

# 蜜环菌胞外多糖的发酵条件研究

谭周进<sup>1</sup> 谢达平<sup>2</sup> 王 征<sup>2</sup> 李立恒<sup>2</sup>

(湖南农业大学食品科学技术学院 长沙 410128)<sup>1</sup>

(湖南农业大学理学院 长沙 410128)<sup>2</sup>

**摘要:** 蜜环菌是天麻的共生菌, 有研究证明, 蜜环菌的菌丝及发酵液有与天麻相类似的药理作用, 为此, 我们进行了蜜环菌深层发酵产胞外多糖条件的研究。研究表明: 菌丝生长和多糖产生的最适初始 pH 为 5.0 左右; 消泡剂用量在一定范围内增加, 有利于菌丝的生长, 但增加消泡剂用量会不利于多糖的产生; 接种量大, 菌丝得率高, 但接种量为 10% 时的多糖得率最高; 装液量试验证明, 通气量大, 有利于菌丝的生长和多糖的产生; 机械搅拌对菌丝的生长和多糖的产生都不利; 生长动态试验证明, 蜜环菌可在 6d 内完成液体发酵; 以豆粕粉作氮源时, 菌丝得率最高, 以麸皮作氮源时, 多糖产量最高; 红薯粉为蜜环菌菌丝生长和多糖产生的最适碳源。

**关键词:** 蜜环菌, 深层发酵, 胞外多糖, 理化因素

**中图分类号:** Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0033-05

## STUDIES ON THE PRODUCTION CONDITION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *ARMILLARIA MELLEA*

TAN Zhou-Jin<sup>1</sup> XIE Da-Ping<sup>2</sup> WANG Zheng<sup>2</sup> LI Li-Heng<sup>2</sup>

(College of Food Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)<sup>1</sup>

(College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)<sup>2</sup>

**Abstract:** *Armillaria mellea* is a mutualism fungus of *Gastrodia elata*. Some researches proved that *Armillaria mellea* had the similar medical efficiency to *Gastrodia elata*. The results of study on production condition of exopolysaccharides from *Armillaria mellea* showed: The optimal initial pH for the strain growth and producing polysaccharide was about 5.0. The soybean oil was harmful to produce polysaccharide. The optimal amount of inoculum was 10%. The aeration and agitation was necessary. The strain could finish fermentation in six days, Soybean cake powder was the optimal nitrogen source for the strain growth, and wheat skin was the optimal nitrogen source for polysaccharide production. Sweet potato powder was the optimal carbon source.

**Key words:** *Armillaria mellea*, Submerged fermentation, Exopolysaccharide, Physical and chemical condition

蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl ex Fr. Quél.)] 属于白蘑科 (Tricholomataceae) 真菌, 其菌丝体能在暗处发荧光<sup>[1]</sup>, 是兰科天麻属植物天麻 (*Gastrodia elata* Blumé) 的共生菌。中国医学科学院药物研究所药理室新药组 1977 年报道<sup>[2]</sup>, 在小鼠腹腔中注射蜜环菌发酵液可以延长小鼠睡眠时间, 并且与天麻水剂一样具有与阈下剂量的巴比妥钠协同的作用; 小鼠尾静脉注射试验证明, 蜜环菌发酵液能保护戊四氮引起的惊厥, 能降低尼古丁引起的小鼠死亡数、能增加狗的脑血流量与冠状动脉血流量; 小鼠口服蜜环菌发酵液试验证明无毒害作用。大量试验都证明, 蜜环菌菌丝和发酵液都具有镇静、

收稿日期: 2001-01-02, 修回日期: 2001-08-04

抗惊厥、治疗心脑血管疾病等功效,并无毒副作用。有资料证明<sup>[3]</sup>,经常食用蜜环菌子实体,可以预防视力失常、眼炎、夜盲、皮肤干燥、粘膜失去分泌能力,并可抵抗某些呼吸道和消化道感染的疾病。还有报道,蜜环菌子实体的多肽葡聚糖对肉瘤 S-180 有一定的抑制作用<sup>[4]</sup>。综上所述,蜜环菌的药用价值是相当高的,同时,蜜环菌的化学成分也很丰富,但是对于每一种成分的具体功能也还不是很清楚,特别是蜜环菌发酵液中的成分。为了找到一条高效快速利用蜜环菌药用价值的途径,完善产业化生产的工艺,以及进一步搞清楚蜜环菌的有效成分,挖掘真菌多糖资源,为利用蜜环菌提供更多的依据,我们进行了蜜环菌胞外多糖的有关研究,本文报道蜜环菌胞外多糖的发酵条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种:由华中农业大学真菌室提供。

1.1.2 菌种保存斜面培养基:PDA 斜面。

1.1.3 种子培养基及各理化因素影响试验用培养基:蔗糖 20g,葡萄糖 10g,蛋白胨 10g,酵母膏 10g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75g,  $KH_2PO_4$  1.5g,水 1000mL, pH 自然。碳源试验将其中的蔗糖和葡萄糖以对应碳源代替;氮源试验将其中蛋白胨以相应氮源代替。

### 1.2 方法

1.2.1 发酵液中多糖的提取与测定:取一定体积的发酵液在 3000r/min 下离心 10min,取 20mL 上清液于 50℃ 鼓风浓缩至 10mL,加 3 倍体积的乙醇沉淀 12h,3000r/min 离心 15min,沉淀用 75% 的乙醇洗至无还原糖反应,离心,沉淀用 60℃ 热水充分溶解,离心去沉淀,上清液定容于 100mL 容量瓶。苯酚-硫酸法测多糖含量<sup>[5]</sup>。

1.2.2 发酵液中菌丝干重的测量:将发酵物用两层纱布过滤,取菌丝放于 50℃ 吹风干燥至恒重。换算成每升发酵液中菌丝的干重。

1.2.3 培养蜜环菌的最佳碳源选择:按 2% 的用量将小麦粉和红薯粉分别煮沸 20min,冷却至 60℃,加糖化酶作用至与碘液无兰色反应,两层纱布过滤,滤液配培养基,将蔗糖按 2% 用量溶解,配培养基。每 250mL 三角瓶装 50mL 培养基,灭菌接种,26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

1.2.4 培养蜜环菌的最佳氮源选择:将麸皮按 1% 的用量加水煮沸 20min,豆粕粉按 1% 的用量加少量水浸泡一段时间,用研钵磨成浆,加水煮沸 15min,分别用两层纱布过滤,滤液配培养基,氯化铵和蛋白胨按 1% 用量溶解配培养基。每 250mL 三角瓶装 50mL 培养基,灭菌接种,26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

1.2.5 培养蜜环菌的最适初始 pH 选择:按种子培养基配方配制好的培养基用 NaOH 或 HCl 分别调至 pH4.0、5.0、6.0。每 250mL 三角瓶装 50mL 培养液,灭菌接种,26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

1.2.6 消泡剂用量对蜜环菌的影响:将配制好的种子培养基,每 250mL 三角瓶中装 50mL 培养基,然后分别加入 0、0.1%、0.2%、0.4% 的豆油,灭菌接种,26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

1.2.7 接种量对蜜环菌发酵的影响:将种子培养基分装灭菌后,分别接种 5%、10%、15% 的液体种子,26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

**1.2.8 装液量对蜜环菌的影响:** 在 250mL 三角瓶中分别装入 50mL、75mL、100mL 种子培养基, 灭菌后按同样的接种量接种液体种子, 26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养 6d。各做 3 次重复。

**1.2.9 机械搅拌对蜜环菌发酵的影响:** 在三角瓶中分别放入 0 根、1 根、2 根、4 根等 2 厘米长的玻璃棒, 灭菌接种, 26℃ ~ 27℃ 130r/min 培养 6d。各做 3 次重复。

**1.2.10 蜜环菌胞外多糖发酵动态试验:** 培养基灭菌接种后于 26℃ ~ 27℃ 130r/min 振荡培养, 第 48h 取第一次样测多糖含量及菌丝干重, 然后每隔 24h 取样测结果。各做 3 次重复。

**1.2.11 600mL 验证发酵试验:** 将培养液分装到 1000mL 的三角瓶中, 每瓶装 600mL, 设 3 次重复。灭菌, 接种量 10%, 转速 140r/min, 其它因素按最佳条件设置, 培养 6d, 终止发酵, 测菌丝干重、多糖含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳源对蜜环菌液体发酵的影响

由表 1 可知, 以红薯粉做碳源时, 蜜环菌液体发酵的菌丝产量和多糖产量都高, 小麦粉次之, 蔗糖最差。这与红薯粉的营养成分比较丰富有关, 另外, 有报道<sup>[6]</sup>以红薯粉为碳源时, 对 pH 具有较强的缓冲能力, 可以使 pH 下降缓慢, 也为蜜环菌的液体发酵提供了优越条件。

### 2.2 氮源对蜜环菌液体发酵的影响

由表 2 可知, 蜜环菌产多糖的最适氮源为麸皮, 菌丝生长的最适氮源为豆粕粉, 对氯化铵的利用效果很差。这是由于无机氮不利于某些酶的合成, 同时, 菌在利用无机氮的过程中, pH 会显著下降, 影响多糖的产生, 而有机氮却没有这些缺点。

### 2.3 初始 pH 对蜜环菌液体发酵的影响

pH 的变化会影响菌的代谢速度, 改变菌的代谢途径及细胞结构, 若发酵液 pH 偏离合适范围很远, 则菌代谢差, 甚至死亡。同时, pH 也是影响多糖合成的基本因素之一<sup>[7]</sup>。这一点, 在表 1 中红薯粉和表 2 中有

表 1 碳源对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

碳源	小麦粉	蔗糖	红薯粉
菌丝干重 (g/L)	4.6	3.5	10.3
多糖含量 (mg/mL)	0.228	0.093	0.378

表 2 氮源对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

氮源	氯化铵	蛋白胨	麸皮	豆粕粉
菌丝干重 (g/L)	0.6	4.6	3.9	10.1
多糖含量 (mg/mL)	0.065	0.078	0.444	0.102

表 3 起始 pH 对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

pH	4.0	5.0	6.0
菌丝干重 (g/L)	3.2	11.0	7.7
多糖含量 (mg/mL)	0.180	0.312	0.222

表 4 豆油用量对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

消泡剂用量 %	0	0.1	0.2	0.4
菌丝干重 (g/L)	5.5	17.0	17.6	17.2
多糖含量 (mg/mL)	0.198	0.129	0.084	0.063

由表 3 可知, 蜜环菌菌丝生长和产多糖的最适初

始 pH 均为 5.0。

### 2.4 消泡剂用量对蜜环菌液体发酵的影响

由表 4 可知，豆油用量从 0 逐增到 0.2% 时，菌丝得率相应增加，但加入 0.4% 豆油时，菌丝产率就开始稍微下降，这是由于豆油中含有一些营养物质，能够促进菌丝的生长，但用量过多的话，会影响供氧量，从而不利于好气性蜜环菌的生长。由表 4 也可知，随着豆油用量的增加，多糖产量相应下降，并且用量从 0.1% 增加到 0.2%，多糖产量急剧下降，这说明氧气对蜜环菌产多糖来说是必要的。这一结论与表 6 的结论和“氧对多糖的合成有较显著的促进作用”<sup>[8]</sup>是一致的。鉴于上述原因，工业发酵过程中用豆油做消泡剂时，加入时宜少量多次加入。

### 2.5 接种量对蜜环菌液体发酵的影响

由表 5 可知，接种量增大，菌丝得率增高，但多糖得率以 10% 接种量最好，这可能是由于接种量过大时，菌丝大量繁殖，消耗了大量的营养，不利于多糖的积累。从菌丝和多糖二者的得率来看，接种量选 10% 为佳。

表 5 接种量对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

接种量 (%)	5	10	15
菌丝干重 (g/L)	6.2	9.3	10.5
多糖含量 (mg/mL)	0.120	0.228	0.186

### 2.6 装液量对蜜环菌液体发酵的影响

由表 6 可知，装液量增加，菌丝和多糖的得率都减少，这时由于蜜环菌菌丝的生长和多糖的产生都需要氧气。所以，工业发酵过程中一定要注意氧的供应，解决好溶氧与需氧的问题。

表 6 装液量对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

装液量 (mL)	50	75	100
菌丝干重 (g/L)	7.8	5.9	5.6
多糖含量 (mg/mL)	0.360	0.300	0.258

### 2.7 机械搅拌对蜜环菌液体发酵的影响

由表 7 可知，三角瓶中玻璃棒根数增加，菌丝和多糖的得率都减少。这是由于其中的玻璃棒在振荡过程中与菌丝碰撞，会引起一部分细胞的破裂，不利于菌的生长。

表 7 机械搅拌对蜜环菌菌丝生长和多糖产量的影响

玻棒数 (根)	0	1	2	4
菌丝干重 (g/L)	7.2	6.5	6.0	5.8
多糖含量 (mg/mL)	0.429	0.369	0.363	0.361

### 2.8 蜜环菌胞外多糖发酵的动态

由表 8 可知，在 1~7d 内，随着培养时间的延长，蜜环菌菌丝和多糖的产量都增加，但从第 6d 到第 7d 时，菌丝和多糖的增加量都不高，考虑到工业发酵过程中各种因素，以培养 6d 比较合适。

表 8 蜜环菌胞外多糖发酵的动态

培养时间 (d)	2	3	4	5	6	7
菌丝干重 (g/L)	5.1	5.2	6.5	7.4	10.8	11.2
多糖含量 (mg/mL)	0.114	0.120	0.130	0.180	0.208	0.211

### 2.9 600mL 验证试验结果

发酵试验结果表明，多糖含量可达 0.485mg/mL，菌丝含量可达 20.8g/L。与杨革<sup>[9]</sup>利用深层发酵生产灵芝胞外多糖的效果基本相当，其优化工艺培养灵芝的效果为：菌

丝干重 18.6g/L, 胞外多糖含量 0.510mg/mL。

### 3 讨论

pH是影响多糖产生的一个重要因素: 蜜环菌产多糖的最适起始 pH 是 5.0。另外, 李平作等<sup>[10]</sup>在研究灵芝产胞多糖的过程中发现, 灵芝产胞外多糖的最适初始 pH 为 5.5, 且如果在发酵过程中采用流加碱的办法控制 pH 在 4.0 时, 灵芝胞外多糖的产量最高。至于蜜环菌产多糖过程中的最适 pH 值为多少, 还有待于进一步研究。如果能找到其最适值, 则有望进一步提高蜜环菌多糖的产量。

氧气是影响多糖产生的另一重要因素: 蜜环菌发酵过程中, 创造有利于氧气溶解的条件, 胞外多糖的产量要高, 这说明溶氧量大, 有利于多糖的产生。因此, 进一步研究找出其最适溶氧量, 并在发酵过程中采取措施满足要求, 将会产生更大的效益。

在研究中还发现, 菌丝球大小与多糖的产生存在一定的负相关, 即菌丝球大, 多糖产量少, 至于其间的具体关系、原因以及如何创造好的条件, 也是一个有趣的研究课题。

### 参考文献

- [1] 卯晓岚. 中国经济真菌. 北京: 科学出版社, 1998: 135.
- [2] 黄正良. 中西医结合杂志, 1985, 5 (4): 251 ~ 254.
- [3] 刘波. 中国药用真菌. 太原: 山西人民出版社, 1984: 138.
- [4] 方一苇. 分析化学, 1994, 22 (9): 955 ~ 960.
- [5] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科技出版社, 1987, 18: 3.
- [6] 天津市工业微生物研究所柠檬酸组. 微生物学报, 1976, 16 (2): 166 ~ 170.
- [7] McNeil B, Kristiansen B, Seviour R J. Biotechnol. Bioeng., 1989, 33: 1210 ~ 1212.
- [8] Demain A C. Manual Industrial microbiology and Biotechnology, American society for microbiology 1987: 43 ~ 75.
- [9] 杨革. 生物学杂志, 1997, 14 (2): 16 ~ 17.
- [10] 李平作, 章克昌. 微生物学通报, 2000, 27 (1): 5 ~ 8.