

白灵菇不同菌株生物学特性的研究

宿红艳, 王磊*, 高兴喜, 冯培勇, 姬婧
(鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要: 本实验选用白灵菇的三个不同菌株白灵 pL03-7、白灵 PN-1 和白灵 PN-9 为实验材料, 比较了三者菌丝生长速度、菌丝体生物量及多糖含量, 并进行了菌株间的拮抗性测定。结果表明, 三个菌株间存在明显的遗传差异。白灵 pL03-7 的菌丝生长速度最快, 日均长速为 7.35mm; 白灵 pL03-7 的菌丝体生物量最高, 为 1.0612g/150ml。白灵 pL03-7、白灵 PN-1 和白灵 PN-9 的菌丝体多糖含量分别为 63.80、73.93 和 72.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

关键词: 白灵菇; 菌丝生长速度; 菌丝体生物量; 多糖含量; 拮抗性

Study on Biological Characteristics of Different *Pleurotus nerbrodensis* Strains

SU Hong-yan, WANG Lei *, GAO Xing-xi, FEN Pei-yong, JI Jing
(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The antagonistic effects, the growth speed of hypha and mycelial biomass as well as polysaccharide content of three different *Pleurotus nerbrodensis* strains were tested in this study. The results showed that the genetic diversity exists in three strains. The hypha growth speed of strain pL03-7 is the fastest, 7.35 mm per day. And strain pL03-7 has the highest mycelial biomass, 1.0612 g/150 ml. The polysaccharide contents of strains pL03-7, PN-1 and PN-9 are 63.80, 73.93 and 72.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectively.

Key words: *Pleurotus nerbrodensis*; growth speed of hypha; mycelial biomass; polysaccharide content; antagonistic effect
中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2008)07-0256-04

白灵菇(*Pleurotus nerbrodensis*)属于真菌门(Enmycophyta)、担子菌纲(Basidiomycetes)、伞菌目(Agaricales)、侧耳科(Pleurotaceae)、侧耳属(*Pleurotus*), 又名阿魏蘑、阿魏菇、白阿魏蘑、阿魏侧耳等。白灵菇为掌状阿魏菇的商品名, 因其形状近似灵芝, 全身为纯白色故称白灵菇。它是一种野生名贵食药真菌, 子实体洁白如雪, 肉质细腻、肥厚, 脆滑浓香, 味道鲜美, 风味独特, 被誉为“草原上的牛肝菌”^[1]。白灵菇含有 17 种氨基酸, 氨基酸总量达 10.7%, 人体必需的 8 种氨基酸含量齐全、丰富, 占氨基酸总量的 35%。并且富含 VC 含量达 26.4mg/100g, 而一般平菇中很少含 VC 白灵菇中真菌多糖的含量很高, 其子实体多糖和液态深层发酵培养过程中产生的真菌多糖有消积杀虫、调节人体生理平衡、增强人体免疫功能的作用。现代药理学研究表明, 白灵菇中所含的真菌多糖能降低机体胆固醇含量、防止动脉硬化, 增强肌体免疫功能, 具有抗炎、抗肿瘤的特殊功效^[2-4]。白

灵菇白灵菇集膳食、药用于一身, 是一种珍稀的天然保健食品。

目前, 白灵菇的药用价值及其应用已为世界各国所重视。近年来, 国内的研究重点已经由白灵菇的栽培及菌种的驯化转移到白灵菇多糖的提取及活性功能等方面, 白灵菇生产发展迅速, 面积逐年增加。由于使用的品种多头引进, 菌株的名称多而杂, 为了避免因菌种名称混乱对遗传育种的影响, 本研究对鲁东大学食用菌工程技术研究中心引进的 3 个不同来源的白灵菇菌株的菌丝生长速度、菌丝体生物量、拮抗性和菌丝体多糖含量等生物学特性进行比较, 可为进一步筛选白灵菇优良菌株提供理论依据, 对进一步开发已有的白灵菇资源具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

收稿日期: 2007-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30740017); 鲁东大学校基金项目(20063301)

作者简介: 宿红艳(1976-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为菌物分子生物学。E-mail: suhongyan66@126.com

* 通讯作者: 王磊(1975-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: wanglei9909@163.com

白灵菇 PN-1、PN-9、pL03-7 均由鲁东大学食用菌工程技术研究中心提供, 经过液体培养, 得到的菌丝体在 -20°C 冰箱内保存待用。

1.1.2 固体培养基(PDA 培养基)

去皮马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 蛋白胨 5g, 磷酸二氢钾 1.0g, 琼脂 25g, 定容至 1000ml。用于菌种活化和拮抗性的测定。

1.1.3 发酵培养基

去皮马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 蛋白胨 5g, 磷酸二氢钾 3g, 硫酸镁 1.5g, 酵母粉 5g, VB120mg, 定容至 1000ml。用于液体发酵培养。

1.2 试剂

葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、磷酸二氢钾、琼脂、硫酸镁、VB、乙醇、苯酚、浓硫酸等。

1.3 仪器

分析天平、高压蒸汽灭菌锅、恒温摇床、高速离心机、恒温水浴锅、电热鼓风干燥箱、电热恒温培养箱、可见-紫外分光光度计等。

1.4 方法

1.4.1 菌丝的活化

从供试菌株母种斜面上接种约 0.5cm^2 菌块到 PDA 培养平板上, 25°C 恒温培养 5d 得到活化菌种。

1.4.2 菌丝生长速度的测定^[5]

将活化的菌丝沿菌落边缘切下直径 5mm 的菌块, 接种于 PDA 平板上, 三次重复, 25°C 恒温培养 5~7d, 每天定时观察菌株的生长形态, 精确测量菌落半径, 并按以下公式计算菌丝生长速度。

菌丝生长速度(mm/d)=菌落半径(mm)/菌丝生长天数(d)

1.4.3 不同菌株菌丝体生物量的比较

分两步对白灵菇菌丝体进行液体发酵培养。一级摇瓶: 用灭菌打孔器从活化的菌落边缘定量取三块菌种接种于摇瓶中(250ml 三角瓶装液量 50ml), 置于恒温摇床上, 200r/min, 25°C 培养 4d; 二级摇瓶: 将一级摇瓶的发酵液接种到新的发酵培养基中(500ml 三角瓶装液量 100ml), 接种量 10%, 置于恒温摇床上, 220r/min、 25°C 培养 6d。

所得菌丝体置滤纸上过滤, 并用蒸馏水洗涤数次, 然后置干燥箱中 60°C 烘干, 经 3 次称量后至恒重, 计算菌丝体平均干重。每个处理重复 3 次。

1.4.4 白灵菇菌丝体多糖制备^[6]

取白灵菇菌丝体置于预冷的灭过菌的研钵中, 加液氮研磨至粉末, 称取 0.2g, 置滤纸袋中, 用 20ml 85% 乙醇 60°C 浸提 30min, 重复 2 次, 弃乙醇后加 20ml 蒸馏水, 沸水浴中提取 2h 后定容至 50ml。

1.4.5 白灵菇菌丝体多糖含量测定

多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[6-8]。

标准曲线的制定方法如下: 精确称取已经干燥至恒重的葡萄糖 20.0 mg, 加入适量水溶解, 转移至 50ml 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 配成浓度为 $400\mu\text{g/ml}$ 的标准葡萄糖储备溶液。使用时, 再分别稀释成浓度为 20、60、100、120、140、160、180、200、225、250 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 准确移取蒸馏水 0.2ml 和上述葡萄糖标准使用液各 0.2ml 置于干燥的具塞试管中, 加入 0.05g/ml 苯酚溶液 0.8ml, 混合后, 迅速加入 4ml 浓硫酸, 混均匀后, 室温放置 30min, 在波长 485nm 处测定吸光度, 以加入蒸馏水的溶液作空白。以葡萄糖的浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制吸光度-葡萄糖浓度关系曲线。

如图 1 所示, 在 20~250 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 葡萄糖浓度 C 与吸光度 A 呈良好的线性关系, 所得标准曲线回归方程为 $A=0.0092C-0.012$, 相关系数 $r=0.9987$ 。

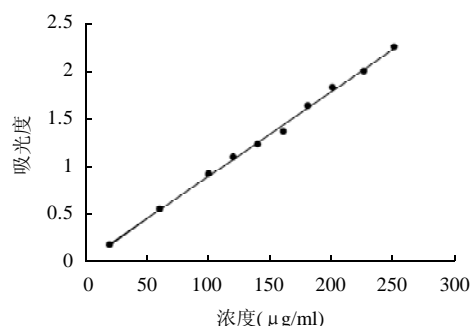


图1 葡萄糖标准曲线
Fig.1 Standard curve of glucose

1.4.6 白灵菇不同菌株菌丝拮抗实验

将活化后的供试菌株沿菌落边缘切下直径 5mm 的菌块, 三株按照“品”字形同时接种于一个 PDA 平板上, 三次重复, 25°C 避光培养, 观察不同菌株间是否有拮抗线的存在, 以及拮抗线是否明显, 并作记录。

2 结果与分析

2.1 白灵菇不同菌株菌丝生长特性比较

培养白灵菇菌丝体 5d 后分别测定菌丝长度, 计算平均生长速度。从表 1 可以看出, 在相同培养条件下, 不同菌株的菌丝生长势(图 2)和生长速度存在一定的差异, 菌株的菌落半径与长势基本一致, 生长旺盛的菌株不仅生长速度快, 而且菌丝致密。菌株 pL03-7 菌丝生长速度最快, 日均生长长度为 7.35mm; 菌株 PN-1 和 PN-9 分别为 6.63mm 和 6.17mm。

2.2 白灵菇不同菌株菌丝体生物量比较

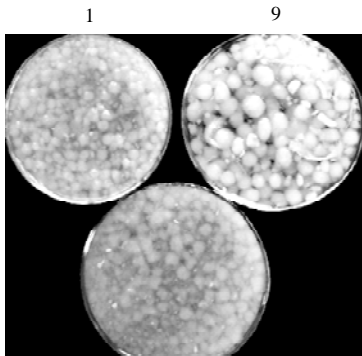
白灵菇经液体发酵培养 10d 后, 形成了菌丝体小

表1 供试菌株菌丝生长速度的比较

Table 1 Comparison of hypha growth speeds of tested strains

菌株	菌丝生长速度(mm/d)			平均值(mm/d)
	I	II	III	
白灵菇 PN-1	6.58	6.43	6.87	6.63
白灵菇 PN-9	6.25	6.38	5.89	6.17
白灵菇 pL03-7	7.56	7.38	7.12	7.35

球, 大小均匀, 密度较高(图2)。白灵菇不同菌株菌丝体生物量见表2。菌株 pL03-7 菌丝体生物量最高, 达 1.0612g/150ml, 其次是菌株 PN-1, 达 0.8659g/150ml, 菌株 PN-9 最低, 达 0.8259g/150ml。推知菌丝密度与菌丝体生物量呈正相关。



1. PN-1; 9. PN-9; PL. pL03-7。

图2 供试菌株液体发酵结果

Fig.2 Liquid ferment results of tested strains

表2 供试菌株菌丝体生物量比较(g/150ml)

Table 2 Comparison of mycelial biomass of tested strains (g/150ml)

菌株	菌丝体生物量			平均值
	I	II	III	
白灵菇 PN-1	0.8376	0.7748	0.9852	0.8659
白灵菇 PN-9	0.9156	0.7297	0.8325	0.8259
白灵菇 pL03-7	1.2312	0.9958	0.9565	1.0612

2.3 白灵菇不同菌株菌丝体多糖含量的比较

对白灵菇不同菌株菌丝体多糖含量的测定结果如表3所示, PN-1 和 PN-9 之间菌丝体多糖含量差异不显著, 含量分别为 73.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 72.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。虽然白灵 pL03-7 菌株的生物量最高, 但多糖含量最低, 仅为 63.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。可见, 菌丝体多糖含量与生物量不呈正相关关系。

2.4 白灵菇不同菌株菌丝拮抗性实验

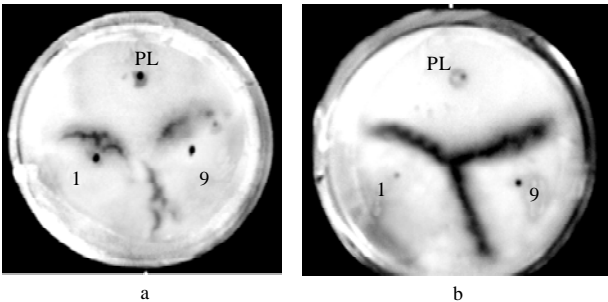
拮抗反应是鉴定菌株差异的重要方法之一, 菌丝间的拮抗反应表现了菌株间的不同遗传特性, 供试菌株间的亲缘关系不同, 所产生的拮抗线也不同。3 个供试菌

表3 供试菌株菌丝体多糖含量比较($\mu\text{g}/\text{mg}$)

Table 3 Comparison of mycelial polysaccharide content of tested strains ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

菌株	菌丝体多糖含量			平均值
	I	II	III	
白灵菇 PN-1	76.25	70.36	75.19	73.93
白灵菇 PN-9	74.34	75.26	67.27	72.29
白灵菇 pL03-7	61.02	63.23	67.14	63.80

株在培养 7d 后开始呈现拮抗反应; 培养 12d 后 3 个菌株间都出现了明显的拮抗线, 说明它们不属同一亲和群, 在遗传上亲缘关系较远(图3)。



a. 7d 后的拮抗反应; b. 12d 后的拮抗反应。

图3 供试菌株间的拮抗反应

Fig.3 Antagonistic effects among tested strains

3 讨论

固体培养基的最优配方不一定适合摇瓶培养。仅有平板培养基成分葡萄糖、蛋白胨和磷酸二氢钾, 发酵培养效果很不理想, 菌丝体生长缓慢。若添加酵母膏、硫酸镁和 VB, 生长明显改善, 几天后就形成数量较多的菌丝体小球, 生物量也较大。如果将封口材料由胶皮塞改为八层纱布, 菌丝球生长更加改善, 菌球直径较大, 数量较多。这充分说明氧气、无机盐和微量元素等对食用菌液体深层发酵的重要作用^[7]。

因为单糖溶于乙醇, 而多糖不溶于乙醇。在提取白灵菇菌丝体多糖时, 85% 乙醇的作用是去除单糖, 防止对多糖测定产生干扰。利用硫酸-苯酚分光光度法测定白灵菇中多糖含量的原理是白灵菇多糖在硫酸的作用下先水解为单糖, 单糖迅速脱水形成糖醛衍生物, 然后与苯酚结合为有色化合物, 在 485nm 处有最大吸收。本法简单, 显色稳定, 灵敏度高, 重现性好。在整个测定过程中应使用同一空白对照, 同时必须注意玻璃仪器的洁净度及间隔时间的长短, 应尽量做到每一样品均在同样的条件下测定。尤其要注意浓硫酸的加入方式和放置时间, 因为浓硫酸遇水产生大量热, 而热量对于反应结果影响很大, 浓硫酸应直接加入样品中, 而

不应沿壁加入,否则会造成实际加入硫酸的时间很难控制,反应体系颜色差别很大,作出的标准曲线很难成一条直线^[8]。

拮抗试验是鉴定菌株间遗传差异的传统方法。菌丝之间的拮抗反应是菌株间不同遗传特性的重要表现,表明不同菌株属于不同亲和群。在本实验中,白灵菇3个菌株间菌丝互相不亲和,拮抗作用均较明显,说明彼此遗传关系较远。

参考文献:

- [1] 蒲训,齐进军.白灵菇分类学特性诠释[J].甘肃科学学报,2001,13(4):48-50.
- [2] MIZUNO M, MINATO K I, ITO H. Antitumor, polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei murill* [J]. *Biochem Molecular Biol Int*, 1999, 47(4): 704-707.
- [3] 李永泉,吴炬,花立民,等.白阿魏菇菌丝体多糖体外抗氧化活性[J].兰州大学学报,2003,39(6):70-73.
- [4] TOSHIO M, MOTOHIRO N. Studies on fungal polysaccharides[J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(12): 3611-3616.
- [5] 张萍,梁建光,杨立红,等.草菇不同菌株的生物学特性研究[J].中国食用菌,2005,24(2):17-19.
- [6] 姚自奇,兰进.杏鲍菇不同菌株生物学特性的研究[J].食用菌学报,2005,12(2):14-18.
- [7] 张长青,张建民,赵明敏,等.培养基配方对白灵菇菌丝生长的影响[J].贵州农业科学,2007,35(1):18-20.
- [8] 黄建华,范文秀.白灵菇多糖的提取及含量的测定[J].光谱实验室,2005,22(5):1014-1016.