

李 红,杨 镇,吕立涛,等. 黑木耳栽培过程中抗霉能力及胞外酶活性变化[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):109-112.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.031

黑木耳栽培过程中抗霉能力及胞外酶活性变化

李 红,杨 镇,吕立涛,刘岩岩,张 敏

(辽宁省农业科学院微生物工程中心,辽宁沈阳 110161)

摘要:以 5 个黑木耳(*Auricularia auricula*)栽培菌株(8808、黑 29、981、黑威 2 号、黑威 4 号)为试验材料,研究黑木耳栽培过程中 4 种胞外酶活性[羧甲基纤维素酶(CMCase)、滤纸纤维素酶(FPase)、漆酶(LAC)、多酚氧化酶(POD)]的变化及酶活性与产量、抗霉能力之间的相关性。结果表明,菌株产量大小排序为黑威 2 号>黑威 4 号>981>8808>黑 29,黑威 2 号显著高于其他菌株,黑威 4 号和 981 菌株差异不显著,8808 和黑 29 菌株产量最低;各菌株抗霉能力有明显差别,黑威 2 号、黑威 4 号、981 菌株抗霉能力较差,8808 和黑 29 菌株抗霉能力较强。不同菌株胞外酶活性不同,但在整个生长发育过程中变化规律基本一致,即随着黑木耳子实体的生长发育,CMCase、FPase、LAC、POD 活性逐渐增强,而后维持在相对稳定的水平。8808、黑 29 菌株 CMCase、FPase、POD 酶活性相对较低,981、黑威 2 号、黑威 4 号菌株酶活性较高。相关性分析表明,不同胞外酶活性之间具有显著或极显著相关性,不同的胞外酶活性又与抗霉能力、产量有一定的相关性,从而为黑木耳抗病育种、黑木耳生产提供了理论依据。

关键词:黑木耳栽培;抗霉能力;胞外酶;酶活性;产量;抗霉能力

中图分类号:S646.601 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0109-04

黑木耳(*Auricularia auricula*)是中国广泛人工栽培的食用菌品种,其栽培业已成为广大菇农走上致富道路的支柱产业之一^[1]。黑木耳食味鲜美,含有丰富的营养成分,具有很高的食、药用价值^[2-3]。近年来,随着人们生活水平的提高,对木耳的消费需求激增,木耳总产量也随之快速增长。但大

量菌种品种退化、老化、不利变异,致使栽培性状难以预测,造成栽培特性、栽培产量的不确定性^[1]。有研究报道,侧耳(*Pleurotus*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)菌丝羧甲基纤维素酶活性与子实体产量成正相关关系,以木屑为主料栽培的黑木耳在子实体形成期间胞外纤维素酶活性逐渐上升^[4]。黑木耳的纤维素酶、半纤维素酶活性与栽培基质的降解速率、子实体的产量有关,表明食用菌胞外酶活性变化在栽培过程中存在一定的规律^[5-7]。从目前的研究成果来看,相关食用菌胞外酶活性研究报道较多,而如何通过菌种检测,鉴定菌种活性、健康程度,预测栽培特性、栽培产量的研究较少^[5-7]。黑木耳菌种培养过程中通过酶活性测定研究菌种生长中的酶活

收稿日期:2016-10-15

基金项目:辽宁省沈阳市科技厅项目(编号:ZT1009)。

作者简介:李 红(1975—),女,辽宁沈阳人,硕士,工程师,主要从事微生物发酵研究。E-mail:Lee_hong123@163.com。

通信作者:张 敏,博士,研究员,主要从事食用菌育种及栽培等研究。E-mail:zhangmindun@163.com。

老化,其地下养分吸收和地上光合作用逐渐减弱,对养分的吸收、转化和贮存饱和,此时采用低肥处理可以实现叶干质量和根干质量增加、肥料成本投入减少的双重目的。

施肥是洋葱获得高产高效的关键栽培因子,合理施肥可以促进产量增加和经济效益提高。本试验结果表明,中肥处理可以明显促进洋葱产量增加和经济效益提高,与对照相比,纯收入增幅为 52.41%,与高肥处理相比,纯收入增幅为 104.62%,这说明在一定范围内,产量和经济效益随施肥的增加而提高,增加施肥达到一定范围时,产量和经济效益不再提高反而降低,符合肥料的“报酬递减率”。因此,洋葱新品种萨姆特高产、高效栽培的施肥方式为中肥处理,即 N、P₂O₅、K₂O 用量分别为 225.0、262.5、375.0 kg/hm²。

总之,应根据洋葱植株生长特点及营养元素的生理功能进行施肥^[7-8]。建议洋葱生产过程中,生育前中期 N、P₂O₅、K₂O 用量分别为 225.0、262.5、375.0 kg/hm²,生育后期 N、P₂O₅、K₂O 用量分别为 150.0、187.5、300.0 kg/hm²,这样既可以节约肥料成本,又可以增加产量并提高经济效益。

参考文献:

- [1] 张雪艳,高艳明,李建设. 宁南山区出口洋葱田间操作规范[J]. 北方园艺,2013(11):54-55.
- [2] 李 平,郁网庆,杜卫东. 国内外洋葱产业现状与发展动向[J]. 中国果菜,2005(4):39-40.
- [3] 王克安,杨 宁,吕晓惠,等. 洋葱氮磷钾肥配施效应模型构建及其推荐用量研究[J]. 中国土壤与肥料,2015(2):57-62.
- [4] 余 萍,买自珍,马 杰. 氮磷钾不同用量对圆葱干物质积累及产量的影响[J]. 北方园艺,2014(21):12-15.
- [5] 孙 宁. 氮磷钾肥不同配比对圆葱产量的影响[J]. 现代农业科技,2010(11):102.
- [6] 王秀娟,解占军,董 环,等. 高桥地区圆葱“3414”肥效试验研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(11):4579-4580.
- [7] 王子文,张兴敬,何春红,等. 意大利红皮洋葱“帅德”无公害高产栽培技术[J]. 中国种业,2012(7):63-64.
- [8] 赵 锴,李 瑾,徐 宁,等. 氮磷钾配施对洋葱产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(3):558-563.

性变化规律,检测菌种分解纤维素、木质素等的能力,可在一定程度上检测菌种老化、退化、不利变异,杜绝劣质菌种危害菇农,为黑木耳栽培生产提供科学、系统的理论依据,因此研究黑木耳胞外酶在栽培过程中的活性变化规律对菌种优劣显得十分重要^[5-6,8]。一方面通过各菌株培养时间与酶活性变化关系的研究,探讨菌株菌丝生长过程中酶活变化的规律性;另一方面通过纤维素、木质素分解酶类的测定,可检测菌株分解基质能力强弱变化,检测菌株因在非纤维基质中长期生长、保藏、传代引起酶活性退化问题,检测因大量引种、扩繁引起的菌株老化、退化、不利变异的发生以及病毒感染引起菌株退化问题,防止劣质菌种流入市场^[2-3]。有鉴于此,本试验选择栽培性状差异较大的 5 个黑木耳优良菌株,研究栽培过程中菌株胞外漆酶(LAC)、多酚氧化酶(POD)、羧甲基纤维素酶(CMCase)、滤纸纤维素酶(FPase)的酶活性变化,为我国黑木耳栽培用种活力检测、菌种退化及黑木耳栽培工作提供科学系统的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

黑木耳 1~5 号菌株分别为 8808、黑 29、981、黑威 2 号、黑威 4 号,均由辽宁省农业科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.2 培养基

母种培养基(L):马铃薯 200.0 g 煮汁,葡萄糖 20.0 g,磷酸二氢钾 3.0 g,硫酸镁 1.5 g,蛋白胨 0.5 g,维生素 B₁ 10.0 mg,琼脂粉 14.0 g。

1.3 试验方法

原种瓶(500 mL 葡萄糖空瓶)装培养料折合干料约 140 g(湿质量 400 g),栽培袋装培养料折合干料约 280 g(湿质量 800 g),121 ℃ 灭菌 2 h,取母种培养基活化菌种 3 块(3.0 mm × 3.0 mm)接于原种培养料中,25 ℃ 培养 30 d,菌丝发满后以 2% 的接种量接入栽培种培养料中,25 ℃ 培养 70 d,每个菌株各接种 100 袋。分别在菌丝生长 10、20、30、40、50、60、70 d 时取样,每个菌株每个时期取样 3 袋,分别压碎混匀,用于粗酶液制备。

1.5 粗酶液制备

250 mL 三角瓶中装入打碎混匀样品 5.0 g,加蒸馏水 25 mL,25 ℃ 下 150 r/min 浸提 4 h,4 ℃ 离心 10 min(2 500 r/min),上清为粗酶液,4 ℃ 冰箱短期保存,酶活性测定设 1 个空白对照,3 个重复。

均匀取培养一定时间的酶样培养基 5.0 g,加入蒸馏水 25 mL,25 ℃ 下恒温摇床以 150 r/min 浸提 4 h,5 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取上清液为待测酶样。

观察发霉洞穴数。

1.6 酶活测定^[7]

1.6.1 LAC 活性测定 取 13.36 mmol/L 邻联甲苯胺(用 95% 乙醇溶解)0.5 mL 作为底物,加入 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 值为 4.6)3.4 mL,0.5 mL 酶液,28 ℃ 下反应 30 min,于 600 nm 处测吸光度。另取同量酶液,沸水浴 5 min 灭活后作为对照。酶活性单位定义:以 1 g 培养物与底物作用 3 min 内改变 0.1 个吸光度为 1 个酶活性单位(U)。

1.6.2 POD 活性测定 取 0.1 mol/L 邻苯二酚 2.0 mL,加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 6.0)2.0 mL,0.5 mL 酶液,28 ℃ 下反应 30 min,于 400 nm 处测吸光度。另取等量酶液,沸水浴 5 min 灭活后作为对照。酶活性单位定义:以 1 g 培养物与底物作用 30 min 内改变 0.1 个吸光度为 1 个酶活性单位(U)。

16.3 CMCase 活性测定 在试管中加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 1.5 mL,加粗酶液 1.0 mL,50 ℃ 水浴保温 30 min,取出后立即加入二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂)1.5 mL,100 ℃ 水浴 5 min,冷却后加入蒸馏水定容至 25 mL,混匀,测 520 nm 处吸光度。另取同量酶液,沸水浴 5 min 灭活后,作为对照。以不同浓度的葡萄糖溶液与 DNS 试剂反应,测 520 nm 处吸光度,制作葡萄糖标准曲线。酶活性单位定义:以 1 g 培养物中的酶量与底物作用 30 min 释放出 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活性单位(U)。

1.6.4 FPase 活性测定 采用滤纸为底物测定 FPase 活性,分别于酶解管中加入滤纸,0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值为 4.5)1 mL,酶液 1 mL,50 ℃ 下保温 30 min,取出后立即加入 DNS 试剂 1.5 mL,100 ℃ 水浴 5 min,冷却后加蒸馏水至 25 mL,混匀,测 520 nm 处吸光度。另取同量酶液,沸水浴 5 min 灭活后,作为对照。酶活性单位定义:以 1 g 培养物中的酶量与底物作用 30 min 释放出 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活性单位(U)。

2 结果与分析

2.1 不同菌株的产量分析

由图 1 可知,各菌株间产量有明显差别,菌株产量大小排序为黑威 2 号 > 黑威 4 号 > 981 > 8808 > 黑 29,新复极差法求出各菌株间差异性,黑威 2 号显著高于其他菌株($P < 0.05$),黑威 4 号、981 菌株差异并不显著($P > 0.05$),8808、黑 29 菌株产量最低。

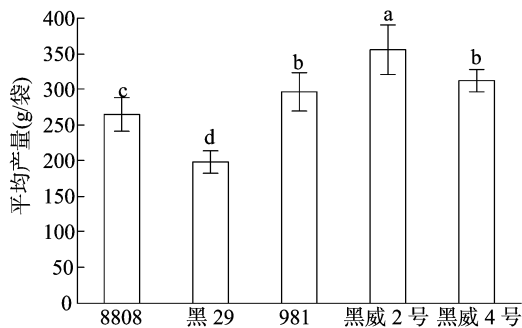


图1 供试菌株的产量

2.2 供试菌株的抗霉性分析

由图 2 可知,各菌株抗霉能力有明显差别,其中菌株抗霉能力大小排序为黑 29 > 8808 > 981 > 黑威 4 号 > 黑威 2 号,黑威 2 号、黑威 4 号、981 菌株抗霉能力较差,8808、黑 29 菌株抗霉能力较强。用新复极差法求出各菌株间抗霉能力差异性,黑威 2 号、黑威 4 号、981 菌株抗霉能力显著低于其他 2 个菌株($P < 0.05$)。

2.3 供试菌株 5 种胞外酶活性分析

2.3.1 LAC 活性变化 5 个供试黑木耳菌株在栽培过程中

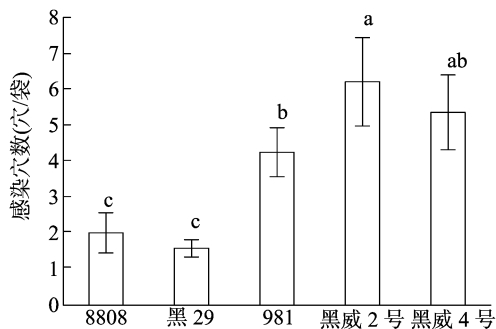


图2 试供菌株抗霉性分析

LAC 活性变化如图 3 所示,由图 3 可知,LAC 活性变化基本趋势一致,981、黑威 2 号、黑威 4 号菌株酶活性较高,981、黑威 4 号酶活性最高峰值出现在培养的 60 d。其他菌株酶活性差别不大,酶活性相对较低的菌株有 8808、黑 29。各菌株酶活性峰值出现的时间不同,5 个供试黑木耳菌株酶活性高峰均出现在培养的 60 d 左右,培养 30 d 以后,酶活性高峰有所波动。

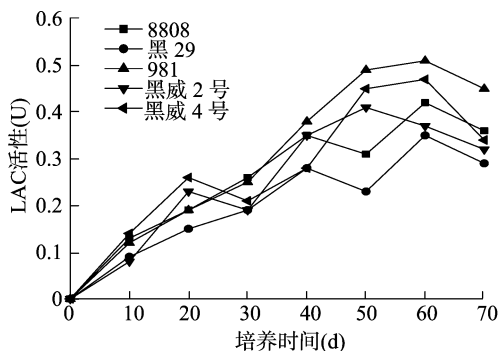


图3 LAC 活性变化

2.3.2 POD 活性的变化 在栽培过程中,5 个供试菌株的 POD 活性有升有降,但总体上呈逐渐上升趋势(图 4)。图 4 中,随着培养时间的延长,981、黑威 2 号、黑威 4 号菌株酶活性较高,50 d 以后 981、黑威 4 号菌株酶活性有所降低,黑威 2 号酶活性在培养的 60 d 达到最大。8808、黑 29 菌株酶活性相对较低,在培养的 20 d 达到最高峰,之后一直维持在较低的水平。

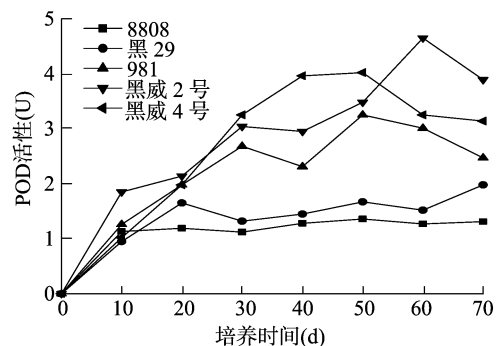


图4 POD活性变化

2.3.3 CMCase 活性变化 CMCase 酶活性随培养时间延长而增加,随后有所降低,降到一定低水平时酶活性又有所升高,呈有交替性的升高下降趋势。图 5 显示,981、黑威 2 号、黑威 4 号菌株酶活性较高,黑威 2 号、黑威 4 号酶活性在培养

的 30 d 达到第 1 个高峰,培养的 50 d 达到第 2 个高峰,之后酶活性最高峰交替波动。8808、黑 29 菌株酶活性相对较低,最高峰出现得比较早,在培养的 30 d 达到最高峰,之后一直维持在较低的水平,在培养的时间内酶活性变化不大。

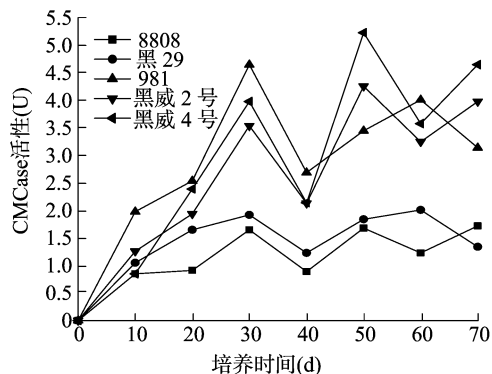


图5 CMCase 活性变化

2.3.4 FPase 活性变化 栽培过程中 FPase 活性变化如图 6 所示,随着栽培时间的延长,981、黑威 2 号、黑威 4 号 FPase 活性迅速升高,而后其峰值交替出现。8808、黑 29 菌株酶活性相对较低,变化幅度也相对较小,20 d 以后趋于稳定的变化趋势,在前 60 d 表现为黑 29 > 8808,60 d 以后表现为黑 29 > 8808。

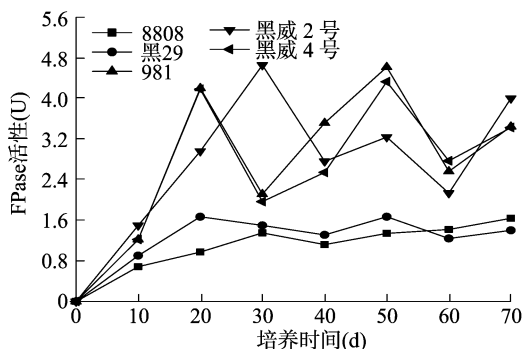


图6 FPase 活性变化

2.4 不同菌株胞外酶相关性分析

相关性分析结果显示(表 1),供试菌株间产量与 CMCase、FPase、LAC 活性呈显著正相关($P < 0.05$),与抗霉性呈显著负相关($P < 0.05$);抗霉性与 CMCase 活性呈极显著负相关($P < 0.01$),与 FPase、LAC、POD 活性呈显著负相关($P < 0.05$);LAC 活性与 CMCase、FPase、POD 活性呈极显著正相关($P < 0.01$);POD 活性与 CMCase、FPase 活性呈极显著正相关($P < 0.01$);CMCase 活性与 FPase 活性呈极显著正相关($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

在黑木耳栽培过程中研究各菌株胞外酶活性变化规律,了解其在整个发育阶段的分泌特点、活性大小、变化规律,推测其不同生长发育阶段对培养基中木质纤维素等大分子营养成分的降解动态,对提高培养料利用率有重要意义^[5-7]。此外,黑木耳栽培过程中合成的各类酶,可使大分子物质降解生成葡萄糖并被食用菌利用,生成各类有机活性物质。研究各菌株在菌丝生长各阶段(母种、原种、栽培种)的酶活性变

表 1 不同菌株胞外酶相关性分析

项目	相关系数					
	产量	抗霉性	LAC 活性	POD 活性	CMCase 活性	FPase 活性
产量	1.000	-0.507 *	0.547 *	0.235	0.589 *	0.512 *
抗霉性		1.000	-0.523 *	-0.603 *	-0.756 **	-0.623 *
LAC 活性			1.000	0.785 **	0.845 **	0.874 **
POD 活性				1.000	0.923 **	0.912 **
CMCase 活性					1.000	0.856 **
FPase 活性						1.000

注：“*”、“**”分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著、极显著。

化规律,找出各菌株在培养过程中酶活性的变化特点,建立各菌株酶活性变化规律基本图谱,绘制某些特定菌株的特定酶活性曲线,了解其酶学基础用于菌株的鉴定工作^[7]。本试验研究显示,被测各菌株酶活性变化存在一定的规律性,这一变化规律表明菌株正常生长的活力。当测定的酶活性及变化规律发生大改变时,就应该考虑停止使用该菌株,并进行栽培试验测试,以检测该菌株是否发生栽培性状的改变。

木质素分解能力与食用菌代谢过程中合成的木质素分解酶有关,LAC、POD 是目前公认的木质素分解酶之一,它能在 O₂ 存在的条件下脱去羟基上的电子或质子形成自由基,导致酚型木质素侧链脱羧或脱氢,造成 C—C 键断裂,从而降解木质素^[2-3]。LAC、POD 是与木质素等大分子物质降解有关的酚氧化酶,它能加速木质素等芳香族高分子化合物的分解^[8-11]。本研究表明,原种培养基中存在丰富的木质素作用底物,黑木耳菌丝生长过程中可向基质中源源不断地分泌 LAC、POD 等木质素酶,当培养菌丝产生的酶积累到一定水平时,表现为酶活性升高,激发酶与底物结合降解木质素,生成小分子而被菌丝生长利用,酶与底物结合后酶活性下降,菌丝生长。在酶活性监测的过程中,随酶活性的升高而降低,能较清晰地看到酶与底物之间的相互作用,这种作用的高低强弱与菌株自身分解基质能力有关,在检测中如果发现某些菌株的酶活性发生异常,就应停止该菌株的大规模生产使用,并进行栽培试验检测。

黑木耳栽培过程中各菌种以分解基质中的纤维素、半纤维素、木质素来满足其生长繁殖所需要的营养,而这些大分子物质须在纤维素酶的作用下才能够分解,培养基中存在大量的纤维素。CMCase 是一种诱导酶,随着菌丝生长发育,菌丝细胞分泌的胞外 CMCase 逐渐增多,因此 CMCase 活性随着培养时间逐渐增加。LAC、POD 活性是与木质素等大分子物质降解有关的酶,本研究显示,LAC、POD 活性随着栽培时间的延长呈上升趋势,与前人的研究结果^[5-7,12-14]一致。试验中 5 个黑木耳菌株的 CMCase、FPase、LAC、POD 活性在菌丝生长

期较低,随着子实体的形成和成熟而逐渐增高,这符合木质素类物质优先利用的推断。5 个供试菌株中,黑 29 产量一般,而本试验测定的 4 种胞外酶活性中该菌株也相对较低,分析低酶活性可能与该菌株退化有关。

参考文献:

[1]唐利华,肖 扬,边银丙. 中国黑木耳主要栽培菌株 ISSR 指纹分析及 SCAR 标记[J]. 菌物学报,2008,27(2):243-251.

[2]李辉平,黄晨阳,陈 强,等. 黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(4):935-940.

[3]张润光,刁小琴,关海宁. 黑木耳营养保健功能及其产品开发[J]. 保鲜与加工,2010(1):54-56.

[4]牛福文,印桂玲. 黑木耳栽培期两种培养基主要组分的降解和有关酶活的变化[J]. 微生物学通报,1990,17(4):201-204.

[5]任广明,李滇华,郭 兴,等. 黑木耳栽培菌株亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 东北林业大学学报,2011,39(5):99-101.

[6]韩增华,张丕奇,孔祥辉,等. 黑木耳胞外酶活变化与栽培性状比较的研究[J]. 食用菌学报,2007,14(4):41-46.

[7]王玉江,韩增华,戴肖东,等. 黑木耳栽培过程中胞外酶活性变化[J]. 食用菌学报,2011,17(4):40-43.

[8]陈艳秋,鹿道富,王 歧,等. 袋料栽培黑木耳与段木栽培黑木耳的品质分析[J]. 食用菌学报,2001,8(1):48-50.

[9]韩增华,张介弛,张丕奇,等. 黑木耳原种胞外酶活性的研究[J]. 生物技术,2009,19(5):14-16.

[10]陈和生,孙振亚. 黑木耳多糖的研究进展[J]. 时珍国医国药,2003,14(5):300-301.

[11]程金良,周丽洁,陈艳秋. 不同培养料栽培黑木耳比较试验初报[J]. 食用菌,2008(3):33-34.

[12]牛福文,印桂玲. 黑木耳栽培期两种培养基主要组分的降解和有关酶活的变化[J]. 微生物学通报,1990,17(4):201-204.

[13]韩增华,张介弛. 六株黑木耳两种同工酶的研究[J]. 中国食用菌,2002,21(6):42-45.

[14]陈锡时,夏 炎. 胞外多糖酶活性和木耳子实体形成的关系[J]. 沈阳农业大学学报,1995,26(4):403-407.