灵芝深层培养的药质培养基及发酵工艺条件优化

冀 宏[1]，汪 虹[2]
(1.常熟理工学院，江苏 常熟 215500；2.上海食用菌研究所，上海 201106)

摘 要：研究灵芝发酵的药质(六味地黄丸)培养基最优配方组成及提高发酵生物量的优化工艺条件。采用均匀设计对影响发酵生物量的关键因子及其水平的相互关系进行研究。通过回归方程求解得到药质培养基最优组合；应用正交试验优化药质发酵的工艺条件。结果表明：生物量最佳的药质培养基组分是：六味地黄丸 10g/L、黄豆粉 50g/L、玉米粉 10g/L、葡萄糖 8.29g/L、$MgSO_4$ 1.0g/L、KH_2PO_4 1.0g/L、VB_1 20～40mg/L。优化发酵条件为：接种量 10%，通气量 0.5m³/min、搅拌速度 150r/min、发酵周期 144h。均匀设计和正交试验结合，实现了对灵芝药质发酵条件的优化。

关键词：灵芝；药质发酵；优化；六味地黄丸；均匀设计；正交设计

Optimization of Drug Culture Medium Compositions and Technology Conditions for *Ganoderma lucidum* Submerged Culture

JI Hong[1]，WANG Hong[2]
(1. Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China ;
2. Institute of Edible Fungi of Shanghai, Shanghai 201106, China)

Abstract：The composition of drug culture medium and technology conditions that increase the yield of biomass for *Ganoderma lucidum* submerged culture were optimized. Uniform design was used to evaluate the crucial factors affecting the yield of biomass. In the following phase of the optimization process, $L_9(3^4)$ orthogonal test was applied to get the optimal fermentation conditions. By statistical analysis, the optimum composition of drug culture medium affecting the yield of the biomass were determined as follows: drug substance (Liuweidihuang pills) 10 g/L, soybean powder 50 g/L, corn powder 10 g/L, glucose 8.29 g/L, $MgSO_4$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L and VB_1 20 to 40 mg/L and the optimal fermentation conditions are as follows: inoculum size 10%, ventilation volume 0.5m³/min, agitation speed 150 r/min and duration 144 h. Uniform design and orthogonal test simultaneously used in the optimization of technology for *Ganoderma lucidum* fermentation in drug culture medium are proved to be effective.

Key words：*Ganoderma lucidum*；drug culture medium fermentation；optimization；Liuweidihuang pills；uniform design；orthogonal test

中图分类号：TS201.1 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)12-0358-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是具有滋补强壮、扶正固本作用的药用真菌。它已经越来越普遍地被用作保健和营养强壮类食品的生产原料。研究证实[1]，利用发酵工程手段获得的灵芝菌丝体与子实体具有同等的临床效果，这为开发灵芝类新产品开拓了新的思路和方法。在灵芝发酵生产中，培养基组分的变化会影响灵芝菌丝体活性成分产生[2]。通过在培养基中添加具有一定功效的中药成分(构成药质培养基)，在代谢的诱导和转化机制作用下，可以使发酵灵芝菌丝体有效成分的组成与含量得到改善与提高[2]，从而为食品和医药工业提供更加丰富的生产新原料。目前，国内学者在食、药用真菌的固体药质发酵的研究与应用方面开展了有益的探索，并取得了丰硕的成果[3]。

传统经典名方“六味地黄丸”是滋阴补肾的良剂，现代药理研究证实，六味地黄丸具有增强机体免疫机能、抗肿瘤和显著抗衰老作用[4-6]，根据中医辨证论治原则，灵芝与其在功效上相辅相成，因此，本实验选用“六味地黄丸”作为药性添加成分制备药质发酵培养基质(药质培养基)，进行灵芝液体发酵，以期改善和提高灵芝发酵菌丝体功效。

收稿日期：2008-10-02
作者简介：冀宏(1969-)，男，副研究员，博士研究生，研究方向为菌物生物学及蕈菌资源工程技术。E-mail：jihong8848@126.com

本实验拟采用均匀设计(Uniform design)与正交设计试验方法，优化确定药质培养基的最佳配方和发酵工艺条件，初步探讨灵芝(六味地黄丸)药质发酵的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及试剂

灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株由河北省微生物研究所提供；仲景牌六味地黄丸(浓缩丸水剂；成分：熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻) 河南宛西制药股份有限公司；玉米粉、黄豆粉等为市售食品级。

试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基

菌种活化培养基(W/W)：甘草(40 目)78%、麸皮20%、蔗糖 1%、硫酸钙(1%):水 =1:1.2(W/V)， pH 值自然。126℃，灭菌 90min。

基础培养基(W/V，g/L)：黄豆粉 20、玉米粉 20、葡萄糖 10、酵母膏 5.0、$MgSO_4$ 1.0、KH_2PO_4 1.0、VB_1 20～40mg/L，pH 值自然。121℃，灭菌 30min。

药质培养基：基础培养基中添加药性成分(六味地黄丸)，采用均匀设计试验优化成分配比，筛选确定最适培养基配方，pH5.5～6.5。121℃，灭菌 30min。

1.2 仪器与设备

中药粉碎机、立式电热蒸汽消毒器、立式温控摇柜、10L 自控式不锈钢发酵罐、超净工作台、高速离心机、精密电子天平等。

1.3 分析检测方法

生物量(菌丝体鲜重)的测定采用离心法测定。取发酵液 100ml，4000r/min，离心 10min，电子天平称量沉淀物重量，即为菌丝体湿重，单位 g/L。结果取三个重复的平均值。

1.4 工艺流程

基础培养基
↓
中 药→粉碎→混合配比→药质培养基
↓
灵芝菌株→甘草培养基活化→种子摇瓶→ 10L 发酵罐
↓
检测←药质发酵液←发酵培养

1.5 操作要点

1.5.1 药质处理

采用均重法测得六味地黄丸质量为 0.18g/ 丸，根据说明书计算出每丸相当于生药材 0.375g，故以此为标准计量药质添加量(单位：g 生药材)；为便于实验称量，需将丸剂预先粉碎，过 120 目不锈钢筛，根据需要称取。

1.5.2 药质培养基配方优化[7-9]

在单因素试验基础上，进行均匀设计试验。以发酵产物浓度(菌丝体鲜重(g/L))为检测指标，选择对发酵效果影响较大的因素：X_1 药质(六味地黄丸，g/L)、X_2 黄豆粉(g/L)、X_3 玉米粉(g/L)、X_4 酵母膏(g/L)和 X_5 葡萄糖(g/L)五个关键因子，利用数据处理软件系统设定各因素水平值间隔，建立试验方案。试验结果为三次重复的平均值，数据的分析和二次多项式回归方程的建立均采用数据处理软件。均匀设计采用表 $U_{13}(13^8)$，因素水平编码及试验结果见表 2。

1.5.3 灵芝菌株活化

将保藏的灵芝斜面菌株无菌操作接种于甘草培养基，28℃恒温培养 15～20d 左右，直至培养基表面布满白色菌丝。

1.5.4 种子摇瓶培养

按照优化配方制备药质培养基，三角摇瓶装液量 100ml/250ml，灭菌，冷却，无菌接入灵芝活化菌株，在 28 ± 1℃，180r/min，摇床培养 96h。

1.5.5 药质发酵工艺实验

10L 机械搅拌式发酵罐，药质培养基装量 7L，灭菌，接种液体灵芝菌丝体进行发酵。选择直接影响发酵效果的接种量(%，V/V)、通气量(m^3/min)、转轴搅拌速度(r/min)和发酵周期(h)四个因素进行 $L_9(3^4)$正交试验(表 1)，以发酵菌丝体鲜重(g/L)为指标，确定最佳发酵条件。

表 1 药质发酵条件正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test on fermentation conditions in drug culture medium

水平	因素			
	A 接种量(%，V/V)	B 通气量(m^3/min)	C 搅拌速度(r/min)	D 发酵周期 (h)
1	15	1.0	300	192
2	10	0.75	200	168
3	5	0.5	150	144

2 结果与分析

2.1 药质培养基优化结果

药质培养基均匀设计试验因素水平编码及结果见表 2。

利用数据处理软件对表 2 中的数据进行二次多项式全回归分析(回归分析结果见图 1)，得到方程：

$$y=515-5.19X_1-3.26X_2-8.06X_3-8.09X_4+22.4X_5+0.0158X_1^2+0.0334X_2^2+0.126X_3^2+0.830X_4^2-1.35X_5^2$$

R^2=0.9983；F=117.3；α =0.05；剩余标准差 s=9.67。

显著性检验说明回归方程显著；确定系数为 0.9983，表明该方程的预测值与实际值之间拟合度极好，能够很

表2 药质发酵培养基均匀设计试验及结果

Table 2 Uniform test design and results on compositions of drug culture medium

试验号	因素(g/L)					菌丝体生物量(g/L)
	X_1药质六味地黄丸	X_2黄豆粉	X_3玉米粉	X_4酵母膏	X_5葡萄糖	
1	10.0	26.7	33.3	5.33	11.3	334
2	15.8	46.7	16.7	2.67	7.50	337
3	21.7	23.3	43.3	0.00	3.75	302
4	27.5	43.3	26.7	6.00	0.00	156
5	33.3	20.0	10.0	3.33	12.5	289
6	39.2	40.0	36.7	0.67	8.75	218
7	45.0	16.7	20.0	6.67	5.00	227
8	50.8	36.7	46.7	4.00	1.25	124
9	56.7	13.3	30.0	1.33	13.8	150
10	62.5	33.3	13.3	7.33	10.0	165
11	68.3	10.0	40.0	4.67	6.25	145
12	74.2	30.0	23.3	2.00	2.50	66.0
13	80.0	50.0	50.0	8.00	15.0	54.0

好解释药质发酵过程中各因素与菌丝生物量之间的变化关系；标准回归系数(图1显示，药质(六味地黄丸)成分(X_1)和葡萄糖含量(X_5)对指标影响最大，且在合理区域内减少药质添加量，或增加葡萄糖浓度对发酵菌丝体产生有积极的影响；其余因素影响的主次顺序是：玉米粉(X_3)＞黄豆粉(X_2)＞酵母膏(X_4)。

在上述回归方程条件下进行优化，得到药质培养基配最优条件为：X_1药质(六味地黄丸)10g/L、X_2黄豆粉50g/L、X_3玉米粉10g/L、X_5葡萄糖8.29g/L，由于X_4(酵母膏)对回归的贡献最小，且有抑制性，故在优化过程中取最小值“0g/L”，优化预期指标的最大值为410g/L。用优化所得最佳培养基进行验证实验，三次重复所得发酵菌丝体鲜重平均为408.8g/L，较优化前最高产量提高了21.3%。因素(X_1、X_2、X_3、X_4、X_5)与指标间的“因素-响应值”二维曲线关系如图2所示。

2.2 菌株活化与种子摇瓶培养

实验发现，由试管斜面接种药质培养基摇瓶发酵，灵芝菌丝生长适应期长，增殖速度慢；经甘草培养基活化后接种，菌丝能较快进入快速生长，发酵培养效果好。分析可能原因，一方面，经过甘草基质培养的生长代谢过程，使灵芝菌丝对药质培养的发酵条件具有了相关适应性；另一方面，甘草基质具有一定松散度，可在液体培养基中形成均匀分散，较多的生长点必然利于菌丝的萌发生长。

接种后，28±1℃，180r/min，摇床培养96～144h，摇瓶培养基变得澄清透明，并有大小均匀的灵芝菌丝球生成。一般种子培养发酵周期以96h为宜。

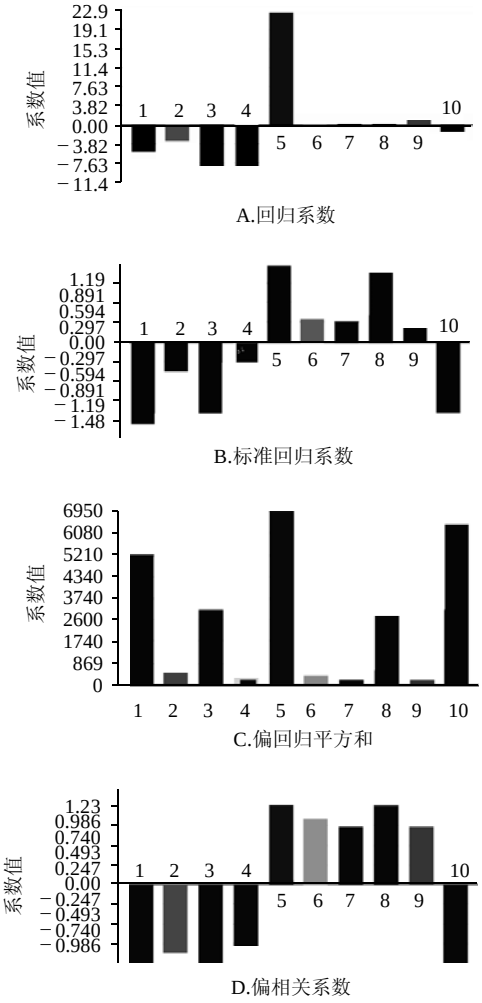


图1 回归分析结果

Fig.1 Results of regression analysis

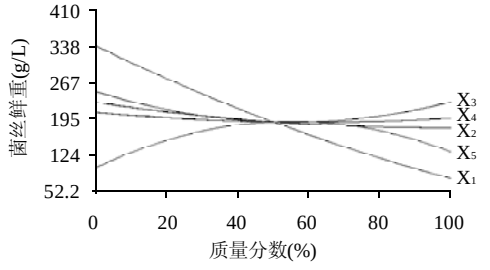


图2 因素-响应值关系图

Fig.2 Relationship of factors with yield of biomass

2.3 发酵工艺条件确定

依表1设计的实验条件，考察各因素对发酵罐药质发酵的影响。结果如表3所示。

从极差分析可以看出，实验所设四个因素对药质发酵的影响顺序为B＞A＞D＞C，从K值看，以A因素的水平2(接种量10% ，V/V)、B因素的水平3(通气量0.5m³/min)、C因素的水平3(搅拌速度150r/min)、D

因素的水平3(发酵周期144h)组合为最佳，因此，选取药质发酵最佳工艺参数组合为$B_3A_2D_3C_3$。

表3 药质发酵条件$L_9(3^4)$正交试验结果

Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test on fermentation conditions in drug culture medium

试验号	A接种量	B通气量	C搅拌速度	D发酵周期	生物量(g/L)
1	1	1	1	1	195
2	1	2	2	2	284
3	1	3	3	3	377
4	2	1	2	3	305
5	2	2	3	1	353
6	2	3	1	2	395
7	3	1	3	2	256
8	3	2	1	3	328
9	3	3	2	1	262
K_1	856	756	918	810	
K_2	1053	965	851	935	
K_3	846	1034	986	1010	
J_1	285.3	252.0	306.0	270.0	
J_2	351.0	321.7	283.7	311.7	
J_3	282.0	344.7	328.7	336.7	
R	69.0	92.7	45.0	66.7	

3 讨 论

3.1 对于复杂的灵芝发酵代谢过程而言，发酵效果可以体现在生物量的增多和有效代谢产物的生成两个方面[10]。所以，当采用不同的考察指标时，优化实验的结论可能是不同的。本实验目的主要考查灵芝药质发酵的工艺可行性，从检测的方便性和数据结果的直观性考虑，没有选择灵芝有效成分(如多糖等)为测定指标，而是确定发酵生物量——灵芝菌丝体重量作为惟一的指标。因此，研究获得的药质培养基组成和发酵工艺仅是在此指标下的优化结果，而针对某一具体代谢产物，尚需在此基础之上进一步研究和探讨。

3.2 在众多对影响生物过程的因子水平及其交互作用进行优化和评价的工具中，本实验采用了Uniform design试验与正交试验相结合的方法进行优化研究。结果说明，Uniform design不仅试验规模小，而且效果显著，而正交试验则更具可比性与直观性。二者结合进行发酵工艺研究，达到了提高实验效率，降低实验成本的要求。

4 结 论

本实验采用Uniform design与正交试验相结合的方法对灵芝在药质(六味地黄丸)培养基中发酵培养的工艺条件进行了优化。获得最高灵芝菌丝体产量(生物量)时的培养基组分为：药质(六味地黄丸)10g/L、黄豆粉50g/L、玉米粉10g/L、葡萄糖8.29g/L、$MgSO_4$ 1.0g/L、KH_2PO_4 1.0g/L、VB_1 20～40mg/L；10L发酵罐发酵的最优工艺条件是：接种量10%、培养通气量0.5m^3/min、搅拌速度150r/min、发酵周期144h。此条件下的产量达到发酵生物量408.8g/L，较优化前最高产量提高了21.3%。

参考文献：

[1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 3版. 北京: 北京医科大学出版社, 2007: 125-126.

[2] 游明乐. 中国食(药)用真菌发酵工程研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 327-331.

[3] 庄毅, 潘扬, 谢小梅. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J]. 中国食用菌, 2007, 26(2): 3-6.

[4] 吴昆仑, 吴眉. 六味地黄丸药理研究及临床应用新进展[J]. 中成药, 2005, 27(11): 15-17.

[5] 孙淑英. 六味地黄丸抗衰老作用机理探讨[J]. 北京中医药大学学报, 1994, 17(4): 48-49.

[6] 刘福君. 地黄及六味地黄汤(丸)的免疫药理及抗肿瘤作用[J]. 中草药, 1996, 27(3): 116.

[7] 方传记, 陆兆新, 孙力军. 淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 4(2): 533-539.

[8] WEN S H, ZHANG T, TAN T W. Optimization of the amino acidcomposition in glutathione fermentation[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3474-3479.

[9] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 35-152.

[10] 曲音波. 微生物技术开发原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 95-121.