第 28 卷 第 5 期
2013 年 10 月

天津科技大学学报
Journal of Tianjin University of Science & Technology

Vol. 28 No. 5
Oct. 2013

紫芝液体深层发酵条件的初步研究

付丽红[1]，王金菊[1]，郝利民[2]，王艳萍[1]
（1. 食品营养与安全教育部重点实验室，天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457；
2. 中国人民解放军总后勤部军需装备研究所，北京 100010）

摘 要：以紫芝为研究对象，讨论液体深层发酵碳源、氮源、无机盐和培养条件对菌体生物量的影响，确定紫芝液体发酵最优培养基配方为葡萄糖 30 g/L、蛋白胨 3 g/L、KH_2PO_4 1.2 g/L 和 $MgSO_4·7H_2O$ 0.8 g/L. 发酵条件为培养温度 25 ℃，起始 pH 自然，装液量 24%，接种量 15%，140 r/min 培养 7 d. 同时，以菌体生物量、胞外多糖和 pH 为指标，绘制紫芝液态发酵动力学曲线，发酵培养 7 d 后菌体生物量和胞外粗多糖的含量分别达到最大值 3.63 g/L 和 1.67 g/L.

关键词：紫芝；深层发酵；菌体生物量；胞外多糖
中图分类号：Q815 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-6510(2013)05-0019-04

Preliminary Study of Liquid Submerged Fermentation of *Ganoderma sinensis*

FU Lihong[1], WANG Jinju[1], HAO Limin[2], WANG Yanping[1]
(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2.The Quartermaster Institute of the General Logistics Department of P.L.A, Beijing 100010, China)

Abstract: The effect of nutritional and environmental conditions on mycelial biomass of *Ganoderma sinensis* in liquid fermentation were studied with a single factor and an orthogonal experiment. The results show that the best carbon source and nitrogen source are glucose and peptone respectively. Consequently, the optimal culture medium components were: 30 g/L glucose, 3 g/L peptone, 1.2 g/L KH_2PO_4 and 0.8 g/L $MgSO_4·7H_2O$. The optimum culture conditions were as follows: the liquid medium volume was 24%, inoculation quantity 15%, culture temperature 25 ℃, shaking frequency 140 r/min, and pH value was natural. The liquid fermentation kinetics curve was determined by biomass, crude extrapolysaccharide and pH, and the optimization fermentation time was 7 d. Then the mycelium yield and extrapolysaccharide could reach 3.63 g/L and 1.67 g/L, respectively.

Key words: *Ganoderma sinensis*; submerged fermentation; mycelial biomass; extrapolysaccharide

紫芝(*Ganoderma sinensis*)别名黑芝、玄芝，隶属于真菌界(Fungi)，担子菌门(Basidiomycota)，伞菌纲(Agaricomycetes)，多孔菌目(Polyporales)，灵芝科(Ganodermataceae)，灵芝属(Ganoderma)，是一种珍稀的食药用真菌[1]. 据《本草纲目》记载，紫芝气味甘、温，无毒，有利关节、保神、益精气、坚筋骨、好颜色、疗虚劳、久服轻身、不老延年等滋补强壮的功效[2]. 紫芝营养价值丰富，富含蛋白质、氨基酸、多糖、三萜类等生物活性物质. 研究表明，紫芝具有抗氧化[3]、抗肿瘤[4]、抑菌[5]和提高免疫力[6]等诸多功效.

紫芝在食药用方面有重要价值，得到广大消费者的青睐，在国内外具有广阔的市场前景. 但人工栽培的紫芝生产周期长，产率低，而且受季节、气候等外界因素影响较大，因此其产量远远不能满足市场需求. 液体深层发酵技术可以在短时间内获得大量菌丝体和发酵产物，成本低，易于规模化生产[7]，最为重要的是发酵获得的发酵液具有与紫芝子实体类似的

收稿日期：2013–03–24；**修回日期**：2013–05–29
基金项目：全军科研重点项目“军用功能基础原料生物制备技术研究”(AX110C002)
作者简介：付丽红（1984—），女，山西人，博士研究生；**通信作者**：王艳萍，教授，ypwang@tust.edu.cn.

功效，由此在综合开发方面具有极大的潜力. 本研究以菌体生物量和胞外多糖为指标，通过对紫芝液体发酵培养基的初步研究，并探讨其适宜的发酵条件，为后续的工业化生产提供物质基础及理论依据.

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌种

紫芝，天津科技大学食品生物技术研究室保藏菌种.

1.1.2　培养基

PDA 培养基(g/L)：马铃薯 200，葡萄糖 20，KH_2PO_4 2，$MgSO_4·7H_2O$ 1，琼脂 20，pH 自然.

种子培养基(g/L)：马铃薯 200，葡萄糖 30，蛋白胨 3，KH_2PO_4 1，$MgSO_4·7H_2O$ 1，pH 自然.

基础培养基(g/L)：葡萄糖 30，蛋白胨 3，KH_2PO_4 1，$MgSO_4·7H_2O$ 1，pH 自然.

1.2　实验方法

1.2.1　菌种活化

将保存的紫芝菌种接入 PDA 斜面培养基，25 ℃下培养，待菌体长满斜面后，将斜面上的母菌接入到 PDA 固体平板培养基上，25 ℃恒温培养.

1.2.2　摇瓶菌种制备

用打孔器从 PDA 固体平板上打取直径为 5 mm 的菌丝体 10 块接入到新鲜的种子培养基中(500 mL 挡板三角瓶，装液量 100 mL)，25 ℃、140 r/min 振荡培养 7 d，得到摇瓶种子液.

1.2.3　摇瓶发酵培养

(1) 碳源、氮源单因素实验

碳源筛选实验：在基础培养基中(蛋白胨 3 g/L，KH_2PO_4 1 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L)分别加入 30 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉作为碳源，每个实验重复 3 次.

氮源筛选实验：在基础培养基中(葡萄糖 30 g/L，KH_2PO_4 1 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L)中分别加入 3 g/L 的蛋白胨、酵母粉、$(NH_4)_2SO_4$、NH_4Cl 和 NH_4NO_3 作为氮源，每个实验设 3 个重复.

(2) 碳源、氮源及无机盐正交实验

根据碳源和氮源单因素实验结果，选用 K_2HPO_4 和 $MgSO_4·7H_2O$ 作为无机盐，设计 $L_9(3^4)$ 正交实验.

(3) 发酵条件的选择

在确定最佳发酵培养基成分的基础上，设计不同温度、pH、装液量和接种量，进行单因素实验，测定菌丝体生物量，确定最佳发酵条件，每个实验设 3 个重复.

1.2.4　发酵动力学曲线

按照以上确定的发酵培养基和发酵条件进行摇瓶培养，在发酵过程中检测菌丝体生物量、胞外多糖和 pH.

1.3　测定方法

1.3.1　生物量的测定

发酵结束后，将发酵液真空抽滤得菌体，用蒸馏水冲洗数次，然后 55 ℃烘干至恒质量，称量，计算菌丝体干质量[8].

1.3.2　粗多糖的测定

将抽滤除菌丝体的发酵液经真空浓缩至原体积的 1/4，加入 4 倍体积的无水乙醇，4 ℃醇沉 12 h，8 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，将沉淀物 55 ℃烘干至恒质量，称量粗多糖含量[9].

1.3.3　pH 的测定

用 DELTA 320 型酸度计进行 pH 的测定.

2　结　果

2.1　培养基的确定

2.1.1　碳源的选择

经发酵培养，筛选出最适碳源，从图 1 可以看出，以葡萄糖为碳源的菌丝体生物量(2.11 g/L)最高，其余依次为可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、麦芽糖. 葡萄糖作为一种速效碳源，可以被菌体直接利用，快速促进菌体生长，且价格相对低廉，因此采用葡萄糖为最适碳源.

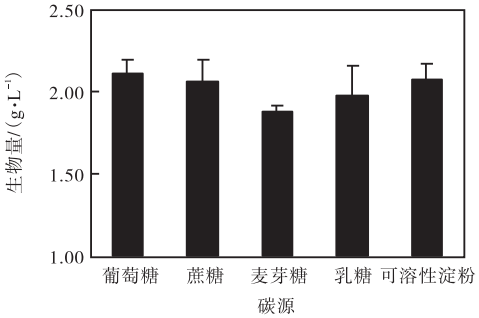

图 1　不同碳源对紫芝生物量的影响

Fig. 1　Effect of carbon sources on biomass of *Ganoderma sinensis*

2.1.2　氮源的选择

氮源是合成菌丝中蛋白质和核酸的必要成分，在发酵培养中起重要作用. 从图 2 可见，蛋白胨和酵母浸粉有利于菌丝生长，菌丝生物量分别达到 2.35 g/L

和 2.03 g/L. 当氮源为无机氮时，如 $(NH_4)_2SO_4$、NH_4Cl 和 NH_4NO_3，其生物量较低，说明紫芝对无机氮的利用不佳. 因此，选择蛋白胨为最适氮源.

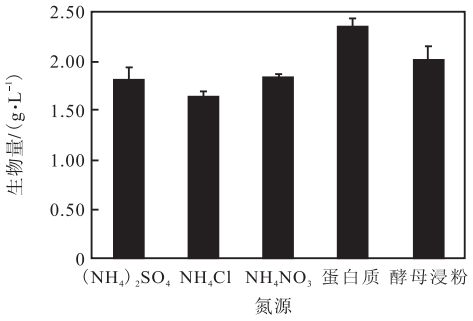

图 2　不同氮源对紫芝菌体生物量的影响

Fig. 2　Effect of nitrogen sources on biomass of *Ganoderma sinensis*

2.1.3　培养基正交实验结果

通过碳源和氮源的单因素实验结果，选用葡萄糖(A)为碳源，蛋白胨(B)为氮源，KH_2PO_4(C)和 $MgSO_4·7H_2O$(D)为发酵真菌常用无机盐，进行 $L_9(3^4)$ 实验，结果见表 2.

表 2　培养基组分正交实验结果的极差分析

Tab. 2　Results of orthogonal experiment on different components

实验号	A/ (g·L⁻¹)	B/ (g·L⁻¹)	C/ (g·L⁻¹)	D/ (g·L⁻¹)	生物量/ (g·L⁻¹)	粗多糖量/ (g·L⁻¹)
1	25	2.5	0.8	0.8	2.69	0.65
2	25	3.0	1.0	1.0	2.61	1.08
3	25	3.5	1.2	1.2	2.37	0.98
4	30	2.5	1.0	1.2	2.99	1.20
5	30	3.0	1.2	0.8	3.23	1.45
6	30	3.5	0.8	1.0	2.46	1.23
7	35	2.5	1.2	1.0	3.05	1.34
8	35	3.0	0.8	1.2	2.73	1.25
9	35	3.5	1.0	0.8	2.92	1.35
K_1	7.67	8.71	7.88	8.84		
K_2	8.65	8.57	8.50	8.12		
K_3	8.70	7.74	8.64	8.07		
K_1'	2.70	3.23	3.13	3.45		
K_2'	3.88	3.78	3.63	3.68		
K_3'	3.98	3.55	3.80	3.43		
R_1	1.03	0.97	0.75	0.77		
R_2	1.28	0.55	0.68	0.25		

极差 R_1 分析结果表明，4 种因素对紫芝菌丝生物量的影响程度为 A＞B＞D＞C，极差值 R_2 分析得到，其对粗多糖影响为 A＞C＞B＞D，极差值越大，作用效果也越大，这说明葡萄糖浓度对紫芝生物量和多糖的影响最大. 以生物量和胞外多糖为衡量指标，选择最适培养基组合为：葡萄糖 30 g/L、蛋白胨 3 g/L、KH_2PO_4 1.2 g/L 和 $MgSO_4·7H_2O$ 0.8 g/L.

2.2　发酵条件的选择

2.2.1　*初始 pH 确定*

用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节培养基的 pH 分别为4、5、6、7、8 和9，进行紫芝液体深层发酵培养，结果如图 3 所示. 在 pH 5～7 时，菌丝体能很好地生长，当 pH 为 6 时，菌体生物量最高(3.57 g/L)，而测得发酵培养基的自然 pH 接近 6，因此采用培养基的自然 pH 即可.

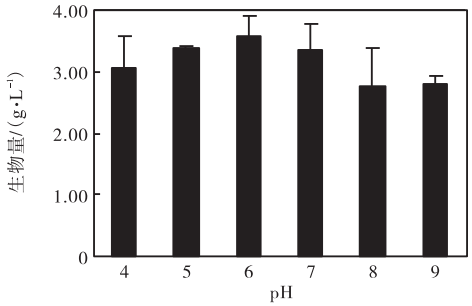

图 3　初始 pH 对紫芝深层发酵的影响

Fig. 3　Effect of initial pH on liquid fermentation of *Ganoderma sinensis*

2.2.2　温度确定

在适合的温度范围内，菌丝体生长代谢旺盛，可快速进入稳定期. 若低于适合温度范围，菌体将生长缓慢；高于该范围时，菌体代谢异常，若持续升温，菌体生长会受到抑制，严重导致其死亡[10]. 在 20、25、30 ℃条件下分别发酵培养，其生物量结果如图 4 所示. 从图中可看出，25 ℃时菌体生物量达到最大值. 因此，确定最佳培养温度为 25 ℃.

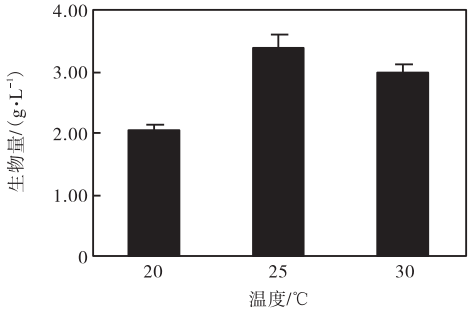

图 4　不同温度对菌丝体生物量的影响

Fig. 4　Effect of different temperature on biomass of *Ganodoerma sinense*

2.2.3　接种量确定

在发酵生产中，选择合适的接种量可以使菌种快速进入对数期，从而缩短发酵周期. 在其他条件不变的情况下，分别接入 5%、10%、15%和 20%的种子液，

25 ℃振荡培养 7 d，以菌丝体生物量为指标，确定最佳接种量，结果如图 5 所示，接种量 15%时获得的菌体含量最大.

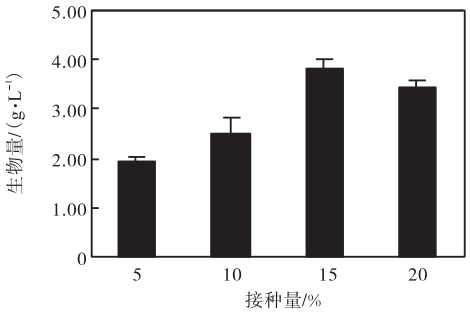

图 5　不同接种量对菌丝体生物量的影响

Fig. 5　Effect of different inoculated volumes on biomass of *Ganodoerma sinense*

2.2.4　装液量确定

溶氧是需氧发酵控制最重要的参数之一，本实验采用摇瓶装液量以反映不同通气量对菌丝生物量的影响. 从图 6 可看出，100 mL 和 120 mL 装液量所得的菌丝生物量均较高，装液量高于 140 mL 时菌丝生物量有所下降，原因是装液量多，则通气量下降，培养基中溶解氧少，无法满足菌体旺盛生长的需要，导致生物量下降. 因此，取 24%(120 mL/500 mL)为最佳摇瓶装液量.

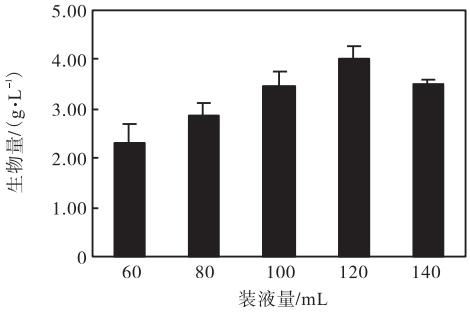

图 6　不同装液量对菌丝生物量的影响

Fig. 6　Effect of different medium volume on biomass of mycelia

2.3　发酵动力学曲线

采用上述优化的培养基和工艺条件，考察紫芝发酵培养过程中菌体生物量、粗多糖和 pH 的变化，结果如图 7 所示. 菌丝体是生物发酵过程中的重要指标，在发酵过程中，1 ~ 7 d 菌丝体前期增加缓慢，随后加速增加，到第 7 天时达到最大值，随后进入相对稳定的阶段；pH 随着菌体基质分解代谢产生有机酸而逐渐下降；发酵液中粗多糖随着发酵时间增加而增加，到第 7 天达到最高值 1.67 g/L，随后为了维持菌体生长，开始消耗发酵液中的多糖，其多糖含量降低，所以确定最佳发酵周期为 7 d.

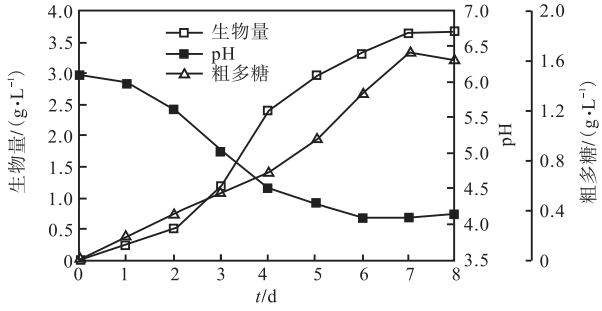

图 7　紫芝发酵过程中生物量、粗多糖和 pH 的变化

Fig. 7　Changes of biomass , crude extrapolysaccharide and pH in the fermentative liquid of *Ganodoerma sinense*

3　讨论分析

本文以菌体生物量为指标，通过单因素筛选和正交实验，确定了紫芝深层发酵培养基为：葡萄糖 30 g/L、蛋白胨3 g/L、KH_2PO_4 1.2 g/L 和$MgSO_4·7H_2O$ 0.8 g/L. 最佳培养条件为：装液量 24%，接种量 15%，起始 pH 自然，25 ℃、140 r/min 培养 7 d. 在此条件下，菌体生物量和胞外多糖分别达到最大值 3.63 g/L 和 1.67 g/L. 有学者也对紫芝深层发酵进行优化，如王晓玲等[11–12]采用响应面、单因素及正交实验，筛选了紫芝发酵的两种培养基配方分别为：(1) 玉米粉 20.3 g/L，蛋白胨 3.6 g/L，黄豆粉 6.9 g/L，蔗糖 19.5 g/L，菌体产量 12.82 g/L；(2) 蔗糖 35 g/L、蛋白胨 3 g/L、酵母膏 1 g/L、磷酸二氢钾 0.7 g/L、硫酸镁 0.2 g/L、VB1 0.01 g/L，菌体产量 9.3 g/L. 这两种培养基与本研究结果相比，配方组分复杂，使得发酵操作繁琐，而且价格成本高. 虽然两种培养基获得的菌体生物量高于本研究，但本实验获得的胞外多糖达到 1.67 g/L. 胞外多糖是发酵液的主要功能成分，这对日后研究多糖功效和结构提供了物质基础. 王晓玲[13]通过在培养基中添加 5%九香虫，其多糖含量仅达到 0.280 g/L，可能是实验菌种差异和发酵条件不同造成的. 先前的研究是单独研究培养基或发酵条件[14]，本实验综合起来，系统地研究紫芝液态发酵培养参数，这将为大规模工业化生产提供技术支持和理论依据. 同时，通过发酵获得的菌丝体和活性物质，如多糖、多酚和蛋白质等，为日后功能性活性物质的开发和研究奠定基础.

（下转第 27 页）