

## 采用均匀设计法优化榆耳液态发酵培养基的研究\*

陶申傲, 蔡永峰, 岳国海, 程 池

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心, 北京, 100027)

**摘 要** 考察了摇瓶发酵培养中碳源、氮源、无机盐等因素对榆耳发酵生物量和发酵液抑菌活性的影响, 通过均匀设计实验对培养基进行了优化。结果表明, 在接种量为 10% (v/v)、28℃、160 r/min 培养 8 d 的条件下, 当培养基组成为蔗糖 0.1%、玉米淀粉 5.0%、麸皮 2.3%、脱脂蛋白粉 3.4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35%、 $\text{MgSO}_4$  0.23%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量时, 摇瓶发酵生物量可达 16.1 g/L; 当培养基组成为蔗糖 4.5%、玉米淀粉 5.0%、麸皮 0.1%、脱脂蛋白粉 0.1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35%、 $\text{MgSO}_4$  0.23%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量时, 发酵液抑菌活性最强, 分别相当于 490 u/mL 青霉素钾、3% 苯甲酸钠的抑菌效果。

**关键词** 榆耳, 发酵, 抑菌活性, 均匀设计

榆耳 (*Gloeostereum incarnatum* Ito et Imai), 学名肉红胶韧革菌, 属皱孔菌目伏革菌科胶韧革菌属<sup>[1]</sup>, 是我国传统的药食兼用真菌, 榆耳子实体和发酵产物营养丰富, 抑菌谱广, 抑菌活性强, 发酵液多糖具有增强机体免疫活性和抑制肿瘤等生理作用<sup>[2,3]</sup>, 在食品防腐保鲜、临床医药制剂和绿色饲料添加剂等领域有着广泛的潜在应用价值, 是一种亟待开发利用的传统药膳真菌。目前国内外针对榆耳菌液体深层发酵技术尚处于初步探索阶段。笔者在前期研究中发现, 液态发酵榆耳时生物量较低、培养时间长、发酵液抑菌活性不稳定。

均匀设计是著名数学家方开泰和王元创立的一种用于多因素优化的实验设计方法<sup>[4]</sup>, 近来在生化、微生物工程等方面应用也越来越多<sup>[5~8]</sup>。文中在考察了碳源、氮源、无机盐等培养基因素对榆耳的发酵生物量和抑菌活性影响的基础上, 应用均匀设计法对榆耳液态发酵培养基进行优化研究, 大大提高了榆耳液体发酵的生物量和发酵液的抑菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种

榆耳 (*Gloeostereum incarnatum* Ito et Imai) CICC 14036, 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) CICC 10285, 均由中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC) 提供。

#### 1.1.2 主要试剂及仪器

第一作者: 硕士, 助理工程师。

\* 国家科技基础条件平台项目 (No. 2005DKA21204)

收稿日期: 2007-08-16

试验所用碳、氮源、无机盐和  $\text{V}_{\text{B}_1}$  均为国产分析纯或生化试剂; 抑菌试验所用琼脂为日本进口分装; 土豆、玉米淀粉、脱脂蛋白粉、细玉米粉均为市售; 青霉素钾片剂 ( $1.6 \times 10^6$  u/g), 市售; 苯甲酸钠, 分析纯试剂。

全温振荡器, 培养箱, 天平, 离心机, pH 计, 牛津杯 (10 mm × 7.8 mm × 6 mm), 超净工作台。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基: PDA 培养基。

液体种子培养基: 细玉米粉 (过 100 目筛) 3%、蛋白胨 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4$  0.15%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量。

基本培养基: (1) 碳源试验用: 蛋白胨 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4$  0.15%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量, pH 自然。(2) 氮源试验用: 玉米淀粉 3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{MgSO}_4$  0.08%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量, pH 自然。

细菌培养及抑菌试验用培养基见文献<sup>[9]</sup>。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 培养方法

液体种子: 自长好的榆耳斜面挑取黄豆粒大小菌丝团接入装有种子培养基的三角瓶。装量 500 mL 三角瓶装 100 mL, 28℃、170 r/min 培养 5 d 待用。

摇瓶发酵: 250 mL 三角瓶装液 50 mL, 接种量 10%, 28℃、160 r/min 培养 7~10 d。

### 1.2.2 生物量和发酵液抑菌直径的测定

(1) 生物量: 按常规方法测定, 3 000 r/min 离心 20 min, 清水洗涤后 80℃ 烘干至恒重。

(2) 抑菌活性: 采用杯碟法<sup>[9]</sup>测定抑菌直径。以标准菌株 CICC10285 为指示菌, 实验操作见文献<sup>[10]</sup>, 依平皿大小、待测样个数用微量移液器加入待

测液 0.1 或 0.2 mL。

1.2.3 发酵液抑菌活性的评价

针对发酵液抑菌活性成分尚不清楚的特殊情况，采用青霉素钾标准品和苯甲酸钠为参照，对其抑菌活性进行对比评价。以青霉素钾为参照时，采用文献[11]的二剂量法进行实验；采用苯甲酸钠为参照时，配制浓度为 2%、3%、4% 的苯甲酸钠溶液与之进行抑菌直径的比较。

2 结果与分析

2.1 碳源对生物量和发酵液抑菌活性的影响

如图 1 所示，9 种试验碳源中玉米淀粉发酵时生物量最高，其次为乳糖、葡萄糖、蔗糖；同样玉米淀粉发酵时抑菌活性最强，果糖做碳源时抑菌活性很低，不同碳源之间发酵液抑菌活性差别很大。

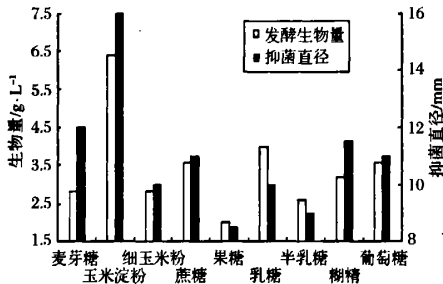


图 1 不同碳源对发酵液生物量和抑菌活性的影响  
(发酵液加样量为 0.1 mL)

2.2 氮源对生物量和发酵液抑菌活性的影响

如图 2 所示，9 种试验氮源中脱脂蛋白粉的发酵生物量最高，其次为酵母膏、豆饼粉、麸皮；抑菌活性最强的为麸皮，其次是豆饼粉、脱脂蛋白粉和酵母膏。

2.3 组合碳、氮源对生物量和发酵液抑菌活性的影响

由 2.1 和 2.2 试验结果分别确定了 4 组碳源和

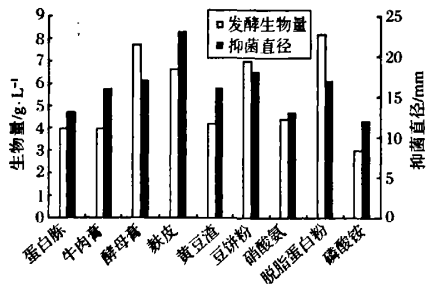


图 2 不同氮源对发酵液生物量和抑菌活性的影响  
(发酵液加样量为 0.2 mL)

4 组氮源组合，以一定量加入基本培养基中进行发酵。结果如表 1 所示，碳源组合为玉米淀粉 3%+蔗糖 1%时，生物量和抑菌直径均最佳，氮源组合为麸皮 0.3%+脱脂蛋白粉 0.1%时生物量和抑菌直径均最高。

表 1 不同组合碳源和组合氮源发酵试验结果

	试验组合	抑菌直径	生物量
		/mm	/g · L <sup>-1</sup>
碳源	玉米淀粉 3%+蔗糖 1%	19.0	8.25
	玉米淀粉 3%+麦芽糖 1%	15.0	4.25
	玉米淀粉 3%+葡萄糖 1%	11.0	6.25
	玉米淀粉 3%+乳糖 1%	15.0	4.5
氮源	麸皮 0.3%+硝酸铵 0.1%	22.0	5.75
	麸皮 0.3%+酵母膏 0.1%	22.0	8.5
	麸皮 0.3%+脱脂蛋白粉 0.1%	23.0	10.5
	麸皮 0.3%+豆饼粉 0.1%	21.0	9.0

注：本抑菌试验中牛津杯内加样量为 0.2 mL。

2.4 均匀设计优化培养基组成

2.4.1 均匀设计试验方案及试验结果

根据以上实验结果，确定蔗糖、玉米淀粉、麸皮、脱脂蛋白粉、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> 为考察对象，采用 6 因素 12 水平 12 组试验的方式 U<sub>13</sub>(13<sup>12</sup>)考察 6 种成分对生物量和发酵液抑菌活性的影响，实验方案和结果见表 2，对应抑菌平板见图 3。

表 2 培养基配方均匀设计方案及实验结果

试验号	蔗糖(X <sub>1</sub> ) /%	玉米淀粉(X <sub>2</sub> ) /%	麸皮(X <sub>3</sub> ) /%	脱脂粉(X <sub>4</sub> ) /%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (X <sub>5</sub> ) /%	MgSO <sub>4</sub> (X <sub>6</sub> ) /%	生物量(Y) /g · L <sup>-1</sup>	抑菌直径(D) /mm
1	4.5	1.0	1.1	2.2	0.26	0.19	6.25	14.0
2	4.1	1.8	2.3	0.7	0.14	0.13	4.0	15.0
3	3.7	2.6	0.9	3.1	0.02	0.07	6.25	9.0
4	3.3	3.4	2.1	1.6	0.29	0.01	7.75	15.0
5	2.9	4.2	0.7	0.1	0.17	0.21	4.0	22.0
6	2.5	5.0	1.9	2.5	0.05	0.15	14.5	15.0
7	2.1	0.6	0.5	1.0	0.32	0.09	2.5	13.0
8	1.7	1.4	1.7	3.4	0.20	0.03	6.25	11.0
9	1.3	2.2	0.3	1.9	0.08	0.23	5.0	13.0
10	0.9	3.0	1.5	0.4	0.35	0.17	4.5	18.0
11	0.5	3.8	0.1	2.8	0.23	0.11	8.0	16.0
12	0.1	4.6	1.3	1.3	0.11	0.05	9.0	17.0

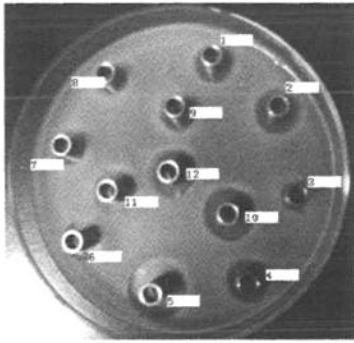


图3 均匀设计试验样的抑菌平板  
(发酵液加样量为0.1 mL)

#### 2.4.2 试验数据的回归分析及方程的建立<sup>[12]</sup>

采用 DPS v3.01 统计软件对表2数据进行多元线性回归分析,结果如下:

(1) 生物量  $Y$  和各因素关系的方程:  $Y = -5.02 + 1.61X_2 + 1.59X_3 + 1.98X_4 + 3.04X_5 + 8.89X_6$ , 线性相关系数  $R = 0.917$ ,  $F = 6.31$ , 回归方程显著, 对应最优组成为: 蔗糖 0.1%, 玉米淀粉 5.0%, 麸皮 2.3%, 脱脂蛋白粉 3.4%,  $KH_2PO_4$  0.35%,  $MgSO_4$  0.23%, 预测最优结果为 16.5 g/L, 实测均值为 16.1 g/L, 与预测值相近且高于前 12 组试验值。

(2) 抑菌直径  $D$  和各因素关系的方程:  $D = 9.484 + 0.096X_1 + 1.538X_2 - 0.192X_3 - 1.410X_4 + 11.538X_5 + 11.538X_6$ , 线性相关系数  $R = 0.943$ ,  $F = 6.71$ , 回归方程显著, 对应最优组成为: 蔗糖 4.5%, 玉米淀粉 5.0%, 麸皮 0.1%, 脱脂蛋白粉 0.1%,  $KH_2PO_4$  0.35%,  $MgSO_4$  0.23%, 预测最优结果为 23.8 mm (略大于 5 号样直径 22 mm)。验证实验表明, 此发酵液抑菌活性略强于 5 号试验发酵液。

#### 2.5 发酵液抑菌活性评价

对 2.4 中优化后的发酵液进行抑菌活性二剂量法实验测定, 结果见表 3。将表 3 数据代入公式:  $lg Cu = \frac{(Un + Ul) - (Sh + Sl)}{(Un + Sh) - (Ul + Sl)} \times lgA$ , 计算得  $Cu = 490$  u/mL, 即发酵液抑菌活性相当于效价为 490 u/mL 的青霉素钾液。

与不同浓度苯甲酸钠溶液的比较实验结果见表 4, 发酵液相当于 3% 苯甲酸钠溶液的抑菌效果。

表3 发酵液抑菌效价的二剂量法测定结果

实验样	抑菌直径/mm			实验均值/mm
标准液 ( $C_s = 400$ u/mL)	19.0	18.0	19.0	$Sh = 18.7$
标准稀释液 (100 u/mL)	15.0	14.0	14.5	$Sl = 14.5$
待测发酵液 ( $C_u$ )	19.0	18.0	20.0	$U_h = 19.0$
待测发酵稀释液	15.0	15.0	16.0	$U_l = 15.3$

表4 发酵液与不同浓度苯甲酸钠溶液的抑菌活性比较

实验样	苯甲酸溶液/%			发酵液
	2	3	4	
抑菌直径/mm	16.0	19.5	25.0	20.3

### 3 结论

分别以生物量和发酵液抑菌活性为优化指标, 在单因素实验基础上通过均匀设计法对榆耳液体发酵培养基组成进行了优化研究。结果表明, 当培养基组成为蔗糖 0.1%、玉米淀粉 5.0%、麸皮 2.3%、脱脂蛋白粉 3.4%、 $KH_2PO_4$  0.02%、 $MgSO_4$  0.23%、VB1 微量时, 摇瓶发酵生物量可达 16.1 g/L; 当培养基组成为蔗糖 4.5%、玉米淀粉 5.0%、麸皮 0.1%、脱脂蛋白粉 0.1%、 $KH_2PO_4$  0.35%、 $MgSO_4$  0.23%、VB1 微量时, 发酵液抑菌活性最强, 实验条件下分别相当于 490 u/mL 青霉素钾液和 3% 苯甲酸钠的抑菌效。

#### 参考文献

- 徐锦堂主编. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996
- 刘瑞君, 李凤珍. 榆耳多糖的分离及其性质的研究[J]. 微生物学杂志, 1994, 12(1): 17~22
- 李典忠. 吉林农业大学博士学位论文[D], 2002: 40~50
- 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表[M]. 1994
- 李野, 张小平, 张克强, 等. 蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 发酵条件探讨及培养基优化[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 45~49
- 李永红, 刘波, 赵宗保, 等. 圆红冬孢酵母菌发酵产油脂培养基及发酵条件的优化研究[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 650~656
- 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养基的优化研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 110~113
- 高兴蓉, 姚善径, 朱健, 等. 麦考酚酸产生菌液体发酵条件的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(4): 273~276
- 杜连祥编著. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 189~190
- 陶申傲, 李绩, 岳国海, 等. 榆耳发酵液抑菌成分的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 33~36
- 郭勇. 现代生化技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社,

12 李云雁,胡传荣编著.实验设计与数据处理[M]. 2005,

Study on Liquid Fermentation Medium of *Gloeostereum incarnatum*

Ito et Imai by Uniform Design

Tao Shenao, Cai Yangfeng, Yue Guohai, Cheng Chi

(China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

**ABSTRACT** The effects of medium factors including carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts on *Gloeostereum incarnatum* Ito et Imai fermentation biomass and antibacterial activity were studied. Uniform design was applied to optimize composition of culture medium. When incubation, fermentation temperature and rotator speed were 10%(v/v), 28℃, 160 r/min respectively, the results show that the biomass can reach up to 16.1g/L when the medium contains 0.1% sucrose, 5.0% cornstarch, 2.3% bran, 3.4% degreased soybean powder, 0.35%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.23%  $\text{MgSO}_4$ , minim  $V_{B1}$ . The fermentation antibacterial activity can reach up to 490u/ml Penicillin potassium and 4% Sodium benzoate when the medium contains 4.5% sucrose, 5.0% cornstarch, 0.1% bran, 0.1% degreased soybean powder, 0.35%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.23%  $\text{MgSO}_4$ , minim  $V_{B1}$ .

**Key words** *Gloeostereum incarnatum* Ito et Imai, fermentation, antibacterial activity, uniform design

## 《食品营养标签管理规范》正式发布

卫生部 2008 年 1 月 11 日公布了《食品营养标签管理规范》(以下简称《规范》),并将于 2008 年 5 月 1 日起施行。《规范》将预包装食品的营养标注分为营养成分表、营养声称和营养成分功能声称等三部分,并制定了详细的标准。

食品营养标签是消费者了解预包装食品营养成分和特征的依据,也是根据自己健康需要选择食品的依据,可以帮助消费者更好地选购食品,以达到平衡膳食、有效预防和减少营养性疾病的目的,同时也是消费者保障自己知情权的一个手段。

食品营养标签是向消费者提供食品营养成分信息和特性的说明,显示了食品的营养特性和相关营养学信息,包括营养成分表、营养声称和营养成分功能声称。营养成分表是标有食品营养成分名称和含量的表格,《规范》规定,食品企业标示食品营养成分、营养声称、营养成分功能声称时,应首先标示所含能量以及蛋白质、脂肪、碳水化合物、钠等 4 种核心营养素及其含量。这是因为它们在我国最具有公共卫生意义,如果缺乏可以引起营养不良、影响儿童和青少年生长发育和健康,而过量摄入会导致肥胖和慢性病发生发展,如我国居民钠的摄入量远远高于每天 6g 的推荐量,导致高血压等疾病日益增加。营养成分还包括糖、膳食纤维、维生素和矿物质等营养元素。营养标签中营养成分标示以每 100g(mL)或每份食品中的含量数值标示。《规范》强调,营养成分的含量不可以再用范围值标示,以前在标签上见到的“≤XX”、“≥XX”,“40~100”等标示方式将不能使用,必须用具体的含量数值来表示。

《规范》规定,营养声称是指食品营养标签上对食物营养特性的确切描述和说明,声称用语包括“含有”、“高”、“低”或“无”等专用词。当固体食品的蛋白质含量 $\geq 12\text{g}/100\text{g}$ 或液体食品的蛋白质含量 $\geq 6\text{g}/100\text{mL}$ 时,均可以声称“高蛋白”或“富含蛋白质”;每 100g 食品中糖含量 $\leq 5\text{g}$ 可称之为“低糖”;“低能量”是指每 100g 食品中的能量值 $\leq 170\text{kJ}$ ;“高钙”是指每 100g 食品(固体)中钙含量 $\geq 240\text{mg}$ 或 100mL 食品(液体) $\geq 120\text{mg}$ ;当 100mL 液态奶和酸奶的脂肪含量 $\leq 0.5\text{g}$ ,或 100g 奶粉的脂肪含量 $\leq 1.5\text{g}$ 时,可以标示“脱脂”。

《规范》特别强调,营养成分功能声称用语由卫生部制定,任何产品标签标注和宣传等不得对其进行删改和添加,例如,对铁营养素的营养成分功能声称只能表述为“铁是血红细胞形成的因子”、“铁对血红蛋白的产生是必需的”或“铁是血红细胞形成的必需元素”,这意味着现在一些乳类产品包装上标注的“铁元素能够增强人体抗感染能力”字样将不再被允许使用。另外营养标签不得明示或暗示治疗疾病的作用。