

竹黄菌的液体发酵及生物学活性研究

于建兴¹, 沈洁¹, 陆筑凤¹, 吴芳^{1,2}, 李加友^{1*}

1. 嘉兴学院 生物与化学工程学院, 浙江 嘉兴 314001

2. 义乌市出入境检验检疫局, 浙江 义乌 322000

摘要: 目的 研究竹黄菌的液体发酵最优条件及生物学活性。方法 利用单因素实验方法比较不同培养条件对竹黄菌生长和产竹红菌素的影响, 考察了竹黄菌发酵液抗菌和抗氧化的生物学活性。结果 竹黄菌的较优培养条件为: 蔗糖 2.0%, 葡萄糖 3.0%, 土豆 20%, pH 7.0, 菌种活化后放置 72 h 接种; 竹黄菌发酵液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、黑曲霉和黑根霉等均表现出了较强的抗性, 对氧自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 84.2% 和 76.32%。结论 竹黄菌的液体发酵条件简单, 发酵产物具有一定的广谱抗菌性能和抗氧化活性, 在养殖业中有着良好的应用前景。

关键词: 竹黄菌; 发酵液; 培养优化; 抗菌; 抗氧化

中图分类号: S853.75 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)01-0026-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.007

Liquid fermentation and bio-activities of *Shiraia bambusicola*

YU Jian-xing¹, SHEN Jie¹, LU Zhu-feng¹, WU Fang^{1,2}, LI Jia-you¹

1. College of Biological and Chemical Engineering, Jiaying University, Jiaying 314001, China

2. Yiwu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yiwu 322000, China

Abstract: Objective To investigate the optimal conditions for liquid fermentation of *Shiraia bambusicola* and its bio-activities. **Methods** With the method of single-factor-test, the fermentation conditions of *S. bambusicola* and the production of hypocrellin were optimized, and the antibiosis and anti-oxidative activities were investigated further. **Results** The results showed that the optimized culture conditions were as follows: sugar 2.0%, glucose 3.0%, potato 20%, initial pH 7.0, and the spawn was inoculated after being preserved for 72 h. The krausen of *S. bambusicola* was resistant to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Rhizopus niger*, and to the oxygen radicals and $\cdot\text{OH}$ with the clearance rate of 84.2% and 76.32%, respectively. **Conclusion** The strain of *S. bambusicola* is cultivated with simple conditions. The krausen is a potential additive in the cultivation with excellent anti-oxidative activities and broad antibiosis.

Key words: *Shiraia bambusicola* P. Henn.; krausen; optimization of fermentation; antibacterial; anti-oxidation

竹黄菌 *Shiraia bambusicola* P. Henn 是我国传统珍稀药用真菌, 具有止咳祛痰、舒筋活络、祛风利湿等功效。现代医药学的研究证实, 野生竹黄菌中含有竹红菌素等大量生物活性物质, 竹红菌素具有镇痛、抗炎、抗菌、抗癌、抗病毒等作用, 可广泛应用于外阴白色病变、软化疤痕疙瘩(肥厚性斑痕)等疾病的治疗^[1-3]。为解决野生竹黄菌资源不足的问题, 竹黄菌无性型菌株的生物学活性成分研究受到广泛关注^[4-7]。近年来, 灵芝、虫草、桑黄等传统药用真菌在现代养殖业中的应用受到重视, 在改善畜禽生产性能和机体免疫方面表现出良好的应用前

景^[8-9]。本课题组将竹黄菌发酵液(含菌丝体)添加于育肥猪的饲料中, 减少了养殖过程中的抗生素等药物使用, 符合中药饲料添加剂的使用规范。因此, 拟对竹黄菌无性型菌株的培养条件及其抗菌和抗氧化生物学活性进行研究, 初步掌握影响竹黄菌发酵的主要因素, 并揭示竹黄菌发酵液在生猪养殖中的作用机制, 为竹黄菌无性型菌株的发酵产物在饲料添加剂方面的开发和应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 竹黄菌 *Shiraia bambusicola* P. Henn

收稿日期: 2012-10-19

基金项目: 义乌市科研计划项目(10-3-03)

*通信作者 李加友 Tel: (0573)83646246 E-mail: lijiayou@mail.zjxu.edu.cn

(ZH01),为本实验室分离保藏。大肠杆菌 *Escherichia coli* T. Escherich, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* F. Cohn, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, 黑曲霉 (*Aspergillus niger* van Tieghem, 黑根霉 *Rhizopus niger* Ehrenberg 均购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 培养基 真菌培养基和发酵优化基础培养基为 PDA 培养基。细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

1.1.3 药品与试剂 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、双氧水等化学试剂与药品均为市售分析纯;牛肉膏、蛋白胨等均为市售生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 竹黄菌菌种活化及制备 将保藏的竹黄菌接种于 PDA 平板培养基上, 28 °C 恒温培养 72 h, 即得活化菌种。

用无菌打孔器在平板菌落上打孔(孔径 1 mm)挖取菌种, 每瓶培养基接入竹黄菌菌种 1 粒, 250 mL 三角瓶装 PDA 液体培养基 50 mL, 空气恒温振荡培养器的转速为 170 r/min, 28 °C 培养恒温培养 48 h, 即制得用于发酵的竹黄菌液体菌种。

1.2.2 竹黄菌液体发酵条件的优化 用移液器定量移取 1 mL 竹黄菌液体菌种, 接入液体发酵培养基中, 28 °C 恒温培养 5 d, 空气恒温振荡培养器的转速为 170 r/min。取发酵液离心(4 000 r/min, 15 min), 将收集的上清液经超滤膜处理后测定其吸光度(A)值^[9], 以单位体积发酵液竹红菌素的量作为竹黄菌液体发酵条件优化的依据。在竹黄菌液体发酵条件优化实验中, 除待测参数根据方案设计进行相应改变外, 其他参数均保持不变。

离心后的沉淀物经抽滤和洗涤, 收集菌丝体并干燥至质量不变, 称质量。在竹黄菌液体发酵条件优化过程中, 进一步结合所测定的竹黄菌生物量, 为发酵条件的优化提供参考。

1.2.3 竹黄菌发酵液的抗菌活性 取直径 0.5 cm 的滤纸片, 灭菌后于无菌操作条件下充分浸取上述发酵液, 自然流除多余液体后常温晾干。在无菌条件下将 5 个晾干滤纸片分别规则地放入接有待测细菌或真菌菌种的平板培养基上, 恒温培养一定时间后测量抑菌圈直径, 确定竹黄菌发酵液的抗菌性能。

1.2.4 竹黄菌发酵液的抗氧化活性 竹黄菌发酵液的抗氧化活性测定参照文献方法^[10]。

2 结果与分析

2.1 竹黄菌液体发酵条件的优化

2.1.1 糖含量对竹黄菌液体发酵的影响 以 PDA 培养基为出发培养基, 分别添加 5 g/L 淀粉、葡萄糖和蔗糖后竹黄菌产竹红菌素的情况见表 1, 在 PDA 培养基中添加葡萄糖和蔗糖后, 竹黄菌的生长情况更好, 产竹红菌素能力更强。葡萄糖和蔗糖比淀粉更容易被菌体利用, 有利于竹黄菌在发酵过程中缩短适应期, 保持菌体快速生长和生理状态的一致性, 提高竹红菌素的产量。

表 1 糖含量对竹黄菌发酵的影响
Table 1 Effect of sugar content on fermentation of strain ZH01

培养基	生物量/g	竹红菌素/(mg·L ⁻¹)
PDA	0.75±0.03	634±21
PDA+淀粉	0.81±0.04	652±19
PDA+葡萄糖	1.12±0.04	729±13
PDA+蔗糖	1.08±0.70	721±23

进一步研究表明, 竹黄菌的生物量随葡萄糖浓度增大而增大(表 2)。当葡萄糖质量浓度为 3% 时, 竹黄菌的生物量达到最大值, 而竹红菌素产量随着葡萄糖质量浓度的提高有所增加。葡萄糖促进竹黄菌生长的作用非常显著, 竹红菌素产量随着葡萄糖添加量的增加显著提高, 可能的原因是竹红菌素为次生代谢产物, 但仍然需要大量碳源作为其生物合成的基础。当葡萄糖添加量超过 3% 后, 竹红菌素的产量不再显著增加。

表 2 葡萄糖对竹黄菌发酵的影响
Table 2 Effect of glucose content on fermentation of strain ZH01

葡萄糖浓度/%	生物量/g	竹红菌素/(mg·L ⁻¹)
0	0.75±0.03	634±21
1	1.65±0.06	815±28
2	1.64±0.04	976±35
3	1.67±0.06	1 013±29
4	1.36±0.07	1 027±22

2.1.2 土豆用量对竹黄菌发酵的影响 土豆中含有丰富的营养物质, 是常用的真菌培养基质, PDA 培养基中土豆的用量为 20%。结果表明, 竹黄菌的生物量随着土豆用量的增加而增大, 但当土豆用量大于 20% 时, 竹红菌素的产量急剧下降。可能的原因是

由于土豆用量过多后,降低了体系的碳氮比,从而导致次级代谢产物竹红菌素的合成受阻(表3)。

表3 土豆用量对竹黄菌发酵的影响

Table 3 Effect of potato juice content on fermentation of strain ZH01

土豆用量/%	生物量/g	竹红菌素/(mg·L ⁻¹)
10	0.38±0.03	250±8
15	0.53±0.04	548±22
20	0.75±0.05	634±32
25	1.04±0.04	327±12
30	1.12±0.05	0

2.1.3 起始pH值对竹黄菌发酵的影响 培养基pH值与微生物的生命活动有着密切的关系,pH值的变化一方面可以影响菌体的生长,另一方面也会影响菌体次生产物的形成。结果表明,不同起始pH值条件对竹黄菌生长和竹红菌素产量均有显著影响,当培养基的起始pH值为7.0时,竹黄菌的生物量和竹红菌素产量均为最大(表4)。

表4 pH值对竹黄菌发酵的影响

Table 4 Effect of pH value on fermentation of strain ZH01

pH值	生物量/g	竹红菌素/(mg·L ⁻¹)
3	0.36±0.02	219±15
4	0.51±0.02	432±21
5	0.63±0.03	573±18
6	0.71±0.03	625±22
7	0.82±0.04	758±9
8	0.54±0.01	618±23
9	0.23±0.02	336±16

2.1.4 菌种菌龄对竹黄菌发酵的影响 菌种菌龄是影响微生物发酵的重要因素,通常处于对数生长期的菌种活力强,生长速度快,是作为菌种的较优菌龄。但在竹黄菌的发酵实验中发现,菌种放置时间越长,竹黄菌的生长越好,而竹红菌素的产量却在菌种放置72h时最高(表5)。对发酵过程的监测发现,接入放置时间较长的菌种后,发酵液中竹黄菌菌丝分散,不成团,生长速度快,生物量高;而接入放置时间短的菌种后,菌丝容易成团,形成一个或几个较大的菌丝球,后期生长速度变慢,表现为生物量低。进一步研究表明,菌种放置冰箱冷藏处理后,发酵液中菌丝分散性能更好。

2.2 竹黄菌发酵液的抗菌活性研究

分别测试了培养条件优化后竹黄菌发酵液对大

表5 菌龄对竹黄菌发酵的影响

Table 5 Effect of cell age on fermentation of strain ZH01

菌龄/h	生物量/g	竹红菌素/(mg·L ⁻¹)
24	0.82±0.04	657±25
48	0.89±0.01	678±21
72	0.93±0.02	693±22
96	0.96±0.03	673±28
120	1.12±0.02	667±17

肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等3种细菌和酿酒酵母、黑曲霉、黑根霉等3种真菌的抗菌性能,结果表明,竹黄菌发酵液对以上3种细菌的抑菌圈大小分别为0.95、0.87、0.77cm,而对以上3种真菌的抑菌圈大小分别为0.82、0.70、0.88cm。竹黄菌发酵液表现出了对不同细菌和真菌的抗性,具有一定的广谱抗菌性。

2.3 竹黄菌发酵液的抗氧化活性研究

2.3.1 发酵液清除氧自由基能力测定(邻苯三酚自氧化法) 向各量瓶中加入3mmol/L邻苯三酚溶液0.3mL,竹黄菌发酵液2mL,用Tris-HCl缓冲液(pH8.30)定容至10mL,以蒸馏水作参比,测定A值,每隔30s测1次数据,直到反应启动后的第6分钟,把所得数据以时间为横坐标,A为纵坐标进行线性回归,得到的直线斜率为反应速率 ΔA_0 和 ΔA ,拟合方程见表6。

表6 竹黄菌发酵液清除氧自由基的模型参数

Table 6 Model parameters of fermentation of strain ZH01 on oxygen radical clearance

模型	方程	R ²
A ₀	$y = -0.0002x + 0.6131$	0.9988
A ₁	$y = -0.00005x + 0.6461$	0.9603
A ₂	$y = -0.00003x + 0.4460$	0.8712
A ₃	$y = -0.00004x + 0.6677$	0.9481

由表6可得 $\Delta A_0 = -0.0002$, $\Delta A_1 = -0.000026$, $\Delta A_2 = -0.000029$, $\Delta A_3 = -0.00004$;即加入发酵液后邻苯三酚自氧化平均速率 $\Delta A = -0.000032$,根据公式计算清除率(SA)。

$$SA = (\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0$$

结果表明,竹黄菌发酵液表现出对氧自由基较高的清除率,为84.2%。

2.3.2 发酵液清除·OH能力测定 在具塞试管中加入1.00mL FeSO₄和2.00mL水杨酸-乙醇溶液(浓度均为9mmol/L),然后加入2mL竹黄菌发酵液,

最后加入 2 mL 浓度为 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 溶液, 启动反应, 在室温下反应 1 h。用蒸馏水代替发酵液作空白调零, 于 510 nm 波长处测定 A 值, 记录数据。按以下公式计算 SA。

$$SA = (A_0 - A_s) / A_0$$

A_s 为加入发酵液后的吸光度

结果可知竹黄菌发酵液表现出对 $\bullet OH$ 较好的清除效率, 为 76.32%。

3 结论

在竹黄菌发酵条件优化过程中发现, 竹红菌素的产生和竹黄菌生长有一定相关性, 但碳氮比对竹红菌素的影响更为显著。同时, 菌种对于竹黄菌生长和竹红菌素合成有较大影响, 放置一段时间后的菌种更有利于菌体生长和产物形成, 甚至冷藏也有显著的增效作用, 这一发现对于竹黄菌的规模生产具有重要意义。

中草药饲料添加剂的应用是现代养殖业的重要发展方向之一^[11-12], 竹黄菌是一种具有良好生物学活性的传统中药材, 研究表明, 竹黄菌的液体发酵条件简单, 发酵液具有良好的广谱抗菌和抗氧化性能, 是一种值得深入研究和开发的中草药饲料添加剂。

参考文献

- [1] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 药用真菌竹黄的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 21-25.
- [2] 贾小明, 徐晓红, 庄百川, 等. 药用真菌竹黄的生物学

研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 147-150.

- [3] 林海萍, 黄小波, 毛胜凤, 等. 野生竹黄菌生物学性状研究 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1407-1409.
- [4] 刘双柱, 赵维民. 药用真菌竹黄化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1239-1242.
- [5] 高波, 刘卫, 张举成, 等. 竹红菌素光敏反应抑菌效果研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7839-7840.
- [6] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. *Shiraia sp.* SUPER-H168 液态发酵产竹红菌素过程中生理特征初步研究 [J]. 工业微生物, 2010, 40(4): 153-156.
- [7] 韩燕峰, 杜文, 梁宗琦, 等. 竹黄无性型的多态性及孢子个体发育研究 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 109-111.
- [8] 刘敏亮, 苏明声, 罗阔丹, 等. 灵雷菌质对大鼠类风湿性关节炎作用的实验研究 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(24): 1917-1921.
- [9] 霍光明, 张李阳, 周业飞, 等. 芝芪菌质多糖对 AA 肉鸡生长、免疫和肉品质的影响 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 31(3): 39-43.
- [10] 吴芳, 李加友. 固体发酵基质中竹红菌素的微波辅助提取 [J]. 浙江农业学报, 2011, 23(3): 604-606.
- [11] 梁绍兰, 覃冬, 黄连秋, 等. 柑橘皮多糖抗氧化性研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2624-2625.
- [12] 王文娟, 汪水平, 左福元, 等. 中药复方对山羊的影响: I 养分表观消化率与血液常规参数 [J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(5): 59-62.
- [13] 曹立辉. 中药“黄藿散”超微粉提高蛋雏鸡新城疫免疫力研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(14): 62-64.