

阿魏菇多糖高产菌株筛选的离子束诱变和 复合诱变对比研究

王连峰 陈恒雷 张 军 曾宪贤

(新疆大学物理学院离子束生物工程中心 乌鲁木齐 830008)

摘要 为筛选出阿魏菇菌丝体多糖高产菌株,本文进行了阿魏菇多糖高产菌株筛选的离子束诱变和复合诱变对比研究。尝试用打散的阿魏菇菌丝体为靶材,以离子束注入为诱变手段,通过营养缺陷型初筛和摇瓶发酵复筛,获得了2株阿魏菇多糖高产菌株 PFPH-1 和 PFPH-2。其菌丝体多糖产量分别达到 551.80 mg/L 和 659.46mg/L,比出发菌株分别提高了 46.55%和 75.14%。再分别以 PFPH-1 和 PFPH-2 为出发菌株,用紫外线和氯化锂进行复合诱变处理,通过高通量初筛和摇瓶发酵复筛,结果发现,菌株 1、9 和 10 号比其出发菌株 PFPH-1 的多糖产量分别减少了 27%、38%和 37%;菌株 17 号比其出发菌株 PFPH-2 的多糖产量减少了 28%。在本研究中,紫外线和氯化锂的复合诱变表现出了一定的负效应。

关键词 阿魏菇,多糖,复合诱变,比较

中图分类号 S335.2+1, S335.3

阿魏菇(*Pleurotus ferulae* Lenzi)又名阿魏侧耳,阿魏蘑,具有很高的营养价值和药用价值^[1]。其子实体菌肉肥厚,质地脆嫩,柔润可口,味道鲜美,被誉为“草原上的牛肚菌”、“侧耳属中最具有烹饪价值的一种”,深受中高档宾馆,酒店的欢迎^[2]。阿魏菇中蛋白质含量占子实体干重的 20%,并含有 17 种氨基酸、多种维生素、不饱和脂肪酸和微量元素等^[3-5]。其生物活性有效组分中真菌多糖含量很高,许多研究表明,阿魏菇多糖具有抗肿瘤、抗疲劳、抗氧化和延缓衰老等功效^[6],具有很高的开发价值。

为了筛选阿魏菇菌丝体多糖高产菌株,本研究突破了传统的食用菌诱变育种方法,从两个方面进行了尝试:(1)常规的物理化学等诱变方法都采用分生孢子来进行诱变,本研究尝试用打散的阿魏菇菌丝体为靶材进行诱变处理。(2)改变了传统单一的诱变育种方法,尝试用离子束、紫外线和氯化锂复合诱变手段来筛选阿魏菇多糖高产菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 阿魏菇(*Pleurotus ferulae* Lenzi)菌种

由新疆离子束生物工程中心提供。1号:组织分离;2号:杂交育种;3号:杂交育种;4号:清河县栽培用高温菌种;5号:清河县野生高温菌种;6号:板房沟低温栽培种。

1.1.2 仪器 LCD-1000 型多功能离子注入机,西南核物理研究所;LRH-150B 生化培养箱,广东省医疗器械厂;LRH-250 光照培养箱,广东省医疗器械厂;ZHWY-2102 新型恒温振荡器,乌鲁木齐祥生仪器有限公司;UV-754 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;METTLER-TOLEDO 精密分析天平(万分之一),METTLER TOLEDO Group。

1.1.3 培养基及其组成 (1)基础平板培养基:玉米淀粉 1.0%,葡萄糖 2.0%,磷酸二氢钾 0.2%,硫酸镁 0.15%,琼脂 2.0%,PH 值 5.64。(2)综合平板培养基:面粉 2.0%,蔗糖 2.0%,酵母膏 0.4%,麸皮 1.5%,磷酸二氢钾 0.20%,硫酸镁 0.15%,琼脂 2.0%,pH 值 5.64。(3)筛选平板培养基:在基础平板培养基上加 0.2 mL 的 18 种氨基酸和 3 种 100μg/g 维生素 VB₁、VB₂、B₆ 溶液。(4)诱变平板培养基:在综合平板培养基中分别添加浓度 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%的氯化锂溶液。(5)液体培养基:面粉 2%,蔗糖 2%,酵母膏

新疆大学青年教师科研启动基金(070295)、国家发改委高技术产业化示范工程项目([2004]2077)资助

第一作者:王连峰,男,1983年11月出生,新疆大学物理科学与技术学院2006级在读硕士研究生,研究方向为离子束生物工程,现主要从事食用菌的离子束诱变育种研究

通讯联系人:张 军, E-mail: zhj@xju.edu.cn

收稿日期:初稿 2008-10-06, 修回 2008-11-25

0.4%, 麸皮 1.5%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.15%。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 试管培养:从菌种斜面挑取一定量新生菌丝接于装有 10 mL 液体培养基的试管(35mL)中,在 25℃ 恒温水浴中振荡培养。摇瓶培养:从菌种斜面挑取一定量新生菌丝体接于装有 100mL 液体培养基的三角瓶(250 mL)中,以 200r/min 的恒温(25℃)摇床振荡培养。

1.2.2 诱变方法 从自然筛选获得的出发菌株平板上,用无菌接种钩挑取一定量外缘新生菌丝接入装有玻璃珠和 30 mL 无菌水的锥形瓶(150 mL),将锥形瓶置于 250 r/min 摇床,菌丝打散,用双层生宣纸加单层脱脂棉过滤制备菌丝体悬液。

用 20%的脱脂奶作为保护剂,用移液枪吸取 0.2mL 菌丝体悬浮液,涂于无菌空白培养皿上,置于超净工作台风干制成菌膜后再置于 LCD-1000 型多功能离子注入机的小真空室。将能量为 15 keV、剂量为 $1.5 \times 10^{15} \sim 1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 的 N^+ 离子束,在 $2.5 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 的真空状态下,以每次 5 s、间隔 10 s 的脉冲方式注入菌膜。处理后的菌丝体转接到综合平板培养基上恒温培养。

将离子束诱变筛选得到的多糖高产菌种进行平板等量转接,在平板正上方 30 cm 处,利用紫外线辐照,时间分别为 20、25、30、35 和 40 s,暗室静置 1 h 后(未测到异常)再参照文献后选取辐照时间为 30 s,进行后续实验。将菌悬液按照已确定的紫外线辐照时间进行处理后,转接到诱变平板培养基上恒温培养。

1.2.3 筛选方法 (1) 出发菌株的自然筛选。对实验室现有的 6 个菌种进行液体摇瓶发酵,每个菌种设 3 个重复。生长稳定后,测定菌丝球生物量和胞外总糖的浓度,确定出发菌株。(2) 离子束注入营养缺陷型初筛。将综合平板培养基上的新生菌落菌丝分别对应转接到基础平板培养基和综合平板培养基上,25℃ 恒温培养。挑选出在基础培养基上停止生长而在综合培养基上能正常生长的菌株,转接到筛选培养基上,找出营养缺陷型的菌株,以备复筛之用。(3) 离子束注入摇瓶发酵定量复筛。用无菌接种钩刮取一定量初筛菌株斜面菌丝,接于装有 100 mL 液体培养基的摇瓶(250 mL)中,用 200 r/min 的摇床恒温(25℃)培养。待菌丝体的生长进入稳定期后,测定菌丝球的生物量和多糖含量。以未经离子注入的菌种为对照,将菌丝体多糖产量提高

15%以上的菌株定为多糖高产突变菌株。(4) 紫外线和氯化锂复合诱变高通量初筛。

将诱变平板培养基上的新生菌落菌丝分别转接到装有 10 mL 液体培养基的试管中,在 25℃ 的水浴振荡器中进行培养,并以菌丝体的生物量及多糖含量为指标筛选出突变株,以备复筛之用。(5) 紫外线和氯化锂复合诱变摇瓶发酵定量复筛。方法同(3),以经离子诱变筛选获得的多糖高产菌种为对照。

1.2.4 分析方法 多糖含量=总糖含量-还原糖含量,其中总糖含量测定用苯酚-硫酸法,还原糖含量测定用 DNS 法^[7]。抽滤收集发酵液中的菌丝体,置鼓风干燥箱中,60℃ 恒温烘至恒重,称其质量。多糖产量=多糖含量×菌丝体生物量

2 结果与分析

2.1 出发菌株的选取

通过对实验室现有的 6 个菌种进行摇瓶发酵比较实验,结果发现:各菌种的菌丝球生物量和胞外总糖的含量之间有一定的相关性。菌丝球生物量较多的菌种其摇瓶发酵胞外总糖含量较低;反之,菌丝球生物量较少的菌种其摇瓶发酵胞外总糖含量较高。出现这一现象的原因可能是各菌种对液体培养基中添加的淀粉等多糖成分的水解和利用率有差异,有些菌种的淀粉酶活性高,淀粉的水解速度快,宏观表现为菌丝球生物量多、胞外总糖浓度低,而有些菌种则恰恰相反。6 个菌种的摇瓶发酵菌丝球生物量和胞外总糖浓度如图 1,我们选取菌丝球生物量最大、胞外总糖浓度最低的 1 号菌种为诱变的出发菌株。

2.2 离子束诱变筛选实验结果

2.2.1 营养缺陷型初筛实验结果 将在基础培养基上停止生长而在综合培养基上能正常生长的菌株 PFPH-1 和 PFPH-2 菌丝体分别转接到筛选培养基上恒温培养(见图 2)。从图 2 中可以看到,在加了苯丙氨酸 Phe、丝氨酸 Ser、赖氨酸 Lys 及维生素 B₆ 的筛选培养基上,菌株 PFPH-1 菌丝生长正常,可以确定该突变株为苯丙氨酸、丝氨酸、赖氨酸及维生素 B₆ 营养缺陷型突变株;在加了赖氨酸 Lys 及维生素 B₆ 的筛选培养基上,菌株 PFPH-2 菌丝生长正常,可以确定该突变株为赖氨酸及维生素 B₆ 营养缺陷型突变株。

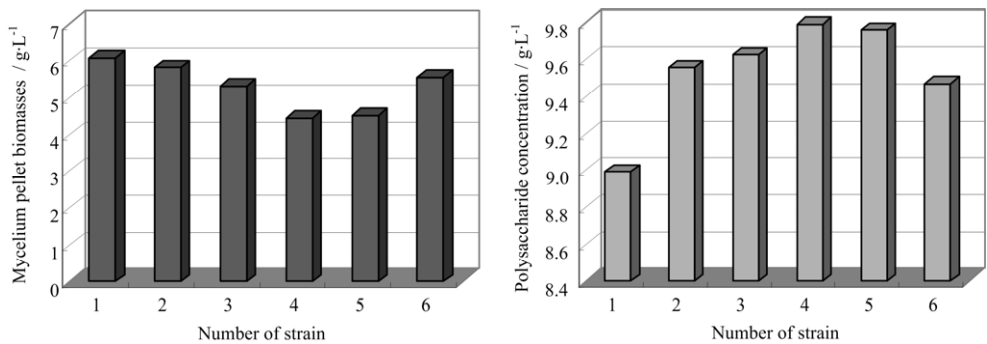


Fig.1 The shake-flask fermentation mycelium pellet biomasses and extracellular polysaccharide concentrations of 6 strains

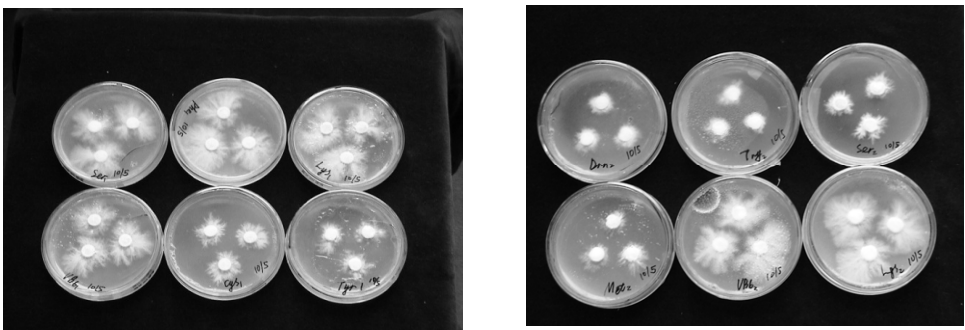


Fig.2 The plate cultivation screening of auxotrophic strains PFPH-1 and PFPH-2

2.2.2 摇瓶发酵复筛实验结果 将通过初筛获得的营养缺陷型突变菌株 PFPH-1 和 PFPH-2 菌丝体进行摇瓶发酵比较实验。以 1 号菌种为对照，定量检测其菌丝体生物量和菌丝体胞内多糖的含量。从表 1 可以发现 PFPH-1 和 PFPH-2 菌丝体生物量分别比出

发菌株 1 号提高了 39.88%和 51.84%，其菌丝体多糖产量分别达到 551.80 mg/L 和 659.46 mg/L，与出发菌株 376.53 mg/L 相比分别提高了 46.55%和 75.14%，这两株营养缺陷型突变株均为多糖高产菌株。

Table 1 The quantitative screening result of mutants shake-flask fermentation

Number of strain	1	PFPH-1	PFPH-2
Mycelium pellet biomasses /g·L ⁻¹	10.03	14.03	15.23
Cellular polysaccharide /mg·g ⁻¹	37.54	39.33	43.30
Yield of polysaccharide /mg·L ⁻¹	376.53	551.80	659.46

2.3 紫外线和氯化锂复合诱变筛选结果

2.3.1 高通量初筛实验结果 统计诱变平板培养基上长出的新生单菌落发现，诱变平板培养基中氯化锂浓度越高，长出的单菌落数越少，且菌落增长速度越慢。对从新生的 47 个单菌落中挑选出的 35 个独立生长且长势良好的菌落进行高通量初筛实验，转接到装液量为 10 mL、编号分别为 1~35 的试管中发酵，用苯酚浓硫酸法测定其试管发酵菌丝体胞外总糖浓度（见图 3）。

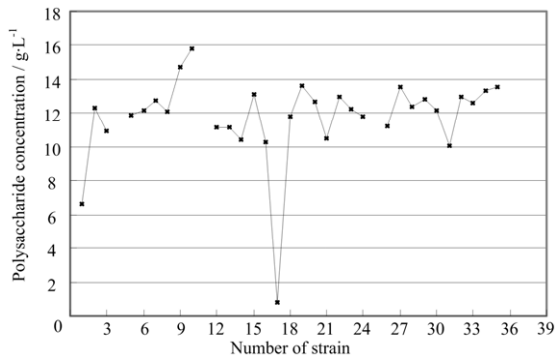


Fig.3 The extracellular polysaccharide concentrations of 35 strains tube fermentation

PFPH-1 为出发菌株复合诱变得到的 1~13 号菌株，以其试管发酵菌丝体胞外总糖浓度的平均值为对照，将浓度提高或降低 20%的菌株定为目的菌株，通过计算发现 1、9、10 号菌株为目的菌株。同理，PFPH-2 为出发菌株复合诱变得到的 14~35 号菌株，以其试管发酵菌丝体胞外总糖浓度的平均值为对照，17 号菌株为目的菌株。

2.3.2 摇瓶发酵复筛实验结果 将通过高通量初筛获得的 1、9、10、17 号菌株和出发菌株 PFPH-1 和 PFPH-2 菌丝体进行摇瓶发酵比较实验，定量检测其菌丝体生物量、菌丝体胞内多糖含量(见表 2)。结果显示菌株 1、9、10 号比其出发菌株 PFPH-1 的多糖产量分别减少了 27%、38%、37%，菌株 17 号比其出发菌株 PFPH-2 的多糖产量减少了 28%。

Table 2 The result of ultraviolet light and LiCl composite mutagenesis

Number of strain	PFPH-1	PFPH-2	1	9	10	17
Mycelium pellet biomasses /g·L ⁻¹	14.03	15.23	16.16	13.6	15.06	13.33
Cellular polysaccharide /mg·g ⁻¹	39.33	43.30	24.86	25.03	22.93	35.40
Yield of polysaccharide /mg·L ⁻¹	551.8	659.4	401.7	340.8	345.3	471.9

3 结论

(1) 以阿魏菇打散菌丝体为靶材，以离子束注入为诱变手段，通过营养缺陷型初筛和摇瓶发酵复筛，获得了 2 株阿魏菇多糖高产菌株 PFPH-1 和 PFPH-2，其菌丝体多糖产量分别达到 551.80 mg/L 和 659.46 mg/L，与出发菌株 376.53 mg/L 相比分别提高了 46.55%和 75.14%。

(2)以阿魏菇多糖高产菌株 PFPH-1 和 PFPH-2 为出发菌株，用紫外线和氯化锂进行复合诱变处理，结果发现菌株 1、9、10 号比其出发菌株 PFPH-1 的多糖含量分别减少了 27%、38%、37%，菌株 17 号比其出发菌株 PFPH-2 的多糖含量减少了 28%。

(3) 在王宝光等^[8]开展的产 1, 3 丙二醇菌株的诱变和筛选研究中，他们利用同样的方法获得了可耐高浓度 1,3 丙二醇且副产物中乙醇少的优良突变株 2 株，紫外线和氯化锂的复合诱变在该筛选中产生了一定的正向效应。而在本实验中，复合诱变选育与离子束诱变选育研究相比，不仅没有提高出发菌株的菌丝体多糖产量，反而使出发菌株的菌丝体多糖产量大幅减少，在提高多糖含量上确实产生了一定的负向效应。

参考文献

- 1 宋旭红, 张月明, 刘金宝, 等. 中国公共卫生, 2003, 19(6): 690-691
SONG Xuhong, ZHANG Yueming, LIU Jinbao, *et al.*

- Chin J Public Health, 2003, 19(6): 690-691
- 2 李敏, 杨荣成, 蔡香英, 等. 食用菌, 2003, 25(5): 16
LI Min, YANG Rongcheng, CAI Xiangying, *et al.* Edible Fungi, 2003, 25(5): 16
- 3 胡文华. 中国种业, 2002, 20(4): 37-38
HU Wenhua. China Seed Ind, 2002, 20(4): 37-38
- 4 李永泉, 吴炬, 杨全珍, 等. 西北民族大学学报, 2003, 24(4): 14-18
LI Yongquan, WU Ju, YANG Quanzhen, *et al.* J North-west Univ Nationalities, 2003, 24(4): 14-18
- 5 张桂芝, 杜鹃, 付雪燕, 等. 新疆农业大学学报, 2004, 27(1): 73-76
ZHANG Guizhi, DU Juan, FU Xueyan, *et al.* J Xinjiang Agric Univ, 2004, 27(1): 73-76
- 6 黄年来. 中国食用菌百科. 北京: 农业出版社, 1993: 114-115
HUANG Nianlai.China edible fungi cyclopedia. Beijing: Agriculture Press, 1993: 114-115
- 7 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 10-11
ZHANG Weijie. Carbohydrate complex biochemical research technique. 2nd Ed. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999: 10-11
- 8 王宝光, 刘铭, 杜晨宇, 等. 中国生物工程杂志, 2006, 26(6): 59-65
WANG Baoguang, LIU Ming, DU Zhenyu, *et al.* China Biotechnol, 2006, 26(6): 59-65

The comparative study on screening of pleurotus polysaccharide high-yield strains by use of ion beam implantation and composite mutagenesis

WANG Lianfeng CHEN Henglei ZHANG Jun ZENG Xianxian

(Ion Beam Bio-engineering Center, School of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830008, China)

ABSTRACT In order to screen pleurotus mycelium polysaccharide high-yield strains, the comparative study was made by use of ion beam implantation and composite mutagenesis before screening. The treating mycelium pellet of *pleurotus* ferulae tentatively with ion beam implantation was performed at the first. Two polysaccharide high-yield strains, PFPH-1 and PFPH-2, were selected using fermentation quantitative screening after auxotrophy qualitative primary screening. It has been found that the polysaccharide yield of the mutants is 551.80mg/L and 659.46mg/L respectively, which increases by 46.55% and 75.14% respectively compared to that of initial strain. Then PFPH-1 and PFPH-2, as the original strain, is exposed to ultraviolet light and is suffered by additive of LiCl respectively. The results indicate that the polysaccharide yield of strains 1, 9 and 10 decreases by 27%, 38% and 37% respectively compared to that of PFPH-1 meanwhile the polysaccharide yield of strain 17 decreases by 28% compared to that of PFPH-2 after high-flux qualitative primary screening. In this study, composite mutagenesis with exposure of ultraviolet and additive of lithium chloride shows some negative effects.

KEYWORDS Pleurotus polysaccharide high-yield strains, Ion beam, Composite mutagenesis

CLC S335.2+1, S335.3