

红缘拟层孔菌最佳母种培养基筛选及液体发酵培养基配方的初步研究

徐田田, 马琳

摘要 [目的] 筛选并优化红缘拟层孔菌的最佳母种培养基和液体发酵培养基的配方。[方法] 将等量红缘拟层孔菌分别接种 4 种不同的固体培养基上, 定期观察各组培养基上菌丝的长势和老化度。以胞内多糖和菌丝体生物量为指标, 利用单因素和正交设计实验对红缘拟层孔菌的液体培养基配方进行筛选及优化。[结果] 红缘拟层孔菌液体发酵培养基最佳配方为 (10 g/L): 大米粉 5, 酵母粉 1, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.15, 维生素 B10.04。[结论] 优选出了红缘拟层孔菌的最佳母种培养基和液体发酵的培养基, 为下一步液体培养条件的探索奠定了基础。

关键词 红缘拟层孔菌; 多糖; 母种培养基; 液体发酵; 正交设计实验

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2010)02-0095-03

Screening of mother medium and the optimal media composition for the liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola*

Xu Tian-tian, Ma Lin

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To select the mother medium composition and the optimal media composition for the liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola*. [Methods] The same amount of *Fomitopsis pinicola* was cultured to compare their growth rate and aging degree by four different solid media. Taking the mycelial biomass and production of polysaccharide as the detecting indices, the optimum submerged fermentation parameters for *Phellinus igniarius* were studied by single factor test and orthogonal test. [Results] *Fomitopsis pinicola* growing on chemical media grew quickly, so the chemical media was suitable to be used as expanding species for reproduction. The aging degree of hypha growing on chemical media was most slowly, so bran media was suitable to be used as conservation. The optimum formula for liquid fermentation (g/100mL) were: rice powder 5, yeast 1, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.15, VB1 0.040. [Conclusion] Our study has selected the mother medium composition and the optimal media composition for the liquid fermentation of *Fomitopsis pinicola* and provided the scientific basis for the further research of *Fomitopsis pinicola*.

Key words: *Fomitopsis pinicola*; polysaccharide; mother medium; liquid fermentation; orthogonal test

红缘拟层孔菌(*Fomitopsis pinicola*)又名红缘层孔菌、红缘树舌。

菌多糖具有独特的生物学活性而日益受到重视。红缘拟层孔菌的主要有效成分是多糖, 红缘拟层孔菌多糖主要来源于子实体, 但子实体生长周期长, 自然资源较稀少。目前国内还未见对于红缘层孔菌液体培养的报道。本实验从野生红缘拟层孔菌子实体中分离出菌丝母种并筛选出适宜于扩种繁殖和作菌种保存的母种培养基, 再利用单因素和正交设计实验筛选并优化出多糖产量最高的液体培

养基配方。

1 材料与仪器

1.1 菌种 采自长白山, 经本校马琳教授鉴定为红缘拟层孔菌(*Fomitopsis pinicola*)子实体。

1.2 试剂 葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、琼脂、硫酸铵、维生素 B1、萘酮、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、98%浓硫酸为国产分析纯, 葡萄糖标准品(购于中国药品生物制品检定所); 大米粉、马铃薯、玉米面、麸皮、黄豆面、小米面为食品级。

1.3 仪器 立式压力蒸汽灭菌锅 YXQ-LS-50 S11 (上海博讯); 生化培养箱 SPX-150B5-11 (上海新苗); 电热恒温立式摇床 SYC-L (上海联环); 电热套 KDM 型常温电热套; 电热恒温干燥箱(天津实验仪

作者单位 300193 天津中医药大学

作者简介 徐田田(1984-), 女, 中药学院 2007 级硕士研究生。

通讯作者: 马琳。

器厂) ;GH802-2 单人垂直净化工作台(天津生物洁净设备厂) ;SHB-95 循环水式多用真空泵(河南省玉华仪器有限公司) ;TD6001 百分之一电子天平(天津天马仪器厂)。

2 方法

2.1 母种的分离和制备

2.1.1 母种斜面培养基制备(10 g/L) 葡萄糖 2、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、琼脂 2、维生素 B1 0.1、pH5.5。

2.1.2 子实体消毒 先将子实体的表面用清水冲洗干净,用纱布擦干水分,后移到无菌室内,紫外照射 30 min,再用 75%乙醇棉擦拭两遍,最后用无菌水冲洗数次待用。

2.1.3 菌丝分离 从消毒好的红缘拟层孔菌子实体中部,切取约 0.5 cm² 小块组织,接在无菌的斜面培养基上,加上棉塞,置 28 ℃恒温培养箱内培养,2 d 后可见组织块周围长出白色绒毛状菌丝。待菌丝长满斜面后,可扩大培养,即得斜面母种。将扩大培养后的斜面母种放置 4 ℃冰箱保存待用。

2.2 液体培养

2.2.1 液体摇瓶种子培养基配方 采用通用的药用真菌培养基(10 g/L):葡萄糖 3、蛋白胨 0.3、酵母粉 0.2、硫酸铵 0.2、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、pH5.5。

2.2.2 液体摇瓶种子培养 250 mL 摇瓶装液体培养基 100 mL 接活化后的斜面母种 4 块,每块约 0.5 cm²,置旋转式摇床,转速 130 r/min,28 ℃震荡培养 5 d,即得液体摇瓶种子。

2.2.3 二级摇瓶培养 100 mL 摇瓶装液体培养基 80 mL,接种量 25%,置旋转式摇床,转速 130 r/min,28 ℃震荡培养 5 d。

2.3 母种最佳培养基的筛选 供试培养基:1)PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。2)玉米粉培养基:玉米粉 35 g/L,蛋白胨 2 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 17 g/L。3)麸皮培养基:麸皮 50 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸铵 0.5 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,琼脂 20 g/L。4)化学培养基:葡萄糖 20 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,维生素 B1 1 g/L,琼脂 20 g/L,酵母粉 6 g/L^[1]。

取等量菌丝块分别接种到 4 种培养基上,设 5 次重复,在 28 ℃下恒温培养。48 h 后记录菌丝生长情况。每 2 d 记录菌丝生长和老化情况。

2.4 液体培养基氮源的选择 选择了 6 种常见的

原料作氮源,分别为:酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、麸皮、豆粕、玉米粉,实验浓度为 10 g/L。培养基其他组成成分为(10 g/L):葡萄糖 3、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、维生素 B10.1。采用 250 mL 摇瓶进行震荡培养,摇瓶装液量 80 mL,接种量 25%,每种氮源重复做 8 瓶,培养温度 28 ℃,转数 130 r/min,培养 6 d,测定菌丝干质量。

2.5 液体培养基碳源的选择 选择了 6 种常见的原料作碳源,分别为:葡萄糖、蔗糖、大米粉、玉米粉、小米面、黄豆面,各为 30 g/L。培养基其他组成成分为(10 g/L):酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05、维生素 B10.1。250 mL 摇瓶震荡培养,摇瓶装液量 80 mL,接种量 25%,每种碳源重复做 8 瓶,培养温度 28 ℃,转数 130 r/min,培养 6 d,测定菌丝干质量。

2.6 液体培养中维生素 B1 用量的选择 维生素 B1 的浓度(10 g/L) 分别设为 0.025、0.040、0.050、0.060。培养基其他组成成分为:大米面 3、酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.05。250 mL 摇瓶震荡培养,摇瓶装液量 80 mL,接种量 25%,每种碳源重复做 8 瓶,培养温度 28 ℃,转数 130 r/min,培养 6 d,测定菌丝干质量。

2.7 优化培养基配方的确定 在单因素分析结果的基础之上,分别以大米粉、酵母粉、磷酸二氢钾、无水硫酸镁为四因素,按照 L9(3⁴)正交表设计试验。250 mL 摇瓶震荡培养,摇瓶装液量 80 mL,接种量 25%,每组设 8 次重复,培养温度 28 ℃,转数 130 r/min,培养 6 d,测定菌丝干质量。见表 1。

表 1 正交因素水平表

组别	A.大米粉	B.酵母粉	C.磷酸二氢钾	D.硫酸镁
1	3	1	0.1	0.05
2	4	2	0.2	0.10
3	5	3	0.3	0.15

2.8 测定方法

2.8.1 菌丝干质量的测定 发酵液用布氏漏斗过滤得菌丝,用清水冲洗干净,置烘箱 60 ℃烘干至恒质量,称质量。

2.8.2 菌丝多糖含量测定 蒽酮-硫酸法。

3 结果

3.1 母种最佳培养基的确定 见表 2。

B 组长势最慢,接种 20 d 时还未完全长满斜面,菌丝生长后期停滞,并出现老化现象,最先排

表 2 菌丝生长情况对照表 d

组别	A	B	C	D
长势	++	+	++	+++
满管时间	12	-	14	8
老化时间	8	0	18	12

注“+++”表示菌丝长势强,“++”表示菌丝长势一般,“+”表示菌丝长势弱。

除 A 组生长速度较快,但在还未长满斜面的菌丝已经开始老化,菌丝很快从白色变为深褐色,也没有实际用途。C 组菌丝长满斜面时,颜色仅为淡黄色,菌丝老化速度最慢,说明其营养成分与菌丝后期生长较为匹配,故麸皮培养基适宜作菌种保存培养基。D 组菌丝生长速度最快,且长满斜面时,菌丝为黄色,老化速度较慢,故化学培养基适宜于扩种繁殖使用。

3.2 液体培养基中氮源的确定 见表 3。

表 3 不同氮源对液体发酵的菌丝生物量和多糖产量的影响

氮源	菌丝干质量(g)	多糖含量(%)	多糖产量(mg)
酵母粉	2.79	3.12	87.05
蛋白胨	1.45	0.61	8.85
牛肉膏	2.59	0.35	9.07
麸皮	1.78	0.37	6.59
豆粕	2.00	0.48	9.60
玉米粉	1.24	0.39	4.84

由表 3 可见,不同氮源对液体培养菌丝的生长量和多糖含量影响明显。其中,含酵母粉的液体培养基既能促进菌丝生长,又能促进提高多糖含量,产生的多糖总量明显高于其他。

3.3 液体培养基中碳源的确定 见表 4。

表 4 不同碳源对液体发酵的菌丝生物量和多糖产量的影响

碳源	菌丝干质量(g)	多糖含量(%)	多糖产量(mg)
葡萄糖	3.03	0.71	21.51
蔗糖	3.69	0.45	16.61
大米粉	5.59	3.27	182.79
玉米粉	4.67	3.00	140.10
小米面	6.47	2.77	179.22
黄豆面	7.12	0.43	30.62

由表 4 可见,红缘拟层孔菌丝对碳源的利用相当广泛,对单糖、寡糖、多糖均可利用,不同碳源对液体培养的菌丝生长量和多糖含量也有非常明显的影响。

3.4 液体培养基维生素 B1 浓度的确定 见表 5。

表 5 维生素 B1 浓度对液体发酵的菌丝生物量和多糖产量的影响

VB1 浓度(g/100 mL)	菌丝干质量(g)	多糖含量(%)	多糖产量(mg)
0.025	7.07	0.56	39.59
0.040	6.38	1.86	118.67
0.050	7.43	0.64	47.55
0.060	7.07	0.54	38.18

由表 5 可以看出,真菌是维生素 B1 的天然缺陷型,必须外界添加才能生长良好。维生素 B1 对真菌的生长相当重要,他们以一种辅酶的形式存在。不同的维生素 B1 浓度对菌丝干重影响不大,但在浓度为 0.40 g/L 时菌丝的多糖含量最高。因此,确定维生素 B1 的浓度为 0.40 g/L。

3.5 优化培养基配方的确定 采用直观分析法分析正交结果,第 8 组 A3B2C1D3 液体发酵培养基多糖产量最高,为 0.317 9 g。由极差可以看出,各因素对多糖总量的影响大小为:A>B>D>C,即大米粉是影响多糖产量的最主要因素,其次为酵母粉、硫酸镁和磷酸二氢钾。分析每个因素三水平之间是否有差距,数据处理后显示 A3 产量明显高于其他两水平,依照此方法确定理论最优方案为:A3B1C1D3。将已做实验的 A3B2C1D3 的组合和未做过实验的 A3B1C1D3 的组合进行对比实验,8 次重复称量菌丝干质量并测定多糖含量,A3B1C1D3 组的多糖总量为 0.332 1 g。由此确定红缘拟层孔菌深层发酵液配方为(10 g/L):大米粉 5、酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.15、维生素 B1 0.040。

4 小结

从实验结果来看,含麸皮的母种培养基适宜作红缘拟层孔菌种保存培养基,而化学培养基适宜于扩种繁殖使用。由单因素试验可知,确定最佳碳源是大米粉,最佳氮源是酵母粉。经正交及验证实验,可以确定最优液体发酵配方为(10 g/L):大米粉 5、酵母粉 1、磷酸二氢钾 0.1、硫酸镁 0.15、维生素 B1 0.040。其中,碳源是影响多糖产量的决定性因素。

参考文献:

- [1] 徐锦堂.中国药用真菌学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:235-252.
- [2] 张丽萍,张翼伸.红缘层孔菌多糖生理活性的初步研究[J].东北师大学报(自然科学版),1988,(4):109-114.
- [3] 张丽萍,苗春艳,许丽艳.红缘层孔菌多糖对小鼠核酸蛋白质合成及对肿瘤 S-180 病毒 CBV-3、HSV- 细胞增殖的影响[J].东北师大学报(自然科学版),1993,2:104-108.

(收稿日期 2009-11-13)