

原生质体紫外诱变法选育高产 γ -氨基丁酸秀珍菇菌株

张亚青¹, 张 美¹, 付佳伟¹, 楼 坚^{1,2,3}, 刘士旺^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘 要: 采用原生质体紫外诱变育种方法, 进行高产 γ -氨基丁酸的秀珍菇菌株选育工作, 对原生质体制备条件、再生条件和诱变株 γ -氨基丁酸含量进行了筛选分析。结果表明: MM 缓冲液中, 20 mg/mL 的溶壁酶能够有效去除秀珍菇细胞壁, 获得 2×10^6 个/mL 的原生质体; 在含有 0.5 mol/L 甘露醇的 YMG 培养基上, 原生质体再生率最高, 可达到 $0.65\% \pm 0.13\%$ 。35 W 紫外灯照射 1~2 min 时, 致死率可达到 76%~86%; 菌丝体和子实体中, 3 株突变株 γ -氨基丁酸含量较出发菌株分别提高了 20.7%、196.3%、126.8% 和 21.3%、237.8%、97.3%。诱变菌株的获得, 可为高值化富含 γ -氨基丁酸秀珍菇生产菌株的培育提供优异的育种材料。

关键词: 秀珍菇; 原生质体; 紫外诱变育种; γ -氨基丁酸

中图分类号: S646.1 文献标志码: A 文章编号: 1671-8798(2019)03-0198-08

Breeding of GABA-rich *Pleurotus geesteranus* strains through an ultraviolet ray-mediated protoplast mutagenesis method

ZHANG Yaqing¹, ZHANG Xian¹, FU Jiawei¹, LOU Jian^{1,2,3}, LIU Shiwang^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Province Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: An ultraviolet ray-mediated protoplast mutagenesis method was applied to breed γ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Pleurotus geesteranus* strains, screening conditions for protoplast preparation, protoplast regeneration and GABA concentrations in mutants. The results show that, concentration of protoplast of *Pleurotus geesteranus* could reach 2×10^6 cells/mL when 20 mg/mL (wt) lywallzyme being dissolved in MM buffer. The protoplast regeneration rate could top $0.65\% \pm 0.13\%$ on a YMG plus 0.5 mol/L mannitol medium. The lethal ratio could range from 76% to 86% when

收稿日期: 2019-01-18

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目(2015C02053)

通信作者: 楼 坚(1980—), 男, 浙江省杭州人, 讲师, 硕士, 主要从事农业生物资源生化制造研究。E-mail: loujianzst@126.com。

protoplasts being irradiated under a 35 W ultraviolet lamp for 1~2 minutes. GABA concentration in mycelia and fruiting bodies from 3 mutants has increased by 20.7% and 196.3%, 126.8% and 21.3%, 237.8% and 97.3% respectively, compared to those from the original strains. The acquisition of GABA-rich mutant strains can provide excellent breeding materials for cultivation of high-value GABA-rich *Pleurotus geesteranus* products.

Keywords: *Pleurotus geesteranus*; protoplast; ultraviolet-mediated mutagenesis breeding; GABA

秀珍菇又名环柄侧耳、环柄斗菇、姬平菇和小平菇等,隶属担子菌纲(*Basidiomycetes*)、伞菌目(*Agaricales*)、侧耳科(*Pleurotaceae*)、侧耳属(*Pleurotus*)^[1-2]。秀珍菇不仅营养丰富,而且味道鲜美,蛋白质含量比双孢蘑菇、香菇、草菇更高,质地细嫩,纤维含量少,口感脆嫩。有资料表明,秀珍菇中含蛋白质 3.65%~3.88%、粗脂肪 1.13%~1.18%、还原糖 0.87%~1.80%、糖分 23.94%~34.87%、木质素 2.64%、纤维素 12.85%、果胶 0.14%等。它的蛋白质含量高于香菇、蘑菇,接近于肉类,比一般蔬菜高 3~6 倍,含有 17 种以上氨基酸^[3]。它富含人体自身不能合成,日常饮食中通常又缺乏的苏氨酸、赖氨酸、亮氨酸等多种必需氨基酸,长期食用可提高人体免疫功能^[4-6]。因此,秀珍菇是一种高蛋白、低脂肪的营养食品^[7],具有独特的风味和生理功能,符合联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)对新食品资源开发“天然、营养、保健”的要求,具有广阔市场前景,也成为目前食用菌商业生产中研究的热点领域。

在秀珍菇培养基原料选择、生产栽培条件控制、栽培模式等研究基础上,人们对秀珍菇高品质菌株研究提出了更高的要求^[8-9],高品质高产量秀珍菇选育是众多秀珍菇研究者特别感兴趣的课题之一,但优质秀珍菇菌株选育方面的研究较少。因此,本文开展了秀珍菇原生质体的制备条件和诱变研究,以期筛选高质量高含量 γ -氨基丁酸(GABA)秀珍菇菌株及其利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与试剂

秀珍菇菌种 X1:浙江绿满都菌业自有生产种;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)购自杭州百思生物技术有限公司;蔗糖购自永华化学科技(江苏)有限公司;麦芽浸取物(Malt extract)购自北京双旋微生物培养基制品厂;纤维素酶(R10)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;溶壁酶(LWZ)购自广东碧德生物科技有限公司;葡萄糖购自江苏强盛功能化学股份有限公司; γ -氨基丁酸(GABA)购自阿拉丁试剂有限公司;2,4-二硝基氟苯(FDNB)购自西亚化工有限公司;乙酸、乙酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸氢钠均购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、山梨醇、甘露醇均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9246A),上海精宏实验设备有限公司;电子天平(TP-114),德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;恒温水浴锅(HH-4),江苏金坛市仪器厂;pH计(PB-10),德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;色谱柱 sunfire™ C18 5.0 μ m 4.6 mm \times 250 mm column 购自美国沃特世科技(上海)有限公司;高效液相色谱仪(UV/Visible detector),美国沃特世科技(上海)有限公司;高压灭菌锅(YXQ-LS-30SII),上海博讯实业有限公司医疗设备厂;无菌操作台(SW-CJ-2FD),苏州净化设备有限公司;恒温生化培养箱(HWS-250),宁波海曙赛福实验仪器厂;光照培养箱(BSG-250),上海博讯实业有限公司医疗设备厂;离心机(Allegra X-30R Centrifuge),美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.1.3 培养基及所用溶液配方

PDA 固体培养基:马铃薯葡萄糖琼脂粉末 43 g,双蒸水 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

PDA 液体培养基:马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,维生素 B₁ 0.01 g,双蒸水 1 000 mL,pH 值 7.2~7.4,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

YMG 固体培养基:麦芽浸取物 10 g,葡萄糖 4 g,酵母抽提物 4 g,琼脂 18 g,双蒸水 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

YMG 液体培养基:麦芽浸取物 10 g,葡萄糖 4 g,酵母抽提物 4 g,双蒸水 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

贮液 A:酒石酸铵 10 g,磷酸二氢钾 20 g,硫酸钠 5.8 g,磷酸氢二钠(无水)45 g,双蒸水定容至 500 mL,加入几滴氯仿室温保存。

贮液 B:硫胺素 0.02 g,双蒸水定容至 500 mL,过滤除菌后 4 ℃ 保存。

贮液 C:氯化镁 12.5 g,双蒸水定容至 500 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min,室温保存。

完全培养基(CM):葡萄糖 10 g,天冬酰胺 2 g,腺嘌呤硫酸盐 0.1 g,酵母提取物 0.75 g,麦芽提取物 1.13 g,酪蛋白胨 0.75 g,贮液 A 25 mL,贮液 B 1 mL,贮液 C 10 mL。固体培养基需要另加入 15 g 琼脂粉,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

固体再生培养基:麦芽糖 10 g,葡萄糖 4 g,酵母抽提物 4 g,琼脂 18 g,0.5~1.2 mol/L 稳渗剂,双蒸水定容到 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

稳渗剂为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mol/L 的蔗糖、山梨醇、氯化钠、甘露醇,过滤除菌。

0.2 mol/L 马来酸缓冲液:马来酸 4.64 g,双蒸水定容至 200 mL;马来酸钠 6.4g,双蒸水定容至 200 mL;将上述酸碱溶液以体积比 1:2.5 混合,调节 pH 值至 5.5,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

MM 缓冲液:1.0 mol/L 甘露醇 25 mL,0.2 mol/L 马来酸盐缓冲液(pH 值 5.5)12.5 mL,双蒸水 12.5 mL,过滤除菌。

MMC 缓冲液:1.0 mol/L 甘露醇 25 mL,0.2 mol/L 马来酸盐缓冲液(pH 值 5.5)12.5 mL,双蒸水 12.25 mL,氯化钙(1 mol/L)0.25 mL,过滤除菌。

溶壁酶或(纤维素酶)溶液:分别称取 0.02、0.03、0.04 g 溶壁酶或(纤维素酶)粉末溶于 2 mL 常温 MM 缓冲液中,获得 10、15、20 g/L 的酶液,用无菌的 0.4 μm 的微孔滤膜过滤除菌后放于 4 ℃ 冰箱中保存备用(当天配制当天使用)。

1% FDEB 溶液:量取 2 mL 2,4-二硝基氟苯置于 200 mL 乙腈中,保存于棕色试剂瓶中。

出菇物料:麸皮 170 g,木屑 280 g,磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,氧化钙 2 g,双蒸水 600 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化及菌丝体的培养

将 4 ℃ 保藏的 X1 菌种转接到 PDA 固体培养基上,于 25 ℃ 恒温培养箱下静置培养 5 d,待菌落直径长至 9 cm,占培养皿一半左右,且气生菌丝旺盛时,即获得活化秀珍菇菌种。切取绿豆大菌块,转接到 PDA 液体培养基后,于 25 ℃ 恒温培养箱下静置培养 7 d 左右,即可获得原生质体制备所需菌丝体^[10]。

1.2.2 原生质体的制备

根据秀珍菇菌种的生长状况,选取长势最好的三角瓶中菌丝体,进行下一步原生质体的试验^[11-13],离心收集培养好的菌丝体,用渗透压稳定剂 MM 缓冲液冲洗 3 次,并移去多余水分。按照每 10 mg 湿菌丝体加 0.4 mL 酶液的比例添加酶液到菌丝体管中,轻轻摇匀,在 25 ℃ 和 30 ℃ 下进行酶解。每间隔 15 min 轻轻颠倒数下使样品混合均匀,酶解 4 h 后吸取少量的酶解液进行镜检,观察菌丝体的变化并计数原生质体密度。在观察 4 h 之后对比溶壁酶和纤维素酶的酶解效果,统计并得出最佳酶解温度以及最佳酶含

量。过滤收集酶解液,并于室温下 750 g 离心力下离心 10 min,收集原生质体。分别以 MM 缓冲液和 MMC 缓冲液洗涤原生质体各 2 次,最后重悬原生质体备用。

1.2.3 原生质体的再生

用渗透压稳定剂稀释原生质体悬液,将密度调至 1×10^5 个/mL。以每个皿 0.1 mL 的量,涂布于固体再生培养基平皿中,于 25 °C 恒温培养箱下培养 7 d,统计菌落再生率。固体再生培养基稳渗剂种类分别为蔗糖、山梨醇、氯化钠、甘露醇,稳渗剂摩尔浓度分别为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mol/L。对照处理原生质体悬液用无菌水稀释,并按上述同样方法涂布于低渗培养基上(固体 YMG 培养基),观察试验组平板和对照组平板的菌落数。原生质体再生率公式如下:

$$\text{原生质体再生率} = \frac{(\text{再生平板菌落数} - \text{低渗平板菌落数}) \times \text{稀释倍数}}{\text{涂布体积} \times \text{原生质体密度}} \times 100\%。$$

1.2.4 原生质体紫外诱变

将 1.2.2 制备的原生质体涂布于稳渗培养基上,所选择的稳渗培养基通过 1.2.3 的试验结果来进行筛选。打开培养皿盖,为防止染菌,紫外光照由超净台提供^[14-15]。将培养基放入 35 W 紫外灯下分别照射 15、30、45、60、120 s。光照完毕后立即放入避光霉菌培养箱中,于 25 °C 下培养 7~10 d 直至获得再生菌落,并统计致死率^[16-17]。

1.2.5 候选突变株长势对比

经过紫外诱变后,选取致死率高的处理条件,随机挑取 3 株再生菌落分别命名为 X2、X5、X57,将出发菌株以及挑选出的菌株转接至 YMG 固体培养基和 CM 固体培养基中,培养并观察长势。将 3 株候选突变株及出发菌株接种至出菇物料瓶中,待菌丝体布满整个瓶子时,将其放入光照培养箱,待其出菇后摘取烘干并磨成粉末备用。

1.2.6 候选突变株 GABA 含量分析

将 3 株候选突变株及出发菌株接种于 YMG 液体培养基中,18 °C 恒温培养箱培养。测定液体培养的 4 株菌株菌丝体的 GABA 含量。选取在 YMG 固体培养基上长势最好的突变株接种于 YMG 液体培养基中,并将其分成 4 个处理组,其中 2 组加 4 mL 的质量分数为 1% 的谷氨酸溶液,分别记为 A1、A2,另 2 组不作处理,分别记为 B1、B2。将 A1、B1 放在 18 °C 恒温培养箱中培养,将 A2、B2 放在 28 °C 恒温培养箱中培养,培养一段时间之后,测菌丝体的 GABA 含量。标准曲线的制作,取 GABA 标准样品 6 个,质量浓度分别为 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4 g/L。准备纤维素酶液,调节 pH 值到 4.0,酶液缓冲液由乙酸钠和乙酸组成。将试样中的悬浮物置于 80 °C 烘箱下烘 2 h 左右,烘干后的悬浮物用研钵磨成粉末,称重,将其放入试管中,每根试管加入 10 mL 的酶液,45 °C 水浴 1 h,沸水浴 15 min,冷却一段时间后进行离心,取上清液 5 mL 左右。取上清液以及准备好的标准样品各 0.2 mL,分别加入 0.2 mL 的 0.5 mol/L 碳酸氢钠和 0.2 mL 的 1% FDEB 溶液,在 60 °C 的烘箱下放置 1 h 进行衍生化反应,然后加 1.4 mL 体积分数为 0.12% 的磷酸溶液避光处理,且每组做 3 个平行,其他发酵液衍生化的处理步骤与此相同^[18]。对烘干后的子实体粉末同样按照上述方法处理,并测 GABA 含量,测量方法参考文献[19]。高压液相的运行参数,柱子型号为 Sunfire™ C18,流动相:乙腈/H₃PO₄ 水溶液(体积分数为 0.12%)为 50/50,检测波长为 370 nm,柱温为 35 °C,流速为 1.0 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 秀珍菇原生质体制备结果

按每 10 mg 加 0.4 mL 酶液,分别于 25 °C 和 30 °C 下进行酶解 4 h,取酶液统计原生质体密度,结果见表 1。从表 1 可以看出 20 mg/mL 溶壁酶(LWZ)所释放出的原生质体数目最多,其酶解效果较好,同时 30 °C 下原生质体得率略高于 25 °C。因此,后续试验中采用 LWZ(20 mg/mL)30 °C 下进行再生试验所需原生质体制备。

表 1 不同水解酶种类和含量下秀珍菇 X1 原生质体密度

Table 1 Concentration of protoplast of *Pleurotus geesteranus* X1 under different hydrolase types and contents

| 水解酶种类 | 质量浓度/(mg · mL ⁻¹) | 得率/(10 ⁶ 个 · mL ⁻¹) | |
|-------|-------------------------------|--|------|
| | | 25 ℃ | 30 ℃ |
| R10 | 20 | 0.5 | 0.3 |
| R10 | 15 | 0.1 | 0.1 |
| R10 | 10 | 0.1 | 0.1 |
| LWZ | 20 | 2.3 | 2.5 |
| LWZ | 15 | 1.0 | 1.2 |
| LWZ | 10 | 0.5 | 0.7 |

2.2 原生质体再生结果

以蔗糖为试验稳渗剂,添加到 YMG 培养基中,涂布原生质体后统计原生质体再生率,结果见表 2。从表 2 可以看出,蔗糖摩尔浓度为 0.6 mol/L 时原生质体的再生率最高。后续甘露醇、山梨醇和氯化钠适宜稳渗浓度筛选设定为 0.5~0.8 mol/L。

以甘露醇、氯化钠、山梨醇为试验稳渗剂,添加到 YMG 培养基中,涂布原生质体后统计原生质体再生率,结果见表 3。从表 3 中可以看出甘露醇的最优浓度为 0.6 mol/L,再生率为 0.65% 左右,氯化钠的最优浓度为 0.5 mol/L,再生率约为 0.09%,山梨醇的最优浓度为 0.6 mol/L,再生率为 0.35% 左右。故选择甘露醇 0.6 mol/L 作为紫外光照的稳渗培养基。

表 2 秀珍菇原生质体在蔗糖稳渗培养基上的再生率统计

Table 2 Statistics of regeneration rate of protoplasts from *Pleurotus geesteranus* on sucrose steady infiltration medium

| 蔗糖摩尔浓度/(mol · L ⁻¹) | 再生率/% |
|---------------------------------|-----------|
| 0.5 | 0.24±0.03 |
| 0.6 | 0.32±0.09 |
| 0.7 | 0.28±0.14 |
| 0.8 | 0.15±0.07 |
| 0.9 | 0.10±0.05 |
| 1.0 | 0 |
| 1.1 | 0 |
| 1.2 | 0 |

表 3 秀珍菇原生质体在 3 组稳渗培养基上的再生率

Table 3 Regeneration rate (%) of protoplasts of *Pleurotus geesteranus* on three groups of stable osmotic media

| 稳渗剂摩尔浓度/(mol · L ⁻¹) | 甘露醇/% | 氯化钠/% | 山梨醇/% |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0.5 | 0.39±0.14 | 0.09±0.02 | 0.26±0.11 |
| 0.6 | 0.65±0.13 | 0.02±0.01 | 0.35±0.70 |
| 0.7 | 0.51±0.17 | 0 | 0.17±0.02 |
| 0.8 | 0.27±0.10 | 0 | 0.13±0.02 |

2.3 原生质体紫外诱变结果

经过梯度时长紫外光照培养皿后,再生菌落形貌见图 1,致死率统计结果见表 4。从图 1 可以看出,

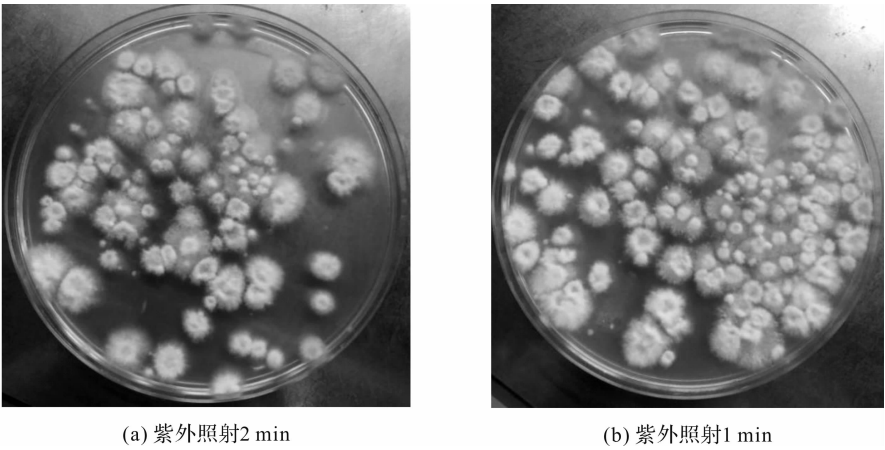


图 1 经紫外照射后再生菌落的形态

Fig. 1 Morphology of regenerated colonies after ultraviolet irradiation

获得分离度良好的秀珍菇原生质体再生单菌落,再生菌落的长势较好,菌丝白且致密。从表 4 可以看出,当照射时长达到 1~2 min 时,致死率达到 76%~86%,属一般认可的正向突变率较高的致死区间。随机挑取 3 株紫外光照 2 min 的再生菌落(X2、X5 和 X57)进行后续性能测试,包括高效液相色谱法测定 GABA 含量。

2.4 候选秀珍菇突变株长势对比

秀珍菇菌株 X1 为出发菌株,X2、X5 和 X57 为从紫外光照 2 min 的平板中随机挑取的 3 株候选突变株,3 株候选突变株以及出发菌株在不同培养基上的长势情况见图 2。从图 2 可以看出,在 YMG 培养基上,突变株 X5 长势弱于出发菌株,X57 长势强于出发菌株,X2 长势与出发菌株基本上持平;在 CM 培养基上,X5 长势强于出发菌株,X57 长势与出发菌株基本上持平,X2 长势强于出发菌株。

表 4 不同紫外光照下秀珍菇原生质体致死率统计
Table 4 Mortality statistics of protoplasts of *Pleurotus geesteranus* under different ultraviolet irradiations

| 照射时间/s | 致死率/% |
|--------|-------|
| 15 | 26.4 |
| 30 | 47.8 |
| 45 | 61.3 |
| 60 | 76.9 |
| 120 | 85.6 |

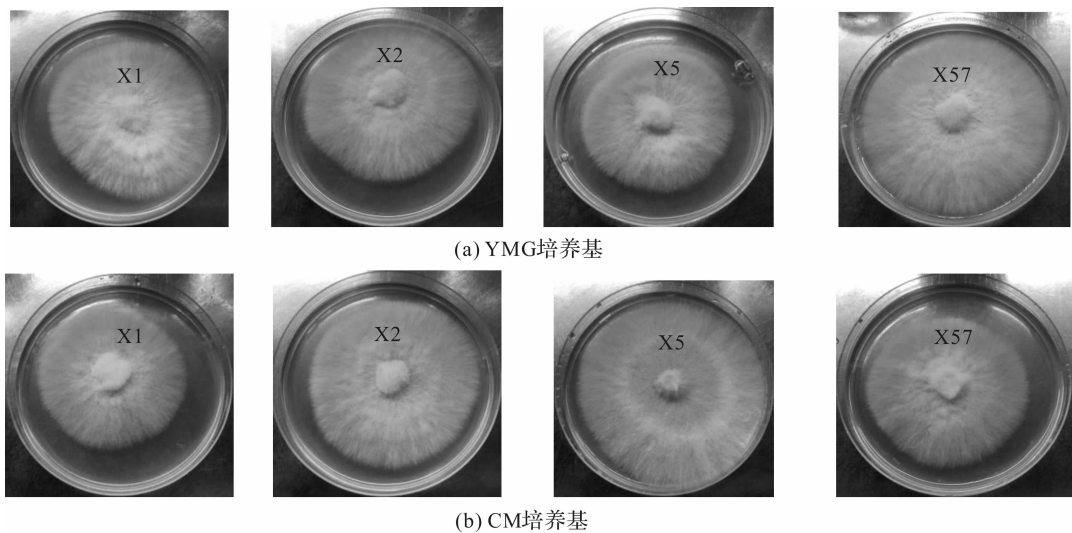


图 2 候选突变株在 YMG 和 CM 培养基上的长势对比

Fig. 2 Comparison of growth potential of candidate mutants on YMG and CM media

候选突变株接种至出菇物料后生长出的子实体见图 3。从图 3 可以看出,其子实体颜色偏白,有微小的伞柄,由于是突变株并且在瓶中培养,存在水分、空气、光照等因素的影响,形状与市场有的有一定差异。

2.5 候选突变株 GABA 含量对比

X1(18℃)菌丝粉提取物、X1 子实体提取物及 0.9 g/L 标准液的出峰图见图 4。由图 4(c)可知,标样中 GABA 保留时间约为 5.8 min,从图 4(a)可以看出,在 5.8 min 左右的时间 X1 菌丝粉提取物中有一个比较小的峰,从图 4(b)可以看出,X1 子实体提取物也有一个较小的波峰,0.9 g/L 的 GABA 标准液则是在 5.8 min 左右有一个很明显的峰,其他标准液也是如此,由此可以确定 GABA 的出峰时间是在 5.8 min。

由标准液求出其标准曲线图 5。取 0.2 mL 所测液稀释至 2 mL,用图 5 所得峰面积-浓度方程计算出的含量,乘以 10 倍即为 GABA 的真实含量。查阅得知 GBAB 分子量为 103,已知 0.2 mL 内 GABA 含量,计算公式为



图 3 候选突变株子实体

Fig. 3 Fruiting bodies of candidate mutants

$$x = \frac{103 \times 0.2 \times m \times 1\,000}{n}$$

其中, x 为菌菇粉 GABA 含量, $\mu\text{g/g}$; m 为 0.2 mL 所测液中 GABA 质量浓度, g/L ; n 为菌菇粉质量, g 。

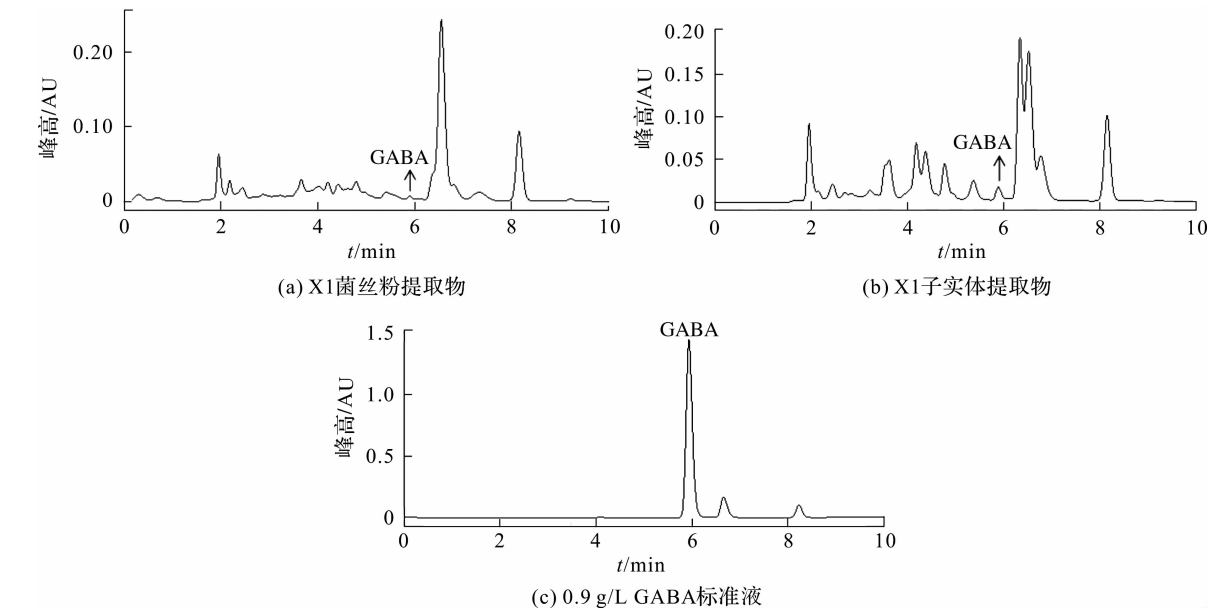


图 4 GABA 测定高效液相色谱峰图

Fig. 4 The peak diagram of high performance liquid chromatography determined by GABA

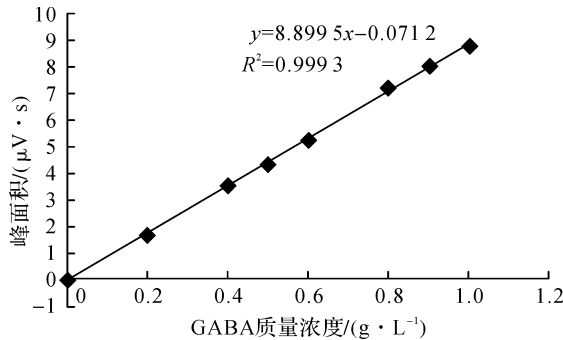


图 5 GBAB 标准曲线

Fig. 5 GBAB standard curve

试验的 4 株菌株菌丝体的 GABA 含量见表 5,从表 5 可以看出突变株 X2、X5 和 X57 的菌丝体 GABA 含量均高于出发菌株 X1,提高幅度分别为 20.7%、196.3%和 126.8%。在向培养基中添加GABA 前体(谷氨酸)时,GABA 产量获得进一步提高。X57(18 ℃+质量分数为 1%的谷氨酸溶液)与 X57 (18 ℃)相比,提高幅度为 312.37%。在 28 ℃下 GABA 产量提高幅度则要比 18 ℃下低得多,这表明温度条件对 GABA 累积有一定的影响。

表 5 菌丝中 GBAB 含量检测表

Table 5 Detection table of GBAB content in mycelia

| 组别 | GABA 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) |
|--------------------|---|
| X1(18 ℃) | 8.2 ± 3.89 |
| X2(18 ℃) | 9.9 ± 3.47 |
| X5(18 ℃) | 24.3 ± 10.5 |
| X57(18 ℃) | 18.6 ± 4.06 |
| X57(18 ℃+1%的谷氨酸溶液) | 76.7 ± 52.56 |
| X57(28 ℃) | 21.5 ± 9.69 |
| X57(28 ℃+1%的谷氨酸溶液) | 22.9 ± 2.96 |

X2、X5、X57 等 3 株突变株子实体中 GABA 含量分别达到 (6.32 ± 1.05) 、 (17.60 ± 2.28) 和 $(10.28 \pm 2.16) \mu\text{g/g}$ 。较出发菌株 $5.21 \pm 0.47 \mu\text{g/g}$, 3 株突变体子实体中 GABA 含量分别提高了 21.3%、237.8% 和 97.3%。

3 结 论

通过此次原生质体紫外诱变育种方法进行高产 γ -氨基丁酸的秀珍菇菌株选育工作的试验,可以得出以下结论:

1) MM 缓冲液中, 20 mg/mL 的溶壁酶能够有效去除秀珍菇细胞壁, 获得密度达到 2×10^6 个/mL 的原生质体。

2) 秀珍菇 X1 菌株原生质体再生适宜培养基为含有 0.5 mol/L 甘露醇的 YMG 培养基, 原生质体再生率可达到 $0.65\% \pm 0.13\%$ 。

3) 秀珍菇 X1 原生质体紫外诱变适宜照射时间为 1~2 min, 致死率为 76%~86% 之间。

4) 初步获得 3 株突变株, 菌丝体和子实体中, 3 株突变株 GABA 含量较出发菌株分别提高了 20.7%、196.3%、126.8% 和 21.3%、237.8%、97.3%。

参考文献:

- [1] 翁伯琦, 江枝和, 林勇. 不同培养料对秀珍菇子实体蛋白质营养评价的影响[J]. 食用菌学报, 2002, 9(2): 10.
- [2] 冯志勇, 王志强, 郭力刚, 等. 秀珍菇生物学特性研究[J]. 食用菌学报, 2003, 10(3): 11.
- [3] 韩建东, 宫志远, 姚强, 等. 金针菇菌渣栽培秀珍菇的营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2013, 32(6): 30.
- [4] SHEN H S, LIU H Z, CHEN J C, et al. Tetramethylpyrazine from *Pleurotus geesteranus* [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(9): 1553.
- [5] HE P X, GENG L J, MAO D B, et al. Production, preliminary characterization, and bioactives of exopolysaccharides from *Pleurotus geesteranus* 5# [J]. Preparative Biochemistry Biotechnology, 2013, 43(1): 108.
- [6] MAO D B, MA Y P, GENG L J, et al. Fermentation characteristics in stirred-tank reactor of exopolysaccharides with hypolipidemic activity produced by *Pleurotus geesteranus* 5(#) [J]. Biological Sciences, 2013, 85(4): 1473.
- [7] RANOGAJEC A, BELUHAN S, SMIT Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversedphase HPLC[J]. J Separation Science, 2010, 33(8): 1024.
- [8] WANG Q, LI H, CHEN T T, et al. Yield, polysaccharides content and antioxidant propeties of *Pleurotus abalonus* and *Pleurotus geesteranus* produced on asparagus straw as substrate[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 134(2): 2229.
- [9] LV G Y, ZHANG Z F, PAN H J, et al. Antioxidant properties of different solvents extracts from three edible mushrooms[C]//3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Beijing: ICBBE, 2009.
- [10] 陈发川, 柯斌榕, 吴小平. 秀珍菇菌种复壮方法比较[J]. 热带作物报, 2011, 32(11): 2037.
- [11] 许谦. 药用真菌桑黄原生质体的制备和诱变[J]. 中国食用菌, 2016, 35(4): 67.
- [12] 秦婷婷, 冯昆达, 张涛, 等. 原生质体诱变筛选高产纽莫康定 B0 的菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(3): 212.
- [13] 李守勉, 李明, 邢蕾, 等. 食用菌原生质体技术应用的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(25): 7770.
- [14] 王丽宁, 赵妍, 张宝粉, 等. 利用原生质体紫外诱变技术选育耐高温香菇菌株[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1350.
- [15] 李红梅. 原生质体紫外诱变技术选育烟酰胺高产菌株[J]. 应用化工, 2013, 42(1): 72.
- [16] 于长青, 李丽娜. 深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的紫外诱变原生质体育种[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 44.
- [17] 何小慧. 杏鲍菇原生质体再生变异菌株的筛选[D]. 福州: 福建师范大学, 2014.
- [18] 梁臣, 陈忠. γ -氨基丁酸及其受体功能的研究与应用现状[J]. 动物医学进展, 2015(4): 108.
- [19] 赵宏飞, 宋伟, 裴家伟, 等. 食品中三种 γ -氨基丁酸检测方法比较[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(11): 51.