

原生质体紫外诱变选育灵芝新菌种的研究

李 刚 杨 凡 李瑞雪 徐志祥 李宝健

(中山大学生物工程研究中心 广州 510275)

摘 要:对灵芝原生质体进行了紫外诱变处理,经过粗筛和精筛后,从中选出多糖含量和产量明显高于原始菌株的两株诱变株 43020# 和 43026#。经过 10 代 PDA 斜面继代培养及其摇瓶试验和连续 3 次 3L 罐的中试试验,表明所得诱变株为比原始菌株更优秀的稳定高产、高多糖含量的灵芝生产菌株。本研究为选育适合发酵的灵芝生产菌种提供了一种快速、有效的方法。

关键词:灵芝,原生质体,紫外诱变,育种

中图分类号:S567.035 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 02-0229-05

灵芝是一种名贵的药用真菌,自古以来就是中药中的上品。现代医学研究发现灵芝对肝炎、心血管疾病、癌症等多种现代疑难疾病具有显著的疗效,因此灵芝已经引起国际医学界的瞩目,关于灵芝的研究,已成为真菌领域的一个新的热点。目前随着人民生活水平的提高,对灵芝的产量和质量都提出了新的要求。由于野生灵芝很少,而种植灵芝存在着周期长,占地大,受季节影响,难以产业化生产等困难,所以目前生产灵芝的主流方向已朝着发酵法发展。灵芝多糖是灵芝的主要有效成份之一,也是目前国内外衡量灵芝质量的主要指标。我们曾在 1997 年分离筛选到了一株赤灵芝菌株,经过发酵驯化后,命名为“汇中一号”,投入工业化发酵生产,产量和多糖含量均达到当时国内先进水平,产品的市场反映良好。为了开拓灵芝生产的潜力,更好地满足市场需求,我们应用原生质体诱变技术对原菌种赤芝“汇中一号”进行了紫外诱变和选育,试图培育出生长更迅速、产量和灵芝多糖含量更高的灵芝新菌种。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌株:“汇中一号”,本室分离的一株优质高产的赤灵芝(*Ganoderma* sp.)菌株,97 年已应用到产业化发酵生产中。

1.1.2 斜面培养基:PDA 培养基。

1.1.3 发酵培养基:见参考文献[1]配方。

1.1.4 原生质体再生培养基:每升培养基中含麦芽糖 10g,葡萄糖 4g,酵母浸出粉 4g,pH 自然,以 0.6mol/L 甘露醇为渗透压稳定剂。

本研究由上海中祥生物制品有限公司资助

作者简介:李 刚(1971-),男,现于中山大学生物工程研究中心攻读博士学位,主要研究方向为真菌分子生物学。

收稿日期:2000-06-01,修回日期:2000-09-08

1.2 原生质体制备与再生

见参考文献[2]方法。

1.3 质生质体的紫外线诱变处理

照射前,先打开石英紫外光管预热 20min,使光波稳定。诱变过程应在黑暗条件下进行,照明采用红灯泡。将制备好的原生质体稀释至 10^6 个/mL,取 5mL 放于无菌的 9cm 平皿内,15w 紫外灯,距离 30cm 照射 0~300s,取 1mL 样品适当稀释至不同浓度后,取 0.1mL 涂平板,黑暗闭光于 28℃ 恒温箱中培养,待平板长出菌落后,菌落计数,并计算原生质体紫外诱变的半致死剂量。

1.4 菌丝培养与收获

1.4.1 摇瓶培养:仿照工业化生产,采用二级发酵。从培养 7~10d 的诱变菌种斜面上和锋利的接种刀切下一块菌丝斜面,接入装有 50mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶中,培养适当时间后转移到装有 400mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中,28℃,160~180r/min 旋转式摇床培养 3~5d。

1.4.2 中试发酵:种子罐和发酵罐均采用机械搅拌的方式发酵。摇瓶培养的 4L 灵芝种子液接入 500L 种子罐中,发酵参数为:培养基 pH5.8~6.0,罐温 26℃~28℃,搅拌速率 120~140r/min,罐压 0.8~1.0kg/cm²,通气量 1:0.5。种子罐培养 2~3d 后,移种到 3t 发酵罐中。发酵参数为:培养基 pH5.8~6.0,罐温 26℃~28℃,搅拌速率 160~180r/min,罐压 0.8~1.0kg/cm²,通风量:0~36h 为 1:0.6;36~60h 为 1:1.0;60h 后为 1:0.8,3t 罐发酵 3~4d 后放罐。

1.4.3 菌体收获:摇瓶发酵后的培养液,用 4 层纱布过滤收集菌丝体,并用蒸馏水冲洗三次,挤干,60℃ 烘干,研磨粉碎,称重。菌粉得率以 100mL 培养液中菌粉干重的克数来表示。

1.4.4 中试菌体收获:用板框压滤机收集菌丝滤饼,60℃ 烘干后,粉碎称重。

1.5 灵芝多糖含量测定

按照文献[3]中的硫酸-苯酚法测定。

2 结果

2.1 灵芝原生质体诱变效应曲线及紫外线诱变剂量的选择

取 20 个 9cm 平皿,每皿分别装有新制备的 10^6 个/mL 的灵芝原生质体悬液 5mL。每两个为 1 组,共分为 10 组。分别照射 0、5、10、15、20、25、30、45、60、180s,然后每皿取 1mL 适当稀释后涂平板。平板用黑布包裹后置于黑暗闭光的 28℃ 恒温箱培养。待平板长出菌落后,菌落计数。每组以两个皿菌落数的平均值作为该组的菌落数。以照射时间为横坐标,以再生菌落数为纵坐标,画出灵芝原生质体紫外诱变剂量效应曲线,如图 1 所示;由上图可以看出,灵芝原生质体经紫外线照射后,再生菌落数开始减少。在 0~30s 照射时间内,曲线的变化很剧烈。30s 以后,曲线的下降趋于平缓。据图我们计算出灵芝半致死率时的照射剂量约为 25s。

2.2 灵芝诱变株的初筛

我们以 25s 作为照射剂量诱变灵芝原生质体,连续诱变 20 批,每批稀释后涂 10 个平

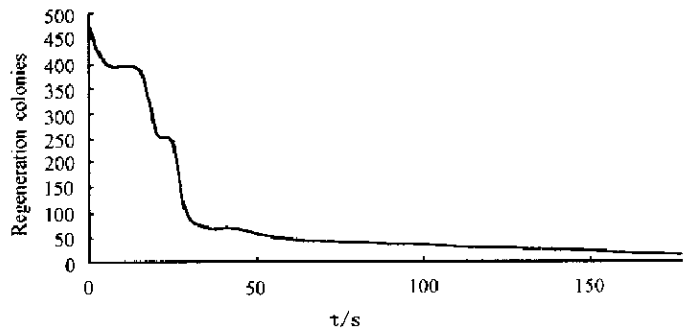


图 1 灵芝原生质体紫外诱变剂量效应曲线

Fig.1 The dose response curve of *Ganoderma* protoplasts by UV radiation

皿。等原生质体在平皿上已再生出菌落后,取优先再生出来、菌落直径最大、生长最旺盛的菌落,接入斜面。据此从 200 个平皿中总共选出 100 株诱变株。

2.3 灵芝诱变株的精筛

将 100 株诱变株每株接两个斜面 and 两个三角瓶培养,斜面培养至菌丝长满斜面,计算出菌丝生长速率(cm/日)。摇瓶培养按二级发酵方式培养至发酵终点,计算菌粉得率。综合菌丝生长速率、菌粉得率两项数据,从 100 株诱变株中选出最好的 10 株(因数据太多,此处略)。根据诱变时的原始批次和编号,这 10 株菌分别命名为:0001#,0002#,43005c#,41341#,43020#,41516#,41514a#,41521#,43018a#,43026#。

2.4 高产、高多糖含量诱变株的获得

取上述 10 株诱变株连同“汇中一号”进行摇瓶发酵试验,接种量相同,分别记录发酵周期、菌粉得率并测定其多糖含量。连续进行三次上述发酵试验,取其平均值,结果如表 1 所示。

表 1 10 株诱变株的发酵周期、菌粉得率和多糖含量的比较

Table 1 Comparison of fermentation period,production and content of polysaccharides among 10 differenent mutants *

Strain	0001	0002	43005c	41341	43020	41516	41514a	41521	43018a	43026	Hui Zhong No.1
Fermentation period/h	178	186	193	209	185	192	216	184	148	165	187
Production/%	0.68	0.90	1.50	0.80	1.34	0.96	1.00	1.08	1.56	1.42	1.12
Content of polysaccharides/%	6.97	4.39	6.33	5.66	7.52	5.76	4.73	6.73	4.66	8.18	6.01

* Arevage value of three batch

根据上表结果,从中选出发酵周期、菌粉得率、多糖含量三项指标都明显优于原始菌株“汇中一号”的两株灵芝诱变株,即 43020#,43026#。

2.5 遗传稳定性试验

鉴于诱变菌株的性状常常不稳定,尤其是在连续继代培养时。为了检测所得两株菌株性状是否稳定,我们将上述两株诱变株和“汇中一号”一起在 PDA 斜面上连续转接 10 代,每代均进行摇瓶培养,结果如表 2 所示。

表 2 43020 #、43026 # 和“汇中一号”连续进行 10 代摇瓶培养的菌粉得率和多糖含量比较

Table 2 Comprison of production and content of polysaccharides of successive 10 generation shaking bottle cultivation from 43020 # ,43026 # and “HuiZhong No.1”

Batch		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average value
Item												
43020 #	Production/%	1.20	1.24	1.45	1.18	1.30	1.25	1.36	1.06	1.16	1.27	1.25
	Content of polysaccharides/%	7.56	7.08	7.45	7.88	7.65	7.66	7.59	7.46	7.92	7.64	7.59
43026 #	Production/%	1.48	1.62	1.40	1.38	1.59	1.44	1.65	1.27	1.35	1.52	1.44
	Content of polysaccharides/%	7.95	8.06	8.15	8.28	8.12	7.84	8.25	8.17	8.39	8.28	8.15
HuiZhong No.1	Production/%	0.98	1.16	1.24	1.05	1.15	1.26	1.25	1.17	1.00	1.15	1.15
	Content of polysaccharides/%	5.56	5.98	5.84	6.02	6.26	5.79	6.11	6.12	5.87	6.24	5.98

由表 2 可以看出,43020 # 和 43026 # 无论产量还是多糖含量都很稳定。而且 10 次发酵试验中基本上每次在产量和多糖含量上都显著超过了对照的原始菌株“汇中一号”。其中 43026 # 在各项指标上较之 43020 # 更为优异。使用统计软件对上述结果进行 Duncan’s 新复极差测验,分析结果显示:在菌粉得率方面,43020 # 与“汇中一号”的差异是 5% 的显著水平($p<0.05$),43026 # 与“汇中一号”的差异是 1% 的极显著水平($p<0.01$);而在多糖含量方面,43026 # 和 43020 # 与“汇中一号”的差异均为 1% 的极显著水平($p<0.01$)。

2.6 中试试验

为了检测所得诱变株在工业化发酵条件下的产量和多糖含量,我们将两株诱变株中性能更好的 43026 # 菌株在上海工业微生物研究所连续进行 3 罐 3t 罐规模的中试试验,菌粉得率与多糖含量分别如表 3 所示。

表 3 43026 # 连续三批 3t 罐发酵的发酵周期、菌粉得率和多糖含量

Table 3 Fermentation period,production and content of polysaccharides of successive 3 batch 43026 # at 3 tons

Item	Fermentation period/h	Production/%	Content of polysaccharides/%
Batch			
No.1 batch	125	1.44	6.87
No.2 batch	124	1.50	6.83
No.3 batch	134	1.00	7.78
Average value	128	1.31	7.16

由于中试与小试的条件和设备差异都很大,因此一般来说中试结果与小试都会有些差异。从上表中可以看出,中试的发酵周期比小试大大缩短了,菌粉产量和多糖含量接近小试结果。因此 43026 # 菌株的性状还是令人满意的。96 年我们曾在广东中山市进行过“汇中一号”菌种的中试。菌粉的平均得率为 0.7%,多糖含量平均为 6.5%。两个中试结果对照,明显可看出诱变菌株 43026 # 比原菌株“汇中一号”生产性能有了大幅度提高,且

从小试、中试的结果看,该菌株的性状还是比较稳定的。因此将新的诱变菌株 43026 # 命名为“灵健二号”,准备在不久后投入工业化发酵生产。

参 考 文 献

- [1] 李 刚,李宝健.中药材,1998,21(8):379~381.
- [2] 李 刚,李宝健.菌物系统,1999,18(1):79~88.
- [3] 徐志祥,李 刚,李宝健.食用菌,2000,3:6~8.

A STUDY ON THE BREEDING OF NEW *GANODERMA* VARIETIES BY UV INDUCED MUTAGENESIS

Li Gang Yang Fan Li Ruixue Xu Zhixiang Li Baojian

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: UV induced mutagenesis of *Ganoderma*'s protoplast was carried out. By crude screen and careful screen, we obtained two mutants, 43020 # and 43026 #, whose dry weight and polysaccharides contents are higher than original strain. Results of continued cultivation for 10 generation on PDA slants and successive tests of shaking bottles, and successive 3 time pilot scale tests at 3 tons, showed that these two mutants are excellent strains with steady properties, high production and high content of polysaccharides. This study has provided a rapid and effective method for breeding of *Ganoderma* varieties which is suitable to industrial fermentation.

Key words: *Ganoderma*, Protoplast, UV induced mutagenesis

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自 2001 年 41 卷第 1 期开始继续扩版,双月刊,每册 128 面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里,《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部