

棘托竹荪菌丝体培养基碳源、氮源、无机盐的筛选

卢惠妮,潘迎捷,赵 勇,孙晓红*
(上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:利用平板培养和试管斜面培养探讨影响棘托竹荪菌丝体培养的理化因子:碳源、氮源、无机盐。结果表明:棘托竹荪菌丝体在平板中和试管中对碳源、氮源、无机盐的利用情况是相似的;无论是平板中培养还是试管中培养,黄豆粉、硫酸铵、硝酸钾、 Na^+ 都能促进棘托竹荪菌丝体的生长,乳糖、蛋白胨、尿素都会阻碍菌丝体的生长。棘托竹荪对氮源的需求最高,其次是无机盐,而对碳源的需求不是很高。

关键词:棘托竹荪,菌丝体,碳源,氮源,无机盐

Screening of carbon and nitrogen sources, inorganic salts for the medium of *Dictyophora echinvolvata* mycelia

LU Hui-ni, PAN Ying-jie, ZHAO Yong, SUN Xiao-hong*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Using plate cultivation and test-tube slant cultivation, the effect of the physical and chemical factors on the growth of *Dictyophora echinvolvata* mycelium were studied: carbon source, nitrogen source, inorganic salts. The results showed that: on using carbon source and nitrogen source, inorganic salts, *Dictyophora echinvolvata* mycelium was similar at both plate cultivation and test-tube slant cultivation. When using soybean meal, ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium, it had the best growth. When using lactose as a carbon source, using peptone and urea as nitrogen source, *Dictyophora echinvolvata* mycelium had the worst growth. Overall, *Dictyophora echinvolvata* mycelium had a high demand for nitrogen source, followed by inorganic salt, and the last was carbon source.

Key words: *Dictyophora echinvolvata*; mycelium; carbon source; nitrogen source; inorganic salt

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)02-0178-04

竹荪是一类大型真菌,在真菌分类学上,属于真菌界(*Fungi*),担子菌门(*Basidiomycota*),担子菌亚门(*Hymenomycotina*),腹菌纲(*Homobasidiomycetes*),鬼笔目(*Phallales*),鬼笔科(*Phallales*),竹荪属(*Dictyophora*)^[1]。竹荪属于生理碱性食品,长期服用能调整中老年人体内血酸和脂肪酸的含量,有降低高血压的作用。竹荪还有降低体内胆固醇,减少腹壁脂肪贮积的作用^[2]。竹荪所含的多糖在抗肿瘤^[3-4]、抗凝血^[5-7]、刺激免疫^[8-10]方面都有一定的疗效,对艾滋病也有抑制作用。另外,在中性至碱性条件下,竹荪可发挥抑菌作用^[11-15],且抑菌成分对高温、

高压稳定,竹荪对食品防腐有奇效,具有广泛的使用范围。本实验对影响竹荪深层培养的理化因子进行研究,利用平板培养、试管斜面培养两种培养方式,对竹荪培养的培养基进行优化。从实验结果来看,本实验可以为竹荪的菌丝大规模生产提供了一些参考,为竹荪的深层培养提供参考,以期为进一步开发利用竹荪的有效活性成分提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棘托竹荪菌丝体 棘托竹荪 16号,购自四川省绵阳市食用菌研究所;竹荪母种培养基(PDA培养基) 土豆 200g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、水 1000mL、pH 自然;碳源实验基础培养基 蛋白胨 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、 MgSO_4 0.15%、水 100mL、pH 自然;氮源实验基础培养基 葡萄糖 2%、 KH_2PO_4 0.3%、 MgSO_4 0.15%、水 100mL、pH 自然;无机盐实验基础培养基 葡萄糖 2%、蛋白胨 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、水

收稿日期:2009-04-14 *通讯联系人

作者简介:卢惠妮(1984-),女,硕士研究生,主要从事食品生物技术的研究。

基金项目:霍英东教育基金会第十一届高等院校优秀资助课题(114035)。

表1 碳源对竹荪菌丝生长的影响

碳源(菌丝体宽度,长度,cm)													
空白(CK1)		葡萄糖(CK2)		蔗糖		麦芽糖		可溶性淀粉		乳糖		羧甲基纤维素钠(CMC-Na)	
长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度
1.41	1.64	1.80	2.28	1.56	1.72	1.64	1.90	1.69	1.87	1.35	1.42	1.34	1.70

表2 氮源对竹荪菌丝生长的影响

氮源(菌丝体宽度,长度,cm)													
空白(CK3)		蛋白胨(CK4)		酵母粉		黄豆粉		尿素		硫酸铵		硝酸钾	
长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度
1.07	1.30	1.10	1.20	2.10	2.42	7.42	7.72	0.95	0.95	3.80	4.00	5.50	5.70

表3 无机盐对竹荪菌丝生长的影响

无机盐(菌丝体宽度,长度,cm)											
空白(CK5)		MgSO ₄		CaCl ₂		FeSO ₄		C ₄ H ₆ O ₄ Zn		NaCl	
长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度	长度	宽度
1.80	2.80	2.00	2.30	1.82	2.20	2.05	2.85	1.20	1.65	2.85	3.50

100mL、pH 自然^[16];葡萄糖,蔗糖,麦芽糖,可溶性淀粉,乳糖,CMC-Na,蛋白胨,酵母浸出粉,黄豆粉,尿素,硫酸铵,硝酸钾,硫酸镁,氯化钙(无水),七水合硫酸亚铁(硫酸亚铁),醋酸锌,氯化钠,乙醇95%,磷酸二氢钾。

1.2 实验方法

1.2.1 竹荪菌丝生长营养生理要求的测定方法 利用打孔器,采用挖块法(Φ6mm),将棘托竹荪菌丝体接种于平板中央和试管斜面的中央,于28℃下培养。进行碳源、氮源、无机盐等实验,等生长到一定时间后,测定平板上菌丝体大小作为菌丝生长的指标^[17]。

1.2.2 碳源实验^[18-23] 在碳源实验基础培养基中分别添加6种不同的碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、乳糖、CMC-Na),共6个处理。以不加任何碳源的培养基作为对照CK1,以加葡萄糖的培养基作为对照CK2,每个处理3次重复,观察不同的碳源对竹荪菌丝生长的影响。各培养基的pH分别为:5.04、5.02、4.93、5.02、5.00、5.02。

1.2.3 氮源实验 在氮源实验基础培养基中分别添加6种不同的氮源(蛋白胨、酵母粉、黄豆粉、尿素、硫酸铵、硝酸钾),共6个处理。以不加任何氮源的培养基作为对照CK3,以加蛋白胨的培养基作为对照CK4,每个处理3次重复,观察不同的氮源对竹荪菌丝生长的影响。各培养基的pH分别为:5.16、4.92、6.08、4.70、4.46、4.17。

1.2.4 无机盐实验 以无机盐实验基础培养基为对照,记做CK5,再向其中分别添加5种不同的无机盐(MgSO₄、CaCl₂、FeSO₄、C₄H₆O₄Zn、NaCl),共6个处理,每个处理3次平行,观察不同的无机盐/维生素对竹荪菌丝生长的影响。各培养基的pH分别为:4.85、4.85、4.47、4.12、4.54、4.56。

2 结果与分析

2.1 竹荪菌丝生长在平板上的营养生理要求

2.1.1 碳源的利用 从表1中可知,棘托竹荪菌丝体对碳源的利用情况顺序如下:葡萄糖>可溶性淀粉>麦芽糖>蔗糖>CK1>CMC-Na>乳糖。棘托竹荪菌丝体能很好地利用葡萄糖,对蔗糖、麦芽糖、可

溶性淀粉的利用情况差不多,对CMC-Na、乳糖的利用率最差,棘托竹荪菌丝体在加了乳糖的培养基中的生长情况甚至比不加任何碳源的生长情况还差。

2.1.2 氮源的利用 从表2中看出,棘托竹荪菌丝体对氮源的利用情况顺序如下:黄豆粉>硝酸钾>硫酸铵>酵母粉>空白(CK3)>蛋白胨>尿素。说明黄豆粉作为一种天然的氮源可以很好地满足棘托竹荪菌丝体的生长,棘托竹荪菌丝体在无机氮源存在的条件下长势也很好,但是蛋白胨、尿素却阻碍了棘托竹荪菌丝的生长。

2.1.3 无机盐的利用 从表3中可以看出,在棘托竹荪菌丝体对无机盐的利用情况顺序如下:氯化钠>硫酸亚铁>空白>硫酸镁>氯化钙>醋酸锌。说明Na⁺、Zn²⁺可以促进棘托竹荪菌丝体的生长。但是其他无机盐离子对棘托竹荪菌丝体的生长具有阻碍作用。

2.1.4 总体分析 棘托竹荪菌丝体的长势排序:黄豆粉>硝酸钾>硫酸铵>NaCl>硫酸亚铁>CK5>酵母浸出粉>硫酸镁>葡萄糖>氯化钙>可溶性淀粉>麦芽糖>蔗糖>醋酸锌>乳糖>CMC-Na>蛋白胨>尿素。

可以很明显的看出黄豆粉、硝酸钾、硫酸铵、NaCl、硫酸亚铁都能促进棘托竹荪菌丝体的生长。其中添加黄豆粉的培养基长势最好,但是稍差于PDA培养基。乳糖、蛋白胨、尿素培养出来的效果最差,甚至抑制了菌丝体的生长。

2.2 竹荪菌丝生长在试管斜面上的营养生理要求

2.2.1 碳源的利用 从表4中可以看出,棘托竹荪菌丝体对碳源的利用情况顺序为:葡萄糖>可溶性淀粉>蔗糖>麦芽糖>CK1>CMC-Na>乳糖。表明棘托竹荪菌丝体能很好地利用葡萄糖,对蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉的利用情况差不多,对CMC-Na、乳糖的利用率最差。

2.2.2 氮源的利用 从表5中可以看出,棘托竹荪菌丝体对氮源的利用情况顺序为:黄豆粉>硫酸铵>硝酸钾>酵母粉>空白(CK3)>蛋白胨(CK4)>尿素。从培养的结果可以看出,蛋白胨和尿素非但不

表4 碳源对竹荪菌丝生长的影响

竹荪菌种	碳源						
	空白(CK1)	葡萄糖(CK2)	蔗糖	麦芽糖	可溶性淀粉	乳糖	羧甲基纤维素钠
棘托竹荪	5	1	3	4	2	7	6

注:长势由好到差表示为:1、2、3、4、5、6,以下类推,表5,表6同。

表5 氮源对竹荪菌丝生长的影响

竹荪菌种	氮源						
	空白(CK3)	蛋白胨	酵母粉	黄豆粉	尿素	硫酸铵	硝酸钾
棘托竹荪	5	6	4	1	7	2	3

表6 无机盐对竹荪菌丝生长的影响

竹荪菌种	无机盐						
	空白(CK5)	MgSO ₄	CaCl ₂	FeSO ₄	C ₄ H ₆ O ₄ Zn	NaCl	
棘托竹荪	4	3	6	2	5	1	

能促进竹荪菌丝体的生长,还阻碍了菌丝体的生长。数据表明棘托竹荪菌丝体在平板中培养和在试管中培养时对氮源的利用情况是一致的。

2.2.3 无机盐的利用 从表6中得知,棘托竹荪菌丝体对无机盐的利用情况如下:NaCl > FeSO₄ > MgSO₄ > 空白(CK5) > C₄H₆O₄Zn > CaCl₂,可以看出Na⁺、Fe²⁺、Mg²⁺均能促进棘托竹荪菌丝体的生长,但是Zn²⁺和Ca²⁺却阻碍了棘托竹荪菌丝体的生长。

2.2.4 总体比较 棘托竹荪在不同的培养基上的长势情况排序如下:黄豆粉 > 硫酸铵 > 硝酸钾 > NaCl > 葡萄糖 > 可溶性淀粉 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 酵母浸出粉 > 硫酸亚铁 > 硫酸镁 > CK5 > 醋酸锌 > 氯化钙 > CMC-Na > 乳糖 > 蛋白胨 > 尿素。

可以很明显的看出,黄豆粉、硫酸铵、硝酸钾、NaCl、麦芽糖都能促进棘托竹荪菌丝体的生长。其中添加黄豆粉的培养基长势最好,但是稍差于PDA培养基。乳糖、蛋白胨、尿素培养出来的效果最差,甚至抑制了菌丝体的生长。

3 总结

棘托竹荪菌丝体在平板上培养和试管中培养时对碳源、氮源的利用情况差不多,碳源方面利用最好的是葡萄糖和可溶性淀粉,然后是麦芽糖和蔗糖,利用最差的是CMC-Na和乳糖。氮源方面利用最好的是黄豆粉,其次是无机氮源硝酸钾和硫酸铵,然后是酵母粉,利用最差的是蛋白胨和尿素,它们甚至阻碍了棘托竹荪菌丝体的生长。

棘托竹荪菌丝体在平板上培养和试管中培养时对无机盐的利用情况差异比较显著,在平板中培养时Na⁺、Fe²⁺可以促进棘托竹荪菌丝体的生长,其他无机盐离子对棘托竹荪菌丝体的生长具有阻碍作用。但是在试管中培养时除了Na⁺、Fe²⁺具有促进作用,Mg²⁺也能促进棘托竹荪菌丝体的生长。

本实验得出最适合棘托竹荪菌丝体生长的培养基配方是:黄豆粉1.5%、葡萄糖2%、KH₂PO₄0.3%、MgSO₄0.15%、水100mL。

无论是平板中培养还是试管中培养,黄豆粉、硫酸铵、硝酸钾、Na⁺都能促进棘托竹荪菌丝体的生长、乳糖、蛋白胨、尿素都会阻碍菌丝体的生长。棘托竹荪对氮源的需求最高、其次是无机盐,而对葡萄糖的需求不是很高。

参考文献

- [1]朱利泉,邓艳霞.竹荪的研究与利用[J].中国野生植物资源,2000,19(3):21-23.
- [2]林海红,林浪.长裙竹荪对大鼠血脂的影响[J].福建农业大学学报,2000,29(2):238-241.
- [3]柯伏钊,林玉满.长裙竹荪菌丝体糖蛋白DiGP-2的组成分析和抑癌作用的研究[J].海峡药学,2001,13(4):120-123.
- [4]赵凯,王飞娟.红托竹荪菌托多糖的提取及抗肿瘤活性的初步研究[J].菌物学报,2008,27(2):289-296.
- [5]林玉满,苏爱华.长裙竹荪凝集素的分离纯化与部分生化性质[J].中国生物化学与分子生物学报,2003,19(2):261-263.
- [6]林玉满,苏爱华.棘托竹荪凝集素的纯化及其生化特性[J].植物资源与环境学报,2004,13(3):1-6.
- [7]林玉满,苏爱华.短裙竹荪(*Dityophora duplicata*)凝集素纯化与生化性质[J].中国生物化学与分子生物学报,2005,21(1):101-107.
- [8]郭渝南,唐礴.长裙竹荪托盖液修复大鼠免疫损伤的实验研究[J].中药材,2006,29(2):174-176.
- [9]熊彬,郭渝南,唐礴.不同剂量竹荪托盖液对大鼠免疫功能的影响[J].现代医药卫生,2005,21(22):3041-3042.
- [10]郭渝南,熊彬,唐礴,等.竹荪托盖液对辐射损伤大鼠免疫功能的修复作用[J].中国临床康复,2005,9(27):116-117.
- [11]檀东飞,苏燕卿,吴若菁,等.棘托竹荪乙酸乙酯提取物的抑菌作用研究[J].海峡药物,2002,14(5):101-103.
- [12]檀东飞,杜峥嵘,吴若菁,等.棘托竹荪正己烷提取物的抑菌作用研究[J].海峡药学,2003,15(1):61-63.
- [13]梁鸣,檀东飞.棘托竹荪丙酮提取物的化学成分及丙酮、乙醇、水提取物的抑菌活性研究[J].菌物学报,2005,24:197-201.
- [14]檀东飞,吴若菁,梁鸣,等.棘托竹荪挥发油化学成分及抑菌作用的研究[J].菌物系统,2002,21(2):228-233.
- [15]杨威,吴素蕊,樊建,等.棘托竹荪菌丝体抑菌作用研究[J].中国食用菌,2008,27(6):34-37.
- [16]刘华,贾薇,刘艳芳,等.珍稀药用真菌—樟芝深层发酵培养条件的优化[J].微生物学通报,2007,34(1)70-74.
- [17]秦红敏,张长凯.竹荪的菌丝培养及其抗菌性的初步研究[J].微生物学通报.1999,26(6):393-396.
- [18]檀东飞,吴若菁,林跃鑫,等.棘托竹荪菌丝深层培养的研究[J].福建师范大学学报:自然科学版,2002,18(1):

一株牛蒡表面产纤维素酶细菌的分离鉴定

侯进慧

(徐州工程学院食品工程学院, 江苏徐州 221008)

摘要:从牛蒡表面获得的多株产纤维素酶细菌中筛选到一株产酶活性较高的菌株 NP10。使用生物技术方法获得了 NP10 长度为 1419bp 的 16S rDNA 序列。利用生物信息学方法在美国国立生物技术信息中心 NCBI 基因库比对分析了该序列,通过分析初步确定该菌为 *Bacillus* sp. 本文为食品科学中进行细菌鉴定提供了方法参考,并为开发新型纤维素酶提供了资料。

关键词:牛蒡, 纤维素酶, *Bacillus*, 16S rDNA

Isolation and characterization of a bacterial strain producing cellulase from burdock

HOU Jin-hui

(Food Engineering Department, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: A bacterial strain NP10 with higher cellulase activity among several bacteria producing cellulase was isolated from burdock in this paper. With biotechnology, a 1419bp 16S rDNA of NP10 was sequenced. The sequence was analyzed with bioinformatics method base on the NCBI Genbank data, and the strain was preliminary identified as *Bacillus* sp. This study provided method to classify bacteria in food science and data to develop new cellulase.

Key words: burdock; cellulose; *Bacillus*; 16S rDNA

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)02-0181-03

牛蒡 (*Arctium lappal*) 是一种菊科牛蒡属的二年生草本植物,其肥大的肉质根是可食用且营养价值较高的农产品。其在江苏徐州的丰县地区种植面积占全国总种植面积的 40% 以上,产品出口到日本、韩国等地区,经济价值较高^[1]。在我国,牛蒡长期以来一直作为药用植物,在《本草纲目》等古籍上都有关于它药用价值的详细记载。近年来,人们加强了牛蒡的营养、食用和药理等方面的研究,逐渐认识到其抗菌、抑制肿瘤的效果,并有东洋参之称^[2]。因此牛蒡是一种值得深入研究开发的农产品资源。纤维素酶可以促进牛蒡等农产品资源的开发利用。植物的根茎有着大量的纤维物质,而纤维物质的降解,对于提取植物性产品的有效成分有着重要的意义。同时,纤维素也是自然界中分布广泛且产量最丰富的一种碳水化合物资源。开发新型纤维素酶对于解决

食品短缺、环境污染和能源危机等问题都有着一定的现实意义。纤维素分子是一种具有复杂结构的结晶分子,可被纤维素酶降解。纤维素酶是一个酶系,是能降解 β -1,4-葡萄糖苷键的酶的总称。纤维素酶的研究是纤维素资源综合利用的基础。纤维素酶来源广泛,主要来自于真菌和细菌,其中对于真菌纤维素酶的研究较多^[3]。细菌中蕴藏着不同的纤维素酶基因,需要通过食品生物工程方法加大对细菌纤维素酶的研究,以开发出特性各异的纤维素酶。本文从牛蒡表面筛选到一株产酶活性较高的菌株 NP10,分析其 16S rDNA 序列,对该细菌进行了鉴定分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验筛选到的产纤维素酶菌株 分离自牛蒡根茎表面; 1L LB (Luria-Bertani) 液体培养基^[4] 蛋白胨 10g、酵母粉 5g、NaCl 10g, 每升 LB 固体培养基还需加琼脂粉 12g; 1L 产纤维素酶菌株筛选培养基^[4] 羧甲基纤维素 10g、蛋白胨 10g、酵母膏 5g、KH₂PO₄

收稿日期: 2009-04-07

作者简介: 侯进慧 (1980-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 校引进人才科研启动项目; 校科研项目 (XKY2008110)。

63-66.

[19] 杜显光, 卜宗式, 白雪芳, 等. 竹荪深层培养的理化因子研究[J]. 中国食用菌, 15(2): 37-40.

[20] 马艳弘, 张福元, 何云峰. 竹荪液体培养适期营养需求的研究[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(1): 20-23.

[21] 吴振强, 高孔荣, 曾惠玲, 等. 竹荪菌丝深层培养研究

[J]. 中国食用菌, 2004, 11(3): 22-24.

[22] 蔺银鼎, 马艳弘, 张福元. 竹荪液体培养基优化配方筛选及培养基营养变化特性的研究[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 18-24.

[23] 闫永亮, 马艳弘. 不同碳氮源对竹荪液体培养菌丝生物量影响[J]. 食用菌, 2006(增刊): 26-27.