

DOI:10.11937/bfyy.201521037

猴头菇菌丝体诱变提高多糖产量的培养基优化试验

吴 清 山

(滨州职业学院, 山东 滨州 256603)

摘 要:以猴头菇菌丝体为试验材料,紫外线诱变后,以菌丝体生物量和多糖含量为指标,筛选优质菌株,运用液体深层发酵的方法培养筛选出的优质菌株菌丝体,通过单因素试验和正交实验研究了规模化生产常用碳源、氮源对菌丝体生物量和多糖产量的影响。结果表明:911-3 为最佳菌株;表现优异碳源为蔗糖和高粱粉,表现优异氮源为麸皮和米糠;深层发酵的最佳碳源、氮源组合为蔗糖 0.4%、高粱粉 0.4%、麸皮 0.3%、米糠 0.3%。

关键词:猴头菇菌丝体诱变;菌丝体干重;胞内外多糖;正交实验

中图分类号:S 646.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0146-04

微生物多糖的现代研究结果表明,多糖具有广泛的生物学活性,如免疫调节、抵抗病原侵入、降低血糖、血脂浓度等^[1-2]。猴头菇作为我国传统的食、药用菌,其含有的多糖和肽类物质一直是糖生物学的研究重点,已经证明猴头菇可以提高机体免疫功能,尤其对治疗胃炎、胃溃疡等疾病,对预防胃癌、食道癌等肿瘤疾病有很好的疗效^[3]。随着人们对猴头菇营养及药用价值认识的提高,猴头菇的栽培和研究具有广阔的发展前景。对猴头菇的栽培及多糖等活性物质研究的报道很多,对猴头菇进行紫外线照射诱变后、其菌丝体生物量及胞内外多糖的变化、选育多糖产量高的菌株方法等方面的研究报道的很少。在紫外线育种过程中,最适宜的诱变对象是单细胞、单核个体,但是孢子的获得往往受季节等条件限制^[4-5],该试验创新式的对猴头菇的菌丝片段进行了紫外线照射,对照射前后菌丝体生物量,胞内、外多糖的变化进行了对比,对筛选出的多糖高产菌株进行深层发酵,对大规模生产中经常添加的碳、氮源进行了单因素试验,并通过正交实验进行了优化,得到了最佳碳、氮源配比,旨在为大规模生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为猴头 911,购自江苏高邮市食用真菌研究所。

作者简介:吴清山(1976-),男,本科,助理研究员,研究方向为食药菌驯化和栽培及技术推广等工作。E-mail:wqs9619@126.com.
收稿日期:2015-07-29

试剂:均为国产分析纯试剂。

设备:SPH-200B 恒温振荡培养箱(上海世平试验设备有限公司);电子天平 FA1004(上海天平仪器厂);DZF-6090 真空干燥箱(上海双旭电子有限公司);LXJ-68-02 型离心机(上海医分仪器制造有限公司)。

培养基:斜面培养基为常规 PDA 培养基;液体培养基为复筛液体培养基(葡萄糖 2%、玉米粉 1%、麸皮 2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%),种子培养基(黄豆粉 5.0 g/L、葡萄糖 30 g/L、酵母膏 2.0 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L);基础培养基(葡萄糖 2%、蛋白胨 0.5%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%)。

1.2 试验方法

1.2.1 紫外线育种 1)菌种活化:从保藏菌种猴头 911 挖取 0.5 cm×0.5 cm 带菌丝体的培养基,接入 PDA 培养基平板,27℃培养 6 d。2)紫外线诱变:将 PDA 培养基平板置于 15 W 紫外灯下 30 cm 处照射 10 s,27℃培养 3 d,待菌丝生长 2 mm;第 2 次照射 20 s,27℃培养 3 d,待菌丝生长 2 mm,第 3 次照射 30 s,27℃培养 3 d。选择菌落生长旺盛的尖端菌丝接入试管斜面,27℃培养满试管斜面,得到诱变菌株。3)菌株纯化:用生理盐水洗涤斜面,制成菌丝悬浮液,适当稀释后,用无菌移液管吸取稀释液置于 PDA 平板,涂布均匀。27℃培养 3 d,挑取生长迅速、菌丝粗壮浓密的菌落,转接到 PDA 斜面试管进行培养,得到纯化的诱变菌株。4)菌株筛选:初筛,测量各诱变菌株菌丝体在培养基上的生长指数;复筛,测量各诱变菌株在复筛液体培养基上的菌丝体生物量和多糖产量,筛选出优秀菌株,再进一步做培养基优化试验^[5]。

1.2.2 种子液制备 1)种子斜面培养:将复筛出来的优秀菌株接入 PDA 培养基,27℃培养 6 d;2)种子摇瓶培养:用直径 4 mm 打孔器打孔,将斜面菌丝转接到装有 150 mL 种子液体培养基的 250 mL 三角瓶中,起始 pH 6,置旋转式摇床,27℃恒温,180 r/min 培养 6 d。

1.2.3 单因素试验 分别用浓度为 2%的蔗糖、高粱粉、乳糖、玉米粉、糊精、麦芽糖代替基础培养基中的葡萄糖,接入 5%种子液,27℃恒温,180 r/min 培养 6 d,检测菌丝生物量,胞内、外多糖含量。分别用 2%豆粕粉、米糠、麸皮、硝酸钾、酵母膏、尿素代替基础培养基中的蛋白胨,接入 5%种子液,27℃恒温,180 r/min 培养 6 d,检测菌丝生物量、胞内外多糖含量。

1.2.4 正交实验 在单因素试验基础之上,考察碳、氮源试验中影响菌丝体生物量和胞内外多糖的主要影响因素的协同作用^[6-10],选取表现优异的碳源和氮源各 2 种,进行正交实验,选取最佳碳氮源组合。

1.3 项目测定

1.3.1 菌丝体干重 将发酵液 3 000 r/min 离心 20 min,将上清液取出单放,菌丝体用蒸馏水冲洗 2 次,再离心,直到上清液不带发酵液颜色为止,将上清液集中存放,菌丝体用吸水纸吸干水分后于 65℃恒温烘箱中烘干至恒重,然后用电子天平称量。

1.3.2 胞内多糖 菌丝球 3 000 r/min 离心 20 min 后,用蒸馏水冲洗 3 次,于 65℃恒温烘箱中烘干至恒重,用研钵研磨粉碎后,按照 1:9(g:v)加入蒸馏水,95℃热水浸提 3 次,每次浸提 2 h,合并 3 次浸提液,经减压浓缩至 1/5 后,加入 6 倍体积的 95%乙醇醇沉,4℃静置 24 h,得纤维状沉淀,3 000 r/min 离心 20 min,沉淀物于 65℃恒温烘箱中烘干至恒重,然后用电子天平称量,即得到菌丝体胞内多糖,然后计算胞内多糖得率。胞内多糖得率=胞内多糖/菌丝体干重。

1.3.3 胞外多糖 将发酵液经 3 000 r/min 离心 20 min 后得上清液,将上清液浓缩至 1/5 后,加入 6 倍体积的 95%乙醇,剧烈搅拌后 4℃静置 24 h,然后 3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,将沉淀物于 65℃恒温烘箱中烘干至恒重,然后用电子天平称量,即得到菌丝体胞外粗多糖。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

2.1.1 菌株初筛 将菌株 911 紫外线诱变后,挑选生长旺盛的诱变菌株各 50 株分别接入 PDA 培养基,27℃培养并测量菌丝体生长速度和浓度,观察菌落形态,进一步从诱变菌株中挑选 5 株长势优秀的进行复筛,分别标为 911-1、911-2、911-3、911-4、911-5。

2.1.2 菌株复筛 将挑选出的 5 株诱变菌株接入复筛液体培养基进行深层培养,测量菌丝体干重和胞内外多

糖含量。由表 1 可以看出,与出发菌株相比较,各诱变菌株菌丝干重变化不一;从胞内多糖产量来看,诱变菌株均有不同程度的提高;从胞外多糖产量来看,各诱变菌株也变化不一;从总多糖产量来看,诱变菌株均有不同程度的提高。综合考虑各项测量指标,筛选出 911-3 为最优菌株。

表 1 诱变菌株的指标参数

Table 1	Index parameter of mutant strain				mg/L
菌株编号 Strain No.	菌丝干重 Mycelium dry weight	胞内多糖 Intracellular polysaccharide	胞外多糖 Extracellular polysaccharide	总多糖 Total polysaccharide	
911	6.450 3	0.566 4	1.835 7	2.402 1	
911-1	9.704 0	0.761 5	1.730 0	2.491 5	
911-2	11.571 5	1.525 0	1.534 6	3.059 6	
911-3	12.031 5	1.650 2	1.615 0	3.265 2	
911-4	10.667 4	1.202 5	2.006 9	3.209 4	
911-5	8.286 5	0.953 0	1.463 1	2.416 1	

2.2 单因素试验结果

2.2.1 碳源对菌丝生物量和多糖产量的影响 对筛选出来的菌株 911-3 进行深层发酵后,不同碳源对菌丝生物量和多糖产量的影响差别较大。由表 2 可以看出,菌株 911-3 在不同碳源的菌丝生物量大小依次为糊精、蔗糖、高粱粉、麦芽糖、玉米粉、乳糖;胞内多糖的产量大小依次为高粱粉、糊精、蔗糖、玉米粉、麦芽糖、乳糖;胞外多糖的产量大小依次为麦芽糖、蔗糖、乳糖、高粱粉、玉米粉、糊精。从菌丝生物量、胞内外多糖、成本、碳源获得难易等因素综合考虑,菌株 911-3 适宜的碳源为蔗糖和高粱粉。

表 2 不同碳源对菌丝体生物量和多糖产量的影响

Table 2	Effect of different carbon sources on biomass and polysaccharide yield of mycelia				mg/L
碳源 Carbon source	菌丝干重 Mycelium dry weight	胞内多糖 Intracellular polysaccharide	胞外多糖 Extracellular polysaccharide	总多糖 Total polysaccharide	
蔗糖	10.521 6	0.774 7	0.520 8	1.295 5	
麦芽糖	8.534 7	0.238 0	0.615 7	0.853 7	
高粱粉	9.548 3	0.910 3	0.376 8	1.287 1	
玉米粉	8.449 0	0.731 4	0.342 5	1.073 9	
乳糖	6.114 5	0.140 7	0.396 0	0.536 7	
糊精	13.305 0	0.792 5	0.265 5	1.058 0	

2.2.2 氮源对菌丝生物量和多糖产量的影响 对筛选出来的菌株 911-3 进行深层发酵后,不同氮源对菌丝生物量和多糖产量的影响见表 3。可以看出,菌株 911-3 在不同氮源的菌丝生物量大小依次为酵母膏、豆粕粉、麸皮、米糠、硝酸钾、氯化钾、尿素;胞内多糖的产量大小依次为酵母膏、麸皮、米糠、硝酸钾、豆粕粉、尿素;胞外多糖的产量大小依次为麸皮、米糠、硝酸钾、豆粕粉、尿素、酵

母膏。从菌丝生物量、胞内外多糖、成本、氮源获得难易等因素综合考虑,菌株 911-3 适宜的氮源为麸皮和米糠。

表 3 不同氮源对菌丝生物量和多糖产量的影响

Table 3 Effect of different nitrogen sources on the biomass and yield of polysaccharide mg/mL

氮源 Nitrogen source	菌丝干重 Mycelium dry weight	胞内多糖 Intracellular polysaccharide	胞外多糖 Extracellular polysaccharide	总多糖 Total polysaccharide
酵母膏	14.267 0	1.067 8	0.170 5	1.238 3
豆粕粉	12.375 0	0.374 5	0.428 3	0.802 8
米糠	10.560 0	0.619 0	0.559 6	1.178 6
麸皮	11.087 4	0.882 0	0.584 0	1.466 0
硝酸钾	8.632 7	0.520 3	0.461 0	0.981 3
尿素	4.975 6	0.231 6	0.358 6	0.590 2

2.2.3 碳氮源优选正交实验结果 考虑到有些辅料既可以作为碳源也可以作为氮源,影响菌丝生物量和胞内外多糖产量的因素有一个协同作用,因此运用最佳的碳氮源进行正交实验,选用高粱粉、蔗糖、米糠、麸皮 4 个因素,设计 3 个水平,27℃ 进行深层发酵,水平分级见表 4,按照按正交表要求,共 9 个处理,试验结果见表 5、6、7。

表 4 碳氮源优选正交实验水平

Table 4 Orthogonal test results of carbon nitrogen source %

因素 Factor	高粱粉 Sorghum flour	蔗糖 Sucrose	米糠 Rice bran	麸皮 Bran
1	0.2	0.2	0.2	0.2
2	0.3	0.3	0.3	0.3
3	0.4	0.4	0.4	0.4

表 5 正交实验菌丝体生物量表现结果

Table 5 The results of the orthogonal experiment on the biomass of mycelium

试验号 Test No.	高粱粉 Sorghum flour /%	蔗糖 Sucrose /%	米糠 Rice bran /%	麸皮 Bran /%	菌丝体生物量 Mycelia biomass /(mg · mL ⁻¹)
1	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	6.618 3
2	1(0.2)	2(0.3)	2(0.3)	2(0.3)	8.701 3
3	1(0.2)	3(0.4)	3(0.4)	3(0.4)	9.274 6
4	2(0.3)	1(0.2)	2(0.3)	3(0.4)	10.387 2
5	2(0.3)	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	11.470 9
6	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	2(0.3)	12.940 0
7	3(0.4)	1(0.2)	3(0.4)	2(0.3)	12.480 6
8	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	3(0.4)	12.369 0
9	3(0.4)	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	14.378 5
I	24.394 2	29.486 1	31.927 3	32.267 7	
II	34.798 1	32.341 2	33.467 0	33.921 9	
III	39.028 1	36.393 1	33.226 1	32.030 8	
k ₁	8.131 4	9.828 7	10.642 4	10.755 9	
k ₂	11.599 4	10.780 4	11.022 3	11.307 3	
k ₃	13.009 4	12.131 0	11.075 4	10.676 9	
R	4.878 0	2.302 3	0.433 0	0.630 4	

表 6 正交实验胞内多糖表现结果

Table 6 The results of orthogonal test cell

试验号 Test No.	高粱粉 Sorghum flour /%	蔗糖 Sucrose /%	米糠 Rice bran /%	麸皮 Bran /%	胞内多糖 Intracellular polysaccharide /(mg · mL ⁻¹)
1	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	1.614 0
2	1(0.2)	2(0.3)	2(0.3)	2(0.3)	1.573 9
3	1(0.2)	3(0.4)	3(0.4)	3(0.4)	1.643 1
4	2(0.3)	1(0.2)	2(0.3)	3(0.4)	1.719 4
5	2(0.3)	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	1.656 8
6	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	2(0.3)	1.692 0
7	3(0.4)	1(0.2)	3(0.4)	2(0.3)	2.067 0
8	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	3(0.4)	2.247 3
9	3(0.4)	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	2.228 4
I	4.831 0	5.500 4	5.453 3	5.499 2	
II	5.168 2	3.430 7	5.721 7	5.332 9	
III	6.742 7	5.563 5	5.666 9	5.609 8	
k ₁	1.610 3	1.833 5	1.817 8	1.933 1	
k ₂	1.722 7	1.143 6	1.873 9	1.777 6	
k ₃	2.247 6	1.854 5	1.889 0	1.869 9	
R	0.637 3	0.710 9	0.071 2	0.155 5	

表 7 正交实验胞外多糖表现结果

Table 7 The results of orthogonal test of extracellular polysaccharide

试验号 Test No.	高粱粉 Sorghum flour /%	蔗糖 Sucrose /%	米糠 Rice bran /%	麸皮 Bran /%	胞外多糖 Extracellular polysaccharide /(mg · mL ⁻¹)
1	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)	0.538 2
2	1(0.2)	2(0.3)	2(0.3)	2(0.3)	1.415 6
3	1(0.2)	3(0.4)	3(0.4)	3(0.4)	2.407 2
4	2(0.3)	1(0.2)	2(0.3)	3(0.4)	1.333 1
5	2(0.3)	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	2.693 0
6	2(0.3)	3(0.4)	1(0.2)	2(0.3)	1.840 7
7	3(0.4)	1(0.2)	3(0.4)	2(0.3)	0.816 0
8	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	3(0.4)	1.409 0
9	3(0.4)	3(0.4)	2(0.3)	1(0.2)	0.624 6
I	4.361 0	2.687 3	3.787 9	3.855 8	
II	5.866 8	5.517 6	3.373 3	4.072 3	
III	2.849 6	4.872 5	5.916 2	5.149 3	
k ₁	1.453 7	0.895 8	1.262 6	1.285 3	
k ₂	1.955 6	1.839 2	1.124 4	1.357 4	
k ₃	0.949 9	1.624 2	1.972 1	1.716 4	
R	0.503 8	0.943 4	0.847 7	0.143 1	

由表 5 可知,各处理对菌丝体生物量的影响程度依次为高粱粉、蔗糖、麸皮、米糠,指标最高的培养基为 A₃B₃C₂D₂ 即高粱粉 0.4%、蔗糖 0.4%、米糠 0.3%、麸皮 0.3%。由表 6 可知,各处理对胞内多糖的影响程度依次为蔗糖、高粱粉、麸皮、米糠,指标最高的培养基为 A₃B₃C₂D₃ 即高粱粉 0.4%、蔗糖 0.4%、米糠 0.3%、麸皮 0.4%。由表 7 可知,各处理对胞外多糖的影响程度依次为蔗糖、米糠、高粱粉、麸皮,指标最高的培养基为 A₂B₂C₃D₃ 即高粱粉 0.3%、蔗糖 0.3%、米糠 0.4%、麸皮 0.4%。综合考虑菌丝体生物量、胞内外多糖产量以及原料成本和获得难易程度等因素,诱变猴头菌株 911-3 深层发酵培养基碳氮源组成为 A₃B₃C₂D₂ 即高粱粉 0.4%、蔗糖 0.4%、米糠 0.3%、麸皮 0.3%,由于在试验过程中未

出现此组合,因此做验证试验,得到的菌丝体生物量 14.965 0 mg/mL,胞内多糖 2.548 7 mg/mL,胞外多糖 2.846 3 mg/mL,通过验证试验证明该组合为诱变菌株深层发酵培养的最佳碳氮源组成。正交实验结果经方差分析,试验处理之间菌丝生物量有极显著差异,碳源高粱粉 $R=4.878\ 0$ 最大,说明猴头菌株深层发酵碳源对菌丝体的影响比其它因素大,菌丝体生物量对食用菌转化率有决定性影响,因此在生产中要保证碳源的充足;试验处理间胞内多糖有显著差异,碳源的影响要显著高于氮源;试验处理之间胞外多糖差异不显著,碳氮源影响变化不一,可能与胞外多糖转化过程中影响因素较多有关。

3 结论与讨论

紫外线照射菌丝体诱变育种相关报道比较少,该试验结果表明,照射前后猴头菇菌丝体生物量和胞外多糖变化不一,胞内多糖和总多糖含量均有增长,照射剂量和照射时间对指标的影响没有深入研究,需要进一步探讨。

在大规模的生产中添加辅料的目的主要是提供碳源和氮源,金属离子、维生素等物质主要靠原辅料供给就能满足生长需要,该试验主要为大规模生产提供参考依据,因此在试验中除了常用的试验材料之外、有意识的选择了高粱粉、玉米粉、豆粕粉、米糠、麸皮、尿素等低成本、易获得的碳、氮源,研究其对菌丝体生物量和胞内外多糖的影响。从试验结果看,有机的碳氮源表现比无机的要优异,复合型的农副产品比如高粱粉、玉米粉、米糠等作为碳氮源比单一的乳糖、尿素、硝酸钾表现优异,

这与大规模生产辅料的选择和添加也比较一致。

碳氮源的协同作用是食用菌研究的新型课题,该试验筛选出了高粱粉 0.4%、蔗糖 0.4%、米糠 0.3%、麸皮 0.3% 是深层发酵培养基最佳的组合,以菌丝体生物量和胞内外多糖产量为指标的前提下,这个组合的验证试验结果比较理想,可以作为多糖生产和菌丝体生产的试验依据;这个组合是否适合猴头菇以子实体产量为指标的大规模生产需要进一步研究。

参考文献

- [1] 张树海. 猴头菇多糖提取及纯化的研究[J]. 食品研究与开发, 2006(11): 103-106.
- [2] 刘维, 吴卫, 李冠, 等. 超声波法提取猴头菌丝胞内多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2008(3): 189-191.
- [3] 吴志明, 李公斌, 辛秀兰, 等. 猴头菇多糖的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2011(7): 36-38.
- [4] 肖淑霞, 黄志龙, 江枝和, 等. ^{60}Co 射线和紫外线复合辐射选育白色姬松茸新株系营养价值性状的因子分析[J]. 食药菌, 2013(2): 93-95.
- [5] 游雄, 钱秀萍, 吴丽燕, 等. 绣球菌的诱变育种和深层发酵工艺的初步研究[J]. 中国食用菌, 2006, 25(3): 41-44.
- [6] 梁海秋, 田春龙, 杨辉, 等. 液体发酵灵芝菌胞外多糖的研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 55-57.
- [7] 朱玉昌, 周大寨, 唐巧玉, 等. 富硒野生食用菌液体培养条件初步优化[J]. 中国酿造, 2009, 28(4): 61-64.
- [8] 杨德, 周明, 高虹, 等. 灵芝液体发酵培养基筛选研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18536-18538.
- [9] 刘卫红. 羊肚菌液体菌种培养基配方优化研究[J]. 农业科技通讯, 2011(11): 81-83.
- [10] 王广慧, 戴明, 魏亚冬, 等. 香菇多糖的提取工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(1): 192-194.

Medium Optimization Test of Improving Polysaccharide Yield by *Hericium mycelium* Mutation

WU Qingshan

(Binzhou Polytechnic, Binzhou, Shandong 256603)

Abstract: Taking *Hericium erinaceus* mycelium as experimental material, after ultraviolet radiation, mycelial biomass and polysaccharides content were selected as the indexes, screening good strains using submerged fermentation method for culturing and screening out the mycelium, through single factor and orthogonal test, the influence of scale commonly used in the production of carbon source and nitrogen source on the production of mycelial biomass and polysaccharides were studied. The results showed that the 911-3 was the best strain; excellent carbon source was sucrose and sorghum flour, the excellent performance of nitrogen source was wheat bran and rice bran; submerged fermentation was the best carbon source, nitrogen source combination for 0.4% of sucrose, sorghum flour 0.4%, wheat bran 0.3% of rice bran 0.3%.

Keywords: *Hericium erinaceum*; mycelium mutation; intercellulre and extracellular polysaccharide; orthogonal test