

构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化

王 玉 万

(本溪师范专科学校, 本溪)

王 云

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳)

摘要 本文分析了构菌在木屑-麦麸基物上生长发育期间, 基物主要组分的降解和几种多糖分解酶活性的变化。结果表明, 菌丝体迅速生长期呼吸强度最大, 在菌丝长满基物到子实体发生期间的呼吸强度很小, 子实体发育期呼吸强度再次升高。在以新鲜木屑为主要基物时, 构菌对基物中的纤维素和半纤维素的分解作用较弱, 并且构菌仅有很微弱的木素分解能力。胞外羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶, 木聚糖酶、果胶酶和淀粉酶的活性存在于构菌整个栽培过程, 在菌丝体迅速生长期淀粉酶活力较高, 在菌丝长满基物后活力明显下降, 其它四种酶的活性变化规律与淀粉酶活性变化规律正好相反。这说明, 菌丝体生长发育主要利用基物中的淀粉(由麦麸提供), 而后才动用一定量的木质纤维素为碳源。

关键词 构菌; 木质纤维素降解; 纤维素酶; 木聚糖酶; 果胶酶; 淀粉酶

构菌是一种具有较高营养价值的食用菌。人工栽培构菌主要以木屑为基质。但是关于构菌在木屑上生长期间, 基质中主要组分的降解情况和与碳素代谢直接相关的几种多糖分解酶活性的变化规律则缺少研究。本文将重点探讨构菌在木屑-麦麸基物上生长发育过程中, 培养基中木素、半纤维素、纤维素的降解, 呼吸强度以及培养基中羧甲基纤维素酶(CMC酶)、滤纸纤维素酶(FP酶)、木聚糖酶、淀粉酶和果胶酶的活性变化规律, 目的为进一步研究构菌营养生理和栽培实践提供科学资料。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

实验用的构菌 (*Flammulina velutipes*) 为上海食用菌研究所提供的商品化菌种。

(二) 培养

于250 ml三角瓶中加入阔叶树锯木屑40.00 g, 麦麸10.00 g, 水100 ml, 于121℃灭菌1小时, 接种后在24℃培养18天, 而后取出

于12℃培养。

(三) 组分分析

培养基失重和木素、半纤维素、纤维素含量的测定均按文献[1]中的方法进行。

(四) 酶活性测定

1. CMC酶、FP酶和木聚糖酶的活性测定按文献[2]中的方法进行。CMC酶活力单位为: $1u = 1 \text{ mg 葡萄糖}/30 \text{ min} \cdot \text{g 干曲}$ 。FP酶的活力单位为: $1u = 1 \text{ mg 葡萄糖}/60 \text{ min} \cdot \text{g 干曲}$ 。木聚糖酶活力单位为: $1u = 1 \text{ mg 木糖}/30 \text{ min} \cdot \text{g 干曲}$ 。

2. 淀粉酶活性测定: 取0.5%的可溶性淀粉溶液(用pH 5.8、0.1 mol/L的乙酸盐缓冲液配制)1.5 ml于试管中, 加入适当稀释的粗酶液0.5 ml, 混匀, 于38℃水浴中准确保温30分钟, 取出后立即加入1.5 ml DNS试剂, 于100℃水浴中加热5分钟, 冷却后加入21.5 ml蒸馏水, 混匀, 于520 nm处测E值, 由标准曲线查得其糖量。对照管在加入DNS试剂后, 再加入0.5 ml酶液, 其它操作与样品管相同。淀粉酶活

力单位为: 1u=1mg 葡萄糖/30min · g 干曲。

3. 果胶酶活性测定: 于样品管中加入 1% 的果胶溶液(从桔子中提取的果胶, 用 0.1 mol/L、pH 4.5 的乙酸缓冲液配制 71.5 ml, 酶液 0.5 ml, 于 50℃ 反应 30 分钟, 其后操作与淀粉酶活性测定相同。酶活力为: 1u = 1mg 半乳糖醛酸/30 min · g 干曲。

结果与讨论

实验过程中观察到, 菌丝体在第 18—19 天长满基质, 第 23—25 天发生子实体原基, 第 38 天头潮菇成熟, 第 50 天左右二潮菇发生, 62 天二潮菇采收结束, 72 天左右发生三潮菇, 85 天左右收获结束。第三潮菇产量很低, 故本文仅讨论 0—62 天期间基物中主要组分的含量和有关酶活力的变化。

(一) 基物失重与呼吸消耗的有机质

从表 1 可见, 培养 62 天期间, 基物失重为 8.22 g, 其中呼吸作用消耗了 4.22 g, 另 4.00 g 转化为子实体生物量, 由此可算出, 子实体转化率为 9% (占基物重量百分比), 呼吸消耗的有机质与子实体干物质的比值接近 1:1, 产量系数(子实体干重/基物失重×100%) 为 49%。这比我们在相同条件下培养的平菇、灵芝、贝叶多孔菌、猴头等食用菌的产量系数(上述菌分别为 18—23%、30% 左右、35% 左右、20—25%) 要高得多, 这说明构菌在木屑-麦麸基物上生长过程中, 能比较经济的利用栽培基物中的营养

物质, 即基物中的有机质更多的去用于子实体干物质的积累, 而不是更多的以呼吸形式消耗掉, 构菌的这种特性可以弥补其对木屑中木质纤维素分解作用较差的缺点(后边将讨论)。

从表 1 还可看出, 0—18 天期间由于呼吸消耗的有机质最多, 而在菌丝体长满基物至原基发生这段时间, 呼吸作用很低, 由呼吸消耗的有机质仅为 0.02 g, 在子实体发育阶段呼吸强度再次升高。这一结果表明, 在菌丝体迅速生长期和子实体发育阶段需要的空气量相对的多于其它阶段。

(二) 木质纤维素与非木质纤维素组分的转化利用

1. 木素的降解: Zadrzail 报导, 构菌在小麦秆上生长 60 天期间, 木素没有被降解^[3]。但有些资料介绍, 构菌能利用木材中的木素^[4,5], 并且认为构菌分解木素的能力很强^[6]。本实验结果表明, 培养 62 天期间, 基物中木素仅减少了 0.74 g。我们又采用了河北省微生物研究所的 F₁ 号菌株, 日本菌株、AS 5.80 菌株、三明 1 号菌株和四川的 W₁₁ 菌株进一步实验, 结果表明, 培养 60 天期间, 上述 5 个菌株培养物中木素减少量仅占基物中木素总量的 3—8% 左右。为此, 我们认为, 构菌仅有十分微弱的木素分解活性。从构菌的纤维素酶和木聚糖酶活力较高这方面来看, 构菌应为木腐菌中的褐腐菌类。

2. 纤维素与半纤维素的降解: 由表 1 可见, 基物中纤维素降解量大于半纤维素降解量。

表 1 构菌培养期间基物中几种组分含量变化

培养时间 (d)	0	12	18	25	38	62
培养基重 (g, 下同)	44.71	43.59	41.85	41.83	38.50	36.49
子实体干重					2.39	1.61
培养基失重		1.11	2.85	2.87	6.21	8.22
呼吸消耗*		1.11	2.85	2.87	3.82	4.22
纤维素含量	18.15	17.97	—	17.42	15.62	15.00
纤维素减少		0.17	—	0.72	2.52	3.14
半纤维素含量	8.38	8.02	—	7.63	7.20	6.61
半纤维素减少		0.35	—	0.74	1.17	1.76
木素含量	7.24	7.23	—	6.91	6.79	6.50
木素减少		0.0001	—	0.32	0.44	0.73

* 呼吸消耗 (g) = 培养基失重 - 子实体干重

但是 0—62 天期间纤维素和半纤维素的降解量都不多,仅占基物中两者总量的 17—20% 左右。我们测定过木耳、猴头、贝叶多孔菌、灵芝、白芝、紫芝、薄树芝和糙皮侧耳等白腐菌的纤维素酶和半纤维素酶的活性,并且同时测定了培养物中纤维素和半纤维素的降解率。结果是,这些菌种的半纤维素酶远比构菌的低 8—20 倍,CMC 酶和 FP 酶活性比构菌的低 2—3 倍(木耳菌)或接近(灵芝等菌种)。但是这些菌类的木屑培养物中半纤维素和纤维素的降解率却高于构菌培养物。我们认为,这和构菌分解木素能力太低而白腐菌分解木素能力较强有关,因为在木屑中,木素、半纤维素、纤维素三者以复合体形式存在,并且木素包围着纤维素且和半纤维素有着共价关系,为此,木素对于纤维素和半纤维素的酶解过程必然存在着一定的物理性障碍作用^[1]。其二是,构菌在纤维分解酶活开始升高时便进入了低温培养阶段,低温环境无疑也会降低纤维素和半纤维素的酶解率。除了上述这两种原因之外,很可能还和构菌本身分解代谢强度较低有关。我们最近的实验表明,在纤维分解酶活性基本相同的情况下,菌株总的分解代谢强度越大(以基物中有机质减少量来估测)基物中纤维素和半纤维素的降解量也越多。关于这一现象的生理生化机制尚不清楚。但是,这些实验结果可以说明:只从纤维分解酶的活力高低去判断纤维分解菌分解利用纤维素和半纤维素的实际能力是不全面的。

3. 培养不同阶段木质纤维素的降解量与基物失重量的比值:测定培养不同阶段木质纤维素减少量与基物失重量的比值,可反应出菌株对基物中木质纤维素与非木质纤维素组分的利用规律,进而可为栽培料中附加物(如麦麸等)加入量的确定提供部分科学根据。从表 1 中有关数据可算出,0—12 天期间的比值为 0.42,12—25 天的比值为 0.72,25—38 天为 0.70,38—62 天为 0.75。这些数据说明:(1)构菌栽培过程中的不同发育阶段所利用的碳源都有一部分来自于基物中的非木质纤维素组分。(2)培养最初阶段菌体利用非木质纤维素组分较

多。(3)在子实体发育阶段,菌体利用的营养物质中约有 30% 是由基物中非木质纤维素组分提供的。木屑-麦麸基物中的非木质纤维素组分主要来自于麦麸。由此可见,用木屑栽培构菌时,适当增加麦麸含量可以提高子实体产量的原因不仅仅是因为提高了基物中的含氮量,还与基物中易为构菌利用的碳源(本研究发现,构菌淀粉酶活较高,这与有关资料介绍的淀粉是构菌的良好碳源是一致的^[9]。而麦麸中淀粉含量是很高的)的增加有着更为密切的关系。根据这些结果分析,我们认为,加入基物中易于利用的碳源量最低应大于基物中菌丝体的最大生物量,否则难于提高子实体产量(指用木屑栽培而言)。

(三) 构菌栽培过程中几种酶活的变化

为了了解构菌生长发育期间对基物降解的生理生化基础,我们测定了 0—85 天期间培养物中胞外淀粉酶、果胶酶、CMC 酶、FP 酶和木聚糖酶这 5 种酶活性的动态变化,结果示于图 1。

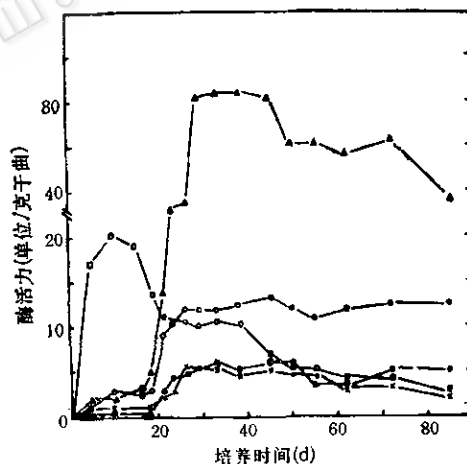


图 1 构菌栽培过程中几种酶活性的变化

△ 木聚糖酶 □ 淀粉酶 ○ CMC 酶 ● FP 酶
× 果胶酶

从图 1 可见:

1. 淀粉酶、果胶酶、CMC 酶、FP 酶和木聚糖酶的活性存在于构菌整个栽培周期。

2. 淀粉酶活性高峰出现于培养的最初阶段(5—15 天);在淀粉酶活性下降时(19—20 天),果胶酶、CMC 酶、FP 酶、木聚糖酶的活性开

表 2 培养温度对构菌几种胞外多糖分解酶活性的影响*

培养时间(天)	8	12	17	19	21	24	26	30	33	38	44
I 组											
CMC酶(u,下同)	0.47	0.63	2.00	6.32	6.20	7.13	11.46	12.68	14.03	15.00	15.32
FP 酶	0	0	0.67	1.75	1.75	3.04	4.66	4.33	4.50	4.83	4.56
木聚糖酶	0.71	0.44	2.23	10.18	9.08	9.53	26.55	45.89	45.98	61.00	65.00
淀粉酶	18.42	9.56	9.46	9.87	6.55	4.56	5.03	2.57	3.27	3.10	3.11
果胶酶	2.44	2.81	2.85	5.85	5.10	4.63	5.61	4.33	4.68	—	—
II 组											
CMC 酶			2.11	6.39	8.51	9.15	12.02	13.17	13.92	14.81	14.36
FP 酶			1.21	2.88	2.63	4.61	6.40	6.49	5.64	6.03	—
木聚糖酶			1.81	9.07	14.59	15.44	35.61	46.84	45.45	48.82	53.02
淀粉酶			6.88	6.67	6.64	6.85	6.95	6.55	6.46	6.46	—
果胶酶			2.77	5.61	6.39	5.15	5.98	5.38	—	—	—
III 组											
CMC 酶					7.74	12.63	12.51	16.47	16.88	—	16.29
FP 酶					2.21	4.29	4.27	6.30	5.99	—	—
木聚糖酶					13.95	33.94	36.75	81.55	84.40	—	73.27
淀粉酶					6.55	5.96	5.77	5.40	5.81	—	—
果胶酶					5.87	5.98	6.01	5.73	5.73	—	—

* I 组于 24℃ 培养 44 天; II 组于 24℃ 培养 12 天后于 12℃ 培养; III 组于 24℃ 培养 19 天后于 12℃ 培养。

CMC 酶、木聚糖酶、淀粉酶、果胶酶的活力单位: 1u = 1mg 还原糖/30min · g 干曲。

FP 酶的活力单位: 1u = 1mg 葡萄糖/60 min · g 干曲。

表 3 构菌 AS 5.80、三明 1 号和 W₁₂ 菌株栽培过程中基物中几种多糖分解酶的活性变化*

培养时间(天)	8	13	18	22	28	37	52	62	80
AS 5.80 菌株									
CMC 酶(u,下同)	2.36	1.24	0.70	5.38	9.45	8.89	15.32	16.18	16.01
FP 酶	—	—	0.09	1.23	2.22	2.46	4.50	3.31	3.32
木聚糖酶	0.81	—	3.17	14.56	41.76	89.99	81.01	80.01	61.11
淀粉酶	6.74	17.95	17.02	8.14	7.79	6.32	5.38	6.66	6.23
三明 1 号菌株									
CMC 酶	2.39	2.84	2.34	7.25	15.02	17.53	17.19	16.97	16.29
FP 酶	—	—	0.07	0.94	4.43	4.97	6.02	4.92	4.00
木聚糖酶	0.44	0.53	3.34	13.86	50.11	88.41	95.86	82.22	52.25
淀粉酶	7.16	10.99	18.30	8.89	8.07	6.78	8.89	6.82	7.13
W ₁₂ 菌株									
CMC 酶	2.46	1.51	1.75	5.78	5.61	15.16	14.01	15.18	14.99
FP 酶	—	—	1.01	1.05	4.62	6.26	4.81	4.03	3.99
木聚糖酶	—	0.70	2.85	14.00	42.29	94.25	96.28	76.78	58.82
淀粉酶	5.19	18.66	8.30	8.89	6.08	5.38	2.64	4.33	4.64

* 酶活力单位(u)与表 2 相同

始上升;在淀粉酶活性降到较低水平时(23 左右),前述其它四种酶活性进入高峰期。五种酶活性的阶段性变化说明了在培养初期构菌主要利用麦麸中的淀粉为碳源,而后才更多的利用纤维素和半纤维素为碳源。

该菌为早生种,培养 23 天左右正是子实体原基发生期,本实验在培养第 18 天开始将培养物置于低温处培养的。那么,上述五种酶活性在培养到 23 天左右时发生的规律性变化是与低温处理有关,还是与子实体发生有相关关系

(下转第 187 页)

(即和菌丝体的生理性成熟有关)。为了清楚其原因,用该菌株做了如下实验。

实验用培养基同前(见“材料与方法”),实验分三组, I 组在 24℃ 培养 0—44 天; II 组在 24℃ 培养 12 天, 而后在 12℃ 培养; III 组在 24℃ 培养 18 天, 而后在 12℃ 培养。测定了该三组培养 44 天期间五种酶活性的变化, 结果表明(见表 2), I、II、III 组的酶活变化规律是一致的, 在培养 19 天左右 CMC 酶、FP 酶、木聚糖酶和果胶酶的活性开始明显升高, 此期间 I 组和 II 组均发生了子实体原基。这表明: 前述几种酶活于 19—21 天的规律性变化并非由于低温处理所致, 而是与菌丝体的生理性成熟有关。据姜隆后等人介绍^[4], 构菌菌丝体生长发育的菌龄决定着子实体的能否形成, 过幼或过老的菌丝体, 都不易形成子实体。本实验结果分析表明: 构菌早生品种子实体发生期, 正是在果胶酶、CMC 酶、FP 酶和木聚糖酶的活性迅速上升时期。用另外三株不同来源的早生菌株(AS 5.80; 三明 1 号; 四川的 W₁₂)进一步

验证, 得出的结果同样如此(见表 3)。为此, 我们认为, 这几种多糖酶的活性变化可以用来预测早生菌株菌丝体的生理发育成熟程度, 这在实际生产中是有用的。同时, 这几种酶的活性变化亦可以作为预测早生菌株子实体分化的生化标志, 这对于研究子实体分化机制可能有用。对于构菌中的晚生种(子实体多在培养 40 天以后出现)是否和早生种一样, 即也存在着这种酶活性变化和子实体发生的相关关系, 这还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王玉万, 徐文玉: 东北师大学报(自然科学版), 4: 85—91, 1986。
- [2] 王玉万, 王云: 生态学杂志, 4: 14—16, 1988。
- [3] Zadrazil F. and Brunnert H.: *Env. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 37—44, 1980。
- [4] 姜隆后等: 食用菌生物学及栽培技术, 中国林业出版社, 第 189 页, 1984。
- [5] 黄年来主编: 自修食用菌学, 南京大学出版社, 第 470 页, 1987。
- [6] 杨曙湘等: 食用菌栽培技术, 湖南科学技术出版社, 第 149 页, 1983。