文章编号:1009-038X(2004)03-0023-04

黑木耳胞外多糖深层发酵培养基组成的优化

肖彩霞[1], 章克昌[2]

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了营养性因子对黑木耳深层发酵的影响. 结果表明,葡萄糖、酵母膏、豆饼粉有利于黑木耳菌体生长和胞外多糖的形成. 正交优化实验得到最佳培养基组成:葡萄糖 40 g/L,豆饼粉 9 g/L,KH_2PO_4 4 g/L, 无机盐 X_2 2 g/L.

关键词: 黑木耳;深层发酵; 胞外多糖;培养基组成

中图分类号:TQ 464.1 **文献标识码**: A

Medium Optimization for Extracellular Polysaccharide Production by Submerged Fermentation of *Auricularia auricula*

XIAO Cai-xia[1], ZHANG Ke-chang[2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Auricularia auricula* is an edible and medicinal fungus. Extracelluar polysaccharide of *Auricularia auricular* has various physiological activity. In this paper, The effects of some nutritional factors on the submerged fermentation of *Auricularia auricula* were studied. The result showed that glucose, yeast extract, and bean cake powder were favorable to the mycelium growing and extracellular polysaccharide fermation. The optimum medium was obtained by orthogonal test. The medium composition was as follows: glucose 40 g/L, bean cake powder 9 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, inorganic salt X_2 2 g/L.

Key words: *Auricularia auricula*; submerged fermentation; extracellular polysaccharide culture; medium composition

---

黑木耳(*Auricularia auricula*)又称木耳、细木耳、耳子、黑菜. 黑木耳区别于其它食药用真菌的一个显著特点是它能治疗高脂血症及由高脂血症引发的其它血液病. 范亚明等[1]证明了黑木耳能加速体内胆固醇的分解代谢、转运和排出,使之降脂. 通过对昆明小鼠注射黑木耳多糖[2],发现高脂肪胆固醇饲料小鼠的总胆固醇含量比对照组降低了 42.2%,达到显著水平.

目前国外对黑木耳的研究主要集中在对黑木耳子实体多糖的性质[3]、结构[4]、纯化分离及临床应用上. 国内对黑木耳的研究主要集中在袋料栽培技术上. 而有关液体培养方面, 除了唐青涛等人[5]对

收稿日期:2003-07-08; 修回日期:2003-09-25.

作者简介: 肖彩霞(1979-),女,湖南新化人,生物工程专业硕士研究生.

万方数据

黑木耳在液体条件下产多糖进行了初步的研究外，很少有人在这方面有过研究，且最高产量只有74.5 mg/dL培养液.为此，作者以黑木耳生物量和胞外粗多糖为目标产物，考察了液体发酵中不同的营养因子对细胞生长和产物合成的影响，确定了最佳培养基成分.

1 材料与方法

1.1 菌种

黑木耳(*Auricularia auricula*)由作者所在的生物资源实验室筛选保藏.

1.2 培养基

1.2.1 斜面PDA 活化菌种用.

1.2.2 液体种子培养基 组分g/L：黄豆芽200，葡萄糖20，KH_2PO_4 2，$MgSO_4$ 1.

1.2.3 摇瓶发酵基础培养基 组分g/L：葡萄糖20，酵母膏2，KH_2PO_4 2，$MgSO_4$ 1.

1.3 培养方法

1.3.1 斜面培养 从母种试管中切出蚕豆大小的菌丝块接种于斜面的中部，于25 ℃培养7 d.

1.3.2 液体种子培养 将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，250 mL三角瓶装培养基100 mL，于30 ℃，150 r/min培养7 d.

1.3.3 发酵培养 采用二级摇瓶，250 mL三角瓶装液量100 mL，液体菌种接种量为10%，于30 ℃，150 r/min培养5 d.

1.4 分析方法

1.4.1 菌丝干重测定 取100 mL发酵液，3 000 r/min离心20 min，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.

1.4.2 胞外粗多糖测定 采用乙醇沉淀法，发酵液经离心分离后(3 000 r/min离心20 min)，向上清液中加入体积分数为95%的乙醇至浓度为30%，冰箱过夜，离心的滤液继续加体积分数为95%的乙醇到浓度为75%，离心得粗多糖，60 ℃烘干至恒重，分析天平称重.

1.4.3 胞外粗多糖计算

$$\text{胞外粗多糖质量浓度(g/L)}=\frac{\text{烘干物净重(g)}}{\text{发酵离心液体积(mL)}}\times 1000$$

2 结果与讨论

2.1 氮源对黑木耳深层发酵的影响

以酵母膏、蛋白胨、豆饼粉、麸皮、硫酸铵、尿素等作为氮源(添加量为2 g/L)，考察各种氮源对菌体生物量和胞外多糖的影响，结果见图1.在所有的氮源中，黑木耳对有机氮源的利用优于无机氮源，菌体生物量及胞外多糖的产率都明显高于无机氮源；单一的无机氮源对菌体生长和胞外多糖的分泌不利.而在有机氮源中，以酵母膏、豆饼粉的利用效果最佳，因此选用豆饼粉为最适氮源.

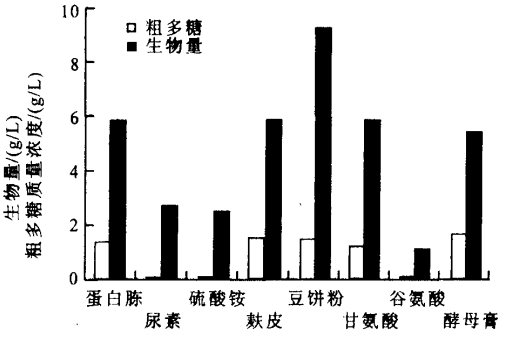


图1 氮源对黑木耳多糖深层发酵的影响

Fig. 1 Effect of nitrogen sources on the submerged fermentation of AA

2.2 碳源对黑木耳深层发酵的影响

在基础培养基中分别加入葡萄糖、蔗糖、乳糖、玉米粉、可溶性淀粉、麦芽糖等各种碳源，添加量为20 g/L，考察各种碳源对菌体生物量和胞外多糖的影响，结果见图2.结果表明，黑木耳对单糖、双糖、多糖和天然农副产品均能较好地利用，其中以葡萄糖为碳源时，菌体生物量最多，产胞外多糖的能力也比其它碳源要好.

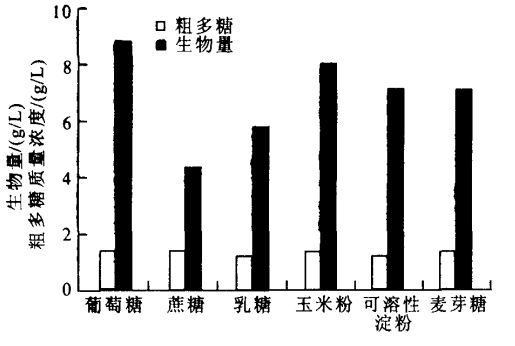


图2 碳源对黑木耳多糖深层发酵的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on the submerged fermentation of AA

2.3 碳源质量浓度对黑木耳深层发酵的影响

基础培养基中以2 g/L的豆饼粉为氮源，通过改变葡萄糖的质量浓度，进行碳源质量浓度实验，结果见表1.

万方数据

表 1　葡萄糖质量浓度对黑木耳多糖深层发酵的影响

Tab. 1　Effect of glucose concentrations on the submerged fermentation of AA

葡萄糖质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	胞外粗多糖质量浓度/(g/L)
10	7.04	1.15
20	9.67	1.48
30	10.45	1.74
40	11.22	1.85
50	12.31	1.78

由表 1 可以看出，葡萄糖质量浓度太高和太低都不利于胞外多糖产率的提高，故葡萄糖质量浓度在 30～40 g/L 为宜.

2.4　氮源质量浓度对黑木耳深层发酵的影响

改变基础培养基中豆饼粉的质量浓度，进行氮源质量浓度实验，结果见表 2.

表 2　豆饼粉质量浓度对黑木耳多糖深层发酵的影响

Tab. 2　Effect of bean cake powder concentrations on the submerged fermentation of AA

豆饼粉质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	胞外粗多糖质量浓度/(g/L)
1	8.34	1.50
3	11.18	2.17
5	12.52	2.32
7	13.97	2.56
9	14.52	2.47
11	12.05	2.27

由表 2 可以看出，豆饼粉质量浓度增加时，菌体生物量和粗多糖产量明显提高，但当氮源质量浓度高于 9 g/L 时，生物量及胞外多糖产量都下降. 只有在适宜的氮源质量浓度(5～9 g/L)下，菌体才能够兼顾其生长和多糖的形成.

2.5　无机盐对黑木耳深层发酵的影响

基础培养基中，添加不同质量浓度的无机盐，结果见表 3. 无机盐 KH_2PO_4 和 X_2 对菌体生长稍有抑制作用，但对胞外多糖的分泌却有显著的促进作用. 当 KH_2PO_4 和无机盐 X_2 的质量浓度分别从 1 g/L 和 0.5 g/L 增加到 4 g/L 和 2 g/L 时，胞外多糖的产量达到最大值，为 3.48 g/L. 综合考虑菌体的生长及胞外多糖的产量，选取 KH_2PO_4 和 无机盐 X_2 质量浓度分别在 4 g/L 和 2 g/L，菌体生长和产胞外多糖的情况均较好.

表 3　无机盐对黑木耳深层发酵的影响

Tab. 3　Effect of minerals on the submerged fermentation of AA

KH_2PO_4 质量浓度/(g/L)	X_2 质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	胞外粗多糖质量浓度/(g/L)
1	0.5	12.45	1.24
2	1.0	11.12	1.87
3	1.5	11.39	2.31
4	2.0	11.20	3.48
5	2.5	10.27	3.12

2.6　正交实验优化发酵培养基

综合上述实验结果，选葡萄糖为碳源，豆饼粉为氮源，KH_2PO_4 和 X_2 为无机盐，考察指标为生物量和胞外粗多糖，因素及水平见表 4，实验方案和结果见表 5 和图 3.

表 4　实验因子及水平 $L_9(3^4)$

Tab. 4　The table of factor and level in $L_9(3^4)$ orthoginal experiment

g/L

水平	因子		
	A(葡萄糖)	B(豆饼粉)	$C(KH_2PO_4+X_2)$
1	20	7	3+1.5
2	30	9	4+2.0
3	40	11	5+2.5

表 5　正交实验结果的极差分析 $L_9(3^4)$

Tab. 5　Extreme value analysis of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D(空列)	生物量/(g/L)	胞外粗多糖质量浓度/(g/L)
1	1	1	1	1	12.44	1.85
2	1	2	2	2	13.53	3.19
3	1	3	3	3	14.74	4.08
4	2	1	2	3	14.42	3.55
5	2	2	3	1	14.86	3.86
6	2	3	1	2	19.83	2.40
7	3	1	3	2	15.52	2.79
8	3	2	1	3	19.38	3.51
9	3	3	2	1	23.70	4.10
K_1	9.12	8.19	7.76			
K_2	9.81	10.56	10.84			
K_3	10.40	10.58	10.73			
k_1	3.04	2.73	2.59			
k_2	3.27	3.52	3.62			
k_3	3.47	3.53	3.58			
R	0.43	0.80	0.99			

万方数据

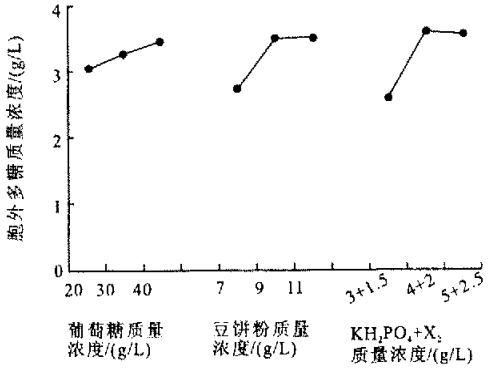


图 3 胞外多糖因素与水平分析图

Fig. 3 Relation between effecting factors, their concentration and extracellular polysaccharide

极差分析表明，各因素对胞外多糖的影响程度的主次顺序为

$$\begin{matrix} 主 & \longrightarrow & 次 \\ C & B & A \end{matrix}$$

即 KH_2PO_4 和 X_2 是影响黑木耳多糖形成的主要因素（R 为 0.99），ABC 3 个因素最优组合为 $A_3B_2C_2$，即葡萄糖质量浓度 40 g/L，豆饼粉质量浓度 9 g/L，KH_2PO_4 质量浓度 4 g/L，无机盐 X_2 质量浓度 2 g/L.

3 结 论

1) 考察了不同营养因子对黑木耳深层发酵的影响，结合多糖的得率及工业化生产实际，选取葡萄糖和豆饼粉为碳氮源，具有一定的实际生产意义.

2) 正交实验确定了黑木耳深层发酵的最佳培养基组成，即葡萄糖质量浓度为 40 g/L，豆饼粉质量浓度为 9 g/L，KH_2PO_4 质量浓度为 4 g/L，无机盐 X_2 质量浓度为 2 g/L.

参考文献：

[1] 范亚明，王朋. 黑木耳降血脂和抗动脉粥样硬化机理的研究[J]. 心肺血管学报，1991，10(3)：240－242.

[2] 蔡小玲，章佩芬. 黑木耳多糖、红菇多糖降的胆固醇作用研究[J]. 深圳中西医杂志，2002，12(3)：137－139.

[3] Zhang L N, Yang L Q. Properties of auricularia auricula-judae beta -D-glucan in dilute solution[J]. **Biopolymers**, 1995, 36(6)：695－700.

[4] Misaki A, Kakuta M. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)-β-D-glucan of Auricularia auricula-judae, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages[J]. **Carbohydr Res**, 1981, 92：115－129.

[5] 唐青涛，陈福生. 深层发酵黑木耳产胞外多糖的初步研究[J]. 食品科学，2002，23(3)：46－49.

（责任编辑：李春丽）

万方数据