

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0273 - 04

营养条件对灰树花产胞外多糖产量的影响

孙克, 敖宗华, 许正宏, 谷文英, 陶文沂

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 灰树花是一种营养丰富的食、药两用真菌。灰树花胞外多糖是一种具有生理活性的真菌多糖。作者研究了营养条件对灰树花产胞外多糖的影响, 确定了合理的初始碳源、氮源、无机离子、生长因子的质量浓度。进一步的正交试验表明, 灰树花产胞外多糖较佳的培养基组合为: 葡萄糖 40 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 磷酸二氢钾 4 g/L, 硫酸镁 2 g/L, 玉米浆 20 g/L。

关键词: 灰树花; 发酵; 胞外多糖

中图分类号: Q 538

文献标识码: A

Effects of Nutritional Conditions on the Production of Extracellular Polysaccharide of *Grifola frondosa*

SUN Ke, AO Zong-hua, XU Zheng-hong, Gu Wen-ying, TAO Wen-yi

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Grifola frondosa* is an edible and medicinal fungus. Extracellular Polysaccharide of *Grifola frondosa* has various physiological activity. In the paper, the effects of nutritional conditions on the production of extracellular polysaccharide of *Grifola frondosa* are discussed. The effects of carbon source, nitrogen source, growth factors, and inorganic salts on the production of extracellular polysaccharide of *Grifola frondosa* were studied. Through the orthogonal test, we found that a medium containing 40 g/L glucose 5 g/L peptone 4 g/L potassium dihydrogen phosphate and 20 g/L corn steep liquor was the best for the production of extracellular polysaccharide.

Key words: *Grifola frondosa*; fermentation; extracellular polysaccharide

灰树花(*Grifola frondosa*)又名栗子蘑、莲花菌、贝叶多孔菌、云蕈等。日本又称之为“舞茸”。在分类学上属于担子菌亚门, 层菌纲, 非褶菌目, 是一种天然的食药两用真菌。灰树花口味鲜美并富含蛋白质、维生素等多种营养物质。近年来发现灰树花中富含的多糖类物质具有抑制肿瘤、抗 HIV、调节免疫^[1-3]等生理活性, 目前已成为研究的热点。灰树花是一种极具开发价值的珍贵的食药两用真菌, 目

前已有一系列相关产品问世^[4]。传统上灰树花多糖及有效成分均由子实体提取。随着现代生物技术的发展, 使用液体深层发酵的方法生产灰树花多糖已成为研究的方向^[5,6]。在液体深层发酵中, 不但可以得到灰树花菌丝体, 而且可以获得相当数量的胞外多糖。这些胞外多糖具有与灰树花菌丝体多糖相同或类似的生理活性。目前国内外研究多集中于灰树花菌丝体的培养, 但对灰树花胞外多糖发酵工艺尚

收稿日期 2001 - 11 - 14; 修订日期 2002 - 01 - 20.

作者简介: 孙克(1973 -), 男, 江苏无锡人, 发酵工程硕士研究生。

万方数据

缺乏系统的研究^[7],作者对此进一步研究,以完善灰树花的发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 GF9801 由江南大学生物工程学院生物制药研究室提供。

1.1.2 种子培养基 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 0.2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, 马铃薯汁 200 g/L, 琼脂 18 g/L。

1.1.3 基础培养基 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 斜面种子于 25 °C 恒温培养 9 d, 挑取生长旺盛时菌块接入液体培养基中, 置 HYG-II 回转式恒温摇瓶柜中, 转速 150 r/min, 温度 25 °C 培养 5 d。

1.2.2 灰树花胞外多糖测定 发酵液经离心分离后(4 000 r/min, 20 min), 向上清液中加入无水乙醇至乙醇体积分数为 60%, 沉淀经乙醚洗涤后, 用硫酸-苯酚法测定多糖含量^[7]。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖质量浓度对菌体生长的影响

碳源既用于灰树花能量代谢, 也是构成胞外多糖糖链的来源。在基础培养基中分别添加不同质量浓度的葡萄糖, 以胞外多糖基本不再增加为发酵终点, 考察葡萄糖质量浓度对灰树花发酵的影响, 结果见表 1。

表 1 葡萄糖质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响

Tab.1 The effect of glucose concentration on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

葡萄糖质量浓度/(g/L)	发酵时间/h	胞外多糖质量浓度/(g/L)	残糖质量浓度/(g/L)	转化率/%
10	120	0.32	2.4	3.20
20	120	0.75	5.4	3.75
30	120	1.23	9.0	4.10
40	120	1.87	16.2	4.68
50	120	1.04	24.2	2.08

由表 1 可见, 随着葡萄糖质量浓度的增加, 灰树花胞外多糖产量与转化率明显提高, 当葡萄糖质量浓度达到 40 g/L 时, 胞外多糖达到最大值 1.87 g/L, 转化率也达到 4.68%。但当葡萄糖质量浓度高

于 40 g/L 时, 胞外多糖的产量反而下降, 且残糖增加迅速, 这表明过高的初糖质量浓度对灰树花胞外多糖的产生有抑制作用。从发酵的转化效率考虑, 葡萄糖质量浓度为 40 g/L 较为适宜。

2.2 氮源质量浓度对菌体生长的影响

氮源对灰树花生长有明显的影响, 灰树花对有机氮源的利用明显优于无机氮源。作者在基础培养基中添加不同质量浓度的蛋白胨考察它对灰树花产胞外多糖的影响。

由表 2 可以看出, 在蛋白胨的质量浓度从 2 g/L 增加至 4 g/L 的范围内胞外多糖的产量一直在随蛋白胨质量浓度的增加而增加, 但高于 4 g/L 后, 胞外多糖的产量下降。这表明, 碳氮比会影响基质进入菌体后的代谢流向, 只有适宜的碳氮比才有利于灰树花胞外多糖产量的提高。

表 2 蛋白胨质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响

Tab.2 The effect of peptone concentration on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

蛋白胨质量浓度/(g/L)	发酵时间/h	胞外多糖质量浓度/(g/L)	残糖质量浓度/(g/L)
2	120	0.60	6.1
3	120	1.08	5.0
4	120	1.17	4.9
5	120	0.96	4.8
6	120	0.89	4.7

2.3 生长因子对菌体生长的影响

药用真菌对生长因子有一定要求^[9]。硫酸素、生物素作为细胞生命活动中辅酶和辅酶组分, 具有重要的催化功能。在基础培养基中分别添加不同质量浓度的硫酸素、生物素, 研究了它们对灰树花产胞外多糖的影响, 结果见图 1~3。由图 1 可见, 硫酸素对于灰树花胞外多糖的生产、分泌有一定的影响, 其中硫酸素质量浓度在 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 胞外多糖最高达到 0.94 g/L, 比空白对照提高了 21%, 此后增加硫酸素质量浓度对胞外多糖产量的增加影响减小。由图 2 可见, 生物素质量浓度在 60~90 $\mu\text{g/L}$ 范围内胞外多糖产量较高, 这可能是由于生物素作为乙酰 CoA 羧化酶的辅酶参与磷脂的合成, 影响了细胞膜的透性。若进一步提高生物素质量浓度则胞外多糖的产量反而会下降。为寻找一种来源广泛、价格便宜的生长因子的来源, 作者在基础培养基中添加不同质量浓度的玉米浆, 考察它对灰树花产胞外多糖的影响。由图 3 可见, 添加玉米浆可以明显

增加灰树花胞外多糖的产量,当玉米浆质量浓度为 20 g/L 时,其胞外多糖的产量比未添加的对照组增加 60%。这可能是因为玉米浆中富含 B 族维生素、生物素、嘌呤等物质,有利于灰树花胞外多糖的生产与分泌^[10]。因此,可以在生产中添加玉米浆以提高胞外多糖的产量。

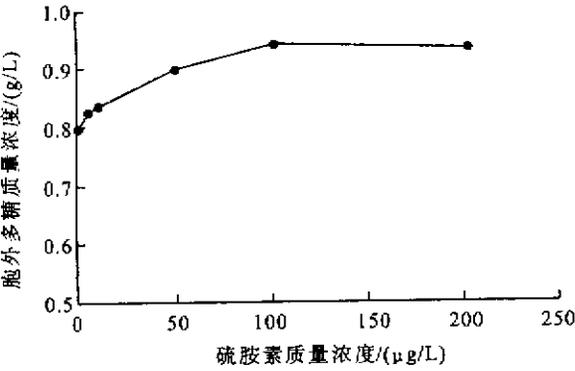


图 1 硫胺素质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响
Fig.1 The effect of Thiamine on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

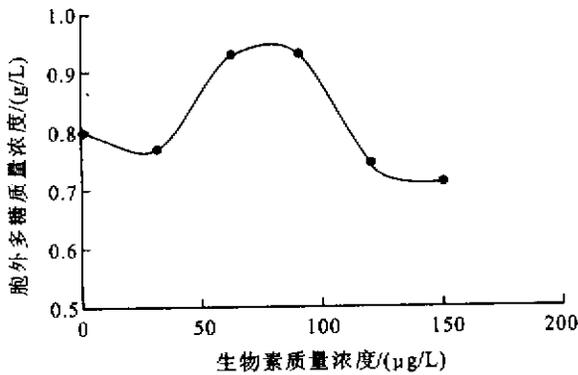


图 2 生物素质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响
Fig.2 The effect of Biotin on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

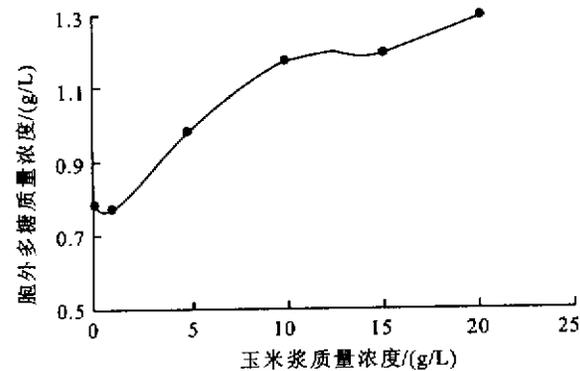


图 3 玉米浆质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响
Fig.3 The effect of different concentration of corn steep liquor on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

2.4 无机盐对灰树花产胞外多糖的影响

药用真菌对硫、磷、镁、钾、锰、铁等无机盐有一定的要求,作者分别在基础培养基中添加不同质量浓度的无机盐,考察它们对灰树花产胞外多糖的影响。

由图 4 可见,磷酸二氢钾对灰树花产胞外多糖有重要的影响。磷酸二氢钾质量浓度在 1 g/L 至 4 g/L 之间,胞外多糖量随磷酸二氢钾质量浓度的升高而增加,在 4 g/L 时达到最大值 1.22 g/L。此时进一步提高磷酸二氢钾质量浓度反会使胞外多糖产量下降,这表明,只有适宜的磷酸二氢钾质量浓度才有利于灰树花胞外多糖的生产与分泌。同样的规律也出现在硫酸镁对灰树花胞外多糖的影响中(图 5),可见,当硫酸镁的质量浓度为 2 g/L 时,最适合灰树花胞外多糖的生产。实验表明铁离子与锰离子对灰树花菌体生长影响不大。

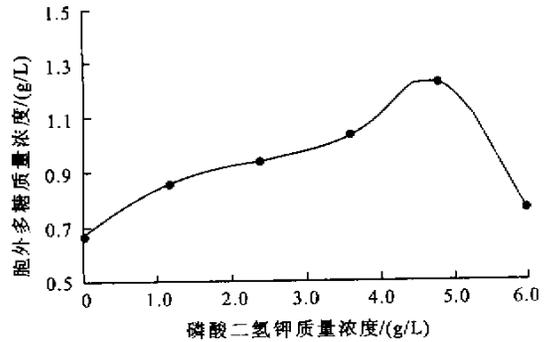


图 4 磷酸二氢钾质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响

Fig.4 The effect of different concentration of potassium dihydrogen phosphate on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

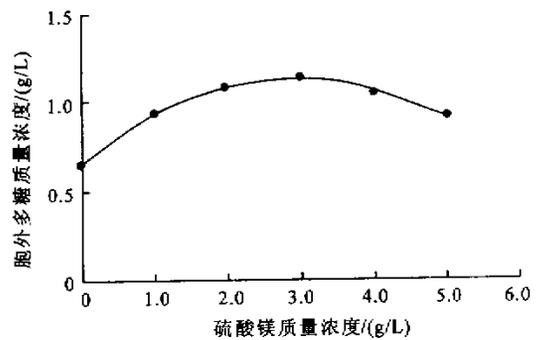


图 5 硫酸镁质量浓度对灰树花产胞外多糖的影响

Fig.5 The effect of different concentration of magnesium sulfate on production of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

2.5 正交设计

上述试验结果表明了基本营养因素对灰树花

产胞外多糖的影响.为了消除不同批次的差异,得出最佳组合,作者选取对胞外多糖产量影响较大的葡萄糖、蛋白胨、磷酸氢二钾、玉米浆为因素,按表3所列质量浓度分别添加在基础培养基中,进行了 $L_9(3^4)$ 正交试验.

表3 $L_9(3^4)$ 正交因素水平表

Tab.3 Level of factors in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

因子	水平		
	1	2	3
A 葡萄糖质量浓度(g/L)	30	40	50
B 蛋白胨质量浓度(g/L)	3	4	5
C 硫酸二氢钾质量浓度(g/L)	3	4	5
D 玉米浆质量浓度(g/L)	10	15	20

由图6与极差分析可以得出,影响灰树花胞外多糖的各因素的主次顺序依次是B、A、D、C,最有利于灰树花产胞外多糖的培养基组成是 $B_2A_2C_2D_3$,即葡萄糖质量浓度为3 g/L、蛋白胨质量浓度为4 g/L、磷酸二氢钾质量浓度为4 g/L,玉米浆质量浓度为2 g/L.

参考文献:

- [1] 黄幸纾.灰树花多糖及其抗癌作用[J].中国食用菌,1994,1:25-28.
- [2] 赵铭.灰树花的抗艾滋病功效[J].中国食用菌,1993,6:40-43.
- [3] ZHUANG C, MIZUNO T, ITO H, et al. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*[J]. *Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology*, 1994, 41(10):724-732.
- [4] 孙培龙.灰树花保健食品的开发[J].陕西粮油科技,1995,20(3):30-32.
- [5] 宋爱荣, 郭立忠, 段方猛. pH对灰树花液体深层发酵的影响[J].中国食用菌,1999,18(3):29-31.
- [6] 汪维云, 吴守一, 朱金华.灰树花深层发酵培养工艺研究[J].生物工程学报,1999,15(3):378-382.
- [7] 雷德柱, 高大维, 于淑娟.糖质溶液中发酵生产灰树花胞外多糖的研究[J].微生物学通报,2001,28(3):15-19.
- [8] 周与良, 邢来君.真菌学[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [9] 梅乐和, 姚善泾, 林乐强.生化生产工艺学[M].北京:科学出版社,1999.

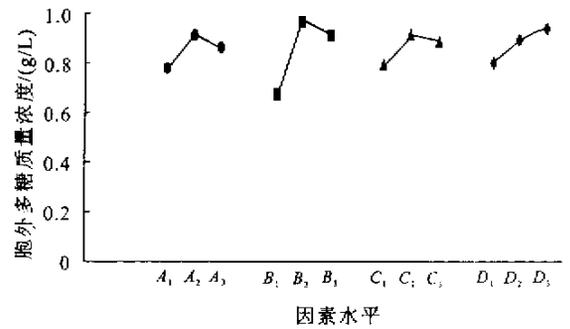


图6 胞外多糖正交趋势图

Fig.6 The trend of factors and indexes in orthogonal experiment of extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*

3 结语

综合以上试验,灰树花产胞外多糖的较佳培养基组合是葡萄糖40 g/L、蛋白胨5 g/L、磷酸二氢钾4 g/L、玉米浆20 g/L、硫酸镁2 g/L.实验中也发现灰树花胞外多糖的产量与菌丝干重的增加几乎同步,这表明灰树花胞外多糖的产生与菌体的生长是相关的.

(责任编辑 杨萌 朱明)