

一种野生香蘑的分离、鉴定、培养条件与产酶特性*

刘悦萍 王子健 崔凯 张国庆**

(北京农学院农业部都市农业(北方)重点实验室 北京 102206)

摘要 为充分开发利用野生食用菌资源,从采集自北京怀柔的野生香蘑子实体中分离获得纯培养,编号为*Lepista* sp. GSM-11,结合形态学特征与ITS序列分析鉴定其分类学地位,并进一步研究其菌丝生长的最适碳源、氮源、C/N比、生长因子、最适温度和最适pH值,并测定了菌体液体发酵产漆酶、蛋白酶、植酸酶、核糖核酸酶和凝集素的特性,同时还研究了Cu²⁺对漆酶产量的影响.结果表明,该菌株与GenBank中报道的采集自中国辽宁、美国马里兰州和日本宫城的紫丁香蘑(*Lepista nuda*)同源性最高,分别为100%、99.98%和99.93%,确定该野生香蘑为紫丁香蘑(ITS序列GenBank登录号JQ519375);菌丝体生长的最适碳源为蔗糖,最适氮源为酵母浸膏,最适C/N比为20/1,最适生长因子为维生素C,最适温度为24℃,最适pH为7.0;GSM-11菌株菌丝体和发酵液中均具有漆酶活性,但缺乏其他3种酶和凝集素活性.1.0~2.0 mmol/L的Cu²⁺对漆酶分泌有显著的促进作用,其活性达到对照组的149.2%~196.4%.图2 表6 参26

关键词 紫丁香蘑; ITS鉴定; 培养条件; 漆酶; Cu²⁺

CLC Q949.320.5 : TQ925

Isolation, Identification, Culture Conditions, and Enzyme Production of a Wild Mushroom *Lepista* sp.*

LIU Yueping, WANG Zijian, CUI Kai & ZHANG Guoqing**

(Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract For efficient application of wild mushrooms, a strain of GSM-11 was isolated from a wild mushroom fruiting body of the genus *Lepista*, from Huairou, Beijing, and identified based on its morphology and ITS sequence analysis. The optimum culture conditions, i.e. carbon source, nitrogen source, C/N rate, growth factor, temperature, and pH value were investigated. And the enzyme activities of laccase, protease, phytase, ribonuclease, and lectin in liquid fermentation were also determined. The results showed that the strain (GenBank accession number of ITS sequence: JQ519375) manifested very high sequence similarity with *L. nuda* samples from Liaoning (China), Miyagi (Japan), and Maryland (USA) based on polymeric analysis of ITS sequences, with similarity of 100%, 99.98% and 99.93%, respectively. It was therefore identified as *L. nuda*. Culture conditions showed that the best carbon source was sucrose, the best nitrogen source was yeast extract, the best C/N rate was 20/1, the best growth factor was Vitamin C, the optimum temperature was 24℃, and the optimum pH was 7.0. Liquid fermentation studies showed that *L. nuda* demonstrated laccase activity in both mycelia and broth, but lack of the other four activities. A range of concentration of Cu²⁺ 1.0~2.0 mmol/L enhanced the laccase activity with a range of 149.2%~196.4% comparing with the control group. Fig 2, Tab 6, Ref 26

Keywords *Lepista nuda*; ITS identification; culture condition; laccase; Cu²⁺

CLC Q949.320.5 : TQ925

菌根菌(Mycorrhizal fungi)是一大类能够与植物建立互惠共生关系(Symbiosis)的大型真菌.宿主植物为菌根菌

提供定殖场所和碳源,菌根菌促进宿主植物对氮、磷和水分的吸收,具有促生长、抗病与抗逆的作用^[1].外生菌根菌(Ectomycorrhizas)作为菌根菌的一类,约占菌根菌总种数的10%,能够与超过200个属、几乎所有的木本植物形成菌根复合物,在植物种子萌发到生长发育的各个阶段扮演着极其重要的作用^[2-3].最近的研究显示,全世界外生菌根菌的种类大约7 750种^[4].这些种类繁多的外生菌根菌在适宜的自然条件下形成子实体,往往具有丰富的蛋白质、维生素和矿物质,

收稿日期: 2012-02-25 接受日期: 2012-05-07

*“十二五”国家科技支撑计划课题(No. 2012BAD14B09)和北京市本科生科学研究计划项目资助 Supported by the Science & Technology Supporting Project of the “12th 5-year-plan” of China (No. 2012BAD14B09) and the Undergraduate Research Program of Beijing, China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhangq1001@gmail.com)

并具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节、降血糖、降血脂等重要生物活性,而有毒类群中的毒素等小分子化合物在医疗、生化等领域也存在着潜在的利用价值^[5]。

紫丁香蘑(*Lepista nuda*),也被称为*Clitocybe nuda*、*Tricholoma nudum*,能与松、榛、山杨等植物形成外生菌根^[6]。紫丁香蘑在亚洲、美洲和欧洲均有分布,其子实体中等大小,菌体颜色淡紫至紫红,具有独特的香味,是一种味道极佳的名贵野生食用菌,与松茸和牛肝菌齐名^[7]。目前紫丁香蘑尚不能人工栽培,国内外对其研究报道主要集中在菌丝体的培养条件、子实体营养成分和生物活性等^[8-12]。近年来,随着紫丁香蘑市场需求逐年增加,野生资源逐渐枯竭,其人工驯化栽培势在必行。

本研究从北京市怀柔区喇叭沟门原始次生林区分离到野生香蘑,通过组织分离获得其菌丝体纯培养,通过分子鉴定的手段确定其分类学地位,从碳源、氮源、C/N比、温度、pH值和微量元素角度研究菌丝体最适培养条件,并测定液体发酵条件下菌丝体和发酵液中漆酶、凝集素、蛋白酶等生物活性蛋白的含量,为紫丁香蘑的进一步开发深度利用奠定理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生香蘑(*Lepista* sp.)采集自北京市怀柔区喇叭沟门原始次生林区,由北京农学院生物技术学院分离、鉴定并保藏,菌株编号为GSM-11。

1.2 培养基

PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g, pH值7.0~7.2,蒸馏水1 000 mL;主要用于菌种分离与保藏。PD培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g, pH值7.0~7.2,蒸馏水1 000 mL;主要用于菌丝体液体发酵培养实验。基础培养基:葡萄糖20 g,大豆蛋白胨2 g,磷酸二氢钾1 g,硫酸镁0.5 g,维生素B1 10 mg,琼脂20 g, pH值7.0~7.2,蒸馏水1 000 mL;主要用于菌丝体最佳培养条件实验。加富培养基:葡萄糖20 g,大豆蛋白胨2 g,马铃薯200 g,硫酸镁0.5 g,磷酸二氢钾1 g,维生素B1 10 mg,琼脂20 g, pH值7.0~7.2,蒸馏水1 000 mL;主要用于菌丝体最佳培养条件实验。

1.3 菌种的分离与培养

利用组织分离的方法,采用无菌操作技术,将表面消毒的香蘑子实体撕开,以无菌解剖针从菌柄和菌盖交界部位挑取绿豆大小组织块,接种于PDA平板中央,于25℃恒温培养箱中培养。获得的菌丝体纯培养编号为GSM-11,并转入PDA斜面中保藏备用^[13]。

1.4 ITS序列分析

菌丝体总DNA提取参照Doyle和Doyle的方法^[14]。ITS

序列扩增参考Wang等的方法^[15]。引物ITS1(上游引物):5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4(下游引物):5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR扩增体系采用50 μL体系。PCR产物利用0.8%琼脂糖凝胶检测与回收后,由上海英骏生物技术有限公司测序。将所测得的ITS序列提交到GenBank核酸序列数据库,并通过NCBI在线BLAST N检索,与GenBank中的IST基因序列进行同源性比较,利用ClustalX软件对所得序列进行多序列联配分析,并用MEGA4.0软件构建系统进化树和计算遗传距离。

1.5 不同碳源对菌丝生长的影响

以供试基础培养基中20 g葡萄糖的含碳量为标准,分别用相等含碳量的蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、山梨醇、甘露醇和羧甲基纤维素钠为碳源,代替供试培养基中葡萄糖, pH值7.0~7.2,基础培养基不加碳源做对照,每处理5次重复。在各平板中央接种直径为5 mm的菌落一块,25℃恒温培养箱中避光培养,观测菌落直径,计算菌丝体日均生长速度[菌丝生长速度=菌落半径增长长度(mm)÷培养天数(d)]。待长势最快一组长满平板时,停止培养,回收各处理菌丝体,测定菌丝体干重,下同。

1.6 不同氮源对菌丝生长的影响

以供试基础培养基中2 g大豆蛋白胨的含氮量为标准,分别用相等含氮量的酵母浸粉、牛肉浸膏、硝酸铵、硫酸铵、尿素、黄豆粉和甘氨酸为氮源,代替供试培养基中大豆蛋白胨, pH值7.0~7.2,基础培养基不加大豆蛋白胨做对照,每处理5次重复。

1.7 不同C/N比对菌丝生长的影响

以基础培养基为基础,通过添加不同质量的大豆蛋白胨,配制成C/N比分别为10/1、20/1、30/1、40/1、50/1和60/1的不同培养基, pH值7.0~7.2,每处理5次重复。

1.8 不同生长因子对菌丝生长的影响

在基础培养基基础上,以10 mg/L的维生素B2、维生素B6、维生素C、玉米浆和肌醇(10 mg)替代维生素B1,以不加生长因子为对照,每处理5次重复。

1.9 不同温度对菌丝生长的影响

以最适碳氮源替代加富培养基中的碳源、氮源,调整C/N比为最适C/N比, pH值7.0~7.2,配成改良培养基。接种后分别在16、20、24、28、32、36℃下恒温避光培养,每处理5次重复。

1.10 不同pH值对菌丝生长的影响

上述改良培养基灭菌后调pH值分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0,每处理5次重复。

1.11 产酶特性实验

将供试菌株接种于PD培养基中,25℃、180 r/min振荡

培养5 d, 作为种子液; 以5% (V/V) 接种量接种PD培养基, 25℃、180 r/min振荡培养7 d, 4℃下12 000 r/min离心15 min, 收集菌丝体和发酵液, 分别测定其漆酶 (Laccase)、蛋白酶 (Protease)、植酸酶 (Phytase)、核糖核酸酶 (Ribonuclease) 和凝集素 (Lectin) 活性。漆酶活性测定以ABTS为底物, 测定pH值为4.5^[16]。蛋白酶活性测定以Casein为底物, 测定pH值为7.2^[17]。植酸酶活性测定以植酸钠为底物, 测定pH值分别为5.2和2.5^[18]。凝集素活性测定用2%兔红细胞在室温下进行^[19]。

1.12 Cu²⁺对液体发酵漆酶产量的影响实验

在PD培养基中加入1.0 mol/L CuSO₄溶液至Cu²⁺终浓度分别为0、1.0、2.0、5.0和10 mmol/L。灭菌后同“1.11”条件和接种量, 利用种子液进行液体发酵。在接种第48、96、144和192 h, 分别收集发酵液, 测定其漆酶活性^[16]。

1.13 统计学分析

所有数据采用SPSS14.0统计软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 基于ITS序列的系统发育分析

经PCR扩增和序列测定, *Lepista* sp. GSM-11菌株的ITS序列长度655 bp, GenBank登录号为JQ519375。该序列与GenBank中报道的采集于中国辽宁、美国马里兰州和日本宫城的紫丁香蘑 (*L. nuda*) 的ITS序列 (GenBank登录号分别为FJ810156.1、JN021061.1和AB285100.1) 同源性最高, 分别为100%、99.98%和99.93% (图1)。结合其形态学特征, 鉴定GSM-11菌株为紫丁香蘑 *L. nuda*。

2.2 不同碳源对菌丝生长的影响

在碳源实验中, 菌丝在添加不同碳源与对照培养基中均能生长 (表1)。在不同碳源培养基上, 菌丝生长速度顺序依次为: 蔗糖>山梨醇>淀粉~麦芽糖>羧甲基纤维素钠>葡萄糖~甘露糖>对照>乳糖, 蔗糖培养基上菌丝生长最快

(3.71 mm/d±0.02 mm/d), 乳糖培养基上菌丝生长最慢 (1.62 mm/d±0.36 mm/d); 菌丝干重大小依次为: 蔗糖~淀粉>麦芽糖>山梨醇>葡萄糖~甘露糖>羧甲基纤维素钠>对照~乳糖, 蔗糖培养基上干重最高 (25.2 mg±1.7 mg), 对照和乳糖上干重最低 (分别为10.4 mg±1.0 mg和10.5 mg±0.6 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适碳源为蔗糖, 其次为淀粉。

表1 不同碳源对菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different carbon sources on mycelial growth

碳源 Carbon source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
蔗糖 Sucrose	3.71±0.02 a	25.2±1.7 a
山梨醇 Sorbitol	3.30±0.15 b	19.0±1.7 b
淀粉 Starch	3.10±0.45 bc	25.0±0.3 a
麦芽糖 Maltose	2.93±0.21 bc	21.0±3.1 b
羧甲基纤维素钠 Sodium carboxymethyl cellulose	2.83±0.11 c	11.7±0.8 c
葡萄糖 Glucose	2.35±0.11 d	12.6±1.3 c
甘露醇 Mannitol	2.35±0.02 d	12.5±0.4 c
对照 CK	1.86±0.22 e	10.4±1.0 c
乳糖 Lactose	1.62±0.36 e	10.5±0.6 c

不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

Different small letters mean significant differences ($P<0.05$). The same below

2.3 不同氮源对菌丝生长的影响

在氮源实验中, 菌丝在添加不同氮源与对照培养基中均能生长 (表2)。不同氮源培养基上, 菌丝生长速度顺序依次为: 酵母浸膏>大豆蛋白胨>硫酸铵~硝酸铵>牛肉浸膏~尿素>甘氨酸>黄豆粉>对照, 酵母浸膏培养基上菌丝生长最快 (2.76 mm/d±0.04 mm/d), 对照培养基上菌丝生长最慢 (1.49 mm/d±0.06 mm/d); 菌丝干重大小依次为: 酵母浸膏>大豆蛋白胨~牛肉浸膏>尿素>硝酸铵>硫酸铵>甘氨酸>黄豆粉>对照, 酵母浸膏培养基上干重最高 (46.1 mg±3.7

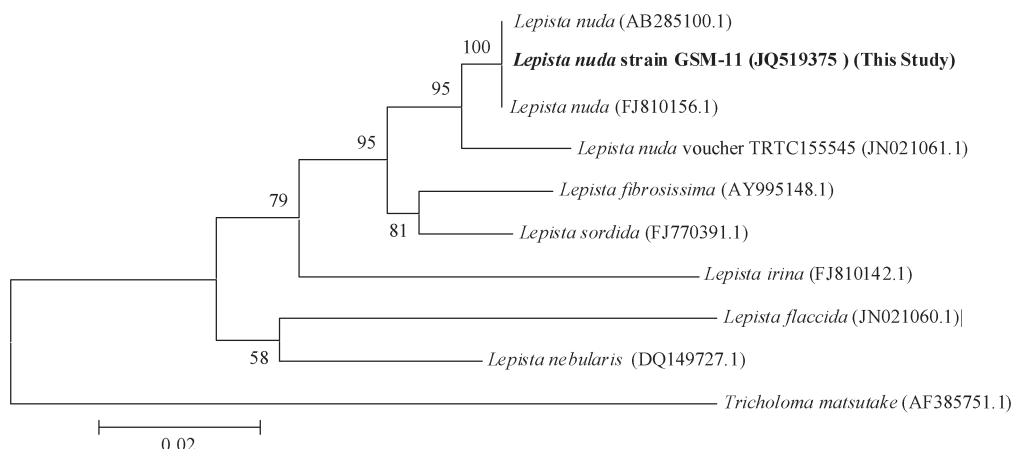


图1 基于ITS序列基础上的*Lepista* sp. GSM-11与其它口蘑的系统发育分析

Fig. 1 Polymeric analysis of *Lepista* sp. GSM-11 and other Tricholomataceae species based on their ITS sequences

表2 不同氮源对菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth

氮源 Nitrogen source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
酵母浸膏 Yeast extract	2.76±0.04 a	46.1±3.7 a
大豆蛋白胨 Soy peptone	2.66±0.05 a	41.1±2.1 b
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	2.48±0.06 b	22.8±3.1 d
硝酸铵 NH ₄ NO ₃	2.47±0.08 b	23.9±0.6 cd
牛肉浸膏 Beef extract	2.35±0.04 c	41.9±2.6 b
尿素 Urea	2.33±0.03 d	27.1±1.1 c
甘氨酸 Glycine	1.97±0.10 e	20.2±1.2 de
黄豆粉 Soybean meal	1.83±0.02 f	18.0±2.4 e
对照 CK	1.49±0.06 g	7.8±2.5 f

mg), 对照培养基上干重最低 (7.8 mg±2.5 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适氮源为酵母浸膏, 其次为大豆蛋白胨。

2.4 不同C/N比对菌丝生长的影响

C/N比实验中, 菌丝在各培养基中均能生长 (表3)。不同C/N比培养基上菌丝生长速度顺序依次为: 20/1>10/1>30/1>60/1≈50/1≈40/1, 20/1培养基上菌丝生长最快 (3.70 mm/d±0.12 mm/d), 50/1和40/1培养基上菌丝生长最慢 (分别为2.79 mm/d±0.15 mm/d和2.79 mm/d±0.04 mm/d); 菌丝干重大小依次为: 20/1>10/1>30/1>60/1>50/1>40/1, 20/1培养基上干重最高 (35.8 mg±2.2 mg), 40/1培养基上干重最低 (19.8 mg±1.6 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适C/N比为20/1, 其次为10/1。

表3 不同C/N比对菌丝生长的影响

Table 3 Effect of different C/N rates on mycelial growth

C/N比 C/N rate	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
20/1	3.70±0.12 a	35.8±2.2 a
10/1	3.40±0.03 b	32.5±5.0 b
30/1	3.03±0.16 c	31.9±5.8 a
60/1	2.83±0.07 d	23.6±2.2 b
50/1	2.79±0.15 d	21.0±1.7 b
40/1	2.79±0.04 d	19.8±1.6 b

2.5 不同生长因子对菌丝生长的影响

不同生长因子实验中, 菌丝在各培养基中均能生长 (表4)。不同生长因子培养基上, 菌丝生长速度顺序依次为: 维生素C≈肌醇>维生素B2≈对照≈维生素B1≈维生素B6≈玉米浆, 维生素C培养基上菌丝生长最快 (2.40 mm/d±0.02 mm/d), 玉米浆培养基上菌丝生长最慢 (2.14 mm/d±0.15 mm/d); 菌丝干重大小依次为: 维生素C>肌醇>维生素B2≈对照>维生素B6≈玉米浆>维生素B1, 维生素C培养基上干重最高 (59.1 mg±3.5 mg), 维生素B1培养基上干重最低 (41.6 mg±4.1 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适生长因子为维生素

表4 不同生长因子对菌丝生长的影响

Table 4 Effect of different growth factors on mycelial growth

生长因子 Growth factor	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
维生素C Vitamin C	2.40±0.02 a	59.1±3.5 a
肌醇 Inositol	2.38±0.07 a	54.7±12.1 ab
维生素B2 Vitamin B2	2.21±0.06 b	47.9±5.5 ab
对照 CK	2.19±0.14 b	47.6±7.2 ab
维生素B1 Vitamin B1	2.16±0.07 b	41.6±4.1 b
维生素B6 Vitamin B6	2.15±0.04 b	45.9±3.7 ab
玉米浆 Corn syrup	2.14±0.15 b	45.3±7.5 b

C, 其次为肌醇。

2.6 不同温度对菌丝生长的影响

温度实验中, 菌丝在16~28℃条件下均能生长, 32℃以上时无生长迹象 (表5)。在不同温度下菌丝生长速度顺序依次为: 24℃>28℃>25℃>16℃>32℃=36℃, 24℃时菌丝生长最快 (3.42 mm/d±0.02 mm/d); 菌丝干重大小依次为: 24℃>28℃>25℃>16℃>32℃=36℃, 24℃时干重最高 (27.3 mg±5.2 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适温度为24℃, 其次为28℃。

表5 不同温度对菌丝生长的影响

Table 5 Effect of different temperatures on mycelial growth

温度 Temperature (θ/℃)	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
24	3.42±0.02 a	27.3±5.2 a
28	3.22±0.15 ab	25.2±3.3 a
20	3.08±0.01 b	19.7±0.1 b
16	1.36±0.24 c	8.2±1.6 c
32	0 d	0 d
36	0 d	0 d

2.7 不同pH值对菌丝生长的影响

在pH实验中, 菌丝在pH 5.0~9.0条件下均能生长 (表6)。不同pH值条件下菌丝生长速度顺序依次为: 6.5≈7.0>6.0≈5.5>5.0>8.0>7.5>8.5≈9.0, pH6.5和7.0时菌丝生长最快 (分别为2.53 mm/d±0.06 mm/d和2.49 mm/d±0.03 mm/d), pH 8.5和9.0时菌丝生长最慢 (分别为1.03 mm/d±0.05 mm/d和1.01 mm/d±0.14 mm/d); 不同pH条件下菌丝干重大小依次为: 7.0>6.5≈5.0>6.0≈5.5>8.0≈7.5>8.5≈9.0, pH 7.0时菌丝干重最高 (24.3 mg±6.1 mg), pH8.5和9.0时菌丝干重最低 (分别为3.9 mg±0.8 mg和4.0 mg±1.4 mg)。以菌丝体干重为主要指标, 并综合菌丝生长速度指标, 确定紫丁香蘑菌丝培养的最适pH为7.0, 其次为6.5。

2.8 产酶特性

供试菌株液体培养7 d, 测定发酵液和菌丝体的漆酶、蛋白酶、植酸酶、核糖核酸酶和凝集素活性, 结果显示, 发酵

表6 不同pH值对菌丝生长的影响

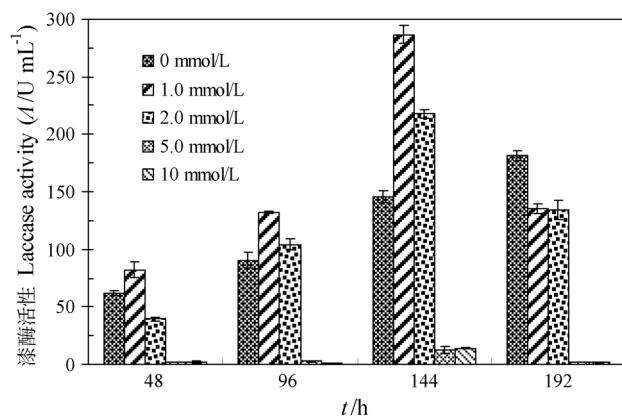
Table 6 Effect of different pH values on mycelial growth

pH	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝干重 Dry weight of mycelia (m/mg)
6.5	2.53±0.06 a	22.5±4.6 ab
7.0	2.49±0.03 a	24.3±6.1 a
6.0	2.39±0.13 ab	18.5±2.7 b
5.5	2.38±0.02 ab	18.4±3.1 b
5.0	2.24±0.01 bc	21.7±0.4 ab
8.0	2.12±0.01 cd	11.5±1.0 c
7.5	2.00±0.10 d	11.0±2.4 c
8.5	1.03±0.05 e	3.9±0.8 d
9.0	1.01±0.14 e	4.0±1.4 d

液和菌丝体中均有较高的漆酶活性,其活性分别为163.5 U/mL±27.1 U/mL和1087.6 U/mL±79.5 U/g。培养7 d的供试菌株发酵液和菌丝体均缺乏蛋白酶、植酸酶、核糖核酸酶和凝集素活性。

2.9 Cu²⁺对液体发酵漆酶产量的影响

不同剂量的Cu²⁺试验结果如图2示。1.0 mmol/L和2.0 mmol/L Cu²⁺对供试菌株漆酶的分泌具有促进作用,其中1.0 mmol/L组活性最高;5 mmol/L以上的Cu²⁺对菌丝生长有显著的抑制作用。1.0 mmol/L和2.0 mmol/L组漆酶活性在144 h达到最高,分别为286.8 U/mL±7.5 U/mL和217.8 U/mL±3.5 U/mL,是同时刻对照组活性(146.0 U/mL±5.0 U/mL)的196.4%和149.2%。192 h对照组活性达到最高,而1.0 mmol/L和2.0 mmol/L Cu²⁺组活性下降。实验表明,添加1.0~2.0 mmol/L Cu²⁺对紫丁香蘑液体发酵漆酶具有极显著促进作用。

图2 Cu²⁺对液体发酵漆酶产量的影响Fig. 2 Effect of Cu²⁺ on laccase production by liquid fermentation

3 讨论

根据野生香蘑的ITS序列分析与比对结果,并结合子实体形态特征,鉴定*Lepista* sp. GSM-11菌株为紫丁香蘑*L. nuda*。研究表明,紫丁香蘑菌丝体生长的最适碳源为蔗糖,最适氮源为酵母浸膏,最适C/N比为20/1,最适生长因子为维生素C,最适温度为24℃,最适pH为7.0。谢富刚等报道,紫丁香

蘑最适温度和pH值分别为16~22℃和4.0~7.0,适宜于在酸性至中性环境中生长,最适碳源为稻草,最适氮源为(NH₄)₂SO₄^[20]。本研究中紫丁香蘑GSM-11菌株最适温度范围为24~28℃,较前者为高;GSM-11菌株最适生长pH值为7.0,而在酸性至中性条件下的生长明显优于碱性条件,这与前者报道相同;GSM-11菌株最适氮源为酵母浸膏,前者则为(NH₄)₂SO₄。赵婷等在以菌丝干重为指标、研究分离自吉林延边的紫丁香蘑培养特性试验中发现,其最适碳源和氮源分别为蔗糖和酵母,最适温度和pH分别为25℃和6~7^[12, 21],与本研究相似。由此可以推测,分离自不同地区的紫丁香蘑菌丝体培养条件存在一定的相似性,但也有各自的特点,这表明菌株之间可能存在着一定的理化特性差异。

野生菌资源一直以来是中国人重要的食用、药物资源,国内外有大量文献对其抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等活性进行报道,并从其子实体或菌丝体中分离得到凝集素、漆酶、蛋白酶等生物活性蛋白和多糖、黄酮、皂苷等大分子化合物。本研究发现,紫丁香蘑GSM-11菌株具有产漆酶活性,但缺乏凝集素、蛋白酶、植酸酶和核糖核酸酶活性。漆酶是自然界中最重要木质素、纤维素降解酶之一,在生物质资源自然降解、染料脱色、污水处理、食品加工、生物医药等众多领域极具开发利用前景。Zhang等从大杯伞(*Clitocybe maxima*)子实体中分离纯化获得一个分子量(*M_r*)为62×10³的单亚基漆酶,具有体外抗肿瘤和抗HIV-1活性^[22]。Wu等从紫丁香蘑子实体中获得一个分子量为20.9×10³、具有体外抗肿瘤和抗病毒活性的金属蛋白酶^[9],而本研究中GSM-11菌株菌丝体和发酵液中均缺乏蛋白酶活性,这可能与研究材料所处发育阶段不同以及发酵条件有关。另外,紫丁香蘑还被报道具有抗病毒活性的麦角固醇组分以及具抗菌活性的醇提组分^[10, 23]。Wang等从同属于口蘑科的蒙古口蘑(*Tricholoma mongolicum*)菌丝体和子实体中分离得到具有抗肿瘤活性的凝集素^[24-25],而本研究中紫丁香蘑菌丝体和发酵液中均缺乏该活性。在液体发酵条件下,1.0~2.0 mmol/L的Cu²⁺对漆酶的分泌具有极显著的促进作用。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶,Cu²⁺对紫丁香蘑发酵产漆酶的促进作用也与其他真菌漆酶^[26]相似。

综上,从分子鉴定、菌丝体培养条件、产酶条件角度,对一株野生紫丁香蘑开展了研究,确定了其分类学地位、培养条件和产酶特性,为进一步开发和利用紫丁香蘑奠定了实验基础。进一步研究拟结合蛋白质分离纯化和基于漆酶保守区序列的基因克隆等手段,获得该菌株漆酶的蛋白质纯品和全基因序列。

References

- 1 Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microorganisms in terrestrial

- environments. In: McGraw-Hill ed. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. 7th ed. Singapore, 2008. 687~712
- 2 Johnson NC, Wilson GW, Bowker MA, Wilson JA, Miller RM. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107** (5): 2093~2098
 - 3 Wang B, Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 2006, **16** (5): 299~363
 - 4 Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Div*, 2008, **33**: 1~45
 - 5 Ng TB. Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 2004, **25** (6): 1055~1073
 - 6 Mao XL (郝晓岚). The Macrofungi in China. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press (郑州: 河南科技出版社), 2000. 178~179
 - 7 Carluccio A. The Complete Mushroom Book. London: Quadrille Publishing Ltd, 2003. 155-156
 - 8 Dulger B, Ergul CC, Gucin F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*, 2002, **73** (7~8): 695~697
 - 9 Wu YY, Wang HX, Ng TB. A novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom *Lepista nuda*. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, **21** (3): 256~262
 - 10 Gao JM (高锦明), Dong ZJ (董泽军), Yang X (杨雪), Liu, JK (刘吉开). Chemical constituents of *Lepista nuda*. *Chin Trad & Herbal Drugs* (中草药), 2002 (5): 17~20
 - 11 Zhou F (周峰), Wang RJ (王瑞娟), Li Y (李玉), Yu HL (于海龙), Guo Q (郭倩). Biology and cultivation of the edible/medicinal fungus, *Lepista nuda* - a review. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2010 (4): 79~83
 - 12 Zhao T (赵婷), Chen YQ (陈艳秋), Li Y (李玉), Li CY (李宗云). Effect of cultural conditions on mycelial growth of *Lepista nuda*. *Edible Fungi* (食用菌), 2010 (3): 8~9
 - 13 Wang HX (王贺祥). 食用菌学. Beijing: China Agricultural University Press (北京: 中国农业大学出版社), 2004. 225~228
 - 14 Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, **19**: 11~15
 - 15 Wang P, Liu Y, Yin Y, Jin H, Wang S, Xu F, Zhao S, Geng X. Diversity of microorganisms isolated from the soil sample surround *Chroogomphus rutilus* in the Beijing region. *Int J Biol Sci*, 2011, **7** (2): 209~220
 - 16 Wang HX, Ng TB. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72** (3): 508~513
 - 17 Cui L, Liu QH, Wang HX, Ng TB. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75** (1): 81~85
 - 18 Zhang GQ, Dong XF, Wang ZH, Zhang Q, Wang HX, Tong JM. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresour Technol*, 2010, **101** (11): 4125~4131
 - 19 Zhao JK, Wang HX, Ng TB. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon*, 2009, **53** (3): 360~366
 - 20 Xie FG (谢富刚), Liu YY (刘雁英), Qiu HL (邱慧兰). Primary report of biological characteristics of *Lepista nuda* (Bull. Fr.) Cooke. *Mod Agric Sci & Technol* (现代农业科技), 2010 (2): 109~110
 - 21 Zhao T (赵婷), Chen YQ (陈艳秋), Li Y (李玉). Characters of mycelial growth of *Lepista nuda*. *Edible Fungi* (食用菌), 2009 (6): 10~11
 - 22 Zhang GQ, Wang YF, Zhang XQ, Ng TB, Wang HX. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochem*, 2010, **45** (5): 627~633
 - 23 Dulger B, Ergul CC, Gucin F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*, 2002, **73** (7~8): 695~697
 - 24 Wang HX, Ng TB, Ooi VE. Lectin activity in fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, **44** (1): 135~141
 - 25 Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology*, 1996, **31** (2~3): 205~211
 - 26 Collins PJ, Dobson A. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (9): 3444~3450