

网络出版时间:2020-03-13 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.09.017
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20200312.1017.018.html

蜜环菌液体培养基碳氮源的筛选和优化

陈伟,冯欢,欧江,张收霞,蒙盼盼,王春燕
(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】筛选生长迅速、性状优良的蜜环菌菌株,对所选优良菌株的液体培养基进行碳氮源筛选和优化,为蜜环菌深层发酵技术的研究提供基础依据和参考。【方法】采用单因素试验,以生物量(菌丝体干质量)为指标,以工业发酵和生产中常用的菌株 A9 为对照,从本实验室分离与收集的 20 个蜜环菌菌株中筛选优良菌株,并设置不同的供试碳源、氮源、碳氮源组合、碳氮源含量,对其液体培养基的碳氮源进行筛选和优化。【结果】供试的 20 个蜜环菌中,菌株 M41 和 M57 生长迅速,生物量显著($P<0.05$)高于对照菌株 A9,其中 M41 菌索粗壮、性状优良,作为优良菌株用于后续研究。供试的 7 种碳源和 5 种氮源中,菌株 M41 和 A9 液体培养基的最佳碳源分别为玉米粉和麦麸,最佳氮源分别是菜籽饼和酵母浸粉,最佳碳氮源组合分别为玉米粉+菜籽饼、玉米粉+蚕蛹粉,最佳碳氮源含量分别为 2%和 4%。菌株 M41 和 A9 的最佳液体培养基为玉米粉 2%、菜籽饼(M41)或蚕蛹粉(A9)4%、磷酸二氢钾 0.15%、硫酸镁 0.075%。恒温振荡(121 r/min,25 ℃)培养 18 d 后,菌株 M41 的菌丝体产量达 16.71 g/L,显著高于对照菌株 A9(10.76 g/L)($P<0.05$)。【结论】筛选出的优良菌株 M41 可用于后续生产,优化液体培养基显著提高了蜜环菌菌株 M41 和 A9 的菌丝体产量。

【关键词】 蜜环菌;液体培养基;发酵技术;碳源;氮源
【中图分类号】 S567.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2020)09-0128-09

Screening and optimization of carbon and nitrogen sources in
liquid medium of *Armillaria mellea*

CHEN Wei,FENG Huan,OU Jiang,ZHANG Shouxia,MENG Panpan,WANG Chunyan
(College of Forestry,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The *Armillaria mellea* strains with fast growth and excellent characteristics were screened,and the carbon and nitrogen sources were screened and optimized in the liquid medium of the selected strain,which provides basis and reference for the study of submerged fermentation technology of *A. mellea*. 【Method】 Using biomass (dry mass of mycelium) as the basis and the strain A9 commonly used in industrial fermentation and production as the control, single factor test was used to screen excellent strains from 20 *A. mellea* strains isolated and collected in the laboratory. The carbon and nitrogen sources of liquid medium were screened and optimized by setting different carbon sources,nitrogen sources, and their combinations with different contents. 【Result】 Among the 20 tested *A. mellea*, strains M41 and M57 grew rapidly,and their biomass were significantly higher than that of control A9 ($P<0.05$). In addition, strain M41 had strong rhizomorph and excellent characteristics. Thus,it was used as the excellent strain for subsequent research. Among the seven carbon sources and five nitrogen sources tested, the best carbon

〔收稿日期〕 2019-09-06
〔基金项目〕 陕西省重点研发计划项目“原料药天麻蜜环菌的开发、工业化高效生产技术及质控研究”(2017ZDXM-SF-003);山东步长制药股份有限公司横向课题“银杏蜜环溶液及产业化研究”
〔作者简介〕 陈伟(1991—),男,甘肃武威人,在读博士,主要从事森林微生物学研究。E-mail:861292141@qq.com
〔通信作者〕 王春燕(1979—),女,河南漯河人,副教授,博士生导师,主要从事森林微生物学研究。E-mail:chunyan@nwsuaf.edu.cn

sources of strains M41 and A9 in liquid medium were cornmeal and wheat bran, the best nitrogen sources were rapeseed cake and yeast extract powder, the best combination of carbon and nitrogen sources were cornmeal + rapeseed cake, cornmeal + silkworm pupa powder, and the best carbon and nitrogen contents were 2% and 4%, respectively. The optimum liquid medium for strains M41 and A9 were: 2% cornmeal, 4% rapeseed cake (M41) or silkworm pupa powder (A9), 0.15% KH_2PO_4 and 0.075% MgSO_4 . The mycelium yield of strain M41 reached 16.71 g/L 18 days after constant temperature oscillation (121 r/min, 25 °C), which was significantly higher than that of control strain A9 (10.76 g/L) ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The selection of carbon and nitrogen sources had great impacts on the growth and yield of *A. mellea*, and the optimum carbon and nitrogen sources and the optimum medium composition of different *A. mellea* strains were different. The mycelial yields of *A. mellea* strains M41 and A9 were significantly increased by screening and optimizing carbon and nitrogen sources in liquid medium. The screened strain M41 could be used for subsequent production.

Key words: *Armillaria mellea*; liquid medium; fermentation technology; carbon source; nitrogen source

蜜环菌(*Armillaria mellea*)又名榛蘑,属于白蘑科(Tricholomataceae)蜜环菌属(*Armillaria*),是传统的药食两用大型真菌,具有重要的经济价值^[1-2]。蜜环菌与我国著名珍贵中药材天麻(*Gastrodia elata*)有着紧密的共生关系,可为天麻提供生长发育所需的营养物质和能量,在天麻的整个生长过程中发挥着巨大的作用^[3-4]。天麻具有广泛的医药活性^[5],随着人们生活水平的提高和保健意识的增强,其需求量逐渐增大。然而,我国野生天麻资源有限,人工栽培天麻生产周期长,天麻产量无法满足日益增长的市场需求^[6]。大量研究表明,天麻共生蜜环菌的菌丝体和发酵液含有多种活性成分,且具有与天麻相似的药理作用和临床疗效^[7-8]。因此,用天麻共生蜜环菌液体发酵产物来代替天麻,是解决我国当前天麻供需矛盾的一条有效资源途径,从而使得蜜环菌的液体培养技术具有重要的研究价值和应用推广前景。

关于蜜环菌液体培养技术目前已有大量研究^[9-11],主要是对碳源和氮源进行筛选优化,但由于所用菌株来源不同、考虑因素和关注点不同,研究结果差异也较大,尤其是对不同碳源、氮源的利用存在较大差异。鉴于生产和实践中所用蜜环菌菌株退化严重,以及不同菌株生长状况和适生条件不同^[12-13],本研究以生产和实践中常用蜜环菌菌株 A9 为对照,对本实验室分离和收集的 20 株蜜环菌的生长状况进行了研究,从中筛选生长迅速、性状优良的菌株;对所选优良菌株的液体培养基进行碳、氮源筛选和优化,以确定其最适液体培养基,为后期蜜环菌深层发酵技术的研究以及工业化生产提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 菌株 M41、M42、M44、M46、M47、M48、M51、M52、M53、M55、M56 和 M57,均分离自陕西省汉中市略阳县野生天麻根围蜜环菌的菌索; Zi3 和 Z1 分离自略阳县野生蜜环菌的子实体; A9、A 贵州、B 湖北、C 宁强、D 湖北和 E 西方,均由略阳县天麻人工栽培公司馈赠,其中 A9 是蜜环菌液体深层发酵和天麻人工栽培生产实践中的常用菌株; Am5.0146 购自中国微生物菌种保藏中心。各菌株均在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基上低温保藏,试验前转接到新鲜的 PDA 平板,于 25 °C 下培养 15 d 后作为备用接种体。

1.1.2 供试碳氮源 碳源:糖蜜(42%~50%)、玉米粉、麦麸、蔗糖、20% 土豆浸提液和葡萄糖;氮源:豆粕、蚕蛹粉、菜籽饼、酵母浸粉和尿素。

1.1.3 供试培养基配方 基础培养基:磷酸二氢钾 0.15%、硫酸镁 0.075%,自然 pH。综合培养基:豆粕 1%、葡萄糖 1%、糖蜜 1%、楸树豆荚粉末 1%、酵母浸粉 1%、麦麸 1%、玉米粉 1%、硫酸镁 0.075%、磷酸二氢钾 0.15%、琼脂 1.8%,自然 pH。工业培养基:豆粕 1%、酵母浸粉 1%、葡萄糖 1%、糖蜜 3%、硫酸镁 0.075%、磷酸二氢钾 0.15%,自然 pH。

1.2 优良蜜环菌菌株的筛选

无菌操作条件下,用镊子从供试蜜环菌菌株的 PDA 平板上挑取 0.5 cm 长的菌索,转接到新鲜的综合培养基平板($\Phi=9$ cm)的中心,25 °C 培养 15 d 后观察各菌株的生长状况和菌落特征,将琼脂融化后收集菌丝体并用清水冲洗干净,置于 80 °C 烘箱中

烘干至恒质量后称量,以菌丝体干质量(g)表示生物量。每个菌株 3~5 次重复。

1.3 蜜环菌液体培养基的筛选

1.3.1 最佳碳源的筛选 在基础培养基中添加 2% 的酵母浸粉作为氮源,再分别添加 2% 的葡萄糖+糖蜜(质量比为 1:1)、糖蜜、玉米粉、麦麸、蔗糖、20% 土豆浸提液和 2% 葡萄糖作为供试碳源,依次标记为 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7,配制成不同的液体培养基,装入 500 mL 锥形瓶(200 mL/瓶)中高压灭菌(121 °C, 30 min)。待培养基温度降至室温后,无菌操作条件下用镊子从筛选的优良蜜环菌菌株和 A9 的 PDA 平板上挑取 1 cm 长的菌索,分别接入锥形瓶的液体培养基中,恒温振荡(121 r/min, 25 °C)培养 18 d 后过滤收集菌丝体,清水冲洗干净后置于 80 °C 烘箱中烘干至恒质量后称量,计算菌丝体产量(g/L)。每个处理 3 次重复。

1.3.2 最佳氮源的筛选 在基础培养基中添加 2% 的葡萄糖作为碳源,再分别添加 2% 的黄豆粕、蚕蛹粉、酵母浸粉、菜籽饼、尿素作为供试氮源,依次标记为 N1、N2、N3、N4、N5,按 1.3.1 节的方法进行最佳氮源的筛选。每个处理 3 次重复。

1.3.3 最佳碳氮源组合的筛选 将前期筛选得到的较优碳氮源进行不同组合(碳氮含量均为 2%,分别为玉米粉+菜籽饼,麦麸+菜籽饼,玉米粉+蚕蛹粉,麦麸+蚕蛹粉,玉米粉+酵母浸粉,麦麸+酵母浸粉,复配 1:玉米粉 1%+麦麸 1%+菜籽饼 0.67%+蚕蛹粉 0.67%+酵母浸粉 0.67%,复配 2:玉米粉 1%+麦麸 1%+菜籽饼 1%+蚕蛹粉 1%,依次标记为 CN1、CN2、CN3、CN4、CN5、CN6、CN7、CN8),分别加入基础培养基中,按 1.3.1 节的方法进行最佳碳氮源组合的筛选。每处理 3 个重复。

1.3.4 最佳碳氮源含量的筛选 根据筛选的最佳碳氮源组合,首先保持氮源(菜籽饼或蚕蛹粉)的质量分数为 2%,依次调整碳源(玉米粉)的质量分数分别为 0.5%,1%,2%,3%和 4%;再保持碳源(玉米粉)的质量分数为 2%,依次调整氮源(菜籽饼或蚕蛹粉)的质量分数分别为 0.5%,1%,2%,3%和 4%,分别加入基础培养基中配制不同组合的液体培养基。按 1.3.1 节的方法(优良菌株用 250 mL 锥形瓶中装 150 mL/瓶培养基,A9 用 500 mL 锥形瓶中装 200 mL/瓶),进行最佳碳氮源含量的筛选。每个处理 3 次重复。

1.4 菌丝体产量测定

将筛选出的优良蜜环菌菌株和对照菌株 A9 分

别接种到优化后的液体培养基中,并以工业生产中常用的蜜环菌液体发酵培养基为对照,培养 18 d 后过滤收集菌丝体,清水冲洗干净后置于 80 °C 烘箱中烘干至恒质量后称量,测定菌丝体产量。每个处理 15 次重复。

1.5 数据处理

用 Microsoft Excel 2010 软件进行试验数据整理,试验结果用“平均值±标准误”表示;用 SPSS 20.0 进行方差分析和 LSD 多重比较($P<0.05$);用 SigmaPlot 12.0 绘图。

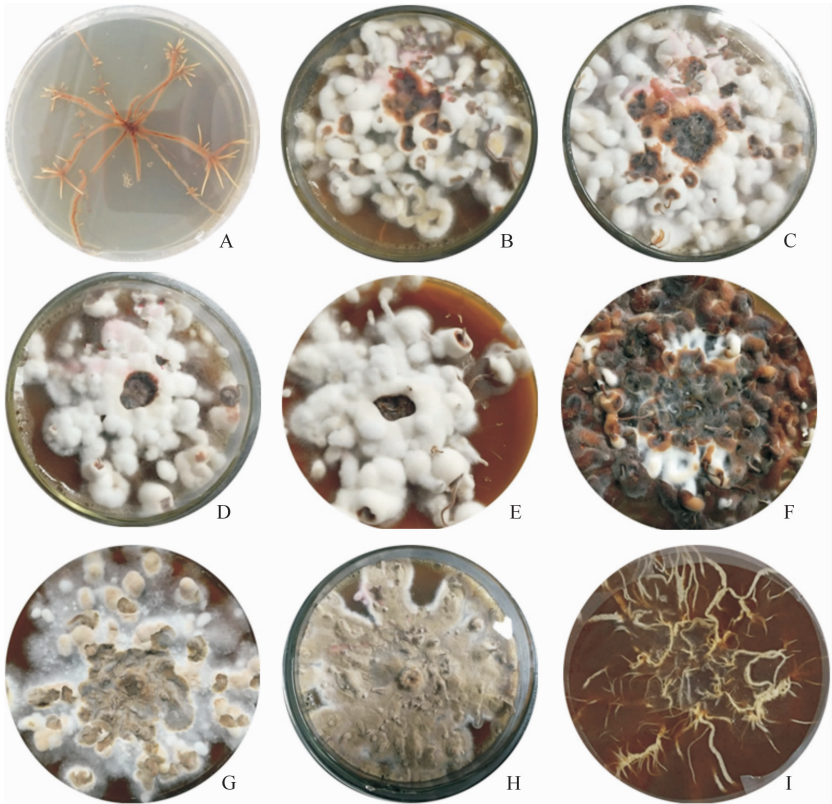
2 结果与分析

2.1 优良蜜环菌菌株的筛选

蜜环菌在 PDA 培养基上生长缓慢,大部分菌株仅形成褐色、分枝的根状菌索(图 1-A),而在综合培养基上的生长状况良好,明显优于 PDA 培养基。20 个供试菌株生长迅速,菌落形状不规则,大部分菌株在生长前期生成大量白色、致密、隆起、易挑取、棉絮状气生菌丝(图 1-B—E);而在生长后期,白色气生菌丝逐渐褐化、消退,紧贴培养基表面形成一层不易挑起的硬膜,且显露出少量锥形的褐色菌索(图 1-F)。个别菌株,如 Zi3,生长前期产生少量短绒毛状、较为稀疏的白色气生菌丝,逐渐聚集形成散点状致密的突起(即为气生菌索顶端)(图 1-G),后转为土黄色,生长后期气生菌丝逐渐消退,并显露出灰褐色的菌索(图 1-H)。所有菌株的基内菌丝均形成丝状、粗细不一的白色菌索(图 1-I)。生长快的菌株在 25 °C 培养 15 d 后,菌丝体基本能铺满整个平板,全部或 2/3 以上面积已发生褐化(图 1-F),而生长较慢的菌株菌丝体仅部分褐化或刚刚开始褐化(图 1-D)。

由图 2 可以看出,供试菌株在综合培养基上的生物量也存在一定的差异。菌株 M41 和 M57 的生长最好,菌丝体干质量最大(均为 0.49 g),明显高于其他供试菌株;M44、B 湖北、E 西方、Zi3 和 Z1(0.40~0.45 g)次之,均显著高于对照菌株 A9($P<0.05$)。其他菌株的菌丝体干质量均低于 0.4 g,其中 M48、A9、C 宁强和 Am5.0146 的生长较差,菌丝体干质量显著($P<0.05$)低于除 M51 外的其余 16 个菌株。可见,大部分供试蜜环菌菌株的生长都优于对照菌株 A9,尤其是 M41 和 M57(图 1-C—D),菌丝体干质量约为 A9 的 2 倍。尽管这两个菌株的菌丝体干质量无显著差异($P>0.05$),但 M41 的菌丝体较为发达,菌索也较为粗壮且分枝较多,活力较强(图 1-

C),故挑选菌株 M41 作为优良菌株,用于后期试验。

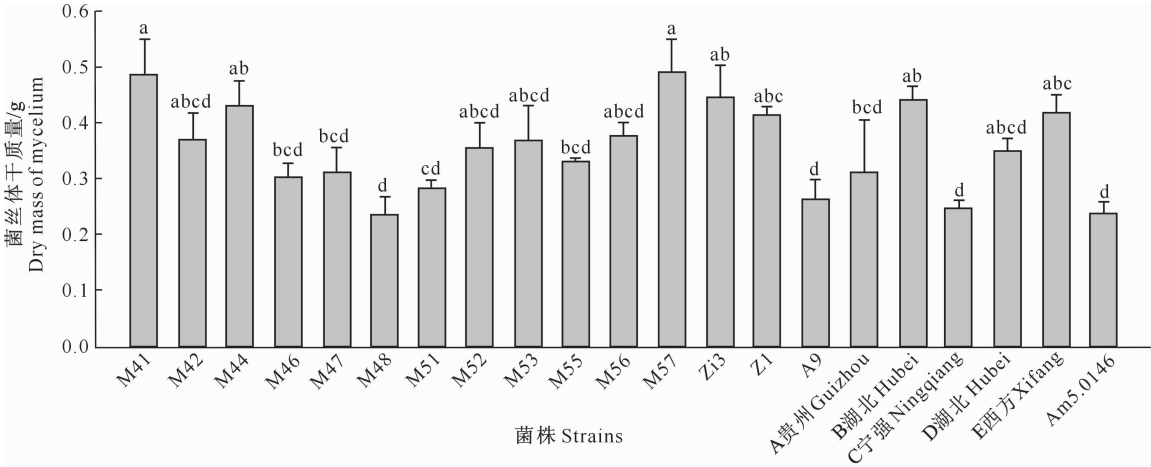


A. 蜜环菌 A9 在 PDA 培养基上的菌落特征;B—I. 蜜环菌在综合培养基上的菌落特征,依次为 A9、M41、M57、M48、褐化菌丝、Zi3(前期)、Zi3(后期)和白色菌索

A. Colony characteristics of *A. mellea* A9 on PDA medium;B—I. Colony characteristics of *A. mellea* on complex medium, are A9,M41,M57,M48,browning mycelium,Zi3 (early stage),Zi3 (late stage) and white rhizomorph,respectively

图 1 蜜环菌菌株在 PDA 和综合培养基上的菌落特征及生长状况(25 ℃,15 d)

Fig. 1 Colony characteristics and growth status of *A. mellea* strains on PDA and complex medium (25 ℃,15 d)



图柱上标不同小写字母表示各菌株间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图 2 不同蜜环菌菌株在综合培养基上的生物量(25 ℃,15 d)

Fig. 2 Biomass of different *A. mellea* strains on complex medium (25 ℃,15 d)

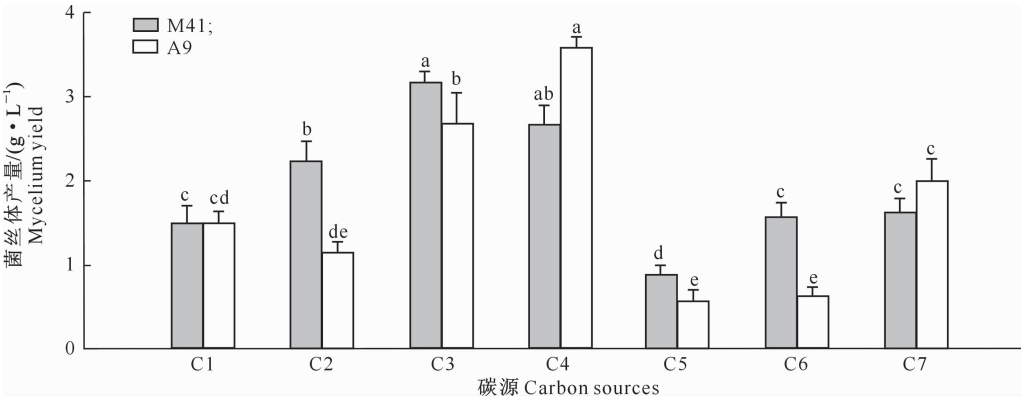
2.2 蜜环菌液体培养基的筛选

2.2.1 最佳碳氮源的筛选 由图 3 可以看出,以

2%酵母浸粉为氮源时,菌株 M41 和 A9 的生长状况及菌丝体产量均随着供试碳源种类的变化而变

化。M41 在以玉米粉(C3)为碳源的培养基中生长最好,菌丝体产量达 3.17 g/L(干质量);在麦麸(C4)中生长次之(2.67 g/L),二者差异不显著($P>0.05$),但均显著高于($P<0.05$)除糖蜜(C2)外的其他碳源;在蔗糖(C5)为碳源的培养基中 M41 生长最差($P<0.05$),菌丝体产量仅为玉米粉中的 1/4。菌株 A9 在以麦麸为碳源的培养基中生长最好($P<0.05$),菌丝体产量达 3.58 g/L;其次为玉米粉(2.68 g/L),二者差异显著且均显著高于其他碳源($P<0.05$);而在蔗糖和土豆浸提液(C6)中 A9 的生长较差,显著($P<0.05$)低于除糖蜜外的其他碳源,菌丝体产量约为玉米粉中的 1/6。可见,尽管菌株 M41 和 A9 能利用所有供试碳源,但对碳源的喜好和利用能力不同,最佳碳源分别为玉米粉和麦麸,而对蔗糖的利用能力最低。

从图 4 可以看出,以 2%葡萄糖为碳源时,菌株 M41 和 A9 的生长和菌丝体产量也受氮源种类的影响,但 A9 菌丝体产量随氮源不同而变化的幅度明显大于 M41,这表明氮源种类对 A9 生长的影响较明显。无论是 M41 还是 A9,二者皆不能利用尿素(N5),在尿素为氮源的培养基中不能生长。菌株 M41 在以菜籽饼(N4)为氮源的培养基中生长最好,菌丝体产量(4.42 g/L)显著高于($P<0.05$)除蚕蛹粉(3.22 g/L)外的其他氮源;而在蚕蛹粉(N2)和酵母浸粉(N3)中生长次之;在黄豆粕(N1)中生长最差,菌丝体产量约为菜籽饼中的 1/2,但三者间差异不显著($P>0.05$)。菌株 A9 在以酵母浸粉为氮源的培养基中生长最好,菌丝体产量(9.97 g/L)最大($P<0.05$);在以蚕蛹粉为氮源的培养基中生长次之,显著高于黄豆粕($P<0.05$),后者的菌丝体产量约为酵母浸粉中的 1/3。可见,菌株 M41 和 A9 的最佳氮源分别为菜籽饼和酵母浸粉,而对黄豆粕的利用能力均较差。



图柱上标不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Lowercase letters show significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below

图 3 不同碳源对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响

Fig. 3 Influences of different carbon sources on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9

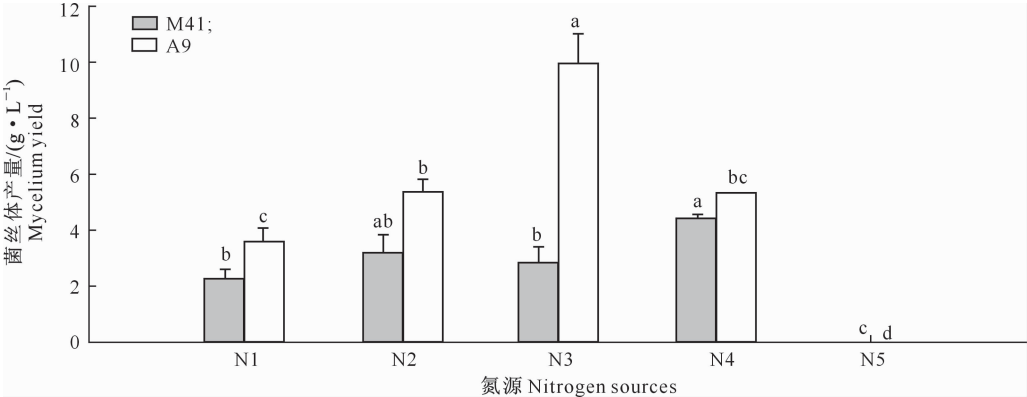


图 4 不同氮源对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响

Fig. 4 Influences of different nitrogen sources on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9

2.2.2 最佳碳氮源组合的确定 综合碳氮源筛选 结果,菌株 M41 和 A9 在以玉米粉和麦麸为碳源,

酵母浸粉、菜籽饼和蚕蛹粉为氮源的培养基中生长相对较好,菌丝体产量较高,且除酵母浸粉外成本均较低,故以它们分别作为碳、氮源进行不同组合,以筛选最适的碳氮源组合。由图 5 可以看出,在 2 种碳源和 3 种氮源组合的 8 种不同液体培养基中,两个蜜环菌菌株的菌丝体产量随碳氮源组合的不同而明显变化。无论是菌株 M41 还是 A9,在麦麸+酵母浸粉(CN6)培养基中的生长都是最差的,菌丝体产量明显低于其他组合。这两个菌株在以玉米粉为碳源的 3 种组合培养基(CN1、CN3、CN5)中的菌丝体产量皆显著($P<0.05$)高于以麦麸为碳源的同种氮源培养基(CN2、CN4、CN6),且菌丝体产量随氮源种类不同而变化的幅度明显大于麦麸,表明玉米粉比麦麸更适合蜜环菌菌丝的生长,对菌丝体产量的影响更大。

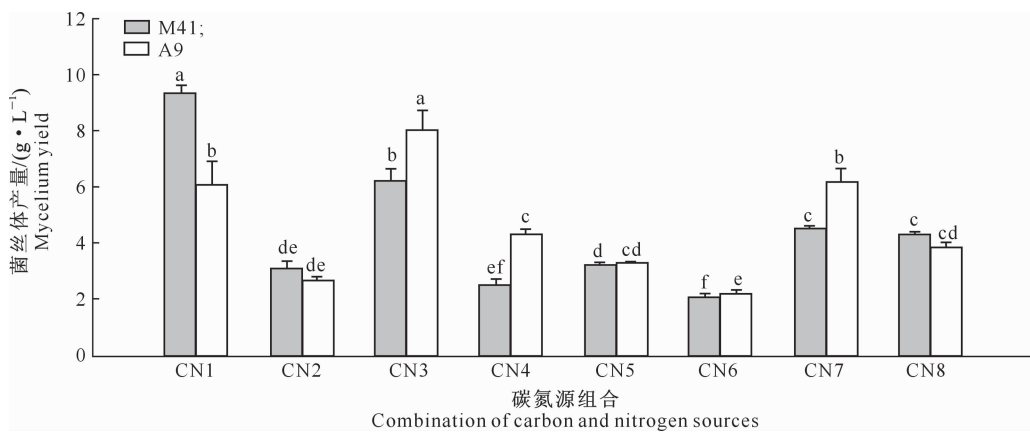


图 5 不同碳氮源组合对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响

Fig. 5 Influences of different combinations of carbon and nitrogen sources on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9

2.2.3 最佳碳氮源含量的筛选 由图 6 可见,当氮源(菜籽饼或蚕蛹粉)含量固定为 2%时,菌株 M41 和 A9 的菌丝体产量随着碳源(玉米粉)含量的增加均呈现先升高后降低的趋势,并在碳源含量为 2%时菌丝体产量达到最大,分别为 4.68 和 7.97 g/L。此外,碳源含量从 0.5%增加到 1%时,M41 和 A9 的菌丝体产量均显著($P<0.05$)增加;而碳源含量从 1%增加到 4%时,除 A9 在碳源含量从 1%增至 2%时菌丝体产量显著($P<0.05$)增加外,这两个菌株的菌丝体产量并无显著性($P>0.05$)变化。这表明氮源固定时,碳源含量在 2%~4%时对 M41 和 A9 生长的影响较小,其含量为 2%时菌丝体产量最大。因此,将碳源含量确定为 2%进行下一步研究。

由图 7 可见,当碳源含量为 2%时,除 M41 在氮

由图 5 还可以看出,菌株 M41 在玉米粉+菜籽饼(CN1)培养基中生长最好,菌丝体产量(9.37 g/L)显著高于其他碳氮源组合($P<0.05$),在玉米粉+蚕蛹粉(CN3)培养基中的生长次之($P<0.05$),两种碳氮源复配组合(CN7 和 CN8)培养基中生长也较好,菌丝体产量均显著高于其余的 4 种组合($P<0.05$)。菌株 A9 在玉米粉+蚕蛹粉的组合培养基中生长最优,菌丝体产量(8.05 g/L)也显著高于其他碳氮源组合($P<0.05$),其次是玉米粉+菜籽饼和复配 1(CN7),二者差异不显著,但均显著高于其他 5 种组合培养基($P<0.05$)。由此可见,菌株 M41 的最适碳氮源组合为玉米粉+菜籽饼,而 A9 则为玉米粉+蚕蛹粉。这两种培养基可以用于两个菌株培养基碳氮源含量的筛选。

源(菜籽饼)含量从 0.5%增加到 1%时菌丝体产量无显著增加($P>0.05$)外,菌株 M41 和 A9 的菌丝体产量均随氮源(菜籽饼或蚕蛹粉)含量的增加而显著($P<0.05$)增加,在氮源含量为 4%时达到最大(7.56 和 11.92 g/L),且显著($P<0.05$)高于其他 4 种培养基。可见,当碳源固定时,氮源含量对 M41 和 A9 菌丝体产量的影响较大,本研究中其含量越高,菌丝体产量越高。考虑到生产成本和产量间的平衡,本研究将菌株 M41 和 A9 液体培养基的最优碳氮源含量确定为 2%碳源(玉米粉)+4%氮源(菜籽饼或蚕蛹粉)。

综合以上研究结果,菌株 M41 和 A9 的最优液体培养基组成为 2%玉米粉+4%菜籽饼(或蚕蛹粉)+0.15%磷酸二氢钾+0.075%硫酸镁。

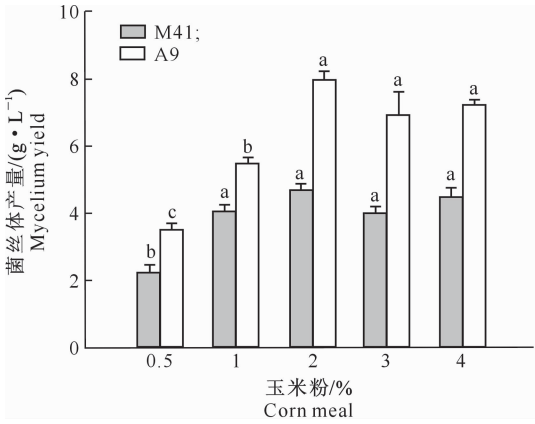


图 6 不同碳源含量对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响(氮源含量为 2%)

Fig. 6 Influences of different carbon source contents on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9 (nitrogen source content 2%)

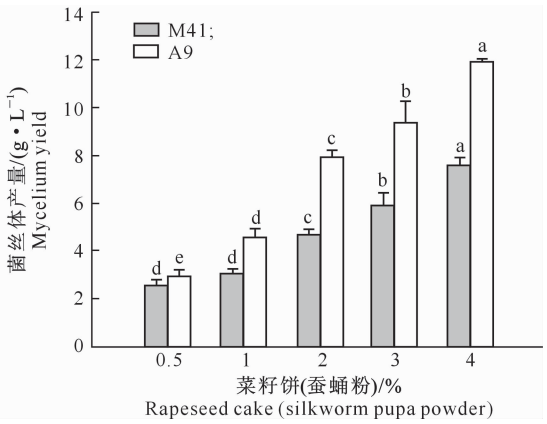


图 7 不同氮源含量对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响(碳源含量为 2%)

Fig. 7 Influences of different nitrogen source contents on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9 (carbon source content 2%)

2.3 优化培养基中菌株 M41 和 A9 菌丝体产量

由图 8 可以看出,菌株 M41 和 A9(对照)在工业生产的常用蜜环菌液体发酵培养基中生长较为缓慢,恒温振荡(25 ℃,121 r/min)培养 18 d 后菌丝体产量低于 4 g/L;而在优化后的液体培养基中,这两个菌株的生长都十分迅速,菌丝体产量显著增加($P<0.05$),分别达到 16.71 和 10.76 g/L,较工业发酵培养基中的菌丝体产量分别提高 5 和 4.7 倍。可见,优化后的液体培养基更适合菌株 M41 和 A9 的生长,显著提高菌丝体产量。此外,无论是在优化后的培养基还是工业发酵常用培养基中,菌株 M41 的生长都明显优于对照菌株 A9,尤其是在优化培养基中,M41 的菌丝体产量显著($P<0.05$)高于 A9。

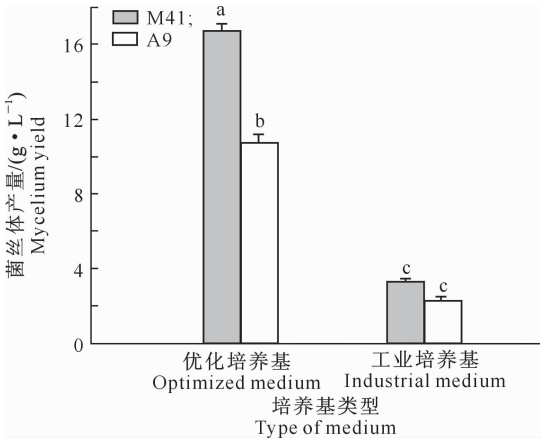


图 8 优化液体培养基对蜜环菌菌株 M41 和 A9 菌丝体产量的影响

Fig. 8 Influences of optimized liquid medium on mycelium yield of *A. mellea* strains M41 and A9

3 讨论与结论

菌种是影响蜜环菌产量和功能的直接的的决定性因素,菌种的退化和优良菌种的匮乏是蜜环菌生产中常见的、急需解决的关键问题^[12]。本研究根据菌丝体生物量和生长特性,从实验室分离和收集的 20 个菌株中筛选获得菌株 M41 和 M57,其生长最好,菌丝体干质量最大,明显优于其他供试菌株。这两个菌株是 2018 年从陕西省略阳县野生天麻周围的蜜环菌菌索中分离得到的,生长前期在综合培养基上产生大量的雪白色菌丝,生长良好,活力较强,菌丝体干质量显著高于对照菌株 A9,在最终优化后的液体培养基中,菌株 M41 的生长也明显优于 A9。究其原因,一方面可能是这两个菌株本身遗传性状优良;另一方面也有可能是新分离菌株传代次数较少,还未出现退化现象,而 A9 在长期的生产应用中传代次数较多,已经开始退化。因此,后期可以考虑将菌株 M41 广泛应用于蜜环菌的发酵和生产中,但也要进一步研究和观察其生产性状,并改进保藏方法或减少传代次数,尽量降低其退化的速率,延长其服务生产的时间。本研究中,供试蜜环菌菌株在真菌常用的 PDA 培养基上生长极其缓慢,主要产生褐色的根状菌索,少见菌丝产生;在综合培养基上,所有供试菌株的生长速度都有所提高,并且产生大量的白色气生菌丝和根状菌索,生长后期气生菌丝才逐渐发生褐化和消退,平板表面显露出少量褐色菌索。这表明,所用的综合培养基更适合蜜环菌的生长和菌丝体的产生,菌株活力增强,可能与培养基的营养成分较为丰富有关。

碳源和氮源是微生物生长所需的最基本营养因子^[14]。碳源既是构成菌体细胞的碳骨架,也可作为菌体活动提供能量来源,氮源则是菌体合成蛋白质、核酸、维生素等必需的原料^[15-16]。大量研究表明,蜜环菌的种类、来源不同,其对营养条件的要求也有所不同,尤其是碳源和氮源对蜜环菌的生长和生物量有着较大的影响。程显好等^[17]对分离自山东烟台和威海地区的蜜环菌菌株液体培养条件进行优化,结果表明最适碳源和氮源分别是糊精和豆饼粉提取液;杨海旭^[12]发现,秦巴山区2株蜜环菌优势菌株ZY-9、ZY-17的最佳碳氮源分别为葡萄糖和蛋白胨。此外,也有研究报道淀粉^[10]、红薯粉^[18]、蔗糖^[9]等为蜜环菌的最适碳源,蛋白胨^[11,19]、豆粕^[16]、酵母膏^[9]等为最适氮源。本研究结果发现,M41和A9对碳源、氮源的喜好和利用能力有所差异,这可能与它们的来源和遗传特性不同相关^[19]。因此,在蜜环菌的生长中,一定要注意所用菌株的来源,以针对特定的菌株进行培养条件优化,获得最大的菌丝体产量。此外,碳氮源种类对M41和A9菌丝体产量的影响较大,尤其是氮源种类对A9菌丝体产量的影响较高。本研究中,这两个菌株的最佳碳源分别为玉米粉和麦麸,最佳氮源为菜籽饼和酵母浸粉,蚕蛹粉为氮源时二者生长也较好。与此结果相似,刘宇等^[16]发现,蜜环菌的最适碳源为玉米粉。熊泽等^[20]和邵伟等^[21]发现蜜环菌的最佳氮源为菜籽饼和蚕蛹粉。谭周进等^[18]认为,蜜环菌基本上不能以尿素作为氮源,与之相同,本研究也发现菌株M41和A9在尿素为氮源的培养基中均不能进行生长。

曹妍等^[22]研究表明,蜜环菌菌株M7的最适碳氮源组合为糊精+红薯粉、蚕蛹粉+玉米浆。本研究中,菌株M41的最佳碳氮源组合为玉米粉+菜籽饼;A9的最适碳氮源分别为麦麸和酵母浸粉,但二者组合的培养基中菌丝体产量却较低,在玉米粉+蚕蛹粉的培养基中生长最好,这个原因还有待进一步研究。本研究中,当氮源含量固定时,碳源含量在2%~4%时对M41和A9生长的影响较小;而当碳源含量固定时,氮源含量对二者菌丝体产量的影响较大,氮含量越高,菌丝体产量越高。因此,在蜜环菌菌丝体生产实践中尤其要重视氮源含量的筛选。

本研究通过液体培养基中碳氮源的筛选和优化,显著提高了蜜环菌菌株M41和A9的菌丝体产量,较工业生产常用培养基中菌丝体产量提高5和4.7倍。尽管试验所用的发酵体积仅为200 mL(500 mL锥形瓶),后期需要进一步放大培养和验

证,但试验结果可为后期蜜环菌菌丝体生产提供基础和理论依据。此外,本研究主要是以菌丝体产量为依据进行了蜜环菌菌株优选和培养基优化,而蜜环菌中的多种活性成分是其临床疗效和药理作用的基础,因而后期有必要依据其活性成分的产量进行下一步的菌株优选和培养条件优化。

[参考文献]

- [1] Lung M Y, Huang P C. Optimization of exopolysaccharide production from *Armillaria mellea* in submerged cultures [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(2): 198-204.
- [2] 曾春函, 邓晶晶, 王传华. 我国蜜环菌分类单元间菌索的相互作用 [J]. 菌物学报, 2019, 38(6): 778-791.
Zeng C H, Deng J J, Wang C H. Interspecific interaction of rhizomorph of *Armillaria* in China [J]. Mycosystema, 2019, 38(6): 778-791.
- [3] Lung M Y, Hsieh C W. Antioxidant property and production of exopolysaccharide from *Armillaria mellea* in submerged cultures: effect of culture aeration rate [J]. Engineering in Life Sciences, 2011, 11(5): 482-490.
- [4] Tsai C C, Wu K M, Chiang T Y, et al. Comparative transcriptome analysis of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) in response to fungus symbiosis to identify gastrodin biosynthesis-related genes [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 212.
- [5] Chang C C, Cheng J J, Lee I J, et al. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory activity of xylosyl galactofuran from *Armillaria mellea* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 584-591.
- [6] 袁媛. 蜜环菌睡眠调节活性菌株筛选及液体深层发酵技术研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2004.
Yuan Y. Studies on the strain of *Armillaria mellea* screening for sleep-regulated activity and the technology of liquid submerged fermentation [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2004.
- [7] Cao Y, Zhang X, Fang Y, et al. Determination of the active ingredients in *Gastrodia rhizoma* by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Analyst, 2001, 126(9): 1524-1528.
- [8] Zhan H D, Zhou H Y, Sui Y P, et al. The rhizome of *Gastrodia elata* Blume—An ethnopharmacological review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 189: 361-385.
- [9] 任思竹, 陈青君, 程继鸿. 不同碳源、氮源对蜜环菌生长的影响 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(16): 4974-4975, 4990.
Ren S Z, Chen Q J, Cheng J H. Effects of different carbon sources and nitrogen sources on the growth of *Armillaria mellea* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(16): 4974-4975, 4990.
- [10] 柳运波. 蜜环菌液体培养条件优化及降血脂作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
Liu Y B. Optimization of culture medium and reduce blood-lipid of *Armillaria mellea* [D]. Changchun: Jilin University,

2015.

[11] 闫 军,王 欢,孙冬梅.蜜环菌培养条件优化 [J]. 黑龙江农业科学,2016(3):112-114.
Yan J,Wang H,Sun D M. Optimization of cultivation on conditions of *Armillaria mellea* [J]. Heilongjiang Agricultural Science,2016(3):112-114.

[12] 杨海旭.秦巴山区天麻共生蜜环菌遗传多样性研究及优良菌种的选育 [D]. 陕西汉中:陕西理工学院,2016.
Yang H X. The genetic diversity of *Armillaria mellea* and selecting the good strains in Qinba Mountains [D]. Hanzhong, Shaanxi;Shaanxi University of Technology,2016.

[13] 于海茹,王 鑫,胡志强,等.伴栽天麻的蜜环菌菌株优选试验 [J]. 食药菌,2016,24(6):397-399.
Yu H R,Wang X,Hu Z Q, et al. Screening of *Armillaria mellea* strains from *Gastrodia elata* [J]. Edible and Medicinal Mushrooms,2016,24(6):397-399.

[14] 周德庆.微生物学教程 [M]. 北京:高等教育出版社,2002.
Zhou D Q. Microbiology course [M]. Beijing: Higher Education Press,2002.

[15] 秦俊哲,吕嘉朽.食用菌贮藏保鲜与加工新技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2003.
Qin J Z,Lü J X. New technology of storage,preservation and processing of edible fungi [M]. Beijing: Chemical Industry Press,2003.

[16] 刘 宇,龚思慧,彭 楠,等.蜜环菌液态发酵培养基及补料分批发酵工艺的优化 [J]. 食品与发酵工业,2016,42(5):187-191,197.
Liu Y,Gong S H,Peng N, et al. Optimization of *Armillaria mellea* liquid fermentation medium and feed-batch fermentation technology [J]. Food and Fermentation Industry,2016,42(5):187-191,197.

[17] 程显好,刘林德,董洪新,等.蜜环菌菌丝体液体培养条件的优化 [J]. 中药材,2007(5):509-512.
Cheng X H,Liu L D,Dong H X, et al. Optimization of submerged culture condition for production of mycelia biomass by *Armillaria mellea* [J]. Journal of Chinese Medicinal Material,2007(5):509-512.

[18] 谭周进,谢达平,李文革.液体培养蜜环菌对碳氮源的利用试验 [J]. 食用菌,1999(4):7.
Tan Z J,Xie D P,Li W G. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Armillaria mellea* in liquid culture [J]. Edible Fungi,1999(4):7.

[19] 彭述敏,陈玉惠,程立君,等.2 株优良天麻共生蜜环菌生长条件筛选 [J]. 中国食用菌,2010,29(4):22-25.
Peng S M,Chen Y H,Cheng L J, et al. Screening of growth condition for 2 *Armillaria mellea* strains symbiotic with *Gastrodia elata* [J]. Edible Fungi of China,2010,29(4):22-25.

[20] 熊 泽,邵 伟,乐超银,等.蜜环菌液体发酵条件研究及其饮料开发 [J]. 三峡大学学报(自然科学版),2003(6):565-567.
Xiong Z,Shao W,Yue C Y, et al. Study on conditions of submerged fermentation for *Armillaria mellea* and development of its beverage [J]. Journal of China Three Gorges University (Natural Sciences),2003(6):565-567.

[21] 邵 伟,乐超银,刘世玲,等.蜜环菌深层液体发酵条件研究 [J]. 中国食用菌,2004(3):50-51.
Shao W,Yue C Y,Liu S L, et al. Study on the conditions of submerged fermentation for *Armillariella mellea* [J]. Edible Fungi of China,2004(3):50-51.

[22] 曹 妍,杜木英,张 帆,等.蜜环菌液体培养基及多糖提取条件的优化 [J]. 食品科学,2011,32(S1):86-90.
Cao Y,Du M Y,Zhang F, et al. Optimization of culture medium and condition of the extraction polysaccharides from *Armillaria mellea* [J]. Food Science,2011,32(S1):86-90.