

孙 勇,蒋继宏. 红缘拟层孔菌的培养条件[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):208-210.

红缘拟层孔菌的培养条件

孙 勇, 蒋继宏

(江苏师范大学药用植物生物技术重点实验室,江苏徐州 221116)

摘要:为了解药用真菌红缘拟层孔菌的最佳培养条件,在单因素试验的基础上,以葡萄糖、蛋白胨、黄豆粉煮汁、pH 值为因素,以菌丝干质量和发酵液抗肿瘤活性为标准,采用正交试验方法从中选出最优培养条件。结果表明:红缘拟层孔菌生长的最适温度为 25 ℃,中性偏酸性环境,最适碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,以菌丝干质量为标准,最优培养条件为:葡萄糖 25 g/L,蛋白胨 10 g/L,黄豆粉煮汁 3 g/L,pH 值为 6;以发酵液抗肿瘤活性为标准,最佳培养条件为:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 8 g/L,黄豆粉煮汁 4 g/L,pH 值为 6。

关键词:红缘拟层孔菌;菌丝干质量;抗肿瘤活性

中图分类号:Q93-335 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0208-03

红缘拟层孔菌 [*Fomitopsis pinicola* (Swartz. ;Fr.) Karst.] 分类上属于多孔菌目多孔菌科拟层孔菌属,是一种对云杉等针叶树危害较大的木腐菌,引起木材木质部褐色块状腐朽,对小白鼠肉瘤 180 及艾氏肉瘤抑制率分别为 70% 和 80%^[1]。近来的研究表明,红缘拟层孔菌水提取物能降低血糖浓度,升高血液中 HDL 浓度,降低 LDL 浓度^[2];红缘拟层孔菌多糖能够抑制 VEGF 诱导的血管生成,乙醇提取物能够抑制 IFN- γ 诱导的炎症标记物 IP-10 的生成,但对脉管内皮细胞没有细胞毒性作用^[3];红缘拟层孔菌提取物能够清除 DP-PH 自由基、超氧化物阴离子自由基;对 SK-Hep3B、HeLa、HO-1、PLC/RF/5、Hep3B、SNU354、SNU185 等肿瘤细胞均有

细胞毒性作用(醇提物活性比水提物活性强)^[4];红缘拟层孔菌的石油醚相、乙酸乙酯相和甲醇相提取物对 HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别为 71.04、36.43、198.04 $\mu\text{g/mL}$,对 SMMC-7721 的 IC₅₀ 分别为 45.22、35.63、187.56 $\mu\text{g/mL}$ ^[5];Yoshikawa 等发现红缘拟层孔菌有 3 种萜类化合物具有选择性抑制 COX-2 的作用^[6];Isabelle 等研究了红缘拟层孔菌的抗木霉菌活性^[7]。综上所述,红缘拟层孔菌具有消炎、抗氧化、抗肿瘤等作用,是一种具有开发前景的药用真菌。我们从黑龙江省长白山上采集到野生子实体,对其进行分离驯化研究,研究温度、酸碱度和营养条件对该菌株生长的影响,为了解该菌的培养特性和进一步研究开发做准备。

收稿日期:2013-05-20

基金项目:江苏省徐州师范大学基金项目(编号:10XLA20)。

作者简介:孙 勇(1977—),男,江西高安人,硕士,讲师,从事微生物学研究。E-mail:sunyong23@jnsu.edu.cn。

通信作者:蒋继宏,博士,教授。Tel:(0516)83403515;E-mail:jhjiang@xznu.edu.cn。

2.8 装料系数对蟹味菇液体培养的影响

由表 9 可知,装料系数 60%,蟹味菇菌丝生长量最大,增幅也较大,为最优。其次分别为 40%、20%。

表 9 装料系数对蟹味菇液体培养的影响

装料系数(%)	菌丝干质量(mg/mL)
20	2.18cC
40	11.43bB
60	13.37aA

2.9 接种量对蟹味菇液体培养的影响

由表 10 可知,接种量 1.5 管,蟹味菇菌丝生长量最大,增幅也较大,为最优。其次为 2 管。

3 结论

结果表明,其适宜的液体培养基组成为:3% 玉米粉,1.5% 麸皮水,0.3% 维生素母液,0.1% KH₂PO₄,0.5% MgSO₄;适宜的培养条件为:培养基初始 pH 值为 5.5,在

1 材料与方法

1.1 供试菌种和肿瘤细胞

供试菌种:红缘拟层孔菌菌种,由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供,分离自东北长白山红缘拟层孔菌子实体。胃腺癌肿瘤细胞:SGC-7901。

表 10 接种量对蟹味菇液体培养的影响

接种量(管)	菌丝干重(mg/mL)
0.5	6.10eE
1	9.61dD
1.5	13.10aA
2	12.31bB
2.5	11.93cC
3	12.01cC

25 ℃,160 r/min 下,装料系数 60%,接种量 1.5 管,振荡培养 5 d。

参考文献:

- [1] 杨荣玲,陈卫东,赵祥杰,等. 巴西虫草液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌,2007,26(1):50-54.
- [2] 张文隽,吴亚召,雷 萍,等. 桦树桑黄液体发酵培养基优化研究[J]. 中国食用菌,2010,29(6):24-25.
- [3] 江艳华,江晓路,王 鹏,等. 白灵菇液体培养条件的研究及栽培试验[J]. 食用菌学报,2005,12(1):37-41.

1.2 温度对红缘拟层孔菌菌丝生长的影响

将分离得到的红缘拟层孔菌菌种用 PDA 平板在 26 ℃ 条件下连续培养 6 d,使其形成可供试验的菌落,用无菌的打孔器取直径 5 mm 的菌落块,置于 PDA 平板中,每皿放 3 块,呈等边三角形放置,分别置于 10、15、20、25、30、35、40 ℃ 的恒温培养箱中,连续培养 6 d,用“十”字交叉法测量菌落直径,并观察菌落形态、菌丝长势。菌丝长势浓密健壮用“+++”表示,生长较浓密用“++”表示,生长较稀疏用“+”表示,生长稀疏用空白表示,不生长用“-”表示。

1.3 pH 值对红缘拟层孔菌菌丝生长的影响

用 1 mol/L 氢氧化钠和 1 mol/L 盐酸将 PDA 培养基的 pH 值调节为 5、6、7、8、9、10、11 共 7 个梯度。将不同 pH 值的培养基倒入直径为 90 mm 的培养皿中,制成固体平板,置于 26 ℃ 恒温箱中连续培养 6 d。用“十”字交叉法测量菌落直径,观察记载菌丝生长势。生长势表示方法同上。

1.4 红缘拟层孔菌对碳源和氮源的利用

供试碳源:淀粉、糊精、羧甲基纤维素钠、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇。

供试氮源:氯化氨、硝酸钾、黄豆粉、酵母粉、蛋白胨、尿素。

碳源利用试验的基础培养基为:0.32 g 硝酸铵,1 g 磷酸二氢钾,0.5 g MgSO₄·7H₂O,0.005 g/L 维生素 B₁,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。以 2% 的量加入不同的碳源,自然 pH 值,在每一平板中接入直径 5 mm 的菌落 3 块,呈等边三角形排列,置于 26 ℃ 恒温培养箱中,连续培养 6 d,“十”字交叉法测量菌落直径,并观察菌落形态、菌丝长势。

氮源利用试验的基础培养基为:20 g 葡萄糖,1 g KH₂PO₄,0.5 g MgSO₄·7H₂O,0.005 g 维生素 B₁,20 g 琼脂,蒸馏水 1 000 mL,以 10 g/L 的量加入 5 种不同的氮源,自然 pH 值,其他方法同碳源试验。以氮源基础培养基为空白对照。

1.5 正交试验设计

从碳氮源试验结果中选出最好的碳源和氮源作为正交试验因素,结合 pH 值因素,采用正交设计进行最佳培养条件试验。采用 150 mL 三角瓶培养(装液量 50 mL),每处理重复 3 次。

1.6 MTT 法测定红缘拟层孔菌抗肿瘤活性

人胃腺癌肿瘤细胞 SGC-7901 以 8×10⁴ 个/孔的浓度接种于 96 孔培养板中,在 5% CO₂ 37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后,加入提取物浓度为 100 μg/mL,继续培养 48 h,弃去溶液,用 200 μL 基本培养基洗 1 次,每孔加入 50 μL 37 ℃ 预热的 MTT (2 mg/mL)4 h,弃去培养基,用 PBS 洗一次,每孔加 200 μL DMSO,在平板摇床上摇 30 min,在酶标仪 570 nm 下读板,根据测得的吸光度计算抑制率。

抑制率 = (1 - 试验组吸光度/对照组吸光度) × 100%

2 结果与分析

2.1 温度对红缘拟层孔菌菌丝生长的影响

由表 1 可知:红缘拟层孔菌生长最快的温度为 30 ℃,培养 6 d 的菌落直径达 7.5 cm,红缘拟层孔菌低于 10 ℃ 和高于 40 ℃ 时均不生长,25 ℃ 生长速度慢,但菌丝的生长势明显高

表 1 不同温度下红缘拟层孔菌的菌落

温度(℃)	菌落直径(cm)	生长势
10	0Aa	-
15	1.983 3 ± 0.147 20Cc	++
20	3.433 3 ± 0.103 28Dd	+++
25	4.933 3 ± 0.975 02Ee	+++
30	7.550 0 ± 0.441 59Ff	++
35	1.183 3 ± 0.147 20Bb	+
40	0Aa	-

注:培养时间为 6 d。同列数值后不同大、小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

于 30 ℃ 时的生长势,说明红缘拟层孔菌为中温型菌类。

2.2 pH 值对红缘拟层孔菌菌丝生长的影响

红缘拟层孔菌在 pH 值 7 左右生长最好,培养基 pH 值 5~8 时菌丝生长无显著差异,当 pH 达到 9 以上时生长速度明显变慢,生长势变差(表 2)。由此可见,红缘拟层孔菌喜欢中性偏酸性环境。

表 2 不同酸碱度条件下红缘层孔菌的菌落

pH 值	菌落直径(cm)	生长势
5	5.333 3 ± 0.152 75Dd	+++
6	5.233 3 ± 0.251 66Dd	+++
7	5.233 3 ± 0.208 17Dd	+++
8	5.400 0 ± 0.360 56Dd	+++
9	4.033 3 ± 0.550 76Cc	++
10	2.300 0 ± 0.200 00Bb	+
11	1.533 3 ± 0.208 17Aa	+

注:培养时间为 6 d。同列数值后不同大、小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

2.3 碳源、氮源对红缘拟层孔菌菌丝生长的影响

红缘拟层孔菌在提供的碳源上均能生长,其中以葡萄糖为最好的碳源,培养 6 d 菌落直径为 4.775 cm,生长势好;蔗糖、麦芽糖和淀粉次之,以甘露醇为碳源时生长速度较快,但长势差,红缘拟层孔菌对羧甲基纤维素钠利用最差,生长慢长势差(表 3)。

表 3 不同碳源条件下红缘拟层孔菌菌落生长直径和生长势

碳源	菌落直径(cm)	生长势
对照	1.500 0 ± 0.081 65Aa	
羧甲基纤维素钠	1.500 0 ± 0.182 57Aa	+
淀粉	4.275 0 ± 0.263 00Bc	+++
糊精	3.725 0 ± 0.263 00Bb	+++
蔗糖	4.225 0 ± 0.573 73Bc	+++
麦芽糖	4.175 0 ± 0.623 83Bc	+++
葡萄糖	4.775 0 ± 0.736 55Cd	+++
甘露醇	4.425 0 ± 0.377 49Bc	++

注:培养时间为 6 d。同列数值后不同大、小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

在所有供试氮源中,除尿素以外,红缘拟层孔菌均能利用,其中,对蛋白质利用最好,酵母膏次之,能够利用硝酸盐和铵盐,对黄豆粉的利用一般(表 4)。

2.4 正交试验结果

以葡萄糖、蛋白胨、黄豆粉煮汁和 pH 值作为研究因素,进

表 4 不同氮源条件下红缘拟层孔菌菌落生长情况

氮源	菌落平均直径 (cm)	生长势
对照	2.725 0 ± 0.221 74b	
氯化铵	2.875 0 ± 0.189 30bc	
硝酸钾	3.250 0 ± 0.251 66bc	
黄豆粉	3.625 0 ± 0.556 03c	
酵母粉	3.200 0 ± 0.081 65bc	+
蛋白胨	4.475 0 ± 0.263 00d	++
尿素	0	-

注:培养时间为 6 d。同列数值后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

行正交试验(表 5)。由表 6 可知,各因素对红缘拟层孔菌干质

表 6 红缘拟层孔菌培养基正交试验结果

处理号	葡萄糖	蛋白胨	黄豆粉煮汁	pH 值	菌丝平均干质量 (g/瓶)	发酵液对肿瘤细胞抑制率 (%)
1	1	1	1	1	0.129 575	23.15
2	1	2	2	2	0.097 425	15.21
3	1	3	3	3	0.108 350	11.55
4	2	1	2	3	0.120 250	21.94
5	2	2	3	1	0.207 300	42.44
6	2	3	1	2	0.149 025	3.65
7	3	1	3	2	0.186 150	4.86
8	3	2	1	3	0.154 300	8.07
9	3	3	2	1	0.240 125	21.71
K ₁ (干质量)	0.335 350	0.435 975	0.432 9	0.577 0		
K ₂ (干质量)	0.476 575	0.459 025	0.457 8	0.432 6		
K ₃ (干质量)	0.580 575	0.497 500	0.501 8	0.382 9		
R(干质量)	0.245 250	0.061 250	0.068 9	0.194 1		
K ₁ (抑制率)	0.499 1	0.499 5	0.348 7	0.873 0		
K ₂ (抑制率)	0.680 3	0.657 2	0.588 6	0.237 2		
K ₃ (抑制率)	0.346 4	0.369 1	0.588 5	0.415 6		
R(抑制率)	0.333 9	0.288 1	0.239 9	0.635 8		

3 讨论

本试验结果表明,菌丝产量和发酵液抗肿瘤活性并不同步,产量最高的培养条件下,发酵液抗肿瘤活性不一定高,在供试水平内,营养成分越高,产量越高,但抗肿瘤活性水平不高,可能是营养丰富的条件下,菌丝处于快速生长期,代谢产物还没有积累,培养时间加长可能更有利于活性成分的积累。

MTT 法测定抗肿瘤活性时,发酵液的酸碱度对肿瘤细胞的生长有一定的影响,试验时发酵液 pH 值应调节至 7 左右才能排除发酵液偏酸的影响,另外,本试验发酵液的测定是在稀释 10 倍的条件下测定的,因而,基本可以排除 pH 值对肿瘤细胞的影响。

参考文献:

[1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 2000:465.
[2] Wol - Suk C, Ding J L, Hyun - Jae S, et al. Effect of fomitopsis pinicola extract on blood glucose and lipid metabolism in diabetic rats

量影响大小顺序为:葡萄糖 > pH 值 > 黄豆粉煮汁 > 蛋白胨,葡萄糖含量的影响明显大于氮源蛋白胨,最优组合为:葡萄糖 25 g/L,蛋白胨 10 g/L、黄豆粉煮汁 3 g/L,pH 值为 6;对发酵液抗 SGC - 7901 肿瘤细胞活性的影响而言,各因素影响大小为:酸碱度 > 葡萄糖 > 蛋白胨 > 黄豆粉煮汁,最佳组合为:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 8 g/L、黄豆粉煮汁 4 g/L,pH 值为 6。

表 5 红缘拟层孔菌培养基正交试验因素及水平

水平	葡萄糖 (%)	蛋白胨 (%)	黄豆粉煮汁 (%)	pH 值
1	15	6	2	6
2	20	8	3	7
3	25	10	4	8

[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009, 26 (6): 1696 - 1699.
[3] Cheng J J, Lin C Y, Lur H S, et al. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 829 - 834.
[4] Choi D, Sang - Shin P, Ding J L, et al. Effects of fomitopsis pinicola extract on antioxydant and antitumor activities [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007, 12: 516 - 524.
[5] Ren G, Liu X Y, Zhu H K, et al. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China [J]. Fitoterapia, 2006, 77 (5): 408 - 410.
[6] Yoshikawa K, Inoue M, Matsumoto Y, et al. Lanostane triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX - 1 and COX - 2 [J]. Journal of Natural Products, 2005, 68 (1): 69 - 73.
[7] Isabelle S G, Daniel J, Hmamba A. Selection of grifola frondosa and fomitopsis pinicola strains resistant to trichoderma viride in Teflon tubes confrontation method [J]. Mycological Progress, 2004, 3 (4): 329 - 336.