

黄绿蜜环菌产胞外多糖发酵培养的研究

王虹¹, 游潇倩², 余梅^{2,3}

(1. 青海大学 化工学院, 青海 西宁 810016; 2. 南京农业大学 动物医学院 江苏 南京 210095; 3. 青海普兰特药业有限公司, 青海 西宁 810007)

摘要:通过正交试验法分析了精制培养基与粗犷培养基对黄绿蜜环菌液体发酵产胞外多糖的影响,以期获得比较适宜的培养基组成。结果表明:黄绿蜜环菌胞外多糖较优的精制培养基组成为:每100 mL含马铃薯20 g、葡萄糖4 g、酵母膏0.20 g、 KH_2PO_4 0.15 g、 MgSO_4 0.05 g,每1 mL含VB₁₂ 12 μg , pH 6.0。

关键词:黄绿蜜环菌; 胞外多糖; 培养基组成

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)22-0174-03

黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)属白蘑科蜜环菌属食用菌,俗称黄蘑菇。它味道鲜美,香气浓郁,含有丰富的蛋白质、矿物质、氨基酸和多种维生素及增强机体免疫功能和抑制肿瘤生长等生理活性的化学成分,具有较高的营养价值和食疗保健作用,特别是“硒”的含量很高,是癌症的克星。现主要分布于青海省的海北(祁连、海晏、刚察),黄南(泽库、河南),海南(共和、贵德、兴海),果洛(玛沁、甘德、久治),玉树等地。曾有报道,黄绿蜜环菌中提取的多糖具有抗肿瘤的作用^[1]。近年来,野生黄绿蜜环菌的过度采食,加上退变的生境致使发生量逐年减少^[2]。因此对黄绿蜜环菌胞外多糖的工业化生产研究,无论从食品工业方面还是从医疗保健方面来说都是很有研究价值的。现通过对精制培养基与粗犷培养基组成及二者结果的显著性比较,旨在为黄绿蜜环菌胞外多糖的深入研究和开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 黄绿蜜环菌(青海大学微生物实验室保存)。

1.1.2 试验仪器 GXZ-300型智能光照培养箱; SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台; UV-9200紫外可见分光光度计; LDZX-40II立式自动压力蒸汽灭菌器; 84-II型磁力恒温搅拌器; Adventurer™天平; 数显恒温水浴锅 HH-6; 格兰仕微波炉。

1.1.3 培养基 液体种子培养基:马铃薯20%,蔗糖2%,蛋白胨0.2%, KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05%, pH 6.0^[3]。基础发酵培养基:马铃薯20%,碳源,氮源, KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05%, pH 6.0^[4]。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵方法 种子斜面培养:从原种取一小块菌体到PDA斜面培养基,置于光照培养箱中,温度控制在 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,培养4~5 d,菌体长满斜面的3/4时,即可作种子斜面使用^[3]。液体菌种制备:取一块约0.5~1.0 cm²的菌块接种到250 mL三角瓶中,其装液量为100 mL,置于光照培养箱中,温度控制在 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为2 000 lx,静置培养3 d,得液体菌种^[5]。

1.2.2 黄绿蜜环菌菌丝生物量测定 将培养6 d的发酵液过滤后得菌丝体,用蒸馏水冲洗2~3次,60℃条件下烘干至恒重,电子天平称重^[4]。

1.2.3 黄绿蜜环菌液体发酵胞外多糖含量的测定 用蒽酮-硫酸法^[4]测定黄绿蜜环菌液体发酵胞外多糖含量。葡萄糖标准曲线制作:精确称取干燥恒重的葡萄糖100 mg配制成溶液,分别准确吸取10、20、30、40、60、80、100、120、140、160 μL 置于比色管中,加蒸馏水至1 mL,各管中加入蒽酮3 mL。于620 nm波长处测定其吸光度,以糖的质量浓度为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制葡萄糖标准曲线。黄绿蜜环菌液体发酵胞外多糖含量测定:将发酵液过滤除去菌丝体,取2.5 mL液体,加入3倍体积的乙醇,低温静置12 h,离心,去上清液,将沉淀溶解,定容至50 mL。

1.3 发酵培养基的优化

1.3.1 不同碳源对生物量及EPS含量的影响 培养基组成:碳源2%,蛋白胨0.2%, KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05%, pH 6.0。碳源种类:乳糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、大米、小麦汁、玉米粉、白糖。

1.3.2 不同氮源对生物量及EPS含量的影响 培养基组成:葡萄糖2%,氮源(以0.2 g蛋白胨的氮量0.0291 g为基础,折算后分别加入), KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05%, pH 6.0。

1.3.3 精制培养基正交实验 培养基组成:马铃薯

第一作者简介:王虹(1978-),女,本科,讲师,现主要从事化学化工等方面的教学与科研工作。

收稿日期:2010-09-08

20%,葡萄糖酵母膏,生长因子 VB₁, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄ 0.05%, pH 6.0, 试验因素和水平见表1。

表2 正交实验因素和水平			
水平	因素		
	A	B	C
	葡萄糖/g·(100mL) ⁻¹	酵母膏/g·(100mL) ⁻¹	VB ₁ /μg·mL ⁻¹
1	2%	0.2%	8
2	4%	0.4%	10
3	6%	0.6%	12

1.3.4 粗培养基正交实验 组成:马铃薯20%,白糖,麸皮,生长因子 VB₁, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄ 0.05%, pH 6.0 试验因素和水平见表2。

表1 正交实验因素和水平			
水平	因素		
	A	B	C
	白糖/g·(100mL) ⁻¹	麸皮汁/g·(100mL) ⁻¹	VB ₁ /μg·mL ⁻¹
1	2%	2%	8
2	4%	3%	10
3	6%	4%	12

2 结果与分析

2.1 标准曲线

该试验操作中得到葡萄糖的标准曲线回归方程, $A=0.1899C-0.0158 (R^2=0.996)$, 表明试验范围内线性良好。

2.2 发酵培养基的优化

2.2.1 不同碳源对菌丝生物量及 EPS 含量的影响 黄绿蜜环菌对不同种类碳源(精制、粗)的利用能力不同, 从而导致菌丝体在碳源不同的培养基中生长状况的不同, 因而会影响其生物量和胞外多糖的产量。由图1可知, 菌丝生物量与 EPS 含量有一定的正相关性, 可以确定黄绿蜜环菌液体发酵最佳精制碳源为葡萄糖, 最佳粗碳源为白糖。对于精制碳源的培养基中所含有的未被消耗糖类物质和粗碳源其组成成分的不确定性, 都可能对试验结果产生一定的影响, 但基于其主要成分为糖类物质, 故可用以上几种物质作为粗碳源进行初步测定。

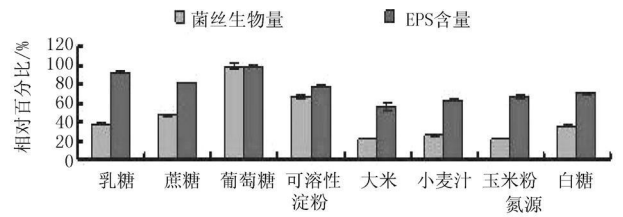


图1 碳源对菌丝生物量以及 EPS 含量的影响

2.2.2 不同氮源对菌丝生物量及 EPS 含量的影响 由图2可知, 菌丝生物量与 EPS 含量有一定的正相关性, 酵母膏作为氮源时最有利于菌体生长以及 EPS 产生, 可以确定黄绿蜜环菌液体发酵最佳精制氮源为酵母膏, 最佳粗氮源为麸皮汁。

2.2.3 精制培养基成分优化正交实验结果 根据以上

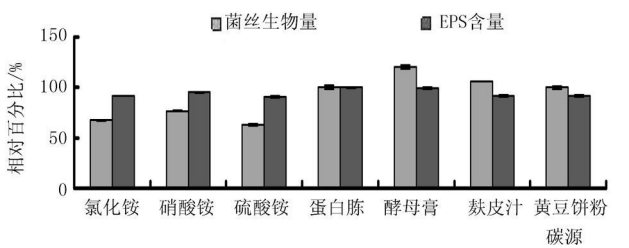


图2 氮源对菌丝生物量以及 EPS 含量的影响

结果, 以黄绿蜜环菌菌丝生物量以及 EPS 含量为指标, 分别进行精制培养基和粗培养基的 L₉ (3⁴) 正交实验, 对培养基组成进行优化。并对2组正交实验的结果进行显著性分析, 选出最优培养基组成。试验培养基: 葡萄糖, 酵母膏, 生长因子 VB₁, 马铃薯20%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄ 0.05%, pH 6.0 试验结果见表3。极差分析表明各因素对黄绿蜜环菌菌丝生物量以及 EPS 含量的影响程度均为 B>A>C。由于各因素对菌丝生物量的影响均不显著, 因此以 EPS 含量为主要指标, 确定最佳的培养基成分为: 马铃薯20 g/100mL, 葡萄糖4 g/100mL, 酵母膏0.20 g/100mL, VB₁ 12 μg/mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100mL, MgSO₄ 0.05 g/100mL, pH 6.0。

表3 精制培养基成分优化正交实验						
试验号	1	2	3	4	生物量	EPS 含量
	A	B	A×B	C	/g·(100mL) ⁻¹	/g·L ⁻¹
1	1	1	1	1	0.58	1.773
2	1	2	2	2	0.548	1.583
3	1	3	3	3	0.525	1.526
4	2	1	2	3	0.855	3.076
5	2	2	3	1	0.677	2.312
6	2	3	1	2	0.526	1.427
7	3	1	3	2	0.818	2.909
8	3	2	1	3	0.330	0.911
9	3	3	2	1	0.676	2.213
均值1	0.551	0.751	0.479	0.644		
均值2	0.686	0.518	0.693	0.631		
均值3	0.608	0.576	0.673	0.57		
极差	0.135	0.233	0.214	0.074		
显著性						
均值1	1.627	2.586	1.370	2.099		
均值2	2.272	1.602	2.291	1.973		
均值3	2.011	1.722	2.249	2.234		
极差	0.645	0.984	0.921	0.261		
显著性	*	*				

注: *表示差异显著, **表示差异极显著, 下同。

2.2.4 粗培养基成分优化正交实验结果 试验培养基: 白糖, 麸皮汁, 生长因子 VB₁, 马铃薯20 g/100mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100mL, MgSO₄ 0.05 g/100mL, pH 6.0 结果见表4。极差分析表明各因素对黄绿蜜环菌菌丝生物量以及 EPS 含量的影响程度均为 A>B>C, 各因素对菌丝生物量以及 EPS 含量影响均极显著。确定最佳的培养基成分为: 马铃薯20 g/100mL, 白糖4 g/100mL,

麸皮汁 3 g/100mL, VB₁ 8 μg/mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100mL, MgSO₄ 0.05 g/100mL, pH 6.0.

表 4 粗培养基成分优化正交实验

试验号	1	2	3	4	生物量 / g · (100mL) ⁻¹	EPS 含量/ g · L ⁻¹
	A	B	A×B	C		
1	1	1	1	1	0.27	0.159
2	1	2	2	2	0.285	0.227
3	1	3	3	3	0.651	0.747
4	2	1	2	3	0.716	1.169
5	2	2	3	1	0.822	2.084
6	2	3	1	2	0.809	1.967
7	3	1	3	2	0.805	1.898
8	3	2	1	3	0.794	1.727
9	3	3	2	1	0.784	1.678
均值 1	0.402	0.597	0.624	0.625		
均值 2	0.782	0.634	0.595	0.633		
均值 3	0.794	0.748	0.759	0.720		
极差	0.392	0.151	0.164	0.095		
显著性	* *					
均值 1	0.378	1.075	1.284	1.307		
均值 2	1.740	1.346	1.025	1.364		
均值 3	1.768	1.464	1.576	1.214		
极差	1.390	0.389	0.551	0.150		
显著性	* *					

3 结论

该试验表明,精制培养基和粗培养基对菌丝生物量的影响差异不显著,而对 EPS 含量的影响差异显著,因此以 EPS 含量为主要指标,得出在精制培养基中胞外多糖产量高于粗培养基中。这是因为粗培养基的成分不

确定,其中的碳源和氮源多数是迟效碳源和氮源,不易于被利用,影响多糖的产量。通过碳源、氮源等单因子筛选和正交实验,确定黄绿蜜环菌液体培养最佳精制碳源、氮源分别是葡萄糖和酵母膏,最佳粗碳源、氮源分别是白糖和麸皮汁。精制培养基最佳组成是马铃薯 20 g/100mL,葡萄糖4 g/100mL,酵母膏 0.20 g/100mL, VB₁ 12 μg/mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100mL, MgSO₄ 0.05 g/100mL, pH 6.0。粗培养基最佳组成是马铃薯 20 g/100mL,白糖 4 g/100mL,麸皮汁 3 g/100mL, VB₁ 8 μg/mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100mL, MgSO₄ 0.05 g/100mL, pH 6.0。通过显著性分析表明,液体发酵 EPS 含量在精制培养基中较高。黄绿蜜环菌产胞外多糖工艺条件的优化,为黄绿蜜环菌胞外多糖的深入研究和开发利用提供参考,对推动青藏高原食用菌产业向深加工方向发展,具有深远的科学意义和广泛应用前景。

参考文献

[1] 黄年来.黄绿蜜环菌的分类地位和特征特性[J].食用菌,1995 (6): 11.
[2] 李渝珍.青海野生黄绿蜜环菌人工驯化技术途径的探讨[J].青海师 范大学学报(自然科学版),2005(1): 74-76
[3] 许峰,张瞳,许梅,等.黄绿蜜环菌产胞外多糖液体优化培养条件初 探[J].微生物学杂志,2006,26(2): 45-49.
[4] 李正鹏,吴萍,陆晓民.黄绿蜜环菌液体菌种培养条件的研究[J].中 国林副特产,2006,83(4): 12-13.
[5] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社, 1987: 33-40.

Study on Fermentation Production of Exo-polysaccharides by *Armillaria luteo-virens*

WANG Hong¹, YOU Xiao-qian², YU Mei³

(1.College of Chemical Engineering, Qinghai University, Xining, Qing hai 810016; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095; 3. Qinghai Plateau Pharmaceutial Limited Company, Xining, Qinghai 810007)

Abstract: Using orthogonal experiment to analysis the effects between depurate medium and crude medium on fermentation production of exo-polysaccharide from *Armillaria luteo-virens*, while the optimum medium and reaction conditions we obtained. Otherwise, the different submerged- culture conditions were studied. The results showed that the depurate medium composition was as follows, potato 20 g/100mL, glucose 4 g/100 mL, yeast ex-tract 0.20 g/100 mL, VB₁ 12 μg/mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100 mL, MgSO₄ 0.05 g/100 mL, pH 6.0.

Key words: *Armillaria luteo-virens*; exo-poly saccharide; medium composition.