

灵芝胞外多糖高产菌株筛选及其深层发酵培养基的优化

[作者] 宋频然, 常继东

[单位] 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

[关键词] 灵芝, 担子菌, 发酵, 筛选模型

[摘要] 灵芝(*Ganoderma zucidum*)隶属于担子菌纲(BaSidiomycetes), 多孔 L 菌目(Polyporales), 多孔菌科(Polyporaceae), 灵芝属(*Ganoderma*), 是中医药宝库中的珍品, 药用历史悠久。灵芝的现代研究始于 20 世纪 50 年代末, 半个世纪以来, 在真菌化学、药理作用、人工驯化、栽培技术、液体发酵和产品加工等方面都有长足的进展[1-5]。灵芝液体发酵研究主要集中于提高菌丝体、灵芝多糖和灵芝酸的产量[1,6-8], 而对灵芝液体发酵菌种的选育研究甚少[8-10]。应用自身代谢终产物耐受性原理进行抗生素高产菌株筛选的筛选模型已普遍被应用, 但应用蕈菌胞外多糖的反馈抑制原理筛选蕈菌胞外多糖高产菌株的研究尚未见报道。本文应用灵芝胞外多糖反馈抑制原理[11]构建了一个筛选模型, 并用它筛选 37 株灵芝菌株, 检出一株强耐同源胞外多糖反馈抑制、产胞外多糖能力最强的灵芝菌株 GL029, 进而优化 GL029 的深层发酵培养基。

灵芝(*Ganoderma zucidum*)隶属于担子菌纲(BaSidiomycetes), 多孔 L 菌目(Polyporales), 多孔菌科(Polyporaceae), 灵芝属(*Ganoderma*), 是中医药宝库中的珍品, 药用历史悠久。灵芝的现代研究始于 20 世纪 50 年代末, 半个世纪以来, 在真菌化学、药理作用、人工驯化、栽培技术、液体发酵和产品加工等方面都有长足的进展[1-5]。灵芝液体发酵研究主要集中于提高菌丝体、灵芝多糖和灵芝酸的产量[1,6-8], 而对灵芝液体发酵菌种的选育研究甚少[8-10]。应用自身代谢终产物耐受性原理进行抗生素高产菌株筛选的筛选模型已普遍被应用, 但应用蕈菌胞外多糖的反馈抑制原理筛选蕈菌胞外多糖高产菌株的研究尚未见报道。本文应用灵芝胞外多糖反馈抑制原理[11]构建了一个筛选模型, 并用它筛选 37 株灵芝菌株, 检出一株强耐同源胞外多糖反馈抑制、产胞外多糖能力最强的灵芝菌株 GL029, 进而优化 GL029 的深层发酵培养基。

1 材料与方法

1.1 耐反馈抑制筛选模型的构建

1.1.1 构建筛选模型的理论依据、

在灵芝液体发酵过程中, 自身终产物胞外多糖(EPS)具有反馈抑制作用。对菌株 GL002(韩芝 2 号)来说, 培养液中 EPS 的浓度高于 0.59g/L 时, EPS 的产生受到明显抑制, 其趋势是随着培养液中 EPS 浓度的增加, 反馈抑制作用逐渐增强。当 EPS 浓度达到 2.34g/L 时, 菌丝的生长和 EPS 的产生完全被抑制, 即该菌株对自身代谢终产物 EPS 的最大耐受浓度为 2.34g/L[11]。将该浓度的同源灵芝胞外多糖添加到液体培养基中, 对若干灵芝菌株分别进行同步深层发酵, 凡不能生长者, 则其对自身终产物 EPS 的耐受浓度小于 2.34g/L, 反之则高于 2.34g/L。耐受性越强, 其 EPS 的生产能力也越强。

1.1.2 筛选模型指示因子

GL002 菌株于 30℃、120r/min 避光培养 9d, 然后用醇沉法[11]提取胞外多糖(EPS), 所得灵芝胞外粗多糖即为筛选模型指示因子。

1.1.3 筛选模型指示因子提取培养基

培养基配方为蔗糖 30g, 酵母浸膏 1g, (NH₄)₂S₀41g, KH₂P₀4·7H₂O 1g, KCl 0.5g,

FeS040. 01g, 水 1000mL。

1. 1. 4 筛选培养基

培养基配方为蔗糖 30g, 酵母浸膏 1g, (N 地)2S041g, KH₂P0₄ · 7H₂O 1g, KCl 0. 5g, FeS040. 01g, 浓度为 2. 34g/L 筛选模型指示因子的水溶液 1000mL。

1. 1. 5 筛选培养

将 4℃ 保藏的出发菌株置常温下活化后, 接种至 PDA 斜面, 28℃ 避光培养 7d。然后接种到 PDA 平板, 28℃ 避光培养 5d。平板种子接入灭菌后装有 100mL 筛选培养基的 500mL 摇瓶中, 每个摇瓶用 Φ 6mm 的打孔器接种平板种子 12 块, 种子皆取自菌落边沿区域。于 30℃、120r / min 避光培养 9d。

1. 1. 6 筛选检测

当筛选培养进入第 6 天时(对数期为第 2 天至第 6 天[11]), 检查摇瓶中菌丝生长情况, 则可直接淘汰既未生长、又无染菌的菌株。做相关纪录。有菌丝生长者, 则继续培养至终点, 用醇沉法[11]提取胞外多糖(EPS), 稀释至 80 倍, 用硫酸一酚法[12,13]测定其浓度。比较指示因子数值, 检出强耐反馈抑制菌株。

1. 1. 7 筛选模型的模拟运行和验证

从 37 株出发菌株中随机选取 5 株, 按照 1. 1. 5 的方法分别接入 1. 1. 3 的筛选模型指示因子提取培养基和 1. 1. 4 的筛选培养基, 进行同步筛选培养, 从接入筛选模型指示因子提取培养基中的 5 个菌株中检出胞外多糖产量最高的菌株。从接入筛选培养基中相同的 5 个菌株中检出强耐反馈抑制菌株, 比较两种筛选方法所得结果的一致性, 以确定筛选模型的可行性和可靠性。

1. 2 强耐反馈抑制作用胞外多糖高产菌株的检出

1. 2. 1 出发菌株

37 株出发菌株的编号为 GL001、GL002、GL003、GL004、GL005、GL006、GL007、GL008、GL009、GL010、GL011、GL012、GL013、GL014、GL015、GL016、GL017、GL018、GL019、GL020、GL021、GL022、GL023、GL024、GL025、GL026、GL027、GL028、GL029、GL031、GL032、GL033、GL034、GL035、GL036、GL037、GL039, 由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室保藏。

1. 2. 2 筛选操作

将 37 株出发菌株中除已在耐反馈抑制筛选模型模拟运行试验中输入该模型的 5 株之外的 32 株菌株, 按照既定程序输入该模型, 考察其表现, 统一比较 37 株出发菌株的耐反馈抑制作用强度, 检出一株耐受性最强的菌株, 即为胞外多糖高产菌株。

1. 3 既得灵芝胞外多糖高产菌株深层发酵培养基的优化

1. 3. 1 基础培养基

基础培养基配方为蔗糖 10g, 酵母浸膏 1g, KH₂P0₄ · 7H₂O 0. 5g, 水 1000mL。

1. 3. 2 正交试验设计

根据灵芝深层发酵的营养需求, 本试验在基础培养基的基础上, 选取碳源(玉米粉)、氮源(蛋白胨)、钾(氯化钾)、硫酸镁四因素, 每因素设三个水平(表 1)。选择无交互作用的正交表 L₉(3⁴)[14,15]将四因素任意地排列在四个列号的任何列上, 进行既得胞外多糖高产菌株深层发酵培养基优化研究(表 2)。

2 结果与分析

2. 1 耐反馈抑制筛选模型及其操作法

2. 1. 1 耐反馈抑制筛选模型的结构

根据 1. 1. 1 构建筛选模型的理论, 经多次试验, 确立了耐反馈抑制筛选模型框架, 它包括筛选指示因子、筛选培养基、筛选培养、筛选检测四部分, 外围结构为出发菌株。结构

关系如图 1 所示。

2. 1. 2 筛选操作程序

通过出发菌株 GL002 深层发酵获取的筛选指示因子仅供 2d 内备用。准备好筛选模型指示因子和出发菌株的平板种子之后，才制备筛选培养基。时间掌握不好，易出现种子老化和筛选模型指示因子感染杂菌。然后把出发菌株平板种子接到筛选培养基中。当筛选培养进行到第 6 天时，直接淘汰未感染杂菌而菌丝不生长的菌株；继续培养在筛选培养基中能生长的出发菌株至设定的终点，测定筛选培养醪中灵芝胞外多糖总浓度，其中，胞外多糖总浓度最高的菌株就是耐反馈抑制作用最强的、灵芝胞外多糖高产菌株。

2. 1. 3 耐反馈抑制筛选模型的模拟运行与验证

从 37 株出发菌株中随机选取的 GL007、GL010、GL017、GL026 和 GL033 五株菌株分别接入筛选模型指示因子提取培养基和筛选培养基，进行同步筛选培养。耐反馈抑制作用筛选模型试运行结果与指数比较试验结果比较见表 3。由表 3 可见，用耐反馈抑制筛选模型选出的强耐反馈抑制作用的菌株与用指数比较试验选出的胞外多糖产量最高的菌株是一致的，都是 GL033，证明模型可行而且可靠。

2. 2 灵芝胞外多糖高产菌株的检出

2. 2. 1 初筛

输入耐反馈抑制筛选模型的 37 株出发菌株菌丝生长情况见表 4。由表 4 可见，其中 28 株无菌丝生长，即予以淘汰。检出 GL006、GL011、GL018、GL025、GL028、GL029、GL031、GL033 和 GL039 九株耐反馈抑制作用较强的菌株(即有菌丝生长者)进行复筛。继续培养至设定终点，测定培养醪中胞外多糖的浓度。

2. 2. 2 复筛

所得 9 株耐反馈抑制作用较强菌株复筛培养基中的胞外多糖总浓度见图 2。由图 2 可见，GL029 培养基中的胞外多糖浓度最高，即其产胞外多糖能力最强。

2. 3 既得灵芝胞外多糖高产菌株 GL029 深层发酵培养基的选优

2. 3. 1 正交试验结果

用 GL029 菌株作正交试验，其正交试验结果见表 5。由表 5 中的 D_{max} 值(因子引起的极大偏差)的比较可见： $DA > Dc > DB > DD$ 。即在基础培养基中添加的四因素对 GL029 胞外多糖产量影响的强度依次为玉米粉、氯化钾、蛋白胨和硫酸镁。比较表 5 中的 K 值得： $KA_2 > KA_1 > KA_3$ ； $KR_2 > Ka_3 > KBt$ ； $Kc_2 > Kc_3 > Kc_1$ ； $KDI > Km > KD_2$ ，即四因素的最佳搭配为： $A_2 B_2 C_2 D_1$ 。

2. 3. 2 试验结果单因素分析

以不同浓度的玉米粉、蛋白胨、KCl 和 $MgSO_4$ 作为单因素，其对灵芝胞外多糖产量的影响结果见图 3~图 6。

由图 3 可见，在基础培养基中添加适量的玉米粉可以提高灵芝胞外多糖产量，但过量的玉米粉会降低灵芝胞外多糖产量，这可能是玉米粉添加量太大，导致培养基过稠，溶氧下降，不利于菌丝生长和灵芝胞外多糖的产生。在提取灵芝胞外多糖时发现，添加玉米粉 30g/L 的培养基比添加玉米粉 15g/L 的培养基要稠，其菌丝浓度也不如玉米粉浓度较低者。

由图 4 可见，在基础培养基中添加适量的蛋白胨作为氮源，可提高灵芝胞外多糖产量，如果添加过量，会导致灵芝胞外多糖产量下降，这可能是因为氮源过于丰富，导致菌丝疯长，而不利于灵芝胞外多糖产量的提高，只有碳氮比合适的培养基才有利于目标代谢物质的积累。

由图 5 可见，基础培养基要维持一定浓度的 K^+ ，才有利于提高灵芝胞外多糖的产量。

由图 6 可见，在基础培养基中添加硫酸镁对灵芝胞外多糖的产量有影响，但影响不大。虽然镁和硫是菌丝生长必需的，可影响胞外多糖的产量，但在本试验中，可能是基础培养基

中的酵母浸膏和因素 A(玉米粉)中含有的镁和硫已足以满足胞外多糖合成的需要,所以添加的硫酸镁对胞外多糖产量影响不大。

单因素分析结果与表 5 中 Dmax 值的比较结果一致。

四因素对胞外多糖产量影响的方差分析见表 6。由表 6 可见, $\alpha=0.10$ 时,四个因素对胞外多糖产量的影响皆显著; $\alpha=0.05$ 时, A、B、C 三个因素对胞外多糖产量的影响显著; $\alpha=0.01$ 时,只有 A、C 二个因素对胞外多糖产量的影响显著。

统计分析结果表明,在基础培养基中添加的四因素最佳搭配水平是 A2 B2C2D1,即玉米粉 15g/L,蛋白胨 2g/L, Ka 0.5g/L, MgSO40g/L。本研究的 9 个试验未采用四因素的这一水平搭配,因为正交试验仅仅选做一部分因素水平搭配[15]。在采用水平搭配 A2B2D1 的 5 号试验中,灵芝胞外多糖产量高达 3.05g/L。结合本试验基础培养基配方综合考虑可见,组合碳源和组合氮源比单一碳源和单一氮源更有利于提高灵芝胞外多糖的产量。所以,菌株 GL029 用于生产灵芝胞外多糖的最适培养基,即在本试验的基础培养基配方中添加水平搭配为 A2 B2 C2D1 的 4 个因素,其配方为蔗糖 10g/L,玉米粉 15g/L,蛋白胨 2g/L,酵母浸膏 1g/L, Ka 0.5g/L, KH2P04·7H2O 0.5g/L,水 1000mL, pH 自然。将 GL029 菌株接入以此配方配制的培养基,于 30℃、装量 100mL/500mL、摇床转速 120r/min 摇瓶培养 9d,该菌株的胞外多糖产量达 3.07g/L。高于正交试验中 5 号试验的产量。表明本优化研究结果可信可靠。

3 讨论

3.1 本研究首次应用灵芝胞外多糖的反馈抑制作用原理-1 构建了耐反馈抑制筛选模型,并用该模型从 37 株灵芝菌株中筛选出一株强耐自身代谢产物胞外多糖反馈抑制、高产胞外多糖的灵芝菌株 GL029。本研究所构建的模型不仅为选育用于深层发酵的灵芝优良菌株提供了新的途径,而且大大提高了选育菌种的效率。

3.2 本研究对既得耐胞外多糖反馈抑制作用的灵芝菌株 GL029 的深层发酵培养基进行了优化。结果表明,组合碳源和组合氮源比单一碳源和单一氮源更有利于提高灵芝胞外多糖的产量。以最适配方培养基,起始 pH 自然,培养温度 30℃,装量 100mL/500mL,摇床转速 120r/min 培养 9d,该菌株的胞外多糖产量达 3.07g/L,高于目前国内文献报道的最高产量 2.91g/L[16]。

3.3 本试验已对既得菌株 GL029 进行了摇瓶培养基优化,其发酵罐发酵工艺过程控制及其优化则有待进一步研究。

参考文献

- [1]林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社,2001.
- [2]何云庆,李荣芷,蔡廷威,等. 灵芝糖肽的化学研究[J]. 中草药,1994,25(8):395-397.
- [3]黄芳,蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,1999,11(5):90-98.
- [4]Jiri Patočka. Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine【J】. Acta Medica,1999,42(4):123-125.
- [5]马礼金,姚汝华. 灵芝的药用及食用研究[J]. 食品与发酵工业,1997,24(1):62-66.
- [6]Kim SW,Hwang HJ, Park JP, et al. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media[J]. Letters in Applied Microbiology,2002,34(1):56-60.
- [7]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(自然科学版),2001,27(3):254-257.
- [8]罗立新,周少奇,姚汝华. 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.

[9]LiSun 。 Huaqingcai , WeihongXu , et al . Efficient transformationofthemedicalmushroomGanoderma lucidium[J]. Plant MolecularBiologyReporter, 2001, 19: 383a--383j.

[10]杨焱,周昌艳,冯志勇,等. 深层发酵灵芝高产菌株筛选初探[J]. 食用菌学报, 2002, 9(4): 18~21.

[11]宋频然,常继东. 灵芝真菌发酵胞外多糖反馈抑制的初步研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2003, 2(3): 311~314

[12]李晓晖,李书平,何云庆,等. 灵芝多糖的含量测定研究[J]. 中草药, 1997, 28(9): 530--531.

[13]张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 81--86.

[14]于寅. 高等工程数学(第二版)[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1995.

[15]上海市科学技术交流站. 正交试验设计法——多因素试验的试验方法[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975.

[16]李平作,徐柔,章克昌. 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): 28—30。