

泛素化结合酶 E2 抑制剂对草菇 15 °C 保鲜的影响

龚明¹, 尹昕², 黄天宇³, 郑婷婷⁴, 唐利华¹, 张赫男^{1*}, 汪滢^{1*}

1 上海市农业科学院食用菌研究所 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心 国家食用菌加工技术研发分中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403

2 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012

3 江苏海洋大学食品科学与工程学院, 江苏 连云港 222005

4 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 为了改进草菇低温保鲜方法, 在 15 °C 贮藏条件下, 采用泛素化结合酶 E2 (UBEV2) 抑制剂对草菇子实体进行处理, 并开展相关生理指标和基因表达检测。结果表明, 使用 100 μmol/L 的 UBEV2 抑制剂 L345-0044 维持了草菇较好的品质, 提高了草菇可溶性糖的含量。低温明显提升抑制剂处理下的碱性蛋白酶和中性蛋白酶活力, 并证实了低温胁迫显著提高了抑制剂处理下的一种类型蛋白酶肽基赖氨酸金属内肽酶的表达。本研究证实了草菇可溶性糖和高活性的冷诱导金属内肽酶对于延长草菇的低温保鲜时间是必须的。

关键词: 草菇; 泛素化结合酶 E2; 蛋白酶; 金属内肽酶; 低温保鲜

[引用本文] 龚明, 尹昕, 黄天宇, 郑婷婷, 唐利华, 张赫男, 汪滢, 2022. 泛素化结合酶 E2 抑制剂对草菇 15 °C 保鲜的影响. 菌物学报, 41(12): 2074-2082

Gong M, Yin X, Huang TY, Zheng TT, Tang LH, Zhang HN, Wang Y, 2022. Effects of inhibitor ubiquitin binding enzyme E2 on preservation of *Volvariella volvacea* at 15 °C. Mycosystema, 41(12): 2074-2082

基金项目: 国家自然科学基金(32072642)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072642).

*Corresponding authors. E-mail: wyhrx@126.com, henanhaoyun@126.com

ORCID: GONG Ming (0000-0002-0221-0015)

Received: 2022-02-17, accepted: 2022-04-11

Effects of inhibitor ubiquitin binding enzyme E2 on preservation of *Volvariella volvacea* at 15 °C

GONG Ming¹, YIN Xin², HUANG Tianyu³, ZHENG Tingting⁴, TANG Lihua¹, ZHANG Henan^{1*}, WANG Ying^{1*}

1 Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Southern Key Laboratory of Edible Fungus Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; National Engineering Research Center of Edible Fungi; National R&D Center for Edible Fungal Processing; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China

2 College of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, Jilin, China

3 College of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

4 College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Fruiting bodies of *Volvariella volvacea* were treated with ubiquitin binding enzyme E2 (UBEV2) inhibitor for improving the preservation quality at low temperature of 15 °C, and related physiological indexes and gene expression were detected. The 100 µmol/L UBEV2 inhibitor treatment maintained better quality of *V. volvacea* and increased the soluble sugar content of *V. volvacea*. Low temperature significantly increased alkaline protease activities and neutral protease activities under inhibitor treatment. It was confirmed that cold pressure significantly increased the expression of peptidyl-lysine metalloendopeptidase, a type of protease, under inhibitor treatment. This study demonstrated that the soluble sugar and high activities of cold-induced metalloendopeptidase were necessary for prolonging the storage time of *V. volvacea* at low-temperature.

Keywords: *Volvariella volvacea*; ubiquitin-binding enzyme E2; protease; metalloendopeptidases; low-temperature preservation

草菇 *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer 被称为“中国菇”，不仅味道鲜美，而且具有重要的医疗保健作用(Buswell & Chen 2005; Wu *et al.* 2019)。草菇肉质鲜美且生长周期短(大约 10 d)，菌丝的生长和结实要求比较高的温度(28–35 °C) (Bao *et al.* 2013; Chen *et al.* 2013)，其菌丝和子实体在 4 °C 下，短时间内便会软化、液化甚至腐烂(图 1) (Chang & Hayes 1978)，即通常所说的“低温自溶”。草菇“低温自溶”使得草菇的货架期明显短于其他菇类，极大地限制其栽培和普及，直接影响了经济效益。

有研究表明草菇子实体贮藏的最适温度为 15–20 °C (王富民和官秀荣 1990)。查磊等(2018)对草菇 V23 子实体进行了 15 °C 贮藏的形态和生

理生化研究,但该研究并没有明确草菇低温贮藏的关键因素。近来有研究发现一种类型的草菇泛素化结合酶 E2 (ubiquitin-conjugating E2 enzyme, UBEV2) 上调表达促进低温自溶，通过加入 UBEV2 的小分子抑制剂 L345-0044 能够一定程度抑制低温(4 °C)自溶，减轻低温胁迫对草菇的伤害(万佳宁等 2020; Gong *et al.* 2022)。虽然抑制剂 L345-0044 作为筛选出的新化合物(万佳宁等 2020)的安全性尚未确定,但如果只关注草菇子实体的抗冻性，那么 L345-0044 溶液为揭示草菇低温保鲜的生理变化提供了研究的可能性。基于此，本研究以小分子抑制剂 L345-0044 处理的草菇 V23 的子实体，在 15 °C 条件下分别贮藏 0–5 d，从形态、生理生化以及分子层面 3 个

方面对其进行系统性评价,为改进草菇低温保鲜方法积累科学数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株

草菇 V23 菌株由上海市农业科学院食用菌研究所菌种库保藏并提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

UBEV2 抑制剂 L345-0044 来源于 ChemDiv, L345-0044 为其在 Chemdiv 库中化合物编号(万佳宁等 2020)。梅特勒 LE204E 型万分之一天平;HWS-系列电热恒温水浴锅;MD SpectraMax 190 全波长酶标仪;普通 PCR 仪 EDC-810 型(北京东胜创新生物科技有限公司);实时荧光定量仪 MA-6000 型(苏州雅睿生物技术有限公司)。

1.2 样品处理

将草菇 UBEV2 抑制剂 L345-0044 加水配制成浓度为 100 μmol/L 的溶液,在草菇的小纽扣期生长阶段进行喷洒。每天一次,间隔 24 h,连续喷两天,喷洒以水滴挂住菇体为标准。喷洒后的第 4 天收集草菇子实体,然后在 15 ℃贮藏,每天收集样品,0–5 d,设置 3 个重复,放入–80 ℃,待测定。将同样水溶液喷洒处理设置为对照处理。

1.3 生理指标测定方法

采用茚三酮显色法测定总游离氨基酸含量,具体详见王文平(1998)的报道;采用蒽酮法测定可溶性总糖含量,具体详见王学奎(2006a)

的报道;可溶性蛋白含量测定具体详见王学奎(2006b)的报道。

采用酸性蛋白酶(ACP)活性测定试剂盒、碱性蛋白酶(AKP)活性测定试剂盒、中性蛋白酶(NP)活性测定试剂盒、多酚氧化酶(PPO)活性测定试剂盒、丙二醛(MDA)含量试剂盒进行酶活和含量测定,具体详见王文平 (1998)、王学奎(2006a, 2006b)、余科林等 (2016)和查磊等(2018)的报道。

1.4 蛋白酶热图表达分析

采用 150 μmol/L 的 L345-0044 浸泡处理 2 min 后获得的草菇耐低温表型的转录组数据,具体参见 Gong *et al.* (2022)。其中, 0H 代表对照处理水处理后 4 ℃保存 0 h, 24H 代表水处理后 4 ℃保存 24 h, L24H 代表 150 μmol/L 的 L345-0044 浸泡 2 min 后 4 ℃保存 24 h。采用 Swiss-Prot 蛋白数据库在线注释程序进行草菇蛋白酶的注释,草菇基因组序列数据参见 Bao *et al.* (2013)的报道。使用 R 语言对表达模式进行热图聚类。

1.5 qPCR 分析

收集浸泡过的草菇 V23 (0H、24H 和 L24H)子实体,冻干后,按照厂家说明书使用 TRIzol 试剂 Invitrogen 提取总 RNA。qPCR 的检测详见 Gong *et al.* (2016)的报道。用于 qPCR 的引物见表 1。以 4 ℃贮藏起始点样品为参照,使用 2^{–ΔΔt} 方法(Livak & Schmittgen 2001)计算各基因在 24 h 的相对表达量。

表 1 qPCR 分析的引物
Table 1 The primers used for qPCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	用途 Application
VVO_05291-F	TCGTCCAGCAACCATACA	定量 Quantitative
VVO_05291-2R	TCCTCTTCAAATCCCTCTCA	定量 Quantitative
VVO_03220-F	AGTGGTTCGTCTCGCTGTT	定量 Quantitative
VVO_03220-R	AGTAGCAGTGGTGTGAGTGTTC	定量 Quantitative
GAPDH-F	CCTCTGGCCAAAGTCATCCA	定量 Quantitative
GAPDH-R	AGGGCCCATCGACAGTCTT	定量 Quantitative

1.6 序列生物信息学分析

使用 Geno3D 对金属内肽酶 VVO_03220 进行三维结构的同源建模, 参数默认(Combet *et al.* 2002)。采用 SignalP 5.0 进行信号肽预测(Almagro *et al.* 2019)。使用 MEGA 7.0 软件(Kumar *et al.* 2016)进行系统发育树的构建, 具体参数为: 邻接法, p-distances, Bootstrap=1 000。采用 MEROPS 蛋白酶数据库 merops_scan 在线 BLAST 程序进行 VVO_03220 的同源序列的获取(BLASTp, cut-off e-value $\leq 10^{-5}$)。采用 ENDscript server 进行序列比对的展示(Robert & Gouet 2014)。

1.7 统计分析

使用 SigmaPlotv.12.0 进行单因素方差分析(one way ANOVA), 然后采用 Tukey 检验以进行多重比较, 以评估组间平均值之间的显著差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 形态指标

经过 100 $\mu\text{mol/L}$ UBEV2 抑制剂 L345-0044 溶液喷洒处理的子实体, 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏 5 d, 菇形保持较为完好。而经水溶液喷洒处理的子实

体, 菇形在第 2 天就已经出现部分变形、塌陷和渗水, 第 3 天菇型出现严重变形、收缩(图 1)。以上结果证实了小纽扣期喷洒 L345-0044 溶液能够显著延长草菇子实体低温贮藏时间。

2.2 生理指标

可溶性蛋白检测显示经过 L345-0044 溶液喷洒处理的子实体的可溶性蛋白含量高于对照处理, 但两种处理在低温贮藏中具有类似的变化趋势(图 2A)。可溶性糖检测显示经过 L345-0044 处理的子实体的可溶性糖含量显著($P < 0.05$)高于对照处理, ANOVA 分析显示两种处理子实体糖含量在低温贮藏中都表现出明显($P < 0.001$)的下降趋势(图 2B)。自由氨基酸和 MDA 检测显示经过 L345-0044 处理的子实体的自由氨基酸含量高于对照处理, 两种处理的可溶性总游离氨基酸含量和 MDA 在低温贮藏中具有相似的变化趋势(图 2C, 2D)。以上结果提示 L345-0044 溶液能够通过提高草菇子实体的糖含量来延长草菇的低温保鲜时间。

2.3 酶活指标

PPO 酶活检测显示在低温贮藏中 L345-0044 处理的子实体的酶活整体高于对照处理, NP 酶

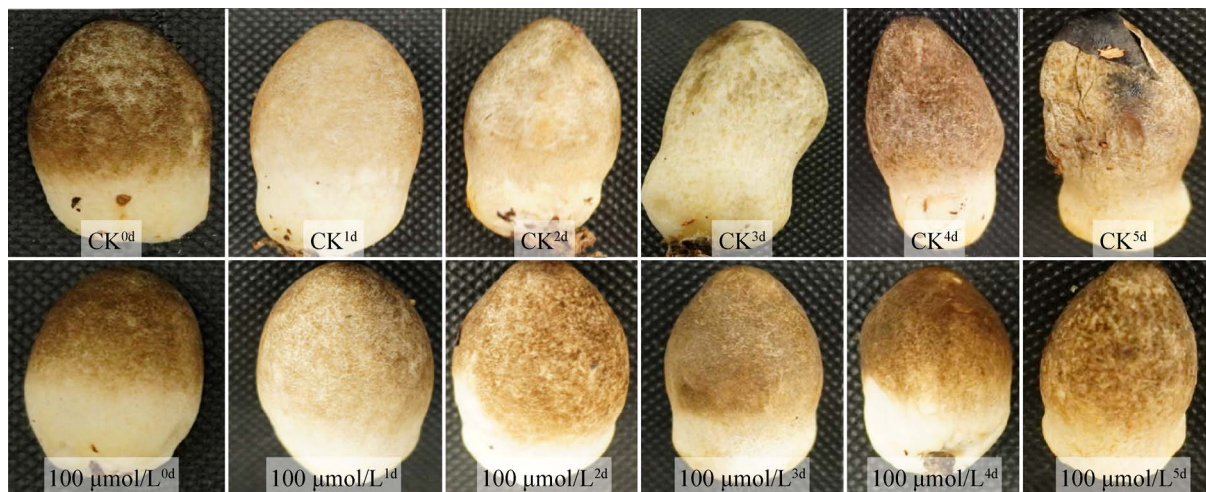


图 1 100 $\mu\text{mol/L}$ L345-0044 溶液处理草菇子实体在 15 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏 CK: 水溶液处理

Fig. 1 Fruiting bodies of *Volvariella volvacea* preserved at 15 $^{\circ}\text{C}$ under 100 $\mu\text{mol/L}$ L345-0044 solution treatment. CK: Aqueous solution treatment.

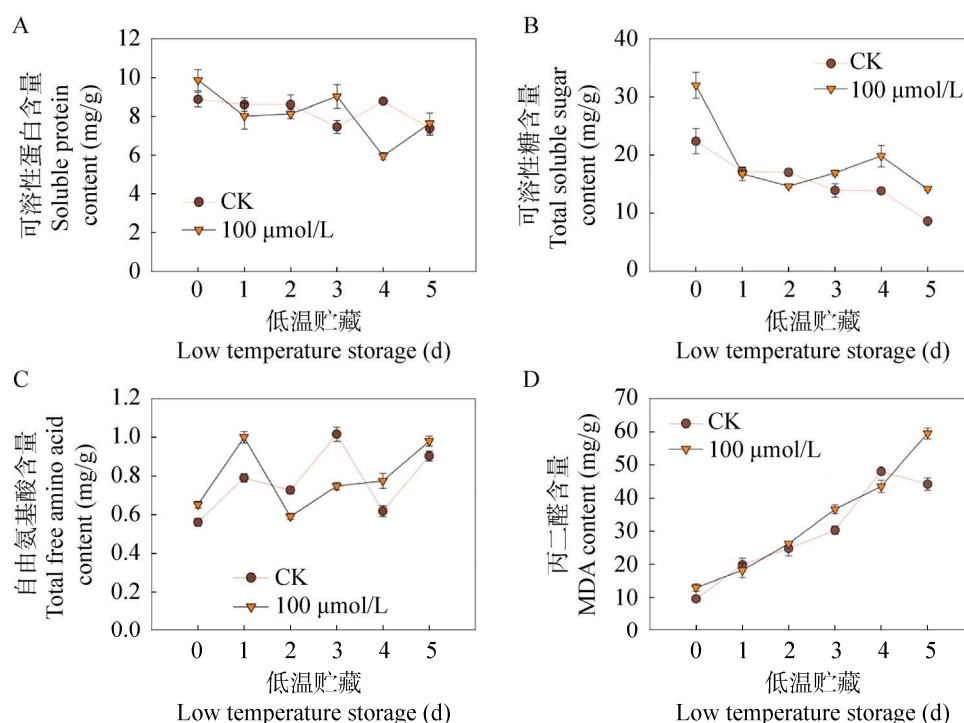


图2 草菇子实体 15 °C 贮藏下的生理指标测定 A: 可溶性蛋白含量变化; B: 可溶性糖含量变化; C: 自由氨基酸含量变化; D: 丙二醛含量变化. 采用单因素方差分析(one way ANOVA)结合 Tukey 检验以进行多重比较, 以评估组间平均值之间的显著差异($P<0.05$)

Fig. 2 Measurement of physiological indexes of fruiting bodies of *Volvariella volvacea* preserved at 15 °C. A: Changes in soluble protein content; B: Changes in soluble sugar content; C: Changes in free amino acid content; D: Changes in MDA content. Multiple comparisons were performed using one way analysis of variance (ANOVA) combined with the Tukey test to assess significant differences between mean values between groups ($P<0.05$).

活检测显示 L345-0044 处理的子实体的酶活低于对照处理(图 3A)。L345-0044 处理的子实体的 NP 酶活性在低温贮藏中呈现上升趋势(图 3B), ANOVA 分析显示变化呈极显著区别($P<0.001$)。AKP 酶活检测显示 L345-0044 处理的子实体的 0 d 酶活明显低于对照处理, L345-0044 处理的子实体的 AKP 酶活性在低温贮藏中呈现上升趋势($P<0.001$) (图 3C), ANOVA 分析显示变化呈极显著区别($P<0.001$)。ACP 酶活检测显示在低温贮藏中 L345-0044 处理的子实体的酶活与对照处理具有相似的趋势(图 3D)。以上结果证实了低温诱导了 L345-0044 处理的 AKP 和 NP 酶活力(图 3B, 3C), 可能参与延长草菇的低温保鲜时间。

2.4 表达分析

热图分析(图 4A)显示 4 °C 低温胁迫抑制了大部分蛋白酶的表达, 但抑制剂 L345-0044 溶液浸泡处理(L24H)提高了金属肽酶家族的活性, 提示这些冷诱导的蛋白酶与草菇抗冻关联。qPCR 实验(图 4B)进一步证实了在低温胁迫作用下, VVO_05291 和 VVO_03220 在 L24H 中极显著($P<0.001$)上调表达, 其中 VVO_03220 提高倍数达到近 50 倍。Interproscan 注释显示该蛋白属于肽基赖氨酸金属内肽酶(peptidyl-Lys metalloendopeptidase, PLMP)亚家族。三维结构模拟分析(图 4C)该蛋白与 *Aeromonas salmonicida* 模型结构(PDB: 2X3A)的相似性达到 31%, 具有 PLMP 包含的 5 个 alpha 螺旋和 4 个 beta 链。信号

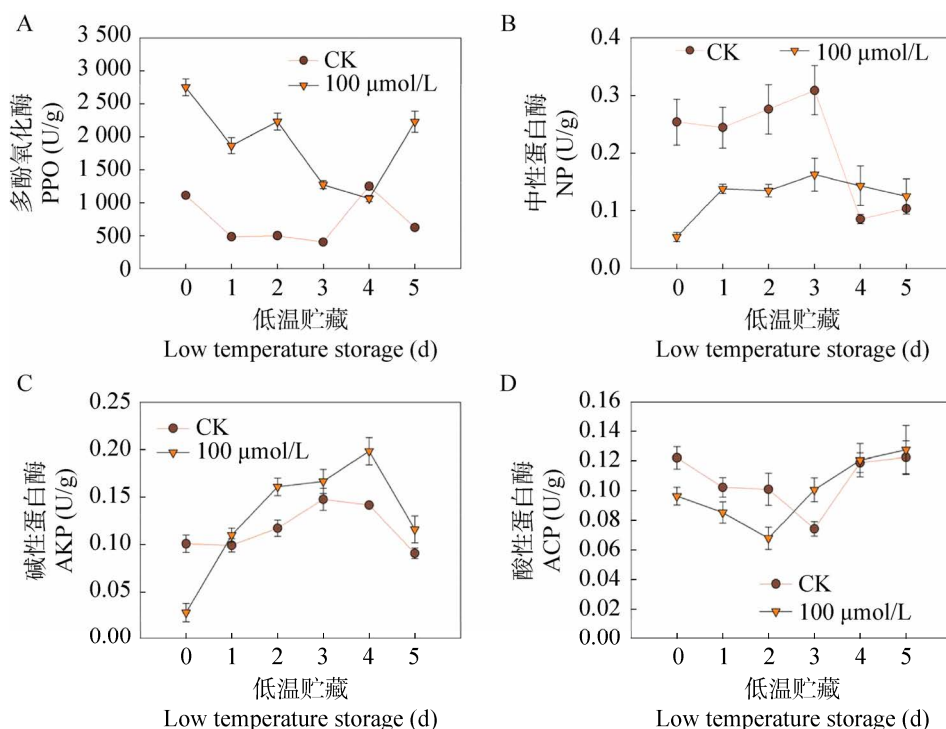


图3 草菇子实体 15 °C贮藏下的酶活指标测定 A: PPO 酶活变化; B: NP 酶活变化; C: AKP 酶活变化; D: ACP 酶活变化. 采用单因素方差分析(one way ANOVA)结合 Tukey 检验以进行多重比较, 以评估组间平均值之间的显著差异($P<0.05$)

Fig. 3 Determination of enzyme activity indexes of fruiting bodies of *Volvariella volvacea* at 15 °C. A: Changes of PPO enzyme activity; B: Changes of NP enzyme activity; C: Changes of AKP enzyme activity; D: Changes of ACP enzyme activity. Multiple comparisons were performed using one way analysis of variance (ANOVA) combined with the Tukey test to assess significant differences between mean values between groups ($P<0.05$).

肽预测显示该蛋白有信号肽的概率为: 96.741%, 信号肽类型: SP (Sec/SPI)。系统发育分析(图 4D)显示 VVO_03220 与 PLMP 亚家族聚成一类, 与中性蛋白酶 2 (neutral protease 2, NP II)亚家族形成一大类。

序列比对显示 PLMP 和 NP II 都具有 HEXXH 基序, 包含两个锌结合组氨酸(His, H)和一个催化谷氨酸(Glu, E), 第三个锌配体是天冬氨酸(Asp, D), 位于 His 锌配体的 GTXDXXYG 基序的 C 端(图 5)。这些基序都属于蛋白酶家族 M35 (EC: 3.4.24.20)的特征, 表明 VVO_03220 属于蛋白酶家族 M35 的 PLMP 亚家族成员。以上结果进一步证实低温胁迫提高了蛋白酶 PLMP 的表达。

3 讨论

本研究发现 15 °C 储藏过程中, 经抑制剂处理的草菇, 其多糖含量显著($P<0.05$)高于对照组(图 2B), 提示了子实体多糖含量的提高可能有助于增强草菇的抗冻性。酸性蛋白酶(ACP)活性变化不显著, 而中性蛋白酶(NP)和碱性蛋白酶(AKP)活性均呈先上升后下降的趋势(图 3), 与前人的研究结果基本一致 (查磊等 2018)。进一步的研究发现 15 °C 处理诱导了抑制剂处理下的 NP 和 AKP 的活性, 并且这两个酶在低温储藏过程中都保持了较高的活性, 提示了它们与草菇的耐低温性的增强相关。热图分析和 qPCR 结果进一步证实 4 °C 低温胁迫提高了抑制剂处理下的

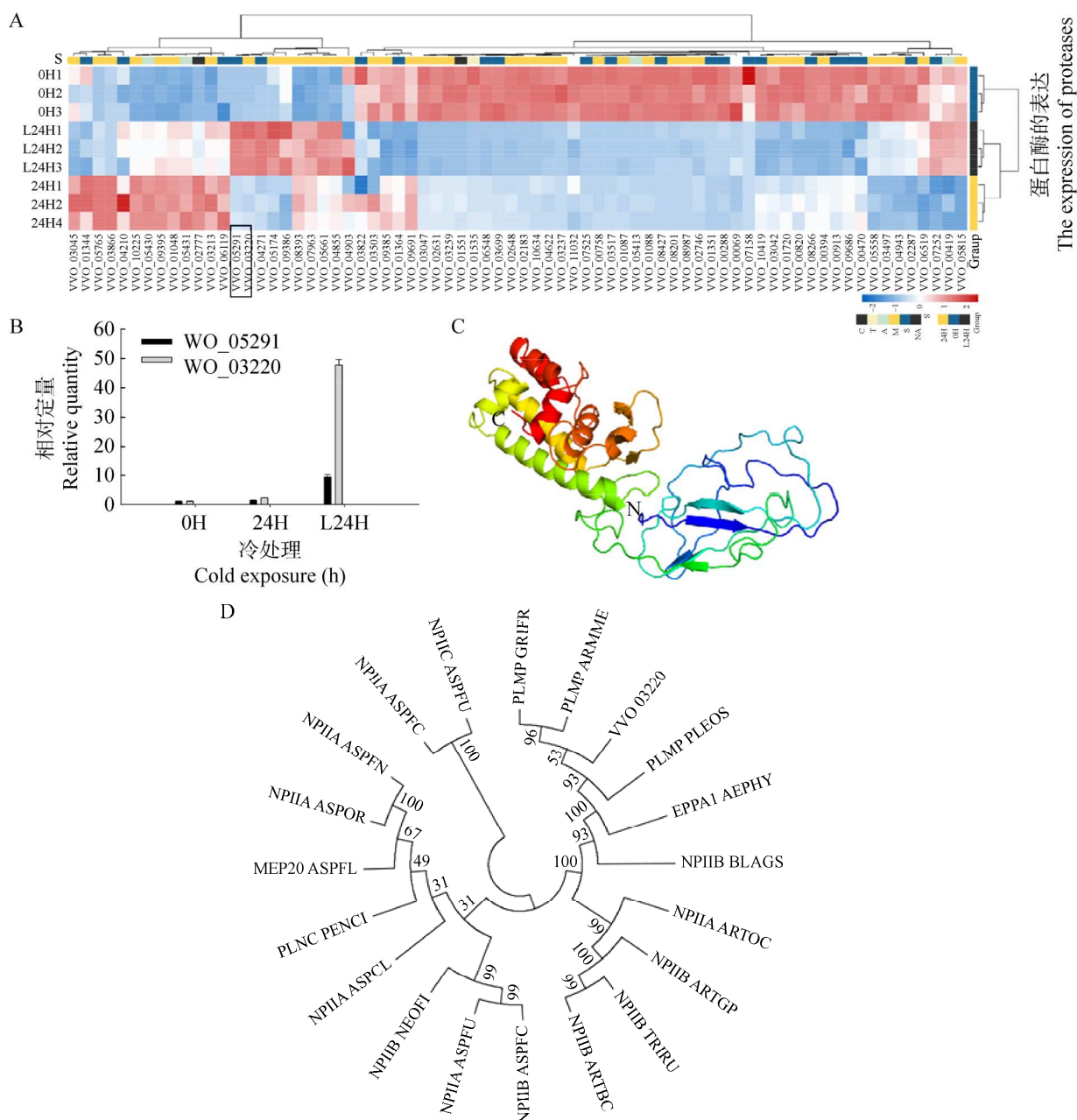


图 4 VVO_03220 的表达与功能注释分析 A: 低温胁迫处理下(4 °C)肽酶表达的热图分析; B: 代表性肽酶的 qPCR 表达分析; C: VVO_03220 的三维结构图, N 代表序列 N 端, C 代表序列 C 端; D: VVO_03220 的系统发育分析. PLMP 代表肽基-Lys 金属肽酶(peptidyl-Lys metalloendopeptidase); NP II 代表中性蛋白酶 2 (neutral protease 2); EPRA1 代表胞外蛋白酶(extracellular protease); M 代表金属肽酶(metallo peptidases) 家族; S 代表丝氨酸肽酶(serine peptidases)家族; 其他参见 MEROPS 数据库注释

Fig. 4 Expression and functional annotation analysis of VVO_03220. A: Heatmap analysis of peptidase expression under cold stress treatment (4 °C); B: qPCR expression analysis of representative peptidase; C: 3D structure diagram of VVO_03220. N represents the N-end of the sequence, and C represents the C-end of the sequence; D: Phylogenetic analysis of VVO_03220. PLMP stands for peptidyl-Lys metalloendoptidase; NP II stands for neutral protease 2; EPRA1 stands for extracellular protease; M stands for metallo peptidases family; S stands for serine peptidases family; For more information, see MEROPS database annotations.

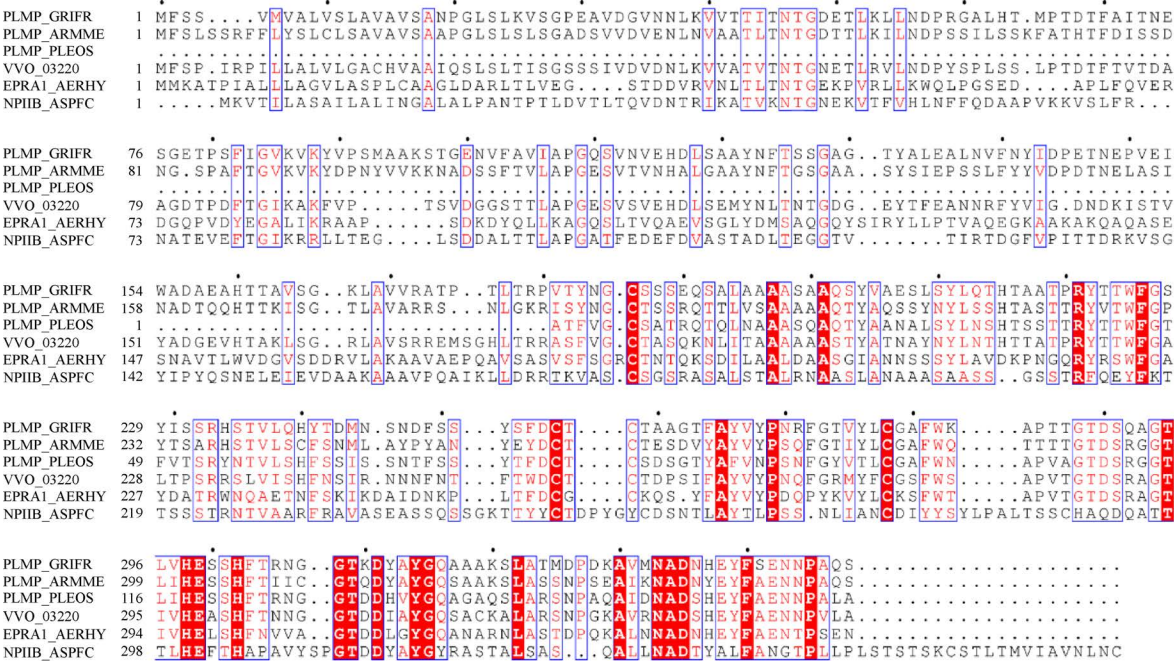


图 5 VVO_03220 的同源序列比对 GRIFR 代表 *Grifola frondosa*; ARMME 代表 *Armillaria mellea*; PLEOS 代表 *Pleurotus ostreatus*; AERHY 代表 *Aeromonas hydrophila*; ASPFC 代表 *Neosartorya fumigata*
Fig. 5 Homologous sequence alignment of VVO_03220. GRIFR stands for *Grifola frondosa*; ARMME stands for *Armillaria mellea*; PLEOS stands for *Pleurotus ostreatus*; AERHY stands for *Aeromonas hydrophila*; ASPFC stands for *Neosartorya fumigata*.

蛋白酶 PLMP (VVO_03220) 的表达(图 4A, 4B)。系统树结果显示该类蛋白酶与 NP 同源。以上结果暗示了冷诱导 NP 对于延长草菇的低温保鲜时间是必需的。

我们的研究结果显示低温胁迫提高了蛋白酶 PLMP 的表达(图 4A, 4B), 与已有的研究结果一致(Singh *et al.* 2019)。有研究显示细菌胞外肽酶对海洋中的细菌营养和有机氮降解非常重要(Yang *et al.* 2016)。该细菌 PepS 是一种金属多肽酶, 最小的底物是五肽, 对小肽具有分解作用(Yang *et al.* 2016)。考虑到 PLMP 属于金属多肽酶超家族的成员, 这些结果暗示了冷诱导 PLMP 参与了小肽的分解作用。已有的结果显示低温胁迫降低了草菇泛素-蛋白酶体系统的降解效率, 导致这些泛素化标记的“垃圾蛋白”得不到迅速的降解回流(Gong *et al.* 2020)。考虑到 PLMP (VVO_03220) 为信号肽 SPase I 类型, 该类型的蛋白能够进入到内质网中, 暗示 PLMP 在内质

网中起作用。环境胁迫诱导细胞内质网应激反应, 表现为错误折叠蛋白的聚集(Nakajima & Suzuki 2013)。而冷诱导的 PLMP 可能作用这些错误折叠蛋白, 进而产生小肽, 促进降解回流, 为细胞提供能量。近期的研究也显示 UBEV2 抑制剂处理加强了内质网中的蛋白质加工过程(Gong *et al.* 2022)。冷诱导 PLMP 在延长草菇低温保鲜时间的机理还有待进一步研究。

[REFERENCES]

Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H, 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4): 420-423
Bao DP, Gong M, Zheng HJ, Chen MJ, Zhang L, Wang H, Jiang JP, Wu L, Zhu YQ, Zhu G, Zhou YP, Li CH, Wang SY, Zhao Y, Zhao GP, Tan Q, 2013. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *PLoS One*, 8(3): e58294
Buswell J, Chen MJ, 2005. Cultivation, biochemical,

- molecular biological and medical aspects of the culinary-medicinal straw mushroom *Volvariella volvacea* (Bull.:Fr.) Singer (Agaricomycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 7(1&2): 157-166
- Chang ST, Hayes WA, 1978. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, London. 573-603
- Chen BZ, Gui F, Xie BG, Deng YJ, Sun XY, Lin MY, Tao YX, Li SJ, 2013. Composition and expression of genes encoding carbohydrate-active enzymes in the straw-degrading mushroom *Volvariella volvacea*. PLoS One, 8(3): e58780
- Combet C, Jambon M, Deléage G, Geourjon C, 2002. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. Bioinformatics, 18(1): 213-214
- Gong M, Li ZP, Wan JN, Chen MJ, Wang H, Shang JJ, Zhou SC, Tan Q, Wang Y, Bao DP, 2020. Chilling stress reduced protein translation by the ubiquitination of ribosomal proteins in *Volvariella volvacea*. Journal of Proteomics, 215: 103668
- Gong M, Wang H, Chen MJ, Bao DP, Zhu QM, Tan Q, 2016. A newly discovered ubiquitin-conjugating enzyme E2 correlated with the cryogenic autolysis of *Volvariella volvacea*. Gene, 583(1): 58-63
- Gong M, Wang Y, Su EZ, Zhang JG, Tang LH, Li ZP, Zhang LL, Zou G, Wan JN, Bao DP, 2022. The promising application of a β -glucosidase inhibitor in the postharvest management of *Volvariella volvacea*. Postharvest Biology and Technology, 185: 111784
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870-1874
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402-408
- Nakajima Y, Suzuki S, 2013. Environmental stresses induce misfolded protein aggregation in plant cells in a microtubule-dependent manner. International Journal of Molecular Sciences, 14(4): 7771-7783
- Robert X, Gouet P, 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Research, 42(W1): W320-W324
- Singh D, Thakur S, Thayil SM, Kesavan AK, 2019. Characterization of a cold-active, detergent-stable metalloproteinase purified from *Bacillus* sp. S1DI 10 using response surface methodology. PLoS One, 14(5): e0216990
- Wan JN, Shang JJ, Wang Y, Li ZP, Wang Y, Tang LH, Mao WJ, Wang H, Bao DP, Gong M, 2020. Homology modeling of *Volvariella volvacea* UBEV2 for screening its small molecule inhibitory compounds. Acta Edulis Fungi, 27(4): 35-42 (in Chinese)
- Wang FM, Guan XR, 1990. Study on postharvest preservation of straw mushroom. Edible Fungi, 12(4): 35-37 (in Chinese)
- Wang WP, 1998. Improving the method for determining the total dissociative amino in fresh plant tissue. Journal of Beijing University of Agriculture, 13(3): 9-13 (in Chinese)
- Wang XK, 2006a. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments. Higher Education Press, Beijing. 202-204 (in Chinese)
- Wang XK, 2006b. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments. Higher Education Press, Beijing. 190-192 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98(1): 1-76
- Yang JY, Wang P, Li CY, Dong S, Song XY, Zhang XY, Xie BB, Zhou BC, Zhang YZ, Chen XL, 2016. Characterization of a new M13 metalloproteinase from deep-sea *Shewanella* sp. e525-6 and mechanistic insight into its catalysis. Frontiers in Microbiology, 6(91): 1498
- Yu KL, Fang DL, Chen MX, Hu QH, Zhao LY, 2016. Effect of perforation mediated nano-packaging on postharvest quality of *Volvariella volvacea* during storage. Food Science, 37(16): 292-298 (in Chinese)
- Zha L, Chen MJ, Yan SH, Li CH, Wang H, Xi LP, Wang CG, Zhao Y, 2018. Morphological and physiological indexes of *Volvariella volvacea* during storage at 15 °C. Food & Machinery, 34(8): 110-114 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 万佳宁, 尚俊军, 汪滢, 李正鹏, 王莹, 唐利华, 茅文俊, 汪虹, 鲍大鹏, 龚明, 2020. 草菇 UBEV2 蛋白同源模建筛选其小分子抑制剂. 食用菌学报, 27(4): 35-42
- 王富民, 官秀荣, 1990. 草菇采后保鲜研究. 食用菌, 12(4): 35-37
- 王文平, 1998. 植物样品中游离氨基酸总量测定方法的改进. 北京农学院学报, 13(3): 9-13
- 王学奎, 2006a. 植物生理生化试验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. 202-204
- 王学奎, 2006b. 植物生理生化试验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. 190-192
- 余科林, 方东路, 陈梅香, 胡秋辉, 赵立艳, 2016. 纳米聚乙烯包装结合打孔气调对草菇采后贮藏品质的影响. 食品科学, 37(16): 292-298
- 查磊, 陈明杰, 严舒瀚, 李传华, 汪虹, 奚莉萍, 王晨光, 赵妍, 2018. 15 °C贮藏下草菇的品质与生理生化分析. 食品与机械, 34(8): 110-114