

文章编号:1673-1689(2006)06-0049-05

美味牛肝菌胞外多糖高产菌株的诱变选育

邓百万, 陈文强

(陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001)

摘要: 对美味牛肝菌胞外多糖的高产菌株进行了诱变选育。结果表明,美味牛肝菌原生质体制备的最佳条件是56 h菌龄的菌丝体,酶解温度31~35℃,酶解时间2 h,2%纤维素酶和蜗牛酶体积比1:1,稳渗剂0.010 92 g/mL的甘露醇;原生质体产量是 3.71×10^5 个/mL,再生率是7.32%;15 W紫外灯30 cm处照射时间6 min,对原生质体进行诱变处理。选育出一株胞外多糖产量比原始菌株高30.40%的菌株。

关键词: 美味牛肝菌;诱变选育;胞外多糖;原生质体

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Screening of High Exopolysaccharide Yield Strain of *Boletus edulis* by UV Ray

DENG Bai-wan, CHEN Wen-qiang

(Shanxi Key Laboratory of Bio-Resources, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: To enhance the exopolysaccharide production by *Boletus edulis*, the strain was mutagenized by using UV-irradiation was performed, and the conditions for its protoplast preparation and regeneration of the mycelium incubation time, enzyme concentration, enzyme temperature, enzyme time, and osmotic stabilizer were examined. The results showed that the mycelia incubated for 56 h were most suitable for protoplast release. The mixture solution of 1% fiber enzyme/1% snail enzyme and 0.010 92 g/mL mannitol was the most effective osmotic stabilizer and was most favorable for protoplast preparation. The suitable incubation temperature and time for the release of protoplast was 30~35℃ and 2 h. With the optimum conditions, the protoplasts and the regeneration rate was 3.71×10^5 and 7.32%, respectively. Compared with that of parent strain, the yield of exopolysaccharide production by mutant strains increase 30.4%.

Key words: *Boletus edulis*; exopolysaccharides; protoplast; mutagenesis

美味牛肝菌(*Boletus edulis*)俗称大脚菇,属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、牛肝菌科、牛肝菌属。其子实体菌盖呈扁平球形,生于松树、栎等针叶林

和混交林地上,单生或群生,常与栎树和松树的树根形成菌根。该菌菌体较大,肉肥厚,柄粗壮,食味香甜可口,营养丰富,是一种食药价值很高的真

收稿日期:2006-01-03; 修回日期:2006-03-25.

基金项目:陕西省教育厅专项科研项目(99JK109).

作者简介:邓百万(1963-),男,陕西眉县人,教授,理学硕士.

菌。临床上常用来治疗腰腿疼痛,手足麻木,筋骨不舒和四肢抽搐,还可用以治疗妇女白带症,不育症等^[1]。据报道^[1-3],美味牛肝菌含20多种氨基酸,其中有人体必需的异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸等多种氨基酸;还含多种维生素、矿物质和多糖,具有协调内分泌系统、神经系统、提高人体免疫力以及显著的抗癌作用。该菌子实体的水提取活性物质(多糖),对小白鼠肉瘤5-180的抑制率为100%,对艾氏瘤的抑制率为90%。美味牛肝菌为菌根菌,目前仍不能进行人工栽培,液体发酵生产胞外多糖是发展方向。作者对美味牛肝菌原生质体的制备、再生、紫外线诱变和初选高产多糖菌株进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 供试材料 美味牛肝菌由陕西省资源生物重点实验室食药菌种保藏中心提供;纤维素酶由上海双向西巴斯科技发展有限公司提供;蜗牛酶由北京百泰生化技术公司提供。

1.1.2 实验设备 离心机、振荡培养箱、人工气候箱、冰箱、超净工作台、高压灭菌锅。

1.1.3 培养基 母种培养基:葡萄糖2 g/dL,马铃薯20 g/dL, KH_2PO_4 0.5 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/dL, VB₁ 0.0001 g/dL,琼脂1.8 g/dL;再生培养基:母种培养基+浓度为0.6 mol/L的甘露醇稳渗剂;发酵培养基:马铃薯10 g/dL,蔗糖2%,豆饼粉0.6 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, CaCO_3 0.2 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dL, pH 5.4~5.8。

1.1.4 酶液配制 用0.010 92 g/mL的甘露醇分别配置10 g/dL纤维素酶和10 g/dL蜗牛酶的母液,抽提除菌后备用。

1.2 实验方法

1.2.1 原生质体制备 参见文献[4-8,12,13]。

1) 菌种活化培养:配制母种培养基,分装试管,于121.3℃灭菌30 min,放置斜面,接种,于28℃下活化培养7 d,待菌丝长满斜面。

2) 菌龄试验:制备液体培养基,分装于三角瓶中,于121.3℃灭菌30 min,冷却后接活化菌种,静置培养24 h后于28℃振荡培养5 d,制备的液体菌种做如下处理:分别接入新鲜液体培养基中,于28℃培养24、36、48、56、72 h,再用100目铜网过滤收集菌丝体,无菌水冲洗用0.1 mol/L Tris—0.1 mol/L EDTA冲洗,用0.1 mol/L Tris—0.1 mol/L EDTA配制0.2%巯基乙醇,30℃振荡处理30

min,用0.010 92 g/mL甘露醇溶液冲洗→2 000 r/min离心5 min,收集菌丝体→称取1 g菌丝体加4 mL 2%纤维素酶+2%蜗牛酶溶液,30℃振荡2 h,酶解液离心(500 r/min),5 min后弃掉未被酶解的菌丝体→4 000 r/min离心5 min,获得原生质体用稳渗剂制成原生质体悬浮液,血球计数板计数。

3) 酶浓度试验:蜗牛酶、纤维素酶浓度分别为1、1.5、2、2.5、3 g/dL,取培养56 h的菌丝体,进行酶解处理,操作步骤同(2),血球计数板计数。

4) 酶解时间试验:取培养56 h的菌丝体,用2 g/dL纤维素酶+2 g/dL蜗牛酶溶液分别处理1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 h,操作步骤同菌龄试验,血球计数板计数。

5) 酶解温度试验:取培养56 h的菌丝体,用2 g/dL纤维素酶+2 g/dL蜗牛酶溶液分别在25、27、29、31、33、35、37℃下进行酶解处理,操作步骤同菌龄试验,血球计数板计数。

1.2.2 原生质体再生 将制备的原生质体悬浮液分别用液体再生培养基和无菌稳渗剂稀释,28℃预培养24 h,取0.2 mL涂布于再生培养基上,每皿原生质体数达到 10^4 个/mL,28℃培养10 d,观察平皿中的再生菌落数,计算再生率。

1.2.3 诱变育种

1) 诱变处理:取5 mL稀释至一定浓度的原生质体悬浮液,置于直径为6 cm的培养皿中,无盖并距15 W紫外灯30 cm处分别照射0、2、4、6、8、10、15、20 min,照射过程振荡搅拌,然后于28℃下避光培养^[10]。

2) 变异菌株筛选:挑取紫外线诱变后直径大、菌丝生长茂盛的单菌落,接种到综合马铃薯培养基中,28℃培养7 d后,比较各诱变菌株的生长速度。筛选出的诱变菌株经液体发酵培养后,测定各诱变菌株胞外多糖的产量^[11]。

1.2.4 分析方法

1) 胞外多糖的提取:收集发酵液,3 500 r/min下离心20 min,收集上清液并浓缩,加入3倍体积95%酒精,4℃沉淀48 h,3 500 r/min离心20 min,收集粗多糖,烘干测定。

2) 多糖的测定:采用苯酚—硫酸法^[9]。

2 结果与分析

2.1 原生质体制备

2.1.1 菌龄对原生质体产率的影响 活化后的美味牛肝菌分别接入新鲜液体培养基中,28℃培养24、36、48、56、72 h,分别过滤收集菌丝体进行酶解,

细胞计数,结果见表 1。

结果表明,菌龄对原生质体产率的影响明显,随着培养时间不同,美味牛肝菌原生质体产率差异较大。当菌龄为 56 h 时,原生质体数量达到 3.72×10^5 个/mL。在原生质体制备过程中,一般以对数生长期前期的幼嫩菌丝体制备原生质体效果最好,因此确定 56 h 为美味牛肝菌菌丝酶解的最适菌龄。

表 1 菌龄对原生质体产率的影响
Tab. 1 Effect of hyphase age on the released protoplast

菌龄/h	原生质体产率/(个/mL)
24	1.28×10^5
36	2.06×10^5
48	2.97×10^5
56	3.72×10^5
72	3.69×10^5

2.1.2 酶液质量浓度对原生质体产率的影响 蜗牛酶、纤维素酶的质量浓度分别是 1,1.5,2,2.5,3 g/dL,按体积比 1 : 1 混合,取培养 56 h 的美味牛肝菌菌丝体,进行酶解处理,细胞计数,结果见表 2。

表 2 酶液质量浓度对原生质体产率的影响
Tab. 2 Effect of enzyme concentration on the released protoplast

酶液质量浓度/(g/dL)	原生质体产率/(个/mL)
1	2.17×10^5
1.5	3.48×10^5
2	3.56×10^5
2.5	3.62×10^5
3	3.67×10^5

结果表明,酶液质量浓度对原生质体产率的影响明显,由纤维素酶和蜗牛酶组合而成的混合酶,在酶解菌丝时,随酶质量浓度的增加,原生质体产率呈增加趋势。当酶质量浓度大于 2 g/dL 时,原生质体产率增加缓慢,考虑到经济因素,确定 2.0 g/dL 酶液质量浓度(纤维素酶和蜗牛酶体积比为 1 : 1)为美味牛肝菌原生质体酶解的最适浓度。

2.1.3 酶解时间对原生质体产率的影响 取培养 56 h 的菌丝体,由 2 g/dL 纤维素酶和 2 g/dL 蜗牛酶组成的混合酶,分别在不同时间进行酶解,细胞计数,结果见表 3。

表 3 结果表明,酶解时间对原生质体产率的影响较明显,随酶解时间的延长,原生质体数目呈增加趋势,2 h 后达到 3.50×10^5 个/mL。但酶解时间

大于 2 h 时,原生质体产率增加缓慢;并且酶解时间的延长会影响原生质体的活力。确定 2 h 为美味牛肝菌原生质体酶解的最适时间。

表 3 酶解时间对原生质体产率的影响
Tab. 3 Effect of enzyme time on the preparation of the protoplast

酶解时间/h	原生质体产率/(个/mL)
1	1.36×10^5
1.5	1.83×10^5
2	3.50×10^5
2.5	3.58×10^5
3	3.63×10^5
3.5	3.65×10^5
4	3.64×10^5

2.1.4 酶解温度对原生质体产率的影响 取培养 56 h 的菌丝体,用 2 g/dL 纤维素酶+2 g/dL 蜗牛酶溶液组成的混合酶,分别在不同温度下进行酶解 2 h 处理,细胞计数,结果见表 4。

表 4 酶解温度对原生质体产率的影响
Tab. 4 Effect of enzyme temperature on the released protoplast

酶解温度/℃	原生质体产率/(个/mL)
25	1.83×10^5
27	2.67×10^5
29	3.13×10^5
31	3.46×10^5
33	3.55×10^5
35	3.61×10^5
37	3.68×10^5

结果表明,酶解温度对原生质体产率的影响明显,当酶解温度低于 30 ℃ 时,美味牛肝菌原生质体产量随温度的升高增加明显,当酶解温度大于 31 ℃ 时,原生质体产量增加缓慢。综合考虑,确定 31~35 ℃ 为美味牛肝菌原生质体酶解的最适温度范围。

2.2 原生质体再生

以质量浓度为 0.010 92 g/mL 甘露醇作为渗透压稳定剂,在 31 ℃、pH 自然的条件下,用纤维素酶 2 g/dL+蜗牛酶 2 g/dL 的混合酶对培养 56 h 的美味牛肝菌菌丝体酶解 2 h,原生质体的数目可达到 3.71×10^5 个/mL。28 ℃ 进行再生培养,再生率为 7.32%。

再生率=(培养皿中再生出的单菌落个数/($0.2 \times 3.71 \times 10^4$)个/mL) $\times 100\%$

2.3 诱变育种

2.3.1 诱变剂量的确定 取稀释至一定浓度的美味牛肝菌原生质体悬浮液置于培养皿中,无盖并距15 W紫外灯30 cm处照射处理,涂平板,28℃暗培养。根据再生率换算出杀菌率,结果见表5。

表5 紫外线照射时间对原生质体再生率的影响

Tab. 5 Effect of UV irradiation time on the regeneration rate of protoplasts

时间/min	杀菌率/%
0	0
2	1.52
4	20.00
6	66.25
8	78.33
10	80.55
15	93.89
20	97.07

杀菌率=((紫外线处理0 min时原生质体再生率-紫外线处理t min时原生质体再生率)÷紫外线处理0 min时原生质体再生率) $\times 100\%$

表5结果表明,随紫外线照射时间的延长,杀菌率明显提高。根据微生物诱变育种的原理,用紫外线作诱变剂时,一般采用杀菌率30%~70%的相对剂量为合适剂量^[5]。因此,确定诱变剂量为置于15 W紫外灯30 cm处照射6 min。

2.3.2 诱变处理 取5 mL稀释至 2.0×10^5 个/mL的美味牛肝菌原生质体悬浮液,置于培养皿中,无盖并距15 W紫外灯30 cm处照射处理6 min,涂平板,28℃暗培养。每皿选出20个再生菌落,分别接种试管,编号进行筛选。

2.3.3 变异株筛选 将诱变再生的菌落分别接种在综合马铃薯培养基平板上,28℃培养,测定生长速度。挑取生长状况稳定,单菌落直径大、菌丝生长茂盛和生长速度快的菌株10株。对初选的10个菌株进行3次传代培养,在马铃薯10 g/dL,蔗糖2 g/dL,豆饼粉0.6 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dL, CaCO_3 0.2 g/dL发酵培养基上;初始pH 5.4~5.8,振荡速度180~220 r/min,培养温度28℃,装液量60%下进行多糖发酵试验,测定其粗多糖产量,从中复筛选出遗传性状稳定且具有高产多糖的菌株,结果见表6。

表6 Be-0 诱变菌株液体发酵产胞外多糖情况

Tab. 6 Exopolysaccharide production by mutants Be-0

菌株编号	胞外多糖质量浓度/(g/L)
Be-0	11.38
Be-1	11.27
Be-2	9.09
Be-3	12.78
Be-4	11.81
Be-5	12.23
Be-6	13.99
Be-7	14.84
Be-8	11.91
Be-9	11.54
Be-10	10.12

结果表明,与原始菌株Be-0相比,诱变后的美味牛肝菌菌株多糖质量浓度均有较大变化,大部分菌株多糖含量比原始菌株高。Be-3、Be-6和Be-7菌株胞外多糖产量较高,分别是12.78、13.99、14.84 g/L。经原生质体再生的Be-7比出发菌株Be-0优良,菌丝体生长快,胞外多糖含量比Be-0高30.40%。对Be-7菌株进行一年多次平板培养和发酵试验,遗传性状表现稳定。

3 结论

原生质体制备是菌种选育及遗传研究的一个重要方面。影响原生质体产生的因素较多,包括菌龄、酶解时间和温度、酶的浓度、渗透压稳定剂的选择等。本研究结果表明,美味牛肝菌原生质体的最佳制备条件是:培养56 h的菌丝和2 g/dL纤维素酶+2 g/dL蜗牛酶,以质量浓度为0.010 92 g/mL甘露醇作为稳定剂,在31℃下酶解2 h,原生质体的数目可达 3.71×10^5 个/mL,再生率为7.32%。美味牛肝菌原生质体经紫外线照射处理后,再生率有明显的致死效应,在15 W紫外灯30 cm处,照射时间为10~20 min的剂量中,原生质体的致死率为80.55%~97.07%。而综合诱变效应和获得的诱变菌株,在15 W紫外灯30 cm处,照射时间为6 min的剂量为宜。将得到的美味牛肝菌再生菌株进行平板培养,根据菌丝生长状况是否稳定、单菌落直径大小、菌丝生长是否茂盛和生长速度速度等,从中初筛出10株性状较好的变异菌株进行复筛选,经1年多次平板培养和发酵试验后综合评估,

以 Be-7 号菌株为最优, Be-7 号菌株菌丝分枝多且均匀, 生长速度快, 菌丝生长茂盛, 在 28 ℃, pH 5.4~5.8 下, 以马铃薯 10 g/dL, 蔗糖 2 g/dL, 豆饼粉

0.6 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dL, CaCO_3 0.2 g/dL 发酵培养基上进行液体发酵, 胞外多糖产量比出发菌株高 30.40%。

参考文献:

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 147.
- [2] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖研究新进展[J]. 食品与发酵, 2001, 27(7): 45—48.
- [3] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的效应[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1999, (4): 478.
- [4] 谭琦, 潘迎捷, 黄为一. 中国香菇育种的发展历程[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 48—52.
- [5] 戴秉丽. 原生质体技术在食用菌育种中的应用研究[J]. 中国食用菌, 1995, 14(5): 15—16.
- [6] 李刚, 李宝健. 灵芝原生质体分离与再生研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 79—88.
- [7] 刘士旺, 梁宗琦, 刘爱英. 羊肚菌原生质体制备及其再生[J]. 西南农业学报, 1997, 10(4): 75—80.
- [8] 于彦春, 王玉, 李玉祥. 榆黄蘑原生质体分离和再生的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(2): 26—29.
- [9] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编. 食物营养测定法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [10] 张吉福, 蔡同一, 郭顺星. 灵芝原生质体再生和诱变菌株的培养特性及多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(1): 12—13.
- [11] 金玲, 武艳霞, 周宗俊, 等. 原生质体辐射诱变培育金针菇新菌株[J]. 园艺学报, 2000, 27: 65—66.
- [12] Fevre M, Girard V, Nodet P. Biochemistry of cell walls and membrane in fung[M]. Berlin: Springer Press, 1990. 12—14.
- [13] Concepcion G M. Morphological and ultrastructural studies on protoplast production and reversion of the high *Basidiomycete garicus bisporus*[J]. *Current Microbiol*, 1991, 22: 191—194.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第 17 页)

- [8] Gökmen V, Acar J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 730: 53—58.
- [9] Chu F S, Lau H P, Fan T S, et al. Ethylenediamine modified bovine serum albumin as protein carrier in the production of antibody against mycotoxins[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 55: 73—78.
- [10] Sinha R C, Savard M E, Lau R. Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 1740—1744.
- [11] McElroy L J, Weiss C M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin himeglutamate [J]. *Can J Microbiol*, 1993, 39: 861—863.
- [12] Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin N-acetylcysteine and glutathione adducts[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 373—381.
- [13] Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin adduct structures and reaction pathways with 4-Bromothiophenol and other model nucleophiles [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 363—372.
- [14] Rychlik M. Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20(9): 829—837.
- [15] Morgavi D P, Boudra H, Jouany J P, et al. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-Containing reducing agents[J]. *J Agric And Food Chemistry*, 2003, 51: 6906—6910.
- [16] Alves I, Oliveira N C, Laires A, et al. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity [J]. *Mutagenesis*, 2000, 15: 229—234.
- [17] Sheu F, Lee O, Shyu Y T. The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1999, 7(1): 65—72.

(责任编辑: 朱明)