

范博文, 龚教龙, 林俊俊, 等. 碳、氮源对猴头菌菌丝和子实体生长及胞外酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 122–126.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.030

碳、氮源对猴头菌菌丝和子实体生长及胞外酶的影响

范博文, 龚教龙, 林俊俊, 赵莹, 石新新, 唐春双, 王智慧, 李佐同, 杨克军, 赵长江
(黑龙江八一农垦大学农学院/寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江大庆 163319)

摘要:以猴头菌(*Hericium erinaceus*)菌株“RT22”为材料, 研究猴头菌菌丝及子实体原基营养生理特性。将猴头菌接种到不同碳、氮源培养基上培养, 测定其菌丝生长速度、子实体原基品质及胞外酶活性等相关指标。结果发现: 不同碳、氮源对猴头菌菌丝生长速度影响不同, 猴头菌菌丝生长速度较快的处理为葡萄糖、果糖 2 种碳源和酵母膏、酵母浸粉、蛋白胨 3 种氮源。不同碳、氮源对猴头菌子实体原基形成影响不同, 只有葡萄糖、蔗糖 2 种碳源和酵母膏、酵母浸粉、蛋白胨 3 种氮源可以形成子实体原基。不同碳、氮源会导致猴头菌胞外酶活性发生变化, 且胞外酶活性与菌丝干质量存在着正相关关系。

关键词:猴头菌; 碳源; 氮源; 菌丝体; 子实体; 胞外酶活性

中图分类号: S646.906 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0122-05

猴头菌(*Hericium erinaceus*)是我国珍贵的食药兼用真菌^[1], 属于猴菇目猴菇科猴菇属^[2]。猴头菌味道鲜美, 营养丰富, 有“山珍猴头、海味燕窝”之称。近几年, 随着市场需求的增大, 人们对猴头菌的研究也不断加大。但研究主要集中在栽培技术方面, 对猴头菌的生理特性研究较少, 且不具有系统性。赵占国等认为猴头菌菌丝生长最适宜的碳源为葡萄糖和甘露糖, 麦芽糖、淀粉、乳糖等次之^[3]。石勇民等认为猴头菇菌丝在蛋白胨作为氮源的培养基中干质量最大, 酵母膏次之, 并且对于有机氮的利用效果强于无机氮^[4]。何锦星通过利用棉籽壳和酒渣 2 种不同培养料栽培猴头菌, 将所得到的

两种子实体与野生猴头菌子实体进行对比, 发现三者品质都不同, 表明了不同营养对猴头菌子实体品质有一定影响^[5]。目前, 对猴头菌所需不同种类碳、氮源的研究主要集中在菌丝期, 原因是按照传统方法单一碳、氮源固体培养很难形成子实体, 而吴政声用液体培养在 9 种食用菌中做出菇试验, 成功形成子实体^[6]。将液体培养与探究碳、氮源对猴头菌营养利用相结合, 能更深一步了解不同营养对猴头菌理化性质的影响。本试验通过探究不同碳、氮源对猴头菌菌丝和子实体生长以及胞外酶的影响, 为猴头菌营养利用规律提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

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 培养基

基础培养基(蛋白胨葡萄糖琼脂培养基): 蛋白胨 2.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 维生素 B₁ 0.5 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 000.0 mL。

碳源固体培养基: 将基础培养基中葡萄糖分别用供试碳源(麦芽糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉、纤维素、果糖)替代, 供试碳源浓度为 20 g/L。

碳源液体培养基: 去掉固体培养基配方中琼脂, 并将基础

收稿日期: 2017-03-22

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(编号: ZY16A06); 黑龙江省应用技术与开发计划(编号: GZ13B018); 黑龙江省大庆市创新能力建设项目(编号: SJH-2013-35); 农垦总局科技攻关项目(编号: HNK135-02-05); 黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(编号: YJSCX2016-Y01)。

作者简介: 范博文(1992—), 男, 黑龙江克山人, 硕士研究生, 主要从事食用菌栽培研究。E-mail: 1227507946@qq.com。

通信作者: 李佐同, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物高产栽培技术理论与秸秆循环再生利用, E-mail: lxx6401999@163.com; 赵长江, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为作物逆境生理生化及秸秆循环再生利用, E-mail: zhaocj15@126.com。

photosynthesis for winter wheat[J]. Photosynthetica, 2008, 46(4): 637–640.

[8] Farquhar G D, Caemmerers S, Berry J A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species[J]. Planta, 1980, 149(1): 78–90.

[9] Yu Q, Zhang Y Q, Liu Y F, et al. Simulation of the stomatal conductance of winter wheat in response to light, temperature and CO₂ changes[J]. Annals of Botany, 2004, 93(4): 435–441.

[10] 叶子飘. 光合作用对光和 CO₂ 响应模型的研究进展[J]. 植物生态学报, 2010, 34(6): 727–740.

[11] 邱国雄. 植物光合作用的效率[C]//余文叔. 植物生理学和分子生物学. 北京: 科学出版社, 1992: 236–243.

[12] 王富刚, 徐伟洲, 亢福仁, 等. 不同坡向条件下小叶杨光合响应曲线研究[J]. 水土保持研究, 2015, 22(6): 177–182.

[13] 德庆措姆, 高松. 红颜草莓不同距离分株对光强和 CO₂ 浓度的响应特征[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 208–210.

[14] 陈晓亚, 薛红卫. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012, 6: 267–279.

[15] 毕玉伟, 秦俊, 王奎玲, 等. 不同季节风丹光合特性的初步研究[J]. 天津农业科学, 2011, 17(1): 18–21.

培养基中葡萄糖分别用供试碳源(麦芽糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉、纤维素、果糖)替代。供试碳源浓度为 20 g/L。

氮源固体培养基:将基础培养基中蛋白胨分别用供试氮源(苯丙氨酸、谷氨酰胺、硝酸铵、尿素、蛋白胨、酵母膏、酵母浸粉)替代,供试氮源浓度为 2 g/L。

氮源液体培养基:去掉固体培养基配方中琼脂,并将基础培养基中蛋白胨分别用供试氮源(苯丙氨酸、谷氨酰胺、硝酸铵、尿素、蛋白胨、酵母膏、酵母浸粉)替代,供试氮源浓度为 2 g/L。

1.3 猴头菌生长试验

1.3.1 猴头菌菌丝生长试验 菌种活化后,取直径 5 mm 的菌种块,接种到固体培养基上,温度 25 ℃避光培养,之后测定菌丝生长指标。试验均采用直径 90 mm 的培养皿,其中培养基用量 20 mL/皿。每个处理 3 次重复。

1.3.2 猴头菌子实体原基生长试验 菌种活化后,取直径 5 mm 的菌种块,接种到液体培养基中(每瓶接种 10 个菌种块),温度 25 ℃避光培养 20 d 后,测定菌丝生长指标。菌丝移入温度 18 ℃、光照 800 ~ 1 000 lx 条件下出菇。出菇期第 25 天(此时形成子实体处理中九成达到要求)收集子实体原基,测定其品质;吸取培养液,8 000 r/min、4 ℃离心 10 min,取上清液测定其酶活性。每个处理 3 次重复。

1.4 指标测定

1.4.1 生长指标测定 固体培养第 15 天测菌丝生长速度,固体和液体培养第 20 天,取菌丝(固体菌丝用刀片刮下)80 ℃烘干至恒质量,称取干重。

1.4.2 子实体原基品质相关指标测定

1.4.2.1 还原糖含量测定 取 3 g 样品,加入 50 mL 蒸馏水,置于 50 ℃恒温水浴中保温 20 min,使还原糖浸出,定容至 100 mL。在 U3900 型紫外可见分光光度计(日立)540 nm 波长处测吸光度^[7]。

1.4.2.2 可溶性糖含量测定 取干样 0.1 g,加 5 ml 蒸馏水,沸水中提取 30 min,提取液过滤定容至 25 mL 容量瓶中。吸取样品提取液 0.5 mL 于 20 mL 刻度试管中,加蒸馏水 1.5 mL,在 U3900 型紫外可见分光光度计 630 nm 波长处测吸光度^[7]。

1.4.2.3 蛋白含量测定 取 0.5 g 样品,加入 2 mL 蒸馏水,研磨制匀浆,再加 6 mL 蒸馏水洗涤后转移到离心管,室温放置 0.5 ~ 1.0 h 充分提取,然后在 4 000 r/min 离心 20 min,转移上清液并定容至 10 mL 容量瓶中,即为提取液。取 0.1 mL 提取液,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂,放置 2 min 后,在 U3900 型紫外可见分光光度计以 595 nm 波长处测吸光度^[7]。

1.4.3 胞外酶活力测定

1.4.3.1 羧甲基纤维素酶活性测定 取 0.5 mL 酶液和 1.5 mL pH 值为 4.6 的羧甲基纤维素钠溶液混合,置于 40 ℃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。U3900 型紫外可见分光光度计以 540 nm 波长处测定吸光度^[7]。

1.4.3.2 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 ℃水浴锅保温 1 h,取出加入 2 mL DNS 试剂,煮沸 5 min。取出待定容至 20 mL,以煮沸灭活的酶液作对照在 U3900 型紫外可见分光光度计 540 nm 波

长处测定吸光度^[8]。

1.4.3.3 淀粉酶活性测定 将 0.5 mL pH 值为 5.6 的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液和 0.5 mL 酶液混合匀后 40 ℃水浴 15 min,加入 40 ℃1 % 的可溶性淀粉 1 mL,混匀,40 ℃水浴 5 min,加入 2 mL 0.4 mol/L 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,在 U3900 型紫外可见分光光度计 520 nm 波长处测吸光度^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同碳、氮源对猴头菌菌丝生长的影响

研究发现,不同碳源处理对猴头菌丝生长有明显影响(图 1,表 1)。几种碳源菌丝日均生长速度从高到低顺序是果糖 > 葡萄糖 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 淀粉 > 乳糖 > 纤维素。其中,以果糖或葡萄糖为碳源,猴头菌菌丝生长较好,菌丝日均生长速度分别为 0.54、0.51 cm/d。以纤维素为碳源,猴头菌菌丝生长最差,菌丝日均生长速度为 0.15 cm/d。

不同氮源处理对猴头菌丝生长也有明显影响(图 1,表 2)。几种氮源菌丝日均生长速度从高到低顺序是酵母浸粉 > 酵母膏 > 蛋白胨 > 谷氨酰胺 > 硝酸铵 > 苯丙氨酸 > 尿素。其中,以酵母浸粉、酵母膏和蛋白胨为氮源,猴头菌菌丝生长较好,菌丝日均生长速度分别为 0.56、0.54、0.51 cm/d。以尿素为氮源,猴头菌菌丝生长最差,菌丝日均生长速度为 0.03 cm/d。

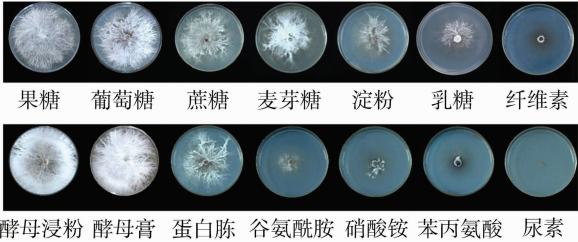


图1 不同碳、氮源对猴头菌丝生长的影响

表 1 不同碳源对菌丝生长速度的影响

碳源	菌丝日均生长速度 (cm/d)	差异显著性	
		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
果糖	0.54	a	A
葡萄糖	0.51	ab	AB
蔗糖	0.48	b	ABC
麦芽糖	0.47	bc	BC
淀粉	0.43	c	C
乳糖	0.33	d	D
纤维素	0.15	e	E

2.2 不同碳、氮源对猴头菌子实体原基品质的影响

将猴头菌进行液体培养后,只有葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母浸粉、酵母膏 5 个处理可以形成子实体原基。因此,仅对这 5 个处理的子实体原基品质进行测定。

2.2.1 不同碳、氮源对猴头菌子实体原基还原糖含量的影响

还原糖是指具有还原性的糖类,包括葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖等。研究发现,氮源的还原糖含量高于碳源的还原糖含量,酵母浸粉和酵母膏的还原糖含量较高,且酵母浸粉

表 2 不同氮源对菌丝生长速度的影响

氮源	菌丝日均生长速度 (cm/d)	差异显著性	
		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
酵母浸粉	0.56	a	A
酵母膏	0.54	a	A
蛋白胨	0.51	a	A
谷氨酰胺	0.30	b	B
硝酸铵	0.24	b	B
苯丙氨酸	0.12	c	C
尿素	0.03	d	D

的还原糖含量最高。葡萄糖、蔗糖和蛋白胨的还原糖含量较低,显著低于酵母浸粉和酵母膏,且蔗糖的还原糖含量最低(图 2)。

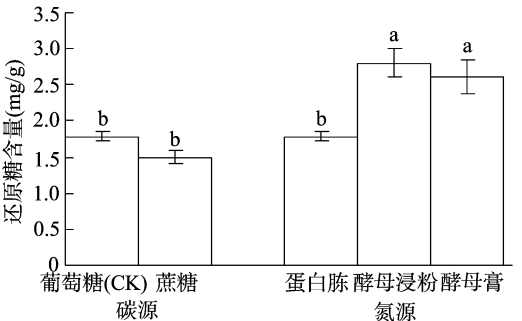
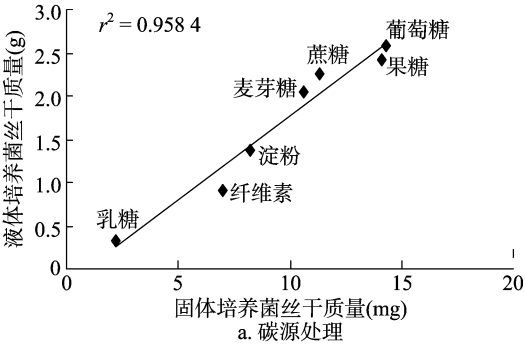


图 2 猴头菌子实体还原糖含量

2.2.2 不同碳、氮源对猴头菌子实体原基可溶性糖含量的影响 可溶性糖就是易溶于水的糖,包括绝大部分的单糖、寡糖。研发发现,酵母膏可溶性糖的含量最高,显著高于其他处理;蔗糖的可溶性糖含量次之;酵母浸粉、葡萄糖和蛋白胨可溶性糖含量在同一水平,且蛋白胨的可溶性糖含量最低(图 3)。

2.2.3 不同碳、氮源对猴头菌子实体原基可溶性蛋白含量的影响 可溶性蛋白指可以以小分子状态溶于水或其他溶剂的蛋白,是重要的渗透调节物质和营养物质。研究发现,整体来



a. 碳源处理

看,氮源处理的可溶性蛋白含量低于碳源处理。蔗糖处理的 可溶性蛋白含量最高,显著高于其他处理;葡萄糖和蛋白胨处理处于同一水平,可溶性蛋白含量仅次于蔗糖处理;酵母膏处理的可溶性蛋白含量最低(图 4)。

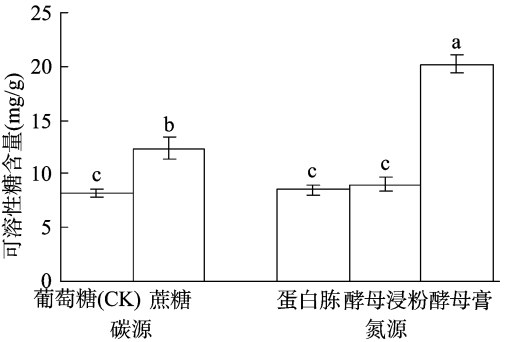


图 3 猴头菌子实体可溶性糖含量

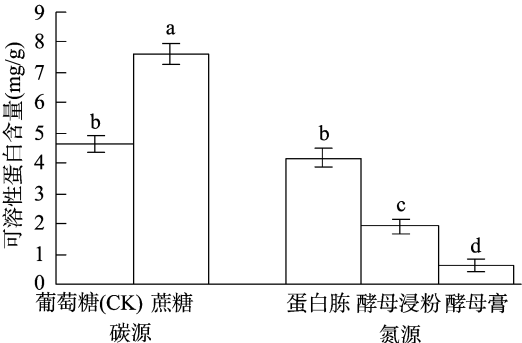
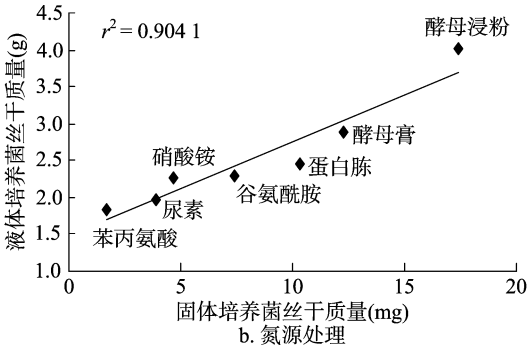


图 4 猴头菌子实体可溶性蛋白含量

2.3 猴头菌菌丝固体培养与液体培养干质量比较

试验结果表明,菌丝固体培养与液体培养具有较高的相关性。碳源菌丝干质量由大到小顺序为葡萄糖>果糖>蔗糖>麦芽糖>淀粉>纤维素>乳糖,其 r^2 值为 0.958 4。氮源菌丝干质量由大到小顺序为酵母浸粉>酵母膏>蛋白胨>谷氨酰胺>硝酸铵>尿素>苯丙氨酸,其 r^2 值为 0.904 1(图 5)。



b. 氮源处理

图 5 菌丝固体培养与液体培养干重比较

2.4 不同碳、氮源对猴头菌胞外酶活性的影响

2.4.1 不同碳、氮源对羧甲基纤维素酶活性的影响 羧甲基纤维素酶表征了纤维素酶的活性。纤维素酶是一种复合酶,是胞外酶的重要组成部分。试验结果表明,尿素处理的羧甲基纤维素酶活性最强;酵母浸粉、蛋白胨、葡萄糖、果糖处理的羧甲基纤维素酶活性较强,且处于同一水平;乳糖、苯丙氨酸、谷氨酰胺处理羧甲基纤维素酶活性次之;麦芽糖、酵母膏处理羧甲基纤维素酶活性较弱;淀粉和纤维素处理羧甲基纤维素

酶活性最弱,且与其他处理差异显著(图 6)。

2.4.2 不同碳、氮源对半纤维素酶活性的影响 半纤维素酶是一种重要的复合酶,能将构成植物细胞膜的多糖类(纤维素和果胶物质除外)加水分解的各种酶的总称。试验结果表明,谷氨酰胺和硝酸铵处理的半纤维素酶活性最强;尿素和苯丙氨酸处理的半纤维素酶活性较强;蛋白胨、酵母浸粉、乳糖和葡萄糖诱导半纤维素酶活性在同一水平;酵母膏、蔗糖、果糖、淀粉和纤维素处理半纤维素酶活性最弱(图 7)。

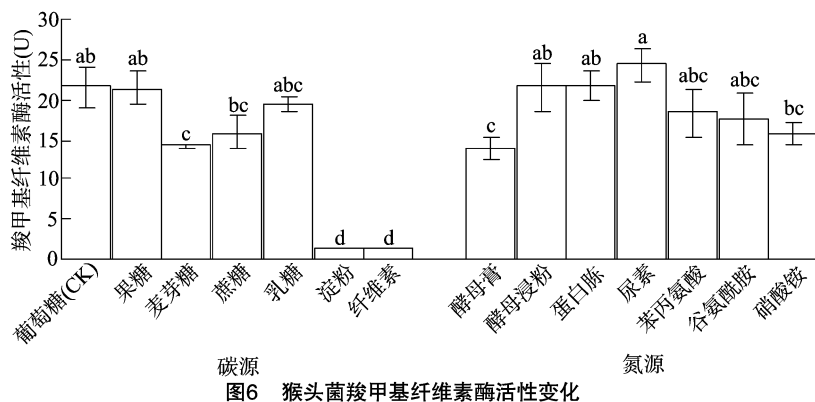


图6 猴头菌羧甲基纤维素酶活性变化

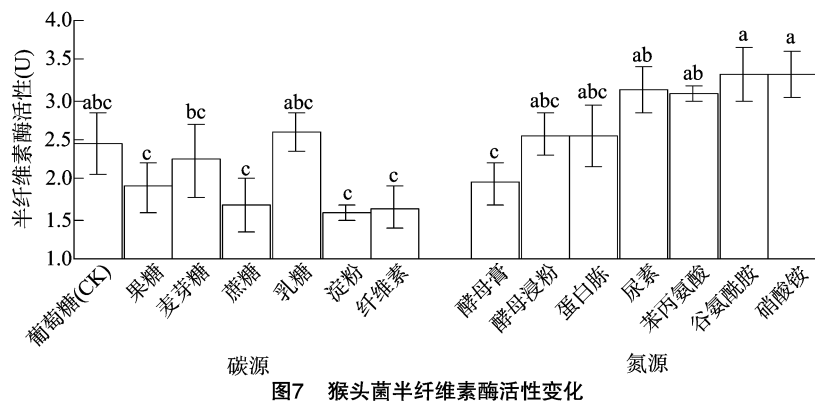


图7 猴头菌半纤维素酶活性变化

2.4.3 不同碳、氮源对淀粉酶活性的影响 淀粉酶是指一类能催化分解淀粉(包括糖原、糊精等)糖苷键的酶的总称。试验结果表明,谷氨酰胺和苯丙氨酸处理的淀粉酶活性最强;硝酸铵处理的淀粉酶活性次之;葡萄糖、麦芽糖、酵母浸粉和蛋

白肽处理的淀粉酶活性较强;果糖、蔗糖、乳糖、酵母膏和尿素诱导淀粉酶活性在同一水平;淀粉和纤维素淀粉酶活性最弱,且与其他处理差异显著(图8)。

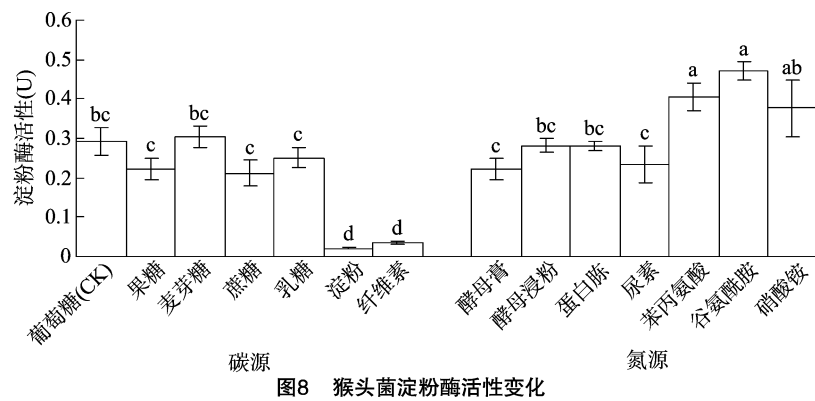


图8 猴头菌淀粉酶活性变化

3 讨论

本试验结果表明,猴头菌菌丝单糖、双糖、多糖均可以利用。其中以果糖、葡萄糖为碳源的效果较好,蔗糖为碳源的次之,所得到的结论与贾素巧的研究结果^[10]相似。猴头菌利用单糖效果好于双糖,双糖效果好于多糖,可能是因为小分子物质可以直接被吸收利用,大分子物质需要胞外酶分解后才可利用。同时本研究也发现,在有机氮培养基中,猴头菌菌丝生长快,与肖光辉等结论^[11]相同,可能是因为有机氮源中含有丰富的蛋白质、多肽和氨基酸,水解后提供了可被直接利用的氨基酸。当使用无机氮为氮源时,菌丝必须利用无机氮合成

其需要的各种氨基酸,而某些氨基酸几乎或完全不能生物合成,所以菌丝长势缓慢^[12]。猴头菌固体培养料中含营养成分较为丰富,无法试验单独某一种营养对猴头菌子实体品质的影响。运用液体培养法,在营养液中培育出猴头菌子实体^[13],可以探究不同碳、氮源对猴头菌子实体的影响。试验结果表明,在可形成子实体的碳源处理中,可溶性糖含量和可溶性蛋白含量变化趋势相同,都是蔗糖含量高于葡萄糖。而在可形成子实体的氮源处理中,可溶性糖含量、可溶性蛋白含量和还原糖含量变化差别较大,说明氮源对子实体品质的影响较大。

胞外酶是细胞内合成在细胞外起作用的一类酶^[14],食用

菌利用胞外酶分解培养料中的营养物质。木质纤维素是大分子物质,被分解成小分子物质后才能被食用菌吸收利用,食用菌主要通过分泌相关的木质纤维素酶将木质纤维素最终降解为还原糖^[15],且已有研究指出纤维素酶活性最高值、最低值与子实体产量相关^[16]。在本试验中猴头菌菌丝在不同碳、氮源培养基中分泌的酶活性不同。其中,羧甲基纤维素酶在尿素处理中产生的活性最高;半纤维素酶在谷氨酰胺和硝酸铵 2 个处理中产生的活性较高;淀粉酶在苯丙氨酸和谷氨酰胺 2 个处理中产生的活性较高。羧甲基纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶的整体趋势都是氮源处理诱导酶活性高于碳源处理,表

明某些氮源可以提高菌丝胞外酶活性。

将生长指标与胞外酶活性聚类分析,羧甲基纤维素酶活性与液体培养菌丝干质量相关性较高,半纤维素酶活性和淀粉酶活性相关性较高(图 9)。菌丝日生长速度对胞外酶活性影响较小。从供试猴头菌生长指标来看,氮源酵母膏、酵母浸粉、蛋白胨和碳源蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖配合效果较好。另外供试碳源和氮源对菌丝干质量积累与羧甲基纤维素酶活性影响趋势相近,表明羧甲基纤维素酶可能在菌丝干重积累过程中发挥重要的作用。供试的 3 种酶活性在不同碳、氮源情况下,可能均优先供应干物质积累。

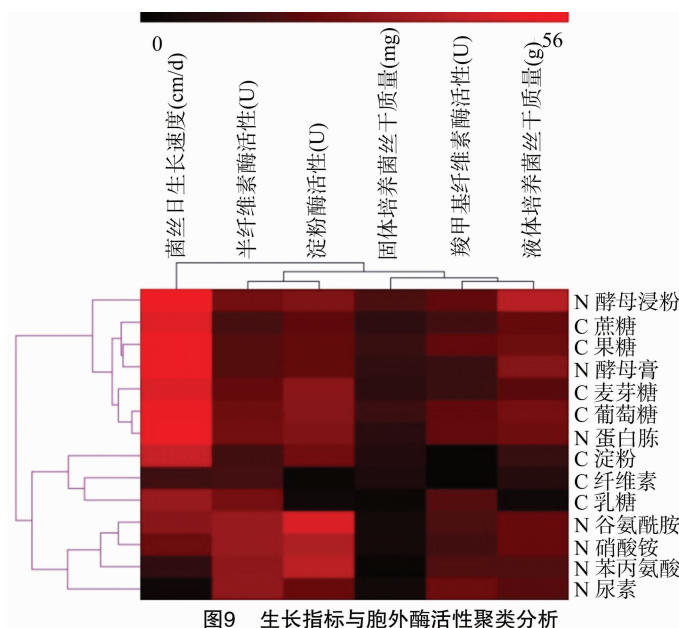


图9 生长指标与胞外酶活性聚类分析

参考文献:

- [1] 林树钱. 中国药用菌生产与产品开发[M]. 北京:中国农业出版社,2000:284.
- [2] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:中国协和医科大学联合出版社,1997:52.
- [3] 赵占国,杨秀兰,王维杨. 猴头菌丝生理特性的研究[J]. 中国食用菌,1988(1):5-6.
- [4] 石勇民,丁彦怀,马麟祥. 液体培养猴头菌对碳氮源的利用试验[J]. 食用菌,1992,1(1):15-16.
- [5] 何锦星. 猴头菌的生物学特性与生产工艺[J]. 福建农业科技,1990,27(2):27-30.
- [6] 吴政声. 水培法在食用菌出菇试验中的应用研究[J]. 中国食用菌,1992(2):24-36.
- [7] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:141-179.
- [8] 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,2004,23(5):48-52.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 肖光辉,吴德喜,李青. 猴头菌对碳、氮营养的利用[J]. 食用菌学报,1995,2(2):27-32.
- [12] 陈石良,谷文英,陶文沂. 液体培养灰树花碳氮营养的研究[J]. 食用菌,1999,6(6):3-5.
- [13] 朱忠贵,董亚萍. 一种猴头菇水培方法:中国,CN102318545A[P]. 2012-01-18.
- [14] Gianfreda L, Rao M. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils; a review[J]. Enzyme and Microbial Technology,2004,35(4):339-354.
- [15] 袁胜东. 猴头菌生长过程中基质内营养物质含量和胞外酶活研究[D]. 雅安:四川农业大学,2012.
- [16] 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.