



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106978465 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201710222219.X

C12R 1/645 (2006.01)

(22) 申请日 2017.04.06

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 1456670 A, 2003.11.19

申请公布号 CN 106978465 A

WO 03045161 A1, 2003.06.05

CN 104099385 A, 2014.10.15

(43) 申请公布日 2017.07.25

审查员 修旺珊

(73) 专利权人 杭州娃哈哈科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市市辖区杭州经济技术开发区14号大街5号5层

(72) 发明人 魏振华 陈妮 王开祥 李言郡

范秋领 侯保朝

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务有限公司

司 33109

代理人 尉伟敏 胡寅旭

(51) Int. Cl.

C12P 33/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,包括以下步骤:(1)种子液的制备;(2)接种发酵。本发明对种子培养基和发酵培养基的配方进行了优化,原料易得,成本低,并于发酵前在发酵培养基中加入2.5~3.5g/L的豆油,同时对发酵工艺参数进行了优化改进,方法步骤简单,可操作性强,发酵周期短,并能同时显著提高菌丝体产量与总三萜产量。

1. 一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 种子液的制备

在无菌条件下将桦褐孔菌从平板上刮下,接种到装有100 ml种子培养基的摇瓶中,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm条件下培养3~5天,得到一级种子液;将一级种子液在无菌条件下倒入已灭菌装有玻璃珠的药瓶中,震荡摇匀,将桦褐孔菌菌丝体打散,以种子培养基体积为基准,将接种量为9~10%的一级种子液接入到装有1L种子培养基的摇瓶中,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm条件下培养至少2天,得二级种子液;

(2) 接种发酵

在发酵罐中装入发酵培养基并灭菌后,以发酵培养基体积为基准,将接种量为9~10%的二级种子液在无菌条件下接种到发酵罐中,同时在发酵培养基中加入2.5~3.5g/L的豆油,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm,通气量为5~7L/min条件下连续发酵至少9天,停罐即完成整个发酵过程。

2. 根据权利要求1所述的一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,其特征在于,步骤(1)中,种子培养基的配方为:葡萄糖35 g/L,酵母粉7.5 g/L,磷酸二氢钾1 g/L,无水硫酸镁0.5 g/L,pH 5.5~6.0。

3. 根据权利要求1所述的一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,其特征在于,步骤(2)中,发酵培养基体积占发酵罐总体积的60~70%。

4. 根据权利要求1或3所述的一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,其特征在于,所述发酵培养基的具体配方为:葡萄糖45 g/L,酵母粉10 g/L,无水硫酸镁0.5 g/L,磷酸二氢钾1 g/L,氯化钙0.4 g/L,pH 5.5~6.0。

5. 根据权利要求1所述的一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,其特征在于,步骤(2)中,灭菌条件为:120~125 ℃下灭菌30~40min。

一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用液态深层发酵技术生产大型真菌活性代谢产物的方法,尤其是涉及一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法。

背景技术

[0002] 桦褐孔菌是一种生长在白桦树上的珍贵药用大型真菌,主要分布在俄罗斯北部,北欧、我国黑龙江、吉林等地。桦褐孔菌作为民间草药,在东欧、俄罗斯等国家有相当长的使用历史。现代医学研究表明,桦褐孔菌具有治疗各种消化系统癌症、提高免疫力、治疗糖尿病有较好的效果,同时其还具有抗衰老和抗病毒的作用。长期的动物实验及临床实验表明桦褐孔菌没有任何毒副作用。桦褐孔菌神奇的功效,无论从经济价值还是社会价值,都有必要去研究、开发。

[0003] 桦褐孔菌多糖和三萜是其重要的功效成分。三萜化合物具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、提高免疫力等生物活性,具有很高的药用开发前景。目前已发现的桦褐孔菌三萜化合物多达几十种,大多为四环三萜和五环三萜。而目前桦褐孔菌三萜主要是从野生菌核中分离的,但野生桦褐孔菌资源稀少,且价格昂贵。人工栽培技术目前尚处于研究阶段,且人工栽培子实体由于生长周期短,有效成分含量低,不足以满足其药用需求。因此,液态深层发酵方法成为了桦褐孔菌功效成分生产研究的热点。

[0004] 但目前的桦褐孔菌深层发酵研究主要集中在以菌丝体和多糖为目标产物进行发酵培养基及发酵工艺的优化。2011年公开的中国发明专利“一种桦褐孔菌深层发酵培养基及桦褐孔菌的深层发酵方法”(公开号为CN102115350A)中,通过优化发酵培养基及开发了两阶段发酵工艺,提高了菌丝体和胞内、胞外多糖的产量。2016年公开的中国发明专利“一种快速深层液态发酵生产桦褐孔菌菌粉的方法”(公开号为CN105670944A)中,开发了一种半连续发酵工艺快速获取富含菌丝体的发酵液,然后将发酵液通过微滤膜处理分离得到桦褐孔菌丝体。要想达到较高的桦褐孔菌总三萜产量,需同时提高发酵菌丝体产量和菌丝体中的三萜含量。但目前,桦褐孔菌三萜发酵研究中,通常都是菌丝体产量低,三萜含量高,但总三萜含量不高。如有文献报道了添加甲基茉莉酸酯和脂肪酸提高了三萜含量,但由于菌丝体产量不高,限制了总三萜含量的进一步提高,且添加的甲基茉莉酸酯和脂肪酸成本较高。

发明内容

[0005] 本发明是为了解决现有技术的桦褐孔菌总三萜发酵产量低的问题,提供了一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,步骤简单,可操作性强,发酵周期短,并能显著提高菌丝体产量与总三萜含量。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种提高桦褐孔菌总三萜发酵产量的发酵方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 种子液的制备

[0009] 在无菌条件下将桦褐孔菌从平板上刮下,接种到装有100ml种子培养基的摇瓶中,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm条件下培养3~5天,得到一级种子液;将一级种子液在无菌条件下倒入已灭菌装有玻璃珠的药瓶中,震荡摇匀,将桦褐孔菌菌丝体打散,以种子培养基体积为基准,将接种量为9~10%的一级种子液接入到装有1L种子培养基的摇瓶中,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm条件下培养至少2天,得二级种子液。

[0010] (2) 接种发酵

[0011] 在发酵罐中装入发酵培养基并灭菌后,以发酵培养基体积为基准,将接种量为9~10%的二级种子液在无菌条件下接种到发酵罐中,同时在发酵培养基中加入2.5~3.5g/L的豆油,于温度28~30℃,搅拌转速150~180rpm,通气量为5~7L/min条件下连续发酵至少9天,停罐即完成整个发酵过程。本发明的关键点在于豆油的加入以及其加入时间、加入量,只有在发酵前加入以及控制其加入量在2.5~3.5g/L才能提高菌丝体产量与总三萜含量,否则效果大打折扣。

[0012] 作为优选,步骤(1)中,种子培养基的配方为:葡萄糖35g/L,酵母粉7.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,无水硫酸镁0.5g/L,pH 5.5~6.0。

[0013] 作为优选,步骤(2)中,发酵培养基体积占发酵罐总体积的60~70%。

[0014] 作为优选,所述发酵培养基的具体配方为:葡萄糖45g/L,酵母粉10g/L,无水硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,氯化钙0.4g/L,pH 5.5~6.0。

[0015] 作为优选,步骤(2)中,灭菌条件为:120~125℃下灭菌30~40min。

[0016] 因此,本发明具有如下有益效果:对种子培养基和发酵培养基的配方进行了优化,原料易得,成本低,并于发酵前在发酵培养基中加入2.5~3.5g/L的豆油,同时对发酵工艺参数进行了优化改进,方法步骤简单,可操作性强,发酵周期短,并能显著提高菌丝体产量与总三萜产量。

具体实施方式

[0017] 下面通过具体实施方式对本发明做进一步的描述。

[0018] 以下实施例及对比例中采用的桦褐孔菌菌株(*Inonotus obliquus*)保藏于中国林业微生物菌种保藏管理中心(菌种编码cfcc 60260)。

[0019] 实施例1

[0020] (1) 种子液的制备

[0021] 在无菌条件下将桦褐孔菌从平板上刮下,接种到装有100ml种子培养基的摇瓶中,于温度28℃,搅拌转速150rpm条件下培养5天,得到一级种子液;将一级种子液在无菌条件下倒入已灭菌装有玻璃珠的药瓶中,震荡摇匀,将桦褐孔菌菌丝体打散,以种子培养基体积为基准,将接种量为9%的一级种子液接入到装有1L种子培养基的摇瓶中,于温度28℃,搅拌转速150rpm条件下培养至少2天,得二级种子液;其中,种子培养基的配方为:葡萄糖35g/L,酵母粉7.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,无水硫酸镁0.5g/L,pH 5.5~6.0

[0022] (2) 接种发酵

[0023] 在发酵罐中装入占发酵罐总体积60%的发酵培养基并于120℃温度下灭菌30min后,以发酵培养基体积为基准,将接种量为9%的二级种子液在无菌条件下接种到发酵罐中,同时在发酵培养基中加入2.5g/L的豆油,于温度28~30℃,搅拌转速150rpm,通气量为

5L/min条件下连续发酵至少9天,停罐即完成整个发酵过程,其中发酵培养基的具体配方为:葡萄糖45g/L,酵母粉10g/L,无水硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,氯化钙0.4g/L,pH 5.5~6.0。

[0024] 发酵后取样分析菌丝体产量和总三萜含量,结果如表1所示。

[0025] 实施例2~3

[0026] 实施例2~3与实施例1相比,区别在于:豆油的添加量分别为3.0g/L、3.5g/L,其余完全相同。

[0027] 发酵后取样分析菌丝体产量和总三萜含量,结果如表1所示。

[0028] 对比例1~6

[0029] 对比例1~对比例6与实施例1的不同之处在于:豆油的添加量分别为0g/L、0.5g/L、1.0g/L、1.5g/L、2.0g/L、4.0g/L,其余完全相同。发酵后取样分析菌丝体产量和总三萜含量,结果如表1所示。

[0030] 对比例7~9

[0031] 对比例7~9与实施例1的不同之处在于:豆油的添加时间分别为发酵后第2、4、6天,其余完全相同。发酵后取样分析菌丝体产量和总三萜含量,结果如表1所示。

[0032] 表1 实施例1~3与对比例1~9中菌丝体产量和总三萜含量的检测结果

项目	桦褐孔菌菌丝体产量	桦褐孔菌三萜产量
	(mg/L)	(mg/L)
[0033] 实施例 1	18.7	1211
实施例 2	18	1124
实施例 3	18.2	1202
对比例 1	15.2	601
对比例 2	16.8	863
对比例 3	17.3	888
[0034] 对比例 4	17.5	846
对比例 5	17.7	989
对比例 6	17.6	998
对比例 7	17.8	993
对比例 8	17.3	996
对比例 9	17.6	998

[0035] 通过表1中数据可以看出,于发酵前在发酵培养基中加入2.5~3.5g/L的豆油,能同时显著提高菌丝体产量与总三萜含量。

[0036] 实施例4

[0037] 本实施例与实施例1相比,不同之处在于:(1)一级种子液培养条件为:温度29℃,搅拌转速160rpm条件下培养4天;二级种子液培养条件为:温度29℃,搅拌转速160rpm;(2)发酵工艺条件为:在发酵罐中装入占发酵罐总体积65%的发酵培养基并于122℃温度下灭菌35min后,以发酵培养基体积为基准,将接种量为9.5%的二级种子液在无菌条件下接种到发酵罐中,于温度29℃,搅拌转速160rpm,通气量为6L/min条件下连续发酵至少9天,其余均与实施例1完全相同。

[0038] 实施例5

[0039] 本实施例与实施例相比,不同之处在于:(1)一级种子液培养条件为:温度30℃,搅

拌转速180rpm条件下培养3天;二级种子液培养条件为:温度30℃,搅拌转速180rpm;(2)发酵工艺条件为:在发酵罐中装入占发酵罐总体积70%的发酵培养基并于125℃温度下灭菌40min后,以发酵培养基体积为基准,将接种量为10%的二级种子液在无菌条件下接种到发酵罐中,于温度30℃,搅拌转速180rpm,通气量为7L/min条件下连续发酵至少9天,其余均与实施例1完全相同。

[0040] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。