

# 发酵法生产桑黄胞外多糖条件的研究\*

郭霞<sup>1,2</sup>, 邹祥<sup>2</sup>, 孙敏<sup>1</sup>

1(西南大学生命科学学院, 重庆, 400715) 2(西南大学药学院, 重庆, 400715)

**摘要** 以单因子摇瓶实验和响应面分析对药用真菌桑黄培养基进行了优化, 确定了优化培养基(g/L): 蔗糖 50、玉米浆 3.0、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10.0、 $\text{MgSO}_4$  1.0、 $\text{CaCl}_2$  3.0、 $\text{VB}_1$  200  $\mu\text{g/L}$ 。在优化条件下, 研究了 0~168 h, 桑黄发酵 pH、总糖、还原糖、胞外多糖、生物量的变化情况。摇瓶发酵结果表明, 整个过程中 pH 变化不明显, 总糖含量先降后升, 生物量先增后趋于稳定, 于 120 h 达最大值 11.012 g/L, 胞外多糖在 144 h 达最大 2.594 g/L, 生产强度为 0.018 g/(L·h)。经 7 L 发酵罐放大实验表明, 桑黄代谢与摇瓶存在一定差异, 胞外多糖的合成速度更快, 于 120 h 达最大值 3.283 g/L, 生产强度为 0.027 g/(L·h), 与摇瓶相比分别提高了 26.5% 和 50%。

**关键词** 桑黄, 优化培养基, 生物量, 胞外多糖

桑黄(*Phellinus linteus*)学名鲍氏木层多孔菌, 属担子纲, 多孔菌目, 多孔菌科, 是一种珍稀的食药两用真菌, 主要活性成分为桑黄多糖, 目前国内外开展了桑黄多糖的抗肿瘤<sup>[1,2]</sup>、增强免疫<sup>[3]</sup>、抗纤维化<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、降血糖<sup>[6]</sup>等药理学方面的研究。由于桑黄多糖具有显著的抗肿瘤效果和其他药用功效, 市场需求很大, 前景较好<sup>[7]</sup>, 但桑黄野生资源稀少, 人工栽培难度较大, 价格昂贵, 采用液态深层培养技术进行桑黄大规模培养将具有广阔的前景, 国内对桑黄液态培养少见相关报道<sup>[8,9]</sup>。为此, 作者以桑黄生物量和多糖为目标产物, 采用单因子实验和响应面分析法对桑黄发酵培养基、发酵过程参数变化进行了系统研究, 并在 7 L 发酵罐进行了初步放大实验, 为大规模利用这一珍稀食药两用资源以及后续进一步产业化放大提供了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

桑黄(*Phellinus linteus*)菌株, 由西南大学药学院制药工程研究室筛选保藏。

### 1.2 培养基(g/L)

斜面培养基: PDA 培养基, 添加 2% 琼脂。

种子培养基: PDA 培养基添加麦芽粉 10.0、酵母粉 3.0。

### 1.3 培养条件

摇瓶发酵培养: 250 mL 摇瓶装样量 50 mL, 转速 170 r/min。发酵罐培养: 7 L 发酵罐装样量 5 L, 转速

140 r/min, 通气量 1:0.8。培养条件: 温度 25℃, 初始 pH6.5, 接种量体积分数为 10%, 培养周期 168 h。

### 1.4 分析方法

(1) 还原糖和总糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法测还原糖<sup>[10]</sup>; 苯酚硫酸法测总糖<sup>[10]</sup>。

(2) 菌丝生物量的测定: 取培养液 3 500 r/min 离心 15 min, 蒸馏水洗涤, 收集菌丝烘干至恒重后称重。

(3) 胞外多糖的测定: 采用乙醇分步沉淀法<sup>[11]</sup>。

### 1.5 工艺参数优化

(1) 采用单因素摇瓶实验法, 在摇瓶水平上对不同碳氮源、无机盐及其浓度进行筛选。

(2) 采用响应面分析对摇瓶单因素发酵结果进行优化, 设计了 4 因素 3 水平的实验, 以桑黄胞外多糖为响应值。因素与水平之间的安排见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平表

因素	水平		
	-1	0	1
蔗糖( $X_1$ )/g·L <sup>-1</sup>	20	35	50
玉米浆( $X_2$ )/g·L <sup>-1</sup>	2	4	6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $X_3$ )/g·L <sup>-1</sup>	2	6	10
$\text{MgSO}_4$ ( $X_4$ )/g·L <sup>-1</sup>	1	2	3

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素摇瓶实验

#### 2.1.1 碳源的筛选

基本培养基(g/L): 蛋白胨 5.0、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0、 $\text{MgSO}_4$  2.0、 $\text{CaCl}_2$  1.0、 $\text{VB}_1$  200  $\mu\text{g/L}$ , 分别添加蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露糖、果糖、酵母膏 30.0 为碳源。摇床培养 168 h, 测菌丝和胞外多糖产量。由表 2 可知, 桑黄菌可以利用多种碳源, 不同碳源对菌丝和胞外多

第一作者: 硕士研究生(邹祥为通讯作者)。

\* 重庆市自然科学基金项目(CSTC, 2005BB1101)

收稿日期: 2006-09-28, 改回日期: 2006-12-11

糖产量有一定的影响,其中蔗糖作为碳源,菌丝和胞外多糖产量较高。故筛选蔗糖为最适碳源。

表 2 碳源对桑黄菌生物量和胞外多糖的影响

碳源	甘露糖	蔗糖	葡萄糖	乳糖	果糖	酵母膏
菌丝体含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$10.700 \pm 0.001$	$10.731 \pm 0.081$	$11.900 \pm 0.248$	$10.371 \pm 0.259$	$9.628 \pm 0.088$	$9.697 \pm 0.235$
EPS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.996 \pm 0.001$	$3.08 \pm 0.762$	$1.791 \pm 0.421$	$2.919 \pm 0.651$	$2.341 \pm 0.319$	$2.915 \pm 0.811$

2.1.2 氮源的筛选

基本培养基(g/L):乳糖 30.0、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0、 $\text{MgSO}_4$  2.0、 $\text{CaCl}_2$  1.0、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  200 $\mu\text{g}$ ,分别添加牛肉膏、鱼粉、玉米浆、蛋白胨 5.0 为氮源,结果见表 3。可知,桑黄菌可以利用多种氮源,鱼粉为氮源时菌丝生物量最大,但多糖产量较低。以玉米浆为氮源时多糖产量最高,生物量仅次于鱼粉,考虑到成本和胞外多糖产量,筛选玉米浆为最适氮源。

表 3 氮源对桑黄菌生物量和胞外多糖的影响

氮源	牛肉膏	鱼粉	玉米浆	蛋白胨
菌丝体含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.763 \pm 0.145$	$8.538 \pm 0.132$	$8.153 \pm 0.063$	$8.139 \pm 0.131$
EPS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.866 \pm 0.852$	$2.528 \pm 0.224$	$3.091 \pm 0.143$	$2.449 \pm 0.499$

2.1.3 无机盐浓度筛选

基本培养基(g/L):乳糖 30.0、蛋白胨 5.0、 $\text{V}_{\text{B}_1}$

200  $\mu\text{g}$ ,分别添加不同浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$  进行液体培养,结果见表 4 和表 5。可见,  $\text{CaCl}_2$  浓度的增加对胞外多糖产量增幅不明显;  $\text{MgSO}_4$  浓度为 1.5 g/L 时,胞外多糖产量最大;随着  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度的增加,胞外多糖产量不断增加,添加至 4.5 g/L 时,达到最大,菌丝产量也较高。

表 4  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgSO}_4$  浓度对桑黄菌生物量和胞外多糖的影响

$\text{CaCl}_2$ 浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0
桑黄菌生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$6.131 \pm 0.571$	$7.053 \pm 0.27$	$7.387 \pm 0.095$	$8.243 \pm 0.297$
EPS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.214 \pm 0.355$	$2.365 \pm 0.184$	$2.504 \pm 0.576$	$2.885 \pm 0.545$
$\text{MgSO}_4$ 浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0
桑黄菌生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$6.882 \pm 0.648$	$7.835 \pm 0.207$	$6.96 \pm 0.384$	$7.253 \pm 0.151$
EPS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.680 \pm 0.528$	$2.867 \pm 0.377$	$3.192 \pm 0.466$	$2.686 \pm 0.485$

表 5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度对桑黄菌生物量和胞外多糖的影响

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5
桑黄菌生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$5.830 \pm 0.717$	$6.099 \pm 0.831$	$5.080 \pm 0.588$	$7.332 \pm 0.162$	$6.374 \pm 0.069$
EPS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.260 \pm 0.390$	$3.041 \pm 0.510$	$3.344 \pm 0.360$	$4.725 \pm 0.290$	$6.22105 \pm 0.675$

2.1.4 响应面分析实验

在单因素实验结果的基础上,利用 SAS 软件进行响应面优化分析,以蔗糖、玉米浆、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为自变量,多糖产量为响应值,以确定各因素对胞外多糖产量影响的显著性和各组分最佳组合,结果见表 6,响应面分析结果见表 7。

表 6 培养基的实验设计与结果

序号	$X_1$ (蔗糖) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_2$ (玉米浆) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_3$ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_4$ ( $\text{MgSO}_4$ ) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	响应值 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	-1	-1	0	0	$3.156 \pm 0.105$
2	-1	1	0	0	$3.443 \pm 0.689$
3	1	-1	0	0	$5.206 \pm 0.463$
4	1	1	0	0	$5.006 \pm 1.208$
5	0	0	-1	-1	$6.626 \pm 1.149$
6	0	0	1	1	$5.850 \pm 0.001$
7	0	0	1	-1	$7.814 \pm 0.269$
8	0	0	0	1	$3.916 \pm 0.256$
9	-1	0	0	-1	$4.858 \pm 0.313$
10	-1	0	0	1	$6.860 \pm 1.760$
11	1	0	0	-1	$4.561 \pm 1.009$
12	1	0	1	1	$7.156 \pm 1.691$
13	0	-1	-1	0	$5.295 \pm 1.329$

续表 6

序号	$X_1$ (蔗糖) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_2$ (玉米浆) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_3$ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$X_4$ ( $\text{MgSO}_4$ ) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	响应值 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
14	0	-1	1	0	$5.416 \pm 0.151$
15	0	1	-1	0	$3.133 \pm 0.344$
16	0	1	1	0	$4.166 \pm 1.084$
17	-1	0	-1	0	$5.544 \pm 1.560$
18	-1	0	1	0	$3.149 \pm 0.536$
19	1	0	-1	0	$3.240 \pm 0.303$
20	1	0	1	0	$5.751 \pm 0.814$
21	0	-1	0	-1	$3.448 \pm 0.234$
22	0	-1	0	0	$3.116 \pm 0.298$
23	0	1	0	0	$2.959 \pm 0.449$
24	0	1	0	0	$4.187 \pm 0.617$
25	0	0	0	0	$4.535 \pm 1.596$
26	0	0	0	0	$4.155 \pm 0.497$
27	0	0	0	0	$3.602 \pm 0.001$

表 7 响应面分析结果

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
$X_1$	1	0.070334	0.070334	0.821502	0.382581
$X_2$	1	0.029703	0.029703	0.346926	0.566781
$X_3$	1	2.559E-6	2.559E-6	0.00003	0.995728
$X_4$	1	0.008038	0.008038	0.093889	0.764542

由表 7 可知,对桑黄胞外多糖产量的影响显著因素为蔗糖>玉米浆>  $\text{MgSO}_4$ >  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,各因素经回归拟合后,解得回归方程:  $Y_1 = 1.405876 + 0.076558X_1 - 0.049752X_2 - 0.000462X_3 + 0.025882X_4 + 0.083151X_1X_1 - 0.031603X_1X_2 + 0.284858X_1X_3 + 0.026384X_1X_4 - 0.161916X_2^2 + 0.112094X_2X_4 + 0.139416X_3^2 - 0.162711X_3X_4 + 0.161091X_4^2$ 。

运用 SAS 程序求解最佳点,可得  $X_1=1, X_2=-0.5, X_3=1, X_4=-1$ ,即蔗糖 50 g/L、玉米浆 3.0 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10.0 g/L、 $\text{MgSO}_4$  1.0 g/L 为最佳发酵培养基。

## 2.2 桑黄摇瓶发酵周期实验:

为了对桑黄发酵过程做全面了解,掌握其液体发酵的一些规律,在以上研究的基础上进行摇瓶发酵周期实验,结果见图 1。

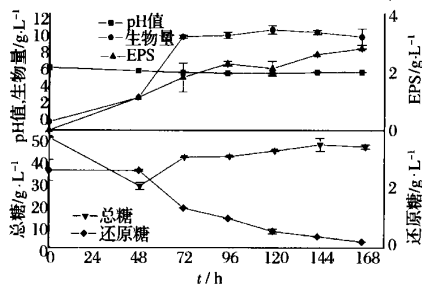


图 1 桑黄摇瓶发酵过程参数变化

可见,发酵开始至 48 h,种子逐渐适应新的培养环境,菌体增长缓慢,总糖含量降低,还原糖、pH 稳定;48~72 h 后菌体、EPS、总糖迅速增加,同时还原糖、pH 缓慢下降。pH 下降可能是因为桑黄菌的生长产生了少量的酸,同时发酵液有浓郁的水果香味,菌球明显,镜检菌丝粗壮,说明菌丝生长进入对数期;72~120 h 菌丝增长缓慢,可能有 2 方面的原因:一方面,随着发酵的进行,培养基营养成分含量降低和代谢产物的积累;另一方面,菌球直径增大,营养物质和溶氧向内传递越来越困难,菌丝球的增大仅局限于其外缘部分,使得菌体增加缓慢,进入停滞期。120 h 菌丝达最大产量 11.012 g/L, pH 开始回升;144 h 胞外多糖达到 2.594 g/L,菌体产量下降;168 h 发酵液颜色加深。可能是由于部分菌丝自溶,胞内的多糖和色素进入发酵液。因此,在本研究中摇瓶桑黄多糖生产的最佳生产周期为 144 h。

## 2.3 7 L 发酵罐放大实验

以摇瓶发酵实验为基础,在 7 L 机械搅拌式发酵

罐上进行桑黄发酵放大实验。结果如图 2。与摇瓶不同的是:在 120 h 胞外多糖达到最大产量 3.283 g/L。pH 在 120 h 后没有回升,而是继续缓慢下降,还原糖、菌丝体含量增加,同时胞外多糖开始迅速降低,其降低的原因可能是菌丝降解胞外多糖为生长提供能量。因此,在本实验中 120 h 应为罐上的发酵终点。菌丝、胞外多糖产量较摇瓶都有所提高,说明放大实验基本成功,与 Hwang 等人<sup>[12]</sup>在 5 L 的发酵罐中的研究相比,胞外多糖产量相当,但缩短了发酵周期,提高了生产效率。但是,在 120 h 后, pH 降低,还原糖、菌丝体含量增加,与摇瓶发酵表现明显的差异,表明在发酵罐中由于机械搅拌剪切等工程行为对桑黄菌代谢的影响还需要大量深入的研究。

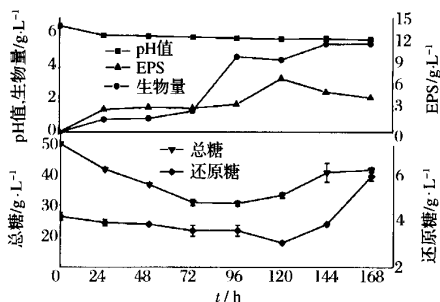


图 2 桑黄 7 L 发酵罐发酵过程参数变化

## 3 结 论

随着桑黄多糖药用价值的不断开发,桑黄多糖的研究越来越受到广大研究者的重视。通过对桑黄培养基的优化,提高了桑黄发酵水平。考察了不同营养因子的影响,结合工业化生产实践,选择蔗糖为碳源,玉米浆为氮源,具有一定的实际生产意义。在初始 pH 6.5、摇瓶装液量 50 mL/250 mL、接种量 10%、温度 25℃、转速 170 r/min 的条件下,菌丝产量可达 11.012 g/L,与未优化前相比提高 2.3 倍;胞外多糖产量 2.594 g/L,提高 1.9 倍。通过对桑黄培养过程的 pH、总糖、胞外多糖、生物量的变化研究分析,确定了摇瓶培养胞外多糖的最佳生产周期为 144 h,产量可达 2.594 g/L,生产强度为 0.018 g/L h;7 L 发酵罐中桑黄胞外多糖产量在 120 h 最高可达 3.283 g/L,生产强度为 0.027 g/L h,和摇瓶相比分别提高了 26.5% 和 50%,放大过程的成功将为进一步大规模生产试验提供了一定的参考价值。

## 参 考 文 献

- 1 Sang Bae Han, Chang Woo Lee, Young Jin Jeon, et al.

- The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis[J]. Immunopharmacology, 1999, 41(2): 157~164
- 2 温克, 陈劲, 李红, 等. 桑黄等四种抗癌药物活性比较[J]. 吉林大学学报, 2002, 28(3): 247~249
  - 3 Hwan Mook Kim, Sang Bae Han, Goo Taeg Oh, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus* [J]. International Journal of Immunopharmacology, 1996, 18(5): 295~303
  - 4 张万国, 胡晋红, 蔡琴. 桑黄调节细胞因子及其在抗纤维化中的意义[J]. 中国新药杂志, 2003, 2(6): 19~20
  - 5 Yun Seon Song, Sun-Hyoung Kim, Jae-Hoon Sa, et al. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 88(1): 113~116
  - 6 Dong-Hyun Kim, Byung-Keun Yang, Sang-Chul Jeong, et al. Production of a hypoglycemic extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus* [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(7): 513~517
  - 7 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
  - 8 陈瑞蕊, 施亚琴, 林先贵, 等. 珍稀药用真菌桑黄菌液体培养条件的初步研究[J]. 中国食用菌, 2004, 24(1): 41~44
  - 9 樊锦艳, 王秋颖, 薛梅, 等. 桑黄胞外多糖生产培养基的初步研究[J]. 食品科技, 2004(2): 93~95
  - 10 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1981
  - 11 肖彩霞, 王玉红, 章克昌. 黑木耳深层发酵工艺条件的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 70~72
  - 12 Hye-Jin Hwang, Sang-Woo Kim, Jang-Won Choi, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC6190 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 309~319

## Study on the Process Condition of Exopolysaccharide Production by Medicinal Mushroom *Phellinus linteus*

Guo Xia<sup>1,2</sup>, Zou Xiang<sup>2</sup>, Sun Min<sup>1</sup>

1(School of Life sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

2(School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**ABSTRACT** The optimal medium of *Phellinus linteus* were determined by using the single factor experiment and Response Surface Analysis in the flask, which were composed of sucrose 50.0 g/L, corn steep powder 3.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10.0 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.0 g/L,  $\text{CaCl}_2$  3.0 g/L and  $\text{V}_B$  200  $\mu\text{g/L}$ . Many parameters such as pH, total sugar, residual sugar, exopolysaccharide production and biomass were detected in the optimal medium in the shake flask. It showed that the change of pH was not obvious during the cultivation; the content of total sugar was decreased at the first and then increased after on. The maximum biomass was 11.012 g/L at the 120 h, and the maximum EPS production and productivity were 2.594 g/L and 0.018 g/(L · h) at 144 h, respectively. The changes of process parameters between the shake flask and the 7 L stirred bioreactor were quite different. The maximum EPS production and productivity were 3.283 g/L and 0.027 g/L h in the fermentor, increased by 26.5% and 50% compared with that in flask.

**Key words** *Phellinus linteus*, optimal medium, biomass, exopolysaccharide

信息窗

### 法国推出新型即食蘑菇

在法国巴黎 Sial 国际食品展上, 法国蘑菇种植者协会推出的一款新型即食蘑菇获得创新奖。这款产品的包装内有樱桃西红柿、新鲜双孢蘑菇和胡萝卜片, 并配有沙拉酱。产品净重 230g, 热量为 104cal, 这也是法国蘑菇种植者协会一贯强调其产品具有的健康特性——低热量。推出这款新产品的原因是食用菌市场竞争异常激烈。