

马勃状硬皮马勃产胞外多糖发酵条件优化

何培新¹,吴双双¹,贺新生²,许春平^{1*}

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450002;
2. 西南科技大学 生命科学与工程学院,四川 绵阳 621010)

摘要:在单因素试验的基础上,采用正交试验优化了马勃状硬皮马勃产胞外多糖(EPS)的摇瓶培养条件,并研究了马勃状硬皮马勃的形态学和黏度特征。单因素试验结果表明,马勃状硬皮马勃产EPS的最适生长周期为10 d,最佳碳源、氮源、无机盐分别为果糖、大豆粉、MgSO₄与KH₂PO₄,最适环境条件为温度26℃、pH值8.0。在此基础上,选用碳源、氮源和无机盐3个因素,应用正交试验优化的马勃状硬皮马勃产EPS的最佳培养基配方为:20 g/L果糖、5 g/L大豆粉、2.5 mmol/L KH₂PO₄、2.5 mmol/L MgSO₄,在优化培养条件下,EPS产量为2.627 g/L。优化培养条件下的形态学和黏度研究表明,马勃状硬皮马勃的菌丝体呈分枝状生长,黏度与培养时间呈正相关,pH值与培养时间呈负相关。研究结果对马勃状硬皮马勃真菌EPS产品的大规模生产和开发具有一定的意义。

关键词:马勃状硬皮马勃;优化;胞外多糖;形态

中图分类号: S646 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0151-05

Optimization for Fermentation Conditions of Exopolysaccharides Production by *Scleroderma areolatum* Ehrenb

HE Peixin¹, WU Shuangshuang¹, HE Xinsheng², XU Chunping^{1*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;
2. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: Based on the results of single-factor experiments, orthogonal test was adopted to optimize the culture conditions in shake flasks for exopolysaccharide(EPS) production by *Scleroderma areolatum* Ehrenb. Moreover, the morphological and viscosity characteristics of the fungus were also investigated. The results of single-factor experiment showed that the most suitable growth period was 10 d; the best carbon source, nitrogen source and inorganic salts were fructose, soybean powder, MgSO₄ and KH₂PO₄, respectively; the optimal temperature and pH value were 26℃ and 8.0, respectively. Based on the above results, three factors, including carbon source, nitrogen source and inorganic salts were selected and optimized by the orthogonal test for EPS production, and the optimal medium was: 20 g/L fructose, 5 g/L soybean powder, 2.5 mmol/L KH₂PO₄ and 2.5 mmol/L MgSO₄. Under the optimal culture conditions, the EPS yield was 2.627 g/L. The morphology and viscosity of *S. areolatum* under the optimal culture conditions showed that the mycelia was branched, the viscosity was positively related with culture time, the pH value was negatively associated with the culture time. The results will be helpful for the scaled-up production and exploitation of fungal EPS products from *S. areolatum*.

Key words: *Scleroderma areolatum* Ehrenb; optimization; exopolysaccharide; morphology

收稿日期:2015-04-31
基金项目:河南省科技创新杰出青年项目(134100510017)
作者简介:何培新(1970-),男,河南民权人,教授,博士,主要从事应用真菌研究。E-mail:peixinhe191@163.com
* 通讯作者:许春平(1977-),男,河南焦作人,教授,博士,主要从事生物催化与烟草工程研究。
E-mail:xuchunping05@163.com

马勃状硬皮马勃 (*Scleroderma areolatum* Ehrenb) 又名马皮泡、灰包, 属于担子菌亚门 (Basidiomycotina)、硬皮马勃目 (Sclerodermatales)、硬皮马勃科 (Sclerodermataceae)、硬皮马勃属 (*Scleroderma*)。该属真菌广泛分布于世界各地, 共有 60 余种, 在我国较常见的有 11 种。硬皮马勃幼嫩时可食用, 并多有止血、消肿、清热和解毒等药用功效^[1]。马勃状硬皮马勃的子实体水提液具有抑菌、抗炎、止咳、止血、杀虫、抗溃疡等作用^[2]。该属真菌具有很高的药用价值, 其部分化学成分国外已有相关报道^[3], 其中一种新的羊毛甾烷型三萜化合物 (lanostane-type triterpenoid) 对单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 有显著的抗病毒活性^[4]。目前尚无马勃状硬皮马勃胞外多糖 (EPS) 的研究报道。鉴于此, 采用单因素和正交试验, 以 EPS 产量为指标, 优化了碳源、氮源、无机盐等营养条件和温度、pH 值等环境条件, 并研究了优化培养条件下的形态学特征, 为马勃状硬皮马勃 EPS 产品的开发利用奠定理论和技术基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 马勃状硬皮马勃试验菌株由野生子实体经组织分离获得, 由西南科技大学贺新生教授提供。

1.1.2 主要仪器 MV-17001C 紫外分光光度计 (上海凤凰光学仪器有限公司)、SFLY-100B 台式小容量恒温培养摇床 (上海申贤恒温设备厂)、DHP-9052 电热恒温培养箱 (上海申贤恒温设备厂)、RE-3000A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)、SHB-Ⅲ 循环水多用真空泵 (西安太康生物科技有限公司)、Nikon E-100 显微镜 (配有 DT2000 图像分析软件, 尼康仪器有限公司)、NDJ-1 旋转式黏度计 (上海精密科学仪器有限公司)、PB-10 pH 计 (德国赛多利斯股份公司)。

1.1.3 试验试剂 葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 K_2HPO_4 、 NaCl 、95% 乙醇、浓硫酸、苯酚等均为国产分析纯, 牛肉膏、蛋白胨、多价胨、胰蛋白胨、酵母粉等为天津市风船化学试剂有限公司产品, 大豆粉购自本地超市。

1.1.4 培养基 PDA 培养基: 去皮土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 108 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值自然, 不加琼脂为 PDA 培养液。基础培养基: 葡萄糖 30 g、蛋白胨 3 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值自然。

1.2 试验方法

1.2.1 种子液的制备 用打孔器打取活化培养的真菌菌丝块 (约 1 cm^2) 2 块接入装 50 mL PDA 培养液的 250 mL 三角瓶中, $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 4 d。然后加入无菌玻璃珠, 置于磁力搅拌器上将菌丝块打碎后备用。试验处理的接种量统一为 8% (V/V)。

1.2.2 菌丝体和 EPS 产量的测定 采用抽滤法^[5]分离菌丝体和发酵液, 滤纸和菌丝 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干后称质量, 减去滤纸干质量得到菌丝干质量。菌丝体产量采用下式计算: 菌丝体产量 (g/L) = 菌丝干质量 (g) / 发酵液体积 (mL) $\times 1\ 000$ 。

将发酵液旋转蒸发浓缩 3 倍, 浓缩液加入 3 倍体积 95% 乙醇, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜, 然后 10 000 r/min 离心 15 min, 得到的粗多糖沉淀用蒸馏水溶解并定容至 250 mL, 采用苯酚-硫酸法^[6]测定其多糖含量。

1.2.3 最适生长周期的确定 马勃状硬皮马勃采用基础培养基摇瓶培养 14 d, 每隔 2 d 测定其菌丝体和 EPS 产量。

1.2.4 单因素试验 碳源优化试验: 分别用果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和木糖代替基础培养基中的葡萄糖, $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、160 r/min 培养, 测定其菌丝体和 EPS 产量。

氮源优化试验: 分别以牛肉膏、玉米粉、胰蛋白胨、大豆粉、酵母粉、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 代替基础培养基中的蛋白胨, $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、160 r/min 培养, 测定其菌丝体和 EPS 产量。

无机盐优化试验: 在基础培养基中分别添加 5 mmol/L 的 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 、 CaCl_2 和 FeSO_4 , 以不加无机盐为对照, $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、160 r/min 培养, 测定其菌丝体和 EPS 产量。

pH 值优化试验: 使用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节基础培养液 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、160 r/min 培养, 测定其菌丝体和 EPS 产量。

温度优化试验: 采用基础培养基, 接种后分别于 22、24、26、28、30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min 培养, 测定其菌丝体和 EPS 产量。

1.2.5 正交试验 在单因素试验的基础上, 选用最适碳源 (果糖)、氮源 (大豆粉) 和无机盐 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$) 3 个因素, 按照 $L_9(3^4)$ 进行正交试验, 优化马勃状硬皮马勃产 EPS 的最佳摇瓶发酵条件。试验的因素和水平见表 1。

表 1 正交试验优化培养基的因素和水平

水平	因素		
	果糖(A)/(g/L)	大豆粉(B)/(g/L)	KH ₂ PO ₄ 、MgSO ₄ (C)/(mmol/L)
1	20	3	2、2
2	30	5	2.5、2.5
3	40	7	3、3

1.2.6 形态学和黏度研究 每 2 d 取 1 次优化培养基培养的菌丝体,显微镜下拍摄菌丝体形态并测定培养液的黏度和 pH 值。菌丝体染色时,先加入与发酵液等体积的固定剂和少许染色剂,4 ℃ 放置 1 d,然后用蒸馏水多次冲洗染色的菌丝体,晾干后放大 100 倍显微镜观察和拍照。测定样品发酵液黏度时应注意样品混合均匀,选择合适的转子及转速并记录,黏度 = 黏度计读取数值 × 转子转速特定系数。所使用仪器设定的转子转速量程见表 2。

表 2 黏度计转子转速特定系数

转子编号	转速/(r/min)			
	60	30	10	6
0	0.1	0.2	0.5	1.0
1	1	2	5	10
2	5	10	25	50
3	20	40	100	200
4	100	200	500	1 000

2 结果与分析

2.1 马勃状硬皮马勃培养基优化单因素试验

2.1.1 培养时间 在 12 d 的培养时间内,每 2 d 测量 1 次马勃状硬皮马勃的菌丝体和 EPS 产量,用 Sigmaplot 软件做图,结果见图 1。随着培养时间的延长,马勃状硬皮马勃的菌丝体产量和 EPS 产量均有所增加,但第 10 天以后 EPS 产量明显下降,这可能是由于菌丝量达到高峰期后,多糖成分作为养分供应菌丝增长而被消耗^[7]。此外,马勃状硬皮马勃在液体培养时,随着菌丝体大量生长,培养液层黏稠状,到第 12 天已经呈糊状,不利于菌丝体和 EPS 的分离。因此,确定马勃状硬皮马勃的生长周期为 10 d,此时 EPS 的产量最高。

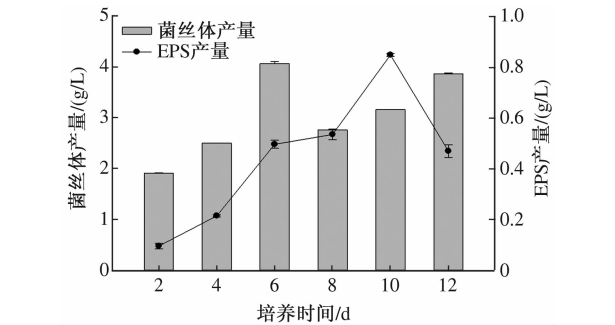


图 1 培养时间对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.1.2 碳源 碳源对马勃状硬皮马勃的菌丝体和 EPS 产量均有明显影响(图 2)。马勃状硬皮马勃能

良好利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖,以蔗糖为碳源时菌丝体生物量最高,但 EPS 产量较低;果糖为碳源时得到的 EPS 产量略高于蔗糖。综合考虑菌丝体产量和 EPS 产量,确定最佳碳源为果糖。果糖的市场价格比蔗糖高,企业大规模生产时考虑到成本因素可以选择蔗糖。

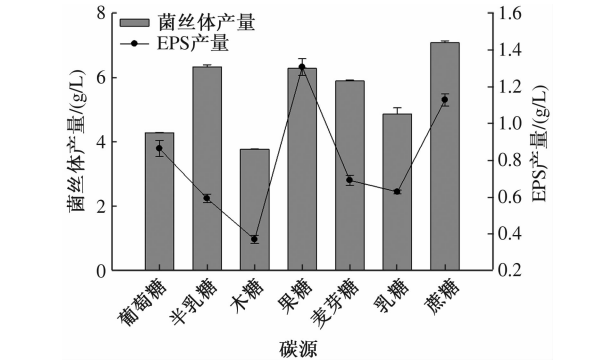


图 2 碳源对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.1.3 氮源 从图 3 可以看出,以大豆粉为氮源时,马勃状硬皮马勃的菌丝产量和 EPS 产量均最高,其次是酵母粉;相对于几种有机氮源,测试的无机氮源不利于菌丝生长和 EPS 产生^[8]。综合考虑,确定最佳氮源为大豆粉。

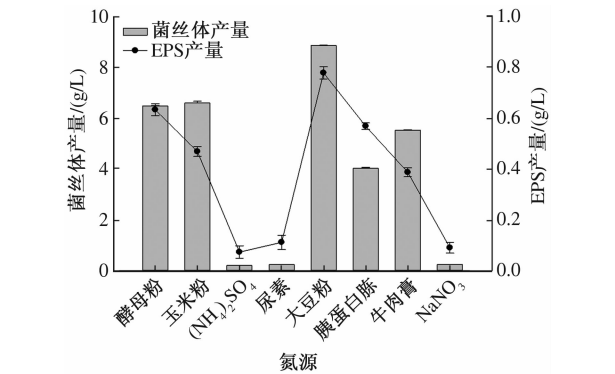


图 3 氮源对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.1.4 无机盐 从图 4 可以看出,添加无机盐均提高了 EPS 产量,但添加 NaCl 和 FeSO₄ 降低了菌丝体产量。添加 KH₂PO₄ 时菌丝体生物量和 EPS 产量均有明显增加,而添加 MgSO₄ 时 EPS 产量增加最大,故选择 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 进一步优化培养基组成。

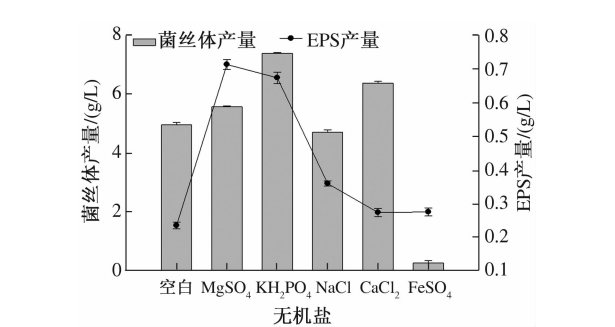


图 4 无机盐对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.1.5 培养温度 从图 5 可以看出,24 ℃ 培养时马勃状硬皮马勃的菌丝体产量最高,而 EPS 产量很低;EPS 产量在 26 ℃ 时最大,此时菌丝体产量也较高,温度继续升高,EPS 产量剧烈降低。综合考虑菌丝体产量和 EPS 产量,26 ℃ 为最适宜培养温度。

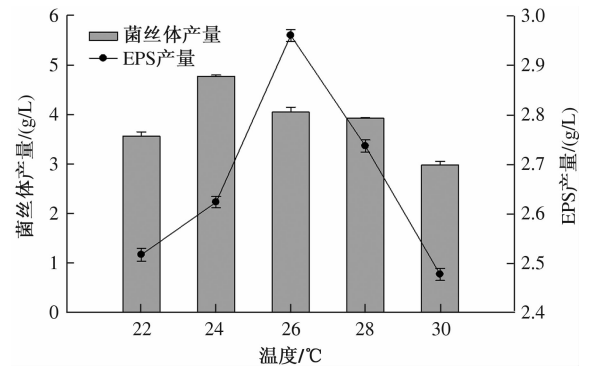


图 5 培养温度对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.1.6 培养基初始 pH 值 培养基 pH 值的变化对营养物质的吸收与利用、细胞的生长、EPS 产量都有很大的影响。pH 值对测试真菌菌丝体生长和 EPS

产量的影响见图 6。由图 6 可以看出,马勃状硬皮马勃菌丝体生长的最适 pH 值为 6.0,产 EPS 的最适 pH 值为 8.0。

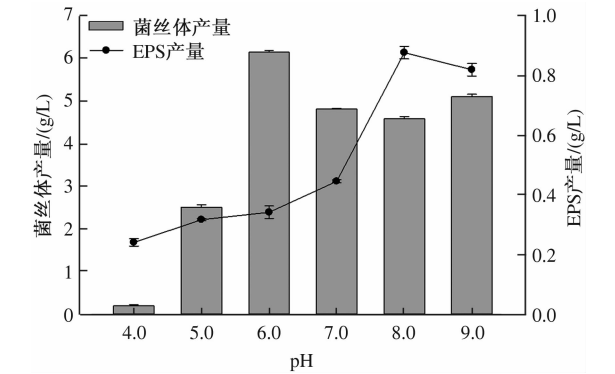


图 6 培养基初始 pH 值对马勃状硬皮马勃菌丝体和 EPS 产量的影响

2.2 马勃状硬皮马勃培养基优化正交试验 根据单因素试验结果,碳源选择果糖,氮源选择大豆粉,无机盐选择 KH_2PO_4 和 MgSO_4 进行正交试验,结果见表 3。

表 3 马勃状硬皮马勃培养基优化正交试验结果

试验号	因素			菌丝体产量/(g/L)	EPS 产量/(g/L)
	A	B	C		
1	1	1	1	10.542	1.290
2	1	2	2	12.906	2.627
3	1	3	3	14.544	1.745
4	2	1	2	17.696	1.463
5	2	2	3	15.114	1.622
6	2	3	1	16.694	1.376
7	3	1	3	20.494	1.439
8	3	2	1	16.760	1.515
9	3	3	2	17.874	1.297
菌丝体产量	K_1	37.992	48.732	43.996	
	K_2	49.504	44.780	48.476	
	K_3	55.128	49.112	50.152	
	k_1	12.664	16.244	14.665	
	k_2	16.501	14.927	16.159	
EPS 产量	k_3	18.376	16.371	16.717	
	R	5.712	1.444	2.052	
	K_1	5.707	4.192	4.182	
	K_2	4.461	5.810	5.432	
	K_3	4.252	4.418	4.806	
形态和黏度特征	k_1	1.902	1.397	1.394	
	k_2	1.487	1.937	1.811	
	k_3	1.417	1.473	1.602	
	R	0.485	0.539	0.417	

由表 3 可知,以 EPS 产量为指标,影响因素的主次顺序为氮源 > 碳源 > 无机盐,最优组合为 $A_1B_2C_2$,即马勃状硬皮马勃的最佳培养基组合为 20 g/L 果糖、5 g/L 大豆粉、2.5 mmol/L KH_2PO_4 、2.5 mmol/L LMgSO_4 ,获得的最大 EPS 产量为 2.627 g/L。

2.3 形态和黏度特征

马勃状硬皮马勃液体培养菌丝体的形态如图 7 所示(由于优化培养基中菌丝体生长快速,发酵后期菌丝体黏稠致密,仅拍摄了第 2 天的菌丝体形态)。由图 7 可以看出,马勃状硬皮马勃的菌丝体

呈分枝状生长,表面光滑,且少见空泡,锁状联合较少^[9]。

培养时间对发酵液黏度和 pH 值的影响见图 8。由图 8 可以看出,随着培养时间的延长(EPS 产量不断增加),发酵液的黏度明显增加(图 8A),表明 EPS 溶液是典型的非牛顿流体。与多数大型真菌人工培养相似^[5,7],随着培养时间的延长,马勃状硬皮马勃发酵液的 pH 值明显降低(图 8B)。丝状真菌发酵形态会直接影响发酵液的流变性能,特别是在高黏度发酵的时候^[10]。最开始的发酵液一般为牛顿流

体,随着菌丝体的增长,菌丝体间发生相互缠绕与粘连,菌丝体生物量的细微变化即可引起发酵液黏性的迅速增加,发酵液在后期表现为非牛顿流体^[11]。马勃状硬皮马勃在优化的培养条件下快速生长,EPS 产量增加,且可产生大量无性孢子,可能是造成其液体培养呈片层状而不是菌球状群体形态的原因,也造成培养液的黏度随着培养时间的延长而明显增加。较高的黏度显示马勃状硬皮马勃的 EPS 有良好的流变学特性,具备作为食品添加剂的开发应用潜力^[12]。



图 7 马勃状硬皮马勃菌丝体的形态(放大倍数 10×10)

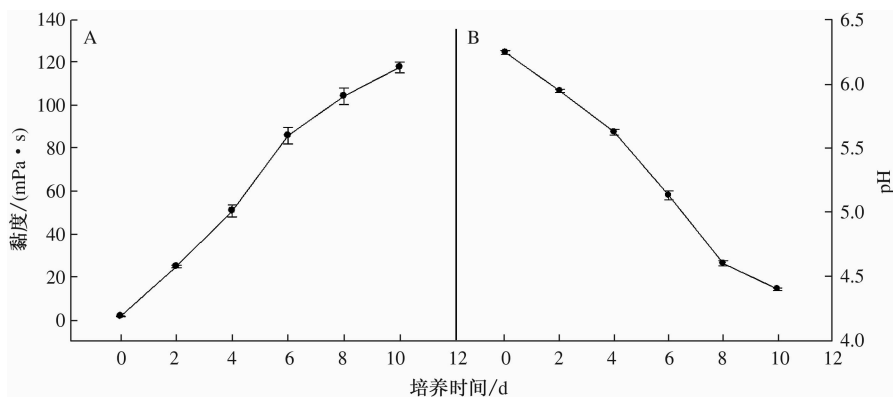


图 8 培养时间对马勃状硬皮马勃液体培养黏度(A)和 pH 值(B)的影响

3 结论

本研究单因素试验结果表明,马勃状硬皮马勃产 EPS 的最优环境条件为温度 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8.0、摇床转速 160 r/min ,最适生长周期为 10 d,最佳碳源、氮源和无机盐分别是果糖、大豆粉、 KH_2PO_4 和 MgSO_4 。正交试验优化的产菌丝体和 EPS 的最佳培养基组合为:20 g/L 果糖、5 g/L 大豆粉、2.5 mmol/L KH_2PO_4 、2.5 mmol/L MgSO_4 ,获得的最大 EPS 产量为 2.627 g/L。优化培养条件下的形态学结果表明,马勃状硬皮马勃的菌丝体呈分枝状生长,群体呈片层状而不是多数丝状真菌的菌球状;发酵液黏度与培养时间呈正相关,较高的黏度表现出良好的流变学性质,使 EPS 具有作为食品添加剂开发利用的潜力;与多数大型真菌类似,其发酵液 pH 值与培养时间负相关。这些结果为进一步研究马勃状硬皮马勃 EPS 的结构和生理活性,以及 EPS 产品的规模化开发利用等奠定了扎实的理论和技術基础,对其他真菌的相关研究也具有一定的借鉴价值。

参考文献:

[1] 刘波. 中国药用真菌[M]. 太原:山西人民出版社,1978:272.
[2] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京:科学出版社,1998:613.
[3] Monika W, Alberto G, Helga S, et al. Unusual pulvinic

acid dimers from the common fungi *Scleroderma citrinum* and *Chalciporus piperatus* [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43 (14):1883-1886.
[4] Somdej K, Kwanjai K, Thirada P, et al. A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum* [J]. *Planta Med*, 2003, 69 (6):568-571.
[5] 柯轶,巫文政,毛宁. 一株虫草类真菌的液体发酵产胞内多糖培养基的优化[J]. *海峡科学*, 2010(7):3-5.
[6] Dubois M, Gilles K A, Hamolton J K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28 (3):350-356.
[7] 陈佩洪,卞柏华,何强泰,等. 几种食药真菌多糖的初步研究[J]. *江苏食用菌*, 1995, 16(5):3-4.
[8] 周琴,蒋冬花,杨叶,等. 合成聚 β -羟基丁酸芽孢杆菌的筛选鉴定及氮源优化[J]. *浙江师范大学学报:自然科学版*, 2010, 33(2):203-209.
[9] 熊强,徐晴,顾帅,等. 丝状真菌形态控制及其在发酵过程优化中的应用[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(2):178-190.
[10] Gupta K, Mishra P K, Srivastava P. A correlative evaluation of morphology and rheology of *Aspergillus terreus* during lovastatin fermentation [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2007, 12(2):140-146.
[11] Riley G L, Tucker K G, Pauln G C, et al. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68 (2):160-172.
[12] 李洁,窦文芳,李会,等. 胶质芽孢杆菌胞外多糖的制备及流变学特性[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(1):1-5.