

珍稀药用真菌发酵调控技术研究概况与展望

姜福春^{1,2}, 冯杰¹, 杨焱^{1*}¹农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403; ² 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 珍稀药用真菌具有极高的应用和商业价值,但其生长缓慢、产量低、药用成分不稳定,使其大规模开发应用成为难题。本文综述了近几年珍稀药用真菌液体发酵动力学模型及其参数拟合优化方法,以及发酵产物合成代谢调控的研究进展,并对目前存在的问题及今后的研究方向进行了探讨。

关键词: 珍稀药用真菌; 数学模型; 动力学; 发酵代谢调控

中图分类号: Q815

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.028

Overview and Prospect of Fermentation Control of Rare and Precious Medicinal Fungus

JIANG Fu-chun^{1,2}, FENG Jie¹, YANG Yan^{1*}¹ Key Laboratory of Edible Fungus Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; ² Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Rare and precious medicinal fungi have attracted much attention to their high application and commercial values. But they grew slowly, low yield and medicinal component were instable, hence their large-scale development and application became a problem. This review summarized the progress on the studies of rare and precious medicinal fungi in recent years, including their optimization method of fermentation parameters, kinetics of fermentation and metabolic regulation. In addition, some related problems and perspectives were also discussed.

Key words: rare and precious medicinal fungi; mathematical model; kinetics of fermentation; metabolic regulation

药用真菌在我国有着悠久的历史,许多真菌不仅是餐桌上的美味佳肴,更是中草药上的珍贵良药,东汉末年《神农本草经》已经记载了十多种珍稀菌类的药用价值^[1]。如茯苓及灵芝具有抗肿瘤,调节心血管、神经系统及免疫系统等作用,冬虫夏草和赤芝具有防治软骨病的作用。药用真菌具有丰富的代谢产物,包括胞内、外多糖和萜类、虫草菌素等多种活性物质,是人们探求新型药物的重要资源。多糖是一类重要的药用真菌代谢产物,具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫和抗衰老等作用,具有较好的医学应用价值^[2]。例如,Pei等研究发现桑黄发酵菌丝体中碱性提取物多糖具有抗肿瘤活性^[3]。同时,Zhang等研究发现灵芝深层发酵胞外多糖具有抗肿瘤活

性^[4]。

药用真菌在分类上,多属于担子菌亚门和子囊菌亚门两大类^[5,6],其种类繁多,形态各异,大小不同,但一般都是由菌丝体和子实体两大部分组成。目前,常用的药用真菌有灵芝[*Ganoderma lucidum* (W. Curtis.) P. Karst.]、桑黄[*Sanghuangporus sanghuang* (Sheng H. Wu, T. Hatt. & Y. C. Dai) Sheng H. Wu, L. W. Zhou & Y. C. Dai]、蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.) Link]、云芝[*Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel.]、竹黄[*Shiraia bambusicola* P. Henn.]、密环菌[*Armillaria mellea* (Schrad. ex Fr.) Quel.]、灰树花[*Grifola frondosa* (Dick. ex Fr.) S. F. Gray]、羊肚菌[*Morehella esculenta* (L.) Pers.]、猴头菌[*Herici-um erinaceus* (Bull. ex Fr.) Pers.]、银耳[*Tremella fuciformis* Berk.]、樟芝[*Antrodia camphorata* (M. Zang & C. H. Su) Sheng H. Wu, Ryvar- den & T. T. Chang]等^[7]。药用真菌在农业、医药、食品等领域得到了广泛的科学研究。

收稿日期:2016-04-01 接受日期:2016-08-31

基金项目:国家十二五科技支撑项目(2012BAD36B05)

* 通讯作者 Tel:86-21-37196810; E-mail: yangyan@saas.sh.cn

由于药用真菌生理需求的特殊性和复杂性,生长周期很长且对外部环境有一定的要求,其野生子实体稀少,且人工栽培药用真菌技术还不成熟,尤其是樟芝局限于台湾少部分地区生长,给珍贵的自然药用真菌资源保护带来了较大的压力,严重制约了药用真菌的开发利用。利用现代液体发酵技术获取菌丝体代替子实体已成为当务之急。液体发酵培养具有菌丝体产量高、培养周期短、可控性好等优点,更易于工业化持续大量生产,具有广泛的市场前景。目前,针对灵芝、猴头菇、樟芝、桑黄、冬虫夏草和蛹虫草等药用真菌的液体发酵均有较多的研究报道^[8-14]。刘凡等以桑黄菌液体发酵获得的菌丝体及胞内总黄酮产量为指标,在单因素试验的基础上利用 Box-Behnken 设计和响应面分析法,获得有利于桑黄产胞内黄酮的液体培养基最佳配方为:葡萄糖 29.6 g/L、黄豆粉 10.2 g/L、硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2.3 g/L、酵母膏 1.1 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L,并使用该培养基,其胞内总黄酮产量可达 186.75 mg/L^[15]。Liang 等以蛹虫草胞内多糖为指标,通过响应面分析方法,优化出最优产蛹虫草胞内多糖的培养基配方为:蔗糖 17.23 g/L、蛋白胨 13.80 g/L、硫酸镁 2.54 g/L,并且该培养基培养获得包内多糖达到 0.6251 g/L,较空白提高了 6.33%^[16]。

至今,大部分珍稀药用真菌的研究热点集中于对发酵培养基的优化,活性成分的分离纯化及活性成分药理作用的探究,而对于珍稀药用真菌发酵代谢调控的探讨与发酵动力学的研究还不够深入。为此,笔者综述了近几年珍稀药用真菌液体发酵动力学以及产物合成代谢调控技术的相关研究,为进一步对珍稀药用真菌进行开发提供参考。

1 发酵动力学

发酵动力学是研究生物反应过程中菌体生长、基质消耗和产物合成的动态平衡及其内在规律的一门科学。发酵动力学的研究,有助于我们更加深入地认识和掌握发酵过程,为工业发酵的模拟、优化和控制打下良好的理论基础^[17]。

在我国,天然的药用真菌数量非常稀少,严重制约了药用真菌医用保健品的发展^[18,19]。因此,以大量易得的菌丝体形式取代子实体的研究已成为食用菌保健及入药的主流趋势,使得采用液态深层发酵技术对珍稀药用真菌进行大规模培养具有重要的意义。同时,构建液态分批发酵的非结构动力学模型

有助于清楚地掌握珍稀药用真菌液体发酵过程中营养物质的消耗与产物合成的动态过程,更好地为工业药用真菌液体发酵动态的模拟、营养物质配方的优化和产物积累提供理论基础。

1.1 药用真菌菌丝体生长模型

在菌体的生长动力学中,最常用的现象模型(经验模型)是 Monod 方程^[20]和 Logistic 方程^[21],该模型可以定量地描述发酵过程及反应的主要影响因素。Monod 方程是形式简单的微生物生长动力学模型,是由 Monod 于 1949 年提出的经验模型。而 Logistic 方程式由 Verhulst 数学家首先提出,它被看作是一个表现生长与营养物质之间的非线性关系的经验方程[见式(1)]。

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_x}{C_{x\max}}\right) \cdot C_x \quad (1)$$

但是,在药用真菌发酵动力学模型中,由于 Monod 方程忽略了发酵过程中底物浓度对生长的限制作用,所以 Monod 在拟合某些微生物发酵动力学时往往不够理想。而 Logistic 方程则能很好地呈现发酵过程中菌丝体浓度的增加对自身生长的抑制作用,对于拟合药用真菌发酵菌体生长动态具有一定的适用性。

有关发酵动力学文献中,利用 Logistic 方程拟合菌体生长模型报道比较普遍。朱会霞等基于 Logistic 方程,构建了樟芝发酵过程中菌体生长动力学模型,该模型计算值与实验数据的平均误差值为 1.5%^[22]。武秋立等对羊肚菌液体发酵过程中,建立其菌体生长的最适合动力学 Logistic 方程,该方程基本能够反应羊肚菌在液体发酵下的生长状况,并通过试验数据进行非线性拟合得到 $\mu_{\max} = 0.069 / \text{h}$,且其平均拟合的误差为 8.9%^[23]。Ma 等对桑黄发酵过程中添加外源物时建立桑黄菌体生长的最适合动力学 Logistic 方程,该方程基本能够很恰当的呈现桑黄在液体发酵下的菌丝体生长状况,并通过求解得到 $X_0 = 0.097 \text{ g/L}$, $\mu_{\max} = 0.04 / \text{h}$ ^[24]。

1.2 发酵产物形成模型

根据目标产物生成速率与菌体生长速率之间的关系^[25],有 3 种类型:产物形成与菌体生长偶联型, $a \neq 0, b = 0$;产物形成与菌体生长非偶联型, $a = 0, b \neq 0$;产物形成与菌体生长部分偶联型, $a \neq 0, b \neq 0$ 。

珍稀药用真菌发酵过程中既有菌丝体的生长,在一定时期内菌丝体又不进行繁殖,但发酵过程继续进行,因此发酵过程属于部分生长偶联型。据目

前文献显示,描述药用真菌发酵产物形成模型是较为通用的乳糖发酵时所提出的 Luedeking-Piret (L-P) 方程^[26],即:

$$\frac{dC_p}{dt} = a \left(\frac{dC_x}{dt} \right) + bC_x \quad (2)$$

戚跃明对紫芝胞外多糖合成动力学研究是根据 L-P 方程,而且建立的动力学模型预测值与实验数据的拟合度为 94.3%,因此基于 L-P 方程的数学模型可以较好的对紫芝胞外多糖生成规律进行预测^[27]。Vasudha 等运用 L-P 方程建立了植物乳杆菌 NCDC 414 在蔬菜汁发酵生产乳酸的非结构动力学模型,该模型的预测值与实验数据很接近^[28]。Feng 等对灵芝三萜产物的合成建立了非结构动力学发酵模型,即 L-P 方程描述灵芝发酵三萜合成规律,并运用遗传算法(置信度为 95%)对模型中的参数进行评估,计算得到模型参数 $a = 0.739$, $b = 0.0104$,充分证明灵芝三萜发酵过程是属于部分生长偶联型^[29]。

1.3 发酵底物消耗模型

珍稀药用真菌发酵过程中,底物包括菌体生长所需的各种营养成分,其消耗主要有 3 方面:(1) 合成新的菌丝体的消耗;(2) 菌体生长活动消耗;(3) 合成代谢产物消耗。根据近几年文献,建立底物消耗模型主要是根据物料平衡原理及 Luedeking-Piret-Like(L-P-L) 方程,即

$$-\frac{dC_s}{dt} = \frac{1}{Y_x} \frac{dC_x}{dt} + \frac{1}{Y_p} \frac{dC_p}{dt} + mC_x \quad (3)$$

Zhang 等根据 L-P-L 方程建立灵芝发酵基质消耗模型,该模型的误差率低于 5%,这样能够更逼真的描述了灵芝发酵过程中基质添加与消耗的动态平衡规律^[30]。刘磊等基于经典的微生物产物合成动力学 L-P 方程,建立了蛹虫草发酵基质消耗 L-P-L 模型。通过对比实验数据和所构建的 L-P-L 模型,结果表明,所构建的底物消耗模型较准确地反应了发酵过程中糖消耗的实际情况,且平均拟合误差为 0.66%^[31]。

1.4 Sigmoid 模型

药用真菌的生长速率曲线与细菌或酵母相似,二者的区别在于单细胞的细菌或酵母,对数生长期细胞生长随时间变化呈指数增加;而对于药用真菌如灵芝来说,细胞的生长表现出典型的“S”形曲线^[13],且在生长最快时期呈线性增加,这是灵芝发酵的最显著的动力学特征。Sigmoid 模型在工程领

域中常用来拟合“S”形曲线,被看作是一个表征细胞生长与营养物质之间的非线性关系的经验方程,其对应的函数如式(4)所示。

$$Y = \frac{y_{\min} - y_{\max}}{1 + e^{\frac{t-t_0}{dt}}} + y_{\max} \quad (4)$$

Sigmoid 函数是从基质消耗、菌体生成以及产物合成层面,构建了菌体发酵的非结构动力学模型,并根据 Boltzmann 拟合求解出模型参数,为分批发酵法生产真菌活性物质提供理论依据。

徐鹏等构建了灵芝深层发酵生产胞外多糖和灵芝酸的非结构动力学 Sigmoid 模型^[32]。王晓玲等基于 Sigmoid 函数构建了灵芝细胞生长、底物消耗、三萜酸的非结构动力学模型,且预测值能较好地吻合实验实测值^[13],各模型的相关性平方 R^2 均在 0.99 以上。周广乙研究发现蛹虫草多糖和 D-甘露醇的形成与细胞生长分别呈现部分生长关联型和生长关联型关系,通过构建了蛹虫草多糖和 D-甘露醇的发酵模型,该模型和相关参数拟合度较好,说明这 Sigmoid 模型能够较好的揭示蛹虫草多糖和 D-甘露醇发酵代谢的基本特征^[33]。

2 常见数学模型对药用真菌发酵参数拟合优化的方法

药用真菌的合成代谢比较复杂,发酵过程中的细微差别都可能引起产物代谢的较大改变。最近,科研者尝试引用数学模型来描述药用真菌发酵动态过程,并运用多种数学优化软件对模型进行参数拟合,这将为发酵过程的“仿真”及跟踪提供确凿的数据支撑。因此,选择合适的数学优化工具是建立发酵模型的重要任务。

2.1 人工神经网络法

人工神经网络(Artificial Neural Network, ANN)所包含的大量神经元可分为输入层、隐层和输出层的多层结构^[34,35]。ANN 具有自组织、自适应、自学习等特点,对解决珍稀药用真菌发酵过程中菌体生长、产物合成及基质消耗的非线性问题特别先进,还有很强的非线性映射能力,它经过调整网络内部权值来达到拟合系统的输入输出关系^[36],其在发酵工业中广泛应用,已成为目前研究的热点之一。

珍稀药用真菌发酵生产不同种类的有益代谢产物,其培养基营养成分种类繁多,各成分间的相互作用也错综复杂。Singh 等研究发现,真菌发酵过程具有诸多特点,如影响因素较多、高度非线性和复杂

性^[37]。因此,对于药用真菌培养基的优化是非常重要的,且多种优化方法已经被广泛地应用于发酵培养基中。例如单因素设计、正交设计、均匀设计等方法,可能会获得大量的实验数据,但这些实验数据往往不能被进一步利用。而人工神经网络在挖掘这些原始数据中的一些额外规律所起的作用尤为明显。

目前,科研者在设计 ANN 时,由于 ANN 采用的是误差反向传播算法,它是基于梯度下降的方法,因此对初始权向量异常敏感,即有关参数的选取只能通过实验和经验来确定,一旦人为取值不当,即会引起网络振荡不收敛或训练时间过长或是陷于局部极值,从而得不到最佳权值分布。陆震鸣等以樟芝孢子浓度和发酵培养基中葡萄糖、蛋白胨、黄豆粉的为输入节点,以发酵终止时樟芝生物量为输出节点,隐含层采用 6 个神经元,得到最优樟芝发酵培养基配方,且模型预测值与实验值的拟合度较好,两者之间的相对误差在 5% 以内^[38]。Sampaio 等研究乳酸克鲁维酵母发酵培养基的优化,以酵母粉、硫酸镁、硫酸铵为输入节点,发酵终止时生物量为输出节点,得到最优培养基配方:酵母粉 7.04% ~ 9.99%、硫酸镁 0.43% ~ 0.50%、硫酸铵 4%,且在此配方下获得的生物量为 2.14 g/L^[39]。

2.2 遗传算法

遗传算法 (Genetic Algorithm, GA) 是以自然选择和遗传理论为基础,将生物进化过程中的优胜劣汰规则和群体内部染色体的随机信息交换机制相综合的高效全局寻优搜索算法^[40]。

GA 根据预定的目标适应度函数对每一个个体进行评估,根据适者生存,优胜劣汰的进化规则,不断得到更优的群体,同时以全局并行搜索形式来搜寻优化群体中的最优个体,以求得满足要求的最优解^[41]。GA 具有鲁棒性强、随机性、全局性以及适于并行处理的优点,被广泛与 ANN 结合应用于模型参数拟合及培养基优化等问题中。目前,最常用的是使用响应面设计的实验数据,建立网络,然后利用遗传算法直接寻优,为响应面设计提供一个强有力的优化手段。

根据王莹等对羊肚菌液体深层发酵的相关研究,利用 GA 分别对比了真菌菌体生长较常用的 Monod 和 Logistic 方程在描述羊肚菌生长动力学时的优劣,并对羊肚菌菌体的生长、目标产物合成和基质消耗的模型进行了参数求解。结果表明,Logistic 方程与试验数据拟合情况更好,且模型的平均误差

为 5.8%^[42]。高爱同等采用 ANN-GA 对乳酸菌发酵培养基 4 种组分进行优化,结果发现 ANN-GA 比原始 MRS 培养基培养获取的 γ -氨基丁酸产量提高了 106.4%,实验验证 ANN-GA 方法对发酵培养基优化是一种行之有效的数学工具^[43]。

2.3 粒子群算法

粒子群算法^[44] (Particle Swarm Optimization, PSO) 最早是由 Eberhart 和 Kennedy 于 1995 年提出^[45,46]。Eberhart 和 Kennedy 的灵感来自于动物群体的觅食行为,当整个群体在搜寻特定目标时,通常是参照群体中目前处于最优位置的个体和自身曾经达到的最优位置来调整下一步搜寻,从而达到寻求群体最大利益。

PSO 作为一种新型的进化算法,具有快速的搜索速度,鲁棒性强,且对于处理较为复杂的优化问题是一种可行的搜索算法。由于珍稀药用真菌发酵的过程中,具有多种因素的影响,并且多目标优化是现今粒子群优化问题的主要研究领域,将粒子算法引入发酵过程控制是提高发酵工业生产效率的有效途径,且具有重要的指导工业生产意义和应用价值。但是 PSO 在处理复杂的多峰值问题时容易陷入局部最优解,且进化后期收敛速度慢,以及该算法搜索空间有限。夏江等在单因素实验确定三个参数(葡萄糖、L-MSG、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)合适取值区域时,以及人工神经网络建好模型后,采用 PSO 进行全局搜索寻最优 γ -氨基丁酸 (GABA) 发酵培养基的最优条件。经实验验证,实验值与预测值相比,误差为 1.94%,同时优化后使得 GABA 产量提高 96.5%^[47]。

3 珍稀药用真菌发酵产物合成的代谢调控

目前,珍稀药用真菌发酵产物的来源大部分是通过液体发酵培养基与发酵工艺参数的优化,从而达到获取大量的目标产物(生物量、胞外与胞内多糖、黄酮等)。而产物合成代谢调控这个方向研究较少,通过调节产物合成途径,可快速地增加药用真菌液体发酵目标产物的合成,是其发酵目标产物增产的最直接和最关键之处。

3.1 油脂类物质对发酵产物合成的影响

近几年,科研人员比较关注油脂类物质对珍稀药用真菌液体发酵影响的研究,由于油脂物质能促进真菌生长代谢与油或脂肪酸改变真菌细胞膜结构和通透性或直接影响代谢途径中某些重要的酶活性

有关。

高兴喜等报道,油酸能显著促进灵芝菌丝体的生长、胞内多糖的合成及胞内外三萜的积累。且硬脂酸有利于灵芝胞外多糖和胞内多糖的产生^[48]。

Yang 等发现薏苡仁油对灵芝液体发酵具有显著的促进作用,添加量为 2% 的薏苡仁油使灵芝生物量达 10.71 g/L,三萜含量达 92.94 mg/L,胞外多糖产量为 0.33 g/L,胞内多糖产量为 0.389 g/L,分别是对照组的 3.34、2.76、2.2 和 2.23 倍^[49]。

Chienyan 等报道添加适当的橄榄油、红花籽油、大豆油和葵花油能显著刺激灰树花菌丝体的增加,但是添加红花籽油和葵花油却不利于胞外多糖的增加^[50]。Yang 等在灰树花深层培养中发现 1.5 g/L 油酸能促进菌丝体生长,棕榈油能促进多糖的合成,1.0 g/mL 亚油酸能显著抑制菌丝体生长和多糖的合成^[51]。Lee 等^[52]、Joo 等^[53]、Hwang 等^[54] 都发现真菌发酵后期,较高浓度的糖能促进胞外多糖的分泌。

3.2 前体物质对发酵产物合成的影响

前体化合物的加入,可以解除关键酶的阻断或阻断内源性中间体的分开或有效储存,大大的增加了次生代谢物的产量。董玉洁等在虫草发酵过程中添加地鳖多肽,结果表明在第 3 天添加 4 mg 地鳖多肽发酵至第 7 天,其虫草菌素产量最高达 55.43 μg/mL,约为对照组虫草菌素产量的 2 倍^[55]。王蕾等筛选出 CM001 号与 10 号高产虫草素的优良菌株,在液体培养基中加入不同的前体物及营养物质进行发酵培养,结果表明腺苷、腺嘌呤、丙氨酸、甘氨酸、L-天冬氨酸 5 种物质均能显著增加虫草素产量,尤其腺嘌呤的效果更为明显,虫草素总产量分别是空白组的 5.57 倍和 7.09 倍,而肌苷、鸟苷、半胱氨酸都抑制菌体虫草素的合成^[56]。Chiang 等^[57] 将 2,4,5-三甲氧基苯甲醛(2,4,5-trimethoxybenzaldehyde, TMBA) 和橙花叔醇(nerolidol) 作为牛樟芝发酵过程中的添加物,结果表明这两种化合物均能显著提高 4-乙酰基安卓奎诺儿 B 的产量,但橙花叔醇在高质量浓度(1 g/100 mL) 时即会产生反馈抑制作用,抑制 4-乙酰基安卓奎诺儿 B 的合成。Ma 等将萘乙酸(naphthaleneacetic, NAA) 和香豆素(coumarin) 作为桑黄菌丝体发酵过程胞内黄酮合成的前体添加物。结果表明,在添加 0.03 g/L 萘乙酸及香豆素添加 0.02 g/L 时,菌丝体中的胞内黄酮产量分别为 3.6 g/L 和 2.75 g/L^[24]。

3.3 信号分子对发酵产物合成的影响

信号分子如激素、真菌激发子和 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 等,可以通过激活特定代谢途径来增加代谢产物的产量,在药用真菌发酵过程中的调控发挥着重要作用。

Ren 等在灵芝发酵过程中通过添加茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA) 诱导灵芝酸的合成,于发酵第 6d 时加入 254 μmol/L 的 MeJA,得到菌丝体中灵芝酸的产量为 4.52 mg/100 mg,较空白组提高了 45.3%,灵芝酸产量的增加与 MeJA 对灵芝产物合成关键性酶基因表达均有不同程度的诱导作用有关^[58]。

马晓宁等研究发现多糖激发子 CM-JS 对蛹虫草多糖的生物合成有显著诱导作用,通过工艺优化得到 CM-JS 的最佳添加量为 70.328 μg/mL,在蛹虫草发酵第 2d 加入激发子并激发 3d,使得蛹虫草干菌丝中的多糖含量增加 54.16%,达到 342.5 mg/g^[59]。

徐轶宁发现添加 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 Mn^{2+} 能够有效地提高灵芝酸产量,其中 10 mmol/L Ca^{2+} 的影响最显著,总灵芝酸的产量达 (1.58 ± 0.03) g/L,其调控灵芝代谢的机制是通过 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 Mn^{2+} 能够增加灵芝菌丝体胞内 Ca^{2+} 浓度,从而刺激钙调磷脂酶信号和灵芝酸产物合成基因的转录水平来促进灵芝酸的合成^[60]。

Ma 等研究发现在桑黄发酵过程中通过添加芦丁、 FeSO_4 、天冬氨酸、Tween80 诱导菌体胞外多糖的合成,且四者同时添加刺激效果最显著,当芦丁、 FeSO_4 、天冬氨酸、Tween80 同时添加量分别为:3.5、0.15、3.5、7.0 g/L 时,得到最大的胞外多糖产量为 6.2 g/L^[61]。

3.4 酶活力对发酵产物合成的影响

通过控制酶活来调节代谢,目前最为常用的方法有两种类型,一种是酶活调节,提高代谢产物合成途径中重要酶的酶活力,或抑制一些与代谢产物合成无关的旁路代谢途径中关键酶的酶活力,将菌体的物质和能量导向目的产物合成途径,促进代谢产物的合成。如 Zhou 等发现薏苡仁脂显著增加灵芝多糖的产量,为此对灵芝多糖 EMP 途径中关键酶 α -PGM 和 PGI 活性做了相关研究,结果显示,在发酵的第 4、6、8 d,对照组 PGI 异构酶的活力分别为 7.46、3.11、2.15 nmol/(min · mg pro),而添加薏苡仁脂后的 PGI 异构酶的活力分别为 5.46、1.14、0.52 nmol/(min · mg pro),PGI 异构酶的活性明显

低于对照组。表明薏苡仁脂是直接通过调节 PGI 异构酶和 α -PGM 变位酶的活性,从而刺激菌体合成灵芝多糖^[62]。

贺宗毅等研究灰树花代谢调控过程中,发现天麻有助于其胞外多糖产量增加,并对灰树花多糖合成代谢途径中的两个重要酶葡萄糖磷酸异构酶 (glucose phosphate isomerase, PGI) 和 α -葡萄糖磷酸变位酶 (α -phosphoglucomutase, α -PGM) 的酶活力进行测定,其中 PGI 是糖酵解途径中的重要酶, α -PGM 是与胞外多糖合成相关的重要酶。结果发现,添加天麻对 α -PGM 变位酶酶活力的改善并无显著作用,但是添加天麻使得 PGI 异构酶活力显著降低,表明天麻中的天麻素或其复合成分抑制了灰树花多糖的糖酵解途径,而有利于灰树花多糖合成的途径^[63]。

Li 等研究灵芝胞内多糖和胞外多糖合成基因时,发现透明颤菌血红蛋白表达基因对灵芝多糖的合成有显著提升作用。结果表明,透明颤菌血红蛋白表达基因有效的提高了灵芝多糖合成的三种重要酶酶活(葡萄糖磷酸变位酶、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶、 β -1,3-葡聚糖合酶),较空白组酶活分别提高了 1.51、1.55、3.83 倍^[64]。

另一种类型是酶合成的调节,诱导药用真菌代谢产物途径中特定酶的基因表达,调节酶分子的合成量,进而激活特定次生代谢途径,引发反应速率和次级代谢途径通量的改变,从而积累特定目的代谢产物,是在遗传学水平上发生的。Xu 等报道灵芝发酵过程中添加钙离子对灵芝酸产量影响较为显著,实验过程中发现,添加 10 mmol/L Ca^{2+} 进行灵芝液体发酵第 4 d 时总灵芝酸产量达到了 (62.55 ± 2.05) mg/g,是对照组的 3.7 倍^[65]。Fan 等发现嘌呤核苷酸对虫草素生物合成有显著影响,当添加 FeSO_4 后使得 purA (编码腺苷酸琥珀酸合成酶) 的转录水平显著上调,但是 purH (编码 IMP 环化水解酶) 和 guaB (编码 IMP 脱氢酶) 的转录水平均有下降,表明虫草素产量的提高可能归因于 purA 的转录水平的上调,使得腺苷酸琥珀酸合成酶刺激菌体合成虫草素^[66]。

同时, Torino 等在研究 *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 时,发现 EPS 高产时, α -phosphoglucomutase 和 galactose 1-phosphate-uridylyltransferase 这两种酶的活性明显提高^[67]。Grobben 等在发酵乳酸菌生产 EPS 时,发现 UPD-glucose phosphophorylase 酶活性增强^[68]。

4 存在的问题及展望

珍稀药用真菌作为一种安全、有效、无毒副作用的天然菌类资源,越来越受到科研及临床工作者的关注。近年来,有关珍稀药用真菌的药理作用、成分和机制逐渐得到阐明,使得珍稀药用真菌的高值利用更加深化。同时,也存在一些亟待解决的问题:①药用真菌多糖和次级代谢产物合成代谢的相关研究很少,培养基成分影响多糖和次级代谢物生物合成量的内在机制尚未明确,培养基营养成分对于多糖和次级代谢物的合成或分泌的影响也无从得知;②对于药用真菌的液体发酵研究主要是培养基营养成分的最佳配比,但有关于药用真菌发酵过程中菌体生长、基质消耗和活性物质合成的非结构动力学模型的研究需深入探讨;③药用真菌发酵过程中,缺乏研究菌丝体的形态、营养素和发酵工艺参数对目的产物合成产生的影响;④药用真菌发酵过程中,关键酶的种类以及作用机理有待进一步的拓展;⑤缺乏借鉴微生物代谢调控手段于药用真菌发酵培养中,例如添加诱导因子和活性物质前体的加入等。相信这些问题得到解决后,药用真菌产品大规模生产、利用和普及将会有一个大幅度的提高。

随着影响药用真菌液体发酵的优化及代谢调控关键性问题的有效解决,药用真菌液体发酵的应用将进入快速发酵阶段。药用真菌发酵工程菌及利于菌丝体生长、多糖和次级代谢物等合成的全合成培养基是直接影响药用真菌发酵水平的关键因素。从发酵动力学、氨基酸代谢调控及其含量的变化、多糖、三萜和黄酮合成的代谢调控等多角度,深入研究发酵液营养素、培养环境和发酵工艺对药用真菌菌丝体生长和活性物质合成代谢的调控机制。同时,运用数学模型分析发酵过程中药用真菌菌丝体生长状况、产物合成代谢和基质消耗及关键因素的影响,这可以为药用真菌工业生产提供技术支撑,促进药用真菌在医药食品等相关领域发挥更大的作用。

参考文献

- 1 Li Y (李媛). The present status aspect of medicinal fungi in China. *Agric Technol* (农业与技术), 2013, 10: 11.
- 2 Zou MG (邹芒砀), et al. The influence of medium composition on the medicinal fungal polysaccharides. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2012, 31(4): 5-7.
- 3 Pei JJ, et al. Structural features and antitumor activity of a

- novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia. *Carbohydr Polym*, 2015, 115:472-477.
- 4 Zhang J, *et al.* Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth. *Carbohydr Polym*, 2012, 87:1539-1544.
 - 5 Yuan MS(袁明生), *et al.* Mushroom Color in China. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2007.
 - 6 Tao WX(陶文沂), *et al.* Drug Edible Fungi Biotechnology. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
 - 7 Li Y(李羿), *et al.* Advances and existed problems in studies on liquid fermentation of medicinal fungi. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:2066-2070.
 - 8 Sun J(孙静), *et al.* Research survey on fermentation of Chinese materia medica. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2011, 34(1):49-52.
 - 9 Yang F, *et al.* Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microbial Technol*, 2000, 27:285-301.
 - 10 Liu CR(刘成荣), *et al.* Study on technological condition in deep fermentation of *Hericium erinaceus*. *J Putian Univ* (莆田学院学报), 2008, 15(2):60-62.
 - 11 Zhang HH(张宏海), *et al.* Experiment study on submerged fermentation condition of *Antrodia camphorata*. *Food Drug* (食品与药品), 2011, 10(9):18-21.
 - 12 Xu Q(许谦). Optimization of liquid culture medium for fermentation mycelial flavone in *Phellinus igniarius*. *Food Machin*(食品与机械), 2015, 31:190-193.
 - 13 Lang JY(郎久义), *et al.* Production of exopolysaccharides by *Cordyceps sinensis* in liquid culture. *J Dalian Polytech Univ* (大连工业大学学报), 2009, 28:107-110.
 - 14 Fang TQ(房天琪), *et al.* Study on the cultivation technology of *Cordyceps militaris* mycelium liquid. *J Changchun Univ Technol, Nat Sci* (长春工业大学学报, 自科版), 2011, 32(1):83-87.
 - 15 Liu F(刘凡), *et al.* Optimization of liquid fermentation medium favorable for production of intracellular flavone from *Phellinus igniarius*. *Sci Sericul* (蚕业科学), 2013, 39:1160-1165.
 - 16 Liang DX, *et al.* Response surface methodology used for statistical optimization of fermentation media of *Cordyceps Militaris*. *Inf Technol Agric Eng*, 2012, 134:485-491.
 - 17 Wang XL(王晓玲), *et al.* Unstructured kinetic models for triterpene acids of *Ganoderma lucidum* in batch fermentation. *Mycosystema* (菌物学报), 2011, 30:767-773.
 - 18 Qin JZ(秦俊哲), *et al.* Study of liquid fermentation medium for *Phellinus linteus* using response surface methodology optimization. *Food Sci Technol* (食品科技), 2010, 35(3):16-19.
 - 19 Zhu SM(祝思明), *et al.* Liquid fermentation conditions for production of mycelium of *Phellinus linteus*. *China Brew* (中国酿造), 2010, 11:88-91.
 - 20 Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol*, 1949, 3:371-394.
 - 21 Avadhani SK, *et al.* A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochem*, 1999, 35:227-235.
 - 22 Zhu HX(朱会霞), *et al.* Fermentation kinetics of *Antrodia camphorata*. *China Brew* (中国酿造), 2009, 7:90-93.
 - 23 Wu QL(武秋立), *et al.* Kinetic model for exopolysaccharides of *Morchella esculenta* by fermentation. *Acta Univ Nankaiensis, Nat Sci* (南开大学学报, 自科版), 2005, 38(1):43-48.
 - 24 Ma XK, *et al.* The influence of naphthaleneacetic acid (NAA) and coumarin on flavonoid production by fungus *Phellinus sp.*: modeling of production kinetic profiles. *Biotechnol Prod Proc Eng*, 2015, 99:9417-9426.
 - 25 Liang XH(梁新红), *et al.* The establishment of mathematical model of *Lactobacillus Acidophilus* cell growth. *Jiangsu Condi Subsidiary Food* (江苏调味副食品), 2006, 23(5):11-13.
 - 26 Luedeking R, *et al.* A kinetic study of the lactic acid fermentation; Batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng*, 1959, 1:393-412.
 - 27 Qi YM(戚跃明). Purification, antioxidant activity and kinetic model of exopolysaccharides from fermentation liquid of *Ganoderma sinense*. Anhui: Anhui Polytechnic University (安徽工程大学), MSc. 2013.
 - 28 Vasudha S, *et al.* Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juice. *Food Sci Technol*, 2014, 59:1123-1128.
 - 29 Feng J, *et al.* An unstructured kinetic model for the improvement of triterpenes production by *Ganoderma lucidum* G0119 based on nitrogen source effect. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2014, 19:727-732.
 - 30 Zhang JG, *et al.* A study on the synthetic characteristics of the extracellular polysaccharides (EPS) of *Ganoderma lucidum* cultured in batch fermentation using a kinetic model. *Chin J Biotechnol*, 2007, 23:1065-1071.
 - 31 Liu L(刘磊), *et al.* Establishment of kinetics models for carotenoids synthesis from liquid fermentation of *Cordyceps militaris*. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2014, 42:137-140.
 - 32 Xu P(徐鹏), *et al.* Kinetic analysis of exopolysaccharide and

- ganoderic acid production by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, 14: 562-565.
- 33 Zhou GY (周广乙). Study on fermentation of polysaccharide and D-mannitol from *Cordyceps mititaris*. Changsha: Central South University Of Forestry And Technology (中南林业大学), Msc. 2015.
- 34 John JH, et al. Neural computation of decisions in optimization problems biological. *Biol Cybernetics*, 1985, 52: 141-152.
- 35 Hagan MT, et al. Neural Network Design. Boston: PWS Publishing Company, 1996.
- 36 Hecht-Nielsen R. Theory of Backpropagation Neural Networks. Proc Ijenn, 1989, 89.
- 37 Singh V, et al. Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 379-385.
- 38 Lu ZM (陆震鸣), et al. Medium optimization for mycelia production of *Antrodia camphorata* based on artificial neural network-genetic algorithm. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2011, 27: 1773-1779.
- 39 Sampaio FC, et al. Batch growth of *Kluyveromyces lactis* cells from deproteinized whey: Response surface methodology versus Artificial neural network-Genetic algorithm approach. *Biochem Eng J*, 2016, 109: 305-311.
- 40 Shi ZP (史仲平), et al. Analysis, Control and Detection Technology of Fermentation Process. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- 41 Lei YJ (雷英杰), et al. MATLAB Genetic Algorithm Toolbox and Application. Xi'an: Xi'an Electronic and Science University Press, 2005.
- 42 Wang Y (王莹), et al. Genetic algorithm for fermentation kinetics of submerged fermentation by *Morchella*. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2008, 24: 1454-1457.
- 43 Gao AT (高爱同), et al. Optimization of fermentation variables by using artificial neural network model and genetic algorithm by *Lactic acid bacteria*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2014, 20: 112-116.
- 44 Wu XP (吴晓鹏), et al. Application research on particle swarm optimization with variation gene in biology fermentation. *Electri Measure Instrument* (电测与仪表), 2005, 42 (475): 48-50.
- 45 Kennedy J, et al. Particle Swarm Optimization. Proc IEEE Int Conf on Neural Networks. Piscataway USA: IEEE Press, 1995. 1942-1948.
- 46 Eberhart R, et al. A New Optimizer Using Particle Swarm Theory. In: Proc of the Sixth International Symposium on Micro Machine and Human Science. Nagoya, Japan: IEEE Press, 1995. 39-43.
- 47 Xia J (夏江), et al. Optimization of γ -aminobutyric acid fermentation medium based on artificial neural network and particle swarm optimization. *J Chem Eng Chin Univ* (高校化学工程学报), 2007, 21: 997-1001.
- 48 Gao XX (高兴喜), et al. Effect of different fatty acids on liquid-state fermentation of *Phellinus igniarius*. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32: 198-201.
- 49 Yang HL, et al. Stimulatory effects of *Coix lacryma-jobi* oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Biochem Eng J*, 2013, 76: 77-82.
- 50 Chienyan H, et al. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelia biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. *Biochem Eng J*, 2008, 38: 198-205.
- 51 Yang FC, et al. Effect of fatty acids on the mycelia growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask culture. *Enzyme Microbiol Technol*, 2000, 27: 295-301.
- 52 Lee BC, et al. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microbiol Technol*, 2004, 5: 369-376.
- 53 Joo JH, et al. Optimization of submerged culture conditions for exopolysaccharide production in *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito TG-3. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004, 20: 767-773.
- 54 Hwang HJ, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme Microbiol Technol*, 2003, 33: 309-319.
- 55 Dong YJ (董玉洁), et al. Effect of eupolyphaga peptide on cordycepin production of *Cordyceps militaris*. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2013, 13: 129-133.
- 56 Wang L (王蕾), et al. Screening of high-yield strain and medium optimization for maximum production of cordycepin by *Cordyceps militaris*. *Mycosystema* (菌物学报), 2012, 31: 382-388.
- 57 Chiang CC, et al. Enhancement of 4-acetylanthroquinone B production by supplementation of its precursor during submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. *J Agric Food Chem*, 2013, 38: 9160-9165.
- 58 Ren A, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Biores Technol*, 2010, 101: 6785-6790.