

刘琳. 利用虎杖药渣生成桦褐孔菌多糖的研究[J]. 江苏农业科学 2018 46(17):205-208.
doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.055

利用虎杖药渣生成桦褐孔菌多糖的研究

刘琳

(青岛农业大学生命科学学院山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:采用单因素和正交试验对桦褐孔菌发酵虎杖药渣生成多糖的发酵培养基进行优化。单因素试验结果表明, 最适麸皮添加量为 10 g/L, 最适虎杖药渣添加量为 15 g/L, 最适氮源为蛋白胨, 其添加量为 5 g/L。正交试验获得的最优培养基为虎杖药渣 15 g/L、麸皮 1.0 g/L、蛋白胨 5 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L。此条件下, 获得多糖 (7.65 ± 0.21) g/L、白藜芦醇 (1.62 ± 0.14) mg/g, 桦褐孔菌菌丝体生物量为 (11.79 ± 0.35) g/L。该方法为虎杖药渣废弃物的综合利用提供了新思路。

关键词:桦褐孔菌; 虎杖药渣; 多糖; 发酵培养基

中图分类号: S182; R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0205-04

白藜芦醇是一种重要的植物抗毒素, 具有抗癌、抗病毒等多种功效, 在美国、日本等国家被列为保健品, 在我国白藜芦醇被制成胶囊, 用于调节血脂和抗癌治疗^[1-4]。目前, 国际市场上对白藜芦醇的需求量与日俱增。白藜芦醇的主要生产方法是从植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) 中提取, 在生产过程中产生大量药渣, 仅 2010 年, 我国虎杖药渣总量就达 2.6 万 t^[5]。部分白藜芦醇残留在药渣中, 造成资源浪费。田凤等报道, 水提虎杖药渣中残留的白藜芦醇含量达到

原药材总量的 47%^[5]。更为重要的是, 这些药渣大多作为废弃物集中堆放、掩埋, 或晒干后焚烧处理, 造成严重的环境污染^[6], 而有关虎杖药渣综合利用的研究却鲜有报道。朱杰等利用虎杖药渣栽培杏鲍菇, 杏鲍菇中白藜芦醇含量仅为 4.91 $\mu\text{g/g}$, 产品附加值较低^[7]。

桦褐孔菌 [*Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat] 是一种非常珍贵的药用真菌, 早在 16 世纪, 欧洲国家已将其应用于治疗癌症、结核病、糖尿病等疑难杂症^[8-9]。多糖是桦褐孔菌的重要活性成分, 具有抗炎、抗肿瘤、降血糖等多种生理活性^[10-11]。然而, 野生桦褐孔菌资源十分稀少, 价格昂贵, 远不能满足市场需求。液体深层发酵是桦褐孔菌多糖的主要来源途径, 同时桦褐孔菌菌丝体含有丰富的人体必需氨基酸, 具有较高的营养价值^[12]。近年来, 对于桦褐孔菌多糖的研究主要集中在药理活性和发酵常规碳、氮源的优化。笔者利用桦褐孔菌发酵

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 山东省高等学校科技计划 (编号: J16LE04); 山东省“泰山学者”建设工程项目 (编号: 6631114314)。

作者简介: 刘琳 (1979—), 女, 吉林白山人, 博士, 讲师, 主要从事微生物转化与分离研究。E-mail: liulin@qau.edu.cn。

- [10] 王有为, 何敬胜, 范建伟, 等. 木瓜道地起源与道地产区形成研究[C]//药用植物化学与中药有效成分分析研讨会论文集(上). 深圳: 中华中医药学会, 2008: 5.
- [11] 俞佳. 不同道地产区木瓜指标成分分析及川木瓜总黄酮提取纯化工艺研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [12] 杨新杰, 许苗苗, 宋蓓, 等. 土壤因子对珠子参药材质量的影响研究[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1513-1517.
- [13] 闫恩荣, 王希华, 陈小勇. 浙江天童地区常绿阔叶林退化对土壤养分库和碳库的影响[J]. 生态学报, 2007(4): 1646-1655.
- [14] 刘晓侠, 刘吉利, 吴娜, 等. 不同地域枸杞主要次生代谢物含量与初生代谢物含量的关系研究[J]. 北方园艺, 2015(23): 163-169.
- [15] 孔璐, 黎云祥, 权秋梅, 等. 不同群落类型柔毛淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷含量及其与土壤因子的关系[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2517-2522.
- [16] 罗敏, 谭秋生, 罗川, 等. 皱皮木瓜质量与土壤理化性质的相关性研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 26-28.
- [17] 辛博. 产地气候、土壤因子及生长年限对黄芪药材质量的影响研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [18] Bryant J P, Chapin F S, Klein D R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory[J]. OIKOS, 1983,

40(3): 357-368.

- [19] 苏文华, 张光飞, 周鸿, 等. 短葶飞蓬黄酮及咖啡酸酯的含量与土壤氮供应量的关系[J]. 植物生态学报, 2009, 33(5): 885-892.
- [20] 杜玮玮, 姚小洪, 黄宏文. 环境胁迫对雷公藤中雷公藤红素含量的影响[J]. 植物生态学报, 2009, 33(1): 180-185.
- [21] 侯力峰. 不同土壤因子与黄顶菊乙醇提取物相关性研究[D]. 保定: 河北大学, 2014.
- [22] 卜晓英, 张敏, 李文芳, 等. 木瓜系列产品加工技术[J]. 食品工业科技, 2003(4): 45-48.
- [23] 董丽菊. 不同品种木瓜光合特性及品质评价[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [24] 谢海伟, 张斌, 杨贤松, 等. 宣木瓜有效成分的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(1): 157-161.
- [25] 吴丹, 罗世琼, 杨占南, 等. 土壤养分及微生物特征对鱼腥草多酚和总黄酮的影响及相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1444-1452.
- [26] 覃容贵, 钱志瑶, 周镁, 等. 宽叶缬草土壤理化性质对其总黄酮含量的影响[J]. 中药材, 2016, 39(8): 1696-1698.
- [27] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关

虎杖药渣生成桦褐孔菌多糖,采用单因素和正交试验获得了最优培养基组成。同时,桦褐孔菌将虎杖药渣中残留的白藜芦醇转化、释放。该方法利用虎杖药渣同时获得高附加值产品桦褐孔菌多糖、白藜芦醇和桦褐孔菌菌丝体,不仅具有较高的经济效益,还能够缓解虎杖药渣引起的环境污染,产生良好的社会效益。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桦褐孔菌取自青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室;葡萄糖、苯酚、硫酸等试剂均为分析纯;乙腈为色谱纯。

恒温振荡器购自上海一恒科学仪器有限公司;电子天平购自奥豪斯国际贸易有限公司;752紫外可见分光光度计购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司;台式离心机购自赛默飞世尔科技有限公司;高效液相色谱 Waters 2690 色谱系统购自 Waters 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 种子培养基: KH_2PO_4 3 g/L、 MgSO_4 15 g/L、蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、5 g/L 麸皮浸汁。

基础发酵培养基: KH_2PO_4 3 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L、蛋白胨 5 g/L、虎杖药渣 20 g/L、5 g/L 麸皮浸汁。

1.2.2 发酵培养 种子培养:将 4℃ 冰箱中的 PDA 斜面菌种转接于 PDA 平板,28℃ 活化培养 5 d。在平板中菌丝生长旺盛处打孔,每个种子培养基中接入 3 个菌块,发酵培养(28℃,120 r/min,3 d),250 mL 三角瓶种子培养基装液量 50 mL。发酵培养:将种子培养基以接种量 8% (v/v) 接种于发酵培养基,250 mL 三角瓶装液量 50 mL,28℃、120 r/min 条件下培养 7 d,检测发酵液中的多糖含量。

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 麸皮添加量的确定 麸皮浸汁的制备:称取一定质量的麸皮,加入适量自来水,煮沸 30 min 后用纱布过滤,弃滤渣,滤液定容。制备麸皮添加量分别为 5、10、20、30 g/L 的麸皮浸汁,利用不同的麸皮浸汁配制培养基,培养基中其他组分及添加量与基础发酵培养基相同。发酵培养结束后,4 000 r/min 离心 15 min,上清液用蒸馏水定容至 50 mL,检测多糖含量,确定最适麸皮添加量。发酵培养方法同“1.2.2”节。

1.2.3.2 碳源的确定 发酵培养基中添加 10 g/L 的虎杖药渣,在此基础上分别添加麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和玉米粉,添加量为 10 g/L。培养基中其他组分及添加量与基础发酵培养基相同。发酵结束后,检测多糖含量,确定最适碳源。发酵培养方法同“1.2.2”节。

1.2.3.3 虎杖药渣添加量的确定 改变基础发酵培养基中虎杖药渣添加量为 5、10、15、20 g/L,培养基中其他组分及添加量与基础发酵培养基相同。发酵结束后,检测多糖含量,确定最适虎杖药渣添加量。发酵培养方法同“1.2.2”节。

1.2.3.4 氮源的确定 分别用豆粕、牛肉膏、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 代替基础发酵培养基中的蛋白胨配制发酵培养基,各种氮源添加量均为 0.5%。发酵结束后,检测多糖含量,确定最适氮源。发酵培养方法同“1.2.2”节。

1.2.4 分析方法

1.2.4.1 苯酚-硫酸法检测多糖含量 发酵结束后,

4 000 r/min 离心 15 min,取发酵液上清用蒸馏水定容至 50 mL。取发酵液上清 10 mL,加入 4 倍体积的无水乙醇,放于 4℃ 冰箱中过夜沉降,6 000 r/min 离心 5 min,弃上清,取沉淀加入 10 mL 蒸馏水溶解,即为多糖提取液。取多糖提取液 1.0 mL 于试管中,加入 6.0% 的苯酚溶液 1.0 mL、浓硫酸 5.0 mL,用微型旋涡混合仪摇匀,迅速用流水冷却至室温,在 490 nm 处检测吸光度,根据标准曲线计算多糖含量。标准曲线方程为 $y = 6.2149x + 0.0033$, $r^2 = 0.9997$ 。

1.2.4.2 白藜芦醇含量 发酵结束后,向三角瓶中加入无水乙醇,使乙醇最终体积分数为 70%,冷浸提 12 h,取上清, HPLC 检测白藜芦醇的含量。色谱柱为 Kromasil - C_{18} ID 4.6 mm × 250 mm, 5 μm , 流速为 0.7 mL/min,柱温为室温,流动相为水和乙腈。梯度洗脱:0 ~ 15 min,乙腈/水 (v/v) 31 : 69 ~ 50 : 50;15 ~ 20 min,乙腈/水 (v/v) 50 : 50 ~ 98 : 2。检测波长为 306 nm。

1.2.4.3 桦褐孔菌菌丝体生物量 发酵结束后,4 000 r/min 离心 10 min 后收集菌丝体,60℃ 干燥至恒质量,称质量。

2 结果与分析

2.1 麸皮添加量的确定

由图 1 可知,添加麸皮后,多糖产量较空白对照明显增加。随着麸皮浸汁中麸皮添加量从 5 g/L 增加到 30 g/L,多糖的产量先增加后减少,当麸皮添加量为 10 g/L 时,多糖产量最高,为 (6.87 ± 0.29) g/L。桦褐孔菌是白腐菌,能够同时分泌纤维素酶和木质素降解酶,比霉菌更适合水解天然木质纤维素^[13]。纤维素和木质素是虎杖药渣中的主要成分,发酵液中纤维素酶和木质素降解酶的活力越高,越有利于虎杖的降解。麸皮中含有低聚葡萄糖、纤维二糖等诱导物质,能够促进菌体产生大量的纤维素酶和木质素降解酶^[14-15]。所以,在培养基中适当地添加麸皮有利于虎杖的降解和多糖的合成,培养基中麸皮过多则对酶的活性具有抑制作用^[16],反而不利于多糖的合成。因此,最适麸皮添加量为 10 g/L。

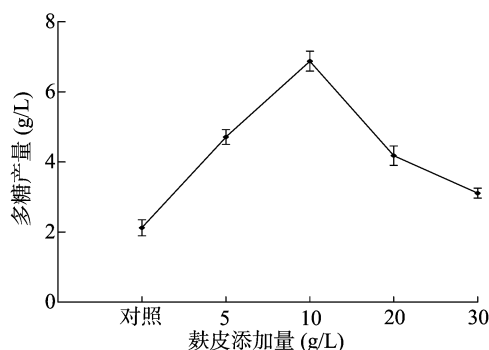


图1 麸皮添加量对多糖产量的影响

2.2 碳源的确定

为了进一步提高多糖产量,在含有 10 g/L 虎杖药渣的培养基中分别添加 4 种补充碳源,添加量为 10 g/L。以基础发酵培养基作对照,考察混合碳源对多糖生成的影响(图 2)。当麦芽糖、蔗糖、葡萄糖与虎杖的混合物作为碳源时,多糖产量分别为对照(虎杖药渣)的 60.59%、59.06%、49.69%;玉米粉作为补充碳源,获得的多糖 $[(4.70 \pm 0.21)$ g/L] 与对照

[(4.72 ± 0.19) g/L] 相差不大。向超等的研究表明,葡萄糖、蔗糖和麦芽糖作为碳源,比玉米粉更有利于桦褐孔菌菌丝体和桦褐孔菌三萜的积累^[17]。然而,在桦褐孔菌发酵虎杖药渣合成多糖的培养基中,添加这3种速效碳源的效果不如玉米粉。虽然虎杖药渣作为主要碳源(对照)与虎杖和玉米粉的混合碳源相比,获得的多糖产量相差不大,但考虑到虎杖药渣的废物利用,确定碳源为虎杖药渣。

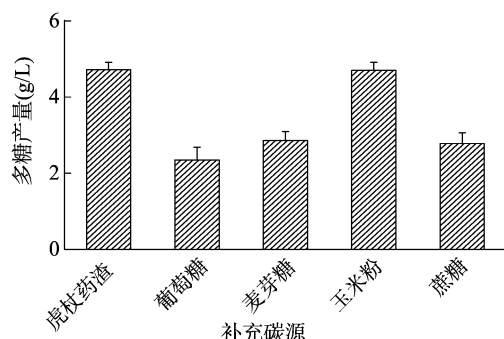


图2 补充碳源对多糖产量的影响

2.3 虎杖药渣添加量的确定

虎杖药渣作为主要的碳源,在培养基中的含量是影响桦褐孔菌多糖积累的重要因素。由图3可知,多糖的产量随着虎杖药渣添加量的增加先增加后减少,当培养基中虎杖药渣添加量为15 g/L时,多糖产量最高,为(6.93 ± 0.24) g/L。当培养基中虎杖药渣添加量超过15 g/L时,多糖产量降低,这是因为虎杖中的多种组分具有一定的抑菌作用^[18],如葱醌衍生物能够与DNA结合,抑制菌体DNA、RNA以及蛋白质的生物合成;鞣质能使微生物原生质凝固。过量的虎杖药渣抑制了桦褐孔菌的生长,导致多糖产量降低。因此,最适虎杖药渣添加量为1.5%。

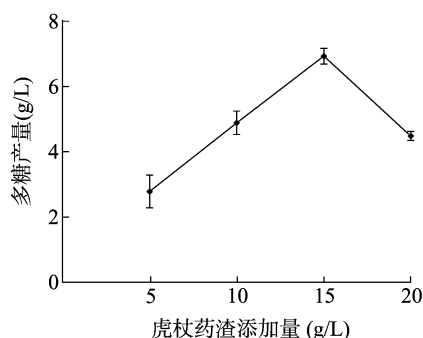


图3 虎杖药渣添加量对多糖产量的影响

2.4 氮源的确定

不同氮源对桦褐孔菌发酵虎杖生成多糖的影响见图4。由图4可知,蛋白胨作为氮源的发酵液中多糖含量最高,为(4.74 ± 0.29) g/L,牛肉膏次之,为(3.03 ± 0.18) g/L。豆粕和(NH₄)₂SO₄作为氮源不利于桦褐孔菌发酵合成多糖,多糖量分别为(0.57 ± 0.16) g/L和(0.36 ± 0.13) g/L,这与张泽生等^[19]和周丽洁等^[20]的研究结果一致。因此,确定蛋白胨为最适氮源。

改变培养基的蛋白胨添加量,考察氮源浓度变化对多糖产量的影响(图5)。由图5可知,蛋白胨添加量从2 g/L增加到15 g/L时,多糖产量先增大后减少。蛋白胨含量从

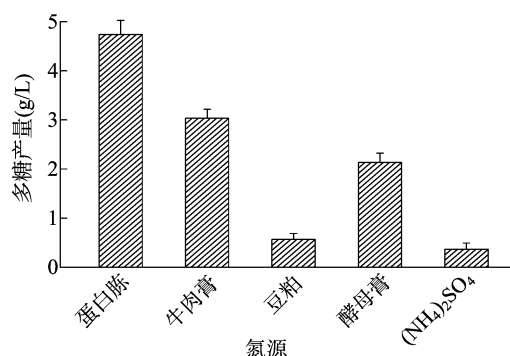


图4 氮源对多糖产量的影响

2 g/L 增加到5 g/L时,多糖产量由(2.13 ± 0.21) g/L 增加到(4.74 ± 0.19) g/L;蛋白胨含量从5 g/L到8 g/L时,多糖量变化不大;蛋白胨含量从8 g/L到15 g/L时,多糖产量下降为(1.63 ± 0.27) g/L。因此,确定发酵培养基中蛋白胨的最适添加量为5 g/L。

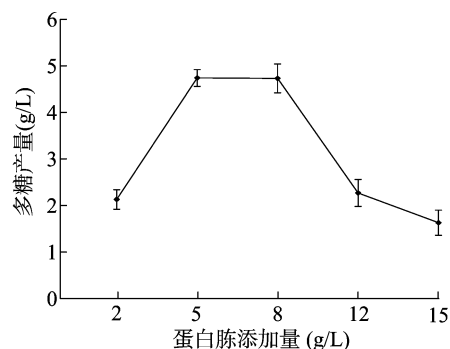


图5 蛋白胨添加量对多糖产量的影响

2.5 正交试验优化发酵培养基

以麸皮、虎杖药渣和蛋白胨的添加量为3个因素,各取3个水平,以多糖产量为指标,选L₉(3³)正交表进行试验,优化发酵培养基(表1)。正交试验极差分析结果(表2)表明,培养基中影响多糖产量的因素主次顺序为B > A > C,即虎杖药渣添加量 > 麸皮添加量 > 蛋白胨添加量。3个因素的最优水平组合为A₂B₂C₂,即虎杖药渣添加量为15 g/L,麸皮添加量为10 g/L,蛋白胨添加量5 g/L。因此,桦褐孔菌发酵虎杖药渣生成多糖的优化培养基为KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄ 1.5 g/L、蛋白胨5 g/L、虎杖药渣15 g/L、麸皮浸汁10 g/L pH值自然。此条件下,多糖产量为(7.65 ± 0.21) g/L。正交试验方差分析结果(表3)表明,麸皮添加量和虎杖药渣添加量对多糖产量的影响显著。根据F值可知,影响多糖产量的因素主次顺序与极差分析结果一致。

表1 虎杖药渣生成多糖培养基优化的正交试验因素水平

水平	因素		
	A: 麸皮 (g/L)	B: 虎杖药渣 (g/L)	C: 蛋白胨 (g/L)
1	5	10	2
2	10	15	5
3	20	20	12

2.6 白藜芦醇和桦褐孔菌菌丝体的获得

利用正交试验获得的发酵培养基进行发酵培养,HPLC法(高效液相色谱法)检测出发酵液中白藜芦醇含量为(1.62 ± 0.14) mg/g虎杖干药渣,桦褐孔菌菌丝体生物量为

表2 虎杖药渣生成多糖培养基优化的正交试验结果($n=3$)

试验号	因素			多糖 (g/L)
	A	B	C	
1	1	1	1	4.44
2	1	2	2	6.93
3	1	3	3	4.07
4	2	1	2	6.48
5	2	2	3	7.44
6	2	3	1	6.22
7	3	1	3	4.18
8	3	2	1	6.32
9	3	3	2	4.78
均值1	5.174	5.660	5.553	
均值2	6.713	6.063	5.777	
均值3	5.093	5.023	5.623	
极差	1.620	1.874	0.224	

表3 虎杖药渣生成多糖培养基优化的正交试验方差分析

方差来源	多糖			
	平方和	自由度	F值	显著性
麸皮	5.082	2	65.154	*
虎杖药渣	6.981	2	89.500	*
蛋白胨	1.042	2	13.359	
误差	0.080	2		

(11.79 ± 0.35) g/L。在虎杖中,白藜芦醇主要以白藜芦醇苷的形式存在,白藜芦醇苷由白藜芦醇和葡萄糖通过 β -葡萄糖苷键连接构成。纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶能够将白藜芦醇苷转化为白藜芦醇^[21]。桦褐孔菌分泌纤维素酶,在利用虎杖药渣的同时,将白藜芦醇苷转化为白藜芦醇。桦褐孔菌菌丝体含有丰富的人体必需氨基酸,在保健食品领域中具有广阔的应用前景。

3 结论

本试验利用桦褐孔菌发酵虎杖药渣生成桦褐孔菌多糖。通过单因素试验确定发酵培养基中最适麸皮添加量为10 g/L,最适虎杖药渣添加量为15 g/L,最适氮源为蛋白胨,添加量为5 g/L。在此基础上,采用正交试验优化发酵培养基。最优培养基组成为 KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L,蛋白胨5 g/L,虎杖药渣15 g/L,10 g/L麸皮浸汁。此条件下,多糖产量为(7.65 ± 0.21) g/L,白藜芦醇为(1.62 ± 0.14) mg/g,桦褐孔菌菌体生物量为(11.79 ± 0.35) g/L。该方法以虎杖药渣废弃物作为主要碳源,变废为宝,原料利用度高,发酵废渣少,发酵产品价值高,具有可观的社会效益、经济效益和产业化前景。

参考文献:

- [1] Kim S H, Kim H J, Lee M H, et al. Resveratrol induces apoptosis of KB human oral cancer cells [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry 2011, 54(6): 966–971.
- [2] Cui Y F, Zhang B Y, Zhang R, et al. Effects of resveratrol on morphology and oxidative stress of brain tissues in aging mice [J]. Journal of Hygiene Research 2013, 42(6): 995–998.
- [3] Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol [J]. Cardiovascular Drug Reviews 2004, 22(3): 169–188.
- [4] 李先宽, 李赫宇, 李 帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568–2578.
- [5] 田 凤, 徐德生, 冯 怡, 等. 虎杖药渣中白藜芦醇的提取和纯化 [J]. 中国医药工业杂志 2012, 43(10): 824–826.
- [6] 朱 杰. 虎杖药渣的生态化综合利用研究 [D]. 张家界: 吉首大学 2013.
- [7] 朱 杰, 刘 艺, 黄 苛, 等. 利用虎杖药渣栽培杏鲍菇的培养基优化及菌糠再利用分析 [J]. 中国农学通报 2013, 29(13): 182–186.
- [8] 戴玉成, 李 玉. 中国六种重要药用真菌名称的说明 [J]. 菌物学报 2011, 30(4): 515–518.
- [9] 赵芬琴, 朴惠善. 桦褐孔菌的研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志 2005, 12(2): 96–98.
- [10] Jarosz A, Skorska M, Rzymowska J, et al. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level in HeLa and nocardia cells [J]. Acta Biochimica Polonica 1990, 37(1): 149–151.
- [11] Yong O K, Park H W, Kim J H, et al. Anti cancer effect and structural characterization of endo-poly-saccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Life Sciences 2006, 79(1): 72–80.
- [12] 回 晶, 郭立雄, 张冬梅, 等. 桦褐孔菌菌丝体与子实体蛋白质营养价值评价 [J]. 食用菌学报 2008, 15(4): 67–69.
- [13] Song L L, Ma F Y, Zeng Y L, et al. The promoting effects of manganese on biological pretreatment with *Ipex lacteus* and enzymatic hydrolysis of corn stover [J]. Bioresource Technology, 2013, 135(3): 89–92.
- [14] 钟文文. 纤维素酶产生菌的选育及发酵条件优化 [J]. 环境工程学报 2007, 1(11): 140–144.
- [15] 艾斌凌, 王义强, 陈介南. 麸皮对里氏木霉 *Rut C-30* 产纤维素酶的促进作用 [J]. 生物质化学工程 2009, 43(2): 27–33.
- [16] Richa G, Jitender S. Production and optimization of alkaline cellulase from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation [J]. International Journal of Science and Research 2014, 3(6): 1186–1194.
- [17] 向 超, 徐向群. 响应面法优化桦褐孔菌产三萜化合物发酵培养基 [J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2013, 30(1): 124–129.
- [18] 朱廷儒, 王素贤, 裴月湖. 中药虎杖抗菌活性成分的研究 [J]. 中草药 1985, 10(3): 21.
- [19] 张泽生, 史佳宁, 张 婕, 等. 响应面法优化桦褐孔菌胞外多糖发酵条件 [J]. 现代食品科技 2009, 25(3): 298–301.
- [20] 周丽洁, 金玉兰, 陈艳秋. 营养条件对桦褐孔菌菌丝生长及多糖含量的影响 [J]. 延边大学农学学报 2006, 28(2): 96–101.
- [21] 袁晓华. β -葡萄糖苷酶产生菌的筛选、培养条件优化及 β -葡萄糖苷酶应用研究 [D]. 济南: 山东大学 2009.