

# 不同基础培养基对漏斗形马勃菌丝体生长的影响

王君<sup>1</sup>, 田强<sup>1</sup>, 游朗<sup>1</sup>, 李玉延<sup>1</sup>, 宋力雅<sup>1</sup>, 马林<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2. 四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心, 四川绵阳 621010)

**摘要** [目的]研究漏斗形马勃在7种不同基础培养基上的生长情况。[方法]采用7种基础培养基进行试验,通过液体和固体培养,以菌丝体生物量及菌落直径为指标,确定漏斗形马勃的最佳基础培养基。[结果]最适合漏斗形马勃生长的基础培养基配方为玉米渣4%、蛋白胨0.3%、蔗糖2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%。在28℃和摇床转速150 r/min条件下,液体培养5 d后的菌丝体干重为16.56 g/L。在28℃固体培养7 d,菌丝体鲜重和干重分别为16.47和2.27 g/L,菌落直径为4.49 cm。[结论]该研究为漏斗形马勃培养条件的进一步优化奠定了基础。

**关键词** 漏斗形马勃; 固体培养; 液体培养; 培养基; 菌丝体; 生长

**中图分类号** S567.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)19-114-03

## Effects of Different Basic Media on the Mycelium Growth of *Lycoperdon excipuliforme*

WANG Jun<sup>1</sup>, TIAN Qiang<sup>1</sup>, YOU Lang<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1,2\*</sup> et al (1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010; 2. Engineering Research Center for Biomass Resource Utilization and Modification of Sichuan Province, Mianyang, Sichuan 621010)

**Abstract** [Objective] To study the mycelium growth of *Lycoperdon excipuliforme* in seven basic media. [Method] According to medium biomass and colony diameter as growth parameters, the optimal basic medium for the mycelium growth of *L. excipuliforme* was selected from seven liquid and solid media with different constituents. [Result] The optimal basic medium for the mycelium growth of *L. excipuliforme* was the IV medium composed of maize (4%), peptone (0.3%), sucrose (2%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1%) and  $\text{MgSO}_4$  (0.05%). After the mycelia were cultured in the liquid medium at the rotational speed of 150 r/min at 28℃ for 5 d, their dry weight in the IV medium was 16.56 g/L. When the mycelia were cultured in solid medium at 28℃ for 7 d, their fresh weight and dry weight in the IV medium were 16.47 and 2.27 g/L respectively, and the colony diameter was 4.49 cm. [Conclusion] The study lays the foundation for the further optimization of culture conditions of *L. excipuliforme*.

**Key words** *Lycoperdon excipuliforme*; Solid culture; Liquid culture; Culture medium; Mycelium; Growth

中药马勃资源丰富、来源广泛,分属于担子菌门不同科属,常见种类包括脱皮马勃、大秃马勃、梨形马勃、头状马勃、硬皮马勃等。马勃类真菌主要含有多糖、蛋白质、氨基酸、多肽、脂肪酸以及甾体、萜类、生物碱、酰胺类化合物等次生代谢成分,具有抑菌、抗炎、清除自由基、抗肿瘤、止咳、止血等多种药理作用<sup>[1-3]</sup>。

漏斗形马勃(*Lycoperdon excipuliforme*)为伞菌纲伞菌目蘑菇科真菌,其子实体中型,成熟后顶部开口,呈漏斗状。夏秋季生长在阔叶树林中地上及路边<sup>[4]</sup>。马勃主要以子实体为人药部位,但由于对生长环境有一定的要求,虽分布广泛,其野生成熟子实体很少,单靠采集野生子实体难以满足需求。利用液体发酵人工培养,可以在短期内获得大量的马勃菌丝体。有关马勃类真菌的液体培养已有一些报道,涉及碳源和氮源筛选、无机盐添加、培养条件优化等,这些研究采用了不同的基础培养基,所获得的菌丝体生物量具有较大的差异<sup>[5-8]</sup>。但目前尚无漏斗形马勃人工培养的研究,该研究采用7种基础培养基进行试验,以菌丝体生物量及菌落直径为指标,确定漏斗形马勃的最佳基础培养基,为进一步优化漏斗形马勃的培养条件奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 漏斗形马勃(*Lycoperdon excipuliforme*)由西南科技大学生命科学与工程学院贺新生教授提供,4℃保存于

PDA培养基上。葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母膏、硫酸镁、磷酸二氢钾均为分析纯试剂,土豆、玉米渣、黄豆粉购自绵阳当地市场。

## 1.2 方 法

**1.2.1 菌种活化。**将4℃保存的漏斗形马勃菌种取出,在无菌环境下接种在培养皿固体PDA培养基上。置于培养箱在28℃培养5 d。

**1.2.2 培养基组成。**共采用7种基础培养基(编号为I~VII)进行试验。I号为培养真菌常用的PDA培养基,II~VII号培养基参考相关文献。各培养基具体组成为:I马铃薯20%、葡萄糖2%<sup>[9]</sup>;II马铃薯20%、蛋白胨2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%<sup>[5]</sup>;III蛋白胨1%、酵母膏0.2%、 $\text{MgSO}_4$  1.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0%<sup>[6]</sup>;IV玉米渣4%、蛋白胨0.3%、蔗糖2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%<sup>[7]</sup>;V葡萄糖3%、蛋白胨0.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、黄豆粉1.5%<sup>[8]</sup>;VI马铃薯20%、黄豆粉1%、蛋白胨0.5%、蔗糖2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%<sup>[10]</sup>;VII葡萄糖1%、 $\text{MgSO}_4$  1.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0%<sup>[6]</sup>。

## 1.2.3 培养基配制。

**1.2.3.1 液体培养基配制。**按照“1.2.2”培养基组成比例配制,pH均为自然。分装后在121℃灭菌20 min。

**1.2.3.2 固体培养基配制。**按照“1.2.2”培养基组成比例配制,并在每个培养基中按18 g/L加入琼脂,121℃灭菌20 min后按20 mL装量倒入90 mm培养皿固化。

**1.2.4 液体培养。**在250 mL锥形瓶中装量液体培养基100 mL,在无菌条件下,用直径6 mm的打孔器取活化菌种的

**基金项目** 国家大学生创新创业训练计划(201410619002);西南科技大学大学生创新基金(CX15-040);西南科技大学生命科学与工程学院大学生创新实践项目(2014011)。

**作者简介** 王君(1994-),女,四川成都人,本科生,专业:制药工程。  
\*通讯作者,教授,博士,硕士生导师,从事天然产物研究。

**收稿日期** 2016-06-08

菌饼 2 块,放入锥形瓶中,使其分散。置于恒温摇床中振荡,转速为 150 r/min,培养温度为 28 ℃,培养时间为 5 d。每一培养基处理设 5 次重复。重复 3 次试验。

**1.2.5 固体培养。**培养皿固体培养基凝固后放置 30 min,在无茵条件下,用直径 6 mm 的打孔器取活化菌种的菌饼 1 块,接种在培养皿中央。恒温培养箱中 28 ℃ 培养 7 d。每一培养基处理设 5 次重复。重复 3 次试验。

**1.2.6 菌丝体生物量及固体培养菌落直径测定。**液体培养 5 d 后,将培养液用真空泵抽滤,收集菌丝体,用蒸馏水充分洗涤,置于培养皿烘干至恒重。固体培养 7 d 后,用游标卡尺在十字交叉的 2 个方向进行测量,以二者的平均值作为菌落直径,菌丝体除去粘附在上面的琼脂并用蒸馏水充分洗涤,用滤纸吸干水分,称量鲜重。烘干至恒重测菌丝体干重。

**1.3 数据统计分析** 以每次试验每个处理的 5 个重复计算平均值,将 3 次试验的结果进行方差分析,不同处理间差异显著性用 LSR 法进行多重比较。

## 2 结果与分析

**2.1 不同基础培养基液体培养对菌丝体生物量的影响** 由表 1 可见,在培养条件(pH、接种量、培养温度、培养时间和转速)相同的情况下,采用不同基础培养基培养所获的菌丝体干重有较大差异。IV 号培养基的菌丝体干重最大,为 16.56 g/L,其次是 V 号培养基,菌丝体干重为 10.25 g/L,其余培养基(I、II、III 和 VI)均在 8 g/L 以下,III 号培养基的菌丝体干重最低,仅为 2.17 g/L,而 VII 号培养基在接种后没有观察到菌丝体生长。对 I~VI 号 6 个处理试验结果进行方差分析发现, $F$  值为 28.21,大于  $F_{0.01} = 5.06$ ,表明各处理间的差异达到极显著。多重比较结果表明,IV 号培养基的菌丝体干重极显著高于其他 5 种培养基,V 号与 VI 号培养基之间未达显著差异,但显著高于另外 3 种培养基。

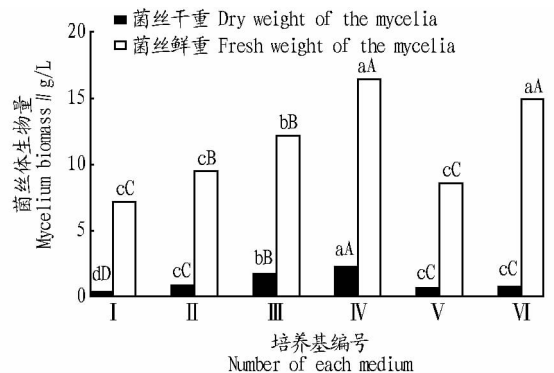
表 1 不同基础培养基液体培养的漏斗形马勃菌丝体干重

Table 1 Dry weight of *L. excipuliforme* mycelia in various basic media in liquid culture

培养基编号 Number of each medium	菌丝体干重 Dry weight of the mycelia//g/L	差异显著性 Significance of difference	
		$P < 0.05$	$P < 0.01$
I	5.41 ± 0.65	c	C
II	6.76 ± 0.66	c	B
III	2.17 ± 1.01	d	C
IV	16.56 ± 0.60	a	A
V	10.25 ± 2.03	b	B
VI	7.52 ± 3.01	b	B
VII	—	—	—

**2.2 不同基础培养基固体培养对菌丝体生物量的影响** 从图 1 可看出,在培养条件相同情况下,不同基础培养基上所获得的菌丝体鲜重及干重均有一定差异。从菌丝体鲜重看,IV 号培养基最大,为 16.47 g/L,其次是 VI 号培养基(14.83 g/L),IV 号和 VI 号之间无显著差异,但均极显著高于另 4 个培养基(I~III 和 V 号);鲜重最少的是 I 号培养基(7.20 g/L)。与液体培养时相似,漏斗形马勃菌接种与 VII 号固体培养基也未见生长。干重测定结果表明,IV 号培养基达最大,为 2.27 g/L,极显著高于其他 5 个基础培养基的菌丝

体干重,III 号培养基的菌丝体干重为 1.77 g/L,极显著高于 I、II、V 和 VI 号培养基,I 号培养基的菌丝体干重仅为 0.38 g/L。



注:图中不同大写字母表示培养基之间的差异达极显著水平( $P < 0.01$ ),不同小写字母表示培养基之间的差异达显著水平( $P < 0.05$ )。

Note: Different capital letters and lowercase letters mean the differences between various media were extremely significant ( $P < 0.01$ ) and significant ( $P < 0.05$ ) respectively.

图 1 不同基础培养基固体培养的漏斗形马勃菌丝体生物量

Fig. 1 Mycelium biomass of *L. excipuliforme* in various basic media in solid culture

**2.3 不同基础培养基固体培养的菌落直径** 由表 2 可见,在培养温度和时间相同的情况下,不同基础培养基对漏斗形马勃的生长有较大影响。菌落直径最大的是 IV 号培养基,为 4.49 cm,极显著高于其他基础培养基。VI 号也有较大的菌落直径(3.25 cm),II、III 和 V 号培养基的菌落直径之间无显著差异,菌落直径最小的是 I 号基础培养基(1.89 cm)。VII 号培养基未观察到菌丝体出现。

表 2 漏斗形马勃固体培养的菌落直径

Table 2 Colony diameter of *L. excipuliforme* in solid culture

培养基编号 Number of each medium	菌落直径 Colony diameter cm	差异显著性 Significance of difference	
		$P < 0.05$	$P < 0.01$
I	1.89 ± 0.09	d	D
II	2.43 ± 0.10	c	C
III	2.58 ± 0.07	c	C
IV	4.49 ± 0.45	a	A
V	2.76 ± 0.08	c	C
VI	3.25 ± 0.08	b	B

## 3 结论与讨论

该研究表明,无论是液体培养还是固体培养,IV 号培养基在菌丝体生物量上均达到最大值,液体培养的菌丝体干重为 16.56 g/L,固体培养的菌丝体鲜重和干重分别为 16.47 和 2.27 g/L。IV 号培养基的氮源为蛋白胨(0.3%),碳源为蔗糖(2%),所添加的玉米渣(4%)含有蛋白质、淀粉、氨基酸等多种营养成分<sup>[11]</sup>,能够满足菌种生长的碳氮需求,配方中的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1%)和  $\text{MgSO}_4$ (0.05%)也有利于菌种的生长。同样采用 IV 号培养基作为基础培养基,王涛等<sup>[7]</sup>培养大秃马勃的研究表明,不同碳源条件下的菌丝体干重为 4.01~9.37 g/L,不同氮源条件下的菌丝体干重为 4.93~9.04 g/L,

菌丝体生物量总体低于该研究的结果,这可能与菌种、培养条件(温度、转速、培养时间等)及培养基主要成分的来源(如玉米渣品质)不同有关。采用V号培养基作基础培养基也能获得较好的效果(液体培养菌丝体干重为10.25 g/L),但杨小方等<sup>[8]</sup>用该基础培养基进行脱皮马勃液体培养,发现不同培养条件下所测得的菌丝体干重差异较大(5.3~28.0 g/L),说明在基础培养基上改变碳源和氮源、添加无机盐的种类及比例、优化组合不同条件等对结果均有很大影响。以III号培养基作基础培养基,液体培养仅获得2.17 g/L的菌丝体干重,可能与配方中碳源比例不足有关。VII号培养基接种后未见生长,可能与缺乏氮源有关。

从固体培养的菌落直径同样可以看出,IV号培养基相比其他培养基生长更为快速,这与生物量测定所反映出的结果一致,但III号和VI号培养基的菌落直径大小与其鲜重、干重并不成正比,可能与培养基不同导致菌丝体积累的干物质量不同有较大关系。孔超等<sup>[10]</sup>对马勃464菌株进行固体培养,发现培养基中采用不同碳源或不同氮源时,对菌丝体日均生长量具有较大影响。

在基础培养基上,通过单因素试验或正交试验进行培养基配方和培养条件优化,可以大幅度提高菌丝体生物

量<sup>[7-8]</sup>,因此,该研究筛选获得的IV号培养基可以作为漏斗形马勃的基础培养基,有利于进一步开展最适碳氮源及最佳碳氮比筛选、无机盐添加以及培养条件优化等研究。

### 参考文献

- [1] 邓志鹏,孙隆儒. 中药马勃的研究进展[J]. 中药材,2006,29(9): 996-998.
- [2] 郭晶,江蔚新,范明松. 马勃化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代医药卫生,2013,29(3):386-389.
- [3] ASGOK C, JAYASHREE K K, SUMA J, et al. Antibacterial, antifungal and preliminary phytochemical investigation of *Lycoperdon umbrinum* [J]. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 2014, 3(3): 2105-2120.
- [4] 贺新生. 四川盆地食药药用菌图志[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 197-200.
- [5] 张帆,王淑敏. 大马勃菌种液体发酵培养条件的研究[J]. 中国食用菌, 2011,30(3):34-36.
- [6] 张华山,余响华,李亚芳,等. 土豆粉在白马勃液体培养中的应用研究[J]. 武汉工业学院学报,2006,25(1):39-41.
- [7] 王涛,田文,游玲,等. 大马勃深层培养条件初探[J]. 食用菌,2009,31(2):13-14.
- [8] 杨小方,薛璟,徐广忠,等. 马勃液体培养条件的研究[J]. 包装与食品机械,2009,27(5):106-110.
- [9] 张玲. 微生物学试验指导[M]. 北京: 北京交通大学出版社, 2007: 35-36.
- [10] 孔超,王丽华,宋爱荣,等. 马勃菌丝体碳氮源利用的研究[J]. 食用菌,2011,19(3):22-24.
- [11] 林谦,戴求仲,蒋桂韬,等. 玉米及其加工副产品的营养价值评定[J]. 中国饲料,2013(4):18-21.

(上接第97页)

消耗完全,使得蛋白质降解逐渐停止。经快速冷却和常规冷却处理的宰后分割牛肉,由于肌肉温度下降速率快,使肌肉进入僵直期时间较长,蛋白酶的活性较低,肌原纤维小片化指数变化不明显( $P > 0.05$ )。

### 3 结论与讨论

牛肉的嫩度是消费者评价牛肉食用品质高低的重要指标,影响牛肉嫩度的因素诸多,不仅受生理因素(如:肉牛品种、年龄等)影响,牛肉屠宰后不同的冷却方式对牛肉的嫩度也有显著影响。该试验对宰后分割牛肉分别采用快速冷却、常规冷却和延迟冷却3种冷却方式处理。快速冷却处理对宰后分割牛肉的冷却失重和肉色影响不显著,但由于分割肉冷却速率较快,抑制肌肉中的内源酶活性,使糖酵解速度缓慢,pH降低速率小,导致肌纤维发生痉挛产生冷收缩,剪切力变大,且在成熟7d后嫩化效果不明显。延迟冷却处理与常规冷却相比,宰后早期胴体温度下降速率较小,肌肉在较高温度下,内源酶活性较大,使糖酵解速度较快,进入僵直期所需要时间短。当中心温度达到15℃左右时转移至常规冷却温度下继续冷却,使肌肉完全僵直。此种冷却方式处理后经成熟的牛肉的肌原纤维小片化指数显著高于其他2种冷却方式,且嫩度最大,牛肉的食用品质最佳。

### 参考文献

- [1] 周光宏,罗欣,徐幸莲,等. 肉品加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] 林清. 牛肉的营养价值[J]. 中国牛业科学,2013(1):66.
- [3] 时廷鑫. 中国牛肉消费现状及其影响因素分析[J]. 农场经济管理,2008(4):53-55.
- [4] 李建. 中国牛肉消费特征及其影响因素研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [5] 孙京新,汤晓艳,周光宏,等. 宰后冷却工艺对冷却猪肉肉色、质量分类

- 的影响[J]. 农业工程学报,2006,22(8):203-208.
- [6] JOSEPH R L. Very fast chilling of beef and tenderness: A report from an EU concerted action [J]. Meat science,1996,43:217-227.
- [7] MALLIKARJUNAN P, MITTAL G S. Selection criteria for beef carcass chilling [J]. Food research international,1996,29(7):661-666.
- [8] 曾志宏. 肉的品质与pH值的相关性[J]. 肉类工业,2001(1):31-32.
- [9] 汤晓艳,周光宏,徐幸莲. 不同质量等级的中国黄牛肉在成熟过程中的品质变化研究[J]. 食品科学,2005,26(4):66-69.
- [10] 刘汉丽,张红霞,韩玲,等. 甘南牦牛肉成熟过程中剪切力、钙激活酶变化规律分析[J]. 畜牧兽医学报,2013,32(1):31-32.
- [11] 刘佳东,余群力,李永鹏. 宰后冷却对牦牛肉排酸过程中肉用品质的变化[J]. 甘肃农业大学学报,2011,46(2):111-114.
- [12] BENDALL J R. Variability in rates of pH fall and of lactate production in the muscles on cooling beef carcasses [J]. Meat science,1978,2(2):91-104.
- [13] GEESINK G H, BEKHIT A D, BICKERSTAFFE R. Rigor temperature and meat quality characteristics of lamb longissimus muscle[J]. Journal of animal science,2000,78(11):2842-2848.
- [14] 罗欣,周光宏. 电刺激和延迟冷却对牛肉食用品质的影响[J]. 中国农业科学,2008,41(1):188-194.
- [15] O' HALLORAN G R, TROY D J, BUCKLEY D J. The relationship between early post-mortem pH and the tenderisation of beef muscles [J]. Meat science,1997,45(2):239-251.
- [16] JANZ J A M, AALHUS J L, PRICE A M. Meat quality of bison(Bison bison longissimus thoracis et lumborum following very fast chilling [J]. Canadian journal of animal science,2002,82:327-337.
- [17] LI C B, LI J, LI X, et al. Effect of low-voltage electrical stimulation after dressing on color stability and water holding capacity of bovine longissimus muscle[J]. Meat science,2011,88(3):559-565.
- [18] 王玉宁,罗欣,张先锋,等. 延迟冷却对牛肉品质影响的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):147-150.
- [19] SIMMONS N J, DALY C C, CUMMINGS T L, et al. Reassessing the principles of electrical stimulation [J]. Meat science,2008,80:110-122.
- [20] 毛衍伟. 快速冷却和电刺激对牛肉品质的影响及其机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学,2011.
- [21] 高淑娟. 两段式冷却及电刺激对牛肉食用品质和肌原纤维超微结构的影响[D]. 泰安: 山东农业大学,2009.
- [22] TORNBERG E. Biophysical aspects of meat tenderness[J]. Meat science,1996,43:175-191.
- [23] AALHUS J L, ROBERTSON W M, DUGAN M E R. Very fast chilling of beef carcasses [J]. Canadian journal of animal science,2002,82:59-67.