

灵芝真菌发酵产灵芝酸培养基优化研究

朱会霞

(衡水学院 生命科学系,河北 衡水 053000)

摘要:以灵芝菌丝体为试材,采用 $L_{18}(3^7)$ 正交实验设计对灵芝发酵产灵芝酸培养基进行了优化研究。结果表明:影响灵芝真菌发酵产灵芝酸的显著性因素为油酸、 α -萘乙酸、L-谷氨酸,优化后的培养基组合为:葡萄糖 20 g/L、豆粉 15 g/L、玉米粉 40 g/L、油酸 2 g/L、 α -萘乙酸 0.2 g/L、L-谷氨酸 1.5 g/L、酵母膏 1.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.9 g/L、 KH_2PO_4 0.2 g/L、 VB_1 0.02 g/L,此培养基条件下灵芝酸含量最高,为 281.58 ± 11.25 g/L。

关键词:灵芝;灵芝酸;油酸;优化;培养基

中图分类号:S 567.3⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0154-02

灵芝酸是近些年被发现存在于灵芝中的另一种重要的药理活性化合物,具有镇静、解毒、保肝、止痛、毒杀肿瘤细胞等功能^[1-4]。传统的灵芝酸的提取来自于培育或野生的灵芝真菌,而随着科技的发展,灵芝酸的应用范围不断扩大,需求量日益上升,目前只靠人工栽培子实体或采集野生灵芝不能满足实际的需要,采用生物技术发酵的方法来液态培养灵芝真菌并提取灵芝酸具有省时、省力、节能、环保的特点,且能够通过优化发酵条件来提高灵芝真菌菌体和灵芝酸的含量。该研究根据灵芝真菌生长的特点,探讨了适宜灵芝真菌发酵产灵芝酸的培养基优化条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灵芝斜面菌丝体由衡水学院生命科学系微生物实验室保藏。

斜面培养基^[5]:马铃薯 200.0 g/L、葡萄 20.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L、 KH_2PO_4 3.0 g/L、 VB_1 0.01 g/L、琼脂 20.0 g/L、20%的土豆汁配制。

种子培养基^[5]:葡萄糖 30.0 g/L、黄豆粉 10.0 g/L、

酵母膏 1.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 VB_1 0.01 g/L、pH 6.0,蒸馏水配制。

发酵培养基^[5]:碳源为葡萄糖 3.6%、氮源为蛋白胨 0.4%、pH 6.0、酵母膏 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 VB_1 0.005%。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 种子液的培养^[5]:从 28℃ 培养 6 d 的斜面上用接种钩切 1 cm²带培养基的菌体转入装有 150 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,26℃、150 r/min 培养 3 d;发酵培养^[5]:将种子以一定的接种量接入装有一定量培养基的 500 mL 三角瓶中,在 26℃ 振荡培养 6 d。

1.2.2 灵芝发酵产灵芝酸培养基优化设计 选用葡萄糖、玉米粉、豆粉为基础培养基,添加量分别为葡萄糖 20 g/L、豆粉 15 g/L、玉米粉 40 g/L,其它因素油酸、 α -萘乙酸、L-谷氨酸、酵母膏、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 VB_1 为因素,各取 3 水平,进行 $L_{18}(3^7)$ 正交实验,500 mL 三角瓶中装液量为 150 mL,10%的接种量,26℃ 150 r/min 培养 6 d 进行检测,正交实验因素与水平见表 1。

表 1 $L_{18}(3^7)$ 正交实验因素与水平
Table 1 The levels and factors of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

水平	因素						
	A 油酸/g · L ⁻¹	B α -萘乙酸/g · L ⁻¹	C L-谷氨酸/g · L ⁻¹	D 酵母膏/g · L ⁻¹	E KH_2PO_4 /g · L ⁻¹	F $MgSO_4$ /g · L ⁻¹	G VB_1 /g · L ⁻¹
1	1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.2	0.02
2	2	0.2	1.0	1.0	0.7	0.4	0.04
3	3	0.3	1.5	1.5	0.9	0.6	0.06

作者简介:朱会霞(1977-),女,河北景县人,博士,副教授,现主要从事发酵工程和食品等研究工作。E-mail:wztg8268@163.com。

收稿日期:2013-07-24

1.2.3 灵芝酸的提取纯化 发酵液经过滤后,用水饱和和正丁醇提取 3 次,合并正丁醇提取液,然后减压浓缩至干,残渣即为粗灵芝酸。粗灵芝酸,以 $CH_3OH : CH_2Cl_2$ (1 : 9.5 : 95.3 : 97) 分段洗脱;以薄层层析检测洗脱

液,经硅胶柱多次层析纯化既得^[6]。

1.2.4 灵芝酸的测定 高效液相色谱法测定灵芝酸,色谱条件为:色谱柱为 250×4.6 mm CART 250-4RPC₁₈,检测器为紫外检测器,检测波长 245 nm,流动相蒸馏水:乙腈 95:5,流速 1 mL/min,柱温为室温^[6]。

2 结果与分析

由表 2、3 可以看出,添加物油酸、 α -萘乙酸、L-谷氨酸对灵芝发酵产灵芝酸的影响显著,而 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 VB_1 的影响不显著,按照对灵芝真菌发酵产灵芝酸影响的强弱排序为油酸> α -萘乙酸>L-谷氨酸>酵母膏> MgSO_4 > KH_2PO_4 > VB_1 ,根据正交实验优化分析及 K 值比较结果,得出灵芝真菌发酵产灵芝酸培养基优化 $L_{18}(3^7)$ 正交实验理论优化配比组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2\text{E}_3\text{F}_1\text{G}_1$,以此正交实验理论优化条件为配比,

表 2 $L_{18}(3^7)$ 正交实验结果

Table 2 $L_{18}(3^7)$ orthogonal test results

试验 编号	因素							灵芝酸含量 /g·L ⁻¹
A	B	C	D	E	F	G		
1	1	1	1	1	1	1	128.59	
2	1	2	2	2	2	2	179.91	
3	1	3	3	3	3	3	185.81	
4	2	1	1	2	2	3	169.89	
5	2	2	2	3	3	1	243.03	
6	2	3	3	1	1	2	222.38	
7	3	1	2	1	3	2	156.31	
8	3	2	3	2	1	3	228.87	
9	3	3	1	3	2	1	184.63	
10	1	1	3	3	2	2	163.39	
11	1	2	1	1	3	3	166.93	
12	1	3	2	2	1	1	218.84	
13	2	1	2	3	1	3	215.89	
14	2	2	3	1	2	1	266.62	
15	2	3	1	2	3	2	248.33	
16	3	1	3	2	3	1	222.38	
17	3	2	1	3	1	2	192.30	
18	3	3	2	1	2	3	209.40	
K ₁	173.912	176.075	181.778	191.705	201.145	210.682	203.602	
K ₂	227.690	212.943	203.897	211.370	195.640	193.770	198.687	
K ₃	198.982	211.565	214.908	197.508	203.798	196.132	198.295	
R	53.778	36.868	33.130	19.665	8.158	16.912	5.307	

表 3 $L_{18}(3^7)$ 正交实验方差分析

Table 3 Significant analysis of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	8 689.565	2	82.803	19.000	*
B	5 241.428	2	49.945	19.000	*
C	3 416.149	2	32.552	19.000	*
D	1 225.073	2	11.674	19.000	
E	207.807	2	1.980	19.000	
F	1 006.569	2	9.592	19.000	
G	104.943	2	1.000	19.000	
误差	104.94	2			

进行发酵试验,经发酵后测定灵芝酸含量,灵芝酸含量为 281.58 ± 11.25 g/L,此结果高于正交实验组合中的最高值,表明此培养基配比条件适合于灵芝真菌发酵产灵芝酸,即葡萄糖 20 g/L、豆粉 15 g/L、玉米粉 40 g/L、油酸 2 g/L、 α -萘乙酸 0.2 g/L、L-谷氨酸 1.5 g/L、酵母膏 1.0 g/L、 MgSO_4 0.9 g/L、 KH_2PO_4 0.2 g/L、 VB_1 0.02 g/L。

3 讨论

灵芝酸又称为三萜类化合物,有一定的抗癌活性,有很多种类,但赤芝酸 A、B、C、D 几类很苦,且活性最高,在一定的范围内苦味强弱代表灵芝的品质高低。培养基优化过程中添加油酸、油酸、 α -萘乙酸、L-谷氨酸能够有效提高灵芝真菌菌体及灵芝酸产量^[7],其作用机理有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 刘媛,丁重阳,章克昌,等. 10 种中药对灵芝液体发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(2):123-126.
- [2] 王玉红,丁重阳,章克昌. 苦荞对灵芝发酵生产灵芝酸的影响[J]. 食品与发酵工业,2004,29(9):95-98.
- [3] 王晓玲,刘昭廷. 灵芝菌丝体中灵芝酸的体外抑菌作用[J]. 食品科技,2008(10):184-186.
- [4] 鄢嫫,聂少平,陈奕. 灵芝氯仿提取物的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(5):589-593.
- [5] 孙金旭. 灵芝紫外诱变育种研究[J]. 中国酿造,2009(8):63-66.
- [6] 凌庆枝,王林,魏兆军,等. pH 值控制灵芝发酵产生灵芝酸的研究[J]. 中国酿造,2009(3):46.
- [7] 孙金旭,朱会霞. 生长因子对灵芝生长及多糖产量的影响[J]. 中国酿造,2008(24):28.

Study on the Optimization of Culture Medium of *Ganoderma* Fermentation Before Extraction of Ganoderic Acid

ZHU Hui-xia

(Department of Life Science, Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: Taking *Ganoderma* mycelium as material, the culture medium and fermentation conditions of *Ganoderma* for ganoderic acids were optimized through $L_{18}(3^7)$ orthogonal experimental design. The results showed that the significant effect factors was as follows:oleic acid, α -Naphthylacetic acid,L-Glutamic acid,the optimal medium composition;glucose 20 g/L,oybean powder 15 g/L,corn flour 40 g/L,oleic acid 2 g/L, α -Naphthylacetic acid 0.2 g/L,L-Glutamic acid 1.5 g/L,yeast extract 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g/L, VB_1 0.02 g/L;the content of ganoderic acids was 281.58 ± 11.25 g/L under the conditions.

Key words: *Ganoderma*; ganoderic acids;oleic acid ;optimization;culture medium