(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101724564 B
(45)授权公告日 2012.07.25

(21)申请号 200810172343.0

(22)申请日 2008.10.31

(73)专利权人 湖北工业大学
地址 430068 湖北省武汉市武昌区南湖李家墩特1号

(72)发明人 汤亚杰 柳巧宁

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限责任公司 11139
代理人 孙皓晨 费碧华

(51)Int.Cl.
C12N 1/14(2006.01)
C12P 19/04(2006.01)
C12R 1/645(2006.01)

(56)对比文件

CN 1316519 A,2001.10.10, 说明书摘要,权利要求1,2.

CN 101153299 A,2008.04.02, 说明书第3页第4行至第16行.

CN 1995322 A,2007.07.11, 权利要求1, 说明书第4页第19行和第5页第2行.

CN 1986827 A,2007.06.27, 说明书具体实施方式实施例1.

Ya-Jie Tang et al..Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and Tuber polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle Tuber sinense.《Process Biochemistry》.2008, 第43卷(第5期),Pages:576-586.

汤亚杰等.块菌活性成分及其人工栽培研究进展.《中草药》.2007, 第38卷(第4期), 第629-632页.

审查员 管冰

权利要求书 1 页 说明书 11 页

(54)发明名称

中间补料发酵生产块菌活性菌丝体和块菌多糖的方法

(57)摘要

本发明公开了一种中间补料发酵生产块菌活性菌丝体及块菌多糖的方法。本发明在块菌属液体深层发酵过程中,在适当的时间向培养体系中补加一定量的碳源和/或氮源,可有效促进菌丝体生长和块菌多糖的生物合成,提高生物量和块菌多糖的产量。本发明方法提高了设备利用率、进一步节省生产成本,为块菌属液体深层发酵生产活性菌丝体和块菌多糖的工业化生产奠定了基础。

CN 101724564 B

1. 一种中间补料发酵生产块菌活性菌丝体和块菌多糖的方法，包括斜面培养，一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵；其特征在于：在液体深层发酵过程中，向培养体系中补加碳源和/或氮源，当培养体系中的残糖浓度为 0.1-15 克/升时，补加碳源使发酵液中的残糖浓度维持在 30-80 克/升的水平；每间隔 2 天向培养体系中添加 1 次 1-20 克/升的蛋白胨和 1-30 克/升的酵母浸膏粉，共添加 1-3 次，在整个发酵过程中使培养体系中蛋白胨和酵母浸膏粉的总浓度分别达到 10-20 克/升和 20-50 克/升。

2. 按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述的碳源包括蔗糖、葡萄糖、麦芽糖或果糖。

3. 按照权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述的块菌选自黑孢块菌 (Tuber melanosporum)、中国块菌 (Tuber sinense)、印度块菌 (Tuber indium)、白块菌 (Tuber magnatum) 或夏块菌 (Tuber aestivum)。

4. 按照权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述的液体深层发酵培养基中含有适量的无机盐和维生素。

5. 按照权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述的液体深层发酵的培养条件为：培养温度为 20-30℃，回旋转速为 80-180 转/分钟。

中间补料发酵生产块菌活性菌丝体和块菌多糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及块菌的细胞培养方法，尤其涉及一种块菌活性菌丝体和块菌多糖的发酵生产方法，属于微生物发酵领域。

背景技术

[0002] 常见的块菌包括有黑孢块菌 (Tuber melanosporum)、夏块菌 (Tuberaestivum)、白块菌 (Tuber magnatum)、印度块菌 (Tuber indicum) 和中国块菌 (Tuber sinense)。其中，块菌 (Truffles) 属于子囊菌亚门 (Ascomycotina)、块菌目 (Tuberales)、块菌科 (Tuberaceae)、块菌属 (Tuber)。块菌是生长在森林地下的药食两用真菌，生物分类学上其主要活性成分有 α－雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等。块菌多糖具有抗肿瘤并参与免疫调节等功能。市场上的块菌主要来源于野生和半人工模拟栽培，新鲜黑孢块菌的价格在欧美市场上高达 1000 多美元 / 公斤，被喻为“地下黄金”和“黑色钻石”。块菌对生长条件要求苛刻，自然界中的块菌是与生长于石灰质等碱性土壤环境中树种（如：橡树、栎树）的根系共生，产量有限。采用半人工模拟栽培，块菌易受到其他外生菌根的影响，从接种到收获，一般需要 7-9 年的时间。

[0003] 块菌作为一种药食两用真菌，具有可培养性。发酵法生产块菌生物活性菌丝体和块菌多糖等有效成分，存在生产周期短、需要劳动力少以及受外部环境影响小等优点，相比于人工模拟栽培，是一种更为有效的方法。

[0004] 目前，采用发酵法生产块菌生物活性菌丝体和块菌多糖等有效成分主要是采用分批培养方法（分批培养：是指将微生物置于一定容积的培养基中，经过培养生长，最后一次收获的培养方式。在分批培养中，培养基一次加入，不予补充、不再更换。）。其生物量和代谢产物产量（块菌胞内多糖、胞外多糖）较低，设备的利用率低。

[0005] 公开号为 CN1986827A（公开日：2007 年 6 月 27 日）的中国专利申请公开了一种块菌多糖的制备方法，该方法所得到的块菌胞外多糖的产量最高为 2.30 克 / 升。公开号为 CN1995322A（公开日：2007 年 7 月 11 日）的中国专利申请公开了一种液体深层发酵生产块菌多糖的培养基，采用该培养基进行液体深层发酵相比于现有的培养基，块菌多糖的产量有了一定程度的提高。

[0006] 汤亚杰等 (Tang YJ, Zhu LL, Li DS, Mi ZY, Li HM. Significance ofinoculation density and carbon source on the mycelial growth and Tuberpolysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle Tubersinense. Process Biochemistry 2008, 43 :576-586.) 报道了一种块菌发酵培养的优化培养方法，该方法对接种量 (160、320、487、653 毫克细胞干重 / 升) 进行了筛选和优化，在最高接种量 (653 毫克细胞干重 / 升) 的条件下可使胞外多糖 (EPS) 的产量达到 1.97±0.08 克 / 升（胞外多糖采用乙醇沉淀法进行提取）。同时，该方法还披露了碳源种类（葡萄糖，麦芽糖，蔗糖，乳糖）对块菌液体发酵过程的影响，试验结果表明：蔗糖最有利于细胞量的提高 (14.97±0.08 克 / 升)。进一步考察了蔗糖起始浓度 (20-125 克 / 升) 对细胞量的影响，实验结果表明：在

20-80 克 / 升范围内，最大细胞量随蔗糖起始浓度的上升而增加，在 80 克 / 升时达到峰值 (22.81±1.03 克 / 升)，此时的胞内多糖也达到最大值 (2.92±0.20 克 / 升)，该方法中胞外多糖也采用乙醇沉淀法进行提取。

[0007] Liu 等 (Liu RS, Li DS, Li HM, Tang YJ. Response surface modeling thesignificance of nitrogen source on the submerged cultivation of Chinese truffleTuber sinense. Process Biochemistry 2008, 43 :868-876.) 考察了块菌发酵的碳氮源最适配比，利用统计学实验设计方法 (Box-Behnken design) 研究了葡萄糖，酵母膏，蛋白胨起始浓度对块菌液体发酵过程的影响。根据实验得出的数学模型可知 : 葡萄糖，酵母膏，蛋白胨的最适起始浓度配比分别为 60 克 / 升，30 克 / 升，10 克 / 升。在该条件下，最高的生物量以及 EPS 产量和 IPS 产量都是在预测的最适条件下获得，分别为 23.94±0.49 克 / 升，1.59±0.06 克 / 升和 1.48±0.26 克 / 升 (胞外多糖采用乙醇沉淀法进行提取)。

[0008] 汤亚杰等在另一篇文献中 (Tang YJ, Zhu LL, Liu RS, Li YY, Li DS, Mi ZY, Li HM. Quantitative response of cell growth and Tuber polysaccharidesbiosynthesis by medicinal mushroom Chinese truffle Tuber sinense to metal ion inculture medium. Bioresource Technology 2008, 99 :7606-7615.) 披露了微量元素种类及最适浓度对块菌发酵的影响 : 通过单因子实验方法对金属离子 (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} 和 Mg^{2+}) 进行了筛选和优化，证明了 50 毫摩尔 Mg^{2+} 和 10 毫摩尔 k^{+} 是最有利于胞外多糖 (EPS) 的产生。接着利用全因子实验设计 (Full factorialdesign)，考察了镁离子和钾离子的协同作用。实验结果表明，30 毫摩尔 Mg^{2+} 和 5 毫摩尔 K^{+} 是最适的组合，能使胞外多糖 (EPS) 产量达到最大值 5.86±0.21 克 / 升 (胞外多糖采用乙醇沉淀法进行提取)。

[0009] 综上所述，现有的块菌活性菌丝体和块菌多糖的发酵生产方法中，其活性菌丝体和块菌多糖的产量都有进一步提高的空间，如何提高块菌活性菌丝体和块菌多糖的产量、提高其设备利用率以及进一步节省生产成本，是现有的块菌活性菌丝体和块菌多糖的发酵生产方法亟待需要解决的技术问题。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种块菌活性菌丝体和块菌多糖的发酵生产方法，该方法能够有效提高块菌活性菌丝体和块菌多糖的产量。

[0011] 为了解决上述技术问题，本发明采用了以下技术方案 :

[0012] 一种块菌属 (Tuber) 活性菌丝体和块菌多糖的发酵生产方法，包括斜面培养、一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵 ; 其中，在液体深层发酵过程中向培养体系中补加碳源和 / 或氮源。

[0013] 作为本发明优选的技术方案之一 : 在液体深层发酵过程中，每隔 1-6 天向培养体系中补加 1-3 次 1-20 克 / 升的蛋白胨和 1-30 克 / 升的酵母浸膏粉，在整个发酵过程中使培养体系中蛋白胨和酵母浸膏粉的总投入浓度分别达到 5-20 克 / 升和 20-50 克 / 升。

[0014] 作为本发明优选的技术方案之二 : 当培养体系中的残糖浓度为 0.1-15 克 / 升时，补加碳源使培养体系中的残糖浓度维持在 0.1-80 克 / 升的水平。

[0015] 其中，所述的碳源可以为各种用于微生物培养的各种单糖或多糖，例如，可以是蔗糖、麦芽糖、葡萄糖或果糖等，其浓度优选为 10-50 克 / 升。

[0016] 本发明人经过进一步的试验发现，在液体深层发酵中补加碳源这一手段的同时辅之以补加一定量的氮源，可以更加有效的提高块菌活性菌丝体和块菌多糖的产量；作为一种优选的技术方案：当残糖浓度在 0.1-15 克 / 升时，补加碳源使培养体系中的碳源浓度维持在 0.1-80 克 / 升的水平，同时可以在液体深层发酵的第 1-3 天的时间段内添加 1 次蛋白胨和酵母浸膏粉，使培养体系中蛋白胨和酵母浸膏粉的浓度分别达到 5-20 克 / 升和 20-50 克 / 升的水平；也可以是在液体深层发酵的第 1-3 天的时间段内向培养体系中添加 1 次蛋白胨和酵母浸膏粉，接着在液体深层发酵的第 4-7 天的时间段内再向培养体系中添加 1 次蛋白胨和酵母浸膏粉，同样在整个发酵过程中使培养体系中的蛋白胨和酵母浸膏粉的总浓度分别达到 5-20 克 / 升和 20-50 克 / 升的水平；还可以是在液体深层发酵的第 3 天、第 6 天和第 9 天分别向培养体系中添加 1 次蛋白胨和酵母浸膏粉，使在整个发酵过程中培养体系中的蛋白胨和酵母浸膏粉的总浓度分别达到 5-20 克 / 升和 20-50 克 / 升的水平；其中，所加入的蛋白胨浓度优选为 1-20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度优选为 1-30 克 / 升。

[0017] 所述的块菌属 (Tuber) 优选为中国块菌 (Tuber sinense)、印度块菌 (Tuberindium)、黑孢块菌 (Tuber melanosporum)、白块菌 (Tuber magnatum) 或夏块菌 (Tuber aestivum)；这些块菌属菌株都可从商业途径购买得到。例如可以购自于四川绵阳食用菌研究所、中国普通微生物菌种保藏管理中心等。

[0018] 所述的斜面培养、一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵所用到的培养基和培养条件均为块菌细胞培养中的常规培养基和常规培养条件，这些都是本领域技术人员所公知的，作为参考，所述的培养基和有关的培养条件可按照有关文献所公开的内容进行 (Tang, Y. J., Zhu, L. L., Li. D. S., Mi, Z. Y., Li, H. M.. Significance of inoculation density and carbon source on themycelial growth and Tuber polysaccharides production by submerged fermentationof Chinese truffle Tuber sinense. Process Biochemistry 2008,43 :576-586.)。

[0019] 作为参考：

[0020] 所述的斜面培养基是 PDA 琼脂培养基：0.15 克 / 升的七水硫酸镁，0.30 克 / 升的磷酸二氢钾，20 克 / 升的葡萄糖，0.05 克 / 升的维生素 B_1 和 200 克 / 升的土豆；斜面培养条件是：培养温度 25℃，培养时间为 5-7 天。

[0021] 所述的一级液体种子培养基为：葡萄糖 35 克 / 升，蛋白胨 5 克 / 升，酵母浸膏粉 2.5 克 / 升，七水硫酸镁 0.5 克 / 升，磷酸二氢钾 1 克 / 升，维生素 B_1 0.05 克 / 升；一级液体种子培养条件为：温度 25℃，旋转式摇床，转速为 80-180 转 / 分。

[0022] 所述的二级液体种子培养基为：葡萄糖 35 克 / 升，蛋白胨 5 克 / 升，酵母浸膏粉 2.5 克 / 升，七水硫酸镁 0.5 克 / 升，磷酸二氢钾 1 克 / 升，维生素 B_1 0.05 克 / 升；二级液体种子培养条件为：温度 25℃，旋转式摇床，转速为 80-180 转 / 分。

[0023] 所述的液体深层发酵培养基为：蔗糖 35-40 克 / 升，蛋白胨 5 克 / 升，酵母浸膏粉 5 克 / 升，30 毫摩尔 Mg^{2+} 和 10 毫摩尔 k^{+}，维生素 B_1 0.05 克 / 升；液体深层发酵条件：温度 20-30℃，旋转式摇床，转速为 80-180 转 / 分。

[0024] 将本发明细胞培养方法所得到的产物用浓硫酸 - 苯酚法测定块菌多糖的含量，测定结果表明，本发明的方法相比于现有的分批培养，培养产物中黑孢块菌菌丝体比分批培养提高了 55.8%，尤其是块菌胞外多糖产量比分批培养法提高了 222.2%，块菌细胞培养

中块菌胞内多糖也比分批培养法增加了 103.2%。这是目前所报道的块菌细胞培养中所获得的块菌多糖的最高值。这表明在液体深层发酵过程中补加碳源和 / 或氮源，对于块菌多糖的生物合成有明显地促进作用，为工业化生产块菌中的活性成分奠定了基础。

[0025] 本发明方法在块菌发酵过程中于适当的时机补加一定量的碳源和 / 或氮源，可有效促进细胞生长，提高生物量，显著提高块菌胞外和胞内多糖的产量，提高了设备利用率，降低了生产成本，具有工业化前景。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0027] 一、试验材料：黑孢块菌 (Tuber melanosporum)、中国块菌 (Tubersinense)、印度块菌 (Tuber indium)、白块菌 (Tuber magnatum)、夏块菌 (Tuberaestivum)，均从四川省绵阳市食用菌研究所购买。

[0028] 二、块菌多糖含量的检测方法：细胞在 60℃烘干后称重，烘干的细胞按照文献 (Tang, Y. J., Zhu, L. L., Li. D. S., Mi, Z. Y., Li, H. M.. Significance ofinoculation density and carbon source on the mycelial growth and Tuberpolysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle Tubersinense. Process Biochemistry 2008, 43 :576-586.) 的方法破碎处理后，用浓硫酸 - 苯酚法测定块菌多糖的含量。

[0029] 对比试验例 1 采用分批培养法发酵生产块菌多糖

[0030] (1) 采用的菌种为：黑孢块菌 (Tuber melanosporum)；

[0031] (2) 斜面培养基：PDA，培养条件：25℃，培养 5-7 天；

[0032] (3) 一级液体种子培养基（克 / 升）：葡萄糖 35，蛋白胨 5，酵母浸膏粉 2.5，七水硫酸镁 0.5，磷酸二氢钾 1，维生素 B_1 0.05，pH5.5，50 毫升培养基 /250 毫升摇瓶中；培养条件：温度 25℃，旋转式摇床，转速为 120 转 / 分。

[0033] (4) 二级液体种子培养基（克 / 升）：葡萄糖 35，蛋白胨 5，酵母浸膏粉 2.5，七水硫酸镁 0.5，磷酸二氢钾 1，维生素 B_1 0.05，pH5.5，200 毫升培养基 /500 毫升摇瓶；培养条件：温度 25℃，旋转式摇床，转速为 120 转 / 分。

[0034] (5) 发酵起始培养基（克 / 升）：蔗糖 35，蛋白胨 5，酵母浸膏粉 5，30 毫摩尔 Mg^{2+} 和 10 毫摩尔 K^+，维生素 B_1 0.05 克 / 升，pH5.5，50 毫升培养基 /250 毫升摇瓶；培养条件：温度 25℃，旋转式摇床，转速为 120 转 / 分；培养 30 天后，进行如下分析测定：

[0035] A、胞外多糖产量的测定：在 30 微米孔径滤膜过滤下得 34.49 克 / 升细胞干重；发酵液中加入四倍体积的无水乙醇，混合过夜，在 13000rpm 离心沉淀得到胞外块菌多糖。经 1 摩尔 / 升 NaOH 溶解，采用浓硫酸 - 苯酚法测定胞外多糖产量为 2.2 克 / 升；

[0036] B、胞内多糖的含量的测定：菌丝体 100 毫克，加入 1 摩尔 / 升 NaOH 溶解，浓硫酸 - 苯酚法测定胞内多糖含量为 7.28 毫克 /100 毫克干重，胞内多糖产量为 2.18 克 / 升（胞内多糖含量乘以细胞干重）。

[0037] 实施例 1

[0038] 一、试验材料及培养条件

[0039] 采用的菌种、斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0040] 二、试验方法

[0041] 分为试验组和对照组：

[0042] 1、对照组：将块菌菌种接种到斜面培养基进行培养，再依次进行一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵；

[0043] 2、试验组分为三组，与对照组所不同的在于：(1) 试验 1 组：液体深层发酵过程的第 3 天向培养体系添加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 5 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 25 克 / 升）使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 10 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 30 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(2) 试验 2 组：分别在液体深层发酵过程的第 3,6 天向培养体系补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 2.5 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 12.5 克 / 升）使培养体系的蛋白胨总投料浓度维持在 15 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 35 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(3) 试验 3 组：分别在液体深层发酵过程的第 3,6,9 天向培养体系补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 1.67 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 8.33 克 / 升）使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 45 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；

[0044] 除此之外，试验组和对照组所用到的培养基和培养条件均完全相同。

[0045] 培养 30 天后，分别测定细胞干重及多糖的产量，测定方法同对比试验例 1，测定结果见表 1。

[0046] 表 1 氮源的三种补加方式对黑孢块菌液体深层发酵的影响

[0047]

	对照组	一次补加组	两次补加组	三次补加组
细胞干重 (克/升)	21.84±0.40[a] (12 天)[b]	27.35±0.07 (12 天)	39.50±0.93 (14 天)	41.65±2.44 (12 天)
胞外多糖产量 (克/升)	3.50±0.15	1.73±0.04	1.39±0.04	1.46±0.07
胞内多糖含量 (毫克/100 毫克细胞干重)	12.21±0.50	7.93±0.43	8.90±0.62	8.90±0.62
胞内多糖产量(克/升)	2.75±0.04	2.80±0.10	2.39±0.22	2.81±0.30

[0048] [a] 三个样品的平均值和标准偏差

[0049] [b] 细胞干重达到最大的培养时间

[0050] 从表 1 可知，与对照组（不添加氮源）相比，试验组添加氮源后，活性菌丝体产量获得一定程度的提高，较对照组提高了 90.71%。这表明在块菌液体深层发酵过程中适量添加氮源，可以促进块菌活性菌丝体的生产。

[0051] 实施例 2

[0052] 一、试验材料及培养条件

[0053] 采用的菌种、斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0054] 二、试验方法

[0055] 分为试验组和对照组：

[0056] 1、对照组：将块菌菌种接种到斜面培养基进行培养，再依次进行一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵；

[0057] 2、试验组分为 3 组，与对照组所不同的在于：(1) 试验 1 组：液体深层发酵过程的第 3 天当残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平时，向培养体系添加蔗糖使发酵液中蔗糖浓度达到 30-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(2) 试验 2 组：分别于液体深层发酵过程的第 3，7 天（经检测此时培养体系中残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平）向培养体系添加蔗糖使发酵液中蔗糖浓度达到 0.1-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(3) 试验 3 组：分别于液体深层发酵过程的第 3、7、10 天（经检测此时培养体系中残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平）向培养体系添加蔗糖使培养体系中蔗糖浓度达到 0.1-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；

[0058] 除此之外，试验组和对照组所用到的培养基和培养条件均完全相同。

[0059] 培养 30 天后，分别测定细胞干重及多糖的产量，测定方法同对比试验例 1，测定结果见表 2。

[0060] 表 2 碳源补加对黑孢块菌液体深层发酵过程的影响

[0061]

	对照组	试验组
细胞干重 (克/升)	23.72±0.01[a] (7 天)[b]	50.15±1.10 (23 天)
胞外多糖产量 (克/升)	1.71±0.19	3.40±0.12
胞内多糖含量 (毫克/100 毫克细胞干重)	7.86±0.56	8.48±0.64
胞内多糖产量(克/升)	1.94±0.38	4.05±0.21

[0062] [a] 三个样品的平均值和标准偏差

[0063] [b] 细胞干重达到最大的培养时间

[0064] 从表 2 可知，与对照组（不添加碳源）相比，试验组块菌活性菌丝体比对照组增加了 111.4%，块菌胞外多糖的产量比对照组增加了 98.8%，块菌胞内多糖的产量比对照组提高了 160.3%。

[0065] 实施例 3

[0066] 一、试验材料及培养条件

[0067] 采用的菌种、斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0068] 二、试验方法

[0069] 分为试验组和对照组：

[0070] 1、对照组：将块菌菌种接种到斜面培养基进行培养，再依次进行一级液体种子培养、二级液体种子培养和液体深层发酵；

[0071] 2、试验组与对照组所不同的在于：(1) 试验 1 组：液体深层发酵过程的第 3 天向培养体系添加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 1.67 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 8.33 克 / 升）使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 50 克 / 升的水平；在液体深层发酵过程中当发现残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平，向培养体系添加 30 克 / 升的蔗糖使发酵液中蔗糖浓度达到 35-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(2) 试验 2 组：分别液体深层发酵过程的第 3 天、第 6 天分别向培养体系添加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 1.67 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 8.33 克 / 升）使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 15 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；在液体深层发酵过程中当发现残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平，向培养体系添加 30 克 / 升的蔗糖使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；(3) 试验 3 组：分别在液体深层发酵过程的第 3 天、第 6 天和第 9 天向培养体系添加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 1.67 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 8.33 克 / 升）使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 10 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 20 克 / 升的水平；在液体深层发酵过程中当发现培养体系中残糖浓度处于 0.1-15 克 / 升的水平，向培养体系添加 30 克 / 升的蔗糖使培养体系中蔗糖浓度达到 0.1-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）；

[0072] 除此之外，试验组和对照组所用到的培养基和培养条件均完全相同。

[0073] 培养 30 天后，分别测定细胞干重及多糖的产量，测定方法同对比试验例 1。测定结果见表 3。

[0074] 表 3 碳、氮源混合补加对黑孢块菌液体深层发酵过程的影响

[0075]

	对照组	碳氮源混合补加组
细胞干重 (克/升)	16.26±0.84[a] (6 天)[b]	53.72±2.57 (36 天)
胞外多糖产量 (克/升)	2.26±0.09	7.09±0.62
胞内多糖含量 (毫克/100 毫克细胞干重)	8.64±0.14	8.64±0.14
胞内多糖产量(克/升)	1.28±0.20	4.43±0.21

[0076] [a] 三个样品的平均值和标准偏差

[0077] [b] 细胞干重达到最大的培养时间

[0078] 从表 3 可知，与对照组（不添加碳氮源）相比，试验组无论是细胞量还是块菌胞外多糖产量、块菌胞内多糖的产量都获得的大幅度提高，分别比对照组的细胞量、块菌胞外多糖产量和块菌胞内多糖的产量提高了 230.4%，213.7% 和 246.1%，这表明在块菌液体深层发酵过程中脉冲补加氮源和间歇补加蔗糖有效结合的碳氮源混合补料培养，可以更加有效的提高块菌多糖的生物合成。

[0079] 实施例 4

[0080] 一、试验材料及培养条件

[0081] 采用的菌种为：中国块菌 (Tuber sinense)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0082] 二、试验方法

[0083] 在液体深层发酵过程中的第 3,6,9 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 3 克 / 升、酵母浸膏浓度为粉 6 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 10 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 30 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 10 克 / 升的水平，向培养体系补加 40 克 / 升麦芽糖，使培养体系中残糖浓度达到 0.1-80 克 / 升的水平（整个发酵过程培养体系的体积最好控制在 50 毫升的恒定水平）。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 55 克 / 升、7.3 克 / 升、4.6 克 / 升。

[0084] 实施例 5

[0085] 一、试验材料及培养条件

[0086] 采用的菌种为：夏块菌 (Tuber aestivum)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0087] 二、试验方法

[0088] 在液体深层发酵过程中的第 3,6,9 天分别向培养体系补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 5 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 12 克 / 升的水平，向培养体系补加 50 克 / 升葡萄糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-80 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 60 克 / 升、7.8 克 / 升、4.86 克 / 升。

[0089] 实施例 6

[0090] 一、试验材料及培养条件

[0091] 采用的菌种为：印度块菌 (Tuber indium)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0092] 二、试验方法

[0093] 在液体深层发酵过程中的第 3,6,9 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 15 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 20 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 7 克 / 升的水平，补加 50 克 / 升果糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-80 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 63 克 / 升、6.8 克 / 升、4.45 克 / 升。

[0094] 实施例 7

[0095] 一、试验材料及培养条件

[0096] 采用的菌种为：白块菌（Tuber magnatum）；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0097] 二、试验方法

[0098] 在液体深层发酵过程中的第 4,7,10 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 4 克 / 升的水平，向培养体系补加 40 克 / 升麦芽糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-50 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 55 克 / 升、5.8 克 / 升、4.83 克 / 升。

[0099] 实施例 8

[0100] 一、试验材料及培养条件

[0101] 采用的菌种为：夏块菌（Tuber aestivum）；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0102] 二、试验方法

[0103] 在液体深层发酵过程中的第 2,5,8 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 7 克 / 升的水平，向培养体系补加 30 克 / 升麦芽糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-40 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 52 克 / 升、6.8 克 / 升、4.34 克 / 升。

[0104] 实施例 9

[0105] 一、试验材料及培养条件

[0106] 采用的菌种为：中国块菌（Tuber sinense）；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0107] 二、试验方法

[0108] 在液体深层发酵过程中的第 1,4,7 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 9 克 / 升的水平，向培养体系补加 50 克 / 升果糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-40 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 56 克 / 升、6 克 / 升、5 克 / 升。

[0109] 实施例 10

[0110] 一、试验材料及培养条件

[0111] 采用的菌种为：黑孢块菌 (Tuber melanosporum)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0112] 二、试验方法

[0113] 在液体深层发酵过程中的第 3,6,9 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 5.7 克 / 升的水平，向培养体系补加 40 克 / 升麦芽糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-50 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 55 克 / 升、5.8 克 / 升、4.83 克 / 升。

[0114] 实施例 11

[0115] 一、试验材料及培养条件

[0116] 采用的菌种为：印度块菌 (Tuber indium)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0117] 二、试验方法

[0118] 在液体深层发酵过程中的第 4,6,8 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 7.8 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 7.9 克 / 升的水平，向培养体系补加 49 克 / 升葡萄糖，使培养体系中中残糖浓度维持在 0.1-60 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 53 克 / 升、6.84 克 / 升、4.23 克 / 升。

[0119] 实施例 12

[0120] 一、试验材料及培养条件

[0121] 采用的菌种为：白块菌 (Tuber magnatum)；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0122] 二、试验方法

[0123] 在液体深层发酵过程中的第 3,6,9 天分别向培养体系中补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 3 克 / 升的水平，向培养体系补加 40 克 / 升蔗糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-45 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 55 克 / 升、5.8 克 / 升、4.83 克 / 升。

[0124] 实施例 13

[0125] 一、试验材料及培养条件

[0126] 采用的菌种为：印度块菌（Tuber indium）；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0127] 二、试验方法

[0128] 在液体深层发酵过程中的第 1，5，7 天分别向培养体系补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 10 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 8 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 2.5 克 / 升的水平，补加 35 克 / 升蔗糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-40 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 58 克 / 升、6.1 克 / 升、4.93 克 / 升。

[0129] 实施例 14

[0130] 一、试验材料及培养条件

[0131] 采用的菌种为：中国块菌（Tuber sinense）；斜面培养基及其培养条件、一级液体种子培养基及其培养条件、二级液体种子培养基及其培养条件、发酵起始培养基及其培养条件同对比试验例 1。

[0132] 二、试验方法

[0133] 在液体深层发酵过程中的第 2，5，7 天分别向培养体系补加蛋白胨和酵母浸膏粉（蛋白胨浓度为 12 克 / 升、酵母浸膏粉浓度为 10 克 / 升），使培养体系中的蛋白胨总投料浓度维持在 20 克 / 升，酵母浸膏粉浓度维持在 40 克 / 升的水平；当残糖浓度处于 5.4 克 / 升的水平，向培养体系补加 36 克 / 升麦芽糖，使培养体系中残糖浓度维持在 0.1-40 克 / 升的水平。培养 30 天后收获菌丝体和发酵液，进行有效成分分析（测定方法同对比试验例 1），分析结果为：细胞量、胞外多糖、胞内多糖的产量分别达到 57 克 / 升、6.31 克 / 升、4.75 克 / 升。