

金福菇氮离子束诱变及诱变菌株性状评价研究

李 畅¹, 王 钰^{1,2*}, 梁昌柱¹, 董先茹¹, 凡启超¹

(1. 安徽大学资源与环境工程学院, 合肥 230601; 2. 安徽省中药材产业技术研发中心, 合肥 230601)

摘 要: 对金福菇出发菌株采用氮离子束进行诱变, 通过低温筛选出 5 个菌株, 测定诱变后各菌株的出菇产量、生物学效率和总糖、蛋白质、粗脂肪、粗纤维等营养成分以及降血脂成分洛伐他汀含量, 筛选出营养和保健价值较高的优质突变菌株。结果表明, 金福菇诱变菌株 JF-004 的生物学效率最高达到 76.64%, 其每栽培袋平均产量为 (191.60 ± 1.80) g。诱变菌株 JF-004 的蛋白质和粗纤维含量最高, 分别达到 35.26% 和 9.26%, 具有适中的总糖含量和较低粗脂肪含量, 符合低脂肪、高纤维的膳食结构; 同时 JF-004 的洛伐他汀含量在所有菌株中也达到最高, 子实体中含量为 (10.180 ± 0.123) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 是一株营养和保健价值较高的优质诱变菌株。

关键词: 金福菇; 氮离子束; 营养价值; 洛伐他汀

中图分类号: S646.1; S335.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)03-0444-05

Ion beam injection and mutation analysis in *Tricholoma lobayense heim*

LI Chang¹, WANG Yu^{1,2}, LIANG Changzhu¹, Dong Xianru¹, FAN Qichao¹

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601;

2. Industry Technology Research and Development Center for Chinese Medicinal Materials, Anhui University, Hefei 230601)

Abstract: *Tricholoma lobayense heim* fruit body was injected by ion beam to induce mutant strains. After treatment, the fruiting yield and biological efficiency of the strains were investigated. As results, a high quality mutant strain was screened out by determining the contents of conventional nutrients including the total sugar, protein, crude fat, crude fiber, and lovastatin (a hypolipidemic component). The results showed that the mutant strain JF-004 had the highest yield (191.60 ± 1.80) g, biological efficiency (76.64%), protein content (35.26%), and crude fiber (9.26%), a moderate total sugar, and a low crude fat content, which fits the low-fat and high-fiber dietary pattern and is beneficial to human health. The mutant strain JF-004 also had the highest lovastatin content $(10.180 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ in the sporocarp. The results indicated that JF-004 is a high-quality mutant strain.

Key words: *Tricholoma lobayense heim*; nitrogen ion beam; nutritional value; coating preservation

金福菇 (*Tricholoma lobayense heim*) 又名洛巴伊口蘑、大白口蘑^[1], 担子菌亚门, 层菌纲, 伞菌目, 口蘑科, 口蘑属^[2], 其肉肥厚嫩白、微带甜鲜, 营养丰富。金福菇是一种大型高温真菌, 出菇时间主要在夏季, 对出菇条件要求苛刻, 我国目前仅在福建、台湾等热带沿海地区少量分布, 尚未在内陆地区推广^[3]。如何使金福菇在内陆地区推广, 丰富国内金福菇品种是当前急需解决的问题。

伴随着国民生活水平的提高, 以动脉粥样硬化为基础的心脑血管疾病发病率也大大增加, 而血清

总胆固醇升高是心脑血管疾病的主要危险因素之一。人体中约 70% 的胆固醇是由自身合成, 其中 50% 以上是在肝脏中合成的, 抑制肝脏过多合成胆固醇是防止心脑血管疾病的一种有效途径^[4]。洛伐他汀是来自真菌代谢的天然他汀, 洛伐他汀通过抑制胆固醇合成的限速酶来阻断内源性胆固醇的合成, 降低细胞内的胆固醇含量^[5]。通过近期的研究发现, 洛伐他汀除了具有显著降血脂效果外, 还能明显改善内皮细胞的功能, 促进一氧化氮合成酶的产生, 从而增加一氧化氮的合成和释放, 这对维持人的正

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (11010302109) 和安徽大学研究生学术创新研究和强化项目 (yqh100266) 共同资助。

作者简介: 李 畅, 硕士。E-mail: Stefanie187@qq.com

* 通信作者: 王 钰, 教授, 博士生导师。E-mail: wangyu@ahu.edu.cn

常肺血管紧张度和逆转低氧诱导的肺血管收缩和血管重构具有关键性的作用^[6]。此外,洛伐他汀具有抗炎和抗增殖的作用,能抑制肾系膜细胞的增殖和细胞外基质的分泌,从而达到减轻肾小球硬化的目的^[7]。

本实验通过氮离子束注入金福菇,筛选出耐低温性较好,营养和保健价值较高的金福菇诱变菌株,丰富了金福菇品种,同时作为保健的食品也有益于预防心脑血管疾病,进而也降低了金福菇在内陆推广的难度。

1 材料与方 法

1.1 材 料

金福菇出发菌株 JF 由安徽大学资源与环境工程学院资源生物组实验室保存。

试剂:葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、蛋白胨、乙腈、乙醇、磷酸、浓硫酸、去离子水。

仪器:离子注入机,中国科学院合肥物质科学研究院;SCQ-2203 超声波清洗机,中国声彦超声设备公司;SW-CJ-CO 超净台,苏州超净设备仪器公司;RO-DI 超净饮水机,普利费尔超纯饮水机;AL104 分析天平,德国托利多-梅特勒仪器公司。

1.2 方 法

1.2.1 出发菌株的分离培养 采用组织分离法,将新鲜金福菇子实体表面消毒后剪取菌柄与菌盖结合部位组织接种入 PDA 培养基中,置于 28℃ 暗室培养 10 d,待组织表面发出菌丝进行挑取转管扩培养后得到出发菌株 JF(CK)。

1.2.2 离子束注入筛选 将出发菌株转接入 PDA 培养基,待菌丝长至直径为 5 cm 时,在空平板上制作成菌膜后进行离子注入。离子注入能量为 15 keV,诱变剂量: $180 \times 10^{13} \text{ N}^+ \cdot \text{cm}^{-2}$ (本实验室前期筛选的最佳诱变剂量)。用 2 mL 无菌水洗脱经离子束处理的菌丝单细胞,取 0.2 mL 菌丝悬液涂于 PDA 培养基平板上,置于 28℃ 下培养,待出现星芒状菌丝后转管培养,共获得 133 个单菌落,并将其放置在 25℃ 暗室培养,筛选出菌丝生长浓密且速度较快的菌株后转管培养。再将其放置在 20℃ 暗室培养,最后筛选出正常生长且菌丝较浓密 5 个菌株,编号为 JF-001、JF-002、JF-003、JF-004 和 JF-005。

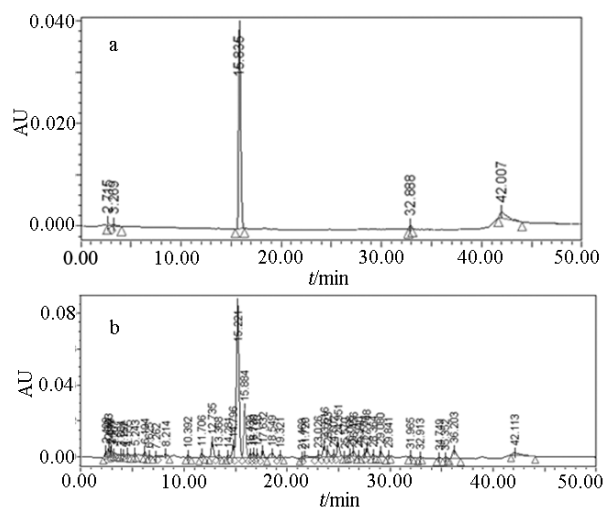
1.2.3 菌株的栽培及采收 将各菌株菌丝接种入灭菌的玉米原种培养基,待菌丝长满原种培养基,制作栽培袋(干重 250 g),拌料、装袋并灭菌,再将各原种转接入栽培袋培养料中。待栽培袋长满后,脱袋覆土,控制温度在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度(RH)

为 $(80 \pm 5)\%$ 。每菌株栽培 10 袋,重复 3 次,出菇后记录各菌株产量并计算生物学效率(生物学效率=食用菌鲜重/栽培料干重 $\times 100\%$)。

1.2.4 菌株营养成分测定 将各菌株子实体烘干至恒重后研磨,过 100 目筛后精密称取。子实体中总糖、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维含量分别用 GB/T15672-2009 方法^[8]、GB/T15673-2009 方法^[9]、GB/T15674-2009 方法^[10]、GB/T5009.10-2003 方法^[11]测定。3 次重复,取平均值(成分含量=检测值/供测试样品干粉重 $\times 100\%$)。

表 1 线性梯度洗脱流动相比例

时间/min Time	流动相 A/% 乙腈 Acetonitrile	流动相 B/% 0.1%磷酸 Phosphate
0~6	60	40
6~24	60→95	40→5
24~34	95	5
34~40	95→60	5→40
40~50	60	40



洛伐他汀标准品(a), 供试样品色谱图(b)
Lovastatin standard solution (a) and sample (b)

图 1 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram

1.2.5 洛伐他汀含量测定 供试样品溶液的制备: 取各菌株子实体,将其烘干至恒重后研磨,过 100 目筛。精密称取 1 g 样品(3 次重复),加入 5 mL 乙酸乙酯摇匀,70℃ 恒温水浴提取 1.5 h,3000 r·min⁻¹ 离心 8 min,取上清液真空冷冻干燥,加入 3 mL 乙腈溶解,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,得滤液备用。

标准品溶液的配制:精密称取洛伐他汀标准品 0.0050 g,乙腈溶解定容至 100 mL,摇匀,即得 0.0500 mg·mL⁻¹ 对照品储备溶液。依次用乙腈稀释

制成含洛伐他汀 0.0050、0.01000、0.0150、0.0200 和 0.0250 mg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液。

高效液相色谱条件：色谱柱为 Agilent TC-C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 0.01% 磷酸溶液，按表 1 进行线性梯度洗脱；流速为 1 mL·min⁻¹；进样量 10 μL；检测波长为 238 nm；柱温 40℃。标准品与供试样品色谱图如图 1 所示。

1.2.6 遗传稳定性评价 将筛选出的优质诱变菌株传代培养，通过连续 5 代、10 代、15 代后进行液体发酵实验（液体培养基体积为 250 mL，接种量为 4%），测定其生物量有无明显退化。

1.2.7 数据处理 实验采用 Excel 2010 和 SPSS19 软件对实验数据进行整理和方差分析。

2 结果与分析

2.1 出发及诱变菌株出菇产量及生物学效率

在(20±2)℃条件下，各菌株均能正常出菇，但出发菌株从菌丝爬土到子实体的形成时间较长。测定出发菌株及各诱变菌株在棉籽壳栽培料中的出菇产量及生物学效率如表 2 所示。由表 2 可知，诱变菌株 JF-004 的出菇产量为 191.60 g，生物学效率达到 76.64%，与出发菌株 JF(CK)有显著性差异，说明其在低于正常出菇温度的情况下仍是一株高产诱变菌株。

2.2 出发及诱变菌株营养成分测定

金福菇各菌株的营养成分含量如表 3。从表 3 可以看出，脂肪含量最低的菌株是 JF-001，其脂肪含量为 8.25%；总糖含量最高的菌株是 JF-004 达到 37.81%；菌株 JF-004 的蛋白质和粗纤维含量最高，分别达到了 35.26%和 9.26%。且这 3 个菌株相应物

质的含量与出发菌株 JF(CK)均有显著性差异；诱变菌株 JF-004 的蛋白质、粗纤维含量最高，同时具有适中的总糖含量和较低的粗脂肪含量，符合低脂肪、高纤维的膳食结构，对人体健康更为有益，是一株常规营养价值较高的诱变菌株。

2.3 出发及诱变菌株洛伐他汀含量测定

制备供试样品和标准品溶液后，进行测定，并对建立的方法进行精密度、稳定性、重复性和样品回收率等方法学验证。

表 2 出发及诱变菌株出菇产量及生物学效率

菌株 Strain	出菇产量/g·袋 ⁻¹ Fruit body yield per bag	生物学效率/% Biological efficiency
JF(CK)	182.34±1.52 ^b	72.94
JF-001	180.72±2.05 ^b	72.29
JF-002	172.04±2.16 ^a	68.82
JF-003	185.88±1.93 ^c	74.35
JF-004	191.60±1.89 ^d	76.64
JF-005	173.81±1.72 ^a	69.52

线性关系考察：精密吸取各标准品溶液 10 μL 注入液相色谱仪，记录峰面积，以峰面积(Y)为纵坐标，洛伐他汀标准品的浓度(X)为横坐标，得线性回归方程为： $Y = 4E+07X-6976.1$ ， $R^2 = 0.9982$ 。说明本方法线性关系良好，标准曲线可用。

精密度试验：精密量取同一浓度标准品溶液各 10 μL，连续进样测定 6 次，根据测定的洛伐他汀峰面积的结果计算 RSD 为 0.68%，说明精密度良好。

稳定性试验：取同一供试样品溶液，分别于 0、2、4、8 和 12 h，进行测定，根据测定的洛伐他汀峰面积的结果计算得 RSD 为 1.6%，表明供试样品溶液在 12 h 内稳定。

表 3 各菌株常规营养成分测定结果

Table 3 Conventional nutrition determination results of the strains

成分 Composition	菌株营养成分含量/% Nutrient content of the strains					
	JF(CK)	JF-001	JF-002	JF-003	JF-004	JF-005
总糖 Total sugar	34.94±0.71 ^a	36.67±0.51 ^b	34.83±0.87 ^a	34.97±0.40 ^a	37.81±0.81 ^b	34.48±0.80 ^a
蛋白质 Protein	31.35±0.58 ^a	31.52±0.74 ^a	31.73±0.81 ^a	31.41±0.46 ^a	35.26±0.45 ^c	33.57±0.85 ^b
粗脂肪 Crude fat	9.40±0.21 ^c	8.25±0.19 ^a	10.17±0.18 ^d	8.78±0.12 ^b	9.21±0.11 ^c	9.28±0.24 ^c
粗纤维 Crude fiber	8.29±0.41 ^b	7.68±0.45 ^{ab}	8.17±0.56 ^{ab}	7.32±0.73 ^a	9.26±0.37 ^c	7.41±0.39 ^{ab}

注：表中的数据为平均值±标准差，无相同标记字母两组间有显著差异 ($P < 0.05$)；有相同标记字母两组间无显著差异。下同。

Note: the data in the table are average value±SD, and those followed by different letters mean significant difference, while those with the same letters mean no significant difference. The same below.

重复性试验：平行制备 6 份供试品溶液，测定洛伐他汀含量。结果得样品中洛伐他汀含量的 RSD

为 1.1%，说明本方法的重复性良好。

样品回收率试验：精密称取已知含量的样品

1.0000 g, 共称取 9 份, 分别精密加入一定量的洛伐他汀对照品溶液, 再按样品溶液制备方法制备、测定, 计算得洛伐他汀平均回收率为 98.18%, RSD 为 0.69%, 表明该测定方法测定结果准确, 符合试验要求。

样品的测定: 各样品进样 10 μL , 记录洛伐他汀的峰面积, 以外标法计算含量。按干燥品计测定, 结果见表 4。

由表 4 结果可知, 在所有菌株中, 诱变菌株 JF-004 子实体中洛伐他汀的含量为 10.180 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 其洛伐他汀的含量为最高, 且与出发菌株均有显著差异, 具有更好的养生保健价值。综合常规营养成分和降血脂活性成分可知, 菌株 JF-004 是一株营养价值较高的诱变菌株。

表 4 各菌株子实体中洛伐他汀含量

Table 4 The content of lovastatin in the fruiting body of the strains

菌株 Strain	洛伐他汀含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Lovastatin content
JF-CK	3.103 \pm 0.098 ^b
JF-001	1.858 \pm 0.060 ^a
JF-002	3.534 \pm 0.071 ^c
JF-003	8.298 \pm 0.145 ^d
JF-004	10.180 \pm 0.123 ^f
JF-005	9.937 \pm 0.042 ^e

表 5 液体发酵诱变菌株 JF-004 生物量

Table 5 Liquid fermentation biomass using mutant strain JF-004 with different generations

菌株 Strain	生物量/ $\text{g}\cdot 250\text{mL}^{-1}$ Biomass
初代 The first generation	3.690 \pm 0.126 ^a
第 5 代 The fifth generation	3.605 \pm 0.899 ^a
第 10 代 The tenth generation	3.586 \pm 0.005 ^a
第 15 代 The fifteenth generation	3.637 \pm 0.099 ^a

2.4 遗传稳定性测定

对诱变菌株 JF-004 液体发酵后的生物量进行测定, 结果如表 5。进一步的方差分析结果表明, 经过传代培养诱变菌株的生物量变化基本不大且无显著性差异, 诱变菌株并未发生明显退化, 可见本实验筛选的诱变菌株 JF-004 遗传稳定性较好。

3 讨论

金福菇是高档优质食用菌, 目前品种较为单一, 适应性较差。为了更好地满足不同地域的要求, 推动金福菇在内陆的培育, 必须加快金福菇新品种选育。传统的化学诱变育种方法周期较长, 损伤高。本实

验所采用的氮离子束诱变技术已广泛应用于植物和微生物育种, 具有损伤轻、突变谱广、突变率高等优点^[12]。董先茹^[13]等利用氮离子束注入蟹味菇, 得到了蛋白质、粗纤维、麦角甾醇含量均比出发菌株有不同程度提高的菌株。严涛^[14]等利用氮离子注入猴头菇, 得到的突变菌株多糖、氨基酸含量均比出发菌株有不同程度的提高证明离子束注入是一种简易、适于食用菌的育种方法。通过氮离子束注入金福菇, 在设定温度下定向筛选出的金福菇诱变菌株, 在 (20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 条件下均能正常出菇, 而对比出发菌株的出菇温度范围 26~35 $^{\circ}\text{C}$, 诱变菌株对出菇要求的温度较低, 其中诱变菌株 JF-004 产量最高, 达到 191.60 g, 与出发菌株有显著差异, 是一株高产菌株; 且诱变菌株 JF-004 的蛋白质、粗纤维含量最高, 同时具有较高的总糖含量和较低的粗脂肪含量, 符合低脂肪、高纤维的膳食结构, 营养价值较高, 有利于降低生产成本, 提高经济效益, 减轻了金福菇开发和推广的难度。虽然物理诱变具有变异不稳定、易恢复, 但通过测定经传代培养后液体发酵的生物量变化验证了本实验筛选的诱变菌株稳定性良好, 对诱变菌株的推广提供了依据。

洛伐他汀作为心脑血管疾病所采用药物的主要成分, 通过延缓动脉粥样硬化进展、降低动脉粥样硬化斑块破裂的风险, 从而能够预防缺血所触发的心律失常, 且心脏性猝死与恶性室性心律失常密切相关, 进而有效的降低心血管疾病的死亡率和心脏性猝死的发生率^[5]。食用菌在我们日常生活中所占比例越来越大, 目前已有食用菌作为保健产品出现在市场上。且黄萍等通过研究证明猴头菇子实体和菌丝体多糖对大鼠胃溃疡和胃酸分泌均有一定的抑制作用^[15]。本实验通过离子束诱变筛选的洛伐他汀含量较高的金福菇菌株, 含量达到 10.180 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。若能得到广泛的推广, 作为日常保健食品供人食用, 便能够有效帮助人们在日常的饮食中预防和减缓心脑血管疾病发生的概率, 对人们的健康带来积极的作用。

参考文献:

- [1] 应建浙, 卯晓岚, 马启明. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 371.
- [2] 傅俊生, 蔡衍山, 柯丽娜, 等. 金福菇的交配型研究[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 10-12.
- [3] 李志生, 郭建铭, 陈躬国, 等. 金福菇生物学特性与栽培特性的研究[J]. 食用菌学报, 2005, 11(24): 255-260.
- [4] 黄卓, 李东栋. 洛伐他汀最新研究进展[J]. 中国生化药

- 物杂志, 2010, 11(2): 144-147.
- [5] 杜景霞. 他汀类药物的多向性效应研究进展[J]. 科教文汇, 2008(6): 200.
- [6] Ozaki K, Yamamoto T, Ishibashi T, et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelial-1 expression by fluvastatin in human vascular endothelial cells[J]. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 85(2): 147-154.
- [7] 何劲松, 钱敏, 蒋春明. 洛伐他汀对大鼠肾系膜细胞增殖和细胞外基质分泌的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2003, 24(6): 289-292.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 15672-2009 食用菌中总糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB/T 15673-2009 食用菌中粗蛋白质含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB/T 15674-2009 食用菌中粗脂肪含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] 食品卫生检验方法. 理化部分(一). GB/T 5009.10-2003 植物类食品中粗纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] 孙国琴, 邢丽萍, 王玉芬. 离子束注入技术在食用菌育种上的应用进展[J]. *内蒙古农业科技*, 2011(3): 103-104.
- [13] 董先茹, 叶翔, 梁昌柱. 氮离子束诱变蟹味菇菌株的营养价值及油菜秸秆栽培研究[J]. *食品工业科技*, 2013(12): 132-135.
- [14] 严涛, 李冠, 曾宪贤. N^+ 离子注入技术选育猴头菌优良菌株[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(3): 109-113.
- [15] 黄萍, 罗珍, 郭重仪, 等. 猴头菇胃黏膜保护作用研究[J]. *中药材*, 2011, 34(10): 1588-1590.