

不同温度处理对草菇、真姬菇蛋白酶活性变化的影响

巫光宏, 詹福建, 钱春梅, 黄卓烈, 周立莉, 岑剑伟

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:以草菇 V884 及真姬菇的子实体为供试材料, 在 4、15、30 °C 下进行保鲜储藏. 结果表明:蛋白酶比活峰值出现愈迟, 菇类保鲜期愈长; 相反, 出现愈早, 保鲜期愈短. 所以草菇在 15 °C 下可保鲜 3 d; 真姬菇在 4 °C 下可保鲜 7 d, 而在其他的温度处理下, 保鲜时间很短(1 d), 说明草菇、真姬菇两种食用菌的腐烂变质和蛋白酶活性密切相关.

关键词:草菇; 真姬菇; 温度处理; 蛋白酶

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)02-0071-04

Effect of different temperature treatments on proteinase activities of *Volvariella volvacea* and *Pleurotus cornucopiae*

WU Guang-hong, ZHAN Fu-jian, QIAN Chun-mei, HUANG Zhuo-lie, ZHOU Li-li, CEN Jian-wei
(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The straw mushrooms (*Volvariella volvacea* and *Pleurotus cornucopiae*) were stored under different temperature, that is 4, 15, 30 °C, to demonstrate their protein and proteinase activity changes. The experimental results showed that, the later the proteinase activity peak appeared, the longer the mushrooms kept fresh. The suitable store temperatures were 15 °C for *Volvariella volvacea* to keep fresh within 3 days and 4 °C for *Pleurotus cornucopiae* to keep fresh within 7 days. While the mushrooms were stored at the other temperatures, the time for them to keep fresh was very short(1 day). This indicated that variations in the proteinase activities were closely related to these effects of keeping fresh in both mushrooms.

Key words: *Volvariella volvacea*; *Pleurotus cornucopiae*; temperature treatment; proteinase

草菇 *Volvariella volvacea* 和真姬菇 *Pleurotus cornucopiae* 隶属真菌门, 分别属于小包脚菇属、侧耳属. 是世界上 10 种大面积种植的食用菌之一, 尤其是真姬菇, 为近年来迅速发展起来的一个新种类. 草菇是一种高温食用菌, 对温度变化敏感, 通常在 0~5 °C 发生水化自溶^[1-5], 加速溃烂, 这成为草菇产后保鲜的严重制约因素. 不同温度影响草菇代谢途径及其过程中的生理生化机制还不明了, 引发草菇腐败的原因是复杂的. 王富明等^[1]、杨淑云等^[2]认为草菇在保鲜贮藏中, 蛋白酶活性增强, 这可能是加速草菇软腐的原因之一; 陈明杰等^[3]发现低温处理的草菇菌丝体内大分子蛋白质减少. 目前对真姬菇的研究开发起步较晚, 对采后真姬菇的生理生化机制的研究在国内很少有文献报道, 更谈不上如何从本质上揭示其代谢的变化与其保鲜的机制. 本试验通过对采

后草菇、真姬菇在几种温度下的蛋白酶活性和蛋白质质量浓度的变化的研究, 以期对草菇、真姬菇的保鲜研究和生产提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试菌株及处理方法

试验材料为采自广州五山志华食用菌种场的草菇 *Volvariella volvacea* V844 子实体和真姬菇 *Pleurotus cornucopiae* 子实体. 每次随机取 3~4 个子实体放入保鲜袋中封口, 分别于 4、15、30 °C 恒温下进行不同时间储藏, 每个试验组设 3 个重复.

1.2 酶液提取

取每个试验组的子实体剪碎混匀, 称取 4 g, 放入研钵中, 用 5 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)在冰浴中研磨, 10 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 收集上

清液,用上述磷酸盐缓冲液定容至 20 mL,进行蛋白质质量浓度和蛋白酶活性的测定。

1.3 蛋白质质量浓度、蛋白酶活性的测定和数据处理

可溶性蛋白质质量浓度测定按照 Bradford^[6]法,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。蛋白酶活性(酪蛋白为底物)测定采用改进方法^[7],在 37 ℃下,以酪蛋白为底物,在 275 nm 波长下光吸收值变化 0.001 个单位的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。酶比活力以 U/(mg·min)表示。每个试验组均 3 次重复,试验数据进行方差分析^[8]。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

本试验用不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法^[9],检测不同温度、时间的蛋白质差异。分离胶质量分数为 10%,浓缩胶质量分数为 4.75%,电极缓冲液为 0.05 mol/L Tris-Gly(pH8.3)溶液,每孔点样量:40 μ L 酶液,加 0.5 mg/mL 溴酚蓝为前沿指示剂。恒压电泳,浓缩胶 80 V,分离胶 160 V,电泳约 3 h,剥胶,用染色液(1 mg/L 考马斯亮蓝 R250、体积分数为 45% 甲醇、体积分数为 10% 冰乙酸)在 45 ℃下染色 3 h,然后用脱色液(体积分数为 5% 甲醇、体积分数为 7.5% 冰乙酸)在常温下脱色 48 h。

2 结果与分析

2.1 不同温度下,草菇、真姬菇可溶性蛋白质随时间的变化

从图 1、2 中可看出,草菇在 30、4 ℃和真姬菇在 30、15 ℃处理 1 d,蛋白质质量浓度较高,可能与此时的蛋白酶活性较高有关,从而导致草菇在 30、4 ℃和真姬菇在 30、15 ℃处理 1 d 后开始水化、腐烂,保鲜

期很短(1 d)。而草菇在 15 ℃、真姬菇在 4 ℃的处理组中,随着天数的增加,蛋白质质量浓度变化较大,有升有降,推测在不同时间里,菇类子实体细胞的蛋白质代谢,既分解蛋白质又合成新的蛋白质,从而使草菇在 15 ℃下有 3 d 保鲜期,真姬菇在 4 ℃下有 7 d 保鲜期。从表 1 的方差分析可知,温度和时间对草菇、真姬菇的蛋白质质量浓度影响极显著,温度、时间的交互作用也极显著。

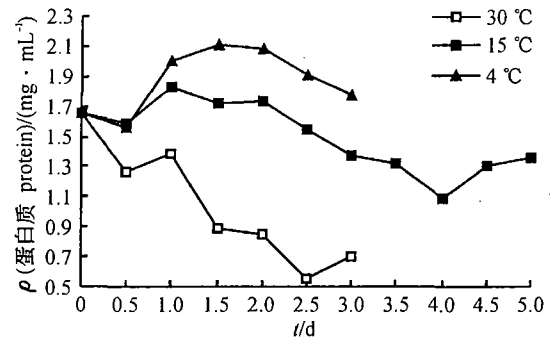


图 1 不同温度下草菇可溶性蛋白质随时间的变化

Fig. 1 Change of protein in different temperatures and time from *Volvariella volvacea*

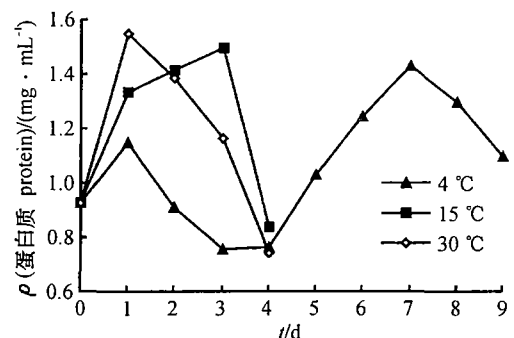


图 2 不同温度下真姬菇可溶性蛋白质随时间的变化

Fig. 2 Change of protein in different temperatures and time from *Pleurotu comucopiae*

表 1 不同温度下草菇和真姬菇可溶性蛋白质随时间变化的方差分析

Tab. 1 Variance analysis of the change of protein in different temperatures and time from *Volvariella volvacea* and *Pleurotu comucopiae*

变异来源 source of variation	菇 mushroom	ν	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
时间 time(t)	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	6	0.176 3	0.029 4	4.66**	2.34	3.29
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	4	0.081 1	0.020 3	6.57**	2.69	4.02
温度 temperature(θ)	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	2	0.667 2	0.333 6	52.86**	3.23	5.18
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	2	0.686 9	0.343 5	111.40**	3.32	5.39
$t \times \theta$	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	12	0.231 7	0.019 3	3.06**	2.00	2.66
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	8	0.097 2	0.012 2	3.94**	2.27	3.17

2.2 不同温度下,草菇、真姬菇蛋白酶活力随时间的变化

从图 3 可知:试验结果与草菇的采后保鲜在不

同温度下的时间差异相符合。蛋白酶活力峰值出现越早,草菇保鲜期越短,蛋白酶活力峰值出现越迟,草菇保鲜期越长。在 30、4 ℃的草菇蛋白酶活力在 1

d后达到最大值;15℃的蛋白酶活力在第1d降到最低,而在第3d才达到最大值.在图4中,真姬菇在15、30℃处理1d,蛋白酶活力虽有所下降,但仍具有较高活性,推测其蛋白质以水解为主,使真姬菇在15、30℃储存1d后开始发软腐烂.在4℃中随着天数增加,蛋白酶活性不断增加,推测4℃真姬菇子实

体的蛋白质不断分解,又不断合成新的蛋白质(图2),从而使真姬菇在4℃储存具有较长的保鲜期(7d).方差分析(表2)表明:温度和时间都对草菇蛋白酶活力影响极显著;温度和时间的交互作用对真姬菇的蛋白酶活性影响极显著.

表 2 不同温度下草菇和真姬菇蛋白酶活力随时间变化的方差分析

Tab. 2 Variance analysis of the change of proteinase activity in different temperatures and time from *Volvariella volvacea* and *Pleurotu comucopiae*

变异来源source of variation	菇 mushroom	ν	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
时间 time(t)	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	6	0.025 4	0.004 2	3.53**	1.98	2.60
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	4	0.005 6	0.001 4	1.24	2.44	3.47
温度 temperature(θ)	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	2	0.017 4	0.008 7	7.31**	3.04	4.71
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	2	0.036 0	0.018 0	15.91**	3.07	4.78
$t \times \theta$	草菇 <i>Volvariella volvacea</i>	12	0.013 1	0.001 1	0.92	1.80	2.28
	真姬菇 <i>Pleurotu comucopiae</i>	8	0.044 0	0.005 5	4.87**	2.01	2.65

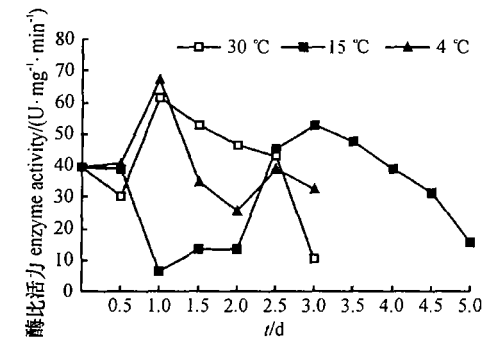


图 3 不同温度下草菇蛋白酶比活力随时间变化
Fig. 3 Change of specific activity in different temperatures and time from *Volvariella volvacea*

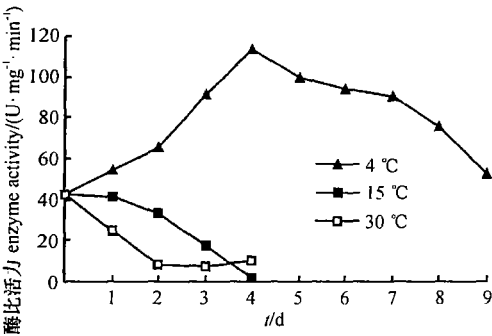


图 4 不同温度下真姬菇蛋白酶比活力随时间变化
Fig. 4 Change of specific activity in different temperatures and time from *Pleurotu comucopiae*

2.3 不同温度和时间下蛋白亚基的差异

在图5中,与采后草菇(0d)相比,15℃、3d草菇的蛋白亚基图谱具有相同的A、B、C、D主带;4℃、3d的具有相同的B、D带,而A、C带模糊;30℃、3d的具有相同的B带,无A、C带,D带模糊.3个不同

温度处理组都无E、F、G带,可能与蛋白酶降解有关.电泳图谱还表明15℃试验组保鲜时间较长(3d),蛋白亚基主带较多.

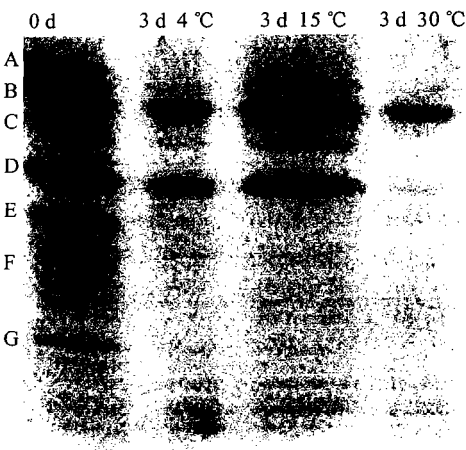


图 5 草菇蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 5 Diagram of SDS-PAGE of proteins from *Volvariella volvacea*

在图6中,与采后真姬菇(0d)相比,不同温度、时间的处理组既有相同的谱带,又各自具有特异的谱带.保鲜时间短的30和15℃处理组有相似的图谱:A、B、E、I、L;保鲜时间较长的4℃处理有特殊的图谱:C、D、F、H、K.推测这些特异性的谱带与真姬菇在4℃下的蛋白质代谢及蛋白酶活性有关.电泳图谱还表明:3个温度处理1d与0d的有较多相对分子质量较小的蛋白亚基,随时间增加,被蛋白酶水解,故在第9、7、4d的相对分子质量小的电泳条带少且模糊.

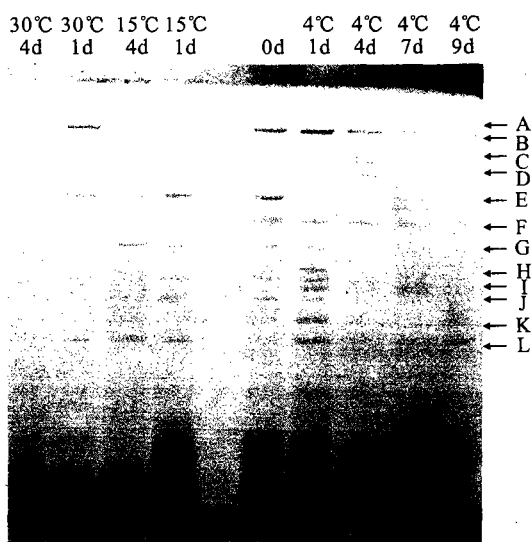


图6 真姬菇蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 6 Diagram of SDS-PAGE of proteins from *Pleurotus cornucopiae*

3 讨论

现有的研究表明:对草菇保鲜贮藏影响最大的酶类之一是蛋白酶,制约草菇储藏保鲜的一个重要原因是温度诱导子实体的蛋白酶活性升高,尤其在低温时,加速子实体蛋白质的分解,可见在菇类的腐烂变质过程中,温度和蛋白酶是重要影响因素^[3,4,10]。

本研究中,通过对草菇、真姬菇蛋白酶活性及可溶性蛋白质质量浓度的分析,发现草菇蛋白酶活性在不同温度下有很大的变化,在4、30℃(1d)时蛋白酶表现较高活性,这与草菇在常规低温(5℃)和常温(30℃)下,发生软化、液化、腐烂变质等生理现象相对应;在15℃时(1d),蛋白酶活性最低,这与王富民等^[1]、杨淑云等^[2]、陈明杰等^[3]认为草菇最适储藏温度为15℃相符。在真姬菇研究中发现其蛋白酶活性在不同温度下也有很大的变化,在15、30℃(1d)时,蛋白酶活性较高,导致真姬菇腐烂变质;在4℃时,真姬菇蛋白酶活性峰值在第4d才出现,此时可溶性蛋白质质量浓度达最低值,表明子实体以分解蛋白质为主,随后(第5~7d)蛋白质质量浓度又逐渐上升,表明此时以蛋白质合成代谢为主,在电泳图谱也有新的特异谱带,推测真姬菇在4℃低温诱导下可能有新的代谢途径,有其他的因素对蛋白酶活性有一定的抑制作用,使蛋白酶活性下降,从而使真姬菇在4℃具有较长(7d)的保鲜期。可见不同菇类子实体蛋白酶在不同温度下具有不同的调控活性的机制^[10,11]。

蛋白质是基因表达的结果,研究蛋白质电泳图

谱是分析在外界因素诱导下产生的基因表达差异的有效方法之一。草菇、真姬菇在不同温度下储存时间的差异,可以在其菌体可溶性蛋白质电泳图谱上得到相应的反映。在电泳图谱中可知,储存时间较长的草菇温度处理组(15℃3d),其电泳谱带与对照(0d)相比,有较多相同的主带,说明在15℃3d前,其蛋白酶活性较低,子实体相对分子质量大的蛋白质较少降解为相对分子质量小的多肽。储存时间较长的真姬菇温度处理组(4℃7d),其电泳谱带与对照(0d)相比,有较多的特异谱带,而储存时间较短的温度处理组(15、30℃4d),特异谱带非常少,且第1d出现较多相对分子质量小的多肽,说明蛋白酶活性高,促进蛋白质分解。这说明了草菇、真姬菇在不同环境温度影响下,导致蛋白酶基因表达或关闭^[10,11],这些正是了解草菇、姬菇保鲜机制的关键所在。进一步研究这些菇类蛋白酶的基因结构、功能,会有助于了解及比较草菇和真姬菇在不同温度条件下的代谢途径,菇类的储藏、保鲜研究无疑将有重大突破。

参考文献:

- [1] 王富民,宫秀荣,高君辉,等. 草菇保鲜技术及有关生理变化[J]. 上海农业学报,1992,8(3):60-66.
- [2] 杨淑云,刘朝贵,曹必好,等. 草菇采后生理及保鲜技术[J]. 生物学杂志,2002,119(4):36-38.
- [3] 陈明杰,汪昭月,贺东梅,等. 低温影响草菇蛋白质组分变化的研究[J]. 食用菌学报,1995,2(4):28-31.
- [4] SCHWALB M N. Developmentally regulated proteases from the basidiomycete *Schizophyllum commune* [J]. J Biol Chem, 1977,252:8 435-8 439.
- [5] HANSELER E, NYHELEN L E, RAST D M. Isolation and properties of chitin synthetase from *Agaricus bisporus* mycelium [J]. Exper Mycol, 1983,7:17-30.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976,72(2):248-254.
- [7] 陶宇容,谭知敏,黄荣芳. 菠萝蛋白酶活力测定法的改进[J]. 药物分析杂志,1982,2(2):102-103.
- [8] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. 77-100.
- [9] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000. 99-127,361-379.
- [10] WANG H X, NG T B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,289:750-755.
- [11] 王美艳,陈明杰. 草菇低温诱导蛋白的分离与纯化[J]. 农业生物技术学报,2002,10(2):194-196.

【责任编辑 柴 焰】