

液体种子种龄对姬松茸深层发酵的影响*

董秀萍 孙玉梅 李燕杰 朱蓓薇

(大连轻工业学院生物与食品工程学院 大连 116034)

摘 要 研究了姬松茸液体种子种龄对其深层发酵过程中生物量、胞内多糖、胞外多糖和胞外纤维素酶的影响,以及深层发酵过程中还原糖和 pH 值的变化。结果表明 种龄为 4 d 时接种,深层发酵产生的生物量、胞内多糖和胞外多糖均高于所选种龄为 6 d 和 8 d 时接种,种龄为 8 d 时接种生成的胞外外切 β -1,4-葡萄糖苷酶(C1 酶)与内切 β -1,4-葡萄糖苷酶(Cx 酶)高于种龄为 4 d 和 6 d 时接种。

关键词 姬松茸,液体种子种龄,深层发酵

姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)原产于巴西、秘鲁等美洲地区,又名巴西蘑菇,是一种食药兼用菇。它不仅美味可口,而且含有活性多糖、凝集素、甾醇类、核酸类、不饱和脂肪酸、食物纤维等多种活性物质^[1]。近年来国内外对其活性物质,尤其是多糖^[2~6]的研究很多。据报道,这些活性成分具有抑制肿瘤、抗诱变、增强机体免疫功能、保护肝脏、抗毒素及抗氧化等保健功能^[7~9],因此姬松茸的开发利用越来越受到人们的关注。

目前对姬松茸菌株的选育、栽培工艺及生长发育研究较多,对其液体培养条件^[10~12]也有一定研究,但对其液体培养特性及胞外酶产生情况研究尚少。文中研究了姬松茸液体种子种龄对液体培养过程中的生物量、胞内多糖、胞外多糖和胞外纤维素酶的影响,这对于采用深层发酵法进行姬松茸产品开发、提高培养过程的经济性有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

姬松茸菌株由庄河市鸿洲种植业公司提供,实验室纯化。

1.2 试剂

柠檬酸, Na_2HPO_4 , 羧甲基纤维素钠, 酒石酸钾钠, 3,5-二硝基水杨酸, NaHSO_3 , 结晶

酚, NaOH , 无水乙醇, 琼脂, 蛋白胨, KH_2PO_4 , 酵母膏为分析纯($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为化学纯), 麸皮由大连调味品厂提供, 蔗糖, V_{B_1} , 玉米粉, 马铃薯, 葡萄糖为市售产品。

1.3 仪器

701-2 型电热干燥箱; LDZ5-2 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅; HZQ-Q 型全温振荡器; 台式保温培养箱; 80-2 离心沉淀器; 电子调温万用电炉; 722 型分光光度计; 数显恒温水浴锅; AB204-N 电子天平; PHS-3C pH 计。

1.4 培养基

1.4.1 斜面培养基

PDA 培养基。

1.4.2 液体种子培养基

马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, V_{B_1} (100 mg/mL) pH 自然。

1.4.3 液体发酵培养基

麸皮 5%, 蔗糖 1%, 葡萄糖 1%, 蛋白胨 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%。

1.5 实验方法

1.5.1 培养方法

液体种子培养:将生长旺盛的斜面菌种切成大小相同的 3mm 见方的菌块,接种到液体种子培养基中,菌块要薄,以便漂浮在液面上,250

第一作者:硕士研究生(朱蓓薇教授为通讯作者)。

* 大连市科技攻关项目(大科 01008)

收稿时间 2004-01-15

mL 三角瓶的装液量为 50 mL ,于 26℃ ,150 r/min 转速 摇床培养。

发酵培养 二级摇瓶 250 mL 三角瓶 ,装液量 50 mL ,液体菌种接种量为 10% ,于 26℃ ,150 r/min 转速 摇床培养。

1.5.2 生物量的测定

将培养液用 40 目滤网过滤 ,分离得到菌丝体和发酵液。菌丝体经去离子水冲洗数次后 ,真空抽滤 ,于 60℃ 烘干至恒重 ,用分析天平称重。

1.5.3 胞外多糖的测定

发酵液于 3500 r/min 离心 10 min。取上清液 5 mL 加 3 倍体积的乙醇 4℃ 下沉淀 12 h 后离心 ,在所得的多糖沉淀中加去离子水定容至 100 mL。用苯酚硫酸法测定 490 nm 处的吸光值 ,再根据葡萄糖标准曲线转换为含糖量。

1.5.4 胞内多糖的测定

菌丝体用去离子水洗 2~3 次后 ,于 90℃ 提取 4 h。取出抽提液定容至 100 mL ,得胞内多糖试样。取 5 mL 样液加 3 倍体积的乙醇 ,4℃ 下沉淀 12 h 后离心 ,在所得的多糖沉淀中加去离子水定容至 100 mL。用苯酚硫酸法测定 490 nm 处的吸光值 ,再根据葡萄糖标准曲线转换为含糖量。

1.5.5 还原糖的测定

发酵液于 3500 r/min 离心 10 min。取上清液用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定 520 nm 处的吸光值 ,再根据葡萄糖标准曲线换算出培养液中的含糖量。

1.5.6 酶活力测定

1.5.6.1 粗酶液的制备

发酵液于 3500 r/min 离心 10 min ,得到上清液即为粗酶液。

1.5.6.2 内切 β -1,4-葡萄糖苷酶(C_x 酶)活力的测定

取 1 mL 已经稀释 10 倍的粗酶液 ,与 1 mL 1% CMC 溶液(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液中制成 ,pH5.0) ,在 50℃ 保温 30 min ,然后加入 2 mL DNS 试剂 ,测定生成的还原糖 ,再根据葡萄糖标准曲线转换成每毫升酶液作用 24 h 后产生的葡萄糖克数。

以 1 mL 适当稀释后的发酵液在沸水中失活 10 min 作为对照。

酶活定义 :将 30 min 内酶作用于底物每释放 1 mg 葡萄糖作为 1 个酶活力单位。

酶活力(U/mL) = $2 \times K \times \Delta OD \times 10 \times 10^3$

式中 :K——葡萄糖标准曲线的斜率 ;

2——应取发酵液的毫升数 ;

ΔOD ——酶液的 OD 值 - 对照的 OD 值(对照为失活酶液) ;

10——稀释倍数 ;

10^3 ——换算成葡萄糖的毫克数。

1.5.6.3 外切 β -1,4-葡萄糖苷酶(C₁ 酶)活力的测定

取 1 mL 已经稀释 10 倍的粗酶液 ,与 50 mg 脱脂棉 ,1 mL 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH4.8) ,在 50℃ 保温 24 h ,然后加入 2 mL DNS 试剂 ,测定生成的还原糖 ,再根据葡萄糖标准曲线转换成每毫升酶液作用 24 h 后产生的葡萄糖克数。

以 1 mL 适当稀释后的发酵液在沸水中失活 10 min 作为对照。

酶活定义 :将 24 h 内酶作用于底物每释放 1 mg 葡萄糖作为 1 个酶活力单位。

酶活力计算同 1.5.6.2。

2 结果与分析

2.1 种龄的确定及其对生物量的影响

液体种子的培养时间为 1~10 d ,通过观察接入液体培养基的斜面菌块的长势 ,发现只有到第 4 d 菌球才明显形成 ,第 6 d 长势旺盛 ,第 8 d 开始出现老化现象。因此 ,选择种龄为 4 d、6 d、8 d 的液体种子进行接种。

将上述种龄为 4 d、6 d 和 8 d 的液体种子分别按 10% 接种量接入到 50 mL 液体发酵培养基中 ,26℃ ,150 r/min 摇床培养 1~8 d ,取发酵液 ,过滤得到菌丝体 ,烘干测定干重 ,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出 ,种龄为 4 d 的发酵液中菌丝体含量高于种龄为 6 d 和 8 d 的发酵液。在发酵培养的前 2 天菌丝体生长速度比较缓慢 ,

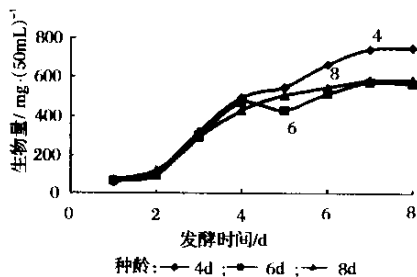


图1 种龄对生物量的影响

从第3天开始菌丝体生长速度明显加快。当达到生长最高峰后菌丝体开始自溶,生物量下降并趋于稳定。

基于相同的接种和培养条件,种龄为4d的发酵液中生物量多于种龄是6d和8d的发酵液中的生物量。原因在于液体种子种龄为4d时已经开始进入生长旺盛期,已经充分适应了液体培养基,选择此时的液体种子进行转接,可以让菌丝体在生长旺盛点时进入营养更充足的发酵培养基中生长,所以长势比较好。而种龄为6d和8d的种子处于生长旺盛期的中期和后期,虽然适应能力强,但已经开始进入老化期,因而不如4d种龄的液体种子。

2.2 种龄对胞外多糖含量的影响

分别将种龄为4d、6d和8d的液体种子接种到液体培养基中进行培养,每隔24h取样测定发酵液中的胞外多糖含量,结果见图2。

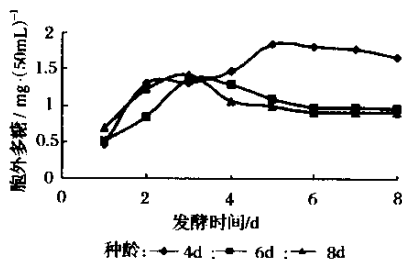


图2 种龄对胞外多糖含量的影响

从图2可以看出,胞外多糖曲线均呈先升高再下降的趋势,这是由于发酵中期菌丝体大量消耗培养液中碳氮源,生成胞外多糖,后期碳氮源消耗殆尽,开始消耗产物多糖。种龄为4d的发酵液中胞外多糖的含量明显高于种龄为6d和8d的发酵液中的胞外多糖含量,这与导致生物量与种龄之间对应关系的原因相同。

2.3 种龄对胞内多糖含量的影响

分别将种龄为4d、6d和8d的液体种子接种到液体培养基中进行培养,每隔24h取样测定发酵液中的胞内多糖含量,结果见图3。

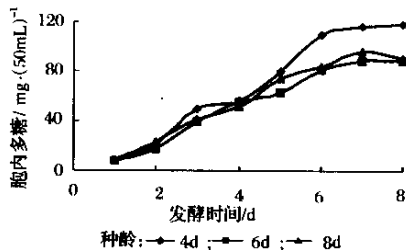


图3 种龄对胞内多糖含量的影响

从图3可以看出,随着发酵时间的延长,胞内多糖呈上升趋势。种龄为4d的发酵液中胞内多糖的含量高于种龄为6d和8d的发酵液中的胞内多糖含量。胞内多糖提取于菌丝体,因此,随着菌丝体的生成,胞内多糖含量增加;当菌丝体的生成达到最高峰开始自溶时,胞内多糖含量也将随之降低。

2.4 种龄对还原糖的影响

分别将种龄为4d、6d和8d的液体种子接种到液体培养基中进行培养,每隔24h取样测定还原糖含量,结果见图4。

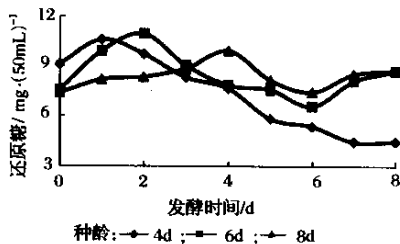


图4 种龄对还原糖的影响

从图4可以看出,还原糖曲线均呈先上升,后下降的趋势,种龄为6d和8d的还原糖曲线在末期略有回升。发酵过程中菌丝体的生成消耗了培养基中的还原糖,种龄为6d和8d的发酵液中还原糖含量在后期有升高的趋势,这是因为有一部分菌丝体老化自溶生成部分还原糖。

2.5 种龄对pH值的影响

分别将种龄为4d、6d和8d的液体种子接

种到液体培养基中进行培养,每隔 24 h 取样测定 pH 值,结果见图 5。

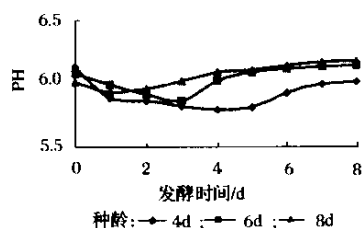


图 5 种龄对 pH 值的影响

从图 5 可以看出, pH 值总体变化趋势均为前期下降后期上升。出现这种变化趋势的原因是发酵中期菌丝体生长旺盛,消耗发酵液中大量的还原糖生成酸性物质, pH 值下降;进入发酵后期菌丝生长缓慢,出现菌体自溶, pH 值回升。

2.6 种龄对胞外 C_x 酶活力的影响

分别将种龄为 4 d、6 d 和 8 d 的液体种子接种到液体培养基中进行培养,每隔 24 h 取样测定胞外 C_x 酶活力,结果如图 6 所示。

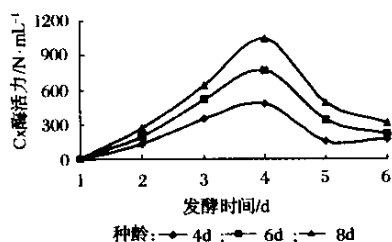


图 6 种龄对胞外 C_x 酶活力的影响

由图 6 可知,液体培养 1~6 d 内,种龄为 4 d、6 d 和 8 d 的发酵液产生的 C_x 酶均有酶活。在培养过程中 C_x 酶活力逐渐升高,至 4 d 达到最高峰,随着发酵时间的进一步延长, C_x 酶活力逐渐下降。在相同发酵时间里,种龄为 8 d 的发酵液比种龄为 4 d 和 6 d 的发酵液产生的 C_x 酶活力大,这说明液体种子成熟程度对 C_x 酶活力有很大影响。

2.7 种龄对胞外 C₁ 酶活力的影响

分别将种龄为 4 d、6 d 和 8 d 的液体种子接种到液体培养基中进行培养,每隔 24 h 取样测定胞外 C₁ 酶活力,结果如图 7 所示。

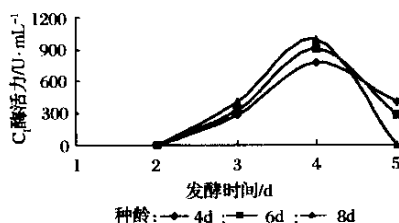


图 7 种龄对胞外 C₁ 酶活力的影响

由图 7 可知,姬松茸液体深层发酵 2~4 d 时,种龄为 4 d、6 d 和 8 d 的发酵液产生的 C₁ 酶活力均随时间的延长逐渐升高。当发酵时间为 4 d 时,发酵液产生的 C₁ 酶活力达到高峰,这与发酵液产生的 C_x 酶的产酶高峰时间完全相同,此结果说明姬松茸液体深层发酵产生的 C₁ 酶与 C_x 酶具有同步性。

3 结 论

姬松茸液体深层发酵的产物与液体菌种的种龄有关。液体种子种龄为 4 d 的发酵液产生的生物量、胞内多糖、胞外多糖明显多于种龄为 6 d 和 8 d 的发酵液所产生的,而 8 d 种龄的发酵液产生的胞外 C_x 酶和 C₁ 酶的酶活力均高于种龄为 4 d 和 6 d 的发酵液产生的 C_x 酶和 C₁ 酶的酶活力。姬松茸液体深层发酵产生的 C₁ 酶与 C_x 酶的酶活力以及产酶速度与液体菌种的种龄有关,并具有同步性。不同种龄的液体种子对发酵液的还原糖、pH 值的影响幅度不同,但各自趋势相同。

参 考 文 献

- 1 王雅茹, 问秀景, 郭砚翠. 功能性食品——姬松茸 [J]. 中国商办工业, 1998, 10(8): 10~11
- 2 Dong Q, Yao J, Yang X Y et al. Structural characterization of a water-soluble beta-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr [J]. Carbohydr Res, 2002, 337(15): 1417~1421
- 3 Oshiman K, Fujimiya Y, Ebina T et al. Orally administered beta-1,6-D-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice [J]. Planta Med, 2002, 68(7): 610~614
- 4 Ohno N, Furukawa M, Miura N N et al. Antitumor

- beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei* [J]. Biol Pharm Bull , 2001 , 24(7) : 820 ~ 828
- 5 Mizuno M , Minato K , Ito H et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mil [J]. Biochem Mol Biol Int , 1999 , 47(4) : 707 ~ 714
 - 6 Mizuno M , Morimoto M , Minato K et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem , 1998 , 62(3) : 434 ~ 437
 - 7 Nskajima A , Ishida T , Koga M et al. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill antibody-producing cells in mice [J]. International Immunopharmacol 2002 , 2(8) : 1205 ~ 1211
 - 8 Martins de Oliveira J , Jordao B Q , Ribeiro L R et al. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro [J]. Food and Chemical Toxicology 2002 , 40(12) : 1775 ~ 1780
 - 9 Barbisan F L , Miyamoto M , Scolastici C et al. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver-toxicity induced by different dosed of diethylnitrosamine [J]. Journal of Ethnopharmacology , 2002 , 83(1 - 2) : 25 ~ 32
 - 10 杨淑云 , 刘朝贵 , 朱 凯等 . 富硒姬松茸液体培养条件的研究 [J]. 微生物学通报 , 2003 , 30(1) : 9 ~ 13
 - 11 王六生 , 谷文英 . 姬松茸深层发酵培养基的优化 [J]. 无锡轻工大学学报 , 2002 , 21(4) : 389 ~ 392
 - 12 邹 祥 , 张 梁 , 章克昌 . 姬松茸液体培养工艺条件的研究 [J]. 药物生物技术 , 2002 , 9(6) : 339 ~ 343

Influence of the Ages of Inoculums in Submerged Fermentation Process

Dong Xiuping Sun Yumei Li Yanjie Zhu Beiwei

(College of Bio & Food Technology , Dalian Institute of Light Industry , Dalian , 116034)

ABSTRACT Insaccharides , the extra cellular polysaccharides , the extra cellular cellulase , the changes of the reduced sugar and pH in submerged fermentation process were studied. In this paper the effects of inoculums ages on the growth of mycelium , the cellular polysaccharides production and extra cellular polysaccharides were studied. It is seen that inoculums of cultivation for 4 days were higher than those with inoculums of cultivation for 6 days and 8 days. The output of exo-1 β -D-glucanase(enzyme C₁) and endo-1 β -D-glucanase(enzyme C_x) for 8 days were higher than those with inoculums of cultivation for 4 days and 6 days.

Key words *Aaricus blazei* Murril , the ages of inoculums , liquid submerged fermentation

欧美包装市场出现全新的食品专用包装纸

最近 欧美市场又推出了全新的 PLMEX 食品专用包装纸 , 它是 100% 纯纸浆 , 不含荧光剂和危害人体的化学物质 , 具有防水、防油、抗粘、耐热(可耐 200 ~ 250℃ 高温) 的特点。使用方便、清理简单、安全卫生 , 符合美国 FDA 和德国 BGA 食品卫生标准。这种食品专用纸使用后经清水清洗可回收 , 并可以反复使用 50 次。这种食品纸有成卷的 , 也有压制成各种纸杯形状的 , 不管是用于蒸制、烘烤 , 还是微波加热 , 都不会变形和褪色。