

# 响应面法优化灵芪菌质多糖固态发酵条件

朱 强<sup>1</sup> 夏艳秋<sup>1</sup> 陈爱芹<sup>1</sup> 熊晓辉<sup>2\*</sup>

(1 淮海工学院 海洋学院 连云港 222005)

(2 南京工业大学 食品与轻工学院 南京 210009)

**摘要** 采用单因素试验和响应面分析法优化灵芪菌质多糖固态发酵条件。优化后发酵条件为:采用药性固体发酵培养基,初始 pH6.5,接种量 10.16ml/100g,发酵温度 30.65℃,相对湿度 59.54%,发酵周期 28d。利用此优化条件进行灵芪菌质多糖发酵,灵芪菌质多糖含量可达  $9.12 \pm 0.09$ mg/g,较优化前  $8.06 \pm 0.07$  mg/g 提高了 13.15%,为开展其药效学研究及产业化研发提供理论试验依据。

**关键词** 灵芝 黄芪 灵芪菌质多糖 固态发酵

**中图分类号** Q935

利用药用真菌发酵中草药,即“药用真菌双向固体发酵工程”,是上世纪 90 年代中期南京中医药大学药用菌与中药技术研究所庄毅等<sup>[1]</sup>提出,是中药创新药物研发的有效途径之一,通过此体系转化的发酵产物称为药性菌质。利用药用真菌的代谢体系或其酶类的催化作用,将底物(中药)中的化学成分结构进行修饰,使中药产生新的药用价值,或是降低中药的毒副作用,或是提高中药原有药效,为创新中药的研发提供新材料<sup>[2-3]</sup>。

灵芪菌质多糖(*Ganoderma lucidum*-*Astragalus membranaceus* polysaccharide, GAPS)就是利用灵芝为发酵菌种,中药黄芪为药性基质再掺入农副产品为营养基质发酵获得的复合多糖,包含了灵芝、黄芪自身的多糖,发酵过程中的转化多糖,也是灵芪菌质的主要药效成分之一。现已证明比单纯灵芝多糖和黄芪多糖具有更好的抗疲劳<sup>[4]</sup>、增强免疫<sup>[5]</sup>、促生长<sup>[6]</sup>、抗病毒<sup>[7]</sup>及抗肿瘤<sup>[8]</sup>等作用。灵芪菌质及其多糖现已被应用到禽类及水生动物养殖<sup>[9]</sup>,具有广阔的开发应用前景。

目前利用灵芝与黄芪组合发酵的研究大多是将灵芝菌作为发酵动力,通过菌体生长降解大分子物质,研究重点放在成品营养检测和活性比对上,对于发酵过程各项条件相互作用及灵芝菌质多糖产量控制报道较少。本文拟利用响应面法优化灵芝与黄芪组合固态发酵条件生产灵芪菌质多糖,初步建立灵芪菌质多糖的

生产工艺,为以后开展其药效学研究及产业化研发提供理论试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 灵芝[*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst]5.534

购自中国普通微生物菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 综合 PDA 琼脂培养基。

1.2.2 液体种子培养基(g/L) 葡萄糖 30,酵母膏 2,麸皮 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75,  $\text{V}_{\text{BI}}$  0.01, pH 自然。

1.2.3 药性固体发酵培养基<sup>[10]</sup>(%) 原料均以啤酒糟为基准添加。啤酒糟 100,黄芪 12.52,葡萄糖 4.78,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.21,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25,水 140。

### 1.3 方法

1.3.1 固体发酵工艺流程 菌种活化→液体种子培养→培养基配制,调整 pH=6.5,装入 250ml 罐头瓶,8 层纱布封口,121℃ 灭菌 40min→接种(接种量 10ml/100g)→28℃ 避光培养待菌体结块后倒置培养 30d→发酵结束。每个处理设 3 个重复。单因素试验时,考察因素变化,其他因素不变。

1.3.2 菌质多糖的提取与测定(苯酚-硫酸法<sup>[11]</sup>) 将固体菌质于 60℃ 干燥,粉碎,过 80 目筛,用 75% 乙醇 60℃ 水浴醇提 1h 去除脂、单糖、低聚糖,过滤,滤渣用 75% 乙醇洗涤 2 次后加 20 倍蒸馏水,超声处理 10min

收稿日期:2011-09-01 修回日期:2011-10-08

\* 通讯作者,电子信箱:xxh. mymr@ yahoo. com. cn

后于 95℃ 水浴提取 4h, 提取液透析至没有还原糖反应。透析液在 50℃ 真空旋转蒸发浓缩至原体积 1/5, 再加入 3 倍体积 95% 酒精, 4℃ 过夜。8000r/min 离心 20min。沉淀用无水乙醇洗涤 2~3 次, 冷冻干燥即得菌质多糖粗品, 热水复溶后用苯酚-硫酸法测定菌质多糖含量。

**1.3.3 响应面分析法 (RSA)** (采用 Design-Expert 6.0 软件设计) 根据中心组合设计原理, 以 GAPS 含量为响应值, 设计三因素三水平共 15 个试验点的响应面, 其中 12 个是析因点, 即自变量取值在所选因子所构成的三维顶点。3 个为零点重复, 用以估计试验误差。根据相应的试验表进行试验后, 对数据进行二次回归拟合, 分析各因素的主效应和交互效应, 最后通过岭脊分析求出最佳值。

**1.3.4 数据统计分析** 试验设 3 次平行, 取平均值, 数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理, 分别对数据作单因子方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  表示差异性显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验确定初始发酵条件

**2.1.1 温度对固态发酵产 GAPS 的影响** 温度是影响灵芝菌丝体生长及代谢产物形成的重要因素。试验考察了 22℃~37℃ 温度对 GAPS 生产的影响。由图 1 可以看出, 温度对灵芝生长及多糖产生影响较大, 其中 31℃ 时菌质中 GAPS 含量达  $8.31 \pm 0.06 \text{ mg/g}$ 。温度过高或过低都会影响相应的酶活, 从而降低对基质的分解效率, 不利于代谢产物的生成。因此, 试验初步确定培养温度为 31℃。由方差分析及多重比较分析可知, 各温度梯度之间 GAPS 产量差异性显著 ( $P < 0.05$ ,  $N = 3$ )。因此, 温度是影响 GAPS 产生的显著性因素。

**2.1.2 接种量对固态发酵产 GAPS 的影响** 接种量也是决定灵芝生长繁殖速度和多糖产量的重要因素。图 2 结果表明, 接种量低于 10ml/100g, GAPS 随着接种量

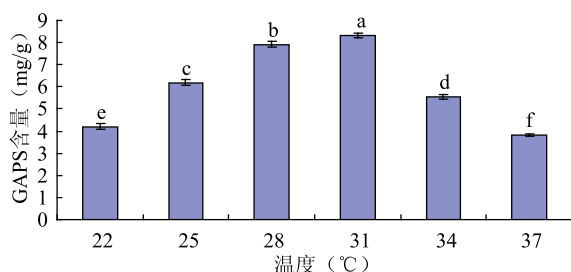


图 1 温度对灵芝菌质多糖的影响

Fig. 1 Effects of temperature on GAPS

的增加逐渐增加。接种量高于 10ml/100g, GAPS 含量反而随接种量的增大而降低。且接种量过大, 基料底部有积液易染菌及生成黄斑。另外, 灵芝菌丝早期生长过快, 在基料表面迅速形成菌膜盖, 造成基料内部菌丝生长受到限制, 继而导致多糖产量下降。菌体生长过快, 老化就快, 也可能是降低多糖积累的重要原因。因此, 试验初步确定接种量为 10ml/100g。由方差分析及多重比较分析可知, 各接种量之间的 GAPS 产量差异性显著 ( $P < 0.05$ ,  $N = 3$ )。因此, 接种量也是影响 GAPS 产生的显著性因素。

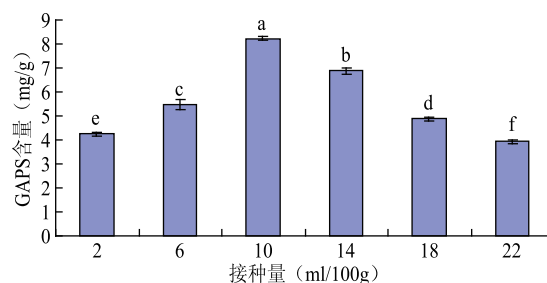


图 2 接种量对灵芝菌质多糖的影响

Fig. 2 Effects of inoculation volume on GAPS

**2.1.3 相对湿度对固态发酵产 GAPS 的影响** 相对湿度影响培养基中水分蒸发速度, 相对湿度较低时, 空气中水蒸气气压低, 基质中的水分容易挥发失去, 致使灵芝萌发速度慢, 生长受阻。而相对湿度较高时, 导致培养基较为潮湿, 气体流通性差也影响灵芝生长。图 3 结果说明了以上论点, 随着相对湿度的增加 GAPS 的产量呈先上升后下降的趋势, 在相对湿度为 60% 时较适合灵芝生长及多糖代谢合成。由方差分析及多重比较分析可知, 各相对湿度梯度间的 GAPS 产量差异性显著 ( $P < 0.05$ ,  $N = 3$ )。因此, 试验初步确定相对湿度为 60%。

**2.1.4 初始 pH 对固态发酵产 GAPS 的影响** 初始 pH 也是一项重要的发酵参数。图 4 表明, 随初始 pH 的升高, GAPS 的产量呈现先上升后下降的趋势, 但变化不大, 尤其是在 pH 6.0~7.0 范围内, GAPS 产量差异性不

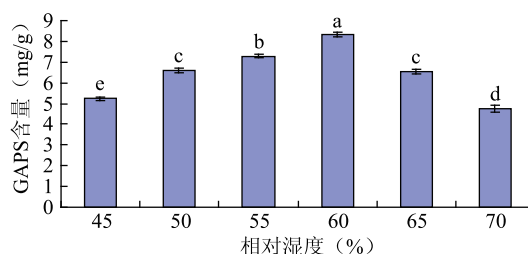


图 3 相对湿度对灵芝菌质多糖的影响

Fig. 3 Effects of humidity on GAPS

显著( $P>0.05$ ,  $N=3$ ), 试验中可调范围较宽, pH 为 6.5 时对应多糖含量最高, 本试验选择初始 pH 为 6.5。

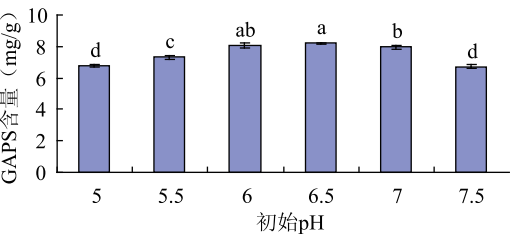


图 4 初始 pH 对灵芝菌质多糖的影响  
Fig. 4 Effects of initial pH on GAPS

2.2 响应面法优化灵芝固态发酵条件

2.2.1 响应面试验设计方案及结果 根据发酵条件单因素试验结果, 选择以接种量、温度、相对湿度为自变量, 以 GAPS 含量为响应值, 设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 试验因素和设计水平及试验结果分别见表 1、表 2。

表 1 灵芝菌质多糖固态发酵条件响应面分析因素与水平  
Table 1 Factors and levels of RSA of GAPS SF condition

因素	编码	水平					
		-1.414	-1	0	1	1.414	$\Delta x_i$
接种量 (ml/100g)	A	7.17	8	10	12	12.83	2
温度 (℃)	B	26.76	28	31	34	35.24	3
相对湿度 (%)	C	52.93	55	60	65	67.07	5

2.2.2 响应面模型的二次方差分析 由表 3 全模型方差分析可知 A、B、C、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、BC 对响应值 Y 影响显

表 2 灵芝菌质多糖固态发酵条件响应面分析方案及试验结果

Table 2 Programs and experimental results of RSA of GAPS SF condition

试验号	接种量 (A, ml/100g)	温度 (B, ℃)	相对湿度 (C, %)	GAPS 含量 (Y, mg/g)
1	8.00	34.00	65.00	6.22
2	10.00	31.00	60.00	9.15
3	12.00	28.00	65.00	5.88
4	8.00	28.00	55.00	6.87
5	10.00	31.00	60.00	9.05
6	12.00	34.00	55.00	5.92
7	10.00	31.00	60.00	9.03
8	10.00	31.00	67.07	6.89
9	10.00	31.00	60.00	9.12
10	12.83	31.00	60.00	7.54
11	7.17	31.00	60.00	7.16
12	10.00	35.24	60.00	6.72
13	10.00	31.00	52.93	7.15
14	10.00	31.00	60.00	9.02
15	10.00	26.76	60.00	7.38

著( $P<0.05$ ), 说明接种量、温度和相对湿度是 GAPS 发酵生产中重要的控制因素。其中温度和相对湿度有交互作用, 且交互作用极显著( $P<0.01$ ), 说明温度和相对湿度是 GAPS 发酵生产中关键的控制因素。失拟项  $P=0.3554$  没有显著性意义, 说明数据中没有异常点, 不需要引入更高次数的项, 模型  $P<0.0001$ , 说明模型适当。

表 3 响应面模型的二次方差分析表  
Table 3 ANOVA of RSA model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	
Model	20.75	9	2.31	680.12	< 0.0001 **	significant
A	0.072	1	0.072	21.30	0.0058 *	
B	0.22	1	0.22	64.25	0.0005 *	
C	0.034	1	0.034	9.97	0.0252 *	
A <sup>2</sup>	5.56	1	5.56	1640.90	< 0.0001 **	
B <sup>2</sup>	7.70	1	7.70	2271.81	< 0.0001 **	
C <sup>2</sup>	7.93	1	7.93	2340.53	< 0.0001 **	
AB	0.013	1	0.013	3.83	0.1077	
AC	0.013	1	0.013	3.86	0.1068	
BC	0.42	1	0.42	123.13	0.0001 *	
Residual	0.017	5	3.390E-003			
Lack of Fit	3.630E-003	1	3.630E-003	1.09	0.3554	not significant
Pure Error	0.013	4	3.330E-003			
Cor Total	20.77	14				

\*  $P<0.05$ , significant; \*\*  $P<0.01$ , very significant.

用多项式回归分析对表 2 数据进行拟合, 建立多元二次响应面回归模型:

GAPS 含量 = -206.08691 + 4.38177 × 接种量 + 4.84367 × 温度 + 3.98630 × 相对湿度 - 0.21229 × 接种

量<sup>2</sup> - 0.11102 × 温度<sup>2</sup> - 0.040567 × 相对湿度<sup>2</sup> + 0.013429 × 接种量 × 温度 - 0.008085 × 接种量 × 相对湿度 + 0.030457 × 温度 × 相对湿度。

由表 3 可知, 交互项 BC 显著( $P<0.05$ ), AB、AC

项不显著( $P>0.05$ ),因此可去除交互项 AB、AC 交互项优化模型。优化后方差分析中失拟项的  $P=0.1601$ ,没有显著性意义,模型的  $P<0.0001$ ,说明优化模型合适。优化后建立的多元二次响应面回归模型为:

GAPS 含量 =  $-205.33353 + 4.31301 \times \text{接种量} + 4.99144 \times \text{温度} + 3.89740 \times \text{相对湿度} - 0.21229 \times \text{接种量}^2 - 0.11102 \times \text{温度}^2 - 0.040567 \times \text{相对湿度}^2 +$

$0.030457 \times \text{温度} \times \text{相对湿度}$ 。

2.2.3 GAPS 固态发酵条件优化结果 (1)响应面分析:从图 5 及软件分析可知,回归方程存在极大值,通过岭脊分析得到极大值(GAPS 含量 9.09 mg/g)所对应的各参数为:接种量 10.16 ml/100g,温度 30.65℃,相对湿度 59.54%。其极大值对应的各因素的坐标值即为通过响应面优化的最优发酵条件。

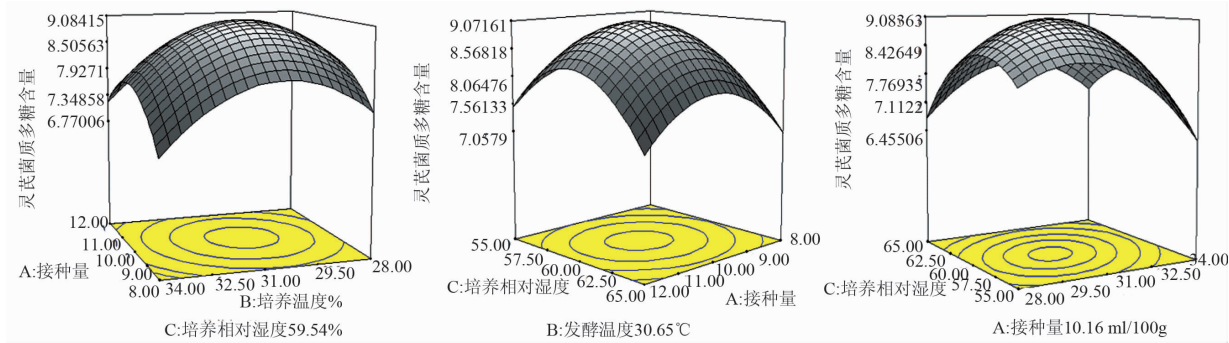


图 5 响应面分析立体图

Fig. 5 The three-dimensional image of response surface analysis

综合单因素及响应面优化结果得出 GAPS 发酵条件为:采用药性固体发酵培养基,初始 pH6.5,接种量 10.16 ml/100g,发酵温度 30.65℃,相对湿度 59.54%。

(2)验证试验:采用初始发酵条件和优化发酵条件,分别进行 5 组平行发酵试验,测得 GAPS 含量如表 4 所示。

表 4 验证试验

Table 4 The test of validation

	初始发酵条件					平均值	优化发酵条件					平均值
GAPS 含量 (mg/g)	8.15	8.02	7.98	8.05	8.10	8.06 ± 0.07	9.08	9.12	9.02	9.04	9.00	9.05 ± 0.05

由表 4 可得,优化后 GAPS 产量比初始发酵条件下产量提高了 12.31%,且优化后实测值  $9.05 \pm 0.05$  mg/g 与模型预测值 9.09mg/g 非常接近,表明该模型能很好地预测实际发酵结果。

2.3 GAPS 固态发酵动态分析

由发酵时效曲线图 6 看出,固态发酵中,GAPS 含

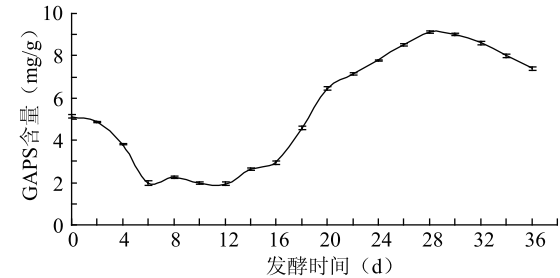


图 6 灵芝菌质多糖固体发酵时效曲线

Fig. 6 Effects of culture time on GAPS

量先降后增,第 12d 出现最低值 ( $1.93 \pm 0.08$ mg/g),28d 达到最高值 ( $9.12 \pm 0.09$ mg/g),随后趋于稳定并少有下降。笔者认为发酵过程中灵芝在消耗基质多糖(包括黄芪多糖)生成自身物质的同时,又不断合成新的多糖。在 12d 以前主要为灵芝快速生长消耗基质多糖的阶段,表现为 GAPS 含量下降。12d 以后由于多糖合成速度逐渐大于消耗速度,表现为 GAPS 含量逐渐增加。但随着菌丝的老化自溶和酶解作用,GAPS 含量在 28d 以后又有所下降,所以 28d 可以作为 GAPS 固态发酵的发酵终点。

3 结 论

本研究利用 Design-Expert 6.0 软件对 GAPS 固态发酵条件进行响应面优化分析,建立多项数学模型,并利用 SAS 对模型进行显著性检验。优化得到其最佳发

酵条件为:采用药性固体发酵培养基,初始 pH6.5,接种量 10.16 ml/100g,发酵温度 30.65℃,相对湿度 59.54%,发酵周期 28d。在此优化条件下,GAPS 含量高达  $9.12 \pm 0.09$  mg/g,为灵芝药性固态培养提供了理论试验数据,也为 GAPS 的开发利用打下基础。

### 参考文献

- [1] 庄毅. 药用真菌新型(双向性)固体发酵工程. 中国食用菌, 2002,21(4):3-6.  
Zhuang Y. Edible Fungi of China, 2002,21(4):3-6.
- [2] 庄毅,池玉梅,陈慎宝,等. 药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质-F 的研制. 中国药学杂志, 2004, 39(3): 175-178.  
Zhuang Y, Chi Y M, Chen S B, et al. Chinese Pharmaceutical Journal, 2004, 39(3): 175-178.
- [3] 阮鸣. 不同药(食)用真菌固体发酵对黄芪中黄芪甲苷的影响. 中草药, 2011,42(7):1421-1424.  
Ruan M. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011,42(7): 1421-1424.
- [4] 魏巍. 灵芝-黄芪液体发酵条件优化及缓解体力疲劳功能研究. 成都: 四川农业大学, 2007. 06.  
Wei W. The study on fermentation condition and relieving physical fatigue function of ganoderma-stragalus. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2007. 06.
- [5] 唐宁,张敦林,张李阳. 芝芪菌质多糖的制备及其增强免疫活性的初步研究. 中国预防兽医学报, 2010,32(1):68-70.  
Tang N, Zhang, D L, Zhang L Y. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2010,32(1):68-70.
- [6] 霍光明,张李阳,周业飞,等. 芝芪菌质多糖对 AA 肉鸡生长、免疫和肉品质的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2010,31(3):39-43.  
Huo G M, Zhang L Y, Zhou Y F, et al. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2010,31(3):39-43.
- [7] 张敦林,张李阳,唐宁,等. 芪菌质多糖对 CEF 的增殖和抵抗 NDV 感染的研究. 安徽农业科学, 2008,36(20):8604-8605,8614.  
Zhang D L, Zhang L Y, Tang N, et al. Journal of Anhui Agr Sci, 2008,36(20): 8604-8605,8614.
- [8] 张雅雯,唐宁,饶玉鹏,等. 芝芪菌质多糖的分离、纯化及体外抗肿瘤活性初步研究. 安徽农学通报, 2009, 15(13):40-41.  
Zhang Y W, Tang N, Rao X P, et al. Anhui Agri Sci Bull, 2009, 15(13):40-41.
- [9] 霍光明,张李阳,张永江,等. 芝芪菌质对罗氏沼虾生长和免疫及肌苷酸含量的影响. 水生态学杂志, 2009,12(6):85-88.  
Huo G M, Zhang L Y, Zhang Y J, et al. Journal of Hydroecology, 2009,12(6):85-88.
- [10] 朱强,夏艳秋,董克克,等. 响应面法优化灵芝药性固体发酵培养基. 中国生物工程杂志, 2010,30(9):75-79.  
Zhu Q, Xia Y Q, Dong K K, et al. China Biotechnology, 2010, 30(9):75-79.
- [11] 黎晶晶,徐格非. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的研究. 杭州化工, 2008,38(1):23-26.  
Li J J, Xu G F. Hangzhou Chemical Industry, 2008,38(1): 23-26.

## Optimization of *Ganoderma lucidum*-*Astragalus membranaceus* Polysaccharide Solid Fermentation Condition by Response Surface Analysis

ZHU Qiang<sup>1</sup> XIA Yan-qi<sup>1</sup> CHEN Ai-qin<sup>1</sup> XIONG Xiao-hui<sup>2</sup>

(1 College of Marine, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(2 College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract** Single factor test and response surface analysis were used for optimization of *Ganoderma lucidum*-*Astragalus membranaceus* polysaccharide solid fermentation. Optimized solid fermentation conditions were as follows: herbs solid fermentation medium, initial pH6.5, inoculum volume 10.16ml/100g, fermentation temperature 30.65℃, relative humidity 59.54%, fermentation period 28d. Under the above optimum conditions, *Ganoderma lucidum*-*Astragalus membranaceus* polysaccharide (GAPS) content was up to  $9.12 \pm 0.09$  mg/g and increased by 13.15% than unoptimization ( $8.06 \pm 0.07$  mg/g), which provided a theoretical experimental basis for pharmacodynamics research and industrialization development.

**Key words** *Ganoderma lucidum* *Astragalus membranaceus* *Ganoderma lucidum*-*Astragalus membranaceus* polysaccharide (GAPS) Solid fermentation (SF)