

竹荪的菌丝培养及其抗菌性的初步研究

秦红敏

张长铠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(山东大学生命科学院微生物系 济南 250100)

摘要: 对长裙竹荪(*Dictyophora indusiata*)等3种的菌丝培养进行了研究并初步测定菌丝的抗菌谱。培养液的pH和液体培养基粘度是竹荪在液体中生长的关键因素,在pH4.7和添加0.5%CMC-Na的合适培养条件下竹荪菌丝在液体中能够生长、菌丝得率达到1%。还探讨了其他几种竹荪菌丝的培养方法,为竹荪菌丝的大量生产提供了依据。另外,在竹荪抗菌性实验中发现,竹荪对许多易造成食品腐败的细菌和酵母具有抗性,但没有发现其对霉菌有抗性。

关键词: 竹荪,菌丝培养,抗菌性

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (1999)-06-393-04

STUDY ON THE CONDITIONS OF MYCELIA CULTURE AND PROPERTIES OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *DICTYOPHORA* SPP.

QIN Hongmin

(*Institute of Microbiology Academic of Sciences Beijing 100080*)

ZHANG Changkai

(*Microbiology Dept. College of Life Shandong University Shandong Jinan 250100*)

Abstract: This paper deals with the submerged culture of *Dictyophora* spp., The pH and the viscosity of the media are two key factors. Through our trial, the mycelia of *Dictyophora* spp. can grow and the yield can be reached 1%. This paper also explores other methods in order to select a suitable one. The mycelia of *Dictyophora indusiata* shows the strong inhibition ability on bacteria. These results provide scientific basis for exploiting this peculiar resource.

Key words: *Dictyophora* spp. Mycelia Culture, Antimicrobial Activities

竹荪是一种名贵的食用菌,口味鲜美,营养丰富,并有极高的药用价值,它对中老年人的高血脂、高血压、高胆固醇有调节降低作用,对便秘、下肢神经性肿具有明显的疗效,竹荪多糖对小

白鼠腹水癌具有明显的疗效^[1]。除此以外,在南方有些盛产竹荪的地区,人们在夏季烧肉煮鱼

收稿日期:1998-09-10,修回日期:1998-12-28

时,加入一朵竹荪,则在几天内肉菜不会腐败变馊,起到特殊的防腐作用。竹荪的培养非常困难,在液体中更是难以生长。研究了几种培养方法,为竹荪的菌丝大规模生产提供了一些参考。对竹荪菌丝块及菌丝提取液的抗菌性进行了测定,为其开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:长裙竹荪 D42、竹荪 105(棘托竹荪 *Dictyophora echino-volvata*)、红托竹荪 (*D. Rubrovolvatab*)、中国栽培种。抗菌性供试菌株:细菌——枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*), 巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*), 变形杆菌 (*Proteus ulgaria*), 大肠杆菌 (*Escherichia. coli*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。酵母——啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 鲁氏酵母 (*S. rouxi*)。霉菌——黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 白地霉 (*Geotrichum candidum*), 以上菌种由山东大学微生物系菌种室提供。

1.1.2 培养基:葡萄糖 20g, 玉米粉 10g, 黄豆粉 10g, 酵母膏 2g, $MgSO_4$ 1.5g, KH_2PO_4 3g, 琼脂 15g, 水 1000mL。0.70 × 10Pa 灭菌 30min。菌株扩繁, 保藏及下列实验中未注明的均用这种培养基。液体培养时不加琼脂。牛肉膏-蛋白胨培养基: 牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 水 1000mL, 琼脂 20g, 培养细菌用; 沙氏琼脂培养基: 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 琼脂 15~18g, 蒸馏水 1000mL, 培养霉菌用; 葡萄糖-酵母汁-蛋白胨培养基: 蛋白胨 10g, 酵母汁 5g, 葡萄糖 20g, 蒸馏水 1000mL, 培养酵母用。

1.2 方法

1.2.1 竹荪菌丝生长营养生理要求的测定方法:采用挖块法, 接种于平板中央, 于 23℃ 下培养。进行碳源、氮源, 无机盐及维生素等实验。生长到一定时间后, 测定平板上菌丝体直径大小作为菌丝体生长的指标。3次重复, 取平均值。

1.2.2 竹荪 D42 菌丝固体培养基的筛选:根据 1.2.1 的实验结果, 选择 7 种培养基, a. PDY; b. 马铃薯综合培养基; c. 麦芽汁培养基; 糖度 10°, 取

自济南市趵突泉啤酒有限公司; d. MYG 培养基: 麦芽糖 10g, 葡萄糖 4g, 酵母膏 4g, 水 1000mL; e. 马铃薯综合培养基加竹叶浸汁: 用竹叶浸汁配马铃薯综合培养基; f. 葡萄糖 20g, 玉米粉 10g, 黄豆粉 10g, 酵母膏 2g, $MgSO_4$ 1.5g, KH_2PO_4 3g, 水 1000mL; g. 葡萄糖 10g, 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, $MgSO_4$ 0.5g, KH_2PO_4 3g, 水 1000mL; 分别加琼脂 15g/1000mL。测定方法同 1.2.1。

1.2.3 环境因子对竹荪菌丝固体培养的影响:测定方法同 1.2.1。分别在 18℃, 21℃, 24℃, 27℃, 30℃ 温度下培养。分别置于自然光、黑暗条件下培养。

1.2.4 竹荪液体培养:竹荪液体培养基的增粘剂选用 CMC-Na, 可溶性淀粉, 琼脂, 分别配制 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6% 的浓度, 250mL 装 100mL 液体培养基, 调 pH 为 4.7。接种一斜面菌丝, 23℃ 静止培养 1d, 然后摇床培养 (100r/min) 20d, 过滤菌丝, 80℃ 烘干, 称干重。3 次重复, 对结果进行分析。pH: 选用 0.5% CMC-Na, pH 取 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 测定方法同上。培养方式选 pH 4.7, 静止培养 0, 1, 2, 3d, 其余的条件同上。摇床转速选用 0.5% CMC Na, 250mL 装 100mL 液体培养基, pH 4.7。摇床转速为 80, 100, 120, 140r/min, 其余同上。

1.2.5 其他培养方法:木屑培养法。用木屑培养基(木屑 75g, 麸皮 13g, 葡萄糖 1g, $CaSO_4$ 1g, 水 200mL, 自然 pH.) 培养, 斜面试种, 23℃ 培养。半固体表面培养。加 0.5% 琼脂, 250mL 三角瓶装入 100mL 培养基。23℃ 静止培养 15d, 测菌丝干重。液体悬浮培养。将平板菌丝整块取下, 小心放在液体培养基表面 (100mL/250mL 三角瓶), 23℃ 静止培养 15d, 测菌丝干重。

1.2.6 菌丝块抗性初筛:采用贴块法, 用打孔器 ($d=0.8cm$) 从测试菌平板上取菌丝块放在供试菌株培养基平板上, 然后放置一定时间, 把混有 0.1mL 的供试菌液 5mL 的半固体琼脂倒在平板上, 在适宜的温度(细菌 37℃, 霉菌 28℃, 酵母 30℃) 下培养。观察抑菌圈的直径。

1.2.7 提取液抗菌性测定:收集新鲜菌丝体,

然后用2倍95%的酒精浸泡,置于4℃冰箱48h,离心3000r/min,10min,50℃左右减压浓缩4h以上,去除酒精并使体积缩小至原来的1/3下,然后采用双层平板法^[2],测定其抗菌能力,下层培养基用供试菌培养基,上层为半固体琼脂5mL和0.1mL的供试菌液(霉菌用其孢子液)。平板凝固后打8mm的孔,加入200 μL提取液,培养一定时间后测量抑菌圈大小。

2 结果与讨论

2.1 碳源的利用(表1)

供试的三种菌中,竹荪D42,105的生长情况相似,以下以D42作为代表,竹荪D42菌丝生

表1 碳源对竹荪菌丝生长的影响(mm/15d)

碳源	葡萄糖	果糖	甘露醇	蔗糖	麦芽糖	CMC-Na	可溶性淀粉	对照
竹荪D42	38	25	萎缩	20	38	13	14	8
红托竹荪	24	14	萎缩	12	23	11	12	8

注:对照培养基(CM):蛋白胨5g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ 1.5g, VB₁, VB₂ 0.5g,琼脂15g,水1000mL,pH5.5。实验时向对照中加入一种碳源,浓度为2%

长可利用多种碳源,最好的碳源是葡萄糖,其次是麦芽糖,果糖。葡萄糖组初期生长稍慢,但增长较快,菌丝粗壮,且在45d内继续生长,并且放置3个月后,其菌丝块于新鲜的培养基上仍能生长;而麦芽糖组初期生长很快,而后期生长慢,20d后基本停止生长,菌丝发黄老化,且放置时间长后,不易转接活。

2.2 碳源浓度

葡萄糖浓度在0~2%的范围内,菌丝生长加快,达2%时,生长速度可以达到37mm/15d;超过2%,菌丝生长受抑制。

2.3 氮源

一些天然氮源可能含有某些竹荪生长的营养因子,菌丝生长好。在实验中发现蛋白胨对菌丝生长极为不利,单独以蛋白胨(1%)以及蛋白胨(0.5%)和牛肉膏(0.5%)合用,菌丝均萎缩不能生长,这与一般文献报道有出入。供试的5种氨基酸(0.2%)Glu, Lys, Asp, Arg, Trp,

尿素(0.2%)均不能作为氮源,菌不能生长,菌丝萎缩。对其他氮源利用的情况见表2。以葡萄糖为碳源, NH₄Cl为氮源,测定碳氮比在30:1时,菌丝生长最快。

表2 氮源的利用(mm/15d)

氮源%	麸皮汁	黄豆粉	玉米粉	酵母膏	KNO ₃	2 NH ₄ NO ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	对照
竹荪D42	40	40	42	36	12	15	15	11
红托竹荪	31	30	33	24	11	12	11	10

注:实验用基础培养基(CM)组成:葡萄糖20g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ 1.5g, 微量元素含量(微量)ZnSO₄, FeSO₄, MnSO₄, CuSO₄, NaMoO₄, H₂BO₃, 维生素B₁, B₂各0.5g, 琼脂15g,pH5.5。实验组加入氮源(试剂为AR)。

2.4 无机盐类及维生素

培养基:葡萄糖20g,蛋白胨5g,琼脂15g,水1000mL,pH5.5。对照加入NaH₂PO₄3g, MgSO₄ 1.5g, KCl 3g, 维生素B₁, B₂各0.5g,实验组设置单缺(-P, -K, -Mg, -B₁, -B₂)三缺(-PKMg)和加VB₁₂0.5 mg/ml组。3次重复,取平均值。对照15d菌丝直径为35mm, K对竹荪菌丝的生长影响最大, -K菌丝直径为25mm; P, Mg, VB₁, VB₂对菌丝的生长有促进作用, -P为32mm, -Mg为28.5mm, -B₁为33mm, -B₂为32.8mm;而少量的VB₁₂即可完全抑制竹荪菌丝的生长。

2.5 竹荪D42菌丝培养基初筛

在不同培养基上,菌丝生长速度不同(菌丝体直径mm/15d, a30, b25, c45, d37, e23, f51, g33)。在f培养基上生长最好,菌丝浓密,并能形成菌丝束。

2.6 环境因子

竹荪菌丝在21℃~24℃生长较好。光对竹荪菌丝的生长不利,菌丝的生长变慢。红托竹荪菌丝见光变红发紫、容易老化。竹荪D42菌丝见光变成灰土色。

2.7 液体培养基粘度对菌球形成的影响

在供试的3种增粘剂中,只有在加入了CMC-Na的培养基中菌丝成球。当加入50g/1000mL的CMC-Na时,菌丝得率最高。达1%。液体培养基粘度对菌球形成有着至关重

要的作用,在竹荪菌丝的表面有一层象蜡质一样的东西,在水中分散性不好,不易成球。竹荪菌球的形成需要很严格的粘度可能是因为竹荪菌丝生长的附着性很强。

2.8 pH对竹荪菌丝液体培养的影响

常规的食用菌培养所用的pH为5.5~6.0,这个pH并不适用于竹荪菌丝液体培养。pH为4.5~5.0时菌丝得率最高,达1.1%。

2.9 培养方式对竹荪菌丝液体培养的影响

从固体转接到液体中,应先静止培养一段时间,待菌丝适应液体环境并开始萌发后,再进行振荡培养,但静置时间不宜过长,否则菌丝生长进入线形生长期时缺氧,会大大抑制菌丝生长。以静置培养1d,然后振荡培养效果最好。

2.10 溶氧及剪切力对菌丝生长的影响

形成规则的菌球需要合适的剪切力,而食

用菌菌丝生长对溶氧需求不高,所以振荡培养摇床转速不宜过高。以100r/min最合适。

2.11 其他培养方式

在食用菌固体栽培常用的木屑培养基上,竹荪菌丝1~2d后萌发,贴壁或附着木屑迅速生长,8~10d后长满,菌丝极疏松,使木屑成菌块状。15d后,菌丝形成菌索。如稍加大葡萄糖用量,菌丝生长量还可增大。半固体及液体表面培养,菌丝生长良好,象岛样悬浮在液体中,最后可布满液面,用这两种方法,菌丝体得率大大高于固体表面培养。

2.12 竹荪抗菌谱

对原核微生物有较好的抗性(表3)。无论是蒸馏水提取液还是酒精提取液都表现出一定的抗菌活性,这说明抗菌成分可能不止一种,有易溶于水的,也有不易溶于水而易溶于酒精的。

表3 菌丝块抗菌力检测(单位:mm)

菌株	菌丝块抗菌力检测			水提取液抗菌力检测			酒精提取液抗菌力检测		
	竹荪105	竹荪D42	红托竹荪	竹荪105	竹荪D42	红托竹荪	竹荪105	竹荪D42	红托竹荪
巨大芽孢杆菌	2	1.5	2	4	4	2.3	1.0	1.0	1.0
枯草芽孢杆菌	1.5	2.5	4	3	2.5	1.5	3.0	3.0	4
大肠杆菌	3	1.5	5	3	2.3	1.5	1.0	3.0	4
变形杆菌	2	1.0	2	2	2.5	2.8	1.5	1.0	3.0
鲁氏酵母	1	0.5	2.0	0.5	+	+	0.5	1.0	1.0
啤酒酵母	1.5	1.0	1.5	3	0.5	1.5	1.0	0.5	1.0
白地霉	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黑曲霉	-	-	-	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-	-	4	4	3	1.5	1.5	1.5

注: - 表示没有抗菌性, + 表示有抗菌性但是非常弱

竹荪的培养非常困难,在液体中更是难以生长。通过长期摸索得知:培养液的pH和液体培养基粘度是竹荪在液体中生长的关键因素,在pH4.7和添加0.5% CMC-Na的培养条件下(培养基:葡萄糖20g,玉米粉10g,黄豆粉10g,酵母膏2g, MgSO₄ 1.5g, KH₂PO₄ 3g,水1000mL),竹荪菌丝在液体中能够生长,菌丝得率达到1.1%。但是即使在最好的培养条件下,竹荪菌丝生长仍然很慢,因此,为了加速菌丝生长,还要从营养要素的合理配比以及菌丝生长时的营养物质的吸收、运输、体内的代谢等方面进行深入研究。

食品由于保存不当而造成微生物的侵袭引起腐败。目前食品工业生产采用的化学防腐剂

均具有一定的毒性,危害人民的健康。因而,现在国内外食品防腐剂的研究重点已经转向寻找新的有效而安全的天然防腐剂^[3,4]。很早以前,人们就已利用食用菌具有抗菌能力进行食品防腐了,在我们实验中证明竹荪对许多造成食品腐败的细菌及酵母都有一定的抗性,为竹荪在这方面的开发利用提供了一定的依据,对于其抗性物质的研究还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 屠六邦,李昌荣.江苏食用菌,1995,16(2)4~6.
 [2] 吴祖道.山东食品发酵,1989,73,1~5.
 [3] [日]井上真由美著,彭武厚等译.微生物灾害及其防止技术.上海:上海科学技术出版社,1983.
 [4] Fields M L. Fundamentals of food Microbiology. AVI Publishing Company, 1978.