

# 蜜环菌胞外多糖液体发酵培养基的优化

温 钢, 刘 海 燕, 杨 梅

(吉林化工学院 环境与生物工程学院, 吉林 吉林 132022)

**摘 要:**以蜜环菌为试材,研究了碳源、氮源、无机离子等因素对胞外多糖产量的影响,并利用正交实验对蜜环菌胞外多糖液体发酵培养基进行了优化研究。结果表明:适宜胞外多糖生产的培养基组分为:蔗糖 25.00 g/L,豆饼粉 2.50 g/L, $K_2HPO_4$  1.50 g/L, $KH_2PO_4$  0.25 g/L, $MgSO_4$  0.50 g/L, $ZnSO_4$  0.03 g/L, $FeSO_4$  0.02 g/L。利用此培养基发酵生产胞外多糖产量可达  $478.5 \pm 22.4$  mg/L,是基本培养基的 6 倍。

**关键词:**蜜环菌;胞外多糖;培养基;正交实验

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0152-03

蜜环菌(*Armillaria mellea*)属担子菌亚门伞菌目白蘑科蜜环菌属的一种著名的药食兼用真菌<sup>[1]</sup>,又名蜜环草、榛蘑。子实体为 1 a 生,其肉质和菌盖上有细鳞片和菌环,菌髓两侧型,菌褶直生或延生,菌丝白色有横隔,能形成菌索,孢子印白色、无色光滑,呈椭圆形。在我国主要分布于黑龙江、吉林、河南、山西、青海、云南、内蒙古、西藏及台湾等省(区)<sup>[2]</sup>。蜜环菌是中药猪苓(*Polyporus umbellatus*)和天麻(*Rhizoma gastrodiae*)生长发育的必需伴生菌,在药理上蜜环菌有与天麻相似的功能<sup>[3]</sup>。用人工液体发酵生产的蜜环菌菌丝体和发酵液制成的蜜环菌制剂主要用于治疗神经衰弱、失眠、耳鸣、眩晕、四肢麻木及癫痫等疾病。胞外多糖是蜜环菌发酵液主要的药效成分之一<sup>[4-5]</sup>,为了进一步挖掘真菌多糖资源,研究蜜环菌发酵收获胞外多糖的发酵培养基和培养条件将对蜜环菌胞外多糖的工业化发展有着重要的现实意义。为此,该试验考察发酵蜜环菌收获胞外多糖的培养条件进行了相关研究,以期充分利用蜜环菌这一生物资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蜜环菌(*Armillaria mellea*)由抚顺市农业科学院提供。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA)<sup>[6]</sup>: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。

LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌器(上海华线医用核子

仪器有限公司);TDL-5 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FA1104 电子精密天平(上海天平仪器厂);722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);202-3A 电热恒温干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司);SHA-C 恒温振荡器(常州国华电器有限公司);SW-CJ-2F 生物超净工作台(苏州净化设备有限公司);DZ-2BC 真空干燥培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 胞外多糖含量测定 无菌条件下将培养于 PDA 平板培养基上的蜜环菌菌丝体切成  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$  的小块,每 10 块接种于装有 200 mL 基本培养基的 500 mL 三角瓶中,28℃ 160 r/min 培养 6 d,结束后,4 000 r/min 离心 15 min。取发酵上清液 5 mL 加入 15 mL 预冷无水乙醇,沉淀过夜以沉淀胞外多糖,沉淀经无水乙醇洗涤 3 次后经真空干燥,复溶后采用苯酚硫酸法测定胞外多糖含量<sup>[7]</sup>。

1.2.2 碳源对蜜环菌胞外多糖产量的影响 分别以蔗糖、玉米粉、乳糖、麦芽糖以及可溶性淀粉等不同碳源替代基础培养基中的葡萄糖培养蜜环菌,测定胞外多糖产量。

1.2.3 氮源对蜜环菌胞外多糖产量的影响 分别以硫酸铵、氯化铵、麸皮、豆饼粉、牛肉膏、酵母粉等不同氮源替代基础培养基中的蛋白胨培养蜜环菌,测定胞外多糖产量。

1.2.4 无机盐离子对蜜环菌胞外多糖产量的影响 在确定培养基碳源和氮源基础上,进一步设计 7 因素 2 水平的正交实验确定合适的无机盐种类。正交实验设计方案如表 1 所示。

1.2.5 培养基组分正交实验 设计 7 因素 3 水平正交试验优化液体发酵培养基中碳源、氮源和无机盐对蜜环

**第一作者简介:**温钢(1976-),男,吉林四平人,硕士,讲师,研究方向生物活性物质开发。

**收稿日期:**2013-05-24

表 1 无机盐正交实验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of inorganic salt orthogonal experiment

因素	水平	
	1	2
A $K_2HPO_4$	0	1.00
B $KH_2PO_4$	0	0.50
C $MgSO_4$	0	0.50
D $ZnSO_4$	0	0.01
E $MnSO_4$	0	0.01
F $FeSO_4$	0	0.01
G $CaCl_2$	0	0.01

菌胞外多糖的最适浓度。正交实验因素及水平设计表见表 2。

表 2 培养基组分正交实验的因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment for culture medium component

因素	水平		
	1	2	3
蔗糖/ $g \cdot L^{-1}$	15.00	20.00	25.00
豆粕粉/ $g \cdot L^{-1}$	1.50	2.00	2.50
$K_2HPO_4/g \cdot L^{-1}$	0.50	1.00	1.50
$KH_2PO_4/g \cdot L^{-1}$	0.25	0.50	0.75
$MgSO_4/g \cdot L^{-1}$	0.25	0.50	0.75
$ZnSO_4/g \cdot L^{-1}$	0.01	0.02	0.03
$FeSO_4/g \cdot L^{-1}$	0.01	0.02	0.03

2 结果与分析

2.1 碳源对蜜环菌胞外多糖产量的影响

从图 1 可以看出,当以蔗糖为碳源时胞外多糖产量最高,可达  $157.6 \pm 3.4 \text{ mg/L}$ ,以葡萄糖、麦芽糖、玉米粉为碳源时胞外多糖的产量也较高,而以乳糖、可溶性淀粉为碳源时胞外多糖的产量相对较低。综上,以选择蔗糖作为蜜环菌液体发酵培养基的碳源。

2.2 氮源对蜜环菌胞外多糖产量的影响

由图 2 可知,以豆粕粉作为培养基氮源时蜜环菌产生胞外多糖产量最高,达到  $434.4 \pm 17.5 \text{ mg/L}$ ,而硫酸铵和氯化铵这 2 种无机氮源作为培养基氮源时,蜜环菌菌丝体产生的胞外多糖的产量相对较低。因此,选择豆

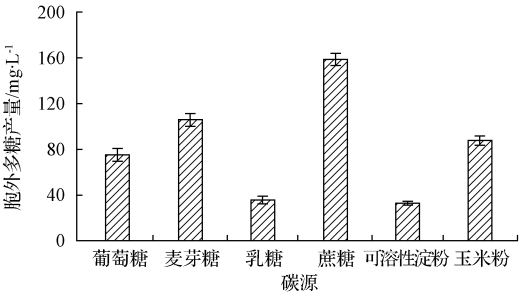


图 1 不同碳源对蜜环菌胞外多糖产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on exopolysaccharide production

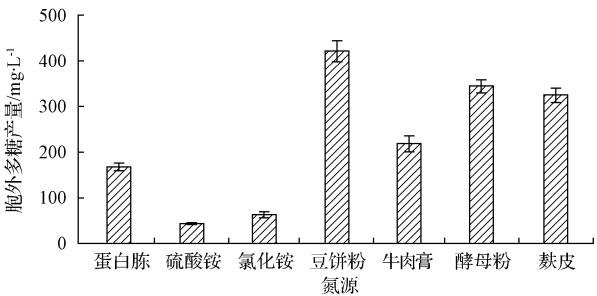


图 2 不同氮源对蜜环菌胞外多糖产量的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on exopolysaccharide production

饼粉作为蜜环菌液体发酵培养基的最适氮源。

2.3 无机盐离子对蜜环菌胞外多糖产量的影响

由表 3 的  $R$  值可知, $K_2HPO_4$  和  $ZnSO_4$  的添加对胞外多糖产量的影响十分明显, $KH_2PO_4$ 、 $MgSO_4$  和  $FeSO_4$  这 3 种无机盐对胞外多糖的产量也是有利的。影响的显著性依次为  $ZnSO_4 > K_2HPO_4 > KH_2PO_4 > MgSO_4 > FeSO_4$ 。而另外 2 种无机盐  $CaCl_2$  和  $MnSO_4$  的极差值为负值,判定这 2 种无机盐对胞外多糖的产量不利。因此选定  $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $FeSO_4$  和  $ZnSO_4$  进行后续培养基优化试验。

表 3 无机盐正交实验直观分析

Table 3 Direct results analysis of orthogonal experimental for inorganic salt

试验号	因素							胞外多糖产量 / $mg \cdot L^{-1}$
	A	B	C	D	E	F	G	
	$K_2HPO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	$KH_2PO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	$MgSO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	$CaCl_2$ / $g \cdot L^{-1}$	$ZnSO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	$FeSO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	$MnSO_4$ / $g \cdot L^{-1}$	
1	0	0	0	0	0	0	0	164.7
2	0	0	0	0.01	0.01	0.01	0.01	247.5
3	0	0.50	0.50	0	0	0.01	0.01	232.6
4	0	0.50	0.50	0.01	0.01	0	0	298.3
5	1	0	0.50	0	0.01	0	0.01	378.4
6	1	0	0.50	0.01	0	0.01	0	254.2
7	1	0.50	0	0	0.01	0.01	0	415.8
8	1	0.50	0	0.01	0	0	0.01	217.7
$K_1$	235.78	261.20	261.43	297.88	217.30	264.78	283.25	
$K_2$	316.53	291.10	290.88	254.43	335.00	287.53	269.05	
$R$	80.75	29.90	29.45	-43.45	117.70	22.75	14.20	

## 2.4 液体发酵培养基组成的正交实验

由表4可以确定,适宜蜜环菌生产胞外多糖的培养基为  $A_3B_3C_3D_1E_2F_3G_2$ :蔗糖 25.00 g/L,豆饼粉2.50 g/L,

$K_2HPO_4$  1.50 g/L, $KH_2PO_4$  0.25 g/L, $MgSO_4$  0.50 g/L,  
 $ZnSO_4$  0.03 g/L, $FeSO_4$  0.02 g/L。

表 4

培养基组分正交实验直观分析

Table 4

Direct results analysis of orthogonal experimental for culture medium component

实验号	因素							胞外多糖产量 /mg · L <sup>-1</sup>
	A 蔗糖 /g · L <sup>-1</sup>	B 豆饼粉 /g · L <sup>-1</sup>	C $K_2HPO_4$ /g · L <sup>-1</sup>	D $KH_2PO_4$ /g · L <sup>-1</sup>	E $MgSO_4$ /g · L <sup>-1</sup>	F $ZnSO_4$ /g · L <sup>-1</sup>	G $FeSO_4$ /g · L <sup>-1</sup>	
1	15.00	1.50	0.50	0.25	0.25	0.01	0.01	144.2
2	15.00	2.00	1.00	0.50	0.50	0.02	0.02	157.9
3	15.00	2.50	1.50	0.75	0.75	0.03	0.03	214.5
4	20.00	1.50	0.50	0.50	0.50	0.03	0.03	110.4
5	20.00	2.00	1.00	0.75	0.75	0.01	0.01	187.9
6	20.00	2.50	1.50	0.25	0.25	0.02	0.02	447.5
7	25.00	1.50	1.00	0.25	0.75	0.02	0.03	125.8
8	25.00	2.00	1.50	0.50	0.25	0.03	0.01	278.6
9	25.00	2.50	0.50	0.75	0.50	0.01	0.02	398.5
10	15.00	1.50	1.50	0.75	0.50	0.02	0.01	154.6
11	15.00	2.00	0.50	0.25	0.75	0.03	0.02	278.6
12	15.00	2.50	1.00	0.50	0.25	0.01	0.03	147.3
13	20.00	1.50	1.00	0.75	0.25	0.03	0.02	109.6
14	20.00	2.00	1.50	0.25	0.50	0.01	0.03	268.5
15	20.00	2.50	0.50	0.50	0.75	0.02	0.01	175.6
16	25.00	1.50	1.50	0.50	0.75	0.01	0.02	97.6
17	25.00	2.00	0.50	0.75	0.25	0.02	0.03	114.5
18	25.00	2.50	1.00	0.25	0.50	0.03	0.01	296.3
$K_1$	182.85	123.70	203.63	260.15	206.95	207.33	206.20	
$K_2$	216.58	214.33	170.80	161.23	231.03	195.98	248.28	
$K_3$	218.55	279.95	243.55	196.60	180.00	214.67	163.50	
R	35.70	156.25	72.75	98.92	51.03	18.68	84.78	

## 3 结论

该试验结果表明,适合蜜环菌生产胞外多糖的最优培养基为:蔗糖 25.00 g/L,豆饼粉 2.50 g/L, $K_2HPO_4$  1.50 g/L, $KH_2PO_4$  0.25 g/L, $MgSO_4$  0.50 g/L, $ZnSO_4$  0.03 g/L, $FeSO_4$  0.02 g/L。以此基础培养基和优化培养基培养蜜环菌,基础培养基胞外多糖产量为  $78.7 \pm 4.8$  mg/L,优化培养基胞外多糖产量达到  $478.5 \pm 22.4$  mg/L,是基本培养基的6倍,达到很好的实际效果。

## 参考文献

[1] 李福后,王伟霞,许冰.蜜环菌的研究进展[J].安徽农业科学,2007,

35(25):7741-774.

[2] 陈顺方,祁岑,黄先敏.蜜环菌的生产技术[J].现代农业科技,2009,14(5):125-127.

[3] 袁媛,刘景圣,蔡丹.蜜环菌化学成分与药理作用的研究进展[J].农产品加工,2008(5):46-49.

[4] 王惠国,冯宝民.蜜环菌多糖免疫调节活性的实验研究[J].陕西科技大学学报,2009,27(2):62-64.

[5] 程显好,刘林德,董洪新,等.蜜环菌菌丝体液体培养条件的优化[J].中药材,2007,30(5):509-512.

[6] 陈珊,刘东波,李凡.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2011:196.

[7] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2版.杭州:浙江大学出版社,1999:11-12.

Optimization of Liquid Culture Medium of *Armillaria mellea* Exopolysaccharides

WEN Gang,LIU Hai-yan,YANG Mei

(School of Environmental and Biological Engineering,Jilin Institute of Chemical Technology,Jilin,Jilin 132022)

**Abstract:** Taking *Armillaria mellea* as material,the effect of carbon source,nitrogen source and inorganic ion on the yield of exopolysaccharides were studied,and the liquid culture medium of it was optimized by orthogonal test. The results showed that the optimal culture medium was:sucrose 25.00 g/L,peptone 2.50 g/L, $MgSO_4$  0.50 g/L, $K_2HPO_4$  1.50 g/L, $KH_2PO_4$  0.25 g/L, $ZnSO_4$  0.03 g/L,and  $FeSO_4$  0.02 g/L. In these conditions,the exopolysaccharides of *Armillaria mellea* can reach  $478.5 \pm 22.4$  mg/L,it was 6 times as the mycelium biomass of the basal medium.

**Key words:** *Armillaria mellea*; exopolysaccharides; culture medium; orthogonal test