

桑黄液体深层发酵培养基优化研究

唐思煜¹,赵优萍¹,吴迪¹,蔡成岗^{1,2,3},毛建卫^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院,生物与化学工程学院,杭州 310023;2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室,
杭州 310023;3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心,杭州 310023)

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)的液体深层发酵培养基进行了优化,通过单因素试验筛选碳源、氮源,通过正交试验优化桑黄液体深层发酵的培养基。结果表明:蔗糖为最佳碳源,氯化铵为最佳氮源;最适培养基各成分的质量浓度为蔗糖 70 g/L、氯化铵 10 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、氯化钠 1 g/L,pH 值自然,以此条件发酵最大菌丝量为 2.814 g。在接种量 5%、装液量 50 mL、28 ℃发酵过程中发现,发酵 120 h 时桑黄菌丝体生成量最大,随后呈下降趋势;发酵液 pH 值随着发酵进程呈现明显下降,在 120 h 后基本趋于稳定。

关键词:桑黄;深层发酵;菌丝生物量;多糖

中图分类号: S567.39

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2018)03-0193-06

Study on optimal culture medium of submerged fermentation of *Phellinus linteus*

TANG Siyu¹, ZHAO Youping¹, WU Di¹, CAI Chenggang^{1,2,3}, MAO Jianwei^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China;2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China;3. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: The mycelial biomass and polysaccharide concentrations were used as main indicators to explore the optimal culture medium of submerged fermentation of *Phellinus linteus* by means of orthogonal tests, with nitrogen sources and carbon sources determined through single-factor tests. The orthogonal results showed that the optimal carbon and nitrogen sources were of sucrose and NH₄Cl respectively. And the optimal culture medium were of sucrose 70 g/L, NaCl

收稿日期: 2017-12-06

基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2017R415017);浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室/浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放基金项目(2016KF0044;2016KF0114)

通信作者:毛建卫(1964—),男,浙江省奉化人,教授,硕士,主要从事农业生物资源生化制造研究。E-mail: zjhzmjw@163.com。

1 g/L, NH_4Cl 10 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, with pH natural and the maximal mycelial biomass fermented up to 2.814 g. Under the conditions of 5% inoculation quantity, 50 mL culture volume and fermented temperature at 28 °C, the mycelial biomass reached maximal at 120 h, then tended to decline, and the pH value of fermented broth decreased with the fermentation process and then remained practically stable after 120 h.

Keywords: *Phellinus linteus*; submerged fermentation; mycelial biomass; polysaccharide

桑黄(*Phellinus linteus*)为多孔菌科真菌火木层孔菌的子实体,是一种珍稀的食药两用真菌,隶属于担子菌亚门层菌纲多孔菌目多孔菌科木层孔菌属^[1-2]。该菌在中国中南地区通常生长于桑属植物上,且其子实体为黄褐色,故名桑黄。研究发现桑黄含有多糖、黄酮、甾醇类物质等多种成分^[3-5],其药理活性物以多糖为主。目前国内外开展了桑黄多糖的抗肿瘤、增强免疫、抗纤维化、抗氧化、降血糖、抗炎^[6-11]等药理学方面的研究。桑黄多糖主要分胞内多糖和胞外多糖,是桑黄中主要的有效成分,具有显著的抗肿瘤效果和其他药用功效,值得深入研究开发^[12];它是目前国际公认的生物治癌领域中有效率排在第一位的药用菌^[13],市场需求很大,前景较好,但桑黄野生资源稀少,人工栽培难度较大^[14],价格昂贵。采用液态深层培养技术进行桑黄发酵培养具有广阔的前景,韩国已有桑黄的人工栽培和批量生产,但国内对桑黄液态培养相关研究并不充分,也未成规模,且仅集中在液体发酵过程中碳、氮源等的筛选等方面^[15-16]及理化因子的选择上^[17]。因此,本研究通过对菌丝体发酵培养基的优化以期对桑黄液体深层培养和进一步应用提供参考。

1 试验材料及设备

1.1 菌种及试验材料

菌种为桑黄,由实验室保存。试剂为葡萄糖、蔗糖、乳糖、牛肉膏、蛋白胨、淀粉、氯化铵、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸锌。以上试剂均为分析纯,购自华东医药试剂公司。

1.2 仪器及设备

UV-1780 紫外分光光度计,日本岛津;TD4K-2 离心机,湖南湘仪集团;SHA-C 数显水浴恒温振荡器,上海福玛试验设备有限公司;DF-101B 集热式恒温搅拌器,金坛市国王试验仪器厂;SPX-250B-Z 型生化培养箱,上海福玛试验设备有限公司;QYC-211 全温空气摇床,上海福玛试验设备有限公司;LDZX-40B1 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;ZY-TP 电子天平,浙江凯丰集团有限公司;MP511pH 计,上海精密仪器仪表有限公司。

2 试验方法

2.1 培养基

2.1.1 PDA 种子培养基

称取 200 g 马铃薯煮沸 30 min 后,滤液加入葡萄糖 20 g,定容至 1 L,分装 30 mL 于 250 mL 三角瓶中,121 °C 灭菌 20 min,冷却至室温备用。

2.1.2 碳源筛选培养基

碳源筛选培养基各成分的质量浓度: KH_2PO_4 0.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 NaCl 1.0 g/L、酵母粉 10 g/L,分别添加乳糖、淀粉、蔗糖至 30 g/L,pH 值自然,分装 50 mL 于 250 mL 三角瓶中,121 °C 灭菌 20 min,冷却至室温备用。

2.1.3 氮源筛选培养基

氮源筛选培养基各成分的质量浓度: KH_2PO_4 0.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 NaCl 1.0 g/L、蔗糖 30 g/L,分别添加尿素、牛肉膏、蛋白胨和 NH_4Cl 至 10 g/L,pH 值自然,分装 50 mL 于 250 mL 的三角瓶,121 °C 灭菌 20 min,冷却至室温备用。

2.2 发酵条件

2.2.1 种子发酵条件

接种桑黄菌丝体于种子培养基,于 28 ℃、150 r/min 条件下培养 24 h。

2.2.2 液体发酵培养条件

用无菌枪头移取 2 mL 种子液,接种于液体深层发酵培养基,并于 28 ℃、150 r/min 条件下培养 7 d。

2.3 检测方法

2.3.1 桑黄生物量测定

发酵结束后以 4 000 r/min 离心 20 min,再用无菌水洗涤 2 次后,60 ℃烘干至恒重并称重。

2.3.2 糖含量测定

还原糖含量采用 DNS 试剂法测定;总糖含量采用苯酚-硫酸法测定^[16];多糖以两者差值计算。

2.4 试验设计

2.4.1 正交试验设计

在获得碳、氮源试验结果的基础上,结合预试验和部分参考文献^[11-14],以碳氮质量比、MgSO₄、KH₂PO₄ 和 NaCl 质量浓度为因素,分别设定为因素 A、B、C、D,设计 4 因素 3 水平正交试验,优化发酵过程中培养基组成,试验设计因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	A 碳氮质量比	B MgSO ₄ /(g·L ⁻¹)	C KH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)	D NaCl/(g·L ⁻¹)
1	10 : 10	0.5	0.5	0.0
2	40 : 10	1.5	1.0	1.0
3	70 : 10	2.5	1.5	2.0

2.4.2 生长过程分析

配制优化后的培养基各成分质量浓度:蔗糖 70 g/L,NH₄Cl 10 g/L,KH₂PO₄ 0.5 g/L,MgSO₄ 0.5 g/L,NaCl 1 g/L,pH 值自然,250 mL 三角瓶装液量 50 mL,121 ℃灭菌 20 min,冷却后以 5%接种量接种,28 ℃、150 r/min 条件下培养,每培养 24 h 取 3 瓶测定菌丝体质量,结果取 3 组平均值,共发酵 8 d。发酵液 pH 值用 pH 计测定。

3 试验结果与分析

3.1 标准曲线

采用 DNS 法测定还原糖含量,得出标准曲线方程为 $y=0.306\ 67x-0.016\ 48(R^2=0.993\ 9)$,还原糖标准曲线如图 1 所示。采用苯酚-硫酸法检测,以葡萄糖作为标准曲线,得出标准曲线方程为 $y=0.607\ 08x-0.029\ 08(R^2=0.992\ 3)$,总糖标准曲线如图 2 所示。

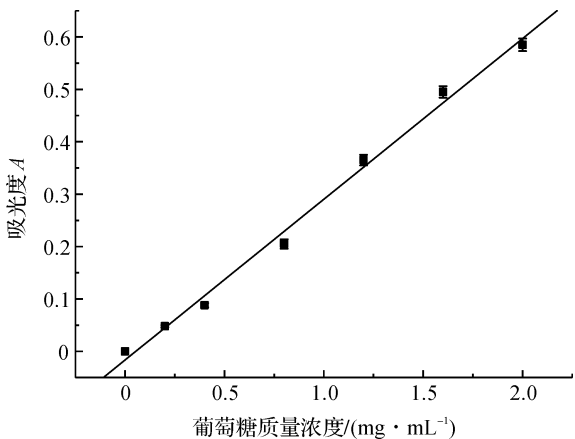


图 1 DNS 法测定还原糖标准曲线
Fig. 1 Standard curve of reducing sugar analysis by DNS method

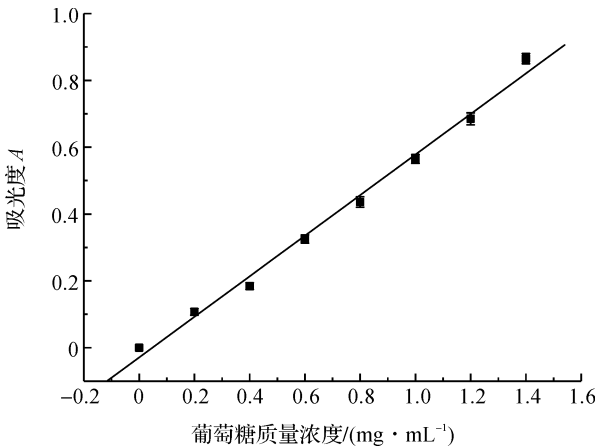


图 2 苯酚-硫酸法测定总糖标准曲线
Fig. 2 Standard curve of total sugar analysis by phenol-sulphate acid method

3.2 培养基的优化

以蔗糖、淀粉、乳糖等为碳源,考察不同碳源对桑黄菌丝体生长的影响,结果如表 2 所示。由表 2 可知,最适合桑黄生长的碳源是蔗糖。

以尿素、牛肉膏、NH₄Cl、蛋白胨为氮源进行优化,菌丝体干质量最大的为 NH₄Cl,结果如表 3 所示。

表 2 不同碳源对桑黄菌丝干质量的影响

Table 2 Effects of carbon sources on growth of *Phellinus linteus*

碳源	菌丝干质量/g
蔗糖	0.510
淀粉	0.210
乳糖	0.085

表 3 不同氮源对桑黄干质量的影响

Table 3 Effects of nitrogen sources on growth of *Phellinus linteus*

氮源种类	菌丝干质量/g
尿素	0.200
牛肉膏	0.680
NH ₄ Cl	0.805
蛋白胨	0.565

在对碳、氮源的筛选研究中,有采用玉米粉、黄豆粉^[18]作为碳、氮源,以及采用玉米粉和麦麸作为碳源,蛋白胨作为氮源进行优化的研究^[19],得到了较好的结果,后续可结合天然有机碳源和氮源进行研究。

3.3 合成培养基筛选

正交试验是在碳、氮源筛选的基础上,结合桑黄液体发酵适宜的碳氮质量比(A)、MgSO₄(B)、KH₂PO₄(C)、NaCl(D)做因素水平设计,得到最适合桑黄生长的培养基,结果如表 4 所示。

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal tests

序号	A	B	C	D	菌丝体干质量/g
1	10 : 10	0.5	0.5	0.0	0.37
2	10 : 10	1.5	1.0	1.0	0.59
3	10 : 10	2.5	1.5	2.0	0.26
4	40 : 10	0.5	1.0	2.0	0.75
5	40 : 10	1.5	1.5	0.0	0.69
6	40 : 10	2.5	0.5	1.0	1.15
7	70 : 10	0.5	1.5	1.0	2.77
8	70 : 10	1.5	0.5	2.0	2.58
9	70 : 10	2.5	1.0	0.0	2.40
K ₁	1.23	3.89	4.10	3.64	
K ₂	2.60	3.86	3.75	4.51	
K ₃	7.75	3.82	3.72	3.42	
k ₁	0.41	1.30	1.37	1.21	
k ₂	0.87	1.29	1.25	1.50	
k ₃	2.58	1.27	1.24	1.14	
极差值	2.14	0.02	0.13	0.36	
主次顺序	A ₃ D ₂ C ₁ B ₁				

由正交试验结果可知,蔗糖 70 g、NH₄Cl 10 g(碳氮质量比 70 : 10),NaCl、KH₂PO₄、MgSO₄ 质量浓度分别为 1、0.5、0.5 g/L 时,对桑黄菌丝体生长最有利,在此条件下进行发酵试验,得到菌丝体干质量为 2.814 g。

发酵液以 4 000 r/min 离心 20 min 得到菌丝体,再加蒸馏水洗涤 2 次后于 60 ℃烘干,加 20 倍水研磨后浸提,离心取上清液用苯酚-硫酸法测总糖,还原糖用 DNS 法测定(表 5)。

表 5 正交试验桑黄菌丝体中的糖含量

Table 5 Orthogonal results of polysaccharide concentrations in mycelial biomass %

序号	还原糖含量	总糖含量	多糖含量
1	0.369	11.34	10.971
2	0.195	10.30	10.105
3	0.357	6.49	6.133
4	0.374	7.89	7.516
5	0.493	10.40	9.907
6	0.441	10.30	9.859
7	0.812	13.72	12.908
8	0.728	13.20	12.472
9	0.728	10.20	9.472

由试验结果可知,正交试验中第 7 组总糖含量最高,还原糖含量也最高,两者之差即菌丝体多糖含量也最高,与菌丝体干质量含量结果一致;其次为第 8 组。这说明还原糖含量增加有利于桑黄菌丝体多糖的积累。该方法以总糖与还原糖含量之差进行多糖含量计算,可以初步反映多糖的含量,因此有必要用寡糖含量、对标药典等检测方法作深入研究。

3.4 桑黄的生长周期试验

将桑黄菌以 5%接种到深层发酵培养基中连续培养,从第 24 h 开始测定其在培养 192 h 过程中的 pH 值和菌丝干质量变化,由图 3 可知桑黄在 120 h 时菌丝干质量达到最大值,pH 值在培养 120 h 前呈下降的趋势,之后基本上趋于稳定(图 4)。

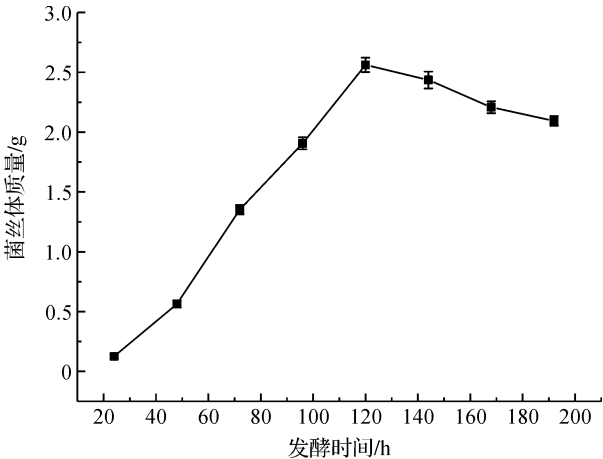


图 3 桑黄菌丝体含量随发酵时间的变化

Fig. 3 Change of *Phellinus ligniarius* mycelium growth with time of fermentation

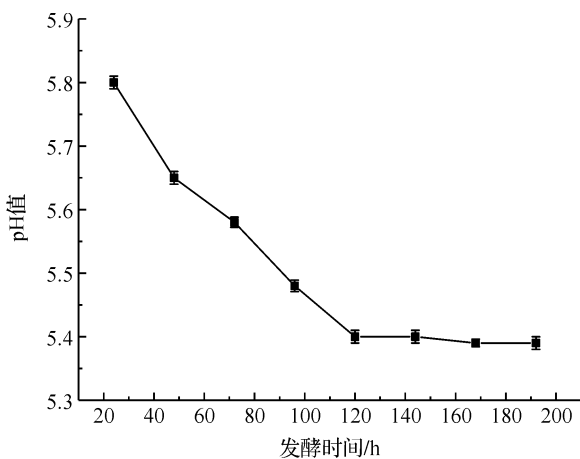


图 4 pH 值在桑黄培养过程中的变化

Fig. 4 Change of pH value in *Phellinus ligniarius* culture medium during fermentation

4 结 论

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)的深层发酵碳源和氮源进行了初步筛选。结果表明,最适合桑黄生长的碳源和氮源分别是蔗糖和 NH₄Cl,在此基础上对桑黄发酵影响的培养基成分进行了三水平四因素正交试验,进一步表明,较优的培养基质量浓度为蔗糖 70 g/L、NH₄Cl 10 g/L、NaCl 1 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L,在此培养基下,接种量 5%,装液量 50 mL,培养 7 d 得到桑黄菌丝体 2.814 g。发酵进程试验表明,桑黄菌丝体生成量呈现上升趋势,在 120 h 达到最高,随后呈逐渐下降的趋势;发酵液 pH 值呈逐渐下降的趋势,发酵 120 h 时基本趋于稳定。

参考文献:

[1] HSIEH P W, WU J B, WU Y C. Chemistry and biology of *Phellinus linteus*[J]. BioMedicine, 2013,3(3):106.

- [2] 张林芳,邹莉. 桑黄多糖的研究进展[J]. 中国食用菌,2012,31(4):1.
- [3] WANG Y, YU J X, ZHANG C L, et al. Influence of flavonoids from *Phellinus ligniarius* on sturgeon caviar: antioxidant effects and sensory characteristics[J]. Food Chemistry, 2012,131(1):206.
- [4] LUNG M Y, TSAI J C, HUANG P C. Antioxidant properties of edible basidiomycete *Phellinus ligniarius* in submerged cultures[J]. Journal of Food Science, 2010,75(1):18.
- [5] ZHU T, KIM S H, CHEN C Y. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*[J]. Current Medicinal Chemistry, 2008, 15(13):1330.
- [6] REIS F S, BARREIRA J C M, CALHELHA R C, et al. Chemical characterization of the medicinal mushroom *Phellinus linteus*, (Berkeley & Curtis) Teng and contribution of different fractions to its bioactivity[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014,58(2):478.
- [7] 张文隽,吴亚召,雷萍,等. 秦巴山区野生桑黄 rDNA ITS 序列及亲缘关系分析[J]. 中国食用菌,2015,34(1):50.
- [8] SONG Y S, KIM S H, SA J H, et al. Antiangiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003,88(1):113.
- [9] LI G, KIM D H, KIM T D, et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells[J]. Cancer Letters, 2004,216(2):175.
- [10] SHONE M Y, KIM T H, SUNG N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts[J]. Food Chemistry, 2003,82(4):593.
- [11] 许谦. 桑黄菌丝体黄酮液体发酵培养基的优化[J]. 食品与机械,2015,31(1):190.
- [12] 丁兴红,温成平,丁志山,等. 桑黄液体发酵生产多糖工艺研究[J]. 中草药,2012,43(5):906.
- [13] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(5):350.
- [14] 张文隽,吴亚召,雷萍,等. 桑黄黄酮液体发酵培养条件的优化[J]. 中国食用菌,2017,36(2):52.
- [15] 邵倩,杨焱. 桑黄菌丝体研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(B12):135.
- [16] RAMOS M, BELTRÁN A, PELTZER M, et al. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014,58(2):470.
- [17] 宋红志,王方芹,王俊,等. 桑黄菌丝体的液体发酵培养及多糖提取和抗氧化活性测定[J]. 蚕业科学,2016,42(4):700.
- [18] 傅海庆,周阳,傅华英. 药用真菌桑黄的液体发酵培养基的配方优化筛选研究[J]. 江西农业大学学报,2012,34(5):1039.
- [19] 许谦. 生产桑黄三萜类化合物液体发酵培养基的优化[J]. 中药材,2016,39(12):2836.