

# 日本灵芝灵芝酸发酵工艺的优化

李海源, 张亮, 张美萍, 孙春玉, 蒋世翠, 王义

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:**以日本灵芝为材料,研究了发酵过程中各个因素对灵芝酸产量的影响,通过正交实验确定了提高灵芝酸产量的最佳发酵条件。结果表明:最佳发酵条件为:接种量 14%,装液量 100 mL/500mL,培养温度 25℃,摇床转速 140 r/min,初始 pH 6.5。

**关键词:**液体发酵;菌丝体;灵芝酸;条件优化

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0170-04

灵芝属于担子菌纲多孔菌属灵芝科,是我国中医药宝库中的珍品,素有“仙草”之誉。随着对灵芝有效成分的提取、分离、纯化及药理活性、菌丝体发酵以及遗传转化等方面的深入研究,灵芝的神秘慢慢被人们揭晓。灵芝主要功能为补气安神、止咳平喘,用于治疗眩晕不眠、心悸气短、虚劳咳嗽<sup>[1]</sup>。灵芝的主要成分有灵芝酸、灵芝多糖等。其中灵芝酸又名灵芝三萜,具有调节核酸和蛋白质的代谢平衡,促进 DNA 合成和抗辐射损伤等作用<sup>[2]</sup>。

由于灵芝栽培周期长,生产效率低等原因造成其产量和质量不稳定<sup>[3-4]</sup>,从而影响灵芝主要有效成分的开发和利用。液体发酵技术具有产量大、周期短、容易控制等优点,其中影响灵芝液体培养的因素很多,如发酵培养基组成<sup>[5-6]</sup>、接种量<sup>[7]</sup>、发酵培养温度<sup>[8]</sup>、pH<sup>[9]</sup>和溶氧<sup>[10]</sup>等。该试验以日本灵芝为试材,以菌丝体干重和灵芝酸含量为指标,对液体发酵条件进行了优化,旨在为灵芝有效成分提取以及大规模生产提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

日本灵芝斜面菌种购自吉林农业大学菌物所。试验药剂:有机试剂,葡萄糖、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、麦芽糖、酵母粉、甘露醇(以上药品均购自北化精细化学品有限责任公司)。培养基:(1)斜面培养基配方(PDA):(1 L)土豆200 g;葡萄糖 20 g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g;VB<sub>1</sub> 500 mg;琼脂粉 15 g;pH 6。(2)灵芝酸发酵

培养基:液体种子培养基配方:(1 L)可溶性淀粉 20 g;蛋白胨 2 g;麸皮 5 g;葡萄糖 20 g;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.41 g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g;pH 6.0。液体发酵培养基配方:(1 L)可溶性淀粉 20 g;蛋白胨 2 g;麸皮 5 g;葡萄糖 25 g;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.41 g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g;pH 6.0。试验仪器:分析天平 SHIMADZU4、JJ 型精密电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司常熟双杰测试仪器厂),电热恒温古风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),UV755B 型可见分光光度计(上海精科),无菌操作台(苏州净化设备有限公司),LS-B50L 灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司),HYG-A 全温摇瓶柜(太仓市试验设备厂)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 灵芝酸的发酵** 灵芝三萜标准曲线的绘制:该试验采用三萜标准类似物齐墩果酸来绘制标准曲线。标准溶液:准确称取齐墩果酸标准品 2.760 mg,加乙醇溶解,定容至 100 mL,得浓度为 27.6 μg/mL 的标准溶液。绘制标准曲线:准确地从齐墩果酸标准溶液吸取 1、2、3、4、5、6 mL 于 10 mL 容量瓶中定容至 10 mL,然后按顺序从中吸取 2.5 mL 溶液于试管中,然后再向各个试管中加入新配置的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 1 mL、高氯酸 6 mL,置沸水浴中 15 min,然后冰浴 15 min,以 UV755B 型紫外分光光度计 550 nm 波长处测量吸光度 OD 值,绘制标准曲线并将结果做统计分析得到回归方程。灵芝三萜的提取,检测与含量计算:(1)发酵产物灵芝三萜的提取:采用吉林农业大学生命科学学院实验室优化的灵芝三萜超声波提取条件,乙醇用量 30 倍+提取温度 60℃+提取时间 60 min+碱醇 pH 8.5。(2)灵芝三萜的检测:检测方法同标准曲线制作。(3)根据标准曲线计算出相应三萜含量按下列公式计算:菌丝体中三萜含量(%)=(C×V<sub>T</sub>×N)/(W×V<sub>S</sub>×10<sup>6</sup>)×100。式中:C:从标准曲线查得的三萜含量(μg);V<sub>T</sub>:提取液总体积(mL);V<sub>S</sub>:测定时取用的样品提取液体积(mL);N:稀释

**第一作者简介:**李海源(1986-),女,在读硕士,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail:lihaiyuan329081769@163.com。

**责任作者:**王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为药用植物生物技术与种质资源创新。E-mail:wanglaoshi2007@tom.com。

**基金项目:**吉林省科学技术厅资助项目(200905107);吉林省教育厅“十一五”科技技术研究资助项目(吉教科合字[2009]第 48 号)。

**收稿日期:**2012-03-27

倍数;W:样品质量(g)。

1.2.2 单因素对发酵产物灵芝酸的影响 选取装液量、接种量、培养基初始 pH、摇床转速、培养温度 5 个因素,不考虑各个因素的交互作用,探讨单一因素对发酵产物灵芝酸含量的影响。各处理 5 个水平进行单因素试验,3 次重复,发酵培养 7 d,记录发酵产物干重,检测灵芝酸含量。装液量对发酵产物灵芝酸的影响:接种量 10%,摇床转速 120 r/min,28℃ 恒温震荡培养,培养基初始 pH 6.0,探讨装液量对灵芝酸含量的影响,装液量的试验梯度为:80、100、120、140、160 mL/500mL。接种量对发酵产物灵芝酸的影响:装液量为 120 mL/500mL,培养基初始 pH 6.0,摇床转速 120 r/min,培养温度 28℃,探讨接种量对灵芝酸含量的影响,接种量的试验梯度为:8%、10%、12%、14%、16%。培养基初始 pH 对发酵产物灵芝酸的影响:接种量 10%,装液量 120 mL/500mL,摇床转速 120 r/min,培养温度 28℃,探讨培养基初始 pH 对灵芝酸含量的影响,初始 pH 的试验梯度为:5.0、5.5、6.0、6.5、7.0。培养温度对发酵产物灵芝酸的影响:接种量 10%,装液量 120 mL/500mL,培养基初始 pH 6.0,摇床转速 120 r/min,探讨培养温度对发酵产物灵芝酸的影响,培养温度的试验梯度为:22、25、28、31、34℃。摇床转速对发酵产物灵芝酸的影响:接种量 10%,装液量为 120 mL/500mL,培养基初始 pH 6.0,培养温度 28℃,探讨摇床转速对发酵产物灵芝酸的影响,摇床转速的试验梯度为:80、100、120、140、160 r/min。

1.2.3 多因素对发酵产物灵芝酸的影响 选取以上 5 个因素设计正交实验  $L_{16}(4^5)$ ,探讨多因素对发酵产物灵芝酸的影响。并且用 SPSS 软件对结果进行分析(表 1、2)。

表 1 灵芝酸液体发酵条件因素水平

因素	A(接种量) /%	B(装液量) /500mL	C(温度) /℃	D(摇床转速) /r·min <sup>-1</sup>	E(初始 pH)
水平 1	8	80	22	80	5.5
水平 2	10	100	25	100	6.0
水平 3	12	120	28	120	6.5
水平 4	14	160	31	140	7.0

表 2 正交实验设计 [ $L_{16}(4^5)$ ]

试验号	试验因素及水平				
	A	B	C	D	E
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制作

齐墩果酸标准曲线见图 1。

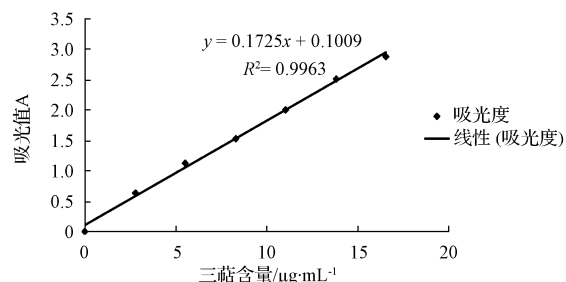


图 1 齐墩果酸标准曲线

### 2.2 单因素对液体发酵产物灵芝酸的影响

2.2.1 装液量对发酵产物灵芝酸的影响 由图 2、3 可知,装液量在 140 mL/500mL 时,发酵产物干重的积累最高,但灵芝酸含量最低;装液量为 80 mL/500mL,获得的灵芝酸含量最高。

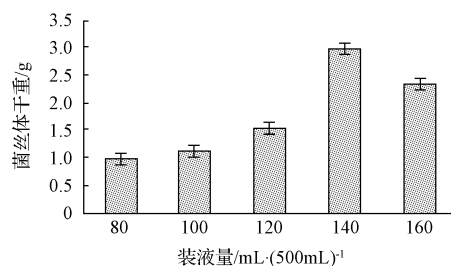


图 2 装液量对菌丝体干物质的影响

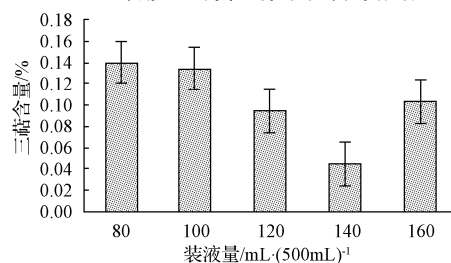


图 3 装液量对灵芝酸的影响

2.2.2 接种量对发酵产物灵芝酸的影响 由图 4、5 可知,当接种量为 12% 时,发酵产物积累量最大,灵芝酸含量在接种量 10% 的时候有最大值。

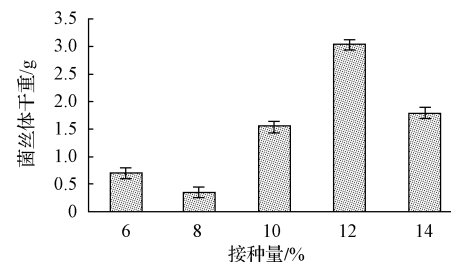


图 4 接种量对发酵产物干物质的影响

2.2.3 培养基初始 pH 对发酵产物灵芝酸的影响 由图 6、7 可知,培养基初始 pH 为 6.5 时,菌丝体干重最多,pH 6.0 时获得的灵芝酸含量最高。

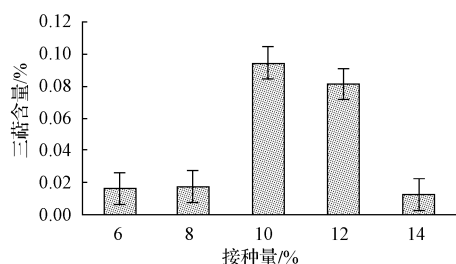


图5 接种量对发酵产物灵芝酸的影响

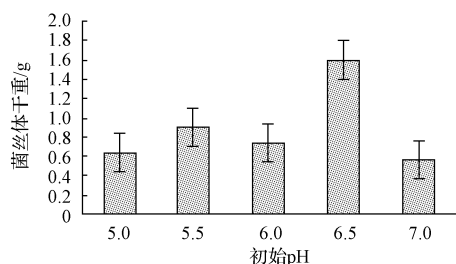


图6 初始 pH 对发酵产物干物质的影响

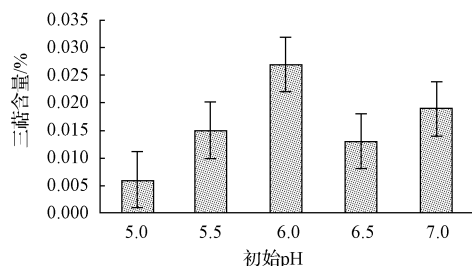


图7 初始 pH 对灵芝酸的影响

2.2.4 摇床转速对发酵产物灵芝酸的影响 由图 8、9 可知,摇床转速给菌丝体发酵提供溶氧,根据试验结果转速在 100~120 r/min 范围时,灵芝酸含量较高,120~140 r/min 时,菌丝体的产量也增加。

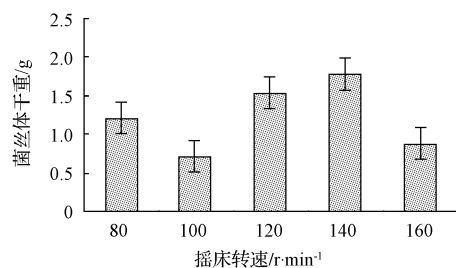


图8 摇床转速对发酵产物干物质的影响

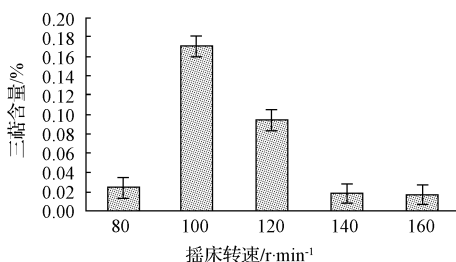


图9 摇床转速对发酵产物灵芝酸的影响

2.2.5 培养温度对发酵产物灵芝酸的影响 由图 10、11 可知,温度对灵芝酸的含量影响变化范围并不是很

大,31℃左右灵芝酸含量有最大值。但对菌丝体生长有很大影响,25℃左右范围内,菌丝体的生长最好。

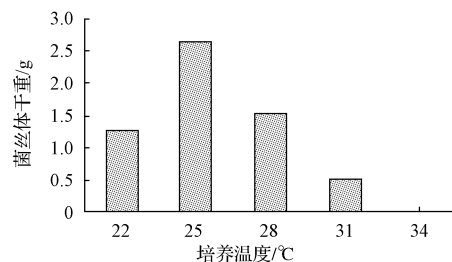


图10 培养温度对发酵产物干物质的影响

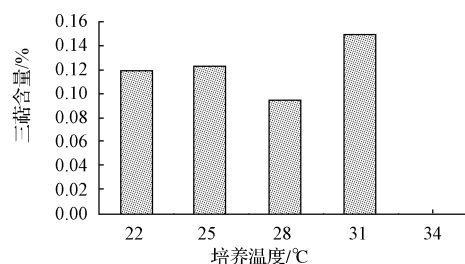


图11 培养温度对发酵产物灵芝酸的影响

### 2.3 多因素对液体发酵产物灵芝酸的影响

由表 3 正交实验结果可知,接种量、装液量、初始 pH、培养温度、摇床转速在发酵培养 7 d,对灵芝酸含量的影响作用没有达到显著性,可能是由于试验的发酵时间条件,灵芝酸的合成积累较少,几种因素对灵芝酸含量的影响作用不太明显。得到的最优组合是: A<sub>4</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>4</sub>E<sub>3</sub>,即:接种量 14%,装液量 100 mL/500mL,培养温度 25℃,摇床转速 140 r/min,初始 pH 6.5。

表3 多因素对灵芝酸含量影响的正交实验结果

试验号	试验因素及水平					灵芝酸含量/%
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.2940
2	1	2	2	2	2	0.0616
3	1	3	3	3	3	0.0521
4	1	4	4	4	4	0.0280
5	2	1	2	3	4	0.0731
6	2	2	1	4	3	0.1120
7	2	3	4	1	2	0.0012
8	2	4	3	2	1	0.0560
9	3	1	3	4	2	0.0693
10	3	2	4	3	1	0.0960
11	3	3	1	2	4	0.0560
12	3	4	2	1	3	0.0729
13	4	1	4	2	3	0.0840
14	4	2	3	1	4	0.0848
15	4	3	2	4	1	0.1540
16	4	4	1	3	2	0.0560
K <sub>1</sub>	0.1820	0.2622	0.2554	0.2303	0.3350	
K <sub>2</sub>	0.2849	0.3568	0.3604	0.2576	0.2385	
K <sub>3</sub>	0.2984	0.3225	0.2880	0.2976	0.3364	
K <sub>4</sub>	0.3836	0.2074	0.2451	0.3634	0.2390	
R	0.2016	0.1494	0.1153	0.1331	0.0979	
Sig.	0.496	0.198	0.606	0.198	0.822	

### 3 讨论

装液量较低时,菌丝体生长较好,可能是由于装液量小,通气量大,摇瓶中溶氧状态好,有利于菌丝体生长,随着装液量的增多,菌丝体易集结成块状,原因是装液量过大,通气量少,导致培养基中溶解氧也少,不仅影响菌丝生长量,而且还影响着培养物的形态。这与金德宽<sup>[11]</sup>的结论相同。

该试验结果表明,接种量对发酵产物的积累与灵芝酸含量的影响很大。接种量过低或者过高,得到的发酵产物干物质与灵芝酸含量都很低,这是因为接种量过低,单位面积内液体种子量少,发酵产生的菌体过少;接种量过高,则会导致单位面积内菌体过多,产生营养竞争,菌体生长因营养供给不良或者因为存在竞争关系,导致菌体老化死亡,最终得到的发酵产物干物质与灵芝酸均较少。与徐济贵<sup>[12]</sup>得出接种量为 10% 的结果不同,可能是由于菌种不同,造成有少许差距。

pH 会影响灵芝菌丝体内的与灵芝酸合成代谢途径有关的酶的活性,pH 6.0 时,酶的活性最大,过低过高酶活性都会降低,从而影响灵芝酸的合成代谢。在 pH 为 6.5 时生物量最大,也有较好的灵芝酸含量。与卫军等<sup>[13]</sup>,李宇伟等<sup>[14]</sup>的结论一致。

摇床转速给菌丝体发酵提供溶氧,转速加快时,通气量增大,溶氧量增大,菌丝体生长加快且菌丝球直径变小,当转速达到 150 r/min 时,菌丝体生长达到最大,继续增大转速时,菌丝体干重反而下降,菌丝易形成球状,形成的菌丝团相对聚集。罗建成等<sup>[15]</sup>也在试验中证明了此结论。

温度对灵芝酸产量的影响相对较小,但是对菌丝体生长确有很大影响,25℃ 左右范围内,菌丝体的生长最好。随着温度升高,菌丝体量降低,菌丝体自溶,发酵液的颜色逐渐变为粉红色。徐济贵<sup>[12]</sup>在研究中得出菌丝体生长最佳温度是 23℃。可能是由于发酵过程中其它因素不同造成结果有所不同。

在多因素试验中,各因素对灵芝酸含量的影响作用

大小依次为接种量、装液量、摇床转速、培养温度、初始 pH。日后还将在延长发酵培养时间方面进行进一步研究,为灵芝的大规模生产提供基础数据。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1 部. 北京:化学工业出版社,2005:130.
- [2] 高玉荣,卢艳明. 灵芝菌丝液体深层发酵培养基的研究[J]. 中国酿造,2006(1):18-20.
- [3] 林志彬. 灵芝抗肿瘤活性和免疫调节作用的研究进展[J]. 北京大学学报(医学版),2002,34(5):493-498.
- [4] 孙冬平,潘锋. 灵芝菌发酵培养基的优化及灵芝胞外多糖的分离纯化[J]. 中草药,2000,31(12):941-943.
- [5] Tang Y J, Zhang J J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 20-28.
- [6] Fang Q H, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites ganoderic acid and polysaccharide[J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, 10: 61-65.
- [7] Fang Q H, Tang Y J, Zhong J J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*[J]. Process Biochemistry, 2002, 37: 1375-1379.
- [8] Lee H Y, Song M K, Hwang S H. Optimizing bioconversion of deproteinized cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(12):1685-1693.
- [9] Lee K M, Lee S Y, Lee H Y. Bistage Control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor[J]. Journal of Bioengineering, 1999, 88(6):646-650.
- [10] Tang Y J, Zhong J J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32: 478-484.
- [11] 金德宽. 灵芝发酵工艺条件的优化[J]. 中国酿造, 2011(9): 93-98.
- [12] 徐济贵. 灵芝液体菌种发酵工艺条件的研究[J]. 食用菌, 2009(6): 15-16.
- [13] 卫军, 李晓. 灵芝液体发酵条件优化研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 18-21.
- [14] 李宇伟, 连瑞丽. 灵芝液体深层发酵菌株筛选与培养基优化的研究[J]. 广东农业科学, 2010(6): 52-55.
- [15] 罗建成, 史政海. 灵芝深层发酵工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(10): 41-45.

## Optimization of Fermentation Technology for Ganoderma Acid of Japanese Ganoderma

LI Hai-yuan, ZHANG Liang, ZHANG Mei-ping, SUN Chun-yu, JIANG Shi-cui, WANG Yi  
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** Japanese ganoderma was used as material, and different factors which influenced the production of ganoderma acid had been studied. The optimal culture conditions were obtained by orthogonal experiment. The results showed that the optimal culture conditions were as follows: inoculum size, volume of medium temperature 25℃, shake frequency 140 r/min, initial pH value 6.5.

**Key words:** liquid fermentation; mycelin; ganoderma acid; condition optimization