

# 香菇 939菌株单核菌丝和双核菌丝多糖产量比较

申进文, 王淑敏, 戚元成, 高玉千, 梁振普, 邱立友\*

(河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

**摘要:** 香菇 939菌株的担孢子萌发成的单核菌丝菌落, 根据其特征可分为 4 种类型: S 型 (菌丝贴生型); A 型 (粉状致密型); R 型 (菌丝稀薄型) 和 H 型 (绒毛气生型)。摇瓶液体培养单核菌丝和双核菌丝, 根据其产多糖能力, 可将 4 种类型单核菌丝分为两组: 第 1 组 S 型和 R 型, 多糖产量和双核菌丝相似; 第 2 组 A 型和 H 型, 多糖产量显著低于第 1 组。菌丝贴生型单核菌丝菌落 S1 高产多糖所需的营养和环境条件与其亲本双核菌丝基本相同, 但是, 易利用的碳源葡萄糖、蔗糖和麦芽糖对单核菌丝产多糖有较大的抑制作用, 而对双核菌丝产多糖的影响则较小。单核菌丝对高溶氧水平没有双核菌丝敏感, 高溶氧水平对双核菌丝产多糖有明显的抑制作用。发酵液初始 pH 值偏酸性对双核菌丝产多糖不利, 而对单核菌丝产多糖影响较小。

**关键词:** 香菇; 单核菌丝; 双核菌丝; 香菇多糖

中图分类号: S 646.1<sup>+</sup>2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 04-0941-06

## Comparing the Lentinan Yield of the Monokaryontic Mycelia to the Dikaryotic Mycelia from *Lentinula edodes* 939

SHEN jin-wen, WANG Shu-min, QI Yuan-cheng, GAO Yu-qian, LIANG Zhen-pu, and QIU Li-you\*

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Lentinan (LN) is a very important immunomodulator. The characteristics of producing LN of monokaryontic mycelia developed from the basidiospores have not been reported. Our research demonstrated that the monokaryontic mycelia colonies developed from basidiospores of *Lentinula edodes* 939 could be classified into four types: type S, sticking; type A, appressed; type R, rare and thin; type H, fine hair. The four types of the monokaryontic mycelia could divide into two groups based on the LN yield by shaking flask cultivation. The first group included type S and R where LN production was similar to that of the dikaryotic mycelia; the second group included type A and H where LN production was significantly lower than that of the first group. The nutrition and environment required for producing LN of monokaryontic mycelia S1 of type S were basically similar to that of its parent dikaryotic mycelia. However, same as glucose, the easily utilized C sources, such as sucrose and maltose, displayed strong repression on S1 for producing LN but weak repression on dikaryotic mycelia. Monokaryontic mycelia were not as sensitive to high dissolved oxygen as dikaryotic mycelia which could be considerably repressed. An initial lower pH of liquid media did not profit dikaryotic mycelia to produce LN, but had little effect on monokaryontic mycelia.

**Key words:** *Lentinula edodes*; Monokaryontic mycelia; Dikaryotic mycelia; Lentinan

香菇 (*Lentinula edodes*) 是世界上生产规模最大的食用菌之一, 年产量仅次于双孢蘑菇。香菇细胞壁中的葡聚糖主要是带有 -1,6 葡聚糖分枝的 -1,3 葡聚糖, 称为香菇多糖 (lentinan, LN)。自 20

收稿日期: 2007 - 04 - 09; 修回日期: 2007 - 06 - 28

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524040003)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qliyou@henau.edu.cn)

世纪 60 年代未发现香菇多糖具有抗肿瘤活性以来, 大量研究表明, 香菇多糖能提高人体免疫能力, 具有抗病毒, 抗肿瘤和刺激干扰素形成等多种医疗保健功效 (Chihara et al, 1969; Markova et al, 2005; Zhang et al, 2005)。

目前香菇多糖的生产主要是从香菇子实体中提取, 工艺复杂, 收得率低, 加上香菇子实体生产周期长、易受环境影响等因素, 导致香菇多糖生产成本高, 产量小, 价格昂贵, 远不能满足临床和保健需要。若采用深层发酵法生产香菇多糖, 生产周期则大大缩短, 且每 100 mL 发酵液所含有的多糖总量与 100 g 鲜香菇相当, 因而成本低, 易于工业化生产 (雷敬敷等, 1993)。然而, 现有香菇菌种多糖产量低, 难以满足液体发酵工业化生产的需要。所以, 应用遗传育种手段提高香菇菌种多糖产量十分必要。发酵生产用香菇菌种为双核菌丝, 诱变育种时不易得到稳定的突变株, 采用其担孢子或单核菌丝进行诱变育种则较容易获得稳定的突变株。因此, 香菇的担孢子或单核菌丝是进行遗传育种的良好材料。有关香菇单核菌丝产多糖的研究尚未见报道。

本研究中对香菇单核菌丝产多糖的特性与双核菌丝加以比较, 为应用单核菌丝作为高产香菇多糖的育种材料打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及其培养基

香菇 939 (*Lentinula edodes* '939') 由河南省农业科学院食用菌研究开发中心提供。

母种培养基 (PDA)、原种培养基和栽培培养基配方见赵柏叶等 (1998) 的报道。液体发酵培养基配方是黄豆粉 10 g, 葡萄糖 30 g, 酵母膏 5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, 维生素  $\text{B}_1$  0.05 g, 水 1 L, pH 6.0。

### 1.2 香菇担孢子分离和单核菌丝鉴定、菌落分型

按常规方法栽培香菇。取八分成熟的新鲜子实体, 弹射法 (赵柏叶等, 1998) 收集担孢子。用无菌水将新鲜的担孢子制成孢子悬液, 以一定的稀释度涂布 PDA 平板, 25℃ 恒温培养 5~7 d, 对单个孢子萌发形成的菌落, 经形态观察分型, 镜检无锁状联合确定为单核菌丝。

### 1.3 单核菌丝和双核菌丝液体发酵产多糖

将香菇 939 菌株的单核菌丝和双核菌丝分别接种于液体发酵培养基中, 装液量为 0.25 L 三角瓶装 0.1 L 培养液, 震荡培养 ( $25^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 分别测定产糖时程曲线, 确定产糖高峰期。以下试验均于产糖高峰期采用苯酚—硫酸法 (于村和吕鑫, 2000) 测定多糖含量。

### 1.4 单核菌丝和双核菌丝发酵条件的比较

选取产多糖量最高的菌丝贴生型菌落单核菌丝 S1 及其亲本香菇 939 菌株的双核菌丝, 在液体发酵培养基的基础上, 分别采用不同的碳源、氮源、金属离子、初始 pH 值、装液量进行摇瓶培养 ( $25^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 于产糖高峰期测定多糖含量。结果取 3 次重复的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 单核菌丝菌落的分型

在 PDA 培养基平板上培养 5~7 d, 担孢子萌发长成单菌落, 镜检菌丝无锁状联合, 鉴定为单核菌丝。

根据菌落特征, 将单核菌丝菌落分为 4 种类型 (图 1): S 型 (菌丝贴生型), 菌丝贴生于培养基表面, 菌落大, 菌丝稀疏, 长势不均匀; A 型 (粉状致密型), 菌丝贴生于培养基表面, 菌丝致密, 菌落有白色斑点, 生长不均匀; R 型 (菌丝稀薄型), 菌丝非常稀薄, 肉眼几乎看不到菌丝, 对着灯光隐约可见菌丝; H 型 (绒毛气生型), 菌丝绒毛状, 气生菌丝明显, 菌丝洁白, 均匀。

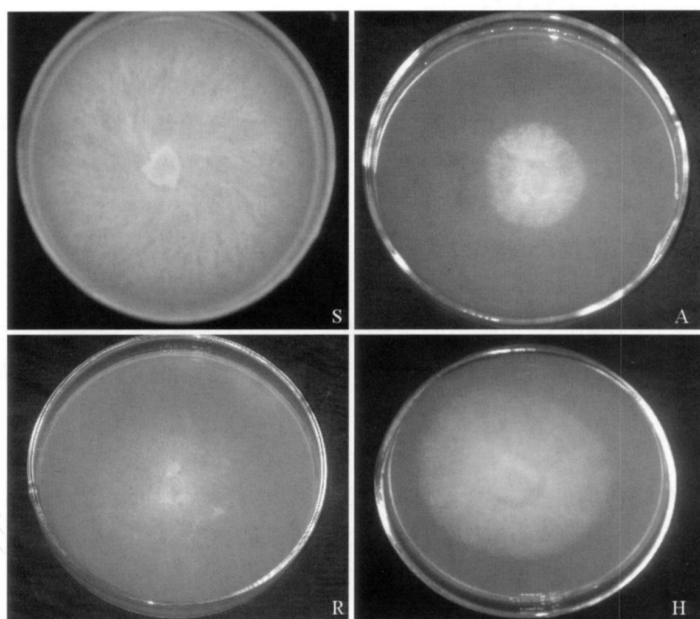


图 1 香菇 939 单核菌丝菌落的 4 种类型

S: 菌丝贴生型; A: 粉状致密型; R: 菌丝稀薄型; H: 绒毛气生型。

Fig 1 Four types of monokaryotic mycelia of *L. edodes* 939

S: Sticking type; A: Appressed type; R: Rare and thin type; H: Fine hair type.

## 2.2 单核菌丝和双核菌丝产多糖量的比较

### 2.2.1 双核菌丝和单核菌丝 S1 产多糖时程的比较

分别摇瓶培养香菇 939 菌株的单核菌丝 S1 和双核菌丝，单核菌丝 S1 培养到第 18 天时，产糖量达到最大值  $1\,024.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；双核菌丝培养到第 11 天时，产糖量达到最大值  $888.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 2)。双核菌丝的产糖高峰期比单核菌丝 S1 提前 7 d，但单核菌丝 S1 高峰期产糖量比双核菌丝高 15.25%。

培养过程中单、双核菌丝发酵液的 pH 值均呈现先高后低的趋势，当产糖量达到高峰时，发酵液 pH 值降至最低 (图 2)，这与前人的报道 (赵永勋和张跃华, 2004) 一致。

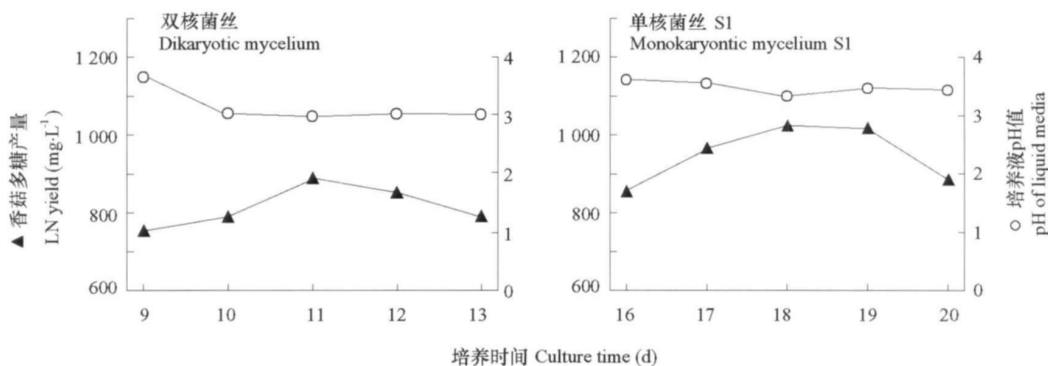


图 2 香菇 939 单核菌丝 S1 和双核菌丝产多糖时程

Fig 2 Time curves of producing LN for monokaryotic mycelium S1 and dikaryotic mycelia of *L. edodes* 939

### 2.2.2 单核菌丝和双核菌丝产多糖量的比较

随机选取香菇 939 菌株的双核菌丝和 4 种不同类型的单核菌丝的单菌落各 5 个, 接入液体发酵培养基中, 培养至产糖高峰期测定多糖量。S 型和 R 型产糖量较高, 均为  $861.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; A 型和 H 型较低, 平均为  $795.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 差异达极显著水平。然而, 单核菌丝 S 型和 R 型的平均产糖量与双核菌丝  $864.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  非常接近, 经方差分析没有差别, 其中 S 型单核菌丝长速快, 产糖量高, 选取代表菌落 S1 用于以下试验。

### 2.3 发酵条件对单核和双核菌丝产多糖的影响

#### 2.3.1 碳源的影响

如图 3 所示, 淀粉 (3.0%) 作为碳源时单核菌丝 S1 和双核菌丝产多糖量最大; 另外 3 种碳源葡萄糖、蔗糖和麦芽糖 (均为 3.0%) 对单核菌丝 S1 产多糖有较大的抑制作用, 而对双核菌丝产多糖影响较小。

#### 2.3.2 氮源的影响

酵母膏 (1.5%) 作氮源时, 单核菌丝 S1 和双核菌丝产糖量均最高, 用其他氮源物质 (均为 1.5%) 时产糖量都较低, 尤其是使用无机氮时仅产生微量的多糖 (图 3)。

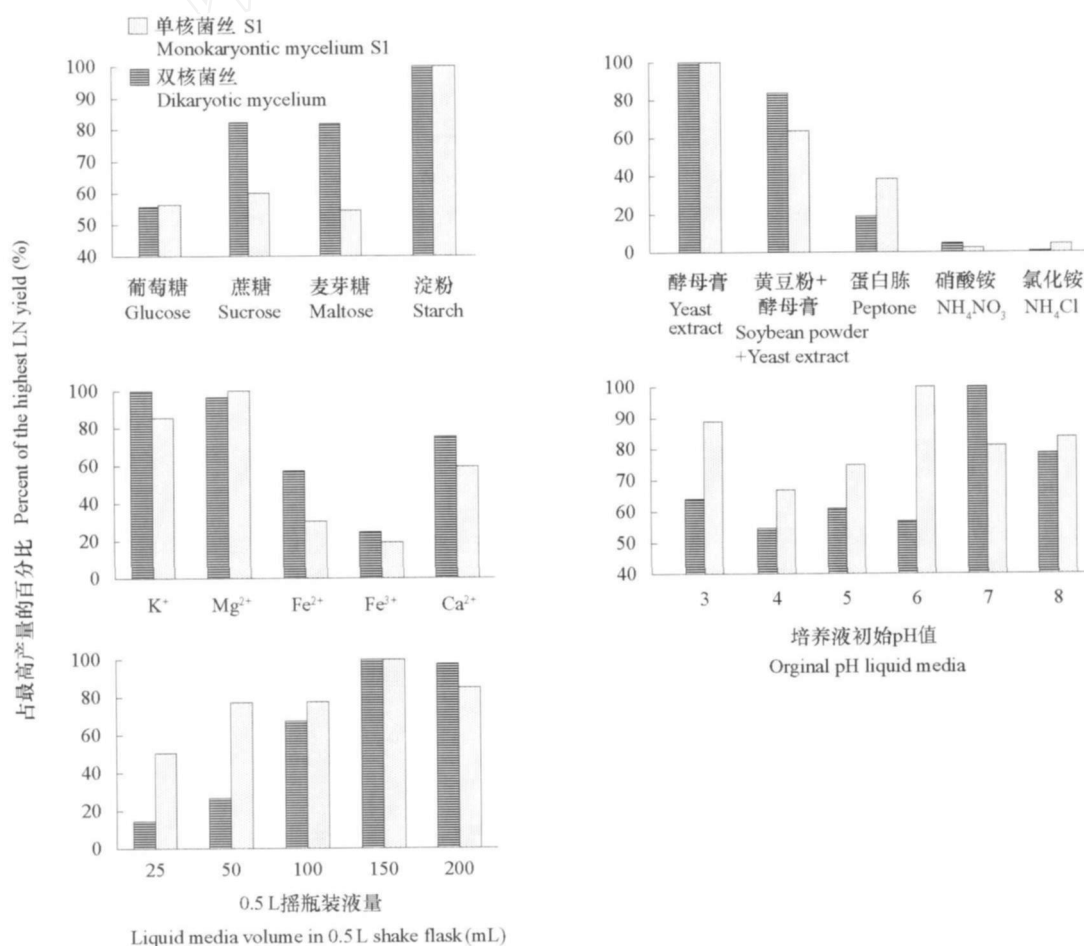


图 3 发酵条件对香菇 939 单核菌丝 S1 和双核菌丝产多糖的影响

Fig. 3 Effect of conditions on LN production of monokaryotic mycelia S1 and dikaryotic mycelia of *Lentinula edodes* 939

### 2.3.3 金属离子的影响

$K^+$ 、 $Mg^{2+}$  (均为 0.15%) 对单核菌丝 S1 产多糖有较大的促进作用, 尤其是添加  $Mg^{2+}$  产多糖量最高, 添加  $Ca^{2+}$  多糖产量居中, 而添加  $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  (均为 0.15%) 多糖产量仅分别是最高值的 30.2% 和 19.1%。 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  对双核菌丝产多糖有较大的促进作用, 添加  $K^+$  多糖产量最高, 添加  $Fe^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  多糖产量仅分别是最高值的 57.3% 和 24.5%。

### 2.3.4 pH 值的影响

如图 3 所示, 培养液初始 pH 6.0 时单核菌丝 S1 产多糖量最高, 初始 pH 7.0 时双核菌丝产糖量最高。发酵液初始 pH 值偏酸性时对双核菌丝产多糖影响较大, 而对单核菌丝产多糖影响较小。

### 2.3.5 装液量的影响

在 0.5 L 三角瓶中分别装入 25 ~ 200 mL 的培养液, 试验溶氧水平对产多糖的影响。随着装液量的增加, 单核菌丝 S1 和双核菌丝产多糖量随之增加, 但当装液量增加到 200 mL 时产多糖量有所下降。单核菌丝对高溶氧水平没有双核菌丝敏感, 高溶氧水平对双核菌丝产多糖有明显的抑制作用, 装液量为 25、50 mL 时, 双核菌丝的产多糖量仅是其最高值的 14.4%、26.6%, 相应地, 单核菌丝的产多糖量分别是其最高值的 50.5% 和 77.0%。

## 3 讨论

香菇是一种典型的四极性异宗结合的担子菌, 其子实体可以产生 4 种交配型的孢子。根据香菇 939 菌株的单核菌丝菌落的生长特征和菌落形态, 我们将其分为 4 种类型: S 型 (菌丝贴生型)、A 型 (粉状致密型)、R 型 (菌丝稀薄型) 和 H 型 (绒毛气生型)。其中, 后 3 种形态与李莉云等 (1997) 报道的形态特征基本相同。张善财等 (2002) 和许益财等 (2003) 也报道了 4 种形态, 但由于没有图片资料, 无法进一步比对。

单核菌丝的形态是受基因控制的, 这些形态和交配型的多态性与遗传物质的多样性是否有一定的相关性, 还有待于进一步验证。

Niederpruem 等 (1977) 发现, 裂褶菌的单核菌丝多糖产量显著高于由其配对形成的双核菌丝, 认为可能是由于双核菌丝具有形成子实体的能力, 所以其产多糖低。但也有相反的情况。Prokop 等 (1992) 的研究表明, 裂褶菌 ATCC38548 菌株的单核菌丝, 不论是从双核菌丝制备原生质体得到的, 还是从担孢子得到的, 其多糖产量均明显低于双核菌丝; 通过制备原生质体得到 1 株产多糖量较高的单核菌丝与来自其他菌株的交配型不同的单核菌丝杂交, 得到的双核菌丝产多糖量均高于其双亲单核菌丝。

作者对香菇 939 菌株单、双核菌丝产多糖的研究结果与裂褶菌有明显不同。4 种不同类型单核菌丝根据其产多糖能力, 可分为两组。第一组 S 型 (菌丝贴生型) 和 R 型 (菌丝稀薄型), 其多糖产量和双核菌丝基本相同; 第二组 A 型 (粉状致密型) 和 H 型 (绒毛气生型), 其多糖产量显著低于双核菌丝和第一组单核菌丝。因此, 裂褶菌单、双核菌丝和香菇单、双核菌丝产多糖的机理有待进一步研究。

除了多糖产量不同外, Prokop 等 (1992) 还观察到, 不论是在合成培养基上, 还是在天然培养基上, 裂褶菌 ATCC38548 菌株的单、双核菌丝的生长速度和生长量没有明显不同, 但是, 单核菌丝的 -1,3 葡聚糖酶活性则显著高于双核菌丝, 这也可能是单核菌丝产多糖量低的一个原因。本研究结果表明, 不论是在固体培养基还是在液体培养基上, 香菇 939 菌株的单核菌丝生长速度均比双核菌丝慢, 生产多糖周期长, 需进一步研究解决。

对菌丝贴生型单核菌丝 S1 和其亲本双核菌丝高产多糖的营养和环境条件的比较发现, 单核菌丝 S1 和双核菌丝二者所需的适宜的碳源、氮源、金属离子、发酵液的初始 pH 值和溶氧水平表现出基本

相同的趋势,但也有一定的差别。易利用碳源葡萄糖、蔗糖和麦芽糖对单核菌丝产多糖有较大的抑制作用,而对双核菌丝产多糖的影响则较小。单核菌丝对高溶氧水平没有双核菌丝敏感,高溶氧水平对双核菌丝产多糖有明显的抑制作用。与之相似,发酵液初始 pH 值偏酸性不利于双核菌丝产多糖,而对单核菌丝产多糖影响较小。

## References

- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fumiko F. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing Nature, 222: 687 - 688.
- Lei Jing-fu, Zhang Ling, Li Xing-yi. 1993. Fermentation process and extraction of lentinan. Edible fungi of China, 12 (3): 31 - 35. (in Chinese)
- 雷敬敷, 张 玲, 李兴义. 1993. 香菇发酵工艺和香菇多糖的提取. 中国食用菌, 12 (3): 31 - 35.
- Li Li-yun, Liu Guo-zhen, Jia Jian-hang, Liu Zhen-yue. 1997. Analysis of polymorphisms for monokaryotic mycelia of *Lentinula edodes* strains. J. Hebei Agricultural University, 20 (2): 36 - 40. (in Chinese)
- 李莉云, 刘国振, 贾建航, 刘振岳. 1997. 香菇单核菌丝多态性研究. 河北农业大学学报, 20 (2): 36 - 40.
- Markova N, Michailova L, Kussovski V, Jourdanova M, Radoucheva T. 2005. Intranasal application of lentinan enhances bactericidal activity of rat alveolar macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. Pharmazie, 60: 42 - 48.
- Niedepfuer D J, Marshall C, Speth J L. 1977. Control of extracellular slime accumulation in monokaryons and resultant dikaryons of *Schizophyllum commune*. Sabouraudia, 15: 283 - 295.
- Prokop A, Rapp P, Wagner F. 1992. Production of extracellular b-1,3/b-1,6-glucan by mono- and dikaryons of *Schizophyllum commune*. Experimental Mycology, 16 (1): 197 - 206.
- Xu Yi-cai, Jiao Yan-ying, Li Yan-qiu, Yu Wen-hai, Xue Jian-chen, Pang Yu-fen, Zhao Guo-qiang. 2003. New strain 'Fuxiang No. 1' of *Lentinula edodes* improvement by single spore crossing. Edible Fungi, 25 (3): 10 - 11. (in Chinese)
- 许益财, 焦言英, 李艳秋, 于文海, 薛建臣, 庞玉芬, 赵国强. 2003. 香菇单孢杂交新品种 '抚香一号' 选育. 食用菌, 25 (3): 10 - 11.
- Yu Cun, L ÜXin. 2000. Study on detection method of lentinan. China Public Health, 16 (3): 245 - 246. (in Chinese)
- 于 村, 吕 鑫. 2000. 香菇多糖测定的方法学研究. 中国公共卫生, 16 (3): 245 - 246.
- Zhang L, Li X, Xu X, Zeng F. 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. Carbohydrate Research, 340: 1515 - 1521.
- Zhang Shan-cai, Cao Yu-qian, Chi Feng, Zhang Yin, Zhang Bing. 2002. Study on the new strain No. 1363 of *Lentinula edodes* improvement. Edible Fungi of China, 21 (1): 40 - 41. (in Chinese)
- 张善财, 曹玉谦, 迟 峰, 张 印, 张 兵. 2002. 香菇杂交新菌株 1363 号的选育研究. 中国食用菌, 21 (1): 40 - 41.
- Zhao Bo-ye, Miao Xue-xia, Chen Hong-ge, Hu Yu, Guo Xia-li. 1998. Spore collection of edible fungi. In: Yao Zhan-fang, Wu Yun-han eds. Microbial experiment technology. Beijing: Meteorologic Press. (in Chinese)
- 赵柏叶, 苗雪霞, 陈红歌, 胡 渝, 郭夏丽. 1998. 食用菌孢子收集法. 见: 姚占芳, 吴云汉主编. 微生物学实验技术. 北京: 气象出版社.
- Zhao Yong-xun, Zhang Yue-hua. 2004. Effects of various inducers on lentinan and enzymes in the liquid cultivating of *Lentinus edodes*. Journal Jijmusi University, 22 (1): 80 - 83. (in Chinese)
- 赵永勋, 张跃华. 2004. 香菇液体培养中不同诱导物对多糖和酶的影响. 佳木斯大学学报, 22 (1): 80 - 83.