

珍稀药用真菌——樟芝深层发酵培养条件的优化

刘 华^{1,2} 贾 薇^{2*} 刘艳芳² 张劲松² 潘迎捷³

(南京农业大学生命科学院微生物系 南京 210095)¹ (上海农业科学院食用菌研究所 上海 201106)²

(上海水产大学食品科学学院 上海 200090)³

摘要: 对樟芝深层发酵培养基进行了筛选,并在此基础上对发酵条件进行了优化。以樟芝深层发酵菌丝体三萜产量为主要目标产物,确定发酵培养条件为:40 g/L 葡萄糖,6 g/L 豆粕粉,1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $MgSO_4$, VB_1 100 mg/L,自然 pH,接种量为20%,装液量为100 mL/250 mL三角瓶,转速100 r/min,26℃恒温培养6d,胞内三萜产量达15.25 mg/100 mL发酵液。

关键词: 樟芝,三萜,深层发酵

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0070-05

Optimum of Submerged Fermentation Parameters for *Antrodia camphorata*

LIU Hua^{1,2} JIA Wei^{2*} LIU Yan-Fang² ZHANG Jin-Song² PAN Ying-Jie³

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)¹

(Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106)²

(College of Food Sciences, Shanghai Fisher University, Shanghai 200090)³

Abstract: Optimal parameters of submerged fermentation for *Antrodia camphorata* were studied. According to the yield of Intracellular triterpene, the optimal fermentation parameters were obtained as follows: 40 g/L glucose, 6 g/L soybean, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $MgSO_4$ and 100 mg/L VB_1 . The optimum cultural period was 6 d at 26℃ in 250 mL shake flasks at 100 r/min. The best aeration ratio was 1:2.5 (medium volume: flask volume). The inoculation volume was 20%. The intracellular triterpene of *Antrodia camphorata* was obtained (about 15.25 mg/100 mL) in the optimum culture.

Key words: *Antrodia camphorata*, Triterpene, Submerged fermentation

樟芝 (*Antrodia Camphorata*, *Antrodia Cinamomea*) 又称牛樟菇、牛樟芝、樟内菇、红樟菇等,主要分布在中国台湾山区海拔450~2000 m之间的牛樟树腐朽的心材内壁,具有黄樟香味,有“台湾森林红宝石”之美称。樟芝能解毒抗癌,对癌症、食物中毒等危急病症具有神奇的疗效。樟芝隶属于真菌门 (Fungusmy cota),担子菌亚门 (Basidiomycotina),层菌纲 (Hymenomycetes),多孔菌科 (Polypolaceae),薄孔菌属 (*Antrodia*),是一种珍稀的药用菌^[1]。

樟芝含有多钟生物活性物质,具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、解毒、抗炎等功效^[2],有很好的药用价值,是一种极具开发潜力和应用前景的药用菌,近年来成为国内外研究和开发的热点,随着樟芝的应用范围不断的拓延,其需求

量急剧上升,但由于樟芝是台湾特有的稀有野生药用真菌,且专一地寄生于牛樟树上。现在因无法进行人工栽培,野生采集的数量远不能满足人们对樟芝的需求,所以利用液体发酵大量获得樟芝菌丝体来提取樟芝中的有效成分是目前最经济、最符合环保的方法,其效果接近于实体^[3],对樟芝深层发酵的研究是大规模生产樟芝活性成分的前提和基础。

樟芝的生理活性物质以多糖类和三萜类为主,但研究者多是集中在樟芝多糖及其药理作用方面的研究,而对樟芝三萜类化合物的研究较少。Cherng等在樟芝子实体的提取物中发现7种新的以麦角甾烷和羊毛甾烷为骨架的三萜类化合物^[4],而从樟芝的发酵菌丝体中研究三萜类化合物却未见报道。本实验对樟芝高三萜产量的发酵液体培

* 通讯作者 E-mail: jiawei0313@yahoo.com

收稿日期: 2006-04-03, 修回日期: 2006-05-08

培养基及其培养条件进行了研究,为今后大规模生产珍稀樟芝和提取有效活性成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

樟芝 (*Antrodia camphorate*) 斜面菌株,由上海农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心保藏。

1.2 实验材料

葡萄糖,果糖,乳糖,可溶性淀粉,马铃薯淀粉,甘露醇均为分析纯试剂;麦芽糖,酵母膏,蛋白胨为生化试剂;麸皮和豆饼粉均为煮沸1 h后纱布滤过液。

1.3 基本培养基

1.3.1 斜面培养基: PDA 斜面培养基。

1.3.2 液体种子培养基: PDA 液体培养基。

1.3.3 发酵基础培养基: K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.5g, VB_1 0.1g, 定容至1 L, 自然 pH。

1.3.4 碳源筛选培养基: 酵母粉 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.5g, VB_1 0.1g, 定容至1 L, 自然 pH 分别加入 25g/L 的葡萄糖、麦芽糖、麸皮、乳糖、果糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、甘露醇作为碳源。

1.3.5 氮源筛选培养基: 葡萄糖 25g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.5g, VB_1 0.1g, 定容至1 L, 自然 pH。分别加入 5g/L 的蛋白胨、酵母粉、酵母膏、牛肉膏、硫酸铵、硝酸铵、尿素作为氮源。

1.4 培养方法

1.4.1 液体种子培养: 将已活化的斜面菌种切成黄豆粒大小的菌丝块,接种于液体种子培养基中。250mL 三角瓶装 100mL 培养液,于 150r/min, 26℃ 培养 8d, 作为一级种子。将已经培养好的一级种子以 20% 的接种量接种到同样的液体培养基中, 500mL 三角瓶装 200mL 培养液, 与一级种子同样的培养条件下培养 6d 得二级种子液备用。

1.4.2 发酵培养: 250mL 三角瓶装 100mL 培养液, 接种量为 10%, 150r/min, 26℃ 培养 8d。每次实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.5 分析方法

1.5.1 菌丝生物量的测定: 发酵结束后将培养液经尼龙布过滤, 菌丝体经用蒸馏水洗涤数次后在 65℃ 的烘箱中烘干至恒重, 精确称量菌丝干重。

1.5.2 胞内三萜含量的测定: 将干燥的樟芝发酵菌丝体浸于 95% 的酒精中超声波萃取 3h, 通过比

色法测定每 100mL 培养液中樟芝菌丝内的三萜含量, 计算表达式如下: 樟芝菌丝体内三萜产量 = 胞内三萜含量 × 生物量 / 100mL 培养液。

2 结果与分析

2.1 樟芝对碳源的利用

碳源是发酵培养基的基础, 既能被菌丝体利用合成细胞结构, 又是菌丝体产生各种代谢产物和细胞能量的主要原料。从图 1 可知, 从生物量上考虑, 樟芝对果糖、葡萄糖等单糖利用较好, 其次是马铃薯淀粉、麦芽糖、乳糖、麸皮、可溶性淀粉, 最差的是甘露醇。就胞内三萜产量而言, 以果糖作为碳源时, 胞内三萜的产量最高, 其次是葡萄糖、麦芽糖, 最差的是甘露醇。从经济角度考虑, 果糖价格较贵, 在发酵过程中大量应用不符合低投入、高产出原则, 所以在以下选用葡萄糖作为培养基碳源。

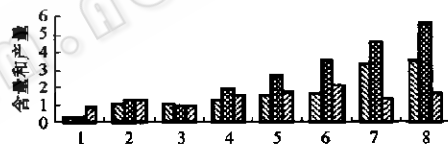


图1 不同碳源对菌丝生物量及胞内三萜含量和产量影响

1 甘露醇, 2 可溶性淀粉, 3 麸皮, 4 乳糖, 5 麦芽糖, 6 马铃薯淀粉, 7 葡萄糖, 8 果糖
□ 菌丝量 $\times 10$ (g/100mL), ■ 三萜产量 (mg/100mL), ▨ 三萜含量 $\times 0.1$ (mg/g)

2.2 樟芝对氮源的利用

氮源是食用菌细胞合成蛋白质和核酸等所需氮元素的主要来源。樟芝可利用的氮源比较广泛, 从图 2 可以看出, 樟芝对不同氮源的利用存在着明显的差异, 对有机氮源的利用明显优于无机氮源。无论从生物量、三萜含量还是三萜产量而言,

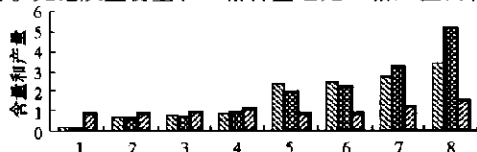


图2 不同氮源对菌丝生物量及胞内三萜含量和产量影响

1 尿素, 2 NH_4NO_3 , 3 $(NH_4)_2SO_4$, 4 酵母膏, 5 酵母粉, 6 麸皮, 7 蛋白胨, 8 豆饼粉
□ 菌丝量 $\times 10$ (g/100mL), ■ 三萜产量 (mg/100mL), ▨ 三萜含量 $\times 0.1$ (mg/g)

对豆饼粉的利用都是最好的，其次是蛋白胨、麸皮、酵母粉，最差的是尿素。因此以下的实验是以廉价的复合氮源豆饼粉作为培养基的氮源。

豆饼粉，磷酸氢二钾和硫酸镁，进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验（表 1、表 2）。

2.3 培养基成分综合实验

通过上面实验结果，选择考察因素为葡萄糖，

表 1 实验因子和水平

水 平	因 素			
	A 葡萄糖 (g/L)	B 豆饼粉 (g/L)	C 硫酸镁 (g/L)	D 磷酸氢二钾 (g/L)
1	20	2	0.2	1
2	30	4	0.5	2
3	40	6	0.7	3

注：培养基其他成分为 VB_1 100mg/L，自然 pH

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

序列号	A	B	C	D	菌丝生物量 (g/100mL)	胞内三萜含量 (mg/g)	胞内三萜产量 (mg/100mL)
1	1	1	1	1	0.3976	24.21	96.2590
2	1	2	2	2	0.3307	26.94	89.0906
3	1	3	3	3	0.3395	25.36	86.0972
4	2	1	2	3	0.3329	25.11	83.5912
5	2	2	3	1	0.3261	28.01	91.3406
6	2	3	1	2	0.3843	25.65	98.5730
7	3	1	3	2	0.3466	37.47	129.8710
8	3	2	1	3	0.3737	35.75	133.5980
9	3	3	2	1	0.5446	28.91	157.4440
I	0.3559	0.3590	0.3852	0.4228			
II	0.3478	0.3435	0.4027	0.3539			
III	0.4216	0.4228	0.3374	0.3487			
Ri	0.0739	0.0793	0.0653	0.0741			
①	25.50	28.93	28.54	27.04			
②	26.26	30.23	26.99	30.02			
③	34.04	26.64	30.28	28.74			
Rj	8.54	3.59	3.29	2.98			
(1)	90.4823	103.2404	109.477	115.015			
(2)	91.1683	104.6764	110.042	105.845			
(3)	140.3043	114.0381	102.436	101.096			
Rk	49.8220	10.7941	7.6056	13.9190			

其中 Ri 代表菌丝生物量极差，Rj 代表胞内三萜含量极差，Rk 代表胞内三萜产量极差

由表 1 和表 2 可知各因素对菌丝生物量的影响依次是 B>D>A>C，对胞内三萜的产量影响依次是 A>D>B>C。所以确定发酵培养基为 A3B3C2D1，即 40g/L 葡萄糖，6g/L 豆饼粉，

0.5g/L 硫酸镁，1g/L 磷酸氢二钾。

2.4 接种量对胞内三萜产量的影响

在发酵培养液中，选择接种量分别为 5% (v/v)，10%，15%，20%，25% 进行实验。从图 3 中可以看出，接种量为 20% 时，发酵菌丝生物量和胞内三萜产量都最高，本研究以樟芝的胞内三

菇产量为目标, 因此确定接种量为20%。

2.5 起始 pH 对胞内三菇产量的影响

调节发酵培养液的初始 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9 进行实验。从图 4 中可以看出, 初始

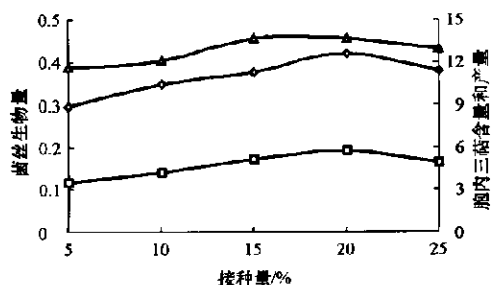


图3 接种量对菌丝生物量及胞内三菇含量和产量影响

—◇— 菌丝生物量 (g/100mL), —□— 三菇产量 (mg/100mL), —△— 三菇含量 (mg/g)

2.6 摇床转速对胞内三菇产量的影响

分别选取 80 r/min、100 r/min、120 r/min、150 r/min、170 r/min 等 5 种转速进行培养。由图 5 可知, 随着摇床转速的增加, 菌丝生物量先升高后降低; 在 100 r/min 时菌丝生物量达最高, 在此转速下胞内三菇产量和胞内三菇含量也达最高, 这可能因为樟芝菌丝体的生长需要一定的通气量, 但较高的转速可能会破坏菌丝体, 不利于菌丝体自身生长。因此, 确定转速为 100 r/min。

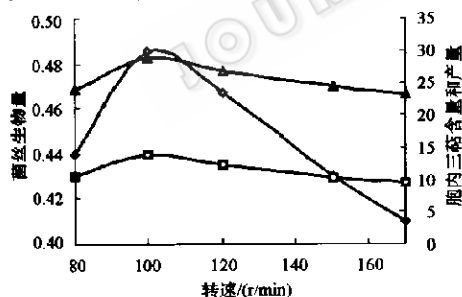


图5 摇瓶转速对菌丝生物量及胞内三菇含量和产量的影响

—◇— 菌丝生物量 (g/100mL), —□— 三菇产量 (mg/100mL), —△— 三菇含量 (mg/g)

2.8 培养温度对胞内三菇产量的影响

分别选取 22℃、24℃、26℃、28℃、30℃ 等 5 种温度培养菌丝体。由图 7 可以看出, 随着温度的升高, 菌丝生物量也逐渐增加, 但胞内三菇的含量则逐渐降低。这说明, 较高的温度有利于菌丝体的生长, 但不利于胞内三菇的积累。在 26℃

pH 为 5~6 时, 菌丝体生物量、胞内三菇含量和产量都达到最高, 因此确定发酵培养初始 pH 为 5~6。

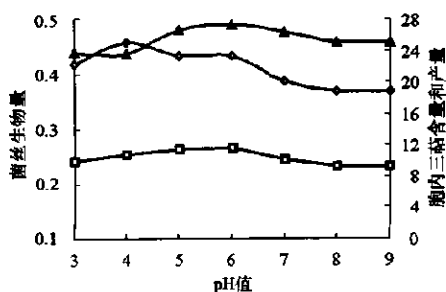


图4 pH对菌丝生物量及胞内三菇含量和产量的影响

2.7 摇瓶装液量对胞内三菇产量的影响

在 250mL 的三角瓶中分别装入 60mL、80mL、100mL、120mL、150mL 培养基, 接种量为 20%, 在 pH5~6、摇床转速为 100 r/min 条件下进行培养。由图 6 可以看出, 随着摇瓶装液量的增加, 菌丝生物量和胞内三菇产量都是先增加后减少, 装液量在 100mL 时菌丝生物量和胞内三菇产量达到最高, 而装液量是为 120ml 时三菇含量达最高。因以胞内三菇产量为目标产物, 确定装液量为 100mL。

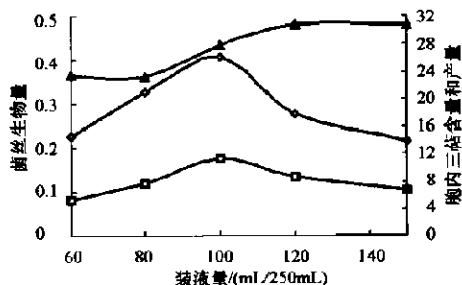


图6 装液量对菌丝生物量及胞内三菇含量和产量的影响

时胞内三菇的产量最高, 所以确定 26℃ 为培养温度。

2.9 樟芝发酵周期实验

选择装液量为 100mL/250mL 三角瓶、接种量为 20%、100 r/min、pH 为 5~6, 在 26℃ 恒温培养进行摇瓶发酵周期实验。由图 8 可以看出, 菌丝

生物量和胞内三萜产量都是随培养时间的延长先增加后减少。由于樟芝在培养对数生长期后期时接种,所以停滞期很短。72h 为对数生长期后期,而大约 168h 后进入衰亡期,菌体自溶,衰亡,菌丝生物量缓慢下降,胞内三萜产量也随之下降。

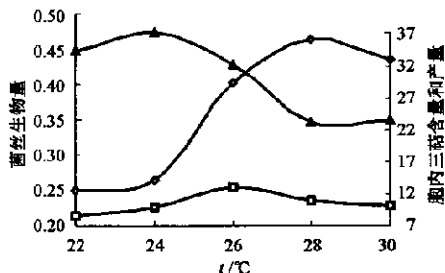


图7 温度对菌丝生物量及胞内三萜含量和产量的影响

—○— 菌丝生物量 (g/100mL), —□— 三萜产量 (mg/100mL), —△— 三萜含量 (mg/g)

3 结论

本实验的目的是采用液体深层发酵技术获得樟芝的主要生理活性物质——三萜类物质,以樟芝菌丝体胞内三萜产量为目标,确定了发酵培养基成分,并对发酵条件进行了筛选。筛选结果表明,樟芝对碳、氮源的利用比较广泛,樟芝对单糖的利用较好,对双糖和有机碳源的利用较差。对天然氮源和有机氮源的利用明显好于无机氮源。

樟芝深层发酵条件筛选实验表明,40g/L 葡萄糖,6g/L 豆饼粉,1g/L K_2HPO_4 ,0.5g/L $MgSO_4$,VB₁100mg/L, pH5~6,接种量为20%,摇瓶装液量为100mL/250mL三角瓶,转速100r/min,26℃培养6d,胞内三萜产量可达15.25mg/100mL发酵液。并且菌丝体中胞内三萜的含量不随生物量的变化而变化,但胞内三萜的产量则随着菌丝生物量的增加而增加。

4 讨论

从以上优化的5个培养条件来看,樟芝对转

因此樟芝发酵时最好在72h左右接种,可以避免菌丝生长的停滞期,缩短发酵时间,收集胞内三萜时可在稳定期,即72~168h左右,此时菌丝生长和次生代谢产物积累达最高。

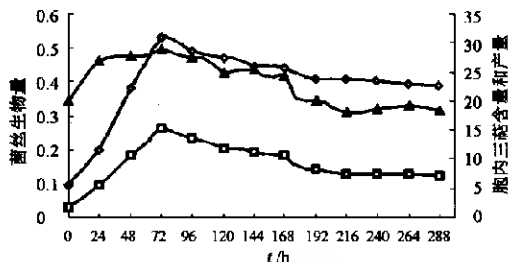


图8 樟芝的发酵曲线

速的要求比较严格,不同的转速对菌丝生物量有很大的影响,转速为100r/min时生物量最高,这说明樟芝可能对通气量的要求不是很高,较低的转速有利于菌丝体的生长,较高的转速反而不利于菌丝体的生长,也不利于胞内三萜的积累。三萜类物质和多糖是樟芝两个主要的生理活性成分,近年来人们对樟芝的多糖类物质研究的比较多,包括多糖的药理作用和结构都研究的比较深入,而对三萜类物质研究却少之又少,本文就是对樟芝的三萜类物质的培养基和培养条件进行了初步的探索,为下一步研究三萜类物质的药理作用及其结构奠定了基础。

参考文献

- [1] 宋爱荣. 中国食用菌, 2002, 21 (5): 41~43.
- [2] 浦跃武, 熊冬生. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (2): 171~173.
- [3] 宋爱荣, 田雪梅. 新疆大学学报(自然科学版), 2004, (增刊): 131~133.
- [4] Cheng I H, Wu D P, Chiang H C. Phytochemistry, 1996, 41 (1): 263~267.