文章编号:1009-038X(2002)02-0135-05

营养因子对鸡腿蘑分泌胞外多糖的影响

曾嵋涓, 章克昌
(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:结合工业发酵的特点,研究了营养因子对鸡腿蘑(毛头鬼伞)胞外多糖产量的影响,筛选到适合其胞外多糖分泌的优化培养基配方:葡萄糖2.0%,玉米粉(60目)1.0%,麸皮粉(60目)0.3%,VB_1 10 mg/L,KH_2PO_4 0.1%,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%,在此基础上进行摇瓶发酵曲线的测定,确定生产胞外多糖的适宜发酵周期为4 d,发酵液中产量最高可达96.3 mg/dL.

关键词:毛头鬼伞;胞外多糖;营养因子
中图分类号:S 646 **文献标识码**:A

Effects of Nutrition Factors on the Xield of Extracelluar Polysaccharide of *Coprinus comatus*

ZENG Mei-juan, ZHANG Ke-chang
(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Considering the traits of the fermentation industry, the effects of the nutrition factors on the yield of extracelluar polysaccharide of *Coprinus comatus* was studied. An optimum medium was selected through orthogonal test. The medium composition was as follows: 2.0% glucose, 1.0% maize powder, 0.3% bran powder, 10 mg/L VB_1, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. The mycelia of the *Coprinus comatus* were grown in the medium, and the time-course of growth in shaking flask was determined. The results showed that under these conditions, the maximum crude extracelluar polysaccharide yield was 96.3 mg/dL, when the mycelia had been cultured about 4 days in the shaking flask.

Key words: *Coprinus comatus*; extracelluar polysaccharide; nutrition factors

毛头鬼伞(*Corprinus comatus*),民间称鸡腿蘑,是伞菌科鬼伞属的一种大型真菌.据阿斯顿大学报道,它能降低血糖,并含有治疗糖尿病的有效成分[1].另有研究结果表明,从它的子实体中提取的粗多糖具有较高的免疫活性和抗肿瘤活性[2].国外研究发现,它对铅、银、汞等某些重金属元素具有较好的富集作用,建议用来作为环境污染的指示植物[3].Abraham M等报道鸡腿磨中含有的纤维素酶在木薯粉废料的糖化中很有效[4].可见,鸡腿蘑是一种具有较高应用价值的食药用真菌,应加快开发和推广.

液体深层发酵产胞外多糖是近年来食药用真菌研究的热点,也是缩短生产周期,降低生产成本的有效方法.正是基于以上的出发点,作者进行了

收稿日期:2001-10-24; 修订日期:2001-12-21.
作者简介:曾嵋涓(1977-),女,江苏南京人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

系统的研究.

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种 本实验室保藏菌种.

1.1.2 培养基配方 斜面培养基:综合PDA培养基;液体种子培养基:葡萄糖2.0%,玉米粉1.5%,麸皮粉0.5%,酵母膏0.2%,玉米浆0.5%,KH_2PO_4 0.2%,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3%,$CaCO_3$ 0.05%;发酵基础培养基:葡萄糖2.0%,蛋白胨0.2%,KH_2PO_4 0.2%,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%.

1.2 方法

1.2.1 工艺路线 斜面菌种→液体种子培养基→发酵培养基

1.2.2 胞外多糖的制备与测定 发酵滤液经离心后去沉淀,收集上清液,加入3倍体积95%的乙醇,置4 ℃冰箱过夜,离心,收集沉淀物,60 ℃烘至恒重即得胞外粗多糖,而后称量.

1.2.3 培养条件 (1)斜面菌种在恒温培养箱中培养10~14 d;(2)液体种子在回转式摇床中振荡培养6~7 d (25 ℃,160 r/min);(3)将培养好的液体种子以10%的接种量接入发酵培养基中,在回转式摇床上振荡培养5~6 d (25 ℃,160 r/min).

1.2.4 碳源利用试验 将发酵基础培养基中的碳源分别换成2.0%的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉,每种碳源3次重复,以无碳源为对照,测定胞外粗多糖的产量.综合考虑胞外粗多糖的产量和工业生产成本及操作等因素,选取合适的氮源,进一步确定它的适宜浓度.

1.2.5 氮源利用试验 将发酵基础培养基中的氮源分别换成0.2%的蛋白胨、尿素、硫酸铵、麸皮粉、豆饼粉、酵母膏、谷氨酸、甘氨酸,每种氮源重复3次,以无氮源为对照,测定胞外粗多糖的产量.综合考虑胞外粗多糖的产量和工业发酵的特点,选取合适的氮源,进一步确定它的适宜浓度.

1.2.6 正交试验优化培养基组成 利用1.2.4和1.2.5的试验结果,选取适宜的碳氮源,再选取VB_1和KH_2PO_4与$MgSO_4 \cdot 7H_2O$的组合共4个因素,各取3个水平,进行$L_9(3^4)$正交试验,测定胞外多糖的产量,考察这些因子的协同作用,并确定用量和配比.

2 结果与分析

2.1 碳源对鸡腿蘑胞外多糖产量的影响

从图1可以看出,鸡腿蘑对单糖、双糖、多糖及天然农产品均可利用.发现它在可溶性淀粉中产胞外粗多糖最多,其次是麦芽糖和玉米粉中,对葡萄糖利用也不错,在果糖和蔗糖中胞外多糖较少.但是在工业生产中,采用可溶性淀粉或麦芽糖成本太高,以选用葡萄糖和玉米粉组成的复合碳源为宜.

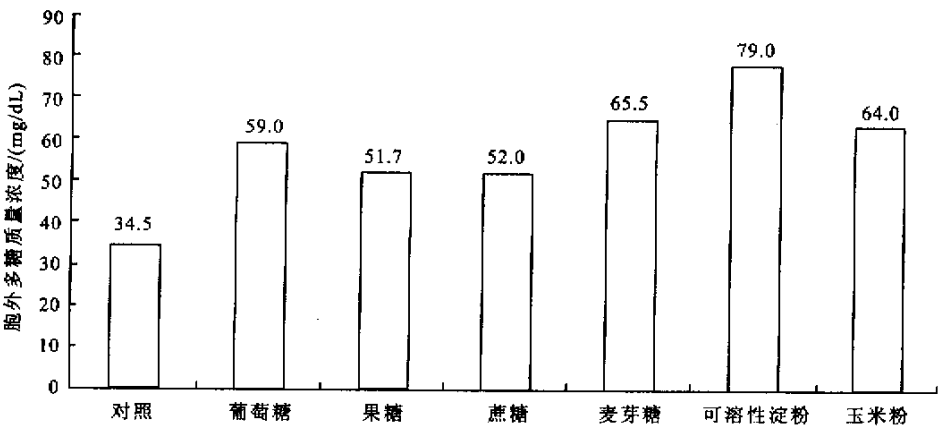

图1 碳源对鸡腿蘑胞外多糖产量的影响

Fig.1 Effect of carbon source on the extracelluar polysaccharide yield of *Coprinus comatus*

据有关食用菌深层培养的报道,葡萄糖质量分数一般选取为2.0%,所以作者以确定玉米粉质量分数为重点.

从表1可以看出,发酵6 d时,在玉米粉质量分数为1.0%和2.0%的培养液中,玉米粉基本耗尽(碘试不呈蓝色),而玉米粉质量分数为2.5%和3.0%的培养液中碘试呈蓝色,说明玉米粉还有较多残留;从胞外粗多糖产量看,随着玉米粉质量分数的递增,胞外多糖产量反而下降,在玉米粉质量分数为3.0%的培养液中胞外多糖明显偏低,可能高

万方数据

质量分数的玉米粉对菌体生长有抑制作用,胞外多糖的产量也相应降低.

表 1　玉米粉质量分数对胞外多糖产量的影响

Tab.1　The effect of concentration of maize power on the extracelluar polysaccharide yield of *Coprinus comatus*

玉米粉质量分数/%	碘试	胞外多糖产量/(mg/dL)
1.5	−	79.9
2.0	−	78.4
2.5	+	73.5
3.0	+	64.0

2.2　氮源对鸡腿蘑胞外多糖产量的影响

分析图 2 可以看出,氮源对胞外多糖产量的影响差异较大.总的来看,鸡腿蘑对有机氮的利用优于无机氮.以蛋白胨效果最好,麸皮粉次之,尿素和谷氨酸效果最差.有机氮如蛋白胨中富含各种氨基酸,这些氨基酸可直接被菌丝吸收利用,所以使用这种多组分复合氮源时,菌丝生长较快,胞外粗多糖产量较高.鸡腿蘑在麸皮粉和豆饼粉等天然植物氮源中分泌胞外多糖也较多.究其原因,一方面可能是这些氮源中含有丰富的蛋白质及多种生长刺激因子;另一方面可能是由于菌体自身分泌的蛋白酶较适合于这类植物蛋白.值得注意的是,在不添加氮源的培养基中,胞外粗多糖的产量为 44 mg/dL,甚至高于添加尿素、谷氨酸、甘氨酸的胞外粗多糖产量,说明添加尿素或某些氨基酸反而抑制菌体向胞外分泌多糖.

综合考虑工业生产的成本等因素,选取麸皮粉为适宜氮源.

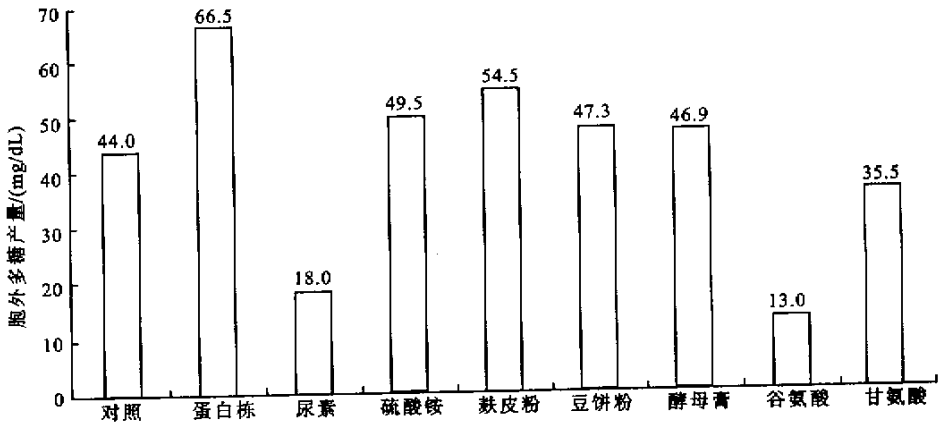

图 2　氮源对鸡腿蘑胞外多糖产量的影响

Fig.2　Effect of nitrogen source on the extracelluar polysaccharide yield of *Coprinus comatus*

实验确定,麸皮粉的适宜质量分数为 0.5%.结果见表 2.

表 2　麸皮粉质量分数对胞外多糖产量的影响

Tab.2　The effect of concentration of bran powder on the extracelluar polysaccharide yield of *Coprinus comatus*

麸皮粉质量分数/%	胞外粗多糖产量/(mg/dL)
0.2	54.2
0.5	54.9
1.0	44.8
1.5	45.6

2.3　正交实验优化培养基组成

一般食用菌的液体深层培养选取 2.0%葡萄糖和另一种天然农副产品为复合碳源,故在正交实验时固定葡萄糖质量分数为 2.0%.有文献报道,对鸡腿蘑进行平板培养时,添加 100 mg/L 的 VB_1 可显著促进菌体的生长[5];此外,K^+、Mg^{2+} 对真菌液体培养菌丝的生长及胞外多糖的合成也有促进作用[5,6].作者选取玉米粉、麸皮粉、VB_1 和 $KH_2PO_4+MgSO_4\cdot 7H_2O$ 组合优化培养基的组成,确定适宜的配比和质量分数,结果见表 3、表 4.

表 3　实验和因子水平

Tab.3　The table of factor and level in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	玉米粉质量分数 A/%	麸皮粉质量分数 B/%	VB_1 质量浓度/(mg/L)	($KH_2PO_4+MgSO_4\cdot 7H_2O$) D/%
1	1.0	0.3	0	0.10+0.05
2	1.5	0.5	10	0.10+0.10
3	2.0	0.7	100	0.15+0.10

万方数据

表4 $L_9(3^4)$正交实验结果的极差分析

Tab.4 Extreme value analysis of orthogonal experiment

组合	因素				胞外多糖产量/(mg/dL)
	A	*B*	*C*	*D*	
1	1	1	1	1	56.4
2	1	2	2	2	73.7
3	1	3	3	3	70.1
4	2	1	2	3	71.7
5	2	2	3	1	54.6
6	2	3	1	2	61.5
7	3	1	3	2	68.5
8	3	2	1	3	58.5
9	3	3	2	1	64.6
K_1	200.2	196.6	176.7	175.6	
K_2	187.8	186.8	210	203.7	
K_3	191.6	196.2	193.2	200.3	
R	12.4	9.8	33.3	28.1	
k_1	64.7	65.5	58.9	58.5	
k_2	62.6	62.3	70	67.9	
k_3	63.9	65.4	64.4	66.8	
R'	2.1	3.2	11.1	8.3	

极差分析表明,各因素对鸡腿蘑的胞外多糖产量的影响程度为 $C>D>B>A$,分析因素趋势图,发现玉米粉质量分数从1.0%到2.0%变化时,胞外多糖的产量变化差异很小,麸皮粉的质量分数从0.3%到0.7%变化时,情况也是如此,选择其中任何一个在理论上均是可行的,考虑到工业上原料成本,分别选取玉米粉质量分数为1.0%,麸皮粉质量分数为0.3%.综上,最优组合为 $A_1B_1C_2D_2$,即得发酵优化培养基:葡萄糖2.0%,玉米粉(60目)1.0%,麸皮粉(60目)0.3%,VB_1 10 mg/L,KH_2PO_4 0.1%,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.1%.

2.4 摇瓶发酵曲线测试

在上述摇瓶培养基正交实验结果的基础上,选择优化好的培养基进行摇瓶发酵曲线的测定实验,由于培养基中含有玉米粉,同时采用碘试以确定玉米粉是否耗用完全.结果见图3.可以看出,在发酵过程中,pH值略有下降,变化不大,与香菇、云芝、灵芝等不同,和金针菇的情况类似,可能与该菌株分泌的酸性物质较少有关;还原糖在前期呈下降趋势,在培养4~5 d时,有上升的趋势,5 d后逐渐下降,最后趋于平缓,这是由于起初培养基里含有的葡萄糖首先被菌生长所消耗,故前期还原糖下降,随着菌生长,代谢旺盛,分解得到还原糖,故在4~5 d,还原糖呈上升趋势,此后随着菌体进一步生长,菌体对还原糖的需求又相应增加,造成发酵液中还原糖又下降;胞外粗多糖的产量第1天和第2天较高,第3天降到低点,第4天升到峰值(此时碘试已不显蓝色),此后又缓慢下降;分析该曲线,可以看出,发酵第1天第2天,测得的多糖主要是培养基中营养物质中的多糖,含量较高,由第3天的低值上升到第4天的峰值说明菌体已消耗了培养基中的营养物质,分泌出胞外多糖,第4天测得的主要是菌体分泌的胞外多糖,产量为96.3 mg/dL;但随着发酵的进行,发酵后期营养物质变得不充足,菌体分泌出的多糖可能又被自身利用,所以胞外多糖产量在后期下降,若以胞外粗多糖产量为指标,应选择摇瓶发酵时间为4 d.

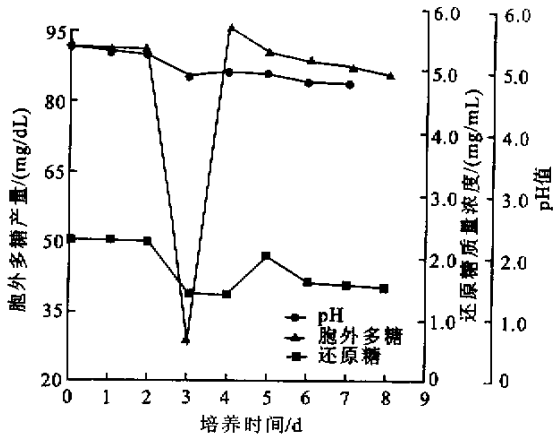

图3 鸡腿蘑液体摇瓶发酵曲线

Fig.3 Time-course of *Coprinus comatus* in shaking flask culture

3 结 论

考察不同的碳氮源对鸡腿蘑分泌胞外多糖的产量的影响,并结合工业生产的实际,发现天然农副产品玉米粉和麸皮粉分别为适宜的碳氮源.在固定葡萄糖质量分数为2.0%的基础上分别选取玉米粉、麸皮粉、VB_1 和 $KH_2PO_4+MgSO_4\cdot 7H_2O$ 作4因素3水平实验,优化培养基的组成,得到发酵优化培养基:葡萄糖2.0%,玉米粉(60目)1.0%,麸皮粉(60目)0.3%,VB_1 10 mg/L,KH_2PO_4 0.1%,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.1%,该培养基配方是在理论基础上综合考虑了工业生产的成本得到的,在实践上有一定意义.在此基础上,进行了摇瓶发酵曲线的测

万方数据

定,以胞外多糖产量为主指标,确定适宜的发酵周期为 4 d.在上述的培养条件下,发酵液中鸡腿蘑胞外多糖的产量最高可达 96.3 mg/dL.

参考文献:

[1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京:农业出版社,1993.

[2] 李诗鹏,苏蕾. 鸡腿蘑多糖的提取及其免疫活性抗肿瘤活性的研究[J]. 中国商办工业,2000,(1):44-45.

[3] 杨宁波,张建民. 鸡腿蘑营养成份及应用价值[J]. 特种经济动植物,2000,(5):31.

[4] ABRAHAM M, KURUP G M. Kinetics of the enzymatic saccharification of pretreated tapioca waste and waterhyacinth[J]. APPL BIOCHEM BIOTECH,1997,66(2):133-145.

[5] 暴增海,马桂珍. 鸡腿蘑 *Coprinus comatus* 菌丝生长的营养研究[J]. 河北农业技术师范学院学报,1994,(6):26-29.

[6] 李绍兰,陈有为. 罗伦隐球酵母胞外多糖的研究[J]. 真菌学报,1995,14(4):296-301.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 124 页)

[2] 杜朋编译.果蔬汁饮料工艺学[M]. 北京:中国农业出版社,1992.

[3] 邵长富,赵晋府主编.软饮料工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1987.

[4] 孙鹤,从培君,王榕树等.绿色蔬菜汁中叶绿素稳定性研究[J].食品科学,1997,18(2):9-13.

[5] 吴成贵.绿色蔬菜汁饮料的护色方法[J].食品科学,1995,16(8):74-75.

[6] 张憋,曹平.加工条件对富硒绿叶蔬菜汁品质稳定性的影响[J].无锡轻工大学学报,2000,19(3):216-219.

[7] 梁文珍,丁立群,富新华等.蔬菜汁生产中的质量问题及解决方法[J].饮料工业,2000,(5):3-6.

[8] 姚晓敏,孙向军,王建强.绿色蔬菜的脱色机理及护色方法[J].食品工业科技,2000,21(5):19-20.

[9] 徐国民.绿色蔬菜变色反应及护绿方法[J].食品科学,1995,16(1):74-75.

[10] 杨振国,陈彬,杨艺青.江西藜蒿的开发利用[J].中国野生植物资源,1995,(1):61-62.

[11] MARTINUS AJS VAN BOEKEL. Anniversary review kinetic modeling in food science:a case study on chlorophyll degradation in olines[J]. J Sci Food Agric,2000,80(1):3-9.

[12] LUKE F, LABORDE, JOACHIM H VON ELBE. Zinc complex formation in heated vegetable puress[J]. J Agric Food Chem, 1990,38(2):484-487.

[13] LUKE F,LABORDE, JOACHIMH VON ELBE. Effect of solute on zinc complex formation in heated green vegetable[J]. J Agric Food chem,1994,42(5):1096-1099.

[14] LUKE F, LABORDE, JOACHIMH VON ELBE. Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables[J]. J Agric Food chem,1994,42(5):1100-1103.

(责任编辑:李春丽)

万方数据