三株药食兼用大型真菌培养条件优化及其代谢产物研究

1. 绪论

1.1药食兼用大型真菌概述

大型真菌macrofungi，是菌物中形成大型子实体的一类真菌，泛指广义上的蘑菇mushroom或蕈菌macrofungi，介于微观生物和宏观生物之间，是菌物中的一个重要类群。大型真菌大多数属于担子菌亚门，少数属于子囊菌亚门，很多种类具有较高的营养价值和药用价值，是菌物中最有开发应用前景的一类[1]。据专家估计，全世界约有野生大型真菌 140000 种，人类已知的仅占 10%（将近 14000 种）。大型真菌是一种纯天然、无污染的绿色菌物资源，不仅香味独特、味道鲜美，含有蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸、矿质元素、维生素等多种营养成分，而且还具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、保护肝脏、增强免疫力、降血糖、抗胃溃疡、防衰抗老、预防和治疗关节炎等多种药理活性。

那些既能用于食用又具有医疗保健功能的大型真菌俗称药食兼用大型真菌。

大型真菌的代谢产物具有极高的利用价值，目前已经开发的真菌氨基酸，多糖等物质具有多种功效，而萜类、黄酮等次级代谢产物的活性也受到广泛关注。

常见的食药用大型食用真菌有香菇、草菇、金针菇、双孢蘑菇、平菇、木耳、银耳、竹荪、羊肚菌等。它们既是一类重要的菌类蔬菜，又是食品和制药工业的重要资源。

1.2药食兼用大型真菌发酵优化研究现状

1.3药食兼用大型真菌代谢研究现状综述包括活性

1.4黄绿蜜环菌

黄绿蜜环菌是（*Armillaria luteo-virens*）

1.3亚东木耳

1. 亚东木耳发酵优化及次级代谢产物研究

2.1引言

对亚东木耳进行菌丝培养条件研究，通过单因素实验和正交实验，从培养基（碳源、氮源、无机盐和生长因子）和培养条件（时间、温度、pH、转速）两个方面来考察亚东木耳菌丝的最佳生长条件。

通过查阅文献，采用米饭培养基对亚东木耳进行大规模发酵，分离纯化次级代谢产物，对次级代谢产物进行结构解析，并进行活性鉴定。

2.2材料与设备

2.2.1实验材料

菌种：西藏亚东木耳，来源：从西藏亚东县采集长有亚东木耳子实体的树枝，通过无菌操作将子实体表面消毒，切成碎片后，转接到PDA培养基上，25℃下培养出无污染，生长健壮的菌丝体，经多次纯化获得原始菌种材料[4]。

本章实验材料见表2.1。

表2.1 主要试剂

Table 2.1 Main reagents

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 级别（规格） | 公司 |
| 葡萄糖 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 可溶性淀粉 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 乳糖 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 蔗糖 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 麦芽糖 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 牛肉膏 | 生化试剂 | 北京奥博星生物科技有限公司 |
| 蛋白胨 | 生化试剂 | 北京奥博星生物技术有限公司 |
| 酵母浸粉 | 生化试剂 | 北京奥博星生物技术有限公司 |
| 硝酸钾 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 硫酸铵 | 分析纯 | 北京奥博星生物技术有限公司 |
| 硫酸亚铁 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 氯化钙 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 硫酸锌 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 硫酸镁 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 氯化钾 | 分析纯 | 北京化工厂 |
| 磷酸二氢钾 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |

续表2.1 主要试剂

Continued table 2.1 Main reagents

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 琼脂 | 分析纯 | 北京康倍斯科技有限公司 |
| 硅胶 | 200目 | 青岛海洋厂 |
| 葡聚糖凝胶 | LH-20 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 乙酸乙酯 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 甲醇 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 二氯甲烷 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 石油醚 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 香草醛 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 硅胶板 | 正相 | 国药集团化学试剂有限公司 |

2.2.2实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
| 电子天平 | BSA-CW | 赛多利斯科学仪器有限 公司 |
| 立式压力蒸汽灭菌器 | YXQ-LS -100SII | 上海博讯实业有限公司 |
| 洁净工作台 | DL - CJ -2N | 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司 |
| 生化培养箱 | LRH -250F | 上海一恒科学仪器有限公司 |
| 真空干燥箱 | DHG -9246A | 上海精宏实验设备有限公司 |
| 旋转蒸发器 | RE - 5205 | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 超声波清洗器 | KQ5200E | 昆山市超声仪器有限公司 |
| 超纯水器 | LaboStar 7 TWF UV | EvoquaWater Technologies |
| 凝胶色谱柱 |  |  |
| 硅胶色谱柱 |  |  |
| 层析缸 |  |  |
| 层析柱 | Symmetry C18 型 | Waters公司 |
| 紫外分析仪 |  |  |
| 分液漏斗 |  |  |
| 高效液相色谱仪 | 1100 型 | Agilent 公司 |

2.2.3培养基

1. 活化培养基：PDA培养基
2. 种子培养基：改良的马铃薯培养基（马铃薯200 g，葡萄糖15 g，酵母浸粉2 g，硫酸镁0.2 g，磷酸二氢钾0.2 g，去离子水1000 ml）
3. 基本培养基：葡萄糖2%，酵母粉0.2 %，KH2PO4 0.1 %，MgSO4 0.1 %，VB1 10 mg/L，固体培养基含有琼脂1.5%

2.3实验方法

2.3.1单因素条件优化

（1）培养基优化

分别以可溶性淀粉，蔗糖，麦芽糖，乳糖作为碳源，替换基本培养基（固体）中的葡萄糖[8]，于平板中间接种约0.5 cm见方的菌块，26℃下静置培养。一周后每3天测量菌丝半径一次，并观察菌丝形态，考察不同碳源对菌丝生长速率的影响。在500 mL三角瓶中，配制200 mL基本培养基，分别以可溶性淀粉，蔗糖，麦芽糖，乳糖作为碳源，替换基本培养基（液体）中的葡萄糖，自然pH，于26℃恒温箱内静置培养55 d，考察不同碳源对菌丝生长量及次级代谢的影响。

分别以牛肉膏，蛋白胨，水解乳蛋白，(NH4)2SO4，KNO3作为氮源，替换基本培养基（固体）中的酵母粉[9]，培养及测量方法同上，考察不同氮源对菌丝生长速率的影响。分别以牛肉膏，蛋白胨，硫酸铵，硝酸钾作为氮源替换基本培养基（液体）中的酵母粉，其他条件同上，考察不同氮源对菌丝生长量及次级代谢的影响。

分别以KCl，CaCl2，ZnCl2，FeSO4，Fe2(SO4)3，替换基本培养基（液体）中MgSO4，其他条件同上，考察不同无机盐对菌丝生长量及次级代谢的影响。

配制PDA培养基，加入不同生长因子（VB1、VB2），无生长因子培养基作为空白对照。于平板中央接种约0.5 cm见方的菌块，26℃下静置培养。一周后每3天测量菌丝半径一次，并观察菌丝形态。以上实验均作3组平行。

（2）培养条件优化

在500 mL三角瓶中，加入200 mL基础培养基，用1 mol/L的HCl溶液或1 mol/L NaOH溶液，调节培养基初始pH值分别为4.0，5.0，6.0，7.0，8.0五个梯度，每个梯度设置两组平行，接种菌龄30 d菌种。置于26℃恒温箱中静置培养55 d，考察培养基初始pH对菌丝生长及其次级代谢的影响。

分别设置20℃，22℃，24℃，26℃，28℃，30℃五个温度梯度，自然pH，其他条件同初始pH，考察温度对菌丝生长及次级代谢的影响。

分别设置时间为35 d，42 d，49 d，56 d，63 d五个时间梯度，室温下静置培养，考察不同培养时间对次级代谢的影响。以上实验均作3组平行。

转速单因素分别设置0 r，80 r，100 r，120 r，150 r五个转速梯度，室温，自然pH下培养50 d，观察转速对菌丝生长的影响。

（3）菌丝收集及代谢产物处理

菌丝收集：采用六层纱布过滤并剥落黏质菌丝的方法。菌丝自然风干至重量不变时，称重。

菌丝发酵液处理：乙酸乙酯与发酵液体积比1:1萃取3次，乙酸乙酯相进行减压浓缩，得到浓缩液，待溶剂挥干，用50-60℃沸程石油醚处理，去除低极性次级代谢物（油脂类），38℃真空干燥36h后称重。将干菌丝用5 mL甲醇浸泡后超声（200 W，10 min）提取3次，得到的提取液浓缩后与发酵浓缩液合并。

固体发酵基质处理：用甲醇-氯仿-乙酸乙酯混合溶液 (v/v = 1:1:1)浸泡基质，超声浸提15 min，重复3次。浸提液经减压浓缩得到浓缩液，浓缩液用乙酸乙酯进行萃取，乙酸乙酯相经减压浓缩得到代谢产物粗提取物。

2.3.2正交条件优化

（1）培养基正交条件优化

表2.2培养基正交实验表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 水平 | 初始pH | 温度/℃ | 时间/d | 接种量/r |
| 1 | 5 | 24 | 35 |  |
| 2 | 6 | 25 | 42 |  |
| 3 | 7 | 26 | 49 |  |

2.3.3次级代谢产物分离纯化

利用米饭作为培养基培养亚东木耳，对发酵基质中的次级代谢产物进行提取，分离纯化。采用硅胶色谱柱进行初步分离，得到几部分不同极性的样品，利用薄层层析方法检测，合并具有相同化合物的样品。合并后，根据溶解性进行凝胶柱层析或进一步利用不同型号的硅胶柱层析进行分离

1. 菌丝发酵 将60 mL大米和80 mL0.3%氯化钠溶液置于500 mL锥形瓶中，共60瓶，121℃高压蒸汽灭菌20 min。置于室内自然条件下发酵35 d。
2. 发酵基质浸提 将经发酵35 d的基质全部转移到2.5 L广口瓶中，加入甲醇：乙酸乙酯：三氯甲烷=1：1：1的混合溶剂，60℃加热浸提过夜。用纱布过滤浸提液，经减压浓缩去除浸提液中水分，浓缩液分别用正丁醇、乙酸乙酯、石油醚各萃取三遍，减压浓缩，得到不同极性的粗提浸膏。
3. 硅胶柱层析进行初步分离 经称量共得100 g粗提物浸膏与100 mL硅胶混合搅拌待用。向硅胶柱中装入空白硅胶500 mL，拌料硅胶100 mL，缓冲硅胶50 mL，柱体积650 mL。采用梯度洗脱的方法分离样品，洗脱剂分为两个体系：体系一，石油醚与乙酸乙酯体积比v/v分别为9:1，8:1，7:1，6:1，5:1，4:1，3:1，2:1，1:1，1:2，1:3，1:4，乙酸乙酯；体系二，甲醇与乙酸乙酯体积比v/v=1:4，1:3，1:2，1:1，甲醇。利用两种体系洗脱剂快速洗脱，每个比例的洗脱剂为5倍柱体积。用250 mL锥形瓶接收洗脱液，减压浓缩，经挥发成为浸膏，以备进一步分离。
4. 薄层层析分析合并 利用青岛海洋厂规格硅胶板进行点板分析分离组分的化合物组成，显示相近或相同样品进行合并，以备进一步分离。
5. 凝胶色谱分离纯化 将合并后的样品选择合适的溶解剂溶解，用0.5 mm有机膜过滤后，用与溶解剂相同的溶剂进行等梯度洗脱。
6. 薄层层析鉴定 利用硅胶板，通过检测紫外吸收和香草醛显色法初步鉴定分离得到的化合物是否为纯化合物。

2.3.4化合物波普解析

经分离纯化，共得到11个化合物，对这些化合物通过核磁共振、质谱等方式进行结构解析。

2.3.5化合物活性实验

对得到的化合物A、B、C进行抗氧化剂抗菌活性分析。

1. 黄绿蜜环菌培养优化

1.1实验材料

1.2单因素试验

斜面培养基

种子培养基

碳源对菌丝生长的影响

氮源对菌丝生长的影响

无机盐对菌丝生长的影响

生长因子对菌丝生长的影响

初始pH对生物量量的影响

温度对生物量的影响

培养时间对生物量的影响

转速对生物量的影响

接种量对生物量的影响

各因素小多糖含量

多糖含量测定

苯酚硫酸法测定多糖含量

（1）5%苯酚配制：称取2.5 g苯酚迅速转移到50 ml容量瓶中溶解，定容，现配现用。

（2）葡萄糖标准液配制：称取25 mg干燥至恒重的葡萄糖，余250 ml容量瓶中，蒸馏水定容，得0.1 mg/ml的葡萄糖标准液。

（3）别取0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.7ml置于青霉素小瓶中补充去离子水至1ml，空白对照为去离子水。

（4）向不同浓度的葡萄糖标准液中加入1 ml5%苯酚溶液，摇匀加入2.5 ml浓硫酸，显色30 min，490 nm处测定吸光度。平行三次。

标准曲线：

多糖含量计算及换算

正交实验中多糖的含量

1.3正交试验

正交实验表

实验结果

1.4结果与讨论

1. 双孢菇发酵及次级代谢产物研究

1.1菌种大规模发酵

1.2发酵物处理

1.3分离步骤

第五章 结论

通过培养优化的到了两株珍稀大型真菌的较优发酵条件，通过次级代谢产物分离

参考文献