

灵芝发酵覆盆子生产总黄酮的培养基优化研究

朱会霞

(衡水学院,河北 衡水 053000)

摘要:以灵芝和覆盆子为试材,通过 $L_{18}(3^7)$ 正交实验设计对灵芝发酵生产覆盆子黄酮基础培养基进行了优化研究。结果表明:灵芝发酵生产覆盆子黄酮的基础培养基组合为葡萄糖 20 g/L,黄豆粉 15 g/L,玉米粉 50 g/L,酵母膏 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, VB_1 0.01 g/L,此培养基条件下,灵芝发酵覆盆子后黄酮含量达到 4.58 mg/g,与对照组(不接种灵芝)相比含量提高 96.57%。

关键词:灵芝;覆盆子;黄酮

中图分类号:S 567.3⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0169-03

覆盆子(*Rubus idaeus* L.)属蔷薇科悬钩子属木本植物。覆盆子果实是一种聚合果,为药食两用果实,富含黄酮、多糖、粗三萜等功能性物质。因此,覆盆子具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫机能、减肥之功效,有助阳缩尿、补肾固精功能,用于治疗阳痿、肾虚遗精、尿频和遗尿等病症,因此,覆盆子具有很强的药用及保健作用^[1]。覆盆子黄酮类化合物是覆盆子代谢过程中产生的重要天然有机化合物,是覆盆子中主要活性成分之一,具有抗氧化、抑菌消炎、消除自由基、抗过敏、抗感染、抗突变、抗肿瘤^[2]等生理活性,且毒性较低,因此可用作食品、化妆品的天然添加剂。

灵芝具有繁殖力强,易于深层发酵培养,且在深层发酵培养过程中会有多种酶系产生,有利于果胶、木质素等分解,有利于覆盆子中有效成分的溶出。该试验对灵芝发酵生产覆盆子黄酮工艺进行了研究,以期为提高覆盆子黄酮提出率及覆盆子黄酮的进一步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灵芝斜面菌丝体:衡水学院生命科学系微生物实验室保藏。

覆盆子干果(一级品,购于衡水市中医院药店)净制粉碎过 40 目筛,50℃烘干备用。样品成分分析中所用化学试剂均为分析纯或生化试剂。

培养基^[3]:斜面培养基:马铃薯 200.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L、 KH_2PO_4 3.0 g/L、 VB_1 0.01 g/L、琼脂 20.0 g/L、20%的土豆汁配制。种子培养基:葡萄糖 30.0 g/L、黄豆粉 10.0 g/L、酵母膏

1.0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 VB_1 0.01 g/L、pH 6.0,蒸馏水配制。发酵培养基:碳源为葡萄糖 3.6%、氮源为蛋白胨 0.4%、pH 6.0、酵母膏 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 VB_1 0.005%。

1.2 试验方法

1.2.1 种子液的培养 从 28℃ 培养 6 d 的斜面上用接种钩切 1 cm² 带培养基的菌体转入装有 150 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,26℃ 150 r/min 培养 3 d^[4]。

1.2.2 发酵培养 将种子以一定的接种量,接入装有一定量培养基的 500 mL 三角瓶中,在 26℃ 振荡培养 6 d。

1.2.3 灵芝发酵覆盆子黄酮培养条件 将灵芝真菌按照 5% 的接种量接种到摇瓶培养基中,培养温度 26℃,摇床转速 100 r/min,培养时间 168 h,覆盆子添加量 100 g/L,以不接种灵芝菌为对照^[6]。

1.2.4 灵芝发酵覆盆子黄酮培养基优化设计 选用葡萄糖、玉米粉、豆粉、酵母膏、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 VB_1 为因素,各取 3 水平,进行 $L_{18}(3^7)$ 正交实验,因素及水平见表 1。500 mL 三角瓶中装液量为 150 mL,10% 的接种量,26℃ 150 r/min,培养 6 d 进行检测。

表 1 $L_{18}(3^7)$ 正交实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

水平	因素						
	A 葡萄糖 /g · L ⁻¹	B 豆粉	C 玉米粉	D 酵母膏	E KH_2PO_4	F MgSO_4	G VB_1
1	10	10	30	0.5	0.5	0.2	0.01
2	20	15	40	1.0	0.7	0.4	0.03
3	30	20	50	1.5	0.9	0.6	0.05

1.3 项目测定

总黄酮含量的测定参照孙金旭等^[5]的方法。

2 结果与分析

2.1 灵芝发酵覆盆子黄酮最佳时间的确定

由图 1 可知,对照组黄酮随振荡时间的延长,培养液中的总黄酮含量不断增加,在 0~96 h 的过程中,总

作者简介:朱会霞(1977-),女,河北景县人,博士,副教授,现主要从事发酵工程和食品等方面的研究工作。

收稿日期:2013-04-15

黄酮含量增幅较大,由 0 mg/g 上升到 2.21 mg/g,增幅效率为 $0.023 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,之后 96~168 h,覆盆子总黄酮含量虽有增幅,但增幅幅度较小,增幅效率为 $0.0017 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,168 h 振荡后,覆盆子黄酮的最大含量为 2.33 mg/g。灵芝发酵覆盆子黄酮的最大含量提取时间为 120 h,此时,黄酮含量为 4.11 mg/g,相对于对照组最大含量提高 76.39%。

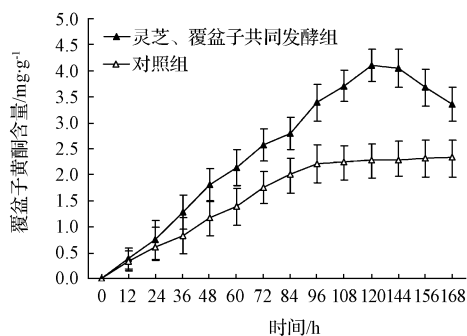


图1 灵芝发酵时间对覆盆子黄酮产量的影响

Fig.1 Effect of *Ganoderma* fermentation time on the extraction efficiency of *Rubus idaeus* total flavonoids

2.2 培养基筛选正交实验结果与分析

由表 2、3 可以看出,葡萄糖、黄豆粉、玉米粉对灵芝发酵生产覆盆子黄酮影响显著,而酵母膏、 KH_2PO_4 、

表2 $L_{18}(3^7)$ 正交实验结果

Table 2 Results of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

水平	A 葡萄糖	B 黄豆粉	C 玉米粉	D 酵母膏	E KH_2PO_4	F MgSO_4	G VB_1	黄酮含量 /mg · g ⁻¹
1	1	1	1	1	1	1	1	2.18
2	1	2	2	2	2	2	2	3.05
3	1	3	3	3	3	3	3	3.15
4	2	1	1	2	2	3	3	2.88
5	2	2	2	3	3	1	1	4.12
6	2	3	3	1	1	2	2	3.77
7	3	1	2	1	3	2	3	2.65
8	3	2	3	2	1	3	1	3.88
9	3	3	1	3	2	1	2	3.13
10	1	1	3	3	2	2	1	2.77
11	1	2	1	1	3	3	2	2.83
12	1	3	2	2	1	1	3	3.71
13	2	1	2	3	1	3	2	3.66
14	2	2	3	1	2	1	3	4.52
15	2	3	1	2	3	2	1	4.21
16	3	1	3	2	3	1	2	3.77
17	3	2	1	3	1	2	3	3.26
18	3	3	2	1	2	3	1	3.55
K_1	2.948	2.985	3.082	3.250	3.410	3.572	3.452	
K_2	3.860	3.610	3.457	3.583	3.317	3.285	3.368	
K_3	3.373	3.587	3.643	3.348	3.455	3.325	3.362	
R	0.912	0.625	0.561	0.333	0.138	0.287	0.090	

MgSO_4 、 VB_1 的影响不显著,按照培养基成分的影响主次顺序为:葡萄糖>黄豆粉>玉米粉>酵母膏> MgSO_4 > KH_2PO_4 > VB_1 ,比较 7 个因素不同水平下的总和,发现 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2\text{E}_3\text{F}_1\text{G}_1$ 条件下覆盆子黄酮产量最高,在此条件下进行验证试验,覆盆子黄酮产量为 4.58 mg/g 高于正交实验中的最高值,由此确定灵芝发酵生产覆盆子黄酮的适宜培养基条件为:葡萄糖 20 g/L,黄豆粉 15 g/L,玉米粉 50 g/L,酵母膏 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, VB_1 0.01 g/L。

表3 培养基优化 $L_{18}(3^7)$ 正交实验方差分析

Table 3 Significant analysis about the effect of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
葡萄糖	2.497	2	83.233	19.000	*
黄豆粉	1.506	2	50.200	19.000	*
玉米粉	0.982	2	32.733	19.000	*
酵母膏	0.352	2	11.733	19.000	
KH_2PO_4	0.060	2	2.000	19.000	
MgSO_4	0.289	2	9.633	19.000	
VB_1	0.030	2	1.000	19.000	
误差	0.03	2			

3 结论

该研究对灵芝发酵生产覆盆子黄酮的工艺进行了研究,通过比较不同发酵时间覆盆子黄酮含量,得出最佳的发酵时间为 120 h;通过 $L_{18}(3^7)$ 正交实验设计对灵芝发酵生产覆盆子黄酮基础培养基进行了优化研究,结果得出灵芝发酵生产覆盆子黄酮的基础培养基组合为:葡萄糖 20 g/L,黄豆粉 15 g/L,玉米粉 50 g/L,酵母膏 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, VB_1 0.01 g/L;在上述培养基条件下,灵芝发酵覆盆子后黄酮含量达到 4.58 mg/g,与对照组(不接种灵芝)相比含量提高 96.57%。

参考文献

- [1] 陈永存. 覆盆子的营养功效及产品开发生[J]. 农产品资源, 2007(10): 42-45.
- [2] Kazuhiro O. Labdane type diterpene glycosides from *rubus foliolosus* [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(9): 2443-2445.
- [3] 孙金旭, 朱会霞, 王敏, 等. 灵芝真菌液体发酵培养基优化研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(12): 51-53.
- [4] 朱会霞, 孙金旭. 灵芝真菌摇瓶发酵条件优化研究[J]. 中国酿造, 2008(12): 30-33.
- [5] 孙金旭, 朱会霞. 超声波提取覆盆子干果黄酮工艺研究[J]. 中国酿造, 2010, 217(4): 147-149.
- [6] 刘金哲, 史小青, 姚艳飞, 等. 香菇发酵葛根生产总黄酮的工艺研究[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 212-215.

Study on Optimization of Medium for Total Flavonoids Production from *Rubus idaeus* L. by *Ganoderma* Fermentation

ZHU Hui-xia

(Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000)

北疆芦竹的扦插快繁技术

陈惠瑜¹, 吕 军²

(1. 新疆石河子科技局, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆石河子农业科技开发研究中心, 新疆 石河子 832011)

中图分类号: S 795.8 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2013)15-0171-01

芦竹(*Arundo donax*)属禾本科芦竹属多年生粗壮草本植物, 又称荻芦竹, 是介于芦苇与竹子之间的1种非木材纤维原料, 分布于温、热带地区。对土壤要求不严格, 河堤碱地均可种植, 而且生长在水边地带还可以净化污水^[1]。芦竹的繁殖力强, 其繁殖方法有分株繁殖、扦插繁殖等。分株繁殖成活率高, 但繁殖系数太低, 且植株大小不一, 生长不一致; 扦插繁殖系数高, 但成活率受扦插技术和环境影响较大。芦竹在新疆北部是稀有的绿化材料、主要用于水景园的背景材料, 也可点缀于桥、亭、榭四周, 也是北疆难得造纸材料, 在滴灌条件下可保证芦竹喜水的特性, 加之北疆光照充足, 有较大的生长量, 1 a 即可收获, 3 a 后稳产, 667 m² 产量可达5~6 t, 但由于北疆冬季种条保存要求高, 苗床水分不易掌握, 且温室的空气干燥, 芦竹插穗中空, 易抽干, 繁殖成苗率低, 现针对近几年的实际操作, 总结出的一套北疆芦竹扦插快繁技术, 成功地提高了扦插成苗率, 总结如下。

1 取种条

10月下旬, 室外温度稳定在-2~5℃, 芦竹根部进入休眠, 地上部分叶子枯黄, 即可取种条, 砍1~1.5 cm粗木质化程度高的茎秆作为种条, 距地面3~4 cm锯成平口, 去除尾梢, 脱叶, 20~30根为1个小捆紧扎准备冬藏。注意取种条低于-5℃芦竹种条上生长点受冻不易发芽, 扦插成活率低。温度高于0℃, 采种条有伤流, 而且冬藏时易霉变, 影响种条扦插成活率。

2 种条保存

把取下的种条及时埋于地面以下40~80 cm之间,

湿细沙冬藏。

3 苗床准备

苗床为20 cm深, 长4 m、宽2 m的小池, 根据育苗量增加育苗池的个数。育苗池底部夯实, 一侧较另一侧高5 cm, 形成坡面, 坡面要顺坡抹平, 厚膜铺底, 较低侧留5 cm长的小沟, 用于排除多余水分, 用膜作隔离, 可防止土传病害的发生。育苗基质准备: 粗沙与蛭石按1:1比例混合, 平铺于育苗池, 厚约15 cm。苗床防病措施: 75%五氯硝基苯可湿性粉剂每1 m² 用3 g与基质拌匀。

4 插穗准备

翌年3月初, 把冬藏的种条取出, 电锯切段, 注意切口要平, 芦竹不易破裂受损, 芦竹节间较长, 每段插穗保留1个节, 节下留3~4 cm, 节上可留5~7 cm。

5 扦插

把处理过的插穗按行距5 cm、株距5 cm, 等距扦插于苗床, 节位深于基质表面2 cm。

6 苗床管理

温度和湿度的控制: 苗床温度稳定于20~25℃, 气温控制在20~30℃, 采用继电器装置控制微喷增加空气湿度65%~70%。一般5 d左右芽开始萌动。

灌水: 前期苗床稍湿, 勤灌水保持湿润, 不积水, 后期见干见湿, 以增加根的数量及长度。

7 练苗

移栽前练苗, 移栽前10 d逐步通风、透光, 逐渐减小空气及土壤湿度。

该方法用于北疆芦竹快繁, 出芽整齐, 根系较多, 成苗率高, 移栽成活率高, 苗床底具坡度解决了苗期积水问题, 极好地预防了苗期的病害。

参考文献

[1] 高斌, 李卫国, 等. 芦竹制浆初探[J]. 纸和造纸, 2001(4): 40.

第一作者简介: 陈惠瑜(1963-), 女, 农艺师, 研究方向为作物栽培。

E-mail: tangyipei@126.com.

收稿日期: 2013-04-09

Abstract: Taking *Ganoderma* and *Rubus idaeus* L. as materials, the culture medium and fermentation conditions of *Ganoderma* before extraction of total flavonoid from *Rubus idaeus* L. were optimized through the L₁₈ (3⁷) orthogonal experimental design. The results showed that the optimal medium composition (g/L) were Glucose 20 g/L, Orybean powder 15 g/L, Corn flour 50 g/L, Yeast extract 1.0 g/L, KH₂PO₄ 0.6 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, VB₁ 0.01 g/L; under these conditions, the content of total flavonoids was 4.58 mg/g, which revealed a 96.57% increase compared with the control group (without the inoculation of *Ganoderma*).

Key words: *Ganoderma*; *Rubus idaeus* L.; flavonoid