青岛农業大學

学士学位论文

题　　目	白腐真菌深层发酵培养条件优化
姓　　名	张家睿
学　　号	20180204476
学　　院	生命科学学院
专　　业	生物科学（创新实验班）
班　　级	201802
指导教师	于浩

二〇二二年六月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年　月　日

学位论文版权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：　　指导教师（签名）：

年　月　日　　年　月　日

白腐真菌深层发酵培养条件优化

摘要：本文首先对平菇、北京鸡枞、大球盖菇的分类地位、研究现状及研究重点做了简要综述。重点对大球盖菇、北京鸡枞的深层发酵培养条件进行了研究。本实验通过向 PDB 培养基中分别添加了 ABTS、碱性木质素、香兰素、丁香醛、氯化镧研究其对大球盖菇和北京鸡枞的漆酶（Lac）和锰过氧化物酶（MnP）的分泌情况的影响。研究发现香兰素对北京鸡枞 Lac、MnP 的分泌具有最强诱导效应，Lac 最高酶活力出现在第 8d，MnP 最高酶活力出现在第 7d，相较于空白组酶活分别提高了 8.6 倍和 8.7 倍；经丁香醛诱导的大球盖菇 Lac 和 MnP 酶活提高了 9.0 倍和 5.3 倍，最高酶活力均出现在第 2d。经香兰素诱导的大球盖菇 Lac 和 MnP 酶活提高了 9.6 倍和 6.9 倍，最高酶活力分别出现在第 1d 和 3d。

关键词：白腐真菌；漆酶；锰过氧化物酶；香兰素；丁香醛

Optimization of Conditions of Submerged Liquid Culturation of White Rot Fungi

Abstract: In this paper, we first make a brief review of the taxonomic status, research status and research focus of Oyster mushroom, Oudemansiella radicata and Stropharia rugosoannulata. The deep fermentation and culture conditions of Stropharia rugosoannulata and Oudemansiella radicata were studied. In this experiment, the effects of laccase and manganese peroxidase on the mushrooms of Stropharia rugosoannulata and Oudemansiella radicata were studied by adding ABTS, basic lignin, vanillin, permollin, and lanthanum lanthion to the PDB medium, respectively.It was found that vanillin had the strongest inducing effect on the secretion of Lac and MnP of the Oudemansiella radicata, the highest enzyme activity of Lac appeared in the 8th d, the highest enzyme activity of MnP appeared in the 7th day, which was 8.6 times and 8.7 times higher than that of the blank group, respectively, and the Lac and MnP activities of the Stropharia rugosoannulata Lac and MnP induced by syperaldehyde were increased by 9.0 times and 5.3 times, and the highest enzyme activity appeared in the 2^{nd}day. Vanillin-induced Stropharia rugosoannulata Lac and MnP activity increased by 9.6-fold and 6.9-fold, with the highest enzyme activity occurring in the 1st day and 3rd day, respectively.

Key words: White rot fungus; laccase; manganese peroxidase; vanillin ; Syringaldehyde

目录

1 前言.....1
2 材料与方法.....2
2.1 实验材料.....2
2.1.1 菌种.....2
2.1.2 试剂.....2
2.1.3 培养基.....2
2.1.4 仪器.....2
2.2 实验方法.....3
2.2.1 菌种活化.....3
2.2.2 接种.....4
2.2.3 平菇寡培养基诱导优化.....4
2.2.3 北京鸡枞、大球盖 PDB 培养基优化.....6
2.2.4 胞内外蛋白质提取及浓度测定.....7
2.2.5 酶活测定.....9
2.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测.....10
3 结果.....11
3.1 平菇寡培养条件实验结果.....11
3.1.1 菌丝干重.....12
3.1.2 不同培养条件下平菇 Lac、MnP 酶活力.....13
3.2 平菇诱导培养基实验结果.....13
3.2.1 胞内外酶活.....14
3.2.2 细胞内外蛋白质浓度.....14
3.3 不同诱导剂对北京鸡枞、大球盖胞外酶分泌的影响.....15
3.3.1 北京鸡枞 Lac、MnP 酶活.....15
3.3.2 大球盖菇 Lac、MnP 酶活.....17
3.3.3 香兰素浓度及添加时间对北京鸡枞的影响结果.....18
4 分析与讨论.....21
4.1 平菇寡培养 Lac、MnP 诱导分析及讨论.....21
4.2 大球盖、北京鸡枞 PDB 培养 Lac、MnP 诱导分析及讨论.....21
5 结论.....21
参考文献.....22
致谢.....23

1 前言

平菇在分类学上属于担子菌门，伞菌纲，伞菌目，侧耳科，侧耳属。平菇营养价值丰富，价格低廉，生长周期短，是我国市场上常见的食用菌品种之一[1]。据中国食用菌协会统计近 5 年国内平菇年均总产量超 600 万吨[2]。研究表明，平菇还含有平菇素（蛋白糖）和酸性多糖等生理活性物质，具有显著的抗氧化、抗病毒、提高免疫力等生物活性[3]。

大球盖菇属担子菌门，层菌纲，伞菌目，球盖菇科，球盖菇属，别名酒红大球盖菇、皱环球盖菇[4]。近年来，大球盖菇中越来越多的活性物质被挖掘，其中最易获得且含量较多的属多糖类物质，其具有降血糖、抗氧化、抑菌、抑制肿瘤、调节免疫等药理活性[5]。此外国外学者发现大球盖菇在环境污染降解的应用具有较大潜力[6]。

北京鸡枞是一种珍稀的白腐真菌，在分类学上属于担子菌门，伞菌目，白蘑科，小奥德蘑属[7]，为珍稀野生食药用真菌，在国际上享有食用菌皇后的美誉[8]。北京鸡枞中含有多种对人体有益的成分，如北京鸡枞多糖，北京鸡枞素。在目前国内外对北京鸡枞的研究主要集中在菌丝培养、培养特性、驯化栽培深层发酵等方面[9]。

研究表明，在生长过程中，白腐真菌可以通过分泌多种胞外的酶如纤维素酶、木聚糖酶、漆酶等将培养料中的木质纤维素进行降解[10]。目前，白腐真菌的分泌蛋白对许多含芳香环结构、高毒性、高分子量的难降解的有机物具有良好的降解能力，使之逐渐成为研究热点，这种食用菌还在生物修复、脱色和酶生产领域有各种生物技术应用[11]。其中对 Lac、MnP、木质素过氧化物酶研究愈加深入。Lac 是一组 MCO，其活性主要依赖于铜原子。完全载铜的纯化 Lac 显示出强烈的蓝色，即也称为蓝色 Lac[12]。Lac 能够催化多种酚类和非酚类化合物发生氧化，同时伴随分子氧还原成水[13]。目前 Lac 的最普遍来源是真菌，已知在多种真菌菌株分泌物中都检测到了 Lac 活性[14]。

在白腐真菌产生的胞外酶中，Lac 已经被广泛研究。在平菇中已经分离和鉴定了 6 种不同的平菇 Lac 同工酶：lacc10、lacc6、lacc2、poxa3a、poxa3b、lacc12[15]。MnP 是真菌分泌的糖基化胞外蛋白，可断裂木质素大分子中的糖苷键，初步降解自然界中木质素。CAZYmes 包含多种蛋白家族，其中 AAs 和 GHs 参与了纤维素和半纤维素的降解，这些酶能够将木质纤维素降解为低分子量化合物。

生物技术应用需要大量低成本的酶，酶制剂是生物技术的一个新兴领域。大多数酶制造商通过深层发酵(SMF)技术生产酶[16]。尽管许多重组生物有效地生产各种工业酶，但还没有实现漆酶和过氧化物酶在异源系统中的高表达，它们仍然必须从自然来源获得[17]。在存在植物多糖的情况下，白腐真菌物种能够产生广泛的纤维素分解，半纤维素分解，和果胶分解家族，以促进生物量的有效降。他们已证明，这种酶的产生在很大程度上取决于底物组成，菌株，离子浓度和培养条件[18]。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种

平菇（*Pleurotus ostreatus*）、大球盖菇（Stropharia rugosoannulata）、黑皮鸡枞菌（Oudemansiella radicata），以上菌种来自山东省农业应用真菌实验室。

2.1.2 试剂

2, 2'-azino-bis(3-ethyLbenzothiazoLine-6-sμLfonic acid)（ABTS）、丙二酸、丙二酸钠、藜芦醇、酒石酸、酒石酸钠、硫酸锰、硫酸铜、KH_2PO_4、30%H_2O_2、苯丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、组氨酸、碱木质素、香兰素、丁香醛、氯化镧、淀粉、葡萄糖、玉米芯粉末、棉籽壳粉末、羟甲基纤维素钠、三氯乙酸（TCA）、丙酮、ST 缓冲液、DNA 提取酚、AAM，甲醇（Met）、UT buffer。

2.1.3 培养基

PDB 培养基：土豆 200 g/L，葡萄糖 20 g/L，蒸馏水定容

PDA 培养基：马铃薯葡萄萄粉末 46 g/L,蒸馏水定容。

2.1.4 仪器

表 2.1 仪器名称

仪器名称	型号	厂家
自动蒸汽高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司

电泳仪	DYY-12	北京市六一仪器厂
核酸蛋白测定仪	BioPhotometer plus	德国艾本德公司
立式压力蒸汽灭菌锅	LT-CPS	立德泰勍（上海）科学仪器有限公司
微型涡旋混合仪	XW-80A	上海泸西分析仪器厂有限公司
酶标仪	Synergy^{TM}4	美国伯腾仪器有限公司
台式高速冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
高通量组织研磨机	RVC2-25	北京博劢行仪器有限公司
核酸蛋白离心真空浓缩仪	TissueLyserⅡ	上海净信实业发展有限公司
程控五段金属浴	OSE-DB-02	天根生化科技（北京）有限公司
超微量紫外分光光度计	NDONE	基因有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 菌种活化

2.2.1.1 平板活化

无菌环境下，挑取菌丝块接种于 PDA 培养基上，每个平板接种 3~4 个 1 cm^2 菌丝块，每种白腐真菌接种 3 个平板。将平板放于 25℃培养箱培养。当菌丝长满三分之二平板时，开始液体菌株的活化。

2.2.1.2 液体菌株的活化

无菌环境下，用打孔器打孔后接种菌丝块于 PDB 液体培养基中，每个菌种接种 2 瓶 200 mL PDB 25℃、125 r/min 摇床培养。培养 7 天左右，用于接种。

2.2.2 接种

2.2.2.1 平菇接种

在无菌条件下，将液体平菇菌种滤去 PDB 培养液，获取菌球，将菌球使用

无菌水清洗一遍，加入等体积的无菌水，将菌球打碎收集。接种量 4%，25℃、125 rpm/min 培养。

2.2.2.2 北京鸡枞接种

在无菌条件下，将培养 7 天的北京鸡枞菌种倒入装有玻璃珠的 50 mL 离心管中，用力摇晃，将菌球打碎，各筛选培养基接种 8%，25℃、125 rpm/min 培养。

2.2.2.3 大球盖菇接种

同北京鸡枞

2.2.3 平菇寡培养基诱导优化

2.2.2.1 平菇寡培养基培养条件筛选

表 2.2 培养基配方筛选

组别	培养基配方
对照组	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，磷酸氢二钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，磷酸铵 3 g/L，氯化钙 0.1 g/L
实验组 1	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A
实验组 2	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 B
实验组 3	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 C
实验组 4	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 D

注：（氨基酸组合浓度为 2g/L）

组合 A：苯丙氨酸 0.5 g/L，组氨酸 0.5 g/L，脯氨酸 0.5 g/L，甘氨酸 0.5 g/L。

组合 B：苯丙氨酸 0.5 g/L，组氨酸 0.5 g/L，脯氨酸 0.5 g/L，丙氨酸 0.5 g/L。

组合 C：苯丙氨酸 0.5 g/L，组氨酸 0.5 g/L，脯氨酸 0.5 g/L，赖氨酸 0.5 g/L 。

组合 D：甘氨酸 0.5 g/L，丙氨酸 0.5 g/L，赖氨酸 0.5 g/L，苯丙氨酸 0.5 g/L。

2.2.2.2 平菇寡培养基诱导物筛选

表 2.3 诱导培养基配方

组别	培养基配方
对照组	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A
实验组 1	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A，淀粉 2 g/L
实验组 2	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A，羟甲基纤维素钠 2 g/L
实验组 3	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A，碱性木质素 2 g/L
实验组 4	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A，玉米芯破碎物 2 g/L
实验组 5	葡萄糖 10 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L，硫酸镁 0.3 g/L，氨基酸组合 A，棉籽壳破碎物 2 g/L

注：氨基酸组合浓度为 2 g/L，氨基酸组成为 0.5 g/L 苯丙氨酸，0.5 g/L 组氨酸，0.5 g/L 脯氨酸，0.5 g/L 甘氨酸。

培养至第 7 天进行胞内外蛋白的提取及 Lac、MnP、LiP 活性的测定。

2.2.3 北京鸡枞、大球盖 PDB 培养基优化

2.2.3.1 北京鸡枞、大球盖菇诱导剂筛选

以 PDB 培养基为基础培养基，经查阅相关文献，选择以 ABTS、碱木质素、香兰素、丁香醛、氯化镧作为产酶诱导剂，添加量分别为 ABTS 0.05 mM，碱木质素 0.2 g/l、香兰素 0.2 g/l，丁香醛 0.2 g/l、氯化镧 0.2 g/l，每组类型分别设置 3 个平行，高压灭菌后，以 8%的接种量接种大球盖菇和北京鸡枞，置于 25℃、125 rpm/min 摇床中培养，从第一天开始取样，测其胞外的 Lac、MnP、木质素过氧化物酶活力，得到胞外酶随时间的含量变化。

2.2.3.2 香兰素添加量及添加时间研究

筛选出最佳诱导剂为 0.2 g/l 的香兰素后，对香兰素进行浓度梯度实验，本实验设置了 0.1 g/l、0.2 g/l、0.5 g/l 三个浓度梯度，同时研究 0.2 g/l 的香兰素的最佳添加时间，本实验设计在第 0 天、第 3 天、第 6 天添加 0.2 g/l 的香兰素进行实验，比较各项酶活数据及生物量，得到最佳添加时间。

2.2.4 胞内外蛋白质提取及浓度测定

2.2.4.1 胞外蛋白提取

取 9 ml 上清中加入 10%的 TCA，4℃沉淀过夜。

将过夜沉淀的上清离心，9,000 rpm/min，离心 15 min 获得沉淀，加入 1 mL 预冷的丙酮洗涤沉淀，把沉淀悬浮起来，并且把蛋白沉淀转移到 1.5 ml 离心管中。15,000 g 离心 5 min，丢弃上清。重复清洗三次。

300 ul ST 缓冲液重悬，95 ℃金属浴加热 10 min 之后简单涡旋震荡。12,000 g 离心 10 min，取上清，即为胞外蛋白质

2.2.4.2 胞内蛋白提取

1、取 0.5 g 菌丝样品剪碎，加入到 2 mL 的厚壁圆底离心管中。

2、加入 2 粒 5 mm 小钢珠，放入组织研磨仪破碎 300 Hz 2 min；

3、将研磨后的样品转移到 15 ml 离心管中，向研磨后的组织液中加入 2 mL 预冷 DNA 提取酚。

4、涡旋震荡 5 min。

5、加入 2 mL 的 TS-Phe，涡旋震荡 5 min。。

6、4,000 g，4 ℃离心 10 min，将上清小心的转移到 2 ml 离心管中。

7、加入等体积预冷 DNA 提取酚，涡旋震荡 5 min。

8、10,000 g，4 ℃离心 10 min，将上清转移到新的离心管中

9、向每个离心管中加入 5 倍体积预冷的 AAM，在-20℃沉淀过夜。

10、15,000 g，4 ℃离心 10 min，丢弃上清。

11、向含沉淀的离心管中加入 0.5 mL 预冷的 Met，轻轻晃动将沉淀悬起来，15000 g，4℃离心 5 min，将上清去除。重复冲洗 1 遍。

12、用 0.5 mL 预冷的丙酮冲洗 2 遍。15000 g 离心 10 min

13、等待丙酮挥发干净，将沉淀重新悬浮于 200 μL ST Buffer，涡旋 30 s，90 ℃金属浴 5 min

14、涡旋 30 s 溶解，10,000 g 离心 5 min，取上清即为胞内蛋白。

2.2.4.3 蛋白质浓度测定

A、平菇胞内外蛋白使用 SDS-PAGE 跑胶之后使用 imagej 进行灰度计算确定蛋白浓度。

B、北京鸡枞胞外蛋白使用改良型 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒（来自生工生物工程（上海）股份有限公司；产品编号 C503051）

2.2.5 酶活测定

在无菌条件下，取培养基上清液 1 mL，4 ℃，9,000 rpm 离心 3 min 后对其 Lac、MnP、LiP 酶活性的测定进行活性测定。

2.2.5.1 Lac 活性测定

表 2.5 Lac 酶活检测液

溶液	体积
100 mM 丙二酸缓冲液	475 μL
0.5 mM ABTS	475 μL
待测酶液	50 μL

在 420nm 处测定吸光值，在 0min 和 1min 测定吸光值。

Lac 酶活公式： A*B*10^6/C

(A：吸光值差值/36,000 B：酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.5.2 MnP 活性测定

表 2.6 MnP 反应体系

溶液	体积
100 mM 丙二酸缓冲液	490 μL
10 mM $MnSO_4$	100 μL
10 mM 2,6-DMP	100 μL
待测酶液	50 μL
水	250 μL
10 mM H_2O_2	10 μL

在 468nm 处测定吸光值，在 0 min 和 1 min 测定吸光值。

MnP 酶活公式：A*B*10^6/C

(A：吸光值差值/49,600 B：酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.5.3 木质素过氧化物酶活性测定

表 2.7 LiP 反应体系

溶液	体积
200 μM 酒石酸缓冲液	490 μL
40 mM 藜芦醇	100 μL
待测酶液	50 μL
水	350 μL
10 mM H_2O_2	10 μL

在 315nm 处测定吸光值，在 0 min 和 1 min 测定吸光值

Lip 酶活公式：A*B*10^6/C

(A：吸光值差值/9,300 B：酶活试剂加酶液的总体积 C:酶液的体积)

2.2.5.5 比酶活测定

比酶活=酶活/蛋白质浓度

2.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

分离胶制作：

表 2.8 分离胶配方

胶浓度	12.5%
30%聚丙烯酰胺/mL	2.5 mL
三蒸水/mL	2 mL
4X 分离胶 buffer/mL pH 8.8	1.5 mL
10%(w/v) SDS/μL	60 μL
10%(w/v）APS/μL	30 μL
Temed/μL	6 μL
总体积/mL	6 mL

浓缩胶制作：

表 2.9 浓缩胶配方

胶浓度	12.5%
30%聚丙烯酰胺/mL	0.38 mL
三蒸水/mL	1.87 mL

4X 分离胶 buffer/mL pH6.8	0.75 mL
10%(w/v)SDS/μL	30 μL
10%(w/v)APS/μL	15 μL
Temed/μL	3 μL
总体积/mL	3 mL

SDS－PAGE 凝胶电泳步骤：

a. 将玻璃板、样品梳、Spacer 用洗涤剂洗净，用 ddH_2O 冲洗数次，再用乙醇擦拭，晾干。

b. 组装好玻璃板：固定玻璃板时，两边用力一定要均匀，防止夹坏玻璃板。按表 2.8 的配方进行配制分离胶。

c. 向玻璃板间灌制分离胶，立即覆一层重蒸水。

d. 按表 2.9 配制浓缩胶。

e. 将分离胶上层重蒸水倾去，滤纸吸干，灌制浓缩胶，插入样品梳。

f. 装好电泳系统，加入电极缓冲液，将样品梳拔去，上样。

g. 稳压 200V，溴酚蓝刚跑出分离胶时，停止电泳。

h. 电泳结束后，染色 0.5h，进行脱色，等到胶上出现清晰的带条时停止脱色。

3 结果

3.1 平菇寡培养条件实验结果

3.1.1 菌丝干重

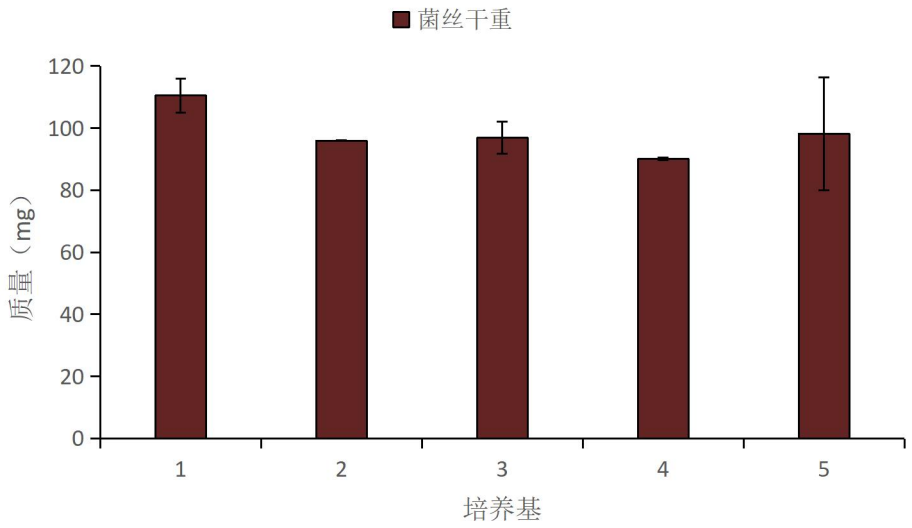

图 3.1 不同寡培养基菌丝生长状态

由图 3.1 可以看出，寡培养条件下，各组的干重数据在 100 mg 左右，仅仅加入诱导剂对菌球生长影响不大。

3.1.2 不同培养条件下平菇 Lac、MnP 酶活力

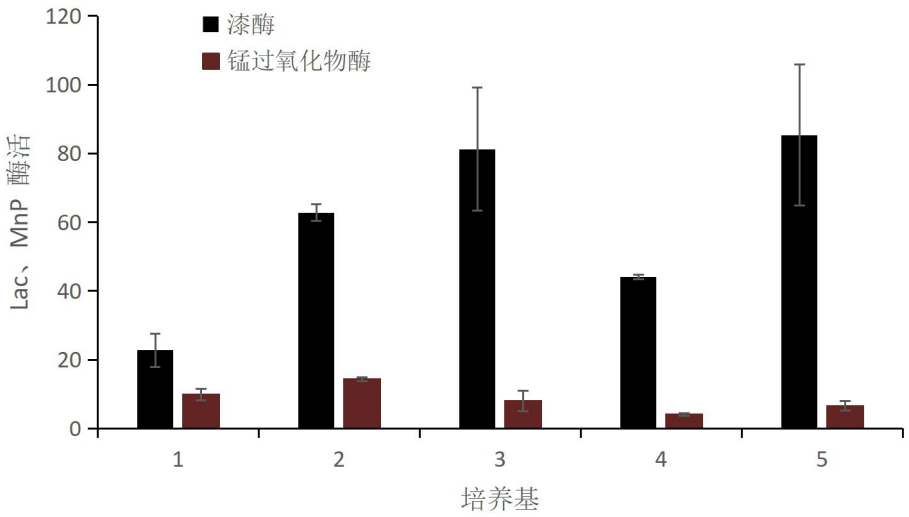

图 3.3 不同寡培养条件下 Lac、过氧化物酶活性

综合 Lac 和 MnP 的活性，选择 2 号培养基作为诱导培养基的基础配方。

3.2 平菇诱导培养基实验结果

3.2.1 胞内外酶活

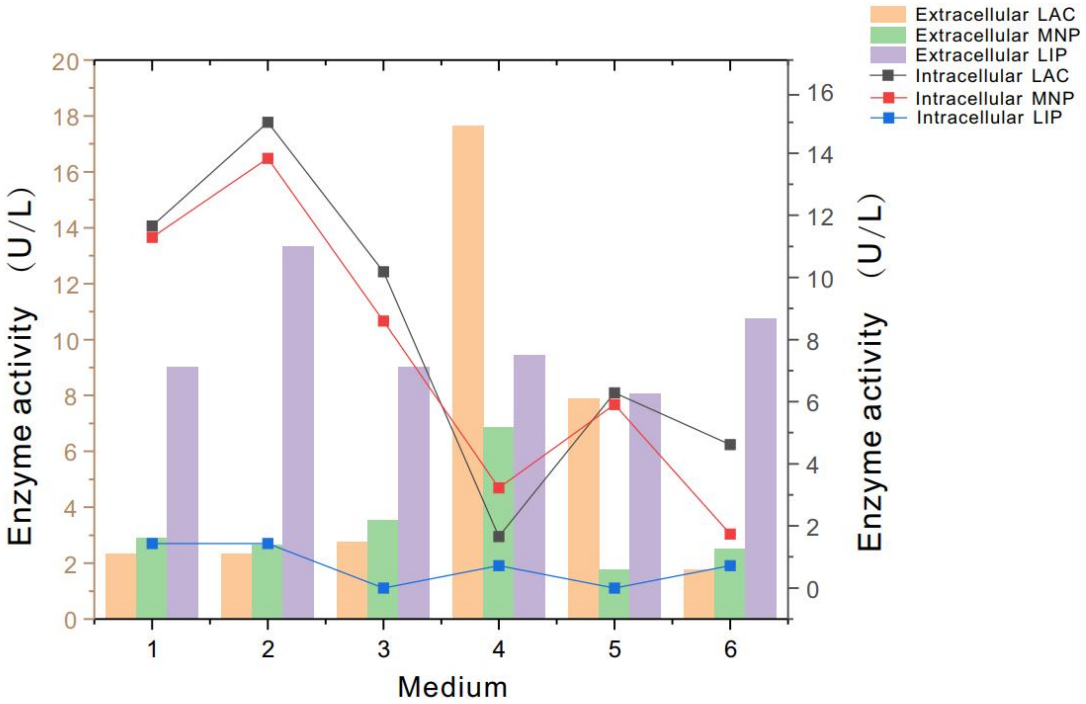

图 3.3 不同诱导物对胞内外酶活的影响

由图 3.3 所示，检测细胞外酶活发现，加入碱性木质素的培养基中的 Lac 活性远高于空白组的 Lac 活性，且经碱木质素诱导的 Lac 活性远高于加入其它诱导

剂的活性，说明碱性木质素对平菇 Lac 的分泌有促进作用。

由图 3.3 所示，检测细胞内酶活发现，只有加入浓度为 2 g/l 淀粉培养基中的 Lac 和 MnP 活性略高于对照组，其余均低于对照组，分析原因为寡培养基中缺少必需的碳源用于生长，加入淀粉弥补了寡培养基碳源的不足，但对于 Lac 和 MnP 的活性增高是否具有诱导作用无法解释。其它实验组的 Lac 及 MnP 活性均低于对照组，所以决定更换为正常培养基。

3.2.2 胞内胞外蛋白浓度测定

使用 imagej 法测胞外蛋白浓度

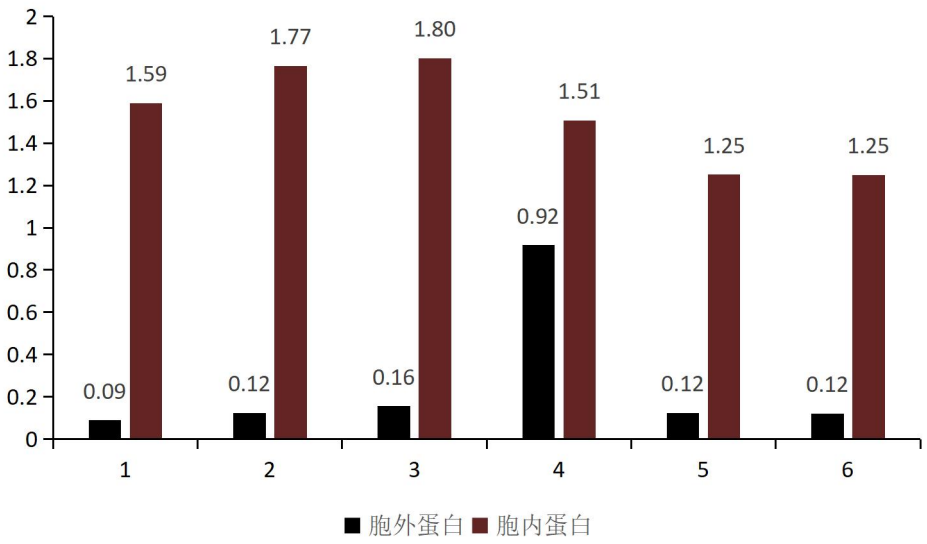

图 3.4 不同寡培养条件下的胞内外蛋白质浓度

3.3 不同诱导剂对北京鸡枞、大球盖胞外酶分泌的影响

3.3.1 北京鸡枞 Lac、MnP 酶活

3.3.1.1 诱导剂对北京鸡枞 Lac 分泌的影响

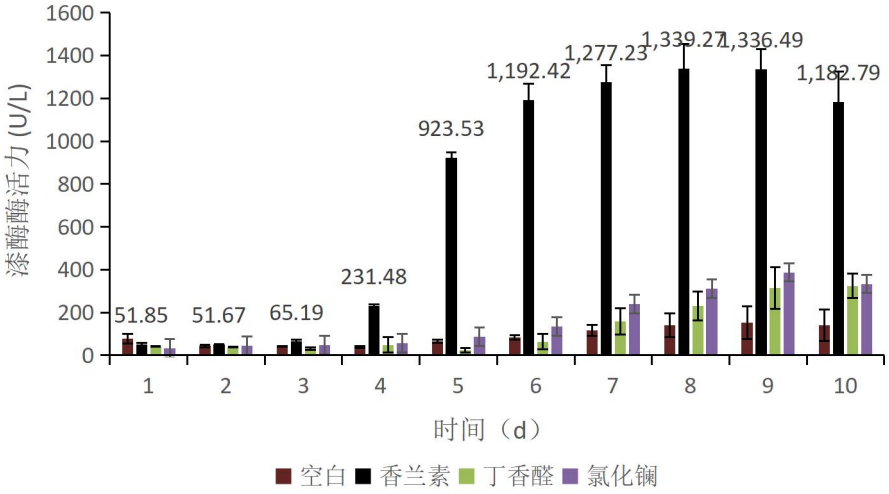

图 3.6 北京鸡枞在不同诱导剂下的 Lac 酶活

由图 3.6 所示，所选取的诱导剂均在第 3 天后出现诱导效果，诱导效果依次为香兰素>氯化镧>丁香醛。据图所示，香兰素在第 5 天开始出现明显的诱导效果，其中香兰素在第 8 天达到 1,339.27 U/L，相较于空白提高了 8.6 倍，丁香醛和氯化镧对北京鸡枞 Lac 的分泌影响较小，丁香醛在 10 天后仍具备诱导效果，第 10 天酶活力为 324.45 U/L。氯化镧对北京鸡枞 Lac 的诱导在第 9 天酶活力达到最大值，为 387.41 U/L。

3.3.1.2 诱导剂对北京鸡枞 MnP 分泌的影响

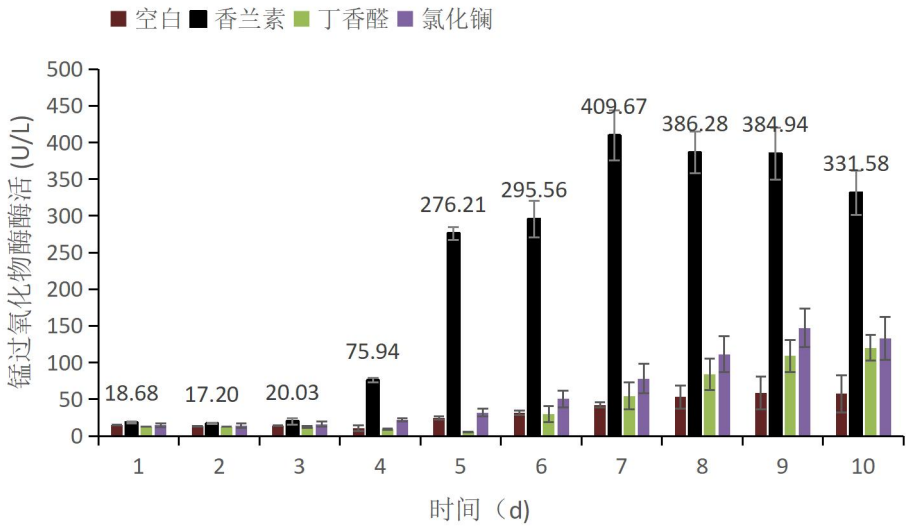

图 3.7 北京鸡枞在不同诱导剂下的 MnP 酶活

由图 3.7 所示，香兰素对北京鸡枞 MnP 的分泌具有最佳诱导作用，酶活力最高值出现在第 7 天，为 409.67 U/L。相较于空白 MnP 酶活力提高了 8.7 倍。在第 7 天后香兰素对 MnP 的诱导开始下降，至第 10 天酶活力下降到 331.58 U/L。在加入诱导剂 6 天之后，所选取的诱导剂对 MnP 的活力均表现出较强的诱导效果。氯化镧诱导的 MnP 最高活力出现在第 9 天，为 147.31 U/L 之后便有所下降。丁香醛诱导力不及香兰素和氯化镧，但在第 10 天仍处于上升趋势,第 10 天酶活力为 120.29 U/L。

3.3.2 大球盖菇 Lac、MnP 酶活

3.3.2.1 不同诱导剂对大球盖菇 Lac 的诱导结果

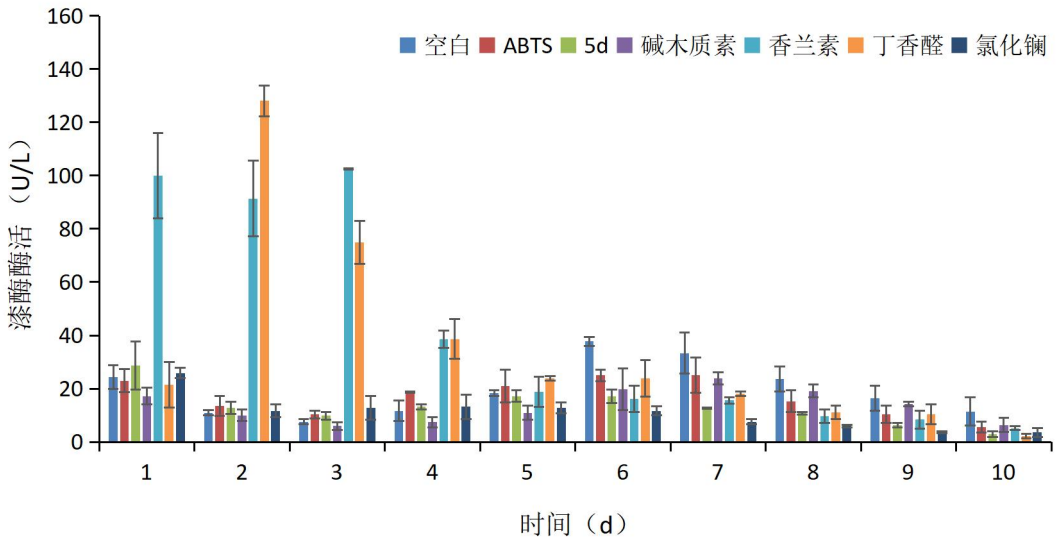

图 3.8 大球盖菇在不同诱导剂下的 Lac 酶活

由图 3.10 所示；所选用的诱导剂对大球盖菇 Lac 的分泌随时间推移呈下降趋势。ABTS 对大球盖作用 6 天后，Lac 活力达到最大值，为 25.00 U/L，五天后加入 ABTS 对 Lac 的分泌不具有诱导效应。碱木质素对大球盖菇作用 7 天后，Lac 活力达到最大值，为 23.89 U/L。香兰素对大球盖菇的 Lac 分泌具有快速应答，在加入香兰素一天后，酶活力达到了最大值，为 100.00 U/L。丁香醛对大球盖菇 Lac 分泌的最强诱导效应出现在第 2 天，酶活力为 128.06 U/L，之后效用开始衰减。氯化镧同香兰素相似，Lac 酶活力最高出现在加入氯化镧一天之后，为 25.83 U/L，之后酶活力开始减弱。与北京鸡枞相比，大球盖对以上诱导剂的效应更为敏感。

3.3.2.2 诱导剂对大球盖菇 MnP 分泌影响结果

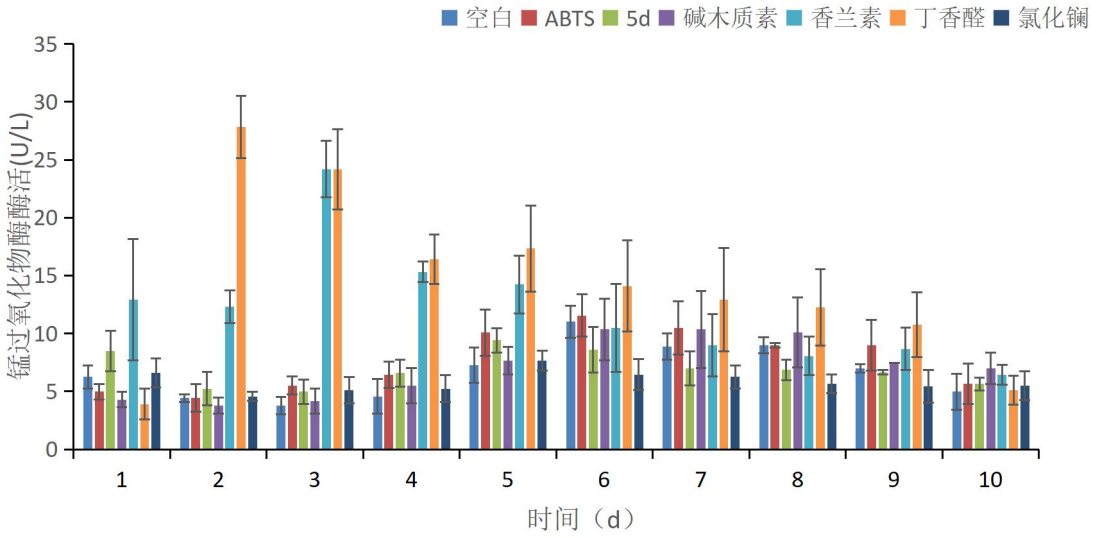

图 3.11 大球盖菇在不同诱导剂下的 MnP 酶活

如图 3.11 所示，空白组 MnP 酶活在第 6 天酶活达到最大值，为 11 U/L，随后开始下降。加入 ABTS 的第 6 天 MnP 的酶活达到最大值，为 11.02 U/L；在第 5 天加入 ABTS 诱导的酶活力始终不及在第 0 天加入的酶活。加入碱木质素的第 7 天 MnP 的酶活达到最大值，为 10.35 U/L，随后缓慢下降，至第 10 天为 6.99 U/L。加入香兰素的第 3 天 MnP 的活力达到最大值，为 24.19U/L，至第 10 天酶活仅为 6.45 U/L。加入丁香醛的第 2 天 MnP 活力达到最大值，为 27.82 U/L，随后下降，至第 10 天酶活仅为 5.10 U/L。加入氯化镧的第 5 天 MnP 酶活力达到最大值，为 7.66 U/L，与空白组相差无几。

3.3.3 香兰素浓度及添加时间对北京鸡枞的影响结果

3.3.3.1 香兰素不同浓度和不同添加时间对北京鸡枞生物量的影响

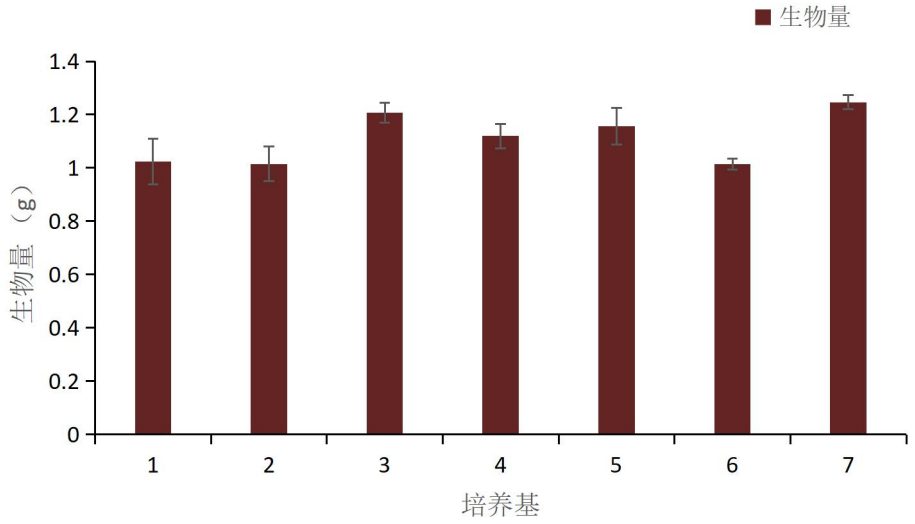

图 3.12 不同培养条件下的生物量

如图 3.12 所示，在第 3 天加入 0.2 g/L 香兰素能够获取最大生物量为 1.21 g。经香兰素处理之后最大生物量为 1.21 g，最小生物量为 1.01 g，空白组的生物量为 1.02 g。

3.3.3.2 香兰素不同浓度和不同添加时间对北京鸡枞 Lac、MnP 的影响

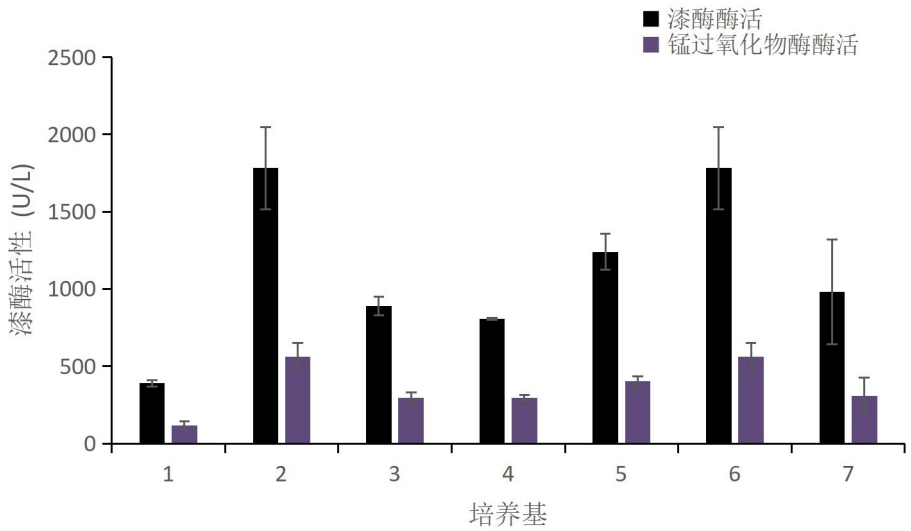

图 3.13 不同香兰素浓度及添加时间诱导的北京鸡枞 Lac、MnP 酶活

如图 3.13 所示，较空白组实验组 Lac 活性和 MnP 活性均具有显提高。通过比较香兰素的添加时间发现，在第 0 天添加 0.2 g/L 香兰素的培养基 Lac 的酶活最高，为 1,781.96 U/L，相较于空白组酶活提高了 4 倍。添加时间越晚对 Lac 分泌的影响越小，或在 6 天之内诱导时间越长，Lac 的活性越高。通过比较添加香兰素的浓度对 Lac 分泌的影响发现：添加 0.2 g/L 香兰素对 Lac 的分泌具有最佳诱导效应，Lac 酶活为 1,781.96 U/L，添加量为 0.5 g/L 时，香兰素对 Lac 分泌的诱导开始减弱。

通过比较香兰素的添加时间发现，在第 0 天添加 0.2 g/L 香兰素，MnP 活性最高，为 562.36 U/L，相较于空白组酶活提高了 4.35 倍。添加时间越晚对 Lac 的分泌影响越小，或在 6 天之内诱导时间越长，MnP 的活性越高。通过比较添加香兰素的浓度对 MnP 分泌的影响发现：添加 0.2 g/L 香兰素对 MnP 的分泌具有最佳诱导效应，MnP 酶活为 562.36 U/L，添加量为 0.5 g/L 时，香兰素对 MnP 分泌的诱导开始减弱。

3.3.3.3 蛋白质浓度测定及比酶活计算

采用 BCA 法对胞外蛋白质浓度测定。

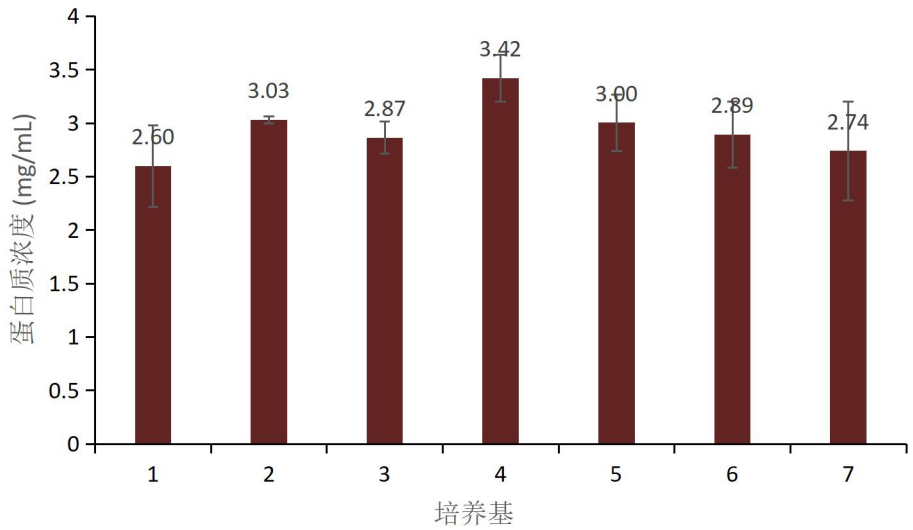

图 3.14 不同香兰素浓度及添加时间诱导的北京鸡枞分泌蛋白浓度

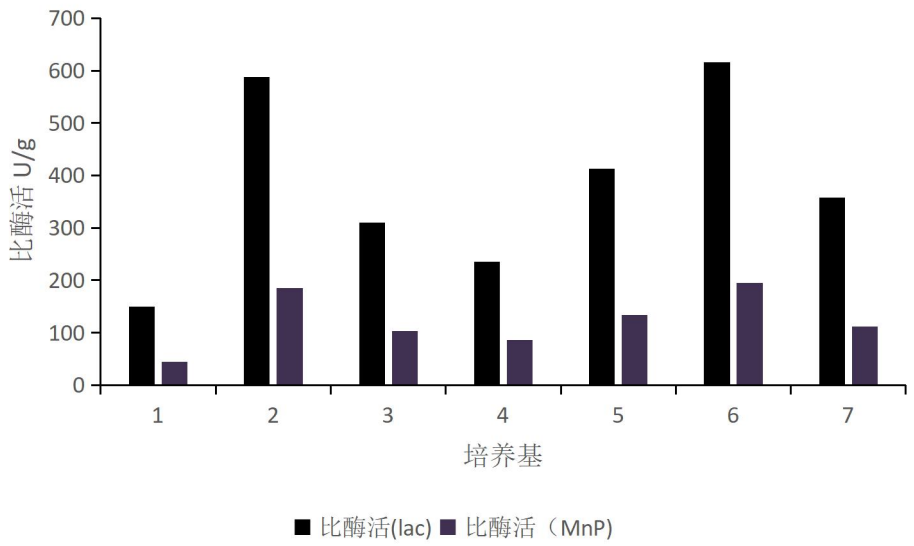

图 3.15 不同香兰素浓度及添加时间诱导的北京鸡枞 Lac、MnP 比酶活

由图 3.15 所示，相较于空白组第 0 天加入 0.2 g/L 香兰素的 Lac 比酶活提高了 2.93 倍，第三天加入 0.2 g/L 香兰素的 Lac 比酶活提高了 1.07 倍，第六天加入 0.2 g/L 香兰素的 Lac 比酶活提高了 0.57 倍。加入 0.1 g/L,0.2 g/L,0.5 g/L 香兰素的培养基 Lac 比酶活分别提高了 1.76 倍，3.12 倍，1.39 倍，综上。香兰素的最佳浓度是 0.2 g/L，且在第 0 天添加的漆酶比酶活最高，即香兰素会持续诱导北京鸡枞表达漆酶基因。

相较于空白组第 0 天加入 0.2 g/L 香兰素的 MnP 比酶活提高了 0.40 倍，第三天加入 0.2 g/L 香兰素的 MnP 比酶活提高了 1.00 倍，第六天加入 0.2 g/L 香兰素的 MnP 比酶活提高了 2.45 倍。加入 0.1 g/L,0.2 g/L,0.5 g/L 香兰素的培养基 MnP 比酶活分别提高了 2.03 倍，3.39 倍，1.54 倍。综上香兰素的最佳诱导浓度是 0.2 g/L，且在第六天添加的锰过氧化物酶比酶活最高。

4 分析与讨论

4.1 平菇寡培养 Lac、MnP 诱导分析及讨论

本实验设计通过寡培养基培养平菇，通过加入诱导剂检测平菇胞外 Lac、MnP、木质素过氧化物酶的活性，对比空白组得到各种诱导剂对酶活的影响情况，表明碱性木质素对平菇的的 Lac 和 MnP 具有诱导效应，证明碱性木质素会诱导 Lac 和 MnP 相关基因的表达。

接下来将进行转录组分析，RT-PCR 确定对 Lac/MnP 基因进行鉴定并与已知基因比对。

4.2 大球盖、北京鸡枞 PDB 培养 Lac、MnP 诱导分析及讨论

通过向 PDB 培养基中加入 ABTS、香兰素、丁香醛、氯化镧发现大球盖、北京鸡枞的 Lac、MnP 的酶活均被提高。香兰素是北京鸡枞 Lac、MnP 的最佳诱导剂；丁香醛和香兰素对大球盖菇 Lac 和 MnP 的分泌均具有较强的诱导效果，该实验证实了 Lac 和 MnP 能够降解多酚类化合物且多酚类化合物对其的分泌具有较好的诱导效果。

北京鸡枞是一种珍稀的白腐真菌，人工栽培时常用木屑、棉籽壳为主要原料，木屑和棉籽壳富含纤维素和半纤维素，北京鸡枞需要分泌 Lac、MnP 对其降解才能用于子实体的生长，所以 Lac 和 MnP 的分泌量决定了子实体的生长速率，进而决定了北京鸡枞的产量。

该实验证明在实验室条件下，香兰素会提高 Lac、MnP 的分泌，且生物量不受到影响，若用于工厂化生产预计会提高北京鸡枞的产量。

5 结论

北京鸡枞在 PDB 培养条件下最佳诱导剂是香兰素，在第 8 天 Lac 酶活达到最大值为 1,781.96 U/L，相较于空白组酶活提高了 4 倍，比酶活最高提高了 2.93 倍。在第 7 天 MnP 酶活达到最大值为 409.67 U/L，相较于空白 MnP 提高了 8.7 倍。

大球盖菇在 PDB 培养条件下，Lac 最佳诱导剂是丁香醛，在第 2 天 Lac 酶活力达到最高，为 109.1 U/L，相较于空白组酶活提高了 5.27 倍。MnP 的最佳诱导剂是丁香醛，在第 3 天 MnP 的酶活力达到最高，为 24.19 U/L，相较于空白组 MnP 提高了 6.90 倍。

北京鸡枞 Lac、MnP 对香兰素的响应较慢；大球盖菇 Lac、MnP 对香兰素和丁香醛的响应较快，但持续时间比北京鸡枞较短。

参考文献

[1] 刘姗姗,赵佳浩,忻龙祚.丹参对平菇生长发育的影响[J].现代农村科技,2022(02):81-83.

[2] 崔筱,刘芹,段亚魁,等.平菇种质资源的遗传多样性分析[J].河南农业科学,2020,49(3):138-144.

[3] 刘芹,胡素娟,崔筱,康源春,张玉亭,孔维丽.糙皮侧耳对培养料中木质纤维素的降解研究[J].江西农业学报,2022(01):202-210.

[4] 黄年来.大球盖菇的分类地位和特征特性[J].食用菌,1995,17(6):11.

[5] 邵华.大球盖菇多糖对大鼠运动疲劳恢复的影响[J].中国食用菌,2020,39(7):68-71.

[6] Kabiersch, G;Rajasarkka, J;Ullrich, R. et al.Fate of bisphenol a during treatment with the litterdecomposing fungi Stropharia rugosoannulata and Stropharia coronilla[J]. *Chemosphere*, 2010, 83(3):226-232.

[7] 顾新伟,何伯伟,郑巧平,等.浙南山区大型真菌[M].杭州:浙江科学技术出版社,2012.

[8] Zhu, H; Sheng, K;Yan, E.F. et a1. Extraction,purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 50(3):840-843.

[9] 张磊,徐丽丽,何翠萍,郭立忠.北京鸡枞菌种鉴定及生长条件优化[J].安徽农学通报,2018(05):14-19+27.

[10] HrebeckováT, WiesnerováL, Hanc A. Change in agrochemical and biochemical parameters during the laboratory vermicomposting of spent mushroom substrate after cultivation of *Pleurotus ostreatus*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 739:140085.

[11] Asgher, M; Shah, S.A.H; Ali, M. et al. Decolorizationof some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2006 ,22:89-93.

[12] Safary, A; Moniri ,R.; Hamzeh-Mivehroud, M; et a1. A strategy for soluble overexpression and biochemical characterization of halo-thermotolerant Bacillus laccase in modified E.coli[J]. *Biotechnol*, 2016, 227:56-63.

[13] Azam ,Safary; Rezvan ,Moniri; Maryam, Hamzeh-Mivehroud. et a1. A strategy

for soluble overexpression and biochemical characterization of halo-thermotolerant *Bacillus* laccase in modified E. coli[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 227:56-63.

[14] 靳蓉,张飞龙.Lac 的来源与分离纯化技术[J].中国生漆,2012,31(03):7-14.

[15] Palmieri, G; Cennamo, G; Faraco, V. et a1. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33:220-230.

[16] Chang, B V; Chang, Y M. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation[J]. *Journal of Microbiology*, *Immunology and Infection*, 2016, 49(2):175-181.

[17] Weenink, X O; Punt, P J; Van Den Hondel C A. et al. A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*[J]. *Applied microbiology and biotechnology,* 2006, 69(6):711-717.

[18] Zhang, W R; Liu, S R; Kuang, Y B. et al. Development of a novel spawn (block spawn) of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in liquid culture and its cultivation evaluation[J]. *Mycobiology*, 2019, 47(1):97-104.

致谢

大学的四年时光转瞬即逝，我在此学到的知识和认识的朋友将使我终身受益。

在即将毕业之际，借此向那些兢兢业业工作的老师表示感谢，没有他们的认真教课育人，就没有青岛农业大学浓厚的学习氛围。

非常感谢我的导师于浩教授不断开拓我的认知领域，训练我的科研思维，指明我奋斗的方向。感谢辛老师在我学习上的关心，感谢高老师在我失落时给我的鼓励，他们都使我感到动力十足。

特别感谢李晓航师兄对我整个实验期间的帮助以及实验技艺的传授。感谢赵书雪师姐对我论文的耐心修改和宝贵实验经验的倾授。感谢 6031 所有的师兄师姐在我工作之时给我的支持和帮助。

在今后的科研生涯中，我一定坚守初心，不负父母的期盼。