API-ZYM中naphthal-As-B1-phosphohydrolas (12), α-galactosidase (13), β-galactosidase (14), α-glucosidase (16), β-glucosidase (17), β-glucuronidase (15)和N-acetyl-β-glucosaminidase (18)等酵素之活性可以区别各不同种的灵芝属菌株。在供试的5株不同品系的*G. lucidum*菌株，以API-

陈士瑜的《食用菌生产大全》(P162)注明“1丝=10微米=0.01毫米”，即1丝为十万分之一米。丝是否是以前的度量衡表*中所说的丝米？经查，度量衡表标明丝米是万分之一米，由此看来不是。若丝就是丝米，厚5丝的塑料袋折叠厚度即达1毫米，这显然与实情不符。有的书刊和广告用米制长度单位表示袋厚，然其所说厚度相差竟达十万倍，从0.05丝米到5分米不等，兹摘录部分典型实例如下：黄毅在《食用菌生产理论和实践》(P123)中指出袋厚“0.6~0.8丝米”，贵州省菌草协会主编的《食用菌栽培技术手册》(P34)所列塑料袋规格是φ120毫米×240毫

*指1984年国务院发布《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》之前，一些出版物中所附的度量衡表。

ZYM中α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase, 和N-acetyl-β-glucosaminidase等酵素活性可区分为3组。第一组为：*G. lucidum* 32471皆具有以上各项酵素。第二组为：*G. lucidum* 32472, *G. lucidum* G001, *G. lucidum* RZ缺少α和β-glucosidase, 2项酵素活性。第3组为：*G. lucidum* 0815缺少α, β-glucosidase, α, β-galactosidase和N-acetyl-β-glucosaminidase等5项酵素活性。经3次重复试验结果皆相似，显示API-ZYM的分析结果可信度高，具有分辨不同种灵芝属菌株的能力。而对一般的*G. lucidum*菌株，虽然其子实体的外观很相似，但在酵素活性反应上却有明显的差异，此结果与1982年Bazzalo等认为*G. lucidum*是由几株相似的“种”所集合而成的结论

相符，有关此3组*G. lucidum*菌株间的类缘关系，仍须配合交配反应结果来证实。

由图（3-2）中所得的类缘关系图显示，利用API-ZYM酵素分析系统，对于纯种培养的灵芝属菌株提供明确而有效的区别在鉴定时应有帮助。而对于图（3-2）中分为3组的*G. lucidum*菌株间亦可供为类缘关系之参考。

(未完待续)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Ganoderma applanatum</i>																				
<i>G. boninense</i>																				
<i>G. ferrocyanum</i>																				
<i>G. lucidum</i> ATCC-32471																				
<i>G. lucidum</i> ATCC-32472																				
<i>G. lucidum</i> (G001)																				
<i>G. lucidum</i> (RZ)																				
<i>G. lucidum</i> (0815)																				
<i>G. microsporum</i> (0321)																				
<i>G. neo-japonicum</i>																				
<i>G. tropicum</i>																				
<i>G. tsunae</i> (G10)																				

图3-1 灵芝属菌株上澄液经API-ZYM分析结果

Fig. 3-1 Summary of enzyme reactions of the supernatants of *Ganoderma* species in the substrate of the API-ZYM enzyme testing system.