

元蘑不同菌株的菌丝发酵液多糖含量比较

刘 宇¹, 王建瑞², 鲁 铁², 郝晓东¹, 图力古尔^{1,2}

(1. 鲁东大学 农学院, 山东省食用菌技术重点实验室, 山东 烟台 264025; 2. 吉林农业大学 菌物研究所, 教育部食药菌工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘 要:以元蘑栽培种和野生种为试材, 研究不同发酵培养时间菌株胞内多糖和胞外多糖的浓度含量, 并对发酵时间与元蘑 3 种菌株菌丝体生物量及胞内外多糖含量等相关指标的动态变化趋势进行了分析。结果表明: 在 25℃, 180 r/min 恒温振荡培养条件下, 元蘑菌丝体生物量在第 12 天达到最大值, 栽培菌株相对于 2 个野生菌株生长速度更快; 在元蘑的液体培养过程中, 胞内多糖含量的变化与菌丝体生物量的变化呈正相关; 在发酵前期胞内多糖的含量随生物量的增加而增加, 但当发酵菌株达到稳定期或者衰退期时, 胞内多糖含量开始降低, 其中栽培菌株较 2 个野生菌株含量高; 胞外多糖含量随着发酵培养时间变化不明显。

关键词:胞内多糖; 胞外多糖; 菌丝体生物量; 液体发酵培养

中图分类号:Q 815 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0155-04

真菌多糖是从真菌的子实体、菌丝体与菌丝发酵液中提取分离出来的天然高分子碳水化合物, 具有抗感染、抗辐射、抗凝血、降血糖、预防和治疗肿瘤、抗疲劳^[1]等多种生物学功能。而且, 真菌多糖对正常细胞不产生毒副作用, 属于天然药用活性成分, 具有重要的经济价值。

元蘑 [*Panellus edulis* Y. C. Dai, Niemelä & G. F. Qin] 属伞菌目侧耳科扇菇属^[2], 学名美味扇菇, 又称冬菇、冻蘑等, 是我国著名的食药菌, 以东北地区为主产, 尤其是长白山地区, 每年的 8 月至 10 月间, 该种大量发生于榆、桦等枯立木、倒木或腐木上^[3-5]。该菌味道鲜美, 口感细嫩清香, 营养丰富, 富含蛋白质、氨基酸、脂质、碳水化合物、维生素及矿物质等多种营养成分。此外该菌中含有的多糖可以防止动脉硬化, 具有增强机体免疫力、抑制肿瘤的药用价值^[6-9]。目前, 该种可人工栽培^[10-11]。

该试验对栽培元蘑和野生元蘑菌株进行液体发酵培养, 在发酵过程中以功能性成分多糖的含量作为评价指标, 并对元蘑菌丝在液体培养过程中的生物量与胞内多糖和胞外多糖含量的变化趋势进行分析研究, 以期元蘑多糖的提取、利用等进一步深入研究和产品开发提供参考依据。

第一作者简介:刘宇(1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为大型真菌资源。E-mail: liuyu8006@163.com

基金项目:山东省高等学校科技计划资助项目(J10LC04); “泰山学者”建设工程专项资助项目; 鲁东大学专项资助项目(LY2010011)。

收稿日期:2013-05-14

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野生美味扇菇菌种采自吉林省长白山, 经过组织分离、纯化得到菌种, 因野生菌子实体生于不同环境下外观形态差异很大, 该试验将其分为长柄菌株和无柄菌株, 经过驯化栽培和品种选育试验获得出菇生产性状较好的栽培种菌株, 具体信息见表 1, 以上菌种均保存于鲁东大学农学院菌种保藏研究室。

表 1 供试菌株

菌株名称	菌株编号	采集地点	生长环境	源菌主要特征
长柄菌株	101005	吉林省 长白山	阔叶树郁闭林 中枯腐木底端	子实体扇形, 菌盖淡紫色至黄紫色, 直径 5 cm, 基部菌柄长约 2 cm
无柄菌株	101006	吉林省 长白山	阔叶树开阔林 中枯腐木上面	子实体半圆形, 菌盖黄色, 直径 4.5 cm, 基部菌柄极短至近无
栽培菌株	101007	鲁东大学 选育栽培	棉籽壳麸皮培 养料栽培	子实体半圆形, 菌盖黄色至黄白色, 直径 4.5 cm, 基部菌柄长约 1~2 cm

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 配制 PDA 培养基对以上 3 个菌种进行活化培养。每 1 000 mL PDA 培养基配方: 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸氢二钾 1 g, 琼脂 20 g, 酵母膏 4 g。配置好的培养基于 121℃ 灭菌 30 min 备用, 灭菌完成后倒于培养皿中冷却, 转接菌种, 于 25℃ 温度下培养, 观察菌株生长情况, 保证菌株不被杂菌污染, 菌丝强壮不老化。

1.2.2 发酵种子液的制备 发酵液培养基配方: 水 1 000 mL, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 6 g, 酵母浸粉 5 g, 硫酸镁

1 g, 磷酸氢二钾 2 g。配制好的发酵种子液培养基, 装液量 200 mL/500 mL, 进行 121℃, 30 min 灭菌备用, 使用打孔器在活化菌种的平板上打孔 1 cm 的菌块接种, 25℃ 摇床培养, 摇瓶转速 180 r/min。发酵培养 4 d 后备用。

1.2.3 发酵液的制备 发酵液培养基配方同种子液培养基配方。培养基准备好后, 每瓶接种 10 mL 5% 的液体种子, 放入摇床, 温度 25℃, 摇瓶转速 180 r/min。第 5 天开始, 每天取样(每次 3 瓶)测定每瓶样本的菌丝干重、胞内多糖和胞外多糖含量等。

1.2.4 菌丝干重的测定 将菌丝体用 100 目筛绢过滤, 用蒸馏水冲洗掉菌丝体上的培养基, 然后置于 80℃ 烘箱内烘干至恒重, 迅速称重。

1.2.5 葡萄糖标准曲线的制作 采用苯酚-硫酸法^[12]: 准确称取干燥至恒重的分析纯葡萄糖 100 mg, 用蒸馏水定容至 1 000 mL 混匀备用; 分别吸取上述葡萄糖溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL 放于试管中, 并各用蒸馏水补至 2.0 mL; 各试管中加入 5% 苯酚溶液 1 mL、浓硫酸 5 mL; 加塞摇匀, 室温冷却, 以 1 号管作为调零管, 于 490 nm 处测吸光值。

1.2.6 多糖的提取和含量的测定 胞外多糖的提取: 采用醇沉法^[13-16]提取发酵液中的多糖。将培养后的菌液经尼龙布过滤后得到发酵液, 取收集到的发酵液 5 mL 于 50 mL 离心管中, 然后加入 4 倍体积(20 mL)的 95% 乙醇, 轻轻摇匀, 放入 4℃ 冰箱中静置 24 h, 后于 4 000 r/min 离心 20 min, 沉淀中加入 30 mL 蒸馏水, 沸水浴溶解 30 min, 溶液冷却后于 2 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为胞外多糖水溶液。胞内多糖的提取: 采用微波醇沉法^[13-14, 16]提取菌丝体中的多糖。将培养好的菌液经尼龙布过滤后得到菌丝体, 用蒸馏水将菌丝体上的培养基冲洗干净后, 置于干燥箱中 80℃ 烘干至恒重。精密称取菌丝体粉末 0.10 g, 放入 50 mL 离心管中, 准确加入 10.00 mL 蒸馏水, 轻轻摇匀, 在微波炉中用中高火(P80)处理 1.5 min 进行提取。将微波提取液以 4 000 r/min 离心 10 min, 取 5.00 mL 上清液, 加入 15.00 mL 95% 乙醇, 放入 4℃ 冰箱静置 12 h, 醇沉完成后于 4 000 r/min 下离心 20 min, 去上清液, 将沉淀晾干即得胞内粗多糖。加少量热水溶解多糖, 定容至 10.00 mL 待测。多糖含量的测定: 以 1 号管作为调零管加入 2 mL 蒸馏水, 以 2、3、4 号管作为样品管加入 2 mL 提取的多糖样液, 然后均依次加入 1 mL 5% 苯酚试剂、5 mL 浓硫酸, 20 min 后在 490 nm 下测定吸光度。从标准曲线上计算得到样品液相对应的含糖量。每处理 3 次重复, 求其平均值。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

以葡萄糖浓度(C)为横坐标, 以吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线见图 1。

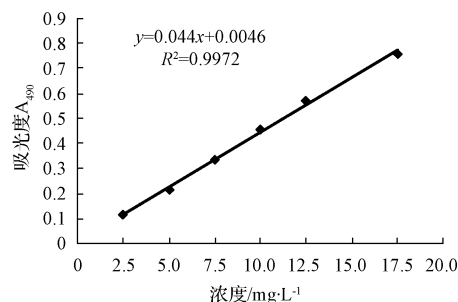


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose solution

2.2 菌丝体生长的时间曲线

由图 2 可知, 野生无柄菌株培养前 7 d 菌丝生物量几乎不增加, 处于延滞期, 在第 7~9 天为生物量快速积累时期, 在第 9~12 天为稳定期, 菌丝体生物量几乎不变, 第 12 天菌丝体生物量达到了最大值, 发酵培养从第 12 天开始进入衰退期, 菌丝量缓慢下降。野生长柄菌株在第 5~12 天生物量增长速率较为均衡; 在第 12 天, 菌丝体生物量达到了最大值; 发酵培养 12 d 后处于衰退期, 菌丝量开始下降。栽培种的菌丝体生物量的变化在开始第 5~10 天为快速增长期, 生物量增长速率较为均衡; 在第 10~12 天为稳定期, 菌丝体生物量变化不大; 第 12 天, 菌丝体生物量达到了最大值; 发酵培养 12 d 后处于衰退期, 菌丝量开始下降。

综合以上 3 个菌株生物量的生长变化情况, 3 个菌株生物量变化在初始 10 d 内, 菌丝体生物量都在不断增长但菌株增长速度不一样, 栽培种菌丝量增加的最快。另外, 3 个菌株都在第 12 天达到最大值, 之后开始下降, 达到生物量积累的生长周期末期。

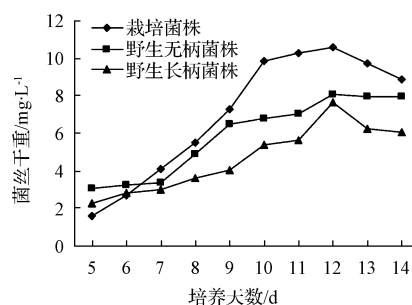


图 2 3 种菌株菌丝生物量时间曲线

Fig. 2 Time curves of mycelia biomass for three strains

2.3 胞内多糖浓度的比较

野生长柄菌株在第 5~10 天, 胞内多糖浓度在缓慢的增大; 在第 10 天达到最大值; 10 d 以后, 胞内多糖浓度开始减少。由图 3 可知, 野生无柄菌株在第 5~8 天, 胞内多糖浓度在不断增加, 但增长速率相对较快, 在第 8 天达到最大值, 8 d 以后, 胞内多糖浓度开始减小, 最后趋于平稳。栽培种的胞内多糖浓度随时间变化可以看

出,在第5~9天,胞内多糖浓度在不断增加,在第9天达到最大值;9 d以后,胞内多糖浓度开始减少,此时发酵菌株趋于胞内多糖分泌的平稳时期。

在元蘑的液体培养过程中,胞内多糖含量的变化与菌丝体生物量的变化呈正相关;在发酵前期胞内多糖的含量随生物量的增加而增加,但当发酵菌株达到稳定期或者衰退期时,胞内多糖含量开始降低,有可能是多糖自身溶解或者多糖浓度的增加抑制自身多糖的再分泌的结果。

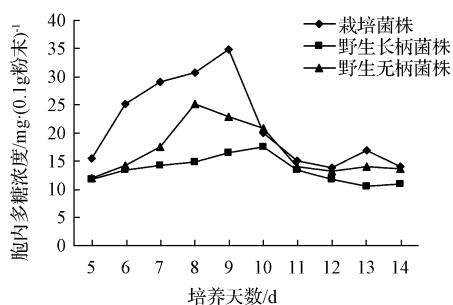


图3 液体发酵培养3个菌株的胞内多糖浓度

Fig. 3 Interacellular polysaccharide concentration of three strains by cultivating in liquid fermentation

2.4 胞外多糖浓度的比较

由图4可以看出,3个菌株的胞外多糖含量随着发酵时间的延长无明显变化规律。但大致上看,培养初期(前8 d),栽培菌株的胞外多糖浓度远高于2个野生菌株。第9~12天2个野生菌株的胞外多糖的浓度呈现迂回往复的形势,随着培养天数的增加而呈现出整体性增加的特点,但栽培菌株则正好相反。可能是栽培种在生物量和胞内多糖方面相对野生种增长较快的前提下,栽培种提前进入发酵后期阶段,发酵后期营养物质变得不充足,菌体分泌的多糖可能又被自身利用,所以胞外多糖的产量在5 d后呈现下降趋势,而此阶段的野生种可能处于营养相对稳定期,胞内多糖和胞外多糖的分泌相对处于一种维稳期,细胞此时转化胞外多糖物质作为营养需求,同时分泌的多糖又因为细胞内部的相对“饱和”而出现代谢吞吐平衡。具体胞外多糖的产生机制需要做更进一步的试验进行验证。

3 讨论

在大型真菌发酵过程中,其自身代谢末端产物胞内多糖的存在可能会引起反馈抑制作用,随着培养基中同源胞内多糖浓度的增加,反馈抑制作用逐渐增强会抑制多糖的大量产生。该试验中胞内多糖和胞外多糖均在发酵过程中均产生了这种逆向规律现象,但真菌多糖的具体合成机制及其反馈抑制机理还有待进一步研究。

该试验通过液体深层发酵培养菌丝体,并绘制其菌丝体的干重、胞内、胞外多糖浓度随着发酵时间的变化

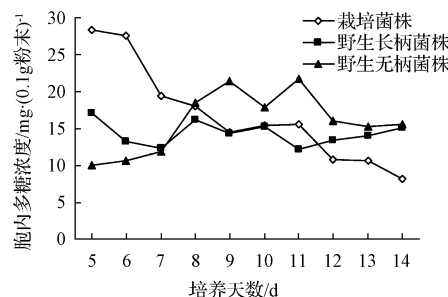


图4 液体发酵培养3个菌株的胞外多糖浓度

Fig. 4 Exopolysaccharides concentration of three strains by cultivating in liquid fermentation

图,结果表明,该研究选育所得的元蘑栽培菌株的以上3个指标均好于2个野生菌株。在日常生活中人们认为野生的食物比栽培的更好,而该试验的结果正好相反,栽培种由于经过一系列的筛选、育种试验而选育成的良好菌种种质,再加上生产时人为给予了适应蘑菇生长的丰富的营养,所以自身生物量以及营养物质积累得更快。该研究也为以后优良菌种的选育和栽培生产提供了依据。

参考文献

- [1] Masuda Y, Kodama N, Nanba H. Macrophage J774.1 cell is activated by MZ-Fraction (Klasma-MZ) polysaccharide in *Gri fo la frondosa* [J]. Mycoscience, 2006, 47: 360-366.
- [2] Dai Y C, Niemela T, Qin G F. Changbai wood-rotting fungi 14, a new pleurotoid species *Panellus edulis* [J]. Annales Botanici Fennici, 2003, 40: 107-112.
- [3] 李玉, 图力古尔. 中国长白山蘑菇[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [4] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 801-824.
- [5] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21.
- [6] 马岩, 张锐, 于小风, 等. 黄蘑多糖对荷瘤小鼠化疗的减毒增效作用[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1199-1202.
- [7] 马岩, 马颖哲, 张家颖, 等. 黄蘑多糖 Fb 对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31(5): 692-695.
- [8] 田杰, 张大方. 亚侧耳的药理作用研究进展[J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(4): 63-64.
- [9] 陈湘, 林炳昌. 黄蘑子实体总糖的提取[J]. 食用菌学报, 2007, 14(1): 47-48.
- [10] 江海霞, 赵海, 张大方. 亚侧耳人工培养工艺及其化学成分的研究进展[J]. 长春中医学院学报, 2005, 21(2): 59-60.
- [11] 贾静, 叶云霞, 王军英, 等. 菌糠袋栽元蘑技术初步研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2011, 31(3): 247-249.
- [12] 甄世梅, 杨树德, 于兰兰, 等. 金福菇液体发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2010, 220(7): 92-95.
- [13] 顾华杰, 黄金汇, 金璵, 等. 4种灰树花多糖测定方法的比较[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 400-402.
- [14] 汪敬健, 温鲁, 翁梁, 等. 不同碳、氮源对猴头菌菌丝体多糖含量的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 149-151.
- [15] 刘菊香, 贾建波. 木蹄层孔菌多糖分离纯化及其结构初步鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 80-83.
- [16] 王艳萍, 黄剑, 刘舒翔, 等. 灰树花胞内多糖和胞外多糖的组成分析[J]. 中国酿造, 2011, 230(5): 95-97.

Comparison of the Contents of Polysaccharide in Hypha and Fermentation Broth of Different *Panellus edulis* Strains

LIU Yu¹, WANG Jian-rui², LU Tie², HAO Xiao-dong¹, Tuliguer^{1,2}

(1. Shandong Key Laboratory of Edible Mushroom Technology, Agricultural Institute, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Institute of Mycology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Mycelia polysaccharide and fermented liquid polysaccharide of cultivated strains and wild strains (wild non-stipe strain and wild long stipe strain) of *Panellus edulis* were extracted and separated after different fermentation time. IPS and EPS concentration of every strain were determined. The dynamic change trend of correlative indexes about mycelia biomass, the contents of IPS and EPS of three kinds of strains in different fermentation time were analyzed. The results showed that mycelia biomass of *Panellus edulis* reached the maximum at 12 d in the conditions of constant temperature and oscillation, as 25°C and 180 r/min culture. The growth rate of cultivated strain was faster than other two wild strains; in the process of *Panellus edulis* liquid culture, the change of intracellular polysaccharide content was positively related to mycelia biomass; at the early stage of fermentation, the content of intracellular polysaccharide got increased when biomass was added more, but got decreased when the fermented strains as plateau or recession time. Among them, the content of IPS in two cultivated strains was considerably higher than wild strains. EPS change was irregularly during the fermental cultivation time.

Key words: IPS; EPS; mycelial biomass; liquid fermentation cultivation

欢迎订阅 2014 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究报告、综述、简报等。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;贮藏·保鲜·加工;畜牧·资源昆虫;兽医;农业经济与管理等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、农业大专院校的科研、教学及管理人员。

《中国农业科学》中文版为半月刊,影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。为北京大学图书馆 1992~2011 年连续 6 次遴选的核心期刊,位居《中文核心期刊要目总览》“农业综合类核心期刊表”的首位。1999~2008、2013~2014 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;1999 年获“首届国家期刊奖”,2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”;2002~2012 年先后 10 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号;2009 年获中国期刊协会/中国出版科学研究院“新中国 60 年有影响力的期刊”称号;2010 年荣获“第二届中国出版政府奖期刊提名奖”。2012 年获清华大学图书馆等“2012 中国最具国际影响力学术期刊”称号;2013 年获新闻出版广电总局“百强科技期刊”称号。

《中国农业科学》中文版大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发行。每期 208 页,定价 49.50 元,全年定价 1 188.00 元。国内统一刊号:CN11-1328/S,国际标准刊号:ISSN 0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》英文版(*Agricultural Sciences in China*),2002 年创刊,月刊,2012 年更名为《农业科学学报》(*Journal of Integrative Agriculture*, JIA)。2006 年 1 月起与国际著名出版集团 Elsevier 合作,全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2009 年被 SCI 收录,2012 年 JCR 影响因子为 0.527。

JIA 大 16 开,每月 20 日出版,国内外公开发行。每期 160 页,国内订价 80.00 元,全年 960.00 元。国内统一刊号:CN 10-1039/S,国际标准刊号:ISSN 2095-3119,邮发代号:2-851,国外代号:1591M。

《中国农业科学》中、英文版均可通过全国各地邮局订阅,也可向编辑部直接订购。

邮编:100081 地址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话:010-82109808,82106280,82106281,82106283 传真:010-82106247

网址:www.ChinaAgriSci.com E-mail:zgnykx@caas.cn

联系人:林鉴非