

液态发酵猴头菌多糖工艺优化研究(Ⅳ) ——培养基重要组分的影响

孙红斌¹ 刘梅森² 陈海晏²

1(江西中德联合研究院,南昌,330047)

2(南昌大学食品科学与工程系,南昌,330047)

摘 要 用 $L_9(4^3)$ 正交试验法研究了液态发酵猴头菌多糖培养基中 4 种主要因素的配比方法,从中筛选出了培养基中 4 个主要因素的适宜浓度比及它们对猴头菌多糖生物合成的大小和主次顺序,当葡萄糖为 3%~4.5%,复合氮源为 1.5%~1.68%, V_{B_1} 为 0.001%~0.0015%,pH 为 5.0~5.2 时猴头菌多糖产量最高,它们对猴头菌多糖生物合成的主次顺序为氮源、碳源、pH、 V_{B_1} 。

关键词 液态发酵 猴头菌多糖 影响因素 筛选

猴头菌(*Hericium erinaceus*)是一个食药兼用的真菌,人们利用的主要是它的药用价值,但据文献分析,目前尚未有关于猴头菌多糖(*Hericium erinaceus* polysaccharide HEP)的液态发酵培养基复合因子影响的研究报道,只有少量的对其菌丝体的研究报道^[1,2]。为了便捷快速地开发猴头菌并利用其多糖,有必要研究液态发酵 HEP 培养基中主要因子的影响顺序及适宜配比,以指导人民的实践。

1 材料和仪器设备

1.1 供试菌株

菌株(中科院微生物所)。

1.2 主要仪器设备

电热手提式高压蒸汽消毒器(上海),隔水式电热恒温培养箱(浙江),THZ-82A 型台式恒温振荡器(上海),800 型电动离心沉淀器(江苏),pHB-4pH 型酸度计(上海),722 型分光光度计(上海),DT-100 单臂天平(北京),旋转蒸发仪等。

1.3 培养基

试管斜面为 PDA 培养基,液态种子培养基为葡萄糖 3%,黄豆粉 0.5%,酵母膏

0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%,水适量,pH 自然,摇瓶培养基(见结果与讨论)。

2 方 法

2.1 多糖测定

硫酸蒽酮比色法。

2.2 工作曲线

按文献[3]方法制作。

2.3 液态种子培养

取 PDA 试管斜面种 0.8 cm²,置 250 mL 摇瓶中,150 r/min,28℃ 培养 72 h,摇瓶装液量 50 mL。

2.4 摇瓶培养

液态种子 3 d,接种量 10%,150 r/min,28℃ 培养 168 h,摇瓶装液量 50/250 mL。

2.5 多糖的分离提取

菌丝体于研钵中研碎,加入适量水于沸水浴中浸提 4 h,离心沉淀(3000 r/min)弃沉淀物,取上清液(I),培养液于 80℃ 水浴中隔水加热,真空抽滤,得滤液(II),合并(I)和(II),旋转蒸发浓缩至原体积的 1/2~1/3,加入 15 倍 95%乙醇醇析 24 h→离心(3000 r/min)→弃上清液,白色沉淀物用无水乙醇洗出→Sevage 法去蛋白 2 次→乙醚洗 2 次→

第一作者:硕士,讲师(刘梅森为博士研究生,现任北京亚克西食品有限公司高级技术顾问)。

收稿时间 2001-03-08,改回时间 2002-01-31

80℃ 蒸馏水溶解→待测。

2.6 试验设计

4 因素 3 水平正交实验(见表 1) 9 个组合随机置于 THZ—82A 型台式恒温振荡器中进行振荡培养。

2.7 数据的统计检验

结果见表 2。计算 4 因素的极差 R 值，

比较其大小,判断各因素对 HEP 影响的大小,通过方差分析来分析各因素间的差异性。

表 1 试验因素和水平表

	葡萄糖/%	氮源/%	$V_{B_1} \times 10^2/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	pH
	A	B	C	D
1	3.00	1.00	0.50	4.50
2	4.50	1.50	1.00	5.00
3	5.00	1.68	1.50	5.20

注:氮源为(黄豆粉+玉米粉+麸皮粉=7:2:1)

表 2 $L_9(4^3)$ 正交试验的 HEP 结果及分析

列号	葡萄糖/%	氮源/%	$V_{B_1} \times 10^2/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	pH	HEP/mg		
	A	B	C	D	x_1	x_2	x
1	1	1	1	1	46.42	47.06	93.48
2	1	2	2	2	55.98	55.00	110.98
3	1	3	3	3	74.57	73.55	148.12
4	2	1	2	3	55.46	54.58	110.04
5	2	2	3	1	65.58	65.04	130.62
6	2	3	1	2	59.55	58.90	118.54
7	3	1	3	2	51.97	51.37	103.34
8	3	2	1	3	61.05	62.69	121.74
9	3	3	2	1	72.32	73.16	145.48
K_1	352.66	306.86	333.67	369.58	K_1, K_2, K_3 为各因素		
K_2	359.11	362.34	366.50	332.77	水平 1、2、3 的总和		
K_3	370.56	412.05	382.08	379.90			
k_1	117.55	102.29	111.22	123.19	k_1, k_2, k_3 为 $K_1, K_2,$		
k_2	119.70	120.78	122.17	110.92	K_3 的平均值		
k_3	123.52	137.50	127.36	126.63			
R	5.97	35.21	16.14	15.71			

3 实验结果

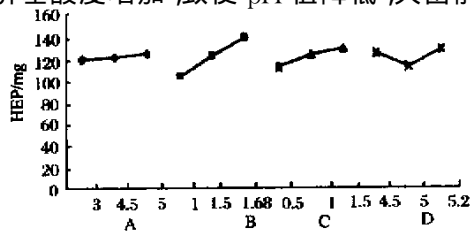
3.1 试验因素的主次分析

从表 2 直观分析可知 A 因素极差 R 值中 R_B 因素最大,其次是 R_C 值, R_D 为第 3,最后是 R_A 。极差 R 值大小说明 B 因素对液态发酵猴头菌多糖的影响最大,对 HEP 产量起主要影响作用。其次是 C 因素和 D 因素,影响最小的是 A 因素,它们的主次顺序为 $B > C > D > A$ 。

3.2 直观分析

从表 2 和图 1 可知,第 3 组合得到的 HEP 为 148.12 mg,大于任何其他组,其方案为:葡萄糖为 3%,氮源为 1.68%, V_{B_1} 为 1.5 mg/100 mL, pH 为 5.2。葡萄糖值中 k_3 值最大,氮源值中 k_3 也是 3 水平中最大的,同样 V_{B_1} 值中 k_3 为最大, pH 值也是 k_3 值最大。

但从 k 值的增加幅度来看, A 因素 k_1 到 k_2 较 k_2 到 k_3 大, B、C 2 因素均以 K_1 到 K_2 为最大,而 K_2 到 K_3 则幅度很小, pH 值的结果有点异常,初步分析可能是因为调 pH 值是在先加 V_{B_1} 后进行的,而 V_{B_1} 与 HCl 会通过氢键结合,故在调 pH 时有一部分 HCl 与 V_{B_1} 结合,导致 HCl 用量增加,高压灭菌时又使氢键破坏,使游离的 HCl 增加,为此,灭菌后培养基酸度增加,致使 pH 值降低,灭菌前 pH



因素

图 1 极差分析图

为 5.2 的灭菌后朝 5.0 方向变化,故图中 5.2 产量最高与前面的单因素试验并不矛盾,但这里 pH 为 5.0 的产量却比 4.5 还低,其原因不祥,有待进一步研究。

3.3 方差分析

从表 3 知 A、B、C、D 4 因素中除 A 外 C 因素的 F 值大于 $F_{0.005}$ 值, B、D 的 F 值大于 $F_{0.01}$ 值,说明 B、C、D 3 因素水平间的差异均达到显著或极显著水平,即 B、C、D 3 因素在本液态培养中是主要因素,其中 B 的 F 值为 31.52 均大于其他 3 个因素,即 $B > C > D > A$ 进一步表明与正交表的 R 值分布情况相符。

表 3 方差分析

变异来源	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F 值	$F_{0.005}$	$F_{0.01}$
A	2	36.93	18.46	1.45	4.26	8.02
B	2	802.72	401.36	31.55**		
C	2	203.47	101.74	8.00*		
D	2	204.51	102.26	8.04**		
E	9	114.44	12.72			
总计	17	1362.07	80.12			

4 分析与讨论

通过正交试验可知,在液态发酵生产

HEP 时,葡萄糖、氮源、 V_{B_1} 和 pH 4 因素对 HEP 产量有一定影响,尤以氮源显著,促生长剂和 pH 值相对次之且对 HEP 的影响处于近乎同等水平。

通过方差分析可知, B、C、D 3 因素间的差异均达到显著或极显著水平,而 A 因素的影响则表现出不显著性,这一结果正好与极差分析相一致,说明葡萄糖对 HEP 的影响不是主要的。

4 因素对 HEP 影响的主次顺序为 $B > C > D > A$, 4 因素的最佳水平为 $A_3B_3C_3D$,

这一最佳水平组合的 C/N 比为 26,这与前面的研究相一致。

参 考 文 献

- 王小雄、高黎明、古玉环等. 中国食用菌, 1997 (1) 33~34
- 乔德生、李绍木、吕翠兰等. 中国食用菌, 1991 (3) 20~22
- 刘梅森、陈海晏. 中国畜产与食品, 1998 (6) :246~247

Study on the Optimization of Polysaccharide Production from *Hericium erinaceus* by Submerged Culture(Ⅳ)

—Effect of Important Components in Medium

Sun Hongbin¹ Liu Meisen² Chen Haiyan²

¹(Jiangxi-OAI, Nanchang, 330047)

²Dept. of Food Science and Engineering, Nanchang Univ., Nanchang, 330047)

ABSTRACT In the medium, the optimum ratio of four important factors that effect *Hericium erinaceus* producing HEP is studied using the science experiment of $L_9(4^3)$ and the results show that the HEP production reaches maximum when glucose, multi-nitrogen sources, vitamin B_1 and pH value are 3%~4.5%, 1.5%~1.68%, 0.001%~0.0015% and 5.0~5.2 respectively, the sequence of their effecting HEP production is nitrogen sources, carbon sources, pH value, vitamin B_1 .

Key words submerged culture, *Hericium erinaceus* polysaccharide, effect factors, screening