

红缘拟层孔菌液体发酵培养基配方的研究

马琳¹, 徐田田¹, 张铁军²

1 天津中医药大学, 天津 300193;

2 天津药物研究院, 天津 300193

摘要 目的: 研究不同培养基组成成分对红缘拟层孔菌菌丝产量和多糖量的影响, 优选出的红缘拟层孔菌液体发酵培养基的最佳配方。方法: 以菌丝体生物量和胞内多糖的量为指标, 通过单因素试验确定液体培养基中最佳碳源、氮源及维生素 B₁ 的用量。通过 L₉(3⁴)正交试验确定红缘拟层孔菌的液体发酵培养基配方的最佳组合。结果: 优选出的红缘拟层孔菌液体发酵培养基最佳配方为 (g/100 mL): 大米粉 5, 酵母粉 1, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.15, 维生素 B₁ 0.04。结论: 优选出红缘拟层孔菌的液体发酵培养基的最佳配方, 为今后大规模液体发酵研究奠定了基础。

关键词 红缘拟层孔菌; 液体发酵; 正交设计试验; 多糖

中图分类号: Q93-335

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0121-04

Study on culture medium composition for liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola*

MA Lin¹, XU Tian-tian¹, ZHANG Tie-jun²

1 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To study the optimal culture medium composition for the liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola*. **Methods:** Taking the mycelial biomass and production of polysaccharide as detecting indices, the optimum submerged fermentation parameters for *F. pinicola* were studied by single factor test and orthogonal test. **Results:** The optimal formula for liquid fermentation (g/100 mL) were: rice powder 5, yeast 1, KH₂PO₃ 0.1, MgSO₄ 0.15, and VB₁ 0.04. **Conclusion:** The optimal medium composition for the liquid fermentation of *F. pinicola* has been selected, which provides the scientific basis for the further research of *F. pinicola*.

Key words *Fomitopsis pinicola*; liquid fermentation; orthogonal test; polysaccharide

红缘拟层孔菌 *Fomitopsis pinicola* 为非褶菌目多孔菌科拟层孔菌属的真菌子实体^[1], 主要有效成分是多糖。国内外有报道, 从红缘拟层孔菌中提取的水溶性多糖对小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能有明显的刺激作用, 可增加小鼠肝脏、脾脏的质量, 并对由四氯化碳所致肝损伤具有一定的保护作用^[2,3]。由于子实体生长周期长, 自然资源较稀少。本试验利用单因素和正交设计试验筛选并优化出多糖的量最高的液体培养基配方, 为将来大规模人工发酵培养扩大资源奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

立式压力蒸汽灭菌锅 YXQ-LS-50 S11 (上海博讯实业有限公司); 电热恒温立式摇床 SYC-L (上海联环生物工程设备有限公司); 生化培养箱 SPX-150B5-11 (上海新苗医疗器械制造有限公司); 751G 分光光度计 (上海分析仪器厂); 电热恒温干燥箱 (天津实验仪器厂); TD6001 电子天平 (百分之一天平, METTLER TOLEDO); AB204N 电子天平 (万分之一电子天平, 上海精密仪器有限公司); BP211D 电子天平 (十万分之一电子天平, Sartorius); 电热套 KDM 型常温电热套 (山东鄞城赛科仪器设备厂); GH802-2 单人垂直净化工作台 (天津生物洁净设备厂); pH 计 (上海之信仪器有限公司);

收稿日期: 2010-02-25

作者简介: 马琳 (1963—), 女, 天津中医药大学中药学院教授, 硕导。研究方向: 中药生物工程。Tel: (022)23052242, E-mail: malin7983@yahoo.com

离心机 LD4-2A (北京医用离心机厂)。

1.2 主要试剂

葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、琼脂、硫酸铵、维生素 B₁、蕙酮、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、98% 浓硫酸、稀盐酸 (1%)、稀氢氧化钠 (1%)、95% 乙醇。

1.3 培养基原料

大米粉、马铃薯、玉米面、麸皮、黄豆面、小米面为食品级。

1.4 菌种

自红缘拟层孔菌 *Fomitopsis pinicola* (天津中医药大学教授马琳鉴定) 子实体中分离得到。

2 方法

2.1 培养

2.1.1 液体菌种的制备

液体培养基配方 (g/100 mL): 葡萄糖 3、蛋白胨 0.3、酵母粉 0.2、硫酸铵 0.2、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05。

2.1.2 一级摇瓶菌种的培养

250 mL 摇瓶装液体培养基 100 mL, 接入在 28 °C 下活化 2 d 的斜面母种 4 块, 每块约 0.5 cm², 置旋转式摇床, 转速 130 r/min, 28 °C 震荡培养 5 d, 即得一级液体摇瓶菌种, 备用。

2.1.3 二级摇瓶菌种的培养

250 mL 摇瓶装液体培养基 80 mL, 接种量 25%, 即接入 20 mL 一级摇瓶培养液, 置旋转式摇床, 转速 130 r/min, 28 °C 震荡培养 5 d, 得二级液体摇瓶菌种, 备用。

2.2 液体培养基中各种营养成分的筛选

2.2.1 液体培养基氮源的选择

选择 6 种常见的有机氮源, 分别为: 酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、麸皮、豆粕、玉米粉, 试验质量浓度为 1 g/100 mL。培养基其他组成成分为 (g/100 mL): 葡萄糖 3、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、维生素 B₁ 0.1。采用 250 mL 摇瓶进行震荡培养, 摇瓶

装液量 80 mL, 接种量 25%, 每种氮源重复做 8 瓶, 培养温度 28 °C, 转数 130 r/min, 培养 6 d, 测定菌丝干质量和多糖的量。

2.2.2 液体培养基碳源的选择

本试验选择了 6 种常见的原料作碳源, 分别为: 葡萄糖、蔗糖、大米粉、玉米粉、小米面、黄豆面, 试验质量浓度均为 3 g/100 mL。培养基其他组成成分为 (g/100 mL): 酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、维生素 B₁ 0.1。250 mL 摇瓶震荡培养, 摇瓶装液量 80 mL, 接种量 25%, 每种碳源重复做 8 瓶, 培养温度 28 °C, 转数 130 r/min, 培养 6 d, 测定菌丝干质量和多糖的量。

2.2.3 液体培养中维生素 B₁ 用量的选择

维生素 B₁ 的质量浓度 (g/100 mL) 分别设为 0.025、0.040、0.050、0.060。培养基其他组成成分为 (g/100 mL): 大米面 3、酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05。250 mL 摇瓶震荡培养, 摇瓶装液量 80 mL, 接种量 25%, 每种碳源重复做 8 瓶, 培养温度 28 °C, 转数 130 r/min, 培养 6 d, 测定菌丝干质量和多糖的量。

2.2.4 优化培养基配方的确定

在单因素分析结果的基础之上, 分别以大米粉、酵母粉、磷酸二氢钾、无水硫酸镁为因素, 按照 L₉(3⁴) 正交表设计试验 (表 1)。250 mL 摇瓶震荡培养, 摇瓶装液量 80 mL, 接种量 25%, 每组设 8 次重复, 培养温度 28 °C, 转数 130 r/min, 培养 6 d, 测定菌丝干质量和多糖的量。

2.3 测定

2.3.1 菌丝产量的测定

发酵液用两层纱布过滤得菌丝, 用清水冲洗干净, 置烘箱 60 °C 烘干至恒重, 称量。

2.3.2 多糖的量测定

蕙酮硫酸法^[4]。

3 结果与分析

3.1 培养基成分对菌丝产量和多糖的量的影响

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水	因素/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)			
	A (大米粉)	B (酵母粉)	C (磷酸二氢钾)	D (硫酸镁)
1	3	1	0.1	0.05
2	4	2	0.2	0.10
3	5	3	0.3	0.15

3.1.1 液体培养基中氮源的确定

由表2可见,不同氮源对液体培养菌丝的生长量和多糖的量影响明显。其中,含酵母粉的液体培养基既能促进菌丝生长,又能提高多糖的量,产生的多糖总质量为87.05 mg,明显高于其他组。

3.1.2 液体培养基中碳源的确定

由表3可见,红缘拟层孔菌丝对碳源的利用相

当广泛,对单糖、寡糖、多糖均可利用,碳源为大米粉组虽然菌丝生物量只有5.59 g,但是多糖的质量分数高达3.27%,多糖质量为182.79 mg,在6组中最高。

3.1.3 液体培养基维生素B₁用量的确定

由表4可以看出,维生素B₁用量为0.040 g/100mL时菌丝的多糖的量最高,多糖质量达到118.67 mg。

表2 不同氮源对液体发酵的菌丝产量和多糖质量的影响

Table 2 Effect of different nitrogen on mycelia yield and polysaccharide content

氮源	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
酵母粉	2.79	3.12	87.05
蛋白胨	1.45	0.61	8.85
牛肉膏	2.59	0.35	9.07
麸皮	1.78	0.37	6.59
豆粕	2.00	0.48	9.60

表3 不同碳源对液体发酵的菌丝生物量和多糖质量的影响

Table 3 Effect of different carbon on mycelia yield and polysaccharide content

碳源	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
葡萄糖	3.03	0.71	21.51
蔗糖	3.69	0.45	16.61
大米粉	5.59	3.27	182.79
玉米粉	4.67	3.00	140.10
小米面	6.47	2.77	179.22
黄豆面	7.12	0.43	30.62

表4 维生素B₁用量对液体发酵的菌丝产量和多糖质量的影响Table 4 Effect of different concentration of VB₁ on mycelia yield and polysaccharide content

VB ₁ / (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
0.025	7.07	0.56	39.59
0.040	6.38	1.86	118.67
0.050	7.43	0.64	47.55
0.060	7.07	0.54	38.18

3.1.4 优化培养基配方的确定

采用直观分析法分析正交结果(表5),第8组A₃B₂C₁D₃液体发酵培养基多糖产量最高,为0.317 9 g。由极差可以看出,各因素对多糖总量的影响大小为:A>B>D>C,即大米粉是影响多糖产量的最主要因素,其次为酵母粉、硫酸镁和磷酸二氢钾。分析每个因素3水平之间是否有差距,数据处理后显示依照此方法确定理论最优

方案为:A₃B₁C₁D₃。将已做试验的A₃B₂C₁D₃的组合和未做过试验的A₃B₁C₁D₃的组合进行对比试验,8次重复,称量菌丝干质量并测定多糖的量。结果如表6,测得A₃B₁C₁D₃组的多糖总质量为341.63 mg,高于A₃B₂C₁D₃的289.25 mg。由此确定红缘拟层孔菌深层发酵液配方为(g/100mL):大米粉5、酵母粉1、磷酸二氢钾0.1、硫酸镁0.15、维生素B₁0.040。

表 5 L₉(3⁴) 正交实验设计及测定结果
Table 5 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A(大米粉)/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	B(酵母粉)/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	C(KH ₂ PO ₄)/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	D(MgSO ₄)/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	多糖质量/mg
1	3	1	0.1	0.05	93.98
2	3	2	0.2	0.10	18.94
3	3	3	0.3	0.15	61.86
4	4	1	0.2	0.15	174.93
5	4	2	0.3	0.05	120.87
7	5	1	0.3	0.10	293.84
8	5	2	0.1	0.15	317.72
9	5	3	0.2	0.05	264.38
K _{1j}	174.78	562.75	532.57	439.26	
K _{2j}	376.70	417.56	458.25	433.65	
K _{3j}	875.94	447.11	436.60	554.51	
R _{1j}	58.26	187.58	177.52	146.42	T=1427.42
R _{2j}	125.57	139.19	152.75	144.55	
R _{3j}	291.98	149.04	145.53	184.84	
R _j	233.72	48.39	31.99	40.29	

表 6 验证试验
Table 6 Verification test

分组	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	8.90	3.25	289.25
A ₃ B ₁ C ₁ D ₃	9.96	3.43	341.63

4 讨论

有机氮源除含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸之外，往往还含有少量糖、脂肪、微量元素及维生素、生长素等，对绝大多数药用真菌，有机氮源比无机氮源更适合菌体的生长。因此本试验均采用了有机氮源。酵母粉的主要成分是经过降解的蛋白质、氨基酸、核苷酸、维生素、生长素、微量元素等营养物质，符合微生物生产所需的营养配比。生物利用度高，微生物的利用速率快，特别有利于对发酵培养基比较挑剔的营养缺陷型真菌的吸收利用，有助于缩短发酵周期，提高微生物发酵效价；同时发酵残留非常少，有利于发酵废液的环保处理。因此选择酵母粉做培养基的氮源。真菌是维生素 B₁ 的天然缺陷型，维生素 B₁ 对真菌的生长相当重要，

它们以一种辅酶的形式存在，必须外界添加才能生长良好。维生素 B₁ 添加量对菌丝多糖的量影响较大，因此要注意维生素 B₁ 添加量的确定。

参考文献：

[1] 肖林榕, 林莉. 菌类本草[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003, 10:113-114.

[2] 张丽萍, 张翼伸. 红缘层孔菌多糖生理活性的初步研究[J]. 东北师大学报(自然科学版), 1988, 4:109-114.

[3] 张丽萍, 苗春艳, 许丽艳. 红缘层孔菌多糖对小鼠核酸蛋白质合成及对肿瘤 S-180 病毒 CBV-3、HSV- I 细胞增殖的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 1993, 2:104-108.

[4] 马玲. 3 种食用菌中多糖的提取与鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(2):174-175.