

文章编号: 1674-7054(2013)01-0061-05

云芝固体培养营养因子的筛选

韩燕娇^{1,2}, 陈喜蓉², 余雪标¹, 蔡 茂¹

(1. 海南大学 环境与植物保护学院, 海南 海口 570228; 2. 海南省林业科学研究所 林副特产品研究室, 海南 海口 571100)

摘 要: 采用固体培养的方法, 研究不同碳源、氮源和无机盐营养因子对云芝菌丝生长的影响, 通过观察菌丝密度和计算菌丝生长速度, 筛选出最适合云芝菌丝生长的营养因子组合。结果表明: 云芝菌丝生长发育的最适碳源、氮源和无机盐分别是: 果糖、牛肉粉和 MgSO_4 。

关键词: 云芝; 固体培养; 营养因子; 筛选

中图分类号: Q 949.1

文献标志码: A

云芝(*Cortolus versicolor* Quel) 又称白芝、彩绒革盖菌、彩纹云芝、千层蘑等, 隶属于担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、革盖菌属, 是一种世界性分布的木腐性药用真菌^[1-5], 在我国主产于东北各省林区^[2]。明朝李时珍的《本草纲目》中对云芝亦有记载, 近年来发现其有效成分云芝多糖对治疗慢性肝炎、迁移性肝炎、乙型肝炎等疾病有显著疗效; 对提高人体免疫力和抗癌治癌也有效^[1, 4-6]。20 世纪 80 年代初, 日本人将云芝开发成抗癌新药 Krestin (PSK), 轰动了肿瘤药界^[7]; 近年来, 我国利用云芝的深层发酵、培养、提取云芝糖肽(PSP), 制成了云芝胶囊、云芝肝泰冲剂、云芝口服液等^[8]。但目前国内对云芝固体培养基配方的研究较少, 故笔者从云芝生长所需的基本营养物质入手, 采用常用的固体培养方法筛选出适合云芝生长的固体培养基配方, 以便进一步大力开发这一珍贵的菌种, 为云芝菌种的大规模生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 云芝培养菌株由海南省海口市林业科学研究所林副特产品研究室提供。

1.1.2 试剂 碳源: 果糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)、蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)、麦芽糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)、乳糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)、甘露醇($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)、木屑浸提液。

氮源: 酵母粉、牛肉粉、尿素(H_2NCONH_2)、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 NH_4Cl 。

无机盐: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MgSO_4 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 、 K_2SO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2SO_3 、 Na_2SO_4 、 NaNO_3 、 Na_2CO_3 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。

1.1.3 基础培养基 云芝菌种固体培养采用的基础培养基是: 马铃薯 200 g + 葡萄糖 20 g + MgSO_4 1.5 g $\cdot \text{L}^{-1}$ + KH_2PO_4 3 g $\cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 20 g + H_2O 1 L。

1.2 方法

1.2.1 碳源筛选试验 以基础培养基为对照, 在培养基: 马铃薯 200 g + MgSO_4 1.5 g $\cdot \text{L}^{-1}$ + KH_2PO_4 3 g $\cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 20 g + H_2O 1 L 中分别添加上述待筛选的 6 种碳源, 以代替基础培养基中的葡萄糖, 每种碳源添加量为含碳量 8 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 。

收稿日期: 2013-03-08

基金项目: 海南省科技厅海南药用真菌云芝的规范化生产技术研究(11-20409-0010)

作者简介: 韩燕娇(1987-) 女, 山东烟台人, 海南大学环境与植物保护学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 陈喜蓉. E-mail: chenxirong2005@126.com

1.2.2 氮源筛选试验 以基础培养基为对照 在基础培养基马铃薯 200 g + 葡萄糖 20 g + MgSO_4 1.5 g $\cdot$ L $^{-1}$ + KH_2PO_4 3 g $\cdot$ L $^{-1}$ + 琼脂 20 g + H_2O 1 L 中分别添加上述待筛选的 9 种氮源, 每种氮源添加量为含氮量 0.7 g $\cdot$ L $^{-1}$ 。

1.2.3 无机盐筛选试验 在培养基马铃薯 200 g + 葡萄糖 20 g + KH_2PO_4 3 g $\cdot$ L $^{-1}$ + 琼脂 20 g + H_2O 1 L 中以 1.5 g $\cdot$ L $^{-1}$ 的用量分别添加上述待筛选的无机盐 10 种, 以替代基础培养基中的 MgSO_4 , 以基础培养基为对照。

1.2.4 观测项目 按照常规培养基制备方法, 将配好的培养基装入三角瓶中, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 后, 在无菌操作台中冷却倒入平板, 每个培养皿中接入生长状况大小一致的 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的固体菌块, 放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。观察菌丝的密度, 记录菌丝生长满平板的时间, 计算菌丝的生长速度。每个处理设 5 个重复。

1.2.5 数据处理 采用 SAS 统计分析软件对试验得出的数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对云芝菌丝生长的影响 由图 1 可以看出, 云芝菌丝对碳源的利用效果, 以果糖最好, 生长速度最快, 为 0.749 cm $\cdot$ d, 葡萄糖次之, 生长速度为 0.745 cm $\cdot$ d, 乳糖生长速度最慢, 生长速度为 0.691 cm $\cdot$ d。从图 2 也可见, 在葡萄糖、麦芽糖和果糖培养基中, 云芝菌丝的密度相差无几, 较其他培养基致密且旺盛, 木屑浸提液最差, 在乳糖、甘露醇和蔗糖中云芝菌丝的生长情况相似。

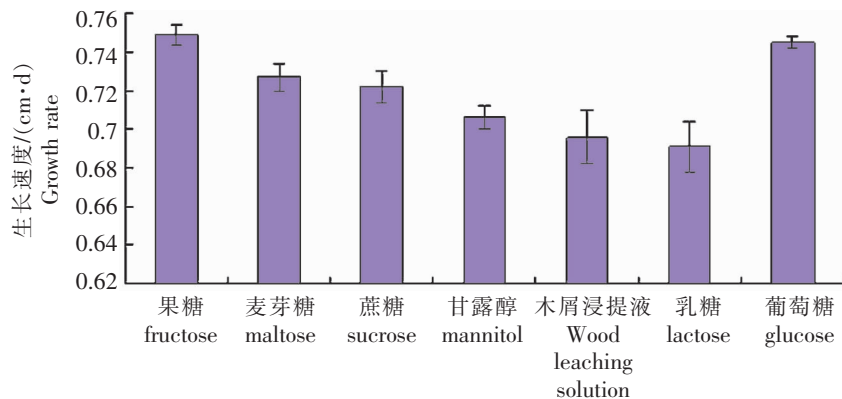


图 1 不同碳源下菌丝生长速度比较

Fig. 1 Hypha growth rate of *Cortolus versicolor* Quel on the mediums with different carbon sources

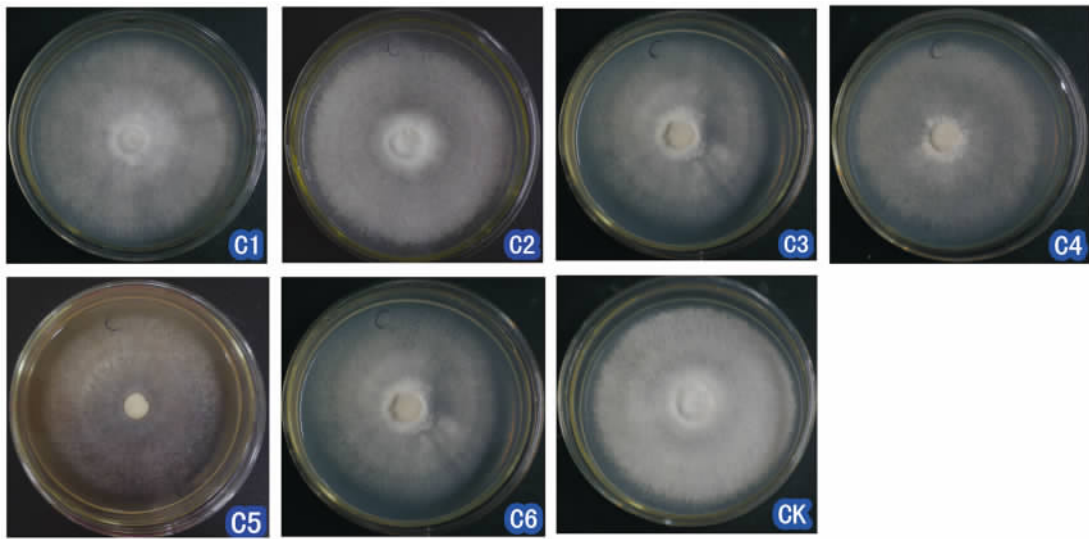


图 2 不同碳源下菌丝的生长状况

Fig. 2 The growth of hyphae of *C. versicolor* cultured on the mediums with different inorganic carbon sources

2.2 不同氮源对云芝菌丝生长的影响 由图 3 可以看出,在不同的氮源处理下,云芝菌丝对酵母粉和牛肉粉的利用效率比较高,云芝菌丝牛肉粉中生长速度为 $0.727 \text{ cm} \cdot \text{d}$, 酵母粉为 $0.716 \text{ cm} \cdot \text{d}$, 其次依次为基础培养基、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 NaNO_3 、蛋白胨、 NH_4Cl 利用率最低的是尿素, 生长速度为 $0.604 \text{ cm} \cdot \text{d}$ 。由图 4 可看出,在菌丝浓密度方面尿素、酵母粉和 NH_4Cl 最浓密,牛肉粉、基础培养基、 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 NaNO_3 菌丝相似,较浓密,菌丝最稀疏的是蛋白胨。

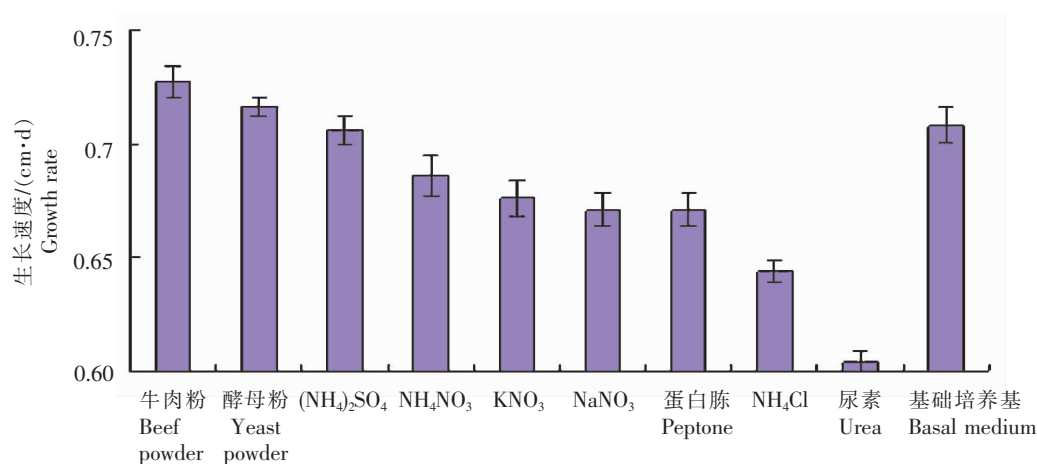


图 3 不同氮源下菌丝生长速度比较

Fig. 3 The hypha growth rate of *C. versicolor* cultured under different nitrogen sources

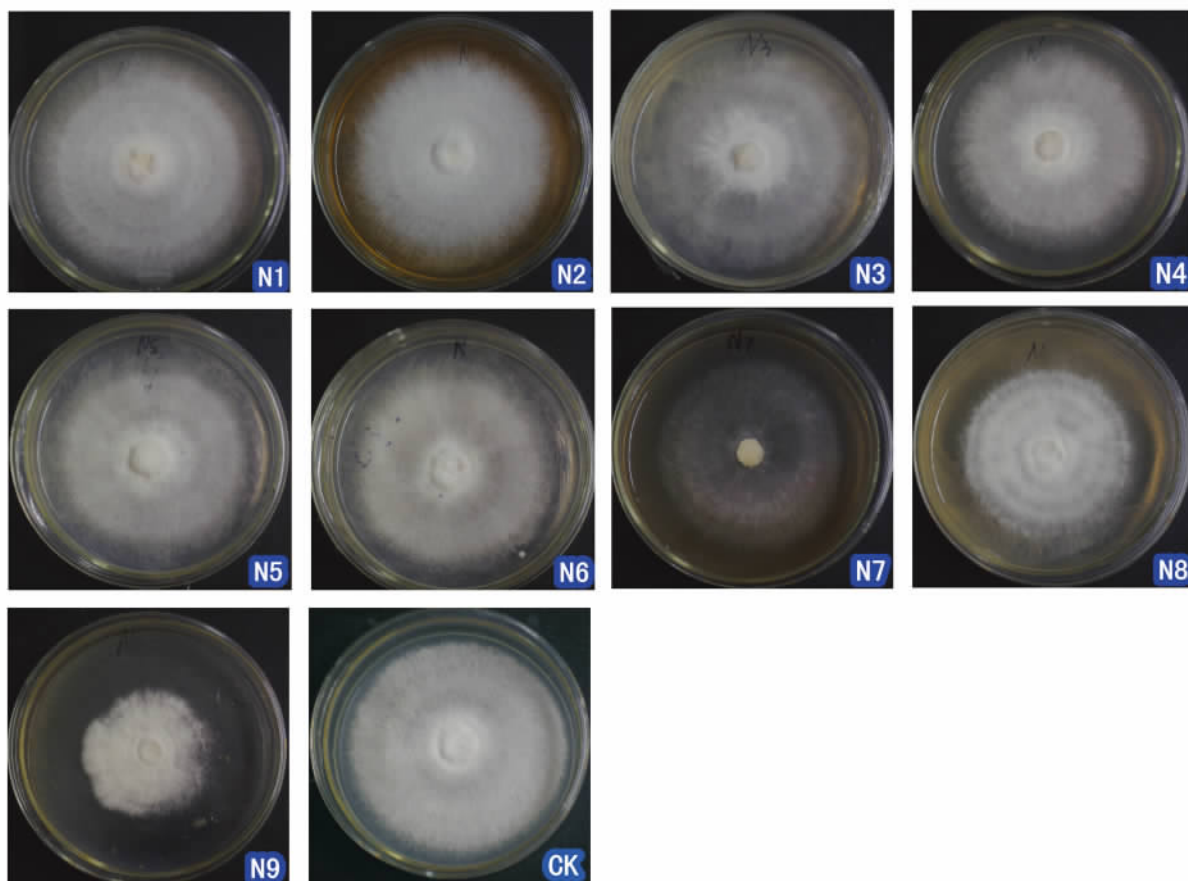


图 4 不同氮源下菌丝生长的状况

Fig. 4 The hypha growth of *C. versicolor* cultured on the mediums with different inorganic nitrogen sources

2.3 不同无机盐对云芝菌丝生长的影响 由图 5 可见, MgSO_4 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对云芝菌丝生长速度的促进作用最大, 其生长速度分别为 $0.658 \text{ cm} \cdot \text{d}$ 、 $0.652 \text{ cm} \cdot \text{d}$, 其次依次为 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 、 K_2SO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2SO_3 、 NaNO_3 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 , Na_2CO_3 对菌丝生长的影响力最小, 生长速度为 $0.389 \text{ cm} \cdot \text{d}$, 菌丝生长速度极其缓慢甚至生长停止。由图 6 亦可发现, 除了 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2CO_3 不同无机盐对菌丝密度基本无影响外, 菌丝生长密度大且颜色洁白。

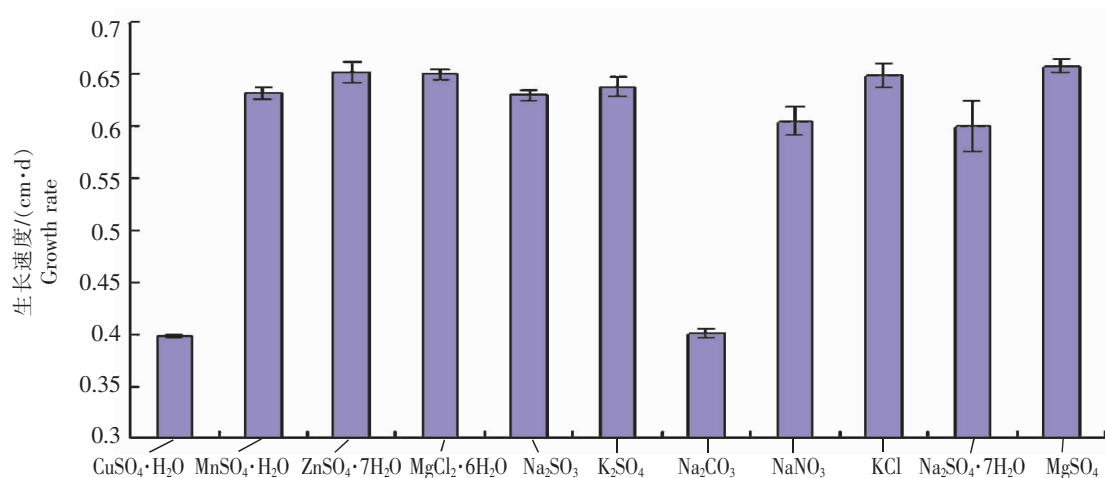


图 5 不同无机盐下的菌丝生长速度比较

Fig. 5 The hypha growth rate of *C. versicolor* cultured on the mediums with different inorganic salts

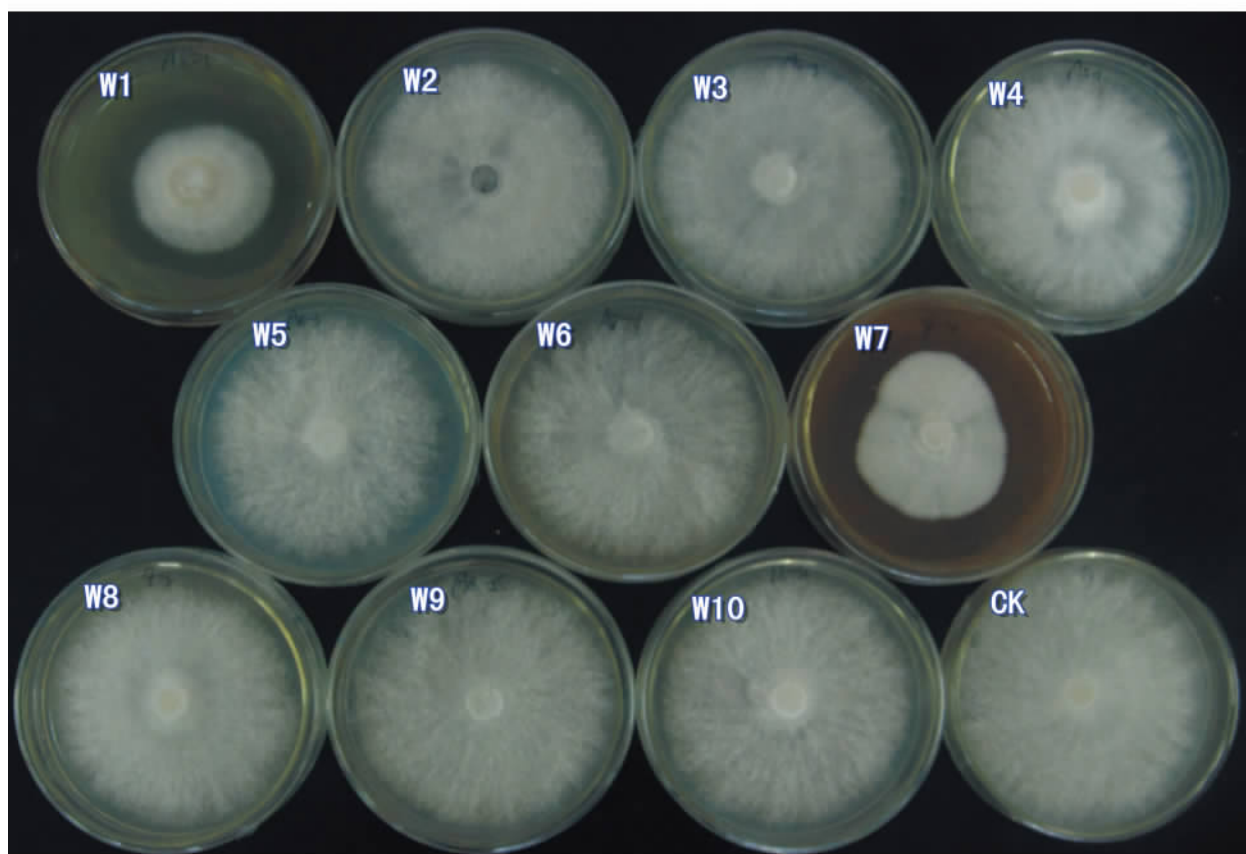


图 6 不同无机盐下菌丝生长的状况

Fig. 6 The hypha growth of *C. versicolor* cultured on the mediums with different inorganic salts

3 讨 论

云芝菌丝对参试的各种碳源的利用效果表明,云芝对木屑浸提液利用率最低,表现为生长速度缓慢,菌丝纤细稀疏。对糖类的利用主要是有机碳,利用率依次为单糖 > 双糖 > 多糖,这说明云芝优先吸收小分子的有机碳。

云芝菌丝对参试的各类型氮源都可以吸收利用,但其吸收利用程度不同,说明云芝菌丝生长发育中,不同类型的氮源对其生长发育所起的作用不相同。在有机氮中,云芝菌丝对牛肉粉利用效果最好,酵母粉次之,对蛋白胨的利用效率最低。在无机氮中,对云芝菌丝生长速度促进作用最大的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,最小的是 NH_4Cl 。总体来看,最适合云芝菌丝生长的是有机氮,其次是无机氮,这与许庆国等^[9]的研究结果一致。

在基础培养基中添加不同无机盐对云芝菌丝生长影响的结果表明,最适合云芝菌丝生长的无机盐为 MgSO_4 ,其次是 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,最差的是 CuSO_4 。分析其原因,可能是配制该培养基时 CuSO_4 中的 Cu^{2+} 形成沉淀(在配制该培养基试验过程中发现配置好的培养液中有些许不溶物并且颜色呈墨绿色),因而影响了云芝菌丝对其的吸收,从而抑制了菌丝的生长发育。

本试验结果表明,云芝菌丝生长发育的最适合碳源、氮源和无机盐分别是:果糖、牛肉粉和 MgSO_4 。

参考文献:

- [1] 于清伟,王明才,薛会丽,等. 云芝菌丝体液体培养条件的研究[J]. 山东农业科学, 2009, 11: 80-82.
- [2] 于清伟,王明才,薛会丽,等. 云芝液体培养条件的研究[J]. 浙江食用菌, 2009, 17(5): 38-39.
- [3] 李宇伟,连瑞利. 药用真菌云芝高产优质栽培技术[J]. 中国林副特产, 2010, 1: 36-37.
- [4] 曾令奎. 云芝的代料栽培技术[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(19): 212-213.
- [5] 田光辉,孟春玲,徐映红. 野生与栽培云芝中多糖含量测定及提取的研究[J]. 汉中师范学院学报: 自然科学版, 2003, 21(2): 68-72.
- [6] 马海燕,郭成金. 云芝菌丝体液体培养基的筛选[J]. 中国食用菌, 2007, 26(4): 34-36.
- [7] 湖广. 云芝的特性及人工栽培技术[J]. 食用菌, 2004, 7: 39.
- [8] 周选围,林娟. 云芝的生物学特性与栽培技术[J]. 1999, 4: 23.
- [9] 许庆国,于清伟,王明才,等. 云芝培养基配方筛选[J]. 山东农业科学, 2011, 4: 61-62.

Screening of Nutrient Elements for Culture of *Trametes versicolor*

HAN Yanjiao^{1,2}, CHEN Xirong², YU Xuebiao¹, CAI Mao¹

(1. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Specialty Forest Products Laboratory, Hainan Forestry Research Institute, Haikou 570100, China)

Abstract: *Cortolus versicolor* Quel was cultured on solid medium added with nutrient elements of different sources such as carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts, and the density and the growth rate of the mycelia of *C. versicolor* were determined to select an optimal combination of nutrient elements for growth of *C. versicolor*. The result showed that *C. versicolor* Quel mycelia grew well when fructose, beef powder and MgSO_4 were used as carbon source, nitrogen source and inorganic salt, respectively.

Key words: *Cortolus versicolor* Quel; solid culture; nutritional element; screen