

DOI:10.11937/bfyy.201504037

# 松杉灵芝液体发酵培养营养条件优化

于海洋, 弥春霞, 陈欢, 韩笑, 廉靖茹

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157001)

**摘要:**以松杉灵芝为试材,研究松杉灵芝在发酵培养过程中营养成分对其菌丝体形态、生物量及多糖产量的影响。结果表明:通过生物量和粗多糖的产量确定最佳碳源为玉米粉;最佳氮源为麦麸;添加无机盐的效果更加明显。试验结果为今后灵芝的液体发酵及工业化生产提供参考依据。

**关键词:**松杉灵芝;发酵;营养条件

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0152-05

松杉灵芝(*Ganoderma tsugae*)属担子菌纲多孔菌科(Polyporaceae)灵芝属(*Ganodelma*),又名铁杉树芝、木灵芝,产于黑龙江、吉林、甘肃等地<sup>[1-2]</sup>,有极高的营养和保健价值,有补肝益气、润肺平喘、降血脂、增强免疫力、安神健脑、抑制肿瘤的作用<sup>[3-5]</sup>,其次还具有抗HIV-1及HIV-1蛋白酶等作用。民间用松杉灵芝泡酒作为风湿、关节炎的辅助治疗。由于灵芝的子实体生长周期长,生长效率低,产品质量也相对不稳定,从而影响灵芝的研究利用。目前通过液体发酵来获得灵芝的有效成分。现以松杉灵芝为试材,研究碳源、氮源及无机盐对松杉灵芝生物量及胞外多糖产量的影响,以期为其液态发酵生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株:松杉灵芝(*Ganoderma tsugae*)1号,由牡丹江师范学院生命科学与技术学院微生物实验室保藏。

试剂:葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (均购自北京双环化学试剂厂);95%乙醇(购自上海振兴化学试剂);蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、蔗糖、琼脂、麦芽糖(均购于江苏昆山市生物化学研究所);玉米粉、麦麸、豆饼粉(购于超市);丙酮、无水乙醚、 $KH_2PO_4$ 、 $K_2HPO_4$ 等均为分析纯试剂。

仪器:BC-R2001 旋转蒸发器(上海贝凯生物化工设备有限公司);Eppendorf 5804R 冷冻离心机(上海市离心机械研究所);Alpha1-4LSC 冷冻干燥机(德国 Christ 公

司);YT-CJ-2ND 超净工作台(上海博讯实业医疗设备厂);SCS-24 摇床(上海市离心机械研究所);BSA223S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PVD-050 真空干燥箱(上海实贝仪器设备厂)。

培养基:1)综合 PDA 培养基:马铃薯 200 g(去皮),蔗糖 20 g,琼脂 20 g,酵母浸膏 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g, $KH_2PO_4$  3 g,微量维生素  $B_1$ ,水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。2)种子培养基:葡萄糖 1%,蔗糖 2%,蛋白胨 1%,酵母浸膏 0.5%, $KH_2PO_4$  0.10%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,121℃灭菌 20 min。3)发酵培养基:葡萄糖 3%,蛋白胨 0.3%,酵母浸膏 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, $KH_2PO_4$  0.05%, $K_2HPO_4$  0.05%,121℃灭菌 15 min。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子培养 将活化的斜面菌种分割成蚕豆大小的小块于无菌条件下接种至液体种子培养基中,250 mL 的三角瓶装液量为 80 mL(内含玻璃珠),在 28℃,160 r/min 条件下培养 7 d。

1.2.2 液体发酵培养方法 将培养好的种子以 10% 的接种量接种到 500 mL 三角瓶中,装液量为 180 mL,相同条件下继续培养 5~6 d<sup>[6]</sup>。

1.2.3 菌丝体的收集 将发酵液置于离心杯中,以 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌丝体沉淀,用蒸馏水洗涤菌丝体重复离心 3 次,将所得菌丝体用蒸馏水清洗至无色于 60℃烘干至恒重,计算生物量,以菌丝体干重(g/L)发酵液计。

1.2.4 胞外粗多糖的提取 将过滤后的发酵液进行真空浓缩至原体积的 1/5,在浓缩的发酵液中加入 3 倍体积的无水乙醇并于 4℃条件下静置过夜,将过夜后的发酵液以 4 000 r/min 离心 5 min 得沉淀,将沉淀冷冻干燥得粗多糖提取物,计算胞外粗多糖得率,以粗多糖干重(g/L)发酵液计。

**第一作者简介:**于海洋(1986-),女,硕士研究生,研究方向为微生物。E-mail:541941237@qq.com。

**责任作者:**弥春霞(1973-),女,硕士,副教授,研究方向为应用微生物。E-mail:swxmcx@126.com。

**基金项目:**2013 年牡丹江师范学院青年一般资助项目(QY201319);2014 年黑龙江省大学生创新创业训练重点资助项目(201410233006)。

**收稿日期:**2014-11-19

2 结果与分析

2.1 不同碳源对灵芝菌丝体生物量及胞外粗多糖的影响

将葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、玉米粉、麦芽糖、乳糖等代替液态培养基中的碳源,其它成分不变,分别测定其生物量、粗多糖含量。

由表 1 可知,不同碳源对菌丝体生长的影响有一定差异,以玉米粉为碳源的培养基菌丝生物量最大,其次为可溶性淀粉、葡萄糖。以可溶性淀粉为碳源的培养基胞外多糖产量最大,其次为玉米粉、蔗糖。虽然以玉米粉为碳源的培养基中的胞外多糖比可溶性淀粉低,但用于发酵液体菌种是较理想的,其菌球较均匀且生物量对比也较高。玉米粉中含有的核苷酸类物质、纤维素及半

纤维素也诱导灵芝胞外多糖的合成<sup>[7-9]</sup>。由于玉米粉原料多、价格低,因此综合考虑培养基的成本、菌丝体生物量及发酵液多糖,宜选择玉米粉作为碳源。

表 1 碳源对松杉灵芝液态发酵的影响

Table 1 Effect of carbon sources on <i>Ganoderma tsugae</i> liquid fermentation			
试验编号 No. of experiment	碳源 Carbon sources	菌丝生物量 Mycelia biomass /(g · L <sup>-1</sup> )	胞外多糖 Extracellular polysaccharide /(g · L <sup>-1</sup> )
1	葡萄糖 Amylaceum	2. 727	0. 406
2	可溶性淀粉 Amylogen	2. 805	0. 909
3	蔗糖 Saccharose	1. 024	0. 616
4	玉米粉 Corn meal	2. 831	0. 761
5	麦芽糖 Malt dust	1. 281	0. 564
6	乳糖 Lactin	1. 708	0. 218

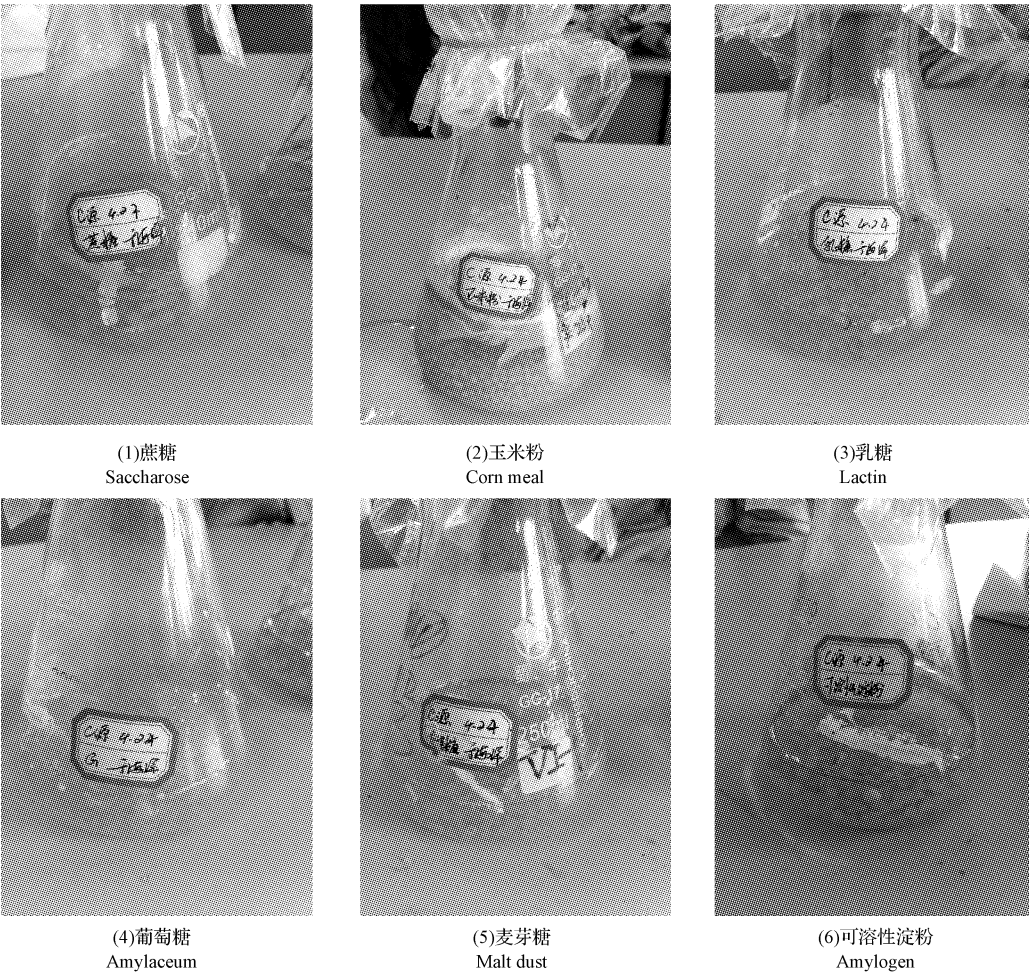


图 1 不同碳源对松杉灵芝液态发酵的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources of Songshan *Ganoderma tsugae* liquid fermentation

2.2 不同氮源对灵芝菌丝体生物量及发酵液多糖的影响

在最适合的碳源下,分别将蛋白胨、酵母浸膏、豆饼粉、麦麸、氯化铵和硝酸铵作为液态培养基中氮源进行摇床培养,其它成分不变,测定其生物量和粗多糖含量。

由表 2 可知,不同氮源均对松杉灵芝菌丝体生长有一定的促进作用,利用有机氮源发酵,灵芝的生物量及胞外多糖的得率明显高于无机氮源。在以豆饼粉、麦麸为氮源的培养基中菌丝生物量较大,其次为蛋白胨、酵母浸膏;麦麸、豆饼粉的胞外多糖得率也较大。由于



表 2  
Table 2                                      氮源对松杉灵芝液态发酵的影响  
Effect of nitrogen sources on *Ganoderma tsugae* liquid fermentation

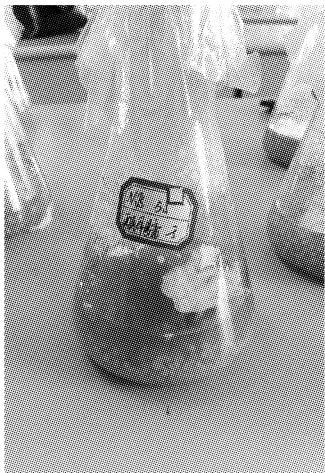
试验编号 No. of experiment	氮源 Nitrogen source	菌丝生物量 Mycelia biomass/(g · L <sup>-1</sup> )	胞外多糖 Extracellular polysaccharide/(g · L <sup>-1</sup> )
1	蛋白胨 Peptone	3.014	0.694
2	酵母浸膏 Yeast extract	2.758	0.656
3	豆饼粉 Bean cake powder	3.076	0.796
4	麦麸 Bran	3.037	0.820
5	硝酸铵 Ammonium nitrate	2.103	0.548
6	氯化铵 Ammonia chloride	2.553	0.579



(1)蛋白胨  
Peptone



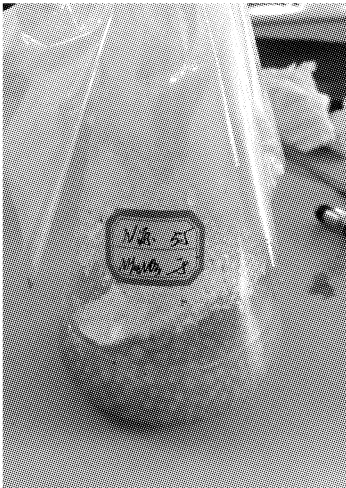
(2)豆饼粉  
Bean cake powder



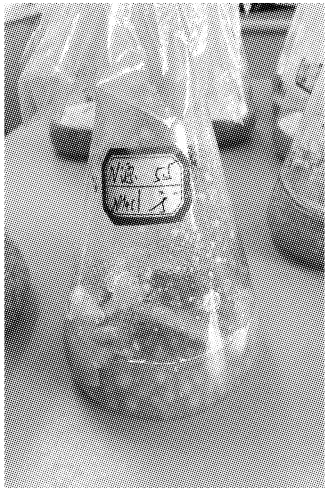
(3)酵母浸膏  
Yeast extract



(4)麦麸  
Bran



(5)硝酸铵  
Ammonium nitrate



(6)氯化铵  
Ammonia chloride

图 2 不同氮源对松杉灵芝液态发酵的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources of Songshan *Ganoderma tsugae* liquid fermentation

麦麸的成本更低且来源广泛,因此综合考虑培养基的成本、菌丝体生物量及发酵液多糖,宜选择麦麸作为氮源。

2.3 无机盐对灵芝菌丝体生物量及发酵液多糖的影响  
在最适的碳源、最适的氮源下,不添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  或

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为对照,其它成分不变测定其生物量和粗多糖含量。

由表 3 可知,无机盐的添加有利于灵芝菌的生长。培养基中添加少量  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  能够提高菌丝体生物量及胞外多糖产量,但效果并不明显。

表 3 无机盐对松杉灵芝液态发酵的影响  
Table 3 Effect of Inorganic salt on *Ganoderma tsugae* liquid fermentation

试验编号 No. of experiment	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O /%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /%	菌丝生物量 Mycelial biomass/(g · L <sup>-1</sup> )	胞外多糖 Extracellular polysaccharide/(g · L <sup>-1</sup> )
1	0.05	0.10	2.930	0.706
2(CK)	0	0.10	2.892	0.672
3	0.10	0.05	3.023	0.711
4(CK)	0.05	0	2.908	0.670

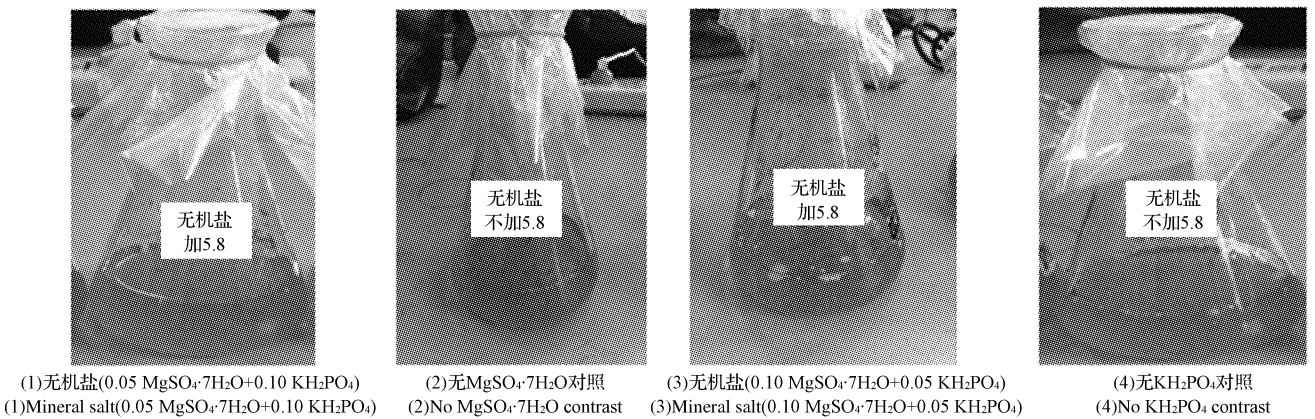


图 3 无机盐对松杉灵芝液态发酵的影响

Fig. 3 Effect of inorganic salt of Songsshan *Ganoderma tsugae* liquid fermentation

2.4 正交实验优化发酵培养基

根据以上试验,确定培养基的组成及各组分之间的比例对松杉灵芝菌丝体的生长和胞外多糖的产量有较大影响的是玉米粉、麦麸、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,对这 4 个因素进行无交互作用的正交实验,正交实验因素与水平设计表如表 4。

表 4 正交实验因素及水平 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

Table 4 Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素			
	玉米粉 Corn meal/ %	麦麸 Bran/ %	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /%	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O /%
1	3	0.2	0	0
2	4	0.3	0.05	0.05
3	5	0.4	0.10	0.10

由表 5 可知,4 个因素对灵芝菌丝体及胞外多糖总得率影响依次分别为 A>D>B>C,即玉米粉浓度>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 浓度>麦麸浓度>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度。培养基的最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即玉米粉 5%,麦麸 0.3%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%。在最优条件下,摇瓶发酵松杉灵芝胞外多糖的得率为 0.873 g/L,生物量为 3.043 g/L。

3 讨论

相对于传统的栽培方式,液体培养技术具有生产周期短、条件易于控制等优势,目前已经越来越受到人们的推崇。随着灵芝活性成分深入的研究,灵芝以及一些下游加工副产品未来将涉及到了食品、药品、化妆品等各个领域,灵芝的应用也将具有更广阔的前景。

表 5 液体菌种培养基正交实验结果

Table 5 Result of the orthogonal test of culture medium of fermentation liquid spawn

试验号	因素				生物量 /(g · L <sup>-1</sup> )	多糖得率 /(g · L <sup>-1</sup> )	总得率 /(g · L <sup>-1</sup> )
	A 玉米粉	B 麦麸	C KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	D MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O			
1	1	1	1	1	2.920	0.697	3.617
2	1	2	2	2	3.002	0.701	3.703
3	1	3	3	3	2.893	0.653	3.546
4	2	1	2	3	2.917	0.677	3.594
5	2	2	3	1	2.878	0.689	3.567
6	2	3	1	2	2.901	0.692	3.593
7	3	1	3	2	2.997	0.723	3.720
8	3	2	1	3	2.976	0.712	3.688
9	3	3	2	1	2.916	0.697	3.613
K <sub>1</sub>	10.866	10.931	10.898	10.797			
K <sub>2</sub>	10.754	10.958	10.91	11.016			
K <sub>3</sub>	11.021	10.752	10.833	10.828			
k <sub>1</sub>	3.622	3.644	3.633	3.599			
k <sub>2</sub>	3.585	3.653	3.637	3.672			
k <sub>3</sub>	3.674	3.584	3.611	3.609			
R	0.089	0.069	0.026	0.073			
优水平	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>			
A>D>B>C							

参考文献

[1] 蔡爱群,任安祥,李海勃,等. 粤北地区桑枝屑栽培松杉灵芝试验[J]. 食用菌,2008(4):31-32.  
[2] 普琼惠,陈虹,陈若芸. 松杉灵芝的化学成分研究[J]. 中草药,2005,36(4):502-504.



DOI:10.11937/bfyy.201504038

# ICP-AES 法测定五种理气类中药材中的十种元素含量

李利华

(陕西理工学院 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723000)

**摘要:**采用湿法消解、电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)对5种理气类中药材(陈皮、佛手、川楝子、木香、香附)中的10种元素Ca、Mg、P、Cu、Fe、Mn、Sr、Zn、Al、Si进行含量测定。结果表明:5种理气类药材样品中各种元素丰富,其中元素Ca、P、Mg、Fe、Al含量较高,各元素在不同样品中含量有一定的差异,方法的加标回收率在97.4%~105.8%,RSD值≤3.27%,表明该方法具有较好的准确度与精密度。

**关键词:**理气类中药材;电感耦合等离子体发射光谱法;元素

**中图分类号:**R 284.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)04-0156-03

理气类中药材是指具有行气或降气作用,能疏畅气机,以治疗气滞证或气逆证为主的中草药,因药性温和、药效持久且毒副作用小而受到患者的青睐<sup>[1-3]</sup>。陈皮、佛手、川楝子、木香、香附均属于理气类中药材,具有具有疏肝解郁、行气止痛、活血调经等功效。

中药材的药效与其微量元素的种类和含量有着密切关系,微量元素除直接参与补充和调节体内必需的元素外,常与其药用有机成分形成配合物,产生协同作用,增强其疗效。已有资料表明,在对中药材治病机理的研究中,微量元素的协同作用不容忽视<sup>[4-5]</sup>。近年来,微量元素以其生物学作用、生理功能和临床疗效成为研究中药材中无机成分的热点<sup>[6-8]</sup>。电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)以检出限低、动态线性范围宽、精密度高、基体效应小、分析速度快,可同时测定多元素的主

**作者简介:**李利华(1977-),女,硕士,高级实验师,研究方向为天然产物有效成分的分析与检测。E-mail:lihqlm@126.com.

**基金项目:**陕西省教育厅资助项目(12JK0602)。

**收稿日期:**2014-11-11

[3] 王柏,张明杰,徐金丹. 松杉灵芝的驯化栽培初探[J]. 中国食用菌, 1996,16(5):14.

[4] 闫丽华,陈学全,王丽,等. 松杉灵芝药用价值与人工栽培技术[J]. 内蒙古农业科技,2009(6):123.

[5] Lin Z B. Modern research of *Ganoderma*[M]. 2nd ed. Beijing, Beijing-Medical University Publishing House,2001.

[6] 田春龙. 液态发酵法生产灵芝菌(*Ganoderma lucidum*)的研究[D]. 南

宁:广西大学,2004.

[7] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,1987.

[8] Standford P A. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry[M]. Academic Press,1979,36:266.

[9] Setherland I W. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures[J]. Adv Microb Physiol,1982,23:79.

## The Fermentation Optimization of *Ganoderma tsugae* Murrill Liquid Strain

YU Hai-yang, MI Chun-xia, CHEN Huan, HAN Xiao, LIAN Jing-ru

(College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal College, Mudanjiang, Heilongjiang 157001)

**Abstract:** Taking *Ganoderma tsugae* as material, the developments of *Ganoderma tsugae* liquid fermentation, nutrient composition of mycelium in the process of fermentation culture, and the effect on biomass and polysaccharide yield were studied. The results showed that the best carbon source for corn flour; the best nitrogen source for bran; the effect of adding inorganic salt was more obvious. For the liquid fermentation of *Ganoderma tsugae* would provide a scientific basis in the process of industrial production.

**Keywords:** *Ganoderma tsugae*; fermentation; nutritional conditions