



灵芝真菌的液体深层发酵技术

作者: 钜晓艳 张日俊

期号: 2005年第8期

灵芝及灵芝生物活性物质因其独特的理化特性和神奇的生物学功能而成为新型绿色饲料添加剂领域的研究热点。然而,人工栽培灵芝的生长周期长(大于2~3个月),受环境影响大,产量低、品质不稳定,生产成本低,极大地影响了灵芝及其生物活性物质在饲料业中的发展。因此,近年来人们转向灵芝菌液体深层发酵培养的研究,获得灵芝菌丝体及其活性生长代谢产物(灵芝酸、灵芝多糖等),并通过发酵条件的控制,缩短生产周期,降低生产成本,使灵芝及其生物活性物质饲料添加剂在畜牧业中应用和推广成为可能。本文就灵芝菌液体深层发酵的培养条件和工艺参数的控制做一综述。

灵芝真菌液体深层发酵培养的基本过程是:生产菌种→孢子制备→种子制备→发酵→发酵产物(提取、精制)→产品。在液体深层发酵生产的过程中,影响生产周期、生产水平和生产成本高低的最主要因素有3个:生产菌种、培养基成分和发酵工艺参数。下面分别进行叙述。

1 生产菌种的选育

在液体发酵生产的过程中,生产菌种的特性是决定生产周期和生产水平的最重要因素。从自然界分离出的灵芝菌,依靠自身代谢调节系统,趋向于平衡生长和繁殖,生长速度慢,生产能力低,不能满足饲料工业规模化生产的需要。为此,采用种种方法来打破灵芝菌的正常代谢,使之失去自我保守性的调节控制,不仅快速生长而且大量积累我们所需要的目标代谢产物(如灵芝多糖、灵芝酸等)。为达到此目的,主要措施就是进行灵芝菌菌种选育工作。

目前,对灵芝菌的菌种选育方法主要有孢子紫外诱变,原生质体紫外诱变,原生质体融合(王淑珍等,2003)等,不同方法各有所长,效果均很明显(见表1)。

2 培养基的优化

表1 灵芝菌的选育方法及结果

方法	结果(与原菌株相比)	作者
灵芝孢子单—紫外线诱变 60s,筛选	诱变菌株性能稳定,菌体干重和粗多糖含量较高	罗立新等(1998)
灵芝孢子 ¹³⁷ CO-γ射线与紫外线交替累积诱变,筛选	菌丝生长速度与菌丝累积量大大提高,与原菌株差异显著	王淑珍等(2003)
灵芝原生质体单—紫外诱变,筛选	诱变菌株菌丝体生长快,产量高,总多糖含量也比原菌株高	张吉福等(2003)
灵芝原生质体单—紫外诱变处理 25s,筛选	诱变菌株的稳定性、菌粉得率、多糖含量均明显优于原菌株	李刚等(2001)
灵芝原生质体单—紫外诱变,筛选	诱变株生物量和晒含量分别高出 9.4%、14.3%	刘士旺等(2003)
中、韩不同灵芝的原生质体 PEC 融合,再生培养,筛选	融合菌株菌丝体含量虽不很高,但粗多糖含量明显高于亲本菌株	曹士苓等(1998)

灵芝菌属于丝状真菌,在液体深层发酵中适宜的发酵基质(培养基)可加速菌丝体生长,缩短发酵周期,因此筛选适宜培养基对液体深层发酵至关重要。

2.1 碳源种类

适合灵芝菌深层发酵的碳源范围较广,但由于其对各种碳源的利用能力不同,因而会影响到菌丝体的生长,产物的形成,甚至产物的化学组成。李平作(1998)试验表明,成分较复杂及富含纤维素、半纤维素的复合碳源如玉米粉、酒糟,有利于菌丝体的生长及其生物活性物质的分泌;原因可能有两个,一是复合碳源中含有其它营养成分(各种维生素等),二是其中的纤维素作为菌丝体胞外多糖合成的前体诱导物而促使胞外多糖的大量合成。白芳静(2000)试验表明,以玉米粉作为碳源进行灵芝深层发酵,其生物量、粗多糖及粗灵芝酸含量均较高,效果好于单一碳源如葡萄糖、蔗糖等。白芳静(2001)还研究了营养因子对灵芝酸深层发酵的影响,结果表明酒糟等有利于灵芝活性物质(灵芝酸)的形成。宋频然(2003)研究表明,复合碳源玉米粉有利于灵芝菌深层发酵和生物活性物质(灵芝多糖)的形成。

2.2 氮源种类

氮源是灵芝菌体细胞合成蛋白质、核酸及代谢产物必不可少的原料。灵芝菌不能充分利用无机氮合成某些必需氨基酸,因此其生长发育主要需要有机氮,同时,氮源的不同影响菌丝体形态,从而影响其生物活性物质灵芝多糖、灵芝酸等的形成。刘冬(2001)研究表明,以有机氮源如:酵母膏、蛋白胨、豆饼粉、花生饼粉进行灵芝液体深层发酵时,菌体生物量明显高于无机氮源如:硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵,可见灵芝菌丝体对有机氮源的利用能力要优于无机氮源。另一方面,复合有机氮源发酵效果好于单一有机氮源。Qing-Hua Fang (2001)用酵母浸粉和蛋白胨作为氮源进行试验,结果表明,当碳源不变,以两者之一为氮源时,菌丝体生长情况并不理想,把两者混合作为复合氮源进行发酵培养时,菌丝体生长情况较好,并且当添加量分别为5g/l时,灵芝多糖和灵芝酸产量同时达到最高。

2.3 碳源和氮源浓度及碳氮比(C/N)

碳源和氮源浓度,影响基质进入细胞后的代谢流向,进而影响代谢产物之间的比例。研究显示,较高的碳氮比,有利于灵芝菌丝体生长及胞外多糖形成。在碳氮比确定时,碳源浓度太高影响灵芝菌发酵周期,且高浓度碳源对其菌体生长有抑制作用;氮源浓度对发酵周期影响不大,但影响灵芝多糖及灵芝酸的产量。王铮(2004)以葡萄糖和蛋白胨作为碳源氮源进行试验,结果显示,当碳氮比为50:1时,菌丝球直径最小,胞外多糖产量最高。李平作(1998)试验表明,较高的C/N有利于灵芝生物活性物质(灵芝多糖)的形成。白芳静(2000)试验表明,氮源浓度太高,灵芝菌体生物量提高,胞外多糖产率下降;碳源浓度太高,延滞期滞后时间较长,灵芝酸产率较高,多糖产率仍下降,适宜的碳源浓度应为20~40kg/m³。因此,只有两者都在适宜浓度下,菌体才能兼顾生长和生物活性物质的形成。

2.4 维生素和无机盐

维生素B族尤其维生素B1(硫胺素),是灵芝菌代谢过程中辅羧酶的重要组成部分,是其菌丝体生长中的必需维生素。在培养基中添加少量维生素B1是有益的,缺少维生素B1时灵芝菌生长迟缓,严重缺乏时则停止生长。在无机盐方面,C1⁻,Ca²⁺,Fe²⁺,Zn²⁺,Mn²⁺对菌丝体生长几乎无影响,原因可能是培养基中含有一定量的离子,能够满足菌体生长的需要。刘冬等(2001)试验证明,缺乏VB1,VB2对菌丝体生长有较大影响;此外,培养基中缺乏Mg²⁺,P⁵⁺对菌丝体生长有较大的影响,而缺乏K⁺时,菌丝体几乎不生长。

3 发酵参数的控制

有了优良的灵芝菌种和适宜的培养基之后,还需要有最佳的环境条件即发酵参数加以配合,才能使其生产能力充分发挥

相关文章

- RNA 干扰的实验方法及应用
- 鸡肝脏组织中防御素基因片段...
- 原生质体融合技术在饲料开发...
- 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴...
- 白腐真菌和黑曲霉对甘蔗渣降...
- 利用产阮假丝酵母转化无机硒...
- 传统技术与现代分子生物学技...
- 硅藻土共固定化淀粉酶和糖化...
- 利用双外流连续培养系统研究...
- 饲用酶制剂中木聚糖酶嗜学性...
- 再生红球藻规模化培养工艺的...
- 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条...

合作伙伴



出来。因此必须研究灵芝菌的最佳发酵参数如：培养温度、pH条件、对氧的需求等，使灵芝菌处于最佳的生长及产物合成状态，才能取得优质高产的效果。

3.1 温度、pH值

温度是影响灵芝菌丝体生长繁殖的重要因素之一，主要表现在对菌丝体生长、产物形成、发酵液的物理性质和生物合成等方面。温度上升，菌体生长繁殖加快，但随着温度的上升，酶失活的速度也加快，菌体提前衰老，对灵芝的发酵生产极为不利。发酵液pH值的变化，与发酵关系密切。Qing-Hua Fang (2002) 研究了灵芝菌液体发酵的不同初始pH与灵芝菌生物量及其生物活性物质产量的关系，得知，在初始pH为6.5时，菌丝体产量和灵芝酸最高；随着pH的下降，灵芝多糖产量上升。Hwanyoung Lee (2003) 用响应面法拟合pH值和温度的关系，建立模型，当pH为4.2，温度为28.3℃时，灵芝菌丝体产量最高，并在试验中进行了验证。

3.2 接种量

生长旺盛的菌体是其生物活性物质产生的基础，接种量的大小关系到菌体的生长、形态进而影响其生物活性物质的产生。接种量过低，对菌体生物量及其活性物质的生产菌不利；接种量过高，菌体代谢产生的抑制产物较多，反而不利于生物活性物质的生产，因此要想两者兼顾，就必须有适宜的接种量。熊晓辉 (1994) 试验表明，当接种量小于10%时，湿菌体含量随接种量增加而增加，因此，最小接种量应为10%。Qing-Hua Fang (2002) 研究得知，当接种量在70~670mg DW/l之间时，接种量上升，菌丝球直径下降，灵芝多糖产量上升，接种量下降，菌丝球直径上升，灵芝酸产量上升；其中接种量为330mg DW/l时，菌丝体生物量最高达15.7g/l。

3.3 溶氧、振荡频率及搅拌速度

灵芝菌是好氧真菌，供养不足会抑制其生长代谢。种子摇瓶培养时的振荡频率和大罐发酵时的搅拌速度和溶氧关系密切。在液体深层发酵中，通入空气并加以搅拌，使培养液不断翻滚，长出的菌丝卷成菌丝团。搅拌速度过低，菌丝团较大，供氧不足，菌丝生长停滞，其生物活性物质积累下降；搅拌频率过高，菌丝体正常生长被破坏，也不利于其生长及其生物活性物质的生产。因此适宜的搅拌速度和溶氧显得十分重要。冯小黎 (1995) 研究表明，当摇瓶振荡频率为150r/min时，菌体生物量最高。Ya-Jie Tang (2003) 研究得知，当氧分压 (DOT) 只占发酵液饱和空气的10%时，菌丝体生长受阻；当DOT为25%时，灵芝生物活性物质总产量比DOT为10%时高；且氧传质系数 (KLa) 越高，菌丝球直径越大，灵芝酸产量越高。

灵芝真菌的生长是孢子→菌丝体→子实体的过程。一直以来，由于灵芝人工栽培生长周期过长，且灵芝子实体生物活性物质提取工序复杂，成本过高，难以满足大规模工业生产的需要，进而限制了其在畜牧业中的应用。另一方面，研究发现，同株灵芝菌其菌丝体生物学活性物质和子实体生物学活性物质的组成、比例、性质及活性相似但产量更高。因此，现在可采用液体深层发酵方法直接培养灵芝菌丝体，其产品直接用于饲喂畜禽，或进一步提取生物活性物质加工成精制的饲料添加剂。与前者相比，液体深层发酵法只将灵芝真菌培养到菌丝体阶段，其生产周期大大缩短，生产效率提高，成本大大降低，促进了灵芝及其生物活性物质在饲料业中的发展及应用。

参考文献

- 1 罗立新, 周少奇等. 灵芝菌诱变育种与深层培养的研究[J]. 工业微生物, 1998, 28 (3) : 10~14
- 2 王淑珍, 白晨. 灵芝孢子诱变与菌丝高长速菌株选育[J]. 中国食用菌, 2000, 19 (6) : 6~9
- 3 张吉福, 蔡同一等. 灵芝原生质体再生和诱变菌株的培养特性及多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21 (1) : 12~13
- 4 李刚, 杨凡等. 原生质体紫外诱变选育灵芝新菌种的研究[J]. 微生物学报, 2001, 41 (2) : 229~233
- 5 刘士旺, 郭泽建等. 灵芝原生质体诱变筛选高生物量菌株[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学班), 2003, 29 (1) 44~48
- 6 曹文琴, 郭顺星等. 灵芝原生质体制备、再生及融合的研究[J]. 菌物系统, 1998, 17 (1) : 51~56
- 7 曹文琴, 郭顺星等. 灵芝原生质体融合子多糖成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23 (7) : 396~397
- 8 王淑珍, 白晨等. 灵芝与糙皮侧耳原生质体融合子基因组RAPD分析[J]. 食用菌学报, 2003, 10(1):1~5
- 9 李平作, 徐柔等. 灵芝胞外多糖深层发酵培养基的优化[J]. 无锡轻工业大学学报, 1998, 17 (4) : 26~30
- 10 白芳静, 章克昌. 利用酒糟深层发酵生产灵芝酸的培养基的优化[J]. 酿酒, 2001, 28 (4) : 66~68
- 11 宋频然, 常继东. 灵芝胞外多糖高产菌株筛选及其深层发酵培养基的优化[J]. 食用菌学报, 2003, 10 (2) : 9~16
- 12 刘冬, 李世敏等. 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) : 16~17
- 13 方庆华, 钟建江. 灵芝真菌发酵生产灵芝多糖和灵芝酸[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27 (3) : 254~257
- 14 吴金男, 郁达等. 灵芝胞外多糖液体发酵培养基的优化[J]. 山西师范大学学报 (自然科学版), 2001, 15 (4) : 59~63
- 15 熊晓辉, 沈昌等. 大豆蛋白为原料的灵芝深层发酵工艺研究[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17 (3) : 111~115
- 16 冯小黎, 高文英等. 灵芝菌液体深层培养的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16 (5) : 210~213
- 17 Hwanyoung Lee, Minkyung Song, et. al. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of Ganoderma lucidum. Process Biochemistry, 2003, (38):1 685~1 693
- 18 Qing-Hua Fang, Jian-Jiang Zong. Submerged fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. Biochemical Engineering Journal, 2002, (10):61~65
- 19 Qing-Hua Fang, Jian-Jiang Zong. Effect of initial PH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of Ganoderma lucidum. Process Biochemistry, 2002, (37):769~774
- 20 Qing-Hua Fang, Jian-Jiang Zong. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of Ganoderma lucidum. Process Biochemistry, 2002, (37): 1 375~1 379
- 21 Ya-Jie Tang, Jian-Jiang Zhong. Role of oxygen supply in submerged fermentation of Ganoderma lucidum for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. Enzyme and Microbial Technology, 2003, (32):478~484

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽 ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址:沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编:110036 投稿:E-mail:tg@feedindustry.com.cn 广告:E-mail:ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部:(024)86391926(传真) 编辑二部:(024)86391925(传真) 网络部、发行部:(024)86391237 总编室:(024)86391923(传真)