

樟芝真菌深层发酵条件优化及三萜成分初步分析

孙金旭

(衡水学院,河北 衡水 053000)

摘 要:以樟芝真菌为试材,以樟芝三萜类化合物为目的物,利用 2 L 发酵罐对其深层发酵条件进行优化,10 L 发酵罐放大培养,并利用高效液相色谱(HPLC)法对樟芝真菌三萜类化合物种类进行初步分析。结果表明:适宜于樟芝真菌深层发酵产三萜类化合物的条件为:接种方式为菌丝接种,培养温度 28℃、培养基初始 pH 为 4、溶氧量控制在 20%,此条件下 10 L 发酵罐放大后,樟芝真菌菌体和三萜类化合物的最大产量分别为 3.19 g/L 和 33.59 mg/L,相对稳定。处理后的樟芝三萜,以齐墩果酸为标准品,经检测共有 5 种三萜类化合物,其中 1 种与标准品相近。

关键词:樟芝;三萜;发酵培养

中图分类号:S 759.81 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0156-04

樟芝(*Antrodia*)属担子纲(非褶菌目多孔科药用真菌),又名牛樟菇、牛樟芝。具有保肝、护肝、抗癌、预防高血压之功效,其药用价值远高于人参、灵芝、鹿茸等传统的中药材,可称之为药材之王^[1]。樟芝中具有很多活性物质如多糖、三萜类化合物、超氧化物歧化酶(SOD)腺苷、蛋白质(含免疫蛋白)、多种维生素、微量元素(钙、磷、锗)、核酸、凝集素、氨基酸、胆固醇、木质素、血压稳定物质等。其具备的生理活性功能包括抗肿瘤、增强免疫力、抗病毒、抗过敏、抗高血压、抑制血小板凝集、降血压、降胆固醇、抗细菌、保护肝脏等。研究表明,其主要的功能物质为樟芝多糖和三萜类化合物,药理研究表明,樟芝三萜具有多种生理功能,如抗肿瘤、降血压、抗氧化、调节免疫、抗炎症等^[2-5]。因樟芝人工栽培较困难,野生采集数量较少,采用深层发酵培养法具有省时、省力、经济、环保的特点,因此,深层发酵法培养樟芝真菌被广泛使用。

该研究以樟芝真菌菌体产量及三萜类化合物为目的物,对深层发酵培养樟芝真菌条件进行优化和发酵罐放大,并对发酵产物中的三萜类化合物成分进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株樟芝真菌(*Antrodia camphorata*)由衡水学院生命科学系发酵工程实验室保藏。

作者简介:孙金旭(1975-),男,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.

资助项目:衡水学院重点资助项目(2008031)。

收稿日期:2013-06-24

斜面培养基:马铃薯 200.0 g/L,葡萄糖 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。

液体培养基:葡萄糖 40 g/L,黄豆粉 20 g/L,酵母膏 2 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, VB_1 0.01 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 2 L 发酵罐樟芝真菌培养:装液量 70%,培养基为液体培养基;溶氧界定:2、10 L 发酵罐溶氧电极界定条件:将溶氧电极安装在线后,完全暴露在空气中的溶氧值界定为 100%,将浸泡于饱和的硫代硫酸钠溶液中 5 min 后的溶氧值界定为 0;接种方式选择:A,菌块接种发酵培养,取一定量的无菌水,无菌操作倒入斜面或茄形瓶培养的固体樟芝真菌中,用接种铲将固体培养基在无菌水中切成小块,无菌操作接种于 2 L 发酵罐中发酵培养,培养温度 26℃,时间 144 h,初始 pH 值自动,溶氧值 10%。B,菌丝接种发酵培养取一定量的无菌水,无菌操作倒入斜面或茄形瓶培养的固体樟芝真菌中,用接种环刮取固体培养基表面的菌丝,使菌丝转移至无菌水中,无菌操作将带菌丝的无菌水接种于 2 L 发酵罐中发酵培养,培养条件同 A。

1.2.2 樟芝真菌三萜类化合物 HPLC 测定条件 样品处理:1 g 樟芝真菌菌丝体干样,加入 50 mL 100%乙醇溶液微波提取 4 h,过滤,取上清液 10 mL 水浴蒸干,添加甲醇 1.4 mL 溶解,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测。检测条件:C18 柱(46 mm×300 mm);流动相:A(甲醇:冰乙酸 99:1):B(蒸馏水:冰乙酸 99:1);柱温:35℃;流速 2 mL/min;进样量 10 μ L;检测波长 254 nm。

1.2.3 樟芝真菌菌体及三萜产量的影响因素 温度:分

别设定 2 L 发酵罐培养温度为 20、22、24、26、28、30℃, 初始 pH 值自动, 溶氧 10%, 接种方式为菌丝接种, 培养 144 h 后测定菌体产量及三萜产量; pH: 分别设定不同的培养基 pH 值条件 2、4、6、8、10, 培养温度 28℃, 接种方式为菌丝接种, 培养 144 h 后测定菌体产量及三萜产量; 溶氧对好氧菌的生长繁殖及代谢产物的生成影响较大, 溶氧较小不利于菌体及代谢产物的生成, 溶氧过大, 菌体生长过剩, 不利于代谢产物的形成, 樟芝真菌培养过程中, 在培养温度 28℃, 培养基初始 pH 值 4, 培养时间 144 h, 菌丝接种培养条件下, 分别设定溶氧值为 5%、10%、15%、20%、25%、30%。樟芝真菌 10 L 发酵罐放大培养: 培养条件为培养温度 28℃, 装液量 70%, 初始 pH 为 4, 溶氧 20%, 培养 144 h 后测定菌体产量及三萜产量。

1.3 项目测定

1.3.1 菌体干重的测定 定量取发酵液, 用已经烘干、称重的滤纸过滤去除发酵液, 蒸馏水清洗菌体至无色为止, 60℃ 烘干称重^[6-7]。

1.3.2 三萜类化合物含量的测定 三萜类化合物标准曲线的制备: 准确称取齐墩果酸标准溶液 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mL, 用无水乙醇补至 0.1 mL, 添加 0.2 mL 香草醛, 0.5 mL 高氯酸, 混匀后 60℃ 水浴保温 30 min, 取出后冷却处理 15 min, 加入 5 mL 冰乙酸, 550 nm 下测定吸光度值, 根据对应浓度确定出标准曲线。样品测定: 樟芝真菌菌丝体烘干后, 研磨成粉末, 称取 1 g 加入 95% 乙醇微波提取 4 h, 比色法测定胞内三萜类化合物的含量^[6-7]。

2 结果与分析

2.1 接种方式的选择

菌丝接种发酵培养真菌已有相关文献的报道, 如球孢白僵菌、银耳菌等, 樟芝真菌固体培养过程中, 培养基表面长有大量的菌丝, 适宜于菌丝接种发酵培养。由图 1、2、3 可知, 菌块和菌丝接种培养樟芝真菌二者之间存在明显差异, 菌丝接种时, 菌体到达最大产量的时间为 120 h, 而菌块接种培养时间到达最大产量的时间相对延

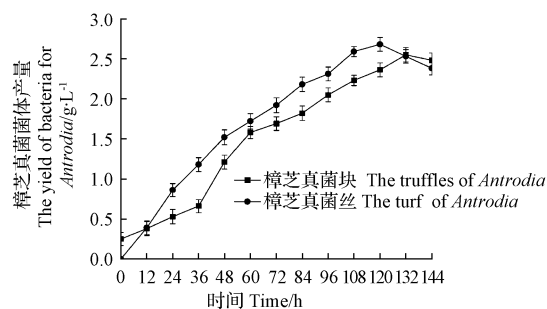


图 1 樟芝真菌块和菌丝接种效果对比

Fig. 1 Comparison of inoculation effect by turf and truffles of *Antrodia camphorata*

长 12 h; 菌丝接种培养樟芝真菌菌体产量明显高于菌块接种培养, 菌丝接种培养樟芝真菌, 菌体大小均匀, 菌体量较大, 菌块接种培养菌体大小不一, 差异较大。

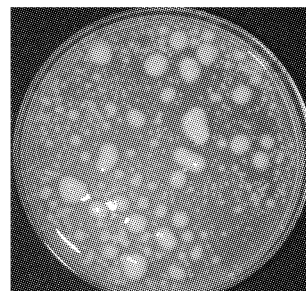


图 2 菌块接种培养菌体

Fig. 2 Fungus of truffles inoculating culture

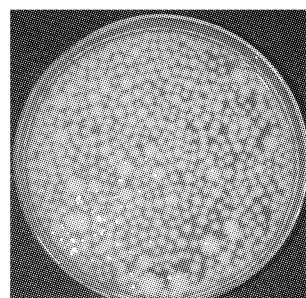


图 3 菌丝接种培养菌体

Fig. 3 Fungus of turf inoculating culture

可见和菌块接种法相比, 菌丝接种法发酵培养樟芝真菌具有缩短培养周期, 提高菌体产量, 降低菌体染菌几率等优点, 较有利于樟芝真菌的发酵培养。

2.2 樟芝真菌菌体及三萜产量的影响因子

2.2.1 发酵温度对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响 温度对真菌菌体生长、菌球的形成、溶氧及代谢产物的形成均有影响^[6], 在最适生长条件下, 菌体新陈代谢旺盛, 生长较快, 产物能够大量形成。由图 4 可知, 樟芝真菌较为适宜的温度范围为 26~30℃, 28℃ 为其生长及代谢产物形成的最适生长温度, 此生长温度下, 樟芝菌体的产量为 2.92 g/L, 樟芝三萜产量为 30.95 mg/L。

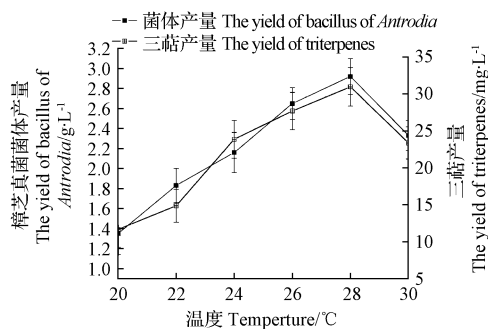


图 4 发酵温度对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the yield of *Antrodia camphorata* mycelia and terpenoids

2.2.2 pH 值对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响 药用真菌培养过程中,培养基的酸碱度对其菌体细胞形态、细胞膜功能、无机盐及生长因子的利用率、菌体量、代谢产物的形成均有影响^[7]。由图 5 可知,和大多数真菌相似,樟芝真菌生长适宜于较酸性的环境,pH 值在 2~6 范围内,菌体量及三萜产量变化不大,且产量较高,pH 值超过 6 以后,菌体及三萜产量明显降低,因此选择培养基初始 pH 为 4 作为樟芝真菌发酵培养的最适 pH 条件。

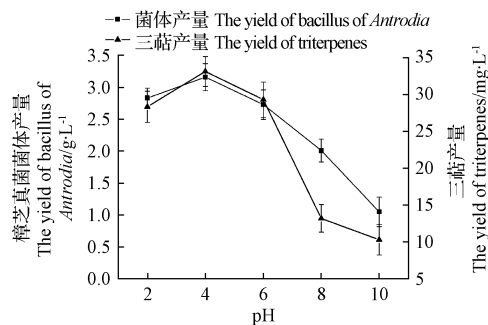


图 5 pH 值对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响

Fig. 5 Effect of pH on the yield of

Antrodia camphorata mycelia and terpenoids

2.2.3 溶氧对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响 由图 6 可知,溶氧对樟芝真菌的菌体生长及三萜产量影响较大,在溶氧值为 5%~20%,随溶氧值的增加,樟芝真菌菌体及三萜产量随之增加,之后随溶氧值的增加,菌体及三萜产量有所降低,由此判断樟芝真菌生长及三萜类化合物形成的适宜溶氧值为 20%。此条件下,菌体和三萜产量分别为 3.28 g/L 和 37.20 mg/L。

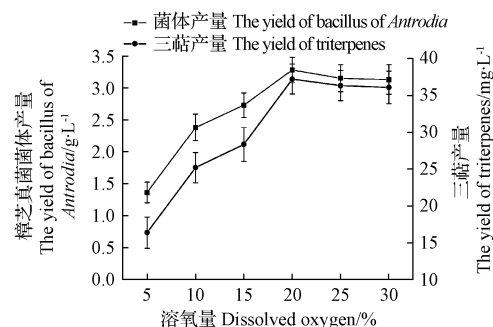


图 6 溶氧对樟芝真菌菌体及三萜产量的影响

Fig. 6 Effect of DO on the yield of *Antrodia*

camphorata mycelia and terpenoids

2.2.4 10 L 发酵罐放大培养研究 由图 7 可知,樟芝真菌在优化后的发酵条件下 10 L 发酵罐放大培养,随培养时间的延长,菌体量和三萜类物质产量不断增加,培养至 120 h 时,菌体产量和三萜类物质的产量同时达到最大,最大产量分别为 3.19 g/L 和 33.59 mg/L,之后随发酵时间的延长,菌体量和三萜类化合物含量均有所降低,相对于 2 L 发酵罐培养,10 L 发酵罐放大培养后,菌

体量和三萜类化合物的产量稍有降低,但降低幅度不大。这可能是放大生产和小型培养的区别所在。

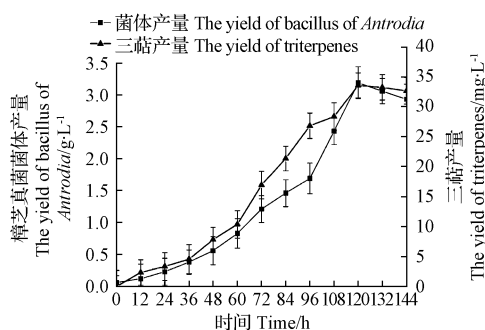


图 7 樟芝真菌 10 L 发酵罐放大研究

Fig. 7 Amplifying of *Antrodia camphorata* in 10 L fermentor

2.3 10 L 发酵罐培养樟芝三萜类化合物的初步分析

由图 8、9 的 HPLC 图谱可知,樟芝三萜类化合物共有 5 个出峰点,其中 1 个出峰点与对照品齐墩果酸相近,表明经发酵培养、分离提取后的樟芝三萜共有 5 种,其中 1 种为齐墩果酸。

DAD1-B, Sig=254, 4-Ref=360, 100-(zhangzhi'santie-2011-12-13 16-23-58/011-0108.D)

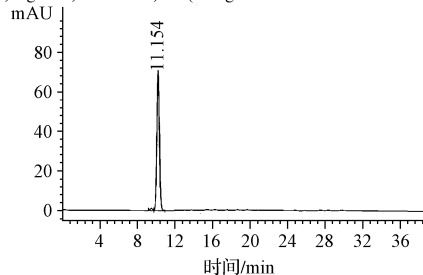


图 8 齐墩果酸标准品液相色谱图

Fig. 8 HPLC spectragram for oleanolic acid standard

DAD1-B, Sig=254, 4-Ref=360, 100-(zhangzhi'santie-2011-12-13 16-23-58/011-0105.D)

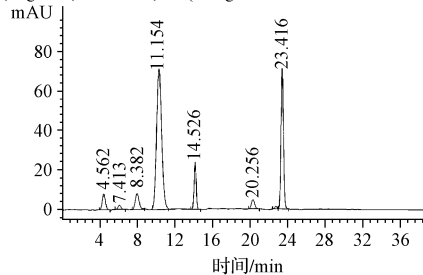


图 9 樟芝三萜液相色谱图

Fig. 9 HPLC spectragram for terpenoids of

Antrodia camphorata

3 讨论与结论

樟芝是一种非褶菌目多孔菌科的担子菌,研究表明该菌具有抗癌、保肝、护肝、抗氧化等功效,其主要的功能性物质为樟芝多糖和三萜类化合物,该试验研究以樟芝菌体产量和三萜类化合物产量为目标,利用 2 L 发酵罐对樟芝真菌深层发酵条件进行了优化,10 L 发酵罐放大培养,并利用高效液相色谱法对樟芝真菌三萜类化合

物种进行了初步分析。结果表明,适宜于樟芝真菌深层发酵产三萜类化合物的发酵条件为:接种方式为菌丝接种;培养温度 28℃;发酵培养高级初始 pH 值为 4;溶氧量控制在 20%,此条件下 10 L 发酵罐放大培养后樟芝真菌菌体和三萜类化合物的最大产量分别为 3.19 g/L 和 33.59 mg/L,相对稳定。处理后的樟芝真菌,以齐墩果酸为标准品,经 HPLC 检测三萜类化合物种类共有 5 种,其中 1 种与标准品相近。

参考文献

- [1] Wang W M, Wu R Y, Ko W H. Variation and segregation following nuclear transplantation in *Antrodia cinnamomea* [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2005, 46: 217-222.
- [2] Kau S W. Studies on triterpenoids from the new species of Taiwan, *Ganoderma camphoratum* Zang et Su [T]. Medical Institute of Natural Chemicals, Taipei Medical University, Master's Thesis, Taipei, ROC, 1992.

- [3] Shen Y C, Chen C F, Wang Y H, et al. Evaluation of the immunomodulating activity of some active principles isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata* [J]. The Chinese Pharmaceutical Journal, 2007, 55: 313-318.
- [4] Shen Y C, Wang Y H, Chou Y C, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhangkui acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata* [J]. Planta Medica, 2004, 70(4): 310-314.
- [5] Geethangili M, Fang S H, Lai C H, et al. Inhibitory effect of *Antrodia camphorata* constituents on the *Helicobacter pylori* associated gastric inflammation [J]. Food Chemistry, 2009(6): 6.
- [6] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process [J]. Biotechnology Advances, 2004(22): 189-259.
- [7] 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.

Fermentation Condition Optimization of *Antrodia camphorata* and the Preliminary Analysis of Triterpene in *Antrodia camphorata*

SUN Jin-xu

(Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: Taking *Antrodia camphorata* as material, triterpene compounds of *Antrodia camphorata* as objective, the fermentation conditions of *Antrodia camphorata* was optimized by 2 L fermentor and amplified in 10 L fermentor. The triterpene compounds of *Antrodia camphorata* was analyzed by HPLC. The results showed that the best in oculte way was turf, temperature 28℃, the initial pH 4 and 20% dissolve of oxygen was suitable for *Antrodia camphorata* fermentation, the maximum yield of *Antrodia camphorata* mycelia and triterpene was 3.19 g/L and 33.59 mg/L respectively. The oleanolic acid as the standard, the result for the triterpene of *Antrodia camphorata* being analyzed by HPLC showed that the triterpene of *Antrodia camphorata* was constituted by five kinds of monomer, one of them was similar to standard.

Key words: *Antrodia camphorata*; triterpene; fermentation

欢迎订阅 2014 年《中国瓜菜》

《中国瓜菜》是由农业部主管、中国农业科学院郑州果树研究所主办的全国性瓜菜一体的科技期刊。2014 年《中国瓜菜》将继续全面、系统地反映我国在瓜类及蔬菜领域的最新研究成果,报道新选育的优良品种,刊登瓜菜产业科技动态、实用技术和信息,以及各大瓜菜种子公司彩版广告。设有试验研究、品种选育、研究简报、专题综述、栽培与植保、产业发展、典型报道等栏目。适合瓜菜科技人员、农业院校师生、瓜菜种植者、种子及产品经销商等瓜菜从业者参阅。双月刊,单月 5 日出版,每期 80 页码,定价 5 元,全年 6 期共 30 元。邮发代号:36-143;国外代号:BM2654。也可汇款至本刊发行部订阅。地址:郑州市航海东路南·中国农业科学院郑州果树研究所;邮编:450009;电子信箱:zg-gc@163.com;电话:0371-65330927(编辑部),65330926(广告部),65330982(发行部),65330949(传真)

《中国瓜菜》2014 年有奖订阅活动:

1. 寄回邮局订单复印件(可传真、邮寄,截止时间为 2013 年 12 月 31 日,以当地邮戳为准)者可获得编辑部赠送礼包 1 份,限前 100 名。如订户有机会凭订单到杂志社将有更多惊喜!

2. 欢迎打包从编辑部直接订阅《中国瓜菜》,10 份以上免邮费,有更多礼品等您拿哟!