

灵芝深层培养的研究*

林忠平 孙安慈 刘永安

(中国科学院植物研究所,北京)

由于灵芝临床试验和药理实验方面取得可喜的进展,研究灵芝的深层培养以扩大药源是十分必要的。初步研究 *Ganoderma* sp. 在深层培养下的形态、生长过程及培养条件证明,适宜的深层培养基为:花生饼粉 2%、蔗糖 2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07%、 CaCO_3 0.2%, pH 自然。在温度 30°C 下培养 6—7 天, pH 降至 3.8—4.1, 残糖约 0.13%, 这时可以终止发酵。

我国古代的医药学家认为灵芝是一类珍贵难得的药材。近年来北京、成都、石家庄、三明等地一些医疗部门和研究机关进行了灵芝的临床和药理实验,取得可喜的进展,证明灵芝对于治疗某些慢性疾病确有疗效,因此单靠人工培养子实体已经远远不能满足需要。利用深层发酵的技术,缩短培养周期、扩大药源就成为十分必要了。

高等真菌菌丝的深层培养,是近 20 年来新发展起来的工作,目的是用深层发酵生产出可作食品的菌丝。例如培养蘑菇属 (*Agaricus*) 和羊肚菌属 (*Morchella*) 等已经取得成功^[1,2]。此外通过杂色木云芝 (*Coriolus versicolor*) 的液体培养获得虫漆酶^[3],以及由某些担子菌的振荡培养产生草酸的工作均见报道^[4]。而对于作为药用的灵芝属 (*Ganoderma*) 的深层培养尚未见正式的报道。我们从 1970 年起开始研究灵芝的深层培养,并将发酵液和菌丝体制成适当剂型,投于临床试验,证明灵芝发酵产物和子实体一样均有疗效。

我们先后进行过深层培养的有灵芝 (*G. lucidum*)、*G. sp.*、紫芝 (*G. japonicum*)、树舌 (*G. applanatum*) 和树舌有柄变种 (*G.*

applanatum var. *gibbosum*) 等。其中 *G. sp.* 适应能力最强,培养条件易于掌握。深层培养实验主要是以这个种为材料进行的。本文报道这些实验的结果。

材料与方 法

供试验菌种 *Ganoderma* sp.、灵芝 [*G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.]、紫芝 [*G. japonicum* (Fr.) Lloyd]、树舌 [*G. applanatum* (Pers. ex Gray) Pat.] 和树舌有柄变种 [*G. applanatum* var. *gibbosum* (Bl. & Nees) Teng], 系中国科学院微生物研究所提供或由我所从野生子实体中分离。有一部分菌种是从人工培养的子实体上通过组织分离法得到的。采用低温方法短期保藏菌种,即在 28°C 下经过 5 天培养的斜面菌种放入 4°C 左右的冰箱内保存。通常每两个月转管一次。同时,我们还发现在某些天然培养基如小米培养基上(小米加水适量,灭菌后呈粥状即可应用)在 4°C 左右保存一年以上仍有生活力。

斜面培养基 土豆 200 克(去皮,切碎,煮沸约 45 分钟去渣)、蔗糖 20 克、磷酸二氢钾 3 克、硫酸镁 1.5 克、维生素 B₁ 10 毫克、琼脂 1.8 克,加水至 1000 毫升, pH 自然。

* 本工作承中国科学院微生物研究所和北京生物制品研究所提供菌种并协助工作,特此致谢。

本文 1973 年 4 月 30 日收到。

培养与结果表示 液体培养在往复式摇床上进行,速度100次/分,振幅14厘米。500毫升锥形瓶装量150毫升。培养温度29℃。

由于目前灵芝的有效成分尚未确定,发酵效果未能从有效物质的积累情况或效价的测定来判断。但是菌体生长的好坏与药品的疗效有密切的关系。因此暂以菌体的数量、形态以及养分消耗情况,做为衡量发酵条件是否适宜的标准。诚然,这个衡量标准是有缺陷的,因为有效物质的积累与菌体增长之间未必就是平行的关系。

结果与讨论

一、菌体形态

(一) 菌丝及厚垣孢子

所试验的几种灵芝在斜面上生长时,菌丝表面覆盖一层结晶物。在深层培养的情况下,菌丝周围也有许多结晶物存在。深层培养的菌丝比斜面培养的菌丝具有更多的锁状联合(Clamp connection)。

挑取上述几个种的菌丝置显微镜下观察时,不但可以看到菌丝上的锁状联合,还可以看到一种形如桃核的厚垣孢子。在其结构上种间的差异是很小的。有的厚垣孢子与菌丝相连,有的已经脱离菌丝(图11—3)。文卡塔罗扬(Venkatarayan, 1936)^[5]曾描述过麦芽琼脂培养基上的灵芝厚垣孢子(chlamyospore),看来和我们观察到的是同一种结构。这种厚垣孢子的形成与发酵条件之间的关系是值得进一步探讨的。

(二) 菌球

在振荡培养下,我们观察到 *G. sp.*、灵芝(*G. lucidum*)、紫芝(*G. japonicum*)和树舌有柄变种(*G. applanatum* var. *gibbosum*)的菌丝纵横交错缠绕而成为许多小球悬浮于发酵液之中,名之为菌球。在同样的培养条件下 *G. sp.*的菌球具放射状“毛刺”,直径多在4—7毫米,还经常可以见到从大的菌球上长出几个小的菌球来;

灵芝(*G. lucidum*)菌球表面没有明显的“毛刺”,多数菌球直径在3—4毫米;紫芝菌球更小一些,表面具短“刺”;树舌有柄变种菌球表面光滑,中空,似球形的薄膜,直径多在4—5毫米(图14—7)。

菌球的形状和大小还受振荡机械方面的因素以及培养液酸碱度的影响。例如在pH4的培养液中 *G. sp.*菌球表面有许多羽状的毛毛;而在营养成分相同但pH值较高的培养液中,如pH7时,菌球变得很小而且表面的毛刺短甚至没有(见图18—9)。

二、培养基

以 *G. sp.* 为材料进行了一系列实验。

首先发现 *G. sp.* 在各种合成的培养基中几乎不生长。而在含有天然成分的培养基中则容易生长。所使用的基础培养基组分为:蔗糖2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.3%、 MgSO_4 0.15%、 CaCO_3 0.2%、维生素 B_1 0.001%。

(一) 氮源

以植物性原料做为氮源的试验证明,花生饼粉较好,黄豆饼粉稍次,玉米粉较差。而玉米粉的一半用花生饼粉代替也能得到很好的效果(表1)。

用不同量的花生饼粉进行试验的结果

表1 不同的植物性原料对菌体生长的影响

培养基	花生饼粉 2%	黄豆饼粉 2%	玉米粉 2%	麸皮 2%	玉米粉 1%+ 花生饼粉 1%
生长密度*	+++	++	++	++	+++
菌丝干重(%)**	1.186	0.941	0.806	-***	1.368

* 目测生长密度记载方法为: +示菌球少,仅占摇瓶底部薄薄一层; ++示菌球较多,约占培养基体积的一半; +++示菌球多,密布整个培养液。

** 菌丝干重(%),指每100毫升发酵液所含菌丝的干重。

*** 由于残余麸皮不易从菌丝上洗净,求得正确的数据。

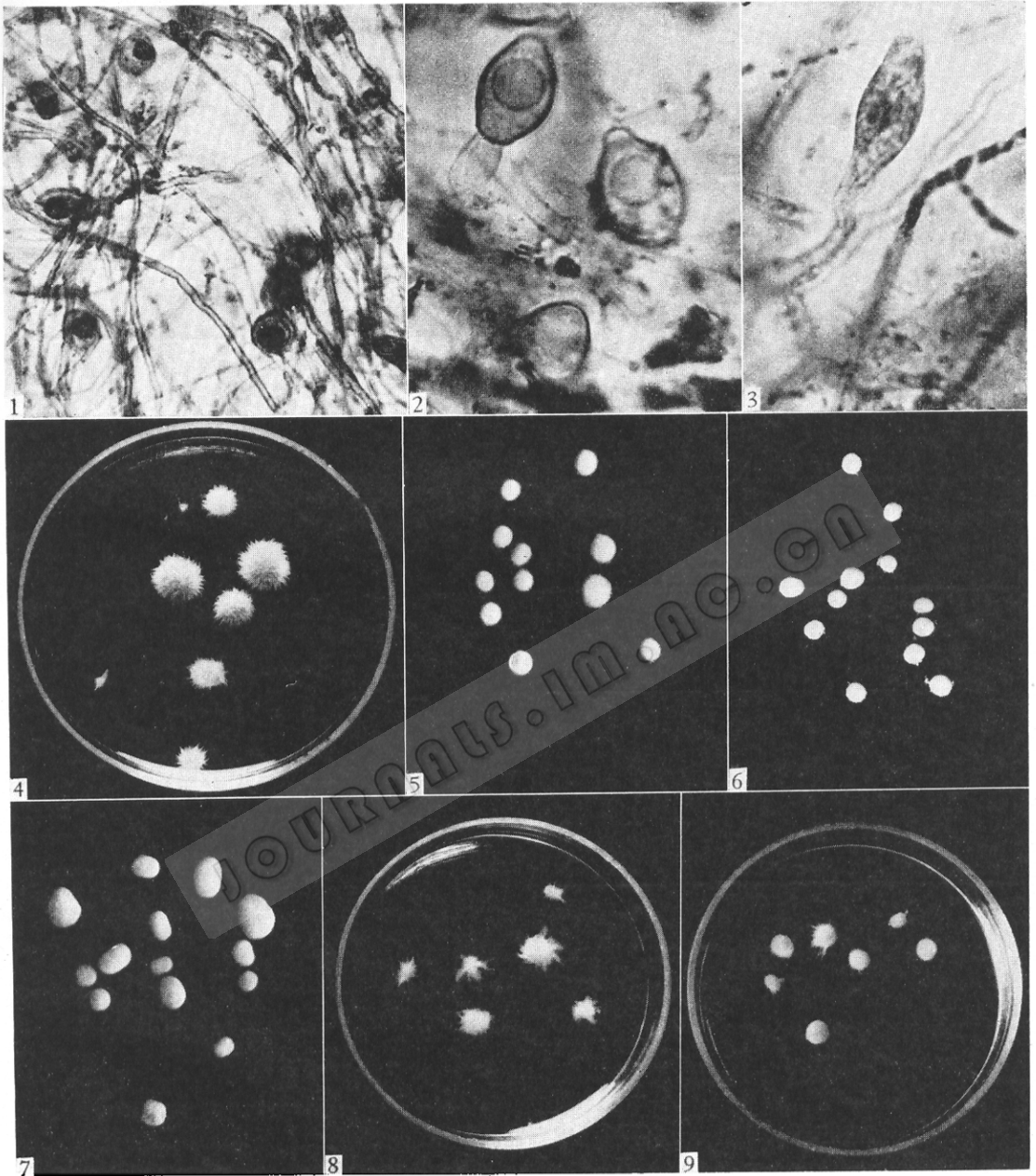


图1 灵芝的厚垣孢子和菌球

1. *Ganoderma* sp. 的菌丝及厚垣孢子($\times 400$)
2. *G.* sp. 的厚垣孢子。有的是与菌丝相连,有的是游离存在的($\times 1000$)
3. 形成过程中的 *G.* sp. 厚垣孢子
4. *G.* sp. 的菌球(原大)
5. 灵芝 (*G. lucidum*) 的菌球(原大)
6. 紫芝 (*G. japonicum*) 的菌球(原大)
7. 树舌有柄变种 (*G. applanatum* var. *gibbosum*) 的菌球(原大)
8. pH 4 的培养液中 *G.* sp. 菌球表面具羽毛状的结构
9. pH 7 的培养液中 *G.* sp. 菌球小而且“毛刺”短、少、甚至没有

(表2)表明,在缺少花生饼粉时,虽然培养基中还有0.5%的硫酸铵做为氮源,菌体仍然不能生长。随着花生饼粉含量的增加,菌体的生长量增大,含氮量不断增高。菌丝含氮量高标志着细胞质浓厚、细胞处于分裂与生长的活跃状态。因此采用高浓度的花生饼粉,发酵时间势必延长。从花生饼粉的利用率来看,利用较高浓度花生饼粉,虽然多得到一些菌体,但很不经济。而实际测定结果也指出此时培养基中还有不少残余的花生饼粉。本实验经7天结束发酵,花生饼粉的用量以2%为适。如采取加大通气量等措施加速生长,则可适当增加花生饼粉的用量。

表2 花生饼粉含量对菌体生长的影响

花生饼粉含量(%)	0	1	2	3	4
菌体生长指标					
生长密度	—	++	++	+++	+++
菌丝干重(%)	0	0.762	0.999	1.172	1.563
菌丝含氮量(克氮/克干菌丝)	—	0.028	0.037	0.038	0.039
菌丝干重(%)	—	0.76	0.49	0.39	0.39

此外我们还试用了蛋白胨、酵母粉等做为有机氮源,结果并未增加菌体的数量,而且这些原料比较昂贵,大量生产时不用为好。

(二) 碳源

除了植物性的原料中有一部分可利用的碳源外,在培养基中还要加入适当的糖类。比较葡萄糖和蔗糖对菌丝生长的影响,结果没有显著差异,而糖浓度对菌丝生长却有明显的作用。糖浓度增加时,菌体的生长量也随着增加,但培养基的利用率却显著下降了。从菌体干物质的累积占培养基中有机物总重量的百分数看来,蔗糖浓度高于2%并不适合(表3)。

表3 蔗糖浓度对深层培养的影响

编号	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
蔗糖浓度(%)*	0	1	2	3	4	5	6	7
生长密度	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
菌丝干重(%)	0.87	0.91	1.03	1.11	1.29	1.44	1.61	1.88
残糖(%)	0.2	0.6	0.9	1.5	2.1	2.2	2.3	3.0
菌丝干重/培养基有机物总重×(%)	45.4	30.3	25.6	22.2	21.5	20.6	20.1	20.9

* 基础培养基加花生饼粉2%和不同浓度的糖。

另外,糖的试验还表明,如果不加蔗糖, *Ganoderma* sp. 还可以从植物性原料中取得碳源而生长。这个情况见于处理I。在培养基中加入淀粉而不加其它有机氮源,即完全缺少有机氮,则不能生长。可见对于 *G.* sp. 深层培养来说,有机氮源是特别重要的。

(三) 无机盐类

对培养基中的几种盐类进行了试验,发现自来水和花生饼粉等原料中所含的微量无机盐即可满足 *G.* sp. 生长的需要。但是某些无机盐对菌体干物质的累积是有影响的。例如采用培养基配方为:花生饼粉2%、蔗糖2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07%、 CaCO_3 0.2%,则菌体干重可达1.434克/100毫升发酵液。如果减去其中全部盐类,仅用自来水配制,菌体干重为1.104克/100毫升发酵液。如将上述培养基中的盐类加大一倍,菌体干重略增,为1.516克/100毫升发酵液。但是,在生产中使用大量无机盐是不经济的,而且给下一步的制剂带来一定的困难。我们认为选用上述配方中的无机盐是适宜的。

利用缺少某一盐类的培养基,观察对菌体密度的影响,发现在缺少磷酸盐的培养基中菌体生长较差,所以培养液以磷酸

盐构成缓冲系统是比较妥当的。

在培养过程中培养基变酸。为了在一定时间内维持 pH 值，而不致于酸性过大，加入适量的碳酸钙是必要的。加入碳酸钙达到 0.4% 时，培养基的 pH 值下降过慢，发酵过程就将延长。如果碳酸钙减少到 0.1%，经过 3 天的培养 pH 值便降到 3.8—4.1，从而限制了菌丝的生长。我们认为碳酸钙的用量以 0.2% 为适。

三、培养条件

(一) 温度

菌丝在斜面上培养 68 小时后生长长度的测定指出，*G. sp.* 菌丝生长以 30℃ 为适(图 2)。深层培养时，温度低于 27℃ 菌丝生长显著延缓；高于 30℃ 则菌丝容易衰老，并可看到不少趋于自溶的菌丝，发酵液颜色变得较深。

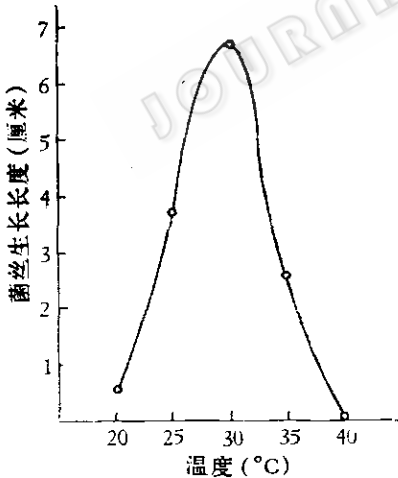


图 2 *G. sp.* 菌丝生长的温度曲线

(二) pH

以缓冲液配制不同 pH 值的培养液，比较 pH 值对 *G. sp.* 菌体生长的影响。各组培养基的营养组成是一致的。从结果(图 3)可以看出，pH 4—5 时菌体生长最

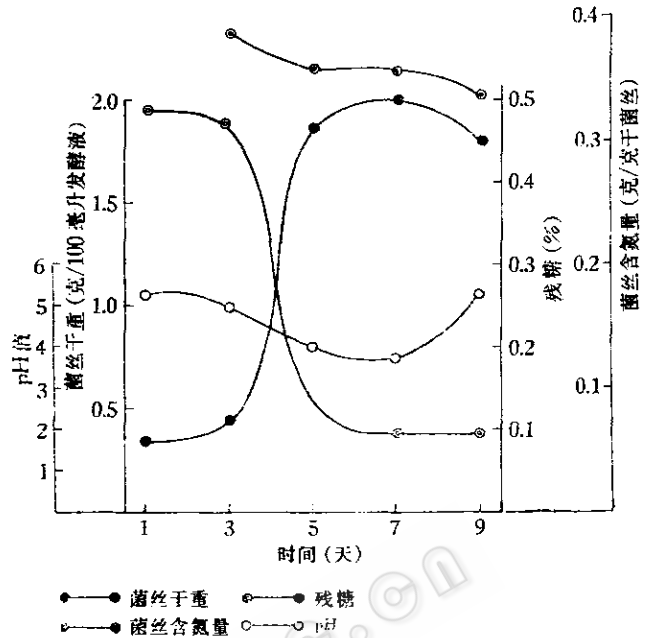


图 3 *G. sp.* 培养过程中菌体生长及养分的消耗(温度 25℃)

为迅速；pH 3 时菌丝不能生长；pH 7—8 时生长非常缓慢。由于菌丝在代谢中产酸导致培养液 pH 降低，所以采用 pH 7—8 的培养液，延长培养时间，菌体的数量也会增加。文卡塔罗扬^[5]在研究灵芝(*G. lucidum*)寄生于槟榔树上造成危害时也发现 pH 值对灵芝菌丝生长有很大影响。

灵芝的培养通常采用自然 pH，即 5.8—6.0 之间。*G. sp.* 的培养指出，从第 3 天起 pH 降到最适生长的数值，到第 7 天 pH 降至 3.8，此时便可终止发酵。

(三) 通气和搅拌

在摇瓶培养时，500 毫升锥形瓶装量 150 毫升可以满足 *G. sp.* 菌体生长所需要的气量。减少培养液装量并不增加菌体干重。

在发酵罐中培养时，投料为罐容积的 2/3，通气量 1:1—1:0.5，搅拌器转速 100—150 次/分。过高的转速会把菌丝打得很碎，不利于生长。培养罐不具机械搅拌时可以适当加大通气量，达到使发酵液

上下充分翻动的程度。

(四) 光照

灵芝属的子实体培养以散射光照为宜,但菌丝生长不需要光线。*G. sp.* 和其他一些种的深层培养实验表明,强光对菌丝生长有明显的抑制作用,深层培养菌丝在黑暗或微弱光线下进行较宜。

(五) 菌种及接种量

1. 菌种: 冷藏的斜面菌种用于液体培养前先活化(27°C—30°C)一天左右,可以加速菌丝生长。用液体培养的菌丝体做种子时,选择3—4天的菌龄为适。这时菌丝正进入旺盛生长的时期。

2. 接种量: 用斜面菌种接500毫升摇瓶时接入1平方厘米的一块菌丝即可。用摇瓶接发酵罐时接种量为1%。

四、培养过程

为了掌握 *G. sp.* 发酵过程,在不同的阶段测定菌丝生长和养分消耗的情况。结果(图3)表明,开始发酵1—3天内菌丝生长缓慢,糖的消耗也少,pH变化不大。从第3天起进入旺盛生长的阶段,菌体干物质急剧积累,发酵液pH值下降。当pH达

4—5时正是菌丝生长的最适环境,这时糖的消耗剧增。由于细胞的伸长,菌丝含氮水平逐渐降低。上述变化过程到第5天开始减缓,第7天以后菌体开始自溶,造成发酵液pH值回升、菌体干重减少、菌丝含氮量进一步下降。因此在第7天终止发酵是合适的。这是在摇瓶中进行的实验,在发酵罐中培养可以提前1—2天。

终止发酵时,由于花生饼粉等原料的消耗,发酵液除去菌丝体后澄清,pH为3.8—4.1,残糖约0.13%。

进行分级发酵时也可以根据上述过程确定转罐的时间。

参 考 资 料

- [1] 中国科学院微生物研究所:《微生物在工业上的应用》(国外研究近况),第19—36页,科学出版社,1971。
- [2] Guha A. K. & Banerje A. B.: *J. Food. Sci. Technol. (Mysore)*, 8(2): 82—83, 1971。
- [3] 佐伯淑身,村上利雄,七字三郎:工业技术院发酵研究所研究报告,29: 1—21, 1966。
- [4] 上林 明·中台一雄:工业技术院发酵研究所研究报告,18: 87—100, 1960。
- [5] Venkatarayan, S. V.: *Phytopathology*, 26(2): 153—175, 1936。

STUDIES ON THE SUBMERGED CULTIVATION OF LING CHIH (*GANODERMA SP.*)

LIN ZHUNG-PING, SUN AN-TZE AND LIU YONG-AN

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Peking*)

This paper comprises a preliminary report on the morphology, the growth process and the submerged-culture conditions of *Ganoderma sp.* under study.

The medium with the following composition was found to be suitable for the submerged growth of the organism: 2% peanut cake meal, 2% sucrose, 0.25%

(NH_4)₂SO₄, 0.15% KH₂PO₄, 0.07% MgSO₄·7H₂O and 0.2% CaCO₃, with natural pH. The inoculated culture was incubated at 30°C for 6—7 days. Fermentation usually stopped when the pH decreased to 3.8—4.1 and the residual sugar content decreased to about 0.13%.