

桑黄菌丝体黄酮液体发酵培养基的优化

Optimization of liquid culture medium for fermenting mycelial flavone in *Phellinus igniarius*

许 谦

XU Qian

(菏泽学院生命科学系, 山东 菏泽 274015)

(Department of Life Science, Heze University, Heze, Shandong 274015, China)

摘要:桑黄是一种珍稀药用真菌,其黄酮可入药。为优化桑黄黄酮发酵的液体培养基,以菌丝体黄酮产量为指标,通过正交试验,对桑黄液体培养基进行优化。研究结果显示黄酮高产培养基最优条件:玉米粉3%+麸皮7%,蛋白胨2.0%, KH_2PO_4 0.10%, MgSO_4 0.15%,菌丝体黄酮产量为212.35 mg/L。

关键词:桑黄;菌丝体;黄酮;液体培养基

Abstract: Objective *Phellinus igniarius* is a kind of rare medicinal fungi, its flavone can be used as medicine. This research was to optimize liquid culture medium for flavone fermentation. Methods Taking the mycelia flavone yield of *Phellinus igniarius* as index, the liquid culture medium was optimized with $L_9(3^4)$ orthogonal test. Results The optimal medium for high flavone yield established was $A_3B_3C_2D_2$: corn flour 3% + wheat bran 7%, peptone 2%, KH_2PO_4 0.10%, MgSO_4 0.15%, mycelia flavone yield of *Phellinus igniarius* was 212.35 mg/L. Conclusion Liquid culture medium optimized will have certain significance for guiding flavone's industrialized production.

Keywords: *Phellinus igniarius*; mycelia; flavone; liquid culture medium

桑黄是一种珍稀药用真菌,属于多孔菌科,针层孔菌属,具有抗菌、抗癌、抗氧化等药用功效^[1]。民间用以治疗淋病、崩漏带下、症瘕积聚、癥饮及脾虚泄泻等^[2,3]。桑黄含有多糖、黄酮、三萜等多种活性成分^[4,5],其黄酮具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂、抗衰老等功能^[6,7]。对桑黄黄酮的研究以往大部分集中在子实体黄酮的提取和分离^[8-10],对液体培养生产桑黄菌丝体黄酮的研究报道较少^[11,12]。自然条件下桑黄子实体的获得需要几十年的时间,而适宜条件下液体培养桑黄

菌丝体只需十几天时间。雷萍等^[13]研究表明,桑黄菌丝体黄酮含量比子实体还要高。所以利用液体培养基,可以高效生产桑黄菌丝体黄酮^[14]。

天然黄酮化合物泛指两个具有酚羟基的苯环通过中央三碳原子相互连接而成的一系列化合物,其基本母核为2-苯基色原酮,结构中常连有酚羟基、甲氧基、甲基、异戊烯基等官能团,常与糖类结合成苷,且因糖的种类、数量、联接位置及方式不同组成各种类型。本研究在前期单因素试验过程中,考虑到黄酮组成成分的多样性,及桑黄菌丝体生长对营养物质的需求,利用营养丰富、成本较低的基质做单因素试验,确定了单因素试验最佳参数。本研究拟在此基础上对生产菌丝体黄酮的液体培养基进行正交试验优化,以克服前人^[12]研究中成本较高、黄酮产量较低的问题,为桑黄黄酮工业化生产提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

桑黄(PH001):由华中农业大学提供;
马铃薯、麸皮、玉米粉:山东菏泽牡丹区生产;
 KH_2PO_4 、葡萄糖:AR级,西陇化工股份有限公司;
 MgSO_4 :AR级,天津凯通化学试剂有限公司;
 AlCl_3 :AR级,天津市河东区红岩试剂厂;
无水乙醇:AR级,济南试剂总厂;
琼脂:BR级,天津科密欧化学试剂有限公司;
蛋白胨:BR级,北京奥博兴生物技术有限公司;
芦丁对照品:阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅:MLS-3780型,Tega SANYO Industry Co., Ltd;
双层全温振荡器:HZQ-Y型,哈尔滨市东联电子技术开

基金项目:菏泽市科技发展规划项目(编号:2012N002);菏泽学院科研基金科技计划项目(编号:xy10sw01)

作者简介:许谦(1971—),女,菏泽学院副教授,硕士。

E-mail: xq710301@163.com

收稿日期:2014-09-11

发有限公司；

电热鼓风干燥箱：101-2 型，北京市永光明医疗仪器厂；

电热恒温水浴锅：SY2-4 型，北京市医疗设备厂；

可见分光光度计：723N 型，上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

(1) PDA 培养基：去皮马铃薯 200 g，切成小块加蒸馏水 1 000 mL 煮沸 30 min，4 层纱布过滤，滤液中加葡萄糖 20 g 和琼脂 20 g，溶化后用蒸馏水补足至 1 000 mL，pH 自然。121 ℃ 灭菌 30 min，倒平板。

(2) 菌种活化：用打孔器($d=1$ cm)取长满菌丝的菌饼，每个平板接一个菌饼，28 ℃ 恒温箱内培养 15 d。

1.2.2 液体培养

(1) 液体培养基配制方法：玉米粉和麸皮加适量蒸馏水煮沸 30 min，4 层纱布过滤，加蛋白胨、 KH_2PO_4 和 MgSO_4 溶解后，定容，pH 自然，分装于 250 mL 三角烧瓶中，每瓶 150 mL，8 层纱布封口，121 ℃ 灭菌 30 min。

接种量为每瓶 2 块菌饼($d=1$ cm)，培养温度 28 ℃，摇床转速 160 r/min，液体培养时间 18 d。每种培养基 3 个重复。

(2) 液体培养基优化试验设计：根据前期预试验结果，进行正交试验，正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平	A 碳源	B 蛋白胨/ C KH_2PO_4 / D MgSO_4 /		
		%	%	%
1	玉米粉 2.0%+麸皮 8.0%	1.0	0.05	0.10
2	玉米粉 2.5%+麸皮 7.5%	1.5	0.10	0.15
3	玉米粉 3.0%+麸皮 7.0%	2.0	0.15	0.20

1.2.3 AlCl_3 比色法(427 nm)标准曲线绘制 参照文献[14]。准确称量 26 mg 芦丁置于 100 mL 容量瓶中，用 60% 乙醇溶解至刻度，分别移取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，分别添加 1% AlCl_3 稀释至刻度，摇匀静置 10 min，在 427 nm 处测定吸光度，以芦丁质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线(见图 1)。

1.2.4 菌丝体的黄酮产量测定 4 层纱布过滤培养液，蒸馏水洗 3 遍，得菌丝球，烘干至恒重，称重。

准确称取桑黄菌丝体(粉碎后过 60 目筛)0.5 g，加 60% 乙醇 15 mL 于 70 ℃ 提取 2 h，流水冷却，定容至 25 mL，过滤。取滤液 5 mL 于 10 mL 容量瓶中，添加 1% AlCl_3 稀释至刻度，摇匀静置 10 min，在 427 nm 处测定吸光度(做 3 个重复)。据回归方程算出黄酮含量。并按式(1)计算黄酮产量。

$$Y = \frac{C \times B}{1\ 000} \quad (1)$$

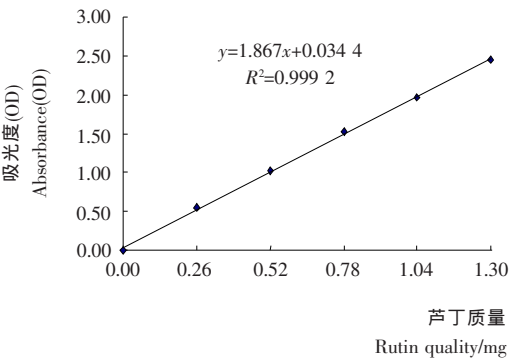


图 1 AlCl_3 比色法(427 nm)标准曲线

Figure 1 AlCl_3 colorimetry (427 nm) standard curve

式中：

Y——黄酮产量，mg/L；

C——黄酮含量，mg/g；

B——菌丝体生物量，mg/L。

2 结果与分析

2.1 正交试验计算结果

由表 2 可知，对菌丝体生物量的影响，4 种因素影响水平由高到低依次为 $D>C>A>B$ ，菌丝体生物量最高的为配方 6($A_2B_3C_1D_2$)，最低的为配方 5($A_2B_2C_3D_1$)，最优配方为 $A_3B_3C_2D_2$ ；对黄酮产量的影响，4 种因素影响水平由高到低依次为 $C>D>B>A$ ，黄酮产量最高的为配方 2($A_1B_2C_2D_2$)，最低的为配方 1($A_1B_1C_1D_1$)，最优配方为 $A_3B_3C_2D_2$ 。

2.2 培养基配方各因素对黄酮产量及菌丝体生物量的影响

由表 3 可知，液体培养基配方 4 个因素中，B、C、D 三因素对黄酮产量都有极显著影响，因素 A 对黄酮产量的影响不显著。

培养基配方各因素对黄酮产量影响的方差分析结果说明，因素 A(碳源)尽管保证了菌丝体合成黄酮时对各种糖的需求，但对黄酮的产生并没有造成显著影响，其他因素 B、C 和 D(蛋白胨、 KH_2PO_4 和 MgSO_4)对菌丝体黄酮产量均具有极显著的影响，所以，黄酮产量主要是由培养基中的蛋白胨、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 决定。造成这种结果原因有三：① 蛋白胨为菌体生长提供充足的氮素营养，保证了代谢物黄酮的产生；② KH_2PO_4 为菌体遗传物质的合成提供磷元素并且为协调菌体的正常生理功能提供钾元素；③ MgSO_4 促进了与黄酮合成有关酶的产生。

由表 4 可知，液体培养基配方 4 个因素中，A、C、D 三因素对菌丝体生物量都有极显著影响。B 因素对菌丝体生物量有显著影响。

培养基配方各因素对菌丝体生物量影响的方差分析结果说明，菌丝体生物量主要由培养基中的因素 A、C 和 D(碳源、 KH_2PO_4 、 MgSO_4)决定，因素 B(蛋白胨)对菌丝体的合成也起到显著的作用。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验计算结果[†]
Table 2 Calculation results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

配方	A 碳源	B 蛋白胨	C KH_2PO_4	D MgSO_4	菌丝体生物量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	黄酮产量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	1	1	1	1	11 836.00	66.50
2	1	2	2	2	18 812.33	201.23
3	1	3	3	3	16 029.33	170.11
4	2	1	2	3	22 415.11	190.38
5	2	2	3	1	11 281.33	68.96
6	2	3	1	2	22 503.00	154.37
7	3	1	3	2	20 225.67	145.92
8	3	2	1	3	18 897.55	130.34
9	3	3	2	1	18 702.89	195.23
菌丝体 生物量	k_1	15 559.22	18 158.93	17 745.52	13 940.07	
	k_2	18 733.15	16 330.41	19 976.78	20 513.67	
	k_3	19 275.37	19 078.41	15 845.44	19 114.00	
	R	3 716.15	2 748.00	4 131.33	6 573.59	
黄酮 产量	k_1	145.95	134.27	117.07	110.23	
	k_2	137.90	133.51	195.61	167.17	
	k_3	157.16	173.23	128.33	163.61	
	R	19.26	39.72	78.54	56.94	

[†] 菌丝体生物量及黄酮产量都是 3 个重复所得数据的平均值。

表 3 培养基配方各因素对黄酮产量影响的方差分析[†]
Table 3 Analysis of variance of orthogonality of medium formula factors' influence on flavone yield

差异源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
A	39.223 39	2	19.611 7	2.245 946	
B	206.557 9	2	103.279	11.827 58	* *
C	722.943 1	2	361.471 5	41.395 99	* *
D	406.108 5	2	203.054 3	23.253 92	* *
误差	157.176 8	18	8.732 043		

[†] $F_{0.05}(2,18) = 3.54, F_{0.01}(2,18) = 6.01$ 。

表 4 培养基配方各因素对菌丝体生物量影响的方差分析
Table 4 Analysis of variance of orthogonality of medium formula's influence on mycelium biomass

差异源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
A	1.631 986	2	0.815 993	8.227 381	* *
B	0.792 479	2	0.396 24	3.995 149	*
C	1.731 828	2	0.865 914	8.730 72	* *
D	4.855 997	2	2.427 998	24.480 69	* *
误差	1.785 243	18	0.099 18		

[†] $F_{0.05}(2,18) = 3.54, F_{0.01}(2,18) = 6.01$ 。

2.3 验证实验

由表5可知,利用最优配方(A₃B₃C₂D₂)、菌丝体生物量最高配方(A₂B₃C₁D₂)和黄酮产量最高配方(A₁B₂C₂D₂)进行液体培养后,最优配方获得的菌丝体生物量和黄酮产量最高,对三者进行方差分析,3种配方对菌丝体生物量和黄酮产量的影响差距显著。综合两项指标,A₃B₃C₂D₂为最优配方,即:玉米粉3%+麸皮7%,蛋白胨2.0%,KH₂PO₄0.10%,MgSO₄0.15%。用这个配方进行桑黄生产,可以同时获得菌丝体生物量高产及黄酮高产。

表5 验证实验结果

Table 5 Results of the verification test (n=3)
(mg·L⁻¹)

工艺组合	菌丝体生物量	黄酮产量
A ₃ B ₃ C ₂ D ₂	24 620.67	212.35
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	19 776.33	201.40
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	22 503.00	185.73

本试验菌丝体黄酮产量为212.35 mg/L,远远高于赵子高等^[11]试验所得(12.805 6 mg/100 mL)及刘凡等^[12]试验所得(186.75 mg/L)。造成这种差距可能有以下几个原因:①培养基成分差异造成了菌丝体黄酮产量的较高差异,其中文献[11]和[12]中没有用到的蛋白胨成分是主要原因,另外本试验中麦麸的添加也是一个不可忽视的因素;②较高转速有利于好氧型桑黄菌丝体的生长及菌丝体黄酮的生产,文献[11]和[12]中液体培养桑黄所用转速为150 r/min,本试验所用摇床转速为160 r/min;③较大的培养基装入量适宜于菌种活性的长时间维持,为提高菌丝体产量和黄酮产量提供了物质基础,提高了生产效率,文献[11]和[12]中液体培养桑黄所用培养基装入量为容器的2/5,本试验所用的液体培养基装入量为容器的3/5。

3 结论

本试验在前期单因素试验的基础上,利用正交设计确定液体培养基配方,研究各配方对菌丝体生物量及黄酮产量的影响,最终通过验证实验确定了优化的液体培养基配方为A₃B₃C₂D₂(玉米粉3%+麦麸7%,蛋白胨2.0%,KH₂PO₄0.10%,MgSO₄0.15%),菌丝体黄酮产量为212.35 mg/L,远远高于赵子高^[11]、刘凡^[12]等的试验结果。而且本试验直接将平板活化的菌种定量接种在液体培养基里进行正交分析试验,较文献[11]和[12]增加了试验定量的准确性,并简化了一次接种工作。

本试验结果表明,利用液体培养技术能够在较短时间内生产大量桑黄菌丝体及菌丝体黄酮,不受季节和环境的限制,可以大幅度降低桑黄黄酮作为新药开发的成本。试验所确定的优化液体培养基将对工业化生产桑黄菌丝体黄酮具有一定的指导意义,应用前景广阔。

参考文献

1 弓建国. 食用菌栽培技术[M]. 北京:化学工业出版社,2011.
2 刘波. 中国药用真菌[M]. 太原:山西人民出版社,1974.
3 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.
4 刘艳芳,杨焱,贾薇,等. 药用真菌桑黄总黄酮测定方法研究[J]. 食用菌学报,2006,13(2):45~48.
5 尹秀莲,游庆红. 超声辅助复合酶法提取桑黄多糖[J]. 食品与机械,2011,27(4):58~60.
6 夏国华. 桑黄黄酮类成分及制剂研究[D]. 镇江:江苏大学,2010.
7 王钦博. 桑黄抗氧化活性成分的筛选及其分离纯化[D]. 上海:上海师范大学,2011.
8 孙锦秀. 大孔吸附树脂纯化桑黄总黄酮工艺[J]. 实用药物与临床,2012,15(11):744~746.
9 陈晓平,于翠翠. 响应面法优化微波辅助乙醇提取桑黄黄酮工艺的研究[J]. 食品与发酵科技,2013,49(4):31~36.
10 夏国华,戈延茹,傅海珍,等. 超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究[J]. 江苏大学学报(医学版),2010,20(1):40~41,55.
11 赵子高,杨炎,刘艳芳,等. 桑黄黄酮高产菌株深层发酵条件的优化[J]. 中国酿造,2007(9):22~25.
12 刘凡,庞道睿,沈维治,等. 有利于桑黄胞内黄酮的液体发酵培养基的配方优化[J]. 蚕业科学,2013,39(6):1160~1165.
13 雷萍,张文隽,吴亚召,等. 桑树桑黄子实体和发酵菌粉有效成分分析[J]. 中国食用菌,2010,29(4):40~42.
14 宋铂. 桑黄黄酮的提取制备与生物活性初步研究[D]. 上海:上海水产大学,2006.

(上接第5页)

6 文成兵,李光辉,邱声强,等. 提高窖泥质量的研究[J]. 酿酒科技,2009(4):68~70.
7 张家庆,宋瑞滨,曹敬华,等. 人工老窖窖泥结晶初步分析[J]. 中国酿造,2014(3):21~23.
8 任道群,唐玉明,姚万春,等. 多菌株共酵培养优质窖泥的研究[J]. 中国酿造,2013(6):65~68.
9 李海峰,沈才洪,卢中明,等. 人工窖泥的研究进展[J]. 酿酒,2012(2):96~99.
10 姚万春,唐玉明,任道群,等. 液体窖泥培养过程微生物和香气成分变化趋势[J]. 中国酿造,2013(2):45~48.
11 孙夏冰,王松涛,陆震鸣,等. 浓香型大曲酒窖泥中挥发性化合物的测定与分析[J]. 食品与机械,2013,29(6):54~58.
12 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.
13 陈益钊. 中国白酒的嗅觉味觉科学及实践[M]. 四川:四川大学出版社,1996.
14 范文来,徐岩. 白酒79个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. 酿酒,2011,38(4):80~84.
15 余有贵,罗俊,熊翔,等. 浓香型白酒主要发酵产物生成与微生物类群的动态变化[J]. 食品科学,2012(1):170~173.