

王丽芳, 毛炯炳, 彭耀, 等. 痂状炭角菌鉴定、培养条件优化及发酵产物活性分析[J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(2): 49-56.
WANG Lifang, MAO Jiongbing, PENG Yao, et al. Identification, optimization of culture conditions and activity analysis of fermentation products of *Xylaria escharoidea*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 49-56.

痂状炭角菌鉴定、培养条件优化及发酵产物活性分析

王丽芳¹, 毛炯炳^{2,3}, 彭耀², 董育德¹, 郝艳佳¹, 毛伟光³, 党向利²
(1 安徽农业大学 园艺学院, 安徽 合肥 230036; 2 安徽农业大学 植物保护学院, 安徽 合肥 230036;
3 绍兴市曙光科技开发有限公司, 浙江 绍兴 312000)

摘要:【目的】炭角菌属具有珍贵的药用价值和较高的经济价值。本研究对采自白蚁废弃巢穴上的炭角菌菌株进行鉴定, 对其液体发酵和固体培养条件进行优化, 并对液体发酵产物抗菌、抗氧化活性进行测定, 以期为痂状炭角菌的开发利用提供参考。【方法】通过形态观察及 ITS 序列测序对炭角菌进行鉴定; 探讨液体发酵中添加不同碳源、氮源和金属离子对痂状炭角菌菌丝体生长的影响; 分析固体培养基中添加氨基酸对无性子座生长的影响; 利用平板抑菌法和 DPPH 法对液体发酵产物抗菌和抗氧化活性进行测定。【结果】采集菌株经形态鉴定和分子鉴定, 为痂状炭角菌。液体发酵最佳碳源为可溶性淀粉, 最佳氮源为蚕蛹粉, 最佳无机盐为 MgSO₄。正交试验筛选的最佳液体培养基组成为可溶性淀粉 4%(w)+蚕蛹粉 0.6%(w)+MgSO₄ 0.06%(w)。固体培养基中添加缬氨酸、异亮氨酸和苏氨酸均能显著促进无性子座的生长。液体发酵产物抗菌效果显著优于山梨酸钾, 对 DPPH 的抗氧化活性为 (75.19±2.08)%, 显著优于维生素 E。【结论】优化的液体发酵和固体培养条件可以显著提高痂状炭角菌菌丝体产量, 促进无性子座生长。痂状炭角菌发酵产物具有较好的抗菌和抗氧化作用, 具有较高的开发利用价值。

关键词: 痂状炭角菌; 液体发酵; 固体培养; 抗菌活性; 抗氧化活性
中图分类号: S646 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)02-0049-08

Identification, optimization of culture conditions and activity analysis of fermentation products of *Xylaria escharoidea*

WANG Lifang¹, MAO Jiongbing^{2,3}, PENG Yao², DONG Yude¹, HAO Yanjia¹, MAO Weiguang³, DANG Xiangli²
(1 School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 3 Shaoxing Shuguang Technology Development Co., Ltd, Shaoxing 312000, China)

Abstract: 【Objective】*Xylaria* has valuable medicinal value and high economic value. *Xylaria* species collected from abandoned nest of termites were identified, and its liquid fermentation and solid culture conditions were optimized. The antibacterial and antioxidant activities of liquid fermentation product were determined. The study aimed at providing reference for exploitation and application of *Xylaria escharoidea*. 【Method】The morphology observation and ITS sequencing were used to identify *Xylaria* species. The effects of adding different carbon sources, nitrogen sources and metal ions in liquid fermentation on mycelial growth were investigated. The effects of adding amino acids in solid medium on stromata growth were also analyzed. Furthermore, the antibacterial and antioxidant activities of liquid fermentation product were determined through

plate bacteriostatic method and DPPH method. 【Result】 The collected strains were identified as *X. escharoidea* based on morphology and molecular data. The optimum carbon source in liquid fermentation was soluble starch, the optimum nitrogen source was silkworm pupa powder, and the optimum inorganic salt was $MgSO_4$. The optimum liquid medium component screened by orthogonal test was soluble starch 4% (w), silkworm pupa powder 0.6% (w) and $MgSO_4$ 0.06% (w). All valine, isoleucine and threonine could significantly promote the growth of stromata in solid medium. The antibacterial effect of liquid fermentation product was significantly better than that of potassium sorbate, and the antioxidant activity to DPPH was $(75.19\pm2.08)\%$, significantly superior than that of vitamin E. 【Conclusion】 The optimized liquid fermentation and solid culture conditions can increase mycelial yield and promote stromata growth. The liquid fermentation product of *X. escharoidea* has excellent antibacterial and antioxidant activities, and possesses high exploitation and utilization value.

Key words: *Xylaria escharoidea*; Liquid fermentation; Solid culture; Antibacterial activity; Antioxidant activity

痂状炭角菌 *Xylaria escharoidea* (Berk.) Sacc.在分类学上隶属于子囊菌门 Ascomycota 炭角菌目 Xylariales 炭角菌科 Xylariaceae 炭角菌属 *Xylaria*。炭角菌属是炭角菌科中最大的一个属,是该科的模式属,也是最早被描述的属^[1-2]。据 Daranagama 等^[3]估计,炭角菌属的种类超过 500 种。全世界共发现 300 多个炭角菌属物种,我国已知的炭角菌属真菌有 61 种^[2]。炭角菌属真菌广泛分布于世界各地,特别是热带、亚热带和温带地区,在我国海南、贵州、广西、四川、浙江等地均发现多种炭角菌属真菌^[4-5]。

炭角菌属是药食同源的兼用真菌,该属很多真菌种类都具有一定的药用价值^[5-7],比如增强机体免疫力、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、延长寿命等功效^[8];而且生物活性高、成分多样,越来越受到人们的青睐^[9]。由于炭角菌生长环境特殊、对生长条件要求较高、自然资源稀缺,在世界药用真菌研究、应用领域均被视为珍稀资源,是一类亟待开发的新真菌资源。

鉴于炭角菌珍贵的药用价值和较高的经济价值,人们对炭角菌进行了大量探索和研究。近年来国内外关于炭角菌属的研究主要集中在培养条件优化、化学成分分析、药理作用和安全性评估等方面^[8, 10-13]。本研究在浙江省诸暨市大唐镇杨板桥山塘的白蚁死亡巢穴上采集到一个野生的大型炭角菌标本,经形态学和分子系统鉴定,为痂状炭角菌。国内外对痂状炭角菌的研究报道较少,邵雪莲^[13]对液体培养及粗多糖提取条件、体外抗氧化活性进行了研究;闻绍峰等^[14]以菌丝体生长状况为指标,对母种培养基及栽培菌核培养料进行了优化;Yue 等^[15]发现痂状炭角菌胞内多糖和胞外多糖具有抗氧化活性;Nagam 等^[16]从痂状炭角菌中鉴定出具有抗菌活性的化合物 4,8-dihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)。目前有关痂状炭角菌人

工培养子座的报道较少。本研究将采集的痂状炭角菌菌株分离后进行了形态和分子鉴定,对液体发酵条件和固体培养条件进行优化,对痂状炭角菌液体发酵产物的抗菌、抗氧化活性进行了测定,以期为今后痂状炭角菌的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

野生痂状炭角菌菌株(编号:ZJ1811,采集人:毛伟光)采集于浙江省诸暨市大唐镇杨板桥山塘白蚁死亡巢穴上,经鉴定,该菌株现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏号为 CGMCC NO. 17000)。

1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L、氯霉素 0.1 g/L, pH 自然;液体发酵基础培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、酵母粉 10 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L, pH 自然;木屑基础培养基:木屑、石膏、蔗糖和玉米粉质量分数分别为 78%、1%、1% 和 20%,加入质量为固体基料质量 80% 的水,混合均匀, pH 自然;优化的液体发酵培养基:马铃薯 200 g/L、可溶性淀粉 40 g/L、蚕蛹粉 6 g/L、 $MgSO_4$ 0.6 g/L, pH 自然;LB 固体培养基:蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L, pH 自然。所有培养基均在 120 ℃ 高温高压条件下灭菌 40 min。

1.3 菌株的分离和培养

将采集的子座样品使用 75%(v) 乙醇溶液表面灭菌 20 s,然后用无菌水冲洗 3 次。在超净台上用灭菌的刀片切取小块(1 cm×1 cm)子实体接种于 PDA 培养基,置于(28±1) ℃ 培养箱培养 3 d。挑取单菌落进行分离、纯化,并重复纯化 1 次,获得纯化的菌株。

1.4 子座切片六胺银染色

子座组织石蜡切片染色由武汉赛维尔生物科技有限公司利用六胺银染色法进行, 包括石蜡切片脱蜡脱水、六胺银染色、组织酸化、孵育染色、显色和脱水封片, 最后在正置光学显微镜 Eclipse E100 (尼康, 日本) 下观察拍照。

1.5 ITS 序列测定

根据真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 操作说明提取野生子座及分离菌株培养的菌丝体的基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 作为模板进行 ITS 序列扩增。PCR 反应体系 (20 μ L): Taq 聚合酶 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。引物序列: ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'和 ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后送至通用生物系统 (安徽) 有限公司测序。测序结果在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 利用 Blast 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性搜索比对。

1.6 液体培养条件优化

1.6.1 碳源、氮源和金属离子筛选 取 4 $^{\circ}$ C 保存的斜面菌种, 室温复苏 30 min 后, 接种到 PDA 培养基, (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 条件下培养至菌丝长满平板, 得到活化菌种。将活化菌种分别接种 (接种量为直径 0.5 cm 菌碟) 至含不同碳源 (葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉)、不同氮源 (酵母粉、蛋白胨、蚕蛹粉、氯化铵、尿素) 和不同金属离子 (KH₂PO₄、MgSO₄、ZnSO₄、CaCl₂、MnSO₄) 的液体发酵基础培养基中, 在温度 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、装液量 150 mL/250 mL 三角瓶、转速 160 r/min 的条件下培养 8 d。将滤纸烘干至恒质量, 称质量并记录; 用烘干的滤纸过滤发酵液, 将滤纸及过滤物烘干至恒质量, 称质量, 计算菌丝干质量。据此筛选最优三因素, 试验重复 3 次。

1.6.2 三因素浓度筛选 在“1.6.1”优化确定最佳三因素 (碳源、氮源及金属离子) 基础上, 设置单个因素的水平, 筛选出每个因素最有利的 3 个水平。其中碳源 (可溶性淀粉) 质量分数为 1%、2%、3%、4%、5%, 氮源 (蚕蛹粉) 质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2% 和金属离子 (MgSO₄) 质量分数为 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%。按照“1.6.1”培养条件及计质量方法进行液体发酵及水平筛选, 试验重复 3 次。

1.6.3 正交试验 以筛选出的最佳三因素的 3 个水平, 即可溶性淀粉质量分数为 3%、4% 和 5%, 蚕蛹粉质量分数为 0.2%、0.4% 和 0.6%, MgSO₄ 质量分数为 0.04%、0.06% 和 0.08%, 构建三因素三水平表, 并按照正交试验方案表进行正交试验。按照“1.6.1”培养条件及计质量方法进行发酵培养及条件优化, 试验重复 3 次。

1.7 固体培养条件优化

在木屑基础培养基中添加基料质量 1% 的不同的氨基酸 (缬氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)。将 50 g 培养基装入透明培养瓶 (直径 80 mm、高 120 mm) 中, 用玻璃棒在培养基上打孔, 灭菌、冷却后备用。每瓶接种 1 mL 液体发酵 3 d 的菌液, 在 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 条件下培养 15 d。木屑基础培养基为空白对照, 统计子实体数量、粗细及高度。

1.8 液体发酵产物的制备

选用优化的液体发酵培养基进行痼状炭角菌菌株的液体发酵。接种量为直径 0.5 cm 打孔器菌碟 1 块, 按照温度 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、装液量 150 mL/250 mL、转速 160 r/min 的培养条件培养 8 d。收集发酵液, 经 100 目孔径双层纱布过滤除菌丝后, 在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 30 min 除去发酵液中较大颗粒物质。收集上清液, 于 64 $^{\circ}$ C 条件下旋转蒸干备用。

1.9 抗菌活性测定

利用平板打孔抑菌法进行抗菌活性测定。将 LB 固体培养基融化后, 取 20 mL 冷却至 45 $^{\circ}$ C 左右, 加入 30 μ L 革兰阴性菌——大肠埃希菌 *Escherichia coli* 或革兰阳性菌——金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ($D_{600\text{ nm}}=0.3$), 摇匀, 倒入一次性培养皿。待培养基凝固后, 平板上打孔 (直径 7 mm), 每孔加入液体发酵产物 100 μ L (质量浓度为 10 mg/mL), 以同体积水和山梨酸钾溶液 (质量浓度为 10 mg/mL) 分别作为阴性和阳性对照, (37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 条件下培养过夜, 观察并测量抑菌圈直径。

1.10 抗氧化活性测定

将液体发酵产物用乙醇重溶 (质量浓度为 1.0 mg/mL), 以维生素 E (V_E) 和维生素 C (V_C) 作为阳性对照, 不加样品作为空白对照 (CK)。用乙醇将 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 配成浓度为 0.5 mmol/L 的溶液。依次加入 0.1 mL 样品、1.0 mL DPPH、1.9 mL 乙醇和 2 mL 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液后混匀, 25 $^{\circ}$ C 条件下避光反应 30 min, 然后利用分光光度计 (SOPTOP) 测定 517 nm 处光密度。试验重复 3 次, 按照下式计算样品抗氧化活性:

抗氧化活性 = $\frac{D_{517\text{ nm}}(\text{空白}) - D_{517\text{ nm}}(\text{样品})}{D_{517\text{ nm}}(\text{空白})} \times 100\%$,

式中, $D_{517\text{ nm}}(\text{空白})$ 为空白对照在 517 nm 处光密度, $D_{517\text{ nm}}(\text{样品})$ 为样品在 517 nm 处光密度。

1.11 数据分析

使用数据处理系统 DPS v7.05 的单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据统计分析。显著性差异分析采用 Duncan’s 新复极差法 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 采集的炭角菌菌片子座形态特征

对从浙江省诸暨市白蚁死亡巢穴上生长的子座进行形态鉴定。该子座单生直立, 子座大、圆柱型, 质地坚硬, 底部有柄, 细小黑色, 中上部分粗大, 颜色为黄色至黑灰色, 表面有黑色凸起, 顶部呈细长状 (图 1A)。子囊壳多个、椭圆形, 埋生于子座内侧 (图 1B), 孔口乳状凸起 (图 1C)。子囊圆柱形, 具长柄 (图 1D), 内含 8 个子囊孢子, 单列排列, 子囊孢子椭圆形, 不等边, $6.0\sim 6.5\text{ }\mu\text{m}\times 2.0\sim 2.5\text{ }\mu\text{m}$, 较光滑 (图 1E)。上述形态特征与痂状炭角菌^[4]相符。

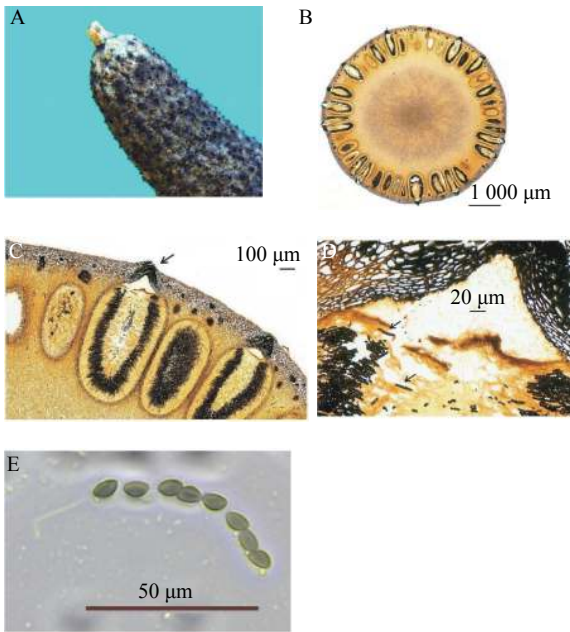


图 1 采集的炭角菌子座外观形态及子囊横切面
Fig. 1 Appearance and ascus cross-section of collected *Xylaria stromata*

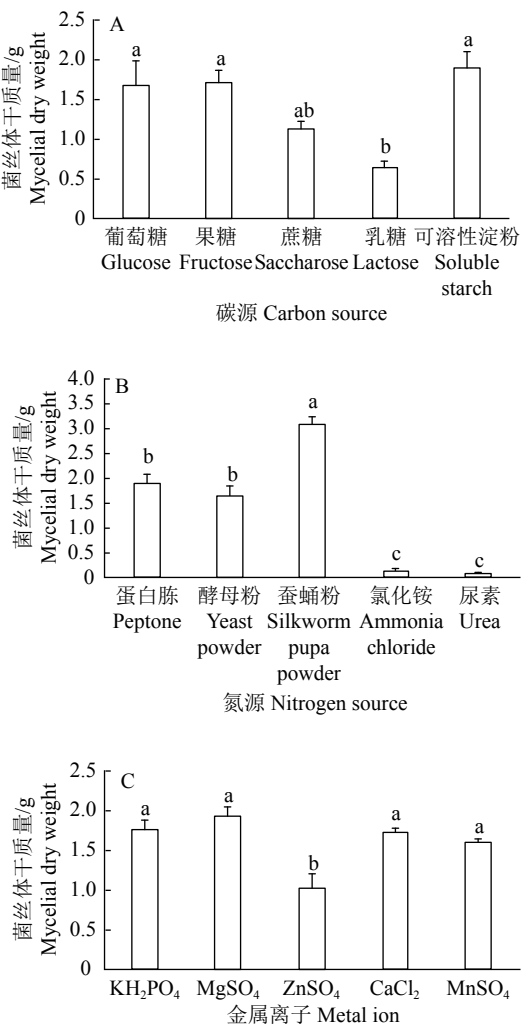
2.2 采集菌株 ITS 序列测序及鉴定

通过扩增和 DNA 测序, 将子座 ITS 序列 (Accession No.: MZ326827) 和分离培养菌丝体 ITS 序列 (Accession No.: MZ326828) 上传到 NCBI 的 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)。将测序结果在 NCBI 数据库利用网上在线 Blast 程序进行相似性比对。比对结果显

示子座 ITS 序列及培养的菌丝体 ITS 序列完全一致, 与痂状炭角菌 (Accession No.: MN622766) 只有 1 个位点的核苷酸序列不同, 相似性达到 99% 以上。经过形态鉴定和分子鉴定, 将该子实体及其分离菌株最终命名为痂状炭角菌 ZJ1811。

2.3 痂状炭角菌液体发酵培养条件优化

在添加不同碳源试验中, 痂状炭角菌对供试碳源有不同程度的利用率。添加葡萄糖、果糖、可溶性淀粉发酵的菌丝干质量较大, 可溶性淀粉发酵的菌丝干质量达 1.905 g (图 2A)。在添加不同氮源试验中, 添加蚕蛹粉发酵的菌丝与添加蛋白胨、酵母粉、氯化铵和尿素发酵的菌丝差异显著。蚕蛹粉是最佳氮源, 菌丝干质量达 3.083 g; 而痂状炭角菌对氯化铵、尿素的吸收较差, 不适于菌丝生长 (图 2B)。在

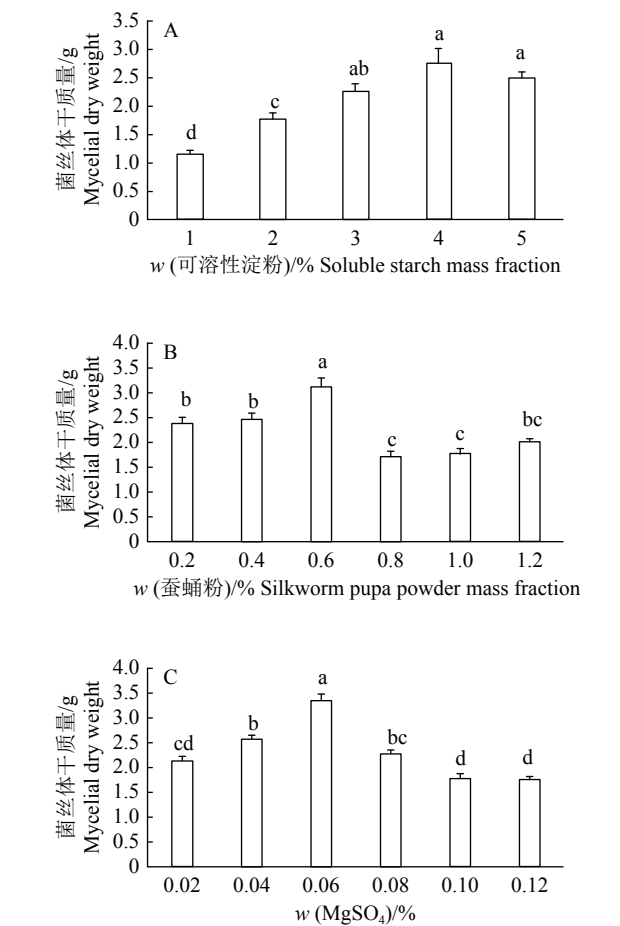


各小图中柱子上的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$, Duncan’s 法)
Different lowercase letters on the columns in each figure indicate significant differences among treatments ($P<0.05$, Duncan’s method)

图 2 添加不同碳源、氮源、金属离子的菌丝体干质量
Fig. 2 Dry weight of mycelia with different carbon and nitrogen sources, and metal ions

添加不同无机金属盐离子试验中, 添加 MgSO_4 产生的菌丝干质量最大, 达 1.932 g(图 2C)。综合菌丝产量及试验成本, 筛选出适合痼状炭角菌菌丝体生长的最佳碳源、氮源、金属离子分别为可溶性淀粉、蚕蛹粉、 MgSO_4 。

液体发酵最佳三因素三水平筛选结果如图 3 所示, 不同处理间的菌丝体干质量差异显著。同时可以看到, 随着可溶性淀粉、蚕蛹粉和 MgSO_4 的添加量增加, 菌丝体产量也在增加, 但是达到最大量之后, 菌丝体产量就会随着添加量的增加而减少。这也说明, 菌丝体发酵的碳源、氮源和金属离子不是越多越好, 添加多了反而抑制菌丝生长。筛选菌丝体干质量最大的 3 个添加量分别是可溶性淀粉质量分数 3%、4%、5%; 蚕蛹粉质量分数 0.2%、0.4%、0.6%; MgSO_4 质量分数 0.04%、0.06%、0.08%。



各小图中柱子上的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

Different lowercase letters on the columns in each figure indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$, Duncan's method)

图 3 添加不同质量分数可溶性淀粉、蚕蛹粉和 MgSO_4 的菌丝体干质量变化

Fig. 3 Dry weight of mycelia with different mass fractions of soluble starch, silkworm pupa powder and MgSO_4

通过上述结果确定痼状炭角菌培养条件最佳三因素三水平, 按照正交试验表进行正交优化试验。从表 1 可以看出痼状炭角菌发酵菌丝干质量最大为 3.335 g, 而从 K 值可以看出, 痼状炭角菌各因素最大菌丝干质量水平为可溶性淀粉 4%、蚕蛹粉 0.6%、 MgSO_4 0.06%; 从极差 R 可以看出不同因素影响痼状炭角菌生长的顺序为可溶性淀粉>蚕蛹粉> MgSO_4 。综上所述痼状炭角菌菌株液体发酵培养各成分质量分数最佳为可溶性淀粉 4%、蚕蛹粉 0.6%、 MgSO_4 0.06%。

表 1 痼状炭角菌液体培养优化正交试验结果
Table 1 Results of *Xylaria escharoidea* liquid culture optimization using orthogonal experiment

序号 Number	w/%			菌丝干质量/g Dry weight of mycelia
	可溶性 淀粉 Soluble starch	蚕蛹粉 Silkworm pupa powder	MgSO_4	
1	3	0.2	0.04	2.946
2	3	0.4	0.06	2.495
3	3	0.6	0.08	2.879
4	4	0.2	0.06	2.626
5	4	0.4	0.08	3.318
6	4	0.6	0.04	3.247
7	5	0.2	0.08	2.040
8	5	0.4	0.04	1.659
9	5	0.6	0.06	3.335
K1	8.320	7.611	7.852	
K2	9.191	7.473	8.456	
K3	7.034	9.461	8.237	
k1	2.773	2.537	2.617	
k2	3.064	2.491	2.819	
k3	2.345	3.154	2.746	
R	0.719	0.663	0.201	

2.4 添加不同氨基酸对无性子座生长的影响

痼状炭角菌在添加不同氨基酸的条件下培养 15 d 后可见无性子座 (图 4), 子座生长情况统计结果见表 2。除了添加甲硫氨酸外, 从无性子座数量、粗细 (粗: 直径 ≥ 3 mm, 细: 直径 < 3 mm) 和长度 (较长: > 8 cm, 长: 5~8 cm, 较短: 2~5 cm, 短: < 2 cm) 来看, 添加氨基酸培养的无性子座生长都好于对照 CK (未添加氨基酸), 说明添加氨基酸能够促进子座的生长。从子座数量来看, 添加了苯丙氨酸、苏氨酸、组氨酸、缬氨酸和异亮氨酸的培养基培养的子

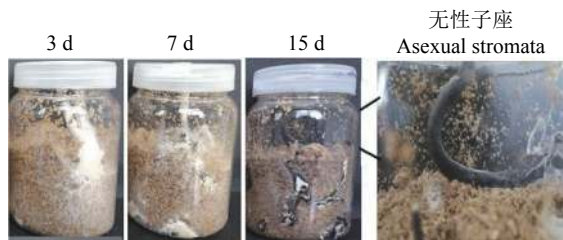


图 4 不同培养天数的无性子座

实体数量较多，显著高于 CK；从子座粗细来看，添加了缬氨酸、精氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的培养基培养的子实体较粗；从子座长度来看，添加了缬氨酸、甘氨酸、苏氨酸和异亮氨酸培养基培养的子座长度较长。综合子座数量、粗细和长度，添加缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的固体培养基是比较好的固体培养基，能够有效促进子座的生长。

Fig. 4 Asexual stromata cultured for different days

表 2 添加不同氨基酸对无性子座生长的影响¹⁾

Table 2 Effects of different amino acid additions on the growth of asexual stromata

氨基酸 Amino acid	数量 Number	粗细 Thickness	长度 Length
缬氨酸 Valine	8.67±1.53a	粗 Thick	较长 Longer
精氨酸 Arginine	5.33±0.58de	粗 Thick	较短 Shorter
苯丙氨酸 Phenylalanine	8.33±2.08ab	细 Thin	短 Short
组氨酸 Histidine	7.67±1.53abc	细 Thin	短 Short
甲硫氨酸 Methionine	—	—	—
甘氨酸 Glycine	6.33±2.08cd	细 Thin	长 Long
丝氨酸 Serine	6.67±0.58bcd	细 Thin	短 Short
苏氨酸 Threonine	8.33±0.58ab	细 Thin	长 Long
亮氨酸 Leucine	6.00±1.00cde	粗 Thick	较短 Shorter
异亮氨酸 Isoleucine	8.33±2.52ab	粗 Thick	长 Long
CK	4.33±0.58e	细 Thin	较短 Shorter

1) “—” 表示未见无性子座
1) “—” indicates no asexual stromata

2.5 痂状炭角菌液体发酵产物抗菌活性

痂状炭角菌液体发酵产物大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌打孔法抑菌试验结果如图 5 所示，统计结果见表 3。从表 3 可以看出，发酵产物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性要高于对大肠埃希菌的。另外在相同浓度下，发酵产物抗菌效果优于常用的化学

抗菌剂山梨酸钾，说明痂状炭角菌株发酵产物具有优良的抗菌作用，将来可开发为食品等防腐保鲜的抗菌剂。

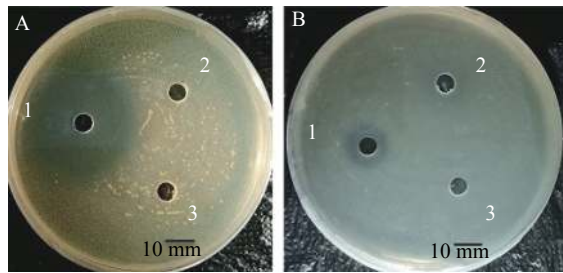
表 3 痂状炭角菌液体发酵产物对细菌的抗菌活性¹⁾

Table 3 Antibacterial activity of liquid fermentation product of *Xylaria escharoidea* against bacteria

样品 Sample	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
液体发酵液 Liquid fermentation product	++	+++
山梨酸钾 Potassium sorbate	+	+

1) “+++”：抑菌圈直径≥20 mm；“++”：10 mm<抑菌圈直径<20 mm；“+”：抑菌圈直径≤10 mm

1) “+++”：Diameter of bacterial inhibition zone≥20 mm；“++”：10 mm<diameter of bacterial inhibition zone<20 mm；“+”：Diameter of bacterial inhibition zone≤10 mm



A: 金黄色葡萄球菌, B: 大肠埃希菌; 1: 液体发酵液, 2: 山梨酸钾, 3: 水
A: *Staphylococcus aureus*, B: *Escherichia coli*; 1: Liquid fermentation product, 2: Potassium sorbate, 3: Water

图 5 平板抑菌法测定痂状炭角菌液体发酵产物抗菌活性
Fig. 5 Antibacterial activity of liquid fermentation product of *Xylaria escharoidea* by plate bacteriostatic method

2.6 痼状炭角菌液体发酵产物抗氧化活性

痼状炭角菌液体发酵产物对 DPPH 的抗氧化活性为 (75.19±2.08)% (图 6), 显著高于阳性对照维生素 E 的抗氧化活性 (60.56±1.21)%, 但显著低于维生素 C 的抗氧化活性 (79.07±1.65)%, 说明痼状炭角菌液体发酵产物具有一定的抗氧化效果。

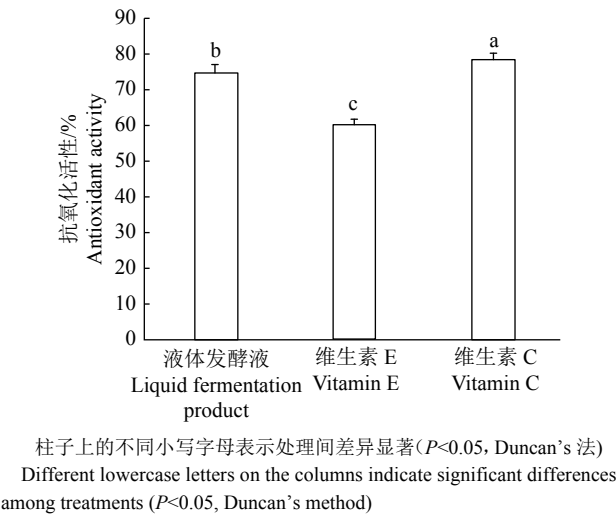


图 6 痼状炭角菌液体发酵产物的抗氧化活性
Fig. 6 Antioxidant activity of liquid fermentation product of *Xylaria escharoidea*

3 讨论与结论

炭角菌属某些真菌具有多种应用价值, 但它们的天然资源非常稀少, 而且生长周期长, 不能满足需求。利用现代生物技术进行液体深层发酵和固体培养, 可以获得用于研发或应用的菌丝体、代谢产物及子座^[17]。经形态观察、ITS 序列测定及中国微生物种保藏管理委员会普通微生物中心鉴定, 将从浙江省诸暨市白蚁死亡巢穴上采集的子座鉴定为痼状炭角菌。痼状炭角菌国内外报道较少, 目前邵雪莲^[13]、闻绍峰等^[14]的报道均为子座的人工栽培技术研究。本研究以菌丝体干质量为指标, 通过单因素试验对不同碳源、氮源和金属离子进行筛选; 结果显示痼状炭角菌菌丝体发酵最佳碳源为可溶性淀粉, 最佳氮源为蚕蛹粉, 最佳无机金属盐离子为 $MgSO_4$ 。痼状炭角菌的菌丝体在不同碳源的培养基下均能生长, 但它们之间存在显著差异, 在可溶性淀粉培养基上发酵的菌丝干质量最大, 这与邵雪莲等^[13]研究痼状炭角菌液体发酵试验结果一致。在添加不同氮源试验中, 痼状炭角菌对供试氮源有不同程度的利用率, 不同氮源菌丝体干质量排序为蚕蛹粉>蛋白胨>酵母粉>氯化铵>尿素。天然氮源 (蚕蛹粉) 最适合痼状炭角菌菌丝生长, 其次是

有机氮源 (蛋白胨和酵母粉), 无机氮源 (氯化铵和尿素) 效果较差。闻绍峰等^[14,18]也发现不同氮源炭角菌菌丝生长效果不一致, 天然氮源优于有机氮源, 有机氮源优于无机氮源, 无机氮源中的铵态氮优于硝态氮, 铵态氮中的磷酸二氢铵优于其他铵盐。大型真菌生长需要的矿物元素分为大量元素和微量元素, 大量元素有 P、S、Mg、K 和 Ca, 微量元素有 Fe、Mn、Zn、Cu、B、Mo 等^[19]。从本研究结果可知痼状炭角菌菌丝对无机盐的利用存在差异, 菌丝体干质量排序为 $MgSO_4>KH_2PO_4>CaCl_2>MnSO_4>ZnSO_4$, 添加 $MgSO_4$ 的培养基菌丝生物量最大, 前四者没有显著差异, 表明 Mg、K、Ca 和 Mn 是痼状炭角菌生长必需的大量元素和微量元素。邵雪莲^[13]也发现添加 KH_2PO_4 和 $MgSO_4$ 的培养基中痼状炭角菌菌丝生物量最大, 而陈宛如等^[20]研究发现 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 是黑柄炭角菌的生长必需元素; 这表明不同炭角菌种类对无机盐的利用率有所不同。经正交试验筛选的液体发酵培养基成分最佳质量分数为可溶性淀粉 4%、蚕蛹粉 0.6%、 $MgSO_4$ 0.06%。

氨基酸是构成生物体蛋白质最基本的物质和营养成分之一。我们在木屑基础培养基中添加不同的氨基酸, 发现除了添加甲硫氨酸外, 添加氨基酸培养的无性子座生长 (数量、粗细和长度) 均优于未添加氨基酸的培养基。张文强等^[21]研究蛋白添加剂对双孢菇农艺性状及品质的影响, 发现豆粕、膨化大豆、玉米等蛋白均能有效提高蘑菇产量及蘑菇子实体蛋白质含量。马元伟等^[22]也发现通过氨基酸的添加, 丝状真菌菌株产孢能力增加, 可以实现简单经济地防止丝状真菌退化。

炭角菌属真菌大多数具抗氧化、抗菌、清除自由基、抗机体衰老等功能。龚庆芳等^[23]对黑柄炭角菌发酵菌丝的化合物进行提取, 发现 1-(2,6-二羟基苯)-3-羟基-丁酮具有很强的抗氧化活性。翁榕安等^[24]报道水溶性黑柄炭角菌肽对 DPPH 自由基的清除能力与维生素 C 接近。刘霞^[25]从纵条纹炭角菌次生代谢产物中分离出 2 个抗菌活性强的化合物——麦角甾醇和过氧麦角甾醇, 对多种病菌都表现出较强的抑制活性。本研究也发现痼状炭角菌液体发酵产物具有较强的抗菌和抗氧化活性, 因此, 需要对痼状炭角菌液体发酵液的次生代谢产物进行深入的研究, 为今后将痼状炭角菌液体发酵产物开发为抗菌剂、抗氧化剂等提供科学依据。

参考文献:

[1] 张清卿, 李传华, 杨瑞恒, 等. 西藏地区一珍稀药用菌: 上升炭角菌生物学特性研究[J]. 云南农业大学学报

(自然科学), 2020, 35(5): 862-870.

[2] 黄谷. 中国南方炭角菌属的分类研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2014.

[3] DARANAGAMA D A, HYDE K D, SIR E B, et al. Towards a natural classification and backbone tree for *Graphostromataceae*, *Hypoxylaceae*, *Lopadostomataceae* and *Xylariaceae*[J]. *Fungal Diversity*, 2018, 88(1): 1-165.

[4] 马海霞. 中国炭角菌科几个属的分类与分子系统学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.

[5] ZHU Y F, GUO L. *Xylaria hainanensis* sp. nov. (Xylariaceae) from China[J]. *Mycosystema*, 2011, 30(4): 526-528.

[6] 李传华, 贾薇, 杨海芮, 等. 人工栽培黑柄炭角菌子实体的生物活性[J]. *食用菌学报*, 2016, 23(2): 59-64.

[7] 汪雯翰, 贾薇, 杨海芮, 等. 一种炭角菌菌丝体生物活性的研究[J]. *菌物学报*, 2017, 36(6): 730-742.

[8] 吴根福, 杨志坚. 炭角菌深层发酵制品的抗氧化特性研究[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2002, 29(2): 179-183.

[9] 李林玉, 金航, 张金渝, 等. 中国药用真菌概述[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(2): 57-61.

[10] YAN S, LI S, WU W, et al. Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, 8(9): 1689-1700.

[11] YIN X, FENG T, LI Z H, et al. Chemical investigation on the cultures of the fungus *Xylaria carpophila*[J]. *Natural Products and Bioprospecting*, 2011, 1(2): 75-80.

[12] ISAKA M, YANGCHUM A, AUNCHAROEN P, et al. Ring B aromatic norpimarane glucoside from a *Xylaria* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(2): 300-302.

[13] 邵雪莲. 痂状炭角菌的液体优化培养及其生物活性的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

[14] 闻绍锋, 曹瑶, 刘舒畅, 等. 炭角菌分子鉴定及培养基配方优化[J]. *食药菌*, 2019, 27(6): 404-407.

[15] YUE S, LI S, WEN H, et al. Isolation, identification and antioxidant properties of *Xylaria escharoidea* associated with termite nest[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2013, 12(3): 330-336.

[16] NAGAM V, ALURU R, SHOAIB M, et al. Diversity of fungal isolates from fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* and characterization of bioactive compound from *Xylaria escharoidea*[J]. *Insect Science*, 2021, 28(2): 392-402.

[17] 李赛飞, 文华安. 药用炭角菌的培养及活性成分研究进展[J]. *菌物学报*, 2007, 26(增刊): 317-323.

[18] 闻绍锋, 曹瑶, 杨林雷, 等. 药用炭角菌的研究进展[J]. *食药菌*, 2019, 27(2): 106-111.

[19] 黄毅. 食用菌栽培. [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 27.

[20] 陈宛如, 胡银忠, 王昱, 等. 白蚁巢上生长的子囊菌: 黑柄炭角菌的深层培养及其生理研究[J]. *真菌学报*, 1995, 14(4): 269-276.

[21] 张文强, 陈青君, 张国庆, 等. 蛋白添加剂对双孢蘑菇农艺性状及品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(10): 2091-2100.

[22] 马元伟, 王荣, 高强, 等. 外源氨基酸的添加对恢复或预防丝状真菌退化的研究[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(2): 108-111.

[23] 龚庆芳, 武守华, 谭宁华, 等. 黑柄炭角菌发酵菌丝中抗氧化及抗肿瘤活性的有效成分研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(12): 28-31.

[24] 翁榕安, 胡劲松, 翁诗玉. 水溶性黑柄炭角菌肽的体外抗氧化活性[J]. *湖南中医药大学学报*, 2012, 32(3): 10-13.

[25] 刘霞. 纵条纹炭角菌抗菌活性次生代谢产物研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2015.

【责任编辑 李庆玲】