

药用真菌桑黄液体深层发酵条件的优化^{*}赵子高^{1 2} 杨 焱^{2* *} 刘艳芳² 张劲松² 潘迎捷³

(南京农业大学生命科学学院微生物系 南京 210095) (上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

(上海水产大学食品科学学院 上海 200090)

摘要 :以菌丝体生物量和多糖产量为主要指标,对桑黄(鲍氏层孔菌)的深层发酵条件进行了优化,通过单因素试验和四因素三水平正交试验筛选出了桑黄液体发酵的培养基,结果表明,最适培养基为:葡萄糖 5g/L,玉米粉 40g/L,豆饼粉 20g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, MgSO_4 1g/L。进一步通过培养条件的优化,得到最适菌丝体生长的液体发酵条件为:培养温度 28℃,摇床转速 140r/min, pH 值自然,接种量 10%,装液量 100mL(250mL 三角瓶),发酵周期 132h。

关键词 桑黄, 深层发酵, 生物量, 多糖

中图分类号: Q939.96 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0459-05

Optimum of Submerged Fermentation Parameters for Medicinal Fungus *Phellinus baumii*^{*}ZHAO Zi-Gao^{1 2} YANG Yan^{2* *} Liu Yan-Fang² ZHANG Jin-Song² PAN Ying-Jie³

(Department of Microbiology, Life Science College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201106)

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract Taking the mycelial biomass and production of polysaccharide as detecting indices, the optimal submerged fermentation parameters for medicinal fungus *Phellinus baumii* were investigated by various media and conditions, including single factor test and $L_9(3^4)$ orthogonal test. The optimal culture was: glucose 5g/L, corn flour 40g/L, soybean cake powder 20g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, MgSO_4 1g/L. The optimal fermented condition was: culture temperature 28℃, rotation speed 140r/min, pH normal, inoculation volume 10%, the amount of liquid 100mL(250mL canonical flask), and fermentation time 132h.

Key words : *Phellinus baumii*, Submerged fermentation, Biomass, Polysaccharide

桑黄,别名桑臣、桑耳、胡孙眼等,隶属于担子菌亚门,层菌纲,多孔菌目,多孔菌科,木层孔菌属;该菌在我国中南地区通常生长于桑属(*Morus L*)植物上,且其子实体为黄褐色,故名桑黄^[1]。桑黄子实体入药,味微苦,民间用以治疗血淋、脱肛、泻血、带下、闭经、脾虚泄泻等。近代研究表明桑黄的水提物对小白鼠 S-180 的抑制率为 96.7%,艾氏腹水癌的抑制率为 87%^[2],而桑黄中的多糖是其抗癌作用的主要成分^[3]。由于桑黄具有显著的抗癌效果,目前对桑黄的研究已成为国际药用真菌领域的热点。传统上,桑黄中的活性成分多糖通常从子实体中提取;但由于桑黄野生资源的日益匮乏,加之人

工栽培难度较大,这已限制了对桑黄的进一步开发和利用。研究表明桑黄菌丝体的成分类似于子实体的活性成分,因而通过发酵培养桑黄菌丝体备受关注。目前桑黄的分类命名有多种,国内外对桑黄的研究主要集中在裂蹄针层孔菌[*Phellinus linteus* (Berk. et. Curt.) Teng], 火木层孔菌[*Phellinus igniarius* (L. ex. Fr.) Quel]和鲍氏层孔菌[*Phellinus baumii* Pilat];对 *P. linteus* 和 *P. igniarius* 的深层发酵报道较多^[4 5 6],而对 *P. baumii* 的深层发酵报道较少。本文对鲍氏层孔菌的深层发酵条件进行了优化,以期获得多糖产量和生物量高的菌丝体并对菌丝体多糖活性进一步研究。

^{*} 上海市农业科学院院发基金资助(No. 院科发 200606)

^{**} 通讯作者 Tel: 021-62208660-3218, E-mail: yangyan9200@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-17, 修回日期: 2006-09-17

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 鲍氏层孔菌(*Phellinus baumii* Pilat),由本试验室自行从安徽金寨椴木栽培的子实体分离获得(菌种由韩国引进),该子实体经广东微生物所李泰辉教授鉴定。

1.1.2 试剂 乳糖、葡萄糖、蔗糖、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 均为国产分析纯,豆饼粉、玉米粉、大米粉、土豆粉、麸皮提取液均为煮沸 30min 后用滤布过滤制得。

1.1.3 仪器 :DKY-II 型恒温调速迴转式摇床 ,DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱 ,Synergy HT 型多功能酶标仪(BIO-TEK),BP3100S 型电子天平。

1.2 方法

1.2.1 培养基 :母种培养基 :PDA 培养基。液体菌种培养基(A):PDY 培养基 马铃薯 20% ,葡萄糖 2% 酵母粉 0.2%。液体菌种培养基(B):葡萄糖 30g/L ,豆饼粉 20g/L , KH_2PO_4 1g/L , MgSO_4 0.5g/L。

1.2.2 液体菌种培养 :250mL 三角瓶装液体菌种培养基(A)100mL ,接活化后的斜面母种 4 块 ,每块 0.5cm^2 , 26°C ,150r/min ,培养 5d 得一级种 ,菌球匀浆后按 10% 接种量接种到液体菌种培养基(B)扩种 ,同样条件培养 3d 得二级种 ,用于发酵培养。

1.2.3 氮源筛选试验 :葡萄糖 30g/L , KH_2PO_4 1g/L , MgSO_4 0.5g/L ,pH 值自然 ,以豆饼粉、麸皮、玉米粉、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、土豆粉为氮源 ,20g/L 添加量 , 26°C ,150 r/min ,培养 6d ,考察不同氮源对菌丝体生物量及多糖产量的影响。

1.2.4 碳源筛选试验 :豆饼粉 20g/L , KH_2PO_4 1g/L , MgSO_4 0.5g/L ,pH 值自然 ,分别以葡萄糖、可溶性淀粉、玉米粉、乳糖、蔗糖、大米粉、麸皮、土豆粉为碳源 ,30g/L 添加量 ,考察不同碳源对菌丝体生物量及多糖产量的影响。

1.2.5 摇瓶发酵条件的优化 :最适装液量、最适接种量、最适初始 pH、最适培养温度及摇床转速等参数优化均按常规方法进行。

1.2.6 测定方法 :发酵液用去离子水经滤布洗涤 ,至洗涤液近无色 ,收集菌丝体 , 65°C 烘干称重 ,测得菌丝体生物量。pH 值用 pH 计测定 ,总糖测定用苯酚 - 硫酸法 ,单糖测定用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸法)^[7]。多糖含量 = 总糖含量 - 单糖含量 ,多糖

产量 = 多糖含量 \times 菌丝体生物量。

2 结果与分析

2.1 液体培养基配方试验

2.1.1 最适氮源的筛选结果 :由图 1 可以看出 ,不同氮源对桑黄菌丝体生长及多糖产量均有明显的差异 ,在以豆饼粉作为氮源的培养基中 ,菌丝体生物量及多糖产量均高于其它有机氮源 ,加之豆饼粉价格低廉 ,容易获得 ,故选择豆饼粉作为氮源。

2.1.2 最适碳源的筛选结果 :由图 2 可知 ,不同碳源培养基中菌丝体生物量由大到小的顺序依次为 :葡萄糖培养基 > 乳糖培养基 > 可溶性淀粉培养基 > 玉米粉培养基 > 大米粉培养基 > 蔗糖培养基 > 麸皮培养基 > 土豆粉培养基 ;从多糖产量的角度来看 ,以可溶性淀粉培养基为最高 ,玉米粉次之 ,综合菌丝体生物量及多糖产量和经济因素 ,选择葡萄糖和玉米粉作为混合碳源更为适宜。

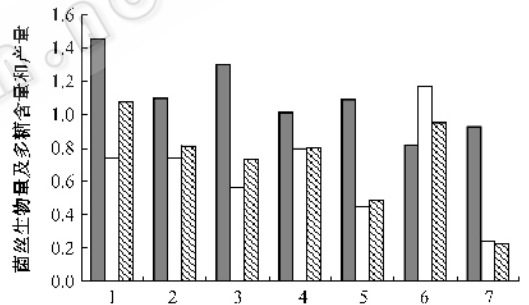


图 1 不同氮源对菌丝生物量及多糖含量和产量的影响
1 豆饼粉 2 麸皮 3 牛肉膏 4 土豆粉 5 酵母膏 6 玉米粉 7 蛋白胨
■ 生物量(g/100mL), □ 多糖含量(mg/g)*0.01,
▨ 多糖产量(g/100mL)*10

2.1.3 优化培养基配方的确定 :以葡萄糖、玉米粉作混合碳源 ,豆饼粉作氮源 ,添加磷酸二氢钾、硫酸镁 ,设计 $L_9(3^4)$ 四因素三水平正交试验(表 1) ,优化培养基配方 ,结果见表 2。

表 1 正交试验水平与因素表

水平	因素(g/L)				
	A 葡萄糖	B 玉米粉	C 豆饼粉	D K_2HPO_4	+ MgSO_4
1	2.5	20	10	1	0.5
2	5	30	20	1.5	1
3	10	40	30	2	1.5

由表 2 的极差分析可知 ,菌丝体生物量的最优培养基配方组合为 $A_2B_3C_2D_2$,而多糖产量的最优培养基配方组合为 $A_1B_3C_2D_2$,于是对 $A_2B_3C_2D_2$ 和 $A_1B_3C_2D_2$ 培养基配方组合进行验证试验 ,结果见表 3。

A₂B₃C₃D₃ 组合进行重复试验,结果显示 A₂B₃C₂D₂ 组合菌丝体生物量及多糖产量均较高,分别为 1.37g/100mL、106mg/100mL。确定桑黄的液体深层发酵培养基配方为:葡萄糖 5g/L,玉米粉 40g/L,豆饼粉 20g/L,KH₂PO₄ 1.5g/L,MgSO₄ 1g/L。

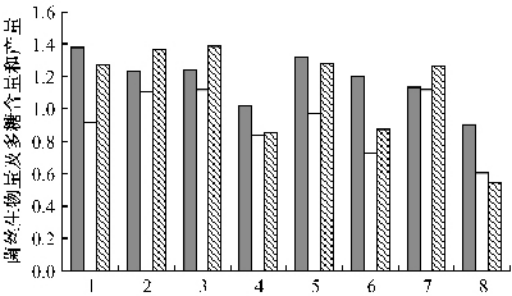


图 2 不同碳源对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

■ 生物量(g/100mL), □ 多糖含量(mg/g)*0.01,
▨ 多糖产量(g/100mL)*10

表 2 各组分正交试验结果

组合	因素				菌丝生物量 (g/100mL)	多糖产量 (mg/100mL)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	0.54	16.4
2	1	2	2	2	1.1	46.3
3	1	3	3	3	1.2	68.2
4	2	1	2	3	1.05	63.1
5	2	2	3	1	1.07	78.7
6	2	3	1	2	1.27	47.5
7	3	1	3	2	0.98	64.6
8	3	2	1	3	1.01	52.7
9	3	3	2	1	1.26	68.4
k _I	0.95	0.86	0.94	0.96		
k ₂	1.13	1.05	1.10	1.12		
k ₃	1.08	1.24	1.08	1.09		
R	0.18	0.38	0.16	0.16		
k _I	46.3	48	38.8	51.2		
k _{II}	63.1	59.2	54	52.8		
k _{III}	62.6	61.3	70.5	61		
R'	16.8	13.3	21.2	9.8		

R 菌丝体生物量极差,R'多糖产量极差。

2.2 摇瓶发酵条件试验

2.2.1 装液量对菌丝体生物量及多糖产量的影响: 分别在 250mL 三角瓶装入 60mL、80mL、100mL、120mL、150mL 的最适组合培养基,10% 接种量接种

培养,试验结果如图 3 所示。随着装液量的增加,菌丝体生物量及多糖产量均呈先增后减的趋势,装液量为 100mL 时菌丝体生物量及多糖产量均达最高;说明装液量过多影响通气量,从而影响菌丝体的好氧需求,过少则营养不足亦影响菌丝体的生长和多糖的积累。从菌丝体生物量及多糖产量的角度考虑,确定最适装液量为 100mL/250mL 三角瓶。

2.2.2 接种量对菌丝体生物量及多糖产量的影响: 由图 4 可以看出,接种量小于 10% 时,随着接种量的增加,菌丝体生物量及多糖产量亦增加,超过 10% 时,菌丝体生物量反而降低,而多糖产量与接种量为 10% 时差别不明显。从经济的因素看以 10% 的接种量最为适宜。

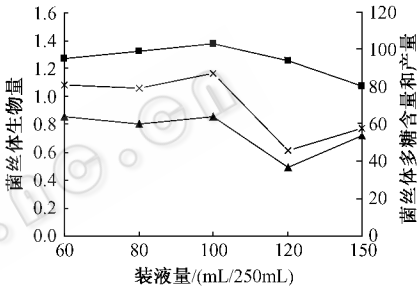


图 3 装液量对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

—■— 生物量(g/100mL) —▲— 多糖含量(mg/g)
—×— 多糖产量(mg/100mL)

2.2.3 培养基初始 pH 值对菌丝体生物量及多糖产量的影响:图 5 的结果表明,桑黄液体培养对 pH 值的适应范围较广。pH 在 4.5~6.5 范围内菌丝体生物量逐渐增加而多糖产量则逐渐降低,培养基自然 pH(5.6)状态下,多糖产量相对较高,从多糖产量的角度考虑,培养基初始 pH 值选择自然 pH。

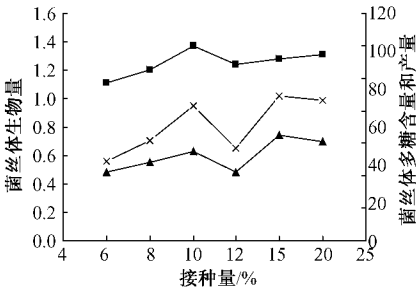


图 4 接种量对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

—■— 生物量(g/100mL) —▲— 多糖含量(mg/g)
—×— 多糖产量(mg/100mL)

2.2.4 培养温度对菌丝体生物量及多糖产量的影响:选择 26℃、28℃、30℃ 3 个温度梯度对菌丝体进

行培养,由图6可以看出28℃时,菌丝体生物量及多糖产量均较高;显示较高的温度有利于菌丝的生长,但温度过高,自身物质消耗过快,生物量及多糖产量均降低,因此选择28℃作为最适培养温度。

2.2.5 摇床转速对菌丝体生物量及多糖产量的影响 摇床转速直接影响通气量的大小,从而影响菌丝的生长;尤其在以玉米粉为主要碳源时,培养基粘度较大,当摇床转速过低时,通气量小,培养基内溶氧不足,难以满足菌丝对氧的需求,直接影响菌丝的生长;转速过大则剪切作用增强,增大了对菌球的机械刺激,亦不利于菌丝生长。由图7可知,转速过高或过低均不利于菌丝生长和多糖的积累;综合菌丝体生物量、多糖产量和能源的利用,确定最佳转速为140r/min。

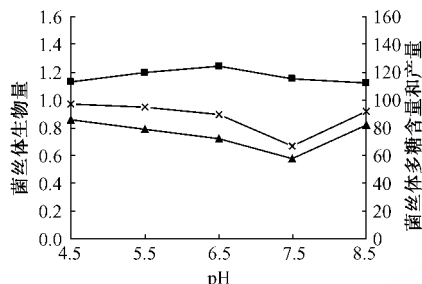


图5 pH值对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

—■—生物量(g/100mL) —▲—多糖含量(mg/g)
—×—多糖产量(mg/100mL)

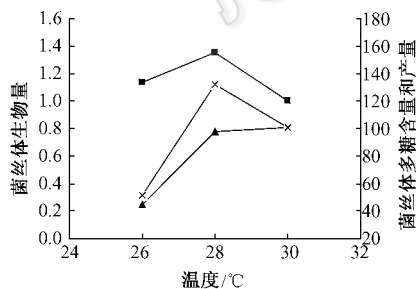


图6 温度对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

—■—生物量(g/100mL) —▲—多糖含量(mg/g)
—×—多糖产量(mg/100mL)

2.2.6 深层发酵过程中菌丝体生物量及胞内多糖含量和产量的变化 由图8可以看出,随着发酵时间的延长,菌丝体生物量逐渐增加,132h达最大,胞内多糖含量在最初108h内逐渐降低,而后陡增,132h后下降;分析认为发酵初期胞内多糖来自于菌种自身的多糖,随着发酵时间的延长,原有的胞内多糖的不断消耗加之新生菌丝对多糖的积累不够,

胞内多糖含量呈下降趋势,随着胞内多糖的积累逐渐增多,多糖含量亦增加,至132h达最高,随后部分菌球自溶致使多糖含量及产量均降低。由此可见桑黄深层发酵应在132h结束。

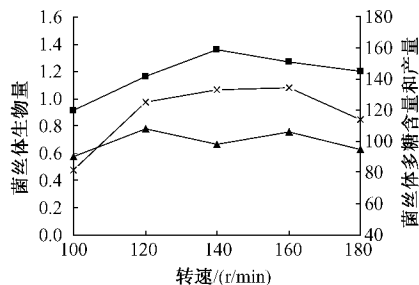


图7 摇床转速对菌丝体生物量及多糖含量和产量的影响

—■—生物量(g/100mL) —▲—多糖含量(mg/g)
—×—多糖产量(mg/100mL)

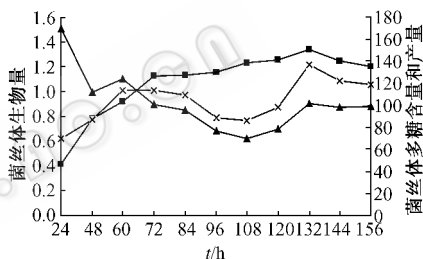


图8 深层发酵过程中菌丝体生物量及胞内多糖含量和产量的变化

—■—生物量(g/100mL) —▲—多糖含量(mg/g)
—×—多糖产量(mg/100mL)

3 讨论

桑黄菌丝致密不易挑取,当接种至种子液培养时,菌丝不易分散,往往形成较大的菌球,致使深层培养接种困难;菌球匀浆后,大小均一,分散均匀,便于深层培养接种。因此本实验选择匀浆后接种,确保了条件的均衡性。

通过单因素及正交试验确定了桑黄深层发酵的最佳培养基配方为:葡萄糖 5g/L,玉米粉 40g/L,豆饼粉 20g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, MgSO_4 1g/L。最适菌丝体生长的液体发酵条件为:培养温度 28℃,摇瓶转速 140r/min, pH 值自然,接种量 10%,装液量 100mL(250mL 三角瓶),发酵周期 132h;在此发酵条件下获得的鲍氏桑黄菌丝体生物量和多糖产量均较大,可做为桑黄生物活性进一步研究的原料。

本研究获得了鲍氏层孔菌深层发酵的最佳条件,为鲍氏层孔菌的进一步的开发利用提供了参

考,桑黄菌丝体多糖的生物活性还在进一步研究之中。

参考文献

- [1] 戴玉成. 中草药 2003 **34**(1):94~95.
- [2] Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, *et al.* Gann, 1968 **59**:155~157.

- [3] Sasaki T, Fujii K, Sugura M, *et al.* Chem Pharm Bull, 1971 **19**:821.
- [4] 郭忠军. 黑龙江医药 2005 **18**(3):198~199.
- [5] 杨全. 广东药学院学报 2004 **20**(3):212~215.
- [6] Hwang H J, Kim S W, Choi J W, *et al.* Enzyme and Microbial Technology, 2003, **33**:309~319.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版), 杭州:浙江大学出版社, 1999, PP.10~12.