

不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体相关酶活性的影响

杨水莲¹, 聂健¹, 莫美华², 崔淑莲¹, 李岩¹, 邓华明¹

(1. 广东岭南职业技术学院, 广东广州 510663; 2. 华南农业大学, 广东广州 510642)

摘要 [目的]明确不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体相关酶活性的影响。[方法]以巨大口蘑菌丝体为试验材料,研究几种不同出菇处理方法对其在不同时间内3种酶活性的影响。[结果]能形成原基的3个处理组从菌丝恢复期到原基形成、现蕾阶段,酪氨酸酶活性相对比较稳定,不能形成原基的2个处理组酪氨酸酶先上升后下降,在第9天达到最大值,显著高于其他3个处理组,说明酪氨酸酶过高反而抑制了原基形成;蛋白酶、淀粉酶活性在原基形成前都得到有效的激活作用,酶活性显著高于不能形成原基的2个处理组。[结论]试验结果为实现巨大口蘑从传统的袋土栽培向瓶子无土栽培出菇的转变,了解巨大口蘑形成原基的相关机理提供了理论依据。

关键词 巨大口蘑;菌丝;原基形成;酶活性

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)33-0012-03

Effect of Different Mushroom Treatment Methods on Correlation Enzyme Activity of Giant Mushroom Mycelium

YANG Shui-lian¹, NIE Jian¹, MO Mei-hua² et al (1. Lingnan Institute of Technology, Guangzhou, Guangdong 510663; 2. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract [Objective] The aim was to clear effect of different mushroom treatment methods on correlation enzyme activity of giant mushroom mycelium. [Method] The giant mushroom was taken as tested materials, and the effect of different mushroom treatment methods on activity of three kinds of enzymes of its mycelium was studied. [Result] The tyrosinase activity of three treatments which could form primordium was relatively stable from the mycelial recovery period to primordium formation and budding stage; the tyrosinase activity of two treatments which could not form primordium firstly increased and then decreased, reached the maximum value on the 9th day, and was significantly higher than that of the other three treatments, which indicated that the higher tyrosinase could inhibit primordium formation. The activities of protease and amylase could be activated effectively before primordium formation, and was significantly higher than that of the other two treatments which could not form primordium. [Conclusion] The results provide theoretical basis for the transformation of giant mushroom from traditional bag soil-cover culture to bottle soilless culture and understanding the relevant mechanism of primordium formation of giant mushroom.

Key words Giant mushroom; Mycelium; Primordium formation; Enzyme activity

巨大口蘑(*Tricholoma giganteum*)属于担子菌亚门层菌纲伞菌目口蘑科口蘑属,又名大白口蘑、洛巴伊口蘑,商品名有金鞭口蘑、金福菇等,是一种珍稀的食药两用大型真菌^[1]。多年来,巨大口蘑的生产方式都是覆土出菇^[2-3]。笔者在此基础上,参考杏鲍菇等食用菌的栽培方法^[4],用瓶子装料接种,即待菌丝长满瓶子并出现生理黄水后,搔菌,然后往瓶子内注水,再把瓶子在适宜环境条件下倒扣放置培养7 d便能形成原基。而在实际生产过程中,用瓶子无土栽培巨大口蘑出现了出菇不整齐、出菇时间长等问题。食用菌原基的形成是出菇的基础,而原基的形成除了基本营养和适合的环境条件外,还与相关酶活性的大小密切相关^[5]。这些酶大多是诱导酶,它们的活性在时间上的表达顺序与协同作用是食用菌内源生化代谢的重要内容。通过在基质中添加一些有利于这些酶合成或表达的物质,促进诱导,加快代谢,提高酶活性的表达水平,或者通过在基质中添加一些抑制剂,降低酶活性的表达,控制子实体的发生,提高产量,从生长代谢角度上研究子实体发生与发育^[6-8]。通过不同的出菇处理方法,研究巨大口蘑从菌丝长满后到子实体形成阶段的菌丝酶活性,找出与原基的形成有关的酶,对于了解巨大口蘑在覆土栽培与无土栽培过程中各阶段的营养需要,确定其利用规律具有重要的指导意义。为此,笔者研究了不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体相关酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种。巨大口蘑。

1.1.2 试剂。磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、L-酪氨酸、三氯醋酸、酪蛋白、福林试剂、盐酸、3,5-二硝基水杨酸、淀粉、麦芽糖。

1.1.3 主要仪器。生化培养箱、高速冷冻离心机、紫外可见分光光度计、恒温水浴锅、微量移液器。

1.2 方法

1.2.1 菌丝培养和出菇处理。待菌丝长满袋子并出现生理黄水后,打开袋子,覆上一层厚3 cm的菜园土^[9]。同时,待菌丝长满瓶子并出现生理黄水后,开盖搔菌,再往瓶子内注水,然后分别把瓶子倒扣处理和正放处理。此后每天以相同的方式对几种不同出菇处理方法进行管理,并保持菇房的温度为28~30℃,湿度为85%~95%^[10]。

1.2.2 酪氨酸酶活性测定。参照魏要武等^[11]的方法,并加以修改。取1 g新鲜菌丝的培养料,放入研钵中,加入5.00 mL预冷的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.8),冰浴研磨成匀浆,4℃、5 000 r/min离心20 min,上清液作为酶提取液。在比色皿中分别加入3.95 mL含1 mmol/L L-酪氨酸的磷酸盐缓冲液(pH 6.8),然后加入0.05 mL酶液并迅速混匀,立即用紫外可见分光光度计在317 nm波长处测定吸光值的变化,连续测定10 min。以吸光率增加的最初直线段斜率来计算酶活力。酶活力单位(U)定义为:测定条件(20℃)下1 min引起OD值变化0.1为1个酶活力单位。

1.2.3 蛋白酶活性测定。取1 g新鲜菌丝的培养料,放入研

钵中,加入 5 mL 0.02 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.4),充分磨匀后,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为菌丝的粗酶液。蛋白酶活力的测定按黄卓烈^[12]的方法。规定:在一定的反应条件下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.4 淀粉酶活性测定。取 1 g 新鲜菌丝的培养料,放入研钵中,加入 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8),充分磨匀后,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为菌丝的粗酶液。酶活力的测定按黄卓烈^[12]的方法。规定:在一定的反应条件下,淀粉酶 1 min 催化淀粉水解生成 1 μmol 麦芽糖的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.3 数据分析 采用 DPSv 9.50 数理统计软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内酪氨酸酶的影响 由图 1 可知,5 种不同处理的菌丝体内酪氨酸酶活性都呈先上升后下降的趋势,覆土、瓶子搔菌后正放 1 和倒扣 1 的酪氨酸酶活性在整个过程都比较低,而瓶子搔菌后正放 2 和倒扣 2 的酪氨酸酶活性在第 6 天后急剧上升,在第 9 天出现最高峰,分别达 55.663 3 和 88.280 3 U/g,之后下降。第 18 天 5 种不同处理的菌丝体内酪氨酸酶活性接近。

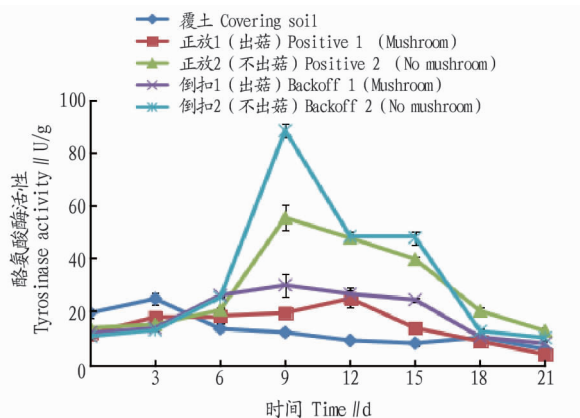


图 1 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内酪氨酸酶活性的影响

Fig.1 Effect of different mushroom treatment methods on tyrosinase activity of giant mushroom mycelium

2.2 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内蛋白酶的影响 由图 2 可知,覆土处理、瓶子搔菌后正放 1 和倒扣 1 的蛋白酶活性不断上升,在第 21 天(现蕾期)达到最大值,分别为 582.075 0、664.697 5 和 677.579 3 U/g,显著高于正放 2 和倒扣 2 的蛋白酶活性。正放 2 和倒扣 2 的蛋白酶活性未被有效激活,整个过程蛋白酶活性变化不明显,一直处于较低水平。

2.3 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内淀粉酶的影响 由图 3 可知,第 0~9 天 5 种不同处理方法的淀粉酶活性差异不显著,均处于较低水平。第 9 天起,覆土处理、正放 1 和倒扣 1 的淀粉酶活性快速上升,显著高于其他 2 组处理。正放 2 和倒扣 2 在后期淀粉酶活性有所上升,但变化不

明显。

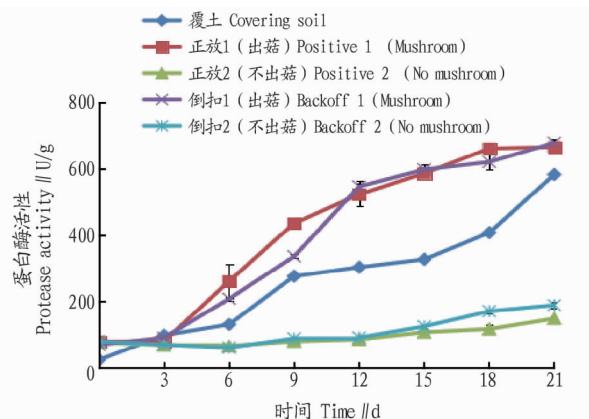


图 2 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内蛋白酶活性的影响
Fig.2 Effect of different mushroom treatment methods on protease activity of giant mushroom mycelium

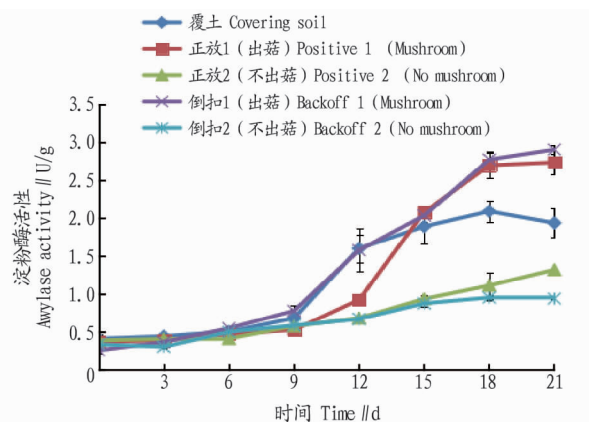


图 3 不同出菇处理方法对巨大口蘑菌丝体内淀粉酶活性的影响
Fig.3 Effect of different mushroom treatment methods on amylase activity of giant mushroom mycelium

3 结论与讨论

试验通过对巨大口蘑覆土后和瓶子搔菌后不同处理其菌丝体内 3 种酶活性的变化规律进行了研究,发现 3 种酶在不同阶段活性变化具有显著差异。覆土处理、瓶子搔菌后正放 1 和倒扣 1 在第 18 天均能形成原基,在第 21 天均能长出小菇蕾,而瓶子搔菌后正放 2 和倒扣 2 在测定的整个过程中未能形成原基。由此可见,巨大口蘑从菌丝恢复期到原基形成、现蕾阶段,不需要很高的酪氨酸酶活性,较高的酪氨酸酶活性抑制了菌丝扭结形成原基;而蛋白酶、淀粉酶活性在原基形成前都需要得到有效的激活作用,酶活性显著高于不能形成原基的处理组。

酪氨酸酶是一类广泛存在于植物体中含 Cu 的结合酶,一起参与呼吸末端氧化还原反应^[13]。该研究发现,能形成原基的处理组在第 6 天酪氨酸酶活性有所升高,之后趋于平缓,与不能形成原基的处理组相比处于较低水平,可能是这个过程菌丝体内产生了酪氨酸酶的有效抑制剂^[14]。而瓶子搔菌后正放 2 和倒扣 2 的酪氨酸酶活性呈现先上升后下降的过程,在第 9 天达到最高峰,显著高于其他 3 个处理。可能是因为菌丝体的呼吸作用受阻,激发了酪氨酸酶的活性,

酶活性很高,菌丝营养生长没有结束,不能扭结形成原基,未具备产实的内在条件,即使有合适的外界环境,也不能出菇。具体原因还有待进一步研究。

该研究结果显示,能形成原基的处理组蛋白酶活性都呈现不断上升的趋势,与前人的描述一致^[15]。蛋白酶活性的升高为新物质的合成积累氮源,当积累到一定程度时,诱导原基发生。而不能形成原基的处理组蛋白酶活性无明显变化,一直处于较低水平,说明该处理缺乏诱导蛋白酶应答反应的条件,缺乏物质的转换和积累,菌丝徒长,一直维持在营养生长阶段,因而难以形成原基,这与张乐^[16]的研究结果一致。

研究表明,淀粉酶在食用菌菌丝生长阶段高,在子实体期降低^[17],说明在栽培前期大部分淀粉类物质被分解利用,在栽培后期则利用较少。该研究发现,5种处理的淀粉酶在前期阶段活性较低,从第9天起能形成原基的处理组淀粉酶活性快速上升。这可能是因为培养料中的不需要用到淀粉酶起分解作用的小分子物质在菌丝恢复期营养生长阶段被消化完后,需要进一步分解淀粉类大分子物质以满足菌丝体不断成长、扭结和形成原基的营养需求。而瓶子搔菌后正放2和倒扣2淀粉酶活性在整个阶段变化不明显,推测其在第21天未能形成原基可能与淀粉酶活性较低有密切关系。而赵亚东^[17]对秀珍菇胞外酶的研究表明,胞外淀粉酶活性的高低与秀珍菇现蕾的早晚不相关。

参考文献

[1] 莫美华,张倩勉.巨大口蘑子实体抽提物抑菌活性研究[J].食品工业

科技,2009,30(5):151-153.

- [2] 陈德荣,卢玉文,陈雪凤,等.利用工业废弃物剑麻渣栽培食用菌夏秀玲技术研究[J].现代农业科技,2013(15):88-89.
- [3] 李碧琼,陈政明,林俊扬,等.袋栽金福菇高产栽培技术[J].食用菌,2007,29(3):53-54.
- [4] 沈敏,李文生,丁伟华.杏鲍菇工厂化栽培技术研究与应[J].安徽农学通报,2010,16(11):138-139.
- [5] 陈美元.双孢蘑菇子实体原基与菇蕾蛋白质表达变化分析[J].食用菌学报,2012,19(3):15-20.
- [6] SAEKI N, TAKEDA H, TANESAKA E, et al. Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native-PAGE[J]. Mycoscience, 2011, 52(2): 132-136.
- [7] 曹春蕾,崔宝凯,秦问敏.桑木层孔菌液体培养过程中几种胞外酶活性的变化[J].菌物学报,2011,30(2):275-280.
- [8] 司静,崔宝凯,贺帅,等.微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用[J].应用与环境生物学报,2011,17(5):736-741.
- [9] 黄建春,蒋其根,陈珏,等.大棚栽培金福菇技术[J].食用菌,2010,32(5):46-47.
- [10] 王庆武,安秀荣,唐丽娜,等.金福菇袋栽高产技术[J].食用菌,2013(1):39-40.
- [11] 魏要武,莫美华,陈东梅,等.金属离子对巨大口蘑褐变相关酶活力的影响[J].食品科技,2015,40(7):55-59.
- [12] 黄卓烈.生物化学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2010.
- [13] YOSHIDA H. Chemistry of lacquer (Urushi); Part 1 [J]. J Chem Soc, 1983, 3: 472-486.
- [14] 张国良.低温处理对阿魏菇菌丝体生理生化及营养积累的影响[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.
- [15] 冯作山,邹亚杰,胡清秀.白灵侧耳栽培过程中胞外酶和呼吸酶活及离子流速的研究[J].菌物学报,2014,33(2):341-354.
- [16] 张乐.低温诱导对阿魏侧耳原基形成相关生理生化影响的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [17] 赵亚东.不同培养料对秀珍菇生长发育、产量及胞外酶的影响[D].南京:南京农业大学,2011.

(上接第11页)

参考文献

- [1] 佰腾专利检索系统.佰腾专利检索—中国专利库[DB/OL].(2016-01-23)[2017-08-20].http://so.baiten.cn/.
- [2] ZHOU G Y, WENG J, ZENG Y S, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Methods in enzymology, 1983, 101(6): 433-481.
- [3] 杨剑波,吴李君,吴家道,等.应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株[J].科学通报,1994,39(16):1530-1534.
- [4] 段晓岚,陈善葆.外源DNA导入水稻引起性状变异[J].中国农业科学,1985,18(3):6-11.
- [5] 黄骏,钱思颖,刘桂玲,等.外源海岛棉DNA导致陆地棉性状的变异[J].遗传,1981,8(1):56-62.
- [6] 曾君祉,王东江,吴有强,等.用花粉管途径获得小麦转基因植株[J].中国科学(B辑),1993,23(3):256-262.
- [7] 黄承彦,楚秀生,杨平平,等.外源DNA导入技术培育抗旱耐盐小麦新品种[J].山东农业科学,2000(4):4-6.
- [8] 倪建福,周文麟,王亚馥.高粱DNA导入小麦选育出抗条锈白粒新品系[J].甘肃农业科技,1994(7):310-314.
- [9] 董春林,张明义,林忠平,等.用花粉管通道法将抗旱耐盐基因导入玉米自交系的研究[J].山西农业科学,2011,39(5):392-394.
- [10] 雷勃钧,钱华,李希臣,等.通过直接引入外源DNA育成高产、优质、高蛋白大豆新品种黑生101[J].作物学报,2000,26(6):725-730.
- [11] 刘昭军,李铁,刘丽艳,等.花粉管通道介导的抗除草剂基因(bar)对大豆的遗传转化[J].大豆科学,2007,27(3):310-314.
- [12] 马盾,黄乐平,黄全生,等.花粉管通道法在棉花转基因上的应用[J].新疆农业科学,2004,41(1):29-30.
- [13] 马盾,黄乐平,周小云,等.花粉管通道法转基因棉花后代特性的研究[J].新疆农业科学,2007,44(S3):105-107.
- [14] 刘方,王坤波,宋国立,等.花粉管通道法转基因棉花材料的获得[J].中国棉花,2008,35(8):16.
- [15] 李莉.离子束介导海藻糖合成酶基因转入小麦的抗旱性研究[D].郑州:郑州大学,2003.
- [16] 袁收伟,秦广雅,余增亮,等.离子束法导入大豆DNA小麦的蛋白质含量分析[J].中国农学通报,2010,26(18):71-74.

- [17] 李红.低能离子束介导水稻转基因体系的研究[D].合肥:中国科学院等离子体物理研究所,1999.
- [18] 程备久,田秋元,李展,等.离子注入法导入外源DNA引起陆地棉性状变异的研究[J].核农学报,1996,10(3):150-154.
- [19] 郑卫红,王瑜,余增亮.低能离子束介导外源基因转化烟草的研究[J].激光生物学报,2000,9(4):241-245.
- [20] 宋道军,王浩波,杨坤,等.离子束处理将外源基因导入西瓜研究初报[J].中国西瓜甜瓜,2001(2):2-3.
- [21] 许宁,赵南明,章力建,等.超声诱导基因转移[J].生物物理学报,1990,6(2):281.
- [22] 许宁,赵南明,章力建,等.超声波诱导植物组织基因转移方法:CN97111924.4[P].1998-05-06.
- [23] 孙毅,崔贵梅,郝曜日,等.超声波辅助花粉介导植物转基因方法:CN102127567A[P].2011-07-20.
- [24] 孙毅,王景雪,崔贵梅.超声波处理花粉介导植物基因转化方法:ZL99121152.9[P].2006-03-29.
- [25] 王节之,郝晓芳,郑向阳,等.谷子花粉介导法转几丁质酶基因的研究[J].生物技术,2004,14(5):5-6.
- [26] 梁雪莲,郑英雄,庄东红,等.花生CpTI基因转化——花粉介导法[J].花生学报,2006,35(4):1-5.
- [27] 杜春芳,刘惠民,李朋波,等.花粉介导法获得油菜转基因植株研究[J].作物学报,2006,32(5):749-754.
- [28] 曹秋芬,岳新丽,孟玉平,等.超声波处理对苹果花粉介导转基因的影响[J].华北农学报,2005,20(2):16-18.
- [29] 南芝润,惠国强,罗绮,等.超声波辅助花粉介导法获得转*BtCry1Ac*基因玉米的研究[J].黑龙江农业科学,2015(9):22-25.
- [30] 郭天璐,张欢欢,杜建中,等.花粉介导的花青素调节基因*NtAn2*转化玉米研究[J].山西农业科学,2016,44(4):427-431,435.
- [31] 单美玉,王戴尊,李彩霞,等.基于专利分析的转基因玉米发展态势分析[J].农业图书情报学刊,2015,27(12):5-10.
- [32] 张梦然.全球转基因农作物发展现状与趋势[J].农家参谋(种业大观),2012(5):9-10.
- [33] 毛开云,陈大明,江洪波.农作物生物育种产业化情况及发展趋势[J].生物产业技术,2013(2):51-57.