

• 制剂与质量 •

桦褐孔菌胞外多糖合成的深层发酵条件研究

陈才法¹, 项小燕², 顾 琪¹, 郑维发^{1*}, 魏江春¹

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116;

2. 安庆师范学院 生物技术系, 安徽 安庆 246000)

摘要:目的 探索桦褐孔菌深层发酵体系中胞外多糖积累的最佳碳、氮源和 pH 值。方法 采用深层发酵法培养桦褐孔菌, 通过添加不同的碳、氮源和改变 pH 值观察胞外多糖的积累。发酵液中的总糖用硫酸-蒽酮法测定, 还原糖以 DNS 法测定, 总糖减去还原糖即为胞外多糖的量。结果 桦褐孔菌深层发酵体系中有利于胞外多糖合成的最佳碳源为 2% 的麦芽糖, 氮源为 0.4% 的蛋白胨, 最适 pH 值为 5.5。结论 最佳单因子组合对桦褐孔菌胞外多糖积累有协同效应, 组合后的发酵体系中胞外多糖的量达 7.8 g/L。

关键词:桦褐孔菌; 深层发酵; 胞外多糖

中图分类号:R282.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0358-04

Submerged fermentation conditions for synthesis of extracellular polysaccharide by *Inonotus obliquus*

CHEN Cai-fa¹, XIANG Xiao-yan², GU Qi¹, ZHENG Wei-fa¹, WEI Jiang-chun¹

(1. Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Department of Biotechnology, Anqing Normal College, Anqing 246000, China)

Abstract: Objective To optimize the sources of carbon and nitrogen and pH value favoring the accumulation of extracellular polysaccharides in the submerged fermentation of *Inonotus obliquus*. **Methods**

The accumulation of extracellular polysaccharides was monitored in the submerged fermentation of *I. obliquus* by supplementation of various carbon and nitrogen sources and alteration of initial pH level. The total sugar was determined by sulfuric acid-anthrone method; sugar was reduced by DNS method; the accumulation of extracellular polysaccharides was calculated by subtracting the reductive sugar from the total sugar. **Results** The optimal submerged fermentation favoring the accumulation of extracellular polysaccharides consisted of 2% maltose and 0.4% peptone as the carbon and nitrogen sources, respectively, and the pH value was 5.5. **Conclusion** The combination of optimal carbon and nitrogen sources and pH level indicates synergism on the accumulation of extracellular polysaccharides in the submerged fermentation of *I. obliquus*. The amount of extracellular polysaccharides is up to 7.8 g/L at the end of fermentation.

Key words: *Inonotus obliquus* (Pers; Fr.) Aoshima; submerged fermentation; extracellular polysaccharides

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Pers; Fr.) Aoshima 属担子菌亚门层菌纲非褐菌目多孔菌科褐卧孔菌属的一种药用真菌, 分布于俄罗斯北部、北欧、日本北海道以及我国长白山和大兴安岭等北纬

40°~50°的地区^[1]。桦褐孔菌在俄罗斯、北欧、日本、美国和韩国被广泛用来治疗恶性肿瘤^[2]、糖尿病、心血管疾病、肝病^[3]和艾滋病^[4]。桦褐孔菌多糖是桦褐孔菌的重要药理活性成分之一, 对 S₁₈₀ 肉瘤有显著

收稿日期: 2006-04-13

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究计划重大基础研究项目(05KJA36012); 江苏省自然科学基金项目(BK2006034); 徐州市科技计划重点项目(06XZA008)

作者简介: 陈才法(1963—), 男, 江苏苏州人, 副教授, 从事药用植物生物技术研究。

* 通讯作者: 郑维发 Tel: (0516) 83403179 E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

的抑制作用^[5],菌丝体多糖能有效地刺激巨噬细胞分泌 NO、IL-1、IL-6、TNF- α 细胞因子,显著提升机体免疫水平,通过调整机体的免疫状态间接地杀伤肿瘤细胞^[6]。用深层发酵法生产桦褐孔菌多糖研究始于 20 世纪末的韩国,我国的相关研究出现在 2004 年^[7,8]。但以上报道均以菌丝体的生物量为指标确定发酵条件。本研究以桦褐孔菌多糖积累为指标,开展了碳、氮源和 pH 值对桦褐孔菌深层发酵体系中胞外多糖积累研究,以期对桦褐孔菌多糖的规模化生产提供参考。

1 材料与仪器

3,5-二硝基水杨酸(DNS)(北京韦斯实验用品有限公司);葡萄糖(glucose)、蛋白胨(peptone)、酵母膏(yeast extract)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)等(中国医药集团上海化学试剂公司)。

桦褐孔菌采自长白山牡丹江、镜泊湖火山口活桦树的树干,标本由俄罗斯国家科学院圣彼得堡真菌研究所 Margarita A. Bondartseva 教授鉴定,保存于江苏省药用植物生物技术重点实验室,编号:LBMP2004005。经过组织分离,获得 PDA 试管菌种,在 4℃ 冰箱中避光保存。将桦褐孔菌 PDA 种接入由葡萄糖(2%),蛋白胨(0.3%),KH₂PO₄(0.1%),MgSO₄·7H₂O(0.05%),CaCl₂(0.01%),pH 值自然(pH 5.5)的液体培养基,在 26℃、振荡频率为 140 r/min 的条件下振荡培养 8 d,得一级摇瓶种子,作为实验菌种,备用。

Flexi—Dry MP 冷冻干燥机(U S Pat #4,823,478);722 光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);BP—211D 型电子天平(德国赛多利斯公司);HH B11 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);FLUKO 匀浆器(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);DHZ—032R 型空气浴恒温振荡器(上海申能博彩生物科技有限公司);PHSJ—3F 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 碳源对胞外多糖积累的影响:以 2.5% 米粉、葡萄糖、蔗糖、半乳糖、D-木糖、麦芽糖代替一级摇瓶中的葡萄糖(同时设空白对照,即不专门加碳源),其他成分不变,在 26℃、振荡频率为 140 r/min 的条件下振荡培养,每天测定胞外多糖的积累。以硫酸-萘酚法测定发酵液总糖^[9],DNS 法测定发酵液中的还原糖^[10]。总糖减去还原糖即为胞外多糖。8 d 后收集菌丝体和提取胞外多糖并称重。结果见表 1。可见在相同质量浓度下不同碳源对桦褐孔菌

胞外多糖积累有一定的影响。其中以 2.5% 的麦芽糖为碳源时胞外多糖积累量达到最高,为 2.75 g/L。其次为米粉、木糖和蔗糖,均在 2.4 g/L 左右。以葡萄糖为碳源的发酵液中胞外多糖积累量较低,仅为 1.9 g/L 左右。实验结果还显示,不同碳源对菌丝体的积累量影响显著,其中以葡萄糖为碳源的培养基其菌丝体干质量达 9.2 g/L。而以米粉、木糖和蔗糖为碳源的发酵液中菌丝体干质量仅有 5.7 g/L。麦芽糖为碳源的菌丝体干质量仅有 2.1 g/L 左右。因此以麦芽糖为碳源的发酵液培养基对胞外多糖的积累最为有利。

表 1 不同碳源对胞外多糖积累的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of various carbon sources on accumulation of extracellular polysaccharides ($\bar{x} \pm s, n=5$)

碳源	培养液内	
	胞外多糖/(g·L ⁻¹)	菌丝体干质量/(g·L ⁻¹)
葡萄糖	1.92±0.01	9.45±0.36
米粉	2.20±0.01	5.45±0.33
木糖	2.23±0.10	5.16±0.13
蔗糖	2.30±0.09	5.14±0.51
麦芽糖	2.75±0.11	3.27±0.07
半乳糖	1.64±0.23	2.08±0.56
空白对照	1.99±0.12	2.14±0.07

2.2 氮源对胞外多糖积累的影响:以酵母膏、黄豆粉、麦皮、(NH₄)₂SO₄、KNO₃ 为氮源(同时设空白对照,即不专门加氮源),取代一级摇瓶中的蛋白胨,取量皆为 0.6%,其他发酵条件不变,在 26℃、振荡频率为 140 r/min 的条件下振荡培养,每天测定胞外多糖的质量分数。8 d 后收集菌丝体和提取胞外多糖并称重。不同氮源对桦褐孔菌胞外多糖的积累也有明显的影响。结果见表 2,可见以蛋白胨和酵母膏为氮源的发酵液中胞外多糖积累量达到近 2 g/L,而以黄豆粉和麦皮为氮源的发酵液中多糖的积累量仅为 1.5 g/L 左右。以无机氮为氮源的发酵液中胞外多糖只有很少的积累。不同氮源也影响菌丝体干质量的积累。以酵母膏为氮源的发酵液中菌丝体的干质量达 6.5 g/L,而以蛋白胨为氮源的发酵液中菌丝体干质量积累不超过 3 g/L。以黄豆粉为氮源的发酵液中菌丝体干质量仅为 2.2 g/L 左右,以麦皮为氮源的发酵液中菌丝体的积累进一步减少。以无机氮为氮源的发酵液中菌丝体生长十分缓慢(表 2)。因此,以酵母膏为氮源的深层发酵培养基有利于桦褐孔菌胞外多糖的积累。

2.3 pH 值对胞外多糖积累的影响:培养基的组成与一级种子培养基一致,设定起始 pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5,在 26℃、振荡频率为 140 r/min 的

表2 不同氮源对胞外多糖积累的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of various nitrogen sources on accumulation of extracellular polysaccharides ($\bar{x} \pm s, n=5$)

氮源	培养液内	
	胞外多糖/(g·L ⁻¹)	菌丝体干质量/(g·L ⁻¹)
蛋白胨	2.06±0.02	2.99±0.02
酵母膏	2.00±0.20	6.55±0.09
黄豆粉	1.47±0.04	2.09±0.42
麦皮	0.92±0.05	1.23±0.44
硫酸胺	0.23±0.12	0.23±0.05
硝酸钾	0.24±0.02	0.24±0.02

条件下振荡培养,每天测定胞外多糖的质量分数。8 d后收集菌丝体和提取胞外多糖并称重。不同pH值对桦褐孔菌胞外多糖的积累有显著的影响,见表3。pH 4.5时胞外多糖积累仅为0.5 g/L。pH 5.5时,胞外多糖积累上升到1.4 g/L左右。pH 6.5时,胞外多糖积累量达到2.42 g/L的最高水平。pH进一步上升到7.5和8.5时,胞外多糖积累又分别下降为0.16、0.18 g/L。不同起始pH值对菌丝体干质量也有显著影响。pH 4.5以下菌丝体生长十分缓慢,pH 5.5~6.5时达到最大值6.9~7.4 g/L,pH值进一步上升为7.5和8.5时,菌丝体干质量分别下降到0.39、0.29 g/L。

表3 不同pH值对胞外多糖积累的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effects of various pH values on accumulation of extracellular polysaccharides ($\bar{x} \pm s, n=5$)

pH值	培养液内	
	胞外多糖/(g·L ⁻¹)	菌丝体干质量/(g·L ⁻¹)
4.5	0.50±0.02	2.20±0.06
5.5	1.33±0.07	7.50±0.45
6.5	2.42±0.05	7.00±0.03
7.5	1.56±0.04	3.70±0.04
8.5	1.83±0.10	2.80±0.75

2.4 最佳碳、氮源起始比例对胞外多糖积累的影响:将最佳碳、氮源按大中小3个比例替代原有培养基中的碳、氮源,其他成分不变,灭菌接种后在26℃、振荡频率为140 r/min的条件下振荡培养,每天测定胞外多糖的积累和还原糖的消耗。发酵终止后测定菌丝体和胞外多糖的干质量。结果见图1。实验结果显示最有利于桦褐孔菌多糖积累的碳、氮源为麦芽糖和蛋白胨。从设定的麦芽糖3个起始比例来看,麦芽糖在桦褐孔菌发酵培养体系中消耗的速率基本一致,在发酵终止时,比例为2%的麦芽糖残留最小(0.2%左右),而起始比例为3%和4%的麦芽糖分别还有0.95%和1.9%的残留。不同起始比例的麦芽糖对桦褐孔菌胞外多糖的积累没有显著

影响,对菌丝体干质量积累也没有显著影响。因此采用2%比例的麦芽糖可以最大限度地利用碳源。

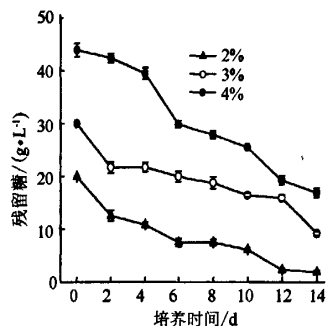


图1 起始麦芽糖比例对单糖利用速率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effects of initial maltose proportion on assimilation of monosaccharide ($\bar{x} \pm s, n=5$)

起始蛋白胨比例对麦芽糖利用率有一定的影响。实验结果显示,蛋白胨比例为0.2%和0.4%时在发酵的前6 d麦芽糖消耗的速率基本一致,从第7天开始,蛋白胨比例为0.4%的发酵液中麦芽糖消耗速率显著增加,直到发酵终止。起始蛋白胨比例为0.6%的发酵液中麦芽糖消耗速率在第2天就显著高于前两个比例,但在第6天时与起始蛋白胨比例为0.4%的一致,第8天到第12天却低于起始蛋白胨比例为0.4%的发酵液对麦芽糖的消耗速率(图2)。不同起始蛋白胨比例对胞外多糖积累没有显著的影响。对菌丝体干质量却有一定影响。其中以起始比例为0.4%蛋白胨为氮源时有利于菌丝体干质量积累(表4)。

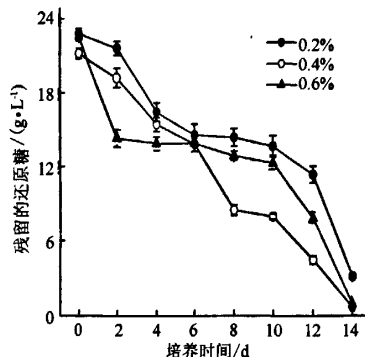


图2 蛋白胨比例对葡萄糖消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effects of peptone proportion on consumption of glucose ($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.5 单因子优化组合试验:将最佳碳源、氮源和最适pH值进行组合,在26℃、振荡频率为140 r/min的条件下振荡培养14 d,每天测定胞外多糖和还原

表 4 起始蛋白胨比例对菌丝体干质量和胞外多糖积累的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 4 Effects of initial peptone proportion on accumulation of mycelial biomass and extracellular polysaccharides ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

蛋白胨比例	培养液内	
	胞外多糖/(g·L ⁻¹)	菌丝体干质量/(g·L ⁻¹)
0.2%	6.91±2.36	0.35±0.12
0.4%	9.35±2.84	0.47±0.14
0.6%	7.08±3.22	0.35±0.16

糖质量分数以及 pH 值的变化。还原糖测定参照文献^[10]所述的方法进行。结果显示,最适碳源是比例为 2% 的麦芽糖,最适氮源是比例为 0.4% 的蛋白胨,最适 pH 值为 5.5。将最适碳、氮源和最适 pH 组合,开展单糖消耗速率、pH 值变化以及胞外多糖积累实验。结果表明,麦芽糖在培养的第 1 天就下降了 8 g 左右,第 2 天到第 4 天下降速率有所减弱,但第 4 天后麦芽糖消耗速率增加,在第 10 天完全耗尽。pH 值也从 5.5 下降到 4.2 左右,而胞外多糖积累则在第 9 天达到 7.8 g/L。最适单因子组合后胞外多糖积累大大超过单因子水平(图 3)。

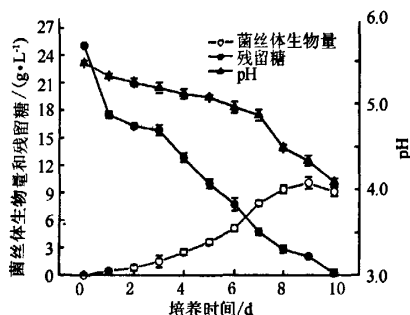


图 3 碳、氮源及 pH 值最优组合后麦芽糖消耗及胞外多糖积累曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Curve of maltose consumption in medium with optimal combination of carbon and nitrogen and pH value and accumulation of extracellular polysaccharides ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

碳是构成菌丝体细胞骨架、合成多糖和蛋白质等代谢产物的重要原料,并为菌丝体的生长提供能量。在桦褐孔菌发酵培养基碳源筛选选用的 6 种碳源中,有机碳对胞外多糖的积累作用远远高于无机碳。有机碳中,以麦芽糖的效果最好。以麦芽糖为碳源,除了胞外多糖积累量显著提高外,对菌丝体生物量的积累也有促进作用。

氮源是菌丝体合成蛋白和其他含氮代谢物的重要原料。本研究选用了 4 种有机氮源和两种无机氮

源。结果表明有机氮源对桦褐孔菌胞外多糖的积累远远高于无机氮。这可能是因为有机氮源含有丰富的蛋白质、多肽、游离的氨基酸以及少量的脂肪、微量元素和生长素等,因而有利于菌体的生长和各种代谢产物的合成。有机氮源中,蛋白胨对胞外多糖的积累明显高于其他有机氮。

pH 对微生物的影响是由于氢离子与细胞质膜上的酶相互作用的结果,细胞内 pH 值合适与否,会影响细胞内酶的活性。另外,pH 对金属离子形成复合物的溶解度有很大影响,从而影响微生物对基质的利用速度,它可以通过引起膜的通透性发生变化而影响微生物对营养物质的吸收和代谢产物的积累。本研究结果表明 pH 值 5.5~6.5 最有利于桦褐孔菌菌丝体生长和胞外多糖积累。在此 pH 范围内,麦芽糖利用率最高。

单因子最佳组合的发酵体系中,桦褐孔菌对碳、源的利用率达到最高水平,胞外多糖积累在第 9 天即达到最大值,说明最佳碳源、氮源和 pH 之间的组合对胞外多糖的积累有协同作用。桦褐孔菌是一类药理活性显著但生长速度十分缓慢的大型真菌,桦褐孔菌多糖是该菌重要的药理活性成分之一。因此探索桦褐孔菌深层发酵的最适碳、氮、源和 pH 与胞外多糖积累的关系,对桦褐孔菌胞外多糖的规模化生产有着重要的指导意义。

References:

- [1] Huang N L. Medicinal folk fungi in Russia—*Inonotus obliquus* [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21 (4): 7-8.
- [2] Glowacki H, Tomaszewski J. Attempted therapy of inoperable cancer of the female genitalia with *Poria oblique* Bres. extract [J]. *Ginekol Pol*, 1962, 33: 445-450.
- [3] Wasser S P, Weis A L. Therapeutic effect of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective [J]. *Crit Rev Immunol*, 1999, 19(1): 65-96.
- [4] Sakuma K. Aids virus multiplication inhibitor and method of culturing active ingredient thereof [P]. JP: 93/159, 946, 1993-07-07.
- [5] Jin G, Yang E, Jin Q, et al. Antitumor activities of polysaccharides from *Fuscoporia oblique* [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 2004, 27: 257-250.
- [6] Kim Y O, Han S B, Lee H W, et al. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus* [J]. *Life Sci*, 2005, 77 (19): 2438-2456.
- [7] Chen Y Q, Li Y. Development of the study in *Inonotus obliquus* [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2005, 32(2): 124-127.
- [8] Jiang Y J, Lv H Z, Xie B G. Cultivation properties of *Inonotus obliquus* [J]. *J Fujian Agric* (福建农业学报), 2004, 19(2): 92-95.
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356.
- [10] Wang L, Zheng P. Quantitative determination of trehalose by DNS method [J]. *Food Sci Technol* (食品科技), 2004, (2): 82-84.