

# 黄背木耳液体培养中几种相关酶活性的测定

马桂珍<sup>1</sup>, 周超<sup>1</sup>, 邱传庆<sup>2</sup>, 何滢<sup>1</sup>, 暴增海<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院 食品工程学院 江苏 连云港 222005; 2. 河北肥乡第一中学, 河北 邯郸 057550)

**摘要:** 采用液体培养法, 对黄背木耳纤维素酶、淀粉酶、氧化酶等几种相关酶的活性变化规律进行了研究, 结果表明: 淀粉酶活性高峰出现最早(第6天), 酶活性最高; 纤维素酶的活性高峰随后出现(第8天); 邻苯二酚氧化酶的活性高峰期到来更晚(第11天)。

**关键词:** 纤维素酶; 淀粉酶; 氧化酶; 活性

中图分类号: S 646.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2009)08-0260-03

黄背木耳是毛木耳(*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.) 家族中的一个高产菌株, 是我国重要栽培食用耳类。其蛋白质、氨基酸含量与黑木耳接近, 并含有 17 种氨基酸, 包括人体必需的 8 种氨基酸。不仅具有较高的食用价值, 还具有较高的药用价值, 具有滋阴壮阳、清肺益气、补血活血等功效, 是纺织和采矿工人理想的保健食品<sup>[1]</sup>。

关于黄背木耳栽培技术研究的较多<sup>[2-4]</sup>, 但有关黄背木耳液体发酵的资料还很缺乏。为了更好地开发利用黄背木耳, 该试验采用液体培养法, 对黄背木耳纤维素酶、淀粉酶、氧化酶等几种相关酶的活性变化规律进行了研究, 以期对黄背木耳的更好地开发利用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 黄背木耳, 自华中农业大学引进, 由淮海工学院微生物研究室保存。

1.1.2 供试培养基 马铃薯 20%、葡萄糖 1%、红糖 1%、酵母粉 0.25%、麦麸 3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub> 0.1%, pH 自然。

### 1.2 方法

将供试菌株活化后, 采用液体培养法, 每天定时取发酵液 5 mL, 4 000 rpm 离心 10 min 后取上清液作为粗酶液, 采用比色法测定酶活。

1.2.1 淀粉酶活力的测定 向试管中加入 0.5% 的可溶性淀粉溶液(pH 5.8 0.1 M 乙酸盐缓冲液配制) 1.5 mL, 加稀释 20 倍的粗酶液 0.5 mL, 38℃保温 30 min, 取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL, 煮沸 5 min, 冷却后稀释至 25 mL, 混匀后倒入比色杯内, 于紫外可见分光光度计(UV-754)540 nm 处测定 OD 值(煮沸 15 min

灭活的酶作对照), 以 1 min 产生 1 μg 麦芽糖的酶量定义为 1 个酶活性单位(U/mL)。麦芽糖标准曲线的制备: 精确称取 105℃烘干至恒重的麦芽糖 0.10 g, 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 得麦芽糖标准溶液。精密吸取标准麦芽糖标准溶液 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40、1.60 mL 于干燥具塞试管中, 然后分别加蒸馏水至 2.00 mL, 摇匀, 再加 2 mL 3,5-二硝基水杨酸, 混匀, 置水浴中 5 min, 冷却后定容至 25 mL, 混匀, 以加入 2.00 mL 蒸馏水的溶液做对照, 用分光光度计在 540 nm 波长下进行比色测定 OD 值。

1.2.2 羧甲基纤维素酶(CMC 酶)活力测定 向试管中加入 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液(用 pH 4.6, 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液配制) 1.5 mL, 加稀释 20 倍的粗酶液 0.5 mL, 50℃水浴准确保温 30 min。取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL, 煮沸 5 min, 取出冷却后加入蒸馏水使总体积为 25 mL, 混匀, 倒入比色杯内, 用紫外可见分光光度计(UV-754)于 550 nm 测 OD 值(以煮沸 15 min 灭活的酶作对照)。以 1 min 产生 1 μg 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活性单位(U/mL)。葡萄糖标准曲线的制备: 精确称取 105℃烘干至恒重的葡萄糖 0.20 g, 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 得葡萄糖标准溶液。精密吸取标准麦芽糖标准溶液 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40、1.60 mL 于干燥具塞试管中, 然后分别加蒸馏水至 2.00 mL, 摇匀, 再加 2 mL 3,5-二硝基水杨酸, 混匀, 置水浴中 5 min, 冷却后定容至 25 min, 混匀, 以加入 2.00 mL 蒸馏水的溶液做对照, 用分光光度计在 540 nm 波长下进行比色测定 OD 值。

1.2.3 邻苯二酚氧化酶活力测定 向试管中加入 2.0 mL 0.05 M pH 6.0 磷酸盐缓冲液, 2.0 mL 0.1 mol/L 邻苯二酚, 然后加入 0.5 mL 稀释 20 倍的粗酶液(可视酶活性高低适当增减用量), 28℃水浴准确保温 30 min 后迅速摇匀, 倒入比色杯内, 用紫外可见分光光度计(UV-754)于 400 nm 波长处在 1~2 min 内测定 OD 值。酶活单位都以反应前后 OD 值的变化表示。

第一作者简介: 马桂珍(1963-), 女, 教授, 现主要从事食用菌液体发酵方面的研究工作。

基金项目: 淮海工学院自然基金资助项目(Z2006034)

收稿日期: 2009-03-25

2 结果与分析

2.1 黄背木耳菌丝球形态

在发酵培养过程中,不同发酵时间的发酵液中,菌丝球形态各异。图1为发酵了8 d的种子液,此时形成的菌丝球细密,上清液透亮,菌丝球充满液体,且菌丝球界面清晰,接种时渗透性强。图2为同批接种的发酵液,右侧瓶中的种子液和菌丝球为米黄色;而左侧瓶中的种子液和菌丝球呈现褐色,经过镜检,左侧瓶中的种子液并没有染菌。在整个研究过程中,也出现过种子液颜色变深的情况,推测可能由于黄背木耳在液体培养过程中会产生色素而致。



图1 菌丝球较为均匀 图2 同批发酵液的不同形态

2.2 黄背木耳液体培养过程酶的变化

为了解黄背木耳液体发酵时胞外酶种类及活性变化,连续测定了15 d内发酵液中淀粉酶、纤维素酶和邻苯二酚氧化酶酶活性,结果见表1。

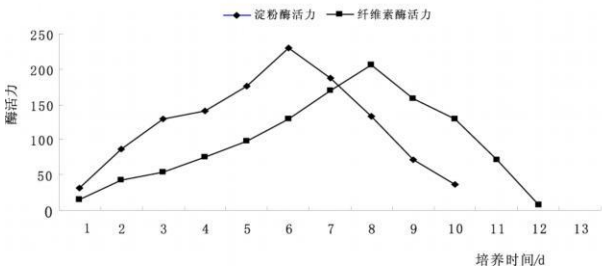


图3 淀粉酶和纤维素酶酶活力与培养时间的关系

表2 黄背木耳菌株产几种酶活性随发酵时间的变化

| 培养时间/d | 淀粉酶活性/ U · mL <sup>-1</sup> | 纤维素酶活性/ U · mL <sup>-1</sup> |
|--------|-----------------------------|------------------------------|
| 1      | 31.667                      | 14.715                       |
| 2      | 86.425                      | 42.672                       |
| 3      | 129.308                     | 53.708                       |
| 4      | 140.523                     | 75.045                       |
| 5      | 176.149                     | 98.588                       |
| 6      | 230.247                     | 129.489                      |
| 7      | 186.704                     | 169.954                      |
| 8      | 132.606                     | 206.005                      |
| 9      | 71.911                      | 158.183                      |
| 10     | 36.945                      | 129.489                      |
| 11     |                             | 72.102                       |
| 12     |                             | 8.093                        |

在整个发酵试验期内3种酶的活性出现的早晚及大小有较大差别。其中淀粉酶活性高峰出现最早(第6天),说明黄背木耳最早利用的是淀粉类物质;酶活性(在多糖降解酶中)也最高,可能与培养基中含有大量的淀粉类诱导物有关。CMC酶的活性高峰随后出现(第8

表1 黄背木耳发酵液 OD 值

| 培养天数/d | 淀粉酶   | 纤维素酶  | 邻苯二酚氧化酶 |
|--------|-------|-------|---------|
| 1      | 0.048 | 0.02  | 0.011   |
| 2      | 0.131 | 0.058 | 0.023   |
| 3      | 0.196 | 0.073 | 0.019   |
| 4      | 0.213 | 0.102 | 0.054   |
| 5      | 0.267 | 0.134 | 0.097   |
| 6      | 0.349 | 0.176 | 0.122   |
| 7      | 0.283 | 0.231 | 0.143   |
| 8      | 0.201 | 0.28  | 0.178   |
| 9      | 0.109 | 0.215 | 0.216   |
| 10     | 0.056 | 0.176 | 0.252   |
| 11     | —     | 0.098 | 0.275   |
| 12     | —     | 0.011 | 0.242   |
| 13     | —     | —     | 0.187   |
| 14     | —     | —     | 0.102   |
| 15     | —     | —     | 0.055   |

2.3 葡萄糖标准曲线

以葡萄糖含量为横坐标,OD值为纵坐标得出葡萄糖标准曲线,其回归方程为 $y=0.5518x-0.0125$ , $R^2=0.9978$ 。

2.4 麦芽糖标准曲线

以麦芽糖含量为横坐标,OD值为纵坐标得出麦芽糖标准曲线,其回归方程为 $y=0.4948x+0.0048$ , $R^2=0.9995$ 。

2.5 比色法测定淀粉酶以及纤维素酶活性结果

根据试验测定的OD值,计算出淀粉酶活力和纤维素酶活力,见表2。

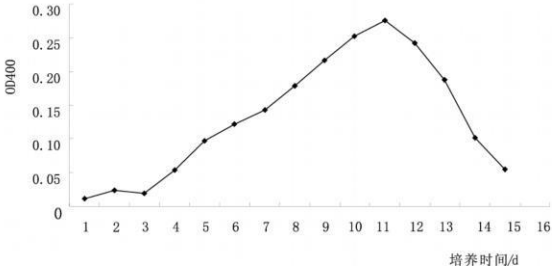


图4 邻苯二酚氧化酶酶活力与培养时间的关系

天),说明黄背木耳利用纤维素比淀粉晚。邻苯二酚氧化酶的活性高峰期到来更晚(第11天),在淀粉酶、纤维素酶活性降到较低水平时才出现,说明黄背木耳利用木质素更晚。

3 结论

从黄背木耳各种酶的变化曲线可见,黄背木耳产各种酶的活性高峰期,以淀粉酶为最早,随后是羧甲基纤维素酶和漆酶,最后才是邻苯二酚氧化酶。若以获得相关酶为目的产物,则应根据不同酶的分泌高峰期确定相应的发酵周期。

参考文献

[1] 王茂如,贺新生.黄背木耳代料高产栽培技术[M].北京:农业出版社,1993.  
[2] 陈德明.黄背木耳袋栽技术[J].浙江食用菌,1993(1):23-24.  
[3] 贾身茂.黄背木耳代料栽培技术[J].食用菌,1996,18(6):34-35.  
[4] 王敏强,王凤霞.黄背木耳优质高产栽培技术[J].食用菌,2002,24(6):29-30.

# 香菇冷棚半熟料地栽技术规程

冯景刚

(沈阳农业大学 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 辽宁省东部山区是我国香菇生产的主产区之一,香菇产品在国内外享有很高的声誉。为了给香菇生产者提供科学的标准化生产依据,提高产品的产量、质量及国内外市场的竞争能力,根据当地香菇的主要生产模式,编写了“香菇冷棚半熟料地栽技术规程”。该规程规定了香菇生产的产地环境、栽培原料、栽培技术、采收标准与病虫害防治等要求,同时适用于辽宁省东部山区香菇冷棚半熟料地栽生产。

**关键词:** 香菇;地栽;半熟料;技术规程

中图分类号: S 646.1<sup>+</sup>2 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2009)08-0262-02

## 1 适用范围

该规程规定了香菇生产的产地环境、栽培原料、栽培技术、采收标准与病虫害防治等要求。适用于辽宁省东部山区香菇冷棚半熟料地栽生产。

## 2 引用文件

下列文件中的条款通过该标准的引用而成为该标准的条款。NY/T 391-2000: 绿色食品产地环境条件; NY/T 5099-2002: 无公害食品食用菌栽培基质安全技术要求; NY/T 528-2002: 食用菌菌种生产技术规程; NY/T 393-2000: 绿色食品农药使用准则; GB 5749: 生活饮用水卫生标准。

## 3 术语和定义

### 3.1 主料

**作者简介:** 冯景刚(1955-),男,回族,教授,现从事食用菌的教学与科研工作,现兼任辽宁省食用菌协会常务理事。E-mail: fjg319@163.com.

**基金项目:** 辽宁省科技厅攻关资助项目(2007207002)。

**收稿日期:** 2009-03-26

主料是指香菇培养基中占数量比重大的碳素营养物质,如木屑、玉米芯、豆秸等作物秸秆。

### 3.2 辅料

辅料是指香菇培养基中占数量比重小的含氮量较高的营养物质,如麦麸、米糠、玉米粉,等。

## 4 产地环境

香菇产地环境应符合国家行业标准 NY/T 391-2000 的要求,栽培场地应远离工矿业污染源,距离在 2 km 以上,不受废水、废气、废渣的污染。

## 5 生产原料及配方

### 5.1 生产原料

生产原料应符合 NY/T 5099-2002 无公害食品食用菌栽培基质安全技术要求,主料木屑应选择阔叶树硬杂木屑,玉米芯要求在使用前粉碎成黄豆粒大小。辅料麦麸,玉米粉等要求新鲜无霉变。

### 5.2 培养料配方

生产上常用的 2 个配方是:①木屑 85%、麦麸 10%、玉米粉 4%、石膏粉 1%;②玉米芯 60%、木屑 30%、麦麸 9%、石膏粉 1%。

## Determination of Related Enzyme Activity from *Auricularia polytricha*

MA Gui-zhen<sup>1</sup>, ZHOU Chao<sup>1</sup>, QIU Chuan-qing<sup>2</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, BAO Zeng-hai<sup>1</sup>

(1. School of Food Engineering Huaihai Institute of Technology, Lianyungang Jiangsu 222005, China; 2. The First Middle School of Feixiang Handan, Hebei 057550 China)

**Abstract:** The liquid medium was used to cultivate *Auricularia polytricha* and the production of cellulose amylase and oxidase were determined. A further study about the changing rules was conducted based on the corresponding enzyme activity assay. The results demonstrated that the max-activity appearing time for amylase, cellulose and oxidase was day 6, 8, 11 respectively, and the amylase possess the maximum activity.

**Key words:** Cellulose; Amylase; Oxidase; Activity