

竹黄菌固态发酵产竹红菌素条件的优化

吕腾飞^{1,2}, 丁彦蕊^{1,3}, 廖祥儒^{1,2}, 蔡宇杰^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 物联网工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了竹黄菌固态发酵产竹红菌素过程中,培养基组成和培养条件对色素产量的影响。试验结果表明,最佳的培养基及培养条件为:玉米 10 g/dL(颗粒度为 0.78~0.95 mm),麦秸秆 10 g/dL(干重),外加碳、氮源及无机盐为葡萄糖 5 g/dL, NH_4Cl 1 g/dL, CuSO_4 0.05 g/dL, CaCl_2 0.1 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL, MgSO_4 0.2 g/dL;种龄 24 h,接种量 2 mL/30 g 基料(干重),初始含水量 50%,最适培养温度 30 ℃,优化后竹红菌素产量达 1.66%。

关键词: 竹红菌素;固态发酵;培养基;培养条件;优化

中图分类号:TQ 920.1 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)08—0832—06

Optimization on Solid Fermentation Media of Hypocrellin

LU Teng-fei^{1,2}, DING Yan-rui^{1,3}, LIAO Xiang-ru^{1,2}, CAI Yu-jie^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Internet of Things, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Maize was selected as the fermentation substrate, the pigment production conditions were optimized, and the optimized medium composition were: maize grits (particle size 0.78~0.95 mm) 90%, straw powder 10% (dry solid), glucose 5%, NH_4Cl 1%, CuSO_4 0.50%, CaCl_2 0.10%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.10%, MgSO_4 0.20%. Initial strains age was 24 hour, inoculation amount of beads was 2 mL/30 g dry solid, moisture content was 50%, the optimum temperature was 30°C. Under these conditions, the pigments yield could reach 1.66%.

Keywords: hypocrellin, solid-state fermentation, culture condition, optimum

竹黄(*Shiraia bambusicola*), 俗称竹花, 赤团子, 竹赤团子等^[1], 属于子囊菌亚门中的核菌纲、球壳目、肉座菌科(Hypocreaceae)、竹黄属(*Shiraia*)。竹黄主要寄主为箭竹属和短穗竹属植物, 主要分布在

江西、浙江、江苏、湖北、湖南、安徽、贵州和云南等地, 以及亚洲的日本^[2]。是一种特异性寄生在某些竹子嫩枝上的药用真菌, 药用部分为其子座, 具有止咳祛痛、舒筋活络、祛风利湿等功效, 可用于风湿性

收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275066); 江苏省科技创新与成果转化(重大科技支撑与自主创新)专项引导资金项目(BY2010117)。

* 通讯作者: 蔡宇杰(1973—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: yu_jie_cai@yahoo.com.cn

关节炎、坐骨神经痛、急性肝炎等^[3],在民间常用其泡酒,用以治疗跌打损伤、虚寒胃痛等症^[4-5]。竹红菌素被认为是竹黄中主要的有效成分之一,由多种萜醌类衍生物组成^[6-7]。近年来发现竹红菌素具有优良的光敏杀伤肿瘤细胞和抑制艾滋病病毒的作用,并且是一种新型的光活化农药和潜在的光电转化材料,在世界范围内正被广泛的研究^[8]。

从竹黄子座中直接提取获得竹红菌素的技术在国内外都有报道^[9],然而竹黄野外采集资源有限,而且容易造成竹林衰败。近年来,通过液态发酵和固态发酵的方法获得竹红菌素取得了一定的进展^[10-11]。项晓燕等(2012)通过优化竹红菌素的液态发酵条件,色素产量达到了7.68 mg/g 菌体^[12];蔡宇杰等(2004)利用固态发酵生物合成竹红菌素,色素产量达到了40 mg/kg 培养基^[9],为解决竹红菌素的来源提供了新思路。

相较于液态发酵,固态发酵具有节水节能的独特优势,而且几乎没有废液排放,属于清洁生产,在发酵领域日益受到重视^[13]。作者采用固态发酵的方法,研究了培养基组成、种龄、接种量、初始含水量和温度等对竹红菌素产量的影响,以期能为规模化生产提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

竹黄菌 (*Shiraia bambusicola*) SUPER-H168; 作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/dL): 马铃薯 20, 葡萄糖 2, 琼脂 2; pH 自然。

种子培养基(g/dL): 马铃薯 20, 葡萄糖 2, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; pH 自然。

基础培养基: 玉米(颗粒度 18~16 目) 25 g, 麦秸秆(20 目) 5 g, 蒸馏水 30 mL, pH 自然。

上述培养基均在 121 °C 下灭菌 20 min。

1.3 方法

1.3.1 孢子悬液的制备 斜面种子于 30 °C 培养 5~7 d 至长出大量孢子,用 20 mL 无菌水洗下孢子,玻璃珠将孢子充分打碎,配置成 10^6 个/mL 的孢子悬浮液。

1.3.2 色素检测方法 将固态培养物于烘箱中 70 °C 烘干至恒重,准确称取 1.00 g,研钵研碎,用 30

mL 无水乙醇在 30 °C 条件下提取两次,每次 40 min,抽滤后得澄清液,用旋蒸仪蒸发干,甲醇溶解并适当稀释后,用分光光度计在 465 nm 处测定其吸光值^[14],根据回归方程 $y=0.0364x+0.0441$ ($R^2=0.999$) 计算色素的含量,其中 y 为吸光度值, x 为色素质量浓度(mg/L)。

1.3.3 玉米颗粒度和麦秸秆添加量的优化 选择不同的玉米粒径和麦秸秆添加量进行组合实验,以确定最佳的配比。

1.3.4 初始含水量的优化 选择初始含水量在 35%~70% 的各个水平,通过实验确定最适含水量。

1.3.5 培养温度的优化 固态发酵培养基接种后,分别在 24、26、28、30、32 °C 条件下培养,以确定最佳培养温度。

1.3.6 种龄的优化 接种 1.3.1 所述孢子悬液 2 mL 于 50 mL 种子培养基中,在 30 °C、200 r/min 分别振荡培养 12、24、36、48、72 h 作为固态发酵的种子液。

1.3.7 接种量的优化 每 30 g 固态发酵基质(以干重计)分别接种 1、2、3、4、5 mL 液体种子,以确定最佳的接种量。

1.3.8 外加碳、氮源以及无机盐的优化 以葡萄糖为外加碳源, NH_4Cl 为外加氮源, CuSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 为无机盐,按照表 1 设计 7 因素 3 水平正交实验。

表 1 正交实验设计

Table 1 Orthogonal design

水平	因素						
	Glucose	NH_4Cl	CuSO_4	CaCl_2	KH_2PO_4	K_2HPO_4	MgSO_4
1	2	0.2	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
2	5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
3	10	1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

2 结果及分析

2.1 玉米颗粒度和麦秸量的优化

固态发酵中加入麦秸粉末有助于改善氧气和热量的传递情况,并且能使培养基蓬松,为菌丝体的生长提供良好的条件;但是麦秸量太多,在培养基制备过程中就会吸收更多的水分,而分配在玉米颗粒上的水分减少,使玉米颗粒在蒸料过程中不能充分糊化,从而影响菌体的生长。玉米颗粒度过小,导致培养基在蒸料过程中容易结块,而颗粒度太

大, 又会影响菌体对玉米颗粒内部营养物质的利用, 实验结果见表 2。当麦秸的添加量为 3 g, 玉米的颗粒度为 0.78~0.95 mm 时, 色素的产量最高, 达 1.42% (色素含量占培养基干重, 下同)。

表 2 玉米颗粒度和麦秸秆量对色素产量的影响

Table 2 Effect of straw powder and maize grits on yield of pigment

实验号	麦秸秆量/g	玉米颗粒度/mm	色素产量/%
1	3	0.35~0.78	1.19
2	3	0.78~0.95	1.42
3	3	0.95~1.25	1.18
4	5	0.35~0.78	1.14
5	5	0.78~0.95	1.29
6	5	0.95~1.25	1.15
7	7	0.35~0.78	0.97
8	7	0.78~0.95	1.16
9	7	0.95~1.25	1.10

2.2 初始含水量的优化

含水量是影响固态发酵的主要因素之一, 从图 1 可知, 含水量为 50% 时色素的产量最高, 可达 0.93%。

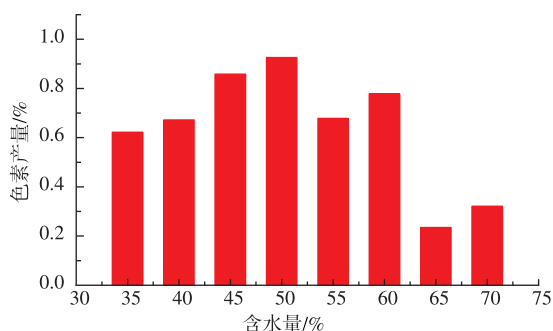


图 1 初始含水量对色素产量的影响

Fig. 1 Effect of moisture content of beads on yield of pigment

2.3 温度的优化

由图 2 可知, 培养温度为 30 °C 时, 色素的产量最高, 达 1.09%。当温度低于 28 °C 时, 不仅最终的色素产量会下降, 色素的合成时间也会推迟。故选择 30 °C 为最佳培养温度。

2.4 种龄的优化

种龄对种子的活性和种子的浓度都有较大的影响。种龄过短, 则大部分菌体尚处在适应期, 此时

接种会延长前期菌体的生长时间; 种龄过长, 则菌体开始进入衰亡阶段, 种子的活力也会急速下降, 影响后期的发酵。由图 3 可知, 当种龄为 24 h 时, 色素的产量最高, 达到 1.44%。种龄超过 24 h, 色素的产量会迅速下降。

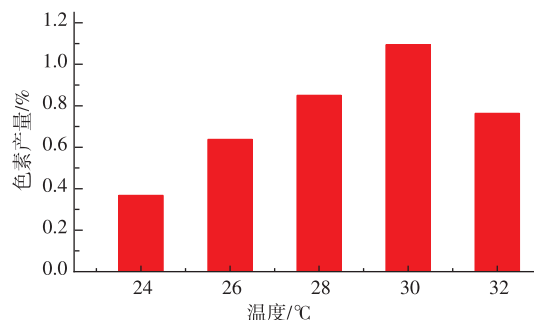


图 2 温度对色素产量的影响

Fig. 2 Effect of temperature on yield of pigment

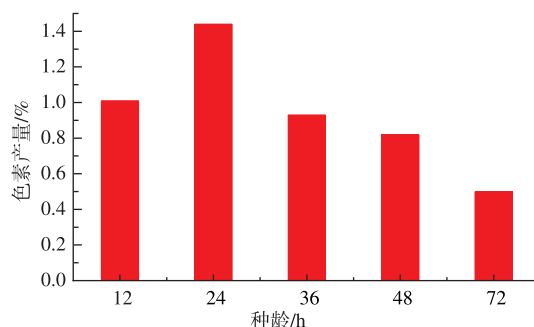


图 3 种龄对色素产量的影响

Fig. 3 Effect of seed age on yield of pigment

2.5 接种量的优化

合适的接种量能缩短发酵周期, 提高色素的产量。由图 4 可知, 当接种量达到 2 mL/30 g 干重时, 色素的产量达到 1.66%。接种量继续提高, 色素的产量会出现下降的趋势, 因此选择 2 mL/30 g 干重为最佳的接种量。

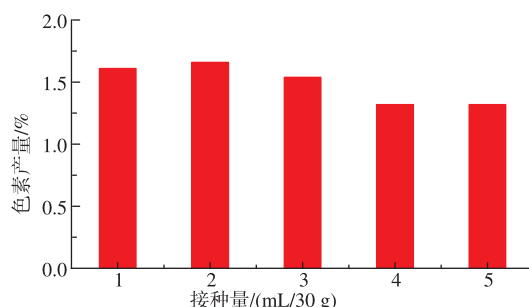


图 4 接种量对色素产量的影响

Fig. 4 Effect of inoculation amount of beads on yield of pigment

2.6 外加碳源、氮源及无机盐的优化

以葡萄糖为外加碳源, NH_4Cl 为外加氮源, CuSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 KH_2PO_3 、 K_2HPO_4 为无机盐, 按

照表 2 设计 7 因素三水平正交实验, 以确定各组分的质量分数及配比, 结果见表 3~4。

表 3 实验数据及结果

Table 3 Data and results of orthogonal experiment

实验	因素							色素产量/%
	Glucose	NH_4Cl	CuSO_4	CaCl_2	KH_2PO_4	K_2HPO_4	MgSO_4	
1	1	1	1	1	1	1	1	1.21
2	1	1	1	1	2	2	2	1.203
3	1	1	1	1	3	3	3	1.012
4	1	2	2	2	1	1	1	0.81
5	1	2	2	2	2	2	2	0.853
6	1	2	2	2	3	3	3	0.763
7	1	3	3	3	1	1	1	1.096
8	1	3	3	3	2	2	2	1.163
9	1	3	3	3	3	3	3	0.798
10	2	1	2	3	1	2	3	0.8
11	2	1	2	3	2	3	1	0.794
12	2	1	2	3	3	1	2	0.747
13	2	2	3	1	1	2	3	1.144
14	2	2	3	1	2	3	1	0.664
15	2	2	3	1	3	1	2	1.014
16	2	3	1	2	1	2	3	1.238
17	2	3	1	2	2	3	1	0.817
18	2	3	1	2	3	1	2	0.719
19	3	1	3	2	1	3	2	0.762
20	3	1	3	2	2	1	3	0.882
21	3	1	3	2	3	2	1	0.63
22	3	2	1	3	1	3	2	0.974
23	3	2	1	3	2	1	3	0.72
24	3	2	1	3	3	2	1	0.86
25	3	3	2	1	1	3	2	0.692
26	3	3	2	1	2	1	3	1.224
27	3	3	2	1	3	2	1	0.815
K_1	0.990	0.893	0.973	0.998	0.970	0.936	0.860	
K_2	0.882	0.867	0.833	0.747	0.832	0.967	0.903	
K_3	0.840	0.951	0.905	0.884	0.820	0.808	0.953	
R	0.150	0.084	0.140	0.151	0.150	0.128	0.093	

表 4 方差分析

Table 4 Tests of Between-Subjects Effects

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
Glucose	29.277	2	14.638	3.677	0.031
MgSO ₄	15.721	2	7.860	1.974	0.148
NH ₄ Cl	8.404	2	4.202	1.056	0.354
CuSO ₄	31.387	2	15.694	3.942	0.025
CaCl ₂	40.742	2	20.371	5.117	0.009
KH ₂ PO ₄	31.322	2	15.661	3.934	0.025
K ₂ HPO ₄	33.841	2	16.920	4.250	0.019
e	242.842	61	3.981		

表 3 表明, 在各因素中, CaCl₂ 的极差最大, 其次是 Glucose, KH₂PO₄, K₂HPO₄ 和 CuSO₄, MgSO₄; 而 NH₄Cl 的极差最小。因此各因素的主次顺序为: CaCl₂ > Glucose > KH₂PO₄ > CuSO₄ > K₂HPO₄ > MgSO₄ > NH₄Cl。最佳的碳氮源及无机盐配比为: Glucose 5%,

NH₄Cl 1%, CuSO₄ 0.05%, CaCl₂ 0.10%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.10%, MgSO₄ 0.20%。

表 4 方差分析表明, Glucose, CuSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄ 以及 K₂HPO₄ 等五个因素在 95% 的置信度下对色素产量的影响都是显著的。

3 结 语

作者通过对竹黄菌固态发酵产竹红菌素条件的研究, 确定了适宜的培养基的成分和培养条件。最佳培养基配方及培养条件为: 玉米颗粒度 0.78~0.95 mm, 麦秸添加量 10%, Glucose 5%, NH₄Cl 1%, CuSO₄ 0.05%, CaCl₂ 0.10%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.10%, MgSO₄ 0.20%, 初始含水量 50%, 培养温度 30 ℃, 种龄 24 h, 接种量 2 mL/30 g 干重, 优化后竹红菌素产量达 1.66% (占培养基干重)。在本实验中, 发酵周期长达 15 d, 因此, 有必要对发酵条件和过程做进一步优化, 以期缩短发酵时间。

参考文献:

- [1] 刘天慧. 食用菌概论[M]. 北京: 中国展望出版社, 1987: 26.
- [2] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄菌丝与竹黄子座成分比较分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 705-708.
LIANG Xiao-hui, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Analysis of the chemical compositions of *Shiraia sp.* SUPER-H168 fermented mycelia and the stromata of *Shiraia bambusicola*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 705-708. (in Chinese)
- [3] 林海萍, 陈声明, 陈超龙, 等. 一种值得开发利用的药用真菌—竹黄[J]. 浙江林业科技, 2002(22): 78.
LIN Hai-ping, CHEN Sheng-ming, CHEN Chao-long, et al. *Shiraia bambusicola*, a medicinal fungi needed to be developed[J]. **Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology**, 2002(22): 78. (in Chinese)
- [4] 钟树荣, 赵海, 李安明, 等. 一种尚待开发的中药—竹黄[J]. 中草药, 2002, 33(4): 372-374.
ZHONG Shu-rong, ZHAO Hai, LI An-ming, et al. Potential TCM-*Shiraia bambusicola* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2002, 33(4): 372-374. (in Chinese)
- [5] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 药用真菌竹黄的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 22-26.
LIANG Xiao-hui, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. The progress of research on medicinal fungus *shiraia bambusicola*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 22-26. (in Chinese)
- [6] 蒋莉金, 何玉英. 竹红菌素类光敏剂的光物理、光化学及光生物[J]. 科学通报, 2000, (45)19: 2019-2033.
JIANG li-jin, HE yu-ying. Photophysical, photochemical and photobiological properties of hypocrellin [J]. **Chinese Science Bulletin**, 2000, (45)19: 2019-2033. (in Chinese)
- [7] 王秀丽, 孙振令, 刘为忠, 等. 四种萘醌类光敏剂活性的比较[J]. 山东理工大学学报: 自然科学版, 2003, 17(5): 21-24.
WANG Xui-li, SUN Zhen-ling, LIU Wei-zhong, et al. Comparison between photosensitive activities of four perylenequinonoid derivatives[J]. **Journal of Shandong University of Technology: Natural Science Edition**, 2003, 17(5): 21-24. (in Chinese)
- [8] 张俭, 马岚. 竹红菌素研究的进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(增刊): 184-188.
ZHANG jian, MA lan. Recent advances of hypocrellin research [J]. **Journal of Yunnan University: Natural Sciences**, 2003, 25 (supplement): 184-188. (in Chinese)
- [9] 林海萍, 陈虹, 叶勇, 等. 竹黄竹红菌素含量的测定方法[J]. 浙江林学院学报, 2002(12): 57.
LIN Hai-ping, CHEN Hong, YE Yong, et al. Determining method for content of hypocrellin A in *Shiraia bambusicola*[J]. **Journal**

- of Zhejiang Forestry College, 2002(12):57. (in Chinese)
- [10] 蔡宇杰,丁彦蕊,张大兵,等. 竹黄菌的固态发酵竹红菌素的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(4):46-47.
CAI Yu-jie, DING Yan-rui, ZHANG Da-bing, et al. Study on fermentation hypocrellin pigments by *Shiraia bambusicola* henn. under solid condition[J]. *Biotechnology*, 2004, 14(4):46-47. (in Chinese)
- [11] 胡明明,蔡宇杰,廖祥儒,等. 竹红菌素培养基的初步优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(5):141-143.
HU Ming-ming, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization on submerged fermentation media of hypocrellin [J]. *Food & Machinery*, 2010, 26(5):141-143. (in Chinese)
- [12] 项小燕,张中信. 竹黄菌液体培养条件下产竹红菌素的研究[J]. 广西植物, 2012, 32(2):264-268.
XIANG Xiao-yan, ZHANG Zhong-xin. Study on fermentation hypocrellin by *Shiraia bambusicola* in submerged cultures [J]. *Guihaia*, 2012, 32(2):264-268. (in Chinese)
- [13] 黄达明,吴其飞,陆建明,等. 固态发酵技术及其研究的进展[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6):87-91.
HUANG Da-ming, WU Qi-fei, LU Jian-ming, et al. Current research progress of solid state fermentation technology and equipment[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(6):87-91. (in Chinese)
- [14] 刘为忠,李聪,陈远腾,等. 菲醌类化合物总量的测定[J]. 云南化工, 2000, 27(2):35-37.
LIU Wei-zhong, LI Cong, CHEN Yuan-teng, et al. Determination of the total quantity of perylene quinonoids [J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2000, 27(2):35-37. (in Chinese)

科技信息

欧盟批准 3 种转基因油菜用于食品与饲料

据欧盟网站消息,6月27日欧盟发布 2013/327/EU 号委员会实施决定,依据 (EC) No 1829/2003 号条例批准含有转基因油菜 Ms8、Rf3 和 Ms8 × Rf3 的食品,或由这些转基因油菜生产的食品或饲料在市场上销售。本决定自通告之日起 10 年内有效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准 3 种转基因油菜用于食品与饲料 [EB/OL]. (2013-7-2). <http://www.foodmate.net/news/daodu/2013/07/236215.html>.

美国研究发现橄榄粉能提高汉堡安全性

近日公布的一项美国研究发现,橄榄粉有灭菌与抗癌的功效,有助提升汉堡的安全性。

该研究由美国农业部与亚利桑那大学联合开展。研究人员发现,将橄榄去脂、去核后加工而成的橄榄粉能杀灭牛肉中的大肠杆菌,并能降低两种致癌物质 MeIQx 与 PhIP 的含量。研究人员发现在天然物质中,橄榄粉最有效改善牛肉的安全性,其 MeIQx 量减少了约 80%,PhIP 量减少了大约 84%。下一步,研究人员将查找橄榄中具有这种灭菌与抗癌作用的活性物质,并研究添加后对汉堡风味的影响。

[信息来源]Food Safety News. Olive Powder May Make Burgers Safer [EB/OL]. (2013-7-3). <http://www.foodsafetynews.com/2013/07/olive-powder-may-make-burgers-safer/>.

安徽省卫生厅公开征求《发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的测定气相色谱-质谱法》等 4 项食品安全地方标准(征求意见稿)意见

根据《食品安全法》和卫生部《食品安全地方标准管理办法》等有关规定,安徽省食安办组织制定了《发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的测定 气相色谱-质谱法》(征求意见稿)、《白酒中邻苯二甲酸酯类化合物含量的测定气相色谱-质谱联用(GC-MS)》(征求意见稿)、《休闲食品中丙烯酰胺的测定液相色谱-串联质谱法》(征求意见稿)、《食用植物油中铅、砷、汞、镉、铬含量的测定 电感耦合等离子质谱(ICP-MS)法》(征求意见稿)等 4 项食品安全地方标准。现公开征求各方意见,请将意见反馈表(附件 5)于 2013 年 9 月 20 日前反馈至省食安办综合协调处。

联系人:胡传鑫 电话/传真:0551-62998100 电子邮箱:ahsab123@126.com

[信息来源]安徽省卫生厅.关于公开征求《发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的测定气相色谱-质谱法》等 4 项食品安全地方标准(征求意见稿)意见的函 [EB/OL]. (2013-7-19). <http://www.ahwst.gov.cn/chn200909261718367/article.jsp?articleId=103764102>.