

# 有机氮对平菇原基分化期胞外酶的影响

陈仁玉, 刘朝贵, 方 琼

(西南大学 园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

**摘 要:**以平菇为试材, 采用不同有机氮浓度的培养料培养, 在平菇原基形成的扭结期、桑椹期、珊瑚期分别测定漆酶、愈创木酚氧化酶、邻苯二酚氧化酶、淀粉酶、羧甲基纤维素酶的活性。结果表明: 配方 5(棉籽壳 97.70%, 尿素 0.30%, 过磷酸钙 1%, 糖 1%) 是最好的配方, 胞外酶活性最大, 平菇子实体分化速度快; 适宜的有机氮含量有助于增加平菇原基分化过程中各酶活性, 加快原基分化进程。

**关键词:**平菇; 有机氮; 原基分化; 酶活性

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)01-0153-03

平菇(*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer) 在真菌分类上属于担子菌纲(Basidiomycetes) 伞菌目(Agaricales) 侧耳科(Pleurotaceae)。我国已发现的食用侧耳有 30 多种, 进行培植的主要有糙皮侧耳、紫孢侧耳(美味侧耳)、金顶侧耳(榆黄蘑)、栉平蘑。

现对通过各种栽培料培养出来的平菇胞外酶活性的大小进行比较和分析, 选择在不同生长阶段相对较好的栽培料, 以期今后平菇栽培料原料选择和配方比例提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌种平菇, 取自西南大学蔬菜重点实验室食用菌研究室。PDA 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18~20 g、水 1 000 mL, 培养料配方见表 1。仪器设备: U-1800 紫外可见分光光度计、恒温水浴锅、超净工作台、JA2003A 电子精密天平、GL-20G-II 高速冷冻离心机、高压灭菌锅、Binder 恒温培养箱。

表 1 培养料配方

配方	棉籽壳/%	玉米面/%	尿素/%	过磷酸钙/%	糖/%
1	96.0	2	0	1	1
2	93.0	5	0	1	1
3	90.0	8	0	1	1
4	98.0	0	0	1	1
5	97.7	0	0.3	1	1
6	97.6	0	0.4	1	1
7	97.5	0	0.5	1	1

### 1.2 试验方法

将表 1 中各组配方按料水比 1:(1.3~1.5) 加水拌

料, 调至含水量 60% 左右和 pH 7.5~8.0, 将栽培料装入 750 mL 的蘑菇菌种瓶。配好的培养料装至瓶颈, 近瓶颈培养料不宜过松。装料后在瓶中央打一孔, 用封口膜封口后经高压灭菌锅彻底灭菌, 待冷却后接种。将接种好的栽培瓶放在 25℃ 的恒温培养箱中培养, 期间按正常的栽培方式控制箱内的温度、光照以及空气湿度, 菌丝生长阶段, 平菇需要相对低的温度, 特别是子实体原基分化阶段更需要低温刺激和较大的温差刺激, 并注意通风<sup>[1]</sup>。

准确称取 10 g 不同培养方法的菌料置于锥形瓶中, 往其中加入 100 mL 的双蒸馏水, 放置于 25℃ 下的生化培养箱中浸提 4 h, 过滤, 4 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为粗酶液<sup>[2]</sup>。

### 1.3 项目测定

淀粉酶活性测定采用 DNS 法<sup>[3]</sup>; 羧甲基纤维素酶活性测定采用 DNS 法<sup>[4]</sup>; 漆酶、愈创木酚氧化酶、邻苯二酚氧化酶活性测定采用分光光度法<sup>[5]</sup>。

### 1.4 数据分析

试验数据采用 Spss 16.0 和 Excel 2007 软件进行分析。

**1.4.1 评估方法的选择** 该试验采用因子分析的方法, 即根据变量之间相关性的大小把变量分组, 使得同组内的指标之间相关性较高, 而不同组的变量相关性较低。每组变量代表一个基本结构(称为公共因子)。对于该研究的问题可以用最少个数的不可测的公共因子的线性函数与特殊因子之和来描述原来观测的每一分量。用因子分析方法进行综合评价, 就是把原指标综合成几个因子, 再以这几个因子的贡献率为权数进行加权平均, 构造出一个综合评价函数, 根据综合评价函数值进行评判, 并由此获得每个处理酶活性大小的综合评估结果。设  $x_1$  表示漆酶,  $x_2$  表示愈创木酚氧化酶,  $x_3$  表示邻苯二酚氧化酶,  $x_4$  表示淀粉酶,  $x_5$  表示羧甲基纤维素酶。

**1.4.2 评价指标的鉴别力分析** 评价指标的鉴别力, 是

**第一作者简介:**陈仁玉(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为应用微生物, 现主要从事食用菌栽培及生理生态研究工作。

**责任作者:**刘朝贵(1955-), 男, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事蔬菜及食用菌的栽培及生理生态研究和珍稀食用菌的驯化栽培工作。

**收稿日期:**2011-10-08

指评价指标区分和辨别评价对象的特征差异的能力。如果所有被评价对象在某个评价指标上几乎一致地呈现很高(或很低)的得分,表明该评价指标几乎没有鉴别力。相反,如果被评价对象在某个指标上的得分出现明显的不同,则表明这个评价指标具有较高的鉴别力,它能够反映不同处理带来的酶活性差异。可以用变异系数来表征评价指标的鉴别力。

$$V_i = S_i / \bar{X}_i$$

其中,  $\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$ ,  $S_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (X_i - \bar{X})^2}$  为标准差。变异系数越大,该指标的鉴别能力越强,反之,变异系数越小鉴别能力越差。根据上述原理,利用 Spss16.0 for Windows 软件包,对 5 个评价指标进行因子分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 平菇子实体分化 3 个时期酶活性的测量值

由表 1 可知,在原基形成的扭结期,5 种胞外酶活性大小中差异性最大的是愈创木酚氧化酶,其次是淀粉酶。由表 2 可知,桑椹期的酶活性大小主要差异也表现在愈创木酚氧化酶和淀粉酶上,并且可以明显看出这 2 种酶呈现出了一定的负相关。由表 3 可知,珊瑚期的酶活性大小差异也主要体现在愈创木酚氧化酶上面。

表 1 扭结期酶活性的 OD 值

配方	漆酶	愈创木酚 氧化酶	邻苯二酚 氧化酶	淀粉酶	羧甲基 纤维素酶
1	0.0605	0.7205	0.2425	0.1030	0.0195
2	0.0785	0.7140	0.2345	0.2295	0.0220
3	0.1040	0.6020	0.2310	0.1675	0.0110
4	0.0805	0.8350	0.2835	0.2925	0.0055
5	0.0755	1.0465	0.3035	0.1675	0.0220
6	0.1085	1.3065	0.3230	0.1990	0.0235
7	0.0665	0.8770	0.2495	0.2070	0.0315

表 2 桑椹期酶活性的 OD 值

配方	漆酶	愈创木酚 氧化酶	邻苯二酚 氧化酶	淀粉酶	羧甲基 纤维素酶
1	0.2117	1.3107	0.3470	0.3020	0.1260
2	0.2363	1.6110	0.3880	0.2560	0.0927
3	0.2067	1.1370	0.2910	0.2937	0.0907
4	0.2227	1.5943	0.3593	0.2940	0.0967
5	0.1623	1.0577	0.3017	0.1330	0.1670
6	0.1553	1.7157	0.2947	0.1327	0.1823
7	0.1490	1.9650	0.3370	0.0700	0.1303

表 3 珊瑚期酶活性的 OD 值

配方	漆酶	愈创木酚 氧化酶	邻苯二酚 氧化酶	淀粉酶	羧甲基 纤维素酶
1	0.1400	1.0813	0.2393	0.0867	0.0963
2	0.1650	1.2977	0.2183	0.1480	0.1350
3	0.2107	1.3240	0.2393	0.1617	0.1020
4	0.1487	0.9643	0.2317	0.0913	0.0743
5	0.1717	1.7010	0.3427	0.1143	0.1233
6	0.1267	1.0953	0.2210	0.0837	0.1367
7	0.1180	1.1227	0.2057	0.0913	0.1610

### 2.2 珊瑚期的酶活性

2.2.1 珊瑚期酶活性评价指标的鉴别力分析 由表 4 可知,各指标的变异系数均较大,说明各指标的鉴别能力均较强。

表 4 变异系数

评价指标	均值	标准差	变异系数
x1	0.1544	0.03139	0.203303
x2	1.2266	0.24410	0.199005
x3	0.2426	0.04578	0.188706
x4	0.1110	0.03178	0.286306
x5	0.1184	0.02929	0.247382

2.2.2 珊瑚期酶活性大小的因子分析 确定综合评价函数的系数,计算出指标间的相关系数,各指标间的相关系数如表 5 所示。

表 5 相关系数矩阵

	x1	x2	x3	x4	x5
x1	1.000	0.554	0.387	0.875	-0.390
x2	0.554	1.000	0.827	0.504	0.230
x3	0.387	0.827	1.000	0.101	-0.158
x4	0.875	0.504	0.101	1.000	-0.024
x5	-0.390	0.230	-0.158	-0.024	1.000

表 6 KMO and Bartlett 检验

KMO and Bartlett's Test		
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.	Approx. Chi-Square	Sig.
0.285	34.571	0.000

$$y_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}, S_j = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}$$

其中  $N$  为样本个数 31;  $i=1,2,3,\dots,7$ ;  $j=1,2,3,4,5$ 。

由表 5 可知,选取的 5 个指标之间的大多数相关系数都较大。同时经 KMO 和 Bartlett 检验表明:Bartlett 值为 34.571,  $P < 0.001$ ,即相关矩阵不是一个单位矩阵,说明比较适合采用因子分析法。

由于原始数据之间有些变量指标之间的相关系数较大(部分达到 0.8 以上),说明部分因子之间存在着高度的正相关,因此该文采用斜交旋转方法(允许因子彼此相关性),得到相关系数矩阵的方差、特征值、贡献比例和累计贡献比例值。接下来在 Spss 软件中得到因子系数向量 B1。同理可用得到因子系数向量 B2 和 B3,公共因子系数矩阵用 B 表示,如表 7。

表 7 公共因子系数矩阵

B1	B2	B3
0.549676	-0.36062	0.127845
0.525777	0.450781	-0.03934
0.428343	0.351786	-0.58415
0.476141	-0.24749	0.548749
-0.10356	0.693849	0.584152

然后用公式  $F = y_{ij} \times B$  计算出各因子值,最后利用综合因子函数计算得到综合因子得分。综合因子函数计算公式为:  $F(\text{综合因子}) = 0.532 \times F1 + 0.256 \times F2 + 0.207 \times F3$ 。

根据上述的公式,可以计算出各公共因子及综合因

子得分。由表 8 可知,在珊瑚期测定平菇胞外酶活性,配方 5 综合因子大小最大。这与表 1 所给出的数据较吻合。即配方 5>配方 3>配方 2>配方 7>配方 6>配方 1>配方 4。

表 8 珊瑚期综合因子得分

配方	F1	F2	F3	F
1	0.779301	0.566542	-0.06061	0.547076
2	0.92299	0.659308	0.002584	0.660348
3	0.980857	0.635818	-0.01666	0.681137
4	0.723765	0.491559	-0.06072	0.498314
5	1.177153	0.882694	-0.11035	0.829373
6	0.765874	0.59994	-0.03024	0.554769
7	0.770044	0.624979	-0.00505	0.568613

### 3.3 扭结期、桑椹期的酶活性

由表 9 可知,桑椹期的酶活性依次为配方 2>配方 4>配方 7>配方 1>配方 6>配方 3>配方 5。

表 9 桑椹期综合因子得分

配方	F1	F2	F
1	0.203948	1.033518	0.420824
2	0.194856	1.297879	0.491158
3	0.211862	0.874548	0.380019
4	0.195455	1.263512	0.48166
5	0.077903	0.874883	0.298535
6	-0.00682	1.389296	0.394571
7	-0.02653	1.633243	0.452586

由表 10 可知,扭结期的酶活性依次为配方 6>配方 5>配方 4>配方 7>配方 2>配方 1>配方 3。

表 10 扭结期综合因子得分

配方	F1	F2	F3	F
1	0.663744859	0.035322931	0.100469234	0.323700314
2	0.678297695	0.11670633	0.171355688	0.367214526
3	0.600790622	0.111022523	0.10282155	0.320001554
4	0.79642445	0.156723512	0.224470663	0.4410817
5	0.930533801	0.046208068	0.16138646	0.455980449
6	1.128469494	0.044338462	0.178367995	0.54652927
7	0.790544841	0.067847406	0.178792915	0.403019507

### 3.4 酶活性综合评价

将综合因子得分求平均数得表 11。配方 5(棉籽壳 97.70%,尿素 0.30%,过磷酸钙 1%,糖 1%)的胞外酶活性最大,平菇子实体分化速度快,是最好的处理,然后依次是配方 2、配方 6、配方 7、配方 4、配方 3、配方 1 处理。

表 11 综合因子得分

配方	F 3 次综合
1	0.430533
2	0.50624
3	0.460386
4	0.473685
5	0.527963
6	0.498623
7	0.47474

该试验结果表明,适宜的有机氮含量有助于增加平菇原基分化过程中各酶活性,加快原基分化进程。对于促进平菇子实体形成,缩短生产周期具有理论指导价值。在 0.30%~0.50% 的浓度范围内,尿素含量在 0.30% 的低浓度下有利于原基的分化。

## 3 讨论

3 次测量的数据综合分析后,所有处理表现出来的差异较小。这可能是由于所设浓度梯度过小所导致的,也进一步证明了平菇的适应能力强,抗逆性强,生活力强的特性。

## 参考文献

- [1] 黄红军. 大棚平菇高产栽培技术[J]. 种业导刊, 2010(2): 28-37.
- [2] 倪新江, 丁立孝, 潘迎捷, 等. 姬松茸在两种培养基上生长期间九种胞外酶活性变化[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 222-227.
- [3] 回晶, 赵文静, 邹志远, 等. 金耳液体培养过程中几种胞外酶活性的变化规律[J]. 食用菌学报, 2007(3): 33-36.
- [4] 王琳, 刘国生, 王林嵩. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学), 1998(8): 66-69.
- [5] 朱启忠. 侧耳 792 几种胞外酶活性的测定比较[J]. 食用菌, 2006, 28(5): 21-22.

## Effects of Organic Nitrogen on the Activity of Extracellular Enzymes During Primordium Formation of *Pleurotus ostreatus*

CHEN Ren-yu, LIU Chao-gui, FANG Qiong

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715)

**Abstract:** *Pleurotus ostreatus* was used as material in this study to test activity of laccase, guaiacol oxidase, pyrocatechol oxidase, amylase and carboxymethyl cellulase with medium of various organic nitrogen content in primordia stage, morula stage and coral period. The results showed that formula 5 (Sawdust 97.70%, urea 3%, calcium superphosphate 1%, glucose 1%) was the best option with maximum exocellular enzymatic activity and fastest differentiation. A suitable content of organic nitrogen was good for promoting enzymatic activity during primordium formation of *Pleurotus ostreatus*, and speeded up the process of primordium formation.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; organic nitrogen; primordium formation; enzyme activity