

洛巴伊大口蘑对栽培基质的降解及其相关胞外酶活性变化

初 洋, 董新伟, 倪新江, 赵金良

(烟台大学 生命科学院, 山东 烟台 264005)

摘 要:以洛巴伊大口蘑为试材, 采用袋栽方法, 测定了洛巴伊大口蘑在棉籽壳培养基上生长期间栽培基质的降解及其相关胞外酶活性变化, 以了解洛巴伊大口蘑对碳源的降解利用特点。结果表明: 洛巴伊大口蘑具有完整的胞外纤维素酶系; 淀粉酶在菌丝生长阶段活性较高; 羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶和半纤维素酶的活性与纤维素和半纤维素的降解速率呈正相关, 但 β -葡萄糖苷酶活性与纤维素的降解速率没有相关性, 漆酶和过氧化物酶活性与木质素的降解速率没有相关性; 洛巴伊大口蘑具有很强的木质素降解能力, 属于白腐菌; 非木质纤维素主要在菌丝生长阶段被利用, 木质纤维素是子实体生长发育阶段的主要碳源; 在 107 d 的栽培过程中, 培养基失重 52.40%, 其中呼吸消耗 43.98%, 子实体转化率为 8.42%。

关键词:胞外酶; 洛巴伊大口蘑; 基质降解

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章标号:**1001-0009(2014)06-0147-03

洛巴伊大口蘑(*Tricholoma lobayense*)属于高温型草腐菌, 又称为金福菇, 菌肉肥厚嫩白, 味微甜而鲜美, 营养丰富, 耐储性好, 在我国南方及台湾省均有小面积栽培, 是一种正处于开发中的珍稀食用菌。近年来, 有关洛巴伊大口蘑的报道多集中在生物学特性和栽培方面, 而有关洛巴伊大口蘑在 2 潮菇生长期间对栽培基质的降解与其相关胞外酶活性的关系缺少系统研究。由于与非发酵料相比, 发酵料更适合洛巴伊大口蘑生长, 该试验以发酵棉籽壳为主料, 采用袋栽方法, 研究洛巴伊大口蘑对大分子碳源的利用特点, 为提高栽培技术以及合理利用食用菌菌渣等提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

洛巴伊大口蘑引自山东省单县高港食用菌有限公司的商品化菌种。

羧甲基纤维素钠、木聚糖、果胶和半乳糖醛酸为 Sigma 公司产品, 其它多为国产分析纯。

1.2 试验方法

用 650 mL 水将发酵棉籽壳(棉籽壳用 2%石灰水拌

匀, 发酵 5 d 后晒干)415 g, 麸皮 75 g, 石膏 5 g, 葡萄糖 5 g 拌匀, 装入 17 cm×40 cm 的聚丙烯塑料袋中, 121℃ 灭菌 2 h, 采用 2 头接种法接入棉籽壳原种核桃大小, 25℃ 恒温培养, 菌丝满袋后, 继续培养 7 d, 促进菌丝长透, 然后将菌袋直立, 覆草炭土约 4 cm, 温度控制在 24~28℃, 湿度 85%~95%, 按常规方法进行出菇管理。

1.3 项目测定

1.3.1 粗酶液的制备 在不同生长发育期, 分别取 3 个菌袋, 将培养物取出后, 每袋多点取样 2 份, 每份湿重 7 g, 然后把从 3 袋中取出的样品(21 g)混匀, 共得 2 份样品。一份样品加 100 mL 超纯水, 20℃ 浸提 4 h, 4 层纱布过滤后, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液; 另一份样品在 80℃ 恒温箱中烘至恒重, 用于计算酶活力单位。

1.3.2 酶活性的测定方法 羧甲基纤维素酶(CMC)、滤纸纤维素酶(FP)参照文献[1]的方法; 淀粉酶参照文献[2]的方法; β -葡萄糖苷酶、半纤维素酶(HC)、漆酶和过氧化物酶分别参照文献[3-6]的方法。FP 酶活力单位为 1 U=1 mg 葡萄糖/(60min·g 干培养物); CMC 酶、 β -葡萄糖苷酶和淀粉酶活力单位均为 1 U=1 mg 葡萄糖/(30min·g 干培养物); 半纤维素酶活力单位为 1 U=1 mg 木糖/(30min·g 干培养物); 漆酶活力单位为 1 g 干培养物中的酶量每分钟使 OD₆₀₀ 值改变 0.01 为 1 个活力单位; 过氧化物酶活力单位为 1 g 干培养物中的酶量每分钟使 OD₄₇₀ 值改变 0.01 为 1 个活力单位。15 d(菌

第一作者简介:初洋(1972-), 男, 硕士, 高级实验师, 现主要从事食用菌栽培与生理生化等研究工作。

责任作者:倪新江(1955-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事食用菌营养生理等研究工作。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2010CM022)。

收稿日期:2013-12-18

丝长至约 1/3 袋)、26 d(菌丝长至约 2/3 袋)、36 d(菌丝平均满袋)、59 d(原基形成期)、68 d(头潮菇幼菇期)、73 d(头潮菇开伞期)、83 d(菇潮间期)、93 d(2 潮菇原基期)、101 d(2 潮菇幼菇期)和 107 d(2 潮菇开伞期)。

1.3.3 组分分析和计算方法 纤维素、半纤维素和木质素的含量测定参照文献[7]的方法;培养基失重、纤维素、半纤维素和木质素的减少、呼吸消耗按文献[8]的方法;绝对生物学效率按文献[9]的方法。组分分析取样时间为 0、36、59、73、93、107 d。

2 结果与分析

2.1 胞外酶活性变化

2.1.1 纤维素酶活性变化 由表 1 可知,洛巴伊大口蘑的胞外 CMC 和 FP 活性变化趋势大致相同,即在菌丝生长期和菇潮间期,这 2 种酶活性均较低,在头潮菇子实

体生长发育期和 2 潮菇子实体生长发育期酶活性均较高,并有酶活性高峰出现。在整个栽培过程中, β -葡萄糖苷酶活性有时较大,有时较小,但没有明显的活性高峰出现。

2.1.2 HC 和淀粉酶活性变化 由表 1 可知,HC 活性高峰对应于子实体生长发育期,酶活性变化趋势与 CMC 大致相同。在菌丝生长阶段,淀粉酶活性较高,随着栽培时间的延长,淀粉酶活性逐渐下降。

2.1.3 木质素酶活性变化 由表 1 可知,在菌丝生长阶段,漆酶活性较高,在头潮菇幼菇期,漆酶出现低谷,但总体上,随着栽培时间的延长,漆酶活性呈逐渐下降趋势。在菌丝生长阶段,过氧化物酶活性较高,头潮菇子实体成熟时,酶活性明显下降,在菇潮间期,过氧化物酶活消失。

表 1 洛巴伊大口蘑不同生长发育期胞外酶活性

Table 1 Activity of extracellular enzymes from *Tricholoma lobayense* cultivated on the cottonseed shell medium during growth period

培养时间 Culture time/d	CMC 活性 CMCase activity	FP 活性 FPase activity	β -葡萄糖苷酶活性 β -glucosidase activity	HC 活性 HCCase activity	淀粉酶活性 Amylase activity	漆酶活性 Laccase activity	过氧化物酶活性 Pectase activity
15	4.38±0.37	0.82±0.17	2.18±0.24	5.40±0.51	7.95±0.34	11.61±0.37	23.65±1.69
26	3.64±0.35	1.53±0.15	1.68±0.15	5.36±0.27	6.60±0.32	13.33±0.55	15.62±0.70
36	2.50±0.36	1.98±0.21	2.07±0.14	3.83±0.29	6.58±0.33	15.44±0.43	14.62±0.88
59	2.42±0.23	1.13±0.15	1.43±0.25	4.06±0.22	5.89±0.26	11.42±0.28	29.90±1.86
68	4.46±0.31	2.20±0.27	1.61±0.23	12.68±0.52	6.58±0.34	3.69±0.19	8.27±0.46
73	8.78±0.39	3.59±0.28	1.23±0.19	28.69±1.39	4.45±0.24	10.00±0.39	2.51±0.22
83	4.32±0.36	1.19±0.17	1.70±0.14	12.40±0.42	3.87±0.20	6.23±0.52	0
93	3.89±0.24	1.12±0.24	1.51±0.15	9.36±0.61	4.62±0.27	7.55±0.39	0
101	9.61±0.48	2.47±0.18	1.73±0.22	12.77±0.64	2.99±0.28	6.44±0.34	0
107	7.84±0.41	2.11±0.22	1.49±0.17	19.43±0.97	3.34±0.30	5.37±0.23	0

2.2 培养基失重、呼吸消耗和绝对生物学效率

从表 2 可以看出,洛巴伊大口蘑经过 107 d 的栽培过程,培养基失重 52.40%,其中呼吸消耗 43.98%,子实体转化率为 8.42%。

表 2 洛巴伊大口蘑不同生长发育期
纤维素、半纤维素和木质素的降解

Table 2 Degradation of cellulose, hemicellulose and lignin from *Tricholoma lobayense* cultivated on the cottonseed shell medium during growth period

	发育时期/d					
	0	36	59	73	93	107
培养基干重/g	442.26	402.13	375.95	282.72	262.61	210.52
培养基失重/g	0	40.13	66.31	159.54	179.65	231.74
培养基失重/%	0	9.07	14.99	36.07	40.62	52.40
呼吸消耗/%	0	9.07	14.99	30.38	34.93	43.98
绝对生物学效率/%	0	0	0	5.69	5.69	8.42
纤维素含量/%	30.42	32.53	34.26	31.85	31.94	29.38
纤维素减少/g	0	3.72	5.74	44.49	50.66	72.68
纤维素减少/%	0	2.77	4.26	33.07	37.65	54.03
半纤维素含量/%	22.12	23.78	24.87	23.53	23.51	20.54
半纤维素减少/g	0	2.20	4.33	31.30	36.09	54.59
半纤维素减少/%	0	2.25	4.43	32.00	36.89	55.80
木质素含量/%	18.21	17.43	15.74	14.16	12.72	12.34
木质素减少/g	0	10.45	21.36	40.50	47.13	54.56
木质素减少/%	0	12.97	26.52	50.29	58.52	67.74

2.3 纤维素、半纤维素和木质素的降解

从表 2 可以看出,洛巴伊大口蘑能够利用木质纤维素复合体中的全部组分,在栽培结束,纤维素降解了 54.03%,半纤维素降解了 55.80%,木质素降解了 67.74%,木质素的降解速率明显快于纤维素和半纤维素。子实体生长阶段(59~107 d)的纤维素和半纤维素降解速率远远快于菌丝生长阶段(0~59 d)。子实体生长阶段的木质素降解速率比菌丝生长阶段快。根据表 2 可以计算出,在菌丝生长阶段,木质纤维素共降解了 31.43 g,培养基失重 66.31 g,木质纤维素降解量与培养基失重的比值为 47.40%;在子实体生长阶段,木质纤维素共降解了 150.40 g,培养基失重 165.43 g,木质纤维素降解量与培养基失重的比值为 90.91%。

3 讨论

在栽培过程中,洛巴伊大口蘑能够分泌多种胞外酶,具有完整的胞外纤维素酶系。这与黄伞等食用菌相似^[10],这是洛巴伊大口蘑分解利用纤维素、半纤维素、木质素和淀粉等大分子碳源的物质基础。

在菌丝生长阶段,木质纤维素降解量远远小于培养基失重量。这说明,淀粉等非木质纤维素组分主要在菌

丝生长阶段被利用,这与淀粉酶在这一时期活性较高的结果吻合,并进一步印证,“在所有添加麦麸等辅料用于人工栽培的食用菌中,菌丝生长发育所需要的主要营养来自非木质纤维素组分”。在子实体生长阶段,CMC、FP和HC均具有活性高峰,这与纤维素和半纤维素的降解主要出现在这一生长时期的结果吻合。在子实体生长阶段,木质纤维素降解量与培养基失重的比值大于90%,这进一步表明,木质纤维素是子实体生长发育过程中的主要碳源。漆酶和过氧化物酶是降解木质素的酶。在子实体生长阶段,漆酶和过氧化物酶活性均比菌丝生长阶段低,并且在菇潮间期过氧化物酶活性消失,而洛巴伊大口蘑在这一阶段对木质素的降解速率却高于菌丝生长阶段,其机理尚不清楚。洛巴伊大口蘑菌丝细胞分解的有机物大都通过呼吸作用排出体外,生物学效率比同为草腐菌的巴西蘑菇高^[9],比鸡腿菇低得多^[11],在已研究的食用菌中属于中等偏低水平。洛巴伊大口蘑具有很强的木质素降解能力,属于白腐菌。在已报道的相关研究中,洛巴伊大口蘑分解木质素的能力最强。据报道,一定比例的金针菇菌渣代替棉籽壳栽培洛巴伊大口蘑可取得一定的经济效益^[12]。这可能与洛巴伊大口蘑具有很强的木质素降解能力和金针菇菌渣中木质素含量相对较高^[3]有关。目前,金针菇菌渣被用于搭配使用栽培食用菌多有报道^[13-14],由于褐腐菌菌渣中木质素含量均较高,据此可推测,除金针菇菌渣外,利用玉蕈、茯苓和黄伞等褐腐菌菌渣与主料搭配使用栽培洛巴伊大口蘑等白腐菌,可能会取得同样的经济效益。

参考文献

- [1] Mandels M, Hontz L, Nystrom J, et al. Enzymatic hydrolysis of waste cellulase[J]. Biotechnol Bioeng, 1974, 16: 1471-1493.
- [2] 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的活性变化[J]. 微生物学通报, 1989, 16(3): 137-140.
- [3] Sengupta S, Sengupta S. β -Glucosidase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1990, 12(4): 309-314.
- [4] Shamala T R, Sreekantiah K R. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates[J]. Enzyme Microb Technol, 1986, 8(3): 178-182.
- [5] 潘迎捷, 陈明杰, 郑海歌, 等. 香菇和平菇生长发育中漆酶、酪氨酸酶和纤维素酶活性的变化[J]. 上海农业学报, 1991, 7(2): 21-26.
- [6] 张志良, 瞿伟青. 植物生理学实验指导[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [7] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序[J]. 微生物学通报, 1987, 14(2): 81-84.
- [8] 王玉万, 潘贞德, 李秀玉, 等. 玉蕈降解木质纤维素的生理生化基础[J]. 真菌学报, 1993, 12(3): 219-225.
- [9] 倪新江, 梁丽琨, 丁立孝, 等. 巴西蘑菇对木质纤维素的降解与转化[J]. 菌物系统, 2001, 20(4): 526-530.
- [10] 倪新江, 初洋, 赵美, 等. 三个黄伞菌株不同生长发育期的几种胞外酶活性变化[J]. 北方园艺, 2013(21): 153-156.
- [11] 倪新江, 冯志勇, 梁丽琨, 等. 鸡腿菇对棉子壳的降解与转化[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 1-4.
- [12] 韩建东, 宫志远, 任海霞, 等. 利用金针菇工厂化生产的菌渣栽培洛巴伊大口蘑[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 39-41.
- [13] 韩建东, 宫志远, 任鹏飞, 等. 金针菇菌渣栽培金顶侧耳研究[J]. 北方园艺, 2011(21): 154-156.
- [14] 谢春芹, 贾君, 谢正林, 等. 金针菇菌渣栽培秀珍菇试验[J]. 北方园艺, 2012(9): 170-172.

Degradation of the Cottonseed Shell Medium and Activity Changes of Related Extracellular Enzymes From *Tricholoma lobayense* at Different Stages of Development

CHU Yang, DONG Xin-wei, NI Xin-jiang, ZHAO Jin-liang

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai, Shandong 264005)

Abstract: Taking *Tricholoma lobayense* as material, using bag cultivation method, degradation of the cottonseed shell medium and activity changes of related extracellular enzymes were determined at different stages of development from *Tricholoma lobayense* cultivated on the cottonseed shell medium in order to reveal the features of degradation of carbon source. The results indicated that *T. lobayense* had a complete set of extracellular cellulase; the activity of extracellular amylase was comparatively high at mycelial growth stage; there existed the positive correlation between the degradation rates of the cellulose and hemicellulose in the medium and the activities of extracellular carboxymethyl cellulase (CMCase), filter paper cellulase (FPase) and hemicellulase (HCase), but no correlation was found between the degradation rates of the cellulose in the medium and the activity of β -glucosidase, no correlation was found between the degradation rates of the lignin in the medium and the activities of laccase and peroxidase; *T. lobayense* degraded lignin strongly, so it belongs white-rot fungi; nonlignocellulose was principally used at the stage of mycelial growth, however, lignocellulose were the main carbon source for the fruiting stage of the fungus; at the end of cultivation (107 d), the medium reduction (dry weight) was 52.40%, the respiration consumption was 43.98%, the absolute biological efficiency (biomass of fruitbodies) was 8.42%.

Key words: extracellular enzyme; *Tricholoma lobayense*; substrate degradation