

香菇菌株品系鑑定之研究— API-ZYM 酵素分析系統之應用

林勝傑 謝堂州

摘 要

為再創本省香菇栽培業之蓬勃發展, 尋求簡便而可靠之菌種篩選及品系鑑定方法, 建立菌種註冊管理制度, 以鼓勵菌種商培育優良菌種, 確為當務之急。API-ZYM 酵素分析系統係根據生化反應原理而設計者, 應用於酵素活性之測定。本試驗以國內外收集之三十七株香菇菌, 經API-ZYM 酵素分析系統分析結果可歸納於十九個品系; 其中有單一菌株為單一品系者, 但亦有多數菌株同歸於同一品系者, 由此可推知 API-ZYM 酵素分析系統確有菌株品系鑑定之功能; 同時亦可推知目前一般菌種商提供之菌株, 多數彼此間具有親緣關係; 更可由各菌株酵素系統之完整性, 供為菌種篩選之參考。

關鍵詞: 香菇菌、API-ZYM 酵素分析系統、品系鑑定、酵素活性。

林勝傑、謝堂州 1990. 香菇菌株品系鑑定之研究—酵素分析系統之應用。林業試驗所研究報告季刊, 6(1):21-26.

Application of API-ZYM Enzyme Testing System to Rapid Identification of Strains in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

Shung-Jei Lin and Tang-Chou Hsieh

[Summary]

The methods used for screening and authenticating of cell line are major components for establishing a registration system of shiitake varieties. The system is very important for the further development of the shiitake industry.

Based on biochemical theories, API-ZYM enzyme testing system is designed for measure enzymatic activities. In this study, thirty-seven isolates of *Lentinus edodes* were collected from the wild strains and cultivated strains. Using of API-ZYM enzyme system analysis, all those strains can be classified into 19 groups. Some groups contained only one strain in each group and some contained many strains in one group. From those results can conclude that the API-ZYM enzyme testing system is a rapid method for cell line authenticating and strains pre-screening.

Key words: *Lentinus edodes*, API-ZYM enzyme testing system, enzymatic activities, cell line authentication (identification).

Shung-Jei Lin and Tang-Chou Hsieh 1991. Application of API-ZYM En-

1990年10月送審

1991年1月通過

zyme Testing System to Rapid Identification of Strains in *Lentinus edodes* (Bark.) Sign. Bull. Taiwan For. Res. Inst. New Series. 6(1):21-26

一、緒 言

香菇為重要之食用菌類，在本省已有四十餘年之栽培歷史，尤其近年來更成為民間熱衷投資的行業，故近年來雖受大陸香菇走私進口之衝擊，有關單位仍積極從事菌種培育及菇木樹種開發之研究，期以改良品質及降低生產成本創造本省香菇栽培事業之第二春。

香菇栽培為一生物生產事業，其成敗深受生長環境及菌株遺傳特性之影響。因此，加強對香菇菌生長影響因子之探討及優良菌種之培育與管理制度之建立，以改進栽培技術及提供品質優良而一致的菌種將是今後主要研究方向；尤其菌種管理制度之建立，更為鼓勵菌種商研究培育優良菌株，提供菇農品質優良且產量穩定之菌種的必要措施。猶如日本政府，即以菌種註冊登記制度來促進該國新菌種之開發。惟辦理菌種之註冊登記，必先設一套完整而具有公信力之菌種品系鑑定標準。日本政府1980年訂訂之菌種品系鑑定標準(Anon. Release 1980)係根據下列四大原則：(1)遺傳特性一即以配對試驗，觀察是否有抑制帶產生。(2)生理特性一包括培養溫度與菌絲生長及木片菌種表面菌絲塊形成情形。(3)栽培特性一包括出菇時間，環境條件及子實體產量。(4)形態特徵一包括子實體大小、顏色、鱗片分布情形及菌蓋、菌褶、菌柄等之形態。然而，前述鑑定標準，幾乎都包括有環境因子與菌種遺傳基因型之交互作用的結果；而此交互作用卻極度影響到真正遺傳變異性表現；亦即無法從形態上的差異，斷定究竟是因環境因子或是遺傳因子之不同所引起者，從而造成品系鑑定上之困擾，因而開發更可靠的品系鑑定方法，實為菌種管理之先決要件。近十餘年來，由於生化科技及化學分類法之發展；有以酵素系統(許瑞祥等, 1986; Bridge et al., 1984)分析或同功酶(May et al., 1981; Roysse et al., 1983; Toyomasu, 1981)之電泳分離，來研究菌分類或菌種品系鑑定；亦有以血清技術(Taquchi et al., 1979)或DNA-BASE的組成(Normore, 1973)為品系鑑定方法者。為促成本省菌種管理制度之建立，本計畫擬以一系列之酵素相關研究，配合傳統式之配對及栽培試驗，探尋正確而可靠的菌種篩選及品系鑑定之方法。本試驗以國內外栽培種及野生種香菇菌計37菌株，經

液體培養後，以API-ZYM酵素分析系統進行其各種體外酵素活性分析，期能以生化反應的特性，建立起迅速而客觀之菌種篩選方法及品系鑑定系統的作業程序，以利育種及管理工作的推展。

二、材料與方法：

1. 試驗菌株：

本試驗計採集香菇菌株，包括野生香菇二種，日本栽培品系五種，西德引進一種及本省栽培種二十九等共計三十七種，其編號及來源如表一所示；各菌種皆培養於馬鈴薯、葡萄糖、洋菜(PDA)的試管斜面培養基中，於5℃下保存備用。

2. 前培養：

將各試驗菌株分別接種於有馬鈴薯，葡萄糖及洋菜(即PDA)之固體培養基的培養皿中，於25℃下培養7天後，供為液體培養之菌種。

3. 菌絲液內培養：

(1)液體培養基之配製：

以Y.M.培養基之組成分，包括麥芽抽出物0.3%，酵母抽出物0.3%，蛋白胨0.5%，葡萄糖1%配製成之液體培養基，取50毫升裝入200毫升的三角瓶中，在121℃，1.2大氣壓下殺菌15分鐘後，取出冷卻備用。

(2)接種及液內培養：

將前培養所得之菌落，以殺菌後的不銹鋼打孔器沿菌落邊緣切下直徑5mm的菌塊為菌種，接種於Y.M.液體培養基中，在25℃下靜置液內培養10天。

4. API-ZYM酵素系統分析：

將各菌株經10天液內靜置培養後之菌液，振盪均勻後，以滴管吸取上澄液，分別滴入法國API-SYSTEM公司設計之API-ZYM 2520酵素分析系統之各項反應基質中(包括一個空白為對照組及19種水解酵素之反應基質)，於陰暗而潮濕之環境下，以37℃，經過4小時反應後，先加一滴ZYM-A反應劑以終止酵素之反應；再加入一滴ZYM-B呈色反應劑，促其呈色，經5分鐘之後，以1000瓦特之燈光照射約10秒鐘，以消除可能發生的黃色變化，然後再與標準色卡對照，依其顏色深淺之相對數值，測定表二所列各種酵素之活性，藉以為菌種篩選或品系鑑定之依據。

表 1 試驗香菇菌株

Table 1. Strains of *Lentinus edodes* used for the Experiment

菌 株 編 號	菌 株 來 源	菌 株 編 號	菌 株 來 源
LE01	關露 野生種	LE28	石岡菜菌種場
LE02	漁池菜菌種場 野生種	LE30	豐原菜菌種場 太空包高滋種
LE03	農試所	LE35	漁池菜菌種場 No.123
LE05	日本 25A	LE36	漁池菜菌種場 No.29
LE06	日本 701	LE37	漁池菜菌種場 No.56
LE07	日本 Y707	LE38	林試所 No.4
LE08	台大 LE-77-1	LE39	林試所 No.5
LE09	台大 LE-77-2	LE40	埔里菜菌種場 A6
LE10	台中菜菌種場 太空包菌種	LE41	埔里菜菌種場 1 號
LE11	台中菜菌種場 太空包菌種	LE42	埔里菜菌種場 小 9
LE13	八仙山陳姓農提供太空包菌	LE43	埔里菜菌種場 b
LE16	日本 365	LE44	埔里菜菌種場 271
LE17	西德 Strain,J.Liese	LE45	台中菜菌種場 271
LE19	八仙山菜菌種場 3號滑木菌種	LE46	台中菜菌種場 271 麥粉培養基
LE20	八仙山菜菌種場 2號滑木菌種	LE47	台中菜菌種場 N 271
LE21	日本 W4 滑木菌種	LE48	台中菜菌種場
LE24	八仙山莊姓農提供	LE49	新營菜菌種場
LE25	中興菜菌種場提供	LE50	新營菜菌種場
LE26	南投菜菌種場		

表 2 API-ZYM 2520 酵素分析系統所測定的各種酵素*

Table 2. Enzymes Assayed for the API-ZYM 2520 Enzyme Testing System

酵素編號	分 析 酵 素	酵素編號	分 析 酵 素
1	Control	11	Phosphatase acid
2	Phosphatase alkaline	12	Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase
3	Esterase (C4)	13	α -galactosidase
4	Esterase lipase (C8)	14	β -galactosidase
5	Lipase (C14)	15	β -glucuronidase
6	Leucine arylamidase	16	α -glucosidase
7	Valine arylamidase	17	β -glucosidase
8	Cystine arylamidase	18	N-acetyl- β -glucosaminidase
9	Trypsin	19	α -mannosidase
10	Chymotrypsin	20	α -fucosidase

* API-ZYM 2520 was from API. System, S.A. La Balme-les-Grottes 38390 Montalieu-Vercieu France.

三、結果與討論

1. 香菇菌體外酵素API-ZYM系統分析：

香菇菌絲接種於Y.M.液體培養基中，在25℃培養箱內，經液內靜置培養10天後，每菌株取3瓶，分別抽取其上澄液，以API-ZYM 2520 Enzyme Testing System測定各菌株所分泌之Esterase等19種體外酵素之活性；並於呈色反應後，依顏色之深淺，與API-ZYM標準色卡對照，直接讀取各酵素活性等級及各種酵素在4小時內

水解不溶性反應基質而釋出可溶性反應基質之量。該標準色卡將各種酵素活性分為六個等級；“0”表示不含酵素而無水解產物釋出；“1”表示該酵素之水解釋出物之含量相當於5 nanomoles以下；“2”表示釋出量為5-10 nanomoles；“3”相當於10-20 nanomoles；“4”表示釋出量為20-30 nanomoles；“5”則其釋出量多於40 nanomoles。本試驗共測定37菌株；各菌株經三次重覆試驗，結果皆相似，顯示API-ZYM分析的可靠性很高。

表3 香菇菌液內培養胞外酵素活性API-ZYM系統分析

Table 3. Enzymatic activities of submerged culture of *Lentinus edodes* in the API-ZYM 2520 enzyme testing system.

菌株編號	API-ZYM酵素編號																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
LE01			++	+							+	+	+					+	+	
LE02		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE03		+	+		+	+					+	+	+	+	+			+	+	
LE05		+	+			+					+		+	+	+			+		
LE06		+	+								+			+	+			+	+	
LE07		+	+								+				+			+		
LE08		+	+										+		+			+	+	
LE09		+	+	+							+	+	+	+	+			+	+	
LE10		+	+	+							+		+	+	+			+	+	
LE11		+	+								+	+	+	+				+	+	
LE13		+	+								+		+	+						+
LE16		+	+								+	+	+	+				+		
LE17		+	+								+		+	+	+			+	+	
LE19		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE20		+	+								+		+	+	+			+	+	
LE21		+	+								+		+	+	+			+	+	
LE24		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE25				+							+				+					+
LE26		+	+								+	+	+		+			+		
LE28		+	+								+		+		+					+
LE30		+	+								+		+		+			+	+	
LE35		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE36		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE37		+	+								+		+	+	+			+	+	
LE38		+	+								+			+	+					+
LE39		+	+								+	+	+		+					+
LE40		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE41		+	+								+	+	+		+			+	+	
LE42		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE43		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE44		+	+								+	+	+	+	+			+	+	
LE45		+	+								+		+	+	+			+	+	
LE46		+	+								+		+	+				+	+	
LE47				+							+				+					+
LE48		+	+								+	+	+		+			+	+	
LE49		+									+	+								
LE50											+		+	+						-

*+表示酵素活性等級≥2

由試驗結果得知, 在API-ZYM 2520 酵素分析系統所測試之19種酵素中, 香菇菌大都不含Valine arylamidase (7)^e, Cystin arylamidase (8), Trypsin (9), Chymotrypsin (10), α -glucosidase (16), α -mannosidase (19)及 α -fucosidase (20)等七種胞外酵素; 而含有Phosphatase alkaline (2), Lipase (C14) (5)及Leucine arylamidase (6)等酵素之菌株亦不多, 且酵素活性亦較弱, 即在4小時之內, 將非水溶性基質水解而釋出之量, 大部不超過5 nanomoles。故在API-ZYM 2520 酵素分析系統中, 香菇菌所含有之胞外酵素乃以Esterase (C4)(3), Esterase Lipase (C8)(4), Phosphatase acid (11), Naphthol-AS-B1- Phosphohydrolase (12), α -galactosidase (13), β -glucosidase (14), β -glucuronidase (15), β -glucosidase (17)及N-acetyl- β -glucosaminidase (18)等九種為主, 且其存缺及活性之強弱, 在品系間均有明顯的差異, 因此, 此等酵素將可成為香菇菌種篩選及品系鑑定之依據。惟API-ZYM 酵素分析系統為微量半定量分析方法, 酵素活性之強弱係依顏色深淺而分級, 是相對值而非絕對值; 且液體培養基的顏色易對活性較弱的酵素之呈色發生干擾而影響觀察結果, 故本試驗將酵素活性相對值 ≥ 2 , 亦即在4小時內, 可水解反應基質達

5 nanomoles以上之酵素以“+”表示, 顯示各菌株間各種酵素存缺之差異如表三:

由表三可知, 香菇菌之胞外酵素幾乎都含有Esterase (3), Esterase Lipase (4)及Phosphatase acid (11)等三種酵素, 此等將可供為以同功酶鑑定品系之研究對象; 而以API-ZYM 酵素分析系統鑑定品系間的差異, 則必需以Naphthol-AS-B1-Phosphohydrolase(12), α -galactosidase (13), β -galactosidase (14), β -glucuronidase (15), β -glucosidase (17)及N-acetyl- β -glucosaminidase (18)等六種酵素為主要依據。

2. 香菇菌株間之酵素系統差異與類緣關係

由國內外收集之三十七株香菇菌, 經API-ZYM 酵素系統分析結果, 依各菌株所含Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase (12), α -galactosidase (13), β -galactosidase (14), β -glucuronidase (15), β -glucosidase (17)及N-acetyl- β -glucosaminidase(18)等酵素之差異, 可歸納為十九個品系(如圖一), 其中有單一菌株為一品系者。亦有多數菌株同歸於一品系者。由此可推知API-ZYM 酵素分析系統確有菌株品系鑑定及類緣關係探求之功能; 亦可依各菌株酵素系統之完整性供為菌種篩選之參考。

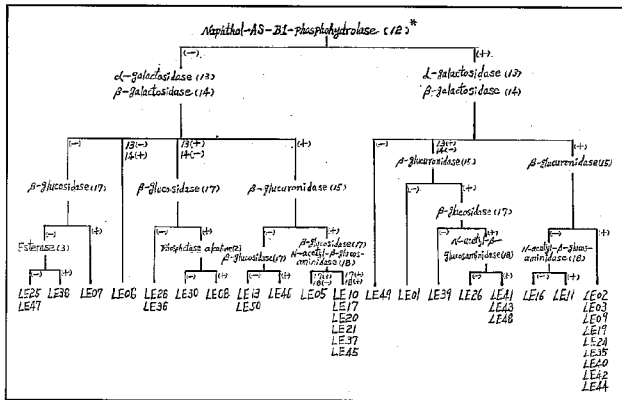


圖1 香菇菌株API-ZYM酵素系統之類緣關係
 Fig 1. Classification of *Lentinus edodes* by the API-ZYM Enzyme Testing System.

* API-ZYM 酵素編號

四、結 論

香菇栽培係一種生物生產事業，因此，菌種優劣對產業經營成功與否之關係至為密切；為再創本省香菇栽培業之蓬勃發展，尋求可靠而客觀之菌株品系鑑定方法，建立菌種註冊管理制度，以鼓勵菌種商培育優良菌種，誠為當務之急。根據生化反應原理設計的API-ZYM酵素分析系統，依本試驗結果顯示，確實不失為迅速客觀而便捷的香菇菌品系鑑定及菌種篩選之方法；惟該系統係採微量半定量(Semi-quantitative micro-method)設計，測試結果為相對性而非絕對性，故其可靠性有待後續計畫之同功酶分析及交配試驗相印證。

致 謝

本研究承行政院國家科學委員會經費補助，編號NSC-77-0409-B-054-16，特此致謝。

引用文獻

許瑞祥、王西華 1986. 利用API-ZYM酵素分析系統進行靈芝屬菌株分類之研究 中國農業化學會誌Vol.24; No.2,103-109.

Anon. Release 1980. The standard of classification. Shiitake-mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. seed and Seedlings Division, Agricultural Production Bureau, Ministry of Agri-

culture, Forestry and Fisheries, Tokyo.

Bridge, P.D. and D.L. Hawkworth. 1984. The API-ZYM enzyme Testing System as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. Microbiological Sciences. 1(9):232-234.

May, B. and D.J. Royle. 1981. Application of the electrophoretic methodology to the elucidation of genetic life histories of edible mushrooms. Mushroom science XI:799-817.

Normore, W.M. 1973. Guanine plus cytosine (GC) composition of the DNA of bacteria, fungi, algae and protozoa. In CRC Handbook of Microbiology, Vol. II. Microbial composition, pp.585-740. Edited by A.L. Laskin & H.A. Lechevalier. Cleveland: CRC press.

Royle, Daniel J., M.C. Spear and Bernie May. 1983. Cell line authentication and genetic relatedness of lines of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. J. Gen. Appl. Microbiol. 29:205-216.

Taquchi, M., M. Tsukiji and T. Tsuchiya. 1979. Rapid identification yeast by serological method: A combined serological and biological method. Sabouraudia 17(3):185-192.

Toyomasu, T. and A. Zennyozzi. 1981. On the application of isozyme electrophoresis to identification of strains in *Lentinus edodes* (Shiitake). Mushroom Science XI:675-684.