

# 白色茶树菇生长发育中漆酶与纤维素酶活力的测定

姜性坚, 王春晖, 彭运祥, 胡汝晓, 施枝军, 尹永刚

(湖南省食用菌研究所, 湖南 长沙 410013)

**摘要:**以“湘茶 158”白色茶树菇为试材, 分别采用 ABTS 法和 DNS 法对其进行了液体发酵和出菇培养 2 个阶段的漆酶与羧甲基纤维素酶活性的测定, 以探讨菌丝体对培养基质中纤维素的分解能力。结果表明: 液体发酵培养阶段, 前 6 d 漆酶活性较低, 6 d 之后迅速上升, 第 8 天达到最高峰值, 之后酶活性峰值又急剧下降, 最后趋于缓和; CMC 酶活性前 4 d 较低, 之后迅速上升, 第 6 天达到最高峰值, 之后酶活性又逐渐下降, 最后趋于缓和。出菇培养阶段, 菌丝长满半袋和满袋时, 漆酶活性处于很低水平, 1 潮菇原基时, 酶活峰值急速升至较高水平, 幼菇时达到最高峰值, 之后又急剧下降, 在 2 潮菇的几个阶段, 漆酶活性均处于较低水平; CMC 酶活性在菌丝长满半袋和满袋时处于一般水平, 而在 1 潮菇原基时期, 酶活峰值急速升至最高峰值, 在幼菇时期又急剧下降至一般水平, 在 1 潮菇子实体成熟期和 2 潮菇的几个阶段, CMC 酶活性变化不大, 均处于较低水平。

**关键词:**茶树菇; 漆酶; 羧甲基纤维素酶; 酶活性

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0149-03

茶树菇(*Agrocybe cylindracea* (DC.) Gillet) 隶属担子菌亚门(Basidiomycotina) 层菌纲(Hymenomycetes) 伞菌目(Agaricales) 粪锈伞科(Bolbitiaceae) 田头菇属(*Agrocybe*)<sup>[1]</sup> 食用菌, 又名柱状田头菇、杨树菇, 因野生于油茶树的枯干上, 也得名茶树菇。柱状田头菇是一种菌盖细嫩、柄脆、味纯香、鲜美可口的食用菌, 并且含多种药用成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、清热、平肝、明目、利尿、健脾的功效, 因此也具有一定的药用功效和开发价值<sup>[2-3]</sup>。漆酶(Laccase)是一种含铜的多酚氧化酶, 广泛存在于担子菌、半知菌和子囊菌中, 自然界中漆酶在木质素矿化降解、腐殖质形成等过程中发挥着重要作用, 在制浆造纸、废物处理、环境污染物降解等方面具有研究价值和应用潜力, 所以对漆酶的研究具有十分重要的意义<sup>[4]</sup>。纤维素酶是一种在分解纤维素起生物催化作用的酶类, 在食品和环境行业中广泛应用。漆酶及纤维素酶是食用菌产生的 2 种典型的胞外酶, 可以为品种鉴定、营养生理研究及高产菌株筛选提供依据<sup>[5]</sup>。

现通过测定白色茶树菇液体培养和基质栽培阶段培养影响木质素降解的漆酶含量及影响纤维素降解的羧甲基纤维素(CMC)酶含量, 从酶学、有机物质分解角

度研究菌株的特性, 旨在揭示茶树菇生长发育不同阶段, 与基质利用相关的 2 种酶活力的变化与菌株生长发育的关系, 以期了解不同发育阶段, 茶树菇对液体培养基及基质成分的利用能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株“湘茶 158”是由湖南省食用菌研究所最新选育的 1 株白色茶树菇(*Agrocybe cylindracea*) 品种。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养 液体培养基配方: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸二氢钾 3 g, 硫酸镁 1.5 g, 蛋白胨 5 g, 维生素 B<sub>1</sub> 10 mg, 水 1.0 L。接种供试菌株于液体培养基中, 25℃振荡培养箱中 130 r/min 条件下振荡培养若干天, 待用。栽培培养基配方: 棉籽壳 40%, 木屑 35%, 麸皮 15%, 玉米粉 5%, 豆饼粉 3%, 白糖 1%, 石膏 1%, 含水量 60%。菌丝生长与出菇条件参照黄年来等<sup>[6]</sup>方法。

1.2.2 样品制备 在液体培养阶段, 过滤液体培养不同天数(第 2、4、6、8、10、12、14 和 16 天)的菌丝体, 收集发酵滤液, 以 12 000 r/min 转速离心 5 min, 取上清作为待测粗酶液。在出菇培养阶段, 分别在菌袋菌丝长至半袋, 菌丝满袋, 1 潮菇原基形成, 1 潮菇幼菇形成, 1 潮菇子实体成熟, 2 潮菇原基形成, 2 潮菇幼菇形成, 2 潮菇子实体成熟 8 个时期取样, 取样 20 g。粗酶液制备参照初洋等<sup>[7]</sup>的方法。

**第一作者简介:**姜性坚(1964-), 男, 本科, 副研究员, 现主要从事食用菌育种与栽培等研究工作。

**基金项目:**湖南省自然科学基金资助项目(12JJ3022)。

**收稿日期:**2013-01-16

## 1.3 项目测定

1.3.1 漆酶活力测定 采用 ABTS 法, 3.0 mL 反应体系中, 加入 0.1 M 的柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0) 2 mL, 1 mM 的 ABTS 溶液 500  $\mu$ L, 粗酶液 500  $\mu$ L, 25℃ 反应 5 min 后每隔 3 min 于 420 nm 处测定 OD 值; 3 次重复。以沸水浴灭活 10 min 的粗酶液为对照。定义在 25℃ 条件下 1.0 g 干培养物在 1 min 内改变的光密度值为 1 个酶活单位 (U/L)。酶活力计算公式:  $U/L = A \times V \times 10^6 / (\epsilon L t v)$ ,  $A$  为吸光度的变化值;  $V$  为反应总体积;  $\epsilon = 3.6 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;  $L$  为比色皿直径;  $t$  为反应时间;  $v$  为样品体积。

1.3.2 羧甲基纤维素酶 (CMC) 活力测定 采用 DNS 法, 在酶解管中加入 0.5% 的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液 (用 pH 4.5, 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液配制) 1.5 mL, 之后加入稀释 10 倍的粗酶液 0.5 mL, 于 50℃ 水浴中准确保温 30 min, 取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL,

100℃ 水浴 5 min, 取出冷却后加入蒸馏水 21.5 mL, 混匀, 分光光度计测 520 nm OD 值, 由标准曲线求得酶解的葡萄糖含量, 以每 30 min 生成 1 mg 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与分析

## 2.1 茶树菇漆酶活性的变化

由图 1 可知, 漆酶活性变化趋势在 2 种培养方式中大致相同。在液体培养阶段的前 6 d, 漆酶活性较低, 而第 6 天之后漆酶活性迅速上升, 第 8 天达到最高峰值, 之后酶活性峰值又急剧下降, 最后趋于缓和。在出菇培养阶段, 菌丝长满半袋和满袋时, 漆酶活性处于很低的水平, 而在 1 潮菇原基时期, 酶活峰值急速升至较高水平, 在幼菇时期达到最高峰值, 之后又急剧下降, 在 1 潮菇子实体成熟期, 漆酶活性处于中等水平。在 2 潮菇的几个阶段, 漆酶活性均处于较低水平。

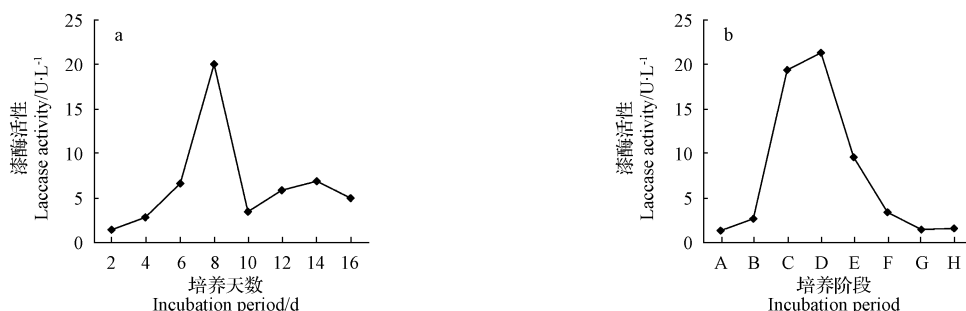


图 1 茶树菇漆酶活性变化

注: a. 液体培养阶段; b. 出菇培养阶段。A. 菌丝半袋; B. 菌丝满袋; C. 1 潮菇原基形成; D. 1 潮菇幼菇形成; E. 1 潮菇子实体成熟; F. 2 潮菇原基形成; G. 2 潮菇幼菇形成; H. 2 潮菇子实体成熟, 图 2 同。

Fig. 1 Laccase activity variation of *Agrocybe cylindracea*

Note: a. Liquid cultured period; b. Fruiting body cultured period. A. Mycelia half of the cultural bag; B. Mycelia full of the cultural bag; C. The first time of primordium formation; D. The first time of young fruiting body formation; E. The first time of fruiting body formation; F. The second time of primordium formation; G. The second time of young fruiting body formation; H. The second time of fruiting body formation, Fig. 2 was the same.

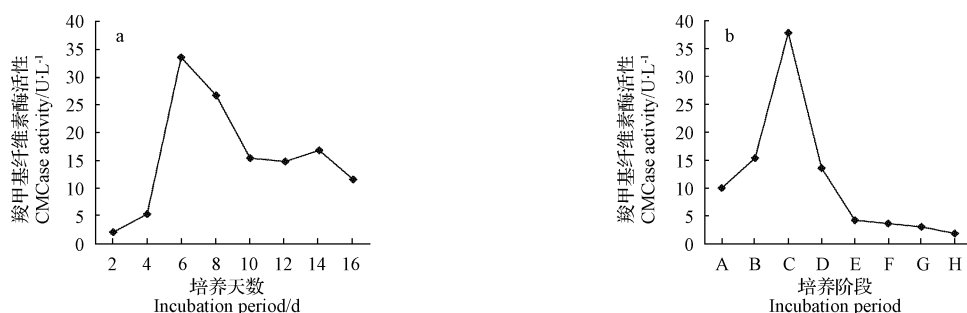


图 2 茶树菇 CMC 酶活性变化

Fig. 2 CMCase activity variation of *Agrocybe cylindracea*

## 2.2 茶树菇 CMC 酶活性的变化

由图 2 可知, CMC 酶活性变化趋势与漆酶相比略有差异。在液体培养阶段的前 4 d, CMC 酶活性较低, 而第 4 天之后 CMC 酶活性迅速上升, 第 6 天达到最高峰

值, 之后酶活性峰值又逐渐下降, 最后趋于缓和。但从第 10 天起, CMC 酶活性变化趋于缓和, 且活性值与前 4 d 相比, 处于较高水平。在出菇培养阶段, 菌丝长满半袋和满袋时, CMC 酶活性处于一般水平, 而在 1 潮菇原基

时期,酶活峰值急速升至最高峰值,在幼菇时期又急剧下降至一般水平,1潮菇子实体成熟期的CMC酶活性较低。在2潮菇的几个阶段,CMC酶活性变化不大,均处于较低水平。

### 3 结论

该试验结果表明,白色茶树菇液体发酵菌丝体和出菇培养菌丝体在漆酶或CMC酶的酶活性上略有差异,出菇时期的菌丝体2种酶活性最高值稍高于液体培养的菌丝体,这也许与菌丝体对培养基质组成成分的摄取与分解能力有关。明显在某一个时期,菌丝体对固体基质木质纤维素的分解能力更好些,这也是有促进纤维素分解作用的漆酶与CMC酶活性较高,但这种较高水平的酶活性维持的时间并不长,尤其是在第2潮菇的整个阶段,2种酶的活性均很低,这可能是因为随时间的推移,菌丝体逐渐老化,因此影响了胞外酶活性。郭倩等<sup>[8]</sup>认为,酶活性的峰值和子实体的发育状态呈正相关。Claydon等<sup>[9]</sup>在研究双孢蘑菇时发现,胞外纤维素酶的活性的峰值的高低与子实体的生物量呈正相关,如果采取随时去除原基的方法抑制出菇,可以使酶活性一直处于低水平状态。暴增海等<sup>[10]</sup>提出,纤维分解酶活性增加与子实体生理生化有着十分密切的关系。对此值得深入研究,这将有助于从营养代谢角度了解子实体发生的生理生化机制。

随着茶树菇的营养和药用价值越来越多地被人们

发现,对于其研究也逐渐成为热点。在茶树菇的菌丝体液体发酵培养和子实体生产过程中,研究其对纤维素分解酶的活性,了解其中胞外酶的生理活性变化,为茶树菇等食用菌的生产和利用可提供参考。

### 参考文献

- [1] 路等学,王龙,张铎,等. 茶树菇胞外酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2010(2):37-39.
- [2] 才晓玲,安福全,邹瑶,等. 柱状田头菇研究进展[J]. 食用菌学报, 2011,18(2):65-69.
- [3] Uhart M, Piscera J M, Albertó E. Utilization of new naturally occurring strains and supplementation to improve the biological efficiency of the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35:595-602.
- [4] 赵爽,刘宇,许峰,等. 姬松茸4个品种菌丝体的生物酶活性测定[J]. 中国食用菌, 2010,29(3):32-33.
- [5] 姜性坚,王春晖,彭运祥,等. 5个姬松茸菌株不同生长阶段漆酶及纤维素酶活力测定[J]. 食用菌, 2010(6):9-10.
- [6] 黄年来,林志彬,陈国良. 中国食用菌学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2010:607-619.
- [7] 初洋,倪新江,杨佳文,等. 姬菇和鲍鱼菇生长期8种胞外酶活性变化比较[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2008,21(2):138-142.
- [8] 郭倩,何庆邦. 四孢蘑菇生长过程中四种胞外酶活性和木质纤维素降解的变化规律[J]. 食用菌学报, 1998,5(2):13-17.
- [9] Claydon N, Allar M, Wood D A. Fruitbody biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus*[J]. Trans Br Mycol Sci, 1988,90(1):85-90.
- [10] 暴增海,马桂珍,吴智艳. 鸡腿蘑对基质的降解及有关酶活性变化特点研究[J]. 北方园艺, 2002(3):54-55.

## Detection of the Laccase and MCMase Activities of *Agrocybe cylindracea* During Its Growth

JIANG Xing-jian, WANG Chun-hui, PENG Yun-xiang, HU Ru-xiao, SHI Zhi-jun, YIN Yong-gang  
(Institute of Hunan Edible Fungi, Changsha, Hunan 410013)

**Abstract:** Aim to analysis the degradation ability of mycelia to cellulose, laccase and CMCase activities from *Agrocybe cylindracea* were tested in the liquid and fruiting body cultured periods by using ABTS method and DNS method, respectively. The results showed that in the liquid period the laccase activity and CMCase activity were in a low level in the first 6 and 4 days. Then the activities were hastily rised, it was highest up to the 8<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> days and then it was hastily declined until to a low and relaxative level, respectively. In the fruiting body cultured period, the laccase activity and CMCase activity were in a low and common level when the mycelia grow to a half cultural bag, respectively. The laccase activity was a higher level in the first time of primordium formation, and the highest level in the first time of young fruiting body formation. However, the CMCase activity was in a common level before the mycelia grow full of the cultural bag, then up to the highest level in the first time of primordium formation, and then hastily declined to a common level. The laccase activity and CMCase activity were both in a low level in the second fruiting body period. This study provided a reference for the analysis of physiological activity and culture production and utilization of *A. cylindracea*.

**Key words:** *Agrocybe cylindracea*; laccase; CMCase; enzyme activity