

药用真菌桑黄的液体发酵 培养基的配方优化筛选研究

傅海庆¹, 周 阳¹, 傅华英²

(1. 福建农林大学 金山学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 作物学院, 福建 福州 350002)

摘要:为探索名贵药用真菌桑黄摇瓶发酵培养基较优配方,在探索到不同碳源、氮源、无机盐种类和不同浓度单因素试验结果的基础上,分别选取玉米粉、黄豆粉、氯化钾作三因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交摇瓶培养试验。摇瓶发酵置于摇瓶转速 135 r/min, 28 °C 温度下培养 9 d,以桑黄菌丝体干质量为检测指标进行发酵培养基配方的优化筛选。初步获得桑黄摇瓶发酵培养基较优配方:玉米粉 30 g/L,黄豆粉 10 g/L,氯化钾 2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, $MgSO_4$ 2 g/L, VB_1 0.1 g/L,使桑黄菌在摇瓶发酵培养条件下其菌丝体干质量可达 2.23 g/100 mL。初步获得桑黄摇瓶发酵培养基较优配方,为进一步的桑黄菌摇瓶发酵工艺研究奠定一定的基础。

关键词:桑黄; 发酵培养基; 优化筛选

中图分类号:Q93-335 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-1039-04

Optimal Screening of Medium Formula for Liquid Fermentation Culture of Medicinal Fungus *Phellinus igniarius*

FU Hai-qing¹, ZHOU Yang¹, FU Hua-ying²

(1. Jinshan College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The current study aims to explore a favorable formula for the shaking flask fermentation culture of the valuable medicinal fungus *Phellinus igniarius*. Based on the single factor test results of different concentrations and different carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts using corn flour, soybean flour and KCl the $L_9(3^4)$ orthogonal shaking-flask culture of three factors and three levels was carried out at the speed of 135 r/min, with a period of 9 days at the temperature of 28 °C. The fermentation medium optimization was based on the mycelium dry weight for the detection formula. A favorable formula for the shaking flask fermentation culture was obtained preliminarily, which contained corn powder 30 g/L, soybean powder 10 g/L, KCl 2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, $MgSO_4$ 2 g/L, VB_1 0.1 g/L, and *Phellinus igniarius* mycelium dry weight was up to 2.23 g/100mL in the shaking flask fermentation culture condition. A favorable formula for the shaking flask fermentation culture of *Phellinus igniarius* was obtained preliminarily, which laid a foundation for further research of *Phellinus igniarius* in shaking flask fermentation condition.

Key words: *Phellinus igniarius*; fermentation medium; optimal screening

收稿日期:2012-03-10 修回日期:2012-05-25

基金项目:福建省教育厅 A 类项目(JA12378)和福建农林大学青年基金资助项目(2009057)

作者简介:傅海庆(1973—),男,讲师,硕士,主要从事食品科学研究, E-mail: fhaiqing@163.com。

桑黄(*Phellinus igniarius*)是一种珍贵的药用真菌,也是目前国际公认的抗肿瘤效果最好的药用真菌之一^[1-3]。它含有多糖、黄酮、麦角甾醇、香豆素、多肽等多种药理成分,其中的多糖具有提高免疫力、抗癌、抗肿瘤、抗肝纤维化、抗菌、抗诱变、降低血糖等多方面功能^[4-13]。因此,桑黄已经成为国内外保健品行业与医药制剂研究与开发的热点之一,市场前景非常广阔^[14-15]。但是,我国桑黄野生资源匮乏,采用固料栽培的方法不仅产量低,而且生长期很长,这些严重制约了桑黄产业的发展。所以对于桑黄菌液体发酵的研究,使其获得大量的菌丝体具有十分重要的意义。本文探讨了桑黄菌液体发酵的培养基配方优化筛选,为进一步研究桑黄液体发酵工艺提供有益试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 桑黄菌种由福建省食用菌种质资源保藏管理中心提供,编号为 ph. I0001。

1.1.2 原料 黄豆、土豆、玉米粉,均从普通市场购得。

1.1.3 主要试剂 酵母提取粉、蛋白胨、牛肉膏、可溶性淀粉、葡萄糖、琼脂为生化试剂,维生素 B₁ 为医药品,其它试剂均为分析纯。

1.1.4 供试培养基 斜面培养基用马铃薯琼脂培养基(PDA);摇瓶液体种子培养基配方(g/L):玉米粉 40、黄豆粉 20、KH₂PO₄ 4、MgSO₄ 2、VB₁ 0.1、pH 自然。

1.1.5 主要仪器设备 立式压力蒸汽灭菌器、LP1002B 电子天平、净化工作台、可调速旋转式摇床、生物显微镜、DHG-9240A 型恒温鼓风干燥箱等。

1.2 方法

1.2.1 菌种培养 (1) 菌种的固体斜面培养:将桑黄菌种接种在固体斜面马铃薯培养基(PDA)上,置于 28 ℃ 培养箱中培养至菌丝长满斜面为止,冷藏备用。

(2) 摇瓶液体种子培养液培养:在 250 mL 三角瓶中装量 100 mL 培养液,一级种子接入约 1.5 cm² 的斜面菌种 2 块,二级发酵是按体积分数为 10% 接种量接入种子培养液,在 28 ℃ 温度下以转速 135 r/min 旋转式摇床培养 5 d 而得。

1.2.2 单因素试验设计及试验方法 (1) 液体发酵碳源的试验。碳源试验中选择了葡萄糖、蔗糖、果糖、可溶性淀粉、玉米粉等 5 种常见的原料作为碳源,分别替换液体种子培养基中的玉米粉,并按 20 g/L 加入量组成新配方进行培养试验,研究不同碳源对桑黄菌丝体生长的影响,从而可筛选出适合桑黄菌生长的最佳碳源。并进一步针对最佳碳源,选取其加入浓度分别为 5、10、15、20、30、40 g/L 组成配方进行试验,培养 5 d 后分别测定所获桑黄菌丝体的干质量,筛选出最适浓度。

(2) 液体发酵氮源的试验。氮源试验选择了硫酸铵、酵母提取粉、蛋白胨、牛肉膏、黄豆粉等 5 种常见的原料作为氮源,分别替换液体种子培养基中的黄豆粉,并按 20 g/L 加入量组成新配方进行培养试验,研究不同氮源对桑黄菌丝体生长的影响,从而可筛选出适合桑黄菌生长的最佳氮源。并进一步针对最佳氮源,选取其加入浓度分别为 5、10、15、20、30、40 g/L 组成配方进行试验,培养 5 d 后分别测定所获桑黄菌丝体干质量,筛选出最适浓度。

(3) 液体发酵无机盐的试验。药用菌的生长发育还需要适量的矿物质元素,这些矿物质元素参与细胞结构物质的组成、酶的组成、调节细胞渗透压等。本试验选择了 5 种不同无机盐,即 NaCl、CaCl₂、KCl、Na₂CO₃、Ca(NO₃)₂,分别按 2.0 g/L 添加到摇瓶液体种子培养基中形成不同的配方进行培养试验,考察不同无机盐对桑黄菌丝体生长的影响。并进一步针对最佳无机盐,选取其加入浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 g/L 组成配方进行试验,培养 5 d 后分别测定所获桑黄菌丝体干质量,筛选出最适浓度。

1.2.3 多因素试验设计和试验方法 在单因素试验的基础上,分别选取玉米粉作为碳源、黄豆粉作为氮源、氯化钾作为无机盐作三因素三水平的 L₉(3⁴) 正交试验,以分别添加 KH₂PO₄ 4.0 g/L、MgSO₄ 2.0 g/L、VB₁ 0.1 g/L 为固定因子。共 9 个组合,以菌丝体干质量为目标,培养 7 d 后测定菌丝体干质量,以确定各因素对桑黄菌丝体干质量的影响,优化筛选桑黄摇瓶发酵培养基的较优配方。

1.2.4 菌丝干质量的测定方法 用 20 目的标准检验筛过滤菌丝,并用清水洗涤 2~3 次,放于 60 ℃ 恒温干燥箱中烘干,称量其干质量,计算公式如下:

$$\text{菌丝干质量}(g/100\text{ mL}) = \text{菌丝体干质量}(g) \div \text{发酵液体积}(\text{mL}) \times 100 \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同碳源种类及浓度对桑黄菌丝产量的影响 经实验测得各碳源对应的菌丝产量如图1所示,可以看出不同的碳源种类获得的菌丝产量是不同的,以玉米粉为碳源时获得的菌丝产量最高,桑黄菌丝体干质量为0.78 g/100 mL,因此确定它为最佳碳源。

进一步以玉米粉做梯度试验结果如图2所示。结果表明,培养基中添加玉米粉质量浓度为5~30 g/L时,菌丝体干质量呈上升趋势;当添加质量浓度大于30 g/L时,菌丝体干质量开始下降;故添加质量浓度为30 g/L时其菌丝体产量最大,为0.67 g/100 mL。因此,确定玉米粉的最佳添加量为30 g/L。

2.1.2 不同氮源种类及浓度对桑黄菌丝产量的影响 经实验测得各氮源对应的菌丝产量如图3所示。可以看出不同的氮源得到的菌丝体产量也不同,使用酵母提取粉和黄豆粉所获得的菌丝体产量较大,两者并无显著差异,若是大批量生产,可考虑使用黄豆粉更经济。因此,可选择黄豆粉为最佳氮源。

进一步以黄豆粉做梯度试验结果如图4所示。当培养基中黄豆粉添加量为5~15 g/L时,桑黄菌丝体干质量呈上升趋势;当添加量大于15 g/L时,其干质量开始下降;故添加量为15 g/L时,获得菌丝体干质量最大,为0.34 g/L。因此,确定黄豆粉的添加量应为15 g/L。

2.1.3 不同无机盐种类及浓度对桑黄菌丝产量的影响 经实验测得各无机盐对应的菌丝产量如图5所示。添加不同的无机盐所得到的菌丝干质量是不同的,其中以添加氯化钾所得到的干菌丝产量最高。

进一步以氯化钾作浓度梯度试验结果如图6所示。由图6可知,

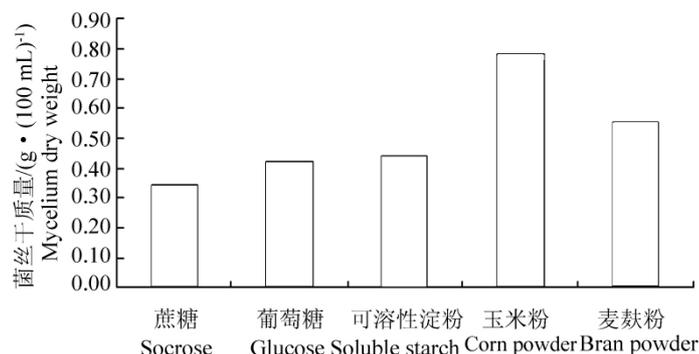


图1 不同碳源对菌丝干质量的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on the mycelium dry weight

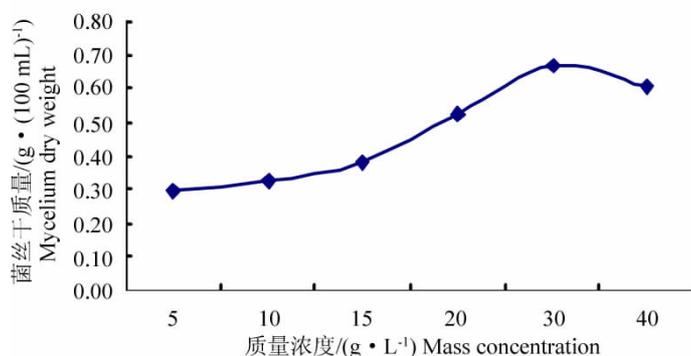


图2 玉米粉对菌丝干质量的影响

Fig. 2 Effect of corn flour on the mycelium dry weight

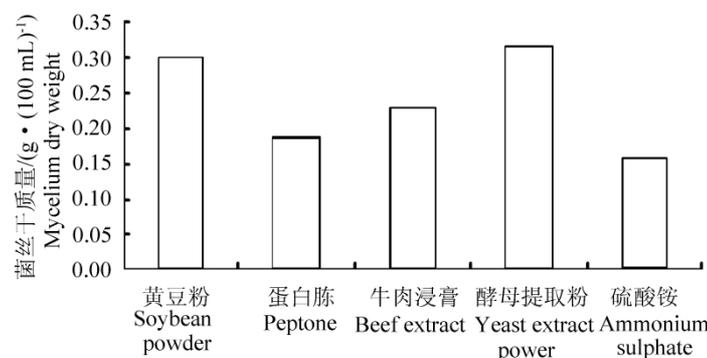


图3 不同氮源对菌丝干质量的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen source on the mycelium dry weight

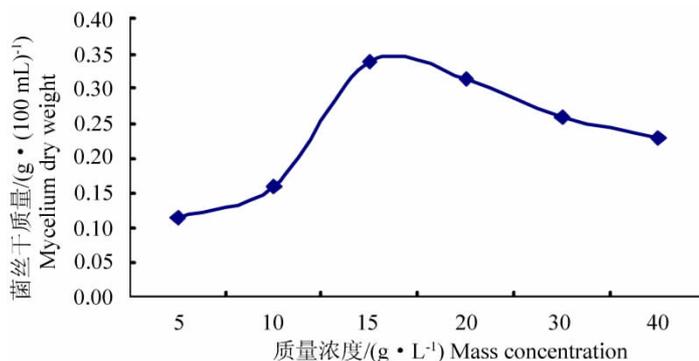


图4 黄豆粉对菌丝干质量的影响

Fig. 4 Effect of soybean powder on the mycelium dry weight

当培养基中氯化钾添加量为 1 ~ 2 g/L 时, 桑黄菌丝体干质量呈上升趋势; 当添加量大于 2 g/L 时, 其干质量开始下降; 故添加量为 2 g/L 时获得菌丝体干质量最大, 为 0.29 g/L。因此, 确定氯化钾的添加量应为 2 g/L。

2.2 多因素的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
多因素的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果见表 1。

根据表 1 的试验结果进行极差分析表明: 试验与理论较优组合均为 $A_2B_1C_2$ 即玉米粉 30 g/L, 黄豆粉 10 g/L, 氯化钾 2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, $MgSO_4$ 2 g/L, VB_1 0.1 g/L, 该组合恰好为第 4 号试验号的组合, 使桑黄菌在摇瓶发酵培养条件下其菌丝体干质量可达 2.23 g/100mL。

3 讨论

本试验仅对桑黄摇瓶发酵培养基配方中碳源、氮源和无机盐种类及浓度进行优化筛选, 初步获得了较优发酵培养配方, 即玉米粉 30 g/L,

黄豆粉 10 g/L, 氯化钾 2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, $MgSO_4$ 2 g/L, VB_1 0.1 g/L, 使桑黄菌在摇瓶发酵培养条件下其菌丝体干质量可达 2.23 g/100 mL。为进一步探索桑黄的摇瓶发酵工艺条件提供了较有价值的试验数据。采用筛选到较优发酵培养基配方, 分别进行不同起始 pH 值、不同摇瓶装量、不同接种量、不同温度、不同摇瓶转速和不同发酵周期等发酵条件的优化筛选有待进一步深入研究。

表 1 多因素的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab.1 The results of multi factor $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号 Test number	因素 Factors				试验指标 Test index
	A(玉米粉) (Corn powder)	B(黄豆粉) (Soybean powder)	C(KCl)	D	菌丝干质量(g/100mL) Mycelium dry weight
1	1(20)	1(10)	1(1)	1	1.09
2	1(20)	2(15)	2(2)	2	0.64
3	1(20)	3(20)	3(3)	3	1.08
4	2(30)	1(10)	2(2)	3	2.23
5	2(30)	2(15)	3(3)	1	1.37
6	2(30)	3(20)	1(1)	2	0.86
7	3(40)	1(10)	3(2)	2	0.91
8	3(40)	2(15)	1(1)	3	1.01
9	3(40)	3(20)	2(2)	1	0.77
\bar{K}_1	0.94	1.41	0.99		试验较优组合为 $A_2B_1C_2$, 即 4 号试验处理组合; 理论较优组合为 $A_2B_1C_2$ 。
\bar{K}_2	1.49	1.01	1.21		
\bar{K}_3	0.90	0.90	1.12		
R	0.59	0.51	0.22		供试三因素主次顺序 A > B > C

(下转第 1048 页)

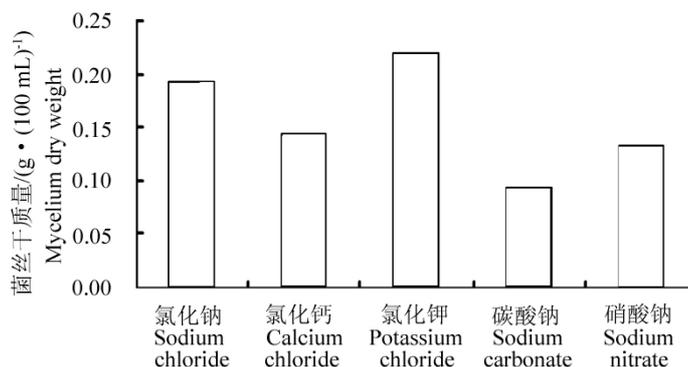


图 5 无机盐对菌丝干质量的影响

Fig.5 Effect of inorganic salt on the mycelium dry weight

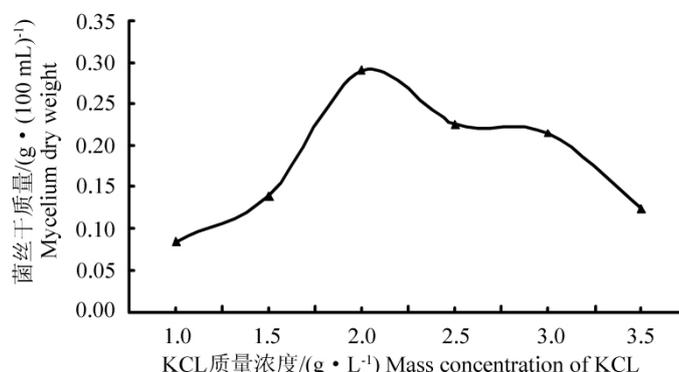


图 6 不同 KCl 质量浓度对菌丝干质量的影响

Fig.6 Effect of KCl on the mycelium dry weight

灵芝大豆固态发酵培养较优组合条件: 大豆固体培养基接种灵芝富集液体种子液, 接种量 10.53%、发酵温度 29.34 ℃, 发酵时间 6.68 d 后, 发酵大豆中的游离氨基酸可达 280.56 mg/100 g, 与优化前的游离氨基酸含量 169.55 mg/100 g 相比提高了 64.64%; 发酵大豆中有机硒的含量可达 0.036%, 与优化前相比提高了 1.1 倍。

参考文献:

- [1]牛丽颖, 石玉娥, 刘振国, 等. 人工富硒灵芝菌丝中微量元素及氨基酸含量分析[J]. 中国食用菌, 1998, 17(6): 31-32.
- [2]杨洋, 吴小勇, 张湛, 等. 富硒灵芝发酵培养工艺及产物抗氧化能力研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1349-1353.
- [3]John Weldon Finley. Increased intakes of selenium-enriched foods may benefit human health[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(10): 1620-1629.
- [4]李丽辉, 林亲录, 陈海军. 硒的生理学功能及富硒强化食品的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(3): 198-200.
- [5]Conor Reilly. Selenium: a new entrant into the functional food arena[J]. Trend in Food Science & Technology, 1998(9): 114-118.
- [6]沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 215.
- [7]魏赛金, 付学琴, 李昆太, 等. 灵芝菌丝体大豆固态发酵条件优化[J]. 广东农业科学, 2009(10): 122-124.
- [8]胡志斌, 甘泉, 魏赛金. 灵芝液体发酵富集硒元素研究[J]. 中国酿造, 2010, 217(4): 36-38.
- [9]魏赛金, 程新, 涂国全, 等. 灵芝发酵液发酵生产灵芝多糖醇工艺的初探[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(4): 746-749.
- [10]朱强, 夏艳秋, 汪志君, 等. 响应面法优化灵芝药性固体发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(9): 75-79.
- [11]Bezerra M A, Santelli R E, Escalera L A, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008(76): 965-977.
- [12]魏赛金, 付学琴, 涂国全, 等. 固态发酵产游离氨基酸的条件优化研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(32): 10202-10203.
- [13]宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 155-175.

(上接第 1042 页)

参考文献:

- [1]郭忠军. 桑黄液体发酵培养液初步研究[J]. 黑龙江医药, 2005, 18(3): 198-199.
- [2]刘正南, 郑淑芬. 中国药用真菌的现状和种植资源[J]. 中国食用菌, 1996, 17(6): 22-24.
- [3]傅海庆, 陈绍军, 陈汉清, 等. 桑黄口服液对小鼠免疫功能的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 538-541.
- [4]宋力, 孔培龙, 郭彬彬, 等. 桑黄的研究进展[J]. 中国食用菌, 2005(3): 24.
- [5]李翠翠, 尉玉晓, 郭立忠. 桑黄液体发酵培养基优化的初步研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(2): 46-48.
- [6]傅海庆. 桑黄多糖的研究进展[J]. 包装与食品机械, 2008, 26(5): 32-36.
- [7]秦俊哲, 姚艳芳. 桑黄菌丝的最适培养条件研究[J]. 食用菌, 2007, 29(1): 6-9.
- [8]胡文彬, 马海乐, 周存山. 桑黄菌液体发酵培养基及发酵条件研究[J]. 中国食用菌, 2006(3): 49-51.
- [9]李朔, 丁一新, 徐霖. 桑黄胞内多糖液体发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2006(11): 236-240.
- [10]戴玉成. 药用担子菌: 鲍氏层孔菌(桑黄)的新认识[J]. 中草药, 2003, 34(1): 94-95.
- [11]刘春辉, 陈体强, 林跃鑫. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 菌物研究, 2004, 2(2): 53-59.
- [12]莫顺燕, 杨永春, 石建功. 桑黄化学成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1095-1097.
- [13]莫顺燕, 杨永春, 石建功. 桑黄化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 28(4): 339-341.
- [14]吕英华, 王建芳, 李玉平, 等. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 蚕业科学, 2009, 35(1): 204-210.
- [15]齐欣, 张峻, 陈颖. 珍稀真菌桑黄的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5): 172-174.