

一种溶高等担子菌细胞壁酶的制备¹⁾

邱景芸 廖汉泉 吴月嫦

(广东省微生物研究所, 广州)

我们试图以高等担子菌(主要是食用菌)为材料进行原生质体融合, 以期获得新型杂种菌株。我们先后采用过制备植物原生质体的纤维素酶(上海东风生化试剂厂生产和从日本进口)、制备酵母菌原生质体的蜗牛酶(来源于中国科学院生物物理研究所)、和制备细菌原生质体的溶菌酶(上海禽蛋二厂生产)单独或混合酶解担子菌菌丝, 均难以获得担子菌原生质体。其原因可能是它们的细胞壁的成分不同所致^[1]。据报道, 担子菌细胞壁的主要成分是葡聚糖(包括 α -葡聚糖和 β -葡聚糖)和几丁质^[7,9]。目前, 国内外市场尚无适合制备担子菌原生质体的商品酶供应^[7,8]。为此, 我们从1979年开始试制溶担子菌细胞壁的酶。众所周知, 多种微生物都能产生溶菌酶, 而要使产生溶菌酶的微生物分泌某些特别的酶系时, 则需要在生长培养基中加入相应的诱导物^[3,7-9]。我们选用了应用最广的绿色木霉(*Trichoderma* spp)作为产酶菌株, 并多方寻找诱导物, 设法诱导出与担子菌细胞壁成分相应的酶系, 同时借鉴纤维素酶的制备方法^[2,4,5], 经过两年的试制, 现已制备出可溶解高等担子菌细胞壁的酶制剂(简称溶壁酶)。本文主要介绍溶壁酶菌曲的培养及提酶方法。

菌 曲 培 养

(一) 菌种

采用长梗木霉(*Trichoderma longibrachiatum* Rifai) 958-11 菌株。此菌株是本所原纤维素酶组从土壤中分离、并经诱发、筛选获得的 FP 高酶活菌株^[6]。

(二) 诱导物

为诱导出与高等担子菌细胞壁成分相应的葡聚糖酶、几丁质酶等酶系, 并尽量减少核糖核酸酶和蛋白酶等对原生质膜有损害的酶系, 选定去掉细胞内含物的蘑菇(或草菇)菌柄细胞壁作诱导物加入木霉培养基中。制备诱导物时, 将开伞的蘑菇(或草菇)子实体的菌柄摘下, 洗净后用高速组织捣碎机捣成糊状(8000—10,000 转/分, 3 分钟), 然后将糊状物倒入尼龙袋中, 用大量水多次冲洗, 除掉可溶于水的细胞内含物, 洗至挤出的水清亮为止, 其残渣即为用作诱导物的菌柄细胞壁。将残渣中的水挤干后置烘箱(70℃左右)烘干, 再用粉碎机粉碎, 并通过40 目筛孔, 保存备用。

(三) 试管斜面菌种的培养

1. 培养基(克) 蔗糖 60、麸皮 25、硫酸铵 20、磷酸二氢钾 1、硫酸镁 0.5、琼脂 20, 水 1000 毫升, 自然 pH(约 6.5)。

2. 培养方法 用接种环将菌种接种在试管斜面上, 置 28℃ 恒温箱培养 5—7 天, 待斜面上长满绿色孢子或浅黄色厚垣孢子后, 置冰箱(4℃左右)保存备用。

(四) 三角瓶固体曲的培养

1. 培养基 蔗糖 70—80%、蘑菇(或草菇)菌柄细胞壁 20—30%、硫酸铵 0.5%²⁾、磷酸二氢钾 0.05%²⁾、硫酸镁 0.025%²⁾, 水 2.2—2.4 倍³⁾。

2. 培养方法 先将试管斜面菌种制成孢

Qiu Jingyun et al.: Preparation of an Enzyme for Lysing the Cell Wall of Higher Basidiomycetes

1) 本实验在黄季芳同志和邓庄同志指导下进行。

2) 对加水量之比。

3) 对干料之比。

子悬浮液(每支斜面菌种制悬液约 100 毫升),然后接种到 1000 毫升三角瓶培养基中(每瓶装干料 20 克),每瓶接种 5 毫升,摇匀后置 28℃ 恒温箱培养 3—4 天,培养到长出大量菌丝并有少量孢子时提酶为好。

提 酶 方 法

(一) 粗酶液的制备

将培养好的三角瓶固体曲,每瓶加蒸馏水 110—120 毫升,浸透菌曲,在 30℃ 下浸泡二小时,用尼龙袋挤出酶液,酶液经冷冻离心(0℃, 3000 转/分, 30 分钟)后,弃沉淀,将上清酶液用 G-5 号细菌漏斗抽滤,收集滤液即为粗酶液。

(二) 沉淀粗酶蛋白

将粗酶液在冰浴(-5—-10℃)和搅拌条件下缓慢加入 95% 的预冷酒精(化学纯),最终使酶液中的酒精浓度达 65%,然后置冰箱(4℃ 左右)中静置数小时(4—16 小时均可),待絮状酶蛋白充分下沉后,轻轻倒掉(或虹吸)上清液,剩下的沉淀部分经冷冻离心(0℃、3000 转/分、

30 分钟),弃上清液,取沉淀即为粗酶蛋白。

(三) 提纯与干燥

用适量的洗脱液(洗脱液成分为:硝酸钾、氯化钙、柠檬酸钠各 2 毫克溶于 1000 毫升蒸馏水)将粗酶蛋白充分溶解后,经冷冻离心(0℃, 3000 转/分, 30 分钟),弃沉淀,所得上清液即为提纯酶液。将提纯酶液倒入洁净培养皿中,冷冻干燥(温度不超过 20℃)后即得灰白色酶制剂。酶制剂要置于低温干燥处保存。

若无冷冻干燥条件,也可采用丙酮沉淀法。即在提纯酶液中缓慢加入 2.5 倍于酶液体积的预冷丙酮,生成絮状沉淀后,离心弃清液,沉淀部分再用冷丙酮洗 2—3 次,以除掉水分,最后将所得的酶蛋白置于真空干燥器中,将剩余的水分抽干;或将酶蛋白置于用无水氯化钙作干燥剂的密封器皿中将水吸干。

溶壁酶的酶解效果

采用 1—1.5% 的溶壁酶浓度,0.4 克分子浓度的氯化钾作渗透压稳定剂,在 34—35℃ 下酶

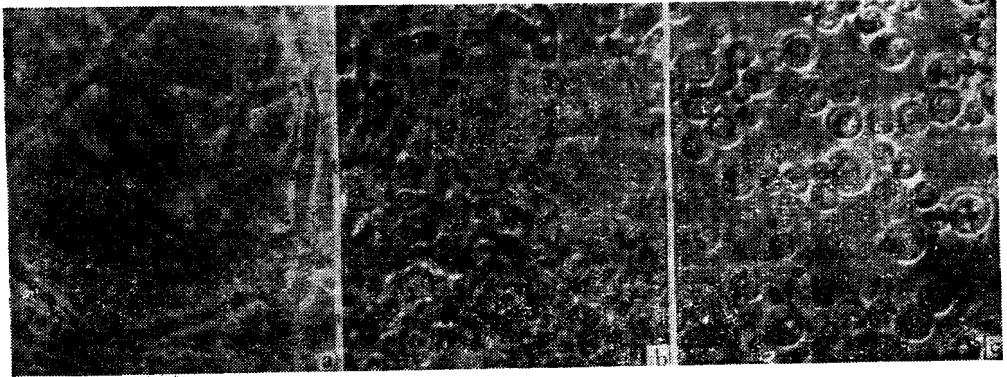


图 1 草菇菌丝及其原生质体(300×)

a. 草菇菌丝; b. 草菇原生质体和未完全溶壁的菌丝; c. 草菇菌丝原生质体。

解草菇 (*Volvariella volvacea*) 菌丝(35℃ 下培养 46—50 小时),1—2 小时内即可释放出大量有活力的原生质体(图 1),其数量可达 10^5 — 10^6 个/毫升酶液以上(用 0.5—1.0 克的鲜菌丝,置 5 毫升酶液酶解之平均数)。制备的原生质体置 4℃ 冰箱保存,可存活 3—5 天(原生质体的活力用染色法鉴定)。

在相似的酶解条件下,先后酶解过以下 12 种担子菌菌丝,也得到了数量不等的原生质体。

在酶解侧耳 (*Pleurotus sajor-caju*)、黑木耳 (*Auricularia auricula*)、毛木耳 (*Auricularia polytricha*)、近裸香菇 (*Lentinus subnudus*)、金针菇 (*Collybia velutipes*)、光帽黄伞 (*Pholiota nameko*) 和云芝 (*Coriolus versicolor*) 等菌丝时,获得了大量完整的原生质体。在酶解蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、香菇 (*Lentinus edodes*)、鸡枞 (*Collybia albuminosa*)、灵芝 (*Ganoderma*

(下转第 24 页)