

灵芝胞内三萜高产菌株的筛选及发酵条件的优化*

余素萍^{1,2} 张劲松^{2**} 杨焱² 贾薇² 潘迎捷^{1,2}

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)¹ (上海农科院食用菌研究所 上海 201106)²

摘要: 通过摇床培养实验, 从 22 个灵芝菌株中筛选出三萜高产菌株 GL31, 通过单因子和正交试验优化了该菌株生产胞内三萜的发酵条件, 包括碳源、氮源、无机盐, 初始 pH, 装液量, 接种量, 发酵时间等。同时研究了 GL31 发酵过程中生物量、胞内三萜含量及胞内三萜产量的变化曲线, 发现该菌株在摇床培养过程中第 84 h 时菌丝内三萜产量高达 $3.51 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$; 另外先摇床培养 84 h 后再静置培养 144 h 的菌丝三萜含量, 菌丝三萜产量分别比仅摇床培养 84 h 的菌丝三萜含量, 菌丝三萜产量提高了 48.6% 和 65%, 该结果说明静置培养的方式有利于提高菌丝总三萜的含量。且将两种发酵方式菌丝总三萜的最高产量比较, 发现先摇床后静置培养的菌丝总三萜最高产量高于仅摇床培养。

关键词: 灵芝, 发酵条件, 培养方式

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0057-05

Screening of *Ganoderma* Strain of High Yield Intracellular Triterpenes and Optimization of Its Fermentation Conditions

YU Su-Ping^{1,2} ZHANG Jing-Song^{2**} YANG Yan² JIA Wei² PAN Ying-Jie^{1,2}

(Microbiology Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)¹

(Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106)²

Abstract: According to the yield of intracellular triterpene, the strain GL31 was screened out from 22 strains of *Ganoderma* collected from various regions. The optimal fermentation conditions were studied by single factor experiments and orthogonal test. The optimal parameters of carbon source, nitrogen source, initial pH, the medium volume in the flask and cell density were obtained. In addition, the metabolic curves of intracellular triterpene and biomass were determined. It was found that the yield of intracellular triterpenes was up to $3.51 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$ medium at the 84th hour. In addition the strain was statically fermented 144 hours flowing 84hours shaking-flask culture, the IT (intracellular triterpenes) content was increased by 48.6% and the yield of IT was increased by 65% compared with those of the mycelia cultured 84hours using shaking-flask method. This indicated that static fermentation method is helpful for improving the total IT content. The result also show that the highest yield of intracellular triterpenes of mycelia statically fermented flowing 84hours shaking-flask culture is higher than that of mycelia using shaking flask culture method.

Key words: *Ganoderma*, Fermentation condition, Culture method

灵芝自古以来一直被用作“扶正固本”的中药, 大量的现代研究也表明灵芝含有多糖、三萜、糖蛋白、生物碱、核苷等生物活性成分。灵芝三萜是灵芝的主要活性成分之一, 其结构复杂, 现在研究发现其母核有 8 种, 再加上不同的取代基, 使灵芝中三萜的种类繁多、药理功能多样。2002 年罗俊等报道现已从灵芝中分离出三萜 122 种^[1], 其具有保肝^[2]、抗肿瘤^[3]、抗 HIV-I、HIV-II 病毒酶活性^[4]、抑制组胺释

* 上海市农委重点攻关项目 (No. 农科攻字 2002-1-4-3)

** 联系人 Tel: (021) 62201337, E-mail: syja16@saas.sh.cn.

收稿日期: 2004-04-05, 修回日期: 2004-06-29

放^[5]、抑制胆固醇合成^[6]等生物活性。因此灵芝三萜生产研究具有重要的意义,而发酵法生产灵芝三萜可以克服栽培生产中的生产条件不可控,质量不稳定,周期长且产量低等缺点。本研究结果为定向和大量的生产活性三萜奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

分别如下 G1: 余山灵芝; G2: 红芝; G5: 松杉灵芝; G6: 汉城 2 号; G7: 圆芝; G8: 泰山赤灵芝; G9: 南韩灵芝; G12: 大仙 823; G13: 灵芝 10; G14: 灵芝 BFW; G16: 灵芝 0771; G17: 灵芝 0772; G18: 灵芝 slope; G19: 日本灵芝; G21: 密纹灵芝; 2306: 6 号; 2308: 8 号; GL31: 南韩灵芝; GL32: 延吉日本灵芝; GL33: 金寨韩芝; 1020: 灵芝 7; G0081: 斯洛文尼亚灵芝。各菌株均为上海农科院食用所菌种保藏中心保藏。

1.2 培养基

1.2.1 母种培养基: PDA 培养基。

1.2.2 液体种培养基: 豆饼粉 20 g/L; 葡萄糖 25 g/L; MgSO_4 1.5 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; pH 自然。

1.2.3 筛选胞内三萜高产菌株的液体培养基: 豆饼粉 20 g/L; 葡萄糖 20 g/L; 可溶性淀粉 10 g/L; MgSO_4 1.5 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; pH 自然。

1.2.4 碳源筛选的基础培养基: 豆饼粉 20 g/L; 碳源 30 g/L; MgSO_4 1.5 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; pH 自然。

1.2.5 氮源筛选的基础培养基: 优选碳源 3 g/L; 氮源 2 g/L; MgSO_4 1.5 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; pH 自然。

1.3 方法

1.3.1 胞内三萜高产菌株的筛选: 菌株复壮后, 制备一级种子液, 然后按等湿重接种法即每个菌株均接 1 g 湿菌球到筛选高产菌株的培养基中 (装液量为 100 mL/250 mL 三角瓶, 3 个重复), 摇床培养 7 d, 3 次重复实验。测定菌丝的生物量^[7]。菌丝研磨后, 菌丝: 95% 乙醇比为 1: 50 (w/v), 超声波提取 3 h, 通过比色法测定胞内三萜含量^[8]。

1.3.2 培养基的优化: 制备二级种子液, 接种量均为 10%, 装液量同 1.3.1, pH 自然, 摇床培养 3 d, 测定生物量、胞内三萜含量及胞内三萜产量。

1.3.3 非营养因子的优化: 最适初始 pH、最适装液量、最适接种量及最适培养时间参数优化均用常规方法进行 (实验用的三角瓶均为 250 mL)。

1.3.4 培养方式的优化: GL31 在摇床培养一段时间 (以胞内三萜产量为指标 1.3.3 确定的最适培养时间) 后, 进行静置培养, 每隔 24 h 取样测定生物量、胞内三萜含量及胞内三萜产量。

2 结果与分析

2.1 胞内三萜高产菌株的筛选

胞内三萜筛选结果见图 1。图 1 表明, 菌株 GL31 在上述培养条件下, 菌丝三萜产量在 22 个菌株中最高, 因此下文对 GL31 进行发酵条件的优化。

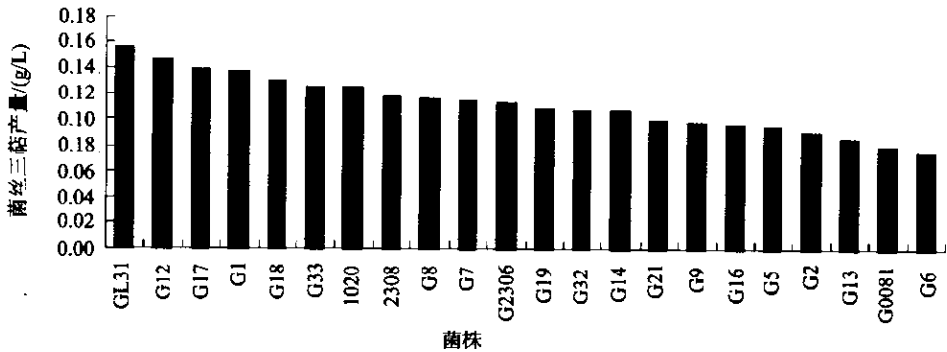


图 1 胞内三萜高产菌株的筛选

2.2 碳源筛选

碳源筛选结果见图 2。图 2 表明，以可溶性淀粉为碳源时菌丝三萜产量最高。

2.3 氮源筛选

氮源的筛选结果见图 3。图 3 表明，以豆饼粉为氮源时菌丝三萜产量最高。

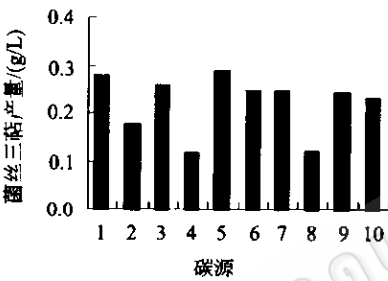


图 2 最适碳源的筛选

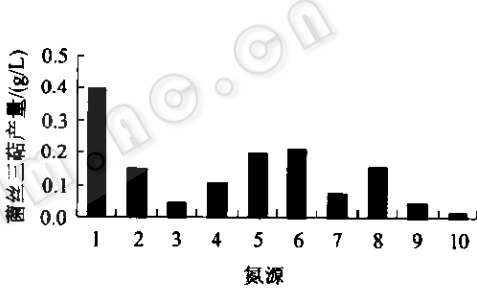


图 3 最适氮源的筛选

- 1 玉米粉, 2 蔗糖, 3 乳糖, 4 谷壳, 5 可溶性淀粉, 6 土豆淀粉, 7 葡萄糖, 8 米糠, 9 麦芽糖, 10 麸皮

- 1 豆饼粉, 2 牛肉膏, 3 NH_4Cl , 4 玉米粉, 5 蛋白胨, 6 麸皮, 7 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 酵母膏, 9 NH_4NO_3 , 10 尿素

2.4 培养基成分的正交实验

对培养基成分进行 $L_9(3)^4$ 实验，表 1 的结果表明，各因素对 GL31 胞内三萜产量影响顺序依次是豆饼粉，可溶性淀粉， MgSO_4 ， KH_2PO_4 ；最佳浓度组合为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_3\text{D}_1$ ，即最佳配方是 30 g/L 可溶性淀粉，30 g/L 豆饼粉，2.25 g/L MgSO_4 ，1.5 g/L KH_2PO_4 。
注：以下实验均用最佳配方的培养基进行实验。

表 1 GL31 正交实验设计与结果

实验号	因素 (g/L)			实验结果	
	A 淀粉	B 豆饼粉	C MgSO_4	D KH_2PO_4	菌丝三萜产量 (g)
1	1 (20)	1 (10)	1 (0.75)	1 (1.5)	0.0089
2	1 (20)	2 (20)	2 (1.5)	2 (3.0)	0.023
3	1 (20)	3 (30)	3 (2.25)	3 (4.5)	0.0293
4	2 (30)	1 (10)	2 (1.5)	3 (4.5)	0.0091
5	2 (30)	2 (20)	3 (2.25)	1 (1.5)	0.0278
6	2 (30)	3 (30)	1 (0.75)	2 (3.0)	0.0313
7	3 (40)	1 (10)	3 (2.25)	2 (3.0)	0.0087

续表 1

8	3 (40)	2 (20)	1 (0.75)	3 (4.5)	0.022
9	3 (40)	3 (30)	2 (1.5)	1 (1.5)	0.0271
K1 均值	0.0204	0.0089	0.0207	0.0213	
K2 均值	0.0227	0.0243	0.0197	0.021	
K3 均值	0.0193	0.0292	0.0219	0.0201	
R	0.0034	0.0203	0.0022	0.0012	

2.5 最适初始 pH 的筛选

GL31 在初始 pH 为自然 pH 时, 菌丝三萜产量最高。

2.6 最适装液量的筛选

GL31 在装液量为 80 mL 时, 菌丝三萜的产量最高。

2.7 最适接种量的筛选

GL31 在接种量为 20% 时, 菌丝三萜的产量最高。

2.8 最适培养时间的筛选

筛选结果见图 4。如图 4 所示, 胞内三萜含量前 84 h 随培养时间延长而提高, 第 84 h 高达 2.51%, 84 h 到 132 h 胞内三萜含量处于稳定期, 第 144 h 胞内三萜含量有所降低; 胞内三萜产量随时间的变化与胞内三萜含量相似, 在前 84 h 胞内三萜产量随培养时间延长而提高, 第 84 h 时产量为 $3.51 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$, 84 h 到 132 h 胞内三萜产量随生物量缓慢提高达 $4.15 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$ 仅比 84 h 时提高了 18%, 第 144 h 胞内三萜产量有所降低; 因此当以胞内三萜产量为指标时最适培养时间是 84 h。

2.9 培养方式的优化

GL31 摇床培养 84 h 后进行静置培养, 结果如图 5 所示, 当静置培养 144 h 后, 胞内三萜含量及产量达到了最高, 胞内三萜含量为 3.61%, 胞内三萜产量为 $4.91 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$, 分别比刚停止摇床培养 (摇床培养 84 h) 样品提高了 48.6%, 65%。因此静置培养有利于提高胞内总三萜产量; 另仅摇床培养方式的菌丝三萜最高产量 (摇床培养 132 h) 为 $4.15 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$, 而先摇床培养后静置培养方式的菌丝三萜最高产量 (先摇床培养 84 h 后静置培养 144 h) 为 $4.91 \times 10^{-2} \text{g}/100 \text{mL}$ 即先摇床后静置培养的培养方式更有利菌丝总三萜产量的提高。

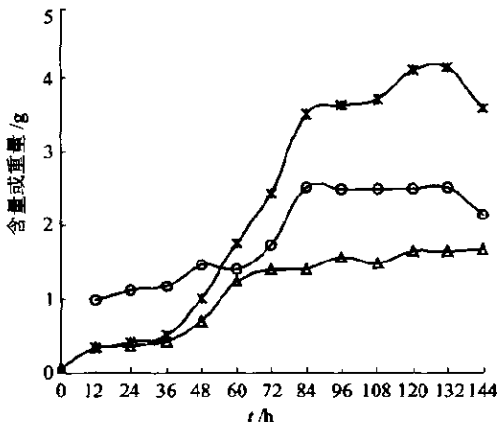


图 4 GL31 摇床培养代谢曲线

—○— 生物量 ($\text{g}/100\text{mL}$), —□— 菌丝三萜含量 $\times 100$, —▲— 胞内三萜产量 $\times 100$ ($\text{g}/100\text{mL}$)

注: 0 h 样品为摇床培养 84 h 的样品

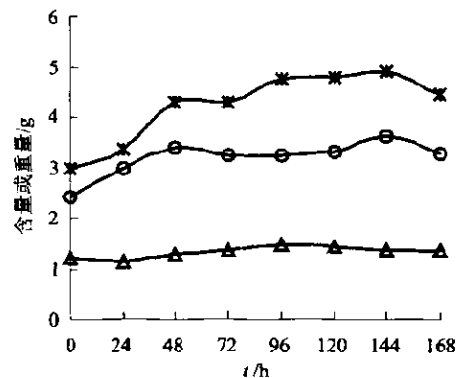


图 5 GL31 静置培养代谢曲线

3 结论

本文的优选菌株 GL31 名称为南韩灵芝, 是我国广泛栽培的商品菌株之一。该菌株在优化的发酵条件 (优化的营养因子为 30 g/L 豆饼粉, 30 g/L 淀粉, 2.25 g/L MgSO_4 , 1.5 g/L KH_2PO_4 ; 优化的非营养因子是 pH 为自然 pH, 装液量为 80 mL, 接种量为 20%, 培养时间为 84 h) 下培养, 获得菌丝三萜 3.51×10^{-2} g/100 mL。本研究发现静置培养有利于胞内三萜产量的提高, 且将两种方式发酵过程的菌丝总三萜最高产量进行比较, 发现先摇床后静置培养的菌丝总三萜最高产量高于仅摇床培养。菌株在摇床培养及静置培养时, 菌丝三萜的含量均在培养后期提高, 说明菌丝三萜是次级代谢产物非菌丝生长所必须, 然而菌丝三萜含量提高是否代表菌丝中有效活性三萜成分提高, 有待于进一步研究, 因为三萜种类多样, 并不是每一种三萜都有药理作用。作者将对各培养阶段的菌丝体进行三萜成分的提取, 通过高压液相分析及相关药理研究, 探索哪一发酵阶段菌丝体的三萜含量高且生物活性强, 进一步的实验正在进行。

参考文献

- [1] 罗俊, 林志彬. 药学报, 2002, 37 (7): 574 ~ 578.
- [2] 王明宇, 刘强, 车庆明, 等. 药学报, 2000, 35 (5): 326 ~ 329.
- [3] Toth J O, Luu Bang et Guy Ourisson. Tetrahedron Lett, 1983, 24 (10): 1081.
- [4] Min B S, Nakamura N, Miyashio H, et al. Chem Pharm Bull, 1998, 46 (10): 1607 ~ 1612.
- [5] Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33 (4): 1367 ~ 1374.
- [6] Komoda Y, Shmizu M, Sonoda Y, et al. Chem Pharm Bull, 1989, 37 (2): 531 ~ 533.
- [7] 贾薇, 张劲松, 周昌艳, 等. 菌物系统, 2002, 21 (4): 573 ~ 579.
- [8] 赵明文, 土晨光, 土南, 等. 中国食用菌, 2003, 22 (2): 43 ~ 46.