

# 不同碳、氮源营养对秀珍菇菌丝体生长及其胞外酶活性的影响

李守勉, 李明, 田景花, 李伟平

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**以“秀丽1号”秀珍菇为试材,研究了不同碳、氮源对秀珍菇菌丝生长及菌丝分泌的胞外酶活性的影响。结果表明:以麦芽糖为碳源、以酵母浸膏为氮源时,菌丝生长速度最快,生长势最旺盛,胞外酶活性较高。

**关键词:**秀珍菇;碳氮源;菌丝生长;胞外酶活性

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0143-03

秀珍菇(*Pleurotus geesteranus* Singer)属真菌门(Eu-mycota)担子菌纲(Basidiomycete)伞菌目(Agaricales)侧耳科(Pleurotaceae)侧耳属(*Pleurotus*)<sup>[1]</sup>,味道鲜美,纤维含量少,富含氨基酸及多种矿质元素,有“味精菇”的美誉。秀珍菇菌丝在生长发育中以分解木质素和纤维素作为主要碳素营养,以微生物代谢中产生的木质素酶及纤维素酶为催化剂,在常温常压下把复杂的不溶性聚合物转化为水溶性的简单有机物。由于秀珍菇等木腐菌具有自身合成木质素酶和纤维素酶的能力,而且菌丝分泌胞外木质素及纤维素酶的能力与培养基中碳、氮营养

水平有关。因此,深入研究秀珍菇菌丝生长及胞外木质素酶的活性,不仅对开发自然界丰富的木质素资源具有重要意义,而且是研究秀珍菇菌生长发育的基础。该试验系统研究了培养基中不同的碳、氮源营养因子对秀珍菇菌丝合成纤维素酶及木质素酶能力的影响,旨在确定最佳的碳、氮源,为进一步的生理生化研究和新品种选育中筛选高酶活菌株提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株“秀丽1号”秀珍菇引自武汉新宇食用菌研究所。供试培养基:PDA培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL;基础培养基:葡萄糖2 g、蛋白胨1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g、VB<sub>6</sub> 0.001 g、琼脂粉2 g、蒸馏水100 mL。

### 1.2 试验方法

1.2.1 不同碳源对菌丝生长的影响 分别用相同碳素

**第一作者简介:**李守勉(1978-),女,河北泊头人,博士研究生,讲师,现主要从事食用菌等教学与科研工作。E-mail: yylsm@hebau.edu.cn.

**基金项目:**河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队资助项目。

**收稿日期:**2013-10-24

## Effect of Environmental Factors on Agronomic Characters of *Pleurotus eryngii*

HUANG Liang<sup>1</sup>, YANG Li-wei<sup>2</sup>, BAN Li-tong<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, ZHENG Jian-long<sup>1</sup>, CHEN Qi-yong<sup>3</sup>

(1. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. Tianjin Research Institute for Forestry and Pomology, Tianjin 300112; 3. Tianjin Lvshengpengyuan of Agricultural Science and Technology Development Limited Company, Tianjin 300400)

**Abstract:** Taking *Hypsizygus marmoreus* as material, the yield of *Hypsizygus marmoreus* on the first, the third and the sixth shelf which were different on the temperature, relative humidity, light intensity and the density of CO<sub>2</sub> was compared. The results showed that the *Hypsizygus marmoreus* on the sixth shelf grew the best, the yield of single bottle was 168.85 g and the biological conversion reached 65.96%. It was concluded that accurate environment factors, that was temperature 15.3°C, relative humidity 89.5%, light intensity 870 lx, the density of CO<sub>2</sub> 2 029 mg/kg could improve the biological conversion of *Hypsizygus marmoreus* significantly.

**Key words:** *Hypsizygus marmoreus*; agronomic characters; biological conversion; industrial culture

含量的蔗糖、乳糖、D-果糖、可溶性淀粉、麦芽糖代替基础培养基中的葡萄糖。每种碳源处理使用 3 个直径 9 cm 的培养皿,培养基 30 mL。每皿接入活化的 8 mm 菌丝圆片,置于 24℃ 恒温培养箱中黑暗培养,每处理 3 次重复。当有一个处理的菌丝长满培养皿时,结束全部培养,记录菌丝生长半径,观察菌丝长势。

1.2.2 不同氮源对菌丝生长的影响 分别用相同氮素含量的酵母浸膏、氯化铵、硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾、乙酸铵、尿素代替基础培养基中的蛋白胨。每处理 3 次重复,试验步骤同 1.2.1。

1.2.3 粗酶液的制备 进行不同碳、氮源对菌丝生长影响试验的同时,去掉各处理培养基中的琼脂,制成液体培养基放入 150 mL 三角瓶中,注入培养基 30 mL,常规灭菌后,接种活化的 8 mm 菌丝圆片,25℃ 下恒温静置培养。培养 9 d 后,将菌丝体去掉,混合培养液,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即为粗酶液。酶活力以每毫升样品与底物反应 30 min 内改变 0.1 个光密度值为 1 个活力

表 1 漆酶、多酚氧化酶及愈创木酚氧化酶测定

Table 1 Measured method of enzyme activity about laccase, catechol oxidase and guaiaol oxidase

酶 Enzyme	反应底物 Reactant	缓冲液 Buffer	粗酶液 Crude enzyme/mL	测定波长 Measured wave/nm
多酚氧化酶	2.0 mL, 0.1 M 邻苯二酚	2.0 mL, 0.05 M, pH 6.0 磷酸盐缓冲液	0.1	400
漆酶	0.5 mL, 3.36 mM 邻联甲苯胺	3.4 mL, 0.1 M, pH 4.6 醋酸盐缓冲液	0.1	600
愈创木酚酶	0.5 mL, 80 mM 愈创木酚	2.0 mL, 0.05 M, pH 6.0 磷酸盐缓冲液	0.1	490

### 1.3 数据分析

试验数据通过 SPSS 软件作方差分析,进行显著性测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源对秀珍菇菌丝生长及其胞外酶分泌的影响

2.1.1 不同碳源对秀珍菇菌丝生长的影响 由表 2 可知,不同碳源对秀珍菇菌丝生长速度及长势的影响存在显著差异。以 D-果糖及麦芽糖为碳源时,菌丝生长速度最快,极显著大于其它碳源,但二者之间无显著差异。乳糖为碳源时菌丝生长速度最慢,显著低于其它处理。以蔗糖及可溶性淀粉为碳源的菌丝生长速度居中,且这

表 2 不同碳源对秀珍菇菌丝生长的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on mycelial growth of *Pleurotus geesteranus*

碳源 Carbon source	菌丝平均生长速度 Mycelial average growth rate/mm · d <sup>-1</sup>	菌丝长势 Mycelial vigour	羧甲基纤维素酶活性 CMCase activity /U	半纤维素酶活性 Hemicellulase activity/U	淀粉酶活性 Distase activity /U	漆酶活性 Laccase activity /U	愈创木酚酶活性 Guaiauloxidase activity/U	多酚氧化酶活性 Catecholoxidase activity/U
D-果糖 Fructose	4.91aA	++	19.73aA	18.80aA	19.80aA	38.93bAB	43.73bB	8.67aA
麦芽糖 Maltose	4.89aA	+++	12.80bB	12.93bB	13.67bB	42.13aA	60.80aA	7.33bB
蔗糖 Sucrose	4.17bB	++	0	2.20dD	0	35.33cB	43.87bB	6.77cC
可溶性淀粉 Solube starch	4.06bB	+++	8.87cB	9.40cC	11.33bB	40.23abA	62.17aA	7.20bB
乳糖 Lactose	1.52cC	+	2.27dC	12.53bBC	6.60cC	30.67dC	20.50cC	3.70dD

### 2.2 不同氮源对秀珍菇菌丝生长及其胞外酶分泌的影响

2.2.1 不同氮源对秀珍菇菌丝生长的影响 从表 3 可以看出,菌丝对氮源的利用具有选择性。酵母浸膏是秀珍菇菌丝生长较好氮源,其对菌丝长势及长速的作用显

单位,每处理 3 次重复。

1.2.4 羧甲基纤维素酶(CMC)活性测定 在试管中加入 0.5%的羧甲基纤维素钠溶液(用 pH 4.6, 0.1 M 醋酸盐缓冲液配制)1.5 mL<sup>[2-3]</sup>,加稀释 10 倍的粗酶液 0.5 mL,50℃ 水浴保温 30 min,取出后立即加入 DNS 试剂<sup>[4]</sup>1.5 mL,煮沸 5 min,取出并冷却后加入 21.5 mL 蒸馏水混匀,UV-2001 紫外分光光度计测 520 nm 处的 OD 值;以煮沸灭活 15 min 的酶液作对照,每处理 3 次重复。

1.2.5 半纤维素酶活性测定 在试管中加入 0.5%的木聚糖溶液(用 pH 4.6, 0.1 M 醋酸盐缓冲液配制)1.5 mL<sup>[2-3]</sup>,加稀释 10 倍的粗酶液 0.5 mL,50℃ 水浴保温 30 min,试验步骤同 1.2.4。

1.2.6 漆酶活性、多酚氧化酶活性及愈创木酚酶活性的测定 具体测定方法按表 1 设置,在 28℃ 恒温水浴中保温 30 min 后,利用紫外分光光度计测定光密度值<sup>[5]</sup>。

2 个处理之间无显著差异。从菌丝长势上看,以麦芽糖和可溶性淀粉为碳源时,菌丝生长势最好,优于其它处理,表现为健壮、洁白、菌落完整、边缘整齐。D-果糖、蔗糖作碳源次之,能形成完整的菌落。以乳糖培养的菌丝生长最差,菌落边缘不整齐、菌丝纤细。

2.1.2 不同碳源对秀珍菇菌丝胞外酶分泌的影响 从表 2 可以看出,利用不同碳源培养秀珍菇菌丝时,各种胞外酶活性存在显著差异,D-果糖和麦芽糖作碳源时,6 种酶活性均能达到较高值。以蔗糖作碳源时,羧甲基纤维素酶和淀粉酶的活性检测不到。但 5 种碳源处理均能得到较高的漆酶活性和愈创木酚酶活性。

著高于其它氮源。以尿素作氮源,菌丝不萌发。在硝酸钾和硝酸铵作氮源培养时,菌丝生长速度虽然稍慢于酵母浸膏,但是菌丝密度小,生长稀疏,长势明显不良。

2.2.2 不同氮源对秀珍菇菌丝胞外酶分泌的影响 从表 3 可以看出,以 6 种氮源分别作培养基时,均表现出一

表 3

不同氮源对秀珍菇菌丝生长的影响

Table 3

Effects of different nitrogen sources on mycelial growth of *Pleurotus geesteranus*

氮源 Nitrogen source	菌丝平均生长速度 Mycelial average growth rate/mm · d <sup>-1</sup>	菌丝长势 Mycelial vigour	羧甲基纤维素酶活性 CMCase activity /U	半纤维素酶活性 Hemicellulase activity/U	淀粉酶活性 Distase activity /U	漆酶活性 Laccase activity /U	愈创木酚酶活性 Guaiacoloxidase activity/U	多酚氧化酶活性 Catecholoxidase activity/U
酵母浸膏 Yeast extract	4.93aA	+++	17.27aA	16.53aA	11.73aA	13.10aA	4.53aA	5.43aA
硝酸钾 KNO <sub>3</sub>	4.00bB	+	11.80bB	10.33bB	3.93cBC	5.33dC	1.90cC	1.57cB
硝酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.67bB	+	11.07bB	11.80bB	6.73bB	9.53cB	1.93cC	1.33cBC
硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.44cC	++	6.87cC	6.67cC	6.60bB	11.87bA	1.70cC	1.00dC
氯化铵 NH <sub>4</sub> Cl	2.39cC	++	2.87dD	4.87cdC	2.60cC	5.77dC	0.83dD	0.53eD
尿素 Urea	0.00dD	+	4.53cdCD	4.20dC	2.27cC	2.83dD	2.73bB	5.13bA

定的酶活性,但存在很大差异。以酵母浸膏作培养基氮源时,各种酶活均达到较高值,尤其在木质素酶的分泌中显著高于其它氮源。

### 3 结论与讨论

目前,秀珍菇作为一种全国栽培量渐增的新兴食用菌,其生物学特性的研究在我国尚鲜见报道。该试验研究表明,秀珍菇菌丝生长的最适碳源是麦芽糖。以D-果糖作碳源时,菌丝生长速度较快,但长势较弱;可溶性淀粉作碳源时,菌丝生长势较强,但生长速度稍慢于麦芽糖,因此二者均不宜作秀珍菇的碳源。

在秀珍菇菌丝生长氮源试验中,无论从菌丝长势还是长速方面,酵母浸膏都是最适氮源。以硝酸钾和硝酸铵为氮源时,生长速度较快,但生长势较弱,因此不宜作秀珍菇的氮源。以尿素为氮源时,菌丝不萌发,这和冯志勇等<sup>[1]</sup>研究结果相一致。秀珍菇菌丝对氮源的利用情况和一般菇类有相似之处,有机态氮如酵母浸膏有利于菌丝的生长,其作用显著优于无机态氮。无机氮源中,硝态氮的利用优于铵态氮。酵母膏等有机氮源富含各种氨基酸,这些氨基酸可直接被菌丝吸收利用。因而,使用这类多组分复合氮源时,秀珍菇菌丝生长快,长势较强。在使用无机氮源时,菌丝必须利用无机氮合成其需要的各种氨基酸,而某些氨基酸几乎不能或完全不能生物合成,从而影响菌丝的生长速度和长势<sup>[6]</sup>。因此,虽然秀珍菇能利用无机氮源,但生长缓慢。

无论以何种碳源作培养基,均可产生较高的漆酶和愈创木酚酶活性。漆酶、愈创木酚酶和多酚氧化酶是降解木质素时分泌的几种酶类,在碳源代谢中起着重要的

作用。而多酚氧化酶的活性较低,说明其和漆酶、愈创木酚酶的作用机理不同。在以可溶性淀粉和麦芽糖作碳源时,漆酶和愈创木酚酶的活性较高。而可溶性淀粉作碳源时,纤维素酶、半纤维素酶和淀粉酶的活性并不高,这和有关报道<sup>[7-8]</sup>称淀粉含量丰富的物质作碳源有利于木质素降解的分泌,而不利纤维素酶和半纤维素酶的分泌有较大的相似性。果糖作碳源时,纤维素酶、半纤维素酶和淀粉酶活性均能得到较高值。

在氮源试验中,以酵母浸膏作氮源时,各种酶活性均能达到最高值。另外硝酸铵、硝酸钾也较利于纤维素酶的分泌;利于漆酶分泌的是酵母浸膏、硫酸铵和硝酸铵。产生差异的原因可能和菌株的特性及供试氮源的范围有一定的关系。

### 参考文献

- [1] 冯志勇,王志强,郭力刚,等. 秀珍菇生物学特性研究[J]. 食用菌学报,2003,10(3):11-16.
- [2] 王玉万,王云. 培养温度和侧耳子实体形成对胞外纤维素分解酶活性的影响[J]. 微生物学通报,1991,18(1):9-11.
- [3] 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.
- [4] 张龙庭. 生化实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社,1983.
- [5] 潘迎捷. 香菇菌丝生长众多酚氧化酶的动态变化[J]. 食用菌,1990(3):4-6.
- [6] 郭向华,王海旺,王永庄,等. 姬松茸的碳氮营养源研究[J]. 食用菌,2002(6):20-21.
- [7] 王宜磊. 碳源和氮源对彩绒革盖菌 *Coriolus versicolor* 木质纤维素酶和木质素酶分泌的影响[J]. 微生物学杂志,2000,20(1):29-31.
- [8] 吴坤,朱显峰,张世敏,等. 杂色云芝产漆酶的发酵条件研究[J]. 菌物系统,2001,20(2):207-213.

## Effects of Carbon and Nitrogen Nutrient on Mycelial Growth and Extracellular Enzyme Activity in *Pleurotus Geesteranus*

LI Shou-mian, LI Ming, TIAN Jing-hua, LI Wei-ping

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** Taking 'Xiuli No. 1' *Pleurotus geesteranus* as material, the effect of different carbon and nitrogen sources on the mycelial growth and extracellular enzyme activity of *Pleurotus geesteranus* were studied. The results showed that *Pleurotus geesteranus* had the highest mycelial growth rate, the strongest mycelial growth vigor and higher extracellular enzyme activity for maltose as carbon, yeast extract as nitrogen source.

**Key words:** *Pleurotus geesteranus*; carbon and nitrogen sources; mycelial growth; extracellular enzyme activity