

均匀设计法优化樟芝产三萜液体发酵条件*

贺元川^{1,2} 蒲 蓆¹ 何开泽^{1**} 谭 健¹ 李 静³ 赵宗杰³

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³深圳市中科海外科技有限公司 深圳 518000)

摘 要 为在兼顾生物量的基础上提高液体发酵中三萜的百分含量,首先通过单因子试验筛选出最佳的碳源、氮源、无机盐,然后采用均匀设计(UD)对其培养基配比和培养条件进行优化试验,建立适当的数学模型,并对模型进行验证确定优化条件.单因子试验结果表明玉米淀粉既能促进菌丝体的生长,又能促进三萜的合成;麸皮虽然对菌体生长略有不利,但是对三萜的积累作用特别显著;硫酸镁对菌丝体生长效果不显著,但是对三萜的合成比较有利.均匀设计试验结果表明,菌丝体干重最大的培养条件和三萜的最优培养条件相差甚远.菌丝体干重的最优培养条件为:1 L培养液中玉米淀粉47 g,麸皮47 g,硫酸镁0.5 g,初始pH 3.0,培养7 d;三萜最佳培养基配方为:1 L培养液中玉米淀粉20 g,麸皮20 g,硫酸镁1.85 g,初始pH 3.0,培养16 d.菌丝体干重在最优条件下能达到15.58(±0.37) g L⁻¹;三萜百分含量在最优培养条件下高达6.04(±0.03)%,三萜的百分含量比基础发酵结果和报道的最高发酵结果3.18%提高了90%,因此,均匀设计法能有效优化液体发酵培养条件.图5 表3 参34

关键词 樟芝;粗三萜;生物量;均匀设计;液体发酵;培养条件优化

CLC Q949.320.6 : TQ920.1

Optimization of Liquid Fermentation Conditions of *Antrodia cinnamomea* Producing Triterpenoid by Uniform Design*

HE Yuanchuan^{1,2}, PU Qiang¹, HE Kaize^{1**}, TAN Jian¹, LI Jing³ & ZHAO Zhongjie³

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³CAS World Science and Technology Limited., Shenzhen 518000, China)

Abstract *Antrodia cinnamomea* contains many valuable compounds, especially triterpenoids. The submerged culture conditions of *Antrodia cinnamomea* producing triterpenoids were optimized by one-factor-at-a-time and uniform design (UD) methods taking biomass into account. First, the one-factor-at-a-time method was adopted to investigate the effects of initial pH and variables of medium components (i.e., carbon, nitrogen and mineral sources) on triterpenoid production and mycelia growth in detail. Corn starch not only improved mycelia growth but also enhanced triterpenoid production, and was identified to be the most suitable carbon. Wheat bran was the favorable nitrogen sources to triterpenoid production (5.5%), however, it was not good for biomass. MgSO₄ was contributed to triterpenoid production, without significant effects on mycelia growth. Subsequently, the concentrations of corn starch, wheat bran, MgSO₄, initial pH and culture time were optimized using the UD method. The optimal conditions for mycelia yield were determined as 4.7% corn starch, 4.7% wheat bran, 0.05% MgSO₄, pH 3.0 and 7 days of cultivation, and the optimal conditions for triterpenoid production was 2% corn starch, 2% wheat bran, 0.185% MgSO₄, pH 3.0 and 16 days of cultivation, being different from the former. Subsequent experiment confirmed the validity of the models. This optimized strategy in shake-flask culture led to a mycelia yield (Dry cell weight, DCW) of 15.58(±0.37) g L⁻¹ and triterpenoid percentage (POT) of 6.04(±0.03)%, respectively. The percentage of triterpenoids was considerably 90% higher than that obtained in the preliminary studies (3.18%). The statistical methods used in the present study are useful strategies for optimizing culture conditions of liquid fermentation. Fig 5, Tab 3, Ref 34

Keywords *Antrodia cinnamomea*; crude triterpenoids; biomass; uniform design (UD); liquid fermentation; culture condition; optimization

CLC Q949.320.6 : TQ920.1

樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 为隶属真菌门 (Fungusmycota) 担子菌亚门 (Basidiomycotina) 层菌纲

(Hymenomycetes) 多孔菌科 (Polypolaceae) 薄孔菌属 (*Antrodia*) 的珍稀药用真菌^[1]. 野生樟芝生长在台湾山区 (海拔450~2 000m) 特有的牛樟树的腐朽中空的木材内壁, 其子实体具有强烈的黄樟香气味, 外形呈板状、钟状等, 表面呈橘黄 (红) 色, 多年生, 无柄, 味苦^[2], 具有安神、驱风行气、活血化痰、温中消积、解毒消肿、抗菌抗病毒等多种功效^[3],

收稿日期: 2010-09-14 接受日期: 2010-09-28

*深圳市中科海外科技有限公司研发与投资专项基金项目资助
Supported by the Research and Investment Foundation of CAS World Science and Technology Limited., Shenzhen, China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hekz@cib.ac.cn)

在台湾享有“灵芝之王”和“台湾森林红宝石”的美称^[4]。

樟芝含有多种化学成分,多糖体(β -D-葡聚糖)和三萜类物质作为两大类主要物质,均具有防癌、抗癌、保肝、增强免疫力等生理活性^[5-6]。从樟芝备受关注以来,研究者陆续从子实体中分离到约30多种与灵芝具有不同结构的三萜类化合物,主要为zhankuicA、B、C等羊毛甾烷结构和zhankuic acid D、E等羊毛甾烷两大类结构的物质^[7-14]。药理实验研究表明, zhankuic acid A和C具有抑制老鼠肝癌细胞等多种癌细胞的功能作用^[8, 15]; Dehyrosulphurenic acid等诱导癌细胞生长周期的停滞,抑制癌细胞的增殖,并诱导癌细胞不同路径的凋亡^[16-17]; Antcin A和B等通过抑制炎症介质——超氧化物的产生,阻止细胞黏粘等途径,发挥其抗炎作用^[19-20]; methyl Antcin A通过Cofilin-介导的氧化调节途径和Bax-诱导的线粒体路径引发肝癌细胞的凋亡^[18]; methyl Antcin K除了通过抑制酶的活性发挥抗炎作用还能激活JNK和ERP信号通路,诱导T淋巴细胞的增殖分化,产生抗体,发挥免疫调节作用^[21-22]; compound B能减低四氯化碳、乙醇诱导的急性肝炎之小鼠血清中的GPT和GOT值,从而达到保肝的效果^[14]。此外,樟芝三萜还能清除自由基,提高谷胱甘肽酶的活性,延缓衰老,抑制血管紧张素转换酶,降低血压等^[23-24]。由此可见,樟芝三萜具有很大的开发潜力和应用前景,随着樟芝研究的深入和应用范围延展,其需求量日益上升,但是野生樟芝因自然生长条件的限制,导致资源短缺;固体发酵周期长,菌丝体的生理活性物质含量低,子实体培养尚未成功,亦无法满足社会需要。因此采用液体发酵技术生产樟芝菌丝体,提高生理活性物质——三萜的产量,是目前最经济有效、最环保的方法。

均匀设计是一种多因素多水平新型实验设计方法,与常规的正交设计相比,能最大限度地减少试验次数,并能借助软件分析试验数据建立相应的数学模型,判断各因素对发酵过程的影响趋势和强弱程度,指导进一步的优化实验。均匀设计方法近年来在发酵工程方面常被用来优化微生物发酵的实验条件等^[25-27]。Xu Chun-Ping和Yun Jong-Won利用均匀设计优化木耳培养条件,其木耳菌丝体含量和多糖含量都显著提高^[28]。针对目前研究者都集中在樟芝多糖和药理活性方面,对樟芝三萜培养的研究较少以及液体培养中三萜含量低的情况,我们采用均匀设计优化樟芝的液体发酵条件,以提高樟芝生物量和三萜的含量,为今后大规模地生产樟芝菌丝体和提取有效物质——三萜奠定实验基础,为进一步开发樟芝三萜的产品提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

樟芝菌种干粉,由中科海外科技有限公司提供。

1.2 实验材料

葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、乙酸乙酯、高氯酸、乙醇、冰醋酸、香草醛及各种无机盐均为分析纯试剂;麦芽浸膏、酵母粉、蛋白胨为生化试剂;玉米淀粉为食用级,玉米浆干粉为工业发酵原料;麸皮汁为饲用级麸皮煮沸40 min后纱布滤过液。

1.3 培养基

斜面培养基: 麦芽浸膏 20 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂粉 20 g, 定容 1 L, pH 5。液体种子培养基: 麦芽浸膏 20 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 定容 1 L, pH 5。发酵基础培养基: 麦芽浸膏 20 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸二氢钾 1 g, 定容 1 L。

1.4 培养方法

1.4.1 液体种子的培养 将已活化的斜面菌种切成 5 mm 大小的菌丝块,接种于液体培养基中。250 mL 三角瓶装 100 mL 培养液,于 120~150 r/min、25 °C 恒温培养 7 d,作种子液备用。

1.4.2 发酵培养: 250 mL 三角瓶装 100 mL 发酵液,接种量为 10%, 120~150 r/min, 25 °C 培养。每组实验重复 3 次取平均值。

1.5 基础培养条件的确定和单因素实验

1.5.1 最佳发酵时间的确定 用基础培养基在初始 pH 5 的条件下培养,从开始到 18 d 定时取样,测定菌丝体干重和三萜的百分含量,根据最大生物量和三萜百分含量确定最佳发酵时间 t d。

1.5.2 最佳发酵 pH 的确定 摇瓶发酵过程中的 pH 难于控制,因此只能控制发酵培养基的初始 pH 值。将基础培养基的初始 pH 值分别调至 2、3、4、5、6、7、8,培养 t d 后过滤烘干测定菌丝体干重和三萜的百分含量,确定最佳 pH 值。

1.5.3 单因子实验 将备选的各类物质分别等浓度替代基础培养基中对应成分,其他因素保持不变,调至最佳 pH 值,培养 t d 后测定菌丝体干重和三萜百分含量,确定最适的碳源、氮源和无机盐。

1.6 均匀设计

根据发酵条件和单因子实验的结果,采用 5 因素 10 水平 10 组试验的均匀设计方案进行优化试验,测定各组实验条件下的菌丝体干重和三萜百分含量,借助软件分析建立合适的数学模型,再结合专业确定最优培养条件,最后通过验证试验确定最优条件的可行性。

1.7 分析方法

1.7.1 pH 值的测定 用梅特勒数字 pH 计测定。

1.7.2 菌丝体干重的测定 发酵结束后,用已称重的滤纸抽滤,并用蒸馏水洗涤 3 遍,55 °C 烘干至恒重。

1.7.3 胞内三萜的含量测定 取干燥的樟芝菌丝体粉末 1 g,加入 25 mL 无水乙醇,90 °C 恒温水浴中回流 3 次,混合 3 次的滤液,并定容至 100 mL,通过高氯酸——香草醛显色法测定滤液中三萜的含量,并计算实际的三萜百分含量^[29]。

2 结果与讨论

2.1 最佳发酵时间的确定

菌丝体生长和产物合成随时间的推移呈现特定的变化规律。图 1 显示了樟芝生长过程中 pH 值、菌丝体干重和三萜百分含量的变化规律。樟芝菌丝体的生长粗略分为两个阶段,第一阶段为 0~7 d,菌丝体以大约 $0.35 \text{ g d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ 的平稳的生长速率生长,7 d 以后生长缓慢,三萜合成量也低,但是 10 d 以后,生长速率明显加快,达到 $0.85 \text{ g d}^{-1} \text{ L}^{-1}$,樟芝菌丝体干重在培养 14 d 后达到最高值,为 4.59 g L^{-1} ,同时胞内三萜含量达到最高,为 3.35%,与以往报道的最高三萜含量 3.18% 相近^[30]。14 d

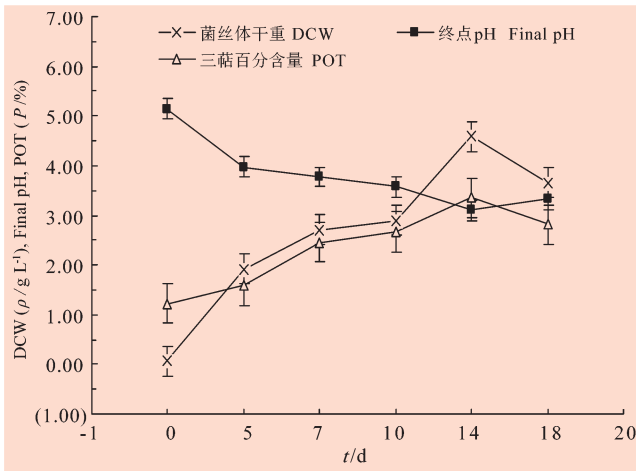


图1 樟芝生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *A. cinnamomea*

后, 菌丝体自溶, 氨基氮的释放导致发酵液pH升高, 胞内三萜降低, 故选择14 d为后续单因子实验的最佳发酵时间。

2.2 最佳发酵pH值的确定

为了解灭菌对发酵培养基pH值的影响, 试验前测定了灭菌后发酵培养基的pH值, 发现灭菌后培养基的pH值略有上升, 幅度不同, 故灭菌后培养基的pH值无法控制, 只能调节发酵培养基的初始pH值。由于真菌生长的pH值范围较宽, 大多数在pH 5~7条件下都能较好地生长, 因此测定了初始pH 2~8对菌体生长状况和三萜类物质积累情况的影响。如图2所示, 培养基的初始pH对樟芝菌丝体生长和产物合成都有显著影响。中性偏碱性环境明显抑制樟芝菌丝体的生长, 弱酸性环境有利于菌丝体的生长和三萜的合成, 当pH 4时, 菌丝体干重最高, 三萜百分含量比基础培养基的pH 5略高。由此可见, 菌丝体生长的最适pH和产物合成的最适pH一致, 即后续单因子实验将采用pH 4进行试验。

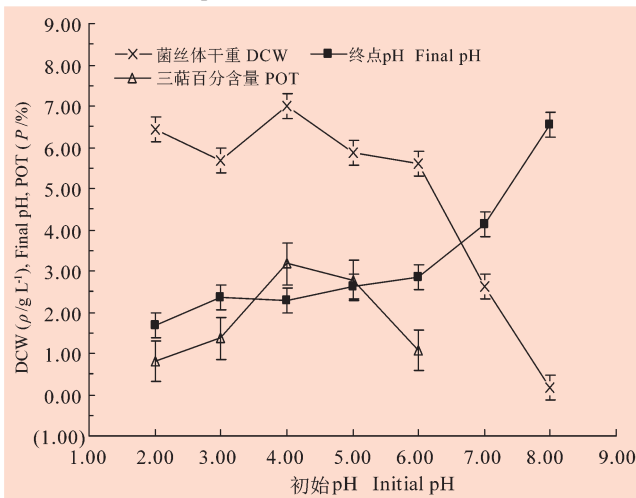


图2 初始pH对樟芝菌丝体和三萜产量的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on mycelium and triterpenoid production of *A. cinnamomea*

2.3 最适碳源的确定

碳源既是构成菌体细胞和代谢产物的主要元素, 又是提供微生物生命活动中所需能源的原料。真菌能利用的碳源范

围广泛, 包括单糖、双糖、多糖、淀粉质类等。为全面考察不同碳源对樟芝生长的影响, 分别添加2%的麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、土豆淀粉、玉米淀粉、玉米粉和玉米粉与葡萄糖(1:1)混合物替代基础培养基中2%葡萄糖进行了试验。从图3可知, 玉米粉、淀粉类物质比单糖、二糖更有利于樟芝菌丝体的生长, 玉米粉作为碳源, 生物量达到 $8 g L^{-1}$ 。Yang Fan-Chiang和杨会成等曾报道玉米粉适合樟芝菌丝体的生长^[31]。虽然玉米粉对樟芝菌丝体生长有利, 但是三萜合成量较低, 而经过初步加工处理的玉米淀粉不仅能促进樟芝菌丝体的生长, 还能提高三萜的产量, 玉米淀粉加工过程可能去除了部分对三萜合成不利的物质有关。比较玉米粉和玉米淀粉对樟芝的影响, 在生物量方面的影响差异不大, 但是对三萜的影响显著, 因此选用玉米淀粉作为液体发酵培养基的最适碳源。

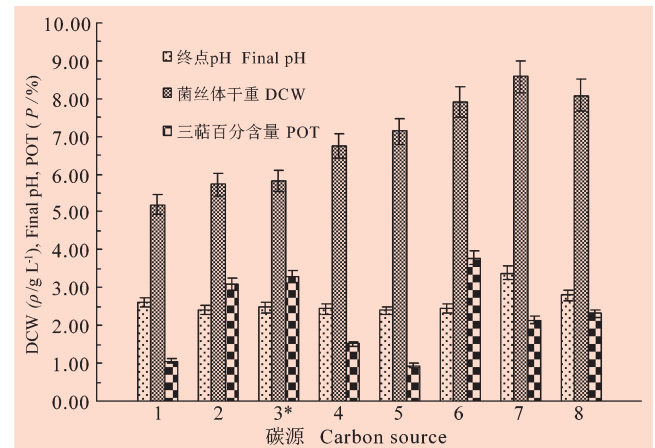


图3 不同碳源对樟芝菌体和三萜产量的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on mycelium and triterpenoid production of *A. cinnamomea*

1~8分别代表蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉、土豆淀粉、玉米淀粉、玉米粉及葡萄糖、玉米粉混合物。*表示基础培养基中的碳源

Symbols 1~8 represent sucrose, maltose, glucose, soluble starch, potato starch, corn starch, corn powder, and mixture of corn powder and glucose, respectively. * represents carbon source in basal medium

2.4 最适氮源的确定

氮源是构成细胞内核酸、蛋白质等含氮代谢物的主要物质。考察了常见的无机氮源和有机氮源对樟芝的影响。将选用的有机氮源和换算后的无机氮源替代基础培养基中的麦芽浸膏和蛋白胨, 结果如图4所示, 樟芝对不同氮源的利用存在着明显差异, 对有机氮源的利用明显优于无机氮源。有机氮源中含有丰富的蛋白质、氨基酸、肽类等, 特别是游离的氨基酸能被直接利用于构成细胞的蛋白质和其他物质, 促进菌体的生长繁殖, 而其它无机氮源需要进一步代谢转化才能利用。有机氮源中, 曾有文献报道酵母粉和玉米浆干粉做氮源有利于樟芝菌丝体的生长, 并且玉米浆干粉还有利于三萜合成^[32-33], 但该试验中酵母粉和玉米浆干粉做氮源时, 培养后pH升高, 菌体的生长良好, 三萜含量却很低。而麸皮对三萜的影响显著, 却不利于菌体的生长。本实验的最终目的在于筛选对三萜合成有利的物质, 因此确定麸皮为后续试验的最适氮源。

2.5 最适无机盐的确定

为考察无机盐对樟芝生长繁殖和产物合成的影响, 对

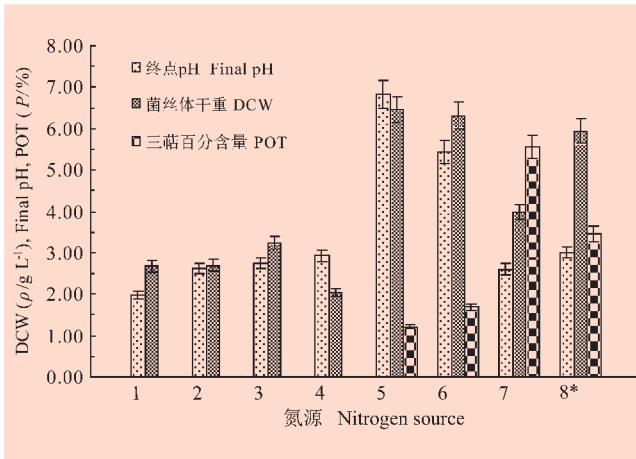


图4 不同氮源对樟芝菌体和三萜产量的影响

Fig.4 Effect of nitrogen sources on mycelium and triterpenoid production of *A. cinnamomea*

1~8分别代表硫酸铵、柠檬酸铵、草酸铵、硝酸钾、酵母粉、玉米浆干粉、麸皮及麦芽浸膏、蛋白胨混合物。*表示基础培养中的氮源

Symbols 1~8 represent $MgSO_4$, ammonium citrate, ammonium oxalate, KNO_3 , yeast extraction, corn steeped powder, wheat bran, and mixture of malt extraction and peptone, respectively. * represents nitrogen source in basal medium

常见的钠、钾、钙、镁盐进行了测试。图5中显示各种无机盐离子对樟芝菌丝体的生长并不显著，但是对三萜合成的影响差异明显。钙离子略有利于菌体的生长，这和Lin En-Shyh等人的报道^[34]一致，但是三萜产量很低。镁离子不但能激活某些酶的活性还能提高菌体对自身产物的耐受性。本实验中镁离子对菌体生长的影响不显著，但能促进三萜的合成，其三萜的含量高于空白和基础培养基中磷酸二氢钾和硫酸镁联合使用时的三萜含量，这和镁离子的作用密切相关。因此确定硫酸镁为后续试验的最适无机盐。

2.6 均匀设计

2.6.1 均匀设计实验 根据最适培养基种类的浓度预试验结

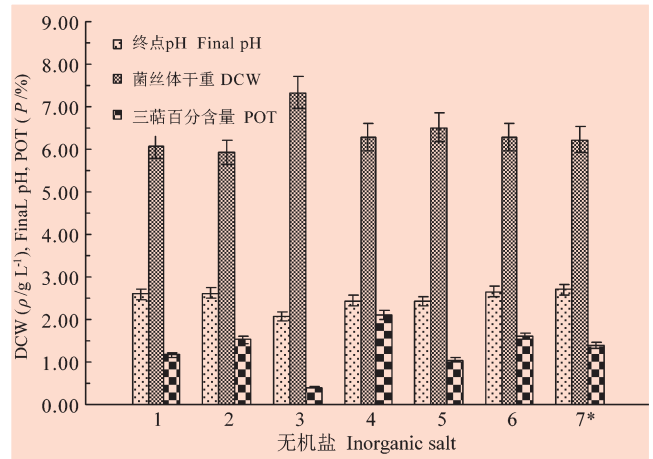


图5 不同无机盐离子对樟芝菌体和三萜产量的影响

Fig. 5 Effect of mineral sources on mycelium and triterpenoid production of *A. cinnamomea*

1~7分别代表无无机盐、氯化钠、氯化钙、硫酸镁、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾及硫酸镁、磷酸二氢钠的混合物。*表示基础培养基中无机盐种类

Symbols 1~7 represent no inorganic salt, NaCl, CaCl₂, $MgSO_4$, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , and mixture of $MgSO_4$ and KH_2PO_4 . * represents mineral source in basal medium

果，结合选定的5因素10水平的实验方案将各因子等分为10水平，具体试验因子水平数见表1，各因子组成及试验结果如表2所示：

用多元逐步回归程序对表3的数据进行多元二次逐步回归分析，得出菌丝体干重和三萜百分含量与各因素之间的回归方程：

$$Y_{mycelia} = 0.2191 + 3.525X_1 - 0.269X_1X_4 + 0.0098X_2X_4 \quad (1)$$

$$Y_{triterpenoids} = 4.1761 - 0.591X_1 - 0.0153X_5^2 - 0.00224X_1X_2 + 0.004X_1X_3 - 0.0207X_4X_5 \quad (2)$$

方程式(1)中 Y 代表菌丝体干重， X_1 、 X_2 、 X_4 分别代表玉米淀粉、麸皮、初始pH，该回归方程的回归相关系数 $R^2 = 0.9838$ ，标准误差 $S = 0.5656$ ， $F(3, 6) = 60.09 \gg F_{0.01}(3, 6) = 9.78$ ，

表1 均匀设计试验因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels for uniform design

试验因素 Factor	水平 Level									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
玉米淀粉 Corn starch (CS, $\rho/g L^{-1}$)	20.00	23.00	26.00	29.00	32.00	35.00	38.00	41.00	44.00	47.00
麸皮 Wheat bran (WB, $\rho/g L^{-1}$)	20.00	23.00	26.00	29.00	32.00	35.00	38.00	41.00	44.00	47.00
$MgSO_4$ ($\rho/g L^{-1}$)	0.50	0.65	0.80	0.95	1.10	1.25	1.40	1.55	1.70	1.85
初始pH Initial pH	3.00	3.30	3.60	3.90	4.20	4.50	4.80	5.10	5.40	5.70
培养时间 Culture time (t/d)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

表2 U10 (10⁵) 试验方案及结果

Table 2 Experimental design and results of the U10 (10⁵) uniform design

试验号 Experiment No	试验因子及水平 Factor and level					试验结果 Result	
	玉米淀粉 CS ($\rho/g L^{-1}$)	麸皮 WB ($\rho/g L^{-1}$)	$MgSO_4$ ($\rho/g L^{-1}$)	初始pH Initial pH	培养时间 Culture time (t/d)	菌丝体干重 DCW ($\rho/g L^{-1}$)	三萜百分含量 POT (P/%)
1	1 (20.00)	2 (23.00)	3 (0.80)	5 (4.20)	7 (13)	5.89 ± 0.51	4.41 ± 0.23
2	2 (23.00)	4 (29.00)	6 (1.25)	10 (5.70)	3 (9)	6.18 ± 0.50	2.95 ± 0.84
3	3 (26.00)	6 (35.00)	9 (1.70)	4 (3.90)	10 (16)	7.09 ± 0.39	5.23 ± 0.12
4	4 (29.00)	8 (41.00)	1 (0.50)	9 (5.40)	6 (12)	8.58 ± 0.18	3.16 ± 0.24
5	5 (32.00)	10 (47.00)	4 (0.95)	3 (3.60)	2 (8)	10.46 ± 0.74	2.43 ± 0.46
6	6 (35.00)	1 (20.00)	7 (1.40)	8 (5.10)	9 (15)	9.16 ± 0.80	3.98 ± 0.74
7	7 (38.00)	3 (26.00)	10 (1.85)	2 (3.30)	5 (11)	10.82 ± 0.44	3.13 ± 0.46
8	8 (41.00)	5 (32.00)	2 (0.65)	7 (4.80)	1 (7)	10.63 ± 0.77	1.61 ± 0.53
9	9 (44.00)	7 (38.00)	5 (1.10)	1 (3.00)	8 (14)	13.84 ± 0.65	3.53 ± 1.13
10	10 (47.00)	9 (44.00)	8 (1.55)	6 (4.80)	4 (10)	12.64 ± 0.65	1.82 ± 0.19

表3 优化条件试验结果
Table 3 The results under the optimal conditions

验证试验 Proof test	菌丝体干重最优条件 Optimal condition for dry cell weight		三萜含量最优条件 Optimal condition for POT	
	菌丝体干重 DCW ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	三萜百分含量 POT (P%)	菌丝体干重 DCW ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	三萜百分含量 POT (P%)
第一批 The first test	16.02	1.20	5.50	6.07
第二批 The second test	15.12	1.53	5.24	5.99
第三批 The third test	15.60	2.23	5.44	6.03
平均值 Mean	15.58 ± 0.37	1.65 ± 0.43	5.39 ± 0.11	6.03 ± 0.03

通过 F 检验 ($\alpha = 0.01$)。分析该方程, X_3 、 X_5 在逐步回归中被剔出方程, 表明硫酸镁和培养时间对菌丝体的影响不显著, 所以在优化时取其最小值; X_1 的回归系数最大说明玉米淀粉对菌丝体贡献最大, 其次是麸皮和初始pH的交互影响, X_1X_4 的系数为负, 初始pH对菌丝体的影响为负作用, 所以pH取最小值对 Y 的负影响最小。故优化条件为: $X_1=47.00$, $X_2=47.00$, $X_4=3.00$ 。方程(2)中 Y 代表三萜百分含量, X_1 ~ X_5 分别表示玉米淀粉、麸皮、硫酸镁、初始pH、培养时间, 该回归方程的回归相关系数 $R^2 = 0.9998$, 标准误差 $S = 0.0354$, $F(5,4) = 1812.35 \gg F_{0.01}(5,4) = 15.5$, 通过 F 检验 ($\alpha = 0.01$), 各因素对该方程均有贡献, X_5^2 、 X_1X_3 的贡献为正效应, X_5 的系数大, 这表明三萜含量与培养时间密切相关。 X_1 、 X_1X_3 、 X_1X_2 都为负影响, 其中 X_1 的负影响最为显著, 因此为了降低 X_1 的负作用, 将其取最小值。所以优化条件为: $X_1 = 20.00$, $X_2 = 20.00$, $X_3 = 1.85$, $X_4 = 3.00$, $X_5 = 16$ 。两个方程的优化条件不一致, 比较二者可以看出, 营养物质丰富有利于菌丝体的生长, 但是不利于三萜的合成, 硫酸镁和培养时间对三萜合成的影响较大, 在给定的条件里, 硫酸镁浓度越高, 培养时间越长, 积累的三萜越多。两个优化条件都处于选定浓度的边界, 由此可见, 培养基种类之间相互影响较大, 为了得到更准确的优化条件, 还需要调整浓度进行试验。

2.6.2 最优条件验证试验 分别按照两个优化条件进行验证实验, 结果如表3, 3批验证试验的结果与优化条件的预测值范围基本一致, 比前面的10组试验的结果都好, 证明回归方程预见性是可信的, 优化条件可行。对于生物量最大的优化条件, 三萜的产量并不太稳定, 对于这不稳定的因素还需要进一步的考察确定。

3 结论

单因子实验结合均匀设计法能有效地优化发酵培养条件, 特别是针对发酵周期较长的真菌液体发酵更为实用。较短时间里, 较少的实验次数就能建立不同指标相应的数学回归方程模型, 数学推导得到优化条件。本研究采用此法得到菌丝体干重的最优培养条件为: 1 L培养液中玉米淀粉47 g, 麸皮47 g, 硫酸镁0.5 g; 初始pH 3, 培养7 d; 三萜最佳培养基条件: 1 L培养液中玉米淀粉20 g, 麸皮20 g, 硫酸镁1.85 g; 初始pH 3, 培养16 d。优化条件下进行验证试验, 分别获得菌丝体含量15.58(± 0.37) g/L, 三萜百分含量达到了6.03(± 0.03)%, 略高于拟合的预测结果, 比报道提高90%, 这为大规模培养樟芝菌丝体和三萜类物质奠定了实验基础, 增加其开发的价值。两个优化条件均处于边界浓度, 并且两个条件针对单个指标, 有显著性的提高, 但是另外一个指标都都比较低, 因此

需要进一步优化得到最优条件, 以及通过补料等工艺提高其生物量, 或者补加前体等来提高三萜含量。

References

- 1 Chiu HH. Phylogenetic analysis of *Antrodia* species and *Antrodia camphorata* inferred from internal transcribed spacer region. *Anton van Leeuwen*, 2007, **91**: 267~276
- 2 Chang TT, Chou WW. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycol Res*, 1995, **99** (6): 756~758
- 3 陳勁初, 呂鋒洲. 靈芝之王: 台灣樟芝. 台北: 元氣齋出版社, 2001. 65
- 4 徐茂揮. 台灣森林中的紅寶石——樟芝. 台北国际食品展专刊, 2001: 79~85
- 5 陳勁初. 靈芝之王2: 台灣樟芝. 台北: 元氣齋出版社, 2008. 87
- 6 Geethangili M, Tzeng YM. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *eCAM*, 2009: 1~15. doi: 10.1093/ecam/nep108
- 7 Cherg IH, Chiang HC, Cheng MC, Wang Y. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *J Nat Prod*, 1995, **58**: 365~371
- 8 Chen CH, Yang SW, Shen YC. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *J Nat Prod* 1995, **58**: 1655~1661
- 9 Wu DP, Chiang CH. Constituents of *Antrodia cinnamomea*. *Chin J Chem Soc*, 1995, **42**: 797~800
- 10 Cherg IH, Wu DP, Chiang HC. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochem*, 1996, **41** (1): 263~267
- 11 Yang SW, Shen YC, Chen CH. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochem*, 1996, **41** (5): 1389~1392
- 12 Shen YC, Yang SW, Lin CS, Chen CH, Kuo YH, Chen CF. Zhankuic acid F: New metabolite from formosan fungus *Antrodia cinnamomea*. *Planta Med*, 1997, **63**: 86~88
- 13 Shen CC, Kuo YC, Huang RL, Lin LC, Don MJ, Chang TT, Chou CJ. New ergostane and lanostane from *Antrodia camphorata*. *Chin J Med*, 2003, **14** (4): 247~258
- 14 Gao HW (高曉薇). Studies of triterpenes content of new Lingzhi, *Antrodia camphorata*, in Taiwan: [Master Degree Dissertation]. Taipei, China: Medical Institute of Natural Chemicals, Tapei Medical University, 1992
- 15 Yeh CT, Rao YK, Yao CJ, Yeh CF, Li CH, Chuang SE, Luong JohnHT, Lai GM, Tzeng YM. Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, **285** (1) 73-79. doi: 10.1016/j.canlet.2009.05.002 (advance access published online on May 23, 2009)

- 16 Chen YJ, Chou CJ, Chang TT. Method for inhibiting tumor growth with dehydrosulphurenic acid extracts from *Antrodia cinnamomea*. USA, 20090318400, Dec. 24, 2009
- 17 Chen YJ, Chou CJ, Chang TT. Compound MMH01 possesses toxicity against human leukemia and pancreatic cancer cells. *Toxicol Vitro*, 2009, **23**: 418~422
- 18 Hsieh YC, Rao Y K, Wu CC, Huang CY F, Geethangili M, Hsu SL, Tzeng YM. Methyl Antcinate A from *Antrodia camphorate* induces apoptosis in human liver cancer cells through oxidant-mediated Cofilin- and Bax-triggered mitochondrial pathway. *J Chem Res toxicol*, 2010, **23**: 1256~1267
- 19 Chen JJ, Lin WJ, Liao CH, Shieh PC. Anti-inflammatory benzenoids from *Antrodia camphorata*. *J Nat Prod*, 2007, **70**: 989~992
- 20 Shen YC, Wang YH, Chou YC, Chen CF, Lin LC, Chang TT. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Planta Med*, 2004, **70**: 310~314
- 21 Shen YC, Chen CF, Wang YH, Chang TT, Chou CJ. Evaluation of the immuno-modulating activity of some active principles isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Chin J Pharmaceu*, 2003, **55** (5): 313~318
- 22 Yu YL, Chen IH, Shen KY, Huang RY, Wang WR, Chou CJ, Chang TT, Chu CL. A triterpenoid methyl antcinate K isolated from *Antrodia cinnamomea* promotes dendritic cell activation and Th2 differentiation. *Eur J Immunol*, 2009, **39** (9): 2482~2491
- 23 Song TY, Yen GC. Protective effects of fermented filtrate from *Antrodia camphorata* in submerged culture against CCl4-induced hepatic toxicity in rats. *J Agric Food Chem*, 2003, **51** (6): 1571~1577
- 24 Liu DZ, Liang YC, Lin SY, Lin YS, Wu WC, Wen CH, Su CH. Antihypertensive activities of solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* (Chang-chih) in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(1): 23~30
- 25 Tao SA (陶申傲), Cai YF (蔡永峰), Yue GH (岳国海), Cheng C (程池). Study on liquid fermentation medium of *Gloeostereum incarnatum* Ito et Imai by uniform design. *Chin J Food & Ferment Ind*, 2008, **34** (1): 73~76
- 26 Fang CJ (方传记), Lu ZX (陆兆新), Sun LJ (孙力军), Bie XM (别小妹), Lü FX (吕凤霞), Huang XQ (黄现青). Optimization of fermentation technology for lipopeptides producing bacteri a *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2~4. *Chin J Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, **41** (2): 533~539
- 27 Wang J, Chen BI, Rao XZ, Huang J, Li M. Optimization of culturing conditions of *Porphyridium cruentum* using uniform design. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**: 1345~1350
- 28 Xu CP, Yun JW. Optimization of submerged-culture conditions for mycelia growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, **38**: 193~199
- 29 范青生. 保健食品注册申报实用指南 北京: 中国轻工业出版社, 2006. 270
- 30 Chang CY, Lee CL, Pan TM. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 654~661. doi: 10.1007/s00253-006-0325-6
- 31 Yang FC, Huang HC, Yang MJ. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme & Microb Technol*, 2003, **33**: 395~402
- 32 Song AR (宋爱荣). The study on utilization of N sources by *Antrodia camphora*. *J Fungal Res*, 2004, **2** (1): 45~48
- 33 Shih IL, Pan K, Hsien CY. Influence of nutrition components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Proc Biochem*, 2006, **41**: 1129~1135
- 34 Lin ES, Sung SC. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Intern J Food Microbiol*, 2006, **108**: 182~187