

doi:10.3969/j.issn.1001-3776.2017.04.007

牛樟芝固态发酵产安卓奎诺尔工艺研究

魏海龙, 程俊文, 胡传久, 贺亮, 钱华, 李海波, 王衍彬, 邹景泉, 蒋云鹤

(浙江省林业科学研究院 浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室, 浙江 杭州 310023)

摘要: 对牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* 固态发酵生产安卓奎诺尔的工艺条件进行优化。先通过单因素试验, 筛选出小麦 *Triticum aestivum* 质量、相对湿度、培养温度 3 个主要影响参数, 再应用响应曲面分析法优化。结果表明, 牛樟芝产安卓奎诺尔固态发酵最佳条件为: 小麦 80.82 g, 相对湿度 58.01%, 培养温度 28.48℃, 安卓奎诺尔的平均产量可达 259.79 mg·kg⁻¹。

关键词: 牛樟芝; 安卓奎诺尔; 固体发酵; 响应面

中图分类号: R282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3776 (2017) 04-0039-06

Optimizing of Technology for Preparation of Antroquinonol from *Antrodia cinnamomea* by Response Surface Methodology

WEI Hai-long, CHENG Jun-wen, HU Chuan-jiu, HE Liang, QIAN Hua, LI Hai-bo, WANG Yan-bin, ZOU Jing-quan, JIANG Yun-he
(Key Laboratory of Biological and Chemical Utilization of Forest Resources of Zhejiang, Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Experiments were conducted on optimizing technology for preparation of antroquinonol from solid-state fermented mycelium of *Antrodia cinnamomea*. Single factor experiment selected important factors such as mass of *Triticum aestivum*, relative humidity and culture temperature, and technology was optimized by response factor analysis. The result demonstrated that the average yield of antroquinonol reached 259.79 mg/kg with wheat of 80.82 g, relative humidity of 58.01%, culture temperature of 28.48℃.

Key words: *Antrodia cinnamomea*; antroquinonol; solid-state fermentation; response surface methodology

牛樟芝 *Antrodia camphorate* 为我国台湾道地药材, 属担子菌门 Basidiomycete 多孔菌科 Polyporaceae 薄孔菌属 *Antrodia*^[1], 仅寄生于我国台湾特有的牛樟树 *Cinnamomum kanehirai* 上, 一般形成子实体的时间较长^[2]。牛樟芝在民间应用久, 具有保肝、解酒、增强免疫力等活性^[3]。

野生牛樟芝子实体由于资源贫乏, 价格不菲。为此, 研究人员采取人工培养的方式获得牛樟芝产品。目前人工培养牛樟芝的主要方法包括液态培养法、椴木栽培法和固态培养法。由于固态培养法得到的产物中活性成分与野生牛樟芝子实体活性成分的近似程度较高, 且生产原料不受限制等优势得到大范围推广。

2007 年, Lee 等^[4]用正己烷萃取牛樟芝产物, 得到一个新化合物安卓奎诺尔 (antroquinonol), 属于泛醌类化合物, 发现具有良好的生理活性。Yu^[5]等人研究显示, 安卓奎诺尔对胰腺癌细胞具有抑制作用。Kumar^[6]等人研究表明安卓奎诺尔可以通过改变信号蛋白活性和 mRNA 的表达, 显著抑制三种肺癌细胞的增殖。

收稿日期: 2017-01-27 ; 修回日期: 2017-05-24

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究项目 (2013C32095), 浙江省农业 (食用菌) 新品种选育重大科技专项 (2016C02057-8)

作者简介: 魏海龙, 硕士, 副研究员, 从事食用药用菌培育与加工研究; E-mail: whlwl@163.com。通信作者: 程俊文, 副研究员, 从事食用药用菌活性成分加工研究; E-mail: jwchengzj@163.com。

响应曲面法 (RSM) 是建立一个包括各因素的一次项、平方项和任何两个因素之间的一级交互作用项的数学模型。该方法广泛应用于固、液态生物发酵培养基优化、培养条件优化等生化反应优化及模型建立中^[7]。本实验以安卓奎诺尔为目标产物, 利用响应面法优化发酵条件来提高牛樟芝固态发酵产物中安卓奎诺尔的产量, 以期工业化生产应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

牛樟芝菌株来源于台湾自然科学博物馆, 在浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室保藏。将保藏的菌种转接至 PDA 试管斜面上, 26℃ 恒温培养 14 d, 待菌丝体长满斜面, 菌丝体颜色泛微红, 4℃ 立式透明冷藏箱低温保藏。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 斜面 PDA 培养基 马铃薯 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 琼脂 20 g·L⁻¹。

1.2.2 液体种子培养基 马铃薯 100 g·L⁻¹, 葡萄糖 15 g·L⁻¹, 酵母粉 5 g·L⁻¹, 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 1 g·L⁻¹, 无水硫酸镁 (MgSO₄) 0.5 g·L⁻¹。

1.2.3 固态发酵基础培养基 葡萄糖 15 g·L⁻¹, 玉米粒 100 g·L⁻¹, 麸皮 300 g·L⁻¹, 蛋白胨 10 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g·L⁻¹。

1.2.4 实验原料与试剂 见表 1。

1.2.5 实验仪器 见表 2。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面培养 将实验室保存的菌株活化后转接到斜面 PDA 试管中, 切出 2 cm²

大小的菌丝块接种于斜面的中部, 在 SPX-250B-Z 型生化培养箱中 28℃ 恒温培养 7 d。

1.3.2 液体种子培养 将活化的斜面菌种切割成 2 cm² 大小的菌丝块, 接种于液体培养基中, 500 mL 三角瓶装培养基 150 mL 于 ZHWY-211B 恒温培养摇床中, 26℃, 150 r·min⁻¹ 培养 6 d。

1.3.3 固体发酵培养 将 10 mL 液体种子液在超净工作台内接入 500 mL 固体培养瓶中, 拌匀, 26℃ 培养 40 d。培养后所得到的产物为牛樟芝固态发酵菌质。

以上所有培养基均进行高压蒸汽灭菌, 温度 121℃, 时间 30 min。

1.4 实验设计

1.4.1 响应面法分析实验 综合单因素试验结果, 选择小麦 *Triticum aestivum* 粒质量 (下文中简称为小麦质量)、相对湿度、培养温度 3 个因素所确定的水平范围, 运用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 采用 3 因素 3 水平的响应面设计, 用 Design Expert 8.05 对实验数据进行回归分析。自变量的试验水平分别以 -1, 0, 1 进行编码, 试验因素及水平设计见表 3。

1.5 分析方法

表 1 实验原料与试剂
Table 1 Raw material and reagent

名称	规格	厂家
无水乙醇	AR	成都市科龙化工试剂厂
KH ₂ PO ₄	AR	成都市科龙化工试剂厂
MgSO ₄	AR	成都市科龙化工试剂厂
小麦粒		杭州市杭富生物制品厂
酵母粉		杭州市杭富生物制品厂
蛋白胨		杭州微生物试剂有限公司
无水葡萄糖	AR	成都市科龙化工试剂厂

表 2 实验仪器
Table 2 Experimental apparatus

名称	型号	厂家
二列四孔水浴锅	HH-2K4	巩义市予华仪器有限公司
数控超声波清洗器	JK-2200DB	合肥金尼克机械制造有限公司
漩涡混匀器	WH-861	太仓市科教器材厂
多功能酶标仪	2300	Perkin Eimer
电子天平	BSA2245	赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司
生化培养箱	SPX-250B-Z 型	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
立式透明冷藏箱	SC-360Y	青岛澳柯玛股份有限公司
高压蒸汽灭菌锅	SX-500	TOMY KOGYO CO. LTD
恒温培养摇床	ZHWY-211B	上海智城分析仪器制造有限公司

表 3 响应面分析因子及水平
Table 3 Factors and levels of RSM analysis

因素	水平		
	-1	0	1
小麦质量 X ₁ /g	60	80	100
相对湿度 X ₂ /%	50	55	60
培养温度 X ₃ /℃	26	28	30

1.5.1 生物量的测定 将培养好的牛樟芝菌丝体真空冷冻干燥至恒重, 电子天平称重。

1.5.2 安卓奎诺尔的分析检测方法 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定牛樟芝产品中安卓奎诺尔的产量。取干燥后的牛樟芝固态发酵菌质 5 g, 加入无水乙醇 90 mL, 在 30℃ 的 HH-2K4 型电热恒温水浴提取 45 min, 静置后 0.22 μm 微膜过滤, 进行 HPLC 分析, 具体分析条件如文献^[8]所示。

1.5.3 实验数据分析软件 用 Design Expert 8.05 进行数据分析和处理。

2 结果与分析

2.2 响应面分析试验结果

2.2.1 响应面分析方案及结果 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 共有 17 个试验点, 其中 12 个为析因点, 5 个零点试验用以估计试验误差。以安卓奎诺尔产量为响应值, 试验方案及结果见表 4。

表 4 响应面试验设计方案及试验结果
Table 4 Experiment design and results of RSM

试验号	X_1/g	$X_2/\%$	$X_3/^\circ C$	安卓奎诺尔产量 (Y) / ($mg \cdot kg^{-1}$)	
				实测值	预测值
BOX-1	0	-1	-1	224.81±2.02	226.30
BOX-2	0	0	0	268.63±1.46	264.79
BOX-3	0	0	0	265.42±2.24	264.79
BOX-4	1	0	1	214.82±2.16	216.82
BOX-5	0	0	0	263.83±1.87	264.79
BOX-6	-1	1	0	241.84±1.42	239.87
BOX-7	1	0	-1	218.37±2.26	214.91
BOX-8	-1	-1	0	229.16±2.56	229.67
BOX-9	0	1	1	253.45±1.91	251.96
BOX-1	0	-1	1	218.36±1.83	214.39
BOX-1	-1	0	1	220.45±1.63	223.91
BOX-1	-1	0	-1	195.36±1.58	193.36
BOX-1	0	0	0	264.81±2.43	264.79
BOX-1	0	0	0	261.25±2.19	264.79
BOX-1	1	-1	0	235.71±1.82	237.67
BOX-1	0	1	-1	203.62±1.74	207.59
BOX-1	1	1	0	246.82±1.68	246.32

2.2.2 回归模型建立及方差分析 用 Design Expert 8.05 对表 4 实验数据进行分析^[9], 获得安卓奎诺尔产量对小麦、相对湿度和培养温度的多元二次回归方程:

$$Y = 264.79 + 3.61X_1 + 4.71X_2 + 8.11X_3 - 0.39X_1X_2 - 7.16X_1X_3 + 14.07X_2X_3 - 19.61X_1X_1 - 6.80X_2X_2 - 32.93X_3X_3$$

表 5 回归模型方差分析
Table 5 ANOVA of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	8 695.11	9	966.12	64.58	< 0.000 1**
X_1	104.47	1	104.47	6.98	0.033 3*
X_2	177.57	1	177.57	11.87	0.010 8*
X_3	526.83	1	526.83	35.21	0.000 6**
X_1X_2	0.62	1	0.62	0.041	0.844 9
X_1X_3	205.06	1	205.06	13.71	0.007 6**
X_2X_3	791.86	1	791.86	52.93	0.000 2**
X_1X_1	1 618.80	1	1 618.80	108.20	< 0.000 1**
X_2X_2	194.57	1	194.57	13.01	0.008 7**
X_3X_3	4 565.90	1	4 565.90	305.20	< 0.000 1**
残差	104.72	7	14.96		
失拟项	76.13	3	25.38	3.55	0.126 3
纯误差	28.60	4	7.15		
总离差	8 799.83	16			

$$R^2 = 0.988 1; \text{Adj } R^2 = 0.972 8$$

注: *表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

由表 5 可知,以安卓奎诺尔产量为目标函数的回归方程的回归效果达到极显著水平, P 值均 $< 0.000 1$; 模型的决定系数 $R^2=0.988 1$, 说明模型与实际实验拟合较好; 校正决定系数 $AdjR^2=0.972 8$, 说明该模型能解释 97.28% 响应值的变化; 模型的失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 表 5 中模型失拟项的 P 值为 0.126 3, 大于 0.05, 表明模型的失拟项不显著; 根据表 5 的显著性分析结果, 各因素的一次项、二次项以及 X_1X_3 , X_2X_3 的交互项对安卓奎诺尔的合成均显著 ($P < 0.05$) 影响; 分析表明这个模型建立的回归方程能运用于牛樟芝固态发酵产安卓奎诺尔条件优化的理论预测。

2.2.3 响应面图形分析 分别将模型中的小麦、相对湿度及培养温度的其中一个因素固定在 0 水平, 得到另外两个因素的交互影响结果, 二次回归方程的响应面及其等高线如图 1, 图 2, 图 3 所示, 各个因素及其相互间的交互作用对响应值的影响结果通过该组图可以直观地反映出来。极值条件应该在等高线的圆心处。

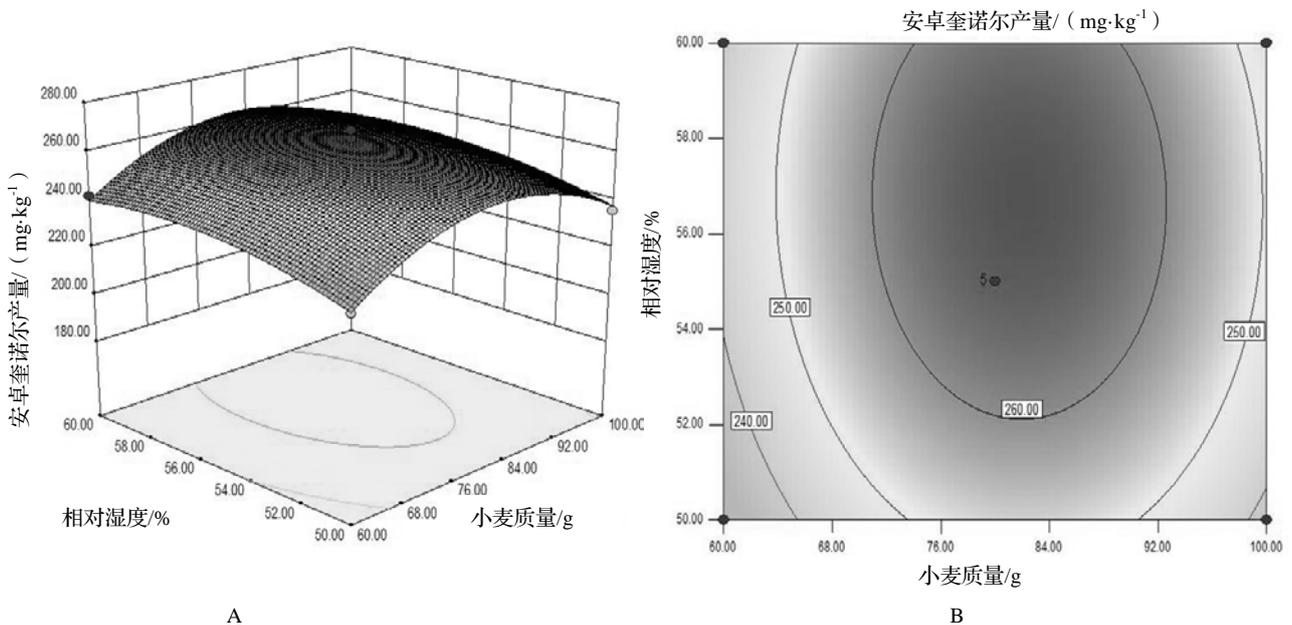


图 1 小麦质量和相对湿度交互影响安卓奎诺尔产量的曲面图 (A) 和等高线图 (B)

Figure 1 Surface diagram and contour of antroquinonol yield under interaction of wheat and relative humidity

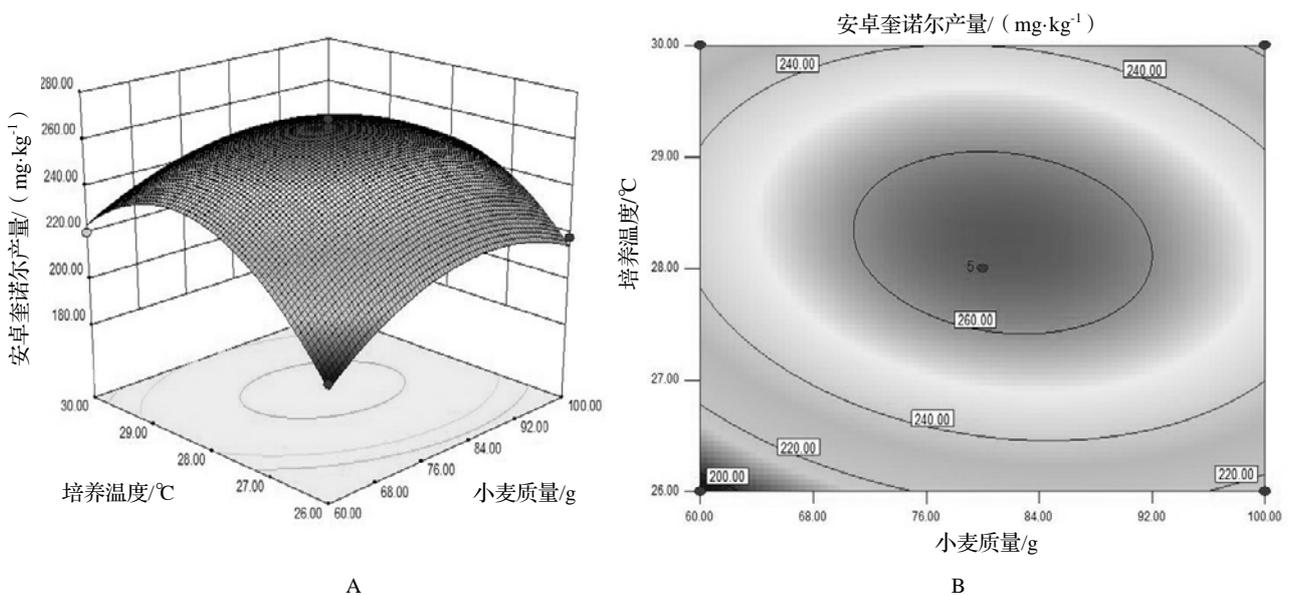


图 2 小麦质量和培养温度交互影响安卓奎诺尔产量的曲面图 (A) 和等高线图 (B)

Figure 2 Surface diagram and contour of antroquinonol yield under interaction of wheat and culture temperature

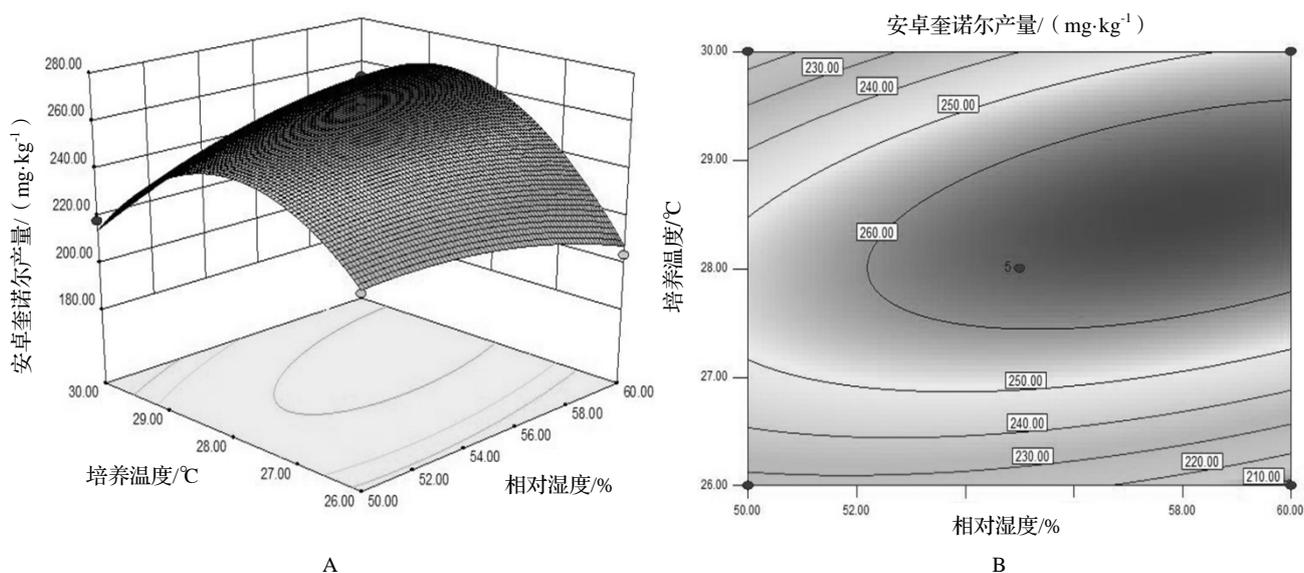


图 3 相对湿度和培养温度交互影响安卓奎诺尔产量的曲面图 (A) 和等高线 (B)

Figure 3 Surface diagram and contour of antroquinolone yield under interaction of relative humidity and culture temperature

从图中可以看出,影响牛樟芝发酵产安卓奎诺尔最显著的因素为培养温度 X_3 ,表现为响应面变化弧度较大。小麦质量 X_1 和相对湿度 X_2 响应面弧度变化平缓,说明对响应值影响相对较小。此外,等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示二因素交互作用显著,而圆形则与之相反^[7]。从图 1 ~ 图 3 可以看出, X_1 与 X_3 、 X_2 与 X_3 交互作用显著。

2.2.4 验证实验 根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程,用 Design Expert 8.05 分析,得到最佳培养条件为:小麦 80.82 g,相对湿度 58.01%,培养温度 28.48℃,安卓奎诺尔产量理论值可达 267.28 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

为检验模型预测值与实际值之间的相关性,即检验响应面优化模型的可靠性,对牛樟芝在预测的最优发酵条件下安卓奎诺尔产量进行实验验证。实验中小麦质量、相对湿度和培养温度的优化值分别为 80.82 g, 58.01%, 28.48℃, 三次平行实验,测得安卓奎诺尔产量分别为 259.89 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 262.17 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 257.32 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 安卓奎诺尔平均产量 259.79 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 达到了回归模型预测理论值的 96.8%, 实验结果与模型符合良好,说明该模型能较好地模拟和预测牛樟芝安卓奎诺尔产量。

3 结论

本实验对牛樟芝固态发酵产安卓奎诺尔的发酵条件进行了优化,结合生产实践,选择小麦质量、相对湿度、培养温度为三个主要参数,根据 Box-Behnken 中心组合实验设计及三因素三水平的响应面分析,通过二次多项回归模型进行方差分析和回归拟合,预测了牛樟芝产安卓奎诺尔最佳固态发酵条件为:小麦粉质量 80.82 g,相对湿度 58.01%,培养温度 28.48℃,安卓奎诺尔产量理论值可达 267.28 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。验证实验中安卓奎诺尔平均产量可达 259.79 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,与预测值十分接近,证明了该实验方法的稳定性。

参考文献:

- [1] 蔡为民,金群力,蔡青松,等.牛樟芝人工培养及活性成分与药理作用的研究进展[J].食药用菌,2015,23(1):17-23.
- [2] Lu M, El-Shazly M, Wu T, et al. Recent research and development of *Antrodia cinnamomea* [J]. Pharmacol Therap, 2013, 139(2): 124-156.
- [3] 赖敏男.台湾牛樟芝发展史及人工栽培现状[J].食药用菌,2017,(25)2:84-89.
- [4] Lee T H, Lee C K, Tsou W L. A new cytotoxic agent from solid-state fermented mycelium of *Antrodia camphorata*[J]. Plant Medic, 2007, 73

(13) : 1412 – 1415.

- [5] Yu C C, Chiang P C, Lu P H, *et al.* Antroquinonol, a natural ubiquinone derivative, induces a cross talk between apoptosis, autophagy and senescence in human pancreatic carcinoma cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23 (8) : 900 – 907
- [6] Kumar V B, Yuan T C, Liou J W, *et al.* Antroquinonol inhibits NSCLC proliferation by altering PI3K/mTOR proteins and miRNA expression profiles [J]. *Mutat Res*, 2011, 707 (1 – 2) : 42 – 52.
- [7] Jin Q L, Zhang Z F, Lu G Y, *et al.* Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharideextracted from *Phellinus baumii* using a delignification method[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152, 575 – 582.
- [8] 夏永军, 李炜疆, 许赣荣. 樟芝固态发酵产品活性代谢产物分析[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37 (8) : 86 – 90.
- [9] 张成军. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.