灵芝发酵覆盆子生产总黄酮的工艺条件优化

朱会霞
（衡水学院，河北衡水 053000）

摘要：在单因素影响研究的基础上，通过 $L_9(3^4)$正交实验设计对灵芝发酵生产覆盆子黄酮基础培养基和发酵条件进行了优化研究，结果得出；发酵优化条件为：灵芝接种量 10%，覆盆子添加量 300 g/L，发酵温度 30 ℃，摇瓶转速 200 r/min，发酵的最佳时间为 120 h，在上述优化条件下，灵芝发酵覆盆子后黄酮含量达到 4.89 mg/g，与对照组（不接种灵芝）相比含量提高 109.87%。

关键词： 灵芝；覆盆子；黄酮
文章篇号： 1673-9078(2013)7-1680-1682

Optimization of *Ganoderma* Fermentation for Production of Total Flavnoids from *Rasspberry*

ZHU Hui-xia
(Heng shui College, Heng shui 053000 China)

Abstract: The culture medium and fermentation conditions of *Ganoderma* for production of total flavnoid from *Rasspberry* were optimization through the $L_9(3^4)$ orthogonal design. The results showed that the optimal fermentation conditions were inoculation 10%, *Raspberry* dosage 300 g/L, fermentation temperature 30 ℃, shaking speed 200 r/min, and fermentation time of 120 h. Under these conditions, the content of total flavonoids was 4.89 mg/g, 109.87% higher than that without the inoculation of *Ganoderma*.

Key words: *raspberry*; flavonoid; *ganoderma*

覆盆子（*Raspberry*），蔷薇科悬钩子属浆果植物。覆盆子果实为药食两用果实，富含有黄酮、多糖、粗三萜等功能性物质。因此，覆盆子具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫机能、减肥之功效，有助阳缩尿、补肾固精功能，用于治疗阳萎、肾虚遗精、尿频和遗尿等病症，因此，覆盆子具有很强的药用及保健作用[1]。

覆盆子黄酮类化合物是覆盆子代谢过程中产生的重要天然有机化合物，是覆盆子中主要活性成分之一，具有抗氧化、抑菌消炎、消除自由基抗过敏、抗感染、抗突变、抗肿瘤[2]等生理活性，且毒性较低，因此可用作食品、化妆品的天然添加剂。

灵芝具有繁殖力强，易于深层发酵培养，且在深层发酵培养过程中会有多种酶系产生，有利于果胶、木质素等分解，有利于覆盆子中有效成分的溶出，本实验对灵芝发酵生产覆盆子黄酮工艺进行研究，为提高覆盆子黄酮提出率及覆盆子黄酮的进一步的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

收稿日期：2013-02-21

灵芝斜面菌丝体：衡水学院生命科学系微生物实验室保藏。

覆盆子干果（一级品，购于衡水市中医院药店）净制粉碎过 40 目筛，50 ℃烘干备用。样品成分分析中所用化学试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 培养基[3]

斜面培养基：马铃薯200.0 g/L、葡萄20.0 g/L $MgSO_4·7H_2O$ 1.5 g/L KH_2PO_4 3.0 g/L、V_{B1} 0.01 g/L、琼脂20.0 g/L、20%的土豆汁配制。

种子培养基：葡萄糖30.0 g/L、黄豆粉10.0 g/L、酵母膏1.0 g/L $MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L、KH_2PO_4 1.0 g/L、VB_1 0.01 g/L、pH 6.0，蒸馏水配制。

发酵培养基：碳源为葡萄糖3.6%、氮源为蛋白胨0.4%、pH 6.0、酵母膏0.2%、KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%、VB_1 0.005%。

1.3 培养方法[4]

种子液的培养：从28 ℃培养6 d的斜面上用接种钩切1 cm^2带培养基的菌体转入装有150 mL种子培养基的500 mL三角瓶中，26 ℃、150 r/min培养3 d。

发酵培养：将种子以一定的接种量，接入装有一定量培养基的500 mL三角瓶中，在26 ℃振荡培养6 d。

1.4 总黄酮含量的测定

参考文献[5]的方法。

2 结果与讨论

2.1 灵芝发酵覆盆子黄酮最佳时间的确定[6]

将灵芝真菌按照 5%的接种量接种到摇瓶培养基中，培养温度 26 ℃，摇床转速 100 r/min，培养时间 120 h，覆盆子添加量 100 g/L，以不接种灵芝菌为对照结果如图 1 所示。

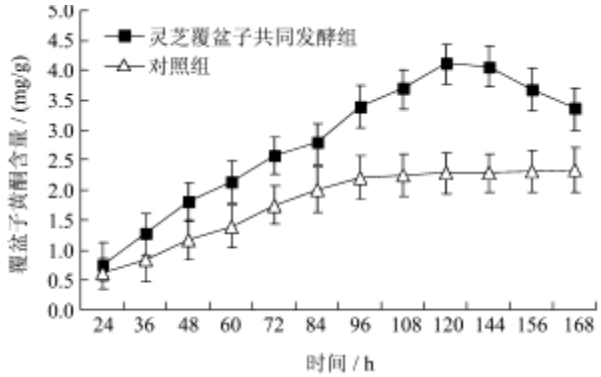


图 1 灵芝发酵时间对覆盆子黄酮产量的影响

Fig.1 Effect of *Ganoderma* fermentation time on the yield of *Rasspberry* total

由图1可知，对照组黄酮随振荡时间的延长，培养液中的总黄酮含量不断增加，在0~96 h的过程中，总黄酮含量增幅较大，由0 mg/g到2.21 mg/g，增幅效率为0.023 mg/g·h，之后96~168 h，覆盆子总黄酮含量虽有增幅，但增幅幅度较小，增加效率为0.0017 mg/g·h，168 h振荡后，覆盆子黄酮的最大含量为2.33 mg/g。灵芝发酵覆盆子黄酮的最佳时间为120 h，黄酮含量的最大值为4.11 mg/g，相对于对照组最大含量提高76.39%。

2.2 工艺优化单因素实验研究

2.2.1 接种量对灵芝发酵覆盆子黄酮的影响

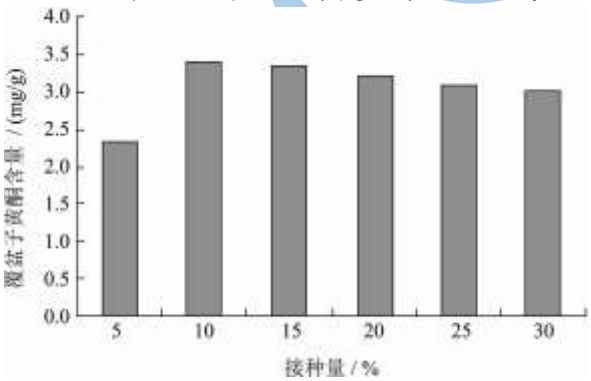


图 2 接种量对灵芝发酵提取覆盆子黄酮的影响

Fig.2 Effect of inoculation amount on the yield of *Rasspberry* total flavonoids

分别在不同接种量（5%、10%、15%、20%、25%、30%）下摇床振荡发酵覆盆子黄酮，26 ℃下培养 120 h，覆盆子添加量 100 g/L，摇瓶转速 100 r/min，装液量 100 mL（500 mL 三角瓶）结果见图 2。

由图 2 可知，接种量对灵芝真菌发酵覆盆子黄酮有一定影响，小接种量不利于覆盆子黄酮的溶出，随接种量的增大，覆盆子黄酮的溶出量增加，接种量 10%时，覆盆子黄酮溶出量最大，为 3.42 mg/g，之后，增大接种量覆盆子黄酮的溶出量反而降低，说明灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的接种量 10%较为适宜。

2.2.2 摇瓶转速对菌体生长及多糖产量的影响

微生物菌株的发酵能力不仅取决于菌体本身的性能，而且适宜的生长环境也是菌体高效表达产物的必要因素。发酵工业中，深层通氧搅拌发酵占据着重要的地位，其中搅拌作用直接影响发酵基质的传递和溶氧水平，最终与发酵生产能力和产品质量息息相关，是发酵过程优化控制的重要参数。因此选取不同摇瓶转速（50、100、150、200、250、300 r/min）进行发酵研究，接种量10%，发酵温度26 ℃，装液量100 mL（500 mL三角瓶），覆盆子添加量100 g/L，培养时间120 h后测定覆盆子黄酮溶出量，结果如图3所示。

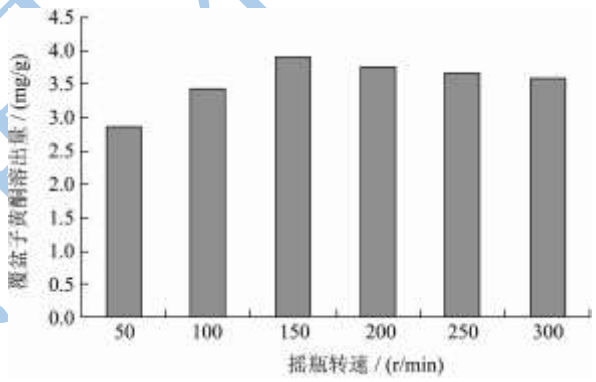


图 3 转速对灵芝发酵提取覆盆子黄酮的影响

Fig.3 Effect of rotation rate on the yield of *Rasspberry* total flavonoids

由图3可知，不同摇瓶转速下，发酵结束后，覆盆子黄酮溶出量不同，转速为150 r/min时，覆盆子黄酮溶出量最高，因此，适宜于灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的适宜转速为150 r/min。

2.2.3 覆盆子添加量对灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的影响

底物浓度对发酵过程及产物均有不同程度的影响，灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的研究中底物中覆盆子粉末的添加量分别设定 50、100、200、300、400、500 g/L，接种量 10%，发酵温度 26 ℃，装液量 100 mL（500 mL 三角瓶），摇瓶转速 150 r/min，培养时间 120 h 后测定覆盆子黄酮溶出量，结果如图 4 所示。

由图 4 可知，底物中覆盆子粉末的添加量对灵芝真菌发酵覆盆子黄酮有影响，随覆盆子粉末添加量的增大，覆盆子黄酮的溶出量增大。当覆盆子粉末添加

量为 200 g/L 时，覆盆子黄酮溶出量达到最高，之后随添加量的增加，覆盆子黄酮溶出量反而降低，所以覆盆子粉末添加量 200 g/L 为适宜添加量。

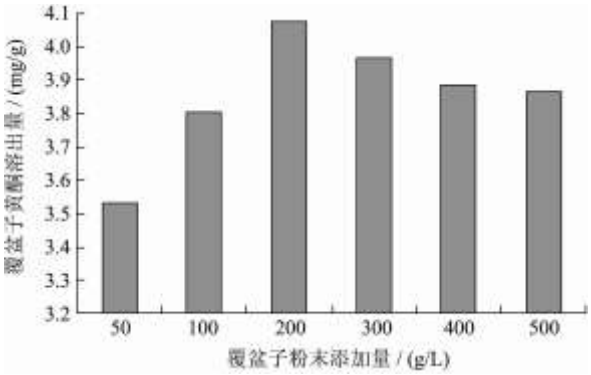


图 4 覆盆子添加量对灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的影响

Fig 4 Effect of additive quality of *Rasspberry* on the yield of *Rasspberry* total flavonoids

2.2.4 发酵温度对灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的影响

分别在不同发酵温度下（22、24、26、28、30、32 ℃）下摇床振荡发酵覆盆子黄酮，培养时间 120 h，覆盆子添加量 200 g/L，摇瓶转速 150 r/min，装液量 100 mL（500 mL 三角瓶）结果见图 5。

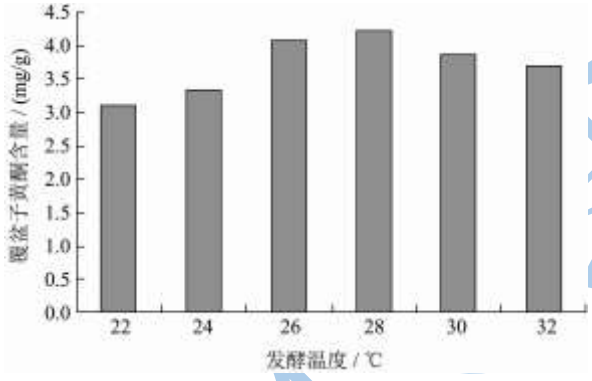


图 5 发酵温度对灵芝发酵提取覆盆子黄酮的影响

Fig.5 Effect of fermentation temperature on the yield of *Rasspberry* total flavonoids

由图 5 可知，发酵温度对灵芝真菌发酵提取覆盆子黄酮有一定的影响，随温度的升高，覆盆子黄酮提取量不断增加，当温度升至 28 ℃时，覆盆子黄酮提取量最大，之后随温度的增加，覆盆子黄酮提取量反而降低，表明灵芝真菌发酵覆盆子黄酮的适宜发酵温度为 28 ℃。

2.3 灵芝发酵覆盆子黄酮发酵条件优化

由表 2、3 可知，灵芝发酵生产覆盆子黄酮发酵条件正交试验中，灵芝接种量、发酵温度的影响显著，而覆盆子添加量、摇瓶转速影响不显著，优化的培养条件为 $A_2B_3C_3D_3$ 即：灵芝接种量 10%，覆盆子添加量 300 g/L，发酵温度 30 ℃，摇瓶转速 200 r/min，此条件下实验得出覆盆子黄酮生产量为 4.89 mg/g，高于正交试验的其它值，因此确定此条件为灵芝发酵生产覆盆子黄酮的发酵适宜条件。

表1 灵芝发酵生产覆盆子黄酮发酵条件优化$L_9(3^4)$正交实验设计表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of fermentation conditions for orthogonal array design

因素 水平	A (灵芝接种量/%)	B [覆盆子添加量/(g/L)]	C (发酵温度/℃)	D [摇瓶转速/(r/min)]
1	5	100	26	100
2	10	200	28	150
3	15	300	30	200

表2 发酵条件优化$L_9(3^4)$正交实验结果与分析

Table 2 $L_9(3^4)$orthogonal array design and results for optimizing fermentation conditions

因素 水平	A	B	C	D	覆盆子黄酮含量/(mg/g)
1	1	1	1	1	2.05
2	1	2	2	2	2.56
3	1	3	3	3	3.66
4	2	1	2	3	3.89
5	2	2	3	1	4.86
6	2	3	1	2	4.28
7	3	1	3	2	3.91
8	3	2	1	3	3.26
9	3	3	2	1	3.38
K_1	2.757	3.283	3.197	3.430	
K_2	4.343	3.560	3.277	3.583	
K_3	3.517	3.773	4.143	3.603	
R	1.586	0.490	0.946	0.173	

表 3 发酵条件优化 $L_9(3^4)$ 正交实验方差分析

Table 3 Significant analysis of the $L_9(3^4)$orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
灵芝接种量	3.778	2	69.963	19.000	*
覆盆子添加量	0.362	2	6.704	19.000	
发酵温度	1.654	2	30.630	19.000	*
摇瓶转速	0.054	2	1.000	19.000	
误差	0.05	2			

3 结论

本研究对灵芝发酵生产覆盆子黄酮的工艺进行了研究，通过比较不同发酵时间覆盆子黄酮含量，得

出最佳的发酵时间为 120 h；在单因素研究基础上，通过 $L_9(3^4)$正交实验设计对灵芝发酵生产覆盆子黄酮基础培养基和发酵条件进行了优化研究，结果得出灵芝发酵生产覆盆子黄酮发酵优化条件为：灵芝接种量 10%，覆盆子添加量 300 g/L，发酵温度 30 ℃，摇瓶转速 200 r/min，在上述优化条件下，灵芝发酵覆盆子后黄酮含量达到 4.89 mg/g，与对照组（不接种灵芝）相比含量提高 109.87%。

参考文献

[1] 陈永存.覆盆子的营养功效及产品开发[J].农产品资源,2007,10:42-45

[2] Kazuhiro O. Labdane type diterpene glycosides from rubus foliolosus [J]. Chem. Pharm. Bull, 1991, 39 (9)：2443-2445

[3] 孙金旭,朱会霞,王敏,等.灵芝真菌液体发酵培养基优化研究[J].现代食品科技,2007,23(12):51-53

[4] 朱会霞,孙金旭.灵芝真菌摇瓶发酵条件优化研究[J].中国酿造,2008,12:30-33

[5] 孙金旭,朱会霞.超声波提取覆盆子干果黄酮工艺研究[J].中国酿造,2010,217(4):147-149

[6] 刘金哲,史小青,姚艳飞,等.香菇发酵葛根生产总黄酮的工艺研究[J].食品科学,2012,33(3):212-215

现代食品科技