

长根菇液体深层发酵条件的研究

邹祥, 胡昌华*

(西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 研究了各种营养因子对长根菇深层发酵的影响, 确定了合适的碳源、氮源、C/N 比、无机盐、生长因子的浓度, 在初始 pH5.5、250ml 摇瓶装液量 50ml、接种量 10%、温度 26℃ 的培养条件下, 长根菇深层发酵结果最佳, 在此基础上进行摇瓶发酵曲线测定, 确定了长根菇适宜发酵周期为 96h, 发酵液胞外多糖最高可达 2.85g/L。

关键词: 长根菇; 深层发酵; 胞外多糖

Studies on Submerged Fermentation Conditions of *Oudemanciella radicata*

ZOU Xiang, HU Chang-hua*

(School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The nutrient factors of *Oudemanciella radicata* were studied in the submerged fermentation. It showed that the suitable of single factors were chosen as: carbon source, nitrogen source, C/N ratio, growth factors and inorganic salts. The optimum conditions of fermentations were as follows: initial pH5.5, temperature 26℃, the cultivations performed in 250ml shake

收稿日期: 2003-12-18

* 通讯作者

作者简介: 邹祥(1976-), 男, 硕士, 主要从事微生物制药和保健食品的研究和教学工作。

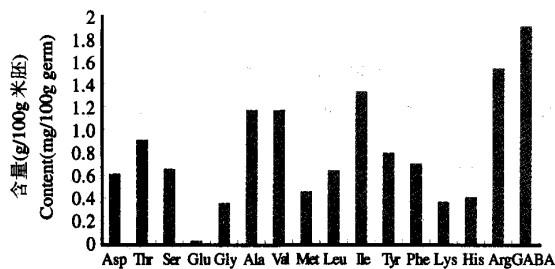


图7 胰蛋白酶富集GABA液的氨基酸组成

Fig.7 Amino acids composition of hydrolyzing supernate enriched with GABA

适合于富含GABA米胚芽健康食品的制备。

3 结论

米胚芽是富集GABA的理想原料, 通过胰蛋白酶水解米胚蛋白富集GABA, 米胚芽中的GABA可提高80倍, 这种富含GABA的米胚芽可作为具有调节血压、改善肝肾功能及促进乙醇代谢等功能的保健食品配料。有

关富含GABA的米胚芽的功能性, 笔者正在做进一步的研究。

参考文献:

- [1] H C Stanton. Mode of Action of Gamma aminobutyric acid or the cardiovascular system[J]. Arch Int Pharmacodyn, 1963, 143: 195-204.
- [2] M Ohmori, et al. Effect of Anaerobically Treated Tea (Gaboron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats[J]. Nippon Noyeikagaku Kaishi, 1987, 61: 1449-1451.
- [3] T Saikusa. Distribution of free amino acid in the rice kernal and kernal fraction and the effect of water soaking on the distribution[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1122-1125.
- [4] T Saikusa. Accumulation of Gamma aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2291-2292.
- [5] 冈田忠司. Physiological function of rice germ enriched with GABA[J]. 食品与开发(日刊), 2001, 36(6): 7-8.
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 中国轻工业出版社, 2001.

flask containing 50ml medium and inoculated to a concentration of 10%. Under these conditions, the time course of growth in shake flask was determined. The results showed that the maximum extracellular polysaccharide(EPS) concentration was 2.85g/L, when the mycelium had been cultured for the optimum cycle of 96h in the shake flask.

Key words: *Oudemanciella radicata*; submerged fermentation; extracellular polysaccharide

中图分类号: S646

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0130-05

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、微量元素等营养成分, 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^[1,2], 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有利于中老年高血压及肥胖肿瘤患者的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^[3,4], 而对长根菇深层培养的研究国内少见相关报道^[5]。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及工艺条件进行了研究, 为今后生物反应器放大和工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 长根菇(*Oudemanciella radicata*)由西南师范大学生命科学学院制药工程实验室筛选保藏。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 斜面培养基 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%, VB_1 10mg/100ml。

1.1.2.2 液体种子培养基 玉米粉 2%, 酵母膏 0.3%, 蔗糖 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, VB_1 10mg/100ml。

1.1.2.3 摇瓶发酵基础培养基 KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, VB_1 10mg/100ml。

1.1.3 培养方法

1.1.3.1 液体种子培养 将以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 25℃, 160r/min 培

养 7~8d。

1.1.3.2 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 25℃, 160r/min 培养 6d。

1.2 分析方法

1.2.1 菌体生物量(DCW)测定 取 100ml 发酵液, 3000r/min 离心 20min, 经自来水洗涤多次后, 将菌丝体在 105℃ 烘干至恒重, 分析天平称重。

1.2.2 胞外多糖(EPS)测定 采用乙醇沉淀法, 取 100ml 发酵液, 3000r/min 离心 20min, 向上清液中加入 95% 乙醇到浓度 60%, 冰箱过夜, 离心得胞外粗多糖, 用水溶解后苯酚-硫酸法^[6]测定多糖含量。

1.2.3 还原糖的测定

还原糖 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[6]。

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。

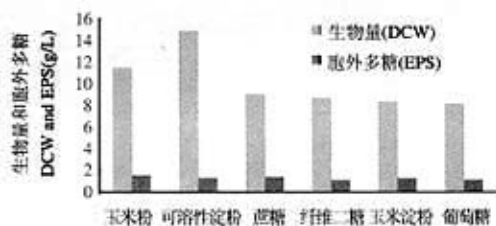


图1 碳源对长根菇深层发酵的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on the submerged fermentation of *O. radicata*

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的利用, 对纤维二糖、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纤维二糖和蔗糖, 从胞外多糖的产量和原料成本综合考虑, 选择玉米粉和蔗糖为最佳碳源。

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。

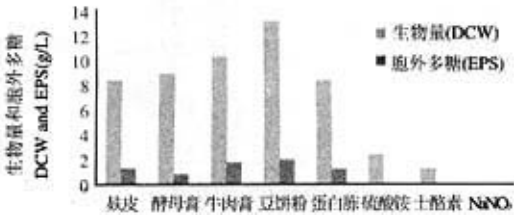


图2 氮源对长根菇深层发酵的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on the submerged fermentation of *O. radicata*

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，NH₄⁺、NO₃⁻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。

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，添加不同的蔗糖浓度，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)	10	20	30	40	50
Carbon concentrations					
C/N 比Carbon/Nitrogen ratio	17	35	52	70	87
生物量DCW(g/L)	9.13	9.67	10.75	10.12	9.52
胞外多糖EPS(g/L)	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。

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KH₂PO₄

表2 氮源浓度对长根菇深层发酵的影响

氮源浓度(g/L)	1	2	3	4	5
Nitrogen concentrations					
C/N 比Carbon/Nitrogen ratio	70	35	23	17	14
生物量DCW(g/L)	9.53	10.90	10.38	9.69	9.58
胞外多糖EPS(g/L)	2.76	2.65	2.42	2.15	1.90

和MgSO₄·7H₂O来考察对长根菇深层发酵的影响，结果(见表3)可看出，KH₂PO₄和MgSO₄·7H₂O对菌体生长以及胞外多糖的分泌均有一定的影响，KH₂PO₄和MgSO₄·7H₂O浓度分别在3g/L和2g/L时菌体生长和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

KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	生物量DCW (g/L)	胞外多糖EPS (g/L)
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 温度对长根菇深层发酵影响

温度主要影响菌体新陈代谢过程中酶的活性，较低温度时，发酵时间长，菌体生长代谢慢，温度偏高，菌体易老化，进而影响菌体生长和多糖的形成。由图3结果可知，当温度在26℃时，有利于长根菇菌体生长和多糖的形成，温度的变化对长根菇菌丝生长和多糖的合成影响显著，因此发酵温度控制在26℃左右较为适宜，与长根菇固体栽培温度相近^[4]。

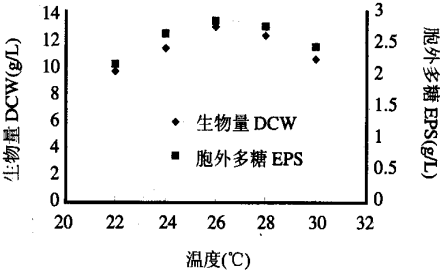


图3 温度对长根菇深层发酵的影响

Fig.3 Effect of temperature on the submerged fermentation of *O. radicata*

2.7 装液量对长根菇深层发酵的影响

考察在250ml的三角瓶中装液量对长根菇发酵的影响，结果见表4，装液量在50ml时，胞外多糖最高达

2.81g/L, 装液量太多, 菌丝体生长耗氧受到限制, 明显不利于胞外多糖的分泌。

表4 装液量对长根菇深层发酵的影响

Table 4 Effect of medium volume on the submerged fermentation of *O. radicata*

装液量Medium volume(ml)	30	50	80	100	120
生物量DCW(g/L)	10.02	12.97	11.81	11.54	11.95
胞外多糖EPS(g/L)	2.51	2.81	2.65	2.34	1.56

2.8 初始 pH 值对长根菇深层发酵的影响

表5 初始 pH 值对长根菇深层发酵的影响

Table 5 Effect of initial pH on the submerged fermentation of *O. radicata*

pH	4.5	5	5.5	6	7	7.5
生物量DCW(g/L)	9.04	10.66	12.61	11.44	10.04	8.13
胞外多糖EPS(g/L)	1.85	2.52	2.89	2.67	2.51	1.53

从表5可看出, 长根菇菌丝体在偏酸性的情况下生长较好, 当起始 pH 为 5.5 时, 长根菇的生物量和胞外多糖最高, 过高或太低都对菌体生长和胞外多糖的产量均不利, 与作者前期研究的姬松茸的生长^[7]较相似。

2.9 长根菇摇瓶发酵周期实验

以玉米粉 2%、蔗糖 1%、豆饼粉 0.3%、KH₂PO₄ 0.3%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、VB₁ 10mg/100ml 为摇瓶发酵培养基, 初始 pH5.5、250ml 摇瓶装液量 50ml、接种量 10%、温度 26℃、摇瓶转速 160r/min 为最佳培养工艺条件, 在 250ml 摇瓶中进行长根菇摇瓶发酵周期实验, 实验结果如图 4、图 5。

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^[8], 胞外多糖的生产属于长根菇发酵过程的次级代谢产物, 菌丝体生长从 24h 开始进入对数生

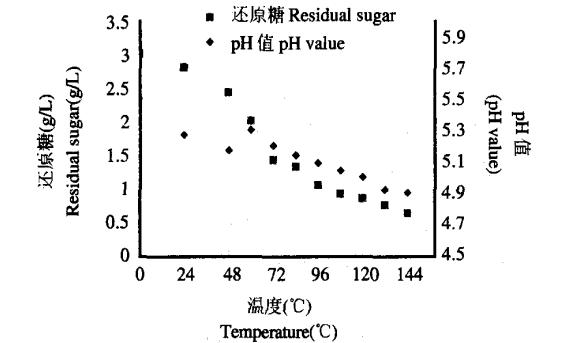


图4 长根菇摇瓶发酵还原糖和 pH 值变化曲线
Fig.4 Change curves of residual sugar and pH value of *O. radicata* on the shake flask fermentation

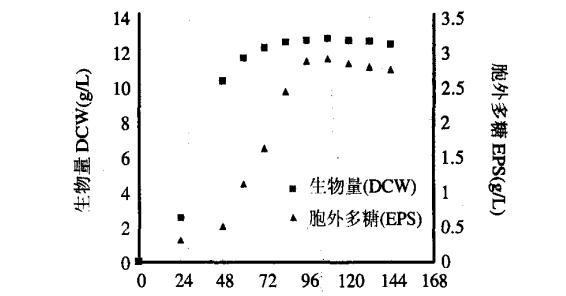


图5 长根菇摇瓶发酵生物量和胞外多糖变化曲线
Fig. 5 Change curves of DCW and extracellular polysaccharide of *O. radicata* on the shake flask fermentation

长期, 72h 后趋于平缓, 长根菇胞外多糖自 48h 后大量积累, 96h 到达最高值 2.85g/L, 之后则缓慢下降, 表明菌丝体开始利用自身分泌的多糖物质, 长根菇整个发酵过程 pH 变化波动不明显, 由起始的 5.5 降至发酵终点时的 4.9, 可能与该菌株分泌的酸性物质较少有关; 还原糖呈逐渐下降趋势, 96h 后还原糖趋于稳定, 表明菌体对营养物质利用能力下降, 菌体生长处于停滞期, 胞外多糖的合成比速下降, 若以胞外多糖为发酵终点评价指标, 应选择摇瓶发酵时间为 96h, 此时, 长根菇胞外多糖最高产量为 2.85g/L。

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^[9], 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, 结合工业化生产实际, 研究了不同培养条件对长根菇深层发酵的影响, 在初始 pH5.5、250ml 摇瓶装液量 50ml、接种量 15%、温度 26℃ 的培养条件下, 长根菇深层发酵结果最佳, 适宜发酵周期为 96h, 胞外多糖最高可达 2.85g/L, 对蔗糖产率为 0.712g/g, 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形物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^[10]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, 从长根菇摇瓶发酵周期实验可以看出, 长根菇的生长属于生长非偶联型, 胞外多糖的合成成为次级代谢产物, 因此, 能够采用控制碳源流加速率, 来实现长根菇高密度菌丝体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。

蔷薇红景天色素的提取及稳定性的研究

帕孜来提·拜合提, 祖丽皮亚·尤努斯, 阿不都拉·阿巴斯*
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 本文对蔷薇红景天色素的提取方法和色素的基本性质进行了研究。通过研究发现, 红景天色素提取时 95% (pH=3) 的乙醇水溶液提取效果最佳, 色素的最大吸收峰在 314nm 处; 日光, 温度和大多数金属离子 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 等对红景天色素的稳定性影响不大, 但是 Na^+ , Fe^{2+} , K^+ 对红景天色素有增色的趋势。这种色素不仅耐光性好, 而它的耐糖性也很好。虽然在碱性环境下, 红景天色素 pH 稳定性较差, 但在酸性条件下, 其 pH 稳定性较好。通过初步研究发现该色素具有一定的开发利用价值。

关键词: 蔷薇红景天; 色素; 提取; 稳定性

Study on Extraction and Stability of Natural Edible Red Pigment from Rhodiola Rosea

PAZILAT Bahti, ZULFIYA Yunus, ABDULLA Abbas*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The technology of extracting natural edible red pigment from Rhodiola and the characteristics of the pigment have been studied in this paper. It was clear from the results that among the several chemicals tested for the extraction of the red pigments, 95% ethanol (pH3) was optimum for the extraction of Rhodiola pigment with λ_{max} of the Rhodiola pigment was 314nm. This Rhodiola pigment was stable when they were affected by the sunshine and temperature. Most of the metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) could not interfere the stability of the pigment except Fe^{3+} . Rhodiola pigment was stable only under acid condition. The results showed that the pigment was worth of exploiting and utilizing. It might be used as one of the resources of natural edible pigments.

Key words: Rhodiola rosea; pigment; extraction; stability

收稿日期: 2004-01-05 * 通讯作者

作者简介: 帕孜来提·拜合提(1969-), 女, 讲师, 在读博士, 从事资源植物学有效成分分析和细胞生物学研究;
阿不都拉·阿巴斯, 男, 教授, 博士导师, 自治区优秀专家。

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] 邹祥, 章克昌. 姬松茸深层培养工艺条件的研究[J]. 药物生物技术, 2002, 10(6): 22-26.
- [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.