

王丽星,黄志伟,郑亚凤,等.樟芝适宜的液体发酵培养基配方研究[J].江苏农业科学,2016,44(7):236-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.066

樟芝适宜的液体发酵培养基配方研究

王丽星¹,黄志伟¹,郑亚凤¹,谢宝贵²

(1. 福建农林大学食品科学学院,福建福州 350002; 2. 福建农林大学菌物研究中心,福建福州 350002)

摘要:研究了珍贵药用菌——樟芝(*Antrodia camphorata*)液体发酵适宜的碳源、氮源、碳氮比及其所需的矿质元素、微量元素、维生素。结果表明:樟芝菌丝生长的最适无机氮源为酒石酸铵;最适有机氮源为麸皮;最适天然碳源为米粉,且以天然多糖类物质(木薯粉除外)为碳源处理的菌丝产量明显高于单糖、双糖、化学制剂多糖处理,而葡萄糖是仅次于天然多糖类物质的碳源;菌丝生长适宜的碳氮比为(20~50):1;K、P、Mg、S、Na、Ca均为菌丝生长必需的矿质元素;微量元素Fe、B、Zn、Mn、Mo、Cu、Co均对樟芝菌丝生长有一定抑制作用,其中Fe、B元素的抑制作用最显著;添加维生素对菌丝生长无显著影响。

关键词:樟芝;菌丝体;液体发酵;培养基配方

中图分类号: S188+.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0236-03

樟芝(*Antrodia camphorata*)属于多孔菌科、薄孔菌属^[1],别称牛樟菇、牛樟芝、樟内菇、红樟菇等,为中国台湾特有的珍贵药用真菌^[2]。樟芝仅寄生在台湾特有树种牛樟(*Cinnamomum comphora*)的树干上^[3],具有抗肿瘤、增加免疫力、抗菌、抗病毒、抗过敏、抗高血压、降血糖、降胆固醇、抑制血小板凝集及保护肝脏等生理功能^[4]。目前野生樟芝数量很少,而且尚未能进行其子实体的人工栽培,所以采用液体发酵培养樟芝的菌丝体是最环保的樟芝获取途径,并且菌丝体的效果接近子实体^[5]。刘华等研究了樟芝液体发酵培养条件,采用的培养基配方为40 g/L葡萄糖、6 g/L豆饼粉、1 g/L K₂HPO₄、100 mg/L维生素B₁,pH值自然,接种量为20%,装液量为100 mL/250 mL三角瓶,转速100 r/min,26℃恒温培养6 d后,胞内的三萜产量达152.5 mg/L^[6]。黄大斌等在电子显微镜下观察了樟芝的菌丝体、子实体、分生孢子,并在琼脂培养基上研究了不同碳源、氮源对樟芝菌丝生长的影响,结果发现樟芝菌丝生长最适温度为28℃,木屑培养基的最适含水量为58.5%,最适碳源为2%葡萄糖,最适氮源为0.2%柠檬酸铵^[7]。黄志伟等对樟芝菌丝体的固体培养特性进行了研究,结果表明以杂木屑、麦皮(或稻草粉)为主料的培养基均可培养出生长良好的樟芝菌丝,菌丝生长适宜的PDA培养基pH值为4~8,在木屑培养基中添加3%~5%的过磷酸钙可促进菌丝生长,光照和黑暗条件下菌丝的生长速度没有显著差异,但在黑暗条件下菌丝长势较好,分生孢子较多^[8]。宋爱荣对樟芝液体培养的碳源、氮源分别进行了研究,结果表明碳源以麦芽糖利用效果最佳,有机氮比无机氮的利用效果更好,其中以酵母膏最佳^[9-10]。陈娟等以樟芝菌丝生物量、三萜、多糖

为响应指标,利用Plackett-Burman法筛选樟芝液态发酵培养基碳源、氮源,结果显示,最有利于提高樟芝菌丝生物量的碳源、氮源为葡萄糖、可溶性淀粉、酵母粉,最有利于提高樟芝多糖含量的碳源、氮源为可溶性淀粉、麸皮,而最有利于提高樟芝三萜含量的碳源为麦芽糖^[11]。凌庆枝等研究表明,樟芝对不同无机盐离子需求不同,对钾盐需求量大,对钠盐、铁盐、镁盐、铜盐需求量少^[12]。本研究探讨了适宜樟芝液体发酵的碳源、氮源、碳氮比及其所需的矿质元素和微量元素等,以期为进一步研究樟芝的液体发酵工程技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 樟芝菌株Ac-A,由福建农林大学菌物研究中心提供。

1.1.2 供试培养基配方

1.1.2.1 研究不同氮源对樟芝菌丝生长影响的培养基配方 基础培养基配方:3%葡萄糖、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、5 mg/L维生素B₁,pH值自然。添加的无机氮种类为硫酸铵、氯化铵、磷酸氢二铵、酒石酸铵、硝酸钾、硝酸钠、硝酸钙、硝酸铵;有机氮种类为蛋白胨、大豆粉、麸皮、玉米粉。氮源添加量为0.032 g N/100 mL无机氮、0.2%蛋白胨、5%天然有机氮。

1.1.2.2 研究不同碳源对樟芝菌丝生长影响的培养基配方 基础培养基配方:0.032% (以氮含量计算)酒石酸铵、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、5 mg/L维生素B₁,pH值自然。添加的碳源种类为葡萄糖、果糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、可溶性淀粉、微晶纤维素、玉米粉、面粉、米粉、甘薯粉、木薯粉。碳源添加量为2%。

1.1.2.3 研究不同碳氮比对樟芝菌丝生长影响的培养基配方 基础培养基配方:2%葡萄糖、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、5 mg/L维生素B₁,pH值自然。分别在基础培养基中添加不同质量的酒石酸铵以调节培养基的C/N。

1.1.2.4 研究不同矿质元素对樟芝菌丝生长影响的培养基

收稿日期:2015-09-17

基金项目:福建省科技计划重点项目(编号:2015N0001)。

作者简介:王丽星(1992—),女,福建仙游人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail:982842976@qq.com。

通信作者:谢宝贵,教授,博士生导师,研究方向为食用菌及生物技术。E-mail:mrctatu@163.com。

配方 基础培养基配方:2% 葡萄糖、0.211% 酒石酸铵、各种试剂,配制出 6 种缺素培养基和 1 种对照培养基。5 mg/L 维生素 B₁,pH 值自然。按表 1 在基础培养基中添加

表 1 7 种培养基的试剂添加种类与添加量

试剂	添加量(%)						
	对照培养基	缺 K 培养基	缺 P 培养基	缺 Mg 培养基	缺 S 培养基	缺 Na 培养基	缺 Ca 培养基
KH ₂ PO ₄	0.10				0.10	0.10	0.10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05				0.05	0.05
NaCl	0.05		0.05		0.05		0.05
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
NaH ₂ PO ₄		0.09		0.09			
K ₂ SO ₄			0.05	0.05			
MgCl ₂			0.025		0.025		

1.1.2.5 研究不同微量元素对樟芝菌丝生长影响的培养基配方 基础培养基配方:2% 葡萄糖、0.211% 酒石酸铵、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O,pH 值自然,用重蒸馏水配制 1 L 基础培养基后,加入 15 g CaCO₃,在 121 ℃ 下灭菌 20 min,冷却后过滤除去微量元素,随后加入 5 mg 维生素 B₁,并按表 2 添加各种微量元素。

表 2 各微量元素及其化合物的添加量

元素名称	元素添加量(μg/L)	化合物名称	化合物添加量(mg/L)
Fe	1.00	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.497 5
Zn	0.10	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.044 2
Mn	0.01	MnSO ₄	0.002 7
Mo	0.01	NaMoO ₄ · 4H ₂ O	0.002 7
Cu	0.10	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.039 1
B	1.00	H ₃ BO ₃	0.565 0
Co	1.00	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.403 2

注:以不添加任何微量元素为阴性对照,以添加上述所有微量元素的完全培养基为阳性对照。在某一微量元素处理中,在配方中不添加该微量元素。例如,研究 Fe 对樟芝菌丝生长的影响时,配方中不添加 FeSO₄ · 7H₂O,其他微量元素都添加。

1.1.2.6 研究不同维生素对樟芝菌丝生长影响的培养基配方 基础培养基配方:2% 葡萄糖、0.211% 酒石酸铵、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O,pH 值自然。添加的维生素种类为生物素、核黄素、硫胺素、尼古丁酸、叶酸、抗坏血酸,对照不添加任何维生素。维生素添加量为 50 μg/L。

1.2 方法

1.2.1 不同氮源对樟芝菌丝生长的影响 将培养基分装于 250 mL 三角瓶中(100 mL/瓶),每个处理 4 瓶,在 121 ℃ 下灭菌 30 min。接种时,先将樟芝斜面菌种放入盛有无菌水的三角瓶中,用分散器搅拌均匀浆,使之成为均匀的菌液。然后用移液枪吸取菌液接种于各瓶培养基中(1 mL 菌液/100 mL),接种后置于摇床上振荡培养(26 ℃、120 r/min)20 d。用纱布和 40 目土样筛过滤樟芝菌丝,分别盛入已于 105 ℃ 下烘至恒质量的坩埚,再将坩埚置于 105 ℃ 烘箱中烘至恒质量后,测定菌丝干质量。然后用 SAS 软件对数据进行方差分析与显著性测验。

1.2.2 不同碳源、矿质元素、微量元素、维生素对樟芝菌丝生长的影响 参照“1.2.1”节的方法进行培养基的分装、灭菌、接种、培养、测定菌丝干质量等。

1.2.3 不同碳氮比对樟芝菌丝生长的影响 设置 8 个 C/N,

即 5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、30 : 1、50 : 1、75 : 1、100 : 1,在基础培养基中添加酒石酸铵调节培养基的 C/N,酒石酸铵添加量依次为 16.03、6.35、3.96、2.88、1.86、1.09、0.72、0.54 g/L。然后参照“1.2.1”节的方法进行培养基的分装、灭菌、接种、培养、测定菌丝干质量等。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对樟芝菌丝生长的影响

2.1.1 无机氮对樟芝菌丝生长的影响 由图 1 可见,不同氮源处理下菌丝产量差异较大,说明樟芝对氮源种类的要求较为严格。不同氮源处理下樟芝菌丝产量高低排序为蛋白胨(有机氮) > 铵态氮 > 硝态氮,差异明显。以硝酸钾、硝酸钠、硝酸钙为氮源时,菌丝产量与对照无明显差异,说明樟芝不能利用硝态氮。硝酸铵既可以提供硝态氮,也可提供铵态氮,其菌丝产量比硝态氮高,但比铵态氮低,说明 NO₃⁻ 可能抑制樟芝菌丝生长。樟芝菌丝生长最适宜的无机氮源为酒石酸铵。

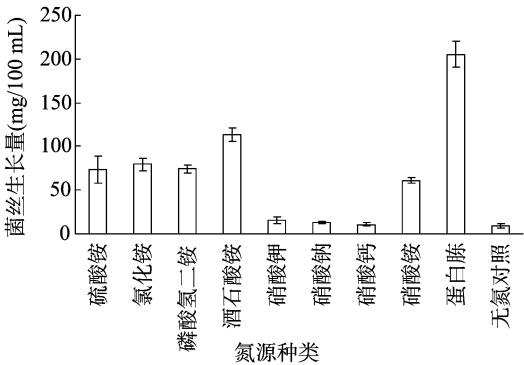


图 1 不同无机氮源对樟芝菌丝生长的影响

2.1.2 有机氮对樟芝菌丝生长的影响 由图 2 可见,不同有机氮源处理下樟芝菌丝产量高低顺序为麸皮 > 大豆粉 > 玉米粉 > 蛋白胨 > 无氮对照,差异明显。以麦皮为氮源时,其菌丝产量是蛋白胨处理的 5 倍,是最适于樟芝菌丝生长的氮源。

2.2 不同碳源对樟芝菌丝生长的影响

从图 3 可以看出,以天然多糖类物质为碳源处理的菌丝产量明显高于双糖、单糖。以米粉为碳源处理的菌丝产量最大,与其他碳源处理差异明显。本研究使用了 5 种天然物质和 2 种化学制剂多糖,除木薯粉外,以天然物质为碳源处理的菌丝产量明显高于以化学制剂多糖(可溶性淀粉、微晶纤维素)为碳源的处理。将天然物质作为碳源,水解后可提供多

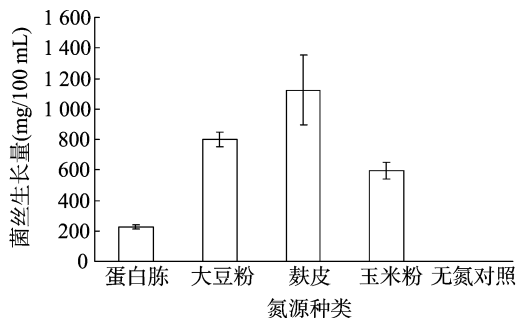


图2 不同有机氮源对樟芝菌丝生长的影响

种糖类供菌丝吸收利用,并且它还含有少量氮素营养或一些生长促进因子,可促进菌丝生长。以麦芽糖、蔗糖为碳源处理的菌丝产量较低。葡萄糖、果糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露醇中,唯有葡萄糖适于樟芝菌丝生长。

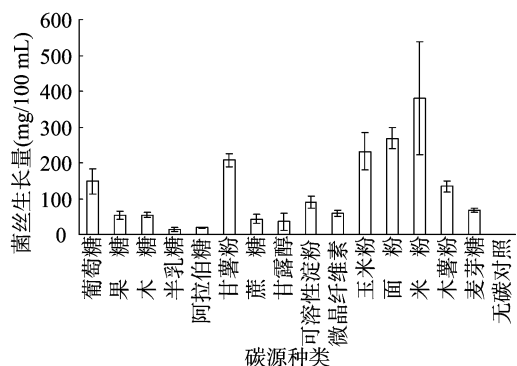


图3 不同碳源对樟芝菌丝生长的影响

2.3 不同碳氮比对樟芝菌丝生长的影响

基于上述碳源、氮源的筛选结果,选用适于樟芝菌丝生长的碳源(葡萄糖)和无机氮源(酒石酸铵)来调节培养基的C/N,以研究适宜樟芝菌丝生长的C/N。从图4可以看出,在所研究的C/N范围内,C/N为10:1以上时均适于樟芝菌丝生长,在C/N为(20~50):1时菌丝生长最快。

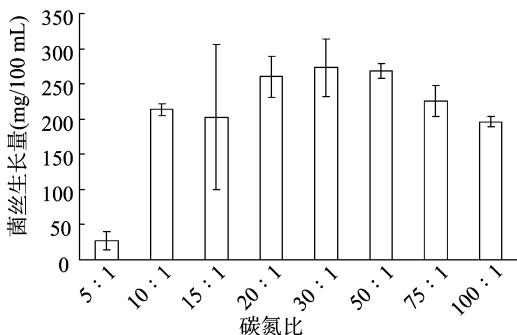


图4 不同碳氮比对樟芝菌丝生长的影响

2.4 不同矿质元素对樟芝菌丝生长的影响

从图5可以看出,矿质元素K、P、Mg、S、Na、Ca的缺乏均会明显影响樟芝菌丝的生长,即这6种元素均为菌丝生长必需的矿质元素。其中,缺Na、缺Ca对菌丝产量影响较小,而K、P、Mg、S的缺乏将极大程度地影响菌丝生长。

2.5 不同微量元素对樟芝菌丝生长的影响

从图6可以看出,7种微量元素(Fe、B、Zn、Mn、Mo、Cu、

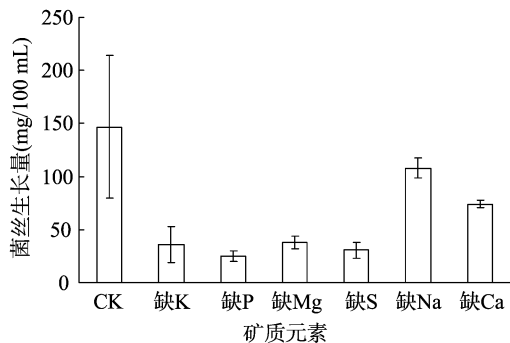


图5 不同矿质元素对樟芝菌丝生长的影响

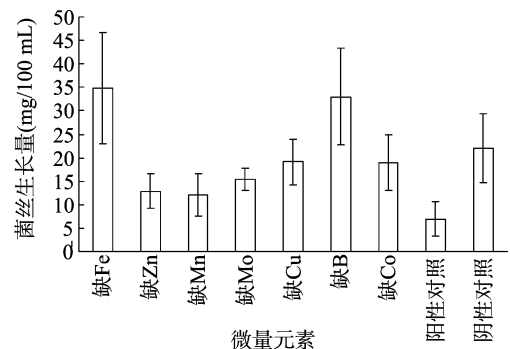


图6 不同微量元素对樟芝菌丝生长的影响

Co)均对樟芝菌丝生长有一定的抑制作用,其中Fe、B元素对樟芝菌丝生长的抑制作用最为明显。

2.6 不同维生素对樟芝菌丝生长的影响

从图7可以看出,所添加的6种维生素均对樟芝菌丝的生长没有明显影响。

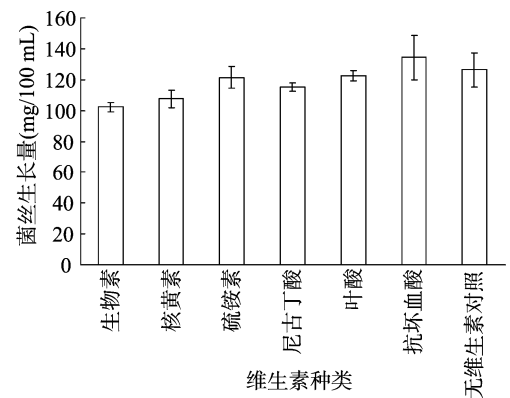


图7 不同维生素对樟芝菌丝生长的影响

3 结论与讨论

本研究分析了樟芝液体发酵适宜的碳源、氮源、碳氮比及其所需的矿质元素和微量元素等,结果表明樟芝菌丝生长的最适无机氮源为酒石酸铵,最适有机氮源为麸皮;最适天然碳源为米粉,且以天然多糖类物质(木薯粉除外)为碳源处理的菌丝产量明显高于单糖、双糖、化学制剂多糖处理;菌丝生长适宜的碳氮比为(20~50):1;K、P、Mg、S、Na、Ca均为菌丝生长必需的矿质元素;微量元素Fe、B、Zn、Mn、Mo、Cu、Co均对樟芝菌丝生长有一定的抑制作用,其中Fe、B元素的抑制作用最显著;添加维生素对菌丝生长无明显影响。

本研究中以蛋白胨为氮源处理的菌丝产量明显高于无机

张慧君,葛宇,杨先锋,等.内源激素对橡胶树花药体细胞胚发生的影响[J].江苏农业科学,2016,44(7):239-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.067

内源激素对橡胶树花药体细胞胚发生的影响

张慧君¹,葛宇³,杨先锋²,李季²,黄天带²

(1. 淮北师范大学生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室,安徽淮北 235000;

2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室,海南儋州 571737;

3. 中国热带农业科学院海口实验站,海南海口 570102)

摘要:以巴西橡胶树花药为外植体,对巴西橡胶树再生过程中不同类型愈伤组织的内源激素含量及比值进行测定。结果表明:过高或过低的内源激素含量和不同内源激素含量比,大多会导致橡胶树外植体在分化过程中出现非胚性愈伤和畸形胚,因此橡胶树花药体细胞胚再生过程与其内源激素密切相关。

关键词:橡胶树;花药;再生;体细胞胚;内源激素

中图分类号: S794.105 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0239-03

高等植物体细胞胚发生是离体生长发育中一个复杂的科学问题,受内外多种因素的影响,目前人们尚未掌握其离体发育规律。植物离体培养过程中植物激素起着重要的调控作用,它们的调控是引起各细胞组织和器官分化的基础,从而维持植物正常的离体发育过程,植物激素对形态发生起着重要的作用,外植体离体培养形态建成往往需要很多外源激素的诱导^[1-2]。对于植物离体培养中体细胞胚发育过程,只有胚

性愈伤才能形成正常胚,畸形胚难以形成正常的组培苗,这种情况严重制约了组培苗工厂化的生产和育种的应用。因此,本试验对橡胶树花药组织培养过程中非胚性愈伤和胚性愈伤、畸形胚和正常胚不同内源激素含量进行研究,对建立高效巴西橡胶树体细胞胚再生体系以及种质资源保存具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料以巴西橡胶树优良无性系热研 7-33-97 花药为外植体,花药培养参照 Hua 等的方法^[3],然后分别取培养 60 d 的胚性愈伤组织(简称 a)、非胚性愈伤组织(简称 b)、子叶胚时期的正常胚(简称 c)和畸形胚(简称 d)用液氮速冻,

收稿日期:2015-05-15

基金项目:淮北师范大学博士科研启动费(编号:15600973);现代农业产业技术体系建设专项(编号:NYCYTX-34)。

作者简介:张慧君(1982—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,讲师,从事园林植物生物技术研究。E-mail:zhuijun@126.com。

氮源处理。而黄大斌等研究发现,在琼脂培养基上以蛋白胨、酵母汁为氮源处理的菌丝生长速度不如柠檬酸铵、硝酸铵、硫酸铵等无机氮源处理^[7]。因此,如果用琼脂培养基活化樟芝菌种,应采用无机氮源;如果进行樟芝菌丝体的液体发酵生产,则应采用有机氮源。

本研究表明,以葡萄糖为碳源处理的樟芝菌丝产量明显高于麦芽糖、半乳糖处理,且葡萄糖是仅次于天然多糖类物质的碳源。而黄大斌等研究表明,在琼脂培养基上,以葡萄糖为碳源处理的菌丝生长速度快于山梨醇糖、半乳糖、麦芽糖、淀粉处理^[7]。因此,以葡萄糖作为碳源,不但适于樟芝菌种的活化,而且适于樟芝菌丝体的液体发酵生产。

本研究还表明,在樟芝的液体发酵培养基中不需要添加维生素。因此,可以推测在樟芝菌丝生长过程中,菌丝体会合成自身生长所需维生素。

参考文献:

- [1]梁志钦.台湾特有真菌——樟芝的药用价值[C]//中国菌物学会首届药用真菌产业发展暨学术研讨会论文集.江苏南通:中国菌物学会药用真菌专业委员会,2005:76-78.
- [2]浦跃武,熊冬生.樟芝的研究及其应用现状[J].中国医院药学

杂志,2005,25(2):171-173.

- [3]陈体强,李开本,林章余.台湾食(药)用菌发展现状[J].福建农业科技,2000(1):20-21.
- [4]张东柱.台湾特有珍贵药用真菌牛樟芝[J].食药用菌,2011,19(1):33-34.
- [5]宋爱荣,田雪梅.不同装瓶量对樟芝液体深层培养的影响[J].新疆大学学报:自然科学版,2004,21(增刊1):131-133.
- [6]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.
- [7]黄大斌,杨菁,黄进华,等.樟芝生物学特性研究[J].食用菌学报,2001,8(2):24-28.
- [8]黄志伟,程祖铨,谢宝贵,等.樟芝菌丝体的固体培养特性研究[J].中国食用菌,2015,34(2):29-32.
- [9]宋爱荣.台湾樟芝对碳源营养源利用的研究[J].中国食用菌,2002,21(5):41-43.
- [10]宋爱荣.樟芝对氮素营养源利用的研究[J].菌物研究,2004,2(1):45-48.
- [11]陈娟,姜兴华,范青生,等. Plackett-Burman 法筛选樟芝液态发酵培养基碳氮源[J].南昌大学学报:理科版,2010,34(5):466-470.
- [12]凌庆枝,刘国庆,袁怀波. pH 和无机盐对樟芝液体发酵的影响[J].食品科学,2007,28(11):365-369.