

# 五株荷叶离褶伞碳氮源及适合发酵菌株的筛选

周会明<sup>1</sup>, 张焱珍<sup>1</sup>, 席亚丽<sup>2</sup>, 魏生龙<sup>2</sup>

(1. 临沧师范高等专科学校, 云南 临沧 677000; 2. 河西学院 食用菌研究所, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:**以荷叶离褶伞为试材,以菌丝体生物量和胞外多糖产量为指标,分别采用不同碳源和氮源对5株荷叶离褶伞菌株进行单因素液体发酵试验,以期筛选荷叶离褶伞液体培养最适碳源、氮源及适合发酵菌株,并为探索其工厂化发酵奠定理论基础。结果表明:菌株ZY01、ZY02及ZY03的最适碳源是蔗糖,最适氮源是蛋白胨,其次为麸皮、尿素;菌株ZY04、ZY05以菌丝体生物量为指标的最适碳源是葡萄糖,最适氮源是蛋白胨,以胞外多糖产量为指标的最适碳源是蔗糖,最适氮源分别是尿素、蛋白胨;菌株ZY02的菌丝体生物量为12.626 g/L与ZY03的胞外多糖产量为11.5148 mg/L在分别以2%蔗糖+0.2%蛋白胨、2%蔗糖+0.3%蛋白胨组合试验中值最大;不同碳、氮源对荷叶离褶伞菌丝体生物量及胞外多糖产量的影响不呈正相关,菌株ZY02、ZY03分别是各指标下的适宜发酵菌株。

**关键词:**荷叶离褶伞;深层培养;碳源;氮源;菌丝体生物量;胞外多糖

**中图分类号:**S 646.19 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)09-0159-04

荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*)是离褶伞属一种珍稀食(药)用菌<sup>[1]</sup>,该菌口感佳、形色美,菌体中富含多种生理活性物质(如粗多糖、粗蛋白、氨基酸等)<sup>[2]</sup>,具有极高的营养<sup>[3-4]</sup>、药用<sup>[5-8]</sup>等价值,以蛋白质的营养均衡性、氨基酸组成等作评价依据,其菌丝体比子实体具有更高的营养价值,开发利用潜力巨大<sup>[9]</sup>。因此,菌丝体液体发酵技术的探索,对满足日益增长的市场需求意义重大。目前已有保健及药效<sup>[10]</sup>、菌体成分<sup>[11]</sup>、多糖提取工艺<sup>[12-13]</sup>等方面的研究。

该菌液体发酵技术因菌株不同而受到多种营养条件(如碳源、氮源等)的限制,导致菌丝体产量不稳定、发酵液生理活性成分含量减少、适宜的发酵菌株不能确定等问题。为了加速开发这一珍稀菌类,以菌丝体生物量和胞外多糖量为指标,在5种不同碳源和氮源的基础上,分别对5株荷叶离褶伞菌株进行单因素液体发酵试验,最终得出荷叶离褶伞各菌株的最适碳源、氮源及适合发酵菌株,为其今后的工厂化生产及营养生理研究提供理论依据。

**第一作者简介:**周会明(1984-),男,硕士,助教,研究方向为大型真菌驯化与遗传。E-mail:632243530@qq.com

**责任作者:**魏生龙(1962-),男,教授,研究方向为食用真菌。E-mail:glad-happy@163.com

**基金项目:**甘肃省科技厅科技支撑计划资助项目(1104NKCG091)。

**收稿日期:**2014-01-15

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为荷叶离褶伞菌株ZY01(1022,甘肃)、ZY02(1061,甘肃)、ZY03(1004,甘肃)、ZY04(2004,云南)、ZY05(大粒丹波,上海),均保存于河西学院食用菌研究所。

供试培养基:种子培养基,马铃薯200 g,蔗糖20 g,蛋白胨3 g,麸皮30 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,水1 000 mL,pH自然;碳源基础培养基:马铃薯200 g,蛋白胨3 g,水1 000 mL,pH自然;氮源基础培养基:马铃薯200 g,蔗糖20 g,水1 000 mL,pH自然。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌株活化** 将保藏的各菌种接种在PDA斜面上,在25℃培养箱中静置培养5~7 d,转接到PDA平板上,并用封口膜封口,继续在25℃培养箱中静置培养5~7 d,备用<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 种子菌种制备** 在无菌条件下,从各活化菌种菌落边缘取直径为5 mm打孔器处理的菌饼3块,接入装有100 mL种子培养基的250 mL三角瓶中,置于22℃、100 r/min摇床培养7 d<sup>[15]</sup>。

**1.2.3 液体优化培养** 碳源筛选:在碳源基础培养基中,分别加入2%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉作碳源,在250 mL三角瓶中分装100 mL各碳源培养基,121℃下灭菌30 min。待冷却至30℃以下,在无菌操作下,将培养好的各液体菌种用移液枪接入三角瓶

中,每瓶 4 mL,每处理 3 瓶,共 75 瓶,放入 22℃恒温摇床上培养,120 r/min 培养 13 d<sup>[16-17]</sup>。氮源筛选:在氮源基础培养基中,分别加入 0.2%的麸皮、蛋白胨、硝酸铵、硫酸铵、尿素作氮源,制成氮源培养基,方法如上。

### 1.3 项目测定

每次取 100 mL 发酵液于 4 000 r/min 下离心 20 min,取上清液采用苯酚-硫酸法<sup>[18]</sup>进行胞外多糖测定,测定还原糖采用 DNS 光度法<sup>[19-20]</sup>;用蒸馏水冲洗离心后的沉淀,洗去其中残留的培养基,反复 3 次,将离心管底部的菌丝体移至 60℃烘箱中烘至恒重进行称量,得出菌丝体生物量<sup>[15]</sup>。适宜液体发酵菌株评定:在碳氮源筛选试验基础上,分别以菌丝生物量及胞外多糖产量为筛选指标,最终确定出各指标下最适碳氮源及相应适宜发酵菌株。

### 1.4 数据分析

试验数据采用 DPS 9.0 数据处理软件进行分析<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳源对 5 株荷叶离褶伞菌株菌丝液体发酵的影响

由表 1 可知,当葡萄糖作为测定菌丝生物量碳源时,5 株荷叶离褶伞菌株生物量依次为 5.956、1.913、2.381、9.157、11.657 g/L,当蔗糖作为碳源时,5 株荷叶

离褶伞菌株胞外多糖产量依次为 7.2607、7.0877、11.5148、5.9450、8.8387 mg/L,除菌株 ZY01 的胞外多糖产量处于第 2 位外,2 种液体发酵参数均为最高值,且 LSD 法分析发现,当显著水平  $\alpha=0.05$  时,与乳糖、麦芽糖相比,菌株 ZY01、ZY04 及 ZY05 菌丝生物量及胞外多糖产量均达到显著水平;菌株 ZY02 除在可溶性淀粉上胞外多糖产量最低外,其它碳源对其影响无差异;菌株 ZY03 胞外多糖产量也达到显著水平,但二者对其菌丝生物量的影响均无显著差异。碳源对各菌株菌丝生物量影响顺序为,菌株 ZY01:葡萄糖>乳糖>麦芽糖>可溶性淀粉>蔗糖;菌株 ZY04:葡萄糖>可溶性淀粉>麦芽糖>蔗糖>乳糖;菌株 ZY05:葡萄糖>麦芽糖>乳糖>可溶性淀粉>蔗糖。碳源对各菌株胞外多糖产量影响顺序为,菌株 ZY01:可溶性淀粉>麦芽糖>蔗糖>乳糖>葡萄糖;菌株 ZY02:蔗糖>乳糖>麦芽糖>葡萄糖>可溶性淀粉;菌株 ZY03:蔗糖>可溶性淀粉>乳糖>麦芽糖>葡萄糖;菌株 ZY04:蔗糖>乳糖>麦芽糖>可溶性淀粉>葡萄糖;菌株 ZY05:蔗糖>可溶性淀粉>麦芽糖>乳糖>葡萄糖。总体来说,不同碳源对荷叶离褶伞各菌株菌丝生物量及胞外多糖产量影响不同,葡萄糖、蔗糖为该菌液体发酵的理想碳源。

表 1 不同碳源对荷叶离褶伞菌株生物量和胞外多糖产量变化的影响

Table 1 Effect of different carbon sources on the mycelial biomass and exopolysaccharide production of *Lyophyllum decastes*

碳源 Carbon source	生物量 Biomass/g · L <sup>-1</sup>					胞外多糖产量 Exopolysaccharide production/mg · L <sup>-1</sup>				
	ZY01	ZY02	ZY03	ZY04	ZY05	ZY01	ZY02	ZY03	ZY04	ZY05
葡萄糖 Glucose	5.956 aA	1.913 aA	2.381 aA	9.157 aA	11.657 aA	4.8986 dD	6.3497 aA	7.0681 cB	3.6785 cC	4.0962 dD
可溶性淀粉 Soluble starch	1.539 cBC	1.504 aA	1.531 aA	8.604 abA	3.244 bB	8.6961 aA	4.5935 bB	10.7225 aA	4.0560 cBC	7.7989 abAB
麦芽糖 Maltose	1.592 cBC	2.127 aA	1.266 aA	8.137 abcA	4.114 bB	7.5471 bB	6.5348 aA	8.6964 bB	4.8883 bAB	6.6066 bcBC
乳糖 Lactose	2.395 bB	1.486 aA	1.174 aA	5.662 cB	3.469 bB	6.2236 cC	6.6010 aA	9.7629 bB	5.1308 bAB	5.3102 cdCD
蔗糖 Sucrose	1.192 cC	1.275 aA	0.489 aA	6.086 bcB	1.603 cC	7.2607 bB	7.0877 aA	11.5148 aA	5.9450 aA	8.8387 aA

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平有显著差异;不同大写字母表示在 0.01 水平有极显著差异。下同。

Note: Different small letters behind the data in the same column mean significant difference at 0.05 level. Different capital letters mean extremely significant difference at 0.01 level.

The same as below.

### 2.2 不同氮源对 5 株荷叶离褶伞菌株菌丝液体发酵的影响

由表 2 可知,麸皮作氮源时,菌株 ZY01、ZY03 的菌丝生物量依次为 7.307、5.192 g/L,其胞外多糖产量依次为 5.5060、7.7481 mg/L,蛋白胨作氮源时,菌株 ZY02、ZY04 其生物量依次为 12.626、7.895 g/L,除菌株 ZY02、ZY04 胞外多糖产量较低外,均为最高值,与硫酸铵、硝酸铵及尿素相比( $\alpha=0.05$ ),均达到显著水平;菌株 ZY05 分别以麸皮、尿素作氮源时,其菌丝生物量与胞外多糖产量依次为 5.207 g/L、6.6504 mg/L,也均为最高值,与蛋白胨、硫酸铵及硝酸铵相比( $\alpha=0.05$ ),均达到显著水

平。氮源对各菌株菌丝生物量影响顺序为,菌株 ZY01:麸皮>蛋白胨>硝酸铵>硫酸铵>尿素;菌株 ZY02:蛋白胨>麸皮>硝酸铵>硫酸铵>尿素;菌株 ZY03:麸皮>蛋白胨>硫酸铵>硝酸铵>尿素;菌株 ZY04:蛋白胨>硫酸铵>硝酸铵>麸皮>尿素。氮源对各菌株胞外多糖产量影响顺序为,菌株 ZY01:麸皮>尿素>硫酸铵>蛋白胨>硝酸铵;菌株 ZY02:尿素>硫酸铵>硝酸铵>麸皮>蛋白胨;菌株 ZY03:麸皮>尿素>蛋白胨>硫酸铵>硝酸铵;菌株 ZY04、ZY05:尿素>麸皮>硝酸铵>硫酸铵>蛋白胨。

因此,不同氮源对荷叶离褶伞各菌株菌丝生物量及

表 2 不同氮源对荷叶离褶伞菌丝生物量和胞外多糖产量变化的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on the mycelial biomass of *Lyophyllum decastes*

氮源	生物量 Biomass/g · L <sup>-1</sup>					胞外多糖产量 Exopolysaccharide production/mg · L <sup>-1</sup>				
Nitrogen source	ZY01	ZY02	ZY03	ZY04	ZY05	ZY01	ZY02	ZY03	ZY04	ZY05
麸皮 Offals	7.307 aA	10.849 bB	5.192 aA	2.757 cBC	5.207 aA	5.5060 aA	1.9134 bcB	7.7481 aA	5.2639 abAB	6.3685 aA
蛋白胨 Peptone	4.695 bB	12.626 aA	3.667 bB	7.895 aA	3.656 bB	3.6623 bAB	1.0366 cC	5.0389 cC	3.3816 cC	4.0003 bB
硫酸铵 Ammonium sulfate	4.136 bB	7.118 cC	3.650 bB	4.740 bB	3.142 bcB	4.3404 abA	2.6728 bB	4.5003 dCD	4.5960 bcB	4.5394 bB
硝酸铵 Ammonium nitrate	4.481 bB	7.843 cC	2.616 bcB	4.242 bcB	2.594 cB	3.0855 bB	2.6531 bB	3.9371 cD	4.6184 bcB	4.6186 bB
尿素 Urea	0.231 cC	0.086 dC	0.979 cC	0.640 dC	0.448 cC	5.4252 aA	6.5567 aA	5.8024 bB	6.0537 aA	6.6504 aA

胞外多糖产量影响不同,麸皮是菌株 ZY01、ZY03 以生物量及胞外多糖产量为液体发酵目标的理想氮源;蛋白胨是菌株 ZY02、ZY04 以生物量及胞外多糖产量为液体发酵目标的理想氮源;麸皮、尿素是菌株 ZY05 分别以生物量、胞外多糖产量为液体发酵目标的理想氮源。

### 2.3 适宜液体发酵菌株的确定

由图 1、2 可知,在不同浓度的蔗糖、蛋白胨共同作用下,荷叶离褶伞菌丝生物量及胞外多糖产量均达到最大值,分别为 12.626 g/L、11.5148 mg/L。因此,菌株 ZY02、ZY03 是分别以菌丝生物量与胞外多糖产量为发酵指标的适宜菌株,其最适碳氮源分别为蔗糖、蛋白胨。

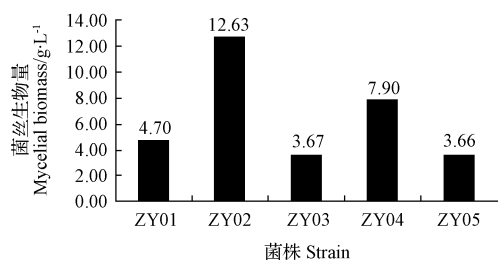


图 1 不同荷叶离褶伞菌株菌丝生物量

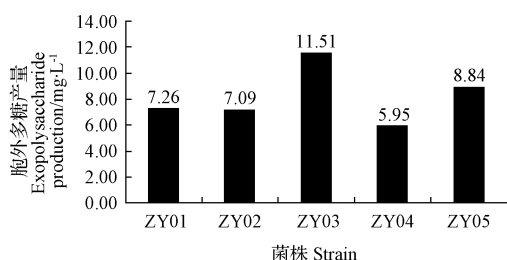
Fig. 1 Mycelial biomass of different strains of *Lyophyllum decastes*

图 2 不同荷叶离褶伞菌株胞外多糖的产量

Fig. 2 Exopolysaccharide production of different strains of *Lyophyllum decastes*

### 3 结论与讨论

不同碳氮源对荷叶离褶伞各菌株菌丝生物量及胞外多糖产量影响不同,菌株 ZY01、ZY02 及 ZY03 以菌丝生物量及胞外多糖产量为发酵指标的最适碳源是蔗糖,

以后者为发酵指标的最适氮源分别是麸皮、尿素、麸皮,以前者为发酵指标的最适氮源分别为麸皮、蛋白胨及麸皮;菌株 ZY04、ZY05 以前者作发酵指标的最适碳源是葡萄糖,最适氮源是蛋白胨,以后者为发酵指标的最适碳源是蔗糖,最适氮源分别是尿素、蛋白胨。以不同浓度的蔗糖与蛋白胨的组合下,菌株 ZY02 菌丝生物量及 ZY03 胞外多糖产量均达到最大值。总之,不同碳氮源对胞外多糖产量与菌丝生物量的影响不呈正相关,菌株 ZY02、ZY03 是分别以菌丝生物量与胞外多糖产量为发酵指标的适宜菌株。

目前,随着人们保健意识的日益重视,食用菌生物活性多糖因其多种生理和药理作用而越来越被诸多科研工作者所青睐<sup>[22-23]</sup>,因此,以胞外多糖、菌丝体生物量、氨基酸含量等目标的液体发酵研究逐渐成为热点,如层孔菌<sup>[14]</sup>、灰树花<sup>[17]</sup>、云芝<sup>[24]</sup>等。该试验以菌丝体生物量和胞外多糖量为指标,分别对 5 株荷叶离褶伞菌株进行液体发酵试验,确定出该菌各菌株的最适碳源、氮源及适合发酵菌株,结果证实了碳源、氮源种类及其质量浓度能够显著影响菌体生长及其代谢产物的生成<sup>[25]</sup>,如 2%蔗糖与 0.2%蛋白胨组合下,菌株 ZY01、ZY02、ZY03、ZY04、ZY05 的生物量依次为 4.695、12.626、3.667、7.895、3.656 g/L,胞外多糖产量依次为 3.6623、1.0366、5.0389、3.3816、4.0003 mg/L;2%蔗糖与 0.3%蛋白胨组合下,生物量依次为 1.192、1.275、0.489、6.086、1.603 g/L,胞外多糖产量依次为 7.2607、7.0877、11.5148、5.9450、8.8387 mg/L,以上 2 种组合中,菌株 ZY02、ZY03 分别以生物量、胞外多糖产量为该试验最高值,而菌株 ZY03、ZY02 分别又以菌丝生物量与胞外多糖产量为该试验最低值。因此,有待对以上碳氮源不同的浓度下 2 种以上组合进行更加深入的研究。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 席亚丽,茆爱丽,王晓琴,等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白营养价值评价[J]. 菌物学报,2010,29(4):603-607.
- [3] 席亚丽,王治江,王晓琴,等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体和发酵液营养成分比较分析[J]. 食品科学,2010,31(6):155-157.
- [4] Pokhrel C P, Ohga S. Submerged culture conditions for mycelial yield



and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*[J]. Food Chemistry, 2007,105(2):641-646.

[5] Ukawa Y, Ito H, Hisamatsu M. Antitumor effects of (1→3)-beta-D-glucan and (1→6)-beta-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, *Hatakesimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000,90(1):98-104.

[6] Ukawa Y, Furuichi Y, Kokean Y, et al. Effect of *Hatakesimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom on serum lipid levels in rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2002,48(1):73-76.

[7] Miura T, Kubo M, Itoh Y, et al. Antidiabetic activity of *Lyophyllum decastes* in genetically type 2 diabetic mice[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002,25(9):1234-1237.

[8] Nakamura T, Itokawa Y, Tajima M, et al. Radioprotective effect of *Lyophyllum decastes* and the effect on immunological functions in irradiated mice[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007,27(1):70-75.

[9] 张汉斌,王治江,席亚丽,等. 荷叶离褶伞中试发酵条件与培养基优化研究[J]. 中国酿造, 2012,31(1):96-99.

[10] Ukawa Y, Izumi Y, Ohbuchi T, et al. Oral administration of the extract from *Hatakesimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2007,53(3):293-296.

[11] 张汉斌,张芬琴,王小明,等. 荷叶离褶伞子实体营养成分分析与评价[J]. 菌物学报, 2008,27(5):696-700.

[12] 张春梅,宋海,魏生龙. 荷叶离褶伞菌丝体多糖的提取及还原力的研究[J]. 中国食用菌, 2012,31(6):44-48.

[13] 张凤琴,李彩霞,李鹏,等. 荷叶离褶伞可溶性多糖提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(5):224-225.

[14] 余海尤,曹春蕾,崔宝凯. 忍冬木层孔菌液体培养过程中多酚含量及抗氧化活性研究[J]. 菌物学报, 2012,31(6):933-939.

[15] 谢占玲,何智媛,唐龙清,等. 五株羊肚菌碳、氮源及适合发酵菌株的筛选[J]. 食用菌学报, 2009,16(1):43-46.

[16] 叶明,陈吴西,彭伟,等. 分批与流加培养对蕈状粒毛盘菌生物量和胞外多糖产量的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2010,36(6):630-634.

[17] Shih I L, Chou B W, Chen C C, et al. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Gri-fola frondosa* [J]. Bioresource Technology, 2008,99(4):785-793.

[18] Vinarta S C, Molina O E, Figueroa L C, et al. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii* [J]. Food Hydrocolloids, 2006,20(5):619-629.

[19] 徐鹏,钱竹,董亮,等. 灵芝深层发酵生产胞外多糖和灵芝酸的动力学分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008,14(4):562-565.

[20] Cui J, Chisti Y. Polysaccharides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, use, and production[J]. Biotechnology Advances, 2003,21:109-122.

[21] 苗志玉,张微帷,何兵. 鲜块菌片热风干燥工艺参数的优化[J]. 现代食品科技, 2013,29(1):162-166.

[22] Leung M Y K, Liu C, Koon J C M, et al. Polysaccharide biological response modifiers[J]. Immunology Letters, 2006,105:101-114.

[23] Wasser S P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002,60:258-274.

[24] Cui J, Kim Tha Goh K, Archer R, et al. Characterisation and bioactivity of protein bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* W-74 and ATCC-20545 strains[J]. Microbiol Biotechnol, 2007,34:393-402.

[25] Huang H C, Liu Y C. Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Gri-fola umbellata* [J]. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 2008,39(4):307-311.

## Screening of Different Carbon and Nitrogen Sources and Suitable for Fermentation on Five Strains of *Lyophyllum decastes*

ZHOU Hui-ming<sup>1</sup>, ZHANG Yan-zhen<sup>1</sup>, XI Ya-li<sup>2</sup>, WEI Sheng-long<sup>2</sup>

(1. Lincang Teachers' College, Lincang, Yunnan 677000; 2. Mushroom Research Institute, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000)

**Abstract:** Taking *Lyophyllum decastes* as material, the effects of different C and N-sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production by five strains of *Lyophyllum decastes* were studied by single factor liquid fermentation experiment. The aim was to screen the optimum C-sources, N-sources and suitable fermenting strains for *Lyophyllum decastes* liquid culture, which was the basis of exploring its main factory fermentation. The results showed that the best C-source of strains ZY01, ZY02 and ZY03 was sucrose, the best N-source was peptone, followed by offals, urea. The mycelium biomass of strains ZY04 and ZY05 was most with glucose and peptone as optimum C and N-sources, sucrose was the best C-sources for its exopolysaccharide yield, the best N-sources was respectively urea, peptone. The mycelium biomass (12.626 g/L) and exopolysaccharide production (11.5148 mg/L) of strain ZY02 was most with combination of 2% sucrose+0.2% peptone and 2% sucrose+0.3% peptone, respectively. Therefore, the effect of different C and N-sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production was not a positive correlation, strain ZY02 and ZY03 was respectively the suitable fermenting strains of two kinds of indicators.

**Key words:** *Lyophyllum decastes*; submerged culture; carbon source; nitrogen source; mycelia biomass; exopolysaccharid