

低能氮离子注入香菇生物学效应的研究

鹿桂花 周海燕 陈恒雷 张军 吕杰

(新疆大学离子束生物工程中心 乌鲁木齐 830008)

摘要 本文用能量为 15 keV, 而注量不同的氮离子注入对武香一号香菇进行诱变, 分析了不同注量下菌丝长速, 菌丝生物量以及多糖含量的变化, 对该低能离子与微生物间的作用规律进行了初步探索, 为进一步筛选出多糖高产菌株提供前提。实验结果表明菌丝长速, 菌丝生物量及多糖含量随不同注量的变化情况基本遵循“马鞍型曲线”。注量小时菌丝日均长速较快, 随着注量的增大, 菌丝日均长速呈下降趋势, 但在 $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 附近, 菌丝长速有短暂回升。在注量较小时, 随着注量的增加, 菌丝生物量及多糖含量先升高后降低, 注量为 $4 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 时, 两者均达到最大值, 而后会出现小的波动, 注量增加到 $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 时, 菌丝生物量及多糖含量又会达到一个较大的峰值。通过发酵动力学分析, 研究了香菇液体菌种培养过程中菌丝球数量及形态、摇瓶总重、pH 值、多糖含量等指标的变化情况, 绘制该菌发酵产糖的过程曲线, 这将为诱变前后液体发酵过程的控制提供参数。

关键词 香菇, 离子注入, 诱变, 发酵, 多糖

中图分类号 S335, Q815, S646.1+2

香菇 (*Lentinus edodes*) 是一种味道鲜美, 营养价值很高的食用菌, 其蛋白质中含有 18 种基本氨基酸, 其中人体所必需的 8 种氨基酸全部具备, 香菇菌丝体、子实体及发酵液均具抗癌、保肝、降胆固醇、提高机体免疫力的作用, 其中起主要作用的有效物质即为多糖^[1]。香菇多糖是一种宿主免疫增强剂, 具有独特的生理功能, 具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和刺激干扰素形成等功能。经常食用能益胃助食, 化痰理气, 对预防人体皮肤炎症和坏血病等有一定的疗效, 且无任何毒副作用。

正因为香菇多糖的药用价值如此之大, 如能通过一定的诱变手段提高菌株的多糖产量, 其重大意义是显而易见的。

随着核技术及其应用研究的发展, 辐射诱变育种在育种领域占据越来越重要的位置。离子注入是 20 世纪 80 年代兴起的一种材料表面处理技术。随后将离子注入这一高新技术应用于农作物品种改良并获得成功, 由此开始了注入离子与生物体系相互作用过程的探索。离子束诱变在育种和改良的应用中植株表现出生理损伤小、突变谱广、突变频率高, 有一定的重复性和方向性等新特点。由于其高效率的复合诱变效应, 离子束诱变在生物育种工作中有

很好的和潜在的应用前景^[2]。

本文研究了 15 keV 的 N^+ 注入香菇的生物学效应, 这在国内外研究中尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 武香一号香菇 (*Lentinula edodes*), 由新疆农科所提供, 在实验中作为对照 (CK) 菌株。

1.1.2 试剂 麦芽糖, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为分析纯, 酵母浸粉, 琼脂为生化试剂, 土豆淀粉为食品级, 麸皮为市售。

1.1.3 仪器 LZD-1000 型多功能离子注入机, 西南核物理研究所; SIGMA 3-18K 离心机, 德国; LRH-150B 生化培养箱, 广东省医疗器械厂; pHS-3C 精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂; 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。

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: 鹿桂花, 女, 1982 年 11 月出生, 在读硕士研究生, 研究方向是离子束生物工程, 现主要从事离子束生物工程与食用菌发酵及多糖研究

通讯联系人: 张军, E-mail: zhj@xju.edu.cn

收稿日期: 初稿 2007-12-13, 修回 2008-01-25

1.1.4 培养基 (1) 斜面(平板)培养基: 马铃薯 20%, 麦芽糖 2%, 酵母浸粉 0.8%, 麸皮 3%, $MgSO_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.3%, 琼脂 2%。(2) 摇瓶培养基: 马铃薯 20%, 麦芽糖 2%, 酵母浸粉 0.8%, 麸皮 3%, $MgSO_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.3%, 琼脂 0.2%。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 平板培养: 25℃, 培养 5~6 d。

摇瓶培养(发酵): 250 mL 的三角瓶中装入 100mL 培养液, 121℃ 高温灭菌 30 min, 每瓶接入三块直径为 0.5 cm 的菌块, 摇床转速 200 r/min, 25℃ 振荡培养 12 d。

1.2.2 诱变方法 武香一号香菇经固体平板培养基活化培养, 待其菌丝长至直径为 5 cm 菌落时, 刮取外围新生菌丝至带有玻璃珠的无菌水中打散后, 双层滤纸过滤制成单细胞菌丝悬液, 加入适量脱脂奶作保护剂, 再将其用涂布棒涂抹均匀, 以无菌风吹干制成菌膜后进行离子注入。

N^+ 注入能量为 15 keV, 注量分别为: 2×10^{15} 、 4×10^{15} 、 6×10^{15} 、 8×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1.2×10^{16} 、 1.5×10^{16} 、 $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 。并在靶室内放置不接受照射的对照样(CK'), 每个处理设 5 个重复。靶室真空度为 10^{-3} Pa 。将平皿置于靶台上, 以 5 s 脉冲式注入, 间隔 15 s, 以消除大注量下热效应可能产生的负作用, 分别注入不同的注量。然后取出平皿, 以 3mL 无菌水洗脱, 涂布于平板培养基上, 于 25℃ 培养 15 d 左右, 再将获得的菌株转入发酵培养基逐个发酵进行多糖产量测定。

1.2.3 分析方法 采用十字交叉法测定菌丝日菌长速, 制作曲线; 用精密分析天平称量摇瓶总重及菌丝干重^[3]; 精密 pH 计测定培养液 pH 值; 采用苯酚-硫酸比色法测定培养液多糖含量, 以葡萄糖作标准曲线^[4]。

2 结果与分析

2.1 菌株的发酵动力学分析

选择 CK 菌株为发酵菌株, 采用发酵培养基中的最佳培养基配方, 进行发酵动力学分析, 测其菌丝生物量变化曲线, 菌丝球形态变化, pH 值变化曲线及多糖产量变化曲线, 如图 1~图 3 所示。

2.1.1 发酵过程中摇瓶总重与菌丝球干重的关系 如图 1 所示, 由于摇瓶质量的变化量和菌丝生物量的变化趋势一致, 即可以通过测摇瓶质量变化来确定发酵终点, 操作简单且不易染菌。

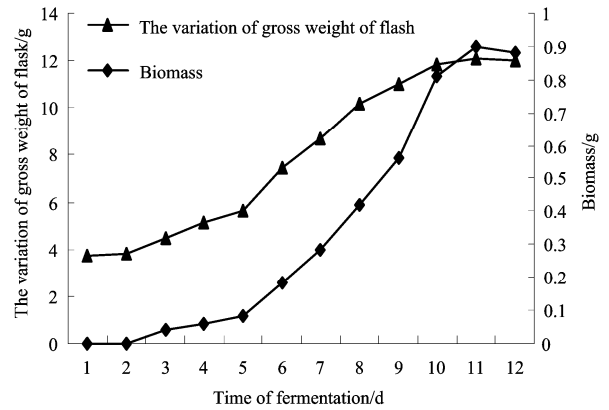


Fig. 1 The correlation the variation of mycelia biomass and gross weight of flask during the liquid culture

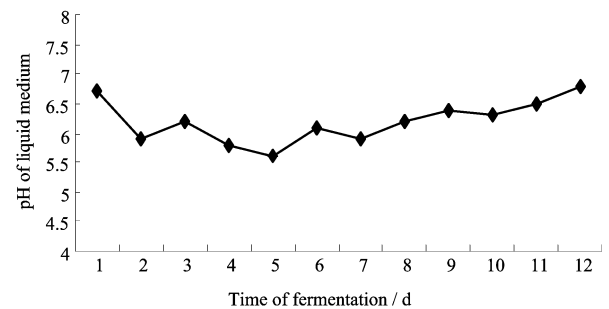


Fig. 2 The variation of pH during the liquid culture

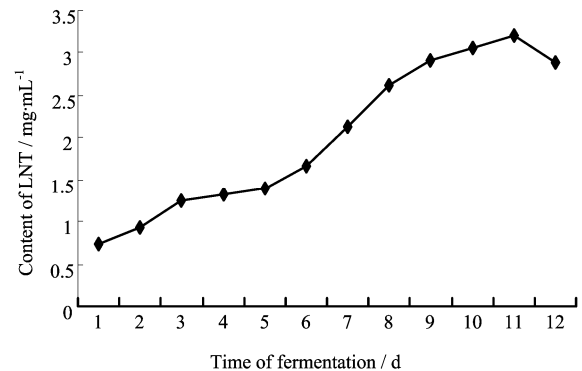


Fig. 3 The variation of LNT during the liquid culture

2.1.2 培养液 pH 值的变化 图 2 显示, 液体培养过程中, 培养液的 pH 值变化幅度不大, 发酵初期菌丝分解基质产生部分有机酸, pH 值略有下降, 培养末期, 由于菌丝球老化自溶产生氨基氮等碱性物质, 又使培养液的 pH 值略微升高^[5]。因此, pH 值的变化可作为判断发酵终点的指标。图中所示的变化趋势符合其生理变化的要求。

2.1.3 培养液多糖含量的变化 从图 3 可以看出, 培养初期培养液中多糖含量较低, 且变化不大, 增长趋势比较平缓, 主要是由于菌丝体分解培养液中碳源物质的能力逐渐增强, 随着时间的延长, 多糖的生成量大于利用量, 随培养基中碳源物质的消耗和菌丝球数量的增长, 多糖含量呈上升趋势, 第 11 天达到 $3.213 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 之后开始下降, 菌丝体活性的下降, 加之产生的碳源等一些代谢物质的减少, 导致碳源的大量利用和生成量的减少, 是培养末期多糖含量下降的主要原因。

2.2 离子注入诱变效应

2.2.1 不同注量对菌丝长速的影响 为了得到适宜的离子注量, 以只进行真空处理而不进行离子辐射的菌样作为对照 (CK'), 以不同注量的离子注入进行处理, 涂平板, 测菌丝日均长速, 得到离子辐射效应曲线。

以菌株 CK 为原始出发菌株进行 15 keV 的 N^+ 注入诱变, 注量分别为 2×10^{15} 、 4×10^{15} 、 6×10^{15} 、 8×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1.2×10^{16} 、 1.5×10^{16} 、 $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 。图 4 显示, 对于 15 keV 的氮离子, 注量小时菌丝日均长速较快, 随着注量的增大, 菌丝日均长速呈下降趋势, 但在 $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 附近, 菌丝长速有短暂回升, 这与其它微生物的“存活率与注量呈马鞍型下降曲线”基本上相一致。该离子的射程较短, 低注量时离子只对细胞表面进行损伤和刻蚀, 没有破坏细胞的完整结构, 对菌丝细胞吸收养份及水份影响不大, 表现为新生菌丝长速与真空对照 (CK') 相差不大。随着注量增加, 细胞表面刻蚀严重, 离子损及细胞内部并产生大量自由基和软射线等, 影响细胞正常的生理代谢, 致使菌丝长速急剧下降。但下降到一定值时, 细胞某种修复机制、修复酶被激活, 诱导产生锰-超氧化物歧化酶的催化 (Mn-Superoxide dismutase catalysis. Mn-SOD.CAT) 活性升高, 存活率又有所回升^[6-9]。当注量上升到一定程度, 聚集于细胞表面的电荷产生库仑爆炸, 使细胞失去了电荷屏蔽, 存活率急剧下降, 宏观表现为新生菌丝长速急剧下降。

2.2.2 不同注量对液体培养菌丝生物量及培养液多糖含量的影响 由图 5 可以看出, 在注量较小时, 随着注量的增加, 菌丝生物量及多糖含量曲线先升高后降低, 在注量为 $4 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 时, 两者均达到最大值, 而后会出现小的波动, 当注量增加到一定程度, 即 $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 时, 菌丝生物量及多糖含量又会达到一个较大的峰值, 观察曲线的整体走向, 与图 4 所示的规律也是基本吻合的。

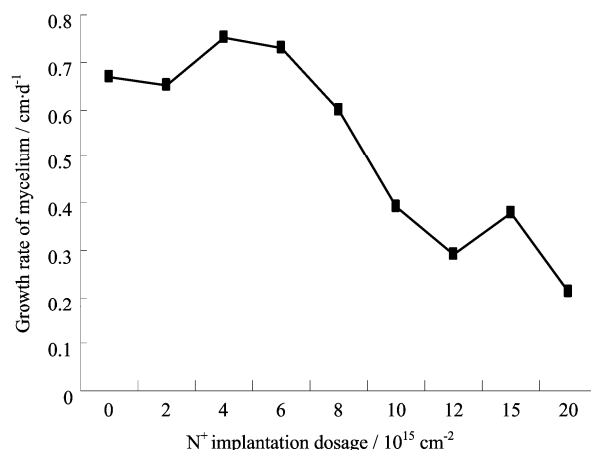


Fig. 4 The variation of growth rate of mycelium under different N^+ implantation dosage

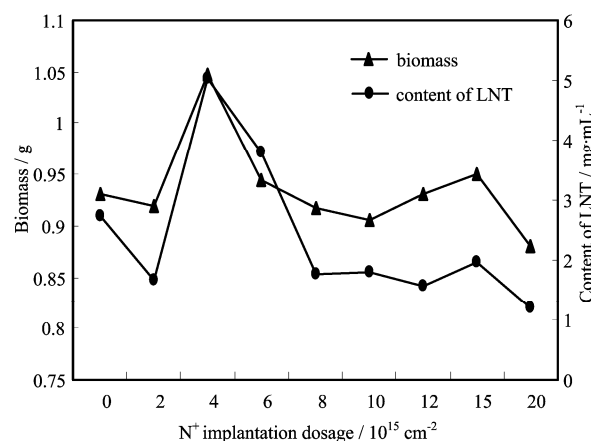


Fig. 5 The variation of mycelial biomass and the contents of LNT under different N^+ implantation dosage

3 结论

通过对武香一号香菇的发酵动力学分析, 观察其菌丝生物量变化曲线, 菌丝球形态变化, pH 值变化曲线及多糖产量变化曲线, 可以通过控制发酵过程中各个指标的变化, 有效地达到发酵的最佳效果。还可以通过测量摇瓶的质量变化来判断发酵终点, 简单易行, 且不易染菌, 这种方法在香菇发酵过程首次用到。

综合图 4 及图 5 我们可以得到以下结论: 菌丝的粗壮程度, 生长状态将直接影响其发酵的效果, 如菌丝生物量及培养液多糖的含量, 且菌丝长速, 菌丝生物量及多糖含量随不同注量的变化情况基本遵循“马鞍型曲线”。

参考文献

- 1 王谦, 刘利群, 闫蕾蕾, 等. 河北大学学报(自然科学版), 2004, 24 (2): 172-174

- WANG Qian, LIU Liquan, YAN Leilei, *et al.* J Hebei Univ (Natural science edition), 2004, **24** (2): 172-174
- 2 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998. 223-247
- YU Zengliang. Introduction to ion beam biotechnology[M]. Hefei: Anhui Science and Technology House, 1998. 223-247
- 3 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 197
- SHEN Ping. Microbiology Experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. 197
- 4 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 11-12
- ZHANG Weijie. Glycoconjugates biochemistry technology[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994. 11-12
- 5 梁建光, 董洪新, 朱德盼. 湖北农业科学, 2005, 6: 76-78
- LIANG Jianguang, DONG Hongxin, ZHU Depan. Hubei Agricultural Science, 2005, 6: 76-78
- 6 YU Long, YU Zengliang. High Technology Letters, 2002, **12**(11): 41-46
- 7 王林香, 王世亨. 新疆大学学报(自然科学版), 2005, **22**(2): 172-177
- WANG Linxiang, WANG Shiheng. J Xinjiang Univ (Natural Science Edition), 2005, **22**(2): 172-177
- 8 Michael B D, Hei T K. Gray Lab Res Rep, 1997: 1035-1041
- 9 Yianhua D, H.Chenghai, T.zhen, L.Yinzhi .Chin.Sci.Bull, 1999, **44**(1): 167-172

Study of biological effects on *Lentinula edodes* by N⁺ ion implantation of low energy

LU Guihua ZHOU Haiyan CHEN Henglei ZHANG Jun LÜ Jie

(Ion Beam Bio-engineering Center, Xinjiang University, Urumchi 830008, China)

ABSTRACT *Lentinula edodes* were implanted with various nitrogen ions implantation dosage but the same energy in this study. The variations of growth rate of mycelium, mycelial biomass and the contents of lentinan(LNT) under various nitrogen ions implantation dosage were investigated. Three curves of implantation all take a "saddle shape" with increasing N⁺ ion implanted doses. The growth rate of mycelium is high under low dosage of N⁺ implantation, but with the increment of dosage, the growth rate shows downtrend then began rising when the dosage reaching $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$. The mycelia biomass and the contents of LNT rise firstly and then fall with the increment of dosage, and they both reach maximum at the dosage of $4 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. Some fluctuation exists in the process, so they both reach another peak at the dosage of $1.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$. During the liquid culture of *Lentinula edodes*, the variation of mycelial biomass, gross weight of shake-flask, pH and the contents of lentinan(LNT) has been studied. The consistency between the variation of mycelia biomass and gross weight of flask during the liquid culture has also been confirmed. This result can be applied to the study on fermentation before and mutation. Thus a conclusion may be drawn that it is an effective way of mutation breeding by N⁺ ion implantation.

KEYWORDS *Lentinula edodes*, Ion implantation, Mutation breeding, Fermentation, Lentinan(LNT)

CLC S335, Q815, S646.1+2