

# 竹黄多糖液态发酵培养基优化研究

陈佳佳<sup>1</sup>, 叶亚新<sup>1</sup>, 金璘<sup>1</sup>, 李兆兰<sup>2</sup>

(1. 苏州科技学院化学与生物工程学院, 江苏苏州 215009; 2. 南京大学生命科学院药物生物技术国家重点实验室, 江苏南京 210093)

**摘要** [目的] 为竹黄多糖的工业化生产提供理论依据。[方法] 通过组织分离, 从野生竹黄子实体中获得能产生竹黄多糖的无性株, 然后用其进行液态发酵培养, 通过摇瓶正交试验确定其最佳培养基配方。[结果] 碳源、氮源、生长因子和初始 pH 值的影响均达显著水平 ( $\alpha=0.05$ ), 其显著性依次为: 碳源浓度 > 生长因子浓度 > 酸碱度 > 氮源浓度, 在交互作用中只有 CGF × CN 的影响达显著水平。方差分析结果表明, 最佳培养基配方为: 蔗糖 20 g/L + 酵母膏 8 g/L + 玉米浆 2 g/L, 最佳初始 pH 值为 6.0。当摇瓶装量为 50/250 ml (V/V), 接种量为 10% (V/V), 培养温度为 28 °C, 摇床转速为 120 r/min 时, 120 h 后发酵液的竹黄多糖含量为 8 g/L。[结论] 该试验初步研究了利用竹黄无性菌株通过液态发酵生产竹黄多糖的培养基组成及培养条件。

**关键词** 竹黄菌; 竹黄多糖; 正交试验; 液态发酵

**中图分类号** Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-11869-02

## Study on the Optimization of Liquid Fermentation Medium of *Shiraia bambusicola* Polysaccharide

CHEN Jia-jia et al (School of Chemical and Biological Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu 215009)

**Abstract** [Objective] The purpose was to supply theoretical foundation for the industrialized production of *Shiraia bambusicola* polysaccharide. [Method] The asexual producing strains of *S. bambusicola* polysaccharide were obtained from the fruiting bodies of wild *S. bambusicola* through tissue isolation. Then they were cultured in liquid medium by fermentation and their optimum medium formula was ascertained through orthogonal shaking flask experiment. [Result] The influences of carbon source, nitrogen source, growth factors and initial pH value reached significant level and their significances were as follows: concn. of carbon source > concn. of growth factors > pH > concn. of nitrogen source. Among interactions, only the influence of CGF × CN reached significant level. The results of variance analysis showed that the optimum medium formula was sucrose 20 g/L + yeast paste 8 g/L + corn syrup 2 g/L and the optimum initial pH value was 6.0. When the culture broth quantity was 50/250 ml (V/V), the inoculation amount was 10% (V/V), the culture temperature was 28 °C and the rotation speed was 120 r/min, the content of *S. bambusicola* polysaccharide in the fermentation broth after 120 h was 8 g/L. [Conclusion] The medium composition and culture condition of producing *S. bambusicola* polysaccharide through liquid fermentation with asexual bamboo parasitic fungus were studied preliminarily in this experiment.

**Key words** Bamboo parasitic fungus; *Shiraia bambusicola* polysaccharide; Orthogonal test; Liquid fermentation

竹黄(*Shiraia bambusicola* Henn) 属子囊菌亚门, 核菌纲, 球壳目, 肉座菌科真菌, 其寄生于竹上, 主要分布于江苏、浙江、安徽等省<sup>[1]</sup>, 是我国传统的名贵药用真菌。民间多以竹黄浸酒服用, 治疗风湿性关节炎, 坐骨神经痛等症。药理和临床试验显示竹黄具有镇痛抗炎和保护心血管的作用<sup>[2]</sup>, 其有效成分竹黄多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基具有清除作用, 并且对油脂的氧化具有抑制能力, 在临床应用和功能性食品开发领域具有很大的潜在价值。然而, 野生竹黄地域分布不平衡, 采收期短<sup>[3]</sup>, 因此竹黄多糖的扩大应用存在困难, 无法满足市场需求。该试验对竹黄子实体进行组织分离, 筛选获得竹黄无性型菌株, 通过液态发酵产生大量的竹黄多糖, 并对培养基成分及培养条件作了初步研究, 以期竹黄多糖的工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方

**1.1 仪器与试剂** 岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计; GL20-G 冷冻高速离心机; THZ-82 型台式恒温振荡器; 电热式 HHS11.4 型恒温水浴锅。试验试剂均为国产分析纯。

### 1.2 培养基

- 1.2.1 母种斜面培养基。** 马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)。  
**1.2.2 液体种子培养基。** PDA 液体培养基, 分装量为每只 250 ml 容积的摇瓶加入 PDA 液体培养基 50 ml, 摇瓶。  
**1.2.3 碳源优化发酵培养基。** 5 g/L 酵母膏, 1 g/L

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L KCl, 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

**1.2.4 氮源优化发酵培养基。** 20 g/L 葡萄糖, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L KCl, 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

**1.3 菌株** 竹黄(*Shiraia bambusicola* Henn) 子实体采自江苏宜兴丁山林场。子实体用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  表面消毒, 无菌水漂洗, 在无菌条件下对菌丝进行组织分离, 转入母种斜面培养基 26~28 °C 恒温培养, 待有菌丝长出, 立即转管纯化, 分离得到 1 株能产生竹黄多糖的无性株。

### 1.4 培养

**1.4.1 种子培养。** 向活化两次的斜面菌株加入无菌蒸馏水, 制备孢子悬液。将孢子悬液接入液体种子培养基, 于往复摇床(行程 8 cm, 频率 130 r/min) 28 °C 培养 48 h。

**1.4.2 培养基单因子优化试验。** 在初始 pH, 摇瓶装量 1:5 (V/V), 接种量 10% (V/V), 培养温度 30 °C, 摇床转速 120 r/min, 培养周期 120 h 下, 测定不同碳源、氮源和生长因子对多糖产量的影响。

**1.4.3 培养基正交优化试验。** 采用  $L_{27}(3^{13})$  正交设计, 选择碳源、氮源、生长因子的浓度和酸碱度等因子进行正交试验, 还安排了碳源浓度与氮源浓度, 碳源浓度与生长因子浓度, 氮源浓度与生长因子浓度的交互作用考察, 具体的因子水平设计见表 1。

**1.5 多糖浓度的测定** 取发酵液, 3 000 r/min 离心 15 min, 倾去上清液, 湿菌体冷冻干燥至恒重, 50 ml 沸水浸提 4 h, 过滤, 滤渣重复浸提 1 次, 合并滤液, 采用硫酸-苯酚法测定滤液中的总糖浓度<sup>[4]</sup>。采用 3,5-二硝基水杨酸法测定滤液中的还原糖浓度。

**作者简介** 陈佳佳(1982-), 女, 江苏苏州人, 讲师, 从事微生物与生药学研究。

**收稿日期** 2009-05-40

多糖浓度的计算公式:

$$\text{多糖浓度 (mg/ml)} = \text{总糖浓度} - \text{还原糖浓度}$$

多糖得率的计算公式:

$$\text{多糖得率 (\%)} = \text{多糖浓度} \times \text{样品溶液体积} \times 100 / \text{菌丝体干重}$$

表1 正交试验的因子水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	碳源浓度 //g/L Concentration of carbon source (CC)	氮源浓度 //g/L Concentration of nitrogen source (CN)	生长因子浓度 //g/L Concentration of growth factor (CGF)	pH 值 pH value
1	10	4	0	6.0
2	20	8	2	自然
3	30	12	4	7.5

## 2 结果与分析

**2.1 培养基单因子优化试验** 结果表明,无机氮源如  $\text{NH}_4^+$  态盐和  $\text{NO}_3^-$  态盐和有机氮源如蛋白胨、酵母膏和玉米浆均可作为发酵培养基所需氮源,但在培养中应搭配使用,以提高产量。蔗糖和酵母膏是最适合的碳源和氮源(图1、2)。竹黄多糖在生产过程中表现出对玉米浆的依赖性,可

能与玉米浆所含的生长因子的调控有关,故选择玉米浆作为生长因子。

**2.2 发酵培养基正交优化试验** 由结果分析可以看出,碳源、氮源、生长因子和初始 pH 值的影响均呈高度显著,显著程度由高到低依次是碳源浓度 > 生长因子浓度 > 酸碱度 > 氮源浓度,交互作用中只有  $\text{CGF} \times \text{CN}$  有显著影响,根据水平比较和交互表的结果,最佳培养基配比应为:蔗糖 20 g/L,酵母膏 8 g/L,玉米浆 2 g/L,初始 pH 值 6.0。

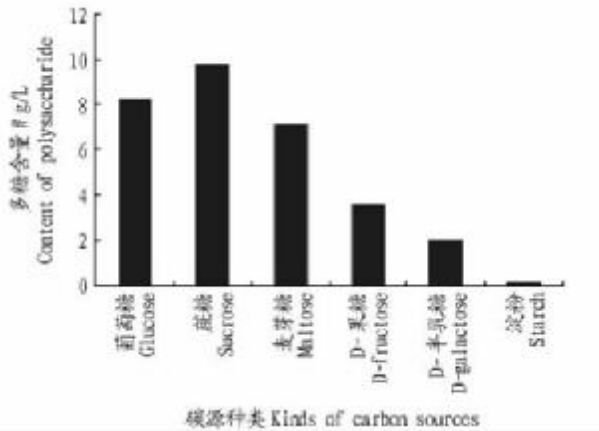


图1 碳源种类对竹黄多糖产量的影响

Fig. 1 Effects of carbon source kinds on the yield of polysaccharide from *Shiraia bambusicola*

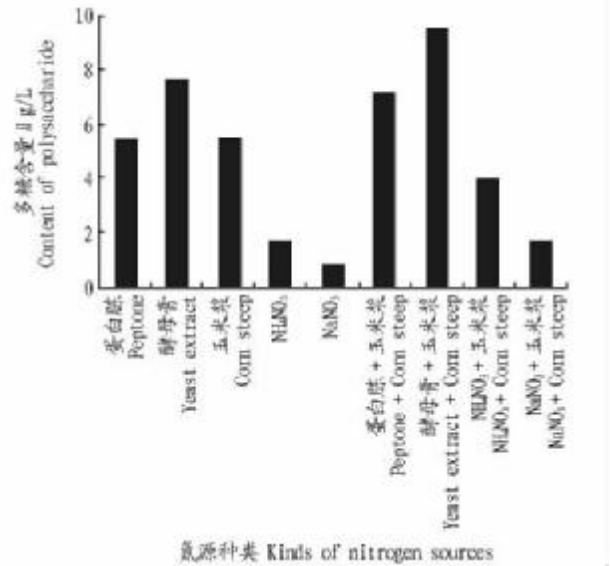


图2 氮源种类对竹黄多糖产量的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source kinds on the yield of polysaccharide from *S. bambusicola*

表2  $L_{27}(3^{13})$  正交试验级差分析结果

Table 2 Rank difference analysis results of  $L_{27}(3^{13})$  orthogonal test

项目 Items	CGF	CN	CC	pH	$\text{CGF} \times \text{CN}$	$\text{CGF} \times \text{CC}$	$\text{CN} \times \text{CC}$
K1	1.640	1.664	0.307	1.702	1.746	1.676	16.332
K2	1.534	1.680	1.725	1.504	1.572	1.623	16.190
K3	1.758	1.637	2.899	1.627	1.614	1.632	16.792
k1	0.546	0.555	0.102	0.565	0.582	0.559	0.544
k2	0.511	0.565	0.575	0.501	0.524	0.541	0.539
k3	0.586	0.526	0.966	0.542	0.538	0.544	0.560
R	0.075	0.039	0.864	0.064	0.058	0.018	0.020

表3  $L_{27}(3^{13})$  正交试验方差分析结果

Table 3 The variance analysis results of  $L_{27}(3^{13})$  orthogonal test

方差来源 Variance sources	变差平方和 ( $10^{-2}$ ) Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 ( $10^{-2}$ ) Mean square	F 比 F ratio	$F_a$	显著性 Significance
CGF	0.999	2	0.500	10.907	$F_{0.1}(2,33) = 2.47$	***
CN	0.572	2	0.286	6.238	$F_{0.05}(2,33) = 3.285$	***
CC	76.376	2	38.188	833.799	$F_{0.01}(2,33) = 5.32$	***
$\text{CGF} \times \text{CN}$	0.323	4	0.081	1.769	$F_{0.1}(4,33) = 2.12$	**
$\text{CGF} \times \text{CC}$	0.138	4	0.034	0.755	$F_{0.05}(4,33) = 2.66$	
$\text{CN} \times \text{CC}$	0.089	4	0.022	0.480	$F_{0.01}(4,33) = 3.94$	
pH	0.605	2	0.303	6.610		***
e	0.179	33	0.022			
T	79.605	53				

量,为 0.64 g/L。且在这 2 个处理组合中的红菇菌丝较其他处理萌发较早,长势快,菌层致密丰厚,菌丝颜色洁白。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test g/L

水平 Level	因素 Factor			
	葡萄糖 Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{ZnSO}_4$	$\text{V}_{\text{B}_1}$
1	15.00	2.07	4.50	0.15
2	20.00	3.45	5.50	0.20
3	25.00	4.38	6.50	0.25

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验结果

Table 2 The results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test g/L

试验号 Test No.	因素 Factor				菌丝生物量 Mycelial biomass
	葡萄糖 Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{ZnSO}_4$	$\text{V}_{\text{B}_1}$	
1	15.00	2.07	4.50	0.15	0.48
2	15.00	3.45	5.50	0.20	0.51
3	15.00	4.83	6.50	0.25	0.33
4	20.00	2.07	5.50	0.25	0.64
5	20.00	3.45	6.50	0.15	0.33
6	20.00	4.83	4.50	0.20	0.57
7	25.00	2.07	6.50	0.20	0.64
8	25.00	3.45	4.50	0.25	0.17
9	25.00	4.38	5.50	0.15	0.43
$K_1$	1.36	1.76	1.22	1.24	
$K_2$	1.54	1.05	1.62	1.76	
$K_3$	1.24	1.33	1.30	1.14	
$R$	0.10	0.24	0.13	0.21	
$K_1^2$	1.85	3.10	1.49	1.54	
$K_2^2$	2.37	1.10	2.62	3.10	
$K_3^2$	1.54	1.77	1.69	1.30	

方差分析结果表明,碳源、氮源、无机盐和生长激素各营养因子对红菇菌丝生长影响作用显著,说明葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$  和  $\text{V}_{\text{B}_1}$  是影响菌丝生长的决定性因子,各因子对红菇菌丝生物量影响程度大小依次为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{V}_{\text{B}_1} > \text{ZnSO}_4 > \text{葡萄糖}$ ,且红菇菌丝生长量的最佳培养基配方为 20% 马铃薯汁 + 葡萄糖 20.00 g/L +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.07 g/L +  $\text{ZnSO}_4$  5.50 g/L +  $\text{V}_{\text{B}_1}$  0.20 g/L +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L。

### 3 结论与讨论

(1) 通过碳源、氮源、无机盐和生长激素优化试验表明,

(上接第 11870 页)

### 3 结论

该试验分离获得的竹黄无性株可通过液态发酵产生竹黄多糖,工艺易于控制,培养基配方简单,pH 偏酸条件下易于产生多糖,最佳液态摇瓶发酵的培养基配方为:蔗糖 20 g/L,酵母膏 8 g/L,玉米浆 2 g/L,pH 6.0,上述培养基配方得到的竹黄多糖产量较高,在摇瓶装量 1:5 (V:V),接种量 10% (V:V),培养温度 28 ℃,摇床转速 120 r/min 的条件下培养 120 h,每升发酵液可获得竹黄多糖 8 g。

过高或过低的营养因子质量浓度都会影响菌丝的生长。过低的碳源浓度不能提供菌丝生长所需足够的  $\text{C}^{2+}$ ,使菌丝生长缓慢,过高的  $\text{C}^{2+}$  浓度则不利于菌丝生长中的无氧呼吸,反而会抑制菌丝的生长;同样,当培养液中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量浓度过低时,菌丝萌发慢,生长慢,当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  质量浓度为 3.45 g/L 时,菌丝生长最快且获得最大菌丝生物量,但随着  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度的增加,红菇菌丝生长放缓,菌丝产量缓慢下降。试验结果表明,最适宜红菇菌丝生长的  $\text{ZnSO}_4$  浓度为 5.50 g/L,在此浓度下,菌丝生长最旺盛且获得生物量最大,继续增加  $\text{ZnSO}_4$  的浓度,菌丝长势放缓;过高或过低的生长激素浓度也不利于红菇菌丝生长,试验中发现,当培养基中不加  $\text{V}_{\text{B}_1}$  或  $\text{V}_{\text{B}_1}$  浓度过低时,菌丝生长缓慢,且菌丝纤弱,呈淡黄色,当  $\text{V}_{\text{B}_1}$  为 0.20 g/L 时,菌丝生长迅速,接种后第 3 天有菌丝萌动,到第 5 天已长满瓶壁,但过高的激素浓度会抑制菌丝的生长,当  $\text{V}_{\text{B}_1}$  浓度为 0.30 g/L 时,菌丝长势缓慢或不生长,稀疏且纤弱,颜色鹅黄,其作用机理还有待进一步研究。

(2) 正交试验表明,碳源、氮源、无机盐和生长激素对红菇菌丝生长都有促进作用,各因素在  $\alpha = 0.05$  的水平上差异显著,说明葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$  和  $\text{V}_{\text{B}_1}$  都是影响红菇菌丝生长的关键因子。适宜该红菇菌丝液体发酵的最佳培养基配方为 20% 马铃薯汁 + 葡萄糖 20.00 g/L +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.07 g/L +  $\text{ZnSO}_4$  5.50 g/L +  $\text{V}_{\text{B}_1}$  0.20 g/L +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L。红菇菌丝体深层发酵条件在进一步研究之中。

### 参考文献

- [1] 许旭萍,李惠珍,黄德鑫. 红菇生态的研究[J]. 中国食用菌, 2001, 20(2): 25-27.
- [2] 宋斌,李泰辉,吴兴亮,等. 中国红菇属种类及其分布[J]. 菌物研究, 2007(3): 20-42.
- [3] 赵志鹏. 松科树种的外生菌根真菌资源及利用[J]. 林业科技通讯, 1990(6): 25-28.
- [4] 上官舟建. 闽西红菇资源与生境考察[J]. 食用菌, 1987(2): 3.
- [5] 陈文新. 土壤和环境微生物学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 210-226.
- [6] 刘斌,莫天砚. 红菇的分离及其培养特征观察[J]. 广西农业大学学报, 1994, 13(4): 345-346.
- [7] 纪大千,顾真荣. 外生菌根菌的培养研究[J]. 食用菌, 1988(2): 5-6.
- [8] 张林. 食用外生菌根菌的分离培养研究[J]. 中国食用菌, 1992, 11(6): 117-119.

### 参考文献

- [1] 王景祥. 竹黄的研究概况[J]. 中草药, 1999, 30(6): 477.
- [2] 钟树荣,赵海,李安明,等. 一种尚待开发的中药——竹黄[J]. 中草药, 2002, 33(4): 372-373.
- [3] 沈萍萍,付庭治. 真菌多糖研究进展[J]. 南京大学学报, 1991, 27(3): 524-527.
- [4] 吕淑霞. 基础生物化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 77-82.
- [5] 贾薇,张劲松,周昌艳. 巴西蘑菇深层发酵培养条件的优化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 85-87.
- [6] 邓勃. 分析测试数据的统计处理方法[M]. 北京: 清华大学出版社, 1995: 190-232.