

doi:10.11937/bfyy.20171421

## 香菇、杏鲍菇与平菇部分胞外酶种类及活性变化规律的对比分析

高 锋, 曹 旻, 何明霞, 刘 静, 方艺伟, 张春霞

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

**摘 要:** 为了比较不同腐生食用菌降解纤维素、木质素以及淀粉的能力, 以平菇(*Pleurotus ostreatus*)、香菇(*Lentinus edodes*)和杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)为研究对象, 采用平板变色圈法对胞外酶种类进行定性检测, 选用 36% 木屑、43% 锯末、20% 麸皮、1% 蔗糖, 58%~60% 水分, pH 6.6 为栽培基质进行栽培出菇, 再利用分光光度计法检测其中 4 种代表性胞外酶在生长发育各阶段的酶活性变化。结果表明: 利用变色圈法在平菇、香菇和杏鲍菇中均检测到羧甲基纤维素钠酶(CMCase)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)、漆酶(Laccase)和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP); 在平菇及香菇中检测到淀粉酶(Amylase), 在香菇中未检测到淀粉酶。杏鲍菇羧甲基纤维素钠酶、滤纸酶、淀粉酶活性与子实体形成正相关, 子实体快速生长或者子实体成熟时活性峰值, 在发菌及潮菇间期酶活性低; 漆酶活性在发菌期有较高的水平, 在菇蕾形成达到第一个活性高峰, 随后逐渐下降直到子实体老化阶段酶活性升高到第二个高峰; 表明杏鲍菇利用木质素先于纤维素和淀粉。平菇羧甲基纤维素钠酶、漆酶活性与子实体形成正相关, 其活性峰分别出现在子实体快速生长及成熟阶段; 滤纸酶及淀粉酶在整个生长发育阶段均维持价低水平, 子实体形成过程无严格相关性。香菇羧甲基纤维素钠酶、滤纸酶在发菌阶段酶活性较高, 在幼菇阶段达到峰值, 之后逐渐下降; 淀粉酶活性与子实体形成过程无严格相关性, 始终维持在较低水平; 在生长发育过程中几乎检测不到漆酶活性。在生长发育过程中, 同种菌不同胞外酶之间、相同胞外酶在不同菌之间酶活性大小及变化规律存在一定的差异。

**关键词:** 香菇; 杏鲍菇; 平菇; 纤维素酶; 滤纸酶; 淀粉酶; 漆酶

**中图分类号:** S 646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)23-0199-08

**第一作者简介:** 高峰(1986-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为食用菌生理学和栽培学。E-mail: 512628651@qq.com

**责任作者:** 张春霞(1981-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事食用菌栽培技术等研究工作。E-mail: zhangchunxia7084@163.com

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31560008); 云南省应用基础研究计划资助项目(2013FZ168); 云南省科研院所技术开发专项资助项目(2015DC014); 云南省应用基础研究重点资助项目(2017FA017); 中国科学院“西部之光”人才培养资助项目(326); 云南省热带作物科技创新体系建设专项资助项目(RF2017-10)。

**收稿日期:** 2017-07-14

刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*, 杏鲍菇), 糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*, 平菇)和香菇(*Lentinus edodes*)是 3 种广泛栽培的腐生食用菌, 均属于白腐真菌, 且可以利用常用阔叶树杂木屑、麸皮、棉籽壳、甘蔗渣、玉米芯等农林废弃物进行人工栽培<sup>[1]</sup>。据报道三者均具有用于分解木质素、纤维素以及淀粉的胞外酶体系, 但是由于不同研究者采用的菌株、栽培基质配方、栽培环境条件以及酶活性测定方法存在较大的差异, 不同食用菌之间胞外酶的种类及酶活性大小及变化规律无法进行直接的对比分析<sup>[2-4]</sup>。因此, 该研究选择最适出菇

温度接近的3个菌株,通过统一的平板变色圈法进行胞外酶的定性检测,选择相同的栽培基质配方及相同出菇条件、在相同的出菇阶段取样,利用统一的酶活性检测方法,研究了3种食用菌胞外酶的种类及酶活性变化差异,实现了对降解纤维素的木质素及淀粉利用能力的直接对比分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为平菇 9506 菌株,香菇 L26 菌株和杏鲍菇 PL e-3 菌株,均购自福建省龙海市九湖食用菌研究所。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 平板变色圈试验

供试菌株在 PDA 固体培养基(直径为 90 mm 的玻璃培养皿)上培养,28℃避光培养 4 d,用 1 cm 无菌打孔器在生长旺盛的菌丝前缘打孔取菌饼,接种于下述相应的测试培养基中央,培养条件同上。设 5 个平行试验,3 次生物学重复试验。每隔 24 h 测量变色圈直径及菌落直径,计算酶指数(enzymatic index, EI); $EI = \text{变色圈直径} / \text{菌落直径}$ <sup>[5]</sup>,结果以平均值±标准差来表示。直径测量方法:以菌落中心为交点画 2 条互相垂直的直线并标出与菌落或者变色圈外缘的交点,用数显游标卡尺分别测量位于每条直线上的菌落及变色圈直径,直径大小取二者平均值,下同。

#### 1.2.2 纤维素酶体系变色圈试验

参照蒋琼凤等<sup>[6]</sup>的方法。测试用刚果红-羧甲基纤维素钠培养基:羧甲基纤维素钠 2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.88 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, 蛋白胨 2.0 g, 刚果红 0.25 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 000 mL, pH 自然。观察记录透明圈产生的时间和清晰度,测量菌落直径及变色圈直径,计算 EI。

#### 1.2.3 淀粉酶变色圈试验

测试用 PDA 可溶性淀粉培养基:去皮马铃薯 200.0 g(煮汁),葡萄糖 10.0 g,可溶性淀粉 2.0 g,水 1 000 mL, pH 自然。培养 1 周左右,先测量菌落直径,然后去除菌落表面的菌丝并用卢戈氏碘液法染色<sup>[7]</sup>,最后测量未被染成蓝色区域的直径,计算 EI。

#### 1.2.4 木质素酶体系变色圈试验

参照杜海萍等<sup>[8]</sup>方法。基本培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g, 维生素 B<sub>1</sub> 0.02 g, 琼脂 15.0 g, 水加至 1 000 mL。PDA-RB 亮蓝试验:所用培养基为基本培养基加 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>(终浓度)RB 亮蓝,观察菌落周围是否有橙黄色轮环产生,木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)能使 RB-亮蓝转变为橙黄色。PDA-单宁酸试验:所用培养基为基本培养基加 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>(终浓度)单宁酸,观察记录菌落周围有无棕褐色轮环出现,漆酶(Laccase)能使单宁酸转变为棕褐色物质。PDA-愈创木酚试验:所用培养基为基本培养基加 0.1 g·L<sup>-1</sup>(终浓度)愈创木酚,观察菌落下方及周围是否变为红棕色,愈创木酚在锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)和  $\text{Mn}^{2+}$  作用下被氧化成红棕色的四邻甲氧基连酚。

### 1.3 项目测定

#### 1.3.1 栽培出菇及酶活性测定

上述平板变色圈试验只能反映相关酶的种类,为了比较菌丝生长及子实体发育过程胞外酶活性的强弱及变化规律,进行了栽培出菇试验,具体方法如下:栽培平菇、香菇、杏鲍菇的基质配方均选用香菇木屑培养基栽培配方,36%木屑、43%锯末、20%麸皮、1%蔗糖,58%~60%水分,用石膏粉调 pH 至大约 6.6,装袋(90 mm×330 mm)121℃灭菌 1 h 备用<sup>[9]</sup>。将购买的原种接种于 PDA 斜面培养基(25 mm×200 mm)上培养,菌丝长满斜面后,将菌丝和培养基全部接到上述栽培基质中,每支斜面培养物接种一袋栽培基质,28℃避光培养。菌丝长满菌袋后,选择三者均适宜的出菇温度(15℃)进行诱导出菇,出菇过程中通过定期喷施无菌水保持水分。取菌丝长满袋、原基、菇蕾、幼菇、幼菇快速生长、子实体成熟、子实体老化及采收后 2 d 共 8 个阶段的基质样品各 10 g,用相应酶所需的缓冲液(纤维素酶、漆酶用 pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液,淀粉酶用 pH 6.0 磷酸-柠檬酸缓冲液)50 mL 振荡浸泡 3 h, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,上清液即为粗酶液,必要时作适当稀释。

#### 1.3.2 酶活性测定

纤维素酶活性测定。葡萄糖标准曲线绘制,

滤纸酶活力和羧甲基纤维素酶活力的测定按照中国食品发酵工业研究院等所示方法<sup>[10]</sup>。酶活性定义为:在 $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ ,相应 pH 条件下,1 min 水解底物(滤纸或羧甲基纤维素钠),产生相当于  $1\ \mu\text{mol}$  葡萄糖的还原糖的酶量,为一个酶活力单位(U)。在测定中,因基质水分含量不一,酶活性最终换算为  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  干质量,下同。

淀粉酶活性测定。参照王玉万等<sup>[11]</sup>的方法,并做了一些改进。绘制麦芽糖标准曲线,分别取稀释的酶液 0.5 mL 于 25 mL 具塞比色管中,加入 1% 的可溶性淀粉溶液( $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 5.6 的柠檬酸缓冲液配制)1.5 mL,  $40^\circ\text{C}$  恒温水浴 30 min,取出立即加入 DNS 试剂 3 mL(对照管先加 DNS 试剂后加 0.5 mL 酶液),沸水浴煮 5 min,冷却至室温后,加蒸馏水至 25 mL,摇匀后,分光光度计(上海美谱达 UV-3200)于 540 nm 波长下测定吸光度,依据麦芽糖标准曲线求得还原糖量,并计算出淀粉酶活力。淀粉酶活力定义为:酶在 pH 5.6,  $40^\circ\text{C}$  条件下测定,每分钟水解底物可溶性淀粉产生  $1\ \mu\text{mol}$  麦芽糖的酶量为一个活力单位(U)。

漆酶活性测定。参照张鹏<sup>[12]</sup>的方法。取浓度为  $0.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 2,2'-连氮-双(3-乙基苯

并噻唑-6-磺酸)(ABTS)溶液 2.9 mL,在  $30^\circ\text{C}$  水浴中预热后,加入 0.1 mL 稀释好的酶液,混匀。立即测  $\text{OD}_{420}$  值,每隔 1 min 读一个数,连续记录 10 min(或读至  $\text{OD}_{420}$  到达 3.000)。以  $\text{OD}_{420}$  值为纵坐标,时间为横坐标,通过 Excel 软件拟合,求出曲线的斜率  $k$ 。酶活力定义:每分钟使 ABTS 溶液产生  $1\ \mu\text{mol}$  ABTS 自由基的酶量,为一个酶活单位(U)。计算公式:酶活(U) =  $1\ 000 \times 0.184\ 4 \times k \times \text{稀释倍数}$ <sup>[12]</sup>。

#### 1.4 数据分析

采用 Excel 2016 软件进行数据统计和分析,采用 SPSS 23.0 软件进行差异显著性分析,显著性水平设置为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 平板变色圈试验结果

#### 2.1.1 刚果红-羧甲基纤维素钠试验结果

由表 1 可知,平菇、香菇及杏鲍菇的菌落周围均可产生透明圈,能够分泌羧甲基纤维素钠酶,降解的羧甲基纤维素钠不再与刚果红结合形成红色复合物。从 EI 推测香菇分解纤维素能力最强。

表 1

刚果红-羧甲基纤维素钠试验结果

Table 1

Result of congo red-sodium carboxymethyl cellulose test

菌株 Strains	变色反应 Color reaction	菌落直径 Diameter of colony/mm	变色圈直径 Diameter of colored halo/mm	酶指数 Enzymatic index(EI)
平菇 <i>P. ostreatus</i>	+	$56.77 \pm 9.42\text{a}$	$50.45 \pm 9.24\text{a}$	$0.89 \pm 0.02\text{c}$
香菇 <i>L. edodes</i>	+	$34.18 \pm 11.56\text{b}$	$52.19 \pm 12.90\text{a}$	$1.60 \pm 0.28\text{a}$
杏鲍菇 <i>P. eryngii</i>	+	$24.23 \pm 7.31\text{c}$	$30.97 \pm 4.84\text{b}$	$1.37 \pm 0.38\text{b}$

注:— 阴性反应, + 阳性反应。同列不同小写字母表示 5% 的差异水平,下同。

Note:— negative reaction, + positive reaction. The list of different lowercase letters with 5% difference in level, the same below.

#### 2.1.2 淀粉-卢戈氏碘液试验结果

由表 2 可知,平菇和杏鲍菇菌落周围均产生明显的透明圈,表明均能分泌淀粉酶,淀粉被降解后遇碘不变蓝。香菇菌落周围全部被染成蓝色,表明该香菇菌株未分泌淀粉酶。EI 均小于 1,平菇和杏鲍菇位于菌落中心及附近的菌丝分泌了淀粉酶,而生长前缘部分则没有分泌,推测菌丝在营养物质被利用到一定程度后才诱导淀粉酶基因的表达。

#### 2.1.3 木质素酶试验

从表 3 可知,平菇、香菇及杏鲍菇均产生变色反应,说明分泌了木质素过氧化物酶,将 RB 亮蓝转变为橙黄色物质。从菌落直径来看,香菇在 PDA-RB 亮蓝培养基上生长缓慢, RB-亮蓝对其生长有一定抑制作用。3 个菌株之间 EI 存在显著性差异,且香菇 EI 最大,预测香菇木质素氧化酶活性最强。

表 2  
Table 2  
淀粉-卢戈氏碘液试验结果  
Results of Lugol's iodine-starch test

菌株 Strains	变色反应 Color reaction	菌落直径 Diameter of colony/mm	变色圈直径 Diameter of colored halo/mm	酶指数 Enzymatic index(ED)
平菇 <i>P. ostreatus</i>	+	85.00±0.02a	41.64±2.87a	0.49±0.03a
香菇 <i>L. edodes</i>	—	56.37±3.50c	—	—
杏鲍菇 <i>P. eryngii</i>	+	74.24±2.29b	26.19±4.18b	0.35±0.06b

表 3  
Table 3  
PDA-RB 亮蓝试验结果  
Results of PDA-RB test

菌株 Strains	变色反应 Color reaction	菌落直径 Diameter of colony/mm	变色圈直径 Diameter of colored halo/mm	酶指数 Enzymatic index(ED)
平菇 <i>P. ostreatus</i>	+	59.25±2.59a	43.70±1.79a	0.74±0.02c
香菇 <i>L. edodes</i>	+	18.53±1.61c	28.11±0.75c	1.25±0.09a
杏鲍菇 <i>P. eryngii</i>	+	47.27±2.15b	33.24±1.35b	0.83±0.02b

由图 1 可知,香菇、杏鲍菇和平菇菌落下方均产生褐色物质,表明香菇、杏鲍菇及平菇均分泌了漆酶。显色区域与菌落大小一致,颜色由深到浅分别为香菇、平菇和杏鲍菇。

由表 4 可知,平菇、香菇及杏鲍菇均能引起变色反应,说明均分泌了锰过氧化物酶,将愈创木酚氧化成为红棕色的四邻甲氧基连酚。从 EI 预测平菇锰过氧化物酶活性最强。

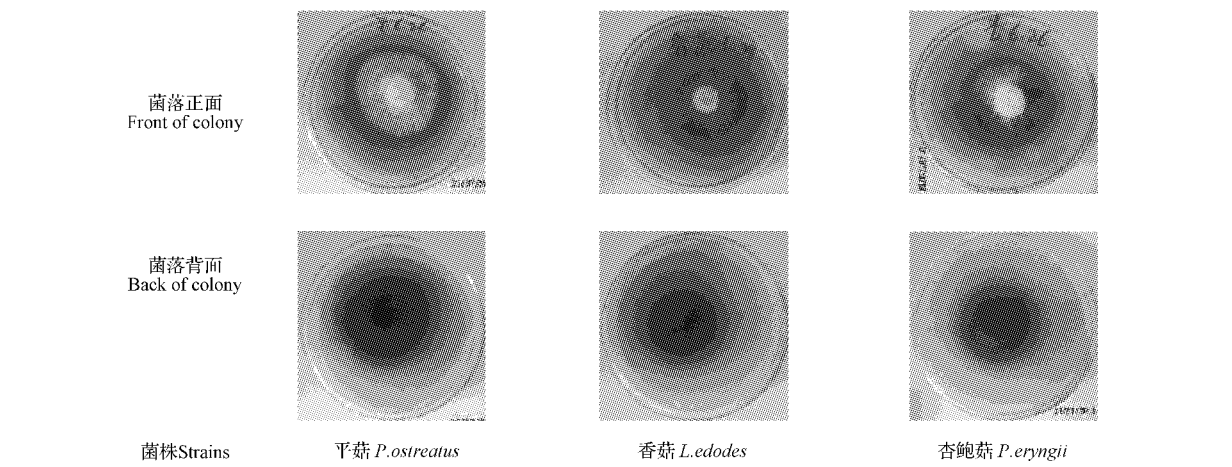


图 1 PDA-单宁酸试验结果  
Fig. 1 Result of PDA-Bavendamm test

表 4  
Table 4  
PDA-愈创木酚试验结果  
Result of PDA-guaiacol test

菌株 Strains	变色反应 Color reaction	菌落直径 Diameter of colony/mm	变色圈直径 Diameter of colored halo/mm	酶指数 Enzymatic index(EI)
平菇 <i>P. ostreatus</i>	+	69.82±4.69a	76.40±5.52a	1.10±0.14a
香菇 <i>L. edodes</i>	+	32.04±2.52c	26.50±2.73c	0.82±0.02b
杏鲍菇 <i>P. eryngii</i>	+	55.76±2.07b	47.44±1.19b	0.85±0.02b

## 2.2 栽培出菇各阶段酶活性测定结果

### 2.2.1 标准曲线绘制结果

图 2 和图 3 分别为葡萄糖标准曲线和麦芽糖标准曲线,  $R^2 > 0.9900$ , 表明标准曲线质量好, 可用于后续酶活性测定。

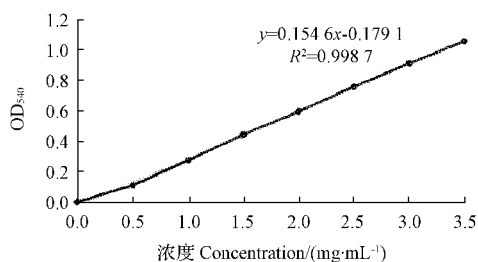


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 Results of glucose standard curve

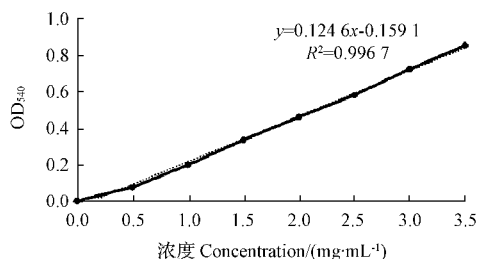


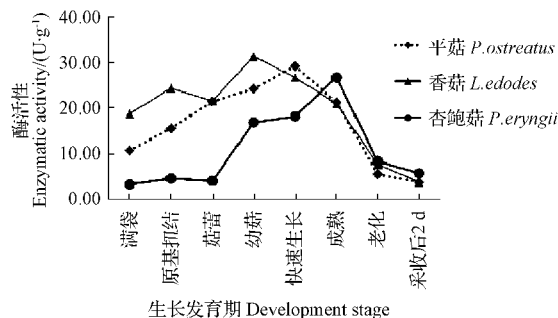
图 3 麦芽糖标准曲线

Fig. 3 Results of maltose standard curve

### 2.2.2 酶活性测定结果

由图 4 可知, 平菇、香菇和杏鲍菇羧甲基纤维素酶活性最大值之间差异不显著 ( $26.00 \sim 32.00 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 但是活性峰出现的时期不一致。香菇在菌丝满袋时已有较高的羧甲基纤维素酶活性, 随着子实体生长发育, 酶活性迅速提高, 在幼菇阶段酶活性达到峰值, 之后缓慢下降, 子实体成熟时仍保持较高水平, 随着子实体老化, 酶活性急剧下降; 平菇羧甲基纤维素酶活性在菌丝生长阶段开始逐渐提高直到幼菇快速生长阶段达到最大值, 随后逐渐下降, 子实体成熟时仍保持较高水平, 随着子实体老化, 酶活性急剧下降; 杏鲍菇羧甲基纤维素酶活性从菇蕾阶段开始升高, 子实体成熟时达到峰值, 随着子实体老化急剧下降。

由图 5 可知, 香菇和杏鲍菇滤纸酶活性变化与子实体形成密切相关。平菇、香菇和杏鲍菇羧甲基纤维素酶活性最大值之间有显著差异



注: 酶活性以 3 个平行试验的平均值 ± 标准差表示, 下同。

Note: The enzyme activity is indicated by the average value of three parallel trials ± standard deviation, the same as below.

图 4 平菇、香菇和杏鲍菇羧甲基纤维素酶活性比较

Fig. 4 CMCase activity variation of *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. eryngii*

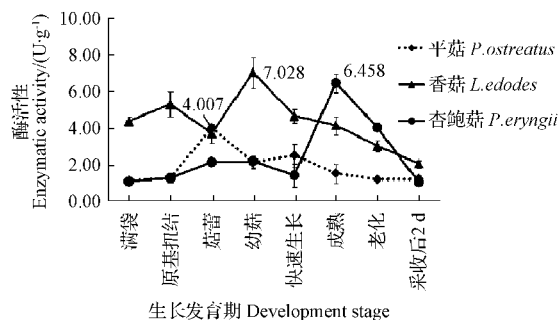


图 5 平菇、香菇和杏鲍菇滤纸酶活性比较

Fig. 5 FPase activity variation of *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. eryngii*

( $4.00 \sim 7.00 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 且活性峰出现的时期不一致。香菇在满袋时已有较高酶活性, 在原基扭结及幼菇形成阶段酶活性分别达到 2 个峰值; 平菇在菇蕾阶段酶活性达到峰值, 随后逐渐下降; 杏鲍菇子实体快速生长时才开始大量分泌淀粉酶, 子实体成熟时达到峰值; 子实体采收后, 3 种腐生食用菌栽培基质中滤纸酶活性均下降至低水平。

由图 6 可知, 杏鲍菇淀粉酶在幼菇快速生长时, 酶活性急剧提高并达到峰值 ( $55.97 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 且一直维持高活性至子实体成熟, 随子实体老化, 酶活性迅速下降; 香菇淀粉酶从幼菇快速生长至成熟时酶活性提高 (峰值为  $17.57 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 子实体成熟后酶活性缓慢下降, 整个阶段酶活性变化不显著; 平菇淀粉酶在整个子实体形成过程中维持在极低水平。

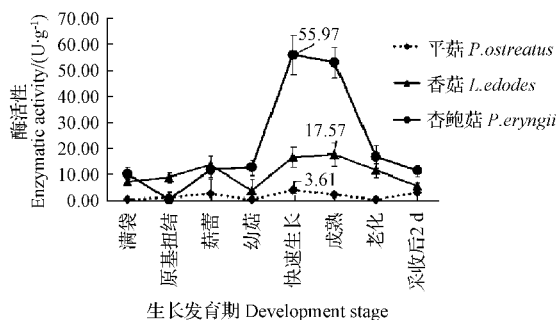


图6 平菇、香菇和杏鲍菇淀粉酶活性比较

Fig. 6 Amylase activity variation of *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. eryngii*

由图7可知,杏鲍菇漆酶在原基扭结到菇蕾形成时期快速积累并达到最大值( $1\,414.27\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ),随后分泌量逐渐减少,直到子实体老化时再次出现另一个酶活性峰值( $1\,109.14\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ );平菇漆酶活性从原基扭结至幼菇形成过程酶活性急剧升高第一个峰值( $1\,208.78\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ),随后酶活性逐渐下降,幼菇快速生长至子实体成熟酶活性又急剧提高到并达到最大值( $1\,635.82\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ),随子实体老化迅速下降;香菇整个栽培过程中仅能测到痕量的漆酶(最高为  $16.11\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ),这与平菇、杏鲍菇具有显著差别。

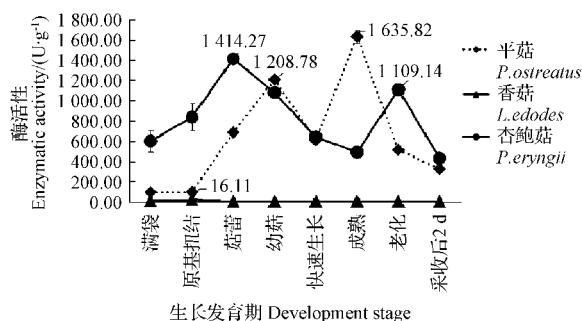


图7 平菇、香菇和杏鲍菇漆酶活性比较

Fig. 7 Laccase activity variation of *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. eryngii*

### 3 结论与讨论

从平板变色圈试验预测平菇 9506 菌株,香菇 L26 菌株和杏鲍菇 PL e-3 菌株均能分泌羧甲基纤维素钠酶、木质素过氧化物酶、漆酶及锰过氧化

物酶;平菇 9506 菌株和杏鲍菇 PL e-3 菌株均能分泌淀粉酶,香菇 L26 菌株不能分泌淀粉酶。从栽培各阶段酶活性定量试验结果发现,3 个菌株在相同培养基及相同培养条件下羧甲基纤维素酶、滤纸酶、淀粉酶及漆酶活性大小及变化规律存在较大差异:①平菇和香菇的羧甲基纤维素钠酶,滤纸酶活性峰值出现在菇蕾形成至幼菇快速生长阶段,杏鲍菇的这 2 种酶的活性峰值却出现在子实体成熟时期,表明其对纤维素的利用晚于平菇和香菇;②杏鲍菇淀粉酶活性在幼菇快速增长阶段开始迅速上升并于子实体成熟阶段达最高值,香菇淀粉酶在整个出菇阶段活性变化相对缓和,平菇则始终维持在极低水平;③杏鲍菇漆酶活性满袋至菇蕾形成阶段均高于平菇,在幼菇快速生长至子实体成熟阶段低于平菇,老化后活性高于平菇;香菇漆酶在整个出菇阶段维持在低水平。

与前人研究相比,①对于香菇而言:该研究中滤纸酶在幼菇阶段达到最大值,之后酶活性逐渐下降,而倪新江等<sup>[13]</sup>的研究发现其活性随子实体生长发育迅速上升;该研究中淀粉酶活性在幼菇期出现回落,这与王伟科等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,而任鹏飞等<sup>[4]</sup>的研究发现其活性在菌丝生长期、转色期至出菇期持续升高;该研究中香菇漆酶活性始终维持在极低水平,而倪新江等<sup>[13]</sup>的研究发现其活性在菌丝生长阶段出现了较高的活性。②对于平菇而言:滤纸酶在该研究中活性峰值出现在菇蕾时期,之后逐渐下降,在刘朝贵等<sup>[3]</sup>研究中第 1 潮中幼菇时期酶活性较子实体成熟时期高,但在第 2 潮菇中,酶活性从原基形成、幼菇期至子实体成熟持续升高;该研究中淀粉酶活性始终维持在低水平,而在刘朝贵等<sup>[3]</sup>研究中菌丝生长至原基形成时期酶活性较高。③对于杏鲍菇而言,该研究中淀粉酶活性峰出现在幼菇期至成熟期之间,而在申挺挺等<sup>[2]</sup>的研究中淀粉酶活性峰出现在菌丝生长阶段。上述差异可能源于物种、菌株、培养基配方及培养条件等各方面的差异。

该研究中平板变色圈法未检出香菇的淀粉酶,在栽培出菇阶段却检出,说明在胞外酶研究工作中,平板变色圈法结果需通过其它手段进一步验证。推测 PDA-可溶性淀粉培养基中营养物质相对充足,缺乏诱导淀粉酶基因表达的有效条件。

## 参考文献

- [1] 黄毅. 食用菌工厂化栽培实践[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2014.
- [2] 申挺挺. 杏鲍菇、白灵菇对芦笋老茎的分解利用研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [3] 刘朝贵, 高金权, 李成琼. 糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)降解转化稻草秸秆研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(2): 258-263.
- [4] 任鹏飞, 任海霞, 曲玲, 等. 香菇胞外酶活性变化及其与农艺性状的相关性分析[J]. 山东农业科学, 2010(12): 11-14.
- [5] FLORENCIO C, COURI S, FARINAS C S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains[J]. Enzyme Research, 2012: 793708.
- [6] 蒋琼凤, 张金金, 周斌, 等. 一株产纤维素酶真菌的筛选和诱变[J]. 湖南农业科学, 2010(11): 24-27.
- [7] 高峰, 许欣景, 何明霞, 等. 继代次数对暗褐网柄牛肝菌菌种活性的影响[J]. 食用菌学报, 2016, 23(2): 44-48.
- [8] 杜海萍, 宋瑞清, 王钰祺. 几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J]. 林业科技, 2006(4): 24-28.
- [9] 黄年来, 林志彬, 陈国良. 中国食药食用菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010.
- [10] QB 2583-2003. 纤维素酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [11] 王玉万, 王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物学通报, 1989, 16(3): 137-140.
- [12] 张鹏. 以 ABTS 为底物测定漆酶活力的方法[J]. 印染助剂, 2007(7): 46-48.
- [13] 倪新江, 潘迎捷, 冯志勇, 等. 香菇生长过程中几种胞外酶活性的变化规律[J]. 食用菌学报, 1995, 2(4): 22-27.
- [14] 王伟科, 陆娜, 周祖法, 等. 8 种胞外酶在香菇不同生长阶段的活性变化[J]. 浙江农业科学, 2014(4): 498-501.

## Type and Activity Variation of Extracellular Enzymes of *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*

GAO Feng, CAO Yang, HE Mingxia, LIU Jing, FANG Yiwei, ZHANG Chunxia  
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100)

**Abstract:** To compare the degradation ability of cellulose, lignin and starch with different saprophytic edible fungi, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* were used as representative. Several discolored halo tests were used for qualitative detection of the related extracellular enzymes. The fruiting tests were carried out in a matrix consisting of 36% wood slag, 43% sawdust, 20% bran, 1% sucrose, 58%—60% moisture, pH 6.6. The activity variations of four representative extracellular enzymes in the process of mycelium vegetative growth and fruiting body development were detected by spectrophotometer. The results showed that based on discolored halo tests, Lignin peroxidase (LiP), Laccase and Manganese peroxidase (MnP) were detected in *P. ostreatus*, *L. edodes* and *P. eryngii*; amylase was detected in *P. ostreatus* and *P. eryngii* except in *L. edodes*. In the process of mycelium vegetative growth and fruiting body development, the activity variations of different types of extracellular enzymes were different in the same mushroom strain, while activity variation for a specific enzyme varied among different mushroom species. For *P. eryngii*, the activities of CMCase, FPase and amylase were positively correlated with the development of fruiting bodies, and the peaks of enzyme activity appeared in the phase of rapid growth of fruiting body or fruiting body maturity. The activity of laccase reached a relatively high level in mycelium vegetative growth phase, reached a peak in the phase of primordial formation, then decreased gradually from the phase of the young fruiting body to fruiting body maturity, finally it reached another peak in the phase of fruiting body aging. According to the enzymatic activity, it speculated that *P. eryngii* preferentially degrades lignin, not cellulose or starch in matrix. For *P. ostreatus*, CMCase and laccase activities were positively correlated with the

doi:10.11937/bfyy.20171583

# 柳叶黄酮提取纯化及其生物活性研究进展

赵二劳, 闫慧云, 高子怡, 王桂林

(忻州师范学院 化学系, 山西 忻州 034000)

**摘要:**黄酮是一类具有多种生物活性的天然功能成分,在食品、医药、保健品等领域应用广泛。该研究综述了柳叶中黄酮提取纯化及其生物活性在我国的研究进展,以期为进一步研究、开发应用提供参考依据。

**关键词:**柳叶;黄酮;提取;纯化;生物活性

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0206-05

柳树叶为垂柳或旱柳的叶,简称柳叶,为常用中药。《本草纲目》记载,柳为本经下品,其性苦寒,无毒,可治风水黄疸、疮痈肿毒、炎热淋疾等症<sup>[1]</sup>。民间常食用柳叶以清热、利胆和明目<sup>[2]</sup>,常采集柳叶(芽)治疗口腔溃疡<sup>[3]</sup>,也有用柳叶泡水治疗脚癣的做法<sup>[4]</sup>。现代临床上还将其用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、慢性气管炎和烧烫伤等<sup>[5]</sup>。许多研究<sup>[6-9]</sup>已表明,柳叶中含有黄酮类成分,具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗病毒、抑菌、降血糖、降血脂等多种功能活性。我国柳叶资源丰

富,提取柳叶中黄酮具有得天独厚的资源优势,一方面,柳叶黄酮的诸多功能活性决定了其具有极大的市场应用潜力;另一方面,从柳叶中提取黄酮类成分具有良好的社会意义、环境效益和经济价值,因此,研究柳叶黄酮的提取纯化极具实际意义。但目前,我国柳叶黄酮的研究开发尚处于初级阶段,如何最大限度的提高柳叶黄酮的提取率,有效利用柳叶黄酮,是非常值得研究的问题。为此,该研究综述了柳叶中黄酮提取纯化及其功能活性在我国的研究进展,以期对相关领域研究人员对柳叶黄酮的深入研究提供参考,同时为柳叶黄酮的综合利用和深度开发提供参考依据。

**第一作者简介:**赵二劳(1952-),男,山西原平人,本科,教授,研究方向为天然产物化学。E-mail: zel0350@sina.com.

**基金项目:**国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201610124001);山西省高等学校大学生创新创业训练计划资助项目(2016381);忻州师范学院化学化工创新基地资助项目(2017)。

**收稿日期:**2017-07-14

## 1 柳叶中黄酮的提取技术

### 1.1 乙醇溶剂回流提取

乙醇溶剂回流提取是天然产物活性功能成分提取的一种常用方法,为防止提取过程中加热导

process of fruiting body development, and their activities peaks appeared in the phase of fruiting body rapidly growth and fruiting body maturity respectively. FPase and amylase activities maintained a low level at all phases. For *L. edodes*, the activities of CMCase and FPase were maintained a relatively high level in the phase of mycelial vegetative growth, the activities peaks appeared in the early phase of the young mushroom, then decreased gradually. The activity of amylase was not closely related to the formation of fruiting body and remained at a low level. Laccase activity was almost undetectable at all phases.

**Keywords:** *Lentinus edodes*; *Pleurotus eryngii*; *Pleurotus ostreatus*; CMCase; FPase; amylase; laccase