

(19) 中華人民共和國國家知識產權局



(12) 發明特許出願

(10) 出願公開番号: CN 105039170 A

(43) 出願公開日: 2015.11.11

(21) 出願番号: 201510281406.6

(22) 出願日: 2015.05.28

(83) 生物保存情報:

CCTCC NO:M 2014671 2014 .12.26

(71) 申請人: 吉林大学

住所: 130011 吉林省長春市前進大街 2699 号

(72) 發明者: 王迪 李佺 孟庆繁 王迪

王美羽 滕利荣 逯家辉 黄晨玮

张洋 权宇彤

(74) 專利代理機關: 吉林長春新紀元專利代理有限公司

代理人: 陈宏伟

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

クレーム書 2 ページ 説明書 5 ページ 図面 3 ページ

(54) 發明名称:

高産松茸誘発株および培養方法

(57) 摘要

本發明は、キノコの変異株と培養方法を開示する。化学変異を用いて、高収穫の新しい松茸菌株が分離・選抜され、その保存番号は CCTCC NO:2014671 であり、菌糸体の乾燥重量は元の出発菌に比べて 69.68%増加し、アデノシン含有量は 33.96%増加し、多糖含有量は 75.72%増加し、タンパク質含有量は 35.17%増加し、マンニトール含有量は 52.8%増加している。本発明の松茸新菌株は 10 回以上連続して培養しても遺伝的に安定している。本発明はまた、松茸変異菌株の最適発酵培地も開示する。

1. 一种松茸菌诱变菌株，2014年12月25日に中国典型培養物保藏中心に保藏され、保藏登記号はCCTCC NO.M 2014671で、分類名称は松茸 T35 *Tricholoma matsutake* T35 です。

2. 获得したクレーム1に記載の松茸変異菌株の方法は以下のステップを含みます：

1) 保藏番号CGMCC 5.793の松茸菌株を活性化し、PDA傾斜培地に接種し、23-27℃の恒温器で4-8日間培養します。pH6.0のリン酸緩衝液を傾斜培地に注入し、4層のガーゼで濾過し、胞子の濃度を 10^6 - 10^7 個/mLに希釈して変異育種に使用します。

2) 直径7cmの培養皿に10mgの亜硝基胍を取り、少量のアセトン溶剤を加え、滅菌したpH6.0のリン酸緩衝液9mLを加え、磁気攪拌器でゆっくりと攪拌し、NTGが完全に溶解した後、1mLの菌懸濁液を平皿に入れて変異を開始します（亜硝基胍の最終濃度は1mg/mL）。

2分、5分、10分、15分、20分それぞれの時間で変異を行い、0.3mLの菌懸濁液を2.7mLの滅菌蒸留水に取り、段階的に希釈します。

3) 変異後の胞子懸濁液をグラデーションで希釈し、PDA培地平板で3-7日間培養した後、生じた単一の菌株を無菌の棒で点对点で96孔板に接種し、PDA固体培地中で培養します。

250mLの錐形瓶に接種用の針で培養した突然変異株を一つずつ接種し、26℃で150rpmで4-6日間培養し、松茸の菌糸体の乾燥重量、多糖、マンニトール、アデノシン含有量を測定して、高収穫の松茸菌株を選択します。

4) 获得した高収穫松茸変異菌株は連続して培養し、培養条件は26℃、150rpmの恒温振とう機で96時間培養し、菌糸体の乾燥重量、多糖、マンニトール、アデノシン含有量を測定し、変異菌株の遺伝的安定性を検討して、最終的な目的株を確定します。

3. クレーム1に記載の松茸変異菌株の培養方法は以下のステップを含みます：

1) 一次斜面菌株

傾斜培地は、グルコース 15-25g/L、ペプトン 5-15g/L、酵母エキス 5-15g/L、 KH_2PO_4 0.1-0.7g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.5g/L、アガー 25g/Lで構成されます。

傾斜培地での培養温度は $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で、4-7日間で菌糸が傾斜面を覆います。冷蔵庫($2-4^\circ\text{C}$)に保存して予備とします。

2) 二次シェーカー菌株

シード培地は、グルコース 15-25g/L、ペプトン 5-15g/L、酵母エキス 5-15g/L、 KH_2PO_4 0.1-0.7g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.5g/Lで構成されます；

シード培地には、傾斜培地から液体シード培地に接種し、 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、120-160rpmのシェーカーで5日間培養します。

3) シェーカー発酵培養

液体シード培地に5%の接種量で液体発酵培地（グルコース 18-25g/L、酵母エキス 15-25g/L、 KH_2PO_4 0.3-0.6g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.3g/L）に接種し、液体発酵を行います。発酵培地量は250mLのシェーカーに100mLを充填し、培養温度は26℃で、シェーカーの回転数は150rpmで、5日後に菌糸体を収穫します。

4) 100L発酵槽での拡大培養

シード液を7%の接種量で60Lの液体発酵培地に接種し、100Lの発酵槽で液体ディープフェルメンテーションを行います。培養条件は26℃、150rpm、換気量3-5L/min、初期

pH は 5.0 で、培養時間は 48 時間です。

4.クレーム 1 に記載の松茸菌株の培養基は、以下の原料を重量比で調製したものであることを特徴とします:

グルコース 25.62g/L、酵母エキス 10.74 g/L、大豆ペプトン 10 g/L、KHPO4 0.57 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/L、ビタミン B₁0.25 g/L。

高産松茸誘発株および培養方法

技術領域

[0001]本発明は、高収獲松茸変異菌株、新しい菌株品種、およびこの菌株の培養方法に関するものであり、生物発酵工学技術分野に属します。

背景技術

[0002]マツタケ (*Tricholoma matsutake* Sing.) は、担子菌目、担子菌亜目、ハラタケ科、ハラタケ属に属する菌類であり、別名としてサンシュ、ショウギユウ、ゴウキン、タイキン、ショウキンなどがあります。マツタケは歴史が古く、全世界に広く分布しており、肉は白くて柔らかく厚みがあり、質感は細かいです。独特の香りがあり、栄養価が高く、タンパク質、アミノ酸、多種多様なビタミン、炭水化物、ミネラルなどの有効成分を含んでおり、貴重な野生キノコの一つです。マツタケの主な生物活性成分には、多糖類、ペプチド、ステロールなどがあります。薬理学的研究により、マツタケには抗腫瘍、免疫調節、抗酸化、抗放射線、糖尿病治療などの機能があることが示され、優れた医薬品としての前途と開発価値があることが分かっています。

[0003]現在、マツタケは主に野生採取に依存しており、人工栽培は非常に困難です。大量の市場需要によりマツタケの資源は枯渇し、生態環境が破壊され、同時に高価格化がもたらされ、マツタケ産業の発展に大きな障害をもたらしています。現代の生物工学技術を利用して、発酵菌株の人工改良と発酵プロセスの最適化の両方のアプローチを採用し、効果的にマツタケの有効成分を獲得することで、現在の発展の壁を打破し、マツタケ産業の開発の基盤を築くことが目指されています。

発明の内容

[0004]本発明は、松茸の変異株である新しい株を提供することを目的としており、その菌糸体の乾燥重量、多糖、アデノシン、マンニトールの含有量が野生菌と比較して著しく増加しています。

[0005]本発明は、この株の培養方法も提供しており、産業生産に適しています。

[0006]本発明で提供される松茸の変異株は、中国の典型的な培養物保管センターに保管されており、保管場所は武漢大学で、保管日は 2014 年 12 月 25 日です。分類名は松茸 T35 *Tricholoma matsutake* T35 であり、保管登録番号は CCTCC NO:M 2014671 です。

[0007]本発明で提供される松茸の菌株培養方法は、以下の手順を含みます:

1) 保藏番号 CGMCC 5.793 の松茸菌株を活性化し、PDA 傾斜培地に接種し、23-27℃ の恒温器で 4-8 日間培養します。pH6.0 のリン酸緩衝液を傾斜培地に注入し、4 層のガーゼで濾過し、胞子の濃度を 10^6 - 10^7 個/mL に希釈して変異育種に使用します。

2) 直径 7cm の培養皿に 10mg の亜硝基胍を取り、少量のアセトン溶剤を加え、滅菌した pH6.0 のリン酸緩衝液 9mL を加え、磁気攪拌器でゆっくりと攪拌し、NTG が完全に溶解した後、1mL の菌懸濁液を平皿に入れて変異を開始します (亜硝基胍の最終濃度は 1mg/mL)。2 分、5 分、10 分、15 分、20 分それぞれの時間で変異を行い、0.3mL の菌懸濁液を 2.7mL の滅菌蒸留水に取り、段階的に希釈します。

3) 変異後の胞子懸濁液をグラデーションで希釈し、PDA 培地平板で 3-7 日間培養し

た後、生じた単一の菌株を無菌の棒で対対で 96 孔板に接種し、PDA 固体培地中で培養します。250mL の錐形瓶に接種用の針で培養した突然変異株を一つずつ接種し、26℃で 150rpm で 4-6 日間培養し、松茸の菌糸体の乾燥重量、多糖、マンニトール、アデノシン含有量を測定して、高収穫の松茸菌株を選択します。

4) 獲得した高収穫松茸変異菌株は連続して培養し、培養条件は 26℃、150rpm の恒温振とう機で 96 時間培養し、菌糸体の乾燥重量、多糖、マンニトール、アデノシン含有量を測定し、変異菌株の遺伝的安定性を検討して、最終的な目的株を確定します。

[0008] この松茸変異菌株 T35 は菌糸の成長が速く、菌糸体は白色であり、迅速な液体深層培養が可能です。この菌株の液体深層発酵の特徴は以下の通りです：

1) 一次斜面菌株

傾斜培地は、グルコース 15-25g/L、ペプトン 5-15g/L、酵母エキス 5-15g/L、 KH_2PO_4 0.1-0.7g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.5g/L、アガー 25g/L で構成されます。

傾斜培地での培養温度は $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で、4-7 日間で菌糸が傾斜面を覆います。冷蔵庫 ($2-4^\circ\text{C}$) に保存して予備とします。

2) 二次シェーカー菌株

シード培地は、グルコース 15-25g/L、ペプトン 5-15g/L、酵母エキス 5-15g/L、 KH_2PO_4 0.1-0.7g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.5g/L で構成されます；

シード培地には、傾斜培地から液体シード培地に接種し、 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、120-160rpm のシェーカーで 5 日間培養します。

3) シェーカー発酵培養

液体シード培地に 5% の接種量で液体発酵培地（グルコース 18-25g/L、酵母エキス 15-25g/L、 KH_2PO_4 0.3-0.6g/L、 $\text{MgSO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3-0.6g/L、ビタミン B_1 0.05-0.3g/L）に接種し、液体発酵を行います。発酵培地量は 250mL のシェーカーに 100mL を充填し、培養温度は 26℃で、シェーカーの回転数は 150rpm で、5 日後に菌糸体を収穫します。

4) 100L 発酵槽での拡大培養

シード液を 7% の接種量で 60L の液体発酵培地に接種し、100L の発酵槽で液体ディープフェルメンテーションを行います。培養条件は 26℃、150rpm、換気量 3-5L/min、初期 pH は 5.0 で、培養時間は 48 時間です

[0009] 本発明の松茸変異菌株の特徴は以下の通りです：

(1) 松茸変異菌株の菌糸体の乾燥重量、アデノシン、粗多糖、およびマンニトールの四つの有効成分の含有量は、元の菌株と比較して明らかに増加しています。菌体の乾燥重量は 15.17g/L に達し、元の菌株と比較して 69.68% 増加しています。アデノシンの含有量は 0.0359g/L に達し、元の菌株と比較して 33.96% 増加しています。多糖の含有量は 1.780g/L に達し、元の菌株と比較して 75.72% 増加しています。マンニトールの含有量は 0.327g/L に達し、元の菌株と比較して 52.8% 増加しています。

[0010] (2) 松茸変異菌株は 20 回以上の連続培養により退化せず、遺伝的に安定しています。

[0011] 本発明の利点は、変異した松茸の新しい菌株が 10 回以上もの連続培養を経て退化せず、遺伝的に安定しており、細胞内の多糖、アデノシン、およびマンニトールの含有量が元の菌に比べて非常に高いという点です。

図の説明

[0012]

図 1、炭素源の目標値への影響；

図 2、窒素源の目標値への影響；

図 3、無機塩の目標値への影響;

図 4、図 5、図 6 は、各要因間の応答曲面と等高線図を示しています。

具体的な実施例

[0013] 本発明を理解しやすくするために、以下に具体的な実施例を挙げます。これらの例は、本発明を制限するものではなく、本発明の解釈に対するものです。

[0014]実施例 1:

マツタケ変異株の誘発と選育方法

(1)マツタケ誘発

CGMCC 5.793 のマツタケ菌株のシードを活性化し、PDA スラントに接種し、26℃の恒温箱で 6 日間培養します。PDA スラント培地に pH6.0 のリン酸緩衝液を注入し、4 層のガーゼでろ過して孢子濃度を 10^7 個/mL に希釈します。誘発育種用の菌懸濁液として用います。直径 7cm の培養皿に 10mg のニトロソ基胍を称量し、少量のアセトン溶媒を加え、無菌のリン酸緩衝液 9mL(pH=6.0)を加え、磁気攪拌機を開いてよく混ぜ、NTG が完全に溶解したら 1mL の菌懸液を取り、プレートに注ぎ、ニトロソ基胍の最終濃度を 1mg/mL にします。それぞれ 2 分、5 分、10 分、15 分、20 分誘発した後、0.3mL の菌懸液を 2.7mL の無菌蒸留水に段階的に希釈します。誘発後の孢子懸濁液を梯度希釈し、PDA 培地平板で 5 日間培養した後、長くなった単一の菌コロニーを無菌の棒で 96 孔プレートに接種し、PDA 固体培地中で培養します。培養した突然変異株を接種針で個別に 250mL の円錐形フラスコに接種し、26℃、150rpm で培養し、5 日間でマツタケ菌系体を得ます。菌系体の乾燥重量、多糖、マンニトール、およびアデノシン含量を測定し、高収量のマツタケ菌株を選別します。得られた高収量のマツタケ変異株は、連続培養を経て、26℃、150rpm の恒温振とう器で 120 時間培養され、菌系体の乾燥重量、多糖、マンニトール、およびアデノシン含量を測定し、遺伝的安定性を調査し、最終的な目的の菌株を確定します。

[0015](2)四つの有効成分の抽出および含有量の測定

誘発された突然変異株を 48 孔プレートに保存し、菌系体を遠心分離します。5000rpm、遠心 10 分、一度洗浄した後、菌系体を平板上に凍結乾燥させ、乾燥した粉末を称量し、粉碎して 60 目の篩でふるい分けします。マツタケの菌系体の乾燥粉末 0.1g を取り、5mL の蒸留水に加え、80℃の水浴で 3 時間浸出し、8000g/min で 10 分間遠心分離し、上澄み液を取り、菌系体の多糖含有量を測定します。マツタケの菌系体の乾燥粉末 0.1g を取り、5mL の蒸留水に加え、45℃の水浴で 3 時間浸出し、8000g/min で 10 分間遠心分離し、上澄み液を取り、菌系体のアデノシンとマンニトールの含有量を測定します。総糖含有量は、ネギ-硫酸法を用いて測定し、還元糖含有量は DNS 法を用いて測定し、多糖含有量は総糖含有量から還元糖含有量を差し引いて求めます。

[0016](3)高収量誘発株の選別

誘発されたマツタケ突然変異体から、菌系体の乾燥重量と四つの有効成分の含有量が明らかに増加している優れた菌株を選別します(表 1 を参照)。次に、代を重ねて培養し、1 代ごとに菌株の乾燥重量と三つの有効成分の含有量を測定します。測定方法は(2)と同じです。10 代で共に培養し、選別した高収量誘発株の遺伝的な安定性を調査します。

[0017] 表 1 誘導変異株の四つの指標の向上値

| 指標 | 干重(g/L) | 胞内多糖(g/L) | 腺苷(g/L) | 甘露醇(g/L) |
|---------|---------|-----------|---------|----------|
| 原始菌株 | 8.945 | 1.013 | 0.0268 | 0.214 |
| T35 | 15.178 | 1.780 | 0.0359 | 0.327 |
| 提高値 (%) | 69.68 | 75.72 | 33.96 | 52.8 |

表 2 誘導変異株 T35 の遺伝的安定性の考察

| 指標 | 干重 (g/L) | 胞内多糖 (g/L) | 腺苷 (g/L) | 甘露醇 (g/L) |
|--------|----------|------------|----------|-----------|
| 第 1 代 | 14.985 | 1.744 | 0.0378 | 0.351 |
| 第 2 代 | 15.011 | 1.787 | 0.0345 | 0.342 |
| 第 3 代 | 14.877 | 1.712 | 0.0367 | 0.356 |
| 第 4 代 | 14.967 | 1.765 | 0.0328 | 0.371 |
| 第 5 代 | 15.321 | 1.786 | 0.0389 | 0.387 |
| 第 6 代 | 15.228 | 1.793 | 0.0396 | 0.353 |
| 第 7 代 | 15.153 | 1.749 | 0.0357 | 0.361 |
| 第 8 代 | 14.841 | 1.728 | 0.0378 | 0.373 |
| 第 9 代 | 14.979 | 1.766 | 0.0364 | 0.351 |
| 第 10 代 | 15.013 | 1.735 | 0.0351 | 0.365 |

実施例 2:

松茸変異株の発酵培養基の最適化

1、期待関数の設定

菌体の乾燥重量、細胞内多糖、アデノシン、マンニトールを評価指標として、松茸の発酵プロセスを最適化するために、複数の評価指標を一つの評価指標の期待値(D)に統合するために、期待関数を使用します。各評価指標（応答値）は式(1)によって無次元の期待値に変換され、期待関数のバランス尺度 d の範囲は 0~1 です。d=0 の場合、応答値が目標値から大きく逸脱していることを意味し、d=1 の場合は応答値が目標値に近いことを意味します。d は期待する応答値の増加とともに増加します。

$$d_i = \begin{cases} \frac{\hat{y}_i - L_i}{E_i - L_i} & \hat{y}_i > E_i, \quad d_i = 1; \\ 0 & \hat{y}_i < L_i, \quad d_i = 0 \end{cases} \quad (1)$$

[0018]

\hat{y}_i は第 i の評価指標の応答値を表し、 L_i は第 i の評価指標がその応答値を下回ることができないことを示します。 E_i は第 i の評価指標が期待する最高の応答値を表します。

$$D = d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times d_3^{w_3} \times \dots \times d_i^{w_i} \quad w_1 + w_2 + w_3 + \dots + w_i = 1 \quad (2)$$

[0019]

w_i は第 i の指標の重み値を表し、松茸の菌発酵の評価指標、期待最低応答値、期待最高応答値、および重みテーブルは表 3 に示されています。

[0020] 表 3 松茸 T35 の発酵における評価指標と期待される最低応答値、最高応答値、および重み値は以下の通りです

| 参数 | 干重 / g · L-1 | 腺苷 / g · L-1 | 甘露醇 / g · L-1 | 胞内多糖 / g · L-1 |
|-----|--------------|--------------|---------------|----------------|
| yil | 2.00 | 0.01 | 0.00 | 0.10 |
| yih | 15.00 | 0.15 | 0.80 | 2.50 |
| wi | 0.25 | 0.30 | 0.15 | 0.30 |

[0021] (1) 炭素源の種類の設定

PDA 培地を基礎とし、20g/L のブドウ糖、砂糖、乳糖、果糖、甘露醇、可溶性デンプン、および麦芽糖をそれぞれ炭素源として培地を調製し、培地の容量は 100mL/250mL と

し、それぞれ5%の接種量で種子液を接種し、150rpm、26℃で4日間培養した。各炭素源培地条件下で各指標成分の含量を測定し、Dv値を計算し、適切な炭素源の種類を選択する。結果は図1に示す通り、ブドウ糖を炭素源とした場合、最も高いDv値が得られたため、ブドウ糖を最適な炭素源と選択しました。

[0022] (2) 窒素源の種類を選定

PDA培地を基礎とし、10g/Lのペプトン、酵母エキス、ビーフエキス、大豆ペプトン、トリプシンペプトン、および硫酸アンモニウムをそれぞれ窒素源として培地を調製し、培地の容量は100mL/250mLとし、それぞれ5%の接種量で種子液を接種し、150rpm、26℃で4日間培養した。各窒素源培地条件下で各指標成分の含量を測定し、D値を計算しました。結果は図2に示す通り、10g/Lの酵母エキスを窒素源とした場合、他の窒素源培地よりもD値が高かったため、酵母エキスを最適な窒素源と選択しました。窒素源の種類を選定を基に、各有効成分の含量を考慮し、複合窒素源を選択し、後続の実験では酵母エキスと大豆ペプトンの最適な比率を単因子実験で選定し、複合窒素源の最適な比率は1:1となりました。

[0023] (3) 無機塩イオン種類を選定

適切な炭素源および窒素源種類を選定を基に、以下の無機塩を培地に添加しました：CuSO₄·5H₂O、ZnCl₂、FeCl₃·6H₂O、KH₂PO₄、NaCl、CaCl₂ および MgSO₄·7H₂O、それぞれの無機塩を0.05%および0.1%の2つの濃度にし、菌糸体中の各指標成分の含量を測定し、Dv値を計算して最適な無機塩イオン種類を選定しました。結果は図3に示す通り、松茸T35の発酵培地の最適な無機塩はKH₂PO₄·H₂Oでした。

[0024] 3、PB試験による松茸変異株T35の発酵培地中の影響が顕著な成分の選定

上記試験を基に、BP試験により、葡萄糖浸粉および無機塩が松茸変異株T35の発酵に顕著な影響を及ぼす成分を選定しました。結果では、葡萄糖(X1)、酵母浸粉(X2)、KH₂PO₄(X3)が顕著でした。したがって、葡萄糖、酵母浸粉、およびKH₂PO₄をさらに最適化するために選択しました。

[0025] 4、ランプ試験による顕著な成分の最適濃度に近づける

BP試験の基礎でランプ試験を設計し、顕著な成分の濃度を最適な領域に近づけました。

[0026] 5、松茸変異株T35の発酵のための中心組合せ試験

上記の試験の基礎で中心組合せ試験を行い、ブドウ糖、イーストエキス、およびKH₂PO₄を精密に最適化し、多変数二次回帰モデル(RSM)を使用して試験結果を適切に分析し、最適な培地配合を探索しました。結果は図4、5、6に示す通りです。RSMに適合したモデルの統計分析により、最適な培地配合は以下のようでした：ブドウ糖 25.62g/L、イーストエキス 10.74g/L、大豆ペプチド 10g/L、KH₂PO₄ 0.57g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、およびVB1 0.25g/L。

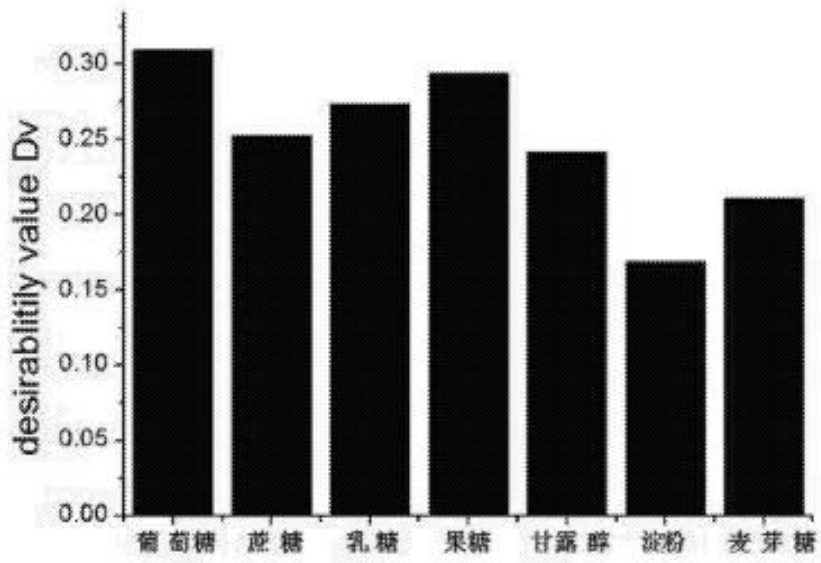


图 1

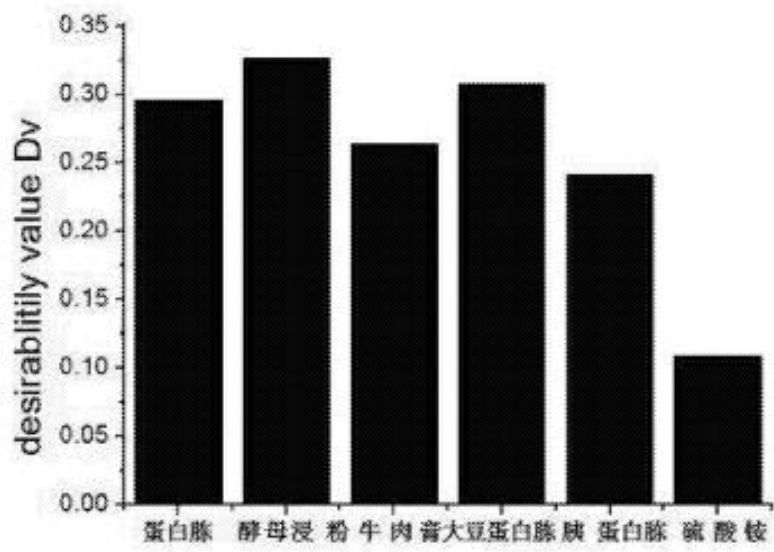


图 2

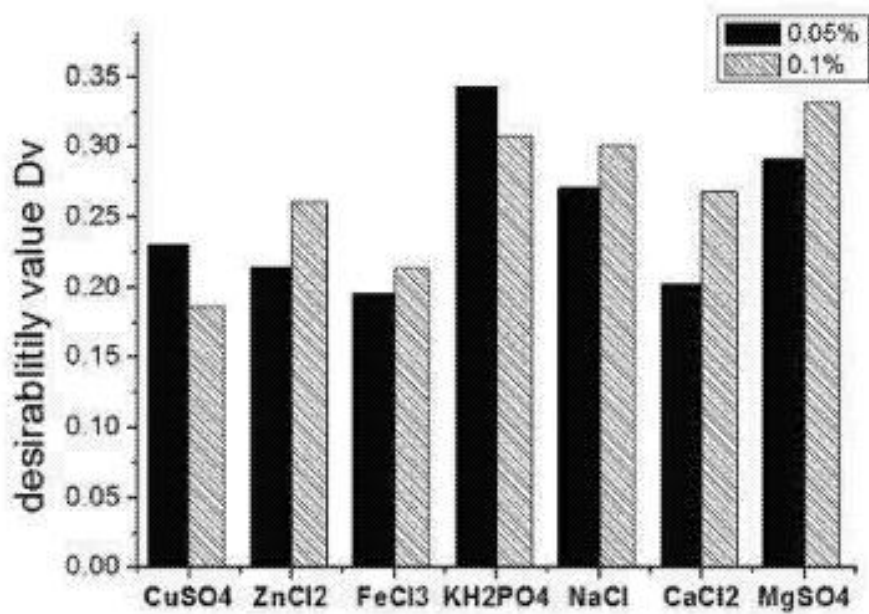


图 3

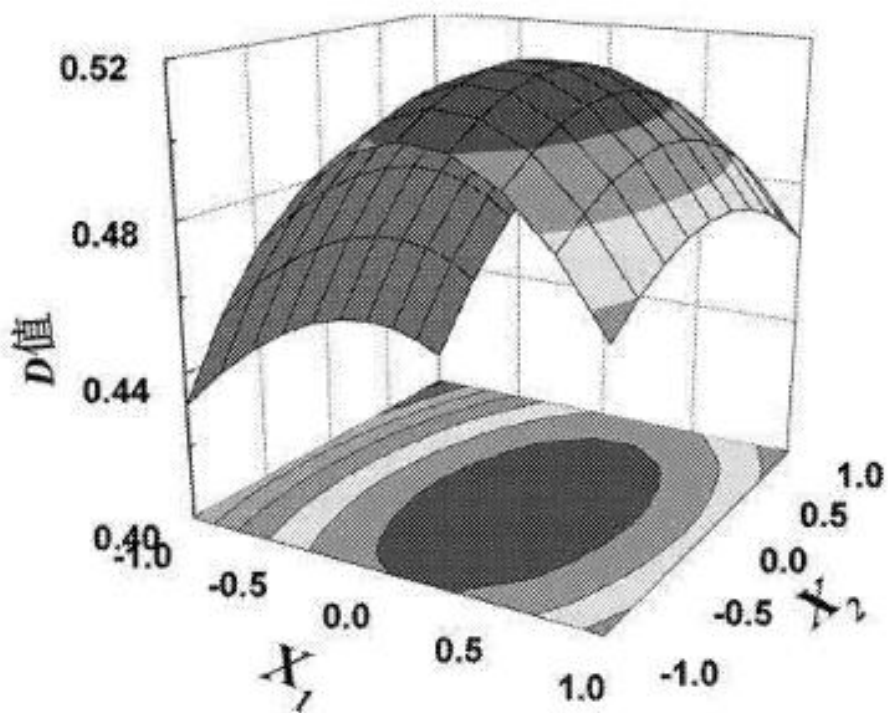


图 4

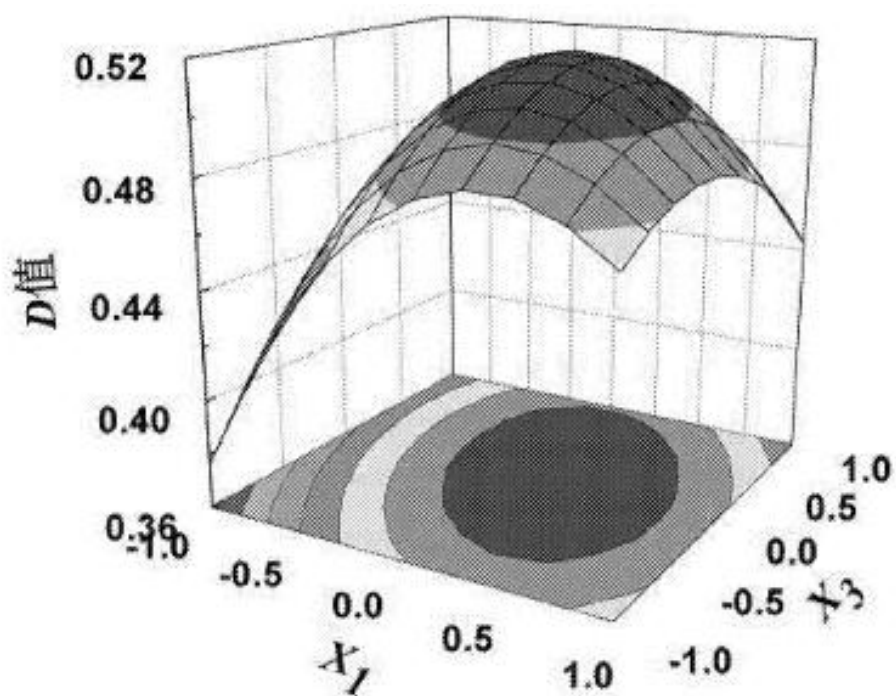


图 5

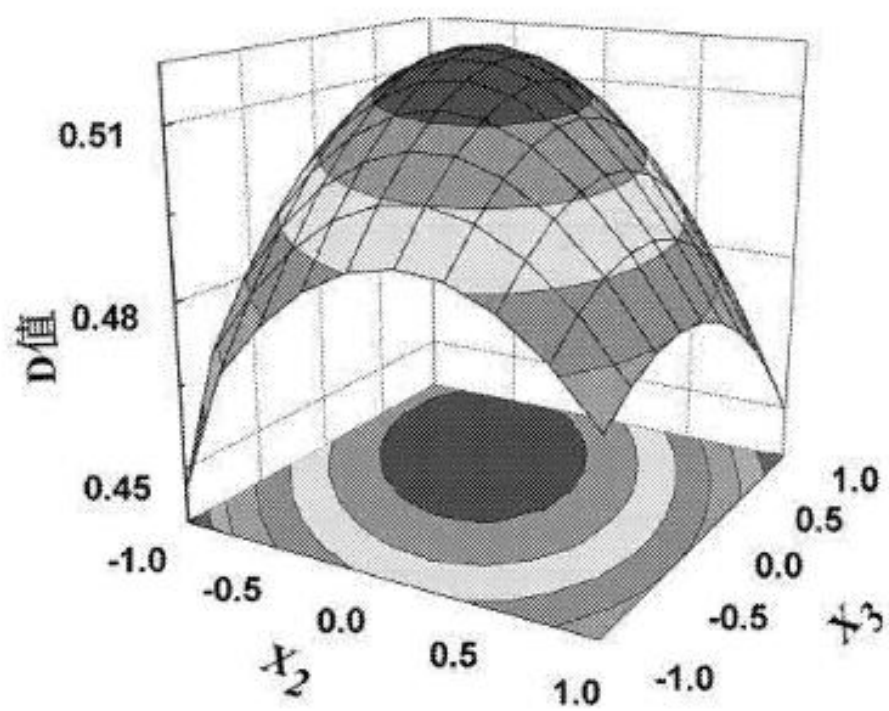


图 6