

灵芝真菌液体发酵培养基优化研究

孙金旭, 朱会霞, 王敏, 魏淑珍, 王倩

(河北衡水学院生命科学系, 河北 衡水 053000)

摘要: 对灵芝真菌的发酵培养条件进行研究, 选取了 7 种培养基成分进行研究, 通过 $L_{18}(3^7)$ 正交试验确定出灵芝真菌的最佳发酵培养基 (g/L) 合为: 葡萄糖 30, 玉米粉 50, 黄豆粉 10, 酵母膏 1, KH_2PO_4 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, VB_1 0.02, pH 6.0。

关键词: 灵芝真菌; 胞外多糖; 培养基; 优化

中图分类号: Q93; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)12-0051-03

Optimization of liquid fermentation medium for the Culture of *Ganoderma lucidum*

SUN Jin-xu, ZHU Hui-xia, WANG Min, WEI Shu-zhen, WANG-qian

(Department of Biology, Hengshui University, Hengshui 053000, China)

Abstract: The liquid fermentation medium for the culture of *Ganoderma lucidum* was studied and the best culture conditions determined by $L_{18}(3^7)$ test were as follows (g/L): glucose content of 30, corn meal content of 50, soybean meal content of 10, yeast extract content of 1, KH_2PO_4 concentration of 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration of 0.1, VB_1 content of 0.02, pH value of 6.0

Key words: fungus; exopolysaccharide; medium; optimization

深层培养^[1]的培养基成分及其之间的配比不仅在很大程度上影响着灵芝菌丝的生长、形态和构造, 而且对代谢产物的产生及其后提取也有很大影响。因此选择一个合适的培养基是非常重要的。

灵芝菌深层发酵选用葡萄糖和玉米粉作综合碳源, 选择酵母膏和黄豆粉作综合氮源, 同时添加一定量的 VB_1 。玉米粉一方面可降低成本, 另一方面可增加培养基的粘度, 利于增加发菌点, 省去为了增加其粘度而添加的 CMC。黄豆粉同样可降低生产成本, 并作为一种复合有机氮源^[2], 更加利于菌体的利用。维生素在细胞中作为辅酶成分, 具有催化功能。大多数真菌的培养与 B 族维生素有关, 与 A 族、K 族关系不大, 如硫胺素 (VB_1), 它是辅羧酶的重要组成, 而辅羧酶是真菌代谢所必不可少的酶类。因此, 若培养基中缺少 VB_1 , 真菌的生长必定迟缓, 严重缺乏时, 其生长完全停止。

1 材料

1.1 灵芝菌: 衡水学院微生物实验室提供。

收稿日期: 2007-07-30

基金项目: 衡水学院2007年资助课题 (0722)

作者简介: 孙金旭(1975-), 男, 河北景县人, 硕士研究生, 讲师。主要从事微生物、发酵工程、食品等方面的研究

1.2 实验地点: 衡水学院生命科学系微生物实验室

1.3 培养基

斜面培养基: 培养基 (PDA-potato dextrose agar) (g/L): 葡萄糖 20.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, KH_2PO_4 3, VB_1 10 mg, 琼脂 20, 加入 20% 土豆汁至 1 L。

1.4 实验仪器

722 光栅分光光度计、WXG-1(A)型光学显微镜、COOLPIX990 型数码相机、FA2004 型光电分析天平、TDA-8002 型电热恒温水浴锅、LRH-250-A 型生化培养箱。

2 实验方法

2.1 发酵液中生物量的测定

取一定量发酵液, 3000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 菌体用水洗、再离心, 直至上清液不再带有发酵液颜色为止。收集菌体, 在 60 °C 恒温烘箱中烘干至恒重, 在干燥器中冷却到常温, 称量, 菌丝得率由下式计算:

$$\text{菌丝得率} (\%) = \frac{\text{菌丝干重} (\text{g})}{\text{发酵液体积} (\text{mL})} \times 100\%$$

2.2 胞外多糖测定^[3]

2.2.1 提取工艺流程

发酵液 → 离心 → 上清液 → 真空浓缩 → 加入 2 倍体积的

95%乙醇→离心→75%乙醇洗涤两次、60℃干燥→粗多糖

2.2.2 多糖的测定苯酚-硫酸法^[6]

标准曲线的制作：准确吸取标准葡萄糖（或葡萄糖）20 mg（预先在 105℃烘至恒重）于 500 mL 容量瓶中，加水至刻度。

分别吸取 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.8 mL，各以水补至 2.0 mL，然后加入 6%苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL，静止 10 min，摇匀，室温放置 20 min 以后于 490 nm 下测光密度，以 2.0 mL 水按同样显色操作空白，横坐标为多糖微克数，纵坐标为光密度值，得到标准曲线。

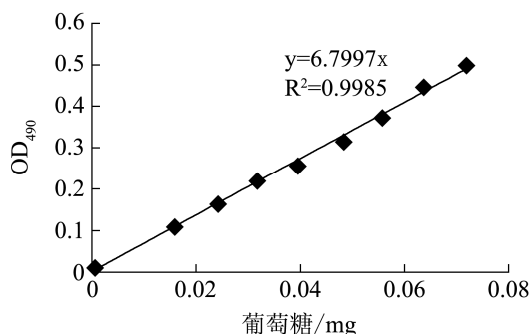


图2 苯酚-硫酸标准曲线

将样品配制成一定浓度的溶液，取 1.0 mL，按同

样操作测光密度，以标准曲线计算多糖含量。

2.3 菌液的镜检

用接种环取发酵液少许，均匀涂布于载玻片上，用镊子夹住后于酒精灯火焰上微火烤干、固定，冷却后，滴加 0.1%美蓝染色液一滴，染 1~3 min，用水轻轻冲洗掉多余的染色液，待干后，在显微镜下观察。

2.4 发酵培养基的选择正交实验设计

选用玉米粉，葡萄糖，豆粉，酵母膏，KH₂PO₄，MgSO₄·7H₂O，VB₁ 为因素，各取 3 水平，进行 L₁₈(3⁷) 正交试验，其结果见表 2 和表 4。

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 因素水平表

		葡萄糖	玉米粉	豆粉	酵母膏	KH ₂ PO ₄	硫酸镁	VB ₁
因素		A	B	C	D	E	F	G
水平	1	10	30	5	0.5	0.4	0.1	0.001
	2	20	40	10	1	0.7	0.3	0.01
	3	30	50	15	1.5	1	0.5	0.02

3 结果分析

3.1 胞外多糖为目的产物的正交试验分析

表2 正交实验计算表

实验	A	B	C	D	E	F	G	Σ
M ₁	29.74	22.82	29.34	32.50	28.20	27.50	23.28	T=87.03 ȳ=1.59
M ₂	31.22	26.32	27.89	30.54	32.36	29.73	32.19	
M ₃	26.06	37.89	29.79	23.99	26.47	29.80	31.56	
S _j	0.78	6.92	0.11	2.21	1.02	0.19	2.75	S ₁ =15.34

表3 正交试验方差分析表

方差来源	平方和	自由度 f	均方 S̄	F 值	显著性
A	0.784	2	0.392		
B	6.916	2	3.458	46.871	**
C	0.109	2	0.055		
D	2.209	2	1.105	14.972	**
E	1.019	2	0.509		
F	0.190	2	0.095		
G	2.747	2	1.373	18.616	**
误	1.365	39	0.035		
误 [△]	3.467	47.000	0.074		

由表 2、3 可以看出，玉米粉、酵母膏和 VB₁ 对灵芝菌胞外多糖的产率有非常显著的影响。按培养基成分对多糖影响的重要性而论：玉米粉>VB₁>酵母膏>KH₂PO₄>葡萄糖> MgSO₄·7H₂O>豆粉。比较 3 个因素不同水平下的总和，发现 A₂、B₃、C₃、D₁、E₂、F₃、G₂ 下胞外多糖的产量最高。用 A₂B₃C₃D₁E₂F₃G₂ 进行摇瓶培养，多糖得率为 2.69 g/L，高于正交试验中的最高值。由此确定以灵芝菌胞外多糖为目的产物的最佳培养基为 (g/L)：葡萄糖 20，玉米粉 40，黄豆粉 15，酵母膏 0.5，KH₂PO₄ 0.7，MgSO₄·7H₂O 0.5，VB₁ 0.01，pH6.0。

3.2 以生物量为目的产物的正交试验分析

表4 正交实验计算表

实验	A	B	C	D	E	F	G	Σ
M ₁	31.01	31.62	32.90	36.84	37.23	37.52	36.25	T=110.93 $\bar{y}=2.03$
M ₂	38.33	33.37	39.24	38.30	38.31	37.37	35.17	
M ₃	41.60	45.94	38.79	35.78	35.38	36.04	39.52	
S _j	3.27	6.78	1.39	0.18	0.24	0.07	0.57	S _T =13.06

表5 正交试验方差分析表

方差来源	平方和	自由度 f	均方 \bar{S}	F 值	显著性
A	3.266	2	1.633	69.853	**
B	6.777	2	3.389	144.952	**
C	1.393	2	0.697	29.796	**
D	0.178	2	0.089		
E	0.244	2	0.122		
F	0.074	2	0.037		
G	0.571	2	0.286	12.212	**
误	0.556	39	0.014	0.610	
误 [△]	1.052	45.000	0.023		

由表4和5可以看出,葡萄糖、玉米粉、豆粉和V_{B1}对灵芝菌丝的生长均有非常显著的影响。按培养基成分对菌丝生长影响的重要性而论:玉米粉>葡萄糖>豆粉>V_{B1}>KH₂PO₄>酵母膏>MgSO₄·7H₂O。比较3个因素在不同水平下的总和,发现A₃、B₃、C₂、D₂、E₂、F₁、G₃下菌丝的产量最高。用A₃B₃C₂D₂E₂F₁G₃进行摇瓶培养,菌丝得率为31.29 g/L,高于正交试验中的最高值。由此确定以灵芝菌菌丝体为目的产物的最佳培养基为(g/L):葡萄糖30,玉米粉50,黄豆粉

10,酵母膏1, KH₂PO₄ 0.7, MgSO₄·7H₂O 0.1, VB₁ 0.02, pH 6.0。

4 结论

研究过程中,以葡萄糖、玉米粉、豆粉、酵母膏、KH₂PO₄、硫酸镁、VB₁七种为影响灵芝真菌液体培养的影响因素,分别以菌丝体和胞外多糖为目的产物进行L₁₈(3⁷)正交试验,综合以胞外多糖和菌丝体为目的产物进行灵芝真菌液体培养的正交实验分析后得出,灵芝真菌液体培养时的适宜培养基为(g/L):葡萄糖30,玉米粉50,黄豆粉10,酵母膏1, KH₂PO₄ 0.7, MgSO₄·7H₂O 0.1, VB₁ 0.02, pH 6.0。

参考文献

- [1] 董洪新,梁建光,曲红静.灵芝菌体深层培养特性研究[M].北京:科学技术文献出版社
- [2] 林志彬.灵芝的现代研究[M].北京:北京医科大学出版社,2001
- [3] 李平作.灵芝液体发酵过程中菌体形态与胞外多糖产量关系[J].工业微生物.2000.30(3):20-23
- [4] 刘冬.灵芝菌丝体深层液体发酵培养基研究[J].微生物学杂志,2001,21(2):7-10

(上接第55页)

3 结论

通过本试验证明,椰壳活性炭对蔗糖溶液的最佳脱色条件为:椰壳活性炭用量1.5%,溶液pH 3.5,脱色温度70℃,脱色时间20 min,在此条件下,饱和蔗糖溶液的脱色率可达81.01%。此外,由于处理时pH 3.5偏酸性,为防止时间久后蔗糖溶液在酸性条件下转化为还原糖,蔗糖溶液脱色后还需尽快用碱中和至中性。

参考文献

- [1] 赵松林.椰子综合加工技术[M].北京:中国农业出版社,2007,58
- [2] 赵洪侠.活性炭在制糖清静过程中的应用[J].山西食品工业,2000,3:29-30
- [3] 肖志刚,孟爽.果寡糖生产中脱色工艺条件优化[J].食品研究与开发,2005,4(26):79-87
- [4] 邓琼,冯长根,曾庆轩.离子交换纤维在碳法甘蔗糖汁脱色中的应用[J].食品与发酵工业,2004,30(7):12-16