

# 大型真菌中谷氨酸生产菌的快速筛选

宋自力<sup>1,2,3</sup>, 李慧钰<sup>1</sup>, 王俊茹<sup>1</sup>, 米生权<sup>\*1</sup>, 李伟<sup>\*2,3</sup>, 尹文兵<sup>2,3</sup>

1 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023

2 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

宋自力, 李慧钰, 王俊茹, 米生权, 李伟, 尹文兵. 大型真菌中谷氨酸生产菌的快速筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4158-4170

Song Zili, Li Huiyu, Wang Junru, Mi Shengquan, Li Wei, Yin Wenbing. Rapid screening of glutamate-producing macrofungi[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4158-4170

**摘要:**【背景】大型真菌是重要的食品和药物资源, 可产生包括必需氨基酸在内的多种营养成分。谷氨酸是食用大型真菌中呈现鲜味的重要功能分子之一, 是衡量食用菌营养价值的一个重要指标。【目的】基于伞菌目中谷氨酸合酶同源基因的保守性, 对大型真菌中含有谷氨酸的菌株资源进行筛选, 为野生大型真菌资源的挖掘及谷氨酸产品的开发提供指导。【方法】通过对伞菌目中已报道的 25 株谷氨酸合酶基因序列进行比对分析, 在谷氨酸合酶保守的外显子区域设计了 2 对简并引物 GS Ag\_les F1/R1 和 GS Ag\_les F2/R2, 并将其用于对伞菌目 13 个科的 65 株大型真菌进行 PCR 筛选。另外, 还采用异硫氰酸苯酯衍生化的方法结合 LC-MS 和 HPLC 对这 65 个菌株产生的谷氨酸进行定量分析, 进而评估该筛选方法的筛选效率。【结果】获得筛选引物的筛选效率为 86.2%, 并且引物 GS Ag\_les F1/R1 的筛选效率明显优于 GS Ag\_les F2/R2。优化后的伞菌目大型真菌谷氨酸发酵培养条件为: LMM 培养基, 28 °C、200 r/min, 2-4 d。结合 PCR 和 HPLC 的分析结果评估该引物筛选的真阳性率为 81.5%, 应用范围涉及伞菌目的口蘑科、泡头菌科、伞菌科、丝膜菌科、粪伞科、离褶伞科、侧耳科、鬼伞科和鸟巢菌科 9 个科。【结论】本研究获得的筛选引物在伞菌目产生谷氨酸的菌株筛选中显示出了良好的应用前景, 为谷氨酸生产菌株提供了高效、便捷的筛选技术方法。

**关键词:** 谷氨酸; 谷氨酸合酶; 分子标记; 食用菌; 高效筛选

基金项目: 北京高等学校高水平人才交叉培养“实培计划”毕业设计(科研类)协同项目; 国家重点研发计划(2018YFD0400200)

**Supported by:** Collaborative Project of Graduation Design (Scientific Research) of “Practical Training Plan” for Cross-Training High-Level Talents in Beijing Universities; National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400200)

**\*Corresponding authors:** E-mail: MI Shengquan: msq65@buu.edu.cn; LI Wei: liw@im.ac.cn

**Received:** 2022-02-08; **Accepted:** 2022-03-22; **Published online:** 2022-04-11

## Rapid screening of glutamate-producing macrofungi

SONG Zili<sup>1,2,3</sup>, LI Huiyu<sup>1</sup>, WANG Junru<sup>1</sup>, MI Shengquan<sup>\*1</sup>, LI Wei<sup>2,3</sup>, YIN Wenbing<sup>2,3</sup>

1 College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China

2 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Background] Macrofungi are important food and drug resources, which can produce a variety of nutrients including essential amino acids. Glutamate, one of the important functional molecules of edible macrofungi, presents umami taste and is an important index to measure the nutritional value of edible fungi. [Objective] We evaluated the resources of macrofungal strains containing glutamate based on the conserved homologous genes of glutamate synthase in *Agaricales*, aiming to guide the exploitation of wild macrofungal resources and the manufacture of glutamate products. [Methods] We compared the glutamate synthase gene sequences from 25 strains and analyzed the conserved exon region. Two pairs of degenerate primers, GS Ag\_les F1/R1 and GS Ag\_les F2/R2, were designed for the conserved exon region of glutamate synthase and used for PCR screening of 65 strains belonging to 13 families of *Agaricales*. In addition, phenylisothiocyanate derivatization was combined with LC-MS and HPLC to quantify the glutamate produced by the 65 strains, and then the screening efficiency of this method was evaluated. [Results] The screening efficiency of primers designed in this study was 86.2%, and the screening efficiency of the primer pair GS Ag\_les F1/R1 was significantly better than that of GS Ag\_les F2/R2. The fermentation conditions of *Agaricales* for the production of glutamate were optimized as follows: LMM medium, 28 °C, 200 r/min and 2–4 days. The results of PCR and HPLC showed that the primer screening method in this study had a true positive rate of 81.5%, and the application scope involved multiple families including *Tricholomataceae*, *Physalacriaceae*, *Agaricaceae*, *Cortinariaceae*, *Bolbitiaceae*, *Lyophyllaceae*, *Pleurotaceae*, *Psathyrellaceae* and *Nidulariaceae* of *Agaricales*. [Conclusion] The primers obtained in this study exhibit a good application prospect in the screening of glutamate-producing strains of *Agaricales*.

**Keywords:** glutamic acid; glutamic acid synthase; molecular marker; edible mushroom; efficient screening

大型真菌一直被视为食品和药物的重要来源, 如木耳、香菇、侧耳属、牛肝菌、双孢蘑菇及金针菇等<sup>[1-3]</sup>。大型真菌之所以具有重要的药用和食用价值, 是因为其能够产生种类丰富且结构多样的代谢产物, 如氨基酸类、核苷酸类、萜类、多肽类及聚酮类等<sup>[4-5]</sup>。而谷氨酸作为食用菌呈现鲜味的关键成分之一, 对食用菌的营养和风味的影响至关重要。

大型真菌中氨基酸的种类十分丰富, 不但包括赖氨酸、组氨酸和亮氨酸等人体必需氨基

酸<sup>[6-7]</sup>, 而且还包括丰富的谷氨酸和天冬氨酸等呈味氨基酸<sup>[8-9]</sup>, 从而使得食用大型真菌既营养丰富又口味鲜美。史琦云等<sup>[10]</sup>通过对香菇、糙皮侧耳、金针菇、双孢蘑菇、茶树菇及黑木耳等食用菌进行氨基酸组成和含量分析, 发现谷氨酸是食用菌呈鲜味的关键。宋爱荣等<sup>[11]</sup>研究表明, 谷氨酸在 4 个刺芹侧耳新品种子实体中的含量占总氨基酸的 15.30%–21.45%。然而, 目前对富含谷氨酸的食用菌进行筛选普遍采用氨基酸自动分析仪对某个食用菌品种进行全氨基

酸的分析,如张航等<sup>[12]</sup>通过氨基酸自动分析仪测定和分析了云南新鲜羊肚菌中 16 种氨基酸的含量,最终证明了谷氨酸和天冬氨酸是其中含量最高的氨基酸,但该方法包括样品匀浆、酸水解等复杂的样品前处理过程且成本较高,难以大规模应用。目前对大型真菌中氨基酸的筛选已经建立了更为高效的筛选方法,如 Song 等<sup>[13]</sup>利用大型真菌中赖氨酸生物合成的关键酶高柠檬酸合酶实现了对 70 多株大型真菌中赖氨酸的快速筛选。

真菌中谷氨酸的生物合成涉及 2 种不同的途径,在第一种生物合成途径中, $\alpha$ -酮戊二酸与游离的氨在高  $\text{NH}_4^+$ 浓度的条件下由谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase)催化还原氨基化而形成谷氨酸;在另一生物合成途径中, $\alpha$ -酮戊二酸在谷氨酸合酶(glutamate synthase, GS)的催化下接受 L-谷氨酰胺的酰胺基形成 2 分子的谷氨酸,该途径在真菌谷氨酸生物合成中较为普遍<sup>[14]</sup>。朱静等<sup>[15]</sup>通过对谷氨酸合酶的基因序列进行预测和分析,获得了大型真菌灵芝中谷氨酸合酶基因序列,证实了该酶不仅在进化上高度保守,而且对灵芝的生长及次级代谢至关重要。可见,谷氨酸合酶对高等真菌中谷氨酸的生物合成起到了关键的调控作用。本研究从高等真菌灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)的染色体上获得了谷氨酸合酶的氨基酸序列<sup>[16]</sup>,通过对其在整个伞菌亚门的保守性分析,以期获得适用于对整个伞菌目的谷氨酸进行挖掘的基因筛选标记,为研究产生谷氨酸的野生大型真菌资源的挖掘和筛选提供高效、便捷的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

研究中所用的 65 株大型真菌由中国科学

院微生物研究所真菌学国家重点实验室保藏,菌株具体信息见表 1。

#### 1.1.2 引物

研究中用于 PCR 扩增筛选的引物详见表 2。

#### 1.1.3 培养基

PDA 培养基: PDA 39 g 溶于 1 L 蒸馏水,用于菌株的活化和固体培养。

PDB 培养基: PDB 24 g 溶于 1 L 蒸馏水,用于菌株的发酵培养。

LMM 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 硝酸盐 50.0, 微量元素 1.0, 酵母提取物 5.0。pH 6.5, 用于菌株的基因组提取和发酵培养。

CBY 培养基(g/L): 玉米粉 25.0, 大豆粉 10.0, 酵母提取物 2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 磷酸二氢钾 1.0, 磷酸氢二钾 0.25。pH 5.5, 用于菌株的发酵培养。

所有培养基均于 105 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min 后备用。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

PDA 和 PDB 培养基, BD 公司; 其他生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司; *SanTaq* PCR Mix 酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

恒温培养箱, 太仓市豪成仪器制造有限公司; 超净工作台, 北京亚泰科隆仪器有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 电泳仪和凝胶分析仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; 紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 谷氨酸合酶序列比对和系统发育分析

灰盖鬼伞(*C. cinerea*)中已报道的谷氨酸合酶(XP\_002911893.1)的氨基酸序列<sup>[16]</sup>被提交到 NCBI 中的 BLASTp 进行同源比对, 分别下载不同分类单元内已报道的与鬼伞菌谷氨酸合酶具有同源性的谷氨酸合酶氨基酸序列, 包括伞菌目 25 株、红菇目 3 株、多孔目 8 株、花耳目

2 株、银耳目 2 株、块菌目 4 株、盘菌目 1 株、肉座菌目 14 株, 并基于不同物种来源的谷氨酸合酶基因序列的保守性, 通过 MEGA 6.0 中的 neighbor-joining 法构建系统发育树, 进而对谷氨酸合酶在不同分类单元内的聚类关系进行分析, bootstrap 值为 1 000。

### 1.2.2 谷氨酸合酶简并引物设计

通过 DNAMAN 软件对来源于伞菌目的

14 个不同属的谷氨酸合酶基因序列进行保守性分析, 利用 MEME 5.4.1 分析软件对伞菌目不同菌株之间谷氨酸合酶基因序列的区域保守性进行分析(Multiple EM for Motif Elicitation, MEME, <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)<sup>[17]</sup>, 根据这些保守序列的外显子区域设计简并引物, 用于对产生谷氨酸的大型真菌进行快速筛选。

表 1 本研究中所用的筛选谷氨酸产生菌株

Table 1 The fungal strains screened glutamate production in this study

Family	Species	Strains	Family	Species	Strains
<i>Tricholomataceae</i>	<i>Lepista sordida</i>	SZL-003	<i>Psathyrellaceae</i>	<i>Psathyrella bivelata</i>	SZL-004
	<i>Lepista sordida</i>	SZL-026		<i>Psathyrella bivelata</i>	SZL-028
	<i>Lepista sordida</i>	SZL-072		<i>Psathyrella bivelata</i>	SZL-030
	<i>Lepista sordida</i>	SZL-097		<i>Psathyrella bivelata</i>	SZL-054
<i>Physalacriaceae</i>	<i>Flammulina velutiper</i>	SZL-109		<i>Psathyrella subsingeri</i>	SZL-021
	<i>Flammulina velutiper</i>	SZL-118		<i>Psathyrella subsingeri</i>	SZL-061
	<i>Oudemansiella raphanipes</i>	SZL-117		<i>Psathyrella candolleana</i>	SZL-058
<i>Agaricaceae</i>	<i>Coprinus comatus</i>	SZL-089		<i>Psathyrella candolleana</i>	SZL-147
	<i>Coprinus comatus</i>	SZL-174		<i>Psathyrella candolleana</i>	SZL-148
	<i>Agaricus</i> sp.	SZL-015		<i>Coprinellus radians</i>	SZL-020
	<i>Agaricus</i> sp.	SZL-130		<i>Coprinellus radians</i>	SZL-087
	<i>Agaricus</i> sp.	SZL-079		<i>Coprinellus radians</i>	SZL-108
	<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-047		<i>Coprinellus radians</i>	SZL-179
	<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-040		<i>Coprinopsis atramentaria</i>	SZL-014
	<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-029	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	SZL-036	
	<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-044	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	SZL-049	
	<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-081	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	SZL-060	
	<i>Agaricus parvibrunneus</i>	SZL-105	<i>Cortinariaceae</i>	<i>Hebeloma</i> sp.	SZL-010
	<i>Agaricus blazei</i>	SZL-110		<i>Hebeloma</i> sp.	SZL-033
	<i>Agaricus bisporus</i>	SZL-025	<i>Strophariaceae</i>	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	SZL-119
	<i>Agaricus bisporus</i>	SZL-125		<i>Omphalotaceae</i>	<i>Lentinula edodes</i>
	<i>Agaricus bitorquis</i>	SZL-059	<i>Lentinula edodes</i>		SZL-178
	<i>Agaricus bitorquis</i>	SZL-046	<i>Bolbitiaceae</i>	<i>Agrocybe pediades</i>	SZL-154
	<i>Agaricus bresadolanus</i>	SZL-052		<i>Agrocybe aegirit</i>	SZL-111
	<i>Agaricus bresadolanus</i>	SZL-051B		<i>Panaeolus retirugis</i>	SZL-100
<i>Agaricus subrufescens</i>	SZL-053	<i>Pleurotaceae</i>	<i>Pleurotus geesteranus</i>	SZL-113	
<i>Agaricus subrufescens</i>	SZL-074		<i>Pleurotus sajor-caju</i>	SZL-116	
<i>Agaricus subrufescens</i>	SZL-099		<i>Pleurotus eryngii</i>	SZL-122	
<i>Macrolepiota</i> sp.	SZL-168		<i>Pleurotus ostreatus</i>	SZL-127	
<i>Agaricus xanthodermus</i>	SZL-038	<i>Amanitaceae</i>	<i>Amanita</i> sp.	SZL-157	
<i>Lyophyllaceae</i>	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SZL-112	<i>Lycoperdaceae</i>	<i>Lycoperdon</i> sp.	SZL-180
	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SZL-114	<i>Nidulariaceae</i>	<i>Cyathus</i> sp.	SZL-181
	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SZL-121			

表 2 本研究中所用筛选引物

Table 2 The primers for screening strains produced glutamate in this study

Primer	Sequence (5'→3')
GS Ag_les F1	ATGGGYTGYATCATGATGCG
GS Ag_les R1	GARATYTCCTTCCARTCCTTGAC
GS Ag_les F2	CGKACYATYAATGAGATGG
GS Ag_les R2	GTRAAYTCYGGGAAGTTG

### 1.2.3 基因组 DNA 的提取与 PCR 筛选

从平板上刮取部分菌丝接种到 10 mL 装有 LMM 液体培养基的平板内, 28 °C 静置培养 3-5 d, 挑取部分菌丝吸干培养基后进行基因组 DNA 的提取, 提取方法参照丝状真菌基因组 DNA 提取方法<sup>[13]</sup>。PCR 扩增利用 *SanTaq* PCR Mix 酶进行。PCR 反应体系(10 μL): 基因组 DNA (20 ng/μL) 0.5 μL, 筛选引物(正向和反向, 10 μmol/L)各 0.4 μL, *SanTaq* PCR Mix 5 μL, 无菌水补足; PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min; 12 °C 保存。PCR 产物检测通过 1%的琼脂糖凝胶电泳(135 V, 16 min)进行。

### 1.2.4 菌株的活化与发酵培养

将保存在 4 °C PDA 培养基斜面的 65 株菌株接种到 PDA 平板培养基上, 28 °C 培养 3-5 d, 然后将其接种到新鲜的 PDA 培养基上培养 5-7 d, 作为发酵种子。利用无菌打孔器在平板上相同的位置进行打孔, 获得直径 1 cm 左右的菌饼, 取 2 块菌饼放入 2 mL 无菌的带有钢珠的离心管进行菌体破碎(70 Hz, 60 s), 然后将破碎后的菌体分别接种到装有 10 mL PDB、LMM 或 CBY 的液体培养基中, 28 °C、200 r/min 摇床振荡发酵 10 d, 发酵液中谷氨酸的含量每 2 天检测一次。

### 1.2.5 谷氨酸衍生化反应

通过谷氨酸的异硫氰酸苯酯 (phenyl

isothiocyanate, PITC) 衍生化的方法进行谷氨酸的 HPLC 检测<sup>[18]</sup>。首先称取谷氨酸标准品溶于适量的超纯水中, 配制成 1 mg/mL 的谷氨酸标准液, 然后分别配制 0.1 mol/L 的 PITC 溶液 (0.6 mL PITC 溶于 49.4 mL 乙腈) 和 1 mol/L 三乙胺溶液 (6.75 mL 三乙胺溶于 43.25 mL 乙腈) 进行衍生化反应。反应体系包括 0.1 mol/L PITC 100 μL、1 mol/L 三乙胺溶液 100 μL 和谷氨酸标准液 200 μL, 混合均匀后室温孵育 1 h, 最后加入 400 μL 正己烷终止反应。取下层溶液 12 000 r/min 室温离心 15 min, 上清液用于 HPLC 或 LC-MS 的分析。不同菌株发酵液中谷氨酸的检测采用相同的衍生化方法进行。

### 1.2.6 谷氨酸衍生物测定标准曲线的制作

将上述配制好的 1 mg/mL 的谷氨酸标准液依次稀释成 0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg/mL 的浓度梯度, 分别进行衍生化后通过 HPLC 检测衍生物含量; 再以谷氨酸含量为横坐标、谷氨酸衍生物峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 依据衍生物的含量对谷氨酸进行定量分析。

### 1.2.7 谷氨酸提取与定量分析

取 300 μL 发酵液 12 000 r/min 室温离心 15 min, 然后将离心后的上清进行 PITC 衍生化和 HPLC 分析检测, 依据谷氨酸衍生物的标准曲线对发酵液中的谷氨酸进行定量。HPLC 分析采用 XTerra MS C18 (4.6 mm×250 mm×5 μm) 色谱柱进行, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm。HPLC 流动相梯度洗脱条件为: 0-2 min, 甲醇 10%-28%; 2-13 min, 甲醇 28%-28%; 13-28 min, 28%-85%; 28-28.1 min, 甲醇 85%-100%; 28.1-33 min, 甲醇 100%-100%; 33-33.1 min, 甲醇 100%-10%; 33.1-38 min, 甲醇 10%-10%。食用菌发酵液中谷氨酸衍生物的 LC-MS 检测通过 Agilent 1200 进行, LC-MS

梯度洗脱条件为: 0–30 min, 乙腈 5%–100%; 30–35 min, 乙腈 100%–100%; 35.0–35.1 min, 乙腈 100%–5%; 35.1–40.0 min, 乙腈 5%–5%。谷氨酸衍生物的分子量被提取用于验证谷氨酸衍生化的可行性。

### 1.2.8 数据处理与统计分析方法

通过 Excel 2016、MEGA 6.0、DNAMAN 及 SnapGene 3.2 等软件对引物设计时的数据进行处理, 通过 GraphPad Prism 8.01 对实验结果的数据进行统计分析, 通过 Agilent ChemStation Rev. B.04.01 对 LC-MS 数据进行分析处理。每个样品培养分析均设置 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 谷氨酸合酶氨基酸序列具有高度保守性

通过对灰盖鬼伞中已报道的谷氨酸合酶的氨基酸序列进行同源比对, 获得同源的 59 种不同菌株来源的谷氨酸合酶, 并对这些酶进行了聚类分析。在系统发育树中, 产生 59 种谷氨酸合酶的菌株涉及 21 个科和 8 个目, 其中伞菌目菌株有 25 株, 几乎占到所有菌株的一半。伞菌目 25 株菌株分别归属于 12 个科, 然而由于这些谷氨酸合酶在不同科之间的亲缘关系较近, 导致科与科的分类界限并不明显, 如 KN817587.1 和 KL142370.1 等。归属于同一目的谷氨酸合酶大多聚到同一分支, 其中谷氨酸合酶的保守性在伞菌目 (*Agaricales*) 中达到 79.12%、在红菇目 (*Russulales*) 中达到 82.45%、多孔目 (*Polyporales*) 达到 90.09%、花耳目 (*Dacrymycetales*) 达到 81.61%、银耳目 (*Tremellales*) 达到 97.54%、块菌目 (*Tuberales*) 达到 94.58%、肉座菌目 (*Hypocreales*) 达到 74.16% (图 1)。结果表明, 在高等真菌中谷氨酸合酶在目内高度保守。

### 2.2 简并引物设计和谷氨酸合酶基因 PCR 扩增

通过对伞菌目中 25 株菌的谷氨酸合酶基因序列进行保守性分析, 获得了 4 段保守的基因序列, 分别为 ATGGGXTGXATXATGATGXG、CGXACXATXAAXGAXATGG、XAAXTCCCCXGAXTTXAC 和 GTCAAXGAXTGGAXGAXATXTC, 其中用于保守性分析的菌株归属于 12 个科, 几乎涉及伞菌目所有常见的科, 表明这些基因序列在整个伞菌目具有较强的保守性。基于谷氨酸合酶这些保守的基因序列我们设计了伞菌目谷氨酸高效筛选的 2 对简并引物, 用于伞菌目产谷氨酸菌株的 PCR 筛选验证。通过引物对 GS Ag\_les F1/R1 的 PCR 扩增验证发现, 在 65 株伞菌目菌株中共有 51 株能获得目的条带, 筛选效率高达 78.5%; 而对于引物对 GS Ag\_les F2/R2 的 PCR 扩增, 共有 44 株能够获得目的条带, 其中有 10 株显示非特异性扩增, 因此, GS Ag\_les F1/R1 的筛选效果明显优于 GS Ag\_les F2/R2, 然而当 2 对引物组合使用时效率高达 86.2% (图 2A–2D)。该结果表明, 本研究依据谷氨酸合酶保守序列设计的简并引物可用于伞菌目 *Tricholomataceae*、*Physalacriaceae*、*Agaricaceae*、*Cortinariaceae*、*Bolbitiaceae*、*Lyophyllaceae*、*Pleurotaceae*、*Psathyrellaceae* 等科中产谷氨酸菌株的筛选。

### 2.3 不同菌株发酵液中谷氨酸定量分析方法的建立

谷氨酸是生物体内氨基酸代谢的重要成员, 参与多种重要的生理代谢过程。然而, 由于谷氨酸特殊的化学性质导致其在一般的 HPLC 分析过程中难以直接被检测和定量, 因此, 本研究先对谷氨酸进行 PITC 衍生化后再对谷氨酸进行 HPLC 检测和定量。通过将谷氨酸标准品与 PITC 进行衍生化反应, 成功检测到无其

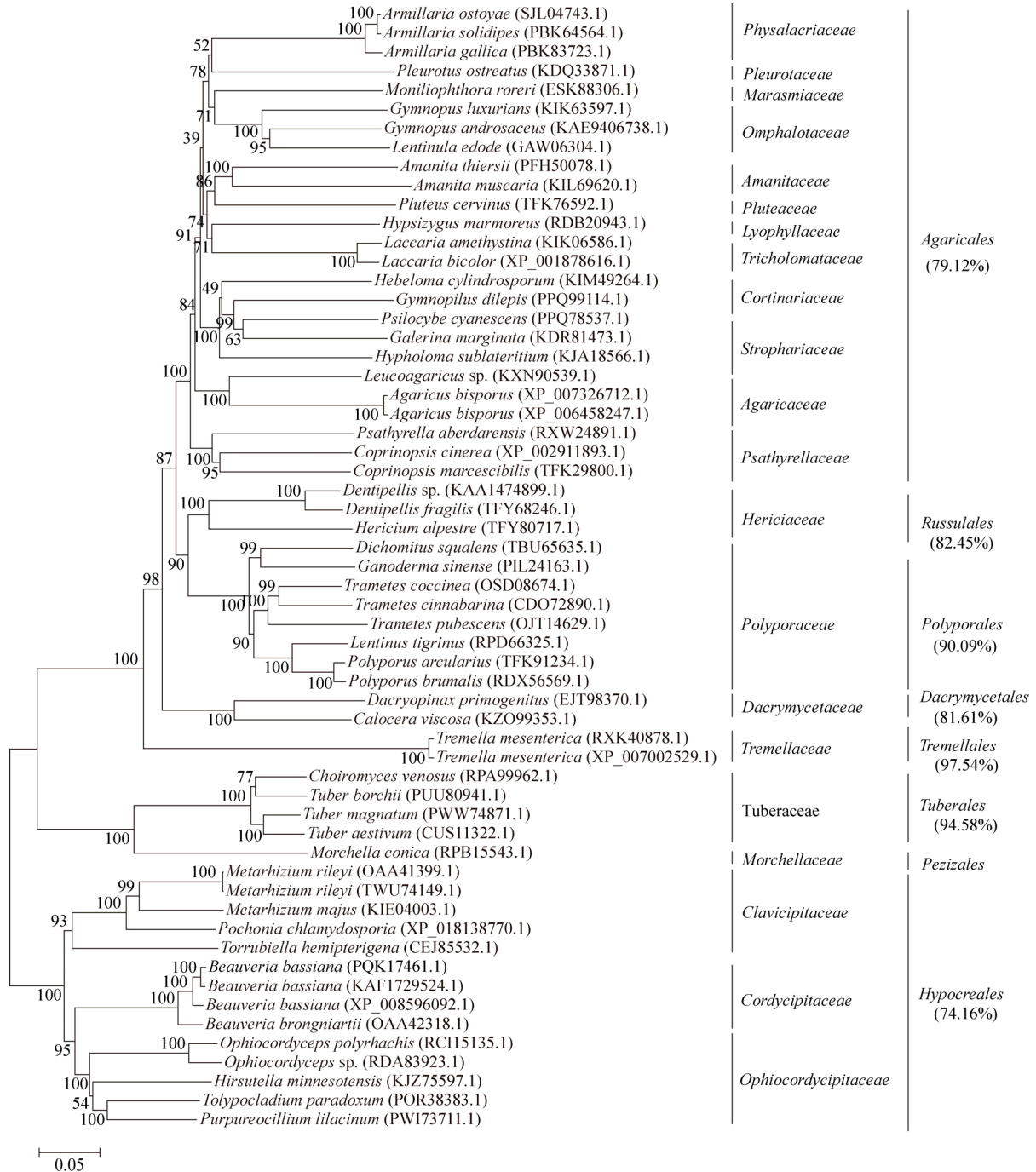


图1 高等真菌谷氨酸合酶的系统发育分析 括号中的序列号表示不同菌株的谷氨酸合酶的 GenBank 登录号；分支点的数字表示进化树不同分支之间的置信程度；标尺表示不同菌株的谷氨酸合酶之间进化距离的比例

Figure 1 Phylogenetic analysis of glutamate synthase in higher fungi. Serial numbers in brackets indicate the GenBank accession numbers of glutamate synthase of different strains. The number of branch points represents the confidence degree between different branches of the evolutionary tree. The scales indicate the proportion of evolutionary distances between glutamate synthases of different strains.



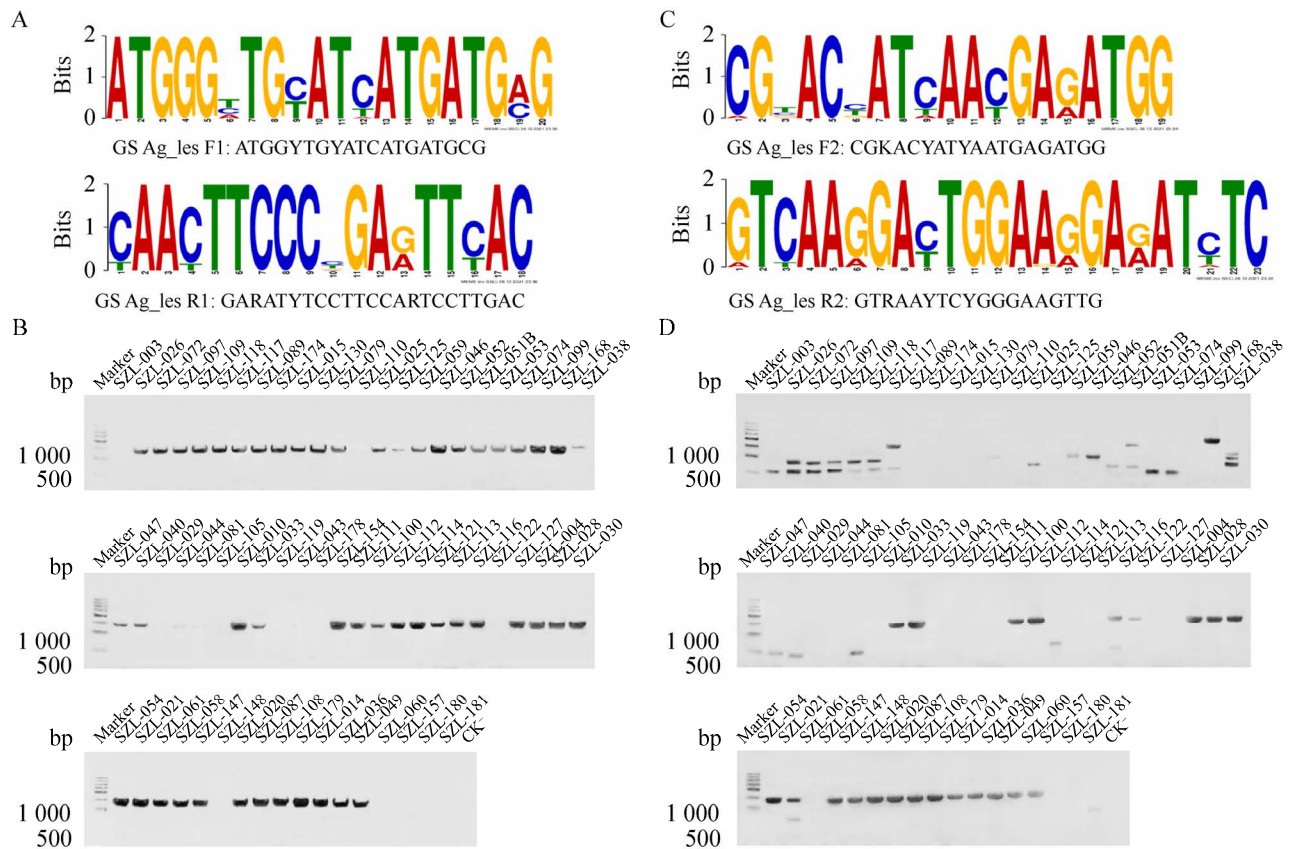


图 2 伞菌目菌株来源的谷氨酸合酶筛选简并引物设计及菌株 PCR 筛选 A: 序列保守区 MEME 分析及 GS Ag\_lesF1/R1 引物对设计; B: GS Ag\_lesF1/R1 引物对用于 PCR 扩增筛选食用菌菌株; C: 序列保守区 MEME 分析及引物对 GS Ag\_lesF2/R2 设计; D: 引物对 GS Ag\_lesF2/R2 用于 PCR 扩增筛选食用菌菌株

Figure 2 Degeneracy primer design of glutamate synthase and PCR screening of strains in *Agaricales*. A: Conservative motif of gene by MEME and the designed GS Ag\_lesF1/R1 primers; B: PCR with the GS Ag\_lesF1/R1 primers; C: Conservative motif of gene by MEME and the designed GS Ag\_lesF2/R2 primers; D: PCR with the GS Ag\_lesF2/R2 primers.

他化合物干扰的谷氨酸衍生物, 并进一步采用此方法对 *A. blazei* SZL-110 发酵液中的谷氨酸进行了检测, 结果显示在相同保留时间存在具有相同吸收波长的化合物(图 3A 和 3B)。为了验证相同保留时间的化合物是谷氨酸衍生化后的产物, 通过 LC-MS 分别对谷氨酸标准品的衍生物和 SZL-110 发酵液的衍生物进行了分析, 结果显示在相同保留时间的 2 种化合物具有相同的分子量为 283.2  $[M+H]^+$ , 表明此化合物为谷氨酸衍生化后的产物(图 3C)。为了对不同菌

株发酵液中的谷氨酸进行定量, 利用谷氨酸衍生物对谷氨酸的产量进行表征, 并通过 HPLC 建立了谷氨酸标准曲线,  $R^2$  接近于 1 (图 3D)。上述结果表明, 谷氨酸 PITC 衍生化可有效用于大型真菌谷氨酸的定量分析。

#### 2.4 产谷氨酸菌株发酵培养条件的优化

谷氨酸是由微生物所产生的初级代谢产物, 其产量受到发酵培养条件的影响, 本研究采用 CBY、LMM 和 PDB 3 种培养基对大型真菌在 10 d 内的谷氨酸产量进行分析。为了充分表征



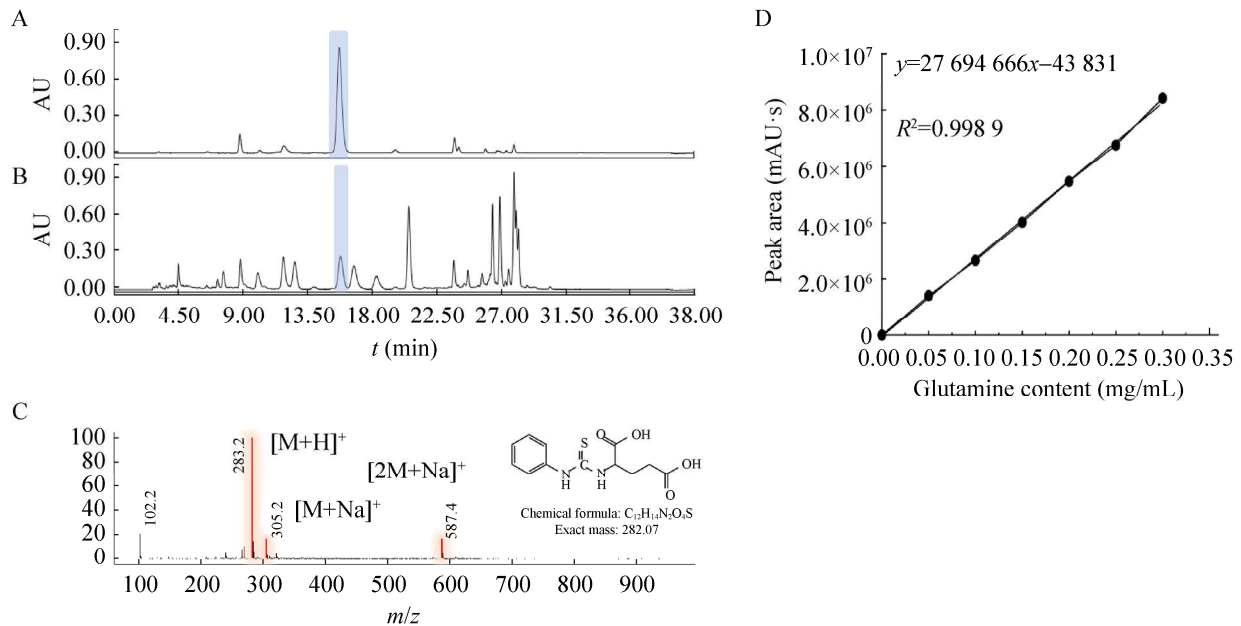


图 3 不同菌株发酵液中谷氨酸 PITC 衍生化及其检测标准曲线测定 A: 谷氨酸衍生物 HPLC 分析; B: 菌株 SZL-110 发酵培养液的 HPLC 分析; C: 谷氨酸衍生物 LC-MS 分析; D: 谷氨酸衍生物检测标准曲线

Figure 3 Glutamate derivation and standard curve measurement for in fermentation broth of mushrooms. A: HPLC analysis of glutamate derivative; B: HPLC analysis of the SZL-110 strain; C: LC-MS analysis of glutamate derivative; D: The standard curve of glutamate determined by HPLC analysis.

在伞菌目不同科内谷氨酸的产生情况, 分别在伞菌科(*Agaricaceae*)、泡头菌科(*Physalacriaceae*)、类脐菇科(*Omphalotaceae*)、鬼伞科(*Psathyrellaceae*)和口蘑科(*Tricholomataceae*) 5 个科中选取了一株菌进行谷氨酸发酵培养条件的优化, 5 个科的代表菌株分别为 *Agaricus* sp. SZL-015、*F. velutipes* SZL-118、*L. edodes* SZL-043、*P. bivelata* SZL-004 和 *L. sordida* SZL-026。结果显示, 不同培养基成分和发酵时间均能显著影响食用菌中的谷氨酸产量, 而且不同科菌株之间谷氨酸产量也存在着较大的差别。通过分析培养基成分对谷氨酸产生的影响, 结果发现 LMM 培养基在谷氨酸生产上具有明显的优势, 其产量能达到 0.1 mg/mL 以上。另外, 发酵时间也对谷氨酸的产量产生了重要影响, 伞菌科、泡头菌科、类脐菇科和口蘑科的菌株在发酵 2 d 内谷氨酸产量达到峰值, 分别为

0.126、0.098、0.029 和 0.095 mg/mL, 随后便开始下降。鬼伞科菌株 SZL-004 的谷氨酸产量在 4 d 时达到峰值, 产量为 0.098 mg/mL (图 4)。因此, 为得到较高的谷氨酸产量, 本研究采用 LMM 培养基进行发酵培养, 鬼伞科菌株发酵 4 d 进行谷氨酸含量测定, 其他 4 科的菌株发酵 2 d 进行谷氨酸含量测定。

## 2.5 谷氨酸合酶基因分子标记可用于谷氨酸生产菌株的筛选

为了进一步评价简并引物筛选谷氨酸生产菌株的可靠性, 利用优化后的谷氨酸发酵培养条件对筛选时所用的 65 株伞菌目菌株进行了发酵培养, 并通过 HPLC 对这些菌株的谷氨酸产量进行了测定(图 5)。结果显示, 不同菌株的谷氨酸产量在同一科内具有一定的相似性, 但不同科之间的差异较为明显。在所有检测的

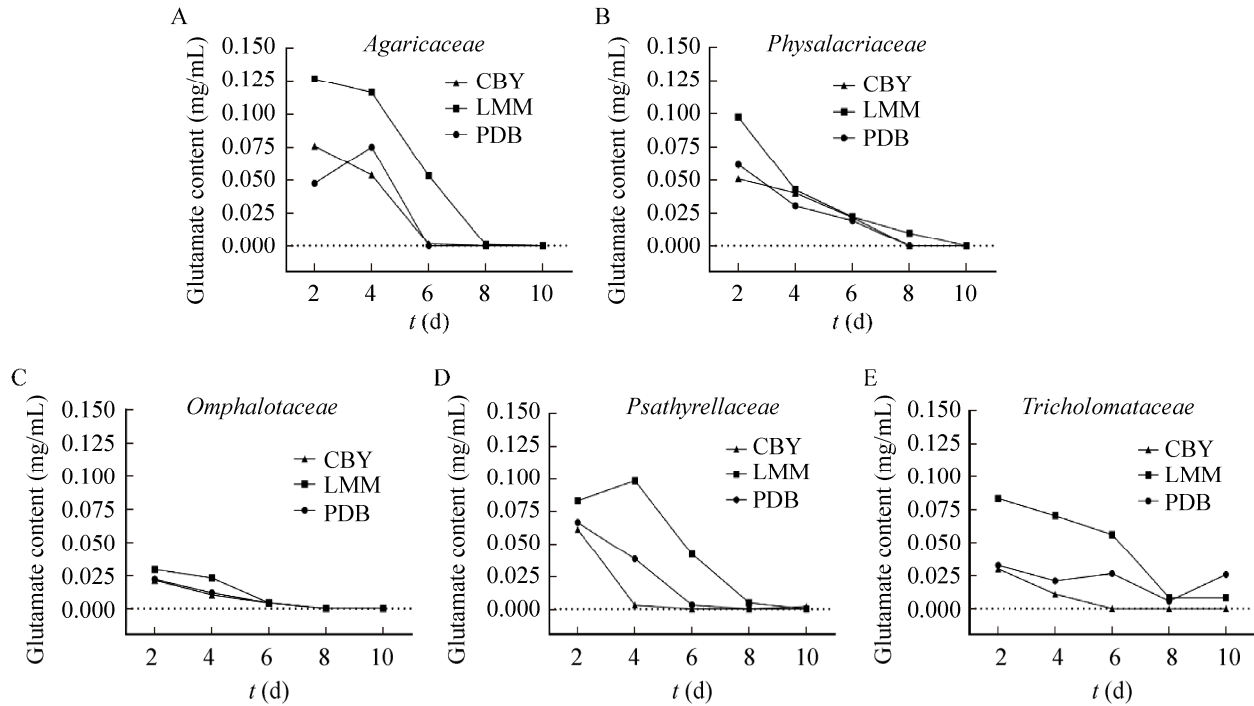


图 4 不同培养基和发酵周期对不同菌株产谷氨酸的影响 A: 伞菌科 *Agaricus* sp. SZL-015 的产量; B: 泡头菌科 *F. velutipes* SZL-118 的产量; C: 类脐菇科 *L. edodes* SZL-043 的产量; D: 鬼伞科 *P. bivelata* SZL-004 的产量; E: 口蘑科 *L. sordida* SZL-026 的产量

Figure 4 Effects of media and fermentation period on glutamate production in different strains. A: Glutamate production of *Agaricus* sp. SZL-015 (*Agaricaceae*); B: Glutamate production of *F. velutipes* SZL-118 (*Physalacriaceae*); C: Glutamate production of *L. edodes* SZL-043 (*Psathyrellaceae*); D: Glutamate production of *P. bivelata* SZL-004 (*Tricholomataceae*); E: Glutamate production of *L. sordida* SZL-026 (*Omphalotaceae*).

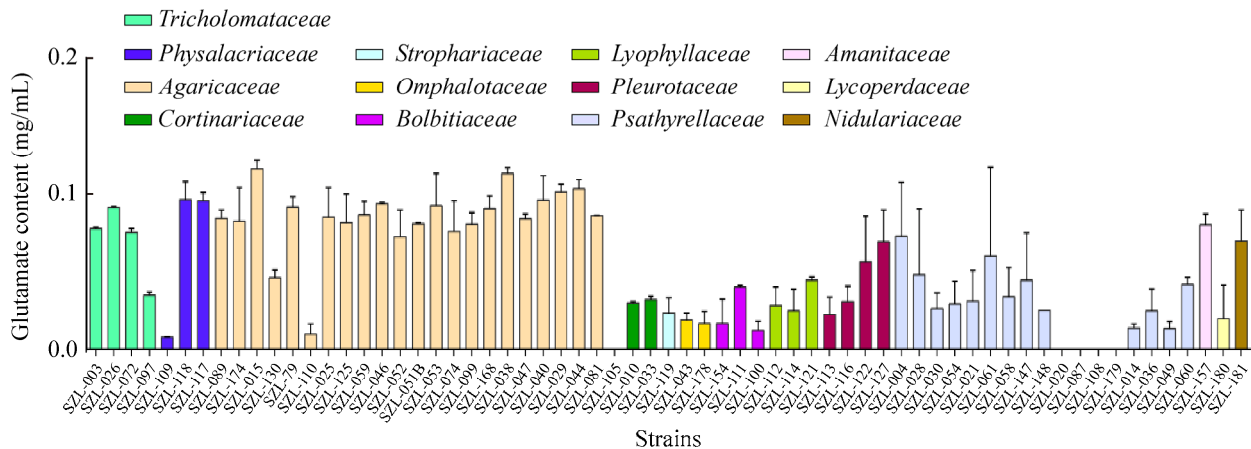


图 5 伞菌目不同菌株在 LMM 培养基中的谷氨酸含量定量分析

Figure 5 Quantitative analysis of glutamic acid yield for the macrofungi strains *Agaricales* in LMM broth fermentation.

13 科的 65 株菌中共有 5 株未检测到谷氨酸的产生, 分别是 *A. parvibrunneus* SZL-105、*C. radians* SZL-020、*C. radians* SZL-087、*C. radians* SZL-108 和 *C. radians* SZL-179, 其中 4 株 *C. radians* 菌株在 PCR 的筛选结果中有目的 PCR 条带, 但在 HPLC 分析结果中未检测到谷氨酸, 表明本研究设计的简并引物用于 *C. radians* 筛选时会出现一定的假阳性。对于菌株 *A. blazei* SZL-110、*A. xanthodermus* SZL-029、*S. rugosoannulata* SZL-119、*L. edodes* SZL-043、*L. edodes* SZL-178、*P. eryngii* SZL-122、*Amanita* sp. SZL-157 和 *Lycoperdon* sp. SZL-180, PCR 扩增结果显示无目的条带, 而 HPLC 分析则有谷氨酸产生, 表明本研究设计的简并引物在筛选球盖菇科(*Strophariaceae*)、类脐菇科、鹅膏科(*Amanitaceae*)、马勃科(*Lycoperdaceae*)的菌株中是否产生谷氨酸时具有一定的局限性。通过对 PCR 和 HPLC 的结果进行综合分析, 在所用的 65 株菌中共有 53 株显示出 PCR 筛选和谷氨酸产生的一致性, 效率达到 81.5%。结果表明所设计的基于谷氨酸合酶基因的分子筛选标记可用于伞菌目中的口蘑科、*Physalacriaceae*、伞菌科、丝膜菌科(*Cortinariaceae*)、粪伞科(*Bolbitiaceae*)、离褶伞科(*Lyophyllaceae*)、侧耳科(*Pleurotaceae*)、鬼伞科和鸟巢菌科(*Nidulariaceae*)中谷氨酸生产菌株的筛选。该分子标记是否可用于伞菌目范围内的其他类群, 需要在更多菌株分析的基础上做进一步的筛选验证。

### 3 讨论与结论

谷氨酸因能赋予食用菌特殊的鲜味而受到广泛关注<sup>[19-20]</sup>, 截至目前, 人们对食用菌中谷氨酸含量的检测主要还是依靠传统的氨基酸自动分析仪或者氨基酸衍生化后的产物进行分析, 这些方法尽管具有较高的精确度和可重复

性, 但也存在着周期长及操作过程烦琐等多种局限性, 在一定程度上限制了谷氨酸生产菌株的挖掘和谷氨酸产品的开发进程<sup>[21-23]</sup>。如谢志茹等<sup>[21]</sup>采用了邻苯二甲醛-9-氟乙酸甲酸甲酯(orthophthalaldehyde-9-formic acid methyl ester of flutorene chlorine, OPA-FMOC)柱前衍生化 HPLC 法对香菇及金针菇中的蛋白氨基酸及非蛋白氨基酸进行了测定, 该方法的建立包括了至少 4 h 的样品制备及 80 min 的 HPLC 运行程序, 另外还需要建立标准曲线及计算该方法的精密密度、重复性、稳定性、回收率等参数指标, 最后得到谷氨酸的含量分别为(2.53±0.75) mg/g-香菇、(2.73±0.39) mg/g-金针菇。然而基于分子标记 PCR 筛选的方法用于功能分子的检测不仅能大幅度缩短筛选周期, 而且成本较低, 适用于对大批量的产物进行快速检测<sup>[24-25]</sup>。如 Guo 等<sup>[24]</sup>利用多重简并 PCR 技术开发了一种能够同时针对 8 个基因的转基因食物筛选方法, 并且该方法已用于 90 多个转基因事件的筛选中。本研究基于大型真菌中谷氨酸生物合成途径的关键酶谷氨酸合酶基因序列的保守性, 设计了 2 对简并引物用于谷氨酸生产菌株的筛选, 效率达到了 86.2%, 在一定程度上提高了产谷氨酸的大型真菌资源的筛选效率, 为大型真菌谷氨酸产生菌株的快速筛选提供了另一个有效方法。

目前, 人们对大型真菌中氨基酸的获取方式主要是依靠子实体, 然而子实体的发酵周期相对较长且培养过程较为复杂, 不利于快速获取特定的氨基酸产品。近年来, 食用菌菌丝液体发酵成为新的获取特定食用菌产品的技术手段, 与传统的食用菌栽培相比具有发酵周期短、生长速度快、条件易控等优点。例如, 赵瑞华等<sup>[26]</sup>综述了羊肚菌发酵物中的主要营养和活性成分, 表明羊肚菌发酵物和子实体一样富含蛋

白质、脂肪酸、维生素、矿物质等营养成分,还富含多糖、多酚及甾醇等活性成分,赋予了羊肚菌发酵物极高的利用价值;张忠等<sup>[27]</sup>以猴头菌发酵菌丝体中的麦角甾醇产量为考察指标,研究了发酵液中的碳源、氮源和无机盐对发酵产物的影响,最终获得了稳定可控的猴头菌液体发酵产麦角甾醇的工艺技术方。大型真菌中谷氨酸的产量除了会受到谷氨酸合酶表达的影响,同时也会受到其他外界因素的影响<sup>[15]</sup>。本研究同时采用3种含有不同营养成分的培养基对5株不同科菌株的发酵培养条件进行了优化,为大型真菌液体发酵生产谷氨酸提供了一定的工艺参数。本研究还利用HPLC对大型真菌发酵培养时的谷氨酸产量进行了定量分析,并结合PCR筛选结果进行了效率评价,最终的阳性率达到81.5%。因此,本研究建立的谷氨酸合酶基因作为分子标记在产谷氨酸的伞菌目菌株的筛选中具有较高的通用性,在评价和鉴别大型真菌谷氨酸生产菌株和谷氨酸类产品的开发等方面具有潜在的应用价值和前景,将对大型真菌谷氨酸产品的开发起到积极的推动作用。

## REFERENCES

- [1] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21  
Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH. A revised checklist of edible fungi in China[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- [2] 吴芳, 员媛, 刘鸿高, 戴玉成. 木耳属研究进展[J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 198-207  
Wu F, Yun Yuan, Liu HG, Dai YC. *Auricularia* (*Auriculariales*, *Basidiomycota*): a review of recent research progress[J]. *Mycosystema*, 2014, 33(2): 198-207 (in Chinese)
- [3] 冯涛, 水梦竹, 李雪, 宋诗清, 庄海宁, 张劲松. 食用菌风味物质的研究进展[J]. 食用菌学报, 2018, 25(4): 97-104  
Feng T, Shui MZ, Li X, Song SQ, Zhuang HN, Zhang JS. Advances in flavor substances research in edible mushrooms[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2018, 25(4): 97-104 (in Chinese)
- [4] 周素娟, 张晓娜. 食用菌保健功能及保健食品应用与开发[J]. 中国食用菌, 2015, 34(1): 4-6  
Zhou SJ, Zhang XN. Health function of edible mushroom and the development of health foods[J]. *Edible Fungi of China*, 2015, 34(1): 4-6 (in Chinese)
- [5] 庄海宁, 张劲松, 冯涛, 杨焱, 冯杰. 我国食用菌保健食品的发展现状与政策建议[J]. 食用菌学报, 2015, 22(3): 85-91  
Zhuang HN, Zhang JS, Feng T, Yang Y, Feng J. Present status of the Chinese edible fungi-based health food industry and recommendations on future policy[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2015, 22(3): 85-91 (in Chinese)
- [6] 陆欢, 王瑞娟, 刘建雨, 宋春艳, 尚晓冬. 不同品种金针菇的营养成分分析与评价[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 69-75, 96  
Lu H, Wang RJ, Liu JY, Song CY, Shang XD. Analysis and evaluation of nutrient components of different strains of *Flammulina filiformis*[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(6): 69-75, 96 (in Chinese)
- [7] 曹世宁, 陈相艳, 崔文甲, 弓志青, 李大鹏, 王文亮. 食用菌中呈味物质的研究进展[J]. 食品工业, 2016, 37(3): 231-234  
Cao SN, Chen XY, Cui WJ, Gong ZQ, Li DP, Wang WL. Research progress of flavor substances in edible fungi[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(3): 231-234 (in Chinese)
- [8] Yamaguchi S, Yoshikawa T, Ikeda S, Ninomiya T. Measurement of the relative taste intensity of some L- $\alpha$ -amino acids and 5'-nucleotides[J]. *Journal of Food Science*, 1971, 36(6): 846-849
- [9] 房凤玲, 丁劲松. L-谷氨酸的胃肠道保护作用机制及药物开发[J]. 药学学报, 2017, 52(4): 517-523  
Fang FL, Ding JS. Protective mechanisms of L-glutamate in gastrointestinal and drug development[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(4): 517-523 (in Chinese)
- [10] 史琦云, 邵威平. 八种食用菌营养成分的测定与分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 38(3): 336-339, 345  
Shi QY, Shao WP. Determination of nutritive components of eight edible fungi[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2003, 38(3): 336-339, 345 (in Chinese)
- [11] 宋爱荣, 岳运勇, 徐坤. 四个杏鲍菇品种的氨基酸分析与比较[J]. 菌物研究, 2005, 3(4): 11-14  
Song AR, Yue YY, Xu K. Analysis and comparison of the amino acids in four new *Pleurotus eryngii* strains[J]. *Journal of Fungal Research*, 2005, 3(4): 11-14 (in Chinese)
- [12] 张航, 宋卿, 林佳, 飞志欣. 氨基酸自动分析法测定云南新鲜羊肚菌中16种氨基酸的含量[J]. 食品安全质

- 量检测学报, 2019, 10(22): 7564-7569
- Zhang H, Song Q, Lin J, Fei ZX. Determination of 16 amino acids in fresh *Morchella esculenta* of Yunnan Province by amino acid automatic analyzer[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(22): 7564-7569 (in Chinese)
- [13] Song ZL, Zhao RL, Zhang HJ, Wei PL, Qi LD, Chen GC, Yin WB, Li W. Rapid and accurate screening of lysine-producing edible mushrooms via the homocitrate synthase gene as a universal molecular marker[J]. ACS Omega, 2021, 6(41): 26910-26918
- [14] Ter Schure EG, Van Riel NAW, Verrips CT. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 67-83
- [15] 朱静, 岳思宁, 陈琛, 宋书琪, 连玲丹, 赵明文. 谷氨酸合酶在灵芝中生物学功能的研究[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(6): 1073-1079
- Zhu J, Yue SN, Chen C, Song SQ, Lian LD, Zhao MW. Study on the biological function of glutamate synthase in *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(6): 1073-1079 (in Chinese)
- [16] Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, et al. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*)[J]. PNAS, 2010, 107(26): 11889-11894
- [17] Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl\_2): W369-W373
- [18] Zheng GH, Jin WW, Fan P, Feng XN, Bai Y, Tao T, Yu LJ. A novel method for detecting amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2015, 392: 1-6
- [19] Wu RN, Yu ML, Liu XY, Meng LS, Wang QQ, Xue YT, Wu JR, Yue XQ. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of Suan-cai, a traditional food made in Northeast China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211: 23-31
- [20] Chen ZQ, Gao HY, Wu WJ, Chen HJ, Fang XJ, Han YC, Mu HL. Effects of fermentation with different microbial species on the umami taste of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*)[J]. LWT, 2021, 141: 110889
- [21] 谢志茹, 程敏, 谭丽容, 肖雪, 李莎莎. OPA-FMOC 柱前衍生化 HPLC 法测定两种常用食用菌中蛋白氨基酸和非蛋白氨基酸的含量[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 240-246, 230
- Xie ZR, Cheng M, Tan LR, Xiao X, Li SS. Determination of protein amino acids and nonprotein amino acids in two edible fungi by HPLC with OPA-FMOC precolumn derivatization[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 240-246, 230 (in Chinese)
- [22] Zhang ZY, Zhang XY, Xin G, Gong X, Wang YD, Wang L, Sun BX. Umami taste and its association with energy status in harvested *Pleurotus geesteranus* stored at different temperatures[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 179-186
- [23] Liu Q, Cui X, Song ZB, Kong WW, Kang YC, Kong WL, Ng TB. Coating shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) with a polysaccharide from *Oudemansiella radicata* improves product quality and flavor during postharvest storage[J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129357
- [24] Guo JC, Chen LL, Liu X, Gao Y, Zhang DB, Yang LT. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs[J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1566-1573
- [25] Azevedo-Nogueira F, Gomes S, Carvalho T, Martins-Lopes P. Development of high-throughput real-time PCR assays for the *Colletotrichum acutatum* detection on infected olive fruits and olive oils[J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126417
- [26] 赵瑞华, 贺晓龙, 田茜. 羊肚菌菌丝体液体发酵及其应用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(12): 190-195
- Zhao RH, He XL, Tian X. Research advancement on liquid fermentation and the application of *Morchella mycelia*[J]. Food Research and Development, 2020, 41(12): 190-195 (in Chinese)
- [27] 张忠, 吴迪, 王雨阳, 杨焱, 冯杰, 李文, 陈万超, 张劲松. 猴头菌高产麦角甾醇液体发酵工艺优化[J]. 菌物学报, 2021, 40(8): 2159-2170
- Zhang Z, Wu D, Wang YY, Yang Y, Feng J, Li W, Chen WC, Zhang JS. Optimization of liquid fermentation process of ergosterol produced by *Hericium erinaceus*[J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 2159-2170 (in Chinese)