

李莎,刘宇,马康,等.原生质体单核化技术在白灵菇菌种提纯复壮中的应用[J].江苏农业科学,2015,43(5):248-250.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.082

原生质体单核化技术在白灵菇菌种提纯复壮中的应用

李莎^{1,2},刘宇²,马康²,马元伟²,李明¹,许峰²

(1.河北农业大学园艺学院,河北保定 071000;

2.北京市农林科学院植物保护环境保护研究所/北京市食用菌工程技术研究中心,北京 100097)

摘要:为了探索原生质体单核化技术在白灵菇菌株提纯复壮中的应用,用退化的白灵菇菌株白 10 进行原生质体单核化,得到 121 个原生质体单核菌丝,通过平板对峙试验,选取 2 个菌落中间有突起的部位转接至新 PDA 平板,镜检保留有锁状联合的菌株,最后得到 1 株菌丝洁白、浓密的菌株,命名为自交 45×49。通过测定菌丝生长速度、生物量、木质纤维素降解酶的活性对复壮菌株进行评价,结果显示,自交 45×49 菌株与白 10 菌株在液体 PDB 培养基中培养 10 d 后的菌丝生物量分别为 1.58、0.90 mg/mL;一级种与二级种菌丝生长速度差异未达 0.01 显著水平;自交 45×49 菌株的漆酶活性比白 10 强 43.47%。由此证明原生质体单核化技术在白灵菇菌株的提纯复壮中应用的可行性。

关键词:菌种退化;白灵菇;原生质体单核化;提纯复壮

中图分类号: S646.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0248-02

白灵菇(*Pleurotus nebrodensis*)属于担子菌门伞菌目侧耳科侧耳属,肉质鲜美,有“素鲍鱼”的美称,但是菌种退化问题一直困扰着白灵菇的育种进程^[1]。而菌种退化导致的产量、生物学效率、商品价值降低,畸形菇数量增加,经济效益减少也制约白灵菇的工厂化发展。那么,如何对菌种进行提纯复壮成了关键问题。漆酶是含有 4 个铜的胞外氧化酶,属于铜蓝氧化酶,存在于菇、菌及植物中,可以选择性地降解木质素,而退化的菌株漆酶含量会下降;纤维素酶是一个由多种水解酶组成的复杂的酶系^[2],产生纤维素酶的菌种易退化,退化后其产酶力明显降低。本试验采用原生质体单核化技术,以白 10 作为试验材料,进行单核菌丝平板对峙试验,获得 1 株优良复壮的菌株,命名为自交 45×49。通过测定自交 45×49 和白 10 在 PDA 平板和大试管栽培料中的菌丝生长速度、生物量、漆酶和纤维素酶活力,以验证提纯复壮菌株的生长活力。

1 材料与与方法

1.1 菌种材料

本试验的白 10 菌株来自北京市农林科学院植物保护环境保护研究所食用菌研究室。

1.2 供试培养基

PDA 综合培养基、PDB 液体培养基、RM 再生培养基、大试管培养基的成分均见文献[3]。

1.3 主要试剂的配制

0.6 mol/L 甘露醇稳渗液、2% 溶壁酶溶液、渗透压稳定剂

的配制参见文献[4];ABTS 溶液的配制参见文献[5];3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS)、0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 5.0)、1% 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液的配制见文献[6]。

1.4 试验方法

(1)原生质体单核化:具体过程参见文献[7]。(2)菌丝生物量的测定:具体过程参见文献[8]。(3)蛋白含量、漆酶活性的测定:具体过程分别参见文献[5,9],其中蛋白含量采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定。(4)纤维素酶活性的测定:具体过程参见文献[6]。

1.5 数据分析

试验均设 3 次重复,结果采用 SPSS 软件对数据之间的差异显著性进行分析。

2 结果与分析

2.1 自交 45×49 和白 10 的菌丝生长速度和生物量

原生质体提取后在显微镜下测定浓度 100 万~1 000 万个/mL,稀释后涂板,挑取单个菌落镜检得到 121 个单核菌丝。平板对峙试验后,获得 1 株菌丝洁白、浓密的菌株,镜检有锁状联合,命名为自交 45×49(图 1)。

2.1.1 自交 45×49 和白 10 的生长速度 由图 2 可知,自交 45×49 和白 10 在平皿上的平均生长速度分别为 10.17、10.70 mm/d,且二者在 0.01 水平差异不显著。由图 3 可知,自交 45×49 和白 10 在大试管上的平均生长速度分别为 3.0、2.81 mm/d,且二者在 0.01 水平差异不显著。

2.1.2 自交 45×49 和白 10 的菌丝生物量 由图 4 可知,白 10、自交 45×49 平均菌丝生物量为 0.9、1.58 mg/mL,可见自交菌株的菌丝生物量明显高于退化的白 10 菌株。

2.2 生物酶活性的测定

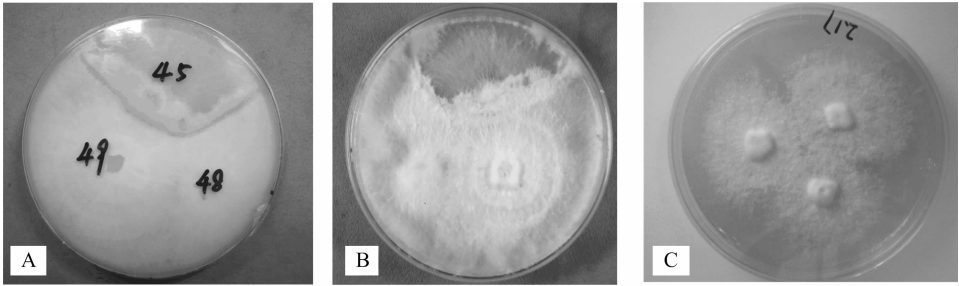
2.2.1 蛋白含量的测定 蛋白含量与吸光度的回归方程为 $y = 0.0016x - 0.0083$, $r^2 = 0.999$,蛋白含量在 50~400 μg/mL 范围内,溶液蛋白含量与 $D_{562\text{ nm}}$ 呈线性关系。

2.2.2 葡萄糖标准曲线的绘制 葡萄糖标准溶液浓度与吸

收稿日期:2014-05-28

基金项目:现代农业产业技术体系北京市食用菌创新团队项目(编号:PXM2013-036204-00069)

作者简介:李莎(1988—),女,河北廊坊人,硕士研究生,从事食用菌生物技术与遗传育种研究。Tel:(010)51503432;E-mail:hen_tianliang003@163.com。



A、B—有拮抗线的平板；C—没有拮抗线的平板

图1 菌丝的平板对峙试验结果

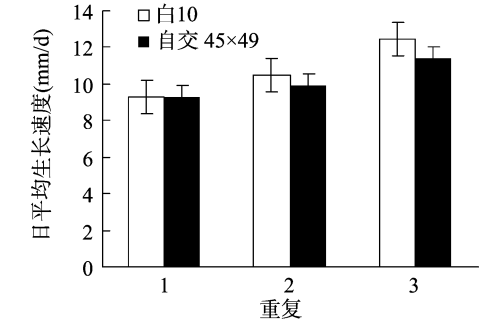


图2 菌株在 PDA 平板上的生长速度

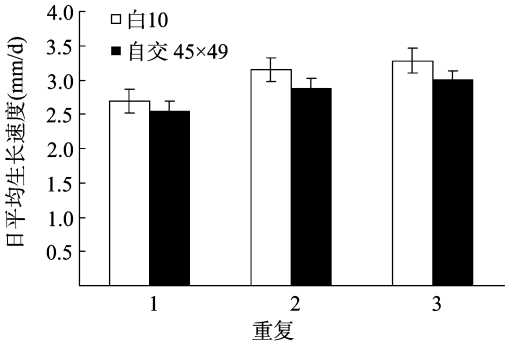


图3 菌株在大试管中的生长速度

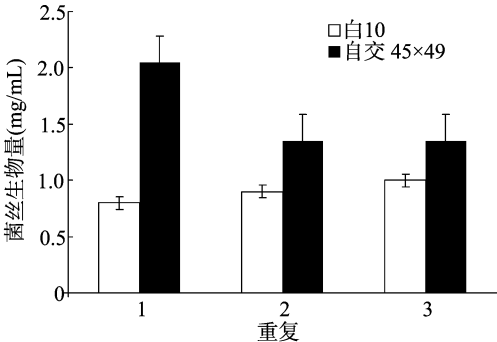


图4 菌株在 PDB 培养基中的菌丝生物量

糖含量在 0.08 ~ 0.56 mg/mL 范围内,葡萄糖含量与 $D_{540\text{ nm}}$ 呈线性关系。

2.2.3 白 10 和自交 45 × 49 的蛋白含量和酶活力的测定结果 由表 1 可知,白 10 的蛋白含量、漆酶活力、滤纸酶活力、羧甲基纤维素酶活力分别为 4.5%、25.64 U/mg、1.43 U/mg、1.23 U/mg; 自交 45 × 49 的相应指标分别为 4.1%、35.03 U/mg、1.43 U/mg、2.87 U/mg。自交菌株发酵菌丝中的蛋白含量虽然降低了,但是生物酶活力却相对增强了,其中漆酶活力更是比退化的白 10 菌株增强了 36.62%,可见经原生质体单核化技术得到的自交菌株改善了退化菌株的菌丝生长活力,说明原生质体单核化技术在一定程度上可以改善白灵菇菌株的退化现象。

表 1 白 10 和自交 45 × 49 的蛋白含量和酶活力的测定结果

菌丝	蛋白含量 (%)	漆酶活力 (U/mg)	纤维素酶活力 (U/mg)	
			羧甲基纤维素酶	滤纸酶
白 10	4.5 ± 0.034a	25.64 ± 2.604b	1.23 ± 0.087b	1.43 ± 0.054a
自交 45 × 49	4.1 ± 0.011b	35.03 ± 1.590a	2.87 ± 0.546a	1.43 ± 0.085a

注:同列后不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

樊晓琳等曾用原生质体单核化技术提纯复壮双孢蘑菇 As2796,并证明原生质体单核化技术提纯复壮菌株是最好的方法^[4];谭琦等利用原生质体单核化技术,以香菇栽培种 Le1 和野生种 70#为亲本,通过原生质单核体杂交选育出申香 8 号^[7],在大面积推广后成为优良菌种;吴小平等将原生质体技术应用于灵芝的杂交育种中获得了 24 个优良的杂交菌株^[10];江玉姬等将原生质体单核化技术应用于金针菇的育种中,证明原生质体单核化技术可为白色金针菇的品种改良提供一个新途径^[11]。由此可见,原生质体单核化技术已被广泛应用于食用菌育种领域,但是对菌种的提纯复壮还未有更深

入的了解。

一般对菌种进行提纯复壮采用的都是优化培养基法,或是进行出菇再组织分离。优化培养基法操作简单、耗费时间短,但是效果不是很明显;出菇再组织分离法效果明显,但是周期比较长、过程复杂。本试验在前人研究的基础上采用原生质体单核化技术提纯复壮菌丝可以比更换培养基达到更好的效果,且比出菇试验简便,在很大程度上缩短了菌种复壮周期。

本研究从菌丝形态、生长速度、菌丝生物量和生物酶活力方面分析了自交 45 × 49 和白 10 菌株的区别,结果表明,自交 45 × 49 的菌丝生长活力优于退化的菌株,证明了原生质体单核化技术对白灵菇菌株提纯复壮中应用的可行性。

熊进,何顺荣,吴鑫颖,等.黑曲霉液态发酵制备没食子酸的工艺研究[J].江苏农业科学,2015,43(5):250-253.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.083

黑曲霉液态发酵制备没食子酸的工艺研究

熊进^{1,2},何顺荣^{1,2},吴鑫颖^{1,2},邱树毅^{1,2},简辉^{1,2},马威¹

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院,贵州贵阳 550025; 2. 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室,贵州贵阳 550025)

摘要:采用高效液相色谱测定黑曲霉 B0201 制备的没食子酸,对底物添加方式、底物浓度、转化方式及转化条件等因素进行研究。最终确定较佳工艺条件为:用五倍子直接作为产酶的诱导物及转化底物,底物分 4 次添加,每次间隔 12 h,最终总浓度达 6%,转化过程中搅拌速度优化为 200 r/min,温度为 35 ℃,没食子酸浓度可达到 39.78 mg/mL,转化率达最大值 73.05%。在对菌丝重复转化试验过程中补充营养物质及调节 pH 值均能提高转化产物浓度。

关键词:黑曲霉;液态发酵;五倍子;生物转化;没食子酸;工艺优化

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0250-04

没食子酸(gallic acid,GA)又名五倍子酸,为白色或淡黄色针状结晶^[1],化学性质活泼,能形成多种酯类、酰卤和酰胺,可以通过氧化耦合反应制得鞣花酸、脱氢二鞣花酸等联苯型化合物^[2],是一种重要的精细化学品,广泛应用于矿产、化工、农业、食品、制药等行业^[3]。目前,没食子酸的制备方法可分为化学法与生物法,工业上没食子酸主要是由化学法经酸或碱水解五倍子制得,其工艺存在对环境污染严重、副反应多、杂质含量较高等问题。而生物法因具有反应条件相对温和、对设备要求低、副产物较少、对环境友好以及后续提纯工艺较为简单等诸多优点,近年来受到国内外相关学者的广泛关注^[4-5]。五倍子富含单宁酸,研究表明单宁酸诱导黑曲霉液态发酵产胞内单宁酶,单宁酶可高效、专一、定向裂解单宁酸分子,生成没食子酸^[6-8];故直接将五倍子投入发酵系统中,利用菌体内的单宁酶将之转化为没食子酸。当转化趋于平衡后,分离菌丝体并洗涤,可反复转化五倍子制备没食子

酸。此过程不需要将酶从菌体中分离,将酶的生成与五倍子单宁酸转化没食子酸的过程相耦合,简化了没食子酸的生物转化过程。与酶法转化相比,此方法转化底物浓度有很大倍数的提高,产物浓度也有很大提高。同时,分光光度法与高效液相色谱法相比,测定没食子酸是前者由于单宁酸和没食子酸结构相近,最大吸收峰波长也较近产生累加效应,因此产生的干扰比较大,实际测量值会偏大。本试验通过对底物添加方式、底物浓度、转化方式及转化条件等因素进行研究,以提高没食子酸相对于五倍子中单宁酸的转化率,为生物法制备没食子酸的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 菌株 黑曲霉 B0201 (*Aspergillus niger*),由笔者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基 斜面培养基:察氏培养基;液态基础培养基:蔗糖 2.0 g,NaNO₃ 0.2 g,K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1 g,KCl 0.05 g,MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g,FeSO₄ · 7H₂O 0.001 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,pH 值自然。

1.1.3 主要试剂 五倍子,购于贵州省遵义市余庆县;单宁酸 C₇₆H₃₂O₄₆,分析纯,购于天津福晨化学试剂厂;没食子酸 C₇H₆O₅ · H₂O,分析纯,购于贵州迪大生物有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2015-03-02

基金项目:国家“863”计划(编号:2014AA021802)。

作者简介:熊进(1989—),男,硕士研究生,研究方向为制药与发酵工艺。E-mail:591538059@qq.com。

通信作者:吴鑫颖,硕士,副教授,研究方向为酶工程及发酵工艺,E-mail:2513331885@qq.com;邱树毅,博士,教授,研究方向为应用生物技术,E-mail:syqiu@gzu.edu.cn。

参考文献:

- [1]王贺祥.食用菌学[M].北京:中国农业大学出版社,2004:25-31.
- [2]沈雪亮,夏黎明.产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J].林产化学与工业,2002,22(1):47-51.
- [3]潘迎捷,伯海英,沈宗英.香菇单核原生质体的制备[J].食用菌,1992(3):14-15.
- [4]樊晓琳,叶绿笋,边银丙.双孢蘑菇菌株 As2796 的提纯复壮[J].食用菌学报,2010,17(3):20-24.
- [5]赵爽,陈杰,许峰,等.北京地区几种人工栽培食用菌生物指标的测定[J].江苏农业科学,2013,41(9):293-295.

- [6]姜心,陈伟,周波,等.纤维素酶活测定影响因素的研究[J].食品工业科技,2010,23(5):65-68.
- [7]谭琦,潘迎捷,汪昭月,等.原生质体单核化技术在香菇育种中的应用[J].园艺学报,1999,26(4):271-272.
- [8]谢天娇.杏鲍菇液体培养微量元素对其菌丝生物量的影响[J].安徽农业科学,2012,40(21):10757-10758.
- [9]赵爽,刘宇,许峰,等.姬松茸 4 个品种菌丝体的生物酶活性测定[J].中国食用菌,2010,29(3):32-33.
- [10]吴小平,刘方,谢玉荣,等.灵芝原生质体单核化杂交育种[J].中国农学通报,2009,25(23):64-69.
- [11]江玉姬,吴文礼,谢宝贵.金针菇的原生质体单核化[J].福建农业大学学报:自然科学版,2001,30(1):44-47.