



葡萄糖与酵母膏比对猴头菌胞外酶活性的影响

张亚洁, 龚教龙, 于 晶, 赵志莹, 阮 航, 范博文, 李佐同, 赵长江

(黑龙江八一农垦大学 农学院/黑龙江省秸秆资源化利用工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为揭示碳源和氮源比对猴头菌胞外酶活性的影响,选用葡萄糖作为碳源,酵母膏作为氮源,以猴头菌(*Hericium erinaceus*)菌种 RT22 为材料,基础培养基中葡萄糖与酵母膏配比为 3:1 为对照,设置基础培养基中葡萄糖和酵母膏配制比例为 5:3、2:1、7:3、5:2、7:2、5:1、6:1、7:1 的液体培养基,摇床培养 8 d 后,取猴头菌菌液测定羧甲基纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、滤纸纤维素酶、漆酶、过氧化物酶的活性。结果表明:在葡萄糖和酵母膏配制比中,羧甲基纤维素酶活性、半纤维素酶活性、淀粉酶活性、漆酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 2:1 处理下最强;滤纸纤维素酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 7:2 处理下最强;过氧化物酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 7:1 处理下最强,其中葡萄糖和酵母膏配比为 2:1 处理与配比为 7:2 处理的滤纸纤维素酶活性差异不显著。在选用葡萄糖作为碳源、酵母膏为氮源时,基础培养基中碳源和氮源最适配比为 2:1,是适合猴头菌生长的最适碳氮配比。

关键词:猴头菌;胞外酶;碳氮比

食用菌作为 21 世纪的保健食品,吸引着广大消费者。随着人们生活习惯改变,消费者越来越注重饮食营养均衡,我国是世界上最大的食药食用菌市场^[1],国内食用菌市场潜力巨大,还有很多发展的空间。这些年来,我国能够大型栽培的食用菌品种越来越多,其中猴头菌是我国珍贵的食药兼用真菌^[2],猴头菌可用于治疗消化道溃疡、神经衰弱、身体虚弱等疾病,具有抗癌、增强免疫力等功效^[3]。

胞外酶是由细胞内产生但在胞外作用的一类酶,食用菌的胞外酶可以将菌料中大分子物质水解为小分子物质如蛋白质被逐步水解为氨基酸以供菌丝吸收利用。王宜磊^[4]对彩绒革盖菌的两种酶分泌活性分析指出麸皮和酵母膏是该菌较好的碳、氮源。已知纤维素酶是一种诱导性质的酶,纤维素酶的活性表示了菌体利用纤维素和木质素的能力,培养基中碳、氮营养的含量和性质能够对纤维素酶的分解活性产生影响。肖光辉^[5]对香菇研究发现,少量米糠等碳源加入到培养基中,在香菇培养初期能吸收利用这种辅助碳源,能够诱导产

生纤维素酶。Janusz 等^[6]发现真菌漆酶除了具有降解木质素的作用之外,在色素合成、子实体形成、脱毒以及发病机制等方面都扮演了重要的角色。Claydon 等^[7]在对双孢蘑菇的研究中发现,抑制出菇能够让酶的活性总是处于低水平状态。Chanter 等^[8-9]提出的数学关系式可诠释在菌体发育期间,细胞外的纤维素酶活性的动态变化规律。食用菌生产中,碳氮比对产量有着重要的影响,获得高产的一个重要因素之一就是得到合适的碳氮比。贺新生^[10]通过试验得到在一定范围内的碳氮比,随着培养料中碳氮比的增加,产量呈不断增加的趋势,氮增加到一定量后,产量迅速下降,超过一定量后产量增加极为缓慢,将氮量控制在适宜的浓度 1.00%~1.20%。有研究表明,胞外酶与食用菌的栽培特性存在着联系,因此能根据胞外酶活性大小、动态变化规律的研究,推测栽培料中营养成分材料的降解程度。

大多数食用菌属于腐生菌,食用菌生长所需的养分主要来自于碳源、氮源、矿质元素和维生素 4 类,不同食用菌对碳氮营养需求有所不同。不同的碳源、氮源对猴头菌养菌期间、出菇期间的各种生长指标有重要的影响。因此,本研究通过探索基础培养基中葡萄糖和酵母膏比对猴头菌胞外酶活性的影响,选择出最有利于猴头菌生长的葡萄糖和酵母膏配比,旨在为该食用菌栽培提供理论指导。

收稿日期:2018-10-13

基金项目:中央引导地方科技发展专项(ZY16A06),黑龙江八一农垦大学大学生创新创业计划训练(XC2016003)。

第一作者简介:张亚洁(1996-),女,在读硕士,从事微生物工程与微生物转化研究。E-mail:zhangyajie1996@126.com。

通讯作者:赵长江(1979-),男,博士,副教授,硕导,从事作物逆境生理及秸秆循环利用研究。E-mail:zhaocj15@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

猴头菌(*Hericium erinaceus*)菌株 RT22 由黑龙江省农业科学院牡丹江分院提供。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 培养试验。将以活化的培养皿菌种切割成 0.5 cm^2 大小的菌丝块,接种于不同葡萄糖与酵母膏配制比液体培养基中,每瓶接3块大小均匀的菌丝块,于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养8 d。每个处理3次重复。

培养基配制。基础培养基:葡萄糖 30.0 g ,酵母膏 10.0 g ,磷酸二氢钾 1.0 g ,硫酸镁 0.6 g ,用蒸馏水定容至 1 L 。

选用基础培养基中的葡萄糖和酵母膏分别作为碳源和氮源,设置不同浓度梯度(碳源浓度: 25 、 30 、 $35\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;氮源浓度: 5 、 10 、 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),葡萄糖和酵母膏配制比例分别为 $5:3$ 、 $2:1$ 、 $7:3$ 、 $5:2$ 、 $7:2$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 、 $7:1$ 的液体培养基,以配比为 $3:1$ 的为对照。

1.2.2 测定项目及方法 羧甲基纤维素酶活性测定:取 0.5 mL 酶液和 1.5 mL pH 为 4.6 的羧甲基纤维素钠溶液混合,置于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保温 30 min 。沸水中煮沸 15 min 后。取 0.5 mL 用 DNS 法测还原糖生成量。用 722 型分光光度计在 540 nm 波长处测定光密度值^[11]。

半纤维素酶活性测定:将 0.5 mL 酶液和 1 mL 1% 的木聚糖溶液混匀后,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保温 1 h ,取出加入 2 mL DNS 试剂,煮沸 5 min ,取出定容至 20 mL 。以煮沸灭活的酶液作对照,用 722 型分光光度计在 540 nm 波长处测定光密度值^[12]。

淀粉酶活性测定:将 0.5 mL pH 为 5.6 , $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液和 0.5 mL 酶液混匀后 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min ,加入 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1% 的可溶性淀粉 1 mL ,混匀, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 。加入 2 mL $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH。取混合溶液 2 mL 和 2 mL DNS 试剂,煮沸 5 min ,取出冷却,加入蒸馏水定容至 25 mL ,用 722 型分光光度计在 520 nm 波长处测光密度值^[13]。

滤纸纤维素酶活性测定:把长宽为 $1\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ 的新华定量滤纸条和 0.5 mL 酶液放入刻度试管中混匀后在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保温 30 min ,取出再加 1.5 mL DNS 试剂,煮沸 5 min 。取出待冷却

后加入蒸馏水定容至 20 mL ,溶液充分混匀,以煮沸灭活的酶液作对照,用 722 型分光光度计在 540 nm 波长处测定光密度值^[14]。

漆酶活力测定:将 0.5 mL pH 为 5.6 , $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液和 0.5 mL 酶液加入到刻度试管中,混匀后在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 15 min ,然后再加入 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预热的 1% 可溶性淀粉 1 mL ,混匀,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 5 min 后加入 2 mL $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 用来终止酶活。取混合溶液 2 mL 和 2 mL DNS 试剂加入到刻度试管中,煮沸 5 min ,取出冷却,加入蒸馏水定容至 25 mL ,用 722 型分光光度计在 520 nm 波长处测光密度值^[15]。

过氧化物酶活性测定:在试管中分别加入由过氧化氢 0.028 mL 、愈创木酚 0.019 mL 、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH6.0 的磷酸缓冲液 50 mL 组成的混合物 3 mL 和酶液 1 mL ,混合均匀后,用 722 型分光光度计在 470 nm 波长处测光密度值^[16]。

1.2.3 数据分析 利用 Excel 2016 进行数据整理及分析,利用 SPSS Statistic 21.0 对所得数据进行单因素方差检验,差异显著性及多重比较分析采用 Duncan 检验法处理,系统聚类采用组间连接平方 Euclidean 距离法处理,图表数据均为 3 次或 3 次以上重复处理的平均值。

2 结果与分析

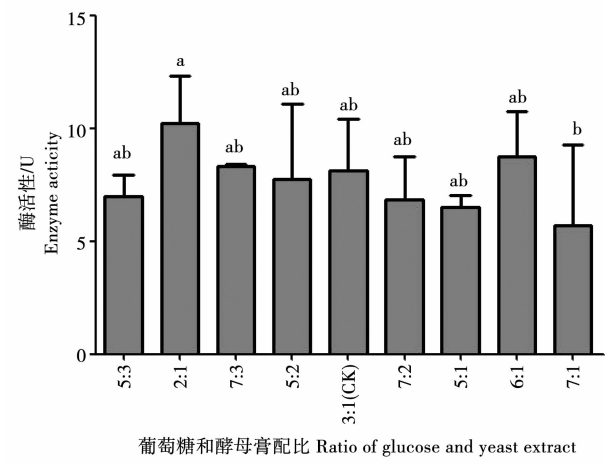
2.1 葡萄糖和酵母膏配比对羧甲基纤维素酶活性的影响

由图 1 可知,葡萄糖和酵母膏各配比处理与对照配比 $3:1$ 处理的羧甲基纤维素酶活性差异均不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 $2:1$ 处理的猴头菌羧甲基纤维素酶活性显著高于配比为 $7:1$ 处理,其中配比为 $2:1$ 处理的猴头菌羧甲基纤维素酶活性最强。

2.2 葡萄糖和酵母膏配比对半纤维素酶活性的影响

由图 2 可知,葡萄糖和酵母膏配比为 $7:3$ 、 $5:2$ 、 $5:3$ 、 $7:1$ 处理的猴头菌半纤维素酶活性与对照配比 $3:1$ 之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 $2:1$ 、 $7:2$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 处理的半纤维素酶活性显著高于对照配比 $3:1$ 处理;葡萄糖和酵母膏配比为 $7:2$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 、 $7:1$ 处理的半纤维素酶活性之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 $2:1$ 处理的猴头菌显著高于配比为 $5:1$ 、 $7:1$ 、 $5:3$ 、 $7:3$ 、 $5:2$ 处理的

半纤维素酶活性;葡萄糖和酵母膏配比在 2:1 处理下半纤维素酶活性最强,在配比为 5:2 处理下半纤维素酶活性最弱。



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著性($P<0.05$),下同。
Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level($P<0.05$),the same below.

图1 葡萄糖和酵母膏配比对猴头菌羧甲基纤维素酶活性的影响

Fig.1 Effect of glucose and yeast extracts ratio on the activity of carboxymethyl cellulase in *Hericium erinaceus*

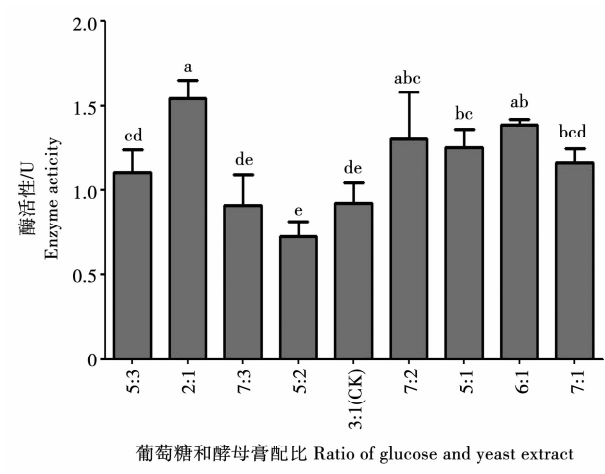


图2 葡萄糖和酵母膏配比对猴头菌半纤维素酶活性的影响

Fig.2 Effects of glucose and yeast extracts ratio on hemicellulase activity of *Hericium erinaceus*

2.3 葡萄糖和酵母膏配比对淀粉酶活性的影响

由图3可知,葡萄糖和酵母膏配比为 2:1、5:2、5:3、7:2、7:1、6:1 处理的猴头菌淀粉酶活性与对照配比 3:1 差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 5:3、5:2、7:2、5:1、6:1、7:1 处理的淀粉酶活性之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 2:1 处理的淀粉酶活性显著高于除对照外的所处理;葡

萄糖和酵母膏配比在 2:1 处理下淀粉酶活性最强,在 7:3 处理下淀粉酶活性最弱。

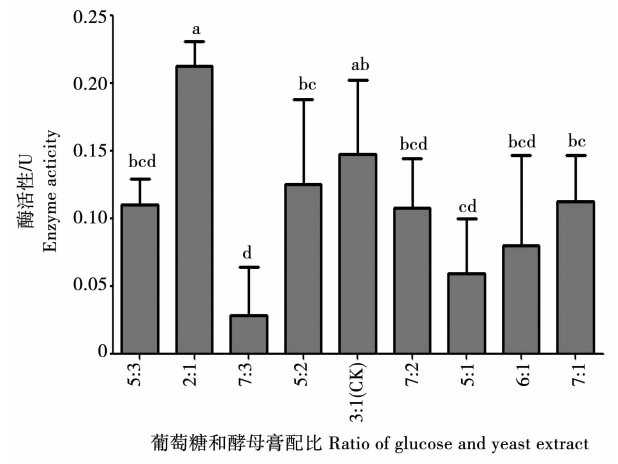


图3 葡萄糖和酵母膏配比对猴头菌淀粉酶活性的影响

Fig.3 Effects of glucose and yeast extracts ratio on amylase activity of *Hericium erinaceus*

2.4 葡萄糖和酵母膏配比对滤纸纤维素酶活性的影响

由图4可知,葡萄糖和酵母膏配比为 5:3、2:1、7:3、5:2、7:2、5:1、6:1 处理的猴头菌滤纸纤维素酶活性与对照配比 3:1 之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为 3:1、7:2、5:1 的处理显著高于配比为 7:1 处理的滤纸纤维素酶活性;葡萄糖和酵母膏配比在 7:2 处理下滤纸纤维素酶活性最强,在 7:1 处理下滤纸纤维素酶活性最弱。

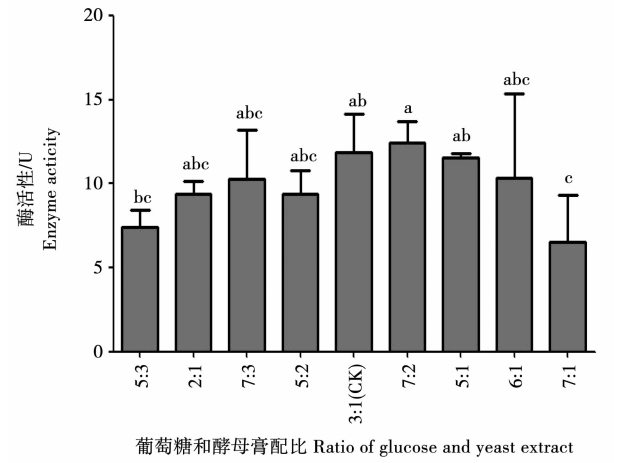


图4 葡萄糖和酵母膏配比对猴头菌滤纸纤维素酶活性的影响

Fig.4 Effects of glucose and yeast extracts ratio on filter paper cellulase activity of *Hericium erinaceus*

2.5 葡萄糖和酵母膏配比对漆酶活力的影响

由图5可知,葡萄糖和酵母膏配比为 7:3、7:2、5:1、7:1 处理的猴头菌漆酶活性与对照配比

3:1之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为5:3、2:1、6:1处理的漆酶活性之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为5:3、5:2、7:2、6:1、7:1处理的漆酶活性之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为2:1处理的漆酶活性显著高于对照配比为3:1、7:3、5:2、7:2、5:1和7:1;葡萄糖和酵母膏配比在2:1处理下漆酶活性最强,在对照配比为3:1处理下漆酶活性最弱。

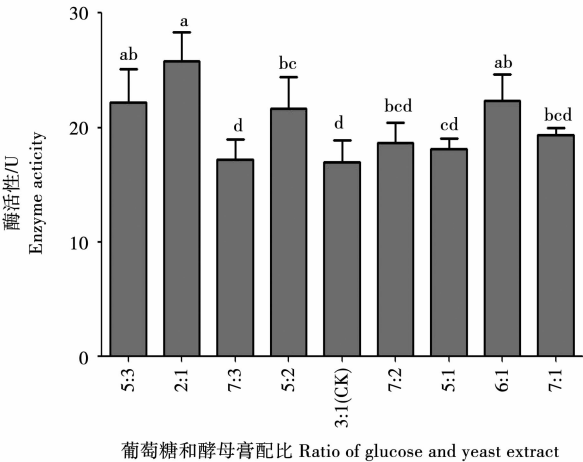


图5 葡萄糖和酵母膏比对猴头菌漆酶活力的影响
Fig. 5 Effects of ratios of glucose and yeast extracts ratio on laccase activity of *Hericium erinaceus*

2.6 葡萄糖和酵母膏比对过氧化物酶活性的影响

由图6可知,葡萄糖和酵母膏配比为2:1、5:2、6:1处理的猴头菌过氧化物酶活性与对照配比为3:1之间差异不显著;葡萄糖和酵母膏配比为7:3、7:2、7:1处理之间的过氧化物酶活性差异不显著,显著高于对照;葡萄糖和酵母膏对照配比为3:1处理显著高于配比为5:3和5:1处理的过氧化物酶活性;葡萄糖和酵母膏配比在7:1处理下过氧化物酶活性最强,在5:1处理下过氧化物酶活性最弱。

2.7 葡萄糖与酵母膏配比和胞外酶活性聚类分析

胞外酶指的是羧甲基纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、滤纸纤维素酶、漆酶、过氧化物酶。由图7可知,在葡萄糖与酵母膏不同配比处理下,不同的配比对6种胞外酶的活性影响不同,葡萄糖和酵母膏配比为2:1处理是一类,胞外酶活性高;葡萄糖和酵母膏配比为7:1处理是一类,胞外酶活性较高。羧甲基纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶和

漆酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为2:1处理下最强;滤纸纤维素酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为7:2处理下最强;过氧化物酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为7:1处理下最强。

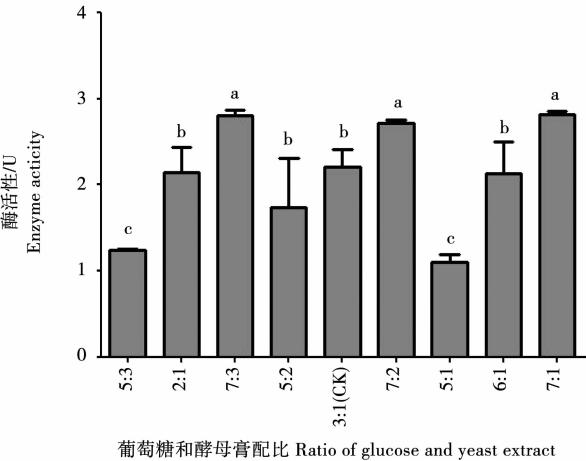
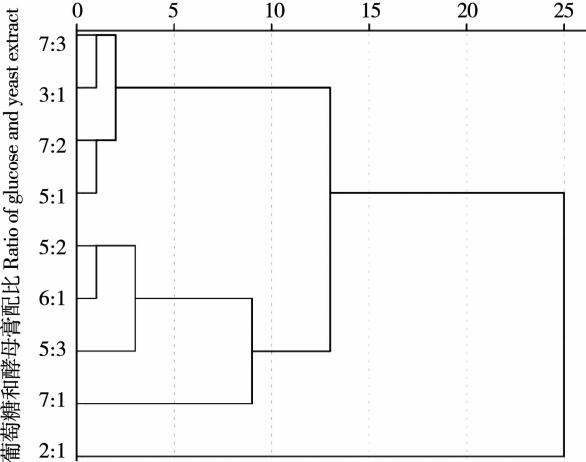


图6 不同葡萄糖和酵母膏比对猴头菌过氧化物酶活性的影响
Fig. 6 Effect of different glucose and yeast extracts ratio on peroxidase activity of *Hericium erinaceus*



系统聚类分析采用组间连接平方 Euclidean 距离法处理。
Systematic clustering analysis is processed by the Euclidean distance method.

图7 葡萄糖与酵母膏配比和胞外酶活性聚类分析
Fig. 7 Clustering analysis of glucose and yeast paste ratios and extracellular enzyme activity

3 结论与讨论

在20世纪初 KLebs 提出了高等植物开花的C/N理论,并且在植物界也产生了极大的影响。此后还发现,C/N对微生物生长发育也是极为重要^[17]。食用菌生产中,碳氮比对产量有着重要的影响,获得高产的一个重要因素之一就是得到合

适的碳氮比。贾素巧^[18]研究表明猴头菌母种培养时,在 C/N=10:1~70:1 的 7 个处理中,猴头菌生长最适的 C/N 为 20:1~30:1。

综合考虑各种酶活性指标及营养元素的成本,不同葡萄糖与酵母膏比对 6 种胞外酶活性影响不同,其中,羧甲基纤维素酶活性、半纤维素酶活性、淀粉酶活性、漆酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 2:1 处理下最强;滤纸纤维素酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 7:2 处理下最强;过氧化物酶活性在葡萄糖和酵母膏配比为 7:1 处理下最强。在选用葡萄糖作为碳源、酵母膏为氮源时,基础培养基中碳源和氮源最适配比为 2:1,是适合猴头菌生长的最适碳氮配比。

参考文献:

- [1] 林应兴. 菌草食用菌品质的研究现状[J]. 食药用菌, 2018, 26(2): 79-83.
- [2] 张岩. 猴头菇化学成分的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [3] 张微思, 何容, 李建英, 等. 猴头菇的营养药用价值及产品研究现状[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 104-108.
- [4] 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(1): 29-31.
- [5] 肖光辉. 香菇大分子碳源代谢的研究[J]. 食用菌学报, 1994(1): 31-35.
- [6] Janusz G, Frac M, Rola B, et al. Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains[J]. World

Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(1): 121-133.

- [7] Claydon N, Allan M, Wood D A. Fruit body biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus* [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1988, 90(1): 85-90.
- [8] Chanter D O, Thomley J H M. Mycelial growth and the initiation and growth of sporophores in mushroom crop: A mathematical model[J]. Journal of General Microbiology, 1978, 106: 55-65.
- [9] Chanter D O. Harvesting the mushroom crop: A mathematical model[J]. Journal of General Microbiology, 1979, 115: 79-87.
- [10] 贺新生. 猴头菌产量与培养料含量的动态关系[J]. 食用菌学报, 2000, 7(1): 51-55.
- [11] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 141-179.
- [12] 李江华, 房峻. 半纤维素酶高产菌种的选育及产酶条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2004(5): 48-52.
- [13] 丛珊. 黑木耳复合基质的适宜品种筛选及营养生理的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [14] 杨民和, 杨新美, 陈立国. 松茸的营养生理及培养基的筛选[J]. 菌物系统, 2000(2): 272-277.
- [15] 方维明, 鲁茂林, 汪志君. 营养因子对灰树花多糖发酵的影响[J]. 江苏农业研究, 1999(4): 65-68.
- [16] 王伟玲, 王展, 王晶英. 植物过氧化物酶活性测定方法优化[J]. 实验室研究与探索, 2010, 20(4): 21-2.
- [17] 李英俊, 吴英杰, 王孝敏. 快速测定猴头菌基质 C/N 方法[J]. 食用菌, 1993, 15(S): 8-9.
- [18] 贾素巧. 碳氮营养对猴头菌生长发育及胞外酶活性的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.

Effects of the Ratio of Glucose and Yeast Extract on Extracellular Enzyme Activity of *Hericium erinaceus*

ZHANG Ya-jie, GONG Jiao-long, YU Jing, ZHAO Zhi-ying, RUAN Hang, FAN Bo-wen, LI Zuo-tong, ZHAO Chang-jiang

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Heilongjiang Engineering Technology Research Center for Crop Straw Utilization, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to reveal the effect of the ratio of carbon source and nitrogen source on the extracellular enzymes activity of *Hericium erinaceus*, glucose was used as carbon source, yeast extract as nitrogen source, *Hericium erinaceus* strain RT22 as material, and the ratio of glucose to yeast extract in basic medium was 3:1 as control. The ratio of glucose to yeast extract in basic medium was 5:3, 2:1, 7:3, 5:2, 7:2, 5:1, 6:1, 7:1 as control. After 8 days of shaking culture, the activity of carboxymethyl cellulase, hemicellulase, amylase, filter paper cellulase, laccase and peroxidase were determined. The results showed that carboxymethyl cellulase activity, hemicellulase activity, amylase activity and laccase activity were the strongest in the ratio of glucose to yeast extract at 2:1, cellulase activity of filter paper was the strongest in the ratio of glucose to yeast extract at 7:2, and peroxidase activity was the strongest in the ratio of glucose to yeast extract at 7:1. The cellulase activity of filter paper treated with 2:1 medium glucose and yeast extract and 7:2 medium glucose had no significant difference. When glucose was used as carbon source and yeast extract as nitrogen source, the optimum ratio of carbon source and nitrogen source in the basic medium was 2:1, which was the optimum ratio of carbon and nitrogen for the growth of *Hericium erinaceus*.

Keywords: *Hericium erinaceus*; extracellular enzyme; carbon nitrogen ratio