

鲍氏层孔菌摇瓶发酵条件初步研究

温兴兵, 刘吉华, 周 嫒, 余伯阳

(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

[摘要] 鲍氏层孔菌是一种珍贵的药用真菌, 本文首次以发酵培养物的免疫增强活性为指标, 同时结合发酵生物量、胞外多糖含量等指标, 研究发酵时间、初始 pH 值、碳源、氮源、无机盐、装液量、温度等因素对鲍氏层孔菌发酵的影响。结果表明在培养基初始 pH 6.0, 碳源为蔗糖, 氮源为豆粉, 无机盐为 $MgSO_4$, 装液量为 40 mL/150 mL 三角瓶, 26°C 培养 7 d 时, 培养物的免疫增强活性、生物量及胞外多糖含量达到最佳。

[关键词] 鲍氏层孔菌, 液体发酵, 免疫增强活性, 生物量, 胞外多糖

[中图分类号] O657 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)02-0075-05

Study on Liquid Fermentative Culture Conditions of *Phellinus baumii*

Wen Xingbing, Liu Jihua, Zhou Yuan, Yu Boyang

(Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract CL, mycelia biomass and output of extracellular polysaccharide was used as primary endpoint, and the effect of growth time, initial pH, carbon source, nitrogen source and ion on the output of mycelium in submerged fermentation of *Phellinus baumii* was studied. The results showed that growth time was 7 days, the optimum pH was 6, sucrose was the optimum carbon source, bean cake was the optimum nitrogen source, optimum ion was the $MgSO_4$, optimum volume was 40 mL/150 mL, and optimum temperature was 26°C.

Key words *Phellinus baumii*, submerged fermentation, mycelium biomass, polysaccharide, CL

鲍氏层孔菌 (*Phellinus baumii*), 俗称桑黄, 又称桑臣、桑耳、胡孙眼等, 为担子菌纲、刺革菌科、层孔菌属真菌, 是一种珍贵药用真菌, 常寄生于桑科植物上。中医认为桑黄性甘、平, 味苦、辛, 归肝。有活血化瘀之功效, 用于治疗血崩、血淋、脱肛泻血、带下、闭经、脾虚泄泻等^[1]。近来国内外研究表明, 该菌具有良好的抗肿瘤、免疫增强、抗突变、抗纤维化等药理活性^[2], 其多糖对小鼠腹水瘤的抑制率达到 95.6%^[3]。对鲍氏层孔菌多糖抗肿瘤等生物活性机理研究显示, 其抗肿瘤等活性主要通过促进巨噬细胞分泌 NO 和肿瘤坏死因子, 增强细胞免疫和体液免疫等来实现^[4-5]。

目前对鲍氏层孔菌液体发酵条件的研究, 主要以生物量、胞外多糖含量为指标, 研究不同发酵条件对鲍氏层孔菌发酵的影响^[5,6], 以该菌培养物的生物活性为指标研究其发酵最佳条件尚未见报道。由于鲍氏层孔菌是一种药用真菌, 发酵产物的药理活性直接关系到发酵培养物质量优劣, 因此有效地监测不同发酵条件对培养物药理活性的影响, 对鲍氏层孔菌发酵具有重要的意义。

动物和人淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后, 均能产生化学发光^[7]。化学发光主要反映淋巴细胞受刺激后氧化代谢变化和氧自由基的生成能力。由此 Kato^[8]等建立了以全血为材料检测吞噬细胞化学发光的方法, 其结果表明, 全血化学发光强度与吞噬氧化功能成正比, 即与吞噬过程中产生的活性氧浓度成正比。因此, 药物对全血化学发光强度的影响可以反映药物的免疫药理活性。本文报道以发酵培养物免疫增强活性为主要指标, 结合生物量和胞外多糖产量, 测定不同发酵条件对鲍氏层孔菌发酵的影响。

收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 国家自然科学基金 (30572320) 资助项目。

通讯联系人: 余伯阳, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药生物技术。E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株: 菌种由本研究室分离而得, 鉴定为鲍氏层孔菌 (*Phellinus baumii*).

试剂: 鲁米诺 (Fluka), 酵母多糖 A (Sigma), 其余试剂均为分析纯或化学纯. 玉米粉、黄豆粉、麸皮、土豆均为市售.

动物: ICR 系小鼠, 18~22 g 由中国药科大学动物中心提供.

仪器: SHG-C 型生物化学发光测量仪 (上海上立检测仪器厂).

1.2 培养方 法

种子培养基 (g/L): 马铃薯 200 g 葡萄糖 20 g KH_2PO_4 3.0 g MgSO_4 0.7 g VB_1 微量.

液体菌种制备: 将斜面菌种转接于液体培养基, 28℃ 180 rpm 培养 4 d

发酵培养条件: 接种量 2%, 28℃, 180 rpm, 培养 7 d, 每因素培养 3~5 瓶.

1.3 发酵生物量的测定

培养 7 d 后, 布氏漏斗抽滤分离菌丝和菌液, 测定菌丝湿重代表生物量.

1.4 多糖含量测定

硫酸-蒽酮法测定发酵液总糖含量, DNS 法测定发酵液单糖含量^[9]. 总糖减去单糖即为发酵液多糖含量.

1.5 免疫增强活性测定^[7]

小鼠眼球取血, 肝素抗凝. 测量时使 SHG-C 型生物化学发光仪样品室恒温在 37℃. 反应总体积为 1.0 mL, 首先加入 0.6 mL pH 7.2~7.4 HBSS 缓冲液、0.1 mL 血和 0.1 mL 鲁米诺, 待水浴 37℃ 温育 10 min 后迅速加入 0.1 mL 调理的酵母多糖和 0.1 mL 10 倍稀释的发酵液, 摇匀, 每 1 s 测一次化学发光值, 测定 3 min 以 HBSS 缓冲液作空白对照^[7]. 样品与空白对照发光积分值的比值为样品的相对发光值.

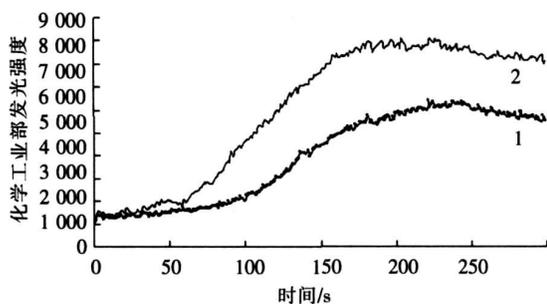
2 结 果

2.1 化学发 光

以 HBSS 缓冲液作对照, 测定了发酵液对外周血生物发光的影响. 结果如图 1 所示, 只加入酵母多糖的空白对照能显著地刺激呼吸爆发的发生, 提高化学发光强度. 反应体系中加入 10 倍稀释的发酵液后, 呼吸爆发较空白对照更加剧烈. 表明发酵液能够显著提高外周血生物发光, 具有免疫增强活性.

2.2 发酵时间的影 响

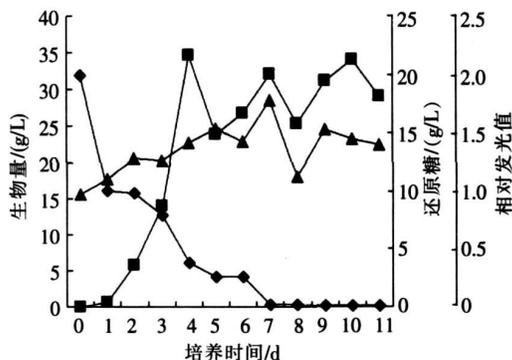
以 PDA 培养基发酵培养鲍氏层孔菌, 在培养不同时间检测发酵培养物免疫增强活性、生物量和单糖含量 (图 2). 结果表明, 培养 4 d 生物量即达到最高水平; 培养到 7 d 时胞外单糖含量达到 0.2021 g/L, 胞外单糖基本耗尽; 发酵产物的免疫药理活性在 7 d 时基本达到最高值, 之后有稍许下降的趋势. 综合以上几项因素, 鲍氏层孔菌培养周期为 7 d



1. 酵母多糖+HBSS, 2. 酵母多糖+发酵 10 倍稀释液

图 1 发酵液对全血发光的影响

Fig.1 Effect of broth of *Phellinus Baumii* on CL



相对发光值(▲), 生物量(■), 胞外还原糖(◆)

图 2 培养时间对发酵的影响

Fig.2 Effect of incubation time on fermentation

2.3 初始 pH 值的影响

PDA培养基,以 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 4 5 6 7 8,液态培养 7 d,结果如图 3 所示.

结果显示鲍氏层孔菌在 pH 4 5 6 的弱酸性环境中培养时,有较高的多糖、生物量和生物发光值, pH 7 8 的中性或偏碱性环境生长较差,表明鲍氏层孔菌较适合生长在弱酸的环境中,液体培养最适 pH 为 6

2.4 碳源的影响

以 PDA 培养基为基础培养基,碳源分别由葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、玉米粉和乳糖代替,加入量为 20 g/L 结果如图 4 所示.

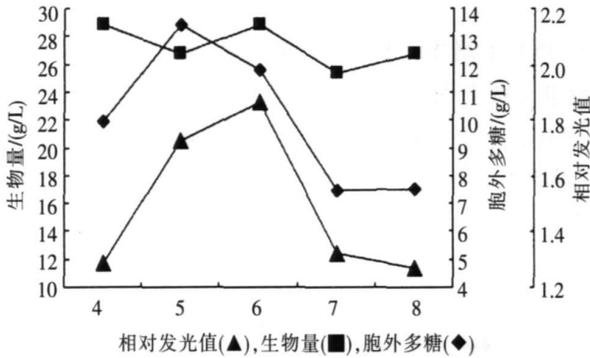


图 3 初始 pH 值对发酵的影响

Fig.3 Effect of initial pH on fermentation

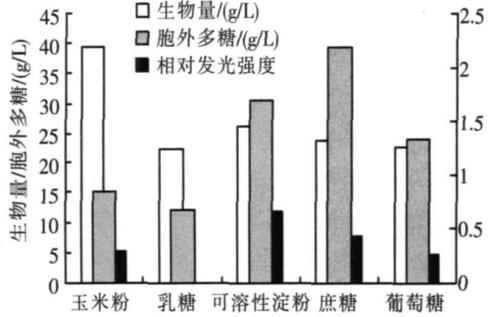


图 4 碳源对发酵的影响

Fig.4 Effect of carbon resource on fermentation

以蔗糖为碳源的发酵产物所致化学发光最强,以玉米粉培养生物量最大,其次为可溶性淀粉和蔗糖,以可溶性淀粉和蔗糖培养多糖含量较高.利用乳糖发酵,其发酵产物的生物量及生物发光强度均较低,培养 7 d 后,发酵液中乳糖含量依然很高,表明菌利用乳糖能力有限,不适合以乳糖作碳源.

综合三因素,以蔗糖培养的发酵产物具有最强的免疫药理活性,同时也有较高的生物量及多糖产量,而玉米粉有最高的生物量,因此最佳碳源为蔗糖,玉米粉次之.

2.5 氮源的影响

碳源选用玉米粉,选定 NaNO_3 、 NH_3NO_3 、蛋白胨、酵母粉、豆粉、麸皮为氮源. NaNO_3 、 NH_3NO_3 、蛋白胨、酵母粉量为 10 g/L,麸皮、豆粉量为 50 g/L,煮沸 30 min,过滤取滤液.结果如图 5 所示:

以蛋白胨为氮源有最强的生物发光,豆粉次之;以豆粉和硝酸铵为氮源有最高的生物量;以酵母浸膏培养,多糖含量最高,豆粉次之,蛋白胨最低.豆粉各项指标均较高,并考虑到其在生产中价廉易得,选定豆粉为最佳氮源.

2.6 无机盐离子的影响

以玉米粉、豆粉为基础培养基,加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 MgSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 培养.结果如图 6 所示.

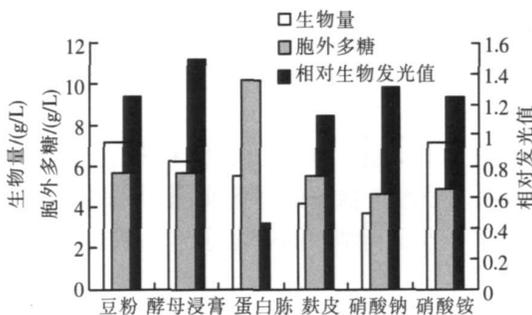


图 5 氮源对发酵的影响

Fig.5 Effect of nitrogen resource on fermentation

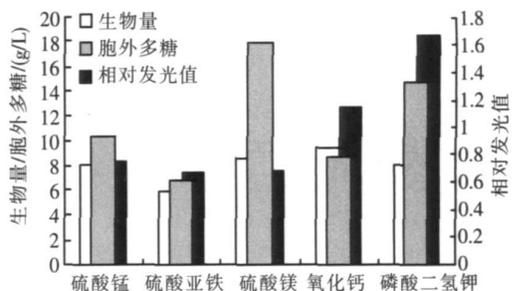


图 6 无机盐离子对发酵的影响

Fig.6 Effect of salt on fermentation

加入 Fe^{2+} 后,发酵产物生物量显著降低,生物发光强度也很低,表明 Fe^{2+} 对菌种生长不利. Ca^{2+} 能显

著提高生物量和胞外多糖量,但其生物发光相对较低.全血发光强度以 Mg^{2+} 培养最高, K^+ 次之,二者生物量也较高.因此,加入 $MgSO_4$ 培养,发酵产物有最高的免疫增强活性和较高的生物量,因而选定 $MgSO_4$ 为最佳无机盐.

2.7 装液量的影响

以 PDA 培养基为基础培养基,150 mL 三角瓶中装入 3Q 4Q 5Q 6Q 7Q mL 的培养基.结果如图 7 所示.

随着装液量的提高,生物量和生物发光强度显著下降,装液量为 30 和 40 mL 时,有较高的生物量和生物发光强度,可能由于鲍氏层孔菌好氧,装液量提高使溶氧降低,影响其生长.在装液量为 40 mL 时,生物发光及生物量最高,同时多糖量也较高,因此 150 mL 摇瓶最适装液量为 40 mL.

2.8 温度的影响

以 PDA 培养基为基础培养基,分别于 2Q 2Q 2Q 3Q 35°C 下培养,结果如图 8 所示.研究发现,培养温度为 26°C 时有最高的生物量及生物发光强度,多糖含量也仅低于 20°C 的培养产物.随着温度的升高,各项指标均有一定的降低趋势,尤其在 35°C 时,菌摇瓶培养 7 d 后仍未形成可见的菌落,表明菌不宜在 35°C 以上的环境中生长,因此其各项指标均作 0 计.结果表明,鲍氏层孔菌适宜在较低的温度下生长,鲍氏层孔菌最适培养温度为 26°C.

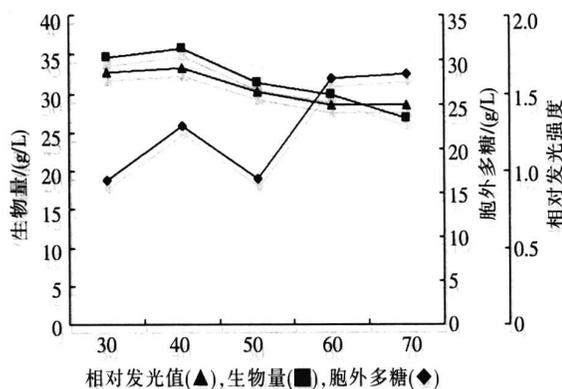


图 7 装液量对发酵的影响

Fig.7 Effect of liquid volume on fermentation

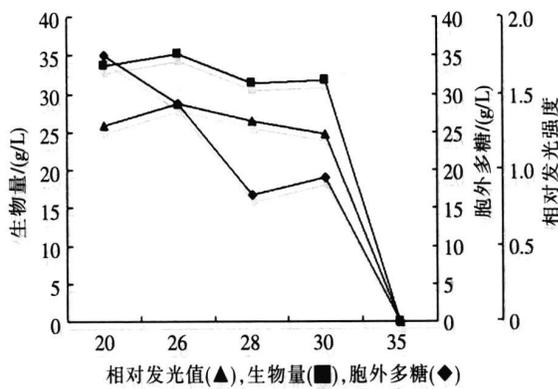


图 8 培养温度对发酵的影响

Fig.8 Effect of temperature on fermentation

3 讨论

Hye-Jin Hwang 等^[6]以生物量和胞外多糖含量为指标研究鲍氏层孔菌的最佳发酵条件,得最适培养基为蔗糖、玉米浸膏、磷酸二氢钾、氯化钙;杨全等^[7]以胞外多糖和生物量为指标,得最适培养基为玉米粉、麸皮、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素 B1、维生素 B2,培养 7 d

我们以生物发光及生物量、胞外多糖含量为指标研究了鲍氏层孔菌的发酵条件,结果表明最佳碳源为蔗糖,最佳氮源为豆粉,最佳无机盐为硫酸镁,150 mL 摇瓶最佳装液量为 40 mL,最佳培养温度为 26°C,培养周期为 7 d.研究结果还显示,尽管培养基中加入玉米粉、氯化钙等能获得较高的生物量及胞外多糖,但其药理活性却较低,不能有效地起到提高产量和质量的目的.在最佳发酵条件下,当发酵液中胞外还原糖含量降到 0.20 mg/mL 以下时,单位体积发酵液中胞外多糖免疫增强活性达到最大值,可作为判断发酵终点的指标.

我们研究发现,不同因素对鲍氏层孔菌发酵液药理活性的影响较大,这很大程度上决定了发酵产物质量的优劣,是不可忽视的. Kim H M^[3]等研究认为,鲍氏层孔菌发酵产物的免疫增强活性与多糖有关,我们研究发现多糖含量与免疫药理活性并不总是呈正相关,这可能与多糖结构的变化等有关,具体原因还有待进一步研究和确证.

[参考文献]

- [1] 卯晓岚. 中国大型真菌 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000: 465.
- [2] Kim G-Y, Young Oh Y, Yang-Hyo Park Yeong-M. Acidic polysaccharide isolated from *PheIIinus Iinteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 309(2): 399-407.
- [3] Kim H M, Han S B, Oh G T, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *PheIIinus Iinteus* [J]. *Int J Immunopharmac* 1996, 18(5): 295-303.
- [4] G-Y Young Kim a, Won-Kyo Oh, Byung-Cheul Shin. Proteoglycan isolated from *PheIIinus Iinteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c⁺, CD8⁺, DC and type I helper T cell-dominant immune state [J]. *FEBS Letters* 2004, 576(3): 391-400.
- [5] Hye-Jin H, Sang-Woo K, Jang-Won Y, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *PheIIinus Iinteus* KCTC 6190 [J]. *Enzyme and Microbial Technology* 2003, 33(3): 309-319.
- [6] 杨全. 桑黄的液体发酵及其粗多糖抗肿瘤作用的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2002.
- [7] 徐伟东, 胡天喜, 杨庆尧. 灵芝提取物对人外周血细胞免疫调节作用的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2000, 35(8): 559-561.
- [8] Kato T, Wokakek H, Schopf E, et al. Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. Role of granulocytes, platelets and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence [J]. *Klin Wochenschr* 1981, 59(5): 203-221.
- [9] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.

[责任编辑: 顾晓天]