

# 营养因子对长根菇液体发酵的影响

邹 祥

(西南师范大学现代生物医药研究所 重庆 400715)

**摘 要** 研究了各种营养因子对长根菇液体发酵的影响,确定了合适的碳源、氮源、C/N 比、无机盐、生长因子的浓度,以玉米粉 2%、豆饼粉 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%、棕榈酸 0.15%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  0.1mg/mL 为发酵培养基,长根菇深层发酵结果最佳,在 7L 发酵罐上进行发酵动力学试验,长根菇适宜发酵周期为 110 h,发酵液胞外多糖最高可达 2.85 g/L。

**关键词** 长根菇,深层发酵,胞外多糖

长根菇(*Oudemanciella radicata*),属于口蘑科金钱菌属,亦称长根奥德蘑、长根小奥德蘑等,是一种珍稀食药菌,子实体菌盖和菌柄表面浅褐色,菌褶白色,菌肉白色细嫩,菌柄嫩脆适口、味道鲜美,富含多糖、蛋白质、氨基酸、脂肪、维生素等营养成分,同时含有在其他药用真菌中未曾发现的降血压成分长根菇素(*Oudenone*),长根菇素对高血压患者有较强的降低血压的作用,其中多糖成分对肿瘤有显著的抑制作用<sup>[1,2]</sup>,但是目前一直限于产量较低,需要培土栽培,出菇时间较长而影响大面积推广,因其特殊的营养、味道和保健作用,野生鲜菇价格一直较高。因此,如果能采用液体深层发酵技术直接协同生产长根菇多糖和长根菇素活性成分,以替代固体栽培的研究,是有效利用这一新型食药菌的根本途径,这一新型的药用真菌资源的开发亦可满足高血压患者及肿瘤患者对保健食品和药品的需求,目前有关长根菇的报道局限于有关固体栽培的情况<sup>[3,4]</sup>,而对长根菇深层培养的研究国内少见相关报道<sup>[5]</sup>。为此,作者以长根菇的菌体生物量和胞外多糖为目标产物,对长根菇的液体深层发酵培养基及发酵动力学进行了研究,为今后生物反应器的放大和工业化生产奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

第一作者:工学硕士,讲师。  
收稿时间 2004-05-10,改回时间 2004-0-0

### 1.1.1 菌 种

长根菇(*Oudemanciella radicata*)购自华中农业大学食用菌菌种中心。

### 1.1.2 培养基

(1)斜面培养基:马铃薯 20%,葡萄糖 2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, $\text{V}_{\text{B}_1}$  10mg/100mL。

(2)液体种子培养基:玉米粉 2%,酵母膏 0.3%,蔗糖 2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, $\text{V}_{\text{B}_1}$  10mg/100mL。

(3)摇瓶发酵基础培养基: $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, $\text{V}_{\text{B}_1}$  0.10mg/mL。

### 1.1.3 培养方法

(1)液体种子培养:将已活化的斜面菌种切割成黄豆大小的菌丝块,接种于液体培养基中,1支斜面接1瓶,500mL三角瓶装培养基100mL于26℃,160r/min培养7~8d。

(2)摇瓶发酵培养:2级摇瓶,250mL三角瓶装液量50mL,液体菌种接种量为10%,于26℃,160r/min培养5d。

(3)7L发酵罐培养:7L发酵罐(上海保兴BIOTECH-7BGZ)装液量5L,接种量为体积分数10%,通气量2L/min,于26℃,160r/min培养5~6d。

### 1.2 分析方法

#### 1.2.1 菌体生物量测定

取 100 mL 发酵液 ,3 000 r/min 离心 20 min 自来水洗涤多次后 ,将菌丝体在 105℃ 烘干至恒重 ,分析天平称重。

1.2.2 胞外多糖测定

采用乙醇沉淀法 ,取 100 mL 发酵液 3 000 r/min 离心 20 min 向上清液中加入 95%乙醇到浓度 60% ,置于冰箱中过夜 ,离心得胞外粗多糖 ,洗涤后溶解用苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>测定多糖含量。

1.2.3 还原糖的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 DNS 比色法<sup>[6]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 碳源对长根菇深层发酵的影响

基础培养基添加 0.3%的蛋白胨 ,分别再添加各种碳源 2% ,进行碳源实验 ,考察各种碳源对菌体生物量和胞外多糖的影响 ,试验结果见图 1。

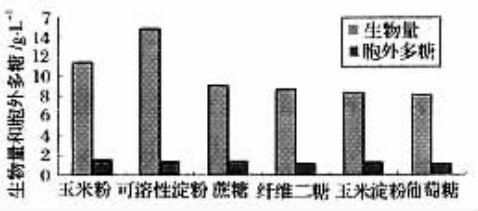


图 1 碳源对长根菇深层发酵的影响

结果表明 ,长根菇对单糖、双糖、多糖和天然农副产品均能较好地利用 ,对玉米粉、蔗糖和可溶性淀粉利用效果最好 ,其中以可溶性淀粉为碳源 ,菌体生物量最多 ,但分泌胞外多糖的能力不及玉米粉和蔗糖 ,从胞外多糖的产量和原料成本综合考虑 ,易选择玉米粉为最佳碳源。

2.2 氮源对长根菇深层发酵的影响

基础培养基添加 2%的蔗糖 ,分别再添加 0.3%的各种氮源 ,进行氮源实验 ,实验结果见图 2。

图 2 表明 ,长根菇对各种氮源的利用存在明显差异 ,其中对有机氮源的利用总体上优于无机氮源 ,菌体生物量及胞外多糖的产率都明显高于无机氮源 ,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等无机离子的存在影响环境体系的 pH 值 ,不利于菌体生长 ,基本上不分泌胞外多糖 ;在有机氮源中以牛肉膏、豆饼粉的利用效果最佳 ,本实验以豆饼粉为

最适氮源。

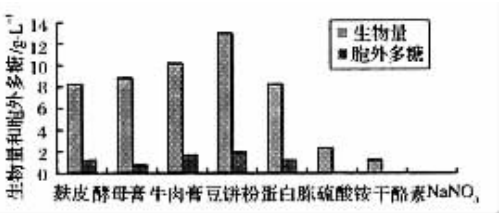


图 2 氮源对长根菇深层发酵的影响

2.3 碳源浓度对长根菇深层发酵的影响

基础培养基中以 0.3%的牛肉膏为氮源 ,添加不同浓度的蔗糖 ,进行碳源浓度实验 ,结果见表 1。

表 1 碳源浓度对长根菇深层发酵的影响

碳源浓度/g·L <sup>-1</sup>	10	20	30	40	50
C/N 比	17	35	52	70	87
生物量/g·L <sup>-1</sup>	9.13	9.67	10.75	10.12	9.52
胞外多糖/g·L <sup>-1</sup>	0.74	1.57	2.55	2.67	2.20

由表 1 可以看出 ,蔗糖质量浓度在 30~40 g/L 为宜 ,碳源浓度太高抑制菌体的生长 ,太低不利于胞外多糖的分泌。

2.4 氮源浓度对长根菇深层发酵的影响

基础培养基中以 2%的蔗糖为碳源 ,添加不同的牛肉膏浓度 ,进行氮源浓度实验 ,结果见表 2。

表 2 氮源浓度对长根菇深层发酵的影响

氮源浓度/g·L <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5
C/N 比	70	35	23	17	14
生物量/g·L <sup>-1</sup>	9.53	10.90	10.38	9.69	9.58
胞外多糖/g·L <sup>-1</sup>	2.76	2.65	2.42	2.15	1.90

由表 2 可以看出 ,牛肉膏质量浓度增加时 ,菌体生物量明显提高 ,胞外多糖产量下降 ,低氮浓度对菌体生长有利 ,因此氮源浓度控制在 1~2 g/L 为好。

从碳、氮源质量浓度对长根菇深层发酵结果亦可以看出 ,较高的 C/N 比有利于长根菇胞外多糖的形成。

2.5 无机盐对长根菇深层发酵的影响

以上述优化后的培养基 ,添加不同浓度的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 来考察对长根菇深层发酵的影响 ,结果(见表 3)可看出 ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 对菌体生长以及胞外多糖的

分泌均有一定的影响,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  浓度分别在 3 g/L 和 2 g/L 时菌体生长和产胞外多糖的情况均较好。

表 3 无机盐对长根菇深层发酵的影响

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ /%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /%	生物量 /g·L <sup>-1</sup>	胞外多糖 /g·L <sup>-1</sup>
1	0	11.21	2.01
2	1	11.97	2.14
3	2	12.61	2.75
4	3	11.39	2.24

2.6 棕榈酸对深层发酵的影响

棕榈酸能改变细胞膜结构和促进胞外多糖的形成<sup>[8]</sup>, 试验结果如图 3 所示, 棕榈酸对长根菇菌体生长有较好的促进作用, 胞外多糖的分泌与菌体生长基本吻合, 当棕榈酸添加量超过 0.15%, 胞外多糖增加趋势不明显, 因此, 在长根菇发酵过程中添加 0.15% 棕榈酸较为适宜。

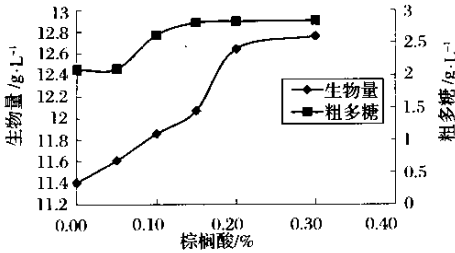


图 3 棕榈酸对长根菇液体发酵的影响

2.7 7L 发酵罐发酵试验

以玉米粉 2%、豆饼粉 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%、棕榈酸 0.15%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  10mg/100mL 为发酵培养基, 在 7L 发酵罐进行长根菇发酵动力学试验, 实验结果如图 4 和图 5。

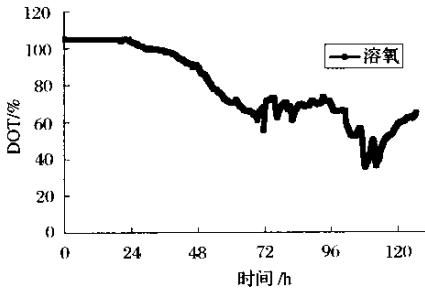


图 4 长根菇发酵过程溶氧变化

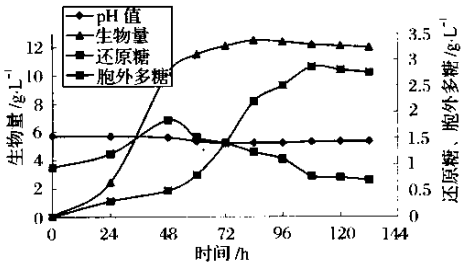


图 5 长根菇发酵产多糖曲线

结果表明,长根菇菌丝体生长和胞外多糖的形成属于生长非偶联型<sup>[8]</sup>,胞外多糖的生产属于长根菇发酵过程的次级代谢产物,在发酵后期大量积累,菌丝体生长从 24 h 开始进入对数生长期,72 h 后趋于平缓,溶解氧消耗相对平稳,长根菇胞外多糖自 48 h 后大量积累,110 h 左右到达最高值 2.85 g/L,溶解氧自 96 h 后被迅速消耗,表明胞外多糖开始大量合成,需要大量的氧参与合成代谢,110 h 溶解氧上升,多糖合成速率下降,长根菇整个发酵过程 pH 变化波动不明显,可能与该菌株分泌的酸性物质较少有关,还原糖由于本试验采用淀粉质作为碳源,存在一个原料被分解再利用的过程,还原糖在 48 h 达到最大值 1.97 g/L,之后由于胞外多糖的快速积累,呈逐渐下降趋势,110 h 左右还原糖趋于稳定,与胞外多糖的合成速率趋于一致,若以胞外多糖为发酵终点评价指标,应选择发酵时间为 110 h 左右。

3 结 论

新型药用资源和保健食品的开发和活性成分的筛选是目前国内外的研究热点<sup>[9]</sup>,长根菇是目前引起关注的一种新型珍稀食药菌,作者考察了不同营养因子对长根菇深层发酵的影响,具有一定的实际意义,同时作者在实验中发现,长根菇发酵在含有一定固体颗粒的培养基中生长有利于菌丝的断裂和增殖,菌丝球直径小,密度大,多糖合成产量高,清液发酵长根菇菌丝球直径大,数量少,多糖合成能力下降,菌丝球直径大小、密度影响多糖的合成能力,与 Fang 等人<sup>[10]</sup>报道一致。

研究如何能协同高产长根菇多糖和长根菇素,是下一步的研究重点,从而起到提高机体抗肿瘤免疫力和降血压的双重功效,在 7 L 发酵罐上对长根菇发酵动力学试验可以看出,长根菇胞外多糖在发酵后期开始大量合成,溶解氧迅速下降,发酵过程的供氧水平有可能会影响多糖的合成速率,因此能够采用溶解氧反馈控制的流加发酵技术,来实现长根菇高密度菌丝体培养和胞外多糖高合成产量相对统一成为可能,这也是本课题进一步的研究内容。

参 考 文 献

1 李建宗. 人工培养长根菇的营养条件研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2001,29(2):68~70  
2 卯晓岚. 中国食用菌百科[M]. 北京:农业出版社,1993  
3 李建宗. 酸碱度、空气和光照对长根菇生长发育的影响[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2002,25(2):67~69

4 李建宗. 温湿度对长根菇生长发育的影响[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2001,24(3):85~88  
5 闵三弟,成全些,宋士良. 长根菇深层发酵和多糖测定[J]. 上海农业学报,1994,10(4):36~40  
6 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1981  
7 Fan Chiang Yang, Yn Fu Ke, Shang Shin Kuo. Effect of acid on the mycelial growth and polysaccharide formation by Ganoderma lucidum in shake flask culture[J]. Enzyme and microbial technology,2000,27(4):295~301  
8 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京:化工出版社,1999  
9 吴梧桐,高美凤,吴文俊. 多糖的抗肿瘤作用的研究进展[C]. 南京生化药学与多糖类药物国际学术会议论文集,2003:12~20  
10 Qing-Hua Fang, Ya-Jie Tang, Jian-Jiang Zhong. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of Ganoderma lucidum[J]. Process Biochemistry,2002,27(4):1375~1379.

Effects of Nutrient Factors on Liquid Fermentation  
of *Oudemanciella radicata*

Zou Xiang

(Institute of Modern Biopharmaceuticals, Southwest China Normal University, Chongqing, 400715)

**ABSTRACT** In this paper, the nutrient factors of *Oudemanciella radicata*, including single carbon source, nitrogen source, C/N ratio, growth factors and inorganic salts, were studied in submerged fermentation. The optimal medium compositions of fermentations were as follows: corn powder 2%, bean cake powder 0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%, palmitic acid 0.15%,  $\text{V}_{\text{B}_1}$  10 mg/100mL. The fermentation kinetics study was done under these condition and it is showed that the maximum extracellular polysaccharide (EPS) concentration was 2.85 g/L, and the optimum ferment time was 110 hours.

**Key words** *Oudemanciella radicata*, submerged fermentation, extracellular polysaccharide

信息窗

### 芬兰推出降血压饮料

芬兰最近开发出一种有助于降低血压的牛乳保健饮料,这种名为“埃沃卢斯”的新饮料,是通过在脱脂牛乳中添加乳酸菌加工制成。

它将牛乳蛋白分离为降低血压的生物活性肽,临床试验结果表明,高血压患者每天喝上一杯这种牛乳,5~7周以后,高血压出现明显下降。在欧洲国家,患高血压症的人口比例较高,仅芬兰国内,大约就有50万多人,约占全国人口的10%。而欧洲国家有降血压功能的健康饮料并不多,因此该新产品在国内外的销售前景良好。