

北京地区夏季野生食用菌生物指标的测定

赵爽¹,刘宇¹,殷贝贝¹,王贺祥²,王守现¹,许峰¹,耿小丽¹,孟莉莉¹

¹北京农林科学院植保环保研究所,北京 100097;

²中国农业大学农业生物技术国家重点实验室,北京 100193)

摘要:为了扩大对野生资源的评价和利用,2009年夏季在北京周边山区收集常见的4种野生菌黄伞、血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌和马勃的子实体。利用二喹林甲酸检测法、苯酚-硫酸法以及改良后的酶活性检测法分别测定4种子实体中蛋白质和水溶性多糖的含量、蛋白酶、磷酸酶和漆酶的活性以及凝集素的活力单位,通过对上述4种野生资源测定指标进行评价,发掘出可用于深度加工的野生品种。研究发现,黄伞子实体中蛋白质和多糖含量相对较高,分别占子实体鲜重和干重的5.12%和2.39%,并且具有凝集素的活性;4种野生菌都具有磷酸酶活性,其中马勃的酶活力最高,为339.91 U/mg;短柄粘盖牛肝菌和马勃存在微弱的漆酶活性,酶活力分别为0.341 U/mg和0.438 U/mg;在4种野生菌中未检测到蛋白酶的活性。比较结果证明黄伞子实体中的蛋白质和多糖含量较高,马勃具有较高的磷酸酶活性,这些野生资源都可以作为深加工的优势材料,进行深度研究开发。

关键词:蛋白含量;酶;多糖含量;凝集素

中图分类号:S646

文献标志码:A

论文编号:2010-1665

Determination of Biological Index of Several Mushroom Collected in Beijing Mountainous Areas

Zhao Shuang¹, Liu Yu¹, Yin Beibei¹, Wang Hexiang², Wang Shouxian¹,

Xu Feng¹, Geng Xiaoli¹, Meng Lili¹

¹Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097;

²State Key Laboratory for Agrobiotechnology and Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: In order to exploit application resources of wild mushroom, the author collected four fruiting bodies of wild mushroom which are common in Beijing mountainous areas, *Pnoliota adiposa*, *Chroogomphis rutillus*, *Suillus brevipes* and *Lasiosphaera fenzlii*. The author detected the contents of protein and hydrophilic polysaccharide, proteinase, phosphatase, laccase and lectin in four types of fruiting bodies by bicinchoninic acid method, phenol-sulphuric acid method and modified enzyme detection. The aim of this study is to compare the resource value of the four wild mushrooms, and find the wild materials for further processing. The results showed that the contents of protein and hydrophilic polysaccharide of *Pnoliota adipose*, which were equal to 5.12% of fresh mycelium weight and 2.39% of dry mycelium weight, respectively, were higher than those of the others. Lectin activity was only found in the fruiting body of *Pnoliota adipose*. The result showed that all of the tested wild mushroom exhibited the phosphatase activity, and the activity of *Lasiosphaera fenzlii* was the highest at 339.91 U/mg. *Suillus brevipes* and *Lasiosphaera fenzlii* were found with slight laccase activity at of 0.341 U/mg and 0.438 U/mg, respectively. Proteinase activity was not found in the tested mushroom. All in all, *Pnoliota adipose*, with high protein and polysaccharide contents, as well as *Lasiosphaera fenzlii*, with high phosphatase activity, could be considered as advanced materials in process investigation.

Key words: protein content; enzyme; polysaccharide content; lectin

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD89B07)的部分研究内容。

第一作者简介:赵爽,女,1982年出生,北京人,助理研究员,博士,主要从事食用菌产品加工方向研究,发表主笔论文6篇。通信地址:100097 北京市海淀区曙光花园中路9号 北京市农林科学院植保所食用菌研究室, Tel: 010-51503432, E-mail: shuangzhaow@126.com

收稿日期:2010-06-02,修回日期:2010-07-05。

0 引言

野生食用菌是一类有待于研究开发的食用菌资源,研究显示多种野生菌中粗蛋白、粗纤维和多糖含量较高,氨基酸含量丰富,同时富含多种人体必需的矿物质元素和维生素等营养元素^[1-3]。野生资源中常常含有多种有益于健康的物质,在改善人类亚健康状态、防治多种重大疾病方面发挥着重要的作用,如多种食用菌在增加机体免疫力、降低三高、抑制肿瘤细胞增殖、抗衰老、抗菌抗病毒等方面都具有明显功效^[4-7],食用菌的直接疗效和辅助治疗的功能已经被社会广泛重视。

食用菌中部分品种药用功能在中医养生学中很早就有所应用,例如早在《本草纲目》中记载:“木耳…主治益气不饥,轻身强志,并有治疗痔疮、血痢等功效”;又如《名医别录》中记载:“马勃味辛平无毒,主治恶疮马疥”等^[8]。研究发现食用菌中多种功能作用分子为蛋白质类和多糖类物质,从20世纪70、80年代以来,中国国内外的科研人员将食用菌的功能研究集中到对蛋白质和多糖的研究方向上。Takashi Mizuno 等^[9]日本学者从姬松茸的子实体中用水、碱性溶液、盐溶液提取出多种具有明显抗肿瘤活性的水溶性和水不溶性多糖。有研究表明,从野生食用菌中能够分离纯化出多种具有抗肿瘤细胞增殖、抑制HIV-1反转录酶活性的蛋白质,为野生资源的加工应用积累了很多实验数据和材料^[9-11]。但是近些年野生资源营养评价的研究报道相对较少,而且针对于北京地区野生食用菌资源的研究甚少,尤其是综合多种功能酶检测的报道。中国对血红铆钉菇和短柄粘盖牛肝菌的报道多数集中于驯化和栽培方面的研究,对于品种生物指标的测定未见明确报道。该研究选取北京地区常见的4种野生菌为材料,综合蛋白质和多糖含量、蛋白酶、磷酸酶、漆酶活性以及凝集素的活力6项指标进行比较评价,为野生菌驯化和加工材料的筛选开发提供数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试材料 本研究的供试材料为4种野生菌子实体,其中子实体黄伞采集于昌平山区次生林的杨树树干上,呈现出单生或丛生的形态;血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌采集于房山山区次生林向阳坡的松树林地上,呈现出单生或群生的形态;马勃采集于延庆山区田埂间和林间地上,呈现出单生至近丛生的形态。

1.1.2 试剂 二喹林甲酸BCA蛋白定量试剂盒购于北京博迈德科技公司,酪蛋白和4-硝基苯基磷酸二钠盐(PNPP)购于美国Sigma公司,2,2-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、二铵盐(ABTS)购于美国Amresco

公司,苯酚、浓硫酸、乙醇、氯化钠(NaCl)、氢氧化钠(NaOH)、乙酸钠、乙酸均为分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.1.3 实验仪器 生物安全柜MSC 1.2,美国Thermo公司;全波长酶标仪VERSA max,美国Molecular Devices公司;精密天平AR2140,美国奥豪斯公司;旋转蒸发仪RE-52AA,上海振捷公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗蛋白或酶液样品的制备 称取子实体或菌丝体各0.1 g,加入1 mL生理盐水,研磨至组织破碎后,4℃浸提3 h,12000 r/min离心10 min,取上清,即为粗蛋白或酶液样品。

1.2.2 蛋白质含量的测定 标准曲线的制作:利用标准样品小牛血清蛋白(BSA)配置成25、50、100、200、300、400 μg/mL的溶液,采用BCA蛋白定量试剂盒制作标准曲线。将不同样品的蛋白提取液进行适当的梯度稀释后采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质含量。

1.2.3 蛋白酶活性的测定 用0.1 mol/L、pH 7.2磷酸缓冲溶液将酪蛋白配置成1%的溶液作为酶反应的底物,储存于-20℃冰箱内待用。取粗酶液20 μL加入140 μL底物,37℃反应15 min,加入440 μL的5%三氯乙酸(TCA)终止反应,12000 r/min离心5 min,取上清在波长280 nm处测量吸收值。以水浴前加入5% TCA终止反应样品作为对照。酶活力单位定义为:37℃下每分钟每毫升反应体系在280 nm处产生0.001个吸光值所需要的酶量^[12]。

1.2.4 磷酸酶活性的测定 用去离子水将PNPP配置成浓度为0.018 mol/L的溶液作为反应底物,避光储存于-20℃冰箱内待用。取粗酶液25 μL加入0.1 mol/L pH 5.0醋酸钠缓冲溶液后,再加入30 μL PNPP底物,37℃反应15 min,加入300 μL的0.5 mol/L NaOH终止反应,在波长400 nm处测量吸收值,以去离子水代替酶液进行反应作为对照。酶活力单位定义为:37℃时每分钟每毫克酶水解底物的微摩尔数。

1.2.5 漆酶活性的测定 取10 mg ABTS加入150 μL乙酸,用去离子水定容到30 mL,所得溶液作为反应底物,避光储存于4℃冰箱内待用。取粗酶液10 μL加入190 μL上述底物,37℃反应5 min后,立即在波长400 nm处测量吸收值,以去离子水代替酶液进行反应作为对照。酶活力单位定义为:37℃时每分钟每毫升反应体系在400 nm处产生1个吸光值所需要的酶量^[13]。

1.2.6 水溶性多糖含量的测定 标准曲线的制作:采用苯酚—硫酸法^[14],将葡萄糖105℃烘干至恒重,配制成0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL的溶液,加入6%苯酚

(重蒸)溶液和浓硫酸,迅速振摇混匀,室温下静置 15 min 后,100℃水浴 30 min,混匀,迅速冷却,用酶标仪在 492 nm 波长处分别测定吸光度。

取子实体或菌丝体适量在 65℃ 条件下烘干至恒重,精密称取各 2 g 干品加入 40 mL 蒸馏水,90℃ 旋转蒸发抽提 3 h,收集提取液加入 4 倍体积的无水乙醇进行多糖沉淀 12 h,离心收集沉淀后再次用蒸馏水溶解,配制成不同浓度的样品溶液,采用苯酚-硫酸法测定^[14]。

1.2.7 凝集素的测定 利用血凝板检测凝集素对兔红细胞的凝集活力。方法是:在 U 型血凝板中每孔加入 25 μL 0.15 mol/L NaCl 溶液;取凝集素样品 25 μL

加入第 1 孔,混匀后取出 25 μL 加入第 2 孔,混匀后再取出 25 μL 加入第 3 孔;以此类推,将样品进行 2 倍稀释之后,每孔加入兔红细胞悬液 25 μL ,室温放置 1 h,以等量的 0.15 mol/L NaCl 代替凝集素的样品作为对照,肉眼观察结果。无凝集活性是红血球沉于 U 型底部,成一小圆点;凝集时血球相互集聚形成一片网络。凝集素活力以产生血凝作用所需的最低浓度的倒数表示^[11]。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作和样品含量测定

蛋白质和葡萄糖的标准曲线见图 1 和图 2。

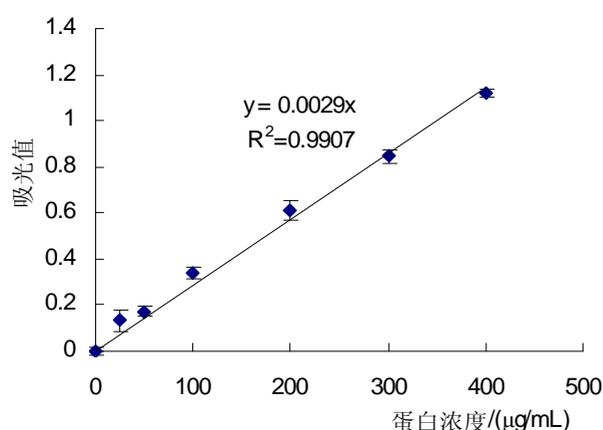


图 1 蛋白质含量标准曲线

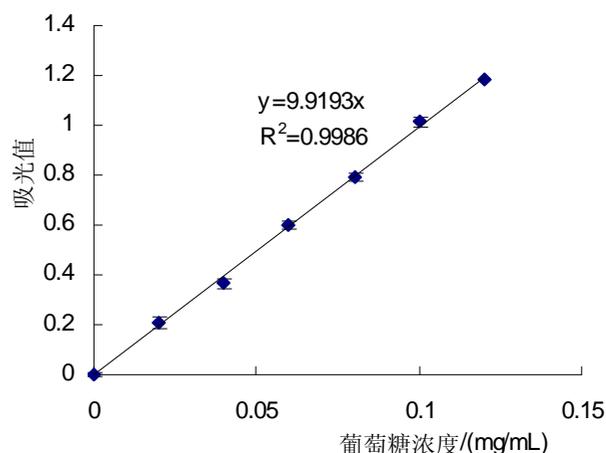


图 2 葡萄糖标准曲线

由标准曲线可以得出蛋白质含量的线性方程为 $y=0.0029x$, $R^2=0.9907$, 当蛋白质含量在 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,溶液蛋白浓度与 562 nm 处吸光值呈现一次线性关系;葡萄糖含量的线性方程为 $y=9.9193x$, $R^2=0.9986$, 当葡萄糖含量在 0~0.14 mg/mL 的范围内,溶液葡萄糖浓度与 492 nm 处吸光值呈现一次线性关系。因此制备待测样品时,需要使样品浓度在线性区间内,才能保证测定数据的准确性。

根据 BCA 蛋白定量试剂盒和苯酚-硫酸法测定 4 种姬松茸菌丝中蛋白质和水溶性多糖含量的结果见表 1。

通过蛋白质含量检测发现:在供试的 4 种野生菌中,黄伞的蛋白质含量最高,占子实体鲜重的 5.12%,其次为血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌和马勃的蛋白质

含量占各子实体鲜重分别为 3.27%、2.83%和 2.28%;在水溶性多糖含量比较中发现:黄伞子实体中多糖含量相对较高,为子实体干重的 2.39%,其次为血红铆钉菇、马勃和短柄粘盖牛肝菌的多糖含量占各子实体干重分别为 2.18%、1.36%和 1.26%。

2.2 生物酶的测定

对黄伞、血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌和马勃子实体中蛋白酶、磷酸酶、漆酶和凝集素的测定结果见表 2。

供试的 4 种野生菌中都含有磷酸酶的活性,其中马勃中的磷酸酶活性最高,酶活力为 339.91 U/mg,黄伞的最低,为 12.32 U/mg;短柄粘盖牛肝菌和马勃具有微弱的漆酶活性,酶活力分别为 0.341 U/mg 和 0.438 U/mg;对黄伞的凝血检测发现其具有凝集素活

表 1 4 种野生菌子实体含量的测定结果

	黄伞	血红铆钉菇	短柄粘盖牛肝菌	马勃
蛋白含量/%	5.12±0.31*	3.27±0.07*	2.83±0.03*	2.28±0.05
水溶性多糖含量/%	2.39±0.19	2.18±0.47*	1.26±0.12	1.36±0.29

注:数据结果以平均数±标准差表示(n=3),经单因素方差分析,其中*表示的是具有显著性差异($P<0.05$)的结果。

表2 4种野生菌子实体生物活性酶测定结果(每克鲜菌丝中酶活性)

供试菌株	黄伞	血红铆钉菇	短柄粘盖牛肝菌	马勃
蛋白酶/(U/mg)	—	—	—	—
磷酸酶/(U/mg)	12.32	20.04	265.49	339.91
漆酶/(U/mg)	—	—	0.341	0.438
凝集素	4	—	—	—

注：“—”代表没有酶活

性,活性为4个单位,其他品种未见凝血活性;供试的4种野生菌均缺乏蛋白酶活性。

3 讨论与结论

食用菌中蛋白质和多糖的含量是营养评价中的重要指标,食用菌的多种营养保健功效成分都来自于菌类蛋白质和多糖,检测评价菌株的蛋白质和多糖含量可以为食用菌保健食品深度开发和加工提供科学依据。

蛋白酶、磷酸酶和漆酶是食用菌中常见的几种生物酶类,其中蛋白酶是催化蛋白质水解成小的肽段或氨基酸的一类代谢酶,维持着整个生物体蛋白质分解与合成的动态平衡,同时也是一类重要的工业用酶,主要能够应用到去污剂、皮革、纺织、食品、医药、环保与资源等诸多领域中;磷酸酶是水解磷酸酯键并催化产生单磷酸的一种水解酶类,其在农业生产上可以改善植物对磷的吸收,调节植物的生长发育和成熟^[15-16],在医药上可以用做某些疾病的诊断指标等;漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,其在木质素矿化降解、腐殖质形成等过程中发挥着重要作用^[17],可以应用在制浆造纸、废物处理、环境污染物的降解等方面^[18];凝集素是指一类存在于多种生物体内,可以凝集红血球的糖蛋白或结合糖的蛋白质类物质,凝集素能够特异的识别糖蛋白和糖脂,具有识别专一性,其参与多种细胞生长代谢和免疫反应,由于凝集素专一识别的特性,其可以应用在医疗诊断、免疫反应等生物检测领域中。

该研究以黄伞、血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌和马勃为研究对象,研究结果显示黄伞、血红铆钉菇、短柄粘盖牛肝菌和马勃子实体中蛋白质含量依次递减,前三种野生菌与马勃相比较蛋白质含量均达到显著性差异的程度,其中检测出黄伞的蛋白质含量为鲜重的 $5.12\pm 0.31\%$,与姜华等^[19]报道的崑崙山野生黄伞的蛋白质含量为干重的 19.02% 和 26.2% 相比较,北京黄伞中蛋白质含量高于崑崙山黄伞,这可能由于野生菌生长环境不同而引起的差异;在水溶性多糖含量比较中发现:黄伞子实体中多糖含量相对较高,与短柄粘盖牛肝菌中多糖含量相比较,黄伞和血红铆钉菇的多糖含

量都已经达到了显著性差异的程度,其中马勃中水溶性多糖含量为干重的 $(1.36\pm 0.29)\%$,与刘淑芬等^[20]报道的马勃含量为干重的 $(3.68\pm 0.05)\%$ 相比较,其含量略低;有文献指出磷酸酶在体内能够参与碳水化合物转化、蛋白质的合成、信号转导、代谢调节等生理活动^[21],是一种广泛存在于菌体内的生物酶,检测发现4种供试的野生菌确实都含有磷酸酶的活性,区别只存在于酶活性的高低,印证了磷酸酶是生物体内一类参与代谢的功能酶,在下一步开发应用的研究中可以选取活性高的马勃为材料;凝血检测发现只有黄伞具有凝集素活性,说明黄伞凝集素可以识别某种特定的糖结构,需要进一步对黄伞凝集素的特异性进行研究,为开发具有应用潜力的物质奠定实验数据。

通过该研究的检测发现,4种野生菌间存在着较大的性质差异,就食用价值的营养成分而言,黄伞和血红铆钉菇可以作为食品加工的重要材料;由于黄伞的多糖含量较高,而且具有凝集素活性,可作为多糖类药物研发的材料;而马勃高磷酸酶活性为其作为工业酶的加工材料奠定了依据。通过研究的筛选和检测,可以扩大野生资源食用菌的加工应用范围,为野生资源的驯化和推广提供了可靠的依据。

参考文献

- [1] 王生存.黄伞研究现状及开发利用前景展望[J].安徽农业科学,2007,35(22):6755-6756.
- [2] 赵会珍,胥艳艳,付晓燕,等.马勃的食药价值及其研究进展[J].微生物学通报,2007,34(2):367-369.
- [3] 张蓉娇,吴天祥.姬松茸多糖及其生物活性研究进展[J].贵州农业科学,2009,37(6):108-110.
- [4] 唐超,王清吉,葛蔚,等.血红铆钉菇多糖对小鼠S180肉瘤的抑制作用[J].安徽农业科学,2010,38(6):2966-2967.
- [5] 樊廷俊,钱冠兰,杜玉堂,等.姬松茸提取物组分体外抗病毒感染活性的研究[J].中国海洋大学学报,2008,38(5):775-780.
- [6] 栾庆书,金若忠,云丽丽,等.血红铆钉菇对土传病原菌抑菌性研究[J].辽宁林业科技,2005(6):13-16.
- [7] 陈丽,李晓明,张鞍灵,等.黄硬皮马勃提取物抑菌活性初步研究[J].西北农业学报,2006,15(3):87-90.
- [8] Mizuno T K. Agaricus blazei Murill medical and dietary effects[J].

- Food Rev Int,1995,11(1):167-172.
- [9] Wang H X, Liu W K, Ng T B. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from mushroom *Tricholoma mongolicum* [J]. Immunopharmacology,1996,31:205-211.
- [10] Liu Q H, Wang H X, Ng T B. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and antimutagenic activities from a wild ascomycete mushroom[J]. Biochim Biophys Acta,2006,1760(12):1914 - 1919.
- [11] Zhao S, Zhao Y C, Li S H, et al. A novel lectin with highly potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible wild mushroom *Russula delica*[J]. Glycoconj J,2010,27:259-265.
- [12] Cui L, Liu Q H, Wang H X, et al. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2007,75(1):81-85.
- [13] Wang H X, Ng T B. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2006,72(3): 508-513.
- [14] 李艳,赵海燕,吕建宁.灵芝多糖提取工艺研究[J].中成药,2006,28(7):1052-1054.
- [15] 张宝贵,李贵桐.土壤生物在土壤磷有效化中的作用[J].土壤学报,1998,35(1):104-111.
- [16] 赵小蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001(3):7-11.
- [17] 程凡升,生吉萍,王仁爱,等.平菇液体培养液全波长光谱特性与漆酶产量关系研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(8):2157-2160.
- [18] 韩洪波.鸡腿菇漆酶基本酶学性质研究[J].西昌学院学报,2008,22(2):49-50,54.
- [19] 姜华,蔡德华.崑崙山野生黄伞蛋白质营养价值评价[J].江苏农业学报,2007,23(2):159-160.
- [20] 刘淑芬,甄攀.中药马勃中多糖含量测定[J].张家口医学院学报,2001,18(5):32-33.
- [21] Granjeiro P A, Ferreira C V, Cavagis A D M, et al. Essential sulfhydryl groups in the active site of castor bean (*Ricinus communis*) seed acid phosphatase[J].Plant Science,2003,164(4): 629-633.