

桑黄扩大培养过程中黄酮产量变化研究

杜睿琦¹, 王芯蕾², 许谦^{2*}

(1. 菏泽一中, 2015 级宏志级部, 山东菏泽 274000; 2. 菏泽学院农业与生物工程学院生命科学系, 山东菏泽 274000)

摘要 [目的] 对桑黄进行液体培养基的扩大培养, 分析扩大培养过程中黄酮产量的变化。[方法] 250、500、1 000 mL 3 种锥形瓶分别装液体培养基 150、300、600 mL, 在 28 ℃、180 r/min 条件下培养。采用有机溶剂浸提法提取黄酮, 分光光度法测定黄酮产量。[结果] 在扩大培养过程中, 桑黄胞内和胞外黄酮产量均呈现先下降再上升的趋势。[结论] 该研究结果对桑黄胞内和胞外黄酮的生产、提取及应用具有现实的指导意义。

关键词 桑黄; 液体培养基; 扩大培养; 黄酮产量

中图分类号 S567.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0109-03

Study on the Change of Flavonoids Production in the Expanding Culture Process of *Phellinus igniarius*

DU Rui-qi¹, WANG Xin-lei², XU Qian^{2*} (1. 2015 Hongzhi Level, Heze No. 1 Middle School, Heze, Shandong 274000; 2. Department of Life Science, Agriculture and Bioengineering College, Heze University, Heze, Shandong 274000)

Abstract [Objective] The research aimed to expand the culture medium of *Phellinus igniarius* and analyze the change of flavonoid production during the culture process. [Method] 150, 300, 600 mL liquid medium were stalled in 250, 500, 1 000 mL flasks respectively and incubated under 28 ℃, 180 r/min conditions. Organic solvent extraction was used to extract flavonoids and spectrophotometry was used to measure flavonoids production. [Result] In the process of expanding the culture, the intracellular and extracellular flavonoids production of *Phellinus igniarius* showed a tendency to decrease first and then rise. [Conclusion] The results of this study have guiding significance for the production, extraction and application of intracellular and extracellular flavonoids from *Phellinus igniarius*.

Key words *Phellinus igniarius*; Liquid culture medium; Expanded culture; Flavonoid production

桑黄属于担子菌亚门、层菌纲^[1], 是国际公认的药用真菌^[2], 因寄生于桑树而得名。黄酮是一种多酚类化合物, 它主要存在于天然植物中。研究表明, 黄酮在防止细胞衰老、增加免疫力、降低血脂血糖和扩张血管等方面有重要作用^[3]。桑黄黄酮含量高于其他真菌。我国野生桑黄资源匮乏^[4], 产量非常有限, 加上人工栽培要求高、周期长, 限制了对桑黄的开发利用, 难以成为稳定的工业产品来源^[5]。有学者证实桑黄菌丝体活性成分与子实体类似, 且菌丝体浸提物同样具有清除氧自由基、改善血液循环等作用^[4]。有人研究过高产桑黄黄酮菌株深层发酵条件的优化以及桑黄黄酮的高效提取和分析方法^[6-7], 但桑黄扩大培养过程中黄酮产量的变化研究还是一个空白。笔者通过对桑黄进行液体扩大培养, 研究扩大培养过程中胞内和胞外黄酮产量的变化规律, 为工业化生产桑黄黄酮提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 桑黄菌种。保存于菏泽学院微生物实验室的固体斜面桑黄菌种。

1.1.2 试剂。95%乙醇(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 无水三氯化铝(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 蔗糖(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 琼脂粉(生化试剂, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 蛋白胨(生化试剂, 北京奥博星生物技术有限责任公司); MgSO₄(分析纯, 天津市河东区红岩试剂厂); KH₂PO₄(分析纯, 西陇化工股份

有限公司); 98% 芦丁(化学对照品, 阿拉丁试剂有限公司); 玉米粉、麸皮、马铃薯提取液, 煮沸 30 min 后由纱布过滤得到。

1.1.3 仪器。HZQ-F160 振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); HZQ-Y 全温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); MJX 型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂); 101-2 型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂); 7230G 可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); SHHW21-CR420 电热恒温水浴箱(北京长安科学仪器厂); MLS-3780 全自动高压蒸汽灭菌锅(日本); CJ-2D 净化工作台(天津市泰新特仪器有限公司); TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 平板培养方法。保存于实验室的固体斜面桑黄菌种转接至马铃薯培养基(PDA), 用接种铲取出均匀菌块接种于平板中央^[8], 28 ℃ 下恒温培养, 测定桑黄生长直径, 并观察生长状况。

1.2.2 液体培养方法。扩大培养过程中所用的液体培养基为菏泽学院微生物实验室在前人研究的基础上改进的^[9]。培养基配方: 玉米粉 30 g/L、麸皮 70 g/L、蛋白胨 20 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、MgSO₄ 1.5 g/L, pH 自然。

待桑黄菌落直径达到平板直径, 无菌条件下, 用直径为 1 cm 的打孔器打出菌柄, 分别接种于 250 mL 锥形瓶内 150 mL 的液体培养液中(每瓶接 2 个菌柄)、500 mL 锥形瓶内 300 mL 的液体培养液中(每瓶接 4 个菌柄)、1 000 mL 锥形瓶内 600 mL 的液体培养液中(每瓶接 8 个菌柄), 28 ℃、180 r/min 条件下振荡培养 18 d。

1.2.3 桑黄菌丝粉末的制备。培养 18 d 的菌液经八层纱布过滤(滤液保留), 用蒸馏水洗涤 3 次, 置于已知重量的培养

基金项目 山东省重点研发项目(2016GNC113019); 菏泽市科技发展计划项目(2012N002)。

作者简介 杜睿琦(2000—), 女, 山东菏泽人, 高中生。* 通讯作者, 副教授, 硕士, 从事食药菌开发应用、微生物遗传育种研究。

收稿日期 2017-08-21

皿中,60℃下恒温鼓风干燥箱干燥至恒重,冷却后称菌丝体质量,研钵研碎后过60目筛得到。

1.2.4 标准曲线的绘制。精密称量芦丁10.0 mg(烘干至恒重),70%乙醇定容至100 mL,终浓度为0.1 mg/mL;称取AlCl₃ 1.34 g,70%乙醇定容至100 mL,配成0.1 mol/L的溶液;分别取0.05、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL的芦丁标准液至10 mL的容量瓶,并加入4 mL的0.1 mol/L AlCl₃溶液,70%乙醇定容至10 mL,摇匀,静置15 min,410 nm下测定吸光度。以芦丁实际浓度(C)对吸光度(Y)做线性回归,得到线性回归方程为 $Y=0.0028C+0.0023$, $R^2=0.9996$ (图1)。

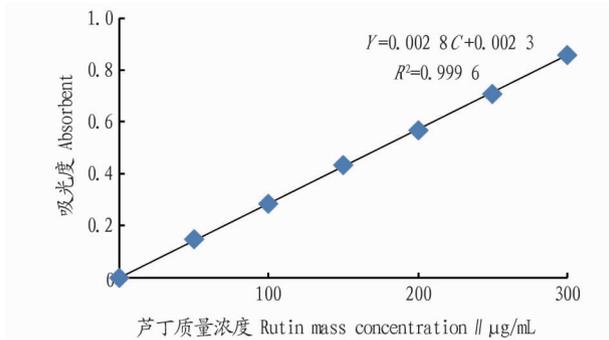
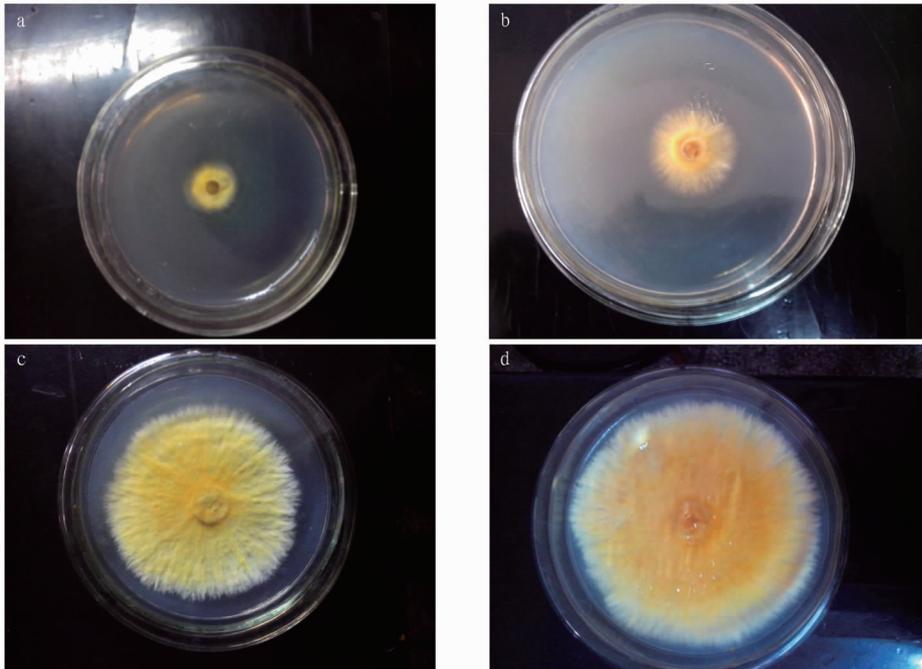


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

1.2.5 桑黄黄酮含量的测定。

1.2.5.1 胞外黄酮测定^[10]。无菌操作下取胞外液,



注:a.第4天;b.第6天;c.第8天;d.第10天

Note:a. The fourth day;b. The sixth day;c. The eighth day;d. The tenth day

图2 固体培养基上桑黄的形态变化

Fig.2 Morphological changes of *Phellinus igniarius* on solid culture medium

2.2.2 胞内黄酮的含量。把OD值代入线性回归方程 $Y=0.0028C+0.0023$,得到的C乘以浸提液的体积为0.5 g菌丝对应的黄酮产量,再经换算得出胞内黄酮产量。从表2可

4 000 r/min离心10 min,取1 mL上清液加入4 mL 0.1 mol/L显色液AlCl₃,70%乙醇定容至10 mL,40℃水浴显色10 min,测定其410 nm处的吸光度,代入标准曲线求得黄酮的浓度,再换算成黄酮产量。

1.2.5.2 胞内黄酮测定。采用有机溶剂浸提法提取黄酮。取菌丝粉末0.5 g,20倍体积70%乙醇、80℃温度下浸提2 h^[11-12],浸提液4 000 r/min离心10 min,取上清,之后操作步骤同“1.2.5.1”。

2 结果与分析

2.1 桑黄扩大培养过程中形态观察

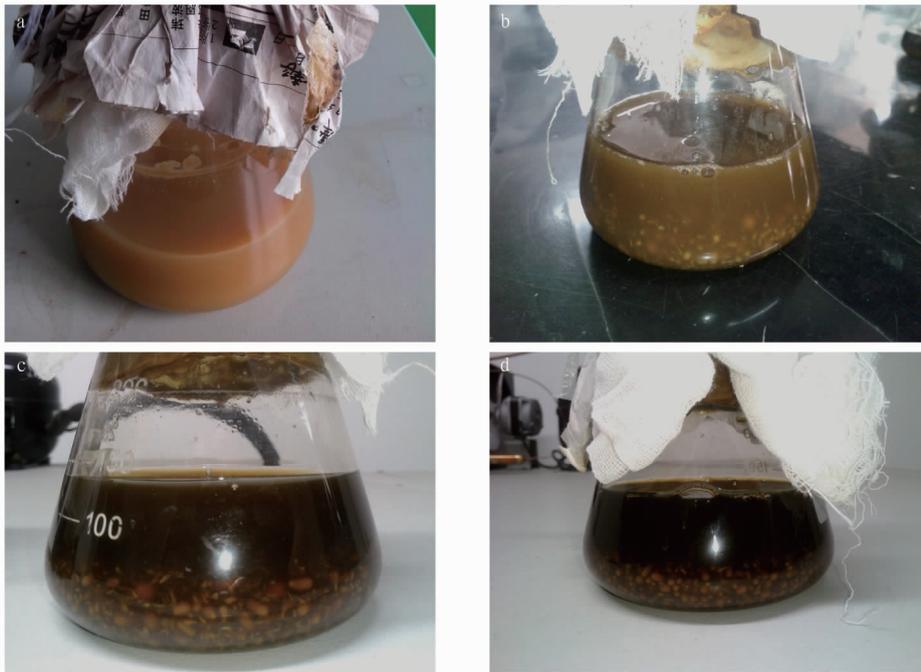
2.1.1 桑黄菌种活化过程中形态变化。图2展示了桑黄在固体培养基上第4天、第6天、第8天、第10天的生长形态,长势良好,菌落直径逐渐增大。

2.1.2 桑黄液体培养过程中形态变化。图3展示了桑黄在液体培养基第4天、第8天、第12天、第16天的生长状况。菌液由棕色逐渐变为棕褐色。菌丝体逐渐增加,其形态呈球形(平均直径约为0.25 cm)或柱形(长和宽分别约为0.35和0.20 cm)。

2.2 桑黄扩大培养过程中黄酮的产量

2.2.1 胞外黄酮的产量。把OD值代入线性回归方程 $Y=0.0028C+0.0023$,经单位换算即可得到黄酮产量。从表1可以看出,3种不同体积的液体培养基胞外黄酮的产量呈现先下降再上升的趋势。

以看出,3种不同体积液体培养基的胞内黄酮产量也呈现先下降再上升的趋势。



注:a.第4天;b.第8天;c.第12天;d.第16天

Note: a. The fourth day; b. The eighth day; c. The twelfth day; d. The sixteenth day

图3 液体培养基上桑黄的形态变化

Fig. 3 Morphological changes of *Phellinus igniarius* on fluid culture medium

表1 桑黄扩大培养过程中胞外黄酮的产量

Table 1 Production of extracellular flavonoids in the expanding culture process of *Phellinus igniarius*

液体培养基体积 Liquid medium volume//mL	胞外黄酮 OD 值 OD of extracellular flavonoids	胞外黄酮产量 Production of extracellular flavonoids//mg/mL
150	0.648	0.231
300	0.318	0.113
600	0.598	0.213

表2 桑黄扩大培养过程中胞内黄酮的产量

Table 2 Production of intracellular flavonoids in the expanding culture process of *Phellinus igniarius*

液体培养基体积 Liquid medium volume//mL	胞内黄酮 OD 值 OD of intracellular flavonoids	菌丝体恒重 Mycelia constant weight//g	胞内黄酮产量 Production of intracellular flavonoids//mg/mL
150	0.255	1.74	0.021
300	0.288	4.17	0.014
600	0.534	5.88	0.037

3 讨论与结论

此次试验中,桑黄胞外黄酮产量略高出文献数据^[8],桑黄菌丝体的黄酮产量比文献资料中偏低^[8]。一方面可能由于试验菌种不同所致,另一方面可能与桑黄菌丝体黄酮提取方法不同有关。

根据测量数据,250、500、1 000 mL 3种锥形瓶胞外黄酮产量分别为0.231、0.113、0.213 mg/mL,胞内黄酮产量分别为0.021、0.014、0.037 mg/mL,均呈现先下降再上升的趋势。

黄酮产量与液体培养基、培养条件、培养天数、浸提方法、测量方法均有密切关系,此次扩大培养过程中除锥形瓶装培养基量不同外,上述条件均相同。黄酮产量随着液体培养基体积的成倍增加呈先下降再上升的变化趋势,可能与桑黄黄酮代谢有关,桑黄调节其代谢机制以适应环境和满足自身生长繁殖对黄酮的需求。

参考文献

- [1] 许谦. 桑黄菌原生质体的高效分离探究[J]. 核农学报, 2014, 28(11): 1993-2000.
- [2] JEON Y E, LEE Y S, LIM S S, et al. Evaluation of the antioxidant activity of the fruiting body of *Phellinus linteus* using the on-line HPLC-DPPH method [J]. J of the Korean Soc for Appl Biol Chem, 2009, 52(5): 472-479.
- [3] PATEL S, GOYAL A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review [J]. Biotech, 2012, 2(1): 1-15.
- [4] 赵子高, 杨焱, 刘艳芳, 等. 桑黄黄酮高产菌株深层发酵条件的优化 [J]. 中国酿造, 2007(9): 22-25.
- [5] 陈瑞蕊, 施亚琴, 林先贵, 等. 珍稀药用真菌桑黄菌液体培养条件的初步研究 [J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 41-43.
- [6] 许谦. 桑黄菌丝体黄酮液体发酵培养基的优化 [J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 190-193.
- [7] 刘凡, 庞道睿, 刘军, 等. 有利于桑黄产胞内黄酮的液体发酵培养基配方优化 [J]. 蚕业科学, 2013, 39(6): 1160-1165.
- [8] 赵子高, 杨焱, 唐庆九, 等. 桑黄黄酮高产菌株筛选及菌丝体提取物生物活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 86-88.
- [9] 傅海庆, 周阳, 傅华英. 药用真菌桑黄的液体发酵培养基的配方优化筛选研究 [J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(5): 1039-1042.
- [10] 李凤林, 李青旺, 高大威, 等. 天然黄酮类化合物含量测定方法研究进展 [J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(4): 8-13.
- [11] 郭雪峰, 岳永德. 黄酮类化合物的提取·分离纯化和含量测定方法的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8083-8086.
- [12] 包海鹰, 孙德立. 桑黄黄酮提取工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 516-518.