

药用蕈菌紫芝液体培养的生长特征分析*

龚建华 王义军

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:使用专门设计的 ALR/ff 蕈菌液体培养反应器,研究了有关紫芝液体培养过程中菌丝生长的特征。结果表明,液体培养时紫芝菌丝生长对温度有较宽的适应范围 25℃ ~ 35℃,但生长比速率相差很大。通气量由 0.93vvm 提高到 1.64vvm 时,菌丝生长比速率明显地增加,最大值为 0.0444(h⁻¹);当通气量进一步提高到 2.50vvm 时,生长比速率反而下降。与低糖浓度比较,较高糖浓度(2.80g/100mL)可以使生长迟滞期缩短;培养后期菌丝缠绕成浓密颗粒,较高糖浓度可以促进生长。在整个培养过程中,糖浓度较低时葡萄糖转化成菌体的生长效率明显高于较高葡萄糖浓度的效率。碳源限制生长的连续培养研究结果,进一步反映了菌丝不同生长活性使菌丝物具有不同形态结构。菌体量、限制生长底物、菌体生成率的三者关系与细菌有明显的差异。并且,在 0.010 ~ 0.220(h⁻¹)稀释率范围内菌丝生长符合 Contois 方程。

关键词: 药用蕈药,紫芝,液体培养体系,菌丝物形态,生长特征

中图分类号: Q949.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0093-06

“蕈菌 Mushrooms”属于一类可以形成子实体的大型丝状真菌^[1]。灵芝是具有代表性的蕈菌,许多种类可以药用^[2]。灵芝在微生物分类学中属于真菌门、担子菌亚门、层担子菌纲、无隔担子菌亚纲、非褶菌目。灵芝属菌类约有 100 余种,其中进行研究与应用较多的是赤芝(*Ganoderma lucidum*)、紫芝(*Ganoderma sinense*)、薄树芝(*Ganoderma capense*)和树舌(*Ganoderma applanatum*)等^[2]。灵芝有一定的药理作用。长期以来灵芝的采集以野生及人工固体栽培为主。近年来的药理研究表明用液体深层培养方法获取的灵芝菌丝体发酵液与子实体有类似的功效,使灵芝液体培养有了深入的研究,但是大部分研究工作主要集中在实用性工艺的开发^[3-4]。在液体培养体系中,蕈菌以悬浮的菌丝体形式进行生长。本文报道了有关紫芝液体培养过程中菌丝生长的动力学特征。在研究工作中为了解决大型丝状真菌在搅拌式反应器中菌丝断裂以及菌丝块粘壁的问题,本文作者使用了专门设计的蕈菌液体培养反应器 ALR/ff(已申请专利)。

1 材料和方法

1.1 菌种

紫芝(*Ganoderma sinense*),又称作“中国灵芝(China *Ganoderma*)”,本所保存菌种。

1.2 培养基

PDA 固体培养基可用于试管斜面的菌种培养。摇瓶种液培养基组成如下,土豆汁

* 本研究中,杜遵义同志参与 ALR/ff 反应器研制工作

作者简介:龚建华(1946-),男,副研究员,主要研究方向为微生物生化工程。

收稿日期:2001-02-15,修回日期:2001-07-17

200g, 葡萄糖 20g, KH_2PO_4 1.5g, MgSO_4 0.7g, VB_1 0.01g, 用水稀释至 1L, 自然 pH。反应器所用液体基础培养基配制如下, 葡萄糖 10~15g, 氮源基质(试验室专门制备)5~8g, MgSO_4 1.5g, VB_1 0.01g, 用水稀释至 1L, pH5.4。在此培养基配方基础上, 根据试验要求调整培养基组成。

1.3 反应器

使用自制的 ALR/ff 型(已申请专利)气升式反应器。容积 2300mL, 由耐压玻璃、不锈钢及耐高温橡胶等材料构成。

1.4 试验方法

取培养好的斜面菌苔 2cm^2 左右接于灭菌后摇瓶液体培养基中(每 250mL 摇瓶中装 70mL 培养基), 置于往复摇床上(120r/min), 28°C 培养 3d。接种于 ALR/ff 反应器内, 接种量 10%, 培养条件由试验要求而定。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度测定: 取样离心, 经三次洗涤后, 80°C 烘干至恒重。

1.5.2 还原糖测定: 二硝基水杨酸盐(DNS)法^[5]

1.5.3 pH 值测定: 笔式 pH 计(日本)、精密 pH 试纸。

2 结果和讨论

2.1 温度对紫芝菌丝生长的影响

固体栽培的灵芝菌丝一般在 $8^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 下均能生长, 生长适温为 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ ^[6]。早期有文献报道了赤芝在木屑、麸皮固体栽培基中, 培养温度分别为 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 和 40°C 时, 菌丝长度的平均延伸速率为 3.4mm/d、4.9mm/d、6.00mm/d、3.4mm/d 和 0mm/d, 菌丝延伸最适温度为 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ ^[6]。本文比较了紫芝在液体培养时温度对悬浮菌丝生长比速率的影响。培养温度分别为 20°C 、 28°C 和 35°C , 观察周期 200h。结果表明, 紫芝菌丝生长比速率的最大值分别为 $0.0175(\text{h}^{-1})$ 、 $0.0261(\text{h}^{-1})$ 和 $0.0180(\text{h}^{-1})$; 最大生长比速率分别在 92h、32h 和 136h。

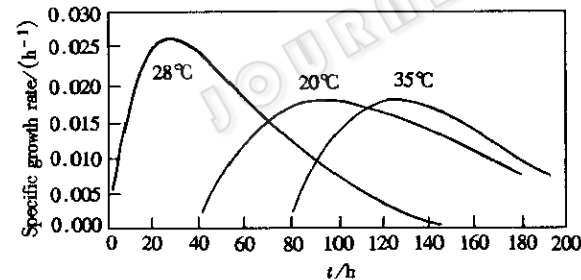


图1 培养温度对 *G. sinense* 悬浮菌丝体生长比速率的影响

Fig.1 Effects of cultivation temperature on specific growth rate of *G. sinense* mycelia

而且, 28°C 培养时几乎无生长迟滞期, 接种后很快表现出活跃的生长。 20°C 时生长迟滞期为 38h, 而 35°C 时要长达 78h(图 1)。因此认为(1)紫芝菌丝在液体培养条件下, 生长迟滞期长短与温度有关。较佳温度可使菌丝很快开始分裂延长, 并保持很好的生长活性;(2)液体培养时紫芝菌丝生长也有较宽的温度适应范围 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$, 但生长活性相差很大。

2.2 通气(供氧)强度对紫芝菌丝生长及形态的影响

灵芝为好气性菇, 固体栽培时菌丝的延伸、分枝、粗壮以及子实体的形成受通风条件

的影响。氧浓度偏低、 CO_2 浓度升高会导致菌丝萎缩、子实体畸形。在液体培养体系中,我们比较了在 ALR/ff 气升反应器中通气量与紫芝菌丝生长的相互关系(图 2)。通气量由 0.93vvm 提高到 1.64vvm 时,菌丝生长比速率明显地增加。后者的生长比速率最大值为 $0.0444(\text{h}^{-1})$,而前者仅为 $0.0286(\text{h}^{-1})$ 。这表明在液体培养体系中紫芝菌丝体生长对氧的要求是明显的,它直接影响菌丝分裂、再生的能力。

通气量较大幅度地提高到 2.50vvm 时,菌丝生长比速率反而明显下降,最大值仅为 1.64vvm 时的一半左右(图 2)。可以看到,0.93vvm 与 1.64vvm 时培养液为菌丝絮粒悬浮状,2.50vvm 时却变成菌丝絮浆状。由显微镜观察,后者的菌丝体大多是断裂的少分枝短丝。虽然,具有专门结构的 ALR/ff 反应器较常用的搅拌反应器产生的流体剪切力已大大缓和。但是极高通风量导致反应器导流筒内外过高的湍流速度、气液分离区气泡激烈的聚并和破裂,而对纤长菌丝造成损伤。

2.3 葡萄糖浓度对紫芝菌丝生长的影响

固体栽培灵芝时,碳源常用阔叶树的木屑、麸皮、棉籽中的碳水化合物,或补加少量蔗糖、红糖。其碳源含量对灵芝子实体生长的影响颇大^[7]。液体培养时,葡萄糖可用作主要碳源。在一定浓度范围内葡萄糖浓度与菌体生长呈正相关^[8-9]。我们比较了葡萄糖浓度 0.95g/100mL 与 2.80g/100mL 时紫芝菌丝的生长情况(相同的氮源浓度)。结果表明:(1)在 20h 前,较高糖浓度可以促进菌丝的分裂生长,生长迟滞期较短。(2)主要生长期 20~90h 期间,菌丝体渐变成雪花状菌絮,低的糖浓度却有助于菌丝延伸与分枝,生成更多的菌絮。这是因为试验条件中的较高 N/C 比,可以促进具有较高生长活性的菌丝絮的生成,而延迟菌丝颗粒的形成。Hemmersdorfer 等人在不同氮源浓度的丝状真菌生长试验中也有类似报道^[10-11]。(3)90h 后,较高糖浓度有利于菌丝生长。因为此时的菌丝聚集物主要是由菌丝缠绕而成的浓密颗粒。颗粒内传质阻力增加,细胞生长受碳源浓度的限制。

2.4 葡萄糖浓度对紫芝菌丝生长效率的影响

液体培养体系中时间 t_i 时的葡萄糖转化成菌体的代谢效率(生长效率),定量表示为菌体浓度增量 dx 与葡萄糖浓度减量 dc 绝对值之比^[12]。它是培养时间的变量。试验中比较了碳源葡萄糖初始浓度分别为 0.95g/100mL 与 2.80g/100mL 时,紫芝菌丝的生长效率。观察周期为 120h。结果如下:(1)整个培养过程中任何时间,初始浓度为 0.95g/100mL 的葡萄糖转化成菌体的生长效率,都大于初始葡萄糖浓度较高时的值;(2)前者的生长效率 20h 为 2.55g/g(即 1g 葡萄糖可以转化成 2.55g 菌丝体)而逐步降低至 120h 的 0.22g/g;而后者的生长效率 20h 为 0.28g/g,52h 时渐升至最高值 0.43g/g(1g 葡萄糖转化为 0.43g 菌丝体),然后下降到 120h 的 0.08g/g。

t_i 时菌体所消耗的葡萄糖碳源量 dc ,一部份用于细胞生成,另一部分用于胞外代谢产

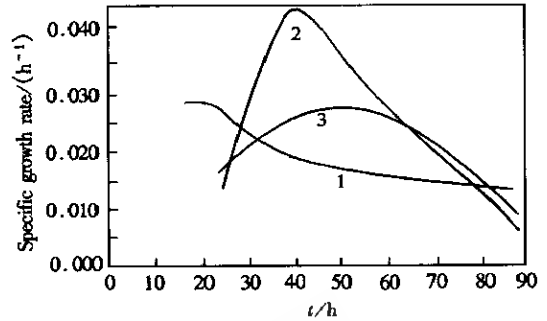


图 2 供氧条件对 *G. sinense* 悬浮菌丝体生长比速率的影响

Fig. 2 Effects of aeration on specific growth rate of *G. sinense* mycelia

1:0.93vvm; 2:1.64vvm; 3:2.50vvm.

物合成,还有一部分用于能量消耗。这几部分的“分配”比例受代谢调控、酶反应效率的影响。生长效率 dx/dc 值从物质利用的效率意义上反映了菌体的生长活性^[13]。高葡萄糖浓度时的“溢流代谢”影响细胞对葡萄糖的利用效率^[14~18]。

2.5 在连续培养体系中紫芝菌丝的生长特征

蕈菌连续培养的研究报告很少。Yaichi Fukushima 等人曾报道了香菇 (*Lentinus edodes*) 连续培养的生长特性^[19]。在液体培养的“开放体系”(Open system)中,使输入液与输出液的流速相同,保持培养液的恒等体积即可构成连续培养体系。不同动力学特征的连续培养体系可作为相应的研究手段^[9,20]。例如在碳源限制生长条件下,使菌体浓度保持在一稳定值。此时,就总体而言,菌体的生长比速率即等于稀释率值 D ($D = F/V$, F 流速, V 培养体系)。稀释率是可选择的。我们比较了稀释率 $0.010 - 0.220$ (h^{-1}) 范围内连续培养体系中 *G. sinense* 菌丝的生长特性(图 3、图 4)。

表 1 连续培养体系中稀释率对紫芝悬浮菌体生长形态的影响

Table 1 Effects of dilution rates on forms of *G. sinense* mycelia in continuous cultivation

| 稀释率 Dilution rate (h^{-1}) | 悬浮菌丝体生长形态 Forms of <i>G. sinense</i> mycelia |
|-----------------------------------|---|
| 0.021 | Branched mycelia |
| 0.038 | Branched mycelia |
| 0.046 | Loosely flocky mycelia |
| 0.065 | Loosely flocky mycelia |
| 0.172 | Closely flocky mycelia |
| 0.208 | Closely flocky mycelia |

试验结果表明, *G. sinense* 在较低生长比速率时,悬浮菌丝物形态呈现为分枝菌丝 (branched mycelia), 生长比速率增加时,菌丝形成松散性菌絮 (Loosely flocky mycelia) 直至成为紧密性菌絮 (Closely flocky mycelia) (表 1)。菌丝的生长活性使菌丝物形态呈现不同立体结构。旺盛的生长行为使纤长、分枝的生长菌丝更易缠绕聚集。Yaichi Fukushima 和 Sergei Braun 在丝状真菌的培养研究中对上述基本状态也有类似的描述^[11,19]。

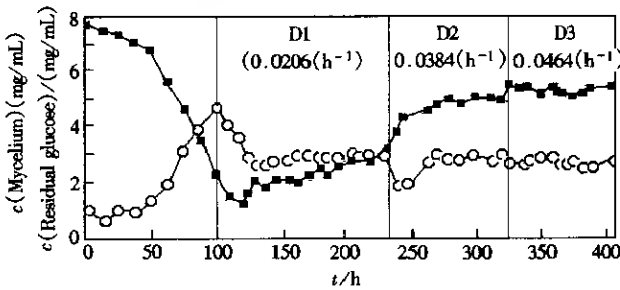


图 3 *G. sinense* 悬浮菌丝体的连续培养

Fig.3 Continuous cultivation of *G. sinense* mycelium

○—○ Mycelium; ■—■ Residual glucose.

因为随着生长比速率提高, *G. sinense* 菌丝的分枝、缠绕、聚集趋势加剧。聚集态结构中的菌丝密度提高,会减弱底物传质速度,影响细胞对该底物的吸收利用,从而明显地减少细胞的增殖量、明显地增加底物的剩余量。

2.6 紫芝菌丝生长的 Contois 方程

文献已有大量关于细菌类微生物生长模型的记载^[9,15],涉及蕈菌液体培养菌丝体生长的数学模型却未见报道。作者通过上述连续培养方法,对稀释率 $0.015 \sim 0.085(\text{h}^{-1})$ 范围内的生长比速率 μ 与限制生长碳源底物浓度 S 数据的处理结果表明,该范围内 *G. sinense* 菌丝生长遵循 Contois 关系,即 $\mu = \mu_m \cdot S / (B \cdot K + S)$,其中 μ 生长比速率 (h^{-1}), S 生长限制性底物浓度 ($\text{g}/100\text{mL}$), X 菌丝体浓度 ($\text{g}/100\text{mL}$),其中 μ_m 与 B 的参数值在试验条件下分别为 $0.181(\text{h}^{-1})$ 和 6.252 。

它阐述了如下生物学性质:(1)式中 $B \cdot X$ 项相当 Michaelis constant (米氏常数)。从 Michaels constant 意义上, $B \cdot X$ 项表征了菌体对 S 底物的“亲合”(吸收)能力^[16]。菌丝体浓度增大时, $B \cdot X$ 值愈大,对 S 底物吸收能力减小。其原因与液体粘度改变、液流内物质传递阻力增加有关。(2)培养初期,菌丝物形态为短而少分枝菌丝,浓度很低。 X 很低时, X 的变化不足以引起 $B \cdot X$ 项的很大改变而近似为常数 K 。则上式可写成 $\mu = \mu_m \cdot S / (K + S)$,表现出经典的 Monod 生长关系。(3)随着菌丝物生长、浓度增大,并成为紧密性菌絮。 X 足够大时, ($B \cdot X + S$) 项中 $B \cdot X$ 远大于 S 则近似成 ($B \cdot X$), Contois 式则可简化成 $\mu = \mu_m \cdot S / (B \cdot X)$,由 $\mu = (1/X) \cdot (dx/dx)$,得到 $dx = (\mu_m/B) \cdot (S) \cdot (dt)$ 。反映了 *G. sinense* 紧密性菌絮物已具有一定的“颗粒模型”特征,它描述了生长增量 dx 主要取决于“颗粒”外表层所接触液流的底物浓度^[15,16]。

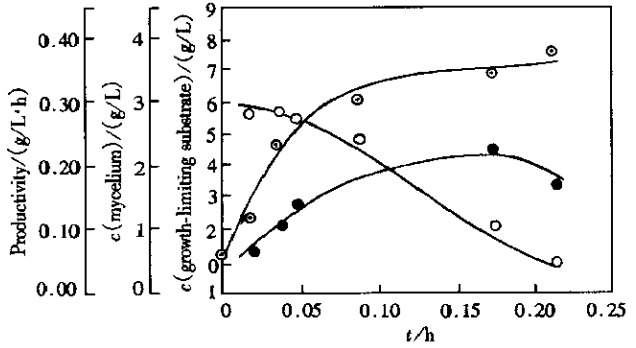


图4 *G. sinense* 连续培养体系中菌体浓度、限制生长基质浓度以及菌体生成率的相互关系

Fig.4 The relationships among mycelia concentration, growth-limiting substrate concentration and productivity of mycelia in *G. sinense* continuous cultivation
●—● Productivity; ○—○ Concentration of mycelium; ●—● Growth-limiting substrate.

参 考 文 献

[1] 张树庭, 卯晓岚. 香港蕈菌, 香港: 中文大学出版社, 1995. 16 ~ 28.
 [2] 赵继鼎. 中国灵芝新编. 北京: 科学出版社, 1989. 3 ~ 46.
 [3] 洪震, 卯晓岚. 食用药用菌实验技术及发酵生产. 北京: 中国农业科技出版社, 1992. 169 ~ 224.
 [4] Yang F C. *Bioprocess Engineering*, 1998, 19: 233 ~ 236.
 [5] Sumner J B. *J Biol Chem*, 1925, 63: 393.
 [6] 中国科学院北京植物研究所. 灵芝. 北京: 科学出版社, 1976. 26 ~ 29.
 [7] 赵根楠 崇耕, 卯晓岚. 中国菇类栽培手册. 北京: 科学普及出版社, 1990. 250 ~ 259.
 [8] 龚建华, Strandberg L, Enfors S O. 生物工程学报, 1990, 6(3): 246 ~ 251.
 [9] Stanbury P F, Whitaker A. *Principles of Fermentation Technology*. New York: Pergamon Press, 1984. 11 ~ 24.
 [10] Hemmersdorfer H. *J Basic Microbiol*, 1987, 27: 309 ~ 315.
 [11] Braun S. *Bittech-february*, 1991, 9: 63 ~ 68.
 [12] Bailey J E, Ollis D F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: Kingsport Press, 1977. 334 ~ 401.
 [13] 龚建华, 陈琦. 生物工程学报, 1987, 3(4): 281 ~ 289.

- [14] 龚建华, 丁久元, 路志强, 等. 微生物学报, 1988, 28(3): 257 ~ 264.
- [15] 屈明波, 龚建华, 黄和容. 生物工程学报, 1992, 8(2): 184 ~ 191.
- [16] Wang D I C, Cooney C L, Deman A L, *et al.* Fermentation and Enzyme Technology. New York: John Wiley & Sons Inc, 1979. 57 ~ 98.
- [17] Kennedy M. *J Industr Microbiol Biotech*, 1999, 23: 456 ~ 475.
- [18] Riesenber D. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 422 ~ 430.
- [19] Fukushima Y. *J Ferment Bioeng*, 1993, 76(1): 45 ~ 48.
- [20] Shioya S. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(3): 261 ~ 266.
- [21] Pirt S J. principles of Microbe and Cell Cultivation. London: John Wiley & Sons, Inc, 1975. 29 ~ 57.

The Kinetic Characteristics of Mycelium Growth of Medicinal Mushroom *Ganoderma sinense* in Liquid-submerged Cultivation

Gong Jianhua Wang Yijun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080, China)

Abstract: The study was carried out to investigate the kinetic characteristics of *Ganoderma sinense* mycelium growth in liquid-submerged cultivation, using a air-lift bioreactor ALR/ff specially designed for the cultivation of mushrooms' suspending mycelia cultures. Mycelia of *G. sinense* grew in the range of 25 °C – 35 °C, and at the different temperature in which the specific growth rate showed by the mycelia much differed. The specific growth rates with the maximum of 0.0444 (h⁻¹) at 1.64vvm of aeration in the cultivation were more than at 0.93vvm, also more than at 2.50vvm. In comparison with the less glucose concentration, the culture of 2.80g glucose/100mL in the medium had a shorter lag-period, and the more concentration of glucose favoured mycelia growth in the latter cultivation course with the denser pellets of mycelia. Then the culture of the less concentration of glucose in the medium had the higher conversion-rates of glucose to *G. sinense* biomass all along the cultivation course, than of the more concentration of glucose. Futhermore, in the continuous cultivations with growth-limiting substrate of carbon source the mycelia displaying different growing activities, demonstrated the varied forms of mycelium-gathering. In that cases the relationships among mycelia biomass, growth-limiting substrate and productivity of mycelium biomass obviously differed from the ones in the case of bacteria. Also in the range of dilution rates 0.010 ~ 0.220 (h⁻¹) the growing of *G. sinense* mycelia followed the function of Contois equation.

Key words: Medicinal mushrooms, *Ganoderma sinense*, Liquid-submerged cultivations, Forms of mycelia-gathering, Growth characteristics