

不同配方培养料生产双孢蘑菇过程中主要木质纤维素降解酶及物料组分的变化*

秦改娟¹ 王 晓¹ 陈青君^{1**} 张国庆²

¹北京农学院植物科学技术学院农业应用新技术北京市重点实验室 北京 102206

²北京农学院生物科学与工程学院农业部都市农业(北方)重点实验室 北京 102206

摘 要 为探讨双孢蘑菇生产过程木质纤维素的利用情况,以麦草秸秆、玉米秸秆和杂草秸秆为主料的3种不同配方的培养料为研究材料,分别测定各配方培养料不同时期主要胞外木质纤维素降解酶活性和木质纤维素组分(纤维素、半纤维素和木质素)的相对含量,并统计各配方产量。结果显示,麦草配方(FWS)的纤维素酶总活性和木聚糖酶活性不断升高,出菇期达到稳定;玉米秸秆配方和杂草配方堆肥期的纤维素酶总活性保持在1 U/g左右,发菌期大幅升高,出菇期先稳定后下降,木聚糖酶活性始终保持在7.97-23.85 U/g之间;3个配方的漆酶活性在堆肥期未检测到,发菌期升至最高,出菇期快速降低。3个配方堆肥期纤维素和半纤维素的相对含量明显下降,木质素相对含量则几乎不变。发菌及出菇期木质素与半纤维素的相对含量较纤维素的下降明显。3个配方双孢蘑菇的产量关系为麦草配方(30.00 kg/m²) > 玉米秸秆配方(17.21 kg/m²) > 杂草配方(16.67 kg/m²)。本研究表明堆肥期主要为堆肥微生物及物理化学作用降解纤维素和半纤维素,发菌期则主要是双孢蘑菇菌丝利用木质素;从播种至三潮菇清床,双孢蘑菇菌丝主要利用木质素和半纤维素;本研究中麦草配方是栽培双孢蘑菇的最佳培养料,而玉米秸秆配方和杂草配方有待进一步优化。(图2表3参33)

关键词 双孢蘑菇; 秸秆; 堆肥; 胞外酶活; 木质纤维素

CLC S141.4 : Q938.1

Changes of lignocellulolytic enzymes and material components in different compost formulas during the production of *Agaricus bisporus**

QIN Gaijuan¹, WANG Xiao¹, CHEN Qingjun^{1**} & ZHANG Guoqing²

¹ College of Plant Science and Technology, Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

² College of Biological Sciences and Engineering, Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract In order to investigate the utilization of lignocellulose during *Agaricus bisporus* production, three formulas were studied. Wheat straw (FMS), corn stalks (FCS), and reservoir weeds (FRW) were used as principal carbon sources. During the composting and fruiting stages, activities of main lignocellulolytic enzymes and relative proportions of lignocellulosic components (lignin, cellulose, and hemicellulose) were assayed. After harvest, mushroom yields in different formulas were counted. The results showed that total cellulase and xylanase activities in FWS continuously increased and stayed at a high level during the fruiting period. Total cellulase activities of FCS and FRW were ~1 U/g during the composting period, followed by a sharp increase and soft decrease during the fruiting period. Xylanase activity of FCS and FRW stayed in a range of 7.97–23.85 U/g. Laccase activities in the three formulations were unmeasurable during the composting stage, reached the highest level in the spawning period, and then rapidly decreased in the fruiting period. During the composting period, relative contents of cellulose and hemicellulose in the three formulations significantly decreased, while relative content of lignin did not change. The relative contents of lignin and hemicellulose decreased obviously in the spawning period and fruiting period. Total yields of the three formulations were FWS (30.00 kg/m²) > FCS (17.21 kg/m²) > FRW (16.67 kg/m²). During composting, microbial communities and physicochemical properties had strong effects on cellulose and hemicellulose degradation. On the other hand,

收稿日期 Received: 2017-01-17 接受日期 Accepted: 2017-02-14

*北京市科技新星项目(xx2015B025)、“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD14B09)和现代农业产业技术体系北京市食用菌创新团队建设经费(PXM2016_014207_000036)资助 Supported by the New-star Plan of Science and Technology of Beijing, China (xx2015B025), the Key Sci-tech Project of the 12th 5-year Plan of China (2012BAD14B09), and the Innovative Grant of Modern Agricultural Technology System of Beijing (PXM2016_014207_000036)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: cqj3305@126.com)

lignin was mainly used by *A. bisporus* mycelia at the spawning stage. In the spawning and fruiting period, *A. bisporus* mycelia mainly used lignin and hemicellulose. Based on the present study, FWS is the best culture formula for mushroom production, while formulas FCS and FRW need further improvements.

Keywords *Agaricus bisporus*; straw; compost; extracellular enzyme activity; lignocelluloses

双孢蘑菇是典型的草腐真菌，其栽培基质主要由稻草、麦秸等农业秸秆和粪肥经过堆制发酵而成^[1-2]。目前国内外工厂化双孢蘑菇堆肥多采用二次发酵的方式，发酵好的培养料播种后在菇房进行统一的出菇管理^[3]。

双孢蘑菇生产离不开农业秸秆资源，而植物秸秆的主要组成成分为木质纤维素（Lignocellulose），占植物秸秆干物质的70%以上，为细胞壁的主要组分，双孢蘑菇的生产是对木质纤维素降解转化的过程^[4-5]。木质纤维素主要由纤维素（Cellulose）、半纤维素（Hemicellulose）和木质素（Lignin）组成^[6]。Iiyama等采用多种方法研究表明，在堆肥阶段有67%的植物细胞壁多糖被堆肥微生物所降解消耗，只有17%的多糖是在蘑菇生长过程中被利用的^[7-8]。Edita等的研究表明，在二次发酵过程（Phase II）中，50%的木聚糖和纤维素是通过微生物降解的，该时期木质素结构没有改变；而在菌丝生长过程（Phase III）中，纤维素轻微消耗，木聚糖部分降解，同时木质素被降解了45%^[9]。

双孢蘑菇降解木质纤维素及其他有机大分子是通过基质中的菌丝不断向胞外分泌各种酶来实现的，酶的活性大小直接影响生物降解的能力^[10]。根据木质纤维素的组成元件，可将木质纤维素降解酶划分为纤维素降解酶系、半纤维素降解酶系和木质素降解酶系^[11]。李晓博等的研究表明，在培养料发酵及双孢蘑菇生长发育期间，纤维素、半纤维素和木质素的降解与酶活性变化有关，酶活性高降解速率就快。双孢蘑菇菌丝生长阶段和蘑菇发育阶段对纤维素、半纤维素和木质素的降解前者低于后者，其中木质素的降解主要发生在蘑菇发育阶段^[12]。

在双孢蘑菇栽培过程中，植物木质纤维素的降解与产量形成相关，但是要实现对植物秸秆木质纤维素的充分降解利用，仍然是工厂化面临的重要课题。目前，对于双孢蘑菇生产过程中木质纤维素利用规律尚不清晰，国内对于双孢蘑菇培养料的研究大多侧重于发酵技术、配方设计、理化性状、微生物动态等方面^[13-16]，国外侧重于理化性质、碳水化合物组分变化及部分酶活的测定^[7-8]，随着分子生物学的发展，近几年国外学者正试图通过高通量测序手段进一步探究双孢

蘑菇生产过程中木质纤维素利用的规律^[17-18]。麦草配方是目前被研究的主要配方，但对其他原料配方的木质纤维素利用情况还少见报道。

目前，利用玉米秸秆、杂草等农业废弃资源替代或部分替代麦草，已成为我国双孢蘑菇产业充分利用当地秸秆资源的发展方向。本研究分别对以麦草、玉米秸秆和杂草为主要原料的配方培养料进行不同时期木质纤维素组分相对含量及其主要降解酶活性测定，并结合其产量进行分析，为充分利用秸秆资源和阐明双孢蘑菇生产过程中的碳代谢机理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料包括麦草、玉米秸秆（切至20-30 cm左右）和密云库区杂草（切至20-30 cm左右）配方。麦草配方（FWS）堆肥发酵及出菇在江苏闽中有机食品有限公司进行。玉米秸秆（FCS）配方和密云水库杂草配方（FRW）堆肥发酵及出菇在北京市密云县太师庄种植专业合作社进行。具体配方如下：麦草配方（FWS），麦草40 t、鸡粪80 t（液态）、豆粕3 t、石膏3 t；玉米秸秆配方（FCS），玉米秸秆22 t、玉米芯6 t、豆粕0.4 t、牛粪40 m³（固态）、石膏1.76 t、石灰0.24 t、尿素0.2 t、过磷酸钙0.16 t；杂草配方（FRW），杂草30 t、鸡粪30 m³（固态）、尿素100 kg、石膏2.0 t。堆肥原料理化性质见表1。

1.2 试验方法

1.2.1 堆肥发酵及出菇 堆肥采用隧道发酵方式。麦草配方：第1-3天混料池混合后建堆；第4-15天入一次发酵隧道，中间翻堆4次；第16-22天入二次发酵隧道。玉米秸秆配方：第1-5天混料池混合后建堆，第6-17天入一次发酵隧道，中间翻堆3次，第18-26天入二次发酵隧道。杂草配方：第1-4天混料池混合后建堆；第5-16天入一次发酵隧道，中间翻堆2次；第17-25天入二次发酵隧道。发酵好的培养料经上料机播种后运送至菇床进行工厂化出菇管理。

1.2.2 取样 每个配方分别取8个时期的样品：（1）堆肥阶段：①建堆期（BM）；②一次发酵结束时期（Phase I-end）；

表1 堆肥原料理化性质
Table 1 Physicochemical properties of composting raw materials

原料 Material	来源 Source	含氮量(w%) Nitrogen content	含碳量(w%) Carbon content	灰分(w%) Ash content	C/N比 C/N rate	含水量(w%) Moisture
麦草 Wheat straw	中国江苏 Jiangsu, China	0.83	49.31	11.25	59.41	13.20
鸡粪 Chicken manure		3.22	39.76	28.44	12.35	88.48
豆粕 Soybean meal		7.81	52.08	6.25	6.67	7.19
玉米秸秆 Corn stalk	中国北京 Beijing, China	0.69	53.07	4.47	77.14	6.00
玉米芯 Corn cob		0.33	54.63	1.66	165.55	7.11
豆粕 Soybean meal		7.11	52.21	6.03	7.35	6.28
牛粪 Cow dung		0.75	39.28	29.30	52.37	-
杂草 Reservoir weeds		0.46	51.94	6.50	112.91	7.84
鸡粪 Chicken manure		2.33	31.93	42.52	13.69	75.00

③二次发酵结束时期 (Phase II-end). (2) 发菌阶段: ④菌丝长满培养料时期 (Filling); (3) 出菇阶段: ⑤一潮菇原基形成时期 (Pinning); ⑥一潮菇清床时期 (1st flush cleaning); ⑦二潮菇清床时期 (2nd flush cleaning); ⑧三潮菇清床时期 (3rd flush cleaning).

堆肥阶段每次取样在料堆前、中、后3个纵切面上分别随机取5个不同位点的样品, 将这些样品均匀混合, 总重约2 000 g. 出菇阶段每次取样在菇房中每架菇床第二层中间位置, 移开覆土层后, 取中间约10 cm厚的料层, 混合均匀, 总重约2 000 g.

取200 g样品, 以液氮速冻, 放置于-80 ℃冰箱保存, 供酶活测定使用; 再取100 g用于培养料基础理化数据测定, 其余1 700 g样品, 自然风干后粉碎过40目筛, 用于木质纤维素组分含量测定使用.

1.2.3 堆肥期样品理化数据测定 取5 g样品, 用10倍蒸馏水稀释, 振荡1 h后离心过滤, 取滤液测定pH值. 采用干燥称重法^[19]、半自动凯氏定氮法^[20]和灼烧重量法^[21]测定各时期样品的含水量、含氮量和含碳量, 计算碳氮比.

1.2.4 粗酶液提取 取3 g培养料剪碎至3 mm³的小段, 加入30 mL的无菌水, 25 ℃, 220 r/min振荡悬摇2 h, 4层纱布过滤后, 4 000 r/min 4 ℃离心10 min, 上清即为粗提酶液, 分装后保存于-80 ℃备用^[22].

1.2.5 胞外酶活测定 本研究以滤纸纤维素酶 (FPase) 反映纤维素酶的活性, 此酶活为纤维素酶的总酶活, 测定的是内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶和β葡聚糖苷酶之和; 以木聚糖酶 (Xylanase) 和漆酶 (Laccase) 分别反映半纤维素酶和木质素酶的活性, 它们分别是双孢蘑菇栽培基质中最主要的半纤维素和木质素降解酶^[23].

滤纸纤维素酶活性测定: 运用DNS法^[24]测定粗提酶液的滤纸纤维素酶活性. 向试验组试管中加入0.05 g新华定量滤纸和1.5 mL的pH4.8柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 再加入粗酶液0.5 mL, 混匀, 50 ℃恒温水浴30 min, 取出后立即加入1.5 mL DNS试剂, 煮沸5 min, 取出冷却后加蒸馏水定容至20 mL, 充分混匀, 然后于540 nm波长处测吸光值. 以煮沸灭活的酶液做对照. 滤纸纤维素酶活性定义: 在50 ℃条件下, 30 min催化底物生成1 mg葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U).

木聚糖酶活性测定: 方法同滤纸纤维素酶 (FPase) 活性测定, 将0.05 g新华定量滤纸替换为用pH 4.8柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的1%的木聚糖溶液. 木聚糖酶活性定义: 在50

℃条件下, 30 min催化底物生成1 mg木糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U).

漆酶活性测定: 运用ABTS法^[25]测定粗提酶液的漆酶活性. 向试验组和对照组EP管中各加入290 μL的ABTS溶液 (1 mmol/L、pH 5.2), 试验组中加入10 μL粗酶液, 对照组不加; 混匀后, 所有EP管于37 ℃水浴5 min, 然后迅速加入700 μL的反应终止液 (5%的三氯乙酸溶液), 最后向对照组中加入10 μL粗酶液, 混匀后, 立即在405 nm波长下测定吸光值. 漆酶活性定义: 在405 nm处, 每min、每mL反应体系产生一个吸光值所需要的酶量为一个酶活力单位 (U).

1.2.6 木质纤维素组分相对含量测定 培养料中木质纤维素的含量参照国标GB/T 20806-2006 [饲料中中性洗涤纤维 (NDF) 的测定]及GB/T 20805-2006 (酸性洗涤木质素) 和饲料质量与安全检测技术 (饲料中碳水化合物的测定)^[26]提供的方法进行测定. 木质纤维素组分相对含量采用每100 g烘干的培养料 (发菌及出菇阶段包含双孢蘑菇菌丝体) 中各组分所占的质量分数表示.

2 结果与分析

2.1 堆肥期不同原料配方的理化性质

培养料的发酵质量对双孢蘑菇的生产具有重要影响^[27]. 表2为堆肥阶段各时期样品的理化性质. 3个配方pH值变化规律一致, 都呈下降趋势; 3个配方经二次发酵后含水率均降低, 麦草和杂草配方降至67%-69%, 而玉米秸秆配方的为60%, 这可能与玉米秸秆配方二次发酵时间稍长有关; 3个配方含碳量均呈下降趋势, 一次发酵结束含碳量下降明显; 含氮量呈上升趋势, 且麦草配方的含氮量整体高于玉米秸秆配方和杂草配方. 3个配方的碳氮比均呈下降趋势, 以麦草配方最低.

2.2 不同配方不同时期木质纤维素酶活性变化

2.2.1 滤纸纤维素酶活性测定 不同配方培养料各时期的滤纸纤维素酶活性测定结果如图1A所示. 麦草配方的滤纸纤维素酶活性远高于其他两个配方并呈持续上升至稳定趋势; 玉米秸秆配方和杂草配方的滤纸纤维素酶活性在堆肥阶段活性基本维持在1 U/g左右 (较低), 发菌阶段大幅升高, 出菇阶段先保持稳定后降低, 总体趋势与麦草配方相似. 整体来看, 玉米秸秆配方和杂草配方各时期的酶活均低于麦草配方.

表2 堆肥期不同配方理化性质变化

Table 2 Physical and chemical properties of different formulations during composting

配方 Formulation	时期 Stage	pH值 pH value	含水量(wt%) Moisture	含碳量(wt%) Carbon content	含氮量(wt%) Nitrogen content	C/N比 C/N rate
麦草配方 FWS	建堆 BM	8.17 ± 0.04	78.05 ± 0.11	42.50 ± 0.00	1.68 ± 0.00	25.35 ± 0.05
	一次发酵结束 Phase I-end	7.95 ± 0.00	72.70 ± 0.03	38.06 ± 0.00	1.93 ± 0.02	19.70 ± 0.18
	二次发酵结束 Phase II-end	7.25 ± 0.01	67.26 ± 0.06	34.72 ± 0.00	2.22 ± 0.08	15.67 ± 0.54
玉米秸秆配方 FCS	建堆 BM	8.74 ± 0.07	73.09 ± 0.02	41.67 ± 1.18	1.41 ± 0.03	29.76 ± 0.57
	一次发酵结束 Phase I-end	8.68 ± 0.01	63.85 ± 0.12	30.97 ± 0.20	1.49 ± 0.01	20.79 ± 0.36
	二次发酵结束 phase II-end	8.01 ± 0.02	60.62 ± 0.05	29.31 ± 1.37	1.55 ± 0.02	18.91 ± 0.77
杂草配方 FRW	建堆 BM	8.51 ± 0.06	73.70 ± 2.22	40.46 ± 0.42	1.43 ± 0.13	28.29 ± 0.34
	一次发酵结束 Phase I-end	8.41 ± 0.06	73.11 ± 0.39	33.33 ± 0.28	1.56 ± 0.02	21.36 ± 0.11
	二次发酵结束 Phase II-end	8.23 ± 0.10	68.81 ± 0.67	34.63 ± 0.16	1.76 ± 0.13	19.68 ± 0.23

FWS: Wheat straw formulation; FCS: Corn stalks formulation; FRW: Reservoir weeds formulation. BM: Basic mixture.

2.2.2 木聚糖酶活性测定 不同配方培养料各时期的木聚糖酶活性测定结果如图1B所示. 3个配方的木聚糖酶活性总体都呈先升高后降低趋势, 但酶活达最高的时期不同. 播种后麦草配方在一潮菇原基形成时达到最高并维持稳定, 三潮菇清床时下降; 玉米秸秆配方在菌丝长满时活性最高, 之后酶活快速下降; 杂草配方在一潮菇清床时升至最高, 之后较快下降. 整体来看, 玉米秸秆配方和杂草配方各时期的酶活性比较相近(处于7.97-23.85 U/g之间), 麦草配方从一潮菇原基形成开始其酶活性(38.26 ± 2.66 U/g)约为玉米秸秆配方和杂草配方的2倍.

2.2.3 漆酶活性测定 不同配方培养料各时期的漆酶活性测定结果如图1C所示. 3个配方的漆酶活性变化规律基本一致, 在建堆期到二次发酵结束过程中漆酶活性很低, 播种后至一潮菇原基形成过程中漆酶活性达到最高, 之后酶活开始下降. 整体来看, 麦草配方各时期酶活性最高, 玉米秸秆配方次之, 杂草配方最低.

3个配方培养料3种酶活的变化趋势一致, 但麦草配方在发菌和出菇阶段3种酶的活性表现突出. 玉米秸秆配方和杂草配方纤维素酶和漆酶活性变化趋势与麦草配方基本相同, 木聚糖酶的活性变化趋势存在部分差异.

2.3 木质纤维素组分相对含量的变化

如图2A所示, 麦草秸秆中, 纤维素占 $32.19\% \pm 2.38\%$, 半纤维素占 $22.91\% \pm 0.74\%$, 木质素占 $8.29\% \pm 0.74\%$, 纤维素和半纤维素含量多, 木质素含量少; 经浸泡堆置后, 纤维素的相对含量下降至 $26.46\% \pm 1.27\%$, 半纤维素和木质素的相对含量保持不变; 经一次发酵后, 纤维素和半纤维素的相对含量分别为 $12.28\% \pm 0.04\%$ 和 $8.81\% \pm 0.14\%$, 分别下降了约19.91%和14.10%, 木质素的相对含量下降较少, 说明此过程虽然3种成分均被降解, 但主要是降解纤维素和半纤维素, 此时3个组分所占含量比例已十分接近; 二次发酵结束, 其3个组分的相对含量基本相同, 分别为 $13.69\% \pm 3.2\%$, $12.44\% \pm 2.30\%$, $13.33\% \pm 3.22\%$, 由此可知, 堆肥过程纤维素和半纤维素降解主要发生在一次发酵期间. 从播种到三潮菇清床的过程中, 纤维素的相对含量相对保持在同一水平, 半纤维素和木质素的相对含量呈下降趋势, 表明双孢蘑菇发菌及出菇

过程中主要利用的是半纤维素和木质素.

图2B是双孢蘑菇对玉米秸秆配方木质纤维素的利用情况, 玉米秸秆中各组分的相对含量分别为 $30.05\% \pm 0.16\%$ 、 $26.66\% \pm 0.05\%$ 、 $6.38\% \pm 0.44\%$ (比麦草秸秆的低); 建堆期各组分的相对含量分别为 $27.12\% \pm 1.18\%$ 、 $20.74\% \pm 0.79\%$ 、 $14.42\% \pm 1.46\%$; 从建堆期到一次发酵结束, 纤维素、半纤维素、木质素的相对含量均在降低, 下降幅度比其它时期的都大; 二次发酵结束后, 3个组分的相对含量趋近一致(分别为 $17.04\% \pm 0.83\%$ 、 $13.71\% \pm 0.51\%$ 、 $10.95\% \pm 0.21\%$); 菌丝长满后三者的相对含量才达到最接近(分别为 $15.35\% \pm 0.72\%$ 、 $11.78\% \pm 0.13\%$ 、 $10.65\% \pm 0.95\%$), 这与麦草不同, 麦草在二次发酵结束时三者的相对含量最接近, 这与两种配方的酶活性变化规律有关; 一潮菇清床时, 半纤维素的相对含量基本没变, 纤维素和木质素的相对含量降低, 木质素降低幅度较纤维素的大, 该过程双孢蘑菇菌丝主要降解了木质素; 一潮菇清床到二潮菇清床, 各组分的相对含量大体相同, 各组分利用情况相似. 此配方木质纤维素利用规律与麦草配方存在差异, 但与其酶活性变化规律相一致.

图2C是双孢蘑菇对杂草配方木质纤维素的利用情况, 杂草秸秆3个组分的相对含量分别为 $42.33\% \pm 0.18\%$ (高于麦草秸秆)、 $21.95\% \pm 0.07\%$ 、 $11.74\% \pm 0.02\%$ (高于麦草秸秆), 纤维素的相对含量约为半纤维素的2倍; 建堆期3个组分的相对含量分别为 $31.12\% \pm 0.4\%$ 、 $18.73\% \pm 0.18\%$ 、 $10.00\% \pm 0.98\%$; 一次发酵结束半纤维素的相对含量下降, 其他两个组分的相对含量基本没变(此时期对应的滤纸纤维素酶活性也比较低); 二次发酵结束时3个组分的相对含量最接近, 分别为 $10.54\% \pm 1.28\%$ 、 $6.79\% \pm 0.72\%$ 、 $5.19\% \pm 0.87\%$, 此时降解的纤维素和半纤维素达到最多(此时期滤纸纤维素酶和木聚糖酶活性也较高), 这与前两个配方不同, 可能与秸秆原料的结构和木质纤维素成分组成差异有关; 菌丝长满时木质素和半纤维素的相对含量比纤维素的小, 说明该阶段菌丝主要利用了木质素和半纤维素, 该配方一潮菇清床时木聚糖酶活性才达到最高; 一潮菇清床到三潮菇清床木质纤维素各组分的相对含量均呈下降趋势, 说明3个组分均在被消耗.

3种原料配方的木质纤维素利用的规律相似, 堆肥阶段

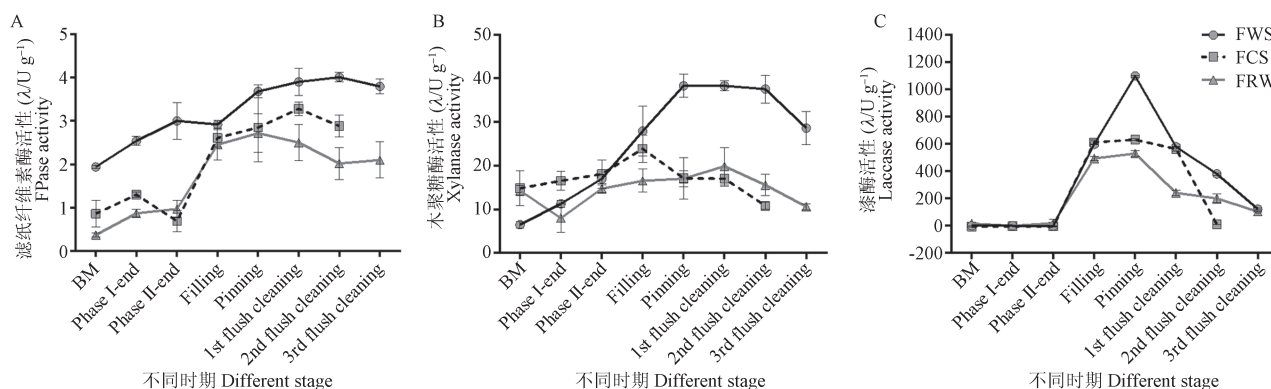


图1 不同配方培养料不同时期木质纤维素酶活性变化. A: 滤纸纤维素酶; B: 木聚糖酶; C: 漆酶. FWS: 麦草配方; FCS: 玉米秸秆配方; FRW: 杂草配方. BM: 建堆期. Phase I-end: 一次发酵结束时期; Phase II-end: 二次发酵结束时期. Filling: 菌丝长满培养料时期; Pinning: 一潮菇原基形成时期; 1st flush cleaning: 一潮菇清床时期; 2nd flush cleaning: 二潮菇清床时期; 3rd flush cleaning: 三潮菇清床时期.

Fig. 1 Changes of lignocellulase activity in different formulations at different stages. A: FPase; B: xylanase; C: laccase. FWS: Wheat straw formulation; FCS: Corn stalks formulation; FRW: Reservoir weeds formulation. BM: Basic mixture.

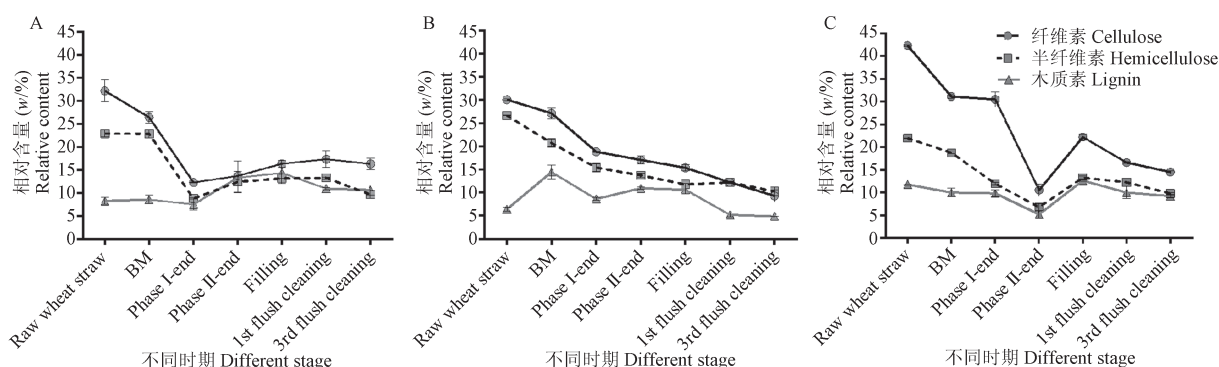


图2 不同配方培养料不同时期木质纤维素组分相对含量变化。A: 麦草配方; B: 玉米秸秆配方; C: 杂草配方。FWS: 麦草配方; FCS: 玉米秸秆配方; FRW: 杂草配方。BM: 建堆期。Raw wheat straw: 麦草原料; Raw corn stalk: 玉米秸秆原料; Raw reservoir weeds: 杂草原料; BM: 建堆期; Phase I-end: 一次发酵结束时期; Phase II-end: 二次发酵结束时期; Filling: 菌丝长满培养料时期; 1st flush cleaning: 一潮菇清床时期; 2nd flush cleaning: 二潮菇清床时期; 3rd flush cleaning: 三潮菇清床时期。

Fig. 2 Changes of lignocellulose component relative content in different formulations at different stages. FWS: Wheat straw formulation; FCS: Corn stalks formulation; FRW: Reservoir weeds formulation. BM: Basic mixture.

表3 不同配方双孢蘑菇产量

Table 3 The yield of different formulations

配方 Formulation	产量 Yield (Y/kg m ⁻²)			占总产量比例 Proportion of total yield (P/%)			总产量 Total yield (Y/kg m ⁻²)
	一潮菇 1st flush	二潮菇 2nd flush	三潮菇 3rd flush	一潮菇 1st flush	二潮菇 2nd flush	三潮菇 3rd flush	
麦草配方FWS	12.50	10.00	7.50	41.70	33.30	25.00	30.00
玉米秸秆配方 FCS	10.32	6.35	-	61.91	38.09	-	16.67
杂草配方 FRW	8.73	5.74	2.73	50.73	33.35	15.92	17.21

FWS: Wheat straw formulation; FCS: Corn stalks formulation; FRW: Reservoir weeds formulation.

纤维素和半纤维素含量大幅降低, 木质素含量变化不大, 而发菌及出菇阶段, 半纤维素和木质素的含量降低较纤维素明显。

2.4 双孢蘑菇产量统计

3个不同配方的双孢蘑菇产量如表3所示, 总产量由高到低依次为麦草配方 (30.00 kg/m²) > 杂草配方 (17.21 kg/m²) > 玉米秸秆配方 (16.67 kg/m²)。麦草配方的产量最高, 玉米秸秆配方只出了两潮菇, 杂草配方的产量略高于玉米秸秆配方的。麦草配方的产量高于其他两个配方的产量, 这与各配方对应的出菇期酶活大小关系一致。

3 讨论与结论

双孢蘑菇的生产是对木质纤维素的转化利用过程, 而培养料中的木质纤维素主要来源于秸秆, 秸秆的种类、结构和性质会影响双孢蘑菇培养料的通气性、基质均一性和微生物群落结构, 进而影响培养料中的木质纤维素降解酶活性, 以及发菌及出菇阶段双孢蘑菇菌丝对培养料木质纤维素的利用, 最终影响双孢蘑菇的产量^[2, 27-31]。本研究试验结果表明, 麦草配方培养料各时期的3种酶活性基本都较玉米秸秆配方和杂草配方的高, 其产量也最高。结合不同时期玉米秸秆配方和杂草配方的木质纤维素的成分组成及变化, 应当优化其配方和堆肥工艺, 如适当增加麦草比例及堆肥时间等, 使堆肥达到良好的理化状态。

Aleksandrina等指出, 堆肥发酵阶段, 微生物群落及物理化学作用下的培养料中只有木质素的含量下降缓慢, 但是在发菌阶段, 双孢蘑菇的营养菌丝体可以有效降解木质素,

漆酶的含量在菌丝体生长期增加、在结实前下降, 然而纤维素酶和木聚糖酶的含量在结实前增加^[5]。本研究中, 麦草配方堆肥阶段纤维素和半纤维素降解酶活性逐渐升高, 木质素降解酶活性很低, 说明堆肥发酵阶段主要是由微生物初步分解纤维素和半纤维素, 木质素的分解很少。播种后至一潮原基形成过程中, 3种酶活性均上升, 纤维素酶的活性增幅最小, 半纤维素酶较大, 木质素降解酶的活性升高幅度最大, 表明双孢蘑菇在发菌期主要利用培养料中的木质素, 半纤维素次之, 纤维素利用最少, 这与Aleksandrina等的报道^[17]一致。而在出菇阶段 (一潮原基形成到三潮菇清床), 纤维素和半纤维素降解酶活性基本维持在同一水平, 纤维素酶活性呈平缓上升趋势 (滤纸纤维素酶活性由 3.68 ± 0.15 U/g 到 3.8 ± 0.17 U/g), 半纤维素酶二潮菇清床到三潮菇清床酶活有明显下降 (木聚糖酶活性由 37.50 ± 3.17 U/g 到 28.62 ± 3.79 U/g), 漆酶活性则呈大幅度下降趋势, 由一潮原基形成时的 1096.07 ± 6.8 U/g 降到三潮清床时的 121.73 ± 5.6 U/g, 半纤维素酶和木质素酶活性降低可能是造成二、三潮菇产量下降的原因, 这也说明该阶段双孢蘑菇菌丝主要利用木质素和半纤维素, 这与李晓博及鲁丽鑫等的研究结果^[11-12]不同。国外有研究表明可能是由于木聚糖骨架的葡萄糖醛酸残基替代和阿拉伯糖基积累, 而双孢蘑菇菌丝分泌的阿拉伯糖苷酶减少, 导致双孢蘑菇菌丝不能充分利用培养料中的木聚糖, 进而造成培养料中木质纤维素利用减少, 造成二、三潮菇产量的下降^[32]。本研究则认为二、三潮菇时漆酶活性大幅下降是影响双孢蘑菇产量降低的主要原因。漆酶在发菌时活性最高, 菌丝的长势最强, 说明漆酶的分泌取决于菌丝的活力, 二、三潮菇时菌丝长势减弱漆酶活性大幅下降。

麦草配方不同时期的木质纤维素各组分相对含量高低与酶活大小变化是一致的。堆肥阶段纤维素和半纤维素的相对含量大幅下降,木质素的相对含量相对增加,说明发酵过程分解了大量的纤维素和半纤维素,而对木质素的分解较少。发菌阶段(二次发酵结束到菌丝长满培养料),纤维素的相对含量上升,半纤维素和木质素的相对含量没变,说明菌丝对半纤维素和木质素的利用较纤维素多。这两个阶段与 Edita、Aleksandrina 等的报道^[5,33]一致。出菇阶段,一潮菇清床后木质素的相对含量降低幅度明显,半纤维素的相对含量持平,纤维素的相对含量仍升高,说明此阶段利用了大量的木质素,半纤维素次之,纤维素最少。Aleksandrina 等通过紫丁香基与愈创木基的比值(S:G)估测木质素的含量,发现木质素的降解主要是在发菌阶段,出菇阶段木质素含量变化不大,双孢蘑菇子实体具有纤维素和半纤维素偏好性^[17]。本研究中二、三潮菇时漆酶活性呈大幅下降趋势,而纤维素酶和半纤维素酶活性依然维持在高水平,这与其观点相符。但组分相对含量测定结果显示,出菇阶段主要利用的是木质素和半纤维素。有研究表明,双孢蘑菇的两个漆酶基因*lcc1*和*lcc2*在发菌期培养料的表达量达到最高水平,在子实体生长期没有检测到其表达,但是一潮菇结束后和二潮菇时又检测到了漆酶的表达^[33]。结合本试验推测可能漆酶的表达主要是在两潮菇的出菇间隙,该阶段是菌丝恢复期,漆酶表达是否只与菌丝生长密切相关而与子实体生长无关,由于试验样品采集的限制,本研究未检测到这一现象,有待于进一步验证。

不同时期培养料木质纤维素各组分的绝对含量应该呈持续下降趋势,本研究测得的相对含量出现上升,原因是此法没有计算双孢蘑菇生产各阶段培养料有机物干重的损耗率。国外有研究表明,与建堆期相比,一次发酵结束时有机物干重损耗为9%,二次发酵结束时为21%,菌丝长满后则为29%^[9],因此本研究所测得的木质纤维素组分含量仅表示每100 g烘干物料中木质纤维素各组分的相对含量。由于所有取样与测试方法均保持一致,虽存在损耗的系统误差,但实验结果仍然反应出3种配方的差异和变化的共同规律。

综上所述,3个配方的培养料,堆肥期只表现出纤维素酶和木聚糖酶活性,纤维素和半纤维素的相对含量下降显著,表明堆肥期主要由堆肥微生物及理化作用降解纤维素和半纤维素;发菌期漆酶活性达到最高,出菇期快速下降,半纤维素和木质素的相对含量较纤维素的下降明显,表明发菌期主要是双孢蘑菇菌丝对木质素的利用,发菌及出菇过程双孢蘑菇菌丝主要利用木质素和半纤维素。玉米秸秆配方和杂草配方出菇期酶活和产量均显著低于麦草配方,说明以玉米秸秆和杂草为主要原料时其配方和堆肥工艺还有待于改进。

参考文献 [References]

- 1 Ten HR, Wijngaard H, Arieš-Kronenburg NA, Straatsma G, Schaap PJ. Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, **51**, 2242-2245
- 2 郭亚萍, 张国庆, 陈青君, 程继鸿. 双孢蘑菇堆肥中真菌群落多样性分析[J]. 菌物学报, 2014, **33** (2): 312-322 [Guo YP, Zhang GQ, Chen QJ, Cheng JH. Fungal community analysis of different composts prepared for production of *Agaricus bisporus* [J]. *Mycosystema*, 2014, **33** (2): 312-322]
- 3 贾金川, 赵书光, 张亚丽, 范玉明. 双孢蘑菇工厂化高效栽培技术研究[J]. 上海蔬菜, 2014 (6): 94-95
- 4 Patyshakuliyeva A, Mäkelä MR, Sietiö OM, Vries RP, Hildén KS. An improved and reproducible protocol for the extraction of high quality fungal RNA from plant biomass substrates [J]. *Fung Genet Biol*, 2014, **72**: 201-206
- 5 Jurak E, Kabel MA, Gruppen H. Carbohydrate composition of compost during composting and mycelium growth of *Agaricus bisporus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **101**: 281-288
- 6 Patyshakuliyeva A, Jurak E, Kohler A, Baker A, Battaglia E, Bruijn W, Burton KS, Challen MP, Coutinho PM, Eastwood DC, Gruben BS, Mäkelä MR, Martin F, Nadal M, Brink J, Wiebenga A, Zhou MM, Henrissat B, Kabel M, Vries HGRP. Carbohydrate utilization and metabolism is highly differentiated in *Agaricus bisporus* [J]. *BMC Genom*, 2013, **14**: 663
- 7 Chen Y, Chefetz B, Rosario R, Heemst JDH, Romaine CP, Hatcher PG. Chemical nature and composition of compost during mushroom growth [J]. *Comp Sci Util*, 2000, **8** (4): 347-359
- 8 Yama K, Stone BA, Macauley BJ. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (5): 1538-1546
- 9 Jurak E, Punt AM, Arts W, Kabel MA, Gruppen H. Fate of carbohydrates and lignin during composting and mycelium growth of *Agaricus bisporus* on wheat straw based compost [J]. *PLoS ONE*, 2015, **10** (10): e0138909
- 10 陈庆榆, 史钧, 何华奇, 吴萍, 许光雷. 双孢蘑菇几种胞外酶的活性测定[J]. 安徽科技学院学报, 2011, **25** (6): 35-38 [Chen QY, Shi J, He HQ, Wu P, Xu GL. Determination of extracellular enzyme activities of *Agaricus bisporus* [J]. *J Anhui Sci Technol Univ*, 2011, **25** (6): 35-38]
- 11 鲁丽鑫, 姚方杰, 张友民. 对双孢蘑菇培养料在发酵过程中胞外酶活性变化和木质纤维素降解的研究[C]//第十届全国食用菌学术研讨会会议论文集, 北京: 2013: 9-16 [Lu LX, Yao FJ, Zhang YM. Study on extracellular enzyme activity and lignocelluloses degradation of *Agaricus bisporus* on different cultivation formulas at the stage of fermentation [C]//Tenth Natl Symp Edible Fungi, Beijing, 2013: 9-16]
- 12 李晓博, 李晓, 李玉. 双孢蘑菇生产中木质素、纤维素和半纤维素的降解及利用研究[J]. 食用菌, 2009 (2): 6-10
- 13 华尔山. 双孢菇培养料二次发酵新技术[J]. 中国食用菌, 2005, **24** (1): 30-31
- 14 孙雷, 张海峰, 倪淑君, 宋金龙, 赵振, 刘颜平, 阮志勇. 不同配方培养料对双孢蘑菇产量的影响[J]. 中国瓜菜, 2011, **24** (3): 19-22 [Sun L, Zhang HF, Ni SJ, Song JL, Zhao Z, Liu YP, Ruan ZY. Effect of substrate on yield of mushroom production [J]. *Chin Cucurb Veget*, 2011, **24** (3): 19-22]
- 15 任鹏飞, 刘岩, 任海霞, 姚强, 曲玲, 李瑾, 宫志远. 秸秆栽培食用菌基质研究进展[J]. 中国食用菌, 2010, **29** (6): 11-14 [Ren PF, Liu Y, Ren HX, Yao Q, Qu L, Li J, Gong ZQ. Research advance on substrate of edible fungi cultivated by straw [J]. *Chin Edible Fungi*, 2010, **29** (6): 11-14]
- 16 Zhang R, Wang HX, Liu QH, Ng TB. Chemical and ultrastructural studies of lignocellulose biodegradation during *Agaricus bisporus* cultivation [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2014, **61** (2): 208-216

- 17 Patyshakuliyeva A, Post H, Zhou MM, Jurak E, Heck AJR, Hildén KS, Kabel MA, Mäkelä MR, Altelaar MAF, Vries RP. Uncovering the abilities of *Agaricus bisporus* to degrade plant biomass throughout its life cycle [J]. *Environ Microbiol*, 2015, **17** (8): 3098-3109
- 18 Morin E, Kohler A, Baker AR, Foulongne-Oriol M, Lombard V, Nagy LG, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Brun A, Aerts AL, Bailey AM, Billette C, Coutinho PM, Deakin G, Doddapaneni H, Floudas D, Grimwood J, Hildén K, Kues U, Butti KML, Lapidus A, Lindquist EA, Lucas SM, Murat C, Riley RW, Salamov AA, Schmutz J, Subramanian V, Wösten HAB, Xu JP, Eastwood DC, Foster GD, Sonnenberg ASM, Cullen D, Vries RP, Lundell T, Hibbett DS, Henrissat B, Burton KS, Kerrigan RW, Challen MP, Grigoriev IV, and Martin F. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche [J]. *PNAS*, 2012, **109** (43): 17501-17506
- 19 童斌, 杨薇红. 园艺产品营养与品质分析[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006: 251-262
- 20 王旭明, 倪永珍, 李维炯, 陈宗泽, 袁毅. 有效微生物群(EM)对饲料pH值及营养价值的影响[J]. 浙江大学学报, 2002, **28** (4): 431-434[Wang XM, Ni YZ, Li WJ, Chen ZZ, Yuan Y. Effects of effective microorganisms (EM) on pH value and nutritional value of feed [J]. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2002, **28** (4): 431-434]
- 21 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 433-438
- 22 刘朝贵, 邵坤, 聂和平, 周贤达, 强志强, 谷春花. 不同培养料对鸡腿菇胞外酶活性影响的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, **33** (1): 40-42 [Liu CG, Shao K, Nie HP, Zhou XD, Qiang ZQ, Gu CH. Study on the Effects of different culture media on extracellular enzyme activity in *Coprinus comatus* [J]. *J Southwestern Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, **33** (1): 40-42]
- 23 Wood DA, Fermor TR, 李崇. 堆肥中的双孢蘑菇营养物[J]. 食用菌, 1984 (1): 47-48
- 24 叶云霞, 金宁, 杨杰, 孟俊龙, 常明昌. 不同培养料对元蘑胞外酶活性的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2011, **31** (2): 172-175 [Ye YX, Jin N, Yang J, Meng JL, Chang MC. Effect of Different different composts on extracellular enzyme activity of *Hohenbuehelia serotina* [J]. *J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2011, **31** (2): 172-175]
- 25 王珊珊, 孙健, 陈青君, 朱孟娟, 王贺祥, 张国庆. 丁香桑黄胞外漆酶的分离纯化与性质研究[C]//第十届全国食用菌学水研讨会会议论文集, 北京: 2014, 205-213 [Wang SS, Sun J, Chen QJ, . Purification and characterization of an extracellular laccase from *Inonotus baumii*, sanghuang mushroom on *Syringa* [C]. Tenth Natl Symp Edible Fungi, Beijing, 2014: 205-213]
- 26 常碧影, 张萍. 饲料质量与安全检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008
- 27 Philippoussis A, Zervakis GI, Diamantopoulou P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, **17**: 191-200
- 28 Isikhuemhen O, Mikiashvilli NA. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization and mushroom yield by *Pleutotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36** (11): 1353-1362
- 29 Kariaga MG, Nyongesa HW, Keya NCO, Tsingalia HM. Compost physico-chemical factors that impact on yield in button mushrooms, *Agaricus bisporus* (Lge) and *Agaricus bitorquis* (Quel) Saccardo [J]. *J Agaric Sci*, 2012, **3** (1): 49-54
- 30 郭亚萍, 张国庆, 陈青君, 杨凯. 双孢蘑菇堆肥过程中细菌群落结构分析[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (5): 832- 839 [Guo YP, Zhang GQ, Chen QJ, Yang K. Bacterial community structure analysis for mushroom (*Agaricus bisporus*) compost using PCR-DGGE technique [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (5): 832-839
- 31 秦改娟, 郭亚萍, 张国庆, 陈青君. 秸秆与菇渣堆肥用于双孢蘑菇栽培的理化性状和细菌群落分析[J]. 农业工程学报, 2016, **32** (z2): 285-291 [Qin GJ, Guo YP, Zhang GQ, Chen QJ. Physical-chemical properties and bacterial community analysis of different composts made by straws or oyster mushroom residues for commercial mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *Trans CSAE*, 2016, **32** (z2): 285-291]
- 32 Jurak E, Patyshakuliyeva A, Vries RP, Gruppen H, Kabel MA. Compost grown *Agaricus bisporus* lacks the ability to degrade and consume highly substituted xylan fragments [J]. *PLoS ONE*, 2015, **10** (8): e0134169
- 33 Richard P, Hilditch S. d-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82** (4): 597-604