

# 牛肝菌胞外多糖发酵培养基的优化

杨玉红<sup>1</sup>, 康宗利<sup>1</sup>, 王宏梅<sup>2</sup>, 刘长江<sup>3</sup>

(1. 沈阳农业大学生物科学与技术学院 110161; 2 辽东学院医学院基础部 丹东 118002; 3. 沈阳农业大学食品科学与工程学院, 110161)

**摘要:**以美味牛肝菌为研究对象, 对其多糖发酵主要影响因子和发酵培养基优化进行研究。通过对单因子培养基优化处理试验结果的分析比较, 选择出 3 个对牛肝菌多糖发酵影响较大的因子进行了正交试验, 结果表明: 美味牛肝菌最适培养基为 20.0g 葡萄糖+7.0g 酵母粉+3.0g 黄豆粉+1.0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+0.5g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O+0.5 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O。

**关键词:**牛肝菌; 多糖; 培养基优化

**中图分类号:**S 646.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)05-0227-03

真菌多糖是一种能够增强人体免疫功能的生活活性物质, 在国际上被称为生物反应调节剂。食药用真菌多糖及其复合物的多种多样生物活性功能以及在功能食品和临床上的广泛使用, 使其成为近年生命科学、生物学、医药和食品科学等研究领域的热点之一<sup>[1-2]</sup>。牛肝菌是野生食用菌的重要组成类群, 我国已发现牛肝菌目的种类达 390 种以上, 可食的 199 种<sup>[3]</sup>。许多种是与松科植物共生的菌根食用菌, 具有很高的研究开发价值。其中的多糖和碱性蛋白可抗肿瘤、病毒, 调节人体的免疫功能<sup>[4-6]</sup>。然而, 由于菌根共生等复杂原因, 牛肝菌至今未能实现人工栽培。深层培养是近代大规模生产微生物产品的基本方法<sup>[7]</sup>。它能在短期内获得大量的产品, 且又可从发酵罐中得到多糖、氨基酸等有用的代谢产物。食药用真菌液态发酵胞外多糖时, 各种理化因素, 包括发酵液的组成和外界环境因素, 都会影响到生产菌的生长速度, 生物量的多少以及代谢特征等<sup>[8]</sup>。因此, 对牛肝菌胞外多糖发酵进行培养基的优化具有很大的现实意义。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验材料

供试菌株: 美味牛肝菌 5.504, 购自北京中关村微生物所菌种保藏中心。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 配制综合马铃薯培养基, 分装试管, 高压灭菌锅中灭菌 30min, 放置斜面, 将美味牛肝菌接入

斜面培养基, 28℃恒温培养箱中培养, 待菌丝长满试管备用。培养基: 葡萄糖 20g, 20%土豆汁 1 000mL, 磷酸二氢钾 3g, 硫酸镁 1.5g, 琼脂 15g, pH=6。土豆汁制备: 土豆去皮, 切碎, 取 20g 放入加水的烧杯中在电炉上加热 1h, 然后纱布过滤, 最后定容至 1 000mL。

1.2.2 平面培养 超净工作台上将活化后的菌种接入灭过菌的装有培养基的培养皿内, 然后在恒温培养箱中 28℃培养至长满菌丝, 备用(菌种扩大)。

1.2.3 摇瓶发酵培养基 葡萄糖 20g+酵母粉 7.0g+黄豆粉 3.0g+磷酸二氢钾 1.0g+硫酸锰 0.5g+硫酸镁 0.5g。

1.2.4 菌种培养及接种 取斜面试管菌种接种于 10 个含基础培养基的培养皿中, 28℃恒温培养箱中培养, 观察, 待长出菌落后, 选出生长均匀的好的菌落, 用打孔器从平板上打孔, 将打下的菌丝分别接种于各个处理中, 即盛有 50mL 发酵液的三角瓶中。

### 1.3 试验设计

以 1.2.3 所述培养基做对照, 再对各个成分优化培养先做单因子试验, 再进行正交试验。在试验过程中发现, 静置培养中的美味牛肝菌菌丝基本不生长, 因此只对摇床培养进行研究。

1.3.1 单因子试验 单因子的摇瓶培养: 以一个因子做参数, 其余因子量不变。将其余因子按基本摇床培养基量做培养基 500mL, 然后分别装入 150mL 的三角瓶中, 再按单因子分析加入不同量, 标记。然后在高压灭菌锅中灭菌 20min, 在超净工作台上接入菌株, 放入恒温摇床中在 28℃下培养 6d。多糖的提取(发酵液多糖提取): 经摇床培养 6d 后, 取出摇瓶, 用纱布过滤, 分离菌丝和发酵液。将菌丝拧干, 然后烘干称重, 记录数据; 发酵液(滤液)在恒温水浴锅中 60℃浓缩至 1/3 体积, 再加入 4

第一作者简介: 杨玉红(1973-), 女, 博士, 讲师, 主要从事微生物工程和食品生物技术方面的研究, E-mail: kzlyangyuhong。

基金项目: 沈阳农业大学青年基金资助项目(2005053)。

收稿日期: 2007-01-12

倍体积的 95%乙醇, 过夜醇析, 然后在离心机上 4 000 r/min离心 10min, 去上清, 得沉淀为粗多糖。

1.3.2 正交试验 在对美味牛肝菌进行了单因子培养基筛选试验之后, 通过对试验结果的比较, 选择对美味牛肝菌多糖发酵影响较大的 3 个因子做正交试验。正交试验因素和水平, 见表 1。从正交设计表中选用  $L_9(3^3)$  进行正交设计试验, 见表 2。

表 1 试验因素和水平			
因素	水平		
	1	2	3
葡萄糖(A)	10	15	20
硫酸锰(B)	0.4	0.5	0.6
磷酸二氢钾(C)	0.8	1.0	1.2

表 2 培养基优化正交试验方案			
试验序号	因素		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

## 2 结果与分析

### 2.1 牛肝菌胞外多糖主要影响因子的筛选

表 3 葡萄糖优化处理后发酵液中菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)					
处理	CK	1	2	3	4
葡萄糖	5	3	10	15	20
菌丝干重	0.1084	0.0984	0.1752	0.2321	0.2349
多糖含量	0.0834	0.0756	0.1529	0.1540	0.1512

2.1.1 葡萄糖量的优化(g/L) 从表 3 可以看出: 当葡萄糖量为 10g、15g、20g 时发酵液中提取的菌丝干重明显多于 CK, 且当葡萄糖量为 20g 时菌丝产量最高。当葡萄糖量为 20g, 15g, 10g 时糖的发酵量明显多于 CK, 其中以 15g 为最好。

表 4 酵母膏优化处理后发酵液菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)						
处理	CK	1	2	3	4	5
酵母膏	12	4	7	8	16	20
菌丝干重	0.1068	0.0414	0.1404	0.1499	0.1422	0.0423
多糖含量	0.0875	0.0345	0.1288	0.1388	0.1358	0.0365

2.1.2 酵母膏的优化(g/L) 从表 4 可以看出: 当酵母膏量为 7g、8g、16g 发酵液中提取的菌丝干重和多糖含量较多, 但差异不明显。

表 5 磷酸氢二钾优化处理后发酵液菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)						
处理	CK	1	2	3	4	5
磷酸二氢钾	1.5	0.5	0.8	1.0	1.2	2.0
菌丝干重	0.1269	0.1863	0.3318	0.3069	0.1962	0.0609
多糖含量	0.1057	0.1602	0.2121	0.2282	0.0669	0.0531

2.1.3 磷酸二氢钾的优化(g/L) 从上表可以看出: 当磷酸二氢钾量为 0.8g、1.0g、1.2g 时发酵液中提取的菌丝干重和多糖含量明显多于 CK, 且当磷酸二氢钾量为 1.0g 时菌丝产量和多糖含量最高。

2.1.4 黄豆粉的优化(g/L) 恒温摇床培养 6d 后, 发酵液中提取出的菌丝干重如表 6。从表 6 可以看出: 当黄豆粉量不同时菌丝干重和多糖含量差异不明显。

表 6 黄豆粉优化处理发酵液菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)					
处理	CK	1	2	3	4
黄豆粉	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
菌丝干重	0.0748	0.0870	0.0922	0.0876	0.0808
多糖含量	0.0657	0.0758	0.0960	0.0778	0.0713

表 7 硫酸锰优化处理后发酵液菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)						
处理	CK	1	2	3	4	5
硫酸锰	0.8	0.2	0.4	0.5	0.6	1.0
菌丝干重	0.0693	0.0588	0.0748	0.1152	0.1029	0.0657
多糖含量	0.0791	0.0496	0.0913	0.1099	0.1134	0.0743

2.1.5 硫酸锰的优化(g/L) 从表 7 可以看出: 当硫酸锰量为 0.4g、0.5g、0.6g 时发酵液中提取的菌丝干重和多糖含量明显多于 CK, 且当硫酸锰量为 0.5g 时菌丝产量最高, 硫酸锰量为 0.6g 时多糖发酵量最多。

2.1.6 硫酸镁的优化(g/L) 恒温摇床培养 6d 后, 发酵液中提取出的菌丝干重如表 8。从表 8 可以看出: 当硫酸镁用量不同时, 发酵液中的菌丝干重和多糖含量差异不明显。

表 8 硫酸镁优化处理后发酵液菌丝干重和多糖含量 (g/50mL)						
处理	CK	1	2	3	4	5
硫酸镁	0.8	0.2	0.4	0.5	0.6	1.0
菌丝干重	0.0408	0.0432	0.0483	0.0581	0.0558	0.0423
多糖含量	0.0359	0.0395	0.0416	0.0471	0.0461	0.0382

由上述 6 个单因子试验结果可知, 对发酵液中的菌丝干重和多糖含量影响相对大的因素葡萄糖、硫酸锰和磷酸二氢钾 3 个因子, 因此选此 3 个因素来做正交实验, 以筛选出胞外多糖发酵最佳培养基组合。

### 2.2 牛肝菌胞外多糖培养基优化的研究

按表 2 所示正交试验方案 结果见表 9。

由正交试验结果直观分析表可以看出, 影响美味牛肝菌发酵液多糖产量的各因素中  $RA > RB > RC$ , 即在试验确定的因素中, 葡萄糖量的影响最大, 硫酸锰次之, 磷酸二氢钾的影响最小。通过直观分析, A、B、C 三因素的最优组合为  $A_3B_2C_2$ , 综合牛肝菌胞外多糖主要影响因子的筛选试验结果分析, 得到美味牛肝菌多糖发酵的最优培养基组合为: 20.0g 葡萄糖+7.0g 酵母粉+3.0g 黄豆粉+ 1.0g  $KH_2PO_4$ + 0.5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  + 0.5g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

表 9 正交试验结果直观分析表				
试验序号	因素			多糖(g)
	A	B	C	
1	1	1	1	0.0986
2	1	2	2	0.1128
3	1	3	3	0.1032
4	2	1	2	0.0951
5	2	2	3	0.1001
6	2	3	1	0.0929
7	3	1	3	0.0985
8	3	2	1	0.1101
9	3	3	2	0.1142
T <sub>1</sub>	0.3146	0.2922	0.3016	
T <sub>2</sub>	0.2881	0.3230	0.3221	
T <sub>3</sub>	0.3228	0.3210	0.3018	
X <sub>1</sub>	0.1049	0.0977	0.1005	
X <sub>2</sub>	0.0960	0.1077	0.1077	
X <sub>3</sub>	0.1076	0.1070	0.1006	
R	0.0116	0.0100	0.0072	

3 结论

单因子培养基筛选试验结果表明: 葡萄糖、硫酸锰

和磷酸二氢钾这 3 个因子对牛肝菌多糖发酵影响较大, 因此以这 3 个因子作为牛肝菌多糖发酵主要影响因子进行正交试验。

通过正交试验结果分析表发现, 葡萄糖量在这 3 个主要影响因子中对美味牛肝菌多糖发酵影响最大, 其次是硫酸锰和磷酸二氢钾。

综合牛肝菌胞外多糖主要影响因子的筛选试验和牛肝菌胞外多糖培养基优化的研究试验的结果得出结论: 美味牛肝菌最适培养基为 20.0g 葡萄糖+7.0g 酵母粉+ 3.0g 黄豆粉+ 1.0g  $KH_2PO_4$ + 0.5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +0.5g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

参考文献:

[ 1 ] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的应用 [ J ]. 西南师范大学学报 1999 24 (4): 478-481.

[ 2 ] 阎明珍, 任玉环, 张朝亮. 吉林美味牛肝菌分布及生态习性的初步研究 [ J ]. 吉林林学院学报 1996 12 (4): 244-246.

[ 3 ] 肖建辉, 蒋依辉, 梁宗琦, 等. 食用菌真菌多糖研究进展 [ J ]. 生命的化学, 2002, 22(2): 148-151.

[ 4 ] Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.) Sing [ J ]. Nature 1969 222: 687-688.

[ 5 ] Chihara G, Hamuro J, Maeda Y Y, et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from Lentinus edodes [ J ]. Cancer Res. 1970, 30: 2776-2781.

[ 6 ] Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, et al. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms [ J ]. Cancer Res. 1969, 29: 734-735.

[ 7 ] 周世文, 徐传福. 多糖的免疫药理作用 [ J ]. 中国生化药物杂志 1994 15(2): 143-147.

[ 8 ] 张彦民, 李宝才, 朱利平, 等. 多糖化学及其生物活性研究进展 [ J ]. 昆明理工大学学报 2003 28(3): 140-145.

The Zymolytic Medium Optimization of the Boletus Polysaccharide Fermentation

YANG Yu-hong<sup>1</sup>, KANG Zong-li<sup>1</sup>, WANG Hong-mei<sup>2</sup>, LIU Chang-jiang<sup>3</sup>

(1. Biological Science and Technology Institute, Shenyang Agricultural University; 2. Basic Department of Medical Institute, Liaodong College, Dandong 118002; 3. College of Food and Engineering, Shenyang Agricultural University, 110161)

**Abstract:** This paper has investigated the major factor and the zymolytic medium optimization of the boletus polysaccharide fermentation. By comparing the experimental results of single factor medium screening test, we has carried on the orthogonal experiment of 3 major factors which have the most important influence to the boletus polysaccharide fermentation. The results of the orthogonal experiment have showed that the optimum culture medium is 20.0 g glucose+7.0g yeast powder+3.0g soy flour+1.0g  $KH_2PO_4$ +0.5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +0.5g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ .

**Key words:** Boletus; Polysaccharide; Culture medium optimization