

引用格式:

李双祁, 刘国峰, 王亚惠, 赵肃清. 灵芝发酵工艺条件优化及美白因子探析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(6): 655–662.

LI S Q, LIU G F, WANG Y H, ZHAO S Q. Optimization of *Ganoderma lucidum* fermentation process and determination of key whitening factors[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(6): 655–662.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



灵芝发酵工艺条件优化及美白因子探析

李双祁^{1,2}, 刘国峰², 王亚惠³, 赵肃清^{1*}

(1.广东工业大学生物医药学院, 广东 广州 510006; 2.湖南菲勒生物技术有限公司, 湖南 长沙 410205; 3.中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205)

摘 要: 采用菌丝体液体深层发酵技术, 以菌丝生长和酪氨酸酶抑制率为主要测定指标, 对灵芝发酵培养基成分和发酵条件进行优化, 并利用质谱分析技术对发酵液进行代谢组学分析, 以确定发酵液中关键美白因子。结果表明: 最佳培养条件为麦芽浸粉 2 g/mL, 蔗糖 1.72 g/mL, 豆粕粉 0.214 g/mL, 酵母提取物 0.1 g/mL, pH5, 温度 30 ℃, 培养时间 6 d, 转速 160 r/min; 在此条件下, 发酵液酪氨酸酶抑制率为 95.1%, 表明其具有良好的美白功效。通过代谢组学技术, 鉴定出包括多糖、三萜、核苷酸和氨基酸等在内的 212 种成分, 其中, 多糖和三萜的种类最多, 分别为 26、30 种; 基于代谢组数据, 进一步对发酵液中灵芝多糖和三萜进行分离及含量的测定, 发酵液中灵芝多糖含量为 24.8 mg/mL, 三萜含量为 55.7 μg/mL; 对发酵液中多糖、三萜含量与酪氨酸酶抑制活性进行相关性分析, 结果表明三萜含量与酪氨酸酶抑制活性呈正相关, 而多糖含量与酪氨酸酶抑制活性无明显的相关性, 表明发酵液中的主要美白因子为灵芝三萜。

关 键 词: 灵芝; 发酵; 酪氨酸酶抑制率; 美白; 工艺优化

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)06-0655-08

Optimization of *Ganoderma lucidum* fermentation process and determination of key whitening factors

LI Shuangqi^{1,2}, LIU Guofeng², WANG Yahui³, ZHAO Suqing^{1*}

(1. School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. Fine(Hunan) Biotechnology Co., Ltd, Changsha, Hunnan 410205, China; 3. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunnan 410205, China)

Abstract: Using submerged fermentation of the mycelium of *Ganoderma lucidum*, the medium composition and fermentation conditions were optimized based on the growth of mycelia and the inhibition ratio of tyrosinase. Meanwhile, metabolomics analysis of the fermentation broth by mass spectrometry was performed to determine the key whitening factors in the fermentation broth. The results showed that optimum culture conditions were: malt extract 2 g/mL, sucrose 1.72 g/mL, soybean meal powder 0.214 g/mL, yeast extract 0.1 g/mL, pH5, temperature 30 ℃, cultured at 6 d, 160 r/min. Under this condition, the inhibition rate of tyrosinase was reached 95.1%, indicating its optimal whitening effect. 212 metabolites including polysaccharides, triterpenes, nucleotides and amino acids were identified. Among them, polysaccharides and triterpenes were the major components with 26 and 30 species respectively. The content of *G. lucidum* polysaccharide in the fermentation broth was 24.8 mg/mL, and the content of triterpene was 55.7 μg/mL. Based

收稿日期: 2020-10-22

修回日期: 2020-12-22

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2019-IBFC)

作者简介: 李双祁(1977—), 男, 湖南长沙人, 博士研究生, 主要从事益生菌的功能评价及产业化研究, 374329801@qq.com; *通信作者, 赵肃清, 博士, 教授, 主要从事应用化学、生物制药及天然产物等研究, sqzhao@gdut.edu.cn

on metabolomic data, the polysaccharides and triterpenes in fermentation broth were isolated and determined. The correlation between the content of polysaccharides and triterpenes in fermentation broth and the inhibitory activity of tyrosinase was analyzed in this study. The results showed that the triterpenoid content and tyrosinase inhibitory activity were positively correlated, but the content of polysaccharide was no obvious correlation and inhibit tyrosinase activity, suggesting that the main whitening factor in the fermented broth were triterpenes.

Keywords: *Ganoderma lucidum*; fermentation; inhibition rate of tyrosinase; whitening; process optimization

灵芝(*Ganoderma lucidum*)又称“瑞芝”“仙草”，是一种珍稀食药两用真菌，具有修复受损细胞、促进角质层更新、淡斑、美白、抗衰老、提高免疫力等功效^[1]。灵芝含有多糖类、三萜类、氨基酸、多肽类、凝集素、甾醇类、生物碱、酶类、矿物元素等多种活性成分，其中，发挥生物活性的主要成分是灵芝多糖和三萜类化合物^[1-6]。在中国灵芝用于中草药护肤品和滋补品已有 2000 多年的历史^[7]。灵芝在化妆品中的应用形式主要是子实体水提物和醇提物，其主要应用于抗衰老领域，但对其美白、抗炎、抗过敏、防辐射、抗菌、防冻等功效的研究较少^[8]。

目前，化妆品中的美白功效成分主要有熊果苷、曲酸、烟酰胺、维生素 C 及其衍生物等^[9]，但这些原料存在稳定性差、易过敏、生产成本高等问题^[10]。随着人们生活水平的不断提高，消费者对日化产品温和性的要求也不断提高，化妆品原料天然化成为了发展趋势^[11]。灵芝作为中国的十大“仙草”之一，其美白功效越来越受到关注。有研究^[8]报道，以灵芝子实体为培养基，以酵母菌和乳酸菌为发酵菌种，灵芝发酵液对酪氨酸酶活性抑制率高达 73.22%。由于灵芝的野生资源日渐稀缺，子实体人工栽培周期长，价格因素影响了灵芝相关产品的大规模推广；因此，基于液体深层发酵法生产灵芝相关活性物质已成为研究热点。

前期研究中，张周美等^[12]利用菌丝体深层发酵技术获得了灵芝发酵液，经检测，证实其具有良好的美白效果。本研究中，以评价美白功效的酪氨酸酶抑制率为主要检测指标，探究灵芝液体深层发酵技术的最优生产工艺，通过基于质谱的代谢组学技术对发酵液中的主要成分进行分析，明确发酵液中的主要活性成分与美白功能之间的关系，旨在探讨灵芝发酵液是否能作为低成本、纯天然功效原料来替代传统的灵芝子实体发酵液或提取液在化妆品

中进行应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

供试菌株 A-1916 由江苏高邮市科学食用菌研究所提供。

1.1.2 培养基

斜面培养基：马铃薯 20 g(去皮)，葡萄糖 2 g，琼脂 2 g，蒸馏水 1000 mL，121 ℃灭菌 20 min。

平板培养基：MEA 培养基，购自青岛日水生物技术有限公司，115 ℃灭菌 30 min。

初始发酵培养基：麦芽浸粉 2 g，葡萄糖 2 g，胰蛋白胨 0.1 g，酵母膏 0.1 g，121 ℃灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌种的培养

无菌条件下将菌株(1 cm×1 cm)转接至斜面培养基中，30 ℃避光培养 5 d 后再转接至平板培养基，30 ℃避光培养 5 d。平板种子接入灭菌后的液体培养基中，30 ℃、160 r/min 避光振荡培养 6 d，9000 r/min 离心 30 min 后收集上清液并进行代谢组分析，检测多糖和三萜含量，计算酪氨酸酶抑制率。

1.2.2 发酵培养基的优化

按表 1 分别配置 4 种培养基。100 mL 分装，无菌条件下接种 3 块菌丝块，30 ℃、160 r/min 避光

表 1 供试培养基的配方

Table 1 Different medium formulations	
培养基	配方
1	麦芽浸粉 2 g/mL, 蔗糖 1.72 g/mL, 豆粕粉 0.214 g/mL, 酵母提取物 0.1 g/mL
2	玉米粉 2 g/mL, 葡萄糖 2.2 g/mL, 麦麸粉 1 g/mL, 豆饼粉 1.8 g/mL
3	玉米粉 2 g/mL, 葡萄糖 2.2 g/mL, 豆饼粉 1.8 g/mL
4	麦麸粉 2 g/mL, 葡萄糖 2.2 g/mL, 豆饼粉 1.8 g/mL

振荡培养 4 d, 过滤。分别测定发酵液酪氨酸酶的抑制率。每种培养基重复 3 次。

1.2.3 生长条件的优化

以 1.2.2 优化后的培养基为液体发酵培养基, 进行单因素试验, 分别设置不同培养天数、温度梯度和 pH 梯度, 于 160 r/min 摇床避光振荡培养, 离心, 过滤, 测定发酵液酪氨酸酶的抑制率。

1.2.4 发酵液代谢组学的分析

1 mL 发酵液中加入甲醇配置的内标(含 L-2-氯苯丙氨酸(0.3 mg/mL)、C-17(0.01 mg/mL))20 μ L, 冻干; 用 300 μ L 的甲醇和乙腈混合溶液(甲醇与乙腈的体积比为 2 : 1)复溶, 涡旋 30 s, 在冰水浴中超声提取 5 min; 低温离心 10 min(13 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C), 用注射器吸取 200 μ L 的上清液, 用 0.22 μ m 的有机相针式过滤器过滤后转移至 LC 进样小瓶, -80 $^{\circ}$ C 下保存, 用于 LC-MS 分析。

采用 Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪进行处理。色谱条件如下: 色谱柱, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温, 45 $^{\circ}$ C; 流动相, A 相, 水(含 0.1%甲酸), B 相, 乙腈(含 0.1%甲酸); 流速, 0.4 mL/min; 进样体积, 2 μ L。采用正负离子扫描模式分别采集样品质谱信号。每 10 个分析样本中插入 1 个质控样本, 以考察整个分析过程的重复性。获得原始数据后对数据进行生物信息分析, 对所有样本的总离子流图进行可视化检查。在模式识别之前进行数据预处理。原始数据经代谢组学处理软件 *progenesis Q1* 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化后得到具有保留时间、质荷比和峰强度的代谢物鉴定数据矩阵。

1.2.5 酪氨酸酶抑制率测定方法

参照田春龙^[13]的方法, 按表 2 配置 4 组溶液。加入 PBS(0.2 mol/L、pH 6.8)、酪氨酸酶(200 U/mL)、样液后混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 10 min 后分别加入 1 mL 的 L-酪氨酸(0.15 mmol/L), 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 10 min, 最后在冰水中迅速冷却, 使用多功能酶标仪测定 475 nm 下 4 组样品的吸光值。按公式(1) 计算酪氨酸酶活性抑制率。

$$K=[1-(K_4-K_3)/(K_2-K_1)]\times 100\%$$

(1)

式中: K 为酪氨酸酶活性抑制率; K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 溶液在 475 nm 处的吸光度。

表 2 酪氨酸酶活性抑制试验体系
Table 2 Experimental system of tyrosinase inhibition

反应液	体积/mL			
	A_1	A_2	A_3	A_4
PBS	3	2	2	1
酪氨酸酶	0	1	0	1
样液	0	0	1	1
L-酪氨酸	1	1	1	1

1.2.6 胞外多糖和三萜的提取与测定

胞外多糖通过 3 倍体积的 95%乙醇进行醇析提取; 采用苯酚硫酸法测定发酵液中多糖的含量; 参照文献[14]提取灵芝三萜; 采用香草醛-高氯酸显色法测定样品的三萜含量^[15]。

1.3 数据处理

运用 Excel 2013 进行数据整理、方差分析和相关性分析; 采用 SPSS 对不同处理条件下酪氨酸酶抑制率差异显著性进行统计分析; 采用 GraphPad Prism 9 绘图。

2 结果与分析

2.1 灵芝液体深层发酵培养基及培养条件的优化

从图 1-A 可以看出, 麦芽浸粉培养基 1 的发酵效果最佳, 酪氨酸酶抑制率达 83.54%, 显著高于其他 3 种培养基的抑制率($P<0.05$)。采用优化好的培养基 1 进行后续试验, 结果 (图 1-B)表明, 随着培养时间的延长, 灵芝发酵液酪氨酸酶抑制率逐渐升高, 在第 6 天达到最高值(90%)。从图 1-C 可以看出, 灵芝发酵液酪氨酸酶抑制率与温度相关, 在 15~30 $^{\circ}$ C, 随着温度的升高, 发酵液酪氨酸酶抑制率逐渐升高; 在 30 $^{\circ}$ C 时, 酪氨酸酶抑制率最高, 达 94.21%; >30~35 $^{\circ}$ C, 随着温度的进一步升高, 发酵液酪氨酸酶抑制率逐渐降低。此外, 灵芝发酵液的酪氨酸酶抑制能力受初始 pH 的影响较大, 在适宜菌丝生长的范围(pH 3~7)内, 其发酵液的酪氨酸酶抑制率相对较高; 在 pH 值为 5 时, 酪氨酸酶抑制率达最大值(95.1%)。

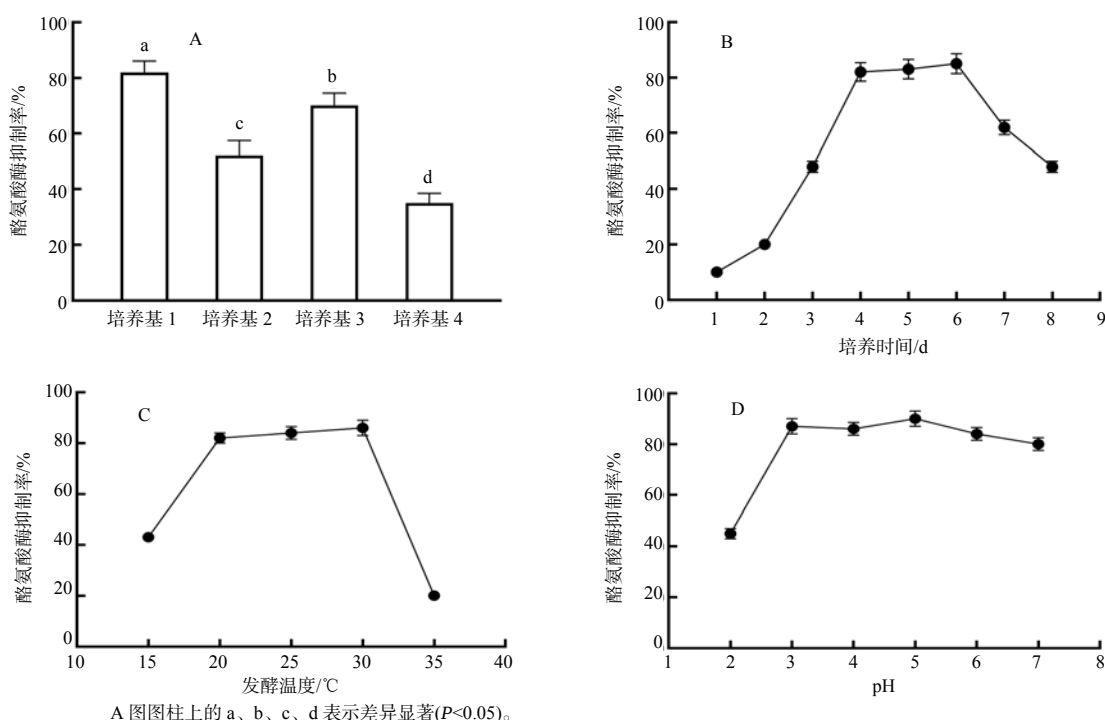


图 1 不同培养基配方、发酵时间、发酵温度以及发酵液初始 pH 下灵芝发酵液的酪氨酸酶抑制率

Fig.1 Tyrosinase inhibition rate of *G.lucidum* fermentation broth under different medium formula, fermentation time, fermentation temperature and initial pH

2.2 灵芝发酵液代谢组学分析

采用 LC-ESI-Q-TOF 非靶向代谢组学方法对发酵液中主要活性成分进行分析。通过数据库搜索，共鉴定出 212 种有功能注释的活性成分。对这

些活性成分进行功能分类，发现灵芝三萜种类有 30 种(表 3)，灵芝多糖种类有 26 种(表 4)，核苷酸有 12 种，氨基酸有 13 种，其余的为其他活性成分。

表 3 灵芝发酵液中鉴定的 30 种三萜的基本性质

Table 3 Basic properties of 30 triterpenes identified in *G.lucidum* fermentation broth

质荷比	保留时间/min	离子模式	代谢物	加成物	分子式
537.285	5.61	正	Ganoderenic acid A	M+Na	C ₃₀ H ₄₂ O ₇
495.275	5.04	负	Ganoderenic acid B	M-H ₂ O-H	C ₃₀ H ₄₂ O ₇
511.270	5.06	负	Ganoderenic acid D	M-H, M+FA-H, M-H ₂ O-H	C ₃₀ H ₄₀ O ₇
509.254	4.92	负	Ganoderenic acid E	M-H ₂ O-H	C ₃₀ H ₄₀ O ₈
561.307	5.12	负	Ganoderic acid A	M+FA-H	C ₃₀ H ₄₄ O ₇
483.309	12.55	正	Ganoderic acid beta	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₄ O ₆
501.320	4.92	正	Ganoderic acid C2	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₆ O ₇
451.321	7.19	正	Ganoderic acid DM	M+H-H ₂ O, M+Na	C ₃₀ H ₄₄ O ₄
499.305	4.94	正	Ganoderic acid epsilon	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₄ O ₇
569.276	4.83	负	Ganoderic acid F	M-H	C ₃₂ H ₄₂ O ₉
515.300	4.89	正	Ganoderic acid G	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₄ O ₈
571.291	4.84	负	Ganoderic acid H	M-H, M+FA-H	C ₃₂ H ₄₄ O ₉
513.284	4.72	负	Ganoderic acid I	M-H ₂ O-H	C ₃₀ H ₄₄ O ₈
515.299	4.76	负	Ganoderic acid L	M-H ₂ O-H	C ₃₀ H ₄₆ O ₈
495.347	7.31	正	Ganoderic acid Mf	M+H-H ₂ O	C ₃₂ H ₄₈ O ₅
603.389	9.68	正	Ganoderic acid Mg	M+H	C ₃₅ H ₅₄ O ₈
501.391	11.14	正	Ganoderiol C	M+H-H ₂ O	C ₃₂ H ₅₄ O ₅
491.374	5.02	正	Ganoderiol H	M+H-H ₂ O, M+H	C ₃₀ H ₅₀ O ₅

表 3(续)

质荷比	保留时间/min	离子模式	代谢物	加成物	分子式
431.292	8.89	正	Ganodosterone	M+Na	C ₂₈ H ₄₀ O ₂
485.326	5.79	正	Ganolucidic acid B	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₆ O ₆
467.316	6.08	正	Ganolucidic acid E	M+H-H ₂ O	C ₃₀ H ₄₄ O ₅
473.258	4.92	负	Lucidenic acid B	M-H ₂ O-H, M-H	C ₂₇ H ₃₈ O ₇
453.227	5.12	正	Lucidenic acid D1	M+H-H ₂ O	C ₂₇ H ₃₄ O ₇
559.256	4.41	负	Lucidenic acid D2	M+FA-H	C ₂₉ H ₃₈ O ₈
497.252	4.64	负	Lucidenic acid E2	M-H ₂ O-H, M-H	C ₂₉ H ₄₀ O ₈
475.272	4.93	负	Lucidenic acid G	M-H	C ₂₇ H ₄₀ O ₇
471.240	4.84	负	Lucidenic acid J	M-H ₂ O-H	C ₂₇ H ₃₈ O ₈
453.227	3.33	负	Lucidenic acid K	M-H ₂ O-H	C ₂₇ H ₃₆ O ₇
443.281	5.81	负	Lucidenic acid M	M-H ₂ O-H, M-H	C ₂₇ H ₄₂ O ₆
443.279	7.12	正	Lucidenic acid N	M+H-H ₂ O	C ₂₇ H ₄₀ O ₆

表 4 灵芝发酵液中鉴定出的多糖的基本性质

Table 4 Basic properties of polysaccharides identified in *G. lucidum* fermentation broth

质荷比	保留时间/min	离子模式	代谢物	加成物	分子式
291.087	4.062 33	负	(E)-1-O-Cinnamoyl-beta-D-glucose	M-H ₂ O-H, M-H	C ₅₅ H ₅₈ O ₇
412.180	6.691 15	正	1-(3-Methyl-2-butenoyl)-6-apiosylglucose	M+NH ₄	C ₅₆ H ₂₆ O ₅₅
377.144	4.183 23	负	1-(3-Methylbutanoyl)-6-apiosylglucose	M-H ₂ O-H	C ₅₆ H ₂₈ O ₅₅
309.166	0.534 98	正	1-[(5-Amino-5-carboxypentyl)amino]-1-deoxyfructose	M+H	C ₅₂ H ₂₄ N ₂ O ₇
845.110	8.445 67	正	1-O-Caffeoyl-(b-D-glucose 6-O-sulfate)	2M+H	C ₅₅ H ₅₈ O ₅₂ S
441.139	4.069 97	负	1-O-E-Cinnamoyl-(6-arabinosylglucose)	M-H	C ₂₀ H ₂₆ O ₅₅
429.046	1.345 10	正	1-O-p-Coumaroyl-(b-D-glucose 6-O-sulfate)	M+Na	C ₅₅ H ₅₈ O ₅₅ S
371.098	3.794 90	负	2,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-D-glucose	M-H ₂ O-H	C ₅₆ H ₂₂ O ₅₅
327.128	4.737 73	正	2-O-a-L-Fucopyranosyl-galactose	M+H	C ₅₂ H ₂₂ O ₅₀
357.168	3.524 25	正	2-O-Methyl-L-fucose	M+NH ₄ , 2M+H	C ₇ H ₅₄ O ₅
325.076	0.576 88	负	3-O-alpha-D-Glucopyranuronosyl-D-xylose	M-H	C ₅₅ H ₅₈ O ₅₅
321.082	1.432 43	负	4-O-beta-D-Glucopyranuronosyl-L-fucose	M-H ₂ O-H	C ₅₂ H ₂₀ O ₅₅
457.172	3.436 15	正	6-Feruloylglucose	M+H-H ₂ O	C ₂₅ H ₃₀ O ₅₂
459.169	3.637 82	正	2,3,4-trihydroxy-3-methylbutylglycoside	M+H	C ₅₇ H ₃₀ O ₅₄
506.295	3.824 77	正	a-L-Fucopyranosyl-(1->2)-b-D-galactopyranosyl-(1->2)-D-xylose	M+NH ₄	C ₂₄ H ₄₀ O ₅₀
517.178	2.146 40	负	alpha-Ionol O-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]	M+FA-H	C ₅₈ H ₃₂ O ₅₄
504.194	0.579 02	正	alpha-L-Rhamnopyranosyl-(1->3)-alpha-D-galactopyranosyl-(1->3)-L-fucose	M+H-H ₂ O, M+H	C ₅₈ H ₃₃ NO ₅₅
248.114	0.626 50	正	beta-D-Galactopyranosyl-(1->4)-2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl-(1->6)-D-mannose	M+H-H ₂ O, M+H	C ₅₀ H ₅₉ NO ₇
179.055	0.631 15	负	D-1-[(3-Carboxypropyl)amino]-1-deoxyfructose	M-H ₂ O-H, M-H	C ₆ H ₅₂ O ₆
131.035	2.237 85	负	D-Glucose	M-H ₂ O-H	C ₅ H ₃₀ O ₅
357.103	0.615 92	负	D-Xylose	M+FA-H	C ₅₅ H ₂₀ O ₅₀
259.021	0.593 05	负	Galactose-beta-1,4-xylose	M-H ₂ O-H, M-H	C ₆ H ₅₃ O ₉ P
510.182	3.978 37	负	Mannose 6-phosphate	M-H ₂ O-H	C ₂₀ H ₃₅ NO ₅₅
729.258	3.498 25	负	O-6-deoxy-a-L-galactopyranosyl-(1->2)-O-b-D-galactopyranosyl-(1->3)-2-(acetylamino)-2-deoxy-D-Galactose	M-H ₂ O-H	C ₂₈ H ₄₈ N ₂ O ₂₅
259.021	0.593 05	负	O-b-D-Gal-(1->3)-O-[O-b-D-Gal-(1->4)-2-(acetylamino)-2-deoxy-b-D-Glc-(1->6)]-2-(acetylamino)-2-deoxy-D-Galactose	M-H ₂ O-H, M-H	C ₆ H ₅₃ O ₉ P
683.225	0.631 15	负	Mannose 6-phosphate	M+FA-H, 2M-H, M-H	C ₅₂ H ₂₂ O ₅₅
		负	Maltose		

2.3 灵芝三萜、多糖含量与灵芝发酵液酪氨酸酶抑制作用的相关性分析

对发酵液中灵芝多糖和三萜含量及酪氨酸酶抑制率进行测定。结果表明,发酵液中灵芝多糖含量为 24.8 mg/g,三萜含量为 55.7 $\mu\text{g/mL}$,多糖和三萜提取率分别为 74.5%和 75.9%。发酵液原液酪氨酸酶抑制率为 95.1%;三萜类提取物的酪氨酸酶抑制率为 69.87%,多糖提取物的酪氨酸酶抑制率为 26.74%。说明发酵液中具有美白活性的成分主要为灵芝三萜。

对发酵液中灵芝多糖和三萜含量与酪氨酸酶抑制率的相关性进行分析,结果(图 2)表明,灵芝三萜对酪氨酸酶抑制率影响显著,灵芝三萜含量与酪氨酸酶抑制率呈线性相关,其相关系数 $R^2=0.983\ 7$,而多糖含量与酪氨酸酶抑制率之间没有明显的相关性。说明通过本工艺生产的灵芝菌丝体深层发酵液中的主要美白功能性物质为三萜类化合物。

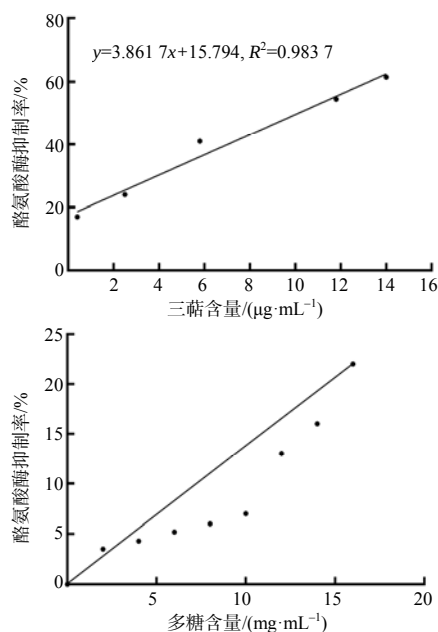


图 2 发酵液中灵芝三萜含量、多糖含量与酪氨酸酶抑制率的相关性

Fig.2 Correlation analysis between *G. lucidum* triterpene and polysaccharide content and tyrosinase inhibition rate in fermentation broth

3 结论和讨论

本研究结果表明,具有美白活性的灵芝发酵液最佳培养条件为:麦芽浸粉 2 g/mL,蔗糖 1.72 g/mL,豆粕粉 0.214 g/mL,酵母提取物 0.1 mg/mL, pH 5,

温度 30 $^{\circ}\text{C}$,培养时间 6 d,转速 160 r/min。在此条件下,发酵液酪氨酸酶抑制率为 95.1%。通过代谢组学技术鉴定出包括多糖、三萜、核苷酸和氨基酸等在内的 212 种成分,其中,多糖和三萜的种类最多,分别鉴定出 26 种和 30 种。发酵液三萜含量与酪氨酸酶抑制活性呈正相关,而多糖含量与酪氨酸酶抑制活性无明显的相关性,表明发酵液中的主要美白因子为灵芝三萜。

现市面上常见的化妆品美白功能性原料可分为化学合成类和天然类。合成类美白剂能快速美白,但其自身所存在的安全性问题使其在化妆品中的使用受到极大限制^[16]。由此,从天然产物中寻找安全高效的美白活性物质已成为化妆品行业研究的热点,已经成为美白化妆品的发展方向^[17]。目前美白功效明确且应用最多的天然产物来源包括人参、甘草、葛根、当归、川芎、灵芝等^[18-20]。近年来,对以灵芝为基础的化妆品原料研究和应用相对较多。研究^[21]发现灵芝菌中含有 1 种黑色素降解酶,可以对合成的黑色素进行降解。然而,灵芝生长需要数月乃至一年时间,同时病虫害、栽培水平也大大制约着灵芝子实体的生产水平^[22]。目前,灵芝深层发酵的研究主要集中在提高灵芝多糖、三萜产量及发酵液抗氧化特性方面,而对于其发酵液美白功效的研究却相对较少。

目前从灵芝孢子粉和子实体分离得到的三萜类化合物有上百种^[23],但对菌丝体的三萜种类及其具有美白功能的关键成分研究相对较少。研究^[24]结果表明,灵芝萜酮二醇可抑制黑色素的合成。但是灵芝发酵液中三萜类美白功能性成分尚少见报道。本研究中,通过代谢组学技术鉴定了包括多糖、三萜、核苷酸和氨基酸等在内的 212 种成分。其中,多糖和三萜的种类最多,进一步证实了三萜类物质为灵芝发酵液的主要美白成分。由于三萜类有 30 种,每种三萜的美白效果如何有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘太锋. 灵芝的现代研究概述[J]. 产业与科技论坛, 2012, 11(18): 60-62.
LIU T F. Summary of modern research on *Ganoderma lucidum*[J]. Industry and Technology Forum, 2012, 11(18): 60-62.
- [2] 陈建飞,周爱珠,程萱,等. 赤芝、紫芝和鹿角灵芝醇提物的活性成分及生物活性研究[J]. 食药菌,

- 2019, 27(4): 264–267.
- CHEN J F, ZHOU A Z, CHENG X, et al. Study on active ingredients and biological activities of alcohol extract of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma sinense* and *Ganoderma balabacense*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2019, 27(4): 264–267.
- [3] HUH S, LEE S, CHOI S J, et al. Quercetin synergistically inhibit EBV-associated gastric carcinoma with *Ganoderma lucidum* extracts[J]. Molecules, 2019, 24(21): 3834.
- [4] 杜巍, 李元瑞, 袁静. 食药菌多糖生物活性与结构的关系[J]. 食用菌, 2001, 23(2): 3–5.
- DU W, LI Y R, YUAN J. The Relation to polysaccharide active and structure of edible and pharmaceutical fungi [J]. Edible Fungi, 2001, 23(2): 3–5.
- [5] 郑丹. 灵芝多糖和灵芝几丁质的分离提取及理化性质的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- ZHENG D. Physicochemical property and extraction studies of the polysaccharide and chitin from *Ganoderma lucidum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009.
- [6] 孙颀. 灵芝中肽类化合物及生物活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.
- SUN J. Study on peptide compounds and biological activity of *Ganoderma lucidum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2001.
- [7] 崔晓莹. 灵芝中的三萜类化合物(灵芝酸)的提取条件优化及其结构分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2007.
- CUI X Y. Optimization of extraction conditions and structural analysis of triterpenoids (ganoderic acid) in *Ganoderma lucidum*[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2007.
- [8] 许文江, 林耀辉, 刘新民, 等. 灵芝发酵液的营养保健成分及其在化妆品中的应用[J]. 亚热带植物科学(原亚热带植物通讯), 1993, 22(2): 51–54.
- XU W J, LIN Y H, LIU X M, et al. Nutritional and health-care components of *Ganoderma lucidum* fermented liquid and its application in cosmetics[J]. Subtropical Plant Science(Subtrop. Plant Res. Commun), 1993, 22(2): 51–54.
- [9] 张凤兰, 苏哲, 吴景, 等. β -熊果苷和氢醌安全性评价及化妆品法规管理现状[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(11): 1017–1021.
- ZHANG F L, SU Z, WU J, et al. Safety evaluation of β -Arbutin and hydroquinone and current status of cosmetic regulation management[J]. Journal of Environment and Health, 2017, 34(11): 1017–1021.
- [10] LEONA. 化妆品美白成分及其功效评价—美白与美白成分解析[J]. 中国化妆品, 2019(10): 88–95.
- LEONA. Cosmetic whitening ingredients and evaluation of their efficacy-analysis of whitening and whitening ingredients[J]. Chinese cosmetics, 2019(10): 88–95.
- [11] 王倩, 张佳婵, 王昌涛, 等. 灵芝美容护肤作用机制及其在化妆品行业中的发展现状[J]. 日用化学工业, 2019, 49(2): 118–125.
- WANG Q, ZHANG J C, WANG C T, et al. The mechanism of *Ganoderma lucidum* beauty and skin care and its development status in the cosmetics industry[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2019, 49(2): 118–125.
- [12] 张周美, 谢纯良, 颜少慰, 等. 不同菌株灵芝发酵液抗氧化和美白活性差异比较分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(8): 43–48.
- ZHANG Z M, XIE C L, YAN S W, et al. Comparative analysis on anti-oxidative and whitening activities of fermentation broth from different *Ganoderma lucidum* strains[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(8): 43–48.
- [13] 田春龙. 液态发酵法生产灵芝菌(*Ganoderma lucidum*)的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2004.
- TIAN C L. Study on the production of *Ganoderma lucidum* by liquid fermentation[D]. Nanning: Guangxi University, 2004.
- [14] 陈功明. 灵芝多糖的液体发酵、提取纯化及其硫酸化改性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- CHEN G M. Study on liquid fermentation, extraction, purification and sulfation modification of *Ganoderma Lucidum* polysaccharide[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [15] 梁峙, 嵇春华. 灵芝深层发酵液的分离纯化与应用[J]. 广州食品工业科技, 2001, 17(1): 68–71.
- LIANG Z, JI C H. Separation, purification and application of *Ganoderma lucidum* submerged fermentation broth[J]. Guangzhou Food Science and Technology, 2001, 17(1): 68–71.
- [16] 尤卓莹. “四物汤”中药美白化妆品的开发及其美白作用机制研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- YOU Z Y. Development of “Siwu Decoction” traditional Chinese medicine whitening cosmetics and research on its whitening mechanism[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2015.
- [17] HYDE K D, BAHKALI A H, MOSLEM M A. Fungi: an unusual source for cosmetics[J]. Fungal Diversity, 2010, 43(1): 1–9.
- [18] ZHANG L, DING Z Y, XU P, et al. Methyl lucidenate F isolated from the ethanol-soluble-acidic components of *Ganoderma lucidum* is a novel tyrosinase inhibitor[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(3): 457–461.
- [19] KIM J W, KIM H I, KIM J H, et al. Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Interna-

- tional Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11): 1798.
- [20] 王云霞, 张萍, 葛蓓蕾, 等. 不同生育期卷丹百合的多酚积累特性及其抗氧化活性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(5): 565–573.
WANG Y X, ZHANG P, GE P L, et al. Polyphenol accumulation characteristics and antioxidant activity of *Lilium lancifolium* at different growth stages[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(5): 565–573.
- [21] OZCARIZ-FERMOSELLE M V, FRAILE-FABERO R, GIBBÉS-JUAN T, et al. Use of lignocellulosic wastes of pecan(*Carya illinoensis*) in the cultivation of *Ganoderma lucidum*[J]. Revista Iberoamericana de Micología, 2018, 35(2): 103–109.
- [22] 刘冬, 李世敏, 许柏球, 等. 灵芝菌丝体深层液体发酵培养基研究[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(2): 15–17.
- LIU D, LI S M, XU B Q, et al. Study on submerged liquid fermentation medium of *Ganoderma lucidum* mycelium [J]. Journal of Microbiology, 2001, 21(2): 15–17.
- [23] 潘继红, 曹霞, 李峰, 等. 灵芝液体培养营养需求的探讨[J]. 食用菌学报, 1997, 4(1): 31–34.
PAN J H, CAO X, LI F, et al. Discussion on the nutritional requirements of *Ganoderma lucidum* liquid culture[J]. Acta Edulis Fungi, 1997, 4(1): 31–34.
- [24] 孙培龙, 陶文扬, 何晋浙. 灵芝中三萜类化合物的研究进展[J]. 食药菌, 2016, 24(2): 76–81.
SUN P L, TAO W Y, HE J Z. Research progress of triterpenoids in *Ganoderma lucidum*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2016, 24(2): 76–81.
- 责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正
-
- (上接第 621 页)
- [25] 曹元元, 王娟, 王建林. 玉米农田生态系统水碳通量日变化特征研究[J]. 中国农学通报, 2016, 32(9): 137–141.
CAO Y Y, WANG J, WANG J L. Diurnal change characteristics of H₂O and CO₂ flux of corn farmland ecosystem[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(9): 137–141.
- [26] 蔡旭, 张风华, 杨海昌. 新疆高产棉田生态系统 NEE 变化及其影响因素[J]. 干旱区资源与环境, 2016, 30(7): 59–64.
CAI X, ZHANG F H, YANG H C. Net ecosystem exchange changes of agricultural ecosystem and its influencing factors in Xinjiang[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2016, 30(7): 59–64.
- [27] 成小琳, 唐先亮, 魏甲彬, 等. 不同耕作模式下稻-油系统 CO₂ 和 CH₄ 净交换量动态变化研究[J]. 作物研究, 2017, 31(2): 110–114.
CHENG X L, TANG X L, WEI J B, et al. Effects of different tillage methods on CO₂ and CH₄ net exchange in rice-oilseed rape cropping system[J]. Crop Research, 2017, 31(2): 110–114.
- [28] 李琪, 胡正华, 薛红喜, 等. 淮河流域典型农田生态系统碳通量变化特征[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(12): 2545–2550.
- LI Q, HU Z H, XUE H X, et al. Variation of net ecosystem carbon flux over typical agro-ecosystem in Huaihe River Basin[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(12): 2545–2550.
- [29] 宋涛, 王跃思, 宋长春, 等. 三江平原稻田 CO₂ 通量及其环境响应特征[J]. 中国环境科学, 2006, 26(6): 657–661.
SONG T, WANG Y S, SONG C C, et al. CO₂ fluxes from rice fields of Sanjiang plain and its environmental response factors[J]. China Environmental Science, 2006, 26(6): 657–661.
- [30] 彭志芸, 丁峰, 湛洁, 等. 麦油稻轮作秸秆还田与施氮对水稻光合特性及产量的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 253–261.
PENG Z Y, DING F, SHEN J, et al. Effects of straw mulching and nitrogen management on photosynthetic characteristics and yield of direct seeding rice under wheat rape rice rotation[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(3): 253–261.
- 责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正