

金地灵芝液体发酵产胞外多糖的营养条件优化

张 璐, 马 沁 沁, 袁 向 华, 杨 学 利, 王 一 丁

(四川师范大学 生命科学院, 四川 成都 610101)

摘 要:以金地灵芝为试材,探究了碳源、氮源及无机盐对其液态发酵产胞外多糖量的影响,通过单因素试验并运用 Design Expert 软件设计响应面试验优化发酵培养基的组分,以得到金地灵芝液态发酵产灵芝多糖的最优培养基配方。结果表明:优化后的最佳碳源为玉米粉,最佳氮源为蛋白胨,最佳辅助无机盐为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,最优培养基配方为 3.98% 玉米粉,0.68% 蛋白胨,0.21% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.05% K_2HPO_4 ,0.05% KH_2PO_4 ,0.001% 维生素 B_1 。优化后胞外多糖得率提高了 30.14%。

关键词:金地灵芝;灵芝多糖;响应面;液体发酵

中图分类号:S 567.3⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0133-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属担子菌门层菌纲非褶菌目灵芝科灵芝属大型真菌,是典型的红色灵芝,有多种活性成分和各种药理活性^[1],是我国传统名贵药食两用菌^[2],古代被称为仙草,史载于汉代《神农本草经》^[3],有补肝益气、润肺平喘、健胃、消炎、利尿、降血脂、降胆固醇、增强免疫力、安神健脑、抑制肿瘤的作用^[4-6],其次还具有抗 HIV-1 及 HIV-1 蛋白酶等作用,民间也有用灵芝泡酒作为辅药。由于灵芝子实体的生长周期长^[7],质量相对不稳定,因而影响灵芝的研究利用,现常通过液体发酵来获得灵芝的有效成分,可有效缩短培养周期^[8]。金地灵芝是四川省农业科学院土壤肥料研究所用赤芝为出发菌株,经过原生质体再生技术选育的灵芝新品种,具有产量高,生长周期短,形态好等优点。该试验以金地灵芝为试材,研究碳源、氮源及无机盐对金地灵芝产胞外多糖产量的影响,以期为液态发酵及工业生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为金地灵芝(*Ganoderma lucidum*),由四川省农业科学院土壤肥料研究所微生物实验室提供(审定编号:川审菌 2003 008)。

试验试剂为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、琼

脂、维生素 B_1 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、无水乙醇,均购自成都市科龙化工试剂厂;蛋白胨、酵母膏、牛肉膏,均购自北京奥博星生物技术有限责任公司;玉米粉、马铃薯,购自超市。

试验仪器为 RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);H1850R 台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司);FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);SW-CJ-2F 洁净工作台(苏净集团安泰空气技术有限公司);ZWYR-2012C 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);AR223CN 电子天平(奥豪斯仪器有限公司)。

培养基如下。1)PDA 培养基:马铃薯 200 g(去皮),葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。2)种子培养基:1.00% 葡萄糖,2.00% 蔗糖,1.00% 蛋白胨,0.50% 酵母膏,0.10% KH_2PO_4 ,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.001% 维生素 B_1 ,121℃灭菌 20 min。3)初始发酵培养基:3.00% 葡萄糖,0.30% 蛋白胨,0.20% 酵母膏,0.05% K_2HPO_4 ,0.05% KH_2PO_4 ,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.001% 维生素 B_1 ,121℃灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 种子培养方法 试验将活化的斜面菌种分割成 1 cm×1 cm 小块于无菌条件下接种至液体种子培养基中,250 mL 锥形瓶中的装液量为 100 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 参考田春龙^[9]的培养方法,将培养好的种子以 10% 的接种量接种到 250 mL 三角瓶中,装液量为 100 mL,在 28℃,160 r/min 条件下培养 5 d。

第一作者简介:张璐(1991-),女,硕士研究生,研究方向为微生物。
E-mail:jove_tina@hotmail.com.

责任作者:王一丁(1963-),男,博士,教授,硕士生导师,现主要从事应用与环境微生物学等研究工作。E-mail:wangyiding@sicnu.edu.cn.

收稿日期:2015-12-16

1.2.3 胞外粗多糖的提取与测定 根据毛健等^[10]的方法加以优化,抽滤(0.45 μm)除去菌丝体,将发酵液进行旋转蒸发浓缩至原体积的1/10,在浓缩的发酵液中加入3倍体积的无水乙醇,于4℃条件下静置沉淀过夜,将过夜后的发酵液以4 000 r/min离心5 min,弃上清得到沉淀,将沉淀冷冻干燥得到多糖提取物,计算胞外多糖得率,以粗多糖干重(g/100mL)发酵液计。

1.3 数据分析

利用 Design Expert 8.0 软件,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,基于单因素试验结果设计3因素3水平的响应面试验,并对回归模型进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度碳源对灵芝产胞外粗多糖的影响

将浓度梯度分别为3.00%、4.00%、5.00%葡萄糖、蔗糖、玉米粉、麦芽糖、可溶性淀粉替代液体培养基中的碳源,其它成分不变,分别测定金地灵芝产胞外多糖的量。由表1可知,不同浓度、不同碳源对金地灵芝产灵芝多糖量的影响有一定差异,以4.00%蔗糖为碳源的培养基胞外多糖产量最大,其次为4.00%葡萄糖与5.00%蔗糖,再次为4.00%玉米粉。虽然以4.00%玉米粉为碳源作为培养基所产灵芝多糖量略少于5.00%蔗糖和4.00%葡萄糖作碳源的培养基,但鉴于玉米粉有价格低、原料多并含有纤维素与多种核苷酸类化合物等利于诱导灵芝多糖合成的物质等优势^[11-12],因此选择4.00%玉米粉作为培养基的碳源。

表1 碳源对金地灵芝液态发酵产多糖的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* liquid fermentation

编号 No. of experiment	碳源 Carbon sources	胞外多糖 Extracellular polysacchride/(g·(100mL) ⁻¹)
1	3.00%葡萄糖	1.271
2	4.00%葡萄糖	1.731
3	5.00%葡萄糖	1.443
4	3.00%蔗糖	1.669
5	4.00%蔗糖	2.174
6	5.00%蔗糖	1.693
7	3.00%麦芽糖	0.235
8	4.00%麦芽糖	0.314
9	5.00%麦芽糖	0.279
10	3.00%可溶性淀粉	0.987
11	4.00%可溶性淀粉	1.251
12	5.00%可溶性淀粉	1.021
13	3.00%玉米粉	1.179
14	4.00%玉米粉	1.448
15	5.00%玉米粉	1.251

2.2 不同氮源对灵芝产胞外粗多糖的影响

在最适合的碳源下,以浓度梯度分别为0.10%、0.30%、0.50%蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、NH₄Cl、NH₄NO₃作为液体培养基中的氮源进行振荡培养,其它成分不变,测定其胞外多糖产量。由表2可知,不同浓度、不同

氮源对灵芝产多糖量都有一定促进作用,而利用有机氮源发酵所产灵芝多糖的产量明显高于用无机氮源的。在以0.30%蛋白胨为氮源的培养基中胞外多糖得率最大,其次为0.30%牛肉膏,再次为0.30%酵母粉。再综合经济方面的考量,选择0.30%蛋白胨作为氮源。

表2 氮源对金地灵芝液态发酵产多糖的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on the production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* liquid fermentation

编号 No. of experiment	氮源 Nitrogen sources	胞外多糖 Extracellular polysacchride/(g·(100mL) ⁻¹)
1	0.10%蛋白胨	1.324
2	0.30%蛋白胨	1.435
3	0.50%蛋白胨	1.268
4	0.10%酵母粉	1.185
5	0.30%酵母粉	1.364
6	0.50%酵母粉	1.326
7	0.10%牛肉膏	1.170
8	0.30%牛肉膏	1.372
9	0.50%牛肉膏	1.353
10	0.10% NH ₄ NO ₃	1.304
11	0.30% NH ₄ NO ₃	1.314
12	0.50% NH ₄ NO ₃	1.239
13	0.10% NH ₄ Cl	1.235
14	0.30% NH ₄ Cl	1.315
15	0.50% NH ₄ Cl	1.277

2.3 无机盐对灵芝产胞外粗多糖的影响

在最适碳源、最适氮源下,分别改变K₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O的浓度梯度为0.10%、0.15%、0.20%作为培养基的无机盐进行培养,其它成分不变,测定其胞外多糖的产量。由表3可知,不同浓度各种无机盐的添加对于金地灵芝产生灵芝多糖都有一定的促进作用,但差异不是很大。在以0.15% MgSO₄·7H₂O为无机盐的培养基中胞外多糖得率最大,其次为0.15% K₂HPO₄,再次为0.2% MgSO₄·7H₂O。在此选择0.15% MgSO₄·7H₂O作为培养基的无机盐。

表3 无机盐对金地灵芝液态发酵产多糖的影响

Table 3 Effect of inorganic salt on the production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* liquid fermentation

编号 No. of experiment	无机盐 Inorganic salt	胞外多糖 Extracellular polysacchride/(g·(100mL) ⁻¹)
1	0.10% K ₂ HPO ₄	1.289
2	0.15% K ₂ HPO ₄	1.469
3	0.20% K ₂ HPO ₄	1.320
4	0.10% MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.317
5	0.15% MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.473
6	0.20% MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.362
7	0.10% KH ₂ PO ₄	0.659
8	0.15% KH ₂ PO ₄	0.987
9	0.20% KH ₂ PO ₄	0.968

2.4 响应面分析(RSA)试验优化发酵培养基

根据以上试验确定培养基的组成及各组分之间比

例对金地灵芝产胞外多糖的产量有较大影响的是 4.00% 玉米粉、0.30% 蛋白胨、0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,以这 3 个因素(分别设为 A、B、C)为自变量,以金地灵芝产生胞外多糖量为响应值设计了 3 因素 3 水平的响应面试验,17 个试验点给出的结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken experiments

编号 No. of experiment	A 玉米粉 Cornmeal /%	B 蛋白胨 Peptone /%	C $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /%	Y 胞外多糖 Extracellular polysaccharide /(g · (100mL) ⁻¹)
1	3.00	0.30	0.10	0.056
2	4.00	0.30	0.15	1.302
3	5.00	0.10	0.15	0.263
4	4.00	0.50	0.10	0.176
5	4.00	0.10	0.10	0.746
6	4.00	0.30	0.15	1.622
7	5.00	0.30	0.10	0.092
8	4.00	0.30	0.15	1.219
9	4.00	0.10	0.20	1.963
10	4.00	0.30	0.15	1.619
11	3.00	0.30	0.20	1.288
12	4.00	0.50	0.20	1.68
13	3.00	0.50	0.15	1.184
14	5.00	0.30	0.20	0.899
15	4.00	0.30	0.15	1.612
16	3.00	0.10	0.15	0.621
17	5.00	0.50	0.15	1.235

利用 Design Expert 8.0 软件,对 Box-Behnken 试验数据进行二次多项回归拟合,可得到响应值(Y 胞外多糖)与各因子(A、B、C)之间的下列函数关系:

$Y = -12.79 + 4.91A - 2.01B + 52.78C + 0.51AB - 2.13AC + 7.18BC - 0.60A^2 - 1.14B^2 - 115.11C^2$, 方差分析见表 5。

表 5 回归模型的方差分析

Table 5 Analysis of variance with regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	Pr>F P-value Prob>F
A	0.054	1	0.054	0.411	0.542 0
B	0.058	1	0.058	0.439	0.529 0
C	2.832	1	2.832	21.368	0.002 4
AB	0.042	1	0.042	0.316	0.591 8
AC	0.045	1	0.045	0.341	0.577 7
BC	0.021	1	0.021	0.155	0.705 2
AA	1.532	1	1.532	11.561	0.011 4
BB	0.009	1	0.009	0.067	0.803 8
CC	0.349	1	0.349	2.631	0.148 8
模型	5.054	9	0.562	4.237	0.035 1
参差	0.928	7	0.133		
失拟项	0.771	3	0.257	6.567	0.050 3
纯误差	0.157	4	0.039		
总误差	5.982	16			

注: $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。

Note: $P < 0.01$ showed highly significant difference, $P < 0.05$ showed significant difference.

由表 5 可知,一次项 C 对回归模型有极显著影响,二次项 AA 对回归模型有显著影响。通过模型 P 值可以看出模型回归显著($P = 0.0351 < 0.05$),而失拟项不显著($P = 0.0503 > 0.05$),表明模拟程度良好,模型相关程度良好,可利用该回归方程确定最佳发酵条件。根据以上回归方程作出响应面分析图(图 1、2、3),可直观的看出各因素对金地灵芝产胞外多糖量的影响:玉米粉与蛋白胨交互作用对金地灵芝产胞外多糖的影响极显著,而蛋白胨与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的交互作用对胞外多糖产量影响也较显著,玉米粉与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之间也存在一定的交互作用,对响应值的影响并不是简单的线性关系。

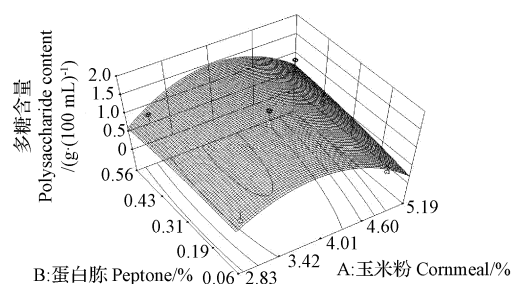
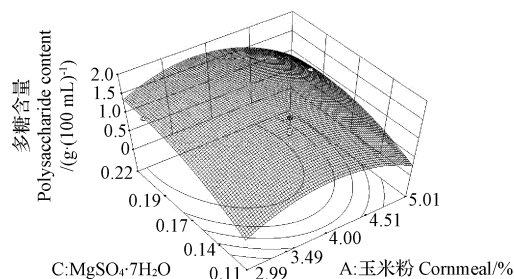
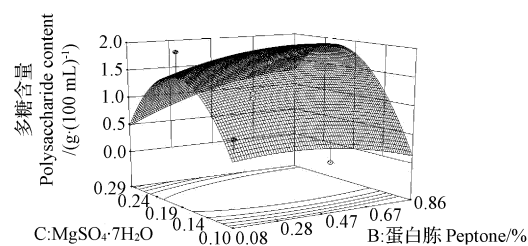


图 1 玉米粉和蛋白胨对胞外多糖产量的交互作用效应

Fig. 1 The effect of cornmeal and peptone on extracellular polysaccharide production

图 2 玉米粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对胞外多糖产量的交互作用效应Fig. 2 The effect of cornmeal and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on extracellular polysaccharide production图 3 蛋白胨和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对胞外多糖产量的交互作用效应Fig. 3 The effect of peptone and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on extracellular polysaccharide production

利用软件对模型极值求解和分析等高线得到最佳条件,响应值 Y 在 $A=3.98$ 、 $B=0.68$ 、 $C=0.21$ 时达到最大 $1.936 \text{ g}/100\text{mL}$,即最优产胞外多糖发酵培养基配方为:3.98%玉米粉,0.68%蛋白胨,0.05% K_2HPO_4 ,0.05% KH_2PO_4 ,0.21% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.001%维生素 B_1 。在此条件下进行验证试验 3 次,得到金地灵芝产胞外多糖平均值为 $1.917 \text{ g}/100\text{mL}$,与理论值较接近。优化后胞外多糖得率提高了 30.14%。

3 结论

通过单因素试验确定了培养基的组成成分,再经 3 因素 3 水平响应面优化得到金地灵芝液体发酵产胞外多糖的最佳培养基配方:3.98%玉米粉,0.68%蛋白胨,0.21% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.05% K_2HPO_4 ,0.05% KH_2PO_4 ,0.001%维生素 B_1 ,并通过验证试验得以证实。优化后胞外多糖得率达到 $1.917 \text{ g}/100\text{mL}$,较之优化前提高了 30.14%。液体培养技术具有周期短、易控制等优势,如今已逐渐趋于成熟。响应面试验设计软件在优化培养基配方及培养条件等方面的应用近年来也越来越普遍,一方面是由于其便捷性,另一方面也是基于试验结果的可靠性,说明其设计的合理性。随着当今对灵芝多糖的功能的逐步深入研究,其应用未来将涉及食品、药品、化妆品等多个领域,具有非常广阔的前景。而金地灵芝产灵芝多糖的各项药理活性还有待下一步试验的探究。

参考文献

- [1] 林志彬,赵大明,许瑞祥,等.灵芝的现代研究[M]. 3 版. 北京:北京大学医学出版社,2007:125-195.
- [2] 邓海林,吴佩颖,王建新.灵芝的研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(2):141-143.
- [3] 韩玉复,宋桂芬,苏鑫,等.灵芝的研究进展[J]. 中药材,1995,18(5):266-268.
- [4] ZHANG J, TANG Q, MARTIN Z K, et al. Activation of blymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*[J]. Life Sciences, 2002, 71(6):623-638.
- [5] WANG Y, KHOO K, CHEN S, et al. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyscs of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities[J]. Bioorganic and Chemistry Medicinal, 2002, 10(4):1057-1054.
- [6] 洪震, 卯晓岚. 食用药用菌实验技术及发酵生产[M]. 北京:中国农业科技出版社,1992.
- [7] 周连玉, 刘明月, 夏志兰, 等. 灵芝发酵液体种子培养条件研究[J]. 食用菌学报, 2005, 12(4):33-39.
- [8] 张甫安, 陈国荣, 李伟芳, 等. 菌菇深层发夹和液体菌种生产[M]. 北京:中国科学文化出版社, 2001:82-85.
- [9] 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, 2004:13-15.
- [10] 毛健, 马海乐. 灵芝菌体液态深层发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(23):377-382.
- [11] STANDFORD P A. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry[M]. Manhattan: Academic Press, 1979:266.
- [12] SETHERLAND I W. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures[J]. Adv Microb Phsiol, 1982(23):79.

Optimization of Liquid Fermentation of *Ganoderma lucidum* for Extracellular Polysaccharide Production

ZHANG Lu, MA Qinqin, YUAN Xianghua, YANG Xueli, WANG Yiding
(College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101)

Abstract: Taking *Ganoderma lucidum* as test material, the effect of carbon source, nitrogen source and minerals on liquid fermentation was investigated by single factor test and response surface test using Design Expert. The results showed that the optimal carbon source and nitrogen source were cornmeal and peptone, respectively. The optimal assistant inorganic salt was $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The optimal formula of liquid fermentation medium was 3.98% corn meal, 0.68% peptone, 0.21% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , 0.001% vitamin B_1 . The increased output of *Ganoderma lucidum* extracellular polysaccharide was 30.14% more than before.

Keywords: *Ganoderma lucidum*; ganoderan; response surface; liquid fermentation