

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.02.024

# 竹黄菌液体培养下产竹红菌素的研究

项小燕, 张中信, 谢翎, 郑爱芳

(安庆师范学院 生命科学学院, 安徽 安庆 246011)

**摘要:** 先对不同产地采集的竹黄菌进行筛选, 得到优产竹红菌素的菌株, 然后采用单因子和 3 因素 3 水平正交试验法对竹红菌素液体发酵条件进行优化, 在优化培养基的基础上, 选用不同浓度的  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对竹红菌素进行离子调控研究。结果表明: 从休宁所采集的菌株不仅生长速度最快, 发酵所产的竹红菌素含量也最高; 竹红菌素最佳发酵碳源是葡萄糖, 最佳发酵氮源是硝酸钠, 最佳培养基组合为 2% 葡萄糖, 0.2% 硝酸钠, pH7.5;  $\text{Cr}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0.005% 时竹红菌素含量均最高; 0.05% 的  $\text{Ca}^{2+}$  最有利于竹红菌素的分泌;  $\text{Cu}^{2+}$  为 0.03% 时竹红菌素含量达到最大值。

**关键词:** 产地; 碳源; 氮源; 离子; 竹红菌素

中图分类号: S326 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)02-0264-05

## Study on fermentation hypocrellin by *Shiraia bambusicola* in submerged cultures

XIANG Xiao-Yan, ZHANG Zhong-Xin, XIE Ling, ZHENG Ai-Fang

(School of Life Sciences, Anqing Teachers College, Anqing 246011, China)

**Abstract:** *Shiraia bambusicola* from different regions were firstly assayed for their hypocrellin production, thus the high performance strains of *Shiraia bambusicola* were obtained. Then the culture media was optimized by one-factor-at-a-time and three factors and three levels of orthogonal matrix methods. Subsequently, the optimized conditions were then assayed for their effects on accumulation of hypocrellin in the presence of different levels of  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . The results showed that the strains collected from Xiuning grew faster and produced relatively high amount of hypocrellin than those from other regions. The most suitable carbon sources and nitrogen sources were glucose and  $\text{NaNO}_3$ ; the growing medium consisting of glucose (2%),  $\text{NaNO}_3$  (0.2%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.01%),  $\text{MgSO}_4$  (0.05%) with pH level at 7.5 yielded the maximum production rate of hypocrellin. This could be further increased following the addition of  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . Addition of  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  at the concentration of 0.005% both stimulated the hypocrellin production and the biosynthesis;  $\text{Ca}^{2+}$  of 0.05% was most suitable for the hypocrellin production; addition of  $\text{Cu}^{2+}$  of 0.03%, the hypocrellin production rate reached the maximum level.

**Key words:** regions; carbon sources; nitrogen sources; ions; hypocrellin

竹黄 (*Shiraia bambusicola*) 又名竹花、天竹花、淡竹花、竹茧、赤团子、竹赤团子、竹赤斑菌、竹参、竹三七、血三七等, 属于肉座菌科竹黄属真菌。竹黄具

有抗炎、镇痛、抗菌、抗肿瘤以及无毒副作用等方面功效。其中, 对该菌研究得最为深入的活性成分之一是竹红菌素。该色素具有止咳、祛疤、祛痛舒筋、

① 收稿日期: 2011-09-05 修回日期: 2011-12-21

基金项目: 安徽省自然科学基金(KJ2007B107); 安徽省高校青年教师计划项目(2007jpl123); 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2012Z229)[Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province(KJ2007B107); Scientific Research Fund Project for Higher Education Youth Teachers of Anhui Province(2007jpl123); the Natural Science Foundation of Anhui Provincial Education Bureau(KJ2012Z229)]

作者简介: 项小燕(1981-), 女, 安徽桐城人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事药用真菌研究, (E-mail) xiaoyanxiang@aqtc.edu.cn.

祛风湿及治疗多种皮肤顽症,并有抗癌和抑制艾滋病的的作用(肖君等,2003;王静祥,1999;Hudson等,1997;Miller等,1997;Hudson等,1994;Hirayama等,1997)。此外,竹红菌素还可以制成新型的光活化药物和潜在的光电转换材料,目前已受到越来越多的重视。从竹黄中共分离到4种竹红菌素,分别是竹红菌甲素、乙素、丙素和丁素(hypocrellin A、B、C、D),且竹红菌素A的含量是衡量竹黄菌品质的重要指标,此色素可用丙酮作溶剂提取获得(林海萍等,2002)。由于竹黄分布地区局限,生长季节短暂,天然产量低(邓丹等,2001),因而野生资源远远满足不了市场需求。要改善这种局面,需要从其它途径进行弥补。研究表明,液体发酵具有周期短、产量高,且不受场地和季节限制等优点,因此,用该技术发酵生产竹黄具有重要的意义。

石贵阳等(2004)对竹黄液体发酵培养基进行了初步优化;李加友(2008)对液体发酵生物量有初步的研究,但对优产竹红菌素的菌株及发酵途径尚无研究报道。安徽省的一些产地有该菌的分布(邓丹等,2001)。本文先对不同产地所采集的菌株进行了筛选,得到优产竹红菌素A菌种,然后对发酵条件进行优化。由于金属离子可以改变真菌细胞膜的透性或改变发酵途径中关键酶的活性,从而改变发酵产物的含量(郑维发等,2008)。因而,本研究在上述实验基础上,又向培养基中添加各种不同浓度的金属离子以达到提高色素含量的目的。对液体发酵培养竹红菌素进行了系统研究,为大规模液体培养获得该色素提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与培养基

竹黄菌株分离自安徽休宁、广德、宁国采集的竹黄子座,由安庆师范学院魏和平博士鉴定。竹红菌素A标准品购自Sigma公司。斜面母种培养基:PDA培养基。菌种筛选液体培养基(%):葡萄糖1.5,硝酸钠0.3,磷酸二氢钾0.1,硫酸镁0.05,pH6.5。液体种子培养基(%):葡萄糖2,牛肉膏0.3,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.1,MgSO<sub>4</sub>0.05,pH值自然。碳源优化基础培养基(%):蛋白胨0.3,各供试碳源2,磷酸二氢钾0.1,硫酸镁0.05,pH值自然。氮源优化基础培养基(%):葡萄糖2,各供试氮源0.3,磷酸二氢钾0.1,硫酸镁0.05,pH值自然。pH基础培养

基(%):葡萄糖2,硝酸钠0.3,磷酸二氢钾0.1,硫酸镁0.05,将pH值调至4.5,5.5,6.5,7.5,8.5。离子培养基:在优化培养基中加入不同浓度的CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、FeCl<sub>3</sub>、CrCl<sub>3</sub>和CaCl<sub>2</sub>。

### 1.2 主要仪器

恒温培养箱(EHSY LAB),摇床(THZ-03M2),冷冻干燥机(FD-1),分光光度计(721)。

### 1.3 竹黄菌的培养

菌种的获得:各地采集的竹黄子座用75%的酒精表面消毒,在无菌条件下切成黄豆粒大小的小块,27℃恒温培养,待试管长满菌丝后,挑选优势菌株转平皿培养,另用等量无菌水冲洗,接入孢子悬液,250 mL三角烧瓶(装液量80 mL)进行摇瓶发酵培养,摇床转速120 r/min,培养168 h。比较平皿和发酵培养各项指标从而选定菌种产地;培养基优化正交试验:将筛选后的斜面菌株用无菌水冲洗,在全温震荡培养箱27℃,130 r/min,培养72 h。再用匀浆器将菌丝打碎,即获得种子液。在上述培养基基础上选定各供试碳源、氮源和pH值,进行单因素试验,每组实验设三个平行对照,在单因素试验的基础上再通过正交实验确定优化的液体培养基。离子优化实验:用0,0.03%,0.05%,0.1%的CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O和CaCl<sub>2</sub>;0,0.003%,0.005%,0.01%的FeCl<sub>3</sub>和CrCl<sub>3</sub>加入优化后的培养基培养,每一浓度做3个平行对照,27℃、130 r/min,培养96 h。

### 1.4 分析方法

竹红菌素A标准曲线的制定:精确称取竹红菌素A标准品10 mg,置于10 mL容量瓶,用丙酮溶解并定容至刻度,得标准品溶液1 mg/mL。用丙酮稀释成一系列浓度(10,20,30,40,50,100,单位:μg/mL)的对照品溶液。取系列对照品溶液在465 nm处测吸光度(林海萍等,2002),以竹红菌素A质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,进行回归计算,得回归方程为 $y = 0.0203x + 0.2842$ , $r = 0.9992$ 。竹红菌素A含量的测定:将一定量的菌丝与一定比例的丙酮混合,浸提过夜,过滤后得到澄清提取液,用丙酮适当稀释后测定吸光值,根据回归方程计算竹红菌素A的含量。生物量(细胞干重)测定:发酵液经200目筛过滤,倾去滤液,收集菌体用蒸馏水洗涤后,将菌丝体放入冷冻干燥机中冷冻干燥至恒重后称重。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件对实验数据进行分

析,所有实验均进行三次测验,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析(ANOVA)进行多重比较,以  $P < 0.05$  时表示组间存在显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同产地菌株的培养比较

由图 1 可以看出,从休宁采集的竹黄菌生长速度为 1.85 cm/d,其生长速率明显高于宁国和广德两地的菌种,与其相比,差异显著。液体发酵竹红菌素含量检测结果显示,休宁的菌株液体发酵产生的竹红菌素含量与其它两地相比差异显著,高达 5.21 mg/g。而广德的菌株液体发酵产竹红菌素为 0.78 mg/g,宁国的菌株液体发酵不产生竹红菌素。故选取休宁的菌株为实验发酵菌种。

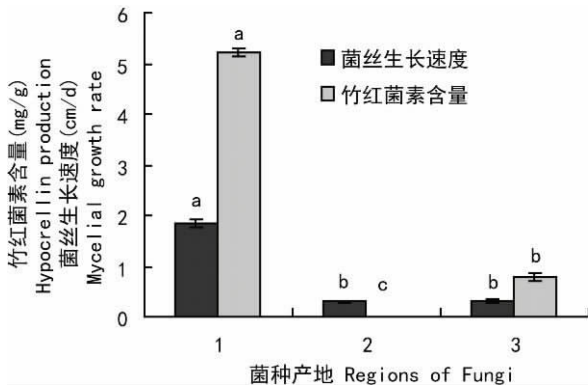


图 1 不同产地竹黄菌生长状况的比较

Fig. 1 Comparison of growing status of *Shiraia bambusicola* from different regions

1. 休宁; 2. 宁国; 3. 广德。不同字母表示在 5% 水平差异显著。  
1. Xiuning; 2. Ningguo; 3. Guangde. Different letters mean significance at 5% level.

### 2.2 竹红菌素液体发酵培养基的优化

2.2.1 碳源对竹黄菌液体发酵的影响 碳源对竹黄菌的生物量和竹红菌素的影响见图 2。其中菌株在可溶性淀粉和蔗糖为碳源时能很好地生长,发酵结束后菌丝体干重分别为 9.58 g/L 和 9.38 g/L,其次是在葡萄糖碳源培养基中,为 8.14 g/L;而葡萄糖为碳源时竹红菌素含量最高,达到 5.25 mg/g。故选葡萄糖为发酵碳源。

2.2.2 氮源对竹黄菌液体发酵的影响 从图 3 看出,以牛肉膏作为氮源时生物量显著高于其它组,为 11.55 g/L,其次影响较大的是蛋白胨和硝酸钠,在尿素中生长最差;而竹红菌素在以尿素为氮源时含量

最高,达到 5.35 mg/g,在以硝酸钠为氮源时次之,为 4.85 mg/g。综合考虑,选硝酸钠为发酵氮源。

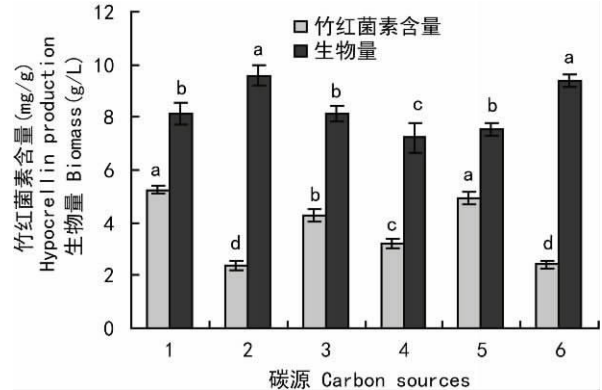


图 2 碳源对生物量和竹红菌素的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources on mycelia dry weight and hypocrellin production

1. 葡萄糖; 2. 可溶性淀粉; 3. 麦芽糖; 4. 甘露醇; 5. 果糖; 6. 蔗糖。  
1. Glucose; 2. Soluble starch; 3. Maltose; 4. Mannitol; 5. Fructose; 6. Sucrose.

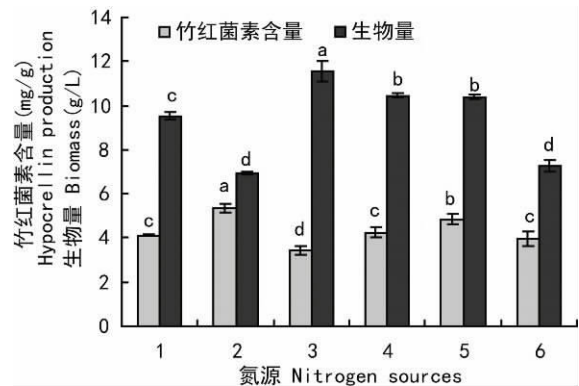


图 3 氮源对生物量和竹红菌素的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on mycelia dry weight and hypocrellin production

1. 酵母膏; 2. 尿素; 3. 牛肉膏; 4. 蛋白胨; 5. 硝酸钠; 6. 硫酸铵。  
1. Yeast extract; 2.  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ; 3. Beef extract; 4. Peptone; 5.  $\text{NaNO}_3$ ; 6.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

2.2.3 pH 值对竹黄菌液体发酵的影响 由图 4 可知,生物量在 pH 值为 8.5 时含量最高,与其它组比较有显著差异,在 4.5~6.5 之间没有显著性差异;而竹红菌素在 pH 6.5 时含量最高,为 6.74 mg/g,显著高于其它组,过高或过低的 pH 均不利于该色素的形成。

2.2.4 正交试验优化竹红菌素培养条件 在碳源、氮源和 pH 单因子试验的基础上,选取葡萄糖、硝酸钠和 pH 值为实验因素,设计了  $L_9(3^4)$  正交试验进一步优化竹红菌素发酵培养基,其因素水平设计见

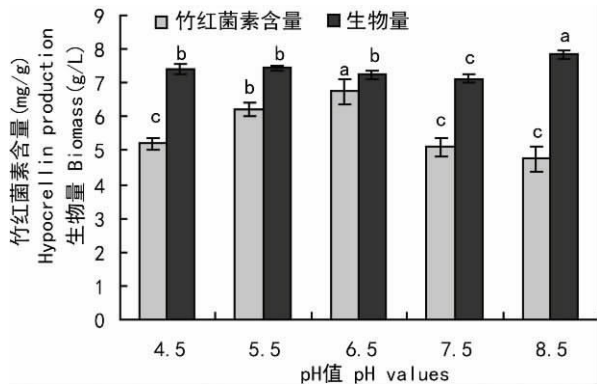


图 4 起始 pH 值对生物量和竹红菌素的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on mycelia dry weight and hypocrellin production

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表

Table 1 The factors and levels of orthogonal experiments

水平 Levels	因素 Factors		
	A 葡萄糖浓度 Glucose concentration(%)	B 硝酸钠浓度 NaNO <sub>3</sub> concentration(%)	C pH 值 pH values
1	1.5	0.2	5.5
2	2	0.3	6.5
3	2.5	0.4	7.5

表 3 正交实验方差分析

Table 3 Analysis of variance of orthogonal tests

方差来源 Variance origin	离差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	显著性 Significance
葡萄糖浓度 Glucose concentration	60.67	2	1.15	不显著 Not significance
硝酸钠浓度 NaNO <sub>3</sub> concentration	124.71	2	2.36	不显著 Not significance
pH 值 pH values	190.10	2	3.60	不显著 Not significance
误差 Error	52.82	2		

注:  $F_{0.05(2,2)} = 19$

由于  $F_A, F_B, F_C$  均小于  $F_{0.05(2,2)} = 19$ , 故 A, B, C 三因素对竹红菌素的产量影响均不显著, 要获得高产量的竹红菌素, 选各因素的最佳发酵水平。

### 2.3 不同离子对液体发酵产竹红菌素的影响

2.3.1  $Cr^{3+}$  和  $Fe^{3+}$  对竹红菌素的影响 图 5 结果表明, 培养基中添加  $Fe^{3+}$  后, 竹红菌素含量随着该离子浓度的增加而不断增加, 在浓度为 0.003% 时, 与对照组有显著性差异, 而当浓度增至 0.005% 时, 其含量达到最大值, 与对照组比较有极显著性差异。0.005% 的  $Cr^{3+}$  也能极显著地提高该色素的含量, 在此浓度下竹红菌素含量高达 7.56 mg/g。

2.3.3  $Ca^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  对竹红菌素的影响 培养基中添  $Ca^{2+}$  后, 竹红菌素的含量有了明显的提高, 其中

表 2 正交试验

Table 2 The results of orthogonal tests

试验号 Test No.	A	B	C	D	竹红菌素含量 Hypocrellin production(mg/g)
1	1	1	1	1	15.36
2	1	2	2	2	17.80
3	1	3	3	3	22.67
4	2	1	2	3	25.6
5	2	2	3	1	20.23
6	2	3	1	2	15.37
7	3	1	3	2	28.04
8	3	2	1	3	6.58
9	3	3	2	1	8.04
K1	55.83	69	37.31	43.63	
K2	61.2	44.61	51.44	61.21	
K3	42.66	46.08	70.94	54.85	
k1	18.61	23	12.44	14.54	
k2	20.4	14.87	17.15	20.4	
k3	14.22	15.36	23.65	18.28	
R	6.18	8.13	11.21	5.86	

表 1, 结果见表 2, 实验各因素显著性分析见表 3。

从表 2 的极差分析结果看出, 对该色素发酵影响最大的是 pH 值, 其次是氮源, 碳源影响最小, 最佳组合为  $A_2B_1C_3$ , 即 2% 葡萄糖, 0.2% 硝酸钠, pH7.5。

在 0.03% 的浓度下, 与对照组相比有显著性差异, 当浓度升至 0.05% 时, 与对照组有极显著的差异。而  $Cu^{2+}$  在 0.03% 时, 培养基中竹红菌素的含量高达 7.68 mg/g, 与对照组差异极显著, 在浓度为 0.05% 时也能显著提高该色素含量。

## 3 结论与讨论

本文先对竹黄菌优产竹红菌素的菌株进行了挑选, 然后系统地研究了该菌的液体发酵条件, 得到了适合竹红菌素分泌的最佳培养基和各离子浓度。单因素和正交试验结果显示, 竹红菌素分泌的最佳培养基组合是 2% 葡萄糖, 0.2% 硝酸钠, pH7.5。离

子浓度试验结果显示,  $\text{Cr}^{3+}$  为 0.005% 时, 比对照组能极显著地提高竹红菌素的含量; 0.03% 和 0.005% 的  $\text{Fe}^{3+}$  都能显著地促进竹红菌素的生长, 尤其是在 0.005% 的水平下色素含量达到最大值; 0.03% 和 0.05% 的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  都能显著地提高培养基中竹红菌素的含量, 其中,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在 0.05% 时竹红菌素含量最高;  $\text{Cu}^{2+}$  在 0.03% 时最适合竹红菌素的生成。

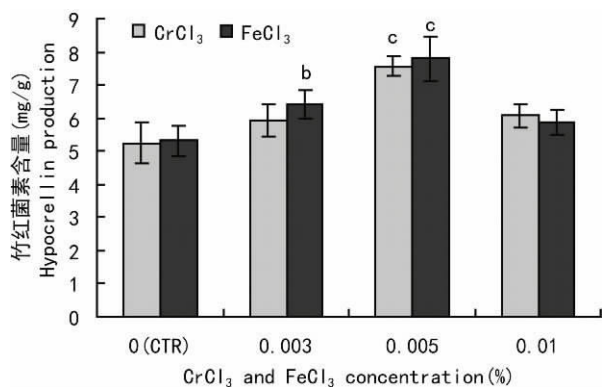


图 5  $\text{Cr}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  对竹红菌素产量的影响

Fig. 5 Effects of  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  on hypocrellin productions

CTR: 对照, 与对照组比较,  $^b P < 0.05$ ,  $^c P < 0.01$ . 下同。CTR: Control;  $^b P < 0.05$  vs CTR;  $^c P < 0.01$  vs CTR. The same below

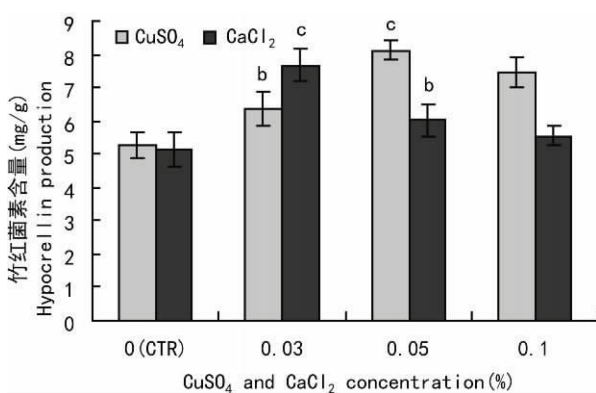


图 6  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对竹红菌素产量的影响

Fig. 6 Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on hypocrellin production

在所选的碳源中, 单糖、二糖和多糖均能较好地促进菌丝体的生长, 而速效碳源葡萄糖和部分二糖对竹红菌素形成具有重要作用, 由于葡萄糖最容易被微生物吸收, 所以被用作该菌发酵的主要碳源, 有机氮源牛肉膏对菌丝体的生长有显著的促进作用, 而尿素最有利于竹红菌素的分泌, 但硝化氮源无论是对菌体生长还是目标产物色素的形成都是较为理

想的选择。实验采用了渐进的优化方法优化培养条件, 并用正交实验考虑了因素间的相互作用, 使培养基配方更加科学。在优化的培养基中添加适当浓度的离子进一步提高了色素的含量, 这可能是由于离子改变了发酵途径中一些关键酶的活性。石贵阳等 (2004) 从优化培养基方面来提高竹红菌素含量, 此方法虽对目标产物有一定的促进作用, 但效果不显著。本实验对优势菌株进行发酵条件的优化后, 结合发酵途径, 得到了更适合竹红菌素分泌的培养方法。实验结果表明, 目标产物在此改良条件下得到了显著提高。但其发酵机制还不清楚, 有待更深入的研究, 以期更好地提高该菌的发酵质量。

#### 参考文献:

- Deng D(邓丹), Zhang H(张灏). 2001. Development and application of the study in *Shiraia bambusicola* (竹黄的研究进展及应用)[J]. *Edib Fung* (食用菌), **36**(5): 36-37
- Hirayama J, Kenji I, Hil WK. 1997. Photoinactivation of virus infectivity by Hypocrellin A[J]. *Photochem Photobiol*, **65**(5): 697-700
- Huderson JB, Imperial V, Haugland RP. 1997. Antiviral activities of photoactive perylenequinones[J]. *Photochem and Photobiol*, **65**(2): 352-354
- Huderson JB, Zhov J, Chen J. 1994. Hypocrellin from hypocrellin bambusaensis phototoxic to human immunodeficiency virus[J]. *Photochem Photobiol*, **60**(3): 253-255
- Li JY(李加友). 2008. Study on *Shiraia bambusicola* in submerged cultures (竹黄菌的液体发酵研究)[J]. *Edib Fung Zhejiang* (浙江食用菌), **16**(5): 24-25
- Lin HP(林海萍), Chen H(陈虹), Ye Y(叶勇), et al. 2002. Determining method for content of hypocrellin A in *Shiraia bambusicola* (竹黄竹红菌甲素含量测定方法)[J]. *J Zhejiang Fore Coll* (浙江林学院学报), **19**(2): 157-160
- Lin HP(林海萍), Chen SM(陈声明), Chen CL(陈超龙). 2002. *Shiraia bambusicola*, a medicinal fungi needed to be developed (一种值得开发利用的药用真菌——竹黄)[J]. *J Zhejiang Sci Tech* (浙江林业科技), **22**(1): 77-80
- Miller G, Brown K, Ballangrud AM. 1997. Preclinical assessment to hypocrellin B and hypocrellin B derivatives as sensitizers for photodynamic therapy of cancer; progress update[J]. *Photochem Photobiol*, **65**(4): 714-722
- Shi GY(石贵阳), Zhang DB(张大兵), Lou ZH(楼志华), et al. 2004. Study on fermentation hypocrellin pigments by *Shiraia bambusicola* under liquid condition (竹黄菌液体培养条件下生成竹红菌素的研究)[J]. *Pharm Biotech* (药物生物技术), **11**(5): 299-301
- Wang JX(王景祥). 1999. A survey of *Shiraia bambusicola* (竹黄的研究概况)[J]. *China Trad Herb Drug* (中草药), **30**(6): 477-479
- Xiao ZJ(肖仔君), Chen HY(陈惠音), Yang ND(杨汝德). 2003. Hypocrellin (竹红菌素)[J]. *Chin Food Addit* (中国食品添加剂), **2**(4): 74-76
- Zheng WF, Xiang XY, Chen CF, et al. 2008. Effects of culture media and three metal ions on the accumulation of lanosterol and ergosterol on cultured mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. *Mycosyst*, **27**(1): 126-139