

红缘拟层孔菌液体发酵培养液条件的研究

徐田田¹, 马琳^{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: 研究不同培养条件对红缘拟层孔菌菌丝产量和多糖量的影响。方法: 通过单因素试验确定液体发酵培养的最佳温度、起始 pH 值、摇瓶装液量、接种量、摇床转速和发酵天数。结果: 最适菌丝液体发酵的条件是培养温度 28℃, 发酵液起始 pH 6.5, 250 mL 摇瓶装 40 mL 培养液, 接种量 30%, 摇床转速 175 r/min, 发酵 9 d。结论: 优选的培养条件有利于提高红缘拟层孔菌菌丝产量和多糖的量。

关键词 红缘拟层孔菌; 液体发酵; 粗多糖

中图分类号: Q93-335 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0275-04

Study on culture conditions for the liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola*

XU Tian-tian¹, MA Lin¹, 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 investigate different culture conditions affecting on the mycelia yield and polysaccharide content of *Fomitopsis pinicola*. **Methods:** To select the optimum temperature, pH, medium volume, amount of inoculation, shaking speed and fermentation period. **Results:** The most optimal liquid fermentation conditions were: culture temperature 28℃, pH 6.5, 40 mL medium in 250 mL flask, inoculum size 30%, shaker rotation speed 175 r/min, fermentation period 9 d. **Conclusion:** Optimal culture conditions are conducive to raising the mycelia yield and polysaccharide content of *Fomitopsis pinicola*.

Key words *Fomitopsis pinicola*; liquid fermentation; 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, 又名红缘层孔菌、红缘树舌^[1]。此菌含抗氧化和抗癌物质, 对小白鼠肉瘤 S180 的抑制率达 70%^[2,3]。本课题组前期筛选出了最优的液体培养基配方^[4], 本试验利用单因素试验优选出多糖产量最高的液体培养条件, 为将来大规模人工发酵培养奠定基础。

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 (Mettler Toledo); AB204N 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, Sarlorius); 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); 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、萘酮、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、98%

收稿日期: 2010-02-25

作者简介: 徐田田 (1984—), 女, 天津中医药大学 2007 级生药学硕士研究生。研究方向: 中药生物工程。Tel: (022) 23052242

E-mail: zhaozhao8420@163.com

* 通讯作者 马琳, 天津中医药大学中药学院教授, 硕士生导师。E-mail: malin7983@yahoo.com

浓硫酸、1%稀盐酸、1%稀氢氧化钠、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

从红缘拟层孔菌 *Fomitopsis pinicola* 子实体(经天津中医药大学马琳教授鉴定)中分离、培养的液体摇瓶菌种。

2 方法

2.1 液体发酵条件对菌丝干质量和多糖量的影响

2.1.1 培养温度对菌丝产量和多糖量的影响

药用真菌菌丝的增殖及次生代谢产物的产生都在各种酶的催化下进行。以生产次生代谢产物为目的的培养,其最适温度也可能与菌丝生长的最适温度不同^[1]。

本试验设4个温度梯度。将250 mL摇瓶内装液体培养基80 mL,接种量为25%,pH值自然,分别置于20℃、24℃、28℃、32℃的摇床内震荡培养,每组4瓶,转速130 r/min,培养6 d,测定菌丝干质量和多糖的量。

2.1.2 培养基起始 pH 值对菌丝产量和多糖量的影响

本试验设计4个pH值梯度,分别为4.5、5.5、6.5、7.5,每组4瓶。250 mL摇瓶内装液体培养基80 mL,用稀盐酸和稀氢氧化钠调成所需pH值,接种量25%,培养温度28℃,转速130 r/min,培养6 d,测定菌丝干质量和多糖的量。

2.1.3 摇瓶装液量对菌丝产量和多糖量的影响

向250 mL摇瓶内分别加入40、60、80、100 mL培养基,每组4瓶,pH值调至6.5。高压灭菌后,接摇瓶种子(种龄5 d)20 mL,温度28℃,130 r/min,培养6 d,测菌丝干质量和多糖的量。

2.1.4 接种量对菌丝产量和多糖量的影响

在250 mL摇瓶内装液体培养基60 mL,pH值调至6.5,接种量分别为10%、20%、30%、40%,

既分别接种6、12、18、24 mL,每组4瓶。温度28℃,130 r/min,培养6 d,测菌丝干质量和多糖的量。

2.1.5 摇床转速对菌丝产量和多糖量的影响

250 mL摇瓶内装液体培养基60 mL,pH值调至6.5,接种量30%,温度28℃,转速分别为90、110、130、150、175 r/min,每组4瓶。培养6 d,测菌丝干质量和多糖的量。

2.1.6 发酵天数对菌丝产量和多糖量的影响

向250 mL摇瓶内装液体培养基60 mL,pH值调至6.5,高压灭菌后,接摇瓶种子(种龄5 d)24 mL,温度28℃,130 r/min,分别培养3、5、7、9、11 d,每组4瓶。观察记录菌丝生长情况并测菌丝干质量和多糖的量。

2.2 测定

2.2.1 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℃烘干至恒重,称质量。

2.2.2 多糖量测定

蒽酮硫酸法^[5]。

3 结果与分析

3.1 培养温度对菌丝产量和多糖量的影响

温度是影响真菌丝生长最重要的因素之一,每种菌丝生长都有其最低、最高、最适温度。由表1可以看出,在20℃和32℃菌丝菌丝生长情况较差,在24℃和28℃菌丝生长较好,且多糖的量也较高。在28℃时,多糖的量最高。

3.2 培养基起始 pH 值对菌丝产量和多糖量的影响

培养液的pH值,对菌丝多糖的积累有至关重要的影响。由表2可以看出,在不同pH值下,菌丝的产量没有明显区别,但在pH值为4.5~5.5时,多糖的量较低,在pH值为6.5~7.5时多糖的量较高,并在pH值6.5时多糖的量最高。说明在pH值为6.5时,菌丝内酶的活性和微量元素的综合利用率最高,最适合胞内多糖的积累。

表 1 不同培养温度对菌丝产量和多糖量的影响

Table 1 Effect of different cultivating temperatures on mycelia yield and polysaccharide content

温度/℃	菌丝干质量/g	多糖的质量分数/%	多糖质量/mg
20	7.06	0.78	55.07
24	9.74	0.99	96.43
28	10.06	1.01	101.61
32	8.76	0.92	80.59

表2 不同起始 pH 值对菌丝产量和多糖量的影响

Table 2 Effect of different cultivating temperatures on mycelia yield and polysaccharide content

pH 值	菌丝干质量/g	多糖的质量分数/%	多糖质量/mg
4.5	9.22	0.62	57.16
5.5	9.92	0.79	78.37
6.5	9.64	1.86	179.30
7.5	10.06	0.93	93.56

3.3 摇瓶装液量对菌丝产量和多糖量的影响

装液体培养基量较少时, 营养物质较少, 影响了菌丝生长, 不利于多糖的积累。由表 3 看出, 装液量为 60 mL 或 80 mL 时, 菌丝产量和多糖的量均较高, 在装液量 60 mL 多糖产量最多, 达到 259.12 mg。

3.4 接种量对菌丝产量和多糖量的影响

接种量过少, 菌丝成活力低, 所形成的菌球数量少且体积较大, 菌球中间的菌丝呈现饥饿状态, 营养吸收不足, 不利于菌丝产量的增加。接种量太大, 菌丝一开始生长旺盛, 形成较多小菌球, 但后期生长缓慢, 可能与培养液内营养成分不足有关, 因而多糖的量较低。由表 4 看出, 接种量为 30% 时, 多糖的量最高。

3.5 摇床转速对菌丝产量和多糖量的影响

摇床转速对菌丝的液体培养主要体现在两方面, 一是能在转动中增加通气量, 二是转动产生的机械力可以使生长出的菌球小而均匀, 增加产量。转速过慢, 培养液中长成的菌球过大, 不利于菌丝的生长。由表 5 看出, 转速为 175 r/min 时, 虽然菌丝产量不是最高, 但胞内多糖的质量分数最高, 多糖产量也最多。

3.6 发酵天数对菌丝产量和多糖量的影响

由表 6、图 1 看出, 在培养 7 d 时, 菌丝产量一直增加, 到 9 d 时, 多糖的质量分数最高, 多糖产量也最高。在 11 d 时, 菌丝产量和多糖的量最低, 说明培养时间过长, 菌球发生自溶。

表3 摇瓶装液量对菌丝产量和多糖量的影响

Table 3 Effect of medium volume in shaking bottles on mycelia yield and polysaccharide content

装液量/mL	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
40	6.92	0.69	47.75
60	9.06	2.86	259.12
80	10.12	1.59	160.91
100	8.88	0.75	66.60

表4 接种量对菌丝产量和多糖量的影响

Table 4 Effect of amount of inoculation on mycelia production and polysaccharide content

接种量/%	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
10	9.74	0.99	96.43
20	10.20	0.75	76.50
30	9.76	1.32	128.83
40	10.70	0.36	38.52

表5 摇床转速对菌丝产量和多糖量的影响

Table 5 Effect of shaking speed on mycelia yield and polysaccharide content

转速/(r · min ⁻¹)	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
90	9.32	0.69	64.31
110	7.14	0.85	60.69
130	10.26	0.71	72.85
150	8.50	2.32	197.20
175	8.06	2.59	208.75

表 6 发酵天数对菌丝产量和多糖量的影响

Table 6 Effect of fermentation period on mycelia yield and polysaccharide content

培养天数/d	菌丝干质量/g	多糖质量分数/%	多糖质量/mg
3	10.66	0.95	101.27
5	10.94	1.11	121.43
7	11.42	1.23	140.47
9	8.44	3.38	285.27
11	6.62	0.70	46.34

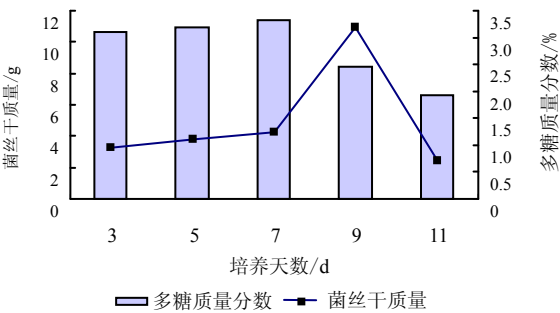


图 1 菌丝生长曲线

Fig.1 Growth curve of hyphae

4 讨论

本试验对红缘拟层孔菌液体发酵条件如温度、发酵液起始 pH、摇瓶装样量、接种量、摇床转速和发酵天数对菌丝产量和多糖的量的影响进行了系统研究。试验中发现，由于液体发酵培养基分别添加了酵母粉、大米粉、玉米粉等，为浑浊粘稠状液体且带有颜色，会影响 pH 试纸的显色反应，造成调节 pH 值的偏差，建议应用 pH 计调节液体发酵培养

液的 pH 值。液体培养过程中，菌球数量经历了由少到多，而后再变少的过程。在培养 7 d 时，菌丝产量一直增加，到 9 d 时，多糖质量分数最高，多糖产量也最高。在 11 d 时，菌丝产量和多糖的量最低，说明培养时间过长，菌球中菌丝发生自溶。由此可见，液体发酵培养时间的选择对菌丝产量及有效成分的量极为重要。

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] Choi D B, Park S S. Effects of Fomitopsis pinicola extracts on antioxidant and antitumor activities [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12: 516-524.

[3] 应建浙. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 12: 139.

[4] 马 琳, 徐田田, 张铁军. 红缘拟层孔菌液体发酵培养基配方的研究[J]. *药物评价研究*, 2010, 33 (2): 121-124.

[5] 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.