

# 桦褐孔菌液体深层发酵条件优化研究

申进文<sup>1</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 王振河<sup>2</sup>, 霍云凤<sup>2</sup>, 王 斌<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 以生物量为指标, 研究了对桦褐孔菌液体深层发酵影响较大的主要因素, 即温度、发酵时间、初始 pH、接种量、摇床转速, 并运用中心旋转组合设计法对发酵条件进行了优化, 确定了其最佳范围。结果表明, 5 个因子对生物量的影响由大到小依次为初始 pH、发酵时间、接种量和摇床转速、温度, 而当温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速分别为 28.6℃, 125 h, 5.9, 10.5% 和 135 r/min 时, 获得的生物量最大, 为 22.91 g/L。

**关键词:** 桦褐孔菌; 发酵条件; 生物量; 中心旋转组合设计

**中图分类号:** S646.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)08-0088-05

## Optimization of the Fermenting Conditions for *Phaeoporus obliquus* Liquor in Submerged Fermentation

SHEN Jin wen<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, WANG Zhen he<sup>2</sup>, HUO Yun feng<sup>2</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>

(1. College of Life Science of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** Different factors, including temperature, fermentation time, initial pH, inoculum and rotary speed were studied comparatively using biomass as a director during the submerged fermentation of *Phaeoporus obliquus* liquor, and were optimized using central composite rotatable design (CCRD). The results indicated that the five factors have different effects on biomass, with an order from high to low: initial pH, fermentation time, inoculum and rotary speed, temperature. The maximum biomass (22.91 g/L) was acquired under the conditions of temperature 28.6℃, fermentation time 125h, initial pH 5.9, inoculum 10.5%(v/v) and rotary speed 135 r/min.

**Key words:** *P. obliquus*; Fermentation condition; Biomass; Central composite rotatable design (CCRD)

桦褐孔菌 [*Phaeoporus obliquus* (Pers.: FL) J. Schroet, 异名: *Lnonotus obliquus* (F) Pilát] 属担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、锈革菌科<sup>[1]</sup>, 是一种木生白腐菌, 常生长在白桦、银桦、赤杨等树种上。桦褐孔菌主要分布于北纬 45°~50° 的寒冷地区, 如俄罗斯西伯利亚和远东地区、北欧、波兰、中国大小兴安岭和长白山地区、日本北海道及北美北部等<sup>[2]</sup>。16 世纪以来, 桦褐孔菌一直被当作药物真菌使用, 俄罗斯、波兰、芬兰等国民间长期用它来防治胃癌、肠癌、

心脏病、糖尿病等疾病<sup>[2]</sup>。近年来, 国内外对桦褐孔菌进行了深入的研究, 主要针对活性成分的分离及鉴定, 目前已报道的主要有: 桦褐孔菌素、桦褐孔菌醇和多种氧化三萜类化合物、多种羊毛甾醇型三萜类化合物、木质素类、黑色素类等<sup>[3~9]</sup>。药理学实验证明: 桦褐孔菌具有显著抑制肿瘤细胞生长、增强机体免疫功能、抗氧化和抗病毒等功效<sup>[7~10]</sup>, 可用于恶性肿瘤、糖尿病和心血管疾病等重大疾病的预防和治疗<sup>[9, 11]</sup>。

收稿日期: 2007-05-09

基金项目: 河南省科技攻关计划重点项目(0223013100)

作者简介: 申进文(1964-), 男, 河南郑州人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事食、药用菌的研究。

桦褐孔菌野生资源十分有限,近年来价格逐渐升高。因此,人工培养桦褐孔菌子实体或菌丝体非常必要,运用液体发酵生产桦褐孔菌菌丝体是一条有效的途径,对研究和开发桦褐孔菌提供充足的原材料具有重要的现实意义。笔者在已有研究的基础上<sup>[12]</sup>,研究了在液体深层发酵过程中影响桦褐孔菌生物量的主要因素,即温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速,并对发酵条件进行了优化,旨在为进行桦褐孔菌的大规模液体发酵生产提供技术依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

桦褐孔菌的瘤状子实体采自黑龙江省与吉林省交界的老爷岭南坡,菌种由子实体分离,河南省科学院生物研究所真菌研究室鉴定,暂编为 *P. obliquus*WH001。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 葡萄糖 20.0g/L、酵母粉 18.70g/L、玉米浆 11.00g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.59g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g/L、琼脂 20.0g/L、pH 6.0。

1.2.2 液体种子培养基 同斜面培养基,去掉琼脂。

1.2.3 发酵培养基 小麦淀粉水解糖 100.83g/L (还原糖含量为 24%)、酵母粉 18.70g/L、玉米浆 11.00g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.59g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g/L、pH 6.0。

1.3 培养方法

1.3.1 液体种子培养 斜面菌种于 30℃恒温培养箱培养 6d 后,将菌丝刮下接入无菌液体种子培养基中,8 层纱布封口,静置 4h 后,置 30℃、120r/min 的 ZHWY-211D 双层恒温振荡器上振荡培养 60h。

1.3.2 摇瓶发酵单因子试验 500mL 三角瓶装 100mL 无菌发酵培养基,分别考察温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速对菌丝生物量的影响。

1.3.3 发酵条件优化 在单因子试验的基础上,以生物量为指标,采用中心旋转组合设计法 (central composite rotatable design, CCRD),对影响生物量的 5 个主要因素,即温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速进行研究,以获得该菌株在液体深层发酵条件下影响生物量的适宜条件。试验辅助软件为 Design expert (version 7.0.2, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA),试验方案由 Design expert 模块生成,共 5 个因子,5 个水平,32 个处理。

用多项式回归方法,对试验数据进行二次回归拟合,以期得到合适的回归方程,再对方程所代表的曲面进行分析,可以推测出最合适条件在试验中所覆盖的区域。多项式方程拟合的概率由相关系数 R 表示,其统计学上的显著性由 F 值检验确定。因素水平编码和试验方案分别见表 1、表 2。

表 1 中心旋转设计试验因子水平编码

编号	因素	编码水平				
		-2	-1	0	1	2
A	温度 (℃)	23	26	29	32	35
B	发酵时间 (h)	80	100	120	140	160
C	初始 pH	5	5.5	6.0	6.5	7
D	接种量 (% v/v)	6	8	10	12	14
E	摇床转速 (r/min)	110	120	130	140	150

1.4 测定方法

1.4.1 生长量的测定 取发酵液,于 4000r/min 离心 30min,菌丝体经蒸馏水洗涤 3 次,置 90℃烘干至恒重,称量。

1.4.2 还原糖测定 SBA-40B 型分析仪测定。

2 结果与分析

2.1 单因子试验结果

由单因子趋势图可知:在 24~30℃的温度范围内,随温度的升高生物量呈现逐渐增大趋势,当发酵温度为 30℃时,生物量达到最大值 18.9g/L。温度超过 30℃,菌丝的生长较弱,生物量下降(图 1)。

发酵时间对生物量的影响较为明显,在 130h 之前,是菌丝快速生长阶段,生物量以较大幅度增长,发酵到 130h 时,生物量达到最大值 18.7g/L,此后即便是延长发酵时间也不能使生物量进一步增大,反而出现下降,可能与培养液中营养基质耗尽导致菌丝体自溶有关(图 2)。

发酵培养基初始 pH 在 4.5~6.0 时,生物量由起初的 15.2g/L 增加到 18.8g/L,当 pH 进一步增大时,生物量开始下降,当初始 pH 达到中性及偏碱性时,生物量迅速下降,表明 *P. obliquus*WH001 不适于在培养液 pH 7 以上的环境下培养(图 3)。

接种量小于 12% 时,生物量一直增大,并达到最大值 18.6g/L(图 4),进一步增大接种量可能使发酵体系中传质和通气效率减小,导致生物量下降。

摇床的旋转速率主要决定通风量,在 100~130r/min 时,生物量呈现上升并保持较为平稳的状态,到 130r/min 时生物量达到最大值 18.4g/L,当大于 130r/min 时,可能增大了菌丝体相互之间的剪切作用阻碍了生物量的进一步增大(图 5)。

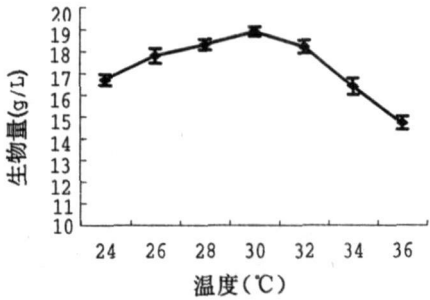


图 1 不同温度对生物量的影响

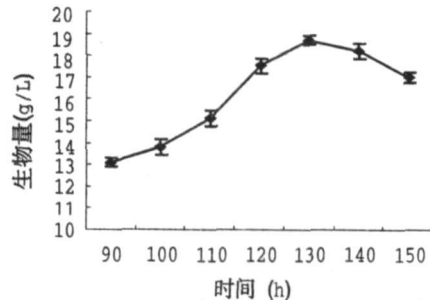


图 2 不同发酵时间对生物量的影响

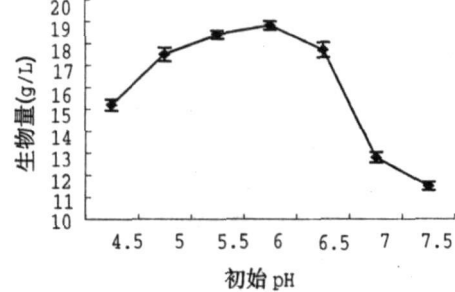


图 3 不同初始 pH 对生物量的影响

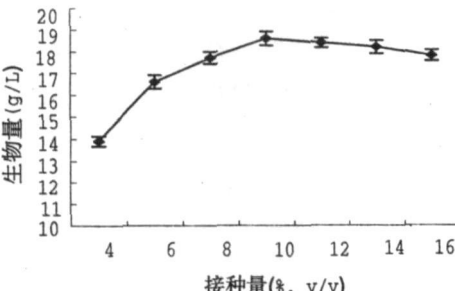


图 4 不同接种量对生物量的影响

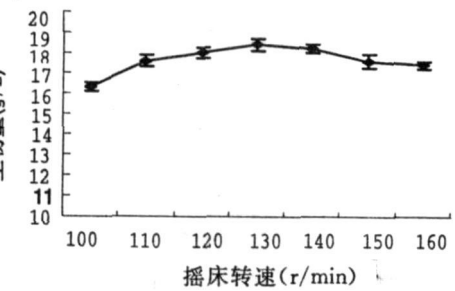


图 5 不同摇床转速对生物量的影响

2.2 发酵条件优化试验结果

在单因子试验的基础上,以生物量为指标,采用 CCRD 法,对影响生物量的 5 个主要因素:温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速进行了研究和探索,32 组处理试验结果见表 2。运用 Design expert 软件,对生物量各因素之间关系的多种拟合模型进行方差分析比较,根据 Design expert 系统建议,选用多元二次模型。将表 2 的数据进行二次多项回归拟合,获得生物量对温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速的多元二次回归方程:

$$Y=22.65-0.48A+0.35B-0.65C+0.31D+0.31E+0.34AB+0.28AC-0.031AD-0.28AE+0.34BC+0.28BD-0.34BE+0.34CD-0.28CE-0.094DE-1.84A^2-1.15B^2-1.72C^2-0.84D^2-0.72E^2。$$

对上述多元二次回归方程进行方差检验,结果见表 3。

表 2 不同处理的生物量

编号	因素					生物量(g/L)	
	A	B	C	D	E	预测值	实际值
1	26	100	5.50	8	140	20.00	20.12
2	32	100	5.5	8	120	16.00	15.30
3	26	140	5.5	8	120	16.00	15.40
4	32	140	5.5	8	140	16.00	15.76
5	26	100	6.5	8	120	15.00	15.50
6	32	100	6.5	8	140	15.00	15.32
7	26	140	6.5	8	140	15.00	15.71
8	32	140	6.5	8	120	16.00	15.81
9	26	100	5.5	12	120	16.50	16.13
10	32	100	5.5	12	140	16.00	16.12
11	26	140	5.5	12	140	17.00	15.26
12	32	140	5.5	12	120	16.00	16.50
13	26	100	6.5	12	140	16.50	16.13
14	32	100	6.5	12	120	15.00	15.86
15	26	140	6.5	12	120	16.50	16.57
16	32	140	6.5	12	140	16.00	15.70
17	23	120	6.0	10	130	17.00	16.24
18	35	120	6.0	10	130	14.50	14.30
19	29	80	6.0	10	130	16.00	16.20
20	29	160	6.0	10	130	21.00	21.84
21	29	120	5.0	10	130	18.00	18.50
22	29	120	7.0	10	130	14.50	14.20
23	29	120	6.0	6	130	18.00	17.58
24	29	120	6.0	14	130	21.50	21.86
25	29	120	6.0	10	110	19.50	19.87
26	29	120	6.0	10	150	21.00	20.60
27	29	120	6.0	10	130	22.50	22.38
28	29	120	6.0	10	130	22.50	22.40
29	29	120	6.0	10	130	22.50	22.42
30	29	120	6.0	10	130	22.50	22.37
31	29	120	6.0	10	130	22.50	22.43
32	29	120	6.0	10	130	22.50	23.08

表 3 回归方程显著性检验

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率> F
模型	241. 71	20	12. 09	7. 61	0. 000 7
理论误差	0. 000	5	0. 000		
总和	259. 18	31			

R= 0. 965 7 R<sup>2</sup>=0. 932 6

从表 3 可知, 选用模型显著,  $P<0.005$ , 拟合优度好, 预测值与实测值之间有较高的相关性(相关系数  $R=0.9657$ )。

对上述方程的回归系数进行显著性检验(表 4), 结果显示: 5 个因子对生物量的影响均显著;

表 4 回归系数显著性检验

因素	标准差	F 值	概率> F
A: 温度	0. 20	3. 47	0. 089 4 *
B: 发酵时间	0. 20	1. 90	0. 019 6 *
C: 初始 pH	0. 20	6. 30	0. 009 2 *
D: 接种量	0. 20	1. 48	0. 025 0 *
E: 摇床转速	0. 20	1. 48	0. 025 0 *
AB	0. 25	4. 82	0. 042 6 *
AC	0. 25	1. 19	0. 298 5
AD	0. 25	$9.84\times 10^{-4}$	0. 734 9
AE	0. 25	0. 80	0. 391 1
BC	0. 25	1. 19	0. 298 5
BD	0. 25	0. 80	0. 391 1
BE	0. 25	1. 19	0. 298 5
CD	0. 25	1. 19	0. 029 9 *
CE	0. 25	5. 08	0. 040 9 *
DE	0. 25	0. 089	0. 876 2
A <sup>2</sup>	0. 18	62. 61	$<0.0001$ *
B <sup>2</sup>	0. 18	24. 58	0. 000 8 *
C <sup>2</sup>	0. 18	54. 39	$<0.0001$ *
D <sup>2</sup>	0. 18	13. 06	0. 009 4 *
E <sup>2</sup>	0. 18	9. 47	0. 010 5 *

注: \*表示达 0. 1 显著水平

温度和发酵时间、初始 pH 和接种量、初始 pH 和摇床转速之间的交互作用显著, 而其他两两交互作用皆不显著。统计概率在 0. 1 水平时, 概率 $>F$  的数值越低, 则相应对生物量的影响越大。因此, 5 个因子对生物量的影响由大到小依次为初始 pH、发酵时间、接种量和摇床转速、温度。

从图 6 可以看出, 当初始 pH、接种量和摇床转速位于中心水平时, 温度和发酵时间都增大时, 生物量也随着增大, 当温度和发酵时间分别为 28. 6℃、122. 6h 时, 生物量的预测值为最大 22. 71 g/L, 若二者的值进一步增大, 则生物量的预测值下降, 说明合理的培养温度和发酵时间对生物量的影响非常重要, 若其值较低或较高都会阻碍菌丝体的生长。图 7 的曲面和等高线显示了当温度、发酵时间和接种量位于中心水平时, 初始 pH 和摇床转速共同对生物量的影响, 当二者分别为 5. 9, 133 r/min 时, 生物量的预测值最大 22. 76 g/L, 进一步增大二者, 反而引起生物量的下降。

图 8 的曲面和等高线显示了当温度、发酵时间和摇床转速位于中心水平时, 初始 pH 和接种量共同对生物量的影响, 当二者的值分别为 5. 93, 10. 34% 时, 生物量的预测值最大 22. 75 g/L, 进一步增大二者, 反而引起生物量的下降。

用多元函数极值理论进行计算可知, 当温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速分别为 28. 6℃, 125 h, 5. 9, 10. 5% 和 135 r/min 时, 生物量的最大预测值为 22. 84 g/L, 为了证实该回归方程的可靠性, 进行了验证试验。在上述最佳发酵条件下进行摇瓶发酵, 实际测定生物量为 22. 91 g/L。说明该数学模型能较好地预测实际发酵情况。

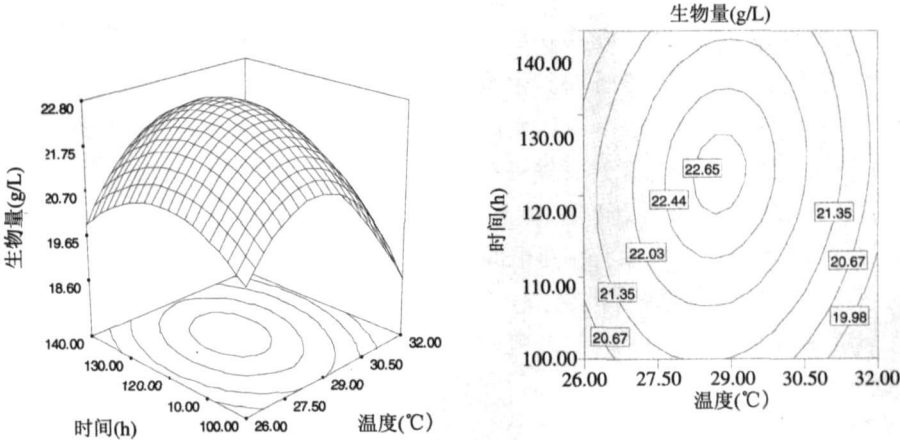


图 6 温度和发酵时间对生物量交互影响的曲面和等高线

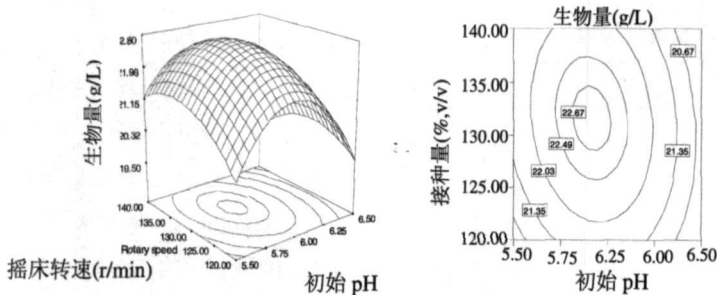


图 7 初始 pH 和摇床转速对生物量交互影响的曲面和等高线

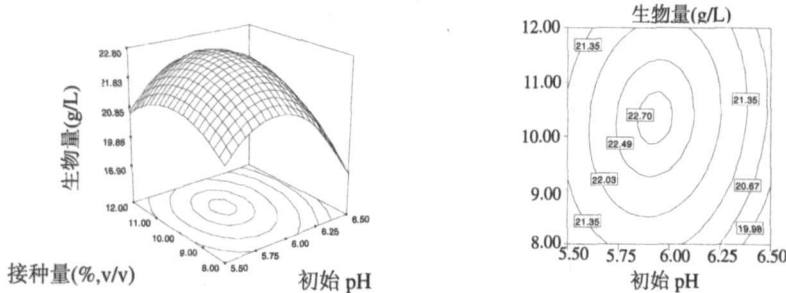


图 8 初始 pH 和接种量对生物量交互影响的曲面和等高线

3 结论与讨论

分别研究了温度、发酵时间、初始 pH、接种量和摇床转速对桦褐孔菌液体深层发酵的影响, 确定当其范围分别为 28 ~ 32 ℃, 120 ~ 140 h, 5. 5 ~ 6. 5, 8% ~ 14%, 120 ~ 140 r/min 时, 可获得较高的生物量。在此基础上, 运用中心旋转组合设计法对发酵条件进行了优化。优化结果表明: 5 个因子对生物量的影响由大到小依次为初始 pH、发酵时间、接种量和摇床转速、温度, 且温度和发酵时间、初始 pH 和接种量、初始 pH 和摇床转速之间的交互作用对生物量的影响显著, 而其他两两交互作用皆不显著; 当温度、发酵时间、初试 pH、接种量和摇床转速分别为 28. 6 ℃, 125 h, 5. 9, 10. 5 % 和 135 r/min 时为最佳优化发酵条件。在此条件下的验证试验获得的生物量最大, 为 22. 91 g/L。

桦褐孔菌野生资源日益枯竭, 解决桦褐孔菌资源短缺问题已经迫在眉睫, 除了进一步研究其生物学特性以及人工栽培菌核的技术外, 运用液体发酵技术生产桦褐孔菌菌丝体是解决研究和开发桦褐孔菌原材料不足的重要途径。在已有的研究基础上, 研究了在液体深层发酵过程中影响桦褐孔菌生物量的主要因素, 并对发酵条件进行了优化, 取得了较为理想的结果, 为大规模液体发酵生产桦褐孔菌菌丝体提供了技术依据。

参考文献:

[ 1 ] 钟秀宏, 孙东植. 桦褐孔菌的研究现状[ J ]. 延边大学医学学报, 2004, 27(4): 319 - 321.

[ 2 ] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌[ J ]. 中国食用菌, 2002, 21( 4 ): 7 - 8.

[ 3 ] 何坚, 冯孝章. 桦褐孔菌化学成分的研究[ J ]. 中草药, 2001, 32( 1 ): 4 - 6.

[ 4 ] Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S. Inhibition of HIV - 1 protease by water soluble lignin like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia oblique*[ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62( 3 ): 575 - 577.

[ 5 ] He J, Feng X Z, Lu Y. Three new triterpenoids from *Fuscoporia oblique*[ J ]. J Asian Nat Prod Res, 2001, 3 ( 1 ): 55 - 61.

[ 6 ] Babitskaia V G, Shcherba V V. The nature of melan in pigments from some micro and acromycetes[ J ]. Prim Biokhim Mikrobiol, 2002, 38( 3 ): 286 - 291.

[ 7 ] 李英秀, 崔基成, 孙东植, 等. 桦褐孔菌提取物对胃癌 MGC - 803 细胞株的抗增殖与诱导作用凋亡[ J ]. 菌物研究, 2003, 1(1): 17 - 23.

[ 8 ] Rasina L N. Effect of cryosubstance Chagi on deposition or isolation of 90Sr and on the effect of prolonged external exposure to gala radiation[ J ]. Biol Radioecol, 2002, 42( 4 ): 399 - 403.

[ 9 ] Wasser S P, Weis A L. Therapeutic effect of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms; a modern perspective[ J ]. Crit Rev Immunol, 1999, 19( 1 ): 65 - 77.

[ 10 ] Rzymowska J. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities[ J ]. Boll Chim Farm, 1998, 137( 1 ): 13 - 15.

[ 11 ] Glowacki H, Tomaszewski J. Attempted therapy of inoperable cancer of the female genitalia with *Poria oblique* Presl[ J ]. Extract Ginekol Pol, 1962, 33: 445 - 452.

[ 12 ] 王振河, 霍云凤, 王斌, 等. 桦褐孔菌液体深层培养研究[ J ]. 菌物学报, 2005, 25(3): 461 - 467.