

# 灵芝液体培养菌株的选择及其发酵条件优化

臧晋<sup>1</sup>, 罗建成<sup>1</sup>, 黄开勋<sup>2</sup>

(1. 南阳理工学院生物与化学工程系, 河南 南阳 473004) (2. 华中科技大学生物系, 湖北 武汉 470070)

**摘要:** 在适于液体培养的灵芝菌株中, 经选择试验确定赤芝 G22 为液体发酵生产多糖的高产菌株, 并对赤芝 G22 菌株的液体发酵条件进行了选择优化。结果表明, 实现多糖高产的发酵工艺条件为: 发酵温度 28 ℃、摇床转速 180 r/min、培养基初始 pH 值 6.0、发酵时间 144 h。采用此优化的工艺条件进行液体发酵, 使灵芝多糖产量由 1.823 g/L 提高到 2.315 g/L, 提高了 26.98%。

**关键词:** 液体发酵; 灵芝多糖; 发酵条件

中图分类号: R282.71; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0039-03

## Studies on Screening of the Strains for Production of *Ganoderma Lucidum* Polysaccharide by Submerged Fermentation and Optimizing the Culture Conditions

ZANG Jin<sup>1</sup>, LUO Jian-cheng<sup>1</sup>, HUANG Kai-xun<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry Engineering, Nanyang Institute of technology, Nanyang 473004, China)

(2. Department of Biology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 470070, China)

**Abstract:** The capacities of the *Ganoderma lucidum* strains for production of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide (GLP) by submerged fermentation were examined and *Ganoderma lucidum* G22 was shown to be the best one. The fermentation conditions for GLP production by *Ganoderma lucidum* G22 were also studied and the optimal fermenting temperature, shaking rate, the initial pH value of the medium and fermenting time were 28 ℃, 180 r/min, 6.0 and 144 h, respectively, under which the yield of GLP was improved to 2.315 g/L.

**Key words:** submerged fermentation; *ganoder lucidum*; polysaccharide; fermentation conditions

随着对灵芝多糖组成结构和药理作用研究的不断深入, 灵芝多糖在免疫调节、抗肿瘤、抗衰老等方面的显著作用已明确<sup>[1-3]</sup>, 使得其在医药、功能食品和保健化妆品等方面的应用越来越广泛<sup>[4]</sup>。采用液体深层发酵法生产灵芝多糖, 周期短 (6~8 d)、产量大、易实现机械化生产, 是灵芝多糖生产的主要途径。近年来, 有关此方法的研究已有一些报道<sup>[5-6]</sup>。由于各地所用灵芝菌株及其发酵条件差异较大, 生产应用中存在着多糖产率低、生产成本偏高等问题。为此, 需对适合液体发酵的灵芝菌株及其发酵工艺条件做进一步的选择优化研究, 为工业化规模生产灵芝多糖提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

##### 1.1.1 灵芝菌株

赤芝 G 5.65, 赤芝 G 22, 赤芝 GL-2, 韩芝 K-1;

收稿日期: 2007-04-30

作者简介: 臧晋 (1964-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 发酵工程

由本系微生物实验室提供。

##### 1.1.2 培养基

斜面培养基: 土豆 20 g, 麸皮 10 g, 葡萄糖 2 g, 蛋白胨 0.1 g, 琼脂 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g, 加水至 100 mL, 调 pH 至 5~6。

液体种子培养基: 葡萄糖 3 g, 玉米粉 2 g, 豆饼粉 0.5 g, 酵母膏 0.3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g, 加水至 100 mL, 调 pH 至 5~6。

液体发酵培养基: 玉米粉水解糖 (以葡萄糖计) 6 g, 蛋白胨 (以可溶性蛋白质计) 0.15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.075 g, 加水至 100 mL, 调 pH 至 5~6。

##### 1.1.3 仪器

HZQ-Q 振荡器, SW-CJ-1CU 净化工作台, TDL-40B 台式离心机, Vivaflow 超滤器, PHS-3C 酸度计, HH-4 恒温水浴锅, 752 紫外可见分光光度计, ZK-82B 真空干燥箱等。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 灵芝的液体发酵培养<sup>[5-6]</sup>

将灵芝菌株经试管斜面活化培养,接于含 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶,置振荡器在转速 150 r/min、26 °C 培养 3 d。按 5% 的接种量移接于含 200 mL 液体发酵培养基的 500 mL 三角瓶,置振荡器在转速 150 r/min、26~28 °C 液体发酵培养 7 d。

### 1.2.2 液体发酵高产菌株的选择

收集适于液体培养的灵芝菌株—赤芝 G5.65、赤芝 G22、赤芝 GL-2、韩芝 K-1,各菌株分别进行液体发酵培养。发酵结束后,取样测定单位体积发酵液的菌体产量和胞内、胞外多糖产量。通过对结果的分析,确定适合液体发酵的高产菌株。

### 1.2.3 液体发酵培养条件的优化

采用菌株选择试验所确定的高产菌株进行液体发酵培养,对影响菌体生长和多糖产量的发酵温度、摇床转速、培养基初始 pH 值、发酵时间等进行选择优化,确定适合多糖高产的液体发酵工艺条件。

### 1.2.4 菌丝体胞内多糖的提取<sup>[7-8]</sup>

液体发酵后,经离心分离得菌丝体和发酵液。菌丝体经 70% 乙醇溶液反复离心洗涤至无可溶性糖反应,于 85 °C 真空干燥至恒重。然后用去离子水,在加热搅拌条件下提取胞内多糖。

### 1.2.5 样品中灵芝多糖的测定<sup>[9]</sup>

胞内多糖提取液或发酵液经超滤去除小分子杂质,从中取样品液 10 mL 加 3 倍量 95% 乙醇使多糖沉淀析出,用 70% 乙醇反复离心洗涤,直至无可溶性糖反应,再分别经无水乙醇和丙酮离心洗涤后,用去离子水加热溶解并定容至 100 mL,以苯酚-硫酸法测多糖含量。用灵芝多糖标准品做标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液体发酵高产菌株的选择

按液体发酵的操作步骤,用赤芝 G5.65、赤芝 G22、赤芝 GL-2、韩芝 K-1 菌株进行液体发酵培养,其结果见表 1。

表 1 不同灵芝菌株的液体发酵结果 单位: g/100 mL

理化指标	灵芝菌株			
	G5.65	G22	GL-2	K-1
菌丝体干重	1.423	1.567	1.485	1.338
胞内多糖	56.4	66.0	61.1	48.0
胞外多糖	94.7	116.3	107.8	89.4
总多糖	151.1	182.3	168.9	137.4

注:各指标单位中的“/100 mL”指“/100 mL 发酵液”,下同。

表 1 的结果表明,赤芝 G22 菌株液体发酵的多糖

产量明显高于其它菌株。因此,在本次所收集的适于液体培养的灵芝菌株中,赤芝 G22 为液体发酵生产多糖的高产菌株。

### 2.2 液体发酵培养条件的选择优化

#### 2.2.1 发酵温度的确定

采用赤芝 G22 菌株,在不同温度条件下的液体发酵结果见表 2。其它发酵条件(摇床转速 150 r/min,培养基初始 pH 为 5.5,发酵时间 7 d)均保持一致。

表 2 不同发酵温度对灵芝液体发酵的影响 单位: g/100 mL

理化指标	发酵温度/°C				
	22	24	26	28	30
菌丝体干重	1.238	1.318	1.464	1.601	1.692
胞内多糖	1.238	1.318	1.464	1.601	1.692
胞外多糖	93.1	121.9	144.5	147.6	129.8
总多糖	139.6	173.2	207.9	216.6	187.9

由表 2 的结果可以看出,发酵温度为 28 °C,多糖的产量最高。发酵温度升高到 30 °C,会促进菌体过量生长而使多糖的产量下降。22~26 °C 低温下发酵,菌体生长量和多糖产量都较低。因此,在恒温发酵条件下,发酵温度应采用 28 °C。

#### 2.2.2 摇床转速的确定

发酵温度采用 28 °C,赤芝 G22 菌株在不同摇床转速条件下的液体发酵结果见表 3。其它发酵条件(培养基初始 pH 为 5.5,发酵时间 7 d)均保持一致。

表 3 不同摇床转速对灵芝液体发酵的影响 单位: g/100 mL

理化指标	摇床转速/(r/min)				
	100	120	150	180	200
菌丝体干重	1.281	1.429	1.603	1.625	1.681
胞内多糖	49.7	58.0	69.2	70.8	61.6
胞外多糖	88.3	120.1	148.2	160.6	131.9
总多糖	138.0	178.1	217.4	231.4	193.5

摇床转速是摇瓶液体发酵过程通气供氧条件的指标。表 3 表明,液体发酵过程中摇床转速为 180 r/min 时,通气供氧条件适宜,菌体生长充足,多糖产量高。摇床转速为 200 r/min 时,长时间的强烈通气供氧,会刺激菌体过量生长而使多糖的产量降低。摇床转速为 100~150 r/min 的低转速条件下,表现为通气供氧量不足,菌体生长量和多糖产量都较低。

#### 2.2.3 培养基初始 pH 值的确定

赤芝 G22 菌株在不同培养基初始 pH 值条件下的液体发酵结果见表 4。其它发酵条件(发酵温度 28 °C,摇床转速 180 r/min,发酵时间 7 d)均保持一致。

由表 4 的结果可知,培养基初始 pH 值为 6.0 时,最有利于菌体的生长和多糖的合成。说明菌体生长和

多糖合成代谢的最适 pH 值为 6.0 左右。培养基初始 pH 值偏高到 6.5 以上或偏低到 5.5 以下时, 菌体生长量和多糖的产量都显著降低。

表 4 不同培养基初始 pH 值对灵芝液体发酵的影响 单位:

理化指标	培养基初始 pH 值				
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
菌丝体干重	1.428	1.561	1.626	1.510	1.372
胞内多糖	53.1	63.7	70.5	59.4	46.7
胞外多糖	115.4	141.1	161.3	130.7	98.4
总多糖	168.5	204.8	231.8	190.1	145.1

### 2.2.4 发酵时间的确定

在培养基初始 pH 值为 6.0、发酵温度 28 °C、摇床转速 180 r/min 条件下, 赤芝 G22 菌株不同发酵时间的液体发酵结果见表 5。

表 5 不同发酵时间的灵芝液体发酵结果 单位: g/100 mL

理化指标	发酵时间/h					
	48	72	96	120	144	168
菌丝体干重	0.503	0.924	1.384	1.536	1.623	1.619
胞内多糖	13.8	29.1	47.7	56.3	70.4	69.8
胞外多糖	19.2	47.0	77.4	130.5	161.1	162.0
总多糖	33.0	76.1	125.1	186.8	231.5	231.8

由表 5 可明显看出, 发酵至 144 h 多糖的生物合成已基本完成, 再延长时间多糖的产量增加极少。因此, 在培养基初始 pH 值为 6.0, 发酵温度 28 °C 和摇床转速 180 r/min 的发酵条件下, 灵芝液体发酵时间应为 144 h (6 d)。

## 3 结论

(上接第 44 页)

- [3] 方修贵,黄振东,林媚.柑桔果皮功能性物质及其联产工艺[J].食品工业科技,2002,23(12):75-77
- [4] 林进能.天然食用香料的生产 and 应用[M].北京:轻工业出版社.1991,70-80
- [5] 彭滨,朱自强,李继胜,等.柑桔皮中提取精油联产果胶的研究之一[J].五邑大学学报(自然科学版),2000,14(2):77-79
- [6] 赵丽,韩晓妍,景磊.柑桔精油的制取与应用[J].天津化工,2006,20(3):41
- [7] 张晓民.水蒸气蒸馏的工艺条件对精油得率和能耗影响分析[J].香精香料化妆品,1994,3:21
- [8] 谢练武,郭亚平,周春山.压榨法与蒸馏法提取柑橘精油

3.1 通过菌株选择试验,确定赤芝 G22 为液体发酵生产多糖的高产菌株。

3.2 对赤芝 G22 菌株的液体发酵条件进行了选择优化。结果表明, 实现多糖高产的发酵条件为: 发酵温度 28 °C、摇床转速 180 r/min、培养基初始 pH 值 6.0, 发酵时间 144 h (6 d)。采用此优化的工艺条件进行液体发酵, 使多糖产量由 1.823 g/L 提高到 2.315 g/L, 提高了 26.98%。

## 参考文献

- [1] 曹容华.灵芝多糖对免疫调节作用的实验研究[J].山东医科大学学报,1993, 31(4): 287-290
- [2] 孔乐生,黄瑞珊,罗九甫.赤芝 GL-2 发酵液中多糖组分及活性研究[J].工业微生物, 2000, 30(5): 27-30
- [3] He YQ, Li RZ, Lei LS et al. Studies on Active Polysaccharides from Ganoderma lucidum With Immune Activity[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 1992, 1(1): 79-80
- [4] 谭礼,谭双辉.灵芝多糖免疫功效及其产品开发[J].牧产品开发, 1997, (5): 7-8
- [5] 乐超生,邵伟,邓春霞,等.灵芝液体发酵条件的研究[J].生物学杂志,1999,16 (2):15-17
- [6] 贾万利,冯涛.灵芝多糖的液态发酵研究[J].山西化工, 2003, 24(1):24-26
- [7] 罗立新,姚汝华,周少奇.灵芝多糖的分离与纯化[J].食品工业科技,1998,(3):5-6
- [8] 苗敬芝,杨虹,王勤.灵芝深层液体发酵多糖的提取与测定[J].食品科技,2003, (2):13-14
- [9] 的比较研究[J].化学与生物工程,2005,5:15-16
- [9] 凌育赵.水蒸气蒸馏法提取桔柑皮中的香精油[J].广东化工,2005,4:43
- [10] 郑旭煦,殷钟意,洪燕,等.从橙皮中提取香精油的工艺条件研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(6):528
- [11] 陈纯馨,赖兴华,袁毅桦,等.从柑桔皮中提取香精油的技术研究[J].佛山大学学报,1997,15(2):70
- [12] 何坚,孙宝国.香料化学与工艺学—天然、合成调合香料[M].北京:化学工业出版社,1995,572-587
- [13] 陈志慧.从柑桔皮中提取香精油实验的改进[J].韶关学院学报(自然科学版),2004,25(9):48