

# 灵芝液体发酵培养条件的响应面法优化研究

李宇伟, 连瑞丽, 班强, 陈忠杰, 程茂高, 李先芳

(郑州牧业工程高等专科学校 药物工程系, 河南 郑州 450011)

**摘要:**为获得更多的灵芝菌丝体产量,以单因素摇瓶试验法研究了发酵温度、发酵时间、发酵液的初始 pH 对灵芝液体深层发酵的影响;在此基础上,利用响应面法优化了灵芝液体发酵条件。结果表明:这 3 个因素对菌丝体产量的影响由大到小依次为发酵液的初始 pH、发酵时间、发酵温度,而当发酵温度为 28.7℃、发酵时间为 124 h、发酵液的初始 pH 为 5.9 时,获得的菌丝体产量最大,为 22.89 g/L,预测值与实测值吻合得较好。

**关键词:**灵芝;液体发酵;响应面法;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)13-0179-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属担子菌亚门(Basidiomycotina)非褶菌目(Aphylophorales)多孔菌科(Polyporaceae)灵芝属(*Ganoderma*)<sup>[1-2]</sup>的珍贵药用真菌,是一种对人体具有保健作用,对疾病有治疗、预防或抑制作用的一类天然真菌类药物;早在明代李时珍的《本草纲目》中对灵芝的记载为:“其性味苦、平,无毒,益心气,入心充血,助心充脉,安神,益肺气,补中,增智慧,好颜色,利关节,坚筋骨,祛痰,健胃,活血”。灵芝原产于亚洲东部,一般生长在湿度高且光线昏暗的山林中,主要生长在腐树或是其树木的根部;主要分布在中国、朝鲜半岛和日本。在我国主要分布河北、山西、山东、江苏、安徽、浙江、福建、江西、湖北、湖南、广西、广东、四川、贵州、云南等省(自治区)。国内外均将灵芝作为重要的药物筛选对象,在临床治疗及抗癌、攻克心血管疾病方面进行深入系统的研究。近年来,国内外对灵芝进行了大量的研究,目前报道的主要有灵芝多糖、萜类化合物、核酸等多种生理活性物质<sup>[3-6]</sup>。大量试验证明,灵芝具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗溃疡、提高免疫力及防辐射等功效<sup>[7-11]</sup>。来源于人工栽培或野生的子实体受自然因素影响较大,影响灵芝生理活性物质的开发应用。采用液体发酵具有周期短、成本低、产量大、适于工厂化生产等显著优点<sup>[1]</sup>。鉴于此,现在已有的研究基础上<sup>[12]</sup>,通过响应面法研究了灵芝液体深层发酵影响较大

的发酵温度、发酵时间、发酵液的初始 pH 这 3 个关键因素对灵芝菌丝体产量的影响,以期对灵芝规模化液体发酵生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌种:紫灵芝(*G. japonicum*)菌株由河南省科学院生物研究所提供;供试培养基:斜面培养基:常规 PDA 固体培养基<sup>[13]</sup>,活化菌种用;液体种子培养基: PDA 培养基中去掉琼脂即可;发酵培养基:蔗糖 2%、豆粕粉 0.2%、FeSO<sub>4</sub> 0.2%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%, pH 6.0。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化培养 从保存的斜面母种试管中切出 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的菌丝块重新接种于斜面培养基的中部,培养 7 d 后待用。

1.2.2 种子液的制备培养 取 1 cm<sup>2</sup> 大小的活化菌种 2~3 块接种于无菌液体种子培养基中(100 mL 培养基于 250 mL 三角瓶),8 层纱布封口,置于 25℃ 旋转式摇床上 180 r/min 振荡培养 7 d。

1.2.3 摇瓶发酵单因素试验 取长好菌丝球的种子液菌种,分别接种于无菌发酵培养基中(100 mL 发酵培养基于 500 mL 三角瓶),分别考察发酵温度、发酵时间和发酵液初始 pH 对发酵后产生菌丝体产量的影响。

1.2.4 发酵条件优化方法 在发酵单因子试验的基础上,以发酵产生菌丝体的产量为考察指标,通过响应面分析法和中心旋转组合设计法考察了液体深层发酵过程中发酵温度、发酵时间和发酵液初始 pH 3 个发酵条件对灵芝发酵菌丝体产量的影响,从而得到该菌株在液体深层发酵条件下影响菌丝体产量的最佳条件。采用的分析软件为 Design Expert(version 7.1.6),设计 3 因

**第一作者简介:**李宇伟(1976-),男,河南汝州人,硕士,讲师,现主要从事高等真菌资源开发与药物制剂的教学与研究工作。

**责任作者:**李先芳(1964-),女,硕士,教授,现主要从事生物资源开发与应用方面的教学与研究工作。

**基金项目:**河南省教育厅科技攻关计划资助项目(2011A230014);河南省教育厅科技攻关计划资助项目(2009B210025)。

**收稿日期:**2012-03-10

素 3 水平的响应面分析。利用多项式回归的分析方法,对试验数据采用二次回归的方法进行拟合,从而获得恰当的回归方程,再对回归方程所代表的响应曲面分析,便可推测最佳条件在试验过程中所覆盖的区域范围。用相关系数  $R$  可以表示对多项式方程拟合以后所得概率,利用  $F$  值检验显著性。试验因素水平见表 1,试验方案及结果见表 2。

表 1 中心旋转设计实验因子水平编码

因素	编号	编码水平		
		-1	0	1
发酵温度/℃	A	26	29	32
发酵时间/h	B	100	120	140
发酵液初始 pH	C	5.5	6.0	6.5

### 1.3 项目测定

对通过液体深层发酵所得的发酵液,4 000 r/min 的转速离心 30 min 后,沉淀所得菌丝体以蒸馏水反复洗涤 3 次后,置 95℃ 烘干至恒重,称量、记录菌丝体产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 摇瓶发酵单因素试验

由图 1 可知,发酵温度对紫灵芝菌丝体产量比较敏感。24~30℃ 时,液体发酵菌丝体的产量随温度升高逐渐增加,但当发酵温度超过 30℃,菌丝体的产量反而下降。由图 2 可知,发酵时间对菌丝体产量的影响较为明显,在 130 h 之前,菌丝生长速度很快,菌丝体产量随发酵时间延长而增加,发酵到 130 h 时,菌丝体产量达到最大,此后即便是延长发酵时间也不能使产量进一步增大,反而下降,根据微生物生长规律分析可能是因为

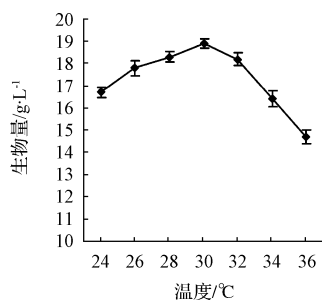


图 1 不同温度对产量的影响

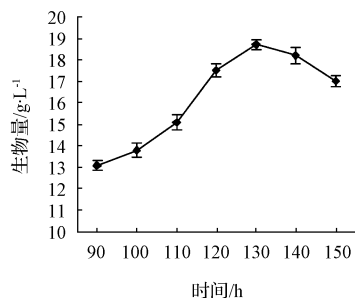


图 2 不同发酵时间对产量的影响

培养液中营养基质的大量消耗导致部分菌丝体自溶所致。由图 3 可知,在偏酸性的初始 pH 条件下,菌丝体产量相对较高,但当初始 pH 超过 6.0 以后,产量开始迅速下降,这表明紫灵芝不适于在培养液碱性条件的环境下培养。

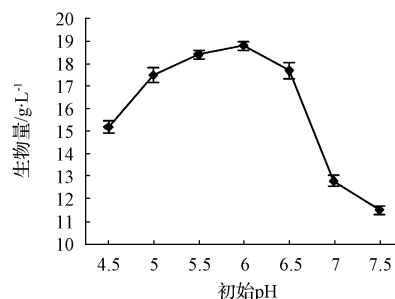


图 3 不同初始 pH 对产量的影响

### 2.2 发酵条件优化结果

在单因素试验基础上,以菌丝体的产量为指标,采用响应面分析法和中心旋转组合设计法,研究了液体深层发酵过程中发酵温度、发酵时间和发酵液的初始 pH 3 个发酵条件对发酵所产菌丝体产量的影响,结果见表 2。表 2 中 15 个试验分为 2 类,1~12 为析因试验,13~15 为中心试验。15 个试验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在 A、B、C 所构成的二维顶点<sup>[14]</sup>;零点为区域的中心点,零点试验 3 次重复,有利于估计试验的误差。使用 Design Expert 软件,采用逐步回归对表 2 的数据进行二次多项式回归拟合,获得紫灵芝液体发酵所得菌丝体产量对发酵温度、发酵时间和发酵液的初始 pH 的多元回归方程:

$$Y = 22.65 - 0.48A + 0.35B - 0.65C + 0.34AB + 0.28AC + 0.34BC - 1.84A^2 - 1.15B^2 - 1.72C^2$$

表 2 响应面中心组合实验设计及结果

	因素			产量/g·L <sup>-1</sup>	
	A	B	C	预测值	实际值
1	-1	-1	0	20.00	20.12
2	-1	1	0	16.00	15.30
3	1	-1	0	16.00	15.40
4	1	1	0	16.00	15.70
5	0	-1	-1	15.00	16.24
6	0	-1	1	15.00	14.30
7	0	1	-1	15.00	16.20
8	0	1	1	16.00	21.84
9	-1	0	-1	16.50	18.50
10	1	0	-1	16.00	16.12
11	-1	0	1	17.00	15.26
12	1	0	1	16.00	16.50
13	0	0	0	16.50	22.37
14	0	0	0	15.00	22.43
15	0	0	0	16.50	23.08

注:A:发酵温度(℃);B:发酵时间(h);C:发酵液的初始 pH。

表 3 回归方程显著性检验

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率 > F
模型	241.71	20	12.09	7.61	0.0007
理论误差	0.000	5	0.000		
总和	259.18	31			

$$R=0.9657 \quad R^2=0.9326$$

表 4 方程回归系数显著性检验

因素	标准差	F 值	概率 > F
A: 发酵温度	0.20	3.47	0.0894 *
B: 发酵时间	0.20	1.90	0.0196 *
C: 发酵液的初始 pH	0.20	6.30	0.0092 *
AB	0.25	4.82	0.0426 *
AC	0.25	1.19	0.2985
BC	0.25	1.19	0.0439 *
A <sup>2</sup>	0.18	62.61	<0.0001 *
B <sup>2</sup>	0.18	24.58	0.0008 *
C <sup>2</sup>	0.18	54.39	<0.0001 *

注: \* 表示 0.1 水平上显著

对该方程进行显著性分析检验(表 3)可知,模型显著( $P<0.005$ ),拟合度好,预测值与实测值之间有高度的相关性( $R^2=0.9326$ )。对方程回归系数显著性进行检

验(表 4)表明,3 个因素对菌丝体产量的影响均显著;发酵温度和发酵时间、发酵时间和发酵液的初始 pH 之间的交互作用显著,而发酵温度和发酵液的初始 pH 之间交互作用不显著。当概率为 0.1 的水平时,概率 > F 的数值越小,相应对菌丝体产量的影响就越大。由表 4 可知,对菌丝体产量的影响从大到小的顺序为:发酵液的初始 pH、发酵时间、发酵温度。

图 4 为发酵液的初始 pH 位于零水平时,发酵温度和发酵时间交互影响紫灵芝液体发酵产菌丝体产量的曲面图和等高线。由图 4 可知,等高线图表现为椭圆形,说明发酵温度和发酵时间这 2 个因素的交互作用显著。随着发酵温度和发酵时间的相应增加,菌丝体产量也在增大,当温度和发酵时间值分别为 28.7℃、121.4 h 时,产量的预测值为最大 22.72 g/L,若二者的值进一步增大,菌丝体产量的预测值反而下降,说明液体发酵产菌丝体产量分别需要合理的发酵温度和一定的发酵时间,才能达到最大产量。

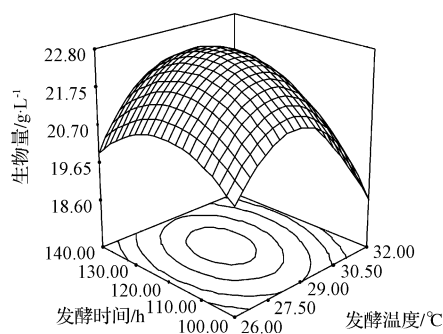


图 4 发酵温度和发酵时间对产量交互影响的曲面图和等高线图

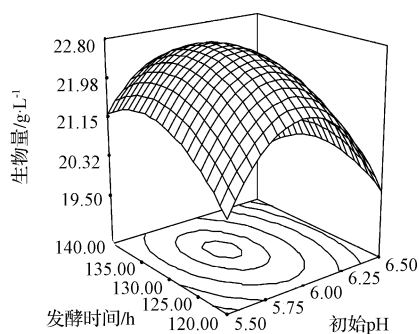


图 5 发酵液的初始 pH 和发酵时间对产量交互影响的曲面图和等高线图

图 5 为发酵温度值位于零水平时,发酵液的初始 pH 和发酵时间交互影响紫灵芝液体发酵产菌丝体产量的曲面图和等高线。由图 5 可知,等高线图表现为椭圆形,说明发酵液的初始 pH 和发酵时间这 2 个因素的交互作用显著。随着发酵液的初始 pH 和发酵时间的相应增加,菌丝体产量也在增大,当发酵液的初始 pH 和发酵时间的值分别为 5.92、122.6 h 时,产量的预测值最大 22.76 g/L,若二者的值进一步增大,菌丝体产量的预测

值反而下降。

根据筛选试验中确定的参数条件,以及拟合优化得到关键参数的最佳试验条件,确定了最终优化的液体发酵条件:发酵温度为 28.7℃、发酵时间为 124 h、发酵液的初始 pH 为 5.9 时,在该条件下模型预测的最大菌丝体产量为 22.78 g/L。经验证试验,在此发酵条件下进行液体发酵,实际测定菌丝体产量为 22.89 g/L。可见该数学模型能较好地预测液体发酵条件对紫灵芝产菌

丝体产量的影响。

### 3 结论与讨论

人工栽培或野生获得灵芝子实体的周期长、产量低,限制了灵芝生理活性物质的规模化生产,然而采用液体发酵技术,为生产灵芝菌丝体并进一步提取生理活性物质如灵芝多糖、三萜类化合物等提供了一条很好的思路,同时也是解决研究灵芝原料不足的重要途径。该试验研究了液体深层发酵过程中影响灵芝菌丝体产量的主要因素,并对其液体发酵条件进行了优化,这为规模化液体发酵生产灵芝生理活性物质提供了技术依据。

液体发酵条件的优化方法主要有单因子试验法和正交设计实验法。单因子试验法仅考察一种因素的影响,由于考察因素间存在交互作用,不能获得最佳的优化条件<sup>[15]</sup>。正交设计试验法可同时利用多种因素,寻找最佳因素水平组合;但也只能对一个个孤立的试验点进行分析,不能使用确切的回归方程来表示整个区域上多种因素和响应值之间的关系,无法得到多因素与响应值的最佳组合<sup>[16]</sup>。响应面法是利用合理的试验设计,采用多元二次回归方程来拟合多因素与响应值之间的函数关系,将复杂的未知的函数关系在小区域内通过对回归方程的分析来寻求最优工艺,在试验条件寻优过程中,可以连续的对试验的各个水平进行分析。

该试验通过响应面法,以菌丝体产量为响应值,运用多元二次回归拟合方程,获得了液体发酵条件的主要影响因素的最佳条件。结果表明,3个因素对菌丝体产量的影响均显著;发酵温度和发酵时间、发酵时间和发酵液的初始 pH 之间的交互作用显著,而发酵温度和发酵液的初始 pH 之间交互作用不显著。当发酵温度为 28.7℃、发酵时间为 124 h、发酵液的初始 pH 为 5.9 时,在该条件下模型预测的最大菌丝体产量为 22.78 g/L。通过验证试验,在响应面优化后所获实际值与预测的最大响应值间拟合程度良好,表明所建数学模型能较好地

预测液体发酵条件对紫灵芝产菌丝体产量的影响,也说明响应面分析法在液体深层发酵条件优化方面具有一定价值。

### 参考文献

- [1] 张倩. 多糖功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 1998, 19(3): 11-13.
- [2] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8.
- [3] 刘美琴, 李建中. 灵芝多糖的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3): 16-19.
- [4] Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia oblique* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(3): 575-577.
- [5] He J, Feng X Z, Lu Y. Three new triterpenoids from *Fuscoporia oblique* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2001, 3(1): 55-61.
- [6] Babitskaia V G, Shcherba V V. The nature of melan in pigments from some micro- and acromycetes [J]. Prim Biokhim Mikrobiol, 2002, 38(3): 286-291.
- [7] 宋频然, 常继东. 灵芝胞外多糖高产菌株筛选及其深层发酵培养基的优化[J]. 食用菌学报, 2003, 10(2): 9-16.
- [8] Rasina L N. Effect of cryosubstance Chagi on deposition or isolation of 90Sr and on the effect of prolonged external exposure to gala-radiation [J]. Biol Radioecol, 2002, 42(4): 399-403.
- [9] Wasser S P, Weis A L. Therapeutic effect of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective [J]. Crit Rev Immunol, 1999, 19(1): 65-77.
- [10] Rzymowska J. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities [J]. Boll Chim Farm, 1998, 137(1): 13-15.
- [11] Glowacki H, Tomaszewski J. Attempted therapy of inoperable cancer of the female genitalia with *Poria oblique* Pres [J]. Extract Ginek Pol, 1962, 33: 445-452.
- [12] 梁剑光, 陈义勇. 灵芝胞外多糖培养基优化及发酵过程研究[J]. 常熟理工学院学报, 2005, 19(2): 71-76.
- [13] 黄毅. 食用菌栽培[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 55-58.
- [14] Fariha H, Aamer A S, Abdul H. Industrial applications of microbial lipases [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [15] 胡永红, 沈树宝, 欧阳平凯. 响应面分析法用于微生物培养基浓度的优化[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 9-12.
- [16] 王云飞, 王成国. 响应面法的理论及应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.

## Optimization of Liquid Fermentation Conditions for *Ganoderma Lucidum* Using Response Surface Methodology

LI Yu-wei, LIAN Rui-li, BAN Qiang, CHEN Zhong-jie, CHENG Mao-gao, LI Xian-fang

(Department of Medicinal Engineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

**Abstract:** For the yields of *Ganoderma Lucidum* mycelium, different factors, including fermentation temperature, fermentation time, initial pH were studied comparatively by using single-factor test during the submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* liquor. Based on the result of single-factor test, fermentation conditions were optimized by using response surface test. The results indicated that the three factors had different effects on the yields of *Ganoderma Lucidum* mycelium and they were initial pH, fermentation time, fermentation temperature from high to low ordinarily; the maximum yields of *Ganoderma Lucidum* mycelium (22.89 g/L) was acquired under the conditions that the temperature, fermentation time, initial pH were 28.7℃, 124 h, 5.9 respectively.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; liquid fermentation; response surface method; optimization