

紫孢侧耳栽培期基质中纤维素类的 降解和有关酶活的变化

贾新成 李喜梅 李磊 张桂莲

(河南农业大学植保系, 郑州 450002)

摘要 以棉籽壳为基质栽培紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus*), 分别在菌丝长满期、菇蕾期、一茬菇和二茬菇时测定培养料中纤维素和半纤维素含量的变化以及纤维素酶(CMC 酶)和半纤维素酶活性的变化。结果表明: 从接种到一茬菇时期, 纤维素酶、半纤维素酶活不断升高, 此后, 迅速降低; 基质中两种酶的底物含量降低速度以菇蕾——一茬菇时最大。菇蕾期后, 两种底物的减少量多, 菇蕾期以前较少。菇蕾期以前半纤维素降解稍多, 菇蕾期以后纤维素降解较多。

关键词 紫孢侧耳, 纤维素酶、半纤维素酶, 纤维素和半纤维素

研究用棉籽壳栽培紫孢侧耳过程中,各生育期内菌丝所产生的纤维素酶(主要是内切 β -1,4-葡聚糖酶,即C₁酶^[1,2])、半纤维素酶活性的变化规律,以及各生育期内基质中纤维素、半纤维素的含量变化,以揭示紫孢侧耳的营养生理机制,并为紫孢侧耳的选种和高产栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus*)菌株P20、P22、P30、P92、P05、P64、P35共7个(编号为河南农业大学植保系微生物组保藏菌种号)。

1.2 培养基

1.2.1 母种培养基为马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA);原种培养基为麦粒。

1.2.2 栽培基质内棉籽壳加水(1:1),装入耐高温聚乙烯袋内,126℃灭菌1.5小时。

1.2.3 发酵培养基(%):麦秸粉0.5、蛋白胨0.2、NH₄H₂PO₄0.2、ZnSO₄0.00044、K₂HPO₄0.02、MnSO₄·4H₂O0.0001、KH₂PO₄0.08、柠檬酸铁0.0005、CaCl₂0.002、酵母膏0.1、MgSO₄·7H₂O0.089、VitB₁1×10⁻⁵。500ml三角瓶装150ml培养液,121℃灭菌30分钟。

1.2.4 测定菌落纤维素酶活性的培养基见参考文献[1]。

1.3 试验方法

1.3.1 各菌株液体发酵时,纤维素酶活测定:将各菌株接入液体培养基中、28℃下振荡(150r/min)培养10天。将发酵液分别以4000r/min离心10分钟,吸取上清液供测定纤维素酶活性用。

1.3.2 各菌株菌落纤维素酶活性测定:将各菌株分别接种在底层为2%琼脂,上层为PSA的双层无菌平板上,28℃下培养6天。用无菌打孔器将菌块放在测定菌落活性的培养基平板上,28℃下培养64小时,显色。

1.3.3 栽培过程中纤维素含量及其酶活、半纤维素含量及其酶活的测定:在灭过菌的棉籽壳

袋两端分别接入各菌株的麦粒种,25℃下恒温培养至菌丝长满袋。将菌袋移至室温下(12月份),使其出菇。分别在菌丝长满期(21天)、菇蕾期(38天)、一茬菇期(57天)和二茬菇期(88天)四个时期取样,分别测定各菌株的纤维素、半纤维素酶活性以及其基质中纤维素和半纤维素的含量。

1.4 酶活性的测定方法

1.4.1 菌落纤维素酶活性的测定:方法见参考文献^[1,3]。刚果红浓度为0.5%,NaCl浓度为1mol/l,HCl为1mol/l。

1.4.2 固体培养料酶提取液的制备:称取一定量的固体样品,加入5倍蒸馏水,30℃下浸提1小时,过滤去残渣,上清液即为酶提取液。

1.4.3 纤维素酶活性测定:将DNS^[4]法略加修改。具体作法是:取0.5%的CMC-Na水溶液2ml,加入0.1mol/l的醋酸缓冲液(pH为4.5)2ml,酶浸提液1ml,混匀后,40℃水浴锅上糖化30分钟,煮沸15分钟灭活。取糖化液1ml,加入3,5-二硝基水杨酸溶液2ml,100℃水浴中显色15分钟,冷却后用7250分光光度计于580nm处测定OD值,计算酶活性。

1.4.4 半纤维素酶活性测定:见参考文献[4]。

1.4.5 纤维素和半纤维素含量测定:见参考文献[5]。

2 结果与分析

2.1 液体发酵的纤维素酶活性

用液体发酵的方法测定各菌株纤维素酶活性具有条件易控制、结果准确等优点。通过对7个紫孢侧耳菌株液体发酵的纤维素酶活性测定(表1),表明各菌株的纤维素酶活差距较大。但是,此法培养时间长,测定手续比较繁琐。

2.2 菌落纤维素酶活性

紫孢侧耳产生的纤维素酶可将CMC水解为糖,遇到刚果红时变为无色,而CMC与刚果红呈蓝色反应。因此,会在产生纤维素酶的菌块四周形成无色透明圈,产生酶量的多少应表现在透明圈的大小上。7个菌株的透明圈大小表

明(表2),当菌株接入64小时后,各菌落的透明圈较大,且差距比较明显。但在检查结果时必须注意,刚果红一定要将菌丝体浸没,否则会因菌丝体与刚果红不浸润而造成菌落下培养基中刚果红不褪色而造成试验误差。

上述两种方法结果的相关性分析表明,菌株液体发酵和菌落刚果红透明圈纤维素酶活性之间无明显的相关性。但是,与液体发酵相比,刚果红透明圈法需要时间短、条件也不苛刻,虽然不能代替液体发酵测定,但可作为筛选产纤维素酶菌株的简便方法。

2.3 紫孢侧耳各生育期纤维素、半纤维素酶活性

7个菌株不同生育期的纤维素酶活性见表3,半纤维素酶活性结果如表4。结果表明:不同菌株在各个时期内两种酶活性差别很大,反映了菌株之间的差异。若以各时间7个菌株酶活性的平均数作成图1,便可发现,在紫孢侧耳的栽培过程中,纤维素酶、半纤维素酶的变化规律基本相似。即:从菌丝开始生长就产生两种酶活性,以后逐步升高,到一茬菇时,两种酶活均达到最高峰。此后,二者均迅速下降。这说明,紫孢侧耳从菌丝生长时即开始分泌纤维素酶和半纤维素酶,随着菌丝的生长、发育,两种酶活不断上升,到出一茬菇时产酶量达到最高,以后又迅速下降。

表1 紫孢侧耳液体发酵纤维素酶活性

菌株号	30	22	35	92	05	64	20
纤维素酶活性 (μg 葡萄糖/ $\text{min} \cdot \text{ml}$)	28.3	40.0	59.1	11.3	21.0	31.0	18.3

培养时间10天,2次平均结果

表2 紫孢侧耳菌株纤维素酶透明圈直径(mm)

菌株号	30	22	35	92	05	64	20
64h	14.0 15.0 14.5	9.0 9.0 11.8	16.0 16.0 14.0	18.0 — 20.0	11.0 12.6 12.0	19.0 20.0 19.0	11.0 9.0 10.0
平均	14.5	9.9	15.3	19.0	11.9	19.3	10.0

表3 紫孢侧耳各生育期纤维素酶活性*

菌株号	30	22	64	05	35	20	92	平均
菌丝期	216.9	90.1	25.6	239.1	83.5	42.0	—	116.2
菇蕾期	421.3	456.6	296.9	425.0	267.4	243.5	231.5	334.6
一茬菇	708.7	735.5	846.7	615.3	745.6	1057.0	854.7	794.79
二茬菇	640.8	591.2	531.8	257.8	702.0	934.5	612.4	610.07

* 活性单位:生成 μg 葡萄糖/ $\text{min} \cdot \text{g}$

表4 紫孢侧耳各生育期半纤维素酶活性*

菌株号	30	22	64	05	35	20	92	平均
菌丝期	109.1	170.9	46.6	84.0	151.3	107.6	116.3	112.30
菇蕾期	164.7	146.2	162.5	187.9	95.9	172.7	167.1	156.71
一茬菇	235.4	238.8	268.7	224.3	253.9	267.1	238.1	246.61
二茬菇	122.7	141.0	128.0	61.8	134.1	203.2	133.6	132.06

* 活性单位:生成 μg 木糖/ $\text{min} \cdot \text{g}$

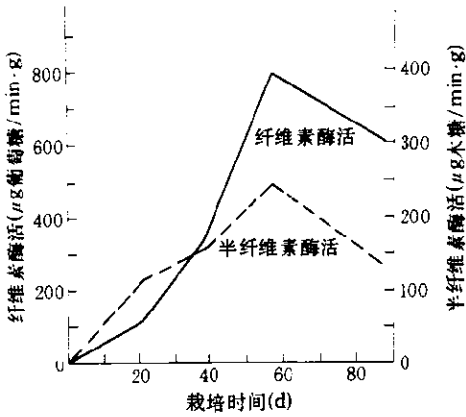


图1 紫孢侧耳栽培过程中纤维素、半纤维素酶活的变化

从图1还可以发现,在菌丝生长期,半纤维素酶活性比纤维素酶活性上升的迅速;而菇蕾期以后,纤维素酶活性又比半纤维素酶活性上升的快。说明在用棉籽壳栽培紫孢侧耳时,前

期菌丝生长时,它更多地分解利用半纤维素,而菇蕾期以后,则更多的分解利用纤维素。这与黄克服^[6,7]用蔗渣栽培香菇时两种酶的变化规律相似,而与牛福文^[8]用棉籽壳栽培黑木耳过程中纤维素、半纤维素酶活性变化的规律不太相同,特别是紫孢侧耳栽培中,这些酶活变化规律与子实体产量有何相关性等,有待进一步研究。

2.4 基质中纤维素、半纤维素含量的变化

在紫孢侧耳栽培过程中,各个生育期内,纤维素和半纤维素的含量结果分别列于表5和表6。可以看出,在整个栽培过程中,基质中纤维素和半纤维素的变化规律相似。即:从菌丝生长开始,培养料中这两种物质的含量即开始减少。将各时期纤维素和半纤维素降解的速度以及各时期降解量所占的百分数可知(表7):从菌丝生长到菇蕾期,纤维素、半纤维素降解速度较慢、菇蕾期到一茬菇时,其降解速度最快,以后速度减慢。这一变化规律与该时期两种酶活性的变化规律基本相符。同时还可以看出纤维素、半纤维素含量的减少主要在菇蕾期以后(纤维素减少占总减少总量的65.88%,半纤维素为60.04%),而且前期半纤维素减少较纤维素多,后期消耗纤维素稍多。

表5 各生育期培养料中纤维素的含量(%)

菌株号 生育期	30	22	64	05	35	20	92	平均
菌丝期	34.51	35.30	29.20	32.74	35.70	34.83	33.76	33.71
菇蕾期	33.06	33.50	23.72	29.70	32.86	33.62	34.12	31.51
一茬菇	28.35	27.21	12.57	23.57	24.85	26.25	25.11	23.99
二茬菇	15.20	19.48	16.52	18.10	14.66	14.52	18.71	16.74

棉籽壳纤维素含量 39.16%

表6 各生育期培养料中半纤维素含量(%)

菌株号 生育期	30	22	64	05	35	20	92	平均
菌丝期	20.63	24.08	22.06	22.57	23.01	18.25	21.18	21.68
菇蕾期	18.98	19.39	19.28	21.32	21.65	16.77	19.83	19.60
一茬菇	14.16	14.10	14.13	15.68	12.47	12.77	15.37	14.16
二茬菇	9.43	10.13	10.80	11.55	8.91	9.35	11.83	10.29

棉籽壳中半纤维素含量为 25.80%

表7 紫孢侧耳各生育期纤维素和半纤维素降解速度

生育期	经历时间(d)	纤维素				半纤维素			
		含量(%)	相对含量(%)	降解速度(每天%)	相当于总降解数(%)	含量(%)	相对含量(%)	降解速度(每天%)	相当于总降解数(%)
棉籽壳		39.16	100			25.80	100		
菌丝长满期	21	33.71	86.1	0.26	24.31	21.70	84.1	0.20	26.43
菇蕾期	17	31.51	80.5	0.13	9.81	19.60	76.0	0.12	13.54
一茬菇	19	23.99	61.3	0.40	33.54	14.16	54.0	0.29	35.07
二茬菇	25	16.74	42.7	0.29	32.34	10.29	40.0	0.16	24.95

根据陈玉梅等^[2]的试验证明,侧耳类的纤维素酶和半纤维素酶的最适宜反应温度分别为40℃和50℃,环境温度的降低必然影响酶的活性。在我们的试验中,紫孢侧耳栽培温度、菌丝生长期为25℃,以后为室温(6—11℃),两种酶活测定时的温度均为40℃。在温度相差很大的基础上测定的两种酶活性,其变化规律与相应底物含量的变化相符,说明在菇蕾期以后,两种酶活性的增加主要靠两种酶分泌量的增加。因此,在菌丝发育良好和后期适当降低温度的条件下(应<18℃),适当提高出菇时的环境温度,必然会增加紫孢侧耳对纤维素和半纤维素的分解、利用量,为取得子实体的高产提供更为丰富的物质基础。

参考文献

- [1] 陈玉梅,李丽娜,陆师义. 食用菌,1987,1,7—8.
- [2] 陈玉梅,李丽娜,陆师义. 中国食用菌,1988,2,13—16.
- [3] Teather R M, Wood P J. Appl and Environmental Microbiol, 1974, 43, 777—780.
- [4] 应用微生物展览会编. 酶制剂的生产和测定方法. 北京, 中国工业出版社, 1971, 99—106.
- [5] 中山大学生物系微生物教研室. 生物技术导论, 北京, 人民教育出版社, 1979.
- [6] 黄克服, 刘月英, 郑忠辉, 等. 厦门大学学报, 1979, 1, 29—32.
- [7] 黄克服, 刘有英, 郑忠辉, 等. 中国食用菌, 1988, 6, 5—9.
- [8] 牛福文, 印桂玲, 刘宝增. 微生物学通报, 1990, 17(4), 201—204.