液体发酵生产猪苓胞内多糖的条件优化

解修超[1,2],陈文强[1,2*],彭浩[1,2],邓百万[1,2],殷书学[3]
(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院,陕西 汉中 723001;
2. 陕西省食药用工程技术研究中心,陕西 汉中 723000; 3. 陕西留坝真菌研究所,陕西 留坝 724100)

[摘要] **目的**:优选猪苓液体发酵生产胞内多糖的工艺条件。**方法**:采用摇瓶培养法制备猪苓胞内多糖的发酵培养基,以猪苓胞内多糖得率为指标,通过单因素试验考察氮源、碳源和发酵条件,正交试验优选培养基的组成。**结果**:液体发酵生产猪苓胞内多糖的最适碳源为蔗糖,最适氮源为黄豆粉,优选的培养基组成为马铃薯 10.0%,蔗糖 4.0%,黄豆粉 0.3%,KH_2PO_4 0.2%,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%;发酵条件为初始 pH 5.2~5.6,振荡速度 180~200 $r \cdot min^{-1}$,培养温度 28 ℃,培养时间 7 d。**结论**:液体发酵猪苓胞内多糖具有周期短、产量高的优势,对猪苓多糖工业化生产和降低生产成本具有重要意义。

[关键词] 猪苓; 液体发酵; 胞内多糖; 正交设计; 单因素试验
[中图分类号] R283.6;R283.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0031-04
[doi] 10.11653/syfj2013190031

Optimization of Liquid Fermentative Conditions for Intracellular Polysaccharides from *Polyporus umbellatus*

XIE Xiu-chao[1,2], *CHEN Wen-qiang*[1,2*], *PENG Hao*[1,2], *DENG Bai-wan*[1,2], *YIN Shu-xue*[3]
(1. *School of Biological Science and Engineering*, *Shaanxi University of Technology*, *Hanzhong* 723001, *China*;
2. *Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi*, *Hanzhong* 723000, *China*;
3. *Liuba Edible Fungi Experiment Station*, *Liuba* 724100, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To optimize liquid fermentative conditions of intracellular polysaccharides from *Polyporus umbellatus*. **Method**: Fermentative medium for intracellular polysaccharides in *P. umbellatus* was prepared by shake flask cultivation. With yield of intracellular polysaccharides from *P. umbellatus* as index, nitrogen source, carbon source and fermentation conditions were investigated by single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize composition of culture medium. **Result**: The best carbon sources was saccharose, optimum nitrogen source was soybean meal, optimized composition of culture medium was as following: potato 10.0%, saccharose 4.0%, soybean meal 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%; Fermentation conditions were: initial pH 5.2-5.6, shaking speed 180-200 $r \cdot min^{-1}$, culture temperature 28 ℃, culture time 7 d. **Conclusion**: It had advantages in fermentation period and polysaccharide production by liquid fermentation, meanwhile it was important to reduce costs and industrial production of polysaccharides from *P. umbellatus*.

[**Key words**] *Polyporus umbellatus*; liquid fermentation; intracellular polysaccharides; orthogonal test; single factor test

猪苓主要分布于河北、陕西、四川等地[1],具有降低肝脏中过氧化脂质含量、提高细胞中超氧化物

[收稿日期] 20130527(008)
[基金项目] 陕西省教育厅专项科研计划基金项目(08JK247);陕西省“13115”科技创新工程计划项目(2008IDGC-04)
[第一作者] 解修超,博士,从事微生物资源保护利用研究,E-mail:xiexiuchao@126.com
[通讯作者] * 陈文强,教授,从事微生物资源的保护、开发和利用研究,Tel:0916-2642832,E-mail:wenqiangc@126.com

歧化酶和肝脏中过氧化氢酶活力等药理作用[2]。猪苓多糖是一种非特异性免疫刺激剂[3-4]，具有抗辐射、抗诱变、增强免疫等活性[5-10]，对肺癌、食道癌、宫颈癌等均有一定疗效[11-14]。与传统方法相比，菌丝发酵法具有规模大、产量高、发酵周期短、生产效益高等优点，其中液体发酵生产营养菌丝中所含粗蛋白、氨基酸的量显著高于栽培菌核[15-16]，该法在实际生产中应用较多，但尚未将用于猪苓菌丝体胞内多糖的提取[17-18]。本实验拟采用液体发酵生产猪苓胞内多糖，通过单因素试验和正交试验优选发酵条件，为工业化生产猪苓多糖提供理论依据。

1 材料

ZHWY-2102C 型恒温振荡器（上海智诚分析仪器制造有限公司），SW-CJ-1F 型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司），BJ100M 型电子天平（上海精科天美科学仪器有限公司），LS-B50L 型立式圆形压力蒸气灭菌器（上海医用核子仪器厂），800 型医用离心机（江苏南通理能实验器材有限公司），LRH-800-GS 型人工气候箱（韶关市明天环保仪器有限公司），DZKW-S-4 型恒温水浴锅（惠州市新旭实业有限公司）。

母种培养基（马铃薯 20.0%，葡萄糖 2.0%，KH_2PO_4 0.5%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3%，VB_1 0.001%，琼脂 2.0%，pH 自然），基础培养基 1（马铃薯 10.0%，酵母膏 0.2%，KH_2PO_4 0.3%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%，$CaCO_3$ 0.2%），基础培养基 2（马铃薯 10.0%，蔗糖 2.0%，KH_2PO_4 0.3%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%，$CaCO_3$ 0.2%），猪苓［陕西省食药用菌工程技术研究中心，经上海交通大学农业与生物学院周选国教授鉴定为多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus*（Pers.）Fries 的干燥菌核］。

2 方法与结果

2.1 菌种活化　配制母种培养基，分装试管，于 121.3 ℃灭菌 30 min，放置斜面，接母种，27 ℃恒温箱培养，待菌丝满管后置 4 ℃冰箱保藏备用。

2.2 液体种制备　制备液体发酵培养基，分装 100 mL 三角瓶，装液量 60%，于 121.3 ℃灭菌 30 min，接入 0.5 ~ 1.0 cm^2 活化的菌块，振荡速度 180 $r \cdot min^{-1}$，于 27 ℃振荡培养 7 d。

2.3 胞内粗多糖的提取　将培养好的菌丝球离心（3 500 $r \cdot min^{-1}$，20 min，下同），用纯净水冲洗 3 次，于 50 ℃烘干至恒重，研钵研磨后加入 10 倍量水，用 80 ~ 90 ℃热水分 3 次共浸提 3.5 h[19-20]，离心，上清液浓缩，加 3 倍量 95% 乙醇醇沉 24 h，得乳白色纤维状沉淀，离心，取沉淀烘干，即得胞内粗多糖[21-23]，精确称定质量，计算胞内粗多糖得率[24]。

2.4 液体发酵培养基的筛选

2.4.1 碳源　在基础培养基 1 中，以 0.2% 酵母膏为氮源，分别以 2.0% 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、玉米淀粉、可溶性淀粉作碳源进行发酵试验（$n=6$），计算猪苓胞内多糖得率分别为 9.16%，14.60%，6.30%，10.29%，6.62%，5.57%，故选择蔗糖为碳源。

2.4.2 氮源　在基础培养基 2 中，以 2.0% 蔗糖为碳源，分别以 0.2% 的蛋白胨、黄豆粉、酵母膏、水解乳蛋白、尿素和 0.4% 麸皮为氮源进行发酵试验（$n=6$），计算猪苓胞内多糖得率分别为 7.02%，16.31%，10.89%，8.13%，11.45%，13.20%，故选择黄豆粉为碳源。

2.4.3 培养基成分的优化　在单因素试验基础上，选取蔗糖为碳源，黄豆粉为氮源，添加 10.0% 马铃薯、KH_2PO_4、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验[25-26]，因素水平见表 1，试验安排及结果见表 2。

表 1　猪苓胞内多糖液体发酵培养基成分正交试验因素水平

水平	*A* 蔗糖 /%	*B* 黄豆粉 /%	*C* KH_2PO_4 /%	*D* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$/%
1	2	0.1	0.2	0.10
2	3	0.2	0.3	0.15
3	4	0.3	0.4	0.20

表 2　猪苓胞内多糖液体发酵培养基成分正交试验安排

No.	*A*	*B*	*C*	*D*	胞内多糖得率/%
1	2	0.1	0.2	0.10	29.87
2	2	0.2	0.3	0.15	26.45
3	2	0.3	0.4	0.20	33.14
4	3	0.1	0.4	0.15	29.19
5	3	0.2	0.2	0.20	33.87
6	3	0.3	0.3	0.10	33.50
7	4	0.1	0.3	0.20	16.17
8	4	0.2	0.4	0.10	33.23
9	4	0.3	0.2	0.15	59.49
K_1	89.46	75.23	23.23	96.60	
K_2	96.56	93.55	76.12	15.13	
K_3	8.89	26.13	95.56	83.18	
R	6.49	16.96	15.71	10.65	

由直观分析可知，各因素影响猪苓胞内多糖得

率的顺序为 $B > C > D > A$，确定最佳水平组合为 $A_3B_3C_1D_2$，即培养基组成为马铃薯 10.0%，蔗糖 4.0%，黄豆粉 0.3%，KH_2PO_4 0.2%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%。

2.5 发酵条件考察

2.5.1 初始 pH[27-28] 配制最适液体培养基，将初始 pH 分别调为 5.0，5.2，5.4，5.6，5.8，6.0，接活化菌种 1.0 cm^2，静置培养 24 h，振荡速度 180 $r \cdot min^{-1}$，装液量 60%，于 28 ℃振荡培养 7 d，计算猪苓胞内多糖得率分别为 14.78%，23.05%，26.74%，24.07%，21.51%，20.98%，故确定液体发酵的 pH 5.2～5.6。

2.5.2 培养温度[29] 配制最适液体培养基，选择发酵温度分别为 24，26，28，30，32 ℃，接活化菌种 1.0 cm^2，静置培养 24 h，振荡速度 180 $r \cdot min^{-1}$，装液量 60%，振荡培养 7 d，计算猪苓胞内多糖得率分别为 13.51%，13.80%，26.56%，22.15%，21.82%，故选取液体发酵温度 28 ℃。

2.5.3 振荡速度[30] 配制最适液体培养基，接活化菌种 1.0 cm^2，静置培养 24 h，装液量 60%，于 28 ℃振荡培养 7 d，选择振荡速度分别为 160，180，200，220 $r \cdot min^{-1}$，计算猪苓胞内多糖得率分别为 15.84%，21.56%，22.52%，18.70%，故选取液体发酵的振荡速度 180～200 $r \cdot min^{-1}$。

2.5.4 培养时间[31] 配制最适液体培养基，接活化菌种 1.0 cm^2，静置培养 24 h，装液量 60%，振荡速度 180 $r \cdot min^{-1}$，分别于 28 ℃振荡培养 4，5，6，7，8 d，计算猪苓胞内多糖得率分别为 10.42%，15.90%，20.61%，26.52%，24.99%，故选择液体发酵的培养时间 7 d。

3 讨论

预试验发现氮源对猪苓液体发酵生产胞内多糖的得率影响最大，其次为 KH_2PO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，碳源影响最小。猪苓对供试碳源均有不同程度的利用，其中以蔗糖的利用率较高，且菌丝球均匀、密度高；对供试氮源亦有不同程度的利用，其中对有机氮的利用率较高，对无机氮的利用率较低，尤其对铵态氮难以利用，符合真菌对氮源的一般利用规律[32]。

对菌丝体胞内多糖提取预处理常采用组织捣碎机捣碎、超声波破碎等形式[33]，组织捣碎机是利用高速旋转的刀片将菌丝球打碎并与水形成悬浊液，以缩短固体或细胞内部溶质分子向其表面扩散的距离，但不能破碎细胞壁；而超声波破碎是在组织捣碎后继续对菌体的细胞壁进行破坏，更易于细胞壁物质的溶解，从而使目标产物更好地溶出，结合生产成本及能耗等考虑，选择研钵研磨法。

[参考文献]

[1] 陈文强，邓百万，彭浩，等. 药用真菌猪苓的研究现状及应用展望[J]. 中国食用菌，2012，31(1)：1.

[2] 刘开辉，邓百万，陈文强，等. 比较 DNA 序列分析不同猪苓菌种的亲缘关系[J]. 食用菌学报，2009，16(3)：11.

[3] 陈文强，邓百万，丁锐，等. 3 种猪苓营养菌丝酯酶和过氧化物酶的同功酶分析[J]. 食品与生物技术学报，2009，28(2)：234.

[4] 何江川，韩永萍. 超滤膜分离法在多糖分离提取中的应用[J]. 食用菌，2005，27(1)：5.

[5] 马晓红，郝桂兰，刘震霞，等. 猪苓多糖联合乙肝疫苗治疗慢性乙型肝炎疗效[J]. 观察职业与健康，2005，21(2)：300.

[6] 陈永刚，邓百万，陈文强，等. 不同猪苓菌核分离营养菌丝的研究[J]. 安徽农业科学，2007，35(28)：8840.

[7] Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, et al. Antitumor-active substances from mushrooms[J]. Food Rev Int, 1995, 11(1): 23.

[8] Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan[J]. Int J Med Mushrooms, 1999, 1(1): 9.

[9] 李平作，章克昌. 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物活性[J]. 微生物学报，2000，40(2)：217.

[10] Lee K M, Lee S Y, Lee H Y. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor[J]. J Biosci Bioeng, 1999, 88(6): 646.

[11] 王林丽，吴寒寅，罗桂芳. 猪苓的药理作用及临床应用[J]. 中国药业，2000，9(10)：58.

[12] 郭随章. 中药多糖的抗癌研究与临床应用进展[J]. 医药导报，2004，23(11)：847.

[13] 黄年来，林志彬，陈国良，等. 中国食药用菌学[M]. 上海：上海科学技术文献出版社，2010：1777.

[14] 陈文强，邓百万，刘开辉，等. 中低海拔地区猪苓人工栽培技术[J]. 江苏农业科学，2007，25(4)：167.

[15] 陈文强，邓百万. 猪苓营养菌丝与栽培菌核蛋白质成分的分析[J]. 氨基酸和生物资源，2004，26(2)：42.

[16] 胡卫珍，余晓斌，缪静. 不同云芝菌株获得云芝胞内多糖比较[J]. 食品与生物技术学报，2005，24(5)：60.

[17] 殷红，顾芳红，叶军红. 几种环境因素对猪苓菌丝生长的影响[J]. 陕西中医学院学报，2001，24(4)：50.

[18] 陈文强，邓百万. 秦巴山区野生与栽培猪苓菌核主要成分的测定[J]. 无锡轻工大学学报，2003，11(6)：22.

星点设计-效应面法优选石斛酒润蒸制工艺

欧德明[1],周一帆[2],胡昌江[2*],卢晓萍[1],胡麟[2]
(1. 重庆桐君阁股份有限公司,重庆 400012; 2. 成都中医药大学药学院,成都 611137)

[摘要] **目的:**采用星点设计-效应面法优选优选石斛的酒润蒸制工艺。**方法:**采用 HPLC 测定石斛碱含量,色谱条件为 Diamonsil 钻石二代 C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(0.1%三乙胺)梯度洗脱(0~30 min,30%~80%乙腈;30~40 min,80%乙腈),流速 1 mL·min^{-1},检测波长 240 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。利用 UV 测定石斛多糖含量,以白酒体积分数、白酒加入量、蒸制时间为自变量,石斛碱与石斛多糖含量的总评归一值为因变量,通过星点设计-效应面法优选石斛的炮制工艺。**结果:**石斛碱线性范围 0.336~3.36 μg(R^2=0.999 8),精密度 RSD 1.24%,重复性 RSD 1.06%,平均加样回收率 97.62%(RSD 1.45%);石斛多糖线性范围 0.020 32~0.101 6 g·L^{-1}(R^2=0.997 1),精密度 RSD 1.71%,重复性 RSD 1.90%。最佳炮制工艺为白酒体积分数 48%,白酒加入量 17%,蒸制时间 6.78 h。石斛碱平均质量分数 0.303%,预测值 0.292%,相对偏差 3.76%;多糖平均质量分数 12.3%,预测值 11.8%,相对偏差 4.24%,建立的模型预测性良好。**结论:**优选的石斛酒润蒸制工艺简便、稳定。

[关键词] 金钗石斛; 石斛碱; 石斛多糖; 炮制工艺; 高效液相色谱法; 星点设计-效应面法
[中图分类号] R283.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0034-04
[doi] 10.11653/syfj2013190034

Optimization of Streamed Processing Technology of Dendrobii Caulis with Wine by Central Composite Design-Response Surface Methodology

OU De-ming[1], *ZHOU Yi-fan*[2], *HU Chang-jiang*[2*], *LU Xiao-ping*[1], *HU Lin*[2]

[收稿日期] 20130306(021)
[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技项目(2011-2-168)
[第一作者] 欧德明,副主任中药师,从事中药材饮片的质量管理、控制和验收研究,Tel:13368080586,E-mail:oudeming2012@ sina. com
[通讯作者] * 胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制研究,Tel:13980980796,E-mail:hhccjj@ hotmail. com

[19] 常景玲,李慧,朱佩燕. 灵芝多糖发酵工艺优化[J]. 中国食用菌,2005,24(6):47.
[20] 张士国,邵伟国. 灰树花子实体多糖提取方法的比较[J]. 中国林副特产,2005,20(2):40.
[21] 魏红福,孙培龙,杨开,等. 姬松茸子实体多糖分离纯化研究[J]. 中国食用菌,2005,24(5):45.
[22] 孙培龙,杨开,赵培城,等. 姬松茸子实体多糖提取方法的研究[J]. 食品科学,2003,24(6):71.
[23] 温磊,尚德静,王伟. 灵芝硒多糖的制备及其分离纯化[J]. 中国食用菌,2005,24(6):44.
[24] 江玉姬,孙淑静,官宁,等. 银耳多糖提取工艺的研究[J]. 农业工程学报,2004,20(Z1):262.
[25] 徐剑,郑曙光. 正交试验优化骨炎消巴布剂的基质处方[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):39.
[26] 李智勇,孙冬梅,杜建平. 均匀设计法优选癌痛巴布剂的基质处方研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):1.
[27] 赵春燕,孙军德,李敏,等. 培养条件对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. 中国食用菌,2005,24(1):15.
[28] 马瑞霞,姚献华,魏志华. 白色金针菇液体菌种生产技术研究[J]. 中国食用菌,2005,24(6):16.
[29] 陈合,赵燕,秦俊哲,等. 金针菇液体菌种发酵罐内深层培养条件的研究[J]. 食用菌,2005,27(6):21.
[30] 马立芝,袁建平,高振江. 杏鲍姑液体菌种培养条件的研究[J]. 食用菌,2005,27(3):10.
[31] 王德芝,余荣珍. 茶薪菇深层发酵产多糖的研究[J]. 中国食用菌,2005,24(2):47.
[32] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993:191.
[33] 武梅,周应揆,赵永昌,等. 灵芝菌丝体液体发酵培养产灵芝多糖的动态研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,1999,21(2):165.

[责任编辑 仝燕]