

文章编号:1009-0193(2007)06-0040-04

# 正交试验优化添加天麻的黑木耳多糖发酵培养基

张大为<sup>1</sup>,赵亮<sup>2</sup>,吴天祥<sup>1</sup>

(1. 贵州大学 化学工程学院, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:**研究天麻对黑木耳深层发酵多糖的影响。通过单因素实验确定了碳源、氮源、天麻和无机盐的添加水平。用正交试验优化添加天麻的黑木耳发酵培养基。优化后培养基组成为: 葡萄糖 40 g/L、酵母膏 13 g/L、天麻 10 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L、 $\text{MgSO}_4$  2.5 g/L。

**关键词:**天麻;黑木耳;胞外多糖;深层发酵

**中图分类号:**TQ920.61 **文献标识码:**A

## 0 前言

黑木耳(*Auricularia Auricula*)是一种药食两用真菌。它在分类学上隶属层菌纲,木耳目,木耳科,木耳属。黑木耳性平,味甘,富含多糖,可以入药<sup>[1]</sup>。研究发现,黑木耳的生物学活性主要来自其产生的多糖成分,具有降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗凝血、抗辐射等多种生物学活性<sup>[2]</sup>。

天麻(*Rhizoma Gastrodiae*)为兰科为多年生寄生菌植物,以蜜环菌的菌丝或菌丝分泌物为营养来源。天麻主产于四川、云南、贵州,其干燥块茎富含天麻素,可以入药。具有平肝、息风、止痉作用,主治头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐等症<sup>[3]</sup>。

文献研究表明,向培养基中添加适当的中药,可促进真菌的生长或者提高活性产物的产量<sup>[4]</sup>。本实验即利用黑木耳,并向发酵培养基中添加了一定量的天麻,以多糖产量为考察指标,用正交试验优化了黑木耳发酵培养基。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)供试菌株:黑木耳(*Auricularia Auricular*),购于中科院微生物研究所。

(2)培养基

斜面培养基:PDA.

种子培养基:每升含葡萄糖 10 g,玉米粉 10 g,麸皮粉 5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, $\text{MgSO}_4$  0.75 g.

摇瓶发酵基础培养基:每升含葡萄糖 30 g,酵母膏 7 g,天麻 10 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, $\text{MgSO}_4$  1 g.

### 1.2 培养方法

斜面培养:于母种试管中切出黄豆大小菌丝块,接于斜面中部。25℃培养 7 d.

液体种子培养:将培养好的斜面菌种切成黄豆大小,转接到液体培养基中,一支斜面接一瓶。500 mL 三角瓶装液量 150 mL,25℃,150 r/min,摇床培养 4 d.

摇瓶发酵培养:250 mL 三角瓶装液量 100 mL,接种量为 10%,25℃,150 r/min,摇床培养 5 d.

### 1.3 胞外多糖测定方法

发酵液于 4000 r/min 离心 30 min. 取离心后上清液 20 mL,加 95%乙醇至乙醇含量达到 30%,于冰箱中静置 24 h. 离心弃沉淀,向上清液中追加乙醇至乙醇含量达到 75%,在冰箱中静置 24 h. 离心,沉淀用蒸馏水

收稿日期:2007-09-13

基金项目:贵州省高层次人才特助基金项目(GZ2006001)

作者简介:张大为(1982-),男,辽宁兴城人,研究生,研究方向:发酵工程。

溶解并稀释至适当倍数。用苯酚-硫酸法测总糖含量<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与讨论

碳源、氮源和无机盐是黑木耳生长所需的必须营养,本实验选择葡萄糖作为碳源,酵母膏作为氮源,磷酸二氢钾和硫酸镁作为无机盐。

### 2.1 碳源质量浓度对黑木耳多糖发酵的影响

固定酵母膏浓度为 7 g/L,天麻 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L. 通过向培养基中添加不同量的葡萄糖,研究其对黑木耳胞外多糖发酵的影响。结果见图 1。

随着葡萄糖浓度的升高,黑木耳胞外多糖的产量也随之升高。当葡萄糖浓度为 40 g/L 时产量达到最高。葡萄糖浓度继续升高时,胞外多糖产量呈下降趋势。

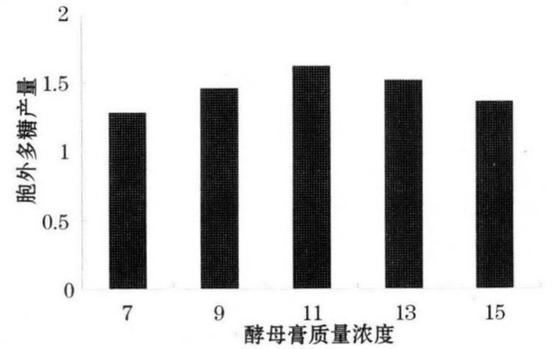
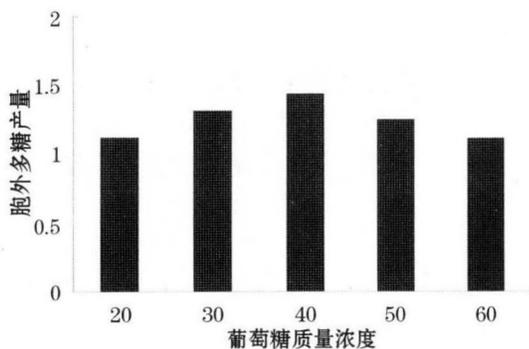


图1 不同碳源质量浓度对黑木耳胞外多糖发酵的影响(g/L)

图2 不同氮源质量浓度对黑木耳胞外多糖发酵的影响(g/L)

### 2.2 氮源质量浓度对黑木耳发酵的影响

固定葡萄糖质量浓度为 30 g/L,天麻 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L. 添加不同质量浓度的酵母膏,考察其对黑木耳胞外多糖发酵的影响,结果见图 2。

随着酵母膏浓度的提升,黑木耳胞外多糖的产量也随之升高。当酵母膏浓度达到 11 g/L 时,胞外多糖产量达到最高。酵母膏浓度继续升高后,胞外多糖产量开始下降。

### 2.3 无机盐浓度的影响

钾离子和镁离子为黑木耳生长所必须,因此,本研究将磷酸二氢钾和硫酸镁合并考察,并按照质量 2:1 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $\text{MgSO}_4$ ) 的比例添加。同时固定葡萄糖质量浓度为 30 g/L,酵母膏质量浓度为 7 g/L,天麻 10 g/L,结果见图 3。

当  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  质量浓度分别为 4 g/L 和 2 g/L 时,黑木耳胞外多糖浓度达到最大。

由以上三组实验的研究结果可以得知,碳源、氮源、无机盐浓度均可影响黑木耳胞外多糖的产生。并且从图中看出,黑木耳多糖的产量随着三种营养源的添加表现出起伏,呈峰形。由此说明,碳源、氮源、无机盐在适当浓度时可以提高黑木耳胞外多糖的产量。但是浓度过高时,会表现出一定的底物抑制作用。

### 2.4 天麻添加量对黑木耳胞外多糖产量的影响

天麻作为一种原料添加到培养基中,可对黑木耳胞外多糖的产生发生作用。添加量以及结果见图 4。从图中可以看出,天麻的添加量对黑木耳胞外多糖的产生具有明显的促进作用。但同时,随着天麻浓度的升高,黑木耳的生物量随之降低。可能是天麻中的某些成分对黑木耳菌丝的生长产生了抑制作用。

### 2.5 正交试验

正交试验是多条件优化经常采用的研究方法。本试验选用  $L_9(3^4)$  正交表优化添加天麻的黑木耳多糖发酵培养基。碳源、氮源、无机盐三种营养源对黑木耳多糖的产量影响曲线呈峰形。所以,我们采用之前试

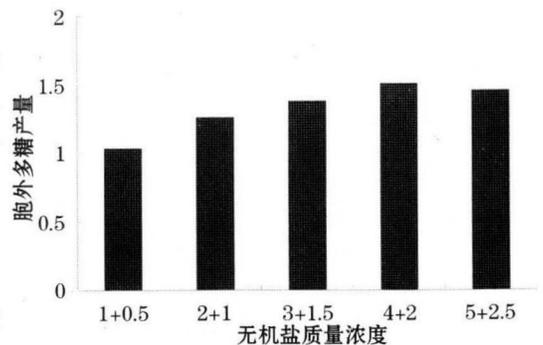


图3 不同无机盐浓度对黑木耳胞外多糖发酵的影响(g/L)

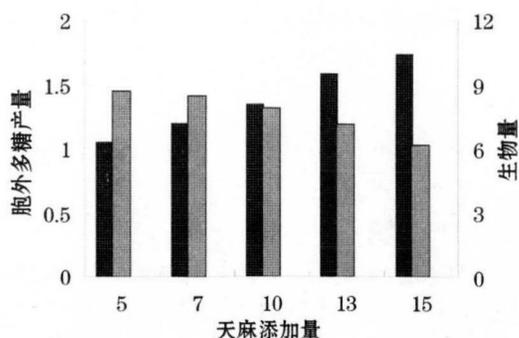


图4 不同天麻添加量对黑木耳胞外多糖发酵的影响(g/L)

验中的峰值作为中间水平。

天麻对黑木耳胞外多糖的影响在试验范围内并未表现出起伏,但为避免较高浓度的天麻对黑木耳菌丝生长产生的严重抑制作用,我们选择7 g/L、10 g/L和13 g/L三个水平进行考察。

葡萄糖、酵母膏、天麻和 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 的水平安排见表1。每个试验设3个平行,结果计算平均值。表2中列出了试验方案及结果。图5给出了胞外多糖和各因素之间的效应。

表1 正交试验的因子及水平 g/L

水平	因子			
	葡萄糖	酵母膏	天麻	无机盐
1	30	9	7	3+1.5
2	40	11	10	4+2.0
3	50	13	13	5+2.5

表2 正交试验结果及极差分析

实验号	葡萄糖	酵母膏	无机盐	天麻	结果/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	1.05
2	1	2	2	2	1.64
3	1	3	3	3	2.17
4	2	1	2	3	2.15
5	2	2	3	1	1.35
6	2	3	1	2	1.90
7	3	1	3	2	1.67
8	3	2	1	3	1.99
9	3	3	2	1	1.41
均值1	1.620	1.623	1.647	1.270	
均值2	1.800	1.660	1.733	1.737	
均值3	1.690	1.827	1.730	2.103	
极差	0.180	0.204	0.086	0.833	

极差分析表明,天麻的添加量是影响胞外多糖产量的主要因素,其次是酵母膏、葡萄糖,无机盐的影响相对最小。各因素对黑木耳胞外多糖的影响程度的主次顺序为:天麻>酵母膏>葡萄糖>无机盐。4个因素最优组合为: $A_2B_3C_2D_3$ ,即葡萄糖40 g/L、酵母膏13 g/L、天麻10 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L、 $\text{MgSO}_4$  2.5 g/L。

在该组合条件下,我们进行了验证实验,数据见表3。其中空白对照组只添加优化后的葡萄糖、酵母膏、无机盐,不加入天麻。

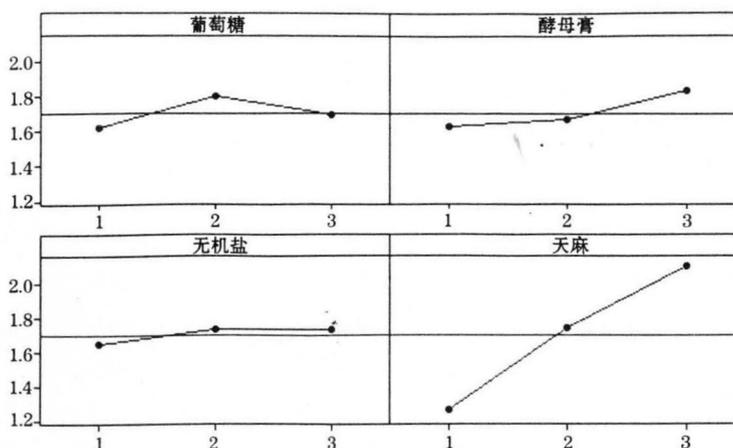


图5 胞外多糖与因素水平的效应图

表3 验证实验结果 g/L

项目	优化后培养基多糖含量	空白对照组多糖含量
1	2.25	1.99
2	2.23	2.02
3	2.26	2.04
平均	2.24	2.02

结果表明,使用优化后的培养基,黑木耳胞外多糖产量比未添加天麻时具有明显的提高。

### 3 结论

天麻是我国名贵中药之一,具有多种疗效。向培养基中添加一定量的天麻可以促进黑木耳多糖的产量。本研究采用了正交试验方法优化了添加天麻的黑木耳多糖液体发酵培养基。试验结果得出最佳培养基构成为:葡萄糖 40 g/L、酵母膏 13 g/L、天麻 10 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L、 $\text{MgSO}_4$  2.5 g/L。

#### 参考文献:

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学出版社;中国协和医科大学出版社, 1997: 402.
- [2] 周 鹏,谢明勇. 多糖的生物活性[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(2): 6-8.
- [3] 艾继周. 天然药物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2006: 272-276.
- [4] 杨海龙,吴天祥,章克昌. 中药提取液对灵芝深层发酵的影响[J]. 微生物学报, 2003, (4): 519-522.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999: 10-12.

## Optimization of *Auricularia Auricula* Extro - Polysaccharide Fermentation Medium by Orthogonal Experiment Design

ZHANG Da-wei<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>2</sup>, WU Tian-xiang<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang City 550003, China; 2. School of Life Science, Guizhou University, Guiyang City 550003, China)

**Abstract:** Rhizoma Gastrodiae was involved in this paper to study the extro - polysaccharide fermentation of *Auricularia Auricula* by submerged culture. The levels of carbon rescores, nitrogen rescores, salt and Rhizoma Gastrodiae was determined at first. And then the fermentation medium was optimized by orthogonal experiment design as well. The results show that the best medium composition was glucose 40g/L, yeast extract 13g/L, Rhizoma Gastrodiae 10g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{MgSO}_4$  5g/L and 2.5g/L respectively.

**Key words:** Rhizoma Gastrodiae; *Auricularia Auricula*; extro - polysaccharide; Submerged submerged culture