

利用三七渣固态发酵灵芝菌的研究*

谭显东 胡 伟 王 浪 羊依金 郭俊元 彭 兰

(成都信息工程学院资源环境学院, 四川 成都 610225)

摘要 以川芝 6 号为发酵菌种,对三七渣固态发酵灵芝菌的培养基制备条件进行了研究和优化。结果表明,优化的培养基制备条件为采用过 60 目筛的三七渣,酵母粉添加量 5%(质量分数,下同),磷酸二氢钾添加量 0.025%,培养基含水量 70%,不调节初始 pH。在此条件下进行灵芝发酵,发酵培养物中灵芝菌丝体的质量分数最高可达 31.27%。

关键词 三七渣 灵芝 饲料 发酵

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2015.07.012

Study on fungus of *Ganoderma lucidum* production from notoginseng residues by solid-state fermentation TAN Xian-dong, HU Wei, WANG Lang, YANG Yijin, GUO Junyuan, PENG Lan. (College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu Sichuan 610225)

Abstract: Taking *Ganoderma lucidum* (Chuan Zhi No.6) as the fermentation strain, the preparation condition of culture medium of solid-state fermentation from notoginseng residues was optimized. Results showed that the optimized conditions were particle size of notoginseng residues as 60 mesh, yeast powder 5% (mass fraction), potassium dihydrogen phosphate 0.025% (mass fraction), moisture content 70%, natural pH. Under this condition, the mass fraction of *Ganoderma lucidum* mycelium in fermenting medium could reach 31.27%.

Keywords: notoginseng residues; *Ganoderma lucidum*; feed; fermentation

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国著名的药用真菌,含有多种复杂的化学组分,其主要的生物活性物质是灵芝多糖和灵芝酸,具有广泛的药理活性^[1]。灵芝除了可以作为保健品和药品的原料使用外,近年来应用领域还被拓展到了养殖业。有研究表明,将灵芝菌的固体发酵培养物作为饲料添加剂使用,可以提高肉鸡的抗氧化性能、免疫功能和生长性能^[2],可以改善鲫鱼的非特异性免疫功能,促进其生长,增强代谢^[3],还可以促进断奶仔猪的生长和免疫活性^[4]。由于野生灵芝资源有限,目前我国主要靠人工培养来满足市场需求。

三七(*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen)是一味传统中药,主要药用成分是具有广泛生理活性的皂苷。目前,中成药厂通常采用水提醇沉工艺从三七根中提取三七总皂苷,提取后的三七渣含水量较高,将其集中堆放在固定区域容易腐败变质、散发臭气,常年风吹雨淋容易造成空气和水体污染,同时还占用大面积土地;将其进行焚烧或填埋处置,费用较高,同时也造成资源浪费。三七渣中富含淀粉、粗蛋白、粗脂肪、维生素 B₂、维生素 E、17 种氨

基酸、14 种微量元素、9 种脂肪酸以及残余皂苷、三七多糖、三七黄酮等药用组分^[5],适合作为发酵基质使用。按照“双向发酵”理论^[6-8],以三七渣为原料固态发酵生产灵芝,可以获得具有独特功能的药性菌质,将其作为饲料添加剂使用,可以实现三七渣的资源化利用、减少固体废弃物的排放。

本研究以川芝 6 号为发酵菌种,对三七渣固态发酵灵芝菌的培养基制备条件进行了研究和优化,以期获得较合适的发酵培养基及制备条件,为后续发酵工艺条件的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌 种

川芝 6 号(国品认菌 2007045,川审菌 2004007)由四川省农业科学院土壤肥料研究所微生物室提供。

1.2 三七渣

三七渣由四川省某中成药厂提供,湿物料经烘干、粉碎、过 60 目筛后,置于干燥器,备用。本次实验所用渣中各主要成分的质量分数如下^[9]:粗蛋

第一作者:谭显东,男,1973 年生,博士,教授,主要从事“三废”处理及资源化研究。

* 四川省科技支撑计划项目(No.2008sz0129)。

白12.28%、真蛋白 9.97%、粗淀粉 33.13%、还原糖 1.37%。若无特别说明,药渣质量均以干物料计。

1.3 培养基

平板培养基:土豆 20 g、葡萄糖 2.0 g、蛋白胨 0.2 g、酵母粉 0.3 g、磷酸二氢钾 0.100 g、硫酸镁 0.06 g、蒸馏水 100 mL、琼脂粉 2.0 g, 121 °C 灭菌 30 min。用于川芝 6 号菌种的扩大培养。

种子液培养基:土豆 20 g、葡萄糖 2.0 g、蛋白胨 0.2 g、酵母粉 0.3 g、磷酸二氢钾 0.100 g、硫酸镁 0.06 g、蒸馏水 100 mL, 121 °C 灭菌 30 min。用于川芝 6 号种子液的制备。

实验所用三七渣固态发酵培养基的基本组成:过 60 目筛的三七渣 10.00 g、酵母粉 0.3 g、培养基初始含水量为 60%, 121 °C 灭菌 1 h。用于固态发酵灵芝菌。该培养基的具体组成会随实验需要而有所变化。

1.4 实验方法

1.4.1 菌种扩大培养

将川芝 6 号菌种接入平板培养基中,于 28 °C 下恒温培养 7 d。

1.4.2 种子液的制备

用打孔器在平板培养基的边缘打取 0.5 cm² 的川芝 6 号菌丝块,接入装有 100 mL 种子液培养基的 250 mL 锥形瓶,置于恒温空气浴振荡器,在 150 r/min、28 °C 条件下培养 4 d。

1.4.3 三七渣固态发酵灵芝菌

将川芝 6 号孢子接种至三七渣固态发酵培养基恒温培养(除特别说明外,培养温度为 28 °C、培养时间为 10 d、接种量为 15%(体积分数))。

(1) 单因子实验

分别考察三七渣固态发酵培养基的酵母粉添加量、磷酸二氢钾添加量、含水量、初始 pH、三七渣粒径等因素对利用三七渣固态发酵灵芝菌的影响。

(2) 正交实验

在单因子实验的基础上,选择酵母粉添加量、磷酸二氢钾添加量、含水量这 3 个对发酵效果影响比较显著的因素,进行三因素三水平正交实验,实验设计如表 1 所示。

1.4.4 发酵培养物的干燥和粉碎

待发酵结束,将发酵培养物置于热风循环烘箱中 60 °C 烘干至恒量,再用中药渣分析研磨机粉碎,过 60 目筛,装袋封存,作为分析用样品。

每一种实验条件下都采用 3 个平行样,取平均值进行分析。

表 1 正交实验设计¹⁾
Table 1 Orthogonal experimental design

实验 编号	因素		
	酵母粉添加量 (A)/ %	磷酸二氢钾 添加量(B)/ %	含水量 (C)/ %
1	3	0.125	50
2	3	0.250	60
3	3	0.375	70
4	5	0.125	60
5	5	0.250	70
6	5	0.375	50
7	7	0.125	70
8	7	0.250	50
9	7	0.375	60

注:1)均以质量分数计,下同。

1.5 灵芝菌丝体含量的测定

1.5.1 灵芝菌丝体的获得

灵芝菌菌丝体的获得方法与种子液的制备方法相同¹⁰。待培养出大量菌丝体后,用 8 层纱布过滤发酵液,并用蒸馏水充分冲洗发酵过滤物以洗涤上面所残留的营养物质。最后将发酵过滤物置于 65 °C 烘箱中烘干至恒量,研磨并包装封存,用于灵芝菌丝体质量标准曲线的制作。

1.5.2 标准曲线绘制

精密称取 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 g 按 1.5.1 节所述方法所制得的灵芝菌丝体,加入 25 mL 5%(体积分数,下同)的三氯乙酸溶液,置于恒温水浴锅中 80 °C 提取 25 min,提取期间每隔 5 min 搅拌 1 次,待提取结束后用流水冷却。最后于 8 000 r/min、4 °C 下离心 15 min。取一定体积的上清液,用 5% 的三氯乙酸溶液稀释 5 倍,再以 5% 的三氯乙酸溶液为空白参比,用 1 cm 比色皿,在紫外分光光度计上于波长 260 nm 处测定其光密度(OD)。以 OD 为横坐标、菌丝体质量为纵坐标,绘制标准曲线。

1.5.3 灵芝菌丝体含量的计算

准确称取 0.25 g 经干燥、粉碎后的发酵培养物,按照 1.5.2 节所述方法进行提取,以未经发酵的三七渣原料按照相同方法提取的提取液作空白参比,用 1 cm 比色皿,在紫外分光光度计上于波长 260 nm 处测定发酵培养物提取液的 OD,再按照 1.5.2 节所制标准曲线查出对应的灵芝菌丝体质量(m_1 , g),计算发酵培养物中灵芝菌丝体的质量分数(y , %).

$$y = m_1 / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_0 为发酵培养物质量, g。

2 结果与讨论

2.1 单因子实验结果

2.1.1 酵母粉添加量的影响

适宜的 C/N 对促进菌丝体的生长很重要,三七

渣中淀粉含量较高,而氮源相对缺乏,需要适量补充氮源。与无机氮源相比,有机氮源更有利于灵芝产酶和菌丝体的生长^[11-12]。本研究选择酵母粉作为氮源,在三七渣固态发酵培养基中按 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%(酵母粉质量/干三七渣质量)的比例添加酵母粉,考察氮源添加量对发酵效果的影响,结果见图 1。

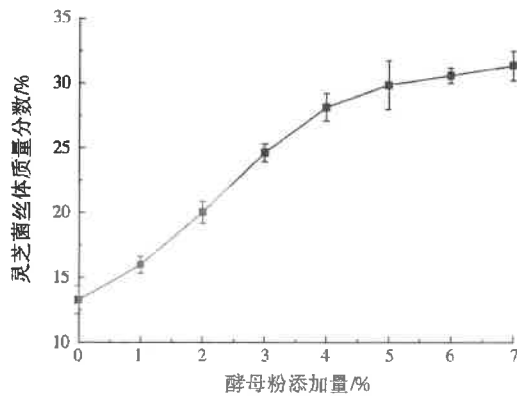


图 1 酵母粉添加量对发酵效果的影响
Fig.1 The influence of the additive amount of yeast powder on fermentation effect

由图 1 可见,在酵母粉添加量为 0~4%时,随着添加量的增大,发酵培养物中灵芝菌丝体的含量增长很快,当添加量超过 4%后,灵芝菌丝体含量的增势趋缓。可见,添加适量的氮源能促进灵芝菌丝体的生长。在相关研究中也发现,培养基适宜的 C/N 对菌丝生长、多糖产生以及产酶都具有重要的调节作用^[13-15]。

2.1.2 磷酸二氢钾添加量的影响

磷是核酸、蛋白质和三磷酸腺苷(ATP)等重要细胞物质的组成成分。磷有利于糖代谢的进行,因此能够促进微生物的生长繁殖,但磷过量时,许多产物的合成会受到抑制。在三七渣固态发酵培养基中分别按 0、0.125%、0.250%、0.375%、0.500%、0.625%(磷酸二氢钾质量/干三七渣质量)的比例添加磷酸二氢钾,考察磷源添加量对发酵效果的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,磷酸二氢钾添加量为 0.250%时,发酵培养物中灵芝菌丝体的含量最高,比不添加时高出了近 50%,这说明适量的添加磷源对灵芝的生长具有促进作用。磷元素是细胞结构和辅酶的重要组成成分,并参与氧化磷酸化反应;钾元素除了可以在酶促反应中作为辅助因子或激活剂以外,还会影响细胞内外的渗透压。在以麸皮为主的固态发酵培养基上接种灵芝菌球进行发酵,结果表明,磷酸二氢

钾的加入能促进灵芝多糖的产生^[16]。但是,过量添加磷酸二氢钾会使得灵芝细胞内外的渗透压增大,从而抑制其生长繁殖。

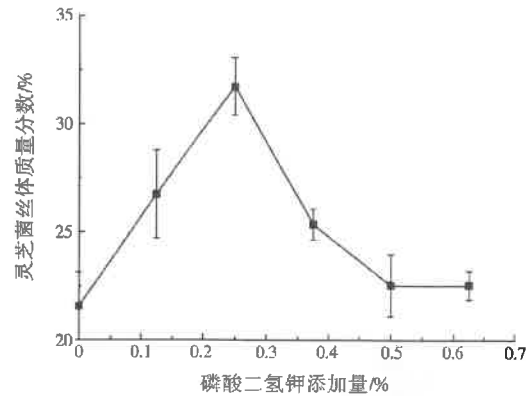


图 2 磷酸二氢钾添加量对发酵效果的影响
Fig.2 The influence of the additive amount of potassium dihydrogen phosphate on fermentation effect

2.1.3 培养基含水量的影响

水在固态发酵中具有重要的意义,基质的性质、最终产物类型以及微生物的需求共同决定所需要的基质含水量。含水量将影响基质的孔隙度,从而对发酵热的逸散、传氧、代谢产物的传递以及基质中营养物质的溶出产生影响。当基质含水量过低时,不足以维持灵芝菌丝体生长之需,其生长受到限制;当含水量过高时,基质物料易黏结成块状,降低了孔隙率,影响整个固态发酵体系的传质、传热与气体交换,限制了灵芝菌丝体的生长。将三七渣固态发酵培养基的含水量控制在 40%、50%、60%、70%、80%,考察培养基含水量对发酵效果的影响,结果如图 3 所示。

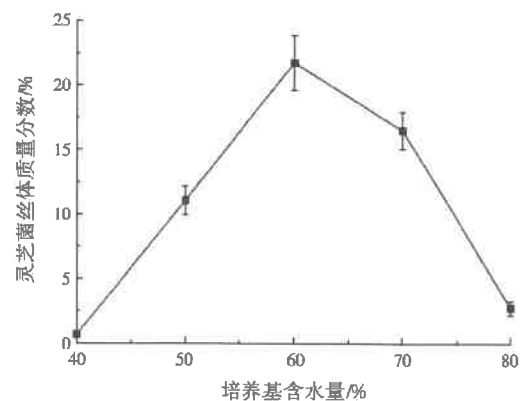


图 3 培养基含水量对发酵效果的影响
Fig.3 The influence of the moisture content of culture medium on fermentation effect

由图 3 可见,在三七渣固态发酵培养基的含水量为 60%时,发酵培养物中灵芝菌丝体的含量最高,这与灵芝固态发酵豆腐渣产灵芝多糖的实验结

果^{[17]1856-1867}接近。表明培养基合适的含水量能促进灵芝菌丝体的生长与繁殖。在三七渣固态发酵灵芝菌过程中,培养基含水量的过高或过低都将对发酵结果产生较大的影响。

2.1.4 培养基初始 pH 的影响

培养基的初始 pH 对菌体生长、代谢产物的合成以及各种酶的活力与稳定性均有比较大的影响。通常认为,调节基质的 pH 可以改变基质中有机化合物的离子化作用程度,对其进入细胞产生影响,从而抑制或促进微生物的生长。目前,固态发酵中培养基的 pH 控制问题还没有得到很好解决,LON-SANE 等^[18]认为,只要调节好培养基的初始 pH,固态发酵过程中就没有必要对微生物生长环境的 pH 加以测控。因此,本研究也考察了培养基初始 pH 对三七渣固态发酵的影响,结果如图 4 所示。

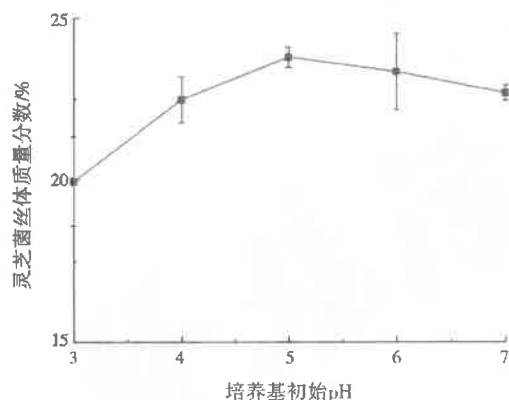


图 4 培养基初始 pH 对发酵效果的影响
Fig.4 The influence of the initial pH of culture medium on fermentation effect

由图 4 可知,在三七渣固态发酵培养基初始 pH 为 3~5 时,发酵培养物中灵芝菌丝体含量随 pH 升高而逐渐增大;pH 继续增大到 7 时,灵芝菌丝体的含量略微有所下降。在灵芝固态发酵豆腐渣产灵芝多糖的研究中,也发现适宜的 pH 为 5.0~5.5^{[17]1856-1867}。灵芝适宜在呈微酸性的培养基中生长,考虑到三七渣在自然状态下即为微酸性,因此用于灵芝发酵的三七渣固态发酵培养基保持其自然状态即可,不用调节初始 pH。

2.1.5 三七渣粒径的影响

粒径对基质的降解速率影响较大,选择合适粒径的基质可以促进固态发酵的生物转化过程^[19]。本研究使用分别过 20、40、60、80、100、120、140 目筛的三七渣考察了其粒径对发酵效果的影响,结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出,选择过 60 目或 80 目筛的三

七渣作培养基时,发酵效果较佳,发酵培养物中灵芝菌丝体质量分数可以达到 23.0% 以上。采用恰当粒径的基质颗粒能为微生物提供适宜的生长面积,更好的通气、散热和微生物呼吸条件,提高固态发酵时的反应速率,从而促进微生物对基质的利用和代谢产物的生成。

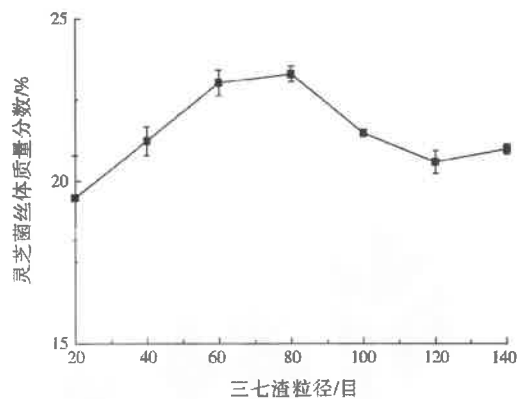


图 5 三七渣粒径对发酵效果的影响
Fig.5 The influence of the particle size of notoginseng residues on fermentation effect

2.2 培养基制备条件的优化

2.2.1 正交实验结果

在上述单因素实验的基础上,按照表 1 的正交实验设计进行了相关研究,结果如表 2 所示。

表 2 正交实验结果
Table 2 The results of orthogonal experiment %

实验编号	发酵培养物中灵芝菌丝体质量分数		
	平行组 1	平行组 2	平行组 3
1	7.71	7.26	7.40
2	29.66	30.13	28.76
3	26.67	25.63	25.44
4	14.63	15.07	14.33
5	30.86	31.50	31.46
6	10.72	10.11	9.83
7	26.06	24.88	25.32
8	13.74	13.42	12.99
9	25.90	25.77	26.54

2.2.2 方差分析

以发酵培养物中灵芝菌丝体含量为评价指标,采用 SPSS 17.0 软件对正交实验结果进行了方差分析,结果如表 3 所示。

由表 3 可见,酵母粉添加量、磷酸二氢钾添加量、培养基含水量,以及 3 者之间的交互作用对实验结果的影响都极显著($P=0$);由 F 可以看出,所考察的 3 个因素及其交互作用对实验结果的影响程度排序为培养基含水量>磷酸二氢钾添加量>交互作用>酵母粉添加量。由于交互作用极显著,可进行不同搭配的多重比较,以寻求最优实验条件组合^[20],

表 3 正交实验结果的方差分析
Table 3 The variance analysis of orthogonal test

变异来源	偏差平方和	自由度	方差	F	P
校正模型	1 927.529	10	192.753	908.628	0
截距	11 276.748	1	11 276.748	53 158.080	0
酵母粉添加量	41.603	2	20.801	98.057	0
磷酸二氢钾添加量	355.509	2	177.755	837.927	0
培养基含水量	1 448.773	2	724.386	3 414.724	0
交互作用	80.804	2	40.402	190.452	0
区组	0.841	2	0.420	1.981	0.170
误差	3.394	16	0.212		
总计	13 207.672	27			
校正的总计	1 930.923	26			

表 4 正交实验结果的多重比较
Table 4 Multiple comparison of orthogonal test

项目	子集						
	1	2	3	4	5	6	7
实验编号	1	7.46%					
	6		10.22%				
	8			13.38%			
	4				14.68%		
	7					25.42%	
	3					25.91%	
	9					26.07%	
	2						29.52%
	5						31.27%
P	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.120 0	1.000 0	1.000 0

结果见表 4(表中数据为发酵培养物中灵芝菌丝体质量分数)。

由表 4 可见,实验 5 得到的结果最好,因此在正交实验所考察的 3 个因素中,优化的实验条件搭配为:酵母粉添加量 5%、磷酸二氢钾添加量 0.250%、培养基含水量 70%。

3 结 论

在三七渣中添加适量的营养物质后可以作为灵芝菌的固态发酵培养基,优化的培养基制备条件为:采用过 60 目筛的三七渣、酵母粉添加量 5%、磷酸二氢钾添加量 0.025%、培养基含水量为 70%、不调节初始 pH。在此条件下进行发酵,发酵培养物中灵芝菌丝体的质量分数最高可达到 31.27%。

参考文献:

- [1] RUSSELL R, PATERSON M. *Ganoderma*: a therapeutic fungal biofactory[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(18): 1985-2001.
- [2] 邢瑞虎, 郭艳丽, 何玉鹏, 等. 灵芝菌培养物对肉鸡生长性能抗

- 氧化性能和免疫功能的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2013, 48(6): 29-33.
- [3] 周业飞, 张李阳, 张敦林. 新型饲料添加剂药性菌质对鲫鱼生长免疫与养殖水体的影响[J]. *水生态学杂志*, 2008, 1(2): 31-34.
- [4] CHEN S D, HSIEH M C, CHIOU M T, et al. Effects of fermentation products of *Ganoderma lucidum* on growth performance and immunocompetence in weanling pigs[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2008, 62(1): 22-32.
- [5] 杨智, 傅梅红, 杨立新, 等. 三七残渣营养成分分析[J]. *人参研究*, 1994(2): 28-29.
- [6] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. *中国食用菌*, 2002, 21(4): 3-6.
- [7] 庄毅, 洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(22): 1918-1919.
- [8] 陈洪章, 徐建. *现代固态发酵原理及应用*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [9] 谭显东, 胡伟, 段娅宁, 等. 三七渣发酵生产蛋白饲料的菌体生长动力学[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(4): 72-77.
- [10] 魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3 种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(1): 60-64, 69.

(下转第 70 页)