

桑黄液体发酵生产多糖工艺研究

丁兴红, 温成平, 丁志山, 范永升

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 考察不同培养条件对桑黄菌液体发酵生产多糖的影响。方法 通过正交试验设计, 对不同培养基种类、起始 pH 值、发酵温度和摇床转速进行优化, 在此工艺基础上, 采用 5 L 发酵罐进行发酵放大试验。结果 采用添加 0.3 g/L 维生素 B1 和 0.3 g/L 维生素 B2 的 PD 培养基, 起始 pH 值 5, 发酵温度 28 °C, 摇床转速 180 r/min 条件下, 桑黄菌摇瓶发酵液中胞内多糖和胞外多糖分别为 5.80、2.37 g/L; 5 L 发酵罐发酵液中桑黄胞内多糖和胞外多糖分别为 5.85、2.30 g/L。结论 桑黄液体发酵可获得桑黄多糖, 本实验结果为桑黄液体发酵工业化生产提供参考。

关键词: 桑黄; 深层发酵; 多糖; 胞内多糖; 胞外多糖

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2012)05 - 0906 - 04

Liquid fermentation of *Phellinus igniarius* for production of polysaccharide

DING Xing-hong, WEN Cheng-ping, DING Zhi-shan, FAN Yong-sheng

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the effects of different fermentation conditions on liquid fermentation of *Phellinus igniarius* for production of polysaccharide. **Methods** The main fermentation parameters, kinds of media, initial pH values, fermentation temperature, and rotation speed, were optimized by using orthogonal test. Amplification tests of fermentation were done in a 5 L fermenter. **Results** The optimal fermentation parameters were potato dextrose (PD) medium with 0.3 g/L vitamin B1 and 0.3 g/L vitamin B2, initial pH value 5, temperature 28 °C, and rotation speed 180 r/min. Under the optimal fermentation conditions, the maximal intracellular polysaccharide (IPS) and exopolysaccharide (EPS) production was 5.80 and 2.37 g/L in shake flasks, while the maximal IPS and EPS production reached 5.85 and 2.30 g/L in 5 L fermenter, respectively. **Conclusion** This study provides reference for industrialization of *P. igniarius* liquid fermentation.

Key words: *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quél; submerged fermentation; polysaccharide; intracellular polysaccharide (IPS); exopolysaccharide (EPS)

桑黄 *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quél 是一种名贵的药用真菌, 属于担子菌亚门 Basidiomycotina 层菌纲 Hymenomycetes 多孔菌目 Polyporales 多孔菌科 Polyporaceae 木层孔菌属 *Phellinus*, 又名火木层孔菌^[1]。现代研究表明, 桑黄多糖主要分胞内多糖 (intracellular polysaccharide, IPS) 和胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS), 是桑黄中主要有效成分, 具有显著抑制肿瘤生长和转移作用, 且对人体不良反应小^[2-3]。因而, 值得深入研究开发。

传统上, 桑黄多糖通常从子实体中提取, 但由于桑黄野生资源日益匮乏, 加之人工栽培难度较大,

限制了桑黄进一步开发和利用。研究表明桑黄菌丝体的成分类似于子实体的活性成分^[4], 因而通过发酵培养桑黄菌丝体获得桑黄多糖具有广阔的应用前景。本研究主要以多糖产量为指标, 采用正交试验设计对桑黄液体发酵条件进行系统研究, 并在 5 L 发酵罐中进行扩大培养实验, 为今后桑黄发酵工业化生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

桑黄菌株购于中国农业微生物菌种保藏管理中心, 菌株编号为 SH009。

收稿日期: 2011-09-04

基金项目: 浙江省高等学校优秀青年教师资助计划 (71008809); 浙江省中医药青年课题研究计划 (2009YA003)

作者简介: 丁兴红, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药生物工程研究。Tel: (0571)86613587 E-mail: zmkm1978@126.com

网络出版时间: 2012-04-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120409.0856.001.html>

1.2 培养基

1.2.1 PD 培养基 (培养基 A) 马铃薯 200 g 去皮洗净切小块, 沸水煮 30 min 后 8 层纱布滤过, 滤液加 20 g 葡萄糖, 定容至 1 000 mL; 培养基 B: 培养基 A 中添加 0.3 mg 维生素 B1; 培养基 C: 培养基 A 中添加 0.3 mg 维生素 B2; 培养基 D: 培养基 A 中添加了 0.3 mg 维生素 B1 和 0.3 mg 维生素 B2。

1.2.2 PDA 培养基 1 L PD 中加入 15 g 琼脂粉。

1.3 斜面培养

将融化的 PDA 培养基倒入试管, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却制成斜面。在无菌条件下, 每支斜面接入 1 块体积约 0.125 cm³ 的桑黄菌种, 28 °C 条件下培养 10 d。

1.4 液体菌种培养

250 mL 锥形瓶装入 PD 培养基 100 mL, 接入活化后的桑黄菌种 4 块, 每块约 0.125 cm³, 28 °C、180 r/min 条件下培养 5 d 得桑黄液体菌种, 用于发酵罐接种培养。

1.5 液体发酵培养

1.5.1 摇瓶发酵培养 250 mL 锥形瓶装液体菌种培养基 100 mL, 接入活化后的桑黄菌种 4 块, 每块约 0.125 cm³, 培养基种类、初始 pH 值、培养温度和摇床转速参数均按表 1 正交试验设计进行试验。

1.5.2 发酵罐培养 5 L 发酵罐 (Sartorius Stedim Biostat Aplus) 中装液量 3 L, 在正交试验优化工艺参数基础上发酵培养, 发酵罐通气速率为 3 L/min, 搅拌转速 200 r/min, 发酵温度 28 °C。发酵过程不同时间点取样, 测定菌丝体干质量、胞内多糖、胞外多糖、残糖和 pH 值。

1.6 主要指标测定

1.6.1 残糖测定 采用 DNS 法 (3, 5-二硝基水杨酸法^[5]) 测定。取桑黄发酵液 10 mL, 布氏漏斗抽滤, 滤渣用蒸馏水洗涤 3 次, 合并所有滤液, DNS 比色法测定葡萄糖质量浓度即为残糖质量浓度。

1.6.2 桑黄 IPS 测定 取发酵液 20 mL, 10 000 r/min 离心 15 min 收集菌丝体, 菌丝体用蒸馏水洗涤 3 次, 80 °C 烘干称定质量, 得菌丝体干质量, 将烘干桑黄菌丝体, 置于索氏抽提器中采用 1 mol/L NaOH 溶液抽提 1 h, 抽提液采用硫酸-苯酚法测定多糖^[6]。

1.6.3 桑黄 EPS 测定 取发酵液 20 mL, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液浓缩至 10 mL, 加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 4 °C 静置过夜, 10 000 r/min

离心 10 min, 收集絮状沉淀, 冷冻干燥, 硫酸-苯酚法测定多糖^[7]。

pH 值测定: 采用 pH 计 (Sartorius PB-10) 测定。

总糖 = IPS + EPS

1.7 数据处理

实验数据采用 SPSS 9.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 摇瓶发酵工艺条件优化

桑黄摇瓶发酵正交试验设计及结果见表 1, 方差分析结果见表 2。

培养基是桑黄液体发酵培养的主要营养成分, 用于提供桑黄菌生长代谢所需要的物质和能量。从表 1 可知, 在正交试验中, 是否添加维生素 B1 和维生素 B2 对菌丝生长的影响差异较大, 维生素 B1 和维生素 B2 均可不同程度促进桑黄菌丝生长, 两者合用具有协同作用, 培养基种类对比试验表明, PD 培养基中添加 0.3 g/L 维生素 B1 和 0.3 g/L 维生素 B2, 可获得较高的桑黄 IPS 和 EPS。傅海庆等^[8]在研究桑黄菌发酵过程中, 也发现维生素 B1 有促进桑黄菌体增殖, 提高多糖产量的效果。

pH 值也是桑黄液体发酵培养的重要影响因素^[9]。本研究中, 设定培养基初始 pH 值为 5 时, 桑黄菌丝体生长较好, IPS 和 EPS 产量较高; 由表 1 中不同 pH 值对比发酵结果可知, 培养基在碱性 (pH 值为 8) 条件下, 桑黄发酵多糖得率较低; 桑黄在弱酸性 (pH 值 5~7) 环境中生长较好, 菌丝体产量较高, 因此选择初始 pH 值 5 有利于桑黄的生长代谢, 可以获得较高的多糖产率。

由表 2 方差分析可知, 在桑黄摇瓶发酵过程中, 以桑黄总糖为指标, 发酵液初始 pH 值影响最大, 其次为培养基种类, 两者均为差异极显著性影响因素; 发酵温度次之, 其影响为差异显著影响因素, 摇床转速影响最小。因此桑黄摇瓶发酵优选工艺为 A₄B₂C₁D₃, 即培养基 D 在 pH 值 5, 28 °C 和摇床转速 180 r/min 发酵培养。A₄B₂C₁D₃ 发酵工艺未在表 1 中列出, 故补做该试验 (验证试验), 结果见表 3。可知, 采用正交试验优选工艺 A₄B₂C₁D₃ 进行 3 次平行试验, 桑黄菌发酵的 EPS、IPS 和总糖分别为 5.80、2.37、8.17 g/L, 这为桑黄的进一步放大发酵研究提供实验数据。

2.2 发酵罐深层发酵

在优化后的桑黄摇瓶发酵工艺条件基础上, 采用于 5 L 发酵罐中进行桑黄发酵放大试验。图 1 是

表 1 桑黄摇瓶发酵 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计与结果 ($n=3$)

Table 1 $L_{16}(4^5)$ orthogonal test design and results of *P. igniarius* flask fermentation ($n=3$)

试验号	培养基	温度 / °C	pH 值	摇床转速 / (r·min ⁻¹)	空白	IPS / (g·L ⁻¹)	EPS / (g·L ⁻¹)	总糖 / (g·L ⁻¹)
1	A (1)	26 (1)	5 (1)	140 (1)	(1)	3.71	1.59	5.30
2	A (1)	28 (2)	6 (2)	160 (2)	(2)	4.22	1.76	5.98
3	A (1)	30 (3)	7 (3)	180 (3)	(3)	4.28	1.84	6.12
4	A (1)	32 (4)	8 (4)	200 (4)	(4)	3.15	1.37	4.52
5	B (2)	26 (1)	6 (2)	180 (3)	(4)	4.85	1.92	6.77
6	B (2)	28 (2)	5 (1)	200 (4)	(3)	5.59	2.29	7.88
7	B (2)	30 (3)	8 (4)	140 (1)	(2)	3.78	1.54	5.32
8	B (2)	32 (4)	7 (3)	160 (2)	(1)	4.67	1.83	6.50
9	C (3)	26 (1)	7 (3)	200 (4)	(2)	4.28	1.64	5.92
10	C (3)	28 (2)	8 (4)	180 (3)	(1)	3.90	1.69	5.59
11	C (3)	30 (3)	5 (1)	160 (2)	(4)	5.26	2.13	7.39
12	C (3)	32 (4)	6 (2)	140 (1)	(3)	4.44	1.72	6.16
13	D (4)	26 (1)	8 (4)	160 (2)	(3)	3.92	1.55	5.47
14	D (4)	28 (2)	7 (3)	140 (1)	(4)	5.31	2.10	7.41
15	D (4)	30 (3)	6 (2)	200 (4)	(1)	5.42	2.16	7.58
16	D (4)	32 (4)	5 (1)	180 (3)	(2)	5.77	2.33	8.10
T_1	21.92	23.46	28.67	24.19	24.97			
T_2	26.47	26.86	26.49	25.34	25.32			
T_3	25.06	26.41	25.95	26.58	25.63			
T_4	28.56	25.28	20.90	25.90	26.09			
R	6.64	3.40	7.77	2.39	1.12			

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	SS	f	s ²	F 值	显著性
培养基	5.828	3	1.942	34.485	$P < 0.01$
温度	1.721	3	0.573	10.183	$P < 0.05$
pH 值	8.097	3	2.699	47.911	$P < 0.01$
摇床转速	0.767	3	0.255	4.538 4	
误差	0.169	3	0.056		

$F_{0.05}(3, 3)=9.28$ $F_{0.01}(3, 3)=29.46$

表 3 桑黄发酵多糖验证试验

Table 3 Verification test of polysaccharide in *P. igniarius* fermentation

试验号	IPS / (g·L ⁻¹)	EPS / (g·L ⁻¹)	总糖 / (g·L ⁻¹)
1	5.79	2.35	8.14
2	5.80	2.40	8.20
3	5.82	2.38	8.20
平均值	5.80	2.37	8.17

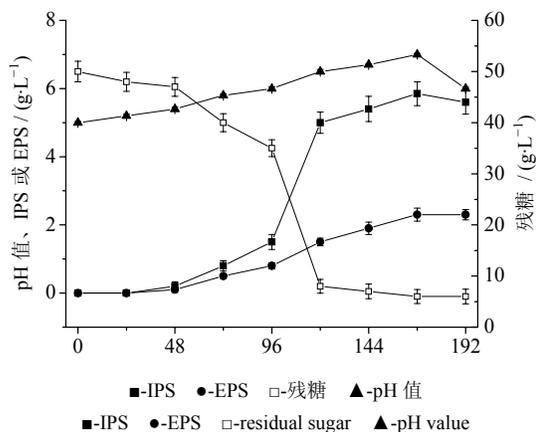


图 1 5 L 发酵罐中桑黄发酵进程曲线 ($n=3$)

Fig. 1 Process curves of *P. igniarius* fermentation in 5 L fermenter ($n=3$)

桑黄发酵过程时间进程曲线,在发酵进程的最初 48 h 内,桑黄菌丝体生长缓慢,该阶段桑黄处于发酵延滞期;在 24~96 h 发酵期间,桑黄菌丝体快速生长,IPS 在 96 h 达到 1.40 g/L,与此同时,培养基中的

葡萄糖也被桑黄菌丝体大量吸收代谢, 残糖浓度也快速减少, 表明在这一阶段, 大量的葡萄糖被桑黄吸收用于菌丝体生长代谢; 发酵 96 h 之后, EPS 开始快速增加, 这可能是因为, EPS 是桑黄发酵过程中的次级代谢产物, 在桑黄菌丝体生长完成后开始逐渐增加。桑黄发酵在 168 h 基本结束, 此时发酵液中的 IPS 和 EPS 均达到最大值, 分别为 5.85、2.30 g/L。

发酵液 pH 值也随着发酵进程逐步增加, 在 168 h 发酵液 pH 值达到最高值, 之后可能是因为桑黄菌丝体自溶, 发酵液的 pH 值开始降低, IPS 的量也缓慢降低。因此, 可以将发酵液 pH 值作为判断发酵终点的间接依据, 桑黄发酵在 168 h 结束是可取的。

3 讨论

在桑黄液体培养过程中, 培养基种类、起始 pH、温度、摇床转速是桑黄液体发酵生产桑黄多糖的主要影响因素, 采用正交试验可以获得适宜的桑黄液体发酵条件; 液体深层发酵是实现桑黄发酵工业化的重要环节, 本实验采用 5 L 发酵罐进行桑黄发酵放大试验, 桑黄在 5 L 发酵罐中生长代谢良好, 发酵培养 168 h 后, 发酵液中 IPS 和 EPS 分别为 5.85、2.30 g/L, 该数据可为药用真菌桑黄大规模培养生产天然活性物质提供重要的参考依据, 显示了桑黄发酵工艺具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技

术出版社, 2006.

- [2] Kim G Y, Lee J Y, Lee J O, *et al.* Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(5): 1218-1226.
- [3] 郭 炜, 董文亮, 李坤星. 桑黄云芝胶囊对荷瘤小鼠生存期的影响 [J]. 山东中医杂志, 2010, 29(1): 45-47.
- [4] 丁兴红, 温成平, 丁志山, 等. 低能离子射线诱变桑黄菌株 SH009 的初步研究 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(2): 15-18.
- [5] Kim H O, Lim J M, Joo J H, *et al.* Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea* [J]. *Bioresour Technol*, 2005, 96(10): 1175-1182.
- [6] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [7] Zou X, Sun M, Guo X. Quantitative response of cell growth and polysaccharide biosynthesis by the medicinal mushroom *Phellinus linteus* to NaCl in the medium [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, 22(11): 1129-1133.
- [8] 傅海庆, 陈绍军, 骆文灿, 等. 桑黄菌液体发酵培养基研究 [J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 58-63.
- [9] 姜 明, 刘 岩, 王伟功, 等. 不同 pH 值和培养基对桑黄菌丝生长的影响 [J]. 北方园艺, 2010 (8): 192-194.