

蜜环菌的深层培养

杨云鹏 岳德超 霍泽民

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

为了代替天麻, 解决临床供药, 对蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Quel.] 的深层培养进行了研究。所得结果是: 该菌在深层培养条件下菌丝体无色, 丝状, 有横隔, 具分枝; 适宜的培养基为: 蔗糖 2%, 葡萄糖 1%, 豆饼粉 1%, 蚕蛹粉 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075%, KH_2PO_4 0.15%, 豆油 0.2%, 自然 pH; 用 15% 的接种量, 通气量 1:0.3—1:0.5 (V/V/分)。在 25—27°C 培养 6—7 天, 当 pH 降至 5.0 左右, 残糖量降至 0.5—0.3%, 菌丝体具有亮光, 发酵液变为棕紫褐色时, 即可终止发酵。

天麻 (*Gastrodia elata* Blumé) 是一种兰科植物, 本身无根无叶。其种子和块茎必须借助于蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Quel.] 的菌丝或根状菌索才能生长发育, 否则种子将不发芽, 块茎将退化, 逐渐变小, 以至腐烂消失。这说明天麻离开蜜环菌不能正常生活。它们的接触过程是蜜环菌菌索幼嫩部份逐渐伸展到天麻块茎上, 破坏块茎表皮组织细胞而侵入表层细胞内, 不断分泌出其所含的内含物, 供给天麻营养物质, 进而促进天麻生长和开花结果。因此天麻种子只有散落于蜜环菌菌丝丰富, 空气湿润的地方, 种子才能吸水膨胀, 接触菌丝而萌发^[1,2]。天麻为常用中药。首载于《神农本草经》内, 列为上品, 其味甘, 性微寒, 能祛风湿, 通血脉, 强筋骨。主治风湿腰膝痛, 四肢痠挛, 眩晕头痛, 小儿惊风等症。药用部份是地下块茎。

当前临床应用的天麻, 主要是野生天麻, 部份来自于人工栽培^[2,3]。

野生资源因受自然条件影响很大, 不易采挖, 满足不了临床上的需要。

人工栽培的研究近年有很大进步, 但仍有生产周期长 (用种子繁殖需 5—7 年;

采用块茎需 2—3 年), 需用木材作原料, 劳动强度较大等问题需要解决。

我们遵照伟大领袖毛主席关于“中国医药学是一个伟大的宝库, 应当努力发掘, 加以提高”的教导, 为了改进天麻现有生产方法, 解决临床供药问题, 更好为广大工农兵服务。在所党委关怀与指导下, 根据天麻与蜜环菌之间的关系, 开展了蜜环菌培养利用方面的研究。药理试验证明在所用剂量下蜜环菌发酵液及菌丝体均与天麻具有同样的生物活性, 临床试验证明蜜环菌发酵液及菌丝体与天麻具有类似的疗效。这说明培养蜜环菌用以代替天麻是可行的。本文报道有关蜜环菌深层培养的研究结果。

材料和方法

(一) 供试菌株:

蜜环菌原始菌种为我所栽培室提供, 经进一步纯化, 分离出 Am 71-3 菌株供试验用。

(二) 培养基:

斜面培养基: 去皮马铃薯 200 克切碎煮沸半

小时过滤(或麦麸 50 克煮汁), 滤液中加入葡萄糖 20 克, 琼脂 20 克; 加水至 1000 毫升, 自然 pH 值, 溶化后分装试管, 灭菌后放成斜面。

种子培养基(%): 葡萄糖 2.0, 磷酸二氢钾 0.15, 硫酸镁 0.075%, 蚕蛹粉 0.5%, 维生素 B₁ 0.001%。其中每 1000 毫升加入去皮马铃薯 200 克(或麦麸 50 克)煮汁, 最后补加自来水定容, 自然 pH 值。

发酵培养基(%): 葡萄糖 1%, 蔗糖 2%, 豆饼粉 1%, 未脱脂蚕蛹粉 1%, 硫酸镁 0.075%, 磷酸二氢钾 0.15%。自来水配制, 自然 pH 值。

培养基均在 121℃ 加压灭菌 30 分钟。

(三) 培养方法:

斜面培养: 将冰箱保存的菌种移植于新鲜的斜面培养基上, 在 25—26℃ 下培养 20 天备用。如不及时应用可将试管斜面装入塑料袋内包扎好放于 4℃ 冰箱内, 若保存时间过长, 则需重新移植。

种子培养:

一级种子: 取斜面培养物接种于种子培养基内(500 毫升三角瓶)置旋转式摇床上振荡培养 5—6 天, 温度为 25—26℃。

二级种子: 把一级种子接种于种子培养基内, 接种量为 10% 培养 4 天(培养基及培养条件同上)。

发酵培养:

摇瓶: 500 毫升三角瓶内盛发酵培养基 100 毫升, 接种量 10%, 置旋转式摇床上, 24—26℃ 培养 7—9 天。

发酵罐: 采用 200 升发酵罐, 内装 100 升, 在 26—27℃ 搅拌通气培养 7—9 天(先经 40 升种子罐培养, 内装 20 升种子培养基, 在 26—28℃ 培养 4 天)。

(四) 发酵结果判定标准:

由于目前蜜环菌的有效成份尚未确定。故仅以其生长情况, 菌体数量, 形态, 颜色变化, 糖的消耗以及发光情况等作为确定发酵结束的标准。一般是菌丝体生长旺盛, 具有亮光, 发酵液变为棕紫褐色。pH 值为 5 左右, 残糖量降至 0.5—0.3% 即可终止发酵。通常培养 6—7 天。

结果及讨论

一、菌体形态及发光习性

(一) 菌丝及菌索的形态观察

菌丝: 液体培养的蜜环菌菌丝为无色透明和具有隔膜丝状体(图版 I-1)。在表面培养情况下, 菌丝初生时为白色, 绒毛状(图版 I-2)随着生长时间的延长, 菌丝逐渐向外生长, 纵横交叉, 以后颜色逐渐加深, 至核化菌核化状态)时变为黑褐色。此时菌体质较脆, 表面有皱纹, 有时在菌体中部亦可再长出绒毛状气生菌丝丛。自生长出菌丝丛至核化前, 在暗处可见到荧光。

菌索: 由无数菌丝网结一起而形成的根状物称为菌索。在纯培养中菌索幼嫩时期为白色, 随着生长发育, 颜色逐渐变为红褐色, 其尖端为白色或白黄色, 直至老化才都变为黑褐色。伸向培养基内部的菌索变色慢或不变色, 而伸向培养基外部的菌索则变色较快。菌索幼嫩时质脆, 老化后则较坚韧不易折断, 新鲜幼嫩的菌索在暗处也可见到荧光。在显微镜下菌索表面亦着生有短的菌丝, 并具有横隔膜, 这时在菌丝周围有的可见到棒状结晶体, 菌索外部有一层质脆的鞘, 鞘内为坚韧的白色或近白色的细长菌丝束。

菌索的形成和培养条件有关, 静止培养时(包括固体及液体培养)菌丝体可形成菌索(图版 I-3—5), 而振荡培养时则不能形成菌索, 只生长菌丝体。如把经一定时期振荡培养的摇瓶, 再静止培养, 由于培养条件的改变, 菌丝体可产生菌索。

菌球: 在摇瓶培养中, 菌丝体的形态多呈刺球状, 刺球状菌丝体大小约为 3—7 毫米。老化后表面光滑, 中空呈褐色。菌球具有荧光。

(二) 发光习性的观察

蜜环菌是一种著名的发光真菌。

试验证明,蜜环菌在不同培养基上发光强弱不同。过滤出的菌丝体块放置数小时后仅表面具有荧光;从内部取出的菌丝体经放置数分钟后才能见到荧光,说明菌丝体必须与空气接触后才能观察到荧光。

发酵罐内培养七天的新鲜培养物,只要保持湿润状态,取出数日内(2—3天)均可见到荧光,干燥后则不见荧光。

蜜环菌菌丝培养物在 10—30℃ 间均可发光,但以 24—28℃ 最适宜。在 24—26℃ 下经 7 天培养的蜜环菌菌丝体(盛于摇瓶内)具有较强的荧光,放入 4℃ 冰箱内 72 小时后取出当时在室温下看不到荧光,如再将其放置于 24—26℃ 下振荡培养 5 小时,又可见到荧光,但荧光较弱,如放于

37℃, 12 小时后则不显荧光。这说明在所试验范围内低温及高温对菌丝体产生荧光性能均有抑制作用,高温的抑制作用更大。

一些化学药品如乙醚、氯仿、苯、甲醛以及其它一些抗氧化剂的蒸气对蜜环菌的发光均有抑制作用,而在培养基中加入适量乙醇却可促进菌体发光。

二、蜜环菌生长过程中所需的营养因素

为了选择出适于蜜环菌生长的培养基以缩短生长时间,曾对其所需的氮源,碳源进行了比较试验。

(一) 氮源对蜜环菌生长的影响

比较了蛋白胨、蚕蛹粉(脱脂及未脱脂)、鲫鱼粉、芝麻饼粉以及豆饼粉等对蜜环菌生长的影响,结果见表 1。

表 1 氮源对蜜环菌生长的影响*

氮源 (含量 1%)	菌丝长势**	亮度***	菌 丝 形 态
蛋 白 胨	+++	+++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体较多。培养液呈褐紫色。
脱脂蚕蛹粉	++++	++++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体多。培养液呈褐紫色。
未脱脂蚕蛹粉	++++	++++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体多。培养液呈褐紫色。
鲫 鱼 粉	+++	+++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体较多。培养液呈褐紫色。
芝 麻 饼 粉	+++	+++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体较多。培养液呈深褐色。
豆 饼 粉	++	++	颗粒状、絮状菌丝体较多,刺球状菌丝体较少。培养液呈褐紫色。

* 基础培养基成份:

葡萄糖 2% 磷酸二氢钾 0.15% 硫酸镁 0.075% pH 自然(约 5.6—5.7)

** “+”表示菌球少,仅占摇瓶底部薄薄一层;“++”表示菌球较多,约占培养基体积的 1/3;“+++”表示菌球多,约占培养基体积 1/2;“++++”表示菌球最多,密布整个培养基。

*** “+”表明已具有亮度;“+”号愈多,表示亮度愈强。一般说来,蜜环菌所产生的荧光亮度强弱和其生长密度成正相关,生长密度愈大则亮度愈强,反之则亮度弱。

表 1 示明,蚕蛹粉(未脱脂及脱脂)效果最好,蛋白胨、芝麻饼粉和鲫鱼粉次之,以豆饼粉为差。为此选用未脱脂蚕蛹粉为氮源并比较了其不同浓度对蜜环菌生长的影响(结果见表 2)。

表 2 示明: 3.0% 未脱脂蚕蛹粉的效果

与 1.0% 未脱脂蚕蛹粉 + 1.0% 豆饼粉的效果较接近,为此我们在实际应用时多采用后者。

在试验中发现,以 0.4% 的天门冬素作氮源的效果也不好。如用 0.5% 的未脱脂蚕蛹粉再分别加入 1.0% 玉米浆或蛋白

表 2 未脱脂蚕蛹粉浓度试验

浓度 (%)	菌丝长势	亮度	菌丝干重 (%)**
0.5	+	+	0.494
1.0	++	++	0.790
2.0	+++	+++	1.146
3.0	++++	++++	1.312
1+1*	++++	++++	1.341

* 为 1.0% 未脱脂蚕蛹粉 + 1.0% 豆饼粉。

** 菌丝干重(%), 指每 100 毫升发酵液所含菌丝的干重。

脉, 均证明具有促进蜜环菌生长的作用。

(二) 碳源对蜜环菌生长的影响

在氮源试验的基础上, 比较了四种不同碳源对蜜环菌生长的影响:

试验证明, 葡萄糖为最适碳源, 蔗糖、淀粉次之, 玉米粉效果最差, 结果见表 3。

进一步试验了不同浓度葡萄糖对蜜环菌生长的影响, 培养七天, 以 3% 葡萄糖最好, 而以 1% 的浓度最差, 菌丝易衰老 (见表 4)。

表 3 不同碳源对蜜环菌生长的影响

碳源 (含量 2%)	菌丝长势	亮度	菌丝形态
葡萄糖	++++	++++	颗粒状、絮状菌丝体较多, 刺球状菌丝体较少。褐紫色。稠。
蔗糖	+++	+++	颗粒状、絮状菌丝体较多, 刺球状菌丝体较少。较用葡萄糖时褐紫色稍浅, 稍稀。
玉米粉	++	++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体较少。暗淡褐色。稀。
淀粉	+++	+++	颗粒状、絮状、刺球状菌丝体较少。褐棕色较稠。

表 4 葡萄糖浓度及葡萄糖与蔗糖的组合对蜜环菌生长的影响

浓度	最终 pH	菌丝干重 (%)	菌丝形态
葡萄糖 1%	5	1.267	菌丝较多, 刺球状菌丝体少。褐色、易衰老。
葡萄糖 2%	5	1.349	菌丝较多, 刺球状菌丝体较多, 褐色。
葡萄糖 3%	5	1.663	菌丝及刺球状菌丝体均多, 褐色。
葡萄糖 4%	4.8	1.542	菌丝及刺球状菌丝体均多, 深褐色。
葡萄糖 1% 蔗糖 1%	5	1.547	菌丝多, 刺球状菌丝体较多, 深褐色。
葡萄糖 1% 蔗糖 2%	5	1.675	菌丝多, 刺球状菌丝体多, 深褐色。
葡萄糖 2% 蔗糖 1%	5	1.466	菌丝多, 刺球状菌丝体较多, 深褐色。

但当葡萄糖和蔗糖组合作为碳源时, 试验证明在本试验条件下以 1% 葡萄糖加 2% 蔗糖最好。

近年来不少资料^[4-6]指出, 在培养基内加入适量浓度的乙醇, 有促进蜜环菌菌索形成的作用。为此, 我们也曾在液体培养基与琼脂平面培养基中分别加入乙醇比

较观察了它对蜜环菌菌丝及菌索生长的影响, 结果见表 5 和表 6。

从表 5 和表 6 可以看出, 无论是液体培养的菌丝干重, 还是平板培养菌落的生长速度, 都一致说明在培养基中加入 1% 的乙醇能促进蜜环菌菌丝及菌索生长。

表5 乙醇对蜜环菌菌丝生长的影响(液体培养基)

乙醇浓度	最终 pH	菌丝干重 (%)	菌丝形态	生长情况
0	5.0	0.714	颗粒状及刺球状菌丝体较多,絮状菌丝体少。	变色早,深褐色、易衰老。
0.5%	5.1	0.990		颜色较对照稍深。
1.0%	5.1	1.027		颜色较对照稍深。
2.0%	5.1	0.943		浅褐色。

表6 乙醇对蜜环菌生长的影响(固体平板培养基)*

编号	10天后菌落直径(毫米)		15天后菌落直径(毫米)		20天后菌落直径(毫米)		25天后菌落直径(毫米)	
	对照	加乙醇	对照	加乙醇	对照	加乙醇	对照	加乙醇
1	18—20	22—30	31—54	43—56	40—70	65—67	42—80	70—76
2	17—23	24—35	30—36.5	55—70	44—52	75—85	49—59	80—95
3	15—20	28—33	22—27	45—64	28—31	75—88	30—40	77—97

* 加入1%无水乙醇于消毒后的培养基中。

三、发酵条件试验

为探索蜜环菌适宜的发酵条件,以发酵培养基进行了接种量,通气量,温度,机械效应以及培养基 pH 值及消沫剂的影响等项试验。

(一) 接种量

比较了5%,10%及15%的接种量对蜜环菌生长的影响,初步试验结果(表7)。以15%的接种量为最好,生长速度快,变色较早,培养7天的发酵液带红深褐色,而以5%接种量生长最差。

表7 接种量对蜜环菌生长的影响

接种量 (%)	菌丝干重 (%)	菌丝形态
5	1.007	颗粒状菌丝体多,刺球状菌丝体少,褐色。
10	1.117	颗粒状菌丝体多,刺球状菌丝体少,褐色。
15	1.270	颗粒状菌丝体多,刺球状菌丝体少,深褐红色。

(二) 通气量

采用500毫升三角瓶分别盛以50毫升,75毫升及100毫升培养基,比较通气情况以及对蜜环菌生长的影响。试验结果表明,在试验条件下,以内盛100毫升培养基效果稍好,但菌体数量及亮度上基本一致。说明蜜环菌的生长对氧气的要求不是很严格的。

(三) 温度

分别在23—24℃、25℃、27℃及29—30℃下进行了比较试验,其中以在27℃蜜环菌生长最快,菌丝粗壮,其次为25℃,在29—30℃下生长缓慢,菌丝亦显示出衰老(7天)。

(四) 机械搅拌的作用

在盛100毫升培养基的500毫升三角

瓶内分别投入长 1.5 厘米, 直径 0.3—0.4 厘米的玻璃棒 1 至 4 根比较它们对蜜环菌生长的影响。结果(表 8)表明, 机械搅拌对蜜环菌生长有较大的不良影响。尤其是机械搅拌强烈时更甚。

(五) pH 值试验

初 pH 值对蜜环菌生长的影响试验结果(表 9)表明, 初 pH 值以 4.8 及 5.1 效果

为最好, 以初 pH 值 5.7 时效果最差, 但发酵最终 pH 值均为 pH5.0。

(六) 消沫剂(豆油)加入量试验

用豆油作消沫剂, 并对其加入量与蜜环菌生长的关系进行了比较试验。结果(表 10)表明, 在一定条件下, 加入豆油比不加入效果好, 以加入 0.2% 的效果为最好。

表 8 机械搅拌的影响

玻璃棒(根)	生长速度	亮度	菌 丝 形 态
(未投)	++++	++++	刺球状菌丝体较多, 颗粒状菌丝体较少, 深褐色, 稠
1	+++	+++	刺球状菌丝体较多, 菌丝体细小而少, 深褐红色, 液浑, 不易过滤。
2	++	++	刺球状菌丝体少, 菌丝体细小而少, 深褐红色, 液浑, 不易过滤。
3	++	++	刺球状菌丝体少, 菌丝体细小而少, 深褐红色, 液浑, 不易过滤。
4	+	+	刺球状菌丝体极少, 菌丝体细小而少, 深褐红色, 液浑, 不易过滤。

表 9 不同初 pH 值对蜜环菌生长的影响

初 pH 值	最终 pH 值	菌丝干重 (%)	菌 丝 形 态
4.5	5.0	0.849	颗粒状菌丝体较多, 刺球状菌丝体少, 深褐色。
4.8	5.0	0.943	颗粒状菌丝体较多, 刺球状菌丝体稍多, 深褐色。
5.1	5.0	0.890	颗粒状菌丝体较多, 刺球状菌丝体较多, 深褐色。
5.4	5.0	0.781	颗粒状菌丝体较多, 刺球状菌丝体较少, 深褐色。
5.7	5.0	0.675	颗粒状菌丝体较多, 刺球状菌丝体较少, 深褐色。

表 10 消沫剂(豆油)加入量试验的效果

加油量 (%)	最终 pH	菌丝干重 (%)	菌 丝 形 态
对照	5	1.382	颗粒状菌丝体多, 刺球状菌丝体少, 深褐色。
0.1	5	1.681	颗粒状菌丝体多, 刺球状菌丝体少, 深褐色较对照稍浅, 生长快。
0.2	5.2	1.946	颗粒状菌丝体多, 刺球状菌丝体少, 褐色, 生长较快。
0.4	5.2	1.665	颗粒状菌丝体多, 刺球状菌丝体少, 浅褐色, 生长慢。

四、200 升发酵罐试验

工艺流程

试管斜面培养 → 500 毫升摇瓶种子培养 → 5000 毫升摇瓶种子培养 → 种子罐 种子培养 → 发酵培养 →
 (一级种子) (二级种子) (三级种子)

过滤 → $\left\{ \begin{array}{l} \text{菌丝体烤干, 压片} \\ \text{(65—75℃)} \\ \text{发酵液, 浓缩制成糖浆} \end{array} \right.$

菌种 Am 71.3

培养基

斜面培养基和种子培养基：成分同摇瓶试验。

发酵培养基(%)：蔗糖 2，葡萄糖 1，豆饼粉 1，蚕蛹粉 1，硫酸镁 0.075，磷酸二氢钾 0.15，pH 值自然，加自来水至 100 升。在 121℃ 加压灭菌 30 分钟。

接种及接种量

每一斜面接一摇瓶一级种子，一级种子接二级种子，接种量为 10%，二级接三级种子接种量为 5—10%。

种子培养条件

一级种子：在旋转式摇床上培养 120—148 小时，温度 24—26℃ (偏心距为 4—6 厘米，转速 240 次/分)。

二级种子：在往返式摇床上 (冲程 7 厘米，转速 90 次/分)，培养 72—96 小时，温度 26—28℃。

种子罐：40 升罐，投料 20 升，搅拌速度为 200 转/分，通气量 1:0.3—1:0.5 (V/V/分)，26—28℃，培养 96—120 小时。

发酵培养条件

200 升罐，投料 100 升。搅拌速度为 190 转/分，温度 26—28℃，通气量 1:0.5—

1:0.8 (V/V/分)。

当培养至 144—168 小时，发酵液为棕紫褐色，发酵罐内布满菌丝，pH 约为 5 左右，残糖量下降至 0.5—0.3% 时这时即可出罐，以离心机或板框过滤，滤液经薄膜蒸发或减压浓缩至原液的 1/10，制成糖浆；滤渣 (菌丝体) 烤干后磨成细粉压片，蜜环片及蜜环糖浆具有相同的药理作用及临床疗效，故二者均可供药用。

五、讨 论

采用发酵法培养蜜环菌以代替天麻，不仅可大大地缩短生长周期，摆脱气候条件等限制，并可在工厂内大量生产，为其广泛地利用提供了条件。

参 考 资 料

- [1] Kusano, S.: *J. Coll. Agr. (Imperial University of Tokyo)*, 4: 1—66, 1911.
- [2] 周铨: 中草药通讯, 第 5 期, 77—80 页, 第 6 期, 51—58 页, 1973。
- [3] 中国医学科学院药物研究所等: 天麻, 人民卫生出版社, 1973。
- [4] Weinhold, A. R.: *Science*, 142: 1065—1066, 1963.
- [5] Weinhold, A. R.: *Phytopathology*, 54: 912, 1964.
- [6] Vance, C. P. and Garraway, M. O.: *Phytopathology*, 63: 743—748, 1973.

SUBMERGED CULTURE OF *ARMILLARIA MELLEA*

YANG YUNPENG, YUE DECHAO AND HUO ZEMIN

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

In order to produce the mycelium of *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Quel. by submerged culture technique, a study has been made on the fermentation conditions of the fungus. The following optimal conditions were verified, the medium composition: 2.0% sucrose, 1.0% glucose, 1.0% soybean cake meal, 1.0% silkworm chrysalis meal, 0.075% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15% KH_2PO_4 , and 0.2% soybean oil, with natural pH, optimal amount of inoculum being 15%, rate of aeration 0.3—0.5 (v/v/min.). The inoculated culture was incubated at 25—27°C for 6—7 days. Fermentation usually stopped

when the pH decreased to about 5.0 and residual sugar decreased to about 0.5—0.3%. The mycelium of this fungus under submerged condition is colorless, filamentous, septate and branched.

Using fermentative culture of *Armillaria mellea* instead of using Tian-ma (*Gastrodia elata* Blumé) not only would greatly shorten the growth cycle, avoid various natural limitations including weather conditions, but also permit its large scale production in the factory, thus providing a new approach for its broad utilization.