

血红铆钉菇液体发酵培养基的优化研究

高 焯 娟, 季 曼, 杨 翔 华, 王 战 勇

(辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001)

摘 要:采用液体发酵培养血红铆钉菇菌丝体,研究了培养基碳源、氮源、无机离子等因素对菌丝体产量的影响。结果表明:适于血红铆钉菇菌丝体液体发酵的培养基配方为:蔗糖 30 g/L, 蛋白胨 3 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, ZnSO_4 0.03 g/L, MnSO_4 0.03 g/L; 用此培养基培养所得菌丝体产量可达 8.655 ± 0.258 g/L, 是基础培养基的 1.5 倍。

关键词:血红铆钉菇; 菌丝体; 正交实验

中图分类号:S 646.03.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2011)03-0191-03

血红铆钉菇 (*Gomphidius rutilus*) 又称红蘑、松树伞、松树钉。生长于松树林地中,与松树形成外生菌根,属于菌根性食用菌^[1]。血红铆钉菇是东北地区著名的野生食用菌,其市场来源主要靠人工采挖野生子实体,其鲜品和干品价格不菲,市场前景十分看好。但是至今尚不能进行人工培养,这大大制约了对血红铆钉菇的应用与深度开发。目前,人们对血红铆钉菇生物学和生态学特性、驯化栽培进行了初步研究,并对其对土传病原菌抑菌性和对重金属的耐性进行了一定的研究。但对其菌丝体的液体培养和代谢产物方面的研究甚少^[1-2]。

20 世纪 50 年代以来,人们发现真菌多糖具有抗肿瘤活性,20 世纪 90 年代,随着细胞生物学、免疫学、分子生物学等发展,多糖及其复合物具有多种生物学功能,如抗肿瘤、抗氧化、抗辐射、抗血凝、抗衰老、免疫调节等^[3-7],引起了国内外的兴趣。真菌多糖的来源虽然很广泛,但是多糖的大批量生产主要还是通过微生物发酵进行。研究表明,有很多真菌经液体发酵的菌丝体多糖含量远高于子实体。从发酵液中提取的蜜环菌粗多糖约为子实体的 10 倍。另有报道,液体培养灵芝菌丝体中的粗多糖及水溶性多糖含量均高于子实体部分^[8]。

现通过液体发酵的方式获取血红铆钉菇菌丝体,优化适于菌丝体生产的培养基配方和培养条件。为其进一步扩大生产规模,进而开发利用血红铆钉菇菌丝体制备其多糖制品奠定一定的研究基础。

第一作者简介:高焯娟(1986-),女,陕西咸阳人,在读硕士,研究方向为生物化工技术。

通讯作者:王战勇(1978-),男,辽宁抚顺人,博士,副教授,研究方向为生物活性物质开发。

收稿日期:2010-12-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌种:血红铆钉菇 (*Gomphidius rutilus*),由抚顺市农业科学院提供。马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[2]。基本培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 0.5 g, MgSO_4 0.5 g,水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 仪器设备

LDZX-40KB 立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);TDL-40C 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);ALC-1100.2 电子天平(德国赛多利斯股份公司);VIS-7220 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);DHG-9146A 型 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);HZQ-Q 全温振荡器(中国哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);SW-CJ-1C 型医用净化工作台(上海阳光实验仪器有限公司)。

1.3 试验方法

将培养于 PDA 斜面培养基上的菌丝体接种于基本培养基 28℃, 180 r/min 培养 7 d, 用作种子培养液, 将种子培养液以 2.5%(v/v)的接种量接种培养, 于 28℃, 180 r/min 培养 7 d, 培养结束后, 4 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 80℃烘干至恒重。称重计算菌丝体产量。

2 结果与分析

2.1 碳源对血红铆钉菇生产菌丝体产量的影响

以乳糖、蔗糖、麦芽糖以及可溶性淀粉等替代基础培养基的碳源葡萄糖配制液体培养基,并以基础培养基作为对照。考察培养基碳源对菌丝体产量的影响。结果如图 1 所示。

由图 1 可知,碳源的不同对血红铆钉菇菌丝体的产量有较大影响,其中以蔗糖作为培养基碳源时,菌丝体

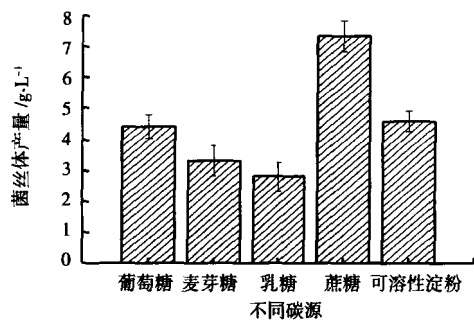


图1 不同碳源对血红铆钉菇菌丝体产量的影响

产量最高,达到(7.31±0.45) g/L。而以乳糖做为碳源时,菌丝体产量最低,仅为(2.80±0.48) g/L。以麦芽糖、葡萄糖和可溶性淀粉作为碳源时的菌丝体产量介于上述二者之间。因此,选定蔗糖为培养基的最适碳源。后续试验选择蔗糖代替基本培养基中的碳源。

2.2 氮源对血红铆钉菇菌丝体生长的影响

以硫酸铵、氯化铵、豆饼粉、牛肉膏、酵母粉替代基础培养基的氮源蛋白胨配制液体培养基,并以基础培养基为对照,考察培养基氮源对菌丝体产量的影响。结果如图2所示。

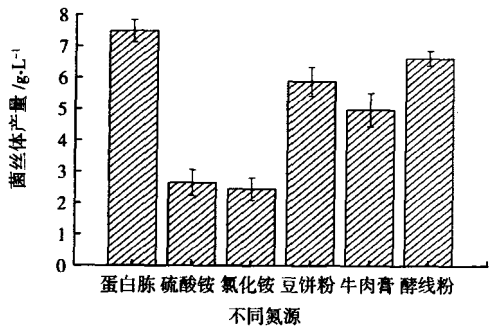


图2 不同氮源对血红铆钉菇菌丝体产量的影响

由图2可知,蛋白胨、豆饼粉、牛肉膏和酵母粉等有机氮源为氮源时菌丝体的产量要明显高于硫酸铵和氯化铵等无机氮源,这是由于有机氮源中除含氮元素外,还含有各种氨基酸和维生素等生长因子,而这些生长因子的存在更有利于菌丝体的生长。以蛋白胨做为氮源时,菌丝体产量最高,达到(7.85±0.36) g/L,说明血红铆钉菇菌丝体对于蛋白胨的利用迅速且完全,因此,优选蛋白胨作为培养基氮源。

2.3 无机离子正交优选

设计七因素二水平的正交实验对无机离子进行优选,以确定适于菌丝体生产的无机离子。无机盐正交实验设计如表1所示,无机盐正交实验直观分析如表2所示。

表1 无机盐正交实验设计

水平	因 素/g·L ⁻¹						
	A	B	C	D	E	F	G
	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	ZnSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0.5	0.5	0.01	0.01	0.01	0.01

表2 无机盐正交实验直观分析

实 验 号	因 素/g·L ⁻¹							菌丝体 产量 /g·L ⁻¹
	A	B	C	D	E	F	G	
	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	ZnSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	
1	0	0	0	0	0	0	0	2.35
2	0	0	0	0.01	0.01	0.01	0.01	2.66
3	0	0.5	0.5	0	0	0.01	0.01	4.39
4	0	0.5	0.5	0.01	0.01	0	0	5.74
5	1	0	0.5	0	0.01	0	0.01	6.78
6	1	0	0.5	0.01	0	0.01	0	3.60
7	1	0.5	0	0	0.01	0.01	0	2.90
8	1	0.5	0	0.01	0	0	0.01	3.79
K ₁	3.785	3.848	2.924	4.103	3.531	4.663	3.647	
K ₂	4.265	4.202	5.125	3.947	4.518	3.387	4.403	
R	0.480	0.354	2.201	-0.156	0.987	-1.276	0.756	

由表2可知,K₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄、ZnSO₄和MnSO₄等无机盐均对菌丝体的生产有利。其R值的大小为:MgSO₄>ZnSO₄>MnSO₄>K₂HPO₄>KH₂PO₄。而CaCl₂和FeSO₄的R值均为负值,说明添加这2种离子对菌丝体的生长无促进作用,反有抑制效果,在培养中不必添加。综合考虑,选定K₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄、ZnSO₄和MnSO₄进行后续的培养基优化试验。

2.4 培养基正交优选试验

设计七因素三水平正交实验优化液体发酵培养基中碳源、氮源和无机盐以确定发酵培养基的最佳营养条件配比,培养基正交实验设计见表3,培养基正交实验直观分析见表4所示。

表3 培养基正交实验设计

水平	因 素/g·L ⁻¹						
	A	B	C	D	E	F	G
	蔗糖	蛋白胨	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	ZnSO ₄	MnSO ₄
1	10	1	0.5	0.2	0.2	0.01	0.01
2	20	2	1	0.5	0.5	0.02	0.02
3	30	3	1.5	0.8	0.8	0.03	0.03

由表4可确定适于血红铆钉菇液体发酵的优化培养基为A₃B₃C₃D₁E₂F₃G₃,即:蔗糖浓度为30 g/L,蛋白胨浓度为3 g/L,K₂HPO₄浓度为1.5 g/L,KH₂PO₄浓度为0.2 g/L,MgSO₄浓度为0.5 g/L,最佳的ZnSO₄浓度为0.03 g/L,最佳的MnSO₄浓度为0.03 g/L。

2.5 优化培养基和基本培养基的比较

分别以优化培养基和基本培养基培养血红铆钉菇,获取菌丝体干重并进行比较,结果如图3所示。

表4 培养基正交实验直观分析

实 验 号	因 素 /g · L ⁻¹							菌丝体 产量 /g · L ⁻¹
	A 蔗糖	B 蛋白胨	C K ₂ HPO ₄	D KH ₂ PO ₄	E MgSO ₄	F ZnSO ₄	G MnSO ₄	
1	10	1	0.5	0.2	0.2	0.01	0.01	2.96
2	10	2	1	0.5	0.5	0.02	0.02	4.03
3	10	3	1.5	0.8	0.8	0.03	0.03	7.68
4	20	1	0.5	0.5	0.5	0.03	0.03	3.98
5	20	2	1	0.8	0.8	0.01	0.01	4.31
6	20	3	1.5	0.2	0.2	0.02	0.02	6.28
7	30	1	1	0.2	0.8	0.02	0.03	4.49
8	30	2	1.5	0.5	0.2	0.03	0.01	6.49
9	30	3	0.5	0.8	0.5	0.01	0.02	8.95
10	10	1	1.5	0.8	0.5	0.02	0.01	2.25
11	10	2	0.5	0.2	0.8	0.03	0.02	4.36
12	10	3	1	0.5	0.2	0.01	0.03	4.56
13	20	1	1	0.8	0.2	0.03	0.02	3.98
14	20	2	1.5	0.2	0.5	0.01	0.03	6.81
15	20	3	0.5	0.5	0.8	0.02	0.01	4.94
16	30	1	1.5	0.5	0.8	0.01	0.02	4.41
17	30	2	0.5	0.8	0.2	0.02	0.03	6.24
18	30	3	1	0.2	0.5	0.03	0.01	9.39
K ₁ [*]	4.305	3.677	5.237	5.715	5.086	5.333	5.057	
K ₂ [*]	5.051	5.373	5.128	4.734	5.901	4.706	5.335	
K ₃ [*]	6.662	6.967	5.652	5.568	5.031	5.978	5.626	
R值	2.357	3.290	0.524	0.981	0.870	1.272	0.569	

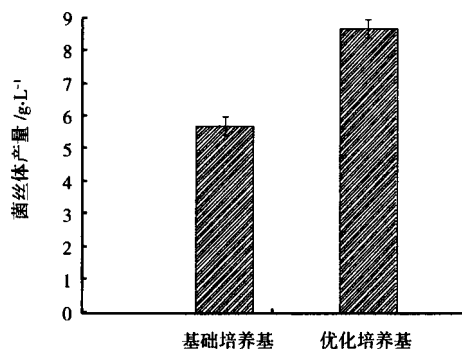


图3 不同培养基菌丝体产量比较

由图3可知,优化培养基的菌丝体的产量可达到(8.66±0.26) g/L,而基本培养基的菌丝体产量仅为

(5.67±0.27) g/L,菌丝体培养基为基本培养基的1.5倍。

3 结论

食用菌液体培养技术比传统的食用菌栽培生产技术有明显的优越性,可在短时间内获得大量的菌丝体和代谢产物。深层发酵培养的真菌菌丝体与子实体在化学组成、生理功能上均很相似。该研究中铆钉菇的菌丝体在液体培养条件下可很好地生长,通过单因素考察结合正交实验确定了适于血红铆钉菇菌丝体液体发酵的培养基:蔗糖 30 g/L,蛋白胨 3 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, ZnSO₄ 0.03 g/L, MnSO₄ 0.03 g/L。使用优化培养基培养血红铆钉菇菌丝体时,菌丝体产量可达(8.655±0.258) g/L,是基本培养基的1.5倍。

参考文献

- [1] 栾庆书. 血红铆钉菇研究现状及开发利用[J]. 食用菌, 2002(2): 2-3.
- [2] 江洁, 宋红梅. 铆钉菇菌丝体液体培养产胞外多糖的研究[J]. 食用菌, 2009(3): 14-16.
- [3] Borchert A T, Stern J S, Hackman R M, et al. Mushrooms, tumors and immunity[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1999, 221: 281-293.
- [4] Li X L, Zhou A G, Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* incitro[J]. Carbohydr Polym, 2006, 66: 34-42.
- [5] Li X, Jiao L L, Zhang Xu, et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium[J]. Int Immunopharmacol, 2008(8): 909-915.
- [6] Sun Y G, Wang S S, Li T B, et al. Purification, structure and immunobiological activity of a new water-soluble polysaccharide from the mycelium of *Polyporus albicans* (Imaz.) Teng [J]. Bioresour Technol, 2008, 99: 900-904.
- [7] Jiao L X, Zhang L L, Tian X, et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium [J]. Int Immunopharmacol, 2008(8): 909-915.
- [8] 邢增涛, 江汉湖, 周昌艳. 不同灵芝中粗多糖含量的比较研究[J]. 食用菌, 2001(6): 4-5.

Optimization of Liquid Culture Medium of *Gomphidius rutilus*

GAO Chan-juan, JI Man, YANG Xiang-hua, WANG Zhan-yong

(School of Environmental and Biological Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun, Liaoning 113001)

Abstract: *Gomphidius rutilus* was cultured by liquid fermentation. Some influence factor, such as carbon source, nitrogen source and inorganic ion etc were studied. According with orthogonal test the optimal culture medium was chosen as follows: sucrose was 30 g/L, peptone was 3 g/L, MgSO₄ was 0.5 g/L, K₂HPO₄ was 1.5 g/L, KH₂PO₄ was 0.2 g/L, ZnSO₄ was 0.03 g/L, and MnSO₄ was 0.03 g/L. In these conditions, the biomass of *Gomphidius rutilus* mycelium can reach (8.655±0.258) g/L, it was 1.5 times as the mycelium biomass of the basal medium.

Key words: *Gomphidius rutilus*; mycelium; orthogonal test