



鸡枞菌母种培养基营养成分筛选及培养条件优化

袁征超,薛玲娜,苏楚亮,杨昱仪,姜莹,李文,莫美华

(华南农业大学 食品学院,广东 广州 510000)

摘要:鸡枞与白蚁存在严格共生机制,因此其驯化极其困难,目前尚无法实现其人工种植。基于获取鸡枞菌相关生理学特性方面的数据,从鸡枞菌碳源、氮源、氨基酸、维生素、温度及 pH 共 6 个指标出发,通过试验探索鸡枞菌母种适宜培养成分及培养条件。结果表明:鸡枞菌最适碳源为麦芽糖、山梨醇;最佳的氮源为酵母膏;脯氨酸和天冬氨酸两种氨基酸为最佳的氨基酸;VB₉ 为最佳的生长促进因子;最适生长温度为 26~28 ℃;最适 pH 为 6。

关键词:鸡枞菌;培养条件优化;培养基;营养成分

鸡枞菌的分类地位为,真菌界(Fungi)担子菌门(Basidiomycota)担子菌纲(Basidiomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)鸡枞菌属(*Termitomyces*)蚁巢伞属^[1-2]。鸡枞菌又名荔枝菌、白蚁菇、三八菌、鸡腿菇、鸡肉菇等,素有“贡菌”“菌中之王”美誉,中国四大名菌之一。鸡枞菌菌盖直径从 2~10 cm 不等,有些种类具菌环而另一些则无菌环,菌盖表面有粘液,孢子印粉红色,菌褶稠密,离生或半离生,菌盖中心突起,显微结构差异较小。大多数鸡枞菌种类与白蚁存在严格共生机制^[3-4],子实体通过地下部分(假根)与菌圃连接,该机制存在众多争论,无较好方式核实,因此其驯化极其困难,目前尚无法实现其人工种植^[5]。本文基于鸡枞菌相关生理学特性研究数据,探索鸡枞菌母种适宜的培养基成分及条件,旨在为实现鸡枞菌的人工种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试鸡枞菌(*Termitomyces*)母种由华南农业大学食品学院应用真菌研究室分离、鉴定、保存的菌种。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 从冰箱保存的菌种,取出 5 只鸡枞菌的试管种,分别放置在 12、17 和 22 ℃ 的生化培养箱培养 1 d,恢复菌种活性。然后转接到 PDA 平板培养基上,培养,进行菌种活化。从活化后的菌种中挑选出无污染、菌丝形态健壮、洁白

度好的优质菌种平板,采用灭菌打孔器均匀地将菌种打成 0.5 cm 的圆片,供后面接种使用。

1.2.2 接种 在超净工作台的无菌的环境,将制备好的 0.5 cm 菌种接入到相应的培养基平板中。

1.2.3 鸡枞菌优化试验的培养方法 鸡枞菌优化试验的过程中,碳源、氮源、氨基酸、维生素 4 个指标,采用培养基接种后放置在 26 ℃ 条件下恒温避光培养。

1.2.4 鸡枞菌生长温度优化试验的培养方法 将接种好的培养基随机分组后,编号培养基,分别放置在 22、24、26、28 和 30 ℃ 条件下恒温避光培养。

1.2.5 鸡枞菌 pH 优化试验的培养方法 因为琼脂凝固受到 pH 的影响较大,固对 pH 优化试验中,采用温度 26 ℃ 转速 100 r·min⁻¹ 避光摇床中震荡的方式培养菌球,从而便于统计出鸡枞菌的生物量及生理指标。

1.2.6 培养基中营养物质的筛选 鸡枞菌与碳源关系培养基:所选碳源 15.0 g,酵母膏 1.5 g,牛肉膏 1.5 g,2.0 g 可溶碳酸钙溶于 20 mL 水的清液 10 mL,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,琼脂 20.0 g,培养基体积 1.0 L。

鸡枞菌与氮源关系培养基:所选氮源 3.0 g,葡萄糖 10.0 g,海藻糖 10.0 g,淀粉 10.0 g,2.0 g 可溶碳酸钙溶于 20 mL 水的清液 10 mL,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,琼脂 20.0 g,培养基体积 1.0 L。

鸡枞菌与氨基酸关系培养基:氨基酸,葡萄糖 10.0 g,海藻糖 10.0 g,淀粉 10.0 g,酵母膏 1.0 g,牛肉膏 1.0 g,蛋白胨 1.0 g,2.0 g 可溶碳酸钙溶于 20 mL 水的清液 10 mL,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,琼脂 20.0 g,培养基体积 1.0 L。

收稿日期:2018-05-23

基金项目:国家级大学生创新创业资助项目(201710564274)。

第一作者简介:袁征超(1997-),在读学士,从事食用真菌学研究。E-mail: 2910230071@qq.com。

通讯作者:莫美华(1966-),女,博士,教授,从事食用真菌学研究。E-mail: mindymo@163.com。

鸡枞菌与维生素关系培养基:维生素,葡萄糖 10.0 g,海藻糖 10.0 g,淀粉 10.0 g,酵母膏 1.0 g,牛肉膏 1.0 g,蛋白胨 1.0 g,2.0 g 可溶碳酸钙溶于 20 mL 水的清液 10 mL,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,琼脂 20.0 g,培养基体积 1.0 L。

鸡枞菌与生长温度关系培养基:葡萄糖 10.0 g,海藻糖 10.0 g,淀粉 10.0 g,酵母膏 1.0 g,牛肉膏 1.0 g,蛋白胨 1.0 g,2.0 g 可溶碳酸钙溶于 20 mL 水的清液 10 mL,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,琼脂 20.0 g,培养基体积 1.0 L。

鸡枞菌与 pH 关系培养基:麦芽糖 10.0 g,马铃薯汁 10.0 g,山梨醇 10.0 g,酵母膏 1.0 g,牛肉膏 1.0 g,蛋白胨 1.0 g,1.0 g 可溶碳酸钙,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,培养基体积 1.0 L。

1.2.7 培养条件筛选 培养温度:鸡枞菌属于夏季出菇的类型,结合对鸡枞菌温度的预试验及相关研究^[3],本研究的温度定位 26 ℃

培养方式:固体培养采用外径 10 cm 的玻璃平板作为试验器材,每个平板倒取溶液 15~18 mL,放置生化培养箱中培养;液体培养采用容积为 250 mL 的三角锥形瓶,其中加入 120 mL 培养液,放置转速 100 r·min⁻¹的摇床中培养。

1.2.8 数据分析 数据采用 Excel 2000 进行分析。

2 结果与分析

2.1 鸡枞菌碳源的筛选

从表 1 中可以看出,鸡枞菌的菌丝生长与碳

表 1 不同碳源对鸡枞菌菌丝生长的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

碳源 Carbon sources	菌丝生长速度/ (mm·d ⁻¹) Mycelium growth rate	洁白度 Whiteness	菌丝长势 Mycelium growth vigour
麦芽糖	1.4926±0.0158 a	较洁白	较浓密
山梨醇	1.4408±0.0177 b	较洁白	浓密
海藻糖	1.4019±0.0037 c	黄	稀疏
淀粉	1.3426±0.0018 d	洁白	浓密
甘露醇	1.2685±0.0206 e	较洁白	较浓密
葡萄糖	1.1815±0.0018 f	较洁白	较稀疏
木糖	1.0111±0.0032 g	较洁白	较稀疏
乳糖	0.9556±0.0032 h	颜色黄	稀疏

同列不同小写字母代表 0.05 水平差异显著不同。

Different lowercase in the same line indicate significant difference at 0.05 level,the same below.

源的选择有较为明显的关系,其中具有较好的生长效应的分别是麦芽糖、山梨醇,同时麦芽糖、山梨醇作为碳源培养条件下菌落菌丝较洁白,菌丝长势也较好,因此选取麦芽糖、山梨醇作为二孢拟奥德蘑生长最佳的碳源,有利于鸡枞菌作为分离培养基和一级种阶段的生长和发育。

2.2 鸡枞菌氮源的筛选

从表 2 可以看出,鸡枞菌的菌丝生长速度与氮源之间的关系,酵母膏与其它所选用氮源差异显著,而且在酵母膏作为氮源情况下,鸡枞菌菌丝长势及菌落颜色均呈现最佳状态,故选择酵母膏作为鸡枞菌培育过程中的氮源。

表 2 不同氮源对鸡枞菌菌丝生长的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

氮源 Nitrogen sources	菌丝生长速度/ (mm·d ⁻¹) Mycelium growth rate	洁白度 Whiteness	菌丝长势 Mycelium growth vigour
酵母膏	1.3271±0.0615 a	洁白	浓密
细菌学蛋白胨	0.9688±0.0188 c	灰黄	较稀疏
蛋白胨	1.1604±0.0229 b	灰黄	较浓密
大豆蛋白胨	0.9500±0.0036 c	较洁白	较稀疏
牛肉膏	1.3229±0.0021 a	黄	较浓密
天门冬酰胺	1.1750±0.0219 b	黄	较稀疏
胰蛋白胨	1.0146±0.0021 c	较洁白	稀疏

2.3 鸡枞菌生长因子氨基酸的筛选

从表 3 可以看出,所选用的氨基酸对鸡枞菌菌丝的生长均有促进作用,以脯氨酸和天冬氨酸促进效果显著。但是对于菌落洁白度和菌丝长势

表 3 不同氨基酸对鸡枞菌菌丝生长的影响

Table 3 Effects of different amino acid on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

氨基酸 Amino acid	菌丝生长速度/ (mm·d ⁻¹) Mycelium growth rate	洁白度 Whiteness	菌丝长势 Mycelium growth vigour
脯氨酸	1.2875±0.0042 a	较洁白	浓密
天冬氨酸	1.2604±0.0055 ab	灰黄	较浓密
丝氨酸	1.2334±0.0199 bc	洁白	较浓密
谷氨酸	1.2021±0.0055 c	黄	较稀疏
丙氨酸	1.2000±0.0036 c	较洁白	较浓密
苏氨酸	1.1417±0.0021 d	灰黄	稀疏
苯丙氨酸	1.0708±0.0042 e	灰黄	较浓密
空白对照	0.9834±0.0199 f	灰黄	较稀疏

两个指标,以脯氨酸、丝氨酸效果明显,故综合上述两个指标,以脯氨酸作为鸡枞菌生长因子中的最佳氨基酸。

2.4 鸡枞菌生长因子维生素的筛选

从表4可以看出,VB₉有较明显的促进生长的作用;但是对于菌丝洁白度、菌圃菌丝密度等宏观整体表现指标却没有规律,每种维生素有各自的特性,表现出各自的差异性,VB₉、VB₁、VB₂表现出明显的优势。故综合以上因素以VB₉为最佳的生长促进因子,对于菌丝生长、洁白度等指标有更好的促进作用。

表4 不同维生素对鸡枞菌菌丝生长的影响

Table 4 Effects of different vitamin on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

维生素 Vitamin	菌丝生长速度/ (mm·d ⁻¹) Mycelium growth rate	洁白度 Whiteness	菌丝长势 Mycelium growth vigour
VB ₉	1.3500±0.0220 a	较洁白	浓密
VB ₆	1.2625±0.0072 b	灰黄	稀疏
VB ₁	1.2229±0.0199 bc	洁白	较浓密
VB ₃	1.2000±0.0063 c	黄	稀疏
VB ₂	1.1792±0.0178 c	较洁白	较浓密
VB ₁₂	1.0792±0.0021 d	灰黄	较稀疏
空白对照	0.9917±0.0240 e	较洁白	较稀疏

2.5 温度对鸡枞菌菌丝生长的影响

从表5可以看出,鸡枞菌菌丝生长速度和菌丝长势在22~26℃呈现同步的关系,在该范围内随温度的升高两指标均呈现良好趋势;当温度高于26℃时,菌落洁白度和菌丝长势均开始下降,不利于培育优良的菌种。温度低于22℃和高于28℃均不利于菌丝的生长和各指标的优化,最适温度为26~28℃。

表5 不同温度对鸡枞菌菌丝生长的影响

Table 5 Effects of different temperature on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

温度/℃ Temperature	菌丝生长速度/ (mm·d ⁻¹) Mycelium growth rate	洁白度 Whiteness	菌丝长势 Mycelium growth vigour
22	1.0604±0.0240 d	洁白	较稀疏
24	1.3521±0.0240 c	洁白	较浓密
26	1.5333±0.0417 a	较洁白	浓密
28	1.5750±0.0380 a	灰黄	较稀疏
30	1.4584±0.0361 b	黄	稀疏

2.6 pH对鸡枞菌生长的影响

从表6中可以看出鸡枞菌菌丝在较高pH和较低pH时均不利于生物量的积累,pH在6~7时出现生物量的最大值。但是液体发酵环境,在pH6~7时,对于鸡枞菌相同接种量的条件下,不利于菌球个数的形成,同时对于菌球表面的纤毛的形成也不利。

接种量相同的条件下,产生菌球的个数多,表面菌丝的密度大和长度长等是优良菌种的表现,有利于真菌在三级种生殖生长时原基分化出菇^[6]。因此综合考虑日均生物量、菌球个数的形成及菌球表面纤毛的形成情况,最适pH为6。

表6 不同pH对鸡枞菌菌球生长的影响

Table 6 Effects of different pH on the mycelial growth of *Termitomyces albuminosus*

pH	日均生物量/ (g·d ⁻¹) Daily biomass	菌球个数 The number of fungus ball	菌丝长势 Mycelium growth vigour
4	0.0233±0.0041 b	基本接近接种数	菌球表面纤毛短
5	0.0134±0.0015 ab	多且形状大	菌球表面纤毛较长
6	0.0359±0.0008 a	较多且形状大	菌球表面纤毛长
7	0.0391±0.0048 a	较多但形状小	菌球表面纤毛短
8	0.0330±0.0006 ab	基本接近接种数	菌球表面纤毛短

3 结论

从试验结果中可以看出,鸡枞菌的生物学特性,最适碳源为麦芽糖、山梨醇;最佳的氮源为酵母膏;脯氨酸两种氨基酸为最佳的氨基酸;VB₉为最佳的生长促进因子;最适生长温度为26~28℃;最适pH为6。

在鸡枞的生产过程中,为了获得优质的菌种和满足科研的需要,可以有选择性的添加上述试验结论中的指标,来满足菌丝高效快速的生长要求。

参考文献:

[1] 胡清秀. 鸡枞菌研究现状[J]. 食用菌学报, 2001, 8(1): 54-58.

[2] 胡清秀. 五种鸡枞菌的分离培养试验[J]. 食用菌学报, 2000, 7(3): 43.

[3] 姚晓红, 许尧兴, 许少春. 鸡枞菌的生物学特性及深层发酵研究进展[J]. 食用菌学报, 2001, 8(1): 59.

[4] 张玉金, 郭华春, 李荣春. 鸡枞的驯化栽培现状[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1288-1290.

[5] 胡尚勤, 刘天贵, 李贤柏. 鸡枞菌的培养条件研究[J]. 食品与生物技术学报, 2001, 27(1): 1-2.

[6] 徐晴, 黄和, 李霜, 等. 深层发酵中丝状真菌菌球形态控制的策略[J]. 食品科技, 2009, 34(2): 1-5.