

碳氮源对灵芝液体发酵胞外糖肽产量的影响

袁保京 张日俊*

(中国农业大学 动物科学技术学院/动物营养学国家重点实验室/饲料生物技术实验室,北京 100193)

摘要 为寻找适合灵芝胞外糖肽(EPSP)液体深层发酵工艺商业化生产经济高效的培养基原料,在摇瓶水平上比较研究了不同类型的碳源和氮源(各6种)对灵芝胞外糖肽(EPSP)产量的影响。试验表明:玉米粉是最适合灵芝 EPSP 生产((2.664 ± 0.801) g/L)和菌丝生长((4.559 ± 0.150) g/L)的碳源;尿素是最适合灵芝 EPSP 生产((0.636 ± 0.040) g/L)的氮源,豆粕粉则是最适合灵芝菌丝生长的氮源((2.222 ± 0.256) g/L);玉米粉与豆粕粉组合是最适合灵芝 EPSP 生产((4.366 ± 0.434) g/L)的碳氮源组合。本研究结果可为灵芝 EPSP 液体深层发酵工艺的工业化生产提供科学指导。

关键词 灵芝; 胞外糖肽; 碳源; 氮源; 液体深层发酵

中图分类号 Q 949.329.7

文章编号 1007-4333(2012)01-0119-06

文献标志码 A

Effect of carbon and nitrogen source on exopolysaccharide peptides production of *Ganoderma lucidum* in submerged culture

YUAN Bao-jing, ZHANG Ri-jun*

(State Key Laboratory of Animal Nutrition/Laboratory of Feed Biotechnology/College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The purpose of this study is to discover high efficient and economical raw materials for commercial production of *G. lucidum* exopolysaccharide peptides (EPSP) in submerged culture. Twelve different sources (six carbon and six nitrogen sources) were used individually in 250 mL shake flask. The optimal carbon source was cornmeal for both EPSP production ((2.664 ± 0.801) g/L) and cell growth ((4.559 ± 0.150) g/L), the best nitrogen source was urea for EPSP production ((0.636 ± 0.040) g/L), and the most favorable nitrogen source was soybean powder for cell growth ((2.222 ± 0.256) g/L). Subsequently, the most advantageous combination in EPSP yield was cornmeal + soybean powder, which resulted in up to (4.366 ± 0.434) g/L. The result of this study would be beneficial to industrial production of EPSP from *G. lucidum*.

Key words *Ganoderma lucidum*; exopolysaccharide peptides; carbon source; nitrogen source; submerged culture

灵芝(*Ganoderma lucidum*)自古以来就是我国名贵药用真菌,2 000 多年前的周朝古籍《列子》一书中就有记载,秦汉时期的药学著作《神农本草经》已把灵芝列为上品,明代李时珍在《本草纲目》中对灵芝药性和功效作了详细的记述。几百年来,在远东地区,尤其中国、日本(称为“reishi”)和韩国,一直

将灵芝用于扶正固本、促进健康、延年益寿、防治疾病。现代药理学与临床实践进一步证实灵芝多糖是其主要有效成分之一,它具有免疫调控^[1]、抗癌^[2]、抗病毒^[3]、抗衰老^[4]及降血脂血糖^[5]等多种药理活性,其中含有蛋白成分的糖肽的药理活性更强^[6-7]。

目前,灵芝产品的生产主要是通过人工栽培获

收稿日期: 2011-08-03

基金项目: 动物营养学国家重点实验室资助项目(2004DA1251840810)

第一作者: 袁保京,博士研究生,E-mail: scienceybj@yahoo.com.cn

通讯作者: 张日俊,教授,博士,主要从事饲料生物技术研究,E-mail: feedbiotech@yahoo.com

取,而人工栽培生产灵芝子实体的生产周期长、产量低,且质量很难控制,因此,通过液体深层发酵生产灵芝菌丝体及其活性成分的方法引起了广泛的关注^[8-9]。近年来,国内外学者对通过液体培养灵芝获取有效成分进行了大量的研究^[10-12],尤其是通过液体培养获取灵芝胞外糖肽,可以简化生产工艺,提高生产效率,降低生产成本,已逐渐成为研究的热点之一。但由于目前的研究多采用合成或半合成培养基,成本很高,难以进行商业化大规模生产,虽然一般认为复合碳氮源更有利于灵芝菌及其代谢产物的生产,但尚缺乏大量的平行性对比研究资料^[13]。

灵芝菌新品种 CAU5501(专利号:200510066114.7,现保存于中国普通微生物保藏管理中心)是本实验室通过原生质体融合与紫外诱导选育的高产灵芝糖肽菌株^[14],本课题组已经对 CAU5501 的液体深层发酵培养基进行了优化(待发表)。本试验通过对包括农副产品在内的多种碳氮源的对比研究,寻找既有利于灵芝菌 CAU5501 胞外糖肽合成,又价格低

廉的培养基原料,旨在为灵芝胞外糖肽(EPSP)的工业化生产提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1)菌种。CAU5501 母种,本实验室诱变筛选。

2)培养基。母种培养基(PDA):马铃薯 200 g 去皮切片,加入适量沸水煮沸 30 min 后过滤取汁,葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, VB_1 30~50 mg,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L。

液体种子培养基:葡萄糖 40 g,蛋白胨 2 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, VB_1 30~50 mg,蒸馏水 1 L。

基础培养基:同液体种子培养基。

发酵培养基:进行碳源研究试验时,以 40 g/L 待测碳源替代基础培养基中的葡萄糖;进行氮源研究试验时,以待测氮源替代基础培养基中的蛋白胨(表 1)。

表 1 氮源种类对灵芝 CAU5501 胞外糖肽合成影响的试验设计*

Table 1 Experimental design for the effect of nitrogen source on the exopolysaccharide peptides production of *Ganoderma lucidum* CAU5501

氮源种类	氯化铵(AC)	尿素(Ur)	大豆蛋白胨(SP)	酵母提取物(YE)	豆粕粉(SPD)	大豆分离蛋白(ISP)
$\omega(\text{氮})/\%$	26.0	46.0	8.0	9.0	7.7	11.4
添加量/(g/L)	0.61	0.35	2.00	1.78	2.08	1.40

注:*培养基中除氮源外的其他成分用量不变。

1.2 方法

1)菌种活化。取 4 °C 保藏的母种接种于斜面培养基,置于霉菌培养箱中,培养好后用特制刀具切下面积为 5 mm×5 mm 的菌块接种于液体培养基,置于转速为 150 r/min,温度为 28 °C 的恒温摇瓶柜中培养 5 d。

2)发酵液的制备。种子液用匀浆机处理后,以 5% 的接种量接入液体发酵培养基,摇瓶发酵 4 d 后进行试验指标测定。

3)碳源试验。以基础培养基为对照,试验组分别用蔗糖、麦芽糖、乳糖、玉米粉和玉米芯粉为碳源替代基础培养基中的葡萄糖,其他成分含量不变。每个处理 3 个重复,置恒温摇瓶柜中连续培养 4 d。培养条件基本同种子液制备。

4)氮源试验。以基础培养基为对照,试验组分

别用氯化铵、尿素、酵母提取物、去皮豆粕(SBM)和大豆分离蛋白(ISP)为氮源替代基础培养中的蛋白胨,其他成分含量不变。每个处理 3 个重复。培养条件同发酵液的制备。

5)碳氮源组合试验。在上述试验的基础上,将筛选出来的碳源和氮源进行组合,寻找最佳碳氮源组合。除碳氮源外,其他同基础培养基,培养条件同发酵液的制备。

6)菌体生物量测定。取摇瓶培养 4 d 的发酵液,用 4 层纱布过滤,过滤所得菌丝球用自来水流水冲洗 2 min,然后挤出水分,置于恒温干燥箱中 70 °C 干燥至恒质量,以电子天平称菌丝干质量。菌丝生物量以每升发酵液中收集的菌丝干质量(g/L)表示。

7)灵芝胞外糖肽测定方法——苯酚-硫酸法。取上述经过纱布过滤的发酵液,于 6 000 r/min 下

离心 15 min, 得上清液按照乙醇: 发酵滤液体积比为 4:1 的比例添加工业乙醇($\geq 95\%$, 体积分数), 混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 24 h, 于 $8\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 下离心 20 min 得沉淀(EPSP), 用苯酚-硫酸法测定其浓度^[15]。

1.3 统计分析

试验数据用 SPSS 16.0 软件包进行方差分析和差异显著性比较。数据表示为平均数 \pm 标准差, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

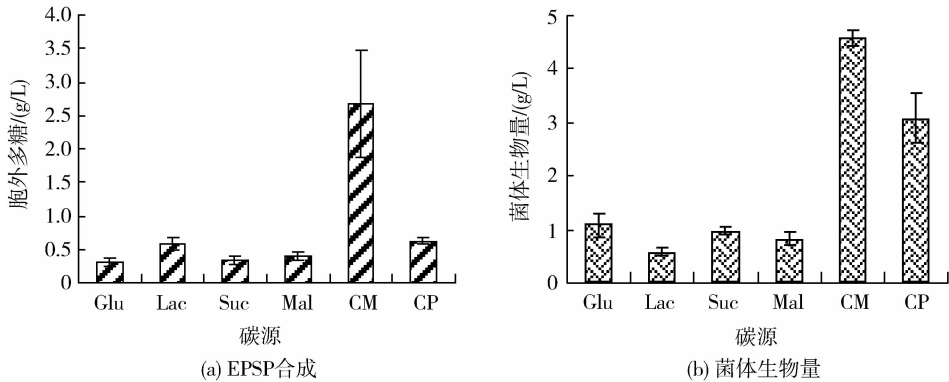
2 结果与分析

2.1 不同碳源对灵芝菌 CAU5501 生物量和 EPSP 产量的影响

碳源是微生物生长所必需的重要营养物质, 具有生物合成的底物和能源的双重作用。图 1(a) 中可见, 本试验选用的复合碳源较单一碳源更有利于 EPSP 的合成, 尤其是玉米粉, EPSP 达到 $(2.664 \pm$

$0.801)\ \text{g}/\text{L}$, 是葡萄糖的 8.734 倍, 乳糖的 4.562 倍 ($P < 0.01$)。单一碳源对 EPSP 产量的作用虽差异不显著但却表现如下趋势: 乳糖 $((0.584 \pm 0.100)\ \text{g}/\text{L}) >$ 麦芽糖 $((0.408 \pm 0.068)\ \text{g}/\text{L}) >$ 蔗糖 $((0.326 \pm 0.061)\ \text{g}/\text{L}) >$ 葡萄糖 $((0.305 \pm 0.054)\ \text{g}/\text{L})$ 。这与 Chang 等^[8] 的报道基本一致, 乳糖较葡萄糖更有利于赤芝 CCRC 36124 多糖合成。但有报道显示^[16], 葡萄糖最有利于树舌灵芝的多糖合成, 其次是蔗糖, 产生这种差异的原因可能与研究中所用菌种不同有关。

图 1(b) 显示, 与对 EPSP 的作用相反, 单糖中葡萄糖最有利于菌丝生长, 生物量达到 $(1.059 \pm 0.220)\ \text{g}/\text{L}$, 依次是蔗糖、麦芽糖和乳糖。不过, 相比之下, 复合碳源对灵芝 CAU5501 菌丝体生长更有利。玉米芯粉和玉米粉组灵芝菌体生物量分别是 $(3.055 \pm 0.468)\ \text{g}/\text{L}$ 和 $(4.559 \pm 0.150)\ \text{g}/\text{L}$, 与葡萄糖相比差异极显著 ($P < 0.01$)。



Glu 为葡萄糖; Lac 为乳糖; Suc 为蔗糖; Mal 为麦芽糖; CM 为玉米粉; CP 为玉米芯粉。

图 1 碳源对灵芝 CAU5501 的菌丝生长与 EPSP 合成的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on mycelial growth and EPSP production *G. lucidum* CAU5501

复合碳源(玉米粉和玉米芯粉)较单一碳源更有利于灵芝菌丝生长和代谢产物的合成, 其原因可能是: 1)除了碳水化合物, 复合碳源可能还含有与灵芝细胞生长和代谢有关的必需氨基酸等营养成分^[13]; 2)复合碳源不会立刻释放大量的葡萄糖, 因而可以避免高浓度的葡萄糖等单糖碳源所造成的分解代谢物阻抑现象^[17]; 3)可以避免高浓度单糖产生的高渗透压造成的不利影响。

上述试验显示, 玉米粉既有利于灵芝 CAU5501 菌丝生长又有利于 EPSP 合成, 因而作为后面碳氮

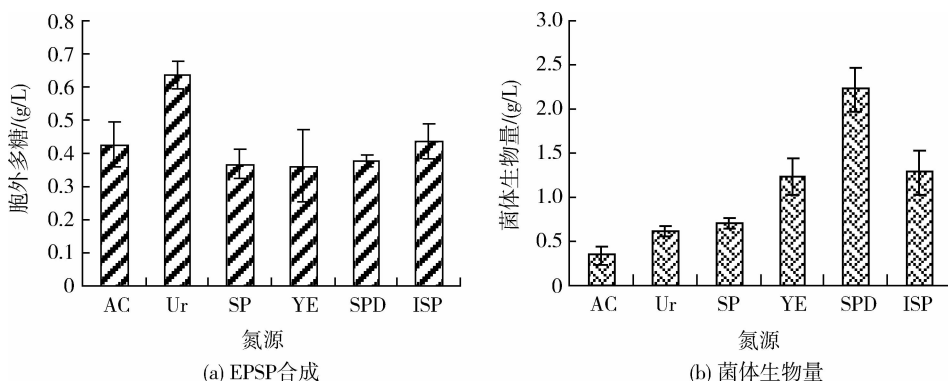
源组合试验的备选碳源。

2.2 不同氮源对 CAU5501 生长及 EPSP 代谢的影响

复合氮源并不比单一氮源更有利于 EPSP 的合成(图 2(a))。在所有检测的氮源中, 最有利于 EPSP 合成的是单一氮源尿素, EPSP 产量是 $(0.636 \pm 0.040)\ \text{g}/\text{L}$, 与其他各组相比, 差异显著 ($P < 0.01$); 其次是大豆分离蛋白, $(0.435 \pm 0.051)\ \text{g}/\text{L}$, 再次是氯化铵, $(0.426 \pm 0.067)\ \text{g}/\text{L}$, 而大豆蛋白胨、酵母提取物、豆粕粉等复合氮源的 EPSP 产量均低于氯化铵, 这与以前对其他真菌的报道不一致。前人^[18]

研究报告,复合氮源比单一氮源更有利于茶树菇胞外多糖的合成;Chen等^[19]也称复合氮源比单一氮源更适合木蹄层孔菌胞外多糖合成,不过,关于复合氮源与单一氮源对灵芝 EPSP 合成影响的对比研究报告较少,且结果不一致。有研究报告^[16],磷酸二氢铵比复合氮源大豆粉和蛋白胨更有利于树舌灵芝多糖的合成,尤其是大豆粉,多糖产量不足磷酸二氢铵的50%;有学者^[20]认为,某些复合氮源,比如大豆蛋白胨,可能含有阻碍灵芝次生代谢的未知抑制因子。

与对 EPSP 合成的影响不同,如图 2(b)显示,



AC为氯化铵;Ur为尿素;SP为大豆蛋白胨;YE为酵母提取物;SPD为豆粕粉;ISP为大豆分离蛋白。下图同。

图2 氮源对灵芝 CAU5501 菌丝生长与 EPSP 合成的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source on mycelial growth and EPSP production from *G. lucidum* CAU5501

试验结果还显示,不同氮源对灵芝菌丝生长和 EPSP 合成具有明显不同的影响。与复合氮源相比,单一氮源更有利于 EPSP 的合成(图 2),但对菌丝体的影响则几乎完全相反,这似乎说明灵芝菌的初级代谢和次级代谢对氮源的需求有所不同。截至目前,其作用机制尚不清楚,对这方面的探讨也较少。综上所述,氮源对于 EPSP 合成的作用比较复杂,需进一步地深入研究。

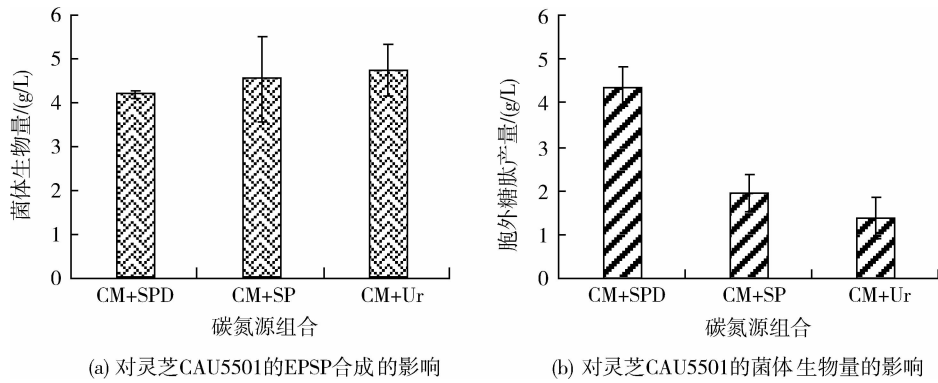
氮源试验结果显示,豆粕粉最有利于灵芝 CAU5501 菌丝生长,尿素最有利于 EPSP 合成,二者作为后面碳氮源组合试验的备选氮源。

2.3 不同碳氮源组合对灵芝 CAU5501 液体发酵的影响

以上述试验为基础,选玉米粉(CM)+尿素(Ur)、玉米粉(CM)+豆粕粉(SPD)和玉米粉(CM)+大豆蛋白胨(SP)作为碳氮源组合筛选试验,结果如图 3

复合氮源显然比单一氮源更适合灵芝菌丝生长,菌丝体产量最高的是豆粕粉组,菌体生物量达到 (2.222 ± 0.256) g/L,比单一无机氮源氯化铵高 542.95% ((0.346 ± 0.106) g/L),差异极显著 ($P < 0.01$);然后依次是大豆分离蛋白、酵母提取物和蛋白胨,均显著优于氯化铵 ($P < 0.05$),这与以前的报道一致,即复合有机氮源更有利于担子菌菌丝生长。原因可能是:1)复合有机氮源含有真菌几乎难以利用无机氮源合成的必需氨基酸^[21];2)复合有机氮源含有丰富的核苷酸、维生素等有利于灵芝菌生长的营养因子^[22]。

所示。CM+Ur 组合菌体生物量最高,达到 (4.708 ± 0.583) g/L,其次是 CM+SP 组合,再次是 CM+SPD(图 3(a))。但 3 个组合间差异不显著。不过,在 EPSP 产量方面,3 个组合差别很大(图 3(b))。CM+SPD 组合 EPSP 产量最高,为 (4.366 ± 0.434) g/L,是 CM+SP 组合的 2.2 倍多,差异显著 ($P < 0.05$),EPSP 产量最低的是 CM+Ur 组合,只有 CM+SPD 组合的 31.4% 左右。值得注意的是,与豆粕粉相比,当与复合碳源玉米粉配合使用时,尿素并未表现出与单一碳源(如葡萄糖等)配伍时更有利于 EPSP 合成的效果。造成这种现象的原因可能是玉米粉中的某些成分抵消了豆粕粉中抑制因子对灵芝次生代谢的不利影响,其必需氨基酸等营养成分对灵芝 EPSP 的合成发挥了促进作用,而复合碳源中某些成分可能加速尿素的分解,迅速释放地氨基氮对灵芝的次生代谢产生不利影响,因而反而不



CM 为玉米粉。

图3 碳氮源组合对灵芝 CAU5501 菌丝生长与 EPSP 合成的影响

Fig. 3 Effect of carbon and nitrogen source combination on mycelial growth and EPSP production from *G. lucidum* CAU5501

利于 EPSP 合成。

3 结论

碳氮源是灵芝菌生长与代谢的重要营养基础,不适宜的碳氮源会对灵芝菌丝生长和代谢产生不良影响。本试验通过 6 种碳源和 6 种氮源的对比研究证实了,复合碳源比单一碳源更有利于灵芝菌丝体生长和 EPSP 合成,同时发现,对灵芝菌 CAU5501,玉米粉是较好的碳源,一则原料易得,成本不高;二则可以更好地同时满足菌丝体生长和 EPSP 合成要求。虽然复合氮源较单一氮源更有利于灵芝菌丝生长,但并不比单一氮源更有利于 CAU5501 胞外多糖的合成。碳氮源组合以玉米粉与豆粕粉最佳,可以显著提高灵芝胞外糖肽产量。

本试验通过对 CAU5501 碳氮源的研究,为灵芝产品的液体深层发酵工业化生产选择适宜的原料具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Li W J, Nie S P, Yu Q, et al. Immune modulation of polysaccharides from *Ganoderma atrum* on immunosuppressed Mice[J]. Food Sci, 2009, 30(19): 297-299
- [2] Shang D, Li Y, Wang C, et al. A novel polysaccharide from Seenriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2011, 25(1): 267-272
- [3] 刘静, 阳帆, 李珊珊, 等. 灵芝多糖 GLP 的抗疱疹病毒作用机理[J]. 中国病毒学, 2005(4): 362-365
- [4] Yu Q, Nie S P, Li W J, et al. Anti-aging effect of polysaccharide of *Ganoderma atrum* on D-galactose-induced mouse aging model[J]. Food Sci, 2009, 30(17): 305-307
- [5] 陈伟强, 黄际薇, 罗利琼, 等. 灵芝多糖调节糖尿病大鼠血糖、血脂的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2005(8): 957-958
- [6] Novaes M R C G, Novaes L C G, Taveira V C. Natural products from agaricales medicinal mushrooms: Biology, nutritional properties, and pharmacological effects on cancer [J]. Revista Brasileira de Cancerologia, 2007, 53(4): 411-420
- [7] Chen Y, Xie M Y, Nie S P. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysacberide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chem, 2008, 107(1): 231-241
- [8] Chang M Y, Tsai G J, Houng J Y. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method [J]. Enzyme Microb Tech, 2006, 38(3-4): 407-414
- [9] Fang Q H, Zhong J J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* [J]. Enzyme Microb Tech, 2002, 37(7): 769-774
- [10] Tang Y J, Zhang W, Zhong J J. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Bioresour Technol, 2009, 100: 1852-1859
- [11] Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex [J]. Bioresour Technol, 2010, 101: 1941-1946
- [12] Tang Y J, Zhang W, Liu R S, et al. Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma polysaccharides* [J]. Process Biochem, 2011, 46(5): 404-408
- [13] Wagner R, Mitchell A D, Sasaki L G, et al. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of

- biomass, ganoderic acid and polysaccharides[J]. Food Technol Biotechnol, 2003, 41(4): 371-382
- [14] 鈕晓艳, 王铮, 张日俊. 灵芝糖肽复合物高产菌株原生质体紫外诱变选育及其在肉仔鸡上的抗生素替代效应[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 511-516
- [15] DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28(3): 350-356
- [16] 宋爱荣, 王光远, 赵晨, 等. 树舌灵芝碳氮营养源利用的研究 [J]. 食用菌, 2006(04): 16-17
- [17] Xu P, Ding Z Y, Qian Z, et al. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media [J]. Enzyme Microb Tech, 2008, 42(4): 325-331
- [18] Kim H O, Lim J M, Joo J H, et al. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea* [J]. Biores Technol, 2005, 96: 1175-1182
- [19] Chen W, Zhao Z, Chen S F, et al. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro* [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(8): 3187-3194
- [20] Fang Q H, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites--ganoderic acid and polysaccharide [J]. Biochem Eng J, 2002, 10(1): 61-65
- [21] Shih I L, Pan K, Hsieh C Y. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea* [J]. Process Biochem, 2006, 41(5): 1129-1135
- [22] Chouiter R, Roy I, Bucke C. Optimisation of β -glucuronidase production from a newly isolated *Ganoderma applanatum* [J]. J Mol Catal B-Enzym, 2008, 50(2/3/4): 114-120

责任编辑: 苏燕