采用正交设计法对桑黄菌丝体液体培养基的优化

李长美，郭成金*
（天津师范大学化学与生命科学学院，天津 300387）

摘 要：以玉米渣和葡萄糖为复合碳源，以麸皮和蛋白胨及酵母粉为复合氮源，采用$L_9(3^4)$正交设计法优化桑黄菌丝体液体培养基，并为此初步确定了液体培养条件。实验结果表明：最佳培养基为玉米渣3%、麸皮3%、葡萄糖3%，KH_2PO_4 0.3%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml。在32.5℃、pH自然、摇床转速130r/min、摇床培养192h的条件下，其菌丝体生物量平均得率为4.4g/100ml。

关键词：桑黄；液体培养基；正交设计；优化；菌丝体；生物量

Optimization of Liquid Culture Medium for *Phellinus linteus* Mycelia by Orthogonal Test

LI Chang-mei, GUO Cheng-jin*
(College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: Corn flour as mixed carbonic source and bran+peptone+yeast as mixed nitrogenous source, the liquid culture medium of *Phellinus linteus* mycelia was optimized by orthogonal test in this study. The results showed that the optimal culture medium comprised corn flour 3%, bran 3%, glucose 3%, KH_2PO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, VB_1 20μg/100 ml, VB_2 30μg/100 ml, and on the culture conditions, of culture temperature 32.5 ℃, natural pH, rotation speed 130 r/min and culture cycle 192 h, the average mycelial biomass was 4.4 g/100 ml.

Key words: *Phellinus linteus*; liquid culture medium; orthogonal test; optimiztion; mycelia; biomass
中图分类号：Q93.335 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0311-04

桑黄*Phellinus linteus*(Berk. et Cart.)Teng.，中文名称为裂蹄木层孔菌，隶属于真菌界(Kingdom Fungi)，担子菌门(*Basidiomycota*)，层菌纲(*Hymenomycetes*)，非褶菌目(*Aphyllophorales*)，多孔菌科(*Polyporaceae*)，木层孔菌属(*Phellinus*)，是一种传统中药[1-2]，因在中国中南部地区通常生长在桑属植物上，子实体为黄褐色的缘故而得名。

桑黄因寄生树种不同，其形状、颜色、含有的成分亦不同。目前，在市场上有桑树桑黄、杨树桑黄、松树桑黄、白桦树桑黄、漆树桑黄、暴麻子树桑黄等。国外学者认定，唯桑树上的才是正品，其特点是颜色鲜黄，呈蛋黄色，质较重。桑树桑黄，货源奇缺，价格昂贵，中国呈零星分布，数量极为有限，是桑黄之极品。

自1968年，日本学者Tetsuro Ikekawa等[3]用*P. linteus*子实体的水提取物进行细胞实验，结果发现其对小鼠S-180的抑制率为96.7%以来，国际上对桑黄的药用功能进行了广泛研究，发现桑黄具有抗肿瘤、免疫调节、抗肝硬化、抗发炎、 抗氧化、抗菌等药理作用[4-6]，被认为是已知高等真菌中抗癌效果最好的珍稀药用菌类之一，也是目前国际公认的生物治癌领域中有效率排在前位的药用菌，已成为药用真菌研究领域的一个热点[7-8]。但是由于受生理状态的特殊性和复杂性以及外部环境的制约，桑黄在自然界中形成子实体稀少，特别是形成可用子实体需要多年；人工栽培极其困难，培养条件苛刻，且生长周期长达3～4年。而真菌的深层发酵具有无菌、生产条件可控制、在短时间内可获得大量细胞物和代谢物、可自动化控制大规模工厂化生产

收稿日期：2007-04-01
基金项目：天津市科学技术委员会项目（06ZHCXNC05900）
作者简介：李长美（1977-），女，硕士研究生，主要从事蕈菌生物学研究。E-mail：li_chang_mei@126.com
*通讯作者：郭成金（1952-），男，副教授，主要从事植物生理及蕈菌生物学研究。E-mail：chengjin6866@163.com

等特点[9]，采用液体发酵培养获得大量桑黄菌丝体或活性物质具有重要意义。本研究旨在采用正交试验的方法优化桑黄菌丝体液体培养基，为桑黄的大规模工厂化生产、从桑黄菌丝体或发酵液中提取活性物质，实现中药业现代化奠定基础，也为原生质体的制备、DNA 的提取以及分子水平上的深入研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及其来源

桑黄(*Phellinus linteus*)由天津师范大学生物系蕈菌研究开发室保藏，引自日本。

1.1.2 固体培养基

20%棉子皮、20%马铃薯、2%葡萄糖、0.3% KH_2PO_4、0.15% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml、1.2%琼脂，pH 自然。

1.1.3 液体培养基

碳氮源按正交配方加入0.3% KH_2PO_4、0.15% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml，pH 自然。

1.1.4 仪器与设备

YXQG02 手提式压力蒸汽消毒器 山东新华医疗器械厂；SW-CJ-2 超净工作台 上海锦屏仪器仪表有限公司；LRH-150-G 光照培养箱 广东省医疗器械厂；WDP 型微生物多用培养箱 广东省医疗器械厂；电热恒温干燥箱 天津争光真空仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 固体培养方法

按固体培养基配方配制培养基，高压灭菌后在超净台内趁热倒平板，培养基凝固后24h 和48h 查无菌，无菌条件下接入0.3cm² 的菌种块，32.5℃条件下培养，挑取菌落前端菌丝体，多次提纯复壮备用。

1.2.2 液体培养方法

按液体培养基配方配制培养基，分装到100ml 三角瓶中，每瓶50ml，每个处理重复3 次(采用处理加重复的方法进行编号，如处理1 的第2 次重复编号为①②)，高压灭菌备用；取培养168h 的平板菌落边缘的0.3cm² 菌丝体块3 块，接入液体培养基中，32.5℃条件下静置培养，48h 后置于摇床上32.5℃、130r/min 条件下培养。

1.2.3 菌丝干重的测量方法

将冲洗干净的培养皿于烘箱中60℃条件下烘干至恒重，电子天平称重，编号(对每个处理的3 次重复分别编号，亦用处理加重复的方法)并记录其重量；将每个三角瓶中培养好的菌丝体悬浮液倒入相应编号的培养皿中，于烘箱中60℃条件下烘干至恒重，电子天平称重并记录。

1.2.4 正交试验的因素及水平

试验以玉米渣(A)和葡萄糖(B)为复合碳源，以麸皮(C)、蛋白胨和酵母粉(D)；(蛋白胨:酵母粉=2:1)为复合氮源，采取四因素三水平正交试验的方法对桑黄菌丝体液体培养基进行优化。试验因素及其各水平见表1。

表 1 $L_9(3^4)$正交实验的因素及水平 (g/1000 ml)

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test (g/1000 ml)

水平	因素			
	A	B	C	D
1	30	10	10	0
2	40	20	20	1
3	50	30	30	2

2 结果与分析

2.1 液体培养过程中菌丝体形态的变化



图 1 日本桑黄的液体发酵培养菌丝体的形态

Fig.1 Shape of mycelia of Japanese *Phellinus linteus* by liquid cultivation

本实验所用的液体培养基为土黄色浑浊的悬浮液，接入菌种块，经静置培养48h 后，手摇可观察到菌块表面有絮状菌丝，说明菌种块上的菌丝在液体环境中能萌发并生长；在摇床培养48～96h 过程中，菌种块逐渐分散到培养液中形成了许多肉眼不可见的菌丝片段；培养120h 后，培养液中逐渐可观察到大量菌丝球的出现，随着培养时间的延长，培养液逐渐由浑浊变澄清，颜色由土黄色变为橙黄色，菌丝球逐渐增大且大小均匀、表面光滑，这说明培养液培养条件较适宜，尤其是通氧量较好，使菌丝球表面的菌丝生长比较均匀；培养192h 时，培养液至澄清，这说明此时培养液的利用比较充分可终止培养，培养液橙黄色。菌丝球表面近似苍耳状，长有长绒毛状菌丝(见图1)也说明随着菌丝球的不断增大而增大，可能是培养体系中氧气不足所致。

2.2 桑黄菌丝体液体培养基的优化

本研究旨在优化液体培养基。因此，对摇床培养

条件(温度、pH 值、摇床培养时间、装液量、接种量、摇床转速等)只进行了初步确定。

2.2.1 桑黄菌丝体液体培养温度的确定

用固体培养法筛选桑黄的最适生长温度并用于液体培养。根据参考文献[10]设置七个温度水平(20、22.5、25、27.5、30、32.5、35℃),用试管培养。接种48h后观察,随着温度的上升,菌种块萌发后,菌丝尖端呈放射状生长,而且面积逐渐增大,这是因为菌种块边缘的菌丝由于直接接触到营养而首先萌发,此现象亦说明在这七个温度范围内温度越高越适于桑黄菌丝的生长;随着培养时间的延长,发现32.5℃条件下培养的菌丝生长速度最快,且健壮;而20～30℃条件下培养的菌丝生长速度依次增大,35℃条件下培养的菌丝生长速度大于30℃的,且小于32.5℃条件下培养的菌丝生长速度,证明培养桑黄的最佳温度为32.5℃。因此,实验采用32.5℃对桑黄进行固体培养和液体培养。

2.2.2 桑黄菌丝体液体培养pH值的确定

据文献[10]报道,液体培养的*P. linteus*菌丝生长的最适pH为5.5(25℃);实验培养液的pH值均在5～6之间。因此,实验直接采用培养液的自然pH值。

2.2.3 桑黄菌丝体摇床培养时间的确定

固体培养时发现,培养168h时,菌丝体的生长势最强、生长速度最大,说明此时是桑黄菌丝的对数生长期,继续培养发现菌丝的生长势减弱、生长速度减小,培养216h时发现接种块周围已开始出现老化水珠;通过液体培养预实验发现,摇床培养192h时,桑黄菌丝生物量最大,继续培养使生物量减少,这与固体培养时证明培养168h是桑黄菌丝的对数生长期相符。因此,实验确定桑黄菌丝体摇床培养时间为192h。

2.2.4 桑黄菌丝体液体培养装液量的确定

摇瓶装液量对菌丝体生物量得率影响非常大。装液量过大,通氧量小,菌丝体得不到充足的氧气使其生长势和生长速度均减弱,且培养基被摇动时容易溅到棉塞上引起污染;装液量过小,在培养后期,菌丝球会露出培养基液面由于得不到营养而影响菌丝的生长并最终减少了菌丝产量。因此通过预实验确定用50%的装液量。

2.2.5 桑黄菌丝体液体培养接种量的确定

根据摇床培养过程中菌丝体形态的变化可知,只有当培养液中菌丝体小片段达到一定浓度时才开始扭结形成菌丝球,因此在一定装液量的条件下,不同的接种量影响菌丝球开始形成的时间和数量,从而影响发酵终止时菌丝球大小和菌丝体的产量。实验确定在100ml三角瓶装50ml培养基的条件下,每瓶接入培养168h的平板菌落边缘的0.3cm^{2}菌丝体块3块。

2.2.6 桑黄菌丝体液体培养摇床转速的确定

在确定的上述培养条件下,分别实验并观察120、130、140r/min条件下菌丝球的变化。结果发现:随着转速的增大,发酵终止时菌丝球的数量逐渐增多,但菌丝球减小,130r/min条件下培养终止时菌丝球大小适中,如黄豆粒大小;120r/min条件下培养192h时培养液还有些浑浊,说明此时营养过剩,130r/min条件下培养192h时培养液澄清,说明营养利用比较充分,140r/min条件下培养168h时培养液就已澄清,说明此时培养液中的营养已用完但菌丝还未达到对数生长期。综合以上结果确定液体培养的摇床转速为130r/min。

2.2.7 正交试验优化桑黄菌丝体液体培养基的结果与直观分析

表2 $L_9(3^4)$正交试验结果直观分析表

Table 2 Direct analytical table of results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

处理	因素				菌丝干重(g/50ml)			
	A	B	C	D	重复1	重复2	重复3	平均值
1	1	1	1	1	1.519	1.532	1.518	1.523
2	1	2	2	2	1.697	1.674	1.705	1.692
3	1	3	3	3	2.203	2.182	2.209	2.198
4	2	1	2	3	1.575	1.569	1.592	1.579
5	2	2	3	1	2.140	2.231	2.117	2.163
6	2	3	1	2	1.208	1.283	1.260	1.372
7	3	1	3	2	1.829	1.832	1.850	1.837
8	3	2	1	3	1.261	1.248	1.241	1.250
9	3	3	2	1	1.732	1.720	1.765	1.739
均值1	1.804	1.646	1.382	1.808				
均值2	1.705	1.702	1.670	1.634				
均值3	1.609	1.770	2.066	1.676				
极差	0.195	0.124	0.684	0.174				

从表2可以看出,9个处理的菌丝干重平均值中,处理3的最大,为2.198g/50ml,即4.396g/100ml,由此得出较优的培养基配方为玉米渣3%、麸皮3%、葡萄糖3%、蛋白胨0.2%、酵母粉0.1%、KH_2PO_4 0.3%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml;随着玉米渣量的增加,菌丝干重减小,但影响不大,随着麸皮量的增加,菌丝干重在增加,影响也不大,随着葡萄糖量的增加,菌丝干重在增加且增加幅度较

表3 $L_9(3^4)$正交实验结果方差分析表

Table 3 Analysis of variance of results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值
A	0.057	2	0.270	4.460
B	0.023	2	0.110	4.460
C	0.708	2	3.379	4.460
D	0.050	2	0.239	4.460
误差	0.840	8		

大，添加蛋白胨和酵母粉反而抑制桑黄菌丝的生长。

从表3可以看出，碳源是影响菌丝产量最主要的因素，其中葡萄糖的影响最大，玉米渣和蛋白胨及酵母粉的影响次之，麸皮的影响最小。

该试验结果说明，液体发酵培养桑黄菌丝体，碳源以葡萄糖为主，以玉米渣为辅，氮源采用麸皮即可。

3 讨 论

在桑黄*P. linteus*的碳、氮源筛选试验中，据日本Tomoyuki Nakamura报道，六碳糖比五碳糖更适于菌丝的生长，其中葡萄糖的效果最好；无机氮不能促进菌丝生长，而单个有机氮或多个有机氮配合使用，如酵母提取液和蛋白胨等，能明显促进菌丝生长[10]。杨全[11]研究不同培养基对桑黄*P. igniarius*菌丝生长的影响，并利用$L_9(3^4)$(因素为玉米粉、麸皮、磷酸二氢钾、硫酸镁)正交试验筛选出了桑黄*P. igniarius*菌丝体液体的优化培养基。结果表明：玉米粉为最佳碳源，麸皮为最佳氮源；优化培养基配方为：玉米粉5%、麸皮3%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml。另据相关文献报道，碳氮源是影响桑黄菌丝生长的最主要因素，无机元素和维生素可用常用量，影响不大，且复合碳氮源有利于桑黄菌丝的生长。因此，以玉米渣和葡萄糖为复合碳源，以麸皮和蛋白胨及酵母粉为复合氮源，采用$L_9(3^4)$正交试验方法优化桑黄菌丝体液体培养基。

在配制液体培养基的过程中发现，随着麸皮与玉米渣比例的增大，其混合提取液逐渐由乳浊液变为悬浊液，当玉米渣和麸皮均为3%时，其混合提取液即为悬浊液，方便过滤。

从便于配制培养基及节省原料和试剂等方面考虑，将液体培养桑黄菌丝体的培养基配方调整为玉米渣3%、麸皮3%、葡萄糖3%、KH_2PO_4 0.3%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml。

4 结 论

通过预实验初步确定了桑黄较优的液体培养条件为32.5℃，pH自然，装液量50%，每瓶接入培养168h的平板菌落边缘的0.3cm²菌丝体块3块，摇床转速130r/min，摇床培养192h，并通过$L_9(3^4)$正交试验筛选出了桑黄最佳液体培养基为玉米渣3%、麸皮3%、葡萄糖3%、KH_2PO_4 0.3%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%、VB_1 20μg/100ml、VB_2 30μg/100ml。此条件下桑黄菌丝体生物量平均得率为4.4g/100ml。这为今后桑黄的大规模工厂化生产、从桑黄菌丝体或发酵液中提取活性物质，实现中药业现代化奠定了基础；也为原生质体的制备、DNA的提取以及分子水平上的深入研究提供科学依据。

参考文献：

[1] 刘波. 中国药用真菌[M]. 太原: 山西人民出版社, 1974: 71-73.

[2] 应建浙, 卯晓岚, 马启明, 等. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 181.

[3] SHIHATA S, NISHIKAWA Y, MAI C F, et al. Anti-tumor studies on some extracts of *Basidiomycetes*[J]. Gann, 1968, 59: 159-161.

[4] 宋力, 孙培龙, 郭彬彬, 等. 桑黄的研究进展[J]. 中国食用菌, 2005, 24(3): 7-10.

[5] 张万国. 桑黄抗肝纤维化及其作用机理的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2002.

[6] 温克, 陈劲, 李红, 等. 桑黄等四种抗癌药物抗癌活性比较[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2002, 28(3): 247-249.

[7] 无名. 几种药用真菌亟待开发[J] 大众商务, 2003(3): 26.

[8] 广东智农通网. 桑黄菌开发前景看好[J]. 农技服务, 2003(9): 5-6.

[9] 郭成金. 蕈菌生物学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005: 297.

[10] 陶美华, 章卫民, 钟韩, 等. 针层孔菌属(*Phellinus*)中药用真菌的研究概述[J]. 食用菌学报, 2005, 12(4): 65-72.

[11] 杨全, 李艳辉, 严寒静, 等. 药用真菌桑黄菌丝体液体工艺的研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 212-215.