

# 大豆富硒灵芝菌固体发酵 产氨基酸工艺的优化研究

杜亚楠<sup>1</sup>, 涂晓嵘<sup>1</sup>, 胡志斌<sup>1</sup>, 李庆蒙<sup>1</sup>, 魏赛金<sup>1, 2\*</sup>

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院/南昌市发酵应用重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 江西 南昌 330045)

**摘要:**为探索在大豆固体培养基中接种富硒灵芝液体种子进行发酵产游离氨基酸的固体发酵工艺条件。在单因素试验分别探索到较佳接种量、培养温度和发酵培养时间的基础上,采用响应面法中心组合设计试验。富硒灵芝对大豆固态发酵培养较优组合条件:即大豆固体培养基中接种灵芝富硒液体种子液,接种量 10.53%、发酵温度 29.34 °C,发酵时间 6.68 d 后,发酵大豆中的游离氨基酸可达 280.56 mg/100 g,与优化前的游离氨基酸含量 169.55 mg/100 g 相比提高了 64.64%;有机硒的含量可达 0.036%,与优化前相比提高了 1.1 倍。初步探索到灵芝对大豆固体发酵产游离氨基酸工艺条件,为开发大豆既富含游离氨基酸,又含微量有机硒的高营养价值食品提供了新思路。

**关键词:**富硒灵芝;氨基酸;响应面法

中图分类号:S567.3<sup>+</sup>1 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-1043-06

## Optimization of the Solid Fermentation Soybean Enrich Selenium *Ganoderma* Producing Amino Acid

DU Ya-nan<sup>1</sup>, TU Xiao-rong<sup>1</sup>, HU Zhi-bin<sup>1</sup>,  
LI Qing-meng<sup>1</sup>, WEI Sai-jin<sup>1, 2\*</sup>

(1. College of Bioengineering, Nanchang Key Laboratory of Fermentation Application and Technology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, JAU, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** To explore the conditions for the solid fermentation to produce free amino acids by inoculating Se-enriched *Ganoderma* liquid seed in soybean solid medium. On the basis of exploring better inoculation amount, incubation temperature and fermentation period, the response surface method of central composite design test was used. Ideal combination conditions for Se-enriched *Ganoderma* on soybean solid fermentation culture: inoculating Se-enriched *Ganoderma* liquid seed in soybean solid medium, inoculation amount 10.53%, fermentation temperature 29.34 °C, fermentation period 6.68 d, free amino acids in fermented soybean up to 280.56 mg/100g, improved by 64.64% compared with those before optimization, organic selenium content up to 0.036%, 1.1 times more than before optimization. Process conditions for producing free amino acid from *Ganoderma* in soybean solid fermentation has initially explored, that provides new ideas of developing soybean enrich free amino acid and trace organic selenium.

**Key words:** *Ganoderma lucidum* enrich selenium; dissociative amino acid; response surface method

收稿日期:2012-03-17 修回日期:2012-05-20

基金项目:江西省教育厅项目(GJJ08193)

作者简介:杜亚楠(1988—),女,硕士生,主要从事微生物次级代谢研究, E-mail: dyn198880321@163.com; \* 通讯

作者:魏赛金 副教授, E-mail: weisaijin@126.com。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是名贵药用真菌,自古被誉为延年益寿之佳品,功可补气益血,养血安神,临床应用非常广泛<sup>[1]</sup>。硒是人体必需的微量营养元素之一,缺硒会直接导致人体免疫能力下降。临床医学证明,威胁人类健康和生命的四十多种疾病都与人体缺硒有关<sup>[2-5]</sup>。

本文以大豆为原材料接种富硒灵芝液体种子,探索大豆固体发酵产氨基酸新工艺,为开发大豆既富含游离氨基酸,又含灵芝多糖及微量有机硒的高营养价值食品提供了新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 灵芝 730(江西农业大学生物科学与工程学院实训基地提供)。

1.1.2 主要试剂与仪器 抗坏血酸、氨基酸标准液、茚三酮试剂、亚硒酸钠,以上均为分析纯。722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)等。

1.1.3 供试培养基 斜面培养基: PDA 培养基<sup>[6]</sup>;一级液体种子培养基: 去皮土豆 300 g,蔗糖 20 g,酵母膏 2.0 g,大豆蛋白胨 5.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0 g, pH 5.5, 蒸馏水 1 000 mL; 二级液体培养基: 蔗糖 80 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 5.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{NaCl}$  5 g, 土豆 200 g, pH 5.5, 蒸馏水 1 000 mL; 固体发酵培养基<sup>[7]</sup>: 浸泡过夜的大豆洗净,沥干水分,在 250 mL 三角瓶中分别盛不同重量的浸泡过夜的大豆,121 °C 灭菌 30 min,备用。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种的活化<sup>[8]</sup> 取实验室冰箱保存的灵芝菌种,接种于 PDA 斜面,置于 30 °C 恒温培养箱培养 7 d,即得活化斜面菌种。

1.2.2 灵芝液体菌种的制备 从活化好的斜面中挖取 0.5 cm<sup>2</sup> 左右的菌块 1~2 块,接入一级液体培养基中,装液量为 50 mL/250 mL。30 °C 180 r/min 振荡培养 3~4 d<sup>[9]</sup>。将培养好的一级种子液按 10% 的接种量接种到亚硒酸钠终浓度为 300 μg/mL 的二级液体培养基中,装液量为 50 mL/250 mL,在 30 °C 180 r/min 培养 4 d,即得富硒灵芝种子液。

1.2.3 单因素试验<sup>[10]</sup> (1) 培养温度试验。取 40 g/瓶的大豆固体发酵培养基 15 瓶,分别接种灵芝液体菌种,接种量 10% (v/w),分别置于 26、28、30、32、34 °C 培养箱内培养。每种温度处理重复 3 瓶。间歇摇匀,使灵芝菌丝体生长均匀。培养 7 d 后取培养料烘干检测游离氨基酸总量。

(2) 接种量试验。取 40 g/瓶的大豆固体发酵培养基 15 瓶,分别接种灵芝液体菌种,接种量 (v/w) 分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30 °C 恒温培养,每种试验处理重复 3 瓶。间歇摇匀。培养 7 d 后取培养料烘干检测游离氨基酸总量。

(3) 培养时间试验。取 40 g/瓶的大豆固体发酵培养基 18 瓶,分别接种灵芝液体菌种,接种量 10% (v/w),置于 30 °C 恒温培养,每种试验处理重复 3 瓶。分别培养至 3、4、5、6、7、8 d 后取培养料烘干检测游离氨基酸总量。

(4) 装量试验。分别取装量 30 g/瓶、40 g/瓶、50 g/瓶、60 g/瓶、70 g/瓶的大豆固体发酵培养基各 3 瓶,分别接种灵芝液体菌种,接种量 (v/w) 分别为 10%,置培养箱中 30 °C 培养。间歇摇匀。培养 7 d 后取培养料烘干检测游离氨基酸总量。

1.2.4 中心组合试验 根据 Box - Behnken 中心组合设计原理<sup>[11]</sup>,分别以不同接种量、不同培养温度和不同培养时间三因素三水平的中心组合试验设计,以游离氨基酸含量为响应值,利用响应面试验结果,探索大豆接种灵芝液体种子进行固态发酵后产游离氨基酸的较佳培养工艺条件。

1.2.5 游离氨基酸总量的测定 将发酵产物按标记倒入平皿中,50 °C 干燥至恒重,称取干燥样品 0.25 g 于研钵中,加入 12.5 mL 体积分数为 10% 醋酸溶液研磨成匀浆,过滤,滤液加蒸馏水定容至 250 mL,保存备用<sup>[12]</sup>。采用茚三酮法<sup>[13]</sup>测定样品中游离氨基酸的含量。

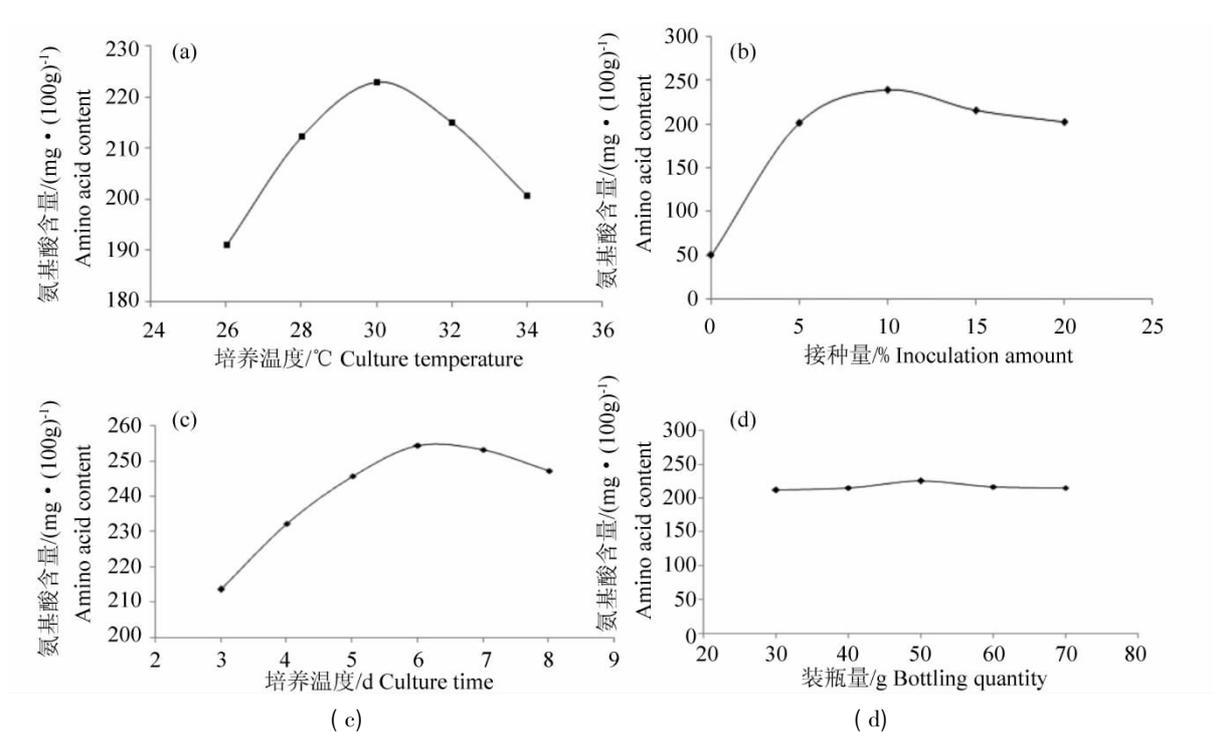
1.2.6 有机硒含量测定 依据参考文献 [8] 的方法测定大豆干粉和灵芝固态发酵物中有机硒的含量。

1.2.7 试验数据统计分析 采用 SAS 统计学软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

大豆固体培养基接种液体灵芝种子液,分别在不同温度、不同接种量、大豆不同装量和不同培养时



(a) 培养温度对固态发酵的影响; (b) 接种量对固态发酵的影响; (c) 培养时间对固态发酵的影响; (d) 装瓶量对固态发酵的影响。

(a) Effect of temperature on solid fermentation. (b) Effect of inoculation level on solid fermentation. (c) Effect of culture time on solid fermentation. (d) Effect of bottling quantity on solid fermentation.

图 1 单因素试验结果

Fig.1 The result of single factor experiment

间进行固体发酵培养对游离氨基酸总量影响的单因素试验结果分别见图 1(a)、图 1(b)、图 1(c) 和图 1(d)。

由图 1(a) 可知: 在温度 30 °C 时, 大豆固体培养基接种液体灵芝种子液进行固体发酵 7 d 后, 发酵大豆中的游离氨基酸的产量高达 223.0 mg/100 g。

由图 1(b) 可知: 大豆固体培养基接种 10% 液体灵芝种子液进行固体发酵为较适宜的接种量, 固体发酵 7 d 后, 发酵大豆中的游离氨基酸的产量高达 238.2 mg/100 g。

由图 1(c) 可知: 大豆固体培养基接种 10% 液体灵芝种子液进行固体发酵 6 d 后, 发酵大豆中的游离氨基酸的产量高达 254.4 mg/100g。

由图 1(d) 可知: 大豆培养基在 250 mL 三角瓶中的不同装量, 接种 10% 液体灵芝种子液进行固体发酵 7 d 后, 发酵大豆中的游离氨基酸的产量差异不显著。

在各个水平灵芝菌丝体的生长变化不大, 游离氨基酸的含量比较接近, 差异不明显。由此可知在接种量一定的情况下, 装瓶量对灵芝固态发酵的影响不显著。

## 2.2 采用响应面分析法对灵芝大豆固态发酵条件的优化结果

2.2.1 响应面分析因素的选取 根据 Box - Benhnken 的中心组合试验设计原理, 综合单因素试验结果, 选取接种量、培养时间、培养温度对游离氨基酸含量影响显著的 3 个因素, 在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析方法。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Tab.1 Factors and levels of experiment of Response Surface Analysis

因素 Factors	编码 Number	因素水平 Factor level		
		-1	0	1
接种量/% Inoculation amount	$X_1$	5	10	15
培养时间/d Culture time	$X_2$	5	6	7
培养温度/°C Culture temperature	$X_3$	26	30	34

2.2.2 响应面分析试验设计方案 以接种量  $X_1$ 、培养时间  $X_2$ 、培养温度  $X_3$  为自变量,以游离氨基酸的含量为响应值( $Y_1$ ) 进行响应面分析试验。试验方案及试验结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及试验结果

Tab.2 Observed and estimated values for different levels of experimental design

实验号 Number	因素 Factor			氨基酸含量 / [mg · (100g) <sup>-1</sup> ] Amino acid content	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	预测值 Predictive value	实验值 Experimental values
	1	-1	-1	0	238.353 6
2	-1	1	0	265.790 6	265.782
3	1	-1	0	259.801 3	259.81
4	1	1	0	269.299 3	267.83
5	0	-1	-1	229.149 1	229.905
6	0	-1	1	222.151 8	219.918
7	0	1	-1	257.616 1	259.85
8	0	1	1	230.619 8	229.864
9	-1	0	-1	238.103 2	235.878
10	1	0	-1	240.574 5	239.81
11	-1	0	1	211.099 5	211.864
12	1	0	1	233.584 7	235.81
13	0	0	0	276.372 3	275.823
14	0	0	0	276.372 3	279.81
15	0	0	0	276.372 3	273.484

2.2.3 多元二次响应面回归模型的建立与分析 对表 2 试验结果通过 SAS 软件程序进行二次回归响应面分析,建立多元二次响应面回归模型:  $Y_1 = 276.372 3 + 6.238 95X_1 + 9.233 85X_2 - 8.498 3X_3 - 11.052 62X_1X_1 - 4.484 7X_1X_2 + 5.003 4X_1X_3 - 7.008 417X_2X_2 - 5X_2X_3 - 34.479 52X_3X_3$ ,各因素的方差分析见表 3。

表 3 二次响应面回归模型方差分析

Tab.3 Analyze of mean square

方差来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F	Pr > F
Model	9	6 556.167	728.463	77.5364	0.000 1
$X_1 - X_1$	1	311.413 4	311.4134	33.146 33	0.002 219
$X_2 - X_2$	1	682.097 1	682.0971	72.601 29	0.000 366
$X_3 - X_3$	1	577.779	577.779	61.497 85	0.000 541
$X_1 X_2$	1	80.451 93	80.45193	8.563 171	0.032 774
$X_1 X_3$	1	100.14	100.14	10.658 74	0.022 327
$X_2 X_3$	1	99.99	99.99	10.642 77	0.022 388
$X_1^2$	1	451.037 2	451.0372	48.007 66	0.000 961
$X_2^2$	1	181.371 4	181.3714	19.304 87	0.007 063
$X_3^2$	1	4 389.527	4 389.527	467.214	0.000 1
残差 Error	5	46.975 55	9.395 11		
失拟性 Lack of fit	3	26.513 76	8.837 92	0.863 846	0.575 967
纯误差 Pure error	2	0.461 79	10.230 89		
总差 Total	14	6 603.143			

从表 3 可以看出,回归模型是显著的( $P < 0.0001$ ),该模型的决定系数为  $X_2$ (培养时间)、 $X_3$ (培养温度)、 $X_1$ (接种量)、 $X_1 X_3$ (接种量与培养温度的交互作用)、 $X_2 X_3$ (培养时间与培养温度的交互作用)、 $X_1 X_2$ (接种量与培养时间的交互作用) 它们的  $Prob > F$  值分别为 0.000366、0.000541、0.002219、0.022327、0.022388、0.032774 对游离氨基酸总量的影响显著,说明该模型的拟合度较好。从表 3 中还可以看出,影响游离氨基酸含量的各因素按影响大小排序依次为  $X_2$ (培养时间)、 $X_3$ (培养温度)、 $X_1$ (接种量)。

由图 2 可得出  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  存在极值点,  $Y_1$  的最大估计值为 280.56 mg/100 g,对应的因素为接种量 10.53%、培养温度 29.34 °C、培养时间为 6.68 d。

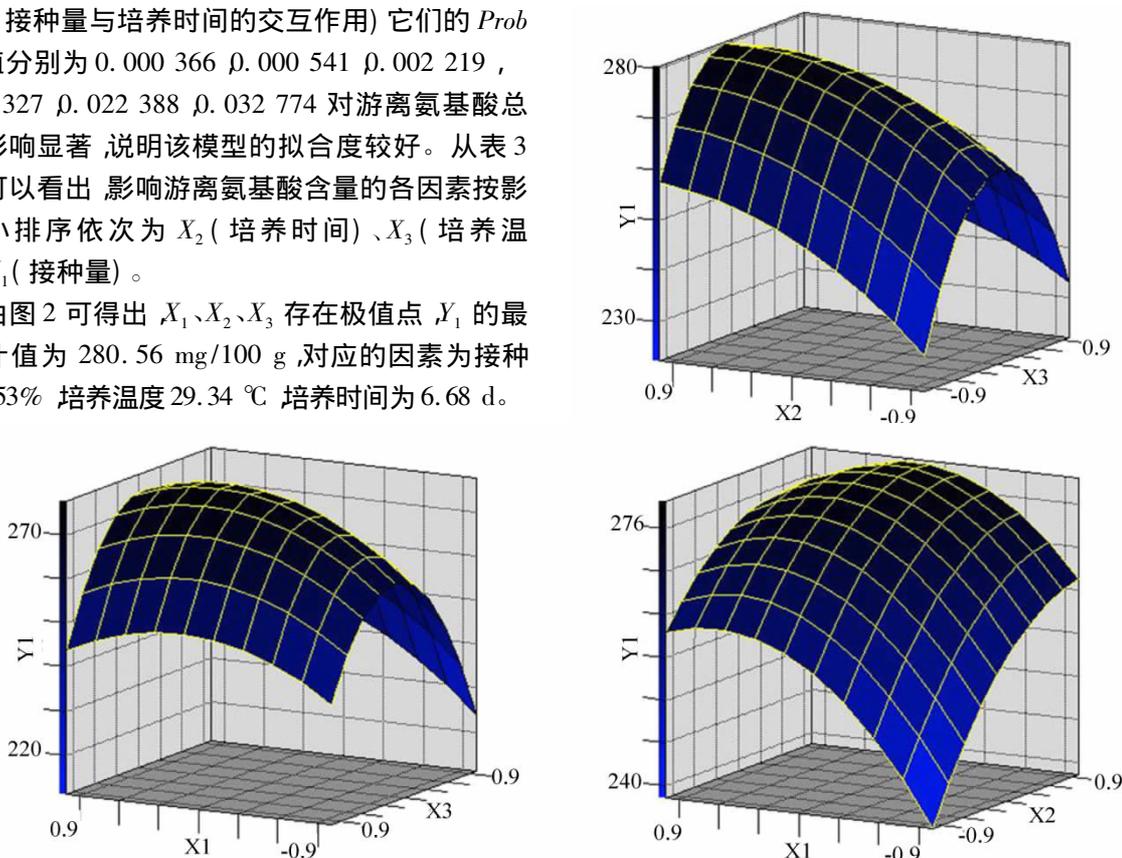


图 2 接种量、培养时间、培养温度对氨基酸含量影响的响应面图

Fig. 2 Surface layer of the effects of inoculation amount, culture time, culture temperature on amino acid content

2.2.4 验证试验 采用优化所得 5 个试验组合进行灵芝对大豆固体发酵试验,所得游离氨基酸的含量分别为: 279.36 mg/100 g、278.96 mg/100 g、280.01 mg/100 g、278.98 mg/100 g、278.44 mg/100 g,平均含量为 279.15 mg/100 g。初步探索到利用响应面法对富硒灵芝对大豆固态发酵培养优化条件: 大豆固体培养基接种灵芝富集液体种子液,接种量 10.53%、发酵温度 29.34 °C,发酵时间 6.68 d 后,发酵大豆中的游离氨基酸可达 280.56 mg/100 g,与优化前的游离氨基酸含量 169.55 mg/100 g<sup>[7]</sup>,相比提高了 64.64%。

### 2.3 有机硒含量测定结果

由图 3 结果表明,灵芝固态发酵物的有机硒含量为 0.036%,而大豆粉中的有机硒含量为 0.017%,优化后有机硒的含量提高了 1.1 倍。

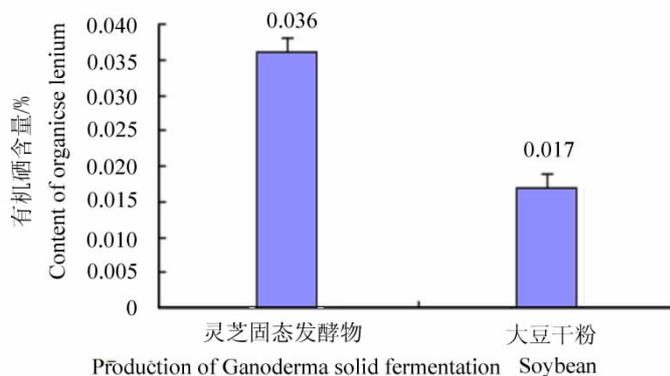


图 3 灵芝固态发酵菌丝体与大豆的常规有机硒的含量的比较

Fig. 3 Comparison of solid fermentation of *Ganoderma* mycelium and soybean conventional organic selenium content

## 3 小结与讨论

大豆固体培养基接种富硒灵芝种子液,分别在不同温度、不同接种量和不同培养时间进行固体发酵培养的单因素试验中,分别获得较佳培养温度为 30 °C、接种量 10%、大豆发酵培养 6 d 后,大豆发酵物中的游离氨基酸含量可达 220 mg/100g 以上。在单因素试验结果的基础上,采用响应面中心组合设计试验,进一步探索到利用响应面法对富硒

灵芝大豆固态发酵培养较优组合条件:大豆固体培养基接种灵芝富集液体种子液,接种量 10.53%、发酵温度 29.34 ℃,发酵时间 6.68 d 后,发酵大豆中的游离氨基酸可达 280.56 mg/100 g,与优化前的游离氨基酸含量 169.55 mg/100 g 相比提高了 64.64%;发酵大豆中有机硒的含量可达 0.036%,与优化前相比提高了 1.1 倍。

#### 参考文献:

- [1]牛丽颖,石玉娥,刘振国,等.人工富硒灵芝菌丝中微量元素及氨基酸含量分析[J].中国食用菌,1998,17(6):31-32.
- [2]杨洋,吴小勇,张湛,等.富硒灵芝发酵培养工艺及产物抗氧化能力研究[J].现代食品科技,2010,26(12):1349-1353.
- [3]John Weldon Finley. Increased intakes of selenium - enriched foods may benefit human health[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(10): 1620-1629.
- [4]李丽辉,林亲录,陈海军.硒的生理学功能及富硒强化食品的研究进展[J].现代食品科技,2005,21(3):198-200.
- [5]Conor Reilly. Selenium: a new entrant into the functional food arena[J]. Trend in Food Science & Technology, 1998(9): 114-118.
- [6]沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:215.
- [7]魏赛金,付学琴,李昆太,等.灵芝菌丝体大豆固态发酵条件优化[J].广东农业科学,2009(10):122-124.
- [8]胡志斌,甘泉,魏赛金.灵芝液体发酵富集硒元素研究[J].中国酿造,2010,217(4):36-38.
- [9]魏赛金,程新,涂国全,等.灵芝发酵液发酵生产灵芝多糖醇工艺的初探[J].江西农业大学学报,2009,31(4):746-749.
- [10]朱强,夏艳秋,汪志君,等.响应面法优化灵芝药性固体发酵培养基[J].中国生物工程杂志,2010,30(9):75-79.
- [11]Bezerra M A, Santelli R E, Escalera L A, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008(76):965-977.
- [12]魏赛金,付学琴,涂国全,等.固态发酵产游离氨基酸的条件优化研究[J].安徽农业科学,2007,35(32):10202-10203.
- [13]宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:155-175.

(上接第 1042 页)

#### 参考文献:

- [1]郭忠军.桑黄液体发酵培养液初步研究[J].黑龙江医药,2005,18(3):198-199.
- [2]刘正南,郑淑芬.中国药用真菌的现状和种植资源[J].中国食用菌,1996,17(6):22-24.
- [3]傅海庆,陈绍军,陈汉清,等.桑黄口服液对小鼠免疫功能的影响[J].福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(5):538-541.
- [4]宋力,孔培龙,郭彬彬,等.桑黄的研究进展[J].中国食用菌,2005(3):24.
- [5]李翠翠,尉玉晓,郭立忠.桑黄液体发酵培养基优化的初步研究[J].中国食用菌,2009,28(2):46-48.
- [6]傅海庆.桑黄多糖的研究进展[J].包装与食品机械,2008,26(5):32-36.
- [7]秦俊哲,姚艳芳.桑黄菌丝的最适培养条件研究[J].食用菌,2007,29(1):6-9.
- [8]胡文彬,马海乐,周存山.桑黄菌液体发酵培养基及发酵条件研究[J].中国食用菌,2006(3):49-51.
- [9]李朔,丁一新,徐霖.桑黄胞内多糖液体发酵培养基的优化[J].食品科学,2006(11):236-240.
- [10]戴玉成.药用担子菌:鲍氏层孔菌(桑黄)的新认识[J].中草药,2003,34(1):94-95.
- [11]刘春辉,陈体强,林跃鑫.药用真菌桑黄的研究进展[J].菌物研究,2004,2(2):53-59.
- [12]莫顺燕,杨永春,石建功.桑黄化学成分研究[J].中草药,2004,35(10):1095-1097.
- [13]莫顺燕,杨永春,石建功.桑黄化学成分研究[J].中草药,2003,28(4):339-341.
- [14]吕英华,王建芳,李玉平等.药用真菌桑黄的研究进展[J].蚕业科学,2009,35(1):204-210.
- [15]齐欣,张峻,陈颖.珍稀真菌桑黄的研究进展[J].食品研究与开发,2009,30(5):172-174.