

非营养因子对金针菇液体发酵多糖产量的影响

陈德碧, 朱建勇

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402168)

摘要:以金针菇杂交菌种 F19 为试材, 采用单因素试验和正交试验研究了非营养因子对金针菇液体发酵多糖产量的影响。结果表明: 金针菇 F19 液体发酵多糖产量收率最好的非营养因子发酵条件为菌龄 48 h、接种量 10%、起始 pH 7.5、发酵温度 26℃、摇床转速 130 r/min、发酵时间 7.5 d。

关键词:金针菇; 非营养因子; 液体发酵; 多糖

中图分类号: S 646.1⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)06-0202-03

金针菇 *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. 隶属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、口蘑科、金钱菌属^[1]。又名冬菇、朴菇、构菌、青杠菌、毛柄金钱菌。金针菇多糖有很强的免疫调节和抗肿瘤活性^[2,7], 对化疗药环磷酰胺也有增效减毒作用^[8], 还具有抗疲劳、降血浆胆固醇、延长寿命、抗凝血、抗艾滋病病毒(HIV)、消除自由基和抗动脉粥样硬化等药理作用等功效^[9-12]。试验采用了单因素和正交组合试验研究了菌龄、接种量、起始 pH 值、发酵温度、摇床转速、发酵时间 6 个因素对金针菇 F19 液体发酵多糖产量的影响, 旨在探索金针菇多糖最大收率时的非营养因子发酵最优条件, 为金针菇多糖产品的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 杂交金针菇菌种 F19, 由四川成都食用菌研究所提供。

1.1.2 活化培养基 马铃薯 200 g(去皮煮汁), 葡萄糖(AR)20 g, 琼脂 18 g, KH₂PO₄ (AR)1.5 g, MgSO₄ (AR)1.0 g, pH 值自然, 配制成 1 000 mL。

1.1.3 种子培养基 活化培养基去琼脂。

1.1.4 液体发酵培养基 马铃薯 200 g(去皮煮汁)、葡萄糖 10 g、可溶性淀粉 30 g、玉米粉 30 g、KCl 1.0 g, V_{B2} 100 mg、配制成 1 000 mL 溶液。

1.1.5 试验药剂 蒽酮、95%乙醇、丙酮、乙醚为分析纯; 浓硫酸、浓盐酸、氢氧化钠为化学纯。

1.2 试验方法

第一作者简介: 陈德碧(1968-), 女, 重庆人, 硕士, 实验师, 现从事植物生理生化实验与教学工作。

通讯作者: 朱建勇(1966-), 男, 重庆人, 硕士, 高级实验师, 现从事应用微生物实验与教学工作。E-mail: educ_zjy@163.com。

基金项目: 重庆文理学院重点资助项目(Z2008SK18)。

收稿日期: 2009-12-20

金针菇液体发酵培养。在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 发酵培养基, 用 8 层纱布封口, 高温灭菌 30 min, 冷却后在无菌条件下接入液体菌种, 按 1.2.1 试验设计进行发酵培养, 培养结束后, 测定多糖的收率。

1.2.1 单因素试验 菌龄对多糖产量的影响: 分别用 24、48、72、96 及 120 h 不同菌龄的液体菌种, 按 10% 接种发酵瓶, 在 25℃、110 r/min、pH 值自然条件下培养 5 d, 设 3 个重复。接种量对多糖产量的影响: 采用 48 h 菌龄分别按 5%、10%、15%、20%、25% 接种量接种发酵瓶, 在 25℃、110 r/min、pH 值自然条件下培养 5 d, 设 3 个重复。发酵温度对多糖产量的影响: 采用 48 h 菌龄按 10% 接种量接种发酵瓶, 分别在 21、23、25、27、29℃ 温度水平、110 r/min、pH 值自然条件下培养 5 d, 设 3 个重复。起始 pH 值对多糖产量的影响: 采用 48 h 菌龄按 10% 接种量接种发酵瓶, 分别在 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 起始 pH 值水平、110 r/min、25℃ 条件下发酵培养 5 d, 设 3 个重复。摇床转速对多糖产量的影响: 分别用 110、130、150、170、190 r/min 的转速, 48 h 菌龄、10% 接种量接种发酵瓶, pH 值自然、25℃ 条件下发酵培养 5 d, 设 3 个重复。发酵时间对多糖产量的影响: 发酵时间分设 5、6、7、8、9 d, 5 个水平, 48 h 菌龄、10% 接种量接种发酵瓶、pH 值自然、110 r/min、25℃ 条件下发酵培养, 设 3 个重复。

1.2.2 正交试验 根据 1.2.1 中的单因素试验结果确定选入正交试验的因子及水平, 设计正交试验, 以确定最适发酵条件。

1.2.3 多糖提取与测定 参照孙居明等的方法^[13]。

1.3 数据分析

方差分析和显著性分析采用 DPS 7.05 数据处理系统进行。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 菌龄对多糖产量的影响 不同菌龄接种后, 将试验结果进行单因素方差分析和 LSD 法显著性分析结果

见表 1、2。由表 1 可知,不同菌龄接种对多糖产量影响达显著水平。由表 2 可知,当菌龄在 24~72 h 之间时,随着菌龄的增长,多糖的含量呈极显著提高,但随菌龄的继续增大,多糖含量反而呈现下降趋势。菌龄 48、72 h 多糖收率较高,且与其它水平平均达到极显著性差异,故将 48~72 h 菌龄确定为正交试验的水平区间。

表 1 菌龄单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.2064	4	0.0516	241.8280	0.0001
处理内	0.0021	10	0.0002		
总变异	0.2085	14			

表 2 菌龄对多糖产量的影响的显著性分析

菌龄/h	多糖/mg · mL ⁻¹
24	0.6367 c C
48	0.7833 b B
72	0.8467 a A
96	0.5967 d C
120	0.5333

注:不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著,不同大写字母表示 0.01 水平上差异显著。下表同。

2.1.2 接种量对多糖产量的影响 对不同接种量的结果进行方差分析和 LSD 法显著性分析结果见表 3、4。由表 3 可知,不同接种量对多糖产量的影响达显著水平。由表 4 可知,当接种量在 10%~25%之间时,多糖的含量无显著性差异,但分别与接种量 5%相比,均呈极显著性差异,且前者多糖的含量较高。在实际生产中,为了节约成本,10%的接种量即为金针菇 F19 液体发酵多糖产量的最佳接种量。

表 3 接种量单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.1139	4	0.0285	152.5000	0.0001
处理内	0.0019	10	0.0002		
总变异	0.1157	14			

表 4 接种量对多糖产量的影响的显著性分析

接种量/%	多糖 / mg · mL ⁻¹
10	0.9500 a A
25	0.9500 a A
20	0.9300 a A
15	0.9300 a A
5	0.7233 b B

2.1.3 发酵温度对多糖产量的影响 对不同发酵温度的试验结果进行方差分析和 LSD 法显著性分析结果见表 5、6。由表 5 可知,不同温度对多糖产量的影响达显著水平。由表 6 可知,在 0.05 和 0.01 显著水平上,25、27℃之间和 23、29、21℃之间均无显著差异,但它们分别与其它水平均存在极显著性差异,且前者多糖的含量明显高于后者,故将 25~27℃纳入正交试验再进行筛选。

表 5 发酵温度单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.2594	4	0.0648	35.6260	0.0001
处理内	0.0182	10	0.0018		
总变异	0.2776	14			

表 6 发酵温度对多糖产量的影响的显著性分析

温度/℃	多糖 mg · mL ⁻¹
27	1.2233 a A
25	1.1133 a A
23	0.9433 b B
29	0.9300 b B
21	0.8700 b B

2.1.4 起始 pH 值对多糖产量的影响 对不同起始 pH 值发酵培养所得数据进行方差分析和 LSD 法显著性分析结果见表 7、8。由表 7 可知,不同起始 pH 发酵培养所得多糖产量的影响呈显著差异。由表 8 可知,起始 pH 值 7.5 分别与其他水平呈极显著差异,而其他水平之间无显著性差异,且起始 pH 7.5 时所得多糖含量达最高,是液体发酵最佳起始 pH 值。

表 7 起始 pH 值单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.1264	4	0.0316	26.0490	0.0001
处理内	0.0121	10	0.0012		
总变异	0.1386	14			

表 8 起始 pH 值对多糖产量影响的显著性分析

起始 pH 值	多糖 mg · mL ⁻¹
7.5	1.2300 a A
7	1.0433 b B
8	1.0367 b B
6.5	1.0100 b B
6	0.9600 b B

2.1.5 摇床转速对多糖产量的影响 对不同摇床转速发酵培养所得数据进行方差分析和 LSD 法显著性分析结果见表 9、10。由表 9 可知,不同摇床转速发酵培养所得多糖产量的影响呈显著差异。由表 10 可知,摇床转速在 130~170 r/min 间无显著性差异,与 110、190 r/min 比较其多糖产量较高,故拟将 130~170 r/min 水平纳入正交试验。

表 9 转速单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.4506	4	0.1127	17.9580	0.0001
处理内	0.0627	10	0.0063		
总变异	0.5134	14			

表 10 转速对多糖产量的影响的显著性分析

转速/r · min ⁻¹	多糖 mg · mL ⁻¹
130	1.1167 a A
150	1.1000 a AB
170	0.9300 ab ABC
110	0.8300 bc BC
190	0.6533 c C

2.1.6 发酵时间对多糖产量的影响 对不同发酵时间培养所得数据进行方差分析和 LSD 法显著性分析结果见表 11、12。由表 11 可知,不同发酵时间培养所得多糖产量的影响呈显著差异。由表 12 可知,7~8 d 多糖产量达到峰值,第 9 天开始下降。故将 7~8 d 纳入正交试验。

表 11 发酵时间单因素试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	0.2042	4	0.0510	17.4000	0.0002
处理内	0.0293	10	0.0029		
总变异	0.2335	14			

表 12 发酵时间对多糖产量的影响的显著性分析

发酵时间/d	多糖/mg · mL ⁻¹
5	0.9867 b B
6	1.0800 b B
7	1.2800 a A
8	1.2867 a A
9	1.1200 b AB

2.2 金针菇液体发酵非营养因子条件优化

2.2.1 正交试验设计 根据以上单因素试验分析结果,采用 L₉(3⁴)正交设计,选择菌龄(A)、温度(B)、摇床转速(C)、发酵时间(D)4个因素,各因素选取3个水平。然后参照正交表分别选择4因素3水平进行正交试验(见表13),对金针菇液体发酵非营养因子条件进行优化。

表 13 正交试验的因素与水平

水平	菌龄/h	温度/℃	摇床转速/r · min ⁻¹	发酵时间/d
	A	B	C	D
1	48	25	130	7
2	60	26	150	7.5
3	72	27	170	8

表 14 正交试验结果

试验编号	A	B	C	D	多糖/mg · mL ⁻¹
1	1	1	1	1	1.06
2	1	2	2	2	1.67
3	1	3	3	3	1.13
4	2	1	2	3	0.93
5	2	2	3	1	1.25
6	2	3	1	2	1.27
7	3	1	3	2	0.98
8	3	2	1	3	1.2
9	3	3	2	1	0.9
k ₁	1.2867	0.99	1.1767	1.07	
k ₂	1.15	1.3733	1.1667	1.3067	
k ₃	1.0267	1.1	1.12	1.0867	
R	0.26	0.3833	0.0567	0.2367	

注: R 值为极差, k 值为各因素各水平的多糖均值。

2.2.2 正交试验结果与分析 由表 14 可知,影响多糖产量的各个因素主次排序为 B>A>D>C,最佳金针菇

液体发酵非营养条件为: A₁B₃C₁D₂,即菌龄 48 h、温度 26℃、摇床转速 130 r/min、发酵时间 7.5 d。

3 结论

单因子试验和正交试验的结果表明,金针菇 F19 液体发酵多糖产量最大收率的非营养因子发酵条件为菌龄 48 h、接种量 10%,起始 pH 7.5,发酵温度 26℃、摇床转速 130 r/min、发酵时间 7.5 d。

参考文献

[1] 毕志树,郑国扬,李泰辉. 广东大型真菌志[M]. 广东: 广东科技出版社, 1994.

[2] Ikekawa T, Ikeda Y, Yoshioka Y. Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.) Sing. II. The structure of EA3 and further purification of EA5[J]. J Pharm Dyn, 1982(5): 576-581.

[3] 曾庆田. 金针菇多糖的抗肿瘤作用[J]. 中国食用菌, 1991, 10(2): 11-13.

[4] Gong F, Chen Y. Crystallization and some characterization of Flammulin purified from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* [J]. Bioresource Technology, 1998, 64: 153-156.

[5] Leung M, Fung K, Choy Y. The isolation and characterization of an immunomodulatory and antitumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes* [J]. Immunopharmacology, 1997, 35: 255-263.

[6] 严茂祥,陈芝芸,项柏康,等. 金针菇多糖对小鼠移植性肿瘤抗癌效应研究[J]. 中国中医药科技, 1999, 6(6): 379-380.

[7] 朱曙东,严茂祥,陈芝芸,等. 金针菇多糖免疫活性的研究[J]. 浙江中医学报, 2001, 25(4): 43-44.

[8] 袁强,陈芝芸,严茂祥. 金针菇多糖对环磷酰胺增效减毒作用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 933-935.

[9] 文静,陈文,王津,等. 金针菇抗疲劳的实验研究[J]. 营养学报, 1993, 15(1): 79-81.

[10] 吴锦文. 食用菌的医疗保健功能和改善食物结构的作用[J]. 中国食用菌, 2003(4): 9-11.

[11] 郑立明,曹长华,张长琳. 金针菇口服液对果蝇和家蝇寿命的影响[J]. 中国食用菌, 1990, 9(3): 7-8.

[12] 陈福祿,谢宝贵,郑金贵. 药用菌多糖的药用功能与展望[J]. 中国药杂志, 2005, 40(4): 244-248.

[13] 孙居民,张巨明. 金针菇液体深层发酵多糖的提取与测定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 1999, 3(1): 36-40.

Effects of Non-nutritional Factors for Liquid Fermentatoin of *Flammulina velutipes* on the Yield of Polysaccharide

CHEN De-bi, ZHU Jian-yong

(College of Life Sciences and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan, Chongqing 402168)

Abstract: The aim was to study the optimum non-nutritional factors for liquid fermentatoin of *Flammulina velutipes* of F19 to obtain polysaccharide. Using single factor experiments and orthogonal tests the effect of non-nutritional factors on the yield of polysaccharide by liquid fermentatoin of *Flammulina velutipes* was studied. The results showed that the optimum condition of liquid fermentatoin on the biggest yield of polysaccharide was seed age 48 h, inoculation size 10%, initial pH 7.5, culture temperature 26℃, rotational speed 130 r/min and fermentation time 7.5 h.

Key words: *Flammulina velutipes*; non-nutritional factors; liquid fermentatoin; polysaccharide