

薛凡尼氏炭角菌液体培养条件探究 及子实体培养

姚珂,范镜博,张能,赵苗,陈波,袁小红,贺新生*
(西南科技大学生命科学与工程学院,四川绵阳 621010)

摘要:目的:探究薛凡尼氏炭角菌菌丝体液体发酵培养的最佳营养条件和最适环境条件及人工培养子实体使用固体培养基料的最适配方。方法:以菌丝体生物量为指标,采用单因素实验研究不同碳源、氮源、无机盐、温度、pH、装液量对薛凡尼氏炭角菌菌丝体液体发酵培养的影响;以子实体生物学效率为指标判断不同配方固体培养基料对人工培养子实体的影响。结果表明:乳糖为最优碳源,蛋白胨为最优氮源,供试无机盐硫酸锰、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸钾对菌丝体生长有一定的促进作用;最适培养温度为30℃,发酵液最优的pH为7,最适的装液量为50 mL/250 mL;用68%木屑加30%麸皮的固体配方为薛凡尼氏炭角菌子实体培养的最优配方,生物学效率达到8.14%(w/w, dry)。结论:此法适用于薛凡尼氏炭角菌菌丝体的液体培养,并首次人工培养出薛凡尼氏炭角菌子实体。

关键词:薛凡尼氏炭角菌,菌丝体,子实体

Optimization of liquid culture conditions and fruiting bodies culture of *Xylaria schweinitzii*

YAO Ke, FAN Jing-bo, ZHANG Neng, ZHAO Miao, CHEN Bo, YUAN Xiao-hong, HE Xin-sheng*

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: Objective: Based on experiments, this research attempted to find out the optimal nutritional conditions, optimal growth environment for *Xylaria schweinitzii* mycelium. It also explored the best formula of solid substrate for its cultured fruiting body. Methods: Using mycelium biomass as the indicator, single-factor experiments were conducted in an effort to study the effects of different carbon sources, nitrogen sources, mineral salts, temperature, pH and liquid volume used in the solid substrate on the growth of cultured fruiting body *Xylaria schweinitzii*. Biological efficiency was used to measure the effects of different formula of solid substrate on cultured fruiting bodies of *Xylaria schweinitzii*. Results: Results showed that lactose was the optimum carbon source, and peptone was the optimum nitrogen source, and mineral salt which was $MnSO_4$, KH_2PO_4 , $MgSO_4$, K_2SO_4 had positive effects in promoting the growth of mycelium. It was also found out that the optimal temperature was 30℃, the optimum pH for fermentation was 7, the optimum liquid volume was 50 mL and optimal solid substrate consists of 68% sawdust and 30% bran. When the optimal formula was used, the biological efficiency reached 8.14% (w/w, dry). Conclusion: This research tried out a liquid culture method for culturing *Xylaria schweinitzii*. And for the first time, this method was successfully used to culture fruiting bodies of *Xylaria schweinitzii*.

Key words: *Xylaria schweinitzii*; mycelium; fruiting body

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0190-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.032

薛凡尼氏炭角菌 (*Xylaria schweinitzii*) 属于菌物界, 子囊菌门, 盘菌亚门, 粪壳菌纲, 炭角菌亚纲, 炭角菌目, 炭角菌科, 炭角菌属。该菌是竹子的一种病原菌, 春夏秋冬生长在树桩、竹荪桩等基物上^[1]。炭角菌含有萜类、核苷类、多糖、氨基酸^[2-4]等对人体有益

的成分, 且具有抑菌、抗贫血、抗氧化、抗肿瘤^[5-7]等活性。其子实体中蛋白质含量及人体必需氨基酸含量都很高, 而人体易缺乏的元素如铁、钙、锌等含量也比较高。文献报道炭角菌属的物种基本都有药用价值, 对治疗脾虚食少、产后及手术后失血过多、产后

收稿日期: 2015-07-02

作者简介: 姚珂 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事食药菌学研究, E-mail: keen638@126.com。

* 通讯作者: 贺新生 (1965-), 男, 教授, 主要从事菌物学研究, E-mail: hexinsheng@swust.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金 (21272189)。

少乳、胃下垂、疝气、心悸失眠及小儿惊风、跌打损伤等症^[8-9]都有明显功效。文献鲜有对薛凡尼氏炭角菌的研究报道。本实验以菌丝体生物量为指标,采用单因素实验研究不同培养条件对薛凡尼氏炭角菌菌丝体生长的影响,再对其培养条件进行优化,并探索薛凡尼氏炭角菌子实体的培养方法。为进一步的规模化生产、化学成分提取分离及药用价值的研究^[10-12]提供了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 在四川省成都市邛崃芦沟竹海的慈竹菟桩上多次采集到一种野生炭角菌标本,经分子鉴定为薛凡尼氏炭角菌(*X. schweinitzii*),组织分离纯化后获得纯菌种,菌种保藏在西南科技大学生命科学与工程学院微生物实验室;供试基础培养基 去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,蛋白胨2 g,琼脂20 g,磷酸二氢钾3 g,硫酸镁1.5 g,水1000 mL,pH自然;种子培养基 基础培养基不加入琼脂;液体发酵培养基 基础培养基不加入琼脂。

SW-CJ-IF超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; **MLS-3780高压灭菌锅** 三洋公司; **电热恒温培养箱** 天津市实验仪器厂; **HZQ-F全温振荡培养箱** 华城海纳仪器厂; **Centrifuge 5804R冷冻离心机** 艾本德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 将保存的菌种接种到基础培养基上,放入25℃恒温培养箱培养5 d,长满待用。

1.2.2 种子液制备 将装有150 mL种子液培养基的三角瓶常规灭菌(121℃,0.5 MPa)20 min后,待培养基冷却,取活化菌种1 cm²左右接种进三角瓶中,放置于25℃、转速为100 r/min的温控摇床培养10 d。

1.2.3 摇床培养

1.2.3.1 碳源对菌丝体生长的影响 以供试基础培养基中20 g葡萄糖的含碳量为基准,用和20 g葡萄糖相同含碳量(含C量7.266 g)的可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、木糖作碳源,液体发酵培养基以不加葡萄糖作为空白对照,共8个处理每个处理重复3次。培养基装液量50 mL/100 mL三角瓶,将液体发酵培养基常规灭菌20 min,冷却后等量接种,放置于25℃、转速为100 r/min的温控摇床培养10 d。培养结束后,取发酵液离心(5000 r/min,10 min),过滤,收集菌丝体。菌丝体于50℃烘干12 h至恒重后称重。计算菌丝体生物量(平均每100 mL发酵液得到的菌丝体干重)。

1.2.3.2 氮源对菌丝体生长的影响 以供试培养基中2 g蛋白胨的含氮量为基准,用和2 g蛋白胨相同含氮量(含N量0.290 g)的酵母粉、硝酸钾、氯化胺、尿素、硝酸铵作氮源,液体发酵培养基不加蛋白胨作为

空白对照,共7个处理,每个处理重复3次。其他步骤同1.2.3.1。

1.2.3.3 无机盐对菌丝体生长的影响 液体发酵培养基不加磷酸二氢钾、硫酸镁为空白对照,分别设置无机盐种类为硫酸镁、碳酸钙、硫酸锰、硫酸钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾,含量均为0.15%,共7个处理,每个处理重复3次。其他步骤同1.2.3.1。

1.2.3.4 pH对菌丝体生长的影响 以最优碳源、氮源、无机盐进行实验,调pH分别为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12。共10个处理,每个处理重复3次。其他步骤同1.2.3.1。

1.2.3.5 温度对菌丝体生长的影响 以最优碳源、氮源、无机盐进行实验,培养时将摇床调为15、20、25、30、35℃。共5个处理,每个处理重复3次。其他步骤同1.2.3.1。

1.2.3.6 装液量对菌丝体生长的影响 以最优碳源、氮源、无机盐进行实验,设计装液量分别为50 mL/250 mL、100 mL/250 mL、150 mL/250 mL、200 mL/250 mL。其他步骤同1.2.3.1。

1.2.4 子实体的培养 每个培养瓶里分别装有等量的干培养料,培养料配方分别为98%木屑加0%麸皮(记为A)、88%木屑加10%麸皮(B)、78%木屑加20%麸皮(C)、68%木屑加30%麸皮(D)、58%木屑加30%麸皮(E),各配方分别加1%的石灰和1%的石膏,再加1:1~1:1.2的水。共5个处理,每个处理5个重复。再以棉籽壳代替木屑进行实验,依次为含98%棉籽壳加0%麸皮(F)、88%棉籽壳加10%麸皮(G)、78%棉籽壳加20%麸皮(H)、68%棉籽壳加30%麸皮(I)、58%棉籽壳加30%麸皮(J)。将装好培养料的培养瓶常规灭菌45 min,冷却接种,放置于25℃的恒温培养箱中培养,待菌丝体长满瓶,移入室内常温培养。待子实体成熟后,称量子实体鲜重,之后将子实体于50℃烘干36 h至恒重后称重。计算生物学效率(子实体鲜重与所用的培养料干重之比)。

1.3 数据统计与分析

实验数据采用SPSS 17.0进行方差分析,用LSD法比较各因素对菌丝体生物量的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌丝体生物量的影响

不同碳源对薛凡尼氏炭角菌菌丝体生物量影响如表1所示。结果表明,薛凡尼氏炭角菌菌丝体在7种供试碳源中均能生长,但不同碳源对菌丝体生物量的影响有差异,其中以乳糖为碳源的菌丝体生物量最大,达到597 mg/100 mL,而蔗糖作为碳源时菌丝体生物量最小为252 mg/100 mL。乳糖和可溶性淀粉对菌丝体生物量影响效果都比较好且两者差异不显著,而与其他碳源差异均达到显著($p < 0.05$)水平。因此可将乳糖

表1 不同碳源对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 1 Effect of production of *X. schweinitzii* in different carbon source

碳源	乳糖	可溶性淀粉	麦芽糖	木糖	果糖	葡萄糖	蔗糖	空白
菌丝体生物量(mg/100 mL)	597 ^{aA}	495 ^{aB}	362 ^{bBC}	329 ^{bCD}	313 ^{bCD}	275 ^{bCD}	252 ^{bCD}	166 ^{dD}

注:同行不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$);不同大写字母表示差异极显著($p < 0.01$);表2~表6同。

表2 不同氮源对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 2 Effect of production of *X. schweinitzii* in different nitrogen source

氮源	蛋白胨	酵母粉	硝酸钾	硝酸铵	氯化铵	尿素	空白
菌丝体生物量(mg/100 mL)	1073 ^{aA}	1041 ^{aAB}	977 ^{aAB}	962 ^{aAB}	945 ^{aAB}	837 ^{abAB}	676 ^{lbB}

表3 不同无机盐对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 3 Effect of production of *X. schweinitzii* in different mineral salts

无机盐	硫酸锰	磷酸二氢钾	硫酸镁	硫酸钾	空白	碳酸钙	磷酸二氢钠
菌丝体生物量(mg/100 mL)	834 ^{aA}	722 ^{aA}	706 ^{aA}	702 ^{aA}	692 ^{aA}	640 ^{aA}	586 ^{aA}

表4 不同pH对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 4 Effect of production of *X. schweinitzii* in different pH

pH	7	6	5	4	8	9	3	10	11	12
菌丝体生物量(mg/100 mL)	936 ^{aA}	780 ^{abAB}	600 ^{bcABC}	486 ^{cdBCD}	468 ^{cdBCD}	228 ^{dkCDE}	192 ^{dkCDE}	84 ^{deE}	18 ^{deE}	0 ^{eE}

选为薛凡尼炭角菌菌丝体液体发酵培养的最佳碳源。

2.2 不同氮源对菌丝体生物量的影响

不同氮源对薛凡尼炭角菌菌丝体生物量影响如表2所示。结果表明,薛凡尼炭角菌菌丝体在6种供试氮源中均能生长,但不同氮源对菌丝体生物量的影响有差异,其中以蛋白胨为氮源的菌丝体生物量最大,达到1073 mg/100 mL,而尿素作为碳源时菌丝体生物量最小为837 mg/100 mL。除尿素组外,供试氮源与空白对照相比对菌丝体生物量影响差异均显著($p < 0.05$),而蛋白胨与空白对照差异达到极显著水平($p < 0.01$)。因此可将蛋白胨选为薛凡尼炭角菌菌丝体液体发酵培养的最佳氮源。

2.3 不同无机盐对菌丝体生物量的影响

不同无机盐对薛凡尼炭角菌菌丝体生物量影响如表3所示。结果表明,薛凡尼炭角菌菌丝体在6种供试无机盐中均能生长,但不同无机盐对菌丝体生物量的影响有差异,其中以硫酸锰为无机盐的菌丝体生物量最大,达到834 mg/100 mL,而加入磷酸二氢钠为无机盐的菌丝体生物量最小,只有586 mg/100 mL,小于空白对照。但供试无机盐与空白对照相比差异都不显著。

2.4 不同pH对菌丝体生物量的影响

不同pH对薛凡尼炭角菌菌丝体生物量影响如表4所示。结果表明,薛凡尼炭角菌菌丝体在供试pH为3~11的培养基都能生长。在pH=7时菌丝体产量最大,达到936 mg/100 mL, pH=12时,菌丝体不生长, pH=11时菌丝体产量最小,达到18 mg/100 mL。培养基pH偏酸或偏碱时,都不适宜菌丝体生长。pH=7时对菌丝体生物量影响与pH为6时比较,差异不显著,但与其他酸碱条件下相比均达到显著水平($p < 0.05$)。因此可将pH=7选为薛凡尼炭角菌菌丝体液体发酵培养的最适pH。

2.5 不同温度对菌丝体生物量的影响

不同温度对薛凡尼炭角菌菌丝体生物量影响如表5所示。结果表明,薛凡尼炭角菌菌丝体在15~30 °C都能生长,30 °C时菌丝体产量最大,达到1266 mg/100 mL,当培养温度为35 °C时,温度过高导致菌丝体不生长,15 °C时菌丝体产量最少只有396 mg/100 mL。30 °C

对菌丝体生物量影响与温度为20 °C差异不显著,而与其他温度条件下相比均达到极显著水平($p < 0.01$)。因此可将30 °C选为薛凡尼炭角菌菌丝体液体发酵培养的最适温度。

表5 不同温度对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 5 Effect of production of *X. schweinitzii* in different temperature

温度(°C)	30	20	25	15	35
菌丝体生物量(mg/100 mL)	1266 ^{aA}	1056 ^{aA}	672 ^{lbB}	396 ^{ab}	0 ^{bc}

2.6 不同装液量对菌丝体生物量的影响

不同装液量对薛凡尼炭角菌菌丝体生物量影响如表6所示。结果表明,薛凡尼炭角菌菌丝体在供试不同装液量的培养基都能生长,在装液量为50 mL/250 mL时菌丝体产量最大,达到1130 mg/100 mL,而装液量为200 mL/250 mL时菌丝体产量最小,只有294 mg/100 mL。装液量为50 mL/250 mL和100 mL/250 mL对菌丝体生物量影响与其他装液量条件下相比均达到极显著水平($p < 0.01$)。随着装液量的增加菌丝产量逐步减少,原因可能是装液量逐渐增多,溶氧量不足,菌丝生长变得缓慢。因此可将装液量50 mL/250 mL选为薛凡尼炭角菌菌丝体液体发酵培养的最适装液量。

表6 不同装液量对薛凡尼氏炭角菌菌丝产量的影响

Table 6 Effect of production of *X. schweinitzii* in different liquid volume

装液量(mL/250 mL)	50	100	150	200
菌丝体生物量(mg/100 mL)	1130 ^{aA}	1086 ^{aAB}	506 ^{ab}	294 ^{cb}

2.7 人工子实体的培养

每个培养瓶里分别装有75 g的干培养料,在加入不同分量 and 不同成分的情况下培养,5~10 d后白色菌丝开始萌发,20~25 d后菌丝长满瓶且菌丝体开始变黑,移入室内培养25~45 d后,培养瓶均长出了子实体,培养90~100 d后,子实体生长成熟,但不同培养基配方下子实体的生长情况各不相同。培养结果如表7所示,含配方D 68%木屑加30%麸皮的木屑培养料配

表7 薛凡尼氏炭角菌子实体培养情况
Table 7 The analysis of *X. schweinitzii* fruit bodies

配方	菌丝体颜色变化	平均每瓶子实体根数	子实体平均长度 (mm)	平均每瓶子实体鲜重 (g)	平均每瓶子实体干重 (g)	生物学效率 (%)
A	白转黄变黑	10	158±12	2.017±0.012	1.210±0.011	2.68
B	白转黄变黑	12	141±7	1.972±0.025	1.224±0.022	2.63
C	白转黄变黑	20	123±11	3.446±0.011	2.240±0.009	4.59
D	白转黄变黑	32	160±8	6.109±0.015	4.032±0.017	8.14
E	白转黄变黑	26	151±4	5.029±0.014	3.068±0.013	6.70
F	白转黄变黑	7	142±8	1.343±0.121	0.833±0.0107	1.79
G	白转黄变黑	9	151±11	1.714±0.054	1.080±0.050	2.28
H	白转黄变黑	29	146±15	5.017±0.029	3.161±0.019	6.68
I	白转黄变黑	25	137±10	4.204±0.064	2.775±0.055	5.60
J	白转黄变黑	22	150±6	4.111±0.101	2.508±0.077	5.48

方培养出的子实体长得最好,平均长度最长为160 mm,平均每瓶子实体鲜重6.109 g,生物学效率高达8.14%。在棉籽壳培养料配方中配方H含78%棉籽壳加20%麸皮培养出的子实体长得最好,平均长度最长为146 mm,平均每瓶子实体鲜重5.017 g,生物学效率为6.68%。相对于两种主料配方,以木屑为主料的配方整体优于以棉籽壳为主料的配方。因此可选择配方D含68%木屑加30%麸皮为最优固体培养料配方。

3 结论

在食药菌生长过程中碳源、氮源、无机盐是很重要的营养条件,而适宜的环境条件决定菌种是否能体现其优良性状。实验首次对薛凡尼氏炭角菌菌丝液体培养进行优化研究及对薛凡尼氏炭角菌子实体进行了人工培养。结果表明,薛凡尼氏炭角菌可以通过液体发酵获得菌丝,实验确定了液体培养条件下该菌菌丝体生长所需的最优营养条件:乳糖为液体发酵培养最优碳源;蛋白胨为液体发酵培养最优氮源;供试无机盐硫酸锰、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸钾对菌丝体生长有一定的促进作用,供试无机盐碳酸钙、磷酸二氢钠对菌丝生长起抑制作用。该菌菌丝体生长所需的最适环境条件:最适培养温度为30℃;发酵液最优pH为7;最适的装液量为50 mL/250 mL。薛凡尼氏炭角菌子实体能在人工条件下培养,含68%木屑加30%麸皮的木屑培养料配方培养出的子实体长得最好,生物学效率达到了8.14%。实验的研究结果可为薛凡尼氏炭角菌菌种生产、子实体作为功能性食品及药品领域的研究,开发利用提供参考依据。

参考文献

[1] 贺新生. 四川盆地蕈菌图志[M]. 北京:科学出版社,2011:

52-57.

[2] 翁榕安. 黑柄炭角菌的人工栽培技术及部分活性成分的研究[D]. 长沙:湖南师范大学,2009.

[3] XIA Y, FENG T, LI ZH, et al. Chemical investigation on the cultures of the fungus *Xylaria carpophila*[J]. Nat Prod Bioprospect, 2011, 17(2):75-80.

[4] 龚庆芳, 张玉梅, 谭宁华, 等. 黑柄炭角菌发酵菌丝体的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008(11):1269-1272.

[5] Veluchamy R, Ezhil A, Annamalai T, et al. Antibacterial activity of wild *Xylaria* sp. strainr005 (ascomycetes) against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2012, 14(1):47-53.

[6] Liu XL, Dong MS, Chen XH, et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2):548-554.

[7] 袁小红, 张春杰, 郑仁林, 等. 六种高等真菌醇提物的抗肿瘤活性筛选[J]. 西南科技大学学报, 2013, 28(3):95-97.

[8] 王嘉麟, 郭蓉娟, 王玉来. 乌灵参的药理作用及应用发展[J]. 环球中医药, 2010, 3(2):150-152.

[9] 邹家林. 真菌中药—乌灵参[J]. 成都中医学学报, 1984, 1(2):35-37.

[10] 陈宛如, 胡银忠, 王昱. 白蚁巢上生长的子囊菌—黑柄炭角菌的深层培养及其生理研究[J]. 真菌学报, 1995:269-276.

[11] 王兴娜, 黄午阳, 刘吉开, 等. 大炭角菌子实体化学成分的研究[J]. 中草药, 2012, 43(12):2327-2332.

[12] Thomas KA, Peintner U, Moser MM, et al. Anamika, a new mycorrhizal genus of Cortinariaceae from India and its phylogenetic position based on ITS and LSU sequences[J]. Mycological Research, 2002, 106(2):245-251.

全国中文核心期刊
轻工行业优秀期刊