

灵芝发酵粉基质优化及其营养成分分析

高文庚¹ 尚楠² 樊明涛³ 李平兰^{2*}

(1. 运城学院 生命科学系,山西 运城 044000; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;
3. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

摘要 采用响应面分析方法对灵芝发酵粉的培养基进行优化,并对发酵粉的营养成分进行测定。试验结果表明:灵芝固体发酵培养基各成分质量分数为,小麦 24%、大豆粉 12%、玉米 64%,其中玉米粉碎颗粒度为 8 目,菌质灵芝粗多糖质量分数达到 3.27%。灵芝发酵可以将基质中淀粉和粗脂肪的质量分数分别降低 43.27%和 9.76%,还原糖、蛋白质和维生素 B₁ 的质量分数分别增加了 684%、35.94%和 167%;基质中氨基酸质量分数增加了 7%,人体必需氨基酸中除赖氨酸外其余均得到提高。

关键词 灵芝; 固态发酵; 培养基优化; 营养成分分析

中图分类号 TS 201.5 文章编号 1007-4333(2011)01-0088-06 文献标志码 A

Optimization of solid-state fermentation medium of *Ganoderma lucidum* and nutrition component analysis

GAO Wen-geng¹, SHANG Nan², FAN Ming-tao³, LI Ping-lan^{2*}

(1. Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China;
2. College of Food Science and Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China;
3. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract The solid-state fermentation medium of *Ganoderma lucidum* was optimized by the response surface methodology. And the nutrient component of powder fermented by *Ganoderma lucidum* was tested, so as to provide a reference for further development of functional food. The results showed that the optimal medium formulations of solid-state fermentation by *Ganoderma lucidum* were 24% wheat, 12% soybean flour and 64% corn powder of 8 mesh. The result of validation test indicated that the polysaccharide content was 3.27% under the optimum conditions. The analysis of nutritional components of substrate before and after fermentation showed that the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum* could reduce the content of starch and crude fat in the substrate by 43.27% and 9.76%, respectively, and increase the content of reducing sugar, protein and vitamin B₁ by 684%, 35.94% and 167%, respectively. According to amino acid analysis, it was found that the amino acid content increased by 7% after *Ganoderma lucidum* fermentation, moreover the content of all the essential amino acids except lysine increased.

Key words *Ganoderma lucidum*; solid-state fermentation; optimization; nutrition component analysis

灵芝(*Ganoderma lucidum*)为药食两用真菌,具有抗肿瘤,降低血液中胆固醇含量,抗炎等药效^[1],其中多糖和三萜类化合物为主要药效成分^[2]。存在于自然界的灵芝非常稀少,目前常采用原木或将木屑装入包装容器中进行人工栽培获得子实体。

近年来,通过优化液体深层发酵培养基和培养条件,增加菌丝体^[3]、胞外多糖或胞内多糖^[4-5]等功能性成分产量的研究较多,而以谷物作为基料进行灵芝固体发酵的研究相对较少,且主要采用单一原料如小麦^[6-7]或玉米^[8]等。

收稿日期: 2010-05-11

基金项目: 山西省科技厅青年科学基金项目(2007021042); 山西省科技厅高等学校科技开发项目(20101125)

第一作者: 高文庚,副教授,主要从事农产品贮藏与加工研究, E-mail: gwg_jhy@163.com

通讯作者: 李平兰,教授,主要从事食品微生物与发酵工程研究, E-mail: lipinglan420@126.com

本研究拟采用玉米、小麦、大豆作为发酵基质，接入灵芝液体菌种，经固体发酵降解基料中的大分子物质，生成含有大量灵芝菌丝体和代谢产物的菌质。试验运用响应面法优化固体发酵培养基，并对最终产品——灵芝发酵粉中灵芝粗多糖、还原糖、蛋白质、游离氨基酸含量进行测定分析，以期获得一种功能性食品，为其生产及推广提供依据，同时为药物真菌在食品加工领域的应用探索新的途径。

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

大盖赤芝 *G₉*，运城学院食品微生物实验室保存。

1.2 培养基

液体种子培养基：马铃薯 200 g/L，蔗糖 20 g/L，MgSO₄ 1.5 g/L，KH₂PO₄ 2 g/L，蛋白胨 2 g/L。121 ℃ 灭菌 20 min 备用。

固体发酵培养基：将玉米和大豆原料分别按要求进行粉碎过筛，各加入适量的水和 1%（质量分数，下同）的食用 CaCO₃；小麦原料整粒浸泡 24 h，预煮 20 min 至变色而不涨裂，添加 1% 的食用

CaCO₃。将处理好的固体培养基混匀后装入 25 cm×15 cm×0.05 cm 食用菌专用袋，控制通气量一致。每袋 500 g，平行 3 组，123 ℃ 灭菌 2 h，冷却备用。

1.3 主要仪器及设备

721 型分光光度计，上海第三分析仪器厂；202-1S 数显电热恒温干燥箱，天津市华北试验仪器有限公司；XY5-802 离心沉淀机，江苏医疗仪器厂；DP01 真空干燥箱，重庆四达试验设备有限公司；SPX-250C 恒温恒湿箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；SA-1480-II 洁净工作台，上海汇龙仪表电子有限责任公司环境工程装备分公司；FZ102 微型植物试样粉碎机，天津泰斯特仪器公司；930 荧光光度计，上海第三分析仪器厂；121MB 氨基酸分析仪，美国贝克曼公司。

1.4 方 法

1.4.1 灵芝发酵粉制备

灵芝发酵粉制作流程见图 1。接入 60 mL 液体菌种后，在相对湿度 65%、28 ℃、黑暗条件下培养 20 d，将长满菌丝的菌质去袋，充分混匀后 70 ℃ 烘干，四分法取样，粉碎过 60 目筛。

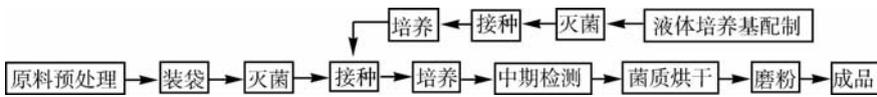


图 1 灵芝发酵粉制作流程

Fig. 1 Process flow diagram for powder fermented by *Ganoderma lucidum* production

1.4.2 主要成分测定

灵芝粗多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[9]；还原糖采用 GB/T 5009.7—2003《食品中还原糖的测定》；蛋白质采用 GB/T 5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》；游离氨基酸采用电位滴定法和氨基酸自动分析仪法测定；粗脂肪采用索氏提取法测定；淀粉采用酸水解法测定；VB₁ 含量采用荧光分析法^[10]测定。

1.4.3 试验设计

1) 培养基优化试验设计。根据灵芝在不同培养基中菌丝的生长状况，比较其发酵后灵芝粗多糖、还原糖、蛋白质、游离氨基酸含量差异，结合前期研究结果，采用 Box-Behnken 试验设计，选择混合料中大豆粉含量、小麦含量及粉碎玉米的颗粒度为自变量，评价指标为菌质的灵芝粗多糖含量。因素水

平设计见表 1。采用 Design Expert 7.1.6 软件对试验数据进行回归分析。

表 1 Box-Behnken 设计试验因素及水平表

Table 1 Analytical factors and levels for Box-Behnken design

因素	编 码	水 平		
		-1	0	+1
w (大豆粉)/%	X_1	10	15	20
w (小麦)/%	X_2	20	25	30
玉米颗粒度/目	X_3	0*	10	20

注：*，玉米为原颗粒未进行粉碎处理。

2) 发酵前后培养基营养成分比较。将经固体发酵所得菌质进行烘干粉碎过 60 目筛后，得到灵芝发酵粉，检测其中蛋白质、淀粉、氨基酸、灵芝粗多糖

等成分质量分数的变化,其中灵芝粗多糖含量测定时,为减少样品中淀粉对测定结果的影响,在样品经热水浸提、乙醇沉淀及洗涤离心得到粗多糖后,再用 I_2 -DMSO(碘-二甲基亚砷)溶液洗涤去除残余淀粉^[11],然后测定。试验采用大盖赤芝 G_0 纯菌丝提取的灵芝多糖做参照进行 I_2 -DMSO洗脱求得校正系数,减少洗脱操作对测定结果的影响。

2 结果与分析

2.1 灵芝在单一原料中菌丝生长状况及主要成分比较

观察各种原料中菌丝生长情况发现,单纯采用玉米、小麦或大豆作为基料进行灵芝固体培养,各料袋中菌丝生长状况差异明显。玉米基质中菌丝萌发力强,生长迅速,内外生长均匀,而小麦基质中菌丝生长稍显迟缓,菌丝细弱,料袋长满时间比玉米推迟2天,同一时间二者菌丝活力、菌丝量差异明显。大豆中菌丝前期生长良好,后期大多出现停滞甚至死亡,这可能与豆类淀粉含量低,蛋白质及油脂含量过高有关。在后期发酵培养基的优化试验中,对大豆含量进行了适当控制。

对不同原料灵芝发酵前后营养成分进行比较(表2)可以看出,经过发酵2种基质中均有灵芝粗多糖产生,还原糖、游离氨基酸明显提高。玉米菌质中 ω (灵芝粗多糖)较小麦菌质高61.41%,还原糖增长量较小麦菌质高出142.49%,而玉米菌质中蛋白质、游离氨基酸增加量分别低于小麦菌质83.3%、60.8%。如果能对基料进行合理搭配,以玉米、小麦为主料,配以适量大豆,不但有利于灵芝菌

表2 不同原料经灵芝发酵前后主要成分质量分数的变化

Table 2 Comparison of principal nutrition components in different materials before and after fermentation

测定项目	玉米		小麦	
	发酵前	发酵后	发酵前	发酵后
ω (灵芝粗多糖)/%		2.97	1.84	
ω (还原糖)/%	1.73	16.74	1.43	7.62
ω (蛋白质)/%	8.82	8.97	13.27	14.17
ω (游离氨基酸)/(mg/100g)	28.30	69.80	35.40	141.40

丝生长,而且可以丰富菌质营养,使灵芝发酵粉在增加灵芝多糖等保健物质的同时,营养更为丰富。

2.2 灵芝固体发酵培养基优化

按照 Box-Behnken 试验设计进行了17组试验,试验结果见表3。利用 Design Expert 7.1.6 软件对表3试验数据进行回归分析,以 ω (灵芝粗多糖)/%(Y)为响应值,建立多元二次响应面回归模型:

$$Y = -4.5415 + 0.0074X_1 + 0.6165X_2 + 0.1132X_3 + 0.0103X_1X_2 + 0.0034X_1X_3 - 0.0019X_2X_3 - 0.0115X_1^2 - 0.0152X_2^2 - 0.0067X_3^2 \quad (1)$$

式中: X_1 为发酵基料中大豆粉的质量分数,%; X_2

表3 灵芝固体发酵培养基优化响应面设计试验方案及结果

Table 3 RSM experimental designs and results for solid-state fermentation medium of *Ganoderma lucidum*

试验号	因素			ω (灵芝粗多糖)/%	
	X_1	X_2	X_3	实测值	预测值
1	1	0	-1	2.02	2.05
2	0	1	-1	2.46	2.41
3	1	0	1	1.96	2.03
4	0	-1	-1	2.22	2.31
5	1	1	0	2.51	2.53
6	-1	0	1	2.18	2.15
7	0	1	1	1.94	1.85
8	-1	0	-1	2.92	2.85
9	-1	-1	0	3.12	3.10
10	-1	1	0	2.37	2.49
11	0	0	0	3.01	3.23
12	0	0	0	3.34	3.23
13	0	0	0	3.25	3.23
14	0	0	0	3.39	3.23
15	0	0	0	3.14	3.23
16	0	-1	1	2.09	2.14
17	1	-1	0	2.23	2.11

注: X_1 , ω (大豆粉)/%; X_2 , ω (小麦)/%; X_3 ,玉米颗粒度/目。下同。

为小麦的质量分数, %; X_3 为玉米的颗粒度, 目。对方程模型(式(1))进行方差分析, 结果见表 4。可以看出, 回归方程模型极显著, 说明所建立的多元线性回归模型可以有效预测培养基中灵芝粗多糖的产生量。失拟项不显著, 表明由误差引起的失拟不显著。复相关系数为 0.965 1, 表明利用多元线性回归的效果好, 影响因素与多糖产生量有相关性。模型的决定系数为 0.920 3, 说明该模型能解释 96.51% 响应值的变化, 仅有总变异的 3.49% 不能用此模型解释, 该模型拟合程度良好, 试验误差小, 自变量与响应值之间线性关系显著, 可用于该试验的理论预测。

表 4 灵芝固体发酵培养基优化数学模型回归分析结果

Table 4 Results of regression analysis for solid-state fermentation medium of *Ganoderma lucidum*

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
变量	4.250	9	0.470	21.53	0.000 3**
X_1	0.440	1	0.440	19.91	0.002 9**
X_2	0.018	1	0.018	0.82	0.394 6
X_3	0.260	1	0.260	11.97	0.010 5*
X_1X_2	0.270	1	0.270	12.08	0.010 3*
X_1X_3	0.120	1	0.120	5.27	0.055 4
X_2X_3	0.038	1	0.038	1.73	0.229 6
X_1^2	0.350	1	0.350	15.91	0.005 3**
X_2^2	0.610	1	0.610	27.77	0.001 2**
X_3^2	1.880	1	1.880	85.60	<0.000 1**
残差	0.150	7	0.022		
失拟项	0.059	3	0.020	0.83	0.541 0
纯误差	0.095	4	0.024		
总和	4.410	16			

注: 复相关系数为 0.965 1, 确定系数 0.920 3; **, 差异极显著, $P < 0.01$; *, 差异显著, $P < 0.05$ 。

各项回归系数显著性检验表明: 一次项 X_1 极显著, X_2 不显著, X_3 显著, 说明在试验设定的范围内, 发酵基料中大豆粉含量对菌质多糖产生量的影响最大, 玉米颗粒度次之, 小麦含量对菌质多糖产生量影响不显著; 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 极显著; 交互效应 X_1X_2 为显著, X_1X_3 、 X_2X_3 为不显著。

由响应面回归分析和回归方程拟合绘制响应面图及等高线(图 2), 以确认其中 2 个影响因子与响应值之间的关系。由图 2(a)、(c)、(e) 可以看出,

X_1 、 X_2 和 X_3 在所选范围内均存在极值点, 说明 3 因素的选择及其试验范围合理有效, 能够很好的反映出 3 因素对相应值的影响趋势。等高线形状、密集程度说明在试验条件范围内 X_1X_2 交互作用显著, X_1X_3 次之, X_2X_3 交互作用不显著; 对多糖含量影响最大的因素为大豆粉含量, 其次是玉米颗粒度, 影响最小的因素为小麦含量。

通过软件分析, 灵芝粗多糖含量的最大估计值为 3.3147%, 对应 3 个因子最优试验值为: w (大豆粉) 为 12.18%、 w (小麦) 23.85%、玉米粉碎颗粒度 8.10 目。考虑到实际的可操作性, 将培养基各成分质量分数修正为大豆粉 12%、小麦 24%、玉米 64%, 玉米颗粒度控制在 8 目进行 3 次验证试验, w (灵芝粗多糖) 测定值平均为 3.27%, 达到了回归模型预测的理论预测值的 98.6%, 说明优化得到的原料配比参数准确可靠, 具有实用价值。

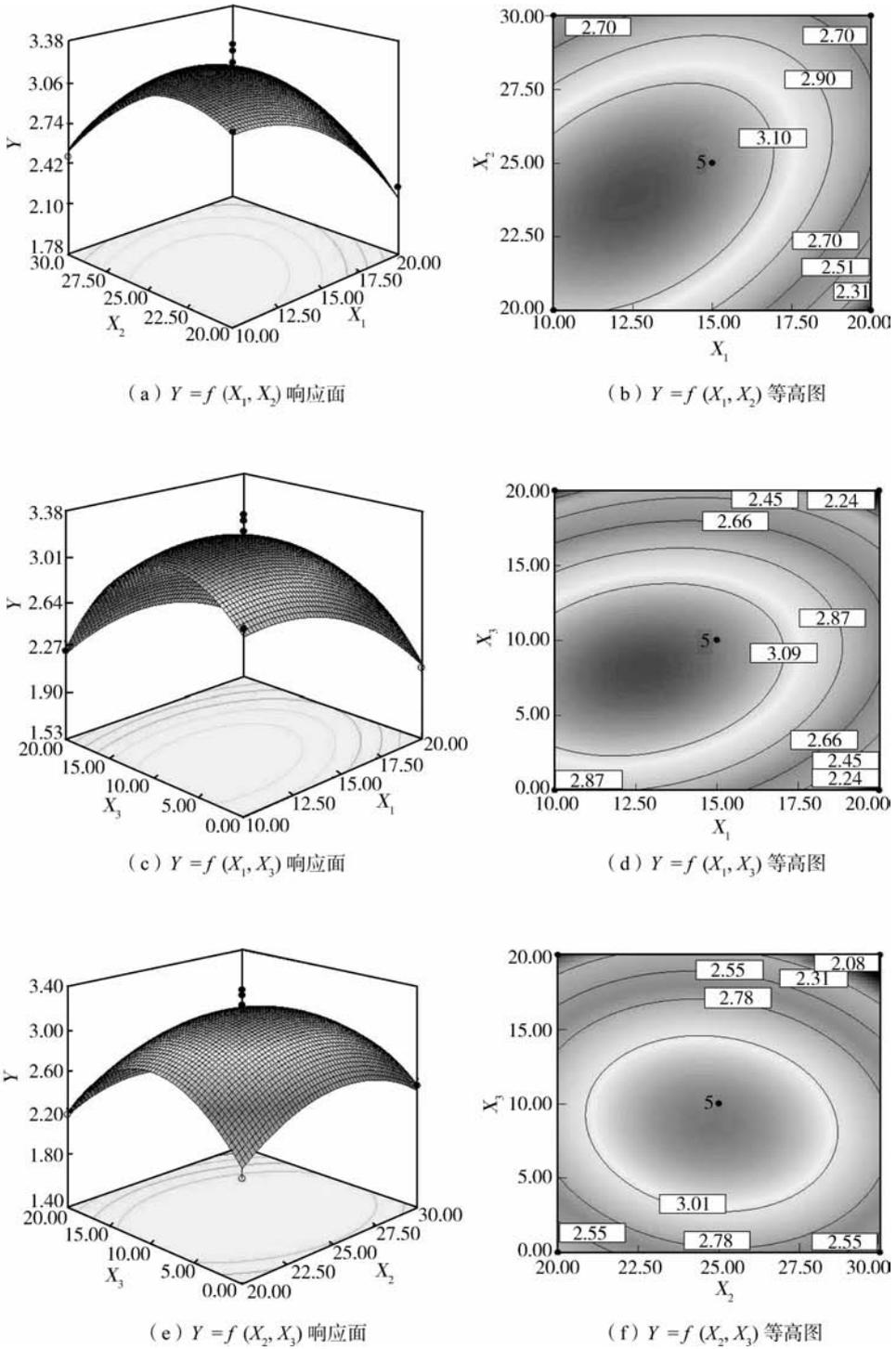
2.3 发酵前后基质营养成分比较

对发酵前后培养基中的主要营养成分进行测定: 经过灵芝菌发酵后, 基料中 w (淀粉) 和 w (粗脂肪) 分别减少了 43.27%、9.76%, w (还原糖) 和 w (蛋白质) 提高了 684% 和 35.94%。维生素选择了对高温敏感的维生素 B_1 , 由于加热灭菌及菌质烘干处理, 使其含量受到很大影响, 但测定结果发现其质量分数仍有所增加, 提高了 167%(表 5)。经过灵芝菌发酵后, 基料氨基酸中除谷氨酸和赖氨酸含量变化不大外, 其他都有所增加。经过原料搭配后其中的必需氨基酸有了一定的改善, 发酵后各必需氨基酸质量分数均有不同程度的提高(苏氨酸 10.52%、缬氨酸 12.16%、蛋氨酸 17.71%、异亮氨酸 8.06%、亮氨酸 10.36%、苯丙氨酸 3.96%、色氨酸 8.01%), 氨基酸总量增加了 7%(表 6)。

表 5 发酵前后培养基中的主要营养成分

Table 5 Comparison of principle nutrition components in substrate before and after fermentation

测定项目	发酵前(基料)	发酵后(菌质)
w (蛋白质)/%	13.80	18.76
w (淀粉)/%	67.57	38.33
w (还原糖)/%	1.64	12.85
w (粗脂肪)/%	6.35	5.73
w (VB_1)/(mg/kg)	1.41	3.77



Y , w (灵芝粗多糖)%; X_1 , w (大豆粉)/%; X_2 , w (小麦)/%; X_3 , 玉米颗粒度/目。

图2 大豆粉、小麦的质量分数和玉米颗粒度对灵芝粗多糖产量的影响

Fig. 2 Response surfaces and contour plots of yield of *Ganoderma lucidum* polysaccharide affected by the contents of wheat soybean flour and corn grain

表 6 试验所制灵芝发酵粉中氨基酸的质量分数

Table 6 Content of amino acids in powder fermented by *Ganoderma lucidum* mg/g

名称	基料	菌质	名称	基料	菌质
天冬氨酸(Asp)	5.90	7.10	异亮氨酸(Ile)	5.21	5.63
苏氨酸(Thr)	5.61	6.20	亮氨酸(Leu)	15.25	16.83
丝氨酸(Ser)	4.90	5.12	酪氨酸(Tyr)	5.10	5.21
谷氨酸(Glu)	15.47	15.38	苯丙氨酸(Phe)	9.10	9.46
脯氨酸(Pro)	7.80	7.87	赖氨酸(Lys)	6.28	6.28
甘氨酸(Gly)	6.13	7.05	组氨酸(His)	3.77	4.10
丙氨酸(Ala)	5.80	6.56	精氨酸(Arg)	8.36	8.43
胱氨酸(Cys)	4.23	5.16	色氨酸(Trp)	2.87	3.10
缬氨酸(Val)	6.33	7.10	合计	120.82	129.77
蛋氨酸(Met)	2.71	3.19			

3 结 论

本研究利用 Design Expert7.1.6 软件对灵芝发酵粉的培养基组成进行响应面分析,建立多项数学模型,并对模型进行显著性检验。优化得到的最佳培养基组成为: ω (小麦)24%、 ω (大豆粉)12%、8 目颗粒玉米 64%,其中发酵基料中大豆粉含量对灵芝粗多糖产生量的影响最大,玉米颗粒度次之,小麦含量的影响不显著。验证试验测得菌质中 ω (灵芝粗多糖)达到 3.27%,达到了回归模型预测的理论预测值的 98.6%。由此可见,利用响应面法对灵芝固体发酵培养基进行优化切实可行。

对灵芝发酵粉成分测定发现,通过发酵不但增加了产品的功能性成分灵芝粗多糖等,还有效降解了基质中的淀粉和粗脂肪(淀粉减少 43.27%,粗脂肪降低 9.76%),提高了还原糖、氨基酸、蛋白质、维生素 B₁ 的质量分数(还原糖增加了 684%,蛋白质增加了 35.94%,维生素 B₁ 提高了 167%)。灵芝菌发酵后,基料中 ω (氨基酸)增加了 7%。8 种人体必需氨基酸除赖氨酸变化不大外,其余 7 种都有一定的增加。通过发酵原料的合理搭配,不仅增加了产品的功能性成分含量,还提高了其消化吸收率和营养价值。

参 考 文 献

[1] 方庆华,钟建江.灵芝真菌发酵生产灵芝多糖和灵芝酸[J].华

东理工大学学报,2001,27(3):254-257

- [2] Boh B, Berovic M, Zhang Jingsong, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds[J]. *Biotechnology Annual Review*, 2007, 13: 265-301
- [3] Yang Fanchiang, Yang Mineje, Cheng Shuehhen. A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40(2): 148-154
- [4] Lee Wiyoung, Park Youngki, Ahn Jinkwon, et al. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(2): 249-254
- [5] Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1941-1946
- [6] 王秋颖,郭顺星,吴惧.灵芝-小麦发酵物开发利用的研究[J]. *食品工业科技*, 2000, 21(4): 32-34
- [7] 张英春,王养军,王静.固态发酵法生产的灵芝面粉的营养成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(8): 44-46
- [8] 韩建荣,赵文婧,高宇英.灵芝固态发酵降解玉米淀粉的初步研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(7): 59-61
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356
- [10] 张水华. *食品分析* [M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007: 202-203
- [11] 杨光成,丁建东,罗付生,等.灵芝菌丝体多糖含量的准确测定[J]. *食品工业科技*, 2001, 22(5): 74-75

(责任编辑:刘迎春)