

网络出版时间:2022-05-27 13:22

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.12.016

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220525.1618.013.html

绣球菌双向液体发酵条件优化及其 菌丝体多糖抗氧化活性分析

任亚倩^{1a}, 庄孟颖^{1b}, 刘兴健^{1b}, 吴小平^{1b}, 张君丽², 郑明锋^{1a}, 傅俊生^{1b}

(1 福建农林大学 a 食品科学学院, b 生命科学学院, 福建 福州 350002;

2 西藏自治区农牧科学院 蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850000)

【摘要】【目的】优化马尾松松针-绣球菌双向液体发酵条件,并探究绣球菌菌丝体多糖的抗氧化活性,为绣球菌菌丝体的高效生产提供参考。【方法】采用双向液体发酵法,即在绣球菌发酵培养基中添加适量马尾松松针粉末,通过单因素试验和正交试验探究马尾松松针添加量(0.50,0.75,1.00,1.25,1.50 g/L)、发酵时间(12,16,20,24,28,32 d)、绣球菌接种量(25,50,75,100,125,150 mL/L)、pH(4,5,6,7,8)对绣球菌菌丝体生物量的影响,优化双向液体发酵条件。以未添加马尾松松针粉的处理为对照组,提取菌丝体多糖,采用红外光谱对菌丝体的多糖结构进行分析。测定菌丝体多糖对 ABTS 自由基和羟基自由基的清除率,分析其抗氧化活性。【结果】单因素试验结果显示,当马尾松松针粉末添加量为 1.25 g/L、发酵时间为 24 d、接种量为 100 mL/L、pH 为 5 时,绣球菌菌丝体生物量均较高。正交试验结果显示,马尾松松针-绣球菌双向液体发酵的最优条件为:马尾松松针粉末添加量 1.25 g/L、发酵时间 24 d、pH 为 4、接种量 125 mL/L,在此条件下绣球菌菌丝体生物量可达到(11.16±0.22) g/L。与对照组相比,双向液体发酵绣球菌菌丝体生物量提高了约 162.10%。红外光谱分析结果表明,马尾松松针-绣球菌双向液体法发酵得到的菌丝体多糖的红外主要吸收峰与对照组一致。抗氧化试验结果显示,绣球菌菌丝体多糖对 ABTS 自由基、羟基自由基均具有较好的清除能力。【结论】得到了马尾松松针-绣球菌双向液体发酵产绣球菌菌丝体的最佳条件,此条件下得到的菌丝体多糖具有良好的抗氧化活性。

【关键词】 绣球菌;马尾松松针;双向液体发酵;菌丝体多糖;抗氧化活性

【中图分类号】 S646.9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2022)12-0146-09

Optimization of bi-direction liquid fermentation conditions of *Sparasis crispa* mycelium and its polysaccharide antioxidant activity

REN Yaqian^{1a}, ZHUANG Mengying^{1b}, LIU Xingjian^{1b}, WU Xiaoping^{1b}, ZHANG Junli²,
ZHENG Mingfeng^{1a}, FU Junsheng^{1b}

(1 a College of Food Science, b College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2 Vegetable Research Institute, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Tibet 850000, China)

Abstract: 【Objective】The optimal conditions of bi-directional liquid fermentation of *Sparasis crispa* were explored under *Pinus massoniana* needles and its mycelium polysaccharides antioxidant activity was studied to provide a reference for efficient production of *Sparasis crispa* mycelium. 【Method】Bi-directional liquid fermentation by adding *Pinus massoniana* needles powder to fermentation medium was exercised.

【收稿日期】 2021-12-08

【基金项目】 西藏自治区科学技术厅重点研发及转化项目“特色食用菌种质资源创新研究与菌种繁育关键技术集成示范”(XZ202001ZY0041N)

【作者简介】 任亚倩(1993—),女,河南许昌人,硕士,主要从事食药菌活性成分研究。E-mail: ryq6050@163.com

【通信作者】 傅俊生(1981—),男,福建莆田人,副教授,博士,主要从事食药菌真菌功效物质分析与药效机理研究。E-mail: fujunsheng81@163.com

The single factor test and orthogonal experiment were adopted to examine the effect of *Pinus massoniana* needles powder addition (0.5, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 g/L), fermentation time (12, 16, 20, 24, 28 and 32 d), inoculum quantity (25, 50, 75, 100, 125 and 150 mL/L), and pH (4, 5, 6, 7, 8) on biomass of *Sparasis crispa* mycelium. Subsequently, mycelium polysaccharides were extracted using the case without *Pinus massoniana* needles powder as control. Infrared spectroscopy was used to analyze the structure feature of mycelium polysaccharide, and its antioxidant activity was evaluated by ABTS, hydroxyl radical scavenging rates. 【Result】 The single factor test showed that the mycelium biomass of *Sparasis crispa* was quite high under conditions of *Pinus massoniana* needles powder 1.25 g/L, fermentation duration 24 d, inoculum size 100 mL/L and pH 5. The orthogonal test results showed that the optimum bi-direction liquid fermentation conditions were 1.25 g/L *Pinus massoniana* needles powder, 24 d fermentation duration, pH 4 and 125 mL/L inoculum quantity. Under these conditions, the mycelium biomass of *Sparasis crispa* was (11.16 ± 0.22) g/L, which was 162.10% higher than that of the control group. Infrared analysis indicated the principal absorption peaks of mycelium polysaccharide accorded with those of experimental control. The antioxidant experiment showed that *Sparasis crispa* mycelium polysaccharides could effectively help scavenge ABTS and hydroxyl radicals. 【Conclusion】 The optimal conditions for *Sparasis crispa* mycelium production were obtained by the bi-direction liquid fermentation with *Pinus massoniana* needles powder, and its mycelium polysaccharide showed good antioxidant activity.

Key words: *Sparasis crispa*; *Pinus massoniana* needles; bi-directional liquid fermentation; mycelium polysaccharide; antioxidant activity

绣球菌(*Sparasis crispa*)隶属担子菌门、伞菌纲、多孔菌目、绣球菌科、绣球菌属^[1],其子实体玲珑似花瓣,晶莹剔透,呈白色或奶黄色,是一种珍贵的食药菌。多糖是绣球菌的主要活性成分之一,具有抗炎^[2]、抗肿瘤^[3]、调节免疫^[4]等功能。由于绣球菌子实体野生资源有限,目前虽已实现人工栽培,但其栽培周期长、生产成本低,这在很大程度上限制了绣球菌相关产品的开发及应用^[5]。然而,菌丝体具有生产周期短、提取加工方便等特点,被认为是一种潜在可替代子实体扩大食用菌开发利用的有效途径,因此如何促进绣球菌菌株快速生长,高效生产菌丝体就显得至关重要^[6]。

双向发酵是一种通过添加药性基质促进目的菌株快速生长的方法,具有生产周期短、产量高、不受环境限制、成本低等优点,在真菌的发酵生产中应用广泛^[7]。解文利等^[8]探究了银杏叶对紫红曲霉双向发酵的影响,发现其可以促进紫红曲霉的生长。胡永乐等^[9]研究了厚朴对蛹虫草双向液体发酵的影响,发现其能在短时间内有效地提高蛹虫草菌丝体生物量并释放各类代谢产物。

马尾松松针是松科植物马尾松(*Pinus massoniana* Lamb)的叶^[10],是一种重要的中药材,其主要活性成分为挥发油类、木脂素类、黄酮类等,具有祛风活血、明目安神等功效^[11-12]。本课题前期研究发现,

马尾松松针能够有效地促进绣球菌菌丝体的生长,但目前还未见关于马尾松松针-绣球菌双向液体发酵对菌丝体生产影响的研究。为进一步提高绣球菌菌丝体生物量,本研究采用单因素试验和正交试验对马尾松松针-绣球菌双向液体发酵的条件进行了优化,并对菌丝体多糖的抗氧化活性进行了分析,以期为绣球菌菌丝体的高效生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 绣球菌菌种,由福建农林大学生命科学学院田间 1-11 试验室保藏,菌株编号 RY01。

1.1.2 试剂和仪器 葡萄糖、蛋白胨、琼脂等试剂,均为国产分析纯试剂;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS),购于 Sigma 公司。主要仪器有电热鼓风干燥箱(DHG-9070A,常州普天仪器制造有限公司)、高速万能粉碎机(GN20,杭州旭众机械设备有限公司)、恒温摇床(KH-300,常州市凯航仪器有限公司)、电子天平(FA104,上海力辰仪器科技有限公司)、pH 计(PHS-3C,上海仪天科学仪器有限公司)和红外光谱仪(德国 Bruker 有限公司)。

1.1.3 培养基 (1) 基础培养基的制备。将土豆 200 g 于 1.2 L 沸水煮沸 30 min,用 3 层纱布过滤,

收集土豆浸提液,依次加入葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g,琼脂 2 g,搅拌溶解,加水定容至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 30 min。

(2) 绣球菌液体菌种制备。将绣球菌菌株接种于装有 100 mL 基础培养基的锥形瓶中,于 25 ℃、160 r/min 条件下培养 20 d,用无菌水稀释,调整菌液质量浓度为 50 g/L,备用。

1.1.4 马尾松松针粉 马尾松松针采自福建农林大学中华名特优植物园。将采摘的马尾松松针于 50 ℃ 烘干,粉碎后过孔径 0.175 mm 的标准筛,备用。

1.2 双向液体发酵单因素试验

采用单因素试验分别探究马尾松松针粉添加量、发酵时间、绣球菌接种量及发酵液 pH 对绣球菌菌丝体生物量的影响。

1.2.1 马尾松松针粉添加量 于 90 mL 基础培养基中分别加入 50,75,100,125,150 mg 马尾松松针粉,121 ℃ 灭菌 30 min 后,冷却至室温,然后每个摇瓶中接入 10 mL 质量浓度为 50 g/L 的绣球菌液体菌种(最终接种量为 100 mL/L),最终培养基中马尾松松针粉添加量分别 0.50,0.75,1.00,1.25,1.50 g/L,于 25 ℃、160 r/min 条件下培养 16 d 后,测定菌丝体生物量。每组试验重复 3 次,结果取平均值。菌丝体生物量的测定:对液体发酵产物于 25 ℃ 条件下抽滤 3 h,分离发酵液和菌丝体,用蒸馏水反复冲洗菌丝体至表面无马尾松松针粉末残留,用滤纸吸干表面残留水分,于 50 ℃ 烘干后称质量。

1.2.2 发酵时间 于 90 mL 基础培养基中加入

125 mg 马尾松松针粉(最终添加量为 1.25 g/L),121 ℃ 高压灭菌 30 min 后,冷却至室温,然后每个摇瓶接入 10 mL 质量浓度为 50 g/L 的绣球菌液体菌种(最终接种量为 100 mL/L),于 25 ℃、160 r/min 条件下分别培养 12,16,20,24,28,32 d,测定菌丝体生物量。每组试验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.3 绣球菌接种量 于 90 mL 基础培养基中加入 125 mg 马尾松松针粉(最终添加量为 1.25 g/L),121 ℃ 高压灭菌 30 min,冷却至室温,分别接入不同体积 50 g/L 的绣球菌液体菌种,控制培养基总体积为 100 mL,绣球菌的最终接种量分别为 25,50,75,100,125,150 mL/L,于 25 ℃、160 r/min 条件下培养 24 d,测定菌丝体生物量。每组试验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.4 发酵液 pH 于 90 mL 基础培养基中加入 125 mg 马尾松松针粉(最终添加量为 1.25 g/L),用氢氧化钠和盐酸分别调节 pH 至 4,5,6,7 和 8,121 ℃ 灭菌 30 min,冷却至室温,然后每个摇瓶接入 10 mL 质量浓度为 50 g/L 的绣球菌液体菌种(最终接种量为 100 mL/L),于 25 ℃、160 r/min 条件下培养 24 d,测定菌丝体生物量。每组试验重复 3 次,结果取平均值。

1.3 双向液体发酵条件的优化

基于双向液体发酵单因素试验结果,以菌丝体生物量为考察指标,对马尾松松针粉添加量、发酵时间、接种量和发酵液 pH 进行 4 因素 3 水平的正交试验,筛选最佳发酵条件。试验设计见表 1。

表 1 绣球菌液态发酵条件正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment for fermentation conditions of liquid fermentation of *Sparasis crispa*

水平 Level	马尾松松针粉添加量/(g · L ⁻¹) <i>Pinus massoniana</i> needles powder addition	pH	绣球菌接种量/(mL · L ⁻¹) <i>Sparasis crispa</i> inoculation quantity	发酵时间/d Fermentation time
1	1.50	4	75	20
2	1.00	5	100	24
3	1.25	6	125	28

在正交试验优化得到最佳条件的基础上,控制其他条件一致,试验设置了马尾松松针-绣球菌双向液体发酵组(以下简称双向发酵组)和未添加马尾松松针粉的对照组 2 个处理,每组 3 个重复,对最佳条件进行验证。

1.4 菌丝体多糖制备

以未添加马尾松松针粉的处理为对照组,参照李瑞雪等^[13]的方法,将烘干后的对照组和双向发酵组绣球菌菌丝体粉碎,过孔径 0.175 mm 的标准筛,

取一定量菌丝体粉末,按料液比 1 (g) : 30 (mL) 比例加入蒸馏水,90 ℃ 提取 3 h,离心收集上清液后旋蒸浓缩,4 ℃ 醇沉过夜,收集沉淀,加水复溶后,采用 Sevage 法除去蛋白杂质,冷冻干燥得到绣球菌菌丝体多糖(*Sparassis crispa* polysaccharides,SCP)。

1.5 菌丝体多糖的结构分析

参照李晋等^[14]的方法,分别称取对照组和双向发酵组 SCP 粉末 2 mg,加入 200 mg 烘干至恒质量的 KBr 粉末,混匀后充分研磨,利用压模机压成片

后,采用红外光谱对其进行结构表征。

1.6 菌丝体多糖的抗氧化活性分析

1.6.1 对 ABTS 自由基清除率 参考雷燕妮等^[15]的方法并略作调整进行试验。配置双向发酵组不同质量浓度(0.25,0.5,1,2,4 mg/mL)的 SCP 溶液,以相同质量浓度的维生素 C 为对照,测定 SCP 对 ABTS 自由基清除率。具体方法为:在试管中分别加入 0.8 mL 的 ABTS 工作液和 0.2 mL 不同质量浓度的样品溶液,振荡混匀 10 s,于 25 ℃ 条件下避光反应 6 min,在波长 734 nm 处测定吸光值(A_i),以蒸馏水分别替代样品溶液和 ABTS 工作液,在波长 734 nm 处测定吸光值(分别记为 A_j 和 A_{ij})。每组试验重复 3 次,结果取平均值。计算 ABTS 自由基的清除率:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = [1 - (A_i - A_{ij}) / A_j] \times 100\%$$

1.6.2 对羟基自由基的清除率 参考 Lai 等^[16]的方法并略作调整进行试验。以相同质量浓度的维生素 C 为对照,采用水杨酸-硫酸亚铁法测定 SCP 对羟基自由基的清除率。具体方法为:在试管中依次加入 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液、9 mmol/L 的 FeSO_4 溶液、不同质量浓度的样品溶液和 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 溶液各 0.1 mL,加蒸馏水补足至 1 mL,涡旋混匀 5 s,于 37 ℃ 条件下反应 30 min,在波

长 510 nm 处测定吸光度(A_a),以 0.1 mL 蒸馏水分别替代样品溶液和 H_2O_2 溶液,于波长 510 nm 处测定吸光度(分别记为 A_b 和 A_{ab})。每组试验重复 3 次,结果取平均值。计算 SCP 对羟基自由基的清除率:

$$\text{羟基自由基清除率} = [1 - (A_a - A_{ab}) / A_b] \times 100\%$$

1.7 数据统计与分析

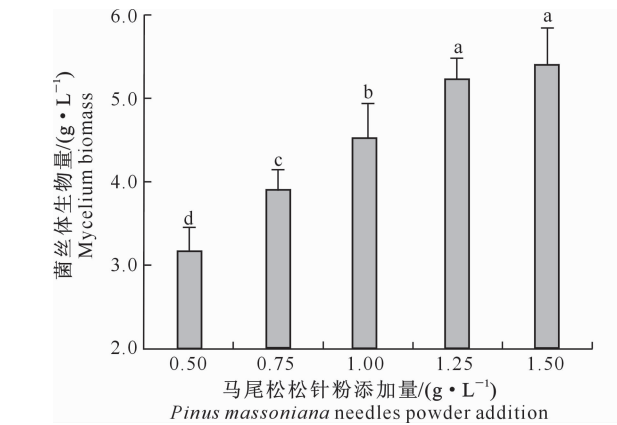
试验数据用“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 24.0 软件分析处理,组间比较采用 Duncan’s 检验。

2 结果与分析

2.1 不同单因素对绣球菌液体发酵的影响

2.1.1 马尾松松针粉添加量 图 1 显示,当马尾松松针粉添加量为 0.50~1.25 g/L 时,绣球菌菌丝体的生物量随着松针粉添加量的增加而显著提高;当松针粉添加量大于 1.25 g/L 时,绣球菌菌丝体生物量趋于稳定,从节约资源的角度考虑,马尾松松针粉添加量选取 1.25 g/L 较为合适。

2.1.2 发酵时间 图 2 显示,当发酵时间为 12~24 d 时,绣球菌菌丝体生物量随着发酵时间的延长而不断增加;当发酵时间超过 24 d,随着发酵时间的延长菌丝体生物量不再发生显著变化。从缩短发酵周期的角度考虑,发酵时间选取 24 d 较为合适。



图柱上标不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下图同
Different lowercase letters show significant difference among groups ($P<0.05$). The same below

图 1 马尾松松针粉添加量对绣球菌菌丝体生物量的影响
Fig.1 Effect of addition amount of *Pinus massoniana* needles powder on biomass of *Sparasis crispa* mycelium

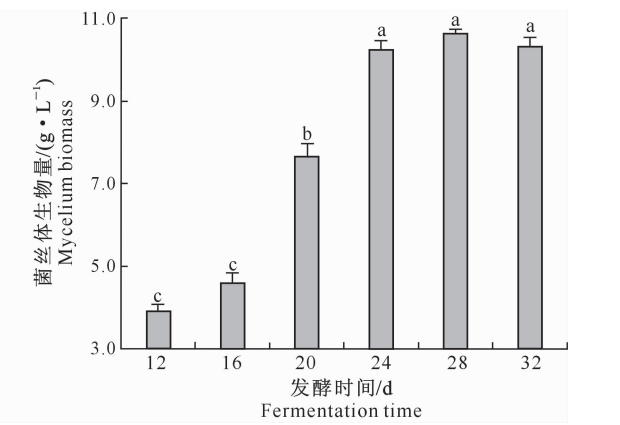


图 2 发酵时间对绣球菌菌丝体生物量的影响
Fig.2 Effect of fermentation time on biomass of *Sparasis crispa* mycelium

2.1.3 绣球菌接种量 图 3 显示,当绣球菌接种量为 25~100 mL/L 时,绣球菌菌丝体生物量随着接种量的增大而显著增加;接种量大于 100 mL/L 时,

菌丝体生物量呈下降趋势,这可能与菌株在单位体积内对营养成分的过度竞争致使培养基中溶氧不足,菌丝体的生长受到抑制有关。因此,选取 100

mL/L 为绣球菌适宜接种量。

2.1.4 发酵液 pH 图 4 显示,在供试 pH 范围内,绣球菌菌丝体生物量随着 pH 的提高呈现先增加后

降低的趋势,在 pH 为 5 时,菌丝体生物量达到最高。因此,发酵液 pH 设定为 5 较为合适。

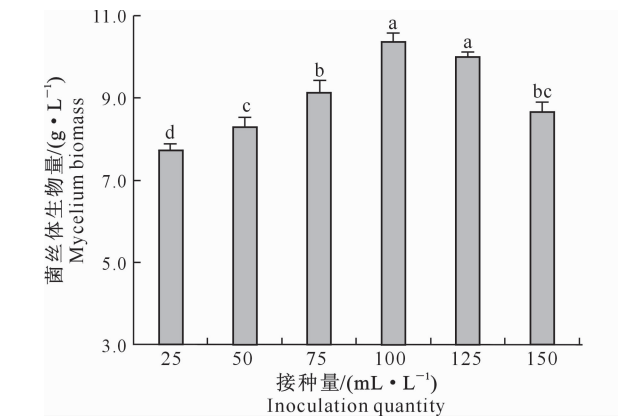


图 3 绣球菌接种量对菌丝体生物量的影响

Fig. 3 Effect of inoculation quantity on biomass of *Sparasis crispa* mycelium

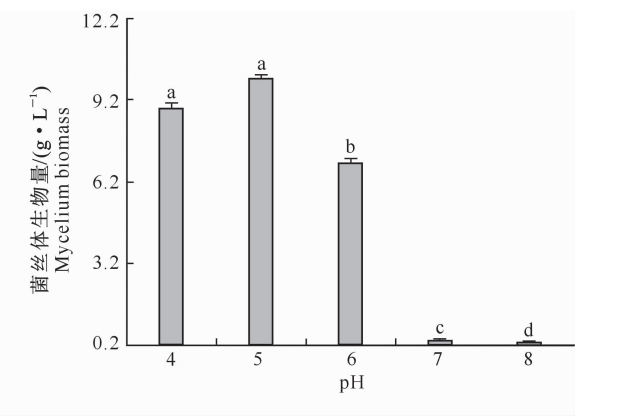


图 4 发酵液 pH 对绣球菌菌丝体生物量的影响

Fig. 4 Effect of pH of fermentation liquid on biomass of *Sparasis crispa* mycelium

2.2 绣球菌双向液体发酵条件的正交优化

表 2 显示,马尾松松针粉添加量中 k_3 最大,发酵时间中 k_2 最大,pH 中 k_1 最大,接种量中 k_3 最大,此条件(第 8 试验组)下菌丝体生物量最高。试验过程中观察菌丝颜色及大小情况发现,第 3 试验组和第 7 试验组菌丝体颜色偏黄,且菌球颗粒大小

不一;第 8 试验组菌丝体颜色偏白,且颗粒均匀。综上所述可以得出,绣球菌双向液体发酵的最佳条件为:马尾松松针粉添加量 1.25 g/L、发酵时间 24 d、pH 4、接种量 125 mL/L,在此条件下绣球菌菌丝体生物量可达到(11.25±0.18) g/L。

表 2 绣球菌双向液体发酵正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of bi-direction liquid fermentation of *Sparasis crispa*.

序号 No.	马尾松松针粉添加量/(g · L ⁻¹) <i>Pinus massoniana</i> needles powder addition	发酵时间/d Fermentation time	pH	绣球菌接种量/(mL · L ⁻¹) <i>Sparasis crispa</i> . inoculation quantity	菌丝体生物量/(g · L ⁻¹) Mycelium biomass
1	1.50	20	4	75	9.78±0.21
2	1.50	24	5	100	8.36±0.34
3	1.50	28	6	125	4.85±0.42
4	1.00	20	5	125	9.42±0.41
5	1.00	24	6	75	5.11±0.36
6	1.00	28	4	100	9.64±0.40
7	1.25	20	6	100	5.22±0.27
8	1.25	24	4	125	11.25±0.18
9	1.25	28	5	75	9.71±0.33
K_1	23.00	24.42	30.67	24.60	
K_2	24.17	24.72	27.48	23.22	
K_3	26.17	24.20	15.18	25.52	
k_1	7.67	8.14	10.22	8.20	
k_2	8.06	8.24	9.16	7.74	
k_3	8.72	8.07	5.06	8.51	
R	1.06	0.17	5.16	0.76	

表 2 显示,4 个单因素中,pH 的极差(R)最大,马尾松松针粉添加量次之,接种量和发酵时间均较小,表明影响双向液体发酵产绣球菌菌丝体的主要因素是 pH 和马尾松松针粉添加量。结合方差分析结果(表 3)可知,pH 的 F 值最大,为 404.209;马尾

松松针粉添加量的 F 值次之,为 15.589;接种量和发酵时间的 F 值均较小,分别为 8.051 和 0.401。由 R 值和 F 值可知,4 个因素对绣球菌菌丝体生物量影响大小的顺序为:发酵液 pH>马尾松松针粉添加量>绣球菌接种量>发酵时间。

表 3 绣球菌双向液体发酵正交试验结果的方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test results of bi-direction liquid fermentation of *Sparasis crispa*

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性 Significance
pH	1.338	2	0.669	404.209	<0.001
粉末添加量 Powder addition	0.052	2	0.02	15.589	<0.001
接种量 Inoculation quantity	0.027	2	0.013	8.051	0.003
发酵时间 Fermentation time	0.001	2	0.001	0.401	0.675
误差 Error	0.03	18	0.002		
总合 Total	1.447	26			

2.3 绣球菌双向液体发酵最佳条件的验证

在 2.2 节正交试验得到的最佳条件下,马尾松松针-绣球菌双向液体发酵组菌丝体生物量可达 (11.16±0.22) g/L,与未添加马尾松松针粉的对照组 ((4.26±0.19) g/L)相比,菌丝体生物量显著提高了约 162.10%,可知马尾松松针能够显著提高绣球菌菌丝体的生物量。

2.4 绣球菌菌丝体多糖的结构分析

图 5 结果显示,双向液体发酵获得的绣球菌菌丝体多糖红外光谱主要特征吸收峰与对照组一致,说明马尾松松针-绣球菌双向液体发酵对菌丝体多糖的结构影响较小。

2.5 绣球菌菌丝体多糖的抗氧化活性分析

图 6-A 结果显示,在设定质量浓度范围内,SCP 对 ABTS 自由基的清除能力随其质量浓度的增大而不断增强,当 SCP 质量浓度为 4 mg/mL 时,其对 ABTS 自由基清除率可达到 99.72%。由图 6-B 可

知,在设定质量浓度范围内,SCP 对羟基自由基的清除率随其质量随浓度的增大而不断提高,当 SCP 质量浓度为 4 mg/mL 时,其对羟基自由基的清除率可达到 68.22%。

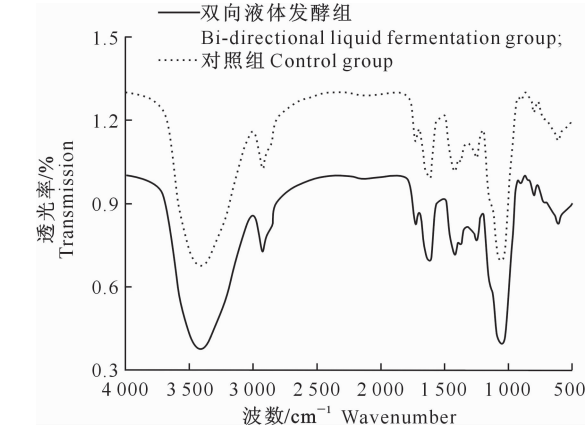
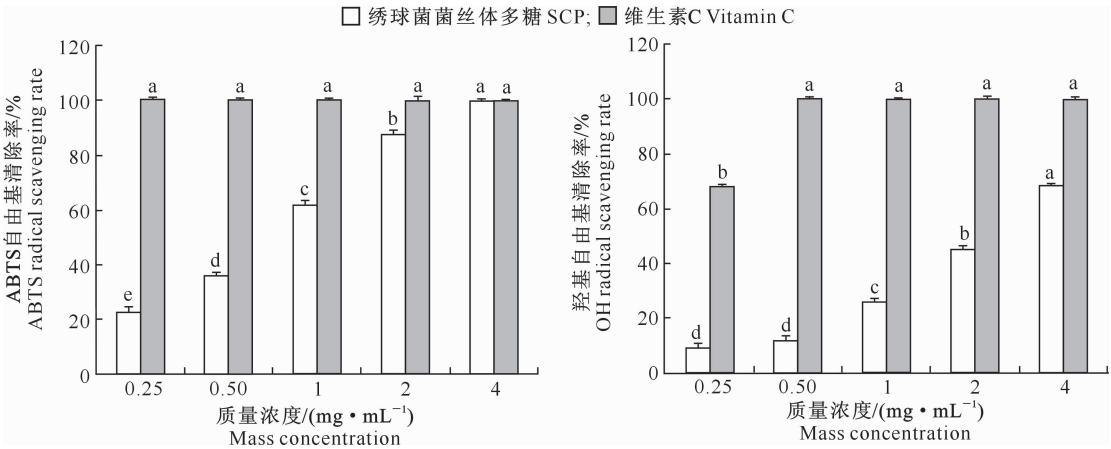


图 5 双向液体发酵绣球菌菌丝体多糖的红外光谱分析
Fig.5 SCP infrared spectra analysis of bi-direction liquid fermentation



图柱上标不同小写字母表示同一种物质不同质量浓度间差异显著 ($P<0.05$)
Different lowercase letters show significant difference of same substance under different mass concentrations ($P<0.05$)

图 6 不同质量浓度绣球菌菌丝体多糖(SCP)的抗氧化活性

Fig. 6 Antioxidant activity of SCP with different mass concentrations

3 讨论与结论

液体发酵技术是菌株扩繁的重要方法,但传统

液体发酵手段难以实现菌株的高效快速生长,双向液体发酵是利用中药材所富含的活性成分刺激菌丝体的生长,可在短时间内实现菌株的快速繁殖^[17]。

基于双向发酵的原理,本试验尝试通过马尾松松针-绣球菌双向液体发酵来提高菌丝体的生物量。单因素试验发现,当马尾松松针粉添加量大于 1.25 g/L,菌丝生物量不再明显提高,这可能是由于马尾松松针中的活性成分在达到一定量后对绣球菌菌丝体生长的促进作用达到了平台期。当发酵时间超过 24 d 后,绣球菌菌丝体生物量随着发酵时间的延长而下降,这可能是由于发酵后期培养基中溶氧量降低而引起菌丝体老化自溶所致。当接种量为 125~150 mL/L 时菌丝体生物量明显下降,这可能是由于接种量过大,菌株对物质能量的消耗过快,导致单位体积培养体系内营养成分和溶氧不足,使得菌丝体的生长受到抑制^[18]。当 $\text{pH} \geq 6$ 时,绣球菌菌丝体生物量显著下降,可知偏中性或碱性环境对其生长产生了不同程度的抑制作用,且发酵中后期菌球颜色逐渐加深,呈现不同程度的灰色,菌丝几乎无法生长,这可能是由于 pH 的升高抑制了与菌株生长相关的酶的活性^[19],此时马尾松松针粉不能发挥对绣球菌菌丝生长的促进作用。

采用正交试验进一步优化马尾松松针-绣球菌双向液体发酵条件,得到最佳发酵条件为:马尾松松针粉添加量 1.25 g/L、发酵时间 24 d、接种量 125 mL/L、 pH 为 4,在此条件下绣球菌菌丝体生物量可达 11.16 g/L。已有关于绣球菌液体培养的研究多集中于发酵条件的优化,2006 年 Kurosumi 等^[20]研究得出绣球菌的液体培养条件为:葡萄糖添加量为 30 g/L、 pH 值为 5,该条件下菌丝体的产量可达 7.95 g/L。胡爽^[21]对绣球菌突变菌株液体培养基配方进行优化,使菌丝体的生物量较优化前提高了约 60%。本研究利用双向发酵原理探究马尾松松针对绣球菌菌丝体生长的影响,试验结果表明,马尾松松针可以显著促进绣球菌菌丝体的生长,与对照组相比,双向发酵组菌丝体生物量提高了约 162.10%。

为探究马尾松松针是否会对绣球菌菌丝体多糖的结构产生影响,本试验进一步对添加马尾松松针与未添加马尾松松针发酵的绣球菌菌丝体多糖的结构进行了红外光谱分析。结果表明,两组菌丝体多糖的红外光谱主要吸收峰一致,表明马尾松松针-绣球菌双向液体发酵对绣球菌菌丝体多糖的结构影响较小。多糖作为绣球菌的重要活性成分,一直是科研工作者探究的热点之一。于韦韦^[22]研究发现,绣球菌多糖可通过诱导乳腺癌细胞凋亡抑制肿瘤生长;高渊等^[23]研究发现,绣球菌多糖可能通过调控机体氨基酸代谢和脂质代谢缓解高脂血症大鼠的血

脂异常。在绣球菌多糖的活性功能探究中,关于菌丝体多糖抗氧化活性的研究相对较少,因此本试验对其抗氧化活性进行了研究,结果显示,绣球菌菌丝体多糖对 ABTS 自由基、羟基自由基的清除能力呈现剂量依赖性,具有较好的抗氧化能力。机体氧化代谢过程中产生的活性氧自由基过量时会诱发脂质过氧化,导致细胞膜和核酸的氧化损伤,进而造成免疫力下降,引发多种疾病^[24-25]。目前越来越多的研究表明,多糖具有良好的自由基清除能力和抑制脂质过氧化作用,初步认为多糖的抗氧化能力与其结构、官能团、分子量、单糖组成等有关^[26],本试验对绣球菌多糖的结构及单糖组分未进行深入研究,后续试验可通过多糖分离纯化、结构解析结合细胞试验进一步探究其抗氧化机理。

综上,马尾松松针-绣球菌双向液体发酵可有效提高绣球菌菌丝体生物量,在最适条件下其菌丝体生物量可达 11.16 g/L,而且所得菌丝体多糖具有良好的抗氧化活性。马尾松松针-绣球菌双向液体发酵方法为绣球菌菌丝体的高效生产提供技术支持。

[参考文献]

- [1] 马璐,杨驰,肖冬来,等.碳氮源对广叶绣球菌液体发酵的影响[J].中国食用菌,2020,39(10):37-41,45.
Ma L, Yang C, Xiao D L, et al. Liquid fermentation of *Sparassia latifolia* on different carbon and nitrogen source combinations [J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(10): 37-41, 45.
- [2] Kim H H, Lee S, Singh T S K, et al. *Sparassis crispa* suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: role of calcium, mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2012, 30(2): 344-350.
- [3] Ohno N, Miura N N, Nakajima M, et al. Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(7): 866-872.
- [4] Kimura T. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa* [J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 982317.
- [5] 陈博文,常明昌,孟俊龙,等.珍稀食用菌绣球菌液体发酵工艺条件优化[J].核农学报,2017,31(10):1979-1985.
Chen B W, Chang M C, Meng J L, et al. Optimization on liquid fermentation of *Sparassis crispa*, the precious edible mushroom [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(10): 1979-1985.
- [6] 董彩虹,马琪琪.珍稀食用菌绣球菌研究进展[J].菌物研究,2014,12(3):172-177.
Dong C H, Ma Q Q. Advances in the study of *Sparassis species*, precious edible mushrooms [J]. Journal of Fungal Re-

search,2014,12(3):172-177.

[7] 庄毅,潘扬,谢小梅,等.药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J].中国食用菌,2007,26(2):3-6.
Zhuang Y,Pan Y,Xie X M,et al. The origin,development and its advantage and potential of “the Bi-directional solid fermentation” for medicinal fungi [J]. Edible Fungi of China,2007,26(2):3-6.

[8] 解文利,方月月,吴雨炯,等.紫红曲霉与银杏叶双向发酵研究[J].食品研究与开发,2020,41(22):174-182.
Xie W L,Fang Y Y,Wu Y T,et al. Study on the Bi-direction fermentation of *Monascus purpureus* and *Ginkgo biloba* leaves [J]. Food Research and Development,2020,41(22):174-182.

[9] 胡永乐,张传海,林崇展,等.响应面法优化蛹虫草与厚朴双向液体发酵工艺[J].菌物学报,2020,39(5):944-954.
Hu Y L,Zhang C H,Lin C Z,et al. Response surface methodology optimizing liquid fermentation process of *Cordyceps militaris* by use of magnoliae officinalis cortex as additional substrate [J]. Mycosystema,2020,39(5):944-954.

[10] 李聪,李鹏,李志浩,等.马尾松松针的研究概况[J].国际中医中药杂志,2013,35(8):748-750.
Li C,Li P,Li Z H,et al. The situation of research on the *Pinus massoniana* Lamb. needles [J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine,2013,35(8):748-750.

[11] 胡文杰,李阁,李冠喜.马尾松松针挥发油化学成分及抗氧化活性研究[J].中国粮油学报,2018,33(12):42-48.
Hu W J,Li G,Li G X. The research on chemical constituents and antioxidant of volatile oil from pine needles of *Masson pine* [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,2018,33(12):42-48.

[12] 粟本超,谢济运,陈小鹏,等.广西柳州产马尾松和湿地松松针挥发油的 GC/MS 分析[J].质谱学报,2008,29(2):70-75.
Su B C,Xie J Y,Chen X P,et al. Analysis of volatile oils in leaves of *Pinus massoniana* and *Pinus elliottii* engelm from Guangxi Liuzhou by GC/MS [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society,2008,29(2):70-75.

[13] 李瑞雪,王钰婷,夏家凤,等.桑黄菌丝体中多糖提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J].中国农学通报,2019,35(29):143-150.
Li R X,Wang Y T,Xia J F,et al. Optimization of extraction process of polysaccharide of *Phellinus igniarius* mycelium and analysis of its antioxidant activity *in vitro* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2019,35(29):143-150.

[14] 李晋,徐怀德,米林峰.洋葱多糖的分离纯化及单糖组成研究[J].中国食品学报,2012,12(2):202-206.
Li J,Xu H D,Mi L F. Isolation,purification and monosaccharide analysis of polysaccharide from onion [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2012,12(2):202-206.

[15] 雷燕妮,张小斌,陈书存.杜仲叶多糖的制备及其体外活性[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(11):97-103.
Lei Y N,Zhang X B,Chen S C. Separation and *in vitro* activity of polysaccharides from *Eucommia folium* leaves [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2020,48(11):97-103.

[16] Lai F R,Wen Q B,Li L,et al. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment [J]. Carbohydrate Polymers,2010,81(2):323-329.

[17] 李羿,杨胜,万德光.药用真菌液体发酵研究进展及存在问题探讨[J].中草药,2012,43(10):2066-2070.
Li Y,Yang S,Wan D G. Advances and existed problems in studies on liquid fermentation of medicinal fungi [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2012,43(10):2066-2070.

[18] 刘鑫,李琳,陈磊,等.利用扁桃斑鸠菊叶发酵高产粗毛纤孔菌胞外多糖的条件优化及其抗氧化活性研究[J].菌物学报,2019,38(3):403-413.
Liu X,Li L,Chen L,et al. Optimization on fermentation conditions for high production of *Inonotus hispidus* exopolysaccharides using *Vernonia amygdalina* dried leaf powder as additive and analyses on antioxidant activities of the polysaccharide product [J]. Mycosystema,2019,38(3):403-413.

[19] 侯若琳,李琳,项凯凯,等.利用扁桃斑鸠菊叶发酵生产蛹虫草胞外多糖的条件及其抗氧化活性[J].生物工程学报,2019,35(4):667-676.
Hou R L,Li L,Xiang K K,et al. Production of antioxidative exopolysaccharides of *Cordyceps militaris* with *Vernonia amygdalina* leaves in substrate [J]. Chinese Journal of Biotechnology,2019,35(4):667-676.

[20] Kurosumi A,Kobayasi F,Mtui G,et al. Development of optimal culture method of *Sparassis crispa* mycelia and a new extraction method of antineoplastic constituent [J]. Biochemical Engineering Journal,2006,30(1):109-113.

[21] 胡爽.绣球菌发酵工艺优化及其多糖神经保护研究[D].长春:吉林大学,2016.
Hu S. Studies on the fermentation process optimization of *Sparassis crispa* and the neuro-protective activities of its polysaccharides [D]. Changchun:Jilin University,2016.

[22] 于韦韦.绣球菌多糖抗乳腺癌活性的研究[D].长春:吉林大学,2018.
Yu W W. Studies on the anti-breast cancer activity of *Sparassis crispa* polysaccharide [D]. Changchun:Jilin University,2018.

[23] 高渊,杨亚茹,常明昌,等.基于代谢组学研究绣球菌多糖对高脂血症大鼠的降血脂作用[J].食品科学,2021,42(11):168-175.
Gao Y,Yang Y R,Chang M C,et al. Metabonomic study on hypolipidemic effect of *Sparassis crispa* polysaccharides on hyperlipidemic rats [J]. Food Science,2021,42(11):168-175.

[24] 李玥彤,隋怡,郝晓伟,等.山茱萸叶多糖的理化性质和抗氧化活性[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(8):109-116,143.
Li Y T,Sui Y,Hao X W,et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Fructus corni*

leaves [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(8): 109-116, 143.

[25] 陈思南,王心怡,李梦婷,等. 五味子蜂花粉不同萃取物对小鼠肝脏脂质过氧化及 DNA 氧化损伤的作用 [J]. 食品科学, 2019, 40(11): 146-151.

Chen S N, Wang X Y, Li M T, et al. Effects of different solvent extracts from *Schisandra chinensis* bee pollen on hepatic lipid peroxidation and DNA oxidative damage [J]. Food Science, 2019, 40(11): 146-151.

[26] 徐元庆,王哲奇,张 静,等. 岩藻多糖的抗氧化功能研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1782-1793.

Xu Y Q, Wang Z Q, Zhang J, et al. Research advance on antioxidant function of fucoidan [J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(10): 1782-1793.

(上接第 145 页)

[21] 钟 涛,王智荣,杜木英. 微生物源挥发性物质防治采后果蔬病害的研究进展 [J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 1771-1785.

Zhong T, Wang Z R, Du M Y. Control of postharvest fruits and vegetables diseases by microbial volatile compounds [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 1771-1785.

[22] 陈利军,王国君,田雪亮,等. 产香真菌 ZY-2 菌株鉴定及其挥发性物质抑菌活性测定与组分分析 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1818-1822.

Chen L J, Wang G J, Tian X L, et al. Identification of an aroma-producing fungus ZY-2 and its analysis on antifungal activity and chemical component of volatile compounds [J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(11): 1818-1822.

[23] 冯福山,刘君昂,胡廉成,等. 枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性物质的分析及抑菌活性 [J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(4): 597-604.

Feng F S, Liu J A, Hu L C, et al. Analysis of volatile compounds from *Bacillus subtilis* Y13 and its antimicrobial activity [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(4): 597-604.

[24] 张 茜,李 洋,王磊明,等. 生物保鲜剂在果蔬保鲜中的应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 308-316.

Zhang X, Li Y, Wang L M, et al. Research progress of application of biological preservative in the preservation of fruits and vegetables [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 308-316.

[25] 许 原,张梦奇. 3 种天然保鲜剂对凤尾菇的保鲜效果 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 253-257, 265.

Xu Y, Zhang M Q. Three natural preservatives for preservation of *Pleurotus sajorcaju* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 253-257, 265.