

碳源和氮源对黑盖木层孔菌菌丝生长的影响

李霞* 黄明 田文敏 陈珊 张丽萍

(东北师范大学生命科学院 长春 130024)

摘要 研究了四种碳源(蔗糖、乳糖、葡萄糖、可溶性淀粉)和九种氮源(玉米面、麸皮、马铃薯、大豆粉、酵母粉、蛋白胨、硝酸钾、硝酸铵、尿素)对黑盖木层孔菌菌丝生长的影响。从不同代数的菌丝体中提取多糖,并测定多糖含量、分子量分布范围及单糖组成。结果表明:黑盖木层孔菌菌丝生长的最佳碳源为可溶性淀粉,最佳氮源为玉米面,最优碳氮组合为蔗糖和玉米面的组合。不同代数的菌丝体多糖性状基本稳定。

关键词 黑盖木层孔菌 碳源 氮源 多糖

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0537-04

Studies on the Effects of Different Carbon Sources and Nitrogen Sources on the Growth of *Phellinus Nigricans*

LI Xia* HUANG Ming TIAN Wen-Min CHEN Shan ZHANG Li-Ping

(School of Life Sciences, Northeast Normal University, ChangChun 130024, China)

Abstract The effects of four kinds of carbon sources and nine kinds of nitrogen sources on the fungus *Phellinus nigricans* mycelia were studied. The four kinds of carbon source are sucrose, lactose, glucose, soluble starch. The nine kinds of nitrogen source are corn meal, wheat bran, potato, soybean meal, yeast extract powder, peptone, potassium nitrate, ammonium nitrate, and urea. Polysaccharides were extracted from different generations of mycelia and the contents, monosaccharide components and molecular weight were analyzed. The results were that the optimal carbon source and nitrogen source were starch and corn meal. The optimal combination was sucrose and corn meal. The properties of polysaccharides from different generations of mycelia were stable.

Key words *Phellinus nigricans*, Carbon source, Nitrogen source, Polysaccharides

黑盖木层孔菌(*Phellinus nigricans*)为木层孔菌属真菌,其子实体木质,硬,多年生。目前,大量的研究证实多数针层孔菌属的真菌有较好的生物学活性^[1~3]。由于真菌多糖具有提高机体免疫力的功能,对多种疾病有很好的疗效^[4~7],日益受到人们的重视。为了使药用真菌在发酵条件下正常生长代谢以及合成人们需要的代谢产物,人们对真菌的发酵培养基及其培养条件进行了大量的研究^[8~14]。此外,发酵培养的菌丝体多糖的产量、组成及稳定性也受到广泛关注。

本实验旨在探索适合黑盖木层孔菌菌丝生长的最优碳、氮源及其组合;根据不同代数菌丝体多糖的糖含量、单糖组成,确定该菌种发酵培养的稳

定性,也为进一步研究该真菌菌丝体多糖的结构及其生物活性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

黑盖木层孔菌(*Phellinus nigricans*)采自吉林省长白山,本实验室分离菌种并保留。

1.2 仪器和试剂

DNP-9082 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),HZQ-F 型全温振荡培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),723 型可见光分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司),柱层析设备(北京新技术应用研究所),气相色谱仪

* 通讯作者 Tel: 0431-85709633, E-mail: lix754@nenu.edu.cn

收稿日期:2006-09-07,修回日期:2006-12-31

(SHIMADZU GC-14C, FID 监测器)。

Sephacrose CL-6B 凝胶购自瑞典 Pharmacia 公司, 蓝色葡聚糖(Blue dextran 2000)和标准分子量葡聚糖(Dextran)为 sigma 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基筛选

1.3.1 斜面培养基 :以 PDA 培养基为基础斜面培养基。

1.3.2 不同碳源基础平面培养基 :以葡萄糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉作碳源, 各 20g 加入无碳基础培养基。无碳基础培养基:蛋白胨 3g, 琼脂 20g, 磷酸二氢钾 3g, 硫酸镁 1.5g, 维生素 B1 10mg, 维生素 B2 10mg, 定容至 1000mL, pH 值自然。

1.3.3 不同氮源基础平面培养基 :分别用马铃薯、大豆粉、麸皮、玉米面、酵母粉、蛋白胨、硝酸钾、硝酸铵、尿素作氮源。马铃薯、大豆粉、麸皮、玉米面煮沸后取浸汁加入无氮基础培养基, 其它的氮源直接加入无氮基础培养基, 使 N 浓度为 0.36g/L。无氮基础培养基:蔗糖 20g, 琼脂 20g, 磷酸二氢钾 3g, 硫酸镁 1.5g, 维生素 B1 10mg, 维生素 B2 10mg, 定容至 1000mL, pH 值自然。

培养基灭菌后倒入无菌的培养皿中, 厚度约 5mm, 放置冷却, 每种培养基做五个重复。无菌条件下打孔器接种, 恒温培养箱 28℃ 倒置培养。每天观察菌丝生长特征, 测量菌落直径, 计算菌丝生长速度。

1.4 液体培养菌丝体多糖的提取

以不加琼脂的最佳碳、氮源组合培养基作为液体培养基。装液量为 120mL/250mL, 待培养基冷却后打孔器接种, 28℃, 130r/min, 发酵 7d。本实验以斜面活化菌种为第一代, 扩繁的斜面为第二代, 种子摇瓶为第三代, 由该种子摇瓶接种再培养的为第四代, 以此类推, 发酵培养至第八代。培养结束后分离菌丝体。菌丝体沸水提取两次, 每次 2h, 过滤, 合并滤液, 浓缩。浓缩液醇沉, 常规干燥得菌丝体粗多糖。

1.5 粗多糖中总糖含量的测定

将粗多糖溶液、6% 苯酚溶液、浓硫酸按 1:0.5:2.5 的比例加入, 振荡冷却后, 在 490nm 波长处比色, 所得数值查标准曲线可得粗多糖总糖含量。

1.6 粗多糖分子量分布的测定^[15]

采用 Sepharose CL-6B 柱层析法(1.5cm ×

110cm) 粗多糖溶液上柱, 0.9% 的 NaCl 洗脱, 洗脱液由苯酚-硫酸法检测。取分子量为 10000, 81600, 153000, 461000 的标准葡聚糖制作标准曲线, 查标准曲线求出样品的平均分子量。

1.7 粗多糖组成的测定^[15]

20mg 粗糖样, 加 1mL 2.0mol/L 的三氟乙酸 120℃ 完全酸水解 3h。乙醇除酸至中性。加硼氢化钾 50mg, 室温 1.5h。25% 的乙酸中和至中性。阳离子交换树脂除盐, 定量滤纸过滤, 甲醇除酸。加 1mg 正丙胺, 1mL 无水吡啶, 55℃ 30min。氮气吹干, 加 0.5mL 吡啶和 0.5mL 乙酸酐 90℃ 1h。氮气吹干, 加 1mL 无水二氯甲烷离心, 取上清。GC 定量分析。气相色谱条件:SP 2340 不锈钢填充柱(2m × 3mm); 起始温度 190℃(保持 1min), 以 10℃/min 速率升温至 260℃(保持 4min), 进样口温度 275℃; FID 检测器; 高纯氮气, 流速 20mL/min。

2 结果

2.1 不同碳源对黑盖木层孔菌菌丝生长的影响

我们选取 4 种不同类型的碳源培养基, 经测定, 以可溶性淀粉为碳源的菌丝生长速度最快, 其次是蔗糖和葡萄糖, 以乳糖为碳源时菌丝生长速度最慢。经方差分析, 可溶性淀粉和蔗糖为碳源时对菌丝生长速度影响的差异不显著, 而以可溶性淀粉和乳糖对菌丝生长速度的影响差异显著。

菌丝在生长初期呈现浅白色, 随着培养时间的不断延长, 菌丝颜色逐渐加深, 由浅白色到浅黄色最终转变为棕黄色。从菌丝长势看, 分别以可溶性淀粉、蔗糖和葡萄糖为碳源的培养基菌丝都很浓密、健壮, 同时菌苔也较厚, 乳糖次之。综合以上分析:黑盖木层孔菌对可溶性淀粉的利用度最好, 对蔗糖、葡萄糖的利用度也很好, 结果见表 1、图 1。

2.2 不同氮源对黑盖木层孔菌菌丝生长的影响

结果显示, 有机氮源培养基上的菌丝生长速度要明显优于无机氮源, 其中以浸汁为氮源时菌丝生长速度要优于蛋白胨和酵母粉(大豆面除外)。而以尿素为氮源时菌丝从开始培养到结束未见生长。从菌丝长势来看, 有机氮源的培养基上菌丝生长健壮、菌苔较厚; 无机氮源的培养基上菌丝普遍表现为浅薄、稀疏。不同氮源培养物上菌丝长势分述见图 2、表 2。综合以上分析:黑盖木层孔菌对玉米面、麸皮、马铃薯的利用都很好。

表 1 碳源对菌丝生长速度的影响

碳源	平均生长速度 mm/d	菌丝特征
可溶性淀粉	4.3	浓密健壮 棕黄色 边缘白色
蔗糖	3.8	同上
葡萄糖	3.7	同上
乳糖	3.0	较浓密较健壮

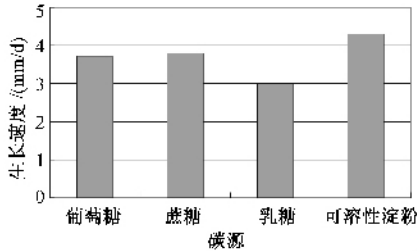


图 1 不同碳源培养基中菌丝的生长速度

表 2 氮源对菌丝生长速度的影响

氮源	菌丝生长 速度 mm/d	菌丝特征
玉米面	5.8	浓密健壮 浅黄 菌台较厚
马铃薯	5.5	同上
麸皮	5.2	同上
酵母粉	5.0	同上 菌台边缘白色
蛋白胨	3.8	同上
硝酸钾	2.0	稀疏 浅薄 棕黄 ,
硝酸铵	1.5	较浓密健壮 菌丝边缘有黄圈
大豆粉	1.5	浓密健壮 棕黄
尿素	0	未见增长

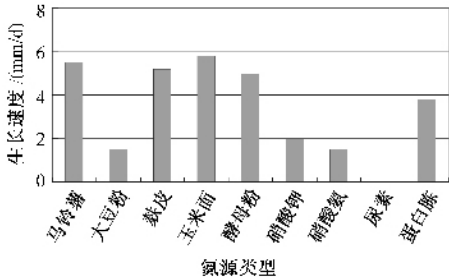


图 2 不同氮源培养基中菌丝的生长速度

2.3 最佳碳氮源组合的筛选

选取最佳碳源 :可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖 ,以及最佳氮源 :玉米面、麸皮、马铃薯进行搭配 ,如表 3。

保留基础培养基中除碳源和氮源外的其它成分 ,碳源和氮源的种类分别如表中所示 ,配制 N1—N9 共 9 种培养基。接种和培养方法如前所述。结果见表 4、图 3。

表 3 不同的碳、氮源组合

	蔗糖	可溶性淀粉	葡萄糖
玉米面	N1	N2	N3
马铃薯	N4	N5	N6
麸皮	N7	N8	N9

表 4 碳氮源组合对菌丝生长速度的影响

种类	菌丝生长速度 mm/d	菌丝特征
N1	6.5	浓密健壮 棕黄色 菌台较厚
N4	6.2	同上
N5	6.1	同上
N7	6.0	同上
N2	5.9	同上
N3	5.8	同上
N6	5.7	同上
N8	5.5	同上
N9	5.3	同上

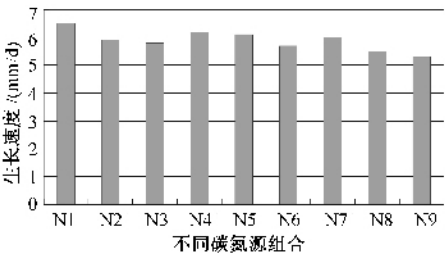


图 3 不同碳氮源组合培养基中菌丝的生长速度

图表显示 ,在 N1 的碳、氮源组合中菌丝生长速度最快 ,菌丝浓密健壮 ,菌苔也较厚。确定 N1 为黑盖木层孔菌的最佳氮源和碳源组合 ,最适宜菌丝生长。各个组合之间的差异并不显著。

2.4 菌丝体粗多糖中的多糖含量

选取液体培养的不同代数菌丝体进行多糖的提取 ,分别测定了各代菌丝体多糖的糖含量 ,以第四代菌丝体的糖含量最高 ,达到 59.4% ,其它各组样品的糖含量差异不明显。结果见表 5。

表 5 不同代数菌丝体多糖的糖含量

	第四代	第五代	第六代	第七代	第八代
糖含量	59.4%	41.4%	43.8%	42.3%	44.0%

2.5 菌丝体粗多糖的分子量分布

经 Sepharose CL-6B 柱层析,苯酚-硫酸法测多糖的分子量分布,各代菌丝体多糖的分子量分布相似。菌丝体多糖主要分布在两个区域,分子量分别在2万和40万左右。以第四代的菌丝体多糖的分子量分布为例,如图4所示。

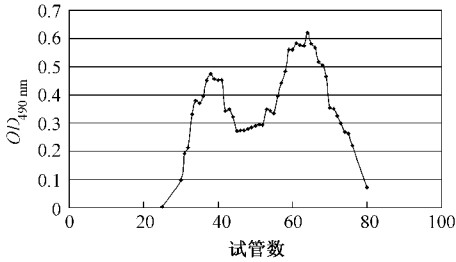


图4 菌丝体多糖分子量分布

2.6 粗多糖的单糖组成

经分析,各代菌丝体多糖的单糖种类无明显差别。以第四代菌丝体多糖为例,其单糖组成为:木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。

3 讨论

碳源和氮源是微生物生长所需的营养因子。实验结果表明,黑盖木层孔菌对氮源的利用有较强的选择性,对有机氮的利用率明显优于无机物氮,其中对氮源浸汁的利用率最高,即黑盖木层孔菌能够很好地利用有机氮促进其生长。适合该菌生长的最佳碳源为可溶性淀粉。在玉米面和蔗糖组合的培养基上该菌丝生长速度最快,菌丝浓密健壮。

大量研究表明,通过液体发酵产生的菌丝体多糖和子实体多糖之间并没有明显的差异,在某些情况下菌丝体多糖比子实体多糖还要好。张李阳等^[10]比较了灵芝子实体多糖和液体发酵菌丝体多糖,发现菌丝体多糖含量是子实体多糖含量的3.5倍,可能是由于子实体的部分木质化影响子实体多

糖的含量。而且,对冬虫夏草、香菇等的研究表明菌丝体多糖的多糖得率、糖含量、溶解性及药理效果等都优于子实体多糖^[13]。本实验初步研究了适合黑盖木层孔菌菌丝生长的固体培养基,为了使其适宜生产和研究出更好的真菌多糖,需要进一步筛选液体培养基及深入研究菌丝体多糖的理化性质等。

第四代菌丝体多糖的糖含量最高达59.4%。其它代数的糖含量在41%~44%之间,有一定的差异,但是不同代数的菌丝体多糖的单糖种类并没有明显变化,初步认为,该菌种菌丝体产糖比较稳定。

参考文献

- [1] 方一苇. 分析化学, 1994, 22(9): 955~960.
- [2] 宋力, 孙培龙, 郭彬彬, 等. 中国食用菌, 2005, 24(3): 7~10.
- [3] Andrea T. Borchers, Carl L. Keen, M. Eric Gershwin. The Society for Experimental Biology and Medicine 2004, pp. 393~406.
- [4] 王阳, 王伯初, 周菁, 等. 重庆大学学报, 2004, 27(3): 104~113.
- [5] Sang Bae Han, Chang Woo Lee, Young Jin Jeon, et al. Immunopharmacology, 1999, 41: 157~164.
- [6] Hwan Mook Kim, Sang Bae Han, Goo Taeg Oh, et al. Int. J. Immunopharmac., 1996, 18(5): 295~303.
- [7] Gi-Young Kim, Soon-Kew Park, Min-Ki Lee, et al. International Immunopharmacology 2003, 3: 1281~1292.
- [8] 赵秀芳. 安徽农业科学, 2005, 33(3): 429~431.
- [9] 赵秀芳. 中国食用菌, 2004, 24(1): 12~14.
- [10] 张李阳, 雄晓辉, 沈昌, 等. 中国食用菌, 1997, 17(1): 15~16.
- [11] 朱戎, 陈向东, 兰进. 中药材, 2001, 24(1): 55~56.
- [12] 池玉杰, 潘学仁. 菌物系统, 2001, 20(3): 378~380.
- [13] 刘祖同, 罗信昌. 食用真菌生物技术及应用. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [14] 杨菁, 黄大斌. 中国食用菌, 2005, 24(4): 31~32.
- [15] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.