

秦巴山区香菇胞外多糖高产菌株的筛选

乔艳明¹, 陈文强^{1,2}, 邓百万^{1,2}, 程贤利³, 彭浩^{1,2}, 王玉¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001; 3. 汉中职业技术学院 药学与医学技术系, 陕西 汉中 723000)

摘要:以秦巴山区主栽香菇菌株(808[#]、66[#]、68[#])为试材,采用组织培养方法,用6种筛选培养基对其菌丝生长状况和胞外多糖产量进行了研究。结果表明:香菇66[#]菌株的菌丝在筛选培养基(葡萄糖1.0%、玉米粉2.0%、麦麸2.0%、酵母膏0.3%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、pH自然)中的生长速度为3.26 mm/d,菌丝粗壮且致密;以此培养基进行液体发酵,其菌丝球数量多,大小均匀,生物转换量为66.00 g/L,胞外多糖产量可达2.99 g/L发酵清液。

关键词:香菇;胞外多糖;筛选;液体发酵

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0137-06

香菇(*Lentinus edodes*)属担子菌纲、伞菌目、口蘑科、香菇属,又名香蕈或冬菇。现代医学研究发现,经常食用香菇有降低胆固醇、防止血管硬化、促进儿童生长发育、增强人体免疫功能和防治癌症等作用。香菇多糖为其中的主要生理活性物质,具有多种生物学功能^[1]。

国内外学者尤其是日本学者对香菇多糖药理学方面的研究相当深入,已在抗肿瘤、增强免疫力、抗辐射、抗糖尿病以及作为眼球晶体疾病的防治药理方面验证了其功效^[2-6]。近几年还发现硫酸根的引入使香菇多糖具有了治疗艾滋病的功能^[7-9]。香菇多糖多从子实体中提取,存在生产周期长、产量和提取率低等问题。利用廉价农副产品做原料,采用液体深层发酵技术大规模培养香菇菌丝体,从发酵液中提取香菇多糖已成为降低成本、提高生产效率的有效途径^[10]。目前,关于香菇胞外多糖提取的报道很多,仍然存在多糖产量低和提取费用太高等不足^[11]。因此,胞外多糖高产香菇菌株的筛选成了香菇胞外多糖生产的关键^[12-14]。

秦巴山区气候温润,非常适宜菌类生长,该地区用于栽培生产的香菇菌株多样。该研究选择3种香菇优势菌株和6种筛选培养基对香菇胞外多糖高产菌株进行筛选和发酵试验,并对发酵液中胞外多糖进行提取,旨在为秦巴山区香菇优势菌种的开发利用及胞外多糖的生产提供参考依据。

第一作者简介:乔艳明(1990-),男,硕士研究生,研究方向为微生物资源利用开发。E-mail:yanmingq1990@qq.com.

责任作者:陈文强(1956-),男,教授,现主要从事微生物资源的保护与利用等研究工作。E-mail:wengqiangc@126.com.

基金项目:陕西省“13115”科技创新工程计划资助项目(2008IDGC-04)。

收稿日期:2015-01-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试香菇808[#]、66[#]、68[#]菌株由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

综合马铃薯培养基(CPDA):马铃薯20.0%、葡萄糖2.0%、琼脂2.0%、KH₂PO₄0.3%、MgSO₄·7H₂O 0.15%、维生素B1 0.001%、pH自然。

筛选培养基:(A)玉米粉1.0%、黄豆粉2.0%、葡萄糖2.0%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、琼脂1.5%、pH自然;(B)葡萄糖1.0%、玉米粉2.0%、麦麸2.0%、酵母膏0.3%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、琼脂1.5%、pH自然;(C)马铃薯15.0%、麦芽糖1.5%、麦麸3.0%、酵母浸粉0.7%、KH₂PO₄0.3%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、琼脂1.5%、pH自然;(D)玉米粉2.0%、黄豆粉2.0%、酵母膏0.2%、蛋白胨0.3%、葡萄糖0.4%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、琼脂1.5%、pH自然;(E)玉米粉2.0%、黄豆粉2.0%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、琼脂1.5%、pH自然;(F)马铃薯10.0%、蔗糖2.0%、黄豆粉0.6%、KH₂PO₄0.3%、CaCO₃0.2%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、琼脂1.5%、pH自然。

试剂:无水乙醇、丙酮、乙醚等均为分析纯,试验用水为纯化水。

仪器:电子分析天平(美国丹佛仪器公司TB-214);电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司BSA8201);精密酸度计(上海大普仪器有限公司PHS-3C);恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司ZHWHY-B2112B);生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司SPX-250B5H-II);型低速冷冻离心机(科大创新股份有限

公司中佳分公司 KDC-2046); 双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司 SW-CJ-2F); 型立式压力蒸汽灭菌器(上海中安医疗器械厂 LDZX-50KBS); 鼓风干燥箱(上海试验仪器总厂 101A-1); 旋转蒸发器(广州仪科试验室技术有限公司 RV10)。

1.2 试验方法

1.2.1 原种的活化 取 0.5 cm² 大小的香菇菌丝点植在制备好的 CPDA 斜面培养基上, 28℃ 培养, 待菌丝长满, 4℃ 保藏备用。

1.2.2 香菇胞外多糖高产菌株的筛选 取 0.5 cm² 大小已活化的香菇菌丝点植在制备好的筛选培养基平板中央, 28℃ 倒置培养 10 d, 每 24 h 记录菌丝生长状况。每种处理做 5 个重复, 菌丝长度求平均值。

1.2.3 香菇胞外多糖的提取 配制液体发酵培养基, 取 1 cm² 大小已活化的香菇菌丝接种, 静置 24 h 后, 于 28℃、180 r/min 摇瓶发酵 10 d。将发酵液抽滤, 除去菌丝体, 浓缩发酵液至原体积的 1/5。取浓缩液 10 mL, 加无水乙醇 40 mL, 调节 pH 为 7.0, 4℃ 冰箱放置 16 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 60℃ 烘干至恒重, 用电子分析天平称重。

2 结果与分析

2.1 香菇 808[#] 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

由表 1 可知, 香菇 808[#] 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度不同, 在 A 中菌丝生长速度较快, 而在 F、B 中生长速度较慢, 在 C、D、E 中菌丝的生长速度平均值差异性不大。香菇 808[#] 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度由快到慢依次是 A>D>C>E>B>F。

表 1 香菇 808[#] 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

Table 1 Mycelial growth of *L. edodes* ('808[#]') in different screening medium

培养基编号 Medium No.	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm · d ⁻¹)					平均生长速度 Averaged growth rate /(mm · d ⁻¹)
	I	II	III	IV	V	
	A	2.80	3.50	2.90	3.10	
B	1.80	2.20	2.00	1.90	1.80	1.94
C	2.50	2.50	2.60	2.60	2.40	2.52
D	2.40	2.90	2.50	2.40	2.70	2.58
E	2.20	2.40	2.40	2.30	2.30	2.32
F	1.20	1.00	1.30	1.20	1.10	1.16
X						2.26

图 1 显示, 香菇 808[#] 接种于 A 中, 培养 10 d, 菌落直径是 76 mm, 平均生长速度为 3.06 mm/d, 菌丝较粗壮, 密度较大, 不产生色素, 13 d 可长满平板。图 2 显示, 香菇 808[#] 接种于 B 中, 培养 10 d, 菌落直径是 50 mm, 平均生长速度为 1.94 mm/d, 菌丝粗壮, 致密, 不产生色素, 20 d 可长满平板。

图 3 显示, 香菇 808[#] 接种于 C 中, 培养 10 d, 菌落直径是 60 mm, 平均生长速度为 2.52 mm/d, 菌丝粗壮, 致

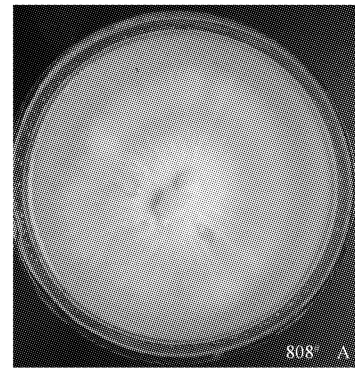


图 1 香菇 808[#] 在培养基 A 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 1 *L. edodes* ('808[#]')'s 10 days colonial morphology in screening medium A

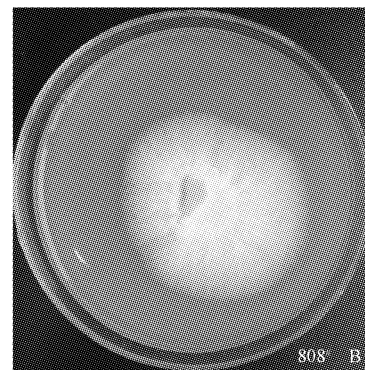


图 2 香菇 808[#] 在培养基 B 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 2 *L. edodes* ('808[#]')'s 10 days colonial morphology in screening medium B

密, 不产生色素, 16 d 可长满平板。图 4 显示, 香菇 808[#] 接种于 D 中, 培养 10 d, 菌落直径是 66 mm, 平均生长速度为 2.58 mm/d, 菌丝粗壮, 致密, 不产生色素, 15 d 可长满平板。

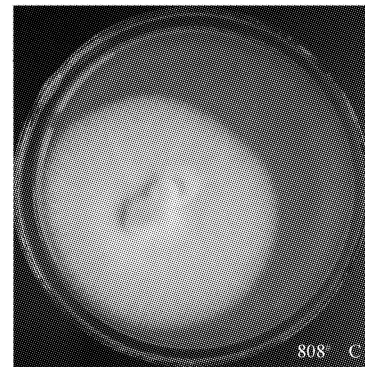


图 3 香菇 808[#] 在培养基 C 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 3 *L. edodes* ('808[#]')'s 10 days colonial morphology in screening medium C

图 5 显示, 香菇 808[#] 接种于 E 中, 培养 10 d, 菌落直径是 58 mm, 平均生长速度为 2.32 mm/d, 菌丝较粗壮, 密度较大, 不产生色素, 17 d 可长满平板。图 6 显示, 香菇 808[#] 接种于 D 中, 培养 10 d, 菌落直径是 30 mm, 平均

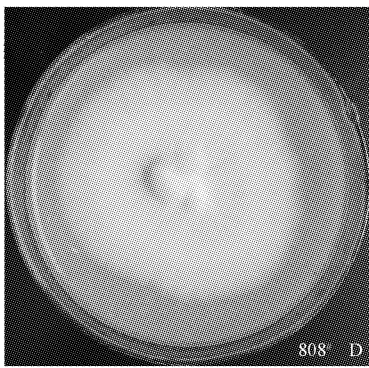


图4 香菇 808# 在培养基 D 中生长 10 d 菌落形态

Fig.4 *L. edodes* ('808#')'s 10 days colonial morphology in screening medium D



图5 香菇 808# 在培养基 E 中生长 10 d 菌落形态

Fig.5 *L. edodes* ('808#')'s 10 days colonial morphology in screening medium E

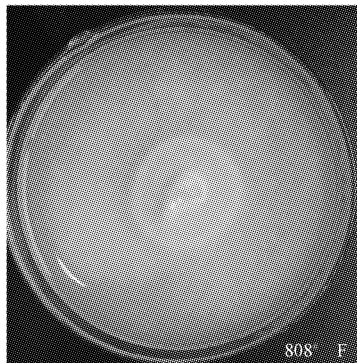


图6 香菇 808# 在培养基 F 中生长 10 d 菌落形态

Fig.6 *L. edodes* ('808#')'s 10 days colonial morphology in screening medium F

生长速度为 1.16 mm/d,菌丝不粗壮,稀疏,不产生色素,30 d 可长满平板。

2.2 香菇 66# 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

表 2 表明,香菇 66# 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度不同,在 B 中菌丝生长速度较快,而在 F 中生长速度较慢,在 A、C、D、E 中菌丝的生长速度平均值差异性不大。香菇 66# 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度由快到慢依次为 B>C>A>E>D>F。

表 2 香菇 66# 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

Table 2 Mycelial growth of *L. edodes* ('66#') in different screening medium

培养基编号 Medium No.	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm·d ⁻¹)					平均生长速度 Averaged growth rate /(mm·d ⁻¹)
	I	II	III	IV	V	
A	2.60	2.50	2.50	2.70	2.60	2.58
B	3.50	3.00	3.20	3.20	3.40	3.26
C	3.00	2.50	2.60	2.60	2.70	2.68
D	2.30	2.20	2.20	2.40	2.30	2.28
E	2.30	2.40	2.30	2.30	2.60	2.38
F	1.10	1.50	1.30	1.10	1.40	1.28
X						2.41

图 7 显示,香菇 66# 接种于 A 中,培养 10 d,菌落直径是 66 mm,平均生长速度为 2.58 mm/d,菌丝较粗壮,密度较大,不产生色素,15 d 可长满平板。图 8 显示,香菇 66# 接种于 B 中,培养 10 d,菌落直径是 80 mm,平均生长速度为 3.26 mm/d,菌丝粗壮,致密,不产生色素,10 d 可长满平板。

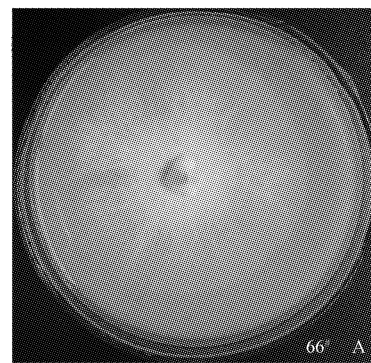


图7 香菇 66# 在培养基 A 中生长 10 d 菌落形态

Fig.7 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium A

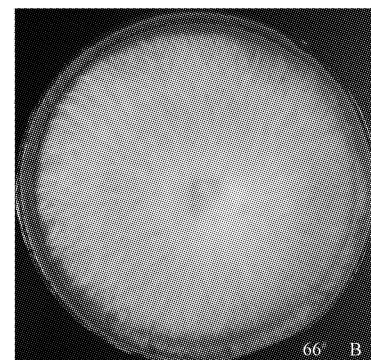


图8 香菇 66# 在培养基 B 中生长 10 d 菌落形态

Fig.8 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium B

图 9 显示,香菇 66# 接种于 C 中,培养 10 d,菌落直径是 68 mm,平均生长速度为 2.68 mm/d,菌丝粗壮,致密,不产生色素,14 d 可长满平板。图 10 显示,香菇 66# 接种于 D 中,培养 10 d,菌落直径是 58 mm,平均生长速

度为 2.28 mm/d,菌丝粗壮,致密,不产生色素,18 d 可长满平板。

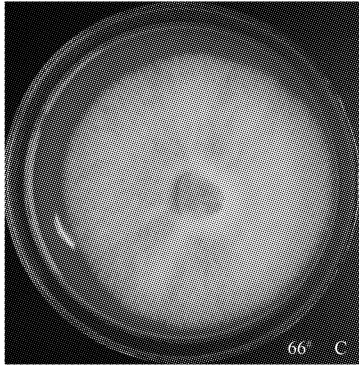


图 9 香菇 66# 在培养基 C 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 9 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium C

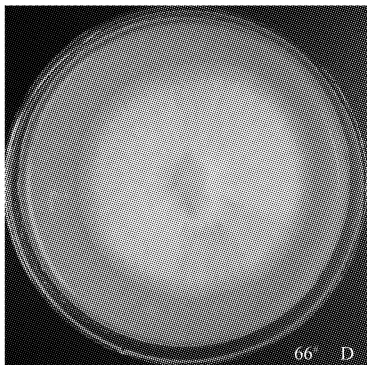


图 10 香菇 66# 在培养基 D 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 10 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium D

图 11 显示,香菇 66# 接种于 E 中,培养 10 d,菌落直径是 66 mm,平均生长速度为 2.38 mm/d,菌丝较粗壮,密度较大,不产生色素,17 d 可长满平板。图 12 显示,香菇 66# 接种于 F 中,培养 10 d,菌落直径是 36 mm,平均生长速度为 1.28 mm/d,菌丝较粗壮,密度较大,不产生色素,29 d 可长满平板。

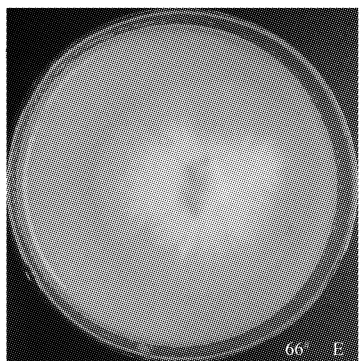


图 11 香菇 66# 在培养基 E 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 11 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium E

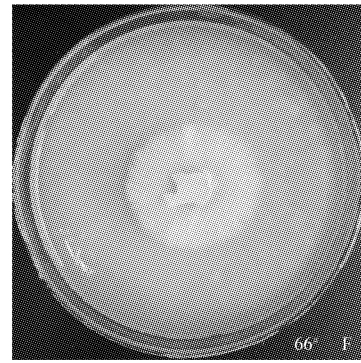


图 12 香菇 66# 在培养基 F 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 12 *L. edodes* ('66#')'s 10 days colonial morphology in screening medium F

2.3 香菇 68# 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

表 3 表明,香菇 68# 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度不同,在 B 中菌丝生长速度较快,而在 F 中生长速度较慢,在 A、C、D、E 中菌丝的生长速度平均值差异性不大。香菇 68# 菌株在 6 种筛选培养基中的生长速度由快到慢依次为 B>E>D>A>C>F。

表 3 香菇 68# 菌株在不同筛选培养基中的生长速度

Table 3 Mycelial growth of *L. edodes* ('68#') in different screening medium

培养基编号 Medium No.	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm · d ⁻¹)					平均生长速度 Averaged growth rate /(mm · d ⁻¹)
	I	II	III	IV	V	
A	1.9	1.6	1.7	1.7	1.8	1.74
B	2.3	2.1	2.1	2.4	2.2	2.22
C	1.5	1.7	1.7	1.6	1.8	1.66
D	1.8	1.8	1.9	2.0	1.8	1.86
E	1.9	1.9	1.8	2.1	2.0	1.94
F	1.5	1.3	1.4	1.5	1.3	1.40
X						1.80

图 13 显示,香菇 68# 接种于 A 中,培养 10 d,菌落直径是 44 mm,平均生长速度为 1.74 mm/d,菌丝不粗壮,稀疏,不产生色素,19 d 可长满平板。图 14 显示,香菇

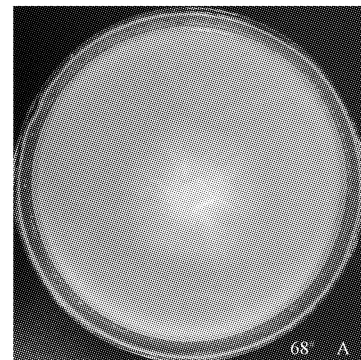


图 13 香菇 68# 在培养基 A 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 13 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium A

68# 接种于 B 中, 培养 10 d, 菌落直径为 50 mm, 平均生长速度为 2.22 mm/d, 菌丝粗壮, 密度较大, 不产生色素, 16 d 可长满平板。

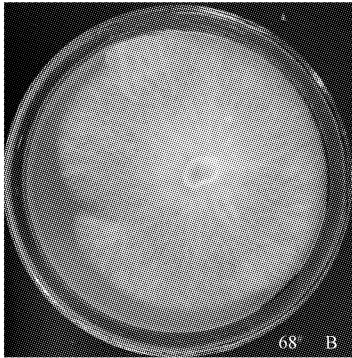


图 14 香菇 68# 在培养基 B 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 14 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium B

图 15 显示, 香菇 68# 接种于 C 中, 培养 10 d, 菌落直径是 40 mm, 平均生长速度为 1.66 mm/d, 菌丝粗壮, 致密, 不产生色素, 20 d 可长满平板。图 16 显示, 香菇 68# 接种于 D 中, 培养 10 d, 菌落直径是 50 mm, 平均生长速度为 1.86 mm/d, 菌丝粗壮, 密度较大, 不产生色素, 19 d 可长满平板。

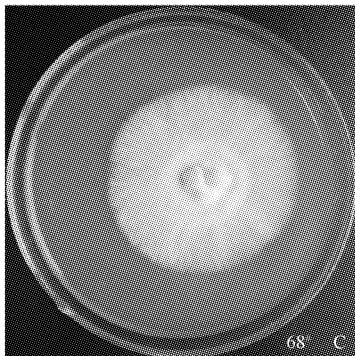


图 15 香菇 68# 在培养基 C 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 15 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium C

图 17 显示, 香菇 68# 接种于 E 中, 培养 10 d, 菌落直径是 46 mm, 平均生长速度为 1.94 mm/d, 菌丝不粗壮, 稀疏, 不产生色素, 20 d 可长满平板。图 18 显示, 香菇 68# 接种于 F 中, 培养 10 d, 菌落直径是 34 mm, 平均生长速度为 1.40 mm/d, 菌丝较粗壮, 稀疏, 不产生色素, 29 d 可长满平板。

2.4 香菇胞外多糖高产菌株的选择和发酵

选择菌落直径最大、平均生长速度最快、菌丝粗壮且致密的香菇 66# 菌株作为胞外多糖高产菌株, 以筛选培养基 B(无琼脂)作为液体发酵培养基进行摇瓶发酵。图 19 表明, 香菇 66# 接种于筛选培养基 B(无琼脂)中, 菌丝球数量多, 大小均匀, 菌丝球生物转换量可达

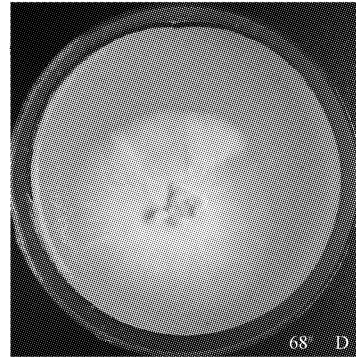


图 16 香菇 68# 在培养基 D 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 16 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium D

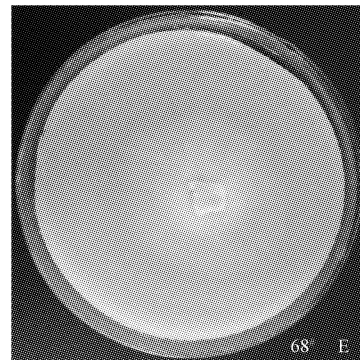


图 17 香菇 68# 在培养基 E 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 17 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium E

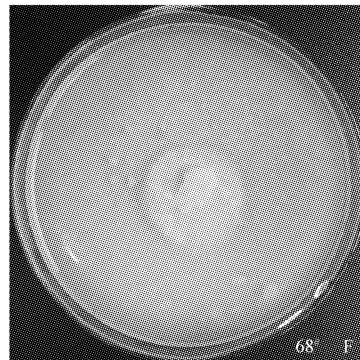


图 18 香菇 68# 在培养基 F 中生长 10 d 菌落形态
Fig. 18 *L. edodes* ('68#')'s 10 days colonial morphology in screening medium F

66.00 g/L。在液体发酵培养基中, 菌丝生物转化量越大, 胞外多糖产量越高^[15]。该试验结果表明, 香菇 66# 菌株在筛选培养基 B(无琼脂)中进行摇瓶发酵, 香菇胞外多糖产量可达 2.99 g/L 发酵清液。

3 讨论与结论

目前, 关于香菇胞外多糖提取的研究报道甚少。活泼等^[16]采用乙醇分步沉淀法得到香菇发酵液中的胞外多糖产量为 3.8 g/L; 贾淑珍^[11]采用乙醇分步沉淀法得

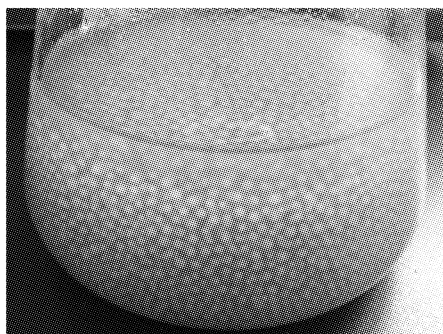


图 19 香菇 66# 在液体筛选培养基 B 中
生长 10 d 菌丝球形态

Fig. 19 *L. edodes* ('66#')'s 10 days mycelial pellets
morphology in liquid screening medium B

到香菇发酵液中胞外多糖的产量为 5.42 g/L。该研究采用一步沉淀方法对香菇胞外多糖进行提取,费时少、简单易行且成本低廉,具有推广应用价值。由于香菇菌株的差异和胞外多糖提取方法等的不同,其胞外多糖的产量差异较大。该研究中所涉及的香菇胞外多糖的最佳提取条件将另文报道。

参考文献

- [1] 韩玲. 香菇多糖的临床应用进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(2): 88-92.
[2] 杨丽梅. 香菇多糖治疗恶性肿瘤临床应用[J]. 中国民康医学, 2013, 25(20): 97-98.
[3] Yamac M, Kanb G, Zeytinoglu M, et al. Hypoglycemic effect of *Lentinus Strigosus* (Schwein.) Fr. crude exopolysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Journal of Medicinal Food, 2008, 11: 513-517.
[4] Shimizu K, Watanabe S, Matsuda K, et al. Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56: 240-244.

- [5] Lo T C, Hsu F M, Chang C A, et al. Branched α -(1,4) Glucans from *Lentinula edodes* (L10) in combination with radiation enhance cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma through the toll-like receptor 4 mediated induction of THP-1 differentiation/activation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 11997-12005.
[6] Oba K, Kobayashi M, Matsui T, et al. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer [J]. Anticancer Research, 2009, 29: 2739-2745.
[7] Rincao V P, Yamamoto K A, Ricardo, et al. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity[J]. Virology Journal, 2012, 9: 37.
[8] Jong S C, Birmingham J M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom[J]. Advances in Applied Microbiology, 1993, 39: 153-184.
[9] Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 17: 71-74.
[10] 活泼. 香菇深层发酵液和香菇子实体营养成分比较[J]. 浙江科技学院学报, 2003, 15(2): 94-96.
[11] 贾淑珍. 香菇深层发酵液中活性成分的分离提取及其应用[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2007: 1-13.
[12] 夏晓静. 香菇单核菌丝诱变杂交及多糖高产菌株的筛选[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
[13] 王淑敏, 高玉千, 戚元成, 等. 不利用香菇多糖的香菇单核菌株的选育[J]. 核农学报, 2009, 23(4): 612-616.
[14] 王淑敏. 应用代谢控制理论选育香菇多糖高产菌株的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
[15] 张新红. 关于食(药)用菌液体培养的研究[J]. 阜阳职业技术学院学报, 2005, 15(2): 7-8.
[16] 活泼, 蒋家新, 黄光荣. 香菇多糖提取工艺的研究[J]. 粮油食品科技, 2003, 11(3): 15-17.

Screening of *Lentinula edodes* with High Exopolysaccharide in Qinling-Bashan Mountainous Area

QIAO Yan-ming¹, CHEN Wen-qiang^{1,2}, DENG Bai-wan^{1,2}, CHENG Xian-li³, PENG Hao^{1,2}, WANG Yu¹

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shannxi 723001; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shannxi 723001; 3. Department of Pharmaceutical and Medical Technology, Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong, Shannxi 723000)

Abstract: Using tissue culture method, with Qinba Mountain main cultivated *Lentinula edodes* (808#, 66#, 68#) as test materials, *Lentinula edodes* with high exopolysaccharides was selected by 6 kinds of screening medium. The mycelial growth rate of *Lentinula edodes* strains and the exopolysaccharides production of *Lentinula edodes* with high exopolysaccharides were studied. The results showed that the hypha of *Lentinula edodes* (66#) was thick and dense and hypha growth rate was 3.26 mm/d in screening medium (glucose 1.0%, corn flour 2.0%, wheat bran 2.0%, yeast extract 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, pH naturally). There were many mycelia spheres to be evolved and the size of mycelia spheres was even, and the mycelia amount of biological transformation (wet weight) was up to 66.00 g/L in screening medium. The exopolysaccharides production of *Lentinula edodes* (66#) was up to 2.99 g/L.

Keywords: *Lentinula edodes*; exopolysaccharide; screening; liquid fermentation