

杨宗渠,李长看,雷志华,等.以小麦为基质的灵芝固体发酵条件研究[J].江苏农业科学,2017,45(13):150-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.043

以小麦为基质的灵芝固体发酵条件研究

杨宗渠^{1,2},李长看^{1,2},雷志华¹,李玉华¹,曲金柱¹,高红云¹,罗青¹

(1. 郑州师范学院生命科学学院,河南郑州 450044; 2. 郑州师范学院生物物种资源研究中心,河南郑州 450044)

摘要:为筛选灵芝菌丝体生长的适宜环境条件和基质,以台湾灵芝和赤芝为材料,观察菌丝体在不同温度、pH 值、氮源、光照条件、基质下的生长情况。结果表明:台湾灵芝的最适生长温度为 25 ℃,培养基最适初始 pH 值为 5.0,最适氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,在黑暗中生长最好;赤芝的最适生长温度为 30 ℃,培养基最适初始 pH 值为 5.5,最适氮源为牛肉膏;台湾灵芝和赤芝菌丝体均在小麦 80%、谷子 10%、荞麦 10% 配方培养基质上生长最旺盛。

关键词:灵芝;菌丝体;培养条件;小麦

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0150-03

灵芝是我国传统的食药兼用真菌,是自然界珍稀的菌类。迄今为止,人们已经从灵芝中分离出 150 种化合物,如多糖、腺苷、有机锗、三萜等^[1]。野生的灵芝子实体资源少,加之不合理采挖,导致药源不足。灵芝子实体栽培要消耗大量木材,破坏森林资源,且灵芝子实体生产周期长、受气候条件影响较大、产量低而不稳。研究证实,发酵菌丝体与子实体成分一致^[2],为利用发酵工程技术生产灵芝菌丝体提供了理论基础。固体发酵生产灵芝菌丝体与子实体栽培相比,具有难度低、生产周期短、次生代谢产物积累时间长、培养料来源广泛等优点。魏龙等研究了接种量、料层厚度、初始酸碱度、发酵时间对灵芝固体发酵产物抗氧化活性的影响^[3]。张平等采用灵芝菌丝固体发酵枇杷叶,分析发酵前后枇杷叶中主要活性成分的变化^[4]。曲墨等报道了以中药渣和莲藕渣为基质的灵芝菌固体发酵条件^[5-6]。杜亚楠等在大豆固体培养基中接种富硒灵芝菌种,探索固体发酵生产游离氨基酸的工艺条件^[7]。付铭等以多糖及赖氨酸含量为指标,研究不同大米加量、装液量、培养基酸碱度和培养温度对灵芝菌丝体生长的影响^[8]。笔者以小麦为发酵基质,以菌丝生长速度为指标,研究不同菌株菌丝的生长特性,探索以小麦为基质的灵芝固体

发酵条件,旨在为将灵芝固体发酵技术应用于小麦深加工提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌株台湾灵芝从中国科学院微生物研究所引进,赤芝由中华供销合作社社昆明食用菌研究所提供。CP313 型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];DH-420 型电热恒温培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);LRH-300-G 型光照培养箱(广东省医疗器械厂);立式高压灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);PHSJ-5 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基 母种采用 PDA 加富培养基。固体培养基以小麦为主要原料,添加辅料制成培养基质。称取一定量的小麦、燕麦、玉米、荞麦、谷子、糙米、高粱,用凉水浸泡,放置冰箱 12 h 后煮沸,煮熟但不裂开,放凉至不黏手,按比例配制培养基质。

1.2.2 试验设计 设置 20、25、30、35、40 ℃ 等 5 个温度处理。将灵芝菌种接种到 PDA 平板加富培养基上,分别置于 5 种温度的恒温培养箱中培养,每个温度处理台湾灵芝、赤芝各接种 4 个培养皿。

设置 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 等 7 个 pH 值。采

收稿日期:2016-08-15

基金项目:河南省重点科技攻关项目(编号:102102110182)。

作者简介:杨宗渠(1964—),男,河南延津人,博士,教授,研究方向为生物资源利用与转化。E-mail: yangzq@163.com。

酮工艺及其抗氧化性[J].江苏农业科学,2016,44(8):366-369.

[14] Mohsen S M, Ammar A S. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 595-598.

[15] Chen R Z, Liu Z Q, Zhao J M, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 434-440.

[16] 孙美,黄艳菲,赵小燕,等.响应曲面法优化荞麦总黄酮的提取工艺[J].现代食品科技,2012,28(12):1714-1718,1742.

[17] 杨芳,杨万林,陈锦玉,等.苦荞壳总黄酮超声辅助醇提工艺的优化[J].食品与机械,2015,31(5):234-238.

[18] 张汇,鄢嫣,聂少平,等.黑灵芝不同部位多糖成分分析及抗氧化活性[J].食品科学,2011,32(1):56-61.

[19] Xiong S L, Li A L, Huang N, et al. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(3): 1273-1280.

[20] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 12[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914.

用 10% NaOH 或 10% HCl 将 PDA 加富培养基分别调整为不同酸碱度,每个 pH 值下台湾灵芝、赤芝各接种 4 个培养皿,放于最适温度下的恒温培养箱中培养。

设置奶粉、牛肉膏、蛋白胨、(NH₄)₂SO₄ 4 个处理。在 PDA 加富培养基中分别添加 2% 的不同氮源,每个处理接种 4 个培养皿,在最适温度下的恒温培养箱中培养。

设置光照、黑暗条件 2 个处理。将菌种接种到加富 PDA 培养基上,分别置于黑暗和 12 h 光照的恒温培养箱,在最适温度下培养。每个处理接种 4 个培养皿。

培养期间定期观察菌丝体生长情况,测量菌落直径。
以小麦为主要原料,添加不同比例的其他谷物,制成 5 种培养基质:A:小麦 80%、谷子 10%、荞麦 10%;B:小麦 70%、玉米 20%、糙米 10%;C:小麦 70%、高粱 20%、薏米 10%;D:小麦 60%、燕麦 20%、籼米 20%;E:小麦 100%。将培养基质装入 500 mL 菌种瓶,棉塞封口,121 ℃ 灭菌 2.5 h。每个菌株在每种培养基上接种 6 瓶,置于 25 ℃ 恒温培养箱中培养,培养 3 d 后摇动菌种瓶。观察灵芝菌丝的生长情况,并记录菌丝体长势及长满瓶的天数。

2 结果与分析

2.1 温度对灵芝菌丝体生长的影响

从表 1 可以看出,9 d 内,台湾灵芝的菌落直径均以 25 ℃ 最大,30 ℃ 次之,20、35 ℃ 下菌落直径较小,40 ℃ 下菌丝未生长。赤芝则是 30 ℃ 下菌落直径最大,其次分别是 25、35 ℃,20 ℃ 菌落直径最小,40 ℃ 下菌丝未生长。由此可知,台湾灵芝的最适生长温度为 25 ℃,赤芝在 30 ℃ 下生长最快。20、25 ℃ 下台湾灵芝菌丝生长速度比赤芝快,台湾灵芝菌丝洁白,赤芝菌丝稍微发黄;30、35 ℃ 下赤芝菌丝生长速度比台湾灵芝快,且赤芝菌丝发黄。

2.2 培养基酸碱度对灵芝菌丝体生长的影响

从表 2 可知,2 个灵芝菌株的菌丝在 pH 值 4.5~7.5 之间的培养基上均能生长。台湾灵芝在 pH 值 5.0~6.0 之间培养基上的菌落直径大于 pH 值 5.0 以下或 6.0 以上的培养基,pH 值为 5.0 时菌落直径最大,且菌丝浓密,长势旺盛,说明台湾灵芝菌丝体生长的最适 pH 值为 5.0。赤芝菌丝在同一 pH 值的培养基上菌落直径大于台湾灵芝,pH 值为 5.5 时赤芝菌落直径最大,长势好,菌丝洁白、浓密,说明赤芝菌丝生长的最适 pH 值为 5.5。

表 3 不同氮源下灵芝菌丝体生长情况

| 菌株 | 氮源 | 菌落直径(mm) | | | | | |
|------|---|----------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | 培养 5 d | 培养 6 d | 培养 7 d | 培养 8 d | 培养 9 d | 培养 10 d |
| 台湾灵芝 | 奶粉 | 3.3 | 6.7 | 10.0 | 17.3 | 25.3 | 31.5 |
| | 牛肉膏 | 7.0 | 9.0 | 15.0 | 21.0 | 28.0 | 36.0 |
| | 蛋白胨 | 7.5 | 12.0 | 17.5 | 24.5 | 31.5 | 37.0 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 14.0 | 21.0 | 30.0 | 38.0 | 46.5 | 55.0 |
| 赤芝 | 奶粉 | 8.6 | 23.3 | 30.0 | 39.3 | 48.7 | 60.7 |
| | 牛肉膏 | 21.0 | 38.5 | 56.5 | 77.0 | 95.0 | 116.0 |
| | 蛋白胨 | 17.0 | 27.5 | 37.5 | 50.5 | 62.0 | 73.5 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20.8 | 38.0 | 54.0 | 76.0 | 94.0 | 102.0 |

2.4 光照对灵芝菌丝体生长的影响

由表 4 可知,2 个供试菌株的菌丝在黑暗条件下的菌落

表 1 不同温度下灵芝菌丝体生长情况

| 菌株 | 培养温度(℃) | 菌落直径(mm) | | | | | |
|------|---------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 培养 4 d | 培养 5 d | 培养 6 d | 培养 7 d | 培养 8 d | 培养 9 d |
| 台湾灵芝 | 20 | 8.6 | 13.2 | 21.2 | 29.0 | 37.3 | 46.0 |
| | 25 | 27.5 | 36.5 | 49.0 | 59.0 | 67.0 | 71.0 |
| | 30 | 18.0 | 28.5 | 37.0 | 49.0 | 50.5 | 60.5 |
| | 35 | 14.5 | 15.0 | 16.0 | 16.5 | 18.0 | 19.0 |
| | 40 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 |
| 赤芝 | 20 | 1.0 | 4.5 | 9.0 | 12.5 | 20.0 | 28.0 |
| | 25 | 10.5 | 24.5 | 37.5 | 49.5 | 57.5 | 64.5 |
| | 30 | 31.5 | 46.6 | 70.0 | 84.0 | 95.3 | 100.0 |
| | 35 | 16.0 | 22.0 | 31.0 | 37.0 | 41.0 | 47.0 |
| | 40 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 | 未生长 |

表 2 灵芝菌丝体在不同酸碱度培养基上的生长情况

| 菌株 | pH 值 | 菌落直径(mm) | | | | | |
|------|------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 培养 4 d | 培养 5 d | 培养 6 d | 培养 7 d | 培养 8 d | 培养 9 d |
| 台湾灵芝 | 4.5 | 13.6 | 27.2 | 40.0 | 54.8 | 64.4 | 78.8 |
| | 5.0 | 20.5 | 33.5 | 49.5 | 64.0 | 82.0 | 93.3 |
| | 5.5 | 14.0 | 25.2 | 38.8 | 55.2 | 66.4 | 80.4 |
| | 6.0 | 11.0 | 23.0 | 35.0 | 52.5 | 67.3 | 84.0 |
| | 6.5 | 13.5 | 25.0 | 35.5 | 48.0 | 58.0 | 68.5 |
| | 7.0 | 12.7 | 19.3 | 26.0 | 33.3 | 42.7 | 49.3 |
| | 7.5 | 12.7 | 19.3 | 29.3 | 32.7 | 34.3 | 36.0 |
| 赤芝 | 4.5 | 23.3 | 40.0 | 60.0 | 80.0 | 88.0 | 105.0 |
| | 5.0 | 25.0 | 40.5 | 60.0 | 73.3 | 90.0 | 109.0 |
| | 5.5 | 25.0 | 48.5 | 64.5 | 83.0 | 100.0 | 116.0 |
| | 6.0 | 18.6 | 32.6 | 52.0 | 64.6 | 94.6 | 100.0 |
| | 6.5 | 17.0 | 30.0 | 49.0 | 61.3 | 81.3 | 95.3 |
| | 7.0 | 22.7 | 37.3 | 53.3 | 68.7 | 90.0 | 110.0 |
| | 7.5 | 22.0 | 36.7 | 51.3 | 67.3 | 81.3 | 95.0 |

2.3 氮源对灵芝菌丝体生长的影响

由表 3 可知,氮源对台湾灵芝菌丝生长有显著影响,在含有 (NH₄)₂SO₄ 的培养基上生长最好,菌落直径最大,生长旺盛,菌丝浓密,牛肉膏、蛋白胨次之,以奶粉作为氮源时菌落直径最小。由此可知,台湾灵芝菌丝对无机氮源 (NH₄)₂SO₄ 的利用能力较强。赤芝菌丝的菌落直径在牛肉膏为氮源的培养基最大,其次为 (NH₄)₂SO₄,奶粉、蛋白胨较小,说明赤芝菌丝生长的最适氮源为牛肉膏,赤芝对奶粉、蛋白胨的利用能力较弱。在相同氮源下,赤芝菌丝的菌落直径均大于台湾灵芝,说明赤芝对氮源的适应能力强于台湾灵芝。

直径均大于光照条件下,且黑暗条件下,菌丝长势旺盛,浓密、洁白;光照条件下,菌丝稀疏、长势弱。说明 2 个供试菌株的

菌丝均适宜在黑暗环境中生长。光照条件下,赤芝菌丝体生长速度较台湾灵芝缓慢,黑暗条件下,赤芝菌丝体的生长速度明显快于台湾灵芝。可见,与台湾灵芝相比,赤芝菌丝体生长对光照条件更为敏感。

表 4 光照对灵芝菌丝体生长的影响

| 菌株 | 光照条件 | 菌落直径(mm) | | | | | |
|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 培养 4 d | 培养 5 d | 培养 6 d | 培养 7 d | 培养 8 d | 培养 9 d |
| 台湾灵芝 | 光照 | 萌动 | 7.3 | 12.0 | 18.0 | 26.0 | 36.0 |
| | 黑暗 | 13.3 | 20.0 | 28.0 | 32.7 | 42.7 | 53.0 |
| 赤芝 | 光照 | 5.5 | 8.0 | 10.5 | 12.0 | 14.0 | 14.7 |
| | 黑暗 | 13.5 | 26.5 | 39.0 | 55.5 | 68.0 | 82.5 |

2.5 基质成分对灵芝菌丝生长的影响

分别在 5 种配方的固体培养基上接种台湾灵芝和赤芝,黑暗条件下培养,观察菌丝生长情况,结果如表 5 所示。台湾灵芝在 A 培养基上生长速度最快、长势强,B 培养基次之,D、E 培养基上菌丝生长速度最慢、长势弱。赤芝菌株在整个培养过程中菌丝泛黄,A 基质上的菌丝生长速度最快,且菌丝浓密,B 基质上菌丝生长最慢,菌丝较稀疏,C、D、E 基质上菌丝生长速度相差不大,C 基质上菌丝较 D、E 基质上浓密。由此可知,台湾灵芝、赤芝的最适培养基配方均为 A 基质。

表 5 不同基质成分对灵芝菌丝体生长的影响

| 菌株 | 基质配方 | 菌丝长势 | 长满瓶时间 (d) |
|------|------|-----------|--------------|
| 台湾灵芝 | A | 菌丝洁白、较浓密 | 15 |
| | B | 菌丝洁白、较浓密 | 17 |
| | C | 菌丝洁白、浓密 | 20 |
| | D | 菌丝洁白、稀疏 | 23 |
| | E | 菌丝洁白、稀疏 | 22 |
| 赤芝 | A | 菌丝稍发黄、较浓密 | 17 |
| | B | 菌丝稍发黄、稀疏 | 23 |
| | C | 菌丝稍发黄、较浓密 | 20 |
| | D | 菌丝稍发黄、浓密 | 21 |
| | E | 菌丝稍发黄、浓密 | 22 |

3 结论与讨论

温度是影响灵芝菌丝体生长的重要因子之一。杜曾荣等报道,黑灵芝(*Ganoderma atrum*)菌丝体最适生长温度为 33℃^[9]。杨德等^[10]、谭才邓等^[11]、余有贵等^[12]研究均发现,赤灵芝菌丝体的最适生长温度为 27℃。本研究中,台湾灵芝、赤芝菌丝的最适生长温度分别为 25、30℃,与上述报道不一致,其原因是试验菌株不同、菌株的生长特性差异所致。培养基酸碱度通过影响细胞膜的通透性和营养物质的溶解度来影响营养物质的吸收,从而影响灵芝菌丝的生长。灵芝菌丝体生长适宜的 pH 值大多在 5.5~6.5,培养基的初始 pH 值应提高,因为培养基在灭菌后 pH 值会降低,同时菌丝体在生长过程中会产生有机酸而使 pH 值减小^[13]。本研究中,台湾灵芝培养基最适初始 pH 值为 5.0,赤芝最适初始 pH 值则为 5.5,据此认为,菌丝体生长中产生的有机酸和灭菌过程对培养基 pH 值影响很小,应将固体发酵基质初始 pH 值调整到 5.0~5.5。2 个菌株的菌丝体在光照条件下生长受到不同程

度的抑制,与前人报道^[10,12]一致。

灵芝菌丝体对氮源的适应能力较强,但对不同种类氮源的利用能力不同。与现有报道^[13]不同,本研究中,台湾灵芝利用无机氮(NH₄)₂SO₄的能力大于蛋白胨、牛肉膏、奶粉等有机氮,赤芝利用(NH₄)₂SO₄的能力大于蛋白胨和奶粉,其原因可能是 2 个菌株菌丝体分泌的催化无机氮合成某些必需氨基酸的酶类活性较强,但其机理还有待进一步研究。小麦富含淀粉、蛋白质、脂肪、膳食纤维、矿物质、钙、铁、维生素等成分,可为灵芝菌丝体生长提供必需的碳源、氮源、微量元素、微量活性物质,2 个菌株的菌丝体在以小麦为主要原料的培养基上生长良好,说明小麦作为灵芝固体发酵基质是适宜的。由于灵芝固体发酵是以获得灵芝多糖等功能成分为目的,所以还需进一步研究培养条件对菌质中灵芝多糖含量的影响。同时,发酵过程中菌丝分泌的酶类会催化淀粉、蛋白质等营养成分的水解,灵芝固体发酵菌质中营养成分的变化也需要进行深入研究。

致谢:郑州师范学院生命科学学院生物科学专业学生杨晶晶、王利红、刘旭、孟翠、李岩参加部分研究工作,在此表示感谢!

参考文献:

[1] 张丽霞,张雅君,张丽萍. 灵芝多糖的提取纯化及其免疫活性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(6):168-172.

[2] 李钦艳,钟莹莹,陈逸湘,等. 我国灵芝种质资源及生产技术研究进展[J]. 中国食用菌,2016,35(1):8-12,20.

[3] 魏 龙,负建民,艾对元,等. 提高灵芝-当归双向固态发酵基质抗氧化活性的条件优化研究[J]. 食品工业科技,2014,35(16):160-165.

[4] 张 平,李 晔,陈 婵,等. 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶主要活性成分的影响[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(16):242-246.

[5] 曲 墨,邱智东,王伟楠. 灵芝菌固体发酵三七药渣工艺研究[J]. 长春中医药大学学报,2016,32(2):263-265.

[6] Yin Y Q, Liu M Y, Wu J X, et al. Optimization of medium composition for soluble dietary fibre production by *Ganoderma lucidum* using lotus root pomace[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 2014,84(10):1225-1230.

[7] 杜亚楠,涂晓嵘,胡志斌,等. 大豆富硒灵芝菌固体发酵产氨基酸工艺的优化研究[J]. 江西农业大学学报,2012,34(5):1043-1048.

[8] 付 铭,江 洁,狄文婷,等. 大米为基质灵芝菌丝体固态发酵条件的优化[J]. 食品工业科技,2014,35(2):186-191.

[9] 杜曾荣,常继东. 黑灵芝菌丝体培养条件的初步研究[J]. 食用菌,2007,29(1):4-6.

[10] 杨 德,周 明,郭 鹏,等. 灵芝发酵豆渣培养条件优化[J]. 湖北农业科学,2013,52(24):6135-6138.

[11] 谭才邓,廖延智,邱玉美,等. 利用糖蜜培养灵芝菌丝工艺条件优化[J]. 中国调味品,2012,37(11):29-31,42.

[12] 余有贵,李忠海,黄国华,等. 响应面设计法优化蕨渣基质的灵芝培养条件[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(12):37-42.

[13] 邓功成,周 川,王文飞,等. 灵芝菌丝体发酵条件优化研究[J]. 广东农业科学,2013,40(21):96-99.