

不同保藏方法对香菇菌种酶活性影响

刘新锐¹, 宋秀高², 邱昌颖², 王玉青¹, 谢宝贵^{1*}

(1. 福建农林大学 菌物研究中心 福建 福州 350002; 2. 福建省农业区划研究所 福建 福州 350003)

摘要: 为研究香菇菌种在不同保藏方法后的酶活性变化, 用液氮保藏、4 °C 保藏、矿物油保藏、25 °C 保藏等 4 种保藏方法对香菇菌种进行保藏试验, 同时测定保藏后的生长速度和酶活性。研究结果可知: 液氮保藏对维持香菇菌种活力的效果最好, 香菇菌种经液氮保藏后的生长速度最快, 并且其漆酶、羧甲基纤维素酶(CMC 酶)、木聚糖酶和淀粉酶的活性最高, 而矿物油保藏的生长速度最慢和酶活性最低。结论: 上述 4 种酶活力可作为香菇菌种保藏效果的评价指标。

关键词: 香菇菌种; 生长速度; 酶活力; 菌种保藏

中图分类号: S646.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0170-05

Effect of Different Preservation Methods on the Enzyme Activity of *Lentinula edodes* Spawn

LIU Xin-rui¹, SONG Xiu-gao², QIU Chang-ying², WANG Yu-qing¹, XIE Bao-gui^{1*}

(1. Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Agricultural Program Institute of Fujian Province, Fuzhou 350003, China)

Abstract: In order to study the enzyme activation change of *Lentinula edodes* spawn after preservation, liquid nitrogen preservation, 4 °C preservation, paraffin preservation and 25 °C preservation were used to preserve *Lentinula edodes*. Growth rate and enzyme activity were detected after preservation. The results showed that liquid nitrogen preservation was the best preservation method. The growth rate was the highest, and the enzyme activities (laccase, CMC, xylanase, alpha amylase) were also the highest after liquid nitrogen preservation, while paraffin preservation was the opposite. It was indicated that laccase, CMC, xylanase and alpha amylase activity could be regarded as evaluating indexes of effects of preservation methods for the preservation of *Lentinula edodes* spawn.

Key words: *Lentinula edodes* spawn; growth rate; enzyme activation; spawn preservation

菌种是重要的生物资源,也是食用菌生产首要的生产资料,但因受各种因素的影响菌种出现退化或丢失,所以菌种保藏非常重要。对菌种保藏效果的鉴定,常用的指标是菌株的存活率和菌株的生长速度。但刘红等^[1]认为仅测菌株的这 2 项指标来衡量保藏效果是不够的,还必须从其它方面对其进行观察和测定。近些年国内各保藏单位相继发展增加测量保藏后的出菇情况来作为评价食用菌保藏的效果的一个指标。蔡令仪等^[2]仅用出菇产量这个指标对香菇的液氮与 4 °C 冰箱保藏方法的保藏效果进行评价,张介驰等^[3]用萌发率、萌发时间及各菌株在栽培性状方面对黑木耳菌种不同方法保藏后进行了保藏效果评价。但 Gerardo Mata 等^[4]用萌发率、萌发时间及出菇产量对超低温液氮保藏香菇 1 周的

收稿日期: 2011-10-15 修回日期: 2011-11-28

基金项目: 公益类科研院所专项项目(2009R10009-1)

作者简介: 刘新锐(1980—),男,助理研究员,硕士,主要从事食用菌分子生物学与种质资源利用研究, E-mail: 121376381@qq.com; * 通讯作者, 谢宝贵 教授, E-mail: mrcfafu@163.com。

保藏效果进行评价时指出,受环境因素、人为因素和菌种特性等影响,出菇的产量主要与出菇规模有关,保藏前与保藏后产量并无多大区别,所以出菇产量并未能充分说明保藏的效果。2006年 Ladislav Homolka 等^[5]对其实验室的不同担子菌(422株)进行保藏效果检测时,首次用测量保藏后的漆酶活性来评价保藏的效果。至今国内仍没有把测量酶活活性作为评价保藏效果的相关报道。对于香菇保藏的报道并不多,而且保藏处理方法也不统一,对保藏效果的评价更是单一。因此本文对香菇进行4种不同保藏方法研究,并从萌发率、萌发时间、生长速度,及漆酶、羧甲基纤维素酶(CMC酶)、木聚糖酶和淀粉酶4种酶活性对保藏效果进行分析,从而对保藏效果进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

香菇 L0123 L0065 +2 L0059 保藏于福建省食用菌种质资源保藏管理中心。

1.2 保藏菌种的培养

将供试菌株从低温保藏库中取出进行 PDA 斜面培养基活化,待菌丝长满试管后,转接至直径 9 cm 含 PDA 的培养皿中央,25℃下培养,待菌落刚长满培养皿时即可。

1.3 液氮保藏

将培养好的香菇菌种,挑起菌种于含 $\varphi = 10\%$ 甘油保护剂的冻存管,样品经以 1℃/min 降到 -40℃,直接放入液氮保藏 60 d^[6]。

1.4 低温 4℃保藏

当菌丝长满斜面后放入 4℃保藏 60 d。

1.5 矿物油保藏

当菌丝长满斜面后注入无菌矿物油,液面超过斜面上缘 1.0~1.5 cm,封口后竖直放入保藏柜中保藏 60 d。

1.6 常温 25℃保藏

当菌丝长满斜面后放入 25℃恒温培养箱保藏 60 d。

1.7 保藏后菌种生长测定

经不同方法保藏的菌种分别接种于 PDA 平皿培养基中央,在 25℃条件下培养,记录菌丝萌发时间和萌发率,测量生长速度和观察菌落形态特征。

1.8 保藏后酶活测定

保藏后的供试菌株用平板活化培养 10 d,转接 PDA 液体培养基中,每瓶平均接 6 块,5 个重复,25℃下 110 r/min 培养,从第 5 天开始每隔 1 d 取 1 次样。取出的样品于 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液即粗酶液。漆酶活性的测定采用 ABTS 法^[7],羧甲基纤维素酶(CMC酶)、木聚糖酶和淀粉酶活性的测定采用 DNS 法^[8]。

2 结果与分析

2.1 不同保藏方法保藏后对菌种萌发情况的影响

不同保藏方法保藏 2 个月后,经解冻活化后对香菇菌丝萌发的影响如表 1 所示。不同方法保存菌种效果不同,且存在明显差异,矿物油保藏的菌株萌发时间长,一般在活化后 6 d 以上才可萌发,且有小部分菌株没有萌发,其他几种方法保存的菌株全部萌发。液氮保藏和 4℃保藏的菌株活化萌发时间短,一般为 3~4 d,且菌丝生长最旺。不同菌株的具体萌发时间不同,但是几种保藏方法之间萌发影响都具有一定规律性。

2.2 不同保藏方法保藏后对菌丝生长速度的影响

不同方法保藏后菌丝生长的强弱与快慢通过表 1 和表 2 可以看出,液氮保藏效果在保藏后测定的生长直径最大,长势最旺,矿物油保藏效果最差且不同菌株表现一致。保藏菌种在未活化时几种不同保藏方法对香菇菌种的生长速度存在极显著差异,液氮保藏的生长速度最快,其次是 4℃保藏和 25℃保藏,矿物油保藏的最差,表明矿物油会阻碍香菇菌丝的生长。

表1 香菇菌种经不同保藏方法后的萌发情况

Tab.1 The germination of different preservation methods in *Lentinula edodes* spawns

保藏方法 Preservation methods	指标 Contents	L0065 + 2	L0123	L0059	菌丝生长情况 Spawn growth
低温保存 4 °C preservation	萌发率/% 萌发天数/d	100 4	100 3	100 3	菌丝浓密,强壮,紧实,旺盛
常温保存 25 °C preservation	萌发率/% 萌发天数/d	100 4	100 5	100 4	菌丝生长一般,旺盛
矿物油保存 Paraffin preservation	萌发率/% 萌发天数/d	90 6	80 8	80 6	菌丝弱,松散,相对稀疏
液氮保存 Liquid nitrogen preservation	萌发率/% 萌发天数/d	100 4	100 3	100 3	菌丝更浓密,强壮,旺盛,紧实

表2 不同保藏方法香菇菌种生长速度

Tab.2 Growth rate of of *Lentinula edodes* after different preservation methods

保藏方法 Preservation methods	L0065 + 2			L0123			L0059		
	生长速度/(cm · d ⁻¹) Growth rate	P _{0.05}	P _{0.01}	生长速度/(cm · d ⁻¹) Growth rate	P _{0.05}	P _{0.01}	生长速度/(cm · d ⁻¹) Growth rate	P _{0.05}	P _{0.01}
液氮 Liquid nitrogen	0.44 ± 0.02	a	A	0.47 ± 0.02	a	A	0.52 ± 0.01	a	A
4 °C	0.37 ± 0.02	b	B	0.44 ± 0.02	b	B	0.49 ± 0.02	b	B
25 °C	0.31 ± 0.03	c	C	0.36 ± 0.04	c	C	0.41 ± 0.02	c	C
矿物油 Paraffin	0.26 ± 0.04	d	D	0.29 ± 0.03	d	D	0.34 ± 0.02	d	D

2.3 不同保藏方法对香菇菌种酶活力影响

2.3.1 漆酶活力的变化 对保藏后漆酶活性测定可知不同保藏方法对漆酶活性的影响有显著差异。菌株 L01233、L0065 + 2 和 L0059 在不同保藏方法后的漆酶活性变化呈抛物线趋势变化,都有一个最大酶活力出现的时间,而不同菌株出现的具体时间存在差异,菌株 L0123 在第 13 天时漆酶活性最强,达 45.92 U,而菌株 L0065 + 2 和 L0059 在第 11 天时漆酶活性最强,漆酶活性最高分别为 10.24 U 和 10.39 U。

以菌株 L0123 为例进行分析(以下 CMC 酶、木聚糖酶和淀粉酶的活性变化同样以菌株 L0123 为例,菌株 L0065 + 2 和 L0059 的略)。通过图 1 可知,不同的保藏方法对漆酶活性的影响不同,其中采用液氮保藏后的漆酶活性最强,最高达 45.92 U,而采用矿物油保藏后的漆酶活性最弱,最高为 6.67 U。前 5 天香菇的漆酶活性很低,

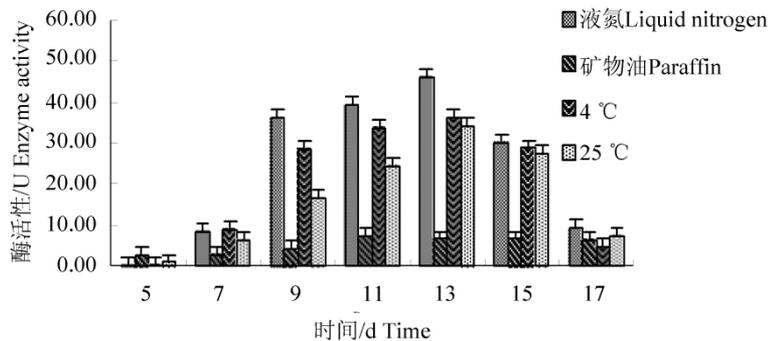


图1 香菇 L0123 经 4 种保藏方式后漆酶活性变化

Fig.1 Laccase activity of *Lentinula edodes* L0123 after four preservation methods

随后漆酶活性上升较快,第 9 天至第 13 天液氮保藏的漆酶活性明显优于其他 3 种保藏方法,达到极显著性差异,4 °C 保藏的保藏效果好于室温保藏和矿物油保藏。此外,菌株 L0065 + 2 和 L0059 在第 9 天至第 13 天 4 种保藏方法后的漆酶活性较强,液氮保藏的效果也明显优于其他 3 种保藏方法,因此在第 9 天至第 13 天的漆酶性可作为香菇菌种保藏效果的检测指标。

2.3.2 羧甲基纤维素(CMC)酶活力的变化 经 4 种不同方法保藏后 3 个菌株的 CMC 酶活性变化规律相一致,其中香菇 L0123 的 CMC 酶活性变化情况如图 2,供试的 3 个菌株在第 15 天香菇 CMC 酶活性最强,菌株 L0123、L0065 + 2 和 L0059 分别为 1.75、1.72、1.80 U,且在 9 天前 3 个菌株的 CMC 酶活性在 4 种保藏方法中差异小,活性都较低,而在第 11 天后 CMC 活性增加,采用液氮保藏和 4 °C 保藏的 CMC

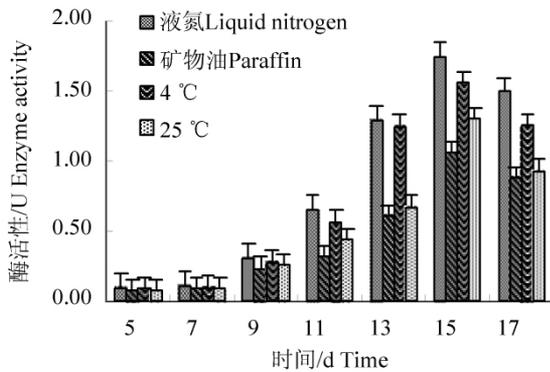


图 2 香菇 L0123 经 4 种保藏方式后 CMC 酶活性变化

Fig. 2 CMC activity of *Lentinula edodes* L0123 after four preservation methods

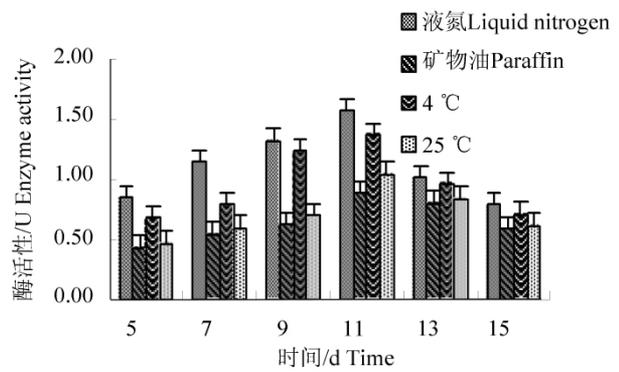


图 3 香菇 L0123 经 4 种保藏方式后木聚糖酶活性变化

Fig. 3 Xylanase activity of *Lentinula edodes* L0123 after four preservation methods

酶活性强于室温保藏和矿物油保藏的,在第 15 天至 17 天时,经液氮保藏后的 CMC 酶活性极显著高于其它 3 种保藏方法。3 个菌株在第 13 天至第 17 天时的 CMC 酶活性比较强,因此该时间段的 CMC 酶活性可作为香菇菌种保藏效果的检测指标。

2.3.3 木聚糖酶活力的变化 经 4 种不同方法保藏后 3 个菌株的木聚糖酶活性变化规律相一致,其中香菇 L0123 的木聚糖酶活经 4 种方法保藏后变化情况如图 3。随着时间的不同,香菇 L0123 的木聚糖酶活性先增强后衰弱,呈抛物线变化。试验的 L0123、L0065 + 2 和 L0059 等 3 个香菇菌株的木聚糖酶含量均在第 11 天达到最大值,最强分别为 1.56 U、1.32 U、1.32 U,采用室温保藏和矿物油保藏的木聚糖酶活性比较弱,在 13 天前,液氮保藏的木聚糖酶活力显著高于其它 3 种保藏方法的,说明液氮保藏能较好地维护香菇菌种的木聚糖酶活性。供试 3 个菌株的木聚糖酶活性在 5 至 15 天期间变化较小,均可作为保藏效果的检测指标。

2.3.4 淀粉酶活力的变化 经不同方法保藏后,香菇 L0123 和 L0065 + 2 淀粉酶活性在第 9 天达到高峰,淀粉酶活性最强分别为 1.35 U 和 1.09 U 而香菇 L0059 的淀粉酶活性在第 7 天达到最大值为 0.90 U,淀粉酶活性最强出现时间存在菌株间的差异。从图 4 中可以看出,香菇 L0123 用液氮保藏和 4 °C 保藏的淀粉酶活性较高,而室温保藏及矿物油保藏对维持香菇淀粉酶活性的能力低。其中在第 9 天时,香菇 L0123 液氮保藏后的淀粉酶活性 (1.35 U) 是室温保藏 (0.49 U) 的 2.7 倍,是矿物油保藏 (0.74 U) 的 1.8 倍,体现了液氮保藏的优势。3 个供试菌株的淀粉酶活性在菌丝阶段均出现的比较早,从第 5 至第 9 天均可作为香菇菌种保藏效果的检测指标。

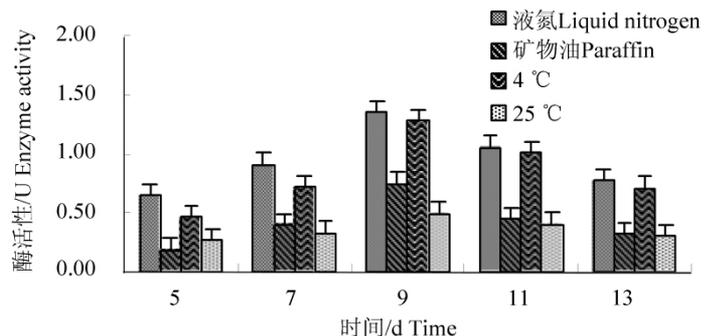


图 4 香菇 L0123 经 4 种保藏方式后淀粉酶活性变化

Fig. 4 Alpha amylase activity of *Lentinula edodes* L0123 after four preservation methods

3 讨论

酶的生成受遗传基因和代谢物的双重控制。食用菌在生长、发育的不同时期、不同环境产生酶的多少不同,是菌体适应环境的表现^[9]。香菇是木腐菌,以植物纤维素和木质素为主要碳素营养源和能源,而多糖物质的降解主要依赖纤维素酶和木质素酶^[10]。这些酶的活性强弱在一定程度上决定菌丝对培养料的生物转化率^[11]。徐建中等^[12]指出漆酶在食用菌利用栽培基料中起到指示作用。因此不同保藏方法后菌丝的酶活性可以直接反映保藏的效果。

本次试验发现同一保藏方法在不同品种之间的酶活性大小有差异,而主要的特性表现趋势是相一

致的,这与倪新江^[13]和王玉江^[14]在研究香菇和黑木耳几种胞外酶活性变化的规律基本一致。通过不同保藏方法后,香菇同一菌种萌发情况及萌发后的生长速度不同,保藏后的酶活力存在差异,综合而言液氮保藏的优势明显,4℃保藏、25℃保藏效果次之,而矿物油保藏效果比较差。本实验再次验证了超低温液氮保藏法是目前国际上公认为较为理想的菌种保藏方法的观点。虽低温定期移植保藏法简单易行,不需特殊设备,但需几个月转管1次,转管的次数多了,一方面会浪费大量的人力及时间,又容易引进污染,另一方面经长期的保藏,遗传物质及生理活性或多或少会发生改变,从图1至图4也可以看出4℃保藏的漆酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖酶和淀粉酶4种酶活性整体低于液氮保藏的。所以对于大量的食用菌菌种保藏单位,传统的如4℃低温保藏方式并不实用^[15]。

在菌种的矿物油保藏方面,宋明芝^[16]和杨之为^[17]主要从保藏期限上进行了研究,张金霞^[18]比较全面评价了草菇菌种的矿物油保藏效果,但对矿物油保藏后的酶活性没有研究。在此次试验中,香菇菌种经矿物油保藏后的酶活性较低,一方面可能是因为矿物油浸泡菌种,对菌种细胞活力产生影响;另一方面可能与活化的次数相关,值得进一步研究。此外本次保藏时间较短(2个月),已知的结果虽初步反映出各种保藏方法对香菇保种的影响,但考虑到保藏工作的长期性,下一步还需增加保藏时间等方面来研究香菇菌种保藏的效果。

参考文献:

- [1]刘红,黄建军,许丽娟,等.谈食用菌菌种的保藏[J].现代农业科技,2008(18):121--122.
- [2]蔡令仪,谭琦,曹晖,等.不同菌种保藏方法对香菇产量的影响[J].食用菌学报,2003,10(4):52-54.
- [3]张介驰,戴肖东,张丕奇,等.黑木耳菌种保藏方法的比较研究[J].中国食用菌,2007,26(5):16-18.
- [4]Gerardo Mata, Dulce Salmones, Perla Ma. Ortega. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* (Fungi: Basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, 16: 283-287.
- [5]Ladislav Homolka, Ludmila Lisů, Frantisek Nerud. Basidiomycete cryopreservation on perlite: Evaluation of a new method [J]. Cryobiology, 2006, 52: 446-453.
- [6]刘新锐,叶夏,王玉青,等.香菇菌种液氮保藏技术研究[J].热带作物学报,2011,32(7):1360-1363.
- [7]赵爽,刘宇,许峰,等.姬松茸4个品种菌丝体的生物酶活性测定[J].中国食用菌,2010,29(3):32-33.
- [8]张国庆,董晓芳,王贺祥,等.8种食用菌菌渣中3种饲用酶活性的测定[J].中国食用菌,2009,28(5):28-29.
- [9]顾雅君,王瑛,刘建荣,等.与食用菌相关主要酶的研究和应用[J].中国食用菌,2009,25(1):40-42.
- [10]贾新成,李喜梅,李磊,等.平菇培养中纤维素半纤维素的降解及其酶活性的变化[J].华北农学报,1994(9):92-95.
- [11]陈建军,杨清香,王栋,等.不同生长阶段平菇漆酶、纤维素酶活性研究[J].西北农业学报,2007,16(1):87-89.
- [12]徐建中,胡开辉,孙淑静,等.不同类型食用菌产木素氧化酶系能力比较与分析[J].江西农业大学学报,2011,33(2):375-380.
- [13]倪新江,潘迎捷,冯志勇,等.香菇生长过程中几种胞外酶活性的变化[J].食用菌学报,1995,2(4):22-27.
- [14]王玉江,韩增化,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,2010,17(4):40-43.
- [15]Chvostova V, Nerud F, Homolka L. Viability of Wood - Inhabiting Basidiomycetes Following Cryogenic Preservation [J]. Folia Microbiol, 1995, 40(2):193-197.
- [16]宋明芝,张宏,张树人,等.微生物菌种保藏方法的研究[J].吉林农业科学,1980(3):76-78.
- [17]杨之为,李有志,宗兆锋.矿物油中保存真菌存活期限的检测[J].西北农业大学学报,1996,24(3):115-119.
- [18]张金霞,张树庭.草菇菌种保藏效果鉴定的研究[J].中国食用菌,1992(4):3-9.