

云芝菌的深层培养

广东省微生物研究所 广州第一制药厂

云芝(*Polystictus versicolor*),又名杂色云芝、瓦菌、千层蘑。属担子菌纲,多孔菌目,多孔菌科,云芝属(见图1)。此菌在我国分布甚广,生于伐倒的阔叶树树干上,偶尔也生长在松木上^[1]。

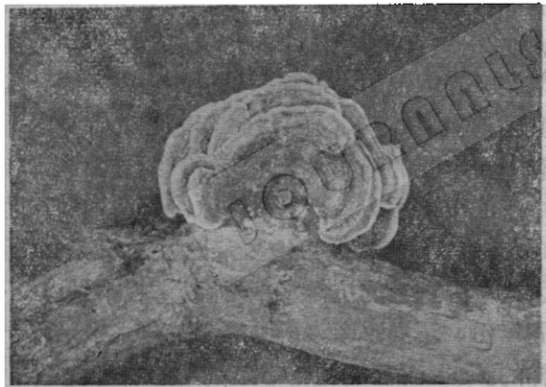


图1 云芝菌子实体

我国民间很早就利用云芝作为治疗肿瘤和

某些慢性疾病(如哮喘、肝炎)的药物。近年来日本报道,云芝多糖有增强机体免疫力和抑制肿瘤的作用^[2,3]。云芝菌野生资源虽多,但受季节限制,采集运输也困难。为了扩大药源,满足临床需要,我们研究了云芝菌的深层培养方法,将其菌丝和产物制成药品,经临床600多例试验,证实它对慢性支气管炎有较好疗效,有效率达85%,与野生云芝疗效相似。本文报道有关云芝菌深层培养的研究结果。

材料与amp;方法

一、菌种

1975年自广州野生云芝分离而得。5℃低温保存,每隔半年转管一次。

二、培养基

1. 斜面培养基(%): 马铃薯20,葡萄糖2,

KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.05, 维生素 B_1 0.001, 琼脂 2, pH 5.5—6.0。

2. 摇瓶培养基(%): 葡萄糖 3, 花生饼粉 1, 酵母粉 0.3, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.05, 自然 pH 约 5.5。

3. 种子罐培养基(%): 葡萄糖 2.5, 花生饼粉 0.8, 酵母粉 0.2, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.05, 消沫油 0.1—0.2, 自然 pH 约 5.5。

4. 发酵培养基(%): 葡萄糖 4, 花生饼粉 1, 酵母粉 0.3, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 消沫油 0.1—0.2, 自然 pH 约 5.5。

三、培养条件

1. 斜面菌种: 28—32℃ 培养 5—7 天, 菌丝长满后放 5℃ 冰箱保存, 使用前一天取出。

2. 摇瓶试验: 采用往复式摇床 (95 次/分, 冲程 8.5 厘米) 或旋转式摇床 (120 转/分, 偏心距 27 毫米)。500 毫升三角瓶装液量 100 毫升。30—31℃ 培养 7—8 天。

3. 深层通气培养: ① 摇瓶种子培养采用 1000 毫升血清瓶, 装液量 300 毫升, 30—33℃ 培养 5—7 天。② 种子罐的菌体培养, 采用 240 升发酵罐, 装液量 160—170 升, 搅拌转速 200 转/分, 通气量 1:0.4—0.6 (体积/体积/分), 罐压 0.4—0.5 公斤/厘米², 30—33℃ 培养 40—48 小时。③ 发酵罐培养采用 1800 升发酵罐, 装液量 1200—1300 升, 搅拌转速 170 转/分, 通气量 1:0.4—0.5 (体积/体积/分), 罐压 0.4—0.5 公斤/厘米², 30—33℃ 培养 42—48 小时。

四、测定方法

1. 菌丝量: 菌丝干重的测定 (克/100 毫升), 是用纱布过滤得菌丝, 置 -10℃ 左右冰冻析出水份, 再在 105℃ 烘干至恒重。菌丝湿重用离心分离法 (分离器转速 3500 转/分, 离心时间 30 分钟) 测定。

2. 酸碱度: 用精密 pH 试纸或 pHS-2 型酸度计测定。

3. 还原糖: 用碘量法测定。

结果与讨论

一、形态观察

(一) 菌丝

斜面培养的菌丝为白色。初生菌丝呈绒毛状平铺于培养基上, 随着培养时间的延长, 菌丝逐渐致密, 形成不规则的小瘤突起状菌蕾, 质韧, 气生菌丝旺盛, 沿试管壁生长。显微镜下观察, 菌丝无色透明, 有横隔, 分枝, 宽 2.4—3.1 微米, 少数达 4.8—6 微米 (见图 2)。液体深层培养的菌丝无色, 菌丝直径较一致, 多为 2.4—2.6 微米。两种方法培养的菌丝均形成明显的锁状联合。

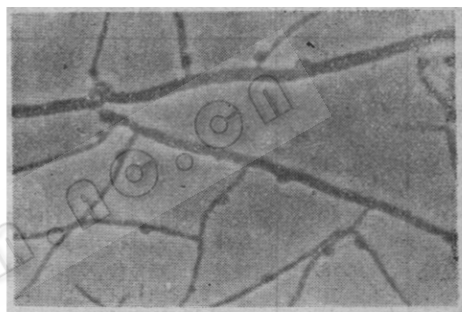


图 2 云芝菌丝

(二) 菌球

1. 摇瓶培养中, 在接种 24 小时后, 菌丝形成颗粒状菌丝体, 随后继续生长成菌球 (见图 3)。菌球形状为球形或近球形, 一般直径 2—4 毫米, 也有小至 1 毫米和大至 8 毫米的菌球。其中心微空, 表面近乎光滑。少数菌球具有短绒毛状或放射状的“毛刺”。

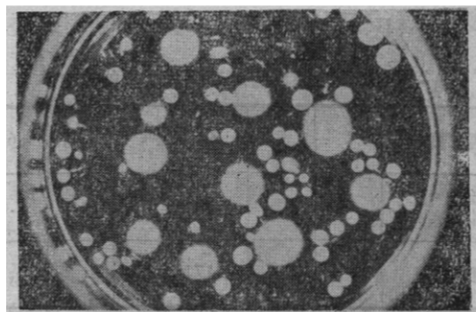


图 3 云芝菌球

2. 发酵罐培养, 生成的菌球较小, 直径约

0.1—0.2 毫米;当通气量大或搅拌速度快时,菌球多形成不定型菌丝体,菌球形成甚少。

(三) 菌液

当菌丝大量增长时,菌液由混浊开始逐渐变清,随着培养时间的延长,菌液越显透明。颜色由稻秆黄色变成硫黄色,最后为淡黄色。粘度也逐渐增加,但菌体自溶后则逐渐下降。

二、营养成分对菌丝生长的影响

(一) 碳源

1. 不同碳源对云芝菌生长的影响(见表 1):

表 1 不同碳源对云芝菌生长的影响*

碳源(3%)	菌丝干重(克/100毫升)	菌丝形态
葡萄糖	0.415	菌球多,毛刺短;絮状菌丝体较多。菌液清,淡黄色。
麦芽糖	0.368	菌球多,毛刺短;颗粒状,絮状菌丝体少。菌液清,黄色。
蔗糖	0.410	菌球多,毛刺短;颗粒状,絮状菌丝体多。菌液清,浅黄色。
乳糖	0.330	菌球多,毛刺甚短;颗粒状,絮状菌丝体少。菌液清,浅黄色。
可溶淀粉	0.587**	菌球甚少;颗粒状,絮状菌丝体很多。菌液浊,乳白色。
对照(不加碳源)	0.057	菌球,菌丝少而小。菌液黄色。

* 基础培养基(%): 蛋白胨 0.3; KH_2PO_4 0.1; MgSO_4 0.05; NaCl 0.2; FeSO_4 0.001; CoCl_2 0.0002; KCl 0.05; MnSO_4 0.0016; CaCO_3 0.05; 维生素 B_1 0.001; pH5.5。

** 菌球含淀粉微粒,增加了菌丝的干重。

表 1 说明:云芝菌对单糖、双糖和多糖均能利用。以葡萄糖为最好碳源。

2. 不同浓度的葡萄糖对云芝菌生长的影响(见表 2):

表 2 不同浓度葡萄糖对云芝菌生长的影响

葡萄糖浓度(%)	1	2	3	4	5	6
菌丝干重(克/100毫升)	0.505	0.81	1.03	1.11	1.13	1.19
残糖(%)	0.545	0.288	0.171	0.214	0.286	0.747

表 2 说明:从菌丝量增长和耗糖的关系,可以看出葡萄糖浓度以 3—4% 为宜。

为了降低成本,我们又以葡萄糖母液代替葡萄糖作为碳源进行试验。结果表明,葡萄糖母液可以代替葡萄糖,菌丝干重由 0.828 克/100 毫升上升到 0.978 克/100 毫升,产量提高了 18%。降低了成本。

(二) 氮源

1. 不同氮源对云芝菌生长的影响(见表 3):表 3 说明,氮源以蛋白胨最好,甘氨酸次之,硫酸铵更次之。对天门冬氨酸及硝酸钠的利用极差。

表 3 不同氮源对菌丝生长的影响*

氮源(0.3%)	菌丝干重(克/100毫升)	菌丝形态
蛋白胨	0.47	菌球多,具绒毛状短毛刺;颗粒状,絮状菌丝体多。菌液清,黄色。
甘氨酸	0.32	菌球多,具放射状长毛刺;颗粒状,菌丝体多。菌液清,浅黄色。
天门冬酸	0.12	菌球少而小;颗粒状,絮状菌丝体也少。菌液清,黄色。
硫酸铵	0.25	菌球多,具放射状毛刺;有颗粒状,絮状菌丝体。菌液稍混,浅黄色。
硝酸钠	0.098	菌球少而小,具羽毛状毛刺;颗粒状,絮状菌丝体少,菌液稍混,浅黄色。
对照(不加氮源)	0.112	菌球少而小。菌液混,浅黄色。

* 基础培养基:葡萄糖 3%;其他成分同碳源实验的培养基。pH5.5。

2. 为进一步降低成本,试验了不同含量的花生饼粉对云芝菌生长的影响(见表 4)。表 4 说明:花生饼粉含量以 1% 为宜。又以花生饼粉代替蛋白胨,结果菌丝生长良好,菌丝干重(0.6457 克/100 毫升)和用 0.2% 蛋白胨时的菌丝干重(0.6464 克/100 毫升)相当。

表 4 不同含量花生饼粉对云芝菌生长的影响

花生饼粉含量(%)	0	0.5	1	1.5
菌丝干重(克/100毫升)	0.02	0.7	0.98	1.08
残余花生饼粉	0	最少	较少	多

3. 不同含量酵母粉对云芝菌生长的影响(见表 5):表 5 表明:加入 0.3% 酵母粉菌球生长均匀,菌丝量最多。

综合上述摇瓶试验结果,较优的培养基为:

表 5 酵母粉含量对菌丝生长的影响

酵母粉含量(%)	0.2	0.3	0.4
菌丝干重(克/100毫升)	0.914	1.16	0.82

葡萄糖 4%；花生饼粉 1%；酵母粉 0.3%； KH_2PO_4 0.1%； $MgSO_4$ 0.05%； $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%；消沫油 0.1—0.2%；自然 pH。经发酵罐试验表明，该培养基适于云芝菌深层培养，菌丝生长良好，产量高，成本低。

三、培养条件对菌丝生长的影响

(一) 温度

在 2—41℃ 菌丝皆能生长，26—34℃ 较适合，30—34℃ 最适合(见图 4)。45℃ 菌丝死亡。-10℃ 保存 4 个月后，其生活力仍不丧失。

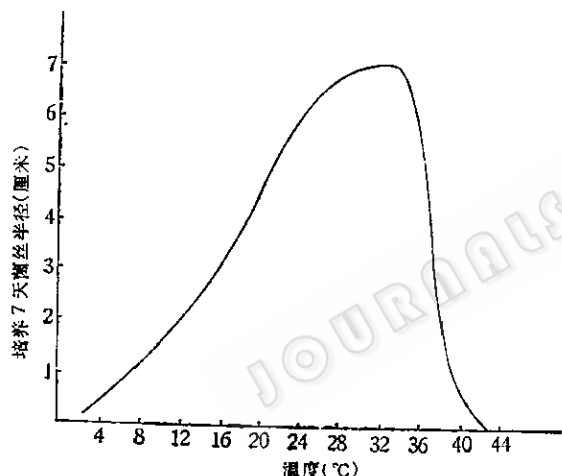


图 4 温度与菌丝生长的关系

(二) pH 值

pH 值在 4.0—5.6 菌丝生长良好，尤以 4.0—4.6 最好，降至 3.1 生长稍差，降至 2.3 不生长(见表 6)。

表 6 pH 值对菌丝生长的影响

pH 值	2.3	3.1	4.0	4.6	5.1	5.6
菌丝干重(克/100毫升)	0	0.9	1.21	1.15	1.03	1.01

(三) 种龄和接种量

摇瓶种子接入种子罐，以 5—6 天种龄为宜。

这时菌丝生长旺盛，球状和颗粒状菌体多，且生活力强。接种量 0.25—0.3%。

种子罐菌种接入发酵罐，种龄以约 2 天的为宜。接种量 13—15%。

摇瓶种子如不立即使用，可置 5℃ 低温保存。低温贮存对菌丝生长的影响见表 7。

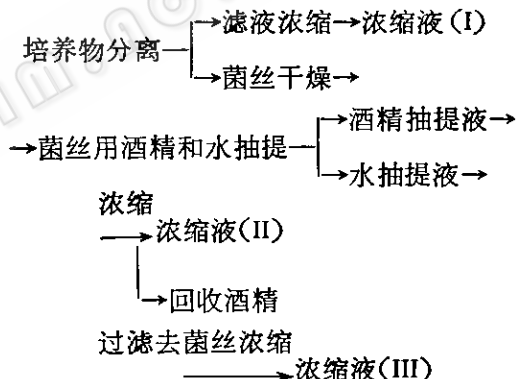
表 7 低温贮存对菌丝生长的影响

贮存温度和时间	不同培养天数的菌丝干重(克/100 毫升)			
	1	2	3	5
立即使用	见新菌丝体	0.18	0.332	0.376
5℃ 贮存 7 天半	同上	0.268	0.388	0.64
5℃ 贮存 15 天	同上	0.32	0.524	0.58

四、1800 升发酵罐培养试验

(一) 工艺流程

试管斜面培养→摇瓶种子培养→种子罐培养→发酵罐培养



合并 I, II, III 浓缩液并继续浓缩，得浓缩液水剂。浓缩至膏状时将其干燥，制成片剂。

(二) 深层通气培养

摇瓶种子培养：接种后 1—2 天，菌球开始生长。培养 5—7 天，菌球密度约占培养液 50%，菌液由浊变清，浅黄色，无杂菌，即可接入种子罐或置 5℃ 冰箱保存备用。

种子罐培养：接种后约一天，菌球已生长，pH 下降。培养至 40—48 小时，菌丝生长旺盛，发酵液变清，浅黄色，果香味浓郁，菌丝湿重达 20% 以上。镜检无杂菌，菌丝粗壮，着色深，锁状联合多。这时可压入发酵罐内培养。

发酵罐培养：接种后 8 小时，菌球开始生

长。16 小时以后,菌球大量生长,pH 下降,发酵液变清,浅黄色,果香味浓郁。镜检菌丝粗壮,着色深,锁状联合多。培养至 42—48 小时,发酵液中布满菌球和菌丝,湿重达 30% 以上,果香味从浓变淡,pH 降至 4.0 以下,还原糖低于 1%,镜检无杂菌,多数菌丝体较前细长、着色浅,空泡多,锁状联合不明显或消失。这时即可停止培养。

(三) 后处理

用板框压滤机或离心机将菌丝体和菌液分离,滤液减压浓缩至原液的 1/10。菌丝体在 70—80℃ 烘干,经酒精和水抽提后,将提取液与浓缩液合并,制成糖衣片或水剂,供临床应用。

参 考 文 献

- [1] 邓叔群: 中国的真菌, 487 页, 科学出版社, 1963。
- [2] 杉浦卫: 公开特许公报: 昭 49—35588。
- [3] 杉浦卫: 公开特许公报: 昭 49—48896。