

# 用可见分光光度法测定茶薪菇生长发育中 几种与基质利用相关的酶活性

傅明辉, 孔敏, 韩雅莉

汕头大学生物系, 广东 汕头 515063

**摘要** 用可见分光光度法研究了茶薪菇和雪莲菇不同生长阶段的过氧化物酶、漆酶、蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的活性。结果表明: 两种菇的淀粉酶和过氧化物酶都在菌丝生长期最高。可见这两种酶在营养生长期起较大作用, 对子实体形成后的影响很小。它们的蛋白酶活力变化相似: 菌丝生长期高于子实体生长后期。但两种菇在漆酶和纤维素酶活性方面就有较大差异, 从中可看出这两种菇是有一定的生理生化差异的。

**关键词** 茶薪菇; 雪莲菇; 菌丝; 成菇; 酶活性

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)03-0532-03

茶薪菇(*Agrocybe cylindracea*)属担子菌纲、伞菌目、粪锈伞科、田头菇属。该菇食味独特, 营养丰富, 具有抗衰老、防癌、抗癌等特殊功能, 是食药两用价值很高的食用菌<sup>[1]</sup>。国内外不少学者对茶薪菇菌丝培养和栽培技术作了深入的研究, 取得了可喜的进展<sup>[1, 2]</sup>。本研究采用可见分光光度法测定了茶薪菇生长发育不同阶段, 与基质利用相关的几种酶活力的变化, 旨在揭示酶活力与菌株生长发育的关系, 了解不同发育阶段, 茶薪菇对不同基质成分的利用能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

购自浙江丽水林科所。茶薪菇, 学名柱状田头菇(*Agrocybe cylindracea*); 雪莲菇, 茶薪菇的一个变种。

### 1.2 培养方法

菌丝培养使用马铃薯培养基, 子实体栽培使用棉籽壳培养基。

### 1.3 粗酶液的提取

新鲜的食用菌菌丝、子实体 1~2 g, 加入 0.9% 的生理盐水, 匀浆, 超声波细胞破碎后, 在  $6\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 8 min。上清液为酶的粗提液。在提取过程中注意保持低温以免酶失活。

### 1.4 过氧化物酶活性测定

采用愈创木酚法<sup>[3]</sup>。酶活性定义:  $1\text{ }\mu = \Delta A_{470\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 即每克(鲜重)培养物每分钟在波长 470 nm 处吸光度的

的变化值。

### 1.5 漆酶活性测定

参考兰瑞芳等<sup>[4]</sup>的方法进行。酶活力定义:  $1\text{ }\mu = \Delta A_{490\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 室温下每克(鲜重)培养物每分钟在波长 490 nm 处吸光度的变化值。

### 1.6 蛋白酶活性测定

参考文献[5], 以牛血清白蛋白作底物, Bradford 法测定蛋白质的含量。酶活力定义: 活力单位  $\mu$  的值即每克培养物在单位时间(1 min)内产生的蛋白质含量(mg)。

### 1.7 淀粉酶活性测定

参考文献[6], 以可溶性淀粉作底物, DNS 法测定还原糖含量。酶活力定义: 活力单位  $\mu$  的值即每克(鲜重)培养物在 38 °C 水浴 30 min 后产生的还原糖含量(mg)。

### 1.8 羧甲基纤维素(CMC)酶活性测定<sup>[7]</sup>

以羧甲基纤维素钠作底物, DNS 法测定还原糖含量。酶活力定义: 活力单位  $\mu$  的值即每克(鲜重)培养物在 50 °C 水浴 30 min 后产生的还原糖含量(mg)。

### 1.9 滤纸纤维素(FP)酶活性测定<sup>[7]</sup>

以滤纸纤维素作底物, DNS 法测定还原糖含量。酶活力定义: 活力单位  $\mu$  的值即每克(鲜重)培养物在 50 °C 水浴 1 h 后产生的还原糖含量(mg)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 测定方法

收稿日期: 2004-12-25, 修订日期: 2005-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(30271033)资助项目

作者简介: 傅明辉, 1967 年生, 汕头大学生物系副教授

本研究利用分光光度法测定几种酶的活性, 波长范围均在可见光范围, 测定过程中将待测溶液转化为在特定波长具有一定吸收值的溶液, 这样就可以很方便地对酶活力加以测定, 说明分光光度法在酶活力测定方面有着广泛的用途<sup>[8, 9]</sup>。

Table 1 The activity determination result of several enzymes

|                  | 茶薪菇   |       |      | 雪莲菇   |      |
|------------------|-------|-------|------|-------|------|
|                  | 菌丝    | 幼菇    | 成菇   | 菌丝    | 成菇   |
| 过氧化物酶活力/ $\mu$   | 0 15  | 0 04  | 0 06 | 0 27  | 0 10 |
| 漆酶活力/ $\mu$      | 0 45  | 0 54  | 0 49 | 0 94  | 0 23 |
| 蛋白酶活力/ $\mu$     | 12 93 | 16 80 | 0 93 | 14 27 | 0 53 |
| 淀粉酶活力/ $\mu$     | 8 66  | 3 70  | 1 94 | 4 68  | 1 95 |
| 羧甲基纤维素酶活力/ $\mu$ | 9 26  | 1 00  | 1 69 | 5 42  | 5 10 |
| 滤纸纤维素酶活力/ $\mu$  | 5 96  | 0 80  | 1 34 | 3 65  | 5 94 |

2 2 过氧化物酶活性

过氧化物酶广泛存在于植物细胞中, 是为细胞清除活性氧伤害的保护性酶的系统, 其活性的提高有助于提高植物的抗病性。同时, 过氧化物酶和漆酶都参与了木质素的分解。

从表 1 中可以看出茶薪菇和雪莲菇的过氧化物酶活性都是菌丝阶段最大, 而雪莲菇菌丝和成菇的酶活性比茶薪菇菌丝和成菇的稍大。这与香菇的情况相近(过氧化物酶只在菌丝生长时期出现, 至子实体形成时期渐行消失)<sup>[10]</sup>。这说明无论是茶薪菇、雪莲菇或香菇, 都是在菌丝生长期较为能利用过氧化物酶分解木质素, 在子实体形成后过氧化物酶几乎没起什么作用。如果单从过氧化物酶活性看, 菌丝的抗病性可能高于子实体。

2 3 漆酶活性

漆酶是与木质素等大分子降解有关的主要酚氧化酶, 它能加速木质素芳香族高分子化合物的分解, 为菌丝提供丰富营养。另外, 漆酶的代谢产物醌能增强菌种的抗病能力, 抑制杂菌的污染。

从表 1 可以看出, 茶薪菇三个生长阶段漆酶活性变化不大, 而雪莲菇则是菌丝阶段漆酶活性远高于成菇, 说明雪莲菇菌丝比成菇更能利用木质素提供碳源。雪莲菇的子实体生长速度比茶薪菇慢很多可能正是由于木质素的分解利用较为缓慢之故。

2 4 蛋白酶活性

食用菌能直接吸收氨基酸、尿素、氨等小分子化合物, 但必须借助蛋白酶把蛋白质分解后才能吸收并将其用于合成蛋白质和核酸。

表 1 的数据表明茶薪菇幼菇的蛋白酶活性最大, 其次是菌丝, 最小是成菇。雪莲菇也是菌丝阶段蛋白酶活性比成菇大。幼菇和菌丝时期较大的蛋白酶活性, 为其生长发育所需大量蛋白质的及时供应提供了可能。而相对而言, 成菇期就不需要那么多的蛋白质了。

2 5 淀粉酶活性

食用菌通过淀粉酶水解淀粉为葡萄糖作为碳源。

茶薪菇菌丝的淀粉酶活性最大, 幼菇比菌丝小, 成菇最小。雪莲菇菌丝的也比成菇的大, 但雪莲菇的菌丝酶活性比茶薪菇菌丝小很多, 其成菇酶活性却与茶薪菇成菇非常接近。这说明在茶薪菇生长发育的前期, 对淀粉类的非木质纤维素的利用能力较强。淀粉酶在营养生长阶段对碳源的提供起重要的作用, 生殖生长后降低表明对子实体的形成和发育的影响不大。

2 6 纤维素酶活性

棉籽壳培养基中的木屑能够为食用菌提供可作为碳源的纤维素, 纤维素经纤维素酶分解成葡萄糖后可合成碳水化合物和氨基酸以构成细胞物质和供给食用菌生长发育所需的能量。纤维素酶是降解纤维素的一类酶的总称, 其中三种主要组分是内切葡聚糖酶(CMC 酶), 外切葡聚糖酶(FP 酶)和 $\beta$ 葡萄糖苷酶。这里着重比较了前两种酶。

从表 1 可以看出茶薪菇的纤维素酶(CMC 酶和 FP 酶)活性都是菌丝远远大于成菇, 成菇比幼菇大(但差额没有那么大)。雪莲菇菌丝与成菇的 CMC 酶活性相近, FP 酶活性的差别较大, 成菇的 FP 酶比菌丝大。可见, 在对纤维素的利用方面, 茶薪菇与雪莲菇有很大的差别。上述结果表明, 茶薪菇在菌丝营养生长阶段, 纤维素已被大量地分解利用; 在萌芽时, 因菌丝处于由营养生长向生殖生长转变的阶段, 故菌丝对纤维素的分解利用速度降低, 到子实体大量生长时, CMC 酶活性再次上升, 从而加大对纤维素的分解, 以此为子实体的长大提供碳水化合物。雪莲菇对纤维素的利用表现为成菇更能利用纤维素。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] ZHENG Yi, YU Wang, SHI Qiao qin, et al( 郑 毅, 余 望, 施巧琴, 等). Chinese Edible Fungi( 中国食用菌), 1999, 18( 5): 13.
- [ 2 ] DANG Jian zhang, HE Zong zhi, JIANG Bao guo, et al( 党建章, 何宗智, 江保国, 等). Microbiological Journal( 微生物学杂志), 1999, 19( 2): 11.
- [ 3 ] ZHANG Zhi liang( 张志良). Plant Physiological Experimental Guide( 植物生理学实验指导). Beijing: Higher Education Press( 北京: 高等教育出版社). 1990. 154.
- [ 4 ] LAN Rui fang, LIN Shao qin, LIN Yu man, et al( 兰瑞芳, 林少琴, 林玉满, 等). Edible Fungi Journal( 食用菌学报), 2002, 9( 2): 14.
- [ 5 ] LI Shi gui, CHEN Ming jie( 李世贵, 陈明杰). Fungi System( 菌物系统), 2003, 22( 2): 335.
- [ 6 ] WANG Yu wan, WANG Yun( 王玉万, 王 云). Microbiology Bulletin( 微生物学通报), 1989, 16( 3): 137.
- [ 7 ] GUO Li zhong, GUO Hua, LI Wei feng, et al( 郭立忠, 郭 华, 李维风, 等). Journal of Laiyang Agriculture College( 莱阳农学院学报), 2002, 19( 3): 210.
- [ 8 ] LI Bing zhen( 李秉真). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2001, 21( 6): 837.
- [ 9 ] WEI Yong feng, YAN Hong tao( 魏永锋, 阎宏涛). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2001, 21( 5): 704.
- [ 10 ] WEI Xiao yu( 尉晓宇). Chinese Edible Fungi( 中国食用菌), 1990, 9( 5): 15.

## Determination of Several Substrate-Decomposition Enzyme Activities of *Agrocybe cylindracea* at Different Stages of Development with Spectrophotometer

FU Ming hui, KONG Min, HAN Ya li

Biology Department of Shantou University, Shantou 515063, China

**Abstract** In the present paper the authors studied the activities of amylase, peroxidase, laccase, protease and cellulase at different developmental stages of *agrocybe cylindracea* and its mutation with the spectrophotometer. The result showed that the activity of amylase and peroxidase in hyphal stage is the highest for the two basidiomycetes. It can be concluded that these two enzymes are important in vegetative growth stage, but they may have little effect after the appearance of fruit body. The change of their protease is similar: in the hyphal growth stage it is higher than that of mature mushroom. But the activities of laccase and cellulase are very different between the two basidiomycetes. It is obvious that they are some different in physiology and biochemistry.

**Keywords** *Agrocybe cylindracea*; Mutation; Hyphal; Mature mushroom; Activity of enzyme

(Received Dec. 25, 2004; accepted Jun. 28, 2005)