

一种通过模拟野外生境胁迫开发的 具有护肤功效的灵芝发酵产物

梁嘉亮^{1,2*}, 林冬明¹, 李洪金^{1,2}

¹肽源(广州)生物科技有限公司;

²广东省医美材料及功效护肤品工程技术研究中心, 广州 511400

摘要:为了生产一种具有护肤功效的灵芝发酵产物,本研究通过模拟灵芝野外生境胁迫来设计灵芝菌丝体液态发酵工艺。该工艺将发酵分为前后两段,前段提供适宜灵芝菌丝体生长的培养条件,目的是提高生物量;后段模拟野外生境施加胁迫因子,目的是促使菌丝体生产多糖和三萜。通过考察灵芝多糖、灵芝三萜、超氧阴离子自由基清除率和糖化抑制率四个指标对胁迫因子进行筛选,发现植物乳杆菌、几丁质酶、升温处理这三个胁迫因子对提高活性成分含量有显著效果。组合这三个胁迫因子制备的灵芝发酵产物,其粗多糖和三萜含量分别为 8.16 mg/g 和 2.95 mg/g,其 5% 稀释液的超氧阴离子自由基清除率和糖化抑制率分别为 81.56% 和 56.11%。皮肤封闭型斑贴测试证明该灵芝发酵产物对人体皮肤没有不良反应。皮肤功效测试证明该灵芝发酵产物对人体皮肤有抗衰老功效,具体表现为提亮肤色、祛黄、紧致肌肤。

关键词:灵芝;液态发酵;生境胁迫;三萜;多糖

中图分类号:Q815;Q939.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)Suppl-0084-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.011

A fermentation product of *Ganoderma lucidum* with skin care benefits developed by simulating wild habitat stress

LIANG Jia-liang^{1,2*}, LIN Dong-ming¹, LI Hong-jin^{1,2}

¹TYRAN (Guangzhou) Biotechnology Company Limited; ²Guangdong Engineering Technology Research Center of Medical Beauty Materials and Efficacy Skin Care Products, Guangzhou 511400, China

Abstract: In order to produce a fermentation production of *Ganoderma lucidum* with skin care benefits, a liquid fermentation process of *G. lucidum* mycelium was designed by simulating the wild habitat stress of *G. lucidum*. The fermentation process was divided into two stages, the front stage provided suitable culture conditions for the growth of mycelium, to increase the mycelial biomass. In the latter segment, the stress factors simulating wild habitat were imposed to *G. lucidum* mycelium, to promote the production of polysaccharides and triterpenoids. The productions of *G. lucidum* polysaccharides and triterpenoids, the superoxide anion radical scavenging rate and the glycation inhibition rate were investigated, so as to screen the stress factors. It was found that three stress factors, which were *Lactobacillus plantarum*, chitinase and increasing temperature, had significant effects on increasing the active ingredient content in *G. lucidum* fermentation products. The crude polysaccharide and triterpenoid contents of *G. lucidum* fermentation product prepared by combining these three stress factors were 8.16 mg/g and 2.95 mg/g, respectively, and the superoxide anion radical scavenging rate and glycation inhibition rate of its 5% dilution solution were 81.56% and 56.11%, respectively. The skin-occlusive patch test proved that the *G. lucidum* fermentation product had no adverse reaction to human skin. The skin efficacy test proved that the *G. lucidum* fermentation product had anti-aging effect on human skin, which is manifested in brightening skin tone, removing yellowing and firming skin.

Key words: *Ganoderma lucidum*; liquid fermentation; habitat stress; triterpenoid; polysaccharide

性物质,其中多糖和三萜类物质是主要的活性成分,二者的含量被中国药典确定为灵芝药材的质量指标。现代研究表明,灵芝多糖具有免疫调节、降血糖、降血脂、抗氧化、抗衰老及抗肿瘤作用;灵芝三萜能净化血液,保护肝功能^[1,2]。在化妆品领域,灵芝提取物可发挥清除自由基、延缓皮肤衰老、提高皮肤微循环血液灌流量等功效^[3-5]。

野生灵芝生长在落叶树的底部或树桩,非常稀有,富含灵芝三萜;人工栽培可以获得灵芝子实体,但生产周期长、栽培成本高,且栽培灵芝的三萜类物质含量通常不如野生灵芝;在发酵罐中液态培养灵芝菌丝体可以获得灵芝发酵产物,灵芝发酵产物生产周期短、成本低,但是灵芝三萜含量往往很低甚至为零。灵芝三萜含量的差异是导致野生灵芝、栽培灵芝和灵芝发酵产物功效差异的主要原因。提高灵芝发酵产物中灵芝三萜含量具有重大的经济意义,同时也有利于保护野生灵芝物种资源。

灵芝多糖是灵芝的初级代谢产物,其含量与灵芝菌丝体的生物量呈正相关^[6,7]。因此,在液态发酵培养灵芝菌丝体的过程中,只需要提供适宜的生长条件(充足的营养,合适的溶氧量、酸碱度和搅拌速度)使菌丝生物量提高,就可以生产高浓度的灵芝多糖。而三萜类物质是灵芝的次级代谢产物,合成三萜类物质的关键是刺激其相关的代谢途径,只提供适宜的生长条件并不能使灵芝生产三萜类物质。如何刺激灵芝合成三萜类物质?一种思路是微观角度,通过代谢组学和基因组学方法从分子层面研究其代谢途径中的各个环节,找到途径中关键的调控因子;另一种思路是宏观角度,观察野生灵芝、栽培灵芝和灵芝菌丝体液态培养的生长环境,从生态层面分析三者的关键不同。从生态层面分析,野生灵芝的生长环境有很多挑战,例如虫咬、其他微生物的侵扰、寒热变化等,而人工培养环境则没有这些挑战,困难和舒适是二者的最大不同。

本研究通过观察和模拟野生灵芝的生长环境,设计了多个胁迫因子并施加在灵芝菌丝体液态培养的过程中;然后通过实验筛选胁迫因子,旨在提高灵芝发酵产物的活性成分含量;最后通过皮肤封闭型斑贴测试和皮肤功效测试,证明本研究所制备的灵芝发酵产物在化妆品领域应用的安全性和功效性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

麦芽提取物、酵母提取粉、MRS 肉汤培养基(批

号 3209072、3209063、1107331, BR 级,广东环凯微生物科技有限公司);磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、七水合硫酸镁(批号 20220211、20171221、20170306, AR 级,国药集团化学试剂有限公司);无水葡萄糖(批号 20220105, AR 级,上海伯奥生物科技有限公司);维生素 B1(批号 20200612, 食品级,河南糖柜食品有限公司);大麦芽(批号 3210136, 农产品,欧麦(保定)麦芽有限公司);甘草(批号 20200801, 农产品,广州清平批发市场);几丁质酶(批号 20221004, 食品级,常茂生物化学工程股份有限公司)。

灵芝(*Ganoderma lucidum*), 菌种编号 GL, 肽源(广州)生物科技有限公司菌种库;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 菌种编号 Lp, 肽源(广州)生物科技有限公司菌种库。

平行生物反应器(含 4 个 10 L 发酵罐)(迪必尔生物工程(上海)有限公司);立式高压蒸汽灭菌锅(LDZX-75KBS, 上海申安医疗器械厂);立式恒温振荡器 IS-RDV1(美国精骐有限公司);生化培养箱 LRH-250(上海一恒科学仪器有限公司)、精密鼓风干燥箱 BPG-9056A(上海一恒科学仪器有限公司);紫外分光光度计 Genesys 50(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司);离心机 HTC-R002(上海甘薇生物科技有限公司);电子分析天平(上海力辰邦西仪器科技有限公司);VISIA 面部皮肤分析仪(美国 Canfield 公司);皮肤颜色测量仪 SkinColorCatch(芬兰 Delfin 公司)、皮肤弹性测量仪 ElastiMeter(芬兰 Delfin 公司)。

1.2 方法

1.2.1 制备灵芝种子液

配制种子培养基:按质量分数混合麦芽提取物 4%, 葡萄糖 2%, 酵母提取物 0.2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 七水合硫酸镁 0.05%, 维生素 B1 0.001%, 水 93.649%。250 mL 锥形瓶装 150 g 种子培养基, 115 °C 灭菌 30 min, 然后冷却至室温。

将灵芝菌种接种到种子培养基, 温度 28 °C, 摇床转速 180 r/min, 培养 4 d, 得到灵芝种子液。

1.2.2 制备植物乳杆菌种子液

将植物乳杆菌菌种接种到 MRS 肉汤培养基中, 温度 37 °C, 静置培养 24 h, 得到植物乳杆菌种子液。

1.2.3 发酵培养基配方

按质量分数混合大麦芽(打粉)2%, 麦芽提取物 2%, 葡萄糖 2%, 甘草(打粉)0.6%, 酵母提取物 0.2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 七水合硫酸镁 0.05%, 维

生素 B1 0.001%, 水 93.049%。10 L 发酵罐装 5 kg 发酵培养基, 115 °C 灭菌 30 min, 然后冷却至室温。

1.2.4 发酵工艺

发酵工艺分为前段和后段, 前段培养灵芝菌丝体, 后段加入胁迫因子刺激菌丝体合成活性成分。

发酵前段: 按接种量 2% 将灵芝种子液接入发酵培养基, 温度 30 °C, 搅拌转速 100 r/min, 溶氧量控制在 70% ~ 90%, 培养 48 h。

发酵后段: 溶氧量控制在 30% ~ 50% 之间。按照表 1 所列出的胁迫因子明细和表 2 所列出的试验方案, 向各试验组施加胁迫因子, 然后继续培养 48 h。最后将培养物升温至 95 °C 并保温 30 min, 0.45 μm 膜过滤, 收集滤液, 得到灵芝发酵产物。每个试验组做 3 个平行样 (即 3 罐灵芝发酵产物)。

测试各试验组灵芝发酵产物的粗多糖和三萜含量、超氧阴离子自由基清除率和糖化抑制率。

表 1 模拟灵芝野生环境的胁迫因子

Table 1 Stress factors simulating the wild habitat of *Ganoderma lucidum*

因子代号 Factor code	施加方法 Application method
A	加入植物乳杆菌种子液 0.3% (w/w)
B	加入几丁质酶 0.1% (w/w)
C	加入甘露聚糖酶 0.1% (w/w)
D	将培养温度从 30 °C 升高至 34 °C
E	加入柠檬酸, 将 pH 从 5 调至 4

表 2 筛选胁迫因子的试验方案

Table 2 Test protocol for screening stress factors

试验组代号 Experiment group code	施加的胁迫因子 Applied factor
G	无
GA	A
GB	B
GC	C
GD	D
GE	E
GAB	A, B
GABD	A, B, D

1.2.5 粗多糖含量测定方法

称取样品 10 g, 加入乙醇 30 g, 混合均匀后 4 °C 冷藏 24 h。将混合液以 3 000 r/min 离心 30 min, 弃

上清液。将沉淀物置于 60 °C 烘箱烘干, 称量沉淀物质量, 按照公式(1) 计算粗多糖含量 (C)。

$$C = m/M \quad (1)$$

式中: m 为沉淀物质量, mg; M 为样品质量 (10 g)。

1.2.6 三萜含量测定方法

中国药典中选择齐墩果酸作为定量检测灵芝三萜的对照品, 因为齐墩果酸与从子实体提取的灵芝三萜都是五环三萜类化合物。但是灵芝菌丝体在液态培养条件下产生的灵芝三萜因带有糖基而成五环三萜苷, 因此本研究用同为五环三萜苷的积雪草苷作为对照品。

配制香草醛乙酸溶液 (0.05 g/mL): 称取 0.5 g 香草醛, 加入 10 mL 乙酸溶解。

配制积雪草苷标准溶液 (0.40 mg/mL): 精密称取积雪草苷对照品 10 mg, 用乙醇溶解定容于 25 mL 容量瓶中, 摇匀。

绘制标准曲线: 精确量取积雪草苷标准溶液 100、200、300、400、500、600 μL, 分别置于比色管中, 90 °C 水浴蒸干; 加入香草醛乙酸溶液 0.2 mL 和硫酸 0.8 mL, 加塞混合摇匀, 60 °C 水浴 15 min, 冰水浴 5 min; 加入 5 mL 乙酸, 混合摇匀, 静置 10 min; 以随行试剂作为空白, 测 550 nm 吸光度; 以积雪草苷质量为纵坐标, 吸光度为横坐标绘制标准曲线。

样品测定: 称取样品 2 g 置于试管中, 加入稀盐酸 (0.3 mol/L) 4 mL, 加塞摇匀, 90 °C 水浴 3 h; 取出冷却至室温后, 加入 2 mL 乙酸乙酯, 加塞剧烈振荡 1 min, 静置 10 min 使分层。取乙酸乙酯相 200 μL 置于比色管中, 90 °C 水浴蒸干, 加入香草醛乙酸溶液 0.2 mL 和硫酸 0.8 mL, 加塞混合摇匀, 60 °C 水浴 15 min, 冰水浴 5 min; 加入 5 mL 乙酸, 混合摇匀, 静置 10 min; 以随行试剂作为空白, 测 550 nm 吸光度。根据标准曲线和吸光度, 计算样品中的三萜含量。

1.2.7 超氧阴离子自由基清除率的测定方法

配制 Tris-HCl 溶液 (0.05 mol/L): 精确称取 Tris 6.057 5 g, 加水定容至 250 mL; 取 Tris 溶液 25 mL 加稀盐酸 (0.1 mol/L) 25 mL, 加水溶解定容至 100 mL。配制焦性没食子酸溶液 (3 mmol/L): 精确称取焦性没食子酸 0.0378 g, 用水溶解定容至 100 mL。准确吸取样品溶液 0.5 mL 置于试管中, 加 Tris-HCl 溶液 4.5 mL, 去离子水 4 mL。摇匀后室温静置 10 min, 再加入焦性没食子酸溶液 0.3 mL, 混合后立即测 320 nm 吸光度。每 30 s 记吸光度读

数,记录 3 min 内的数值,求其变化斜率。以去离子水代替样品作为空白对照。然后按照公式(2)计算自由基清除率(R)^[8]。

$$R = (k_1 - k_2) / k_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: k_1 为空白管吸光度的变化斜率; k_2 为样品管吸光度的变化斜率。

1.2.8 糖化抑制率的测定方法

配制 PBS 缓冲液(pH 7.4):氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,磷酸二氢钾 0.2 g,十二水合磷酸氢二钠 2.56 g,水 1 000 mL,己二醇 20 g,戊二醇 20 g,混合溶解。配制果糖溶液: D -果糖 0.05 mol, PBS 缓冲液 100 mL,混合溶解。配制胶原蛋白溶液:水解胶原蛋白 2 g, PBS 缓冲液 100 mL,混合溶解。配制碳酸钠溶液(pH 10.8):碳酸钠 9.54 g,碳酸氢钠 0.84 g,水 1 L,混合溶解。配制 NBT 显色剂:氯化硝基蓝四氮唑 0.03 mmol,碳酸钠溶液 100 mL,混合溶解,冷藏备用。建立化学模型:按表 3 配制糖化反应化学模型,然后 48 °C 孵化 24 h。

测吸光度:每支孵化液各取 80 μ L,分别加入 NBT 溶液 1.6 mL、水 320 μ L,摇匀,25 °C 反应 15 min,然后测 530 nm 吸光度。然后按照公式(3)计算糖化抑制率(I)。

$$I = [1 - (T - T_0) / (C - C_0)] \times 100\% \quad (3)$$

式中: T 为样品组的吸光度; T_0 为样品本底的吸光度; C 为空白对照组的吸光度; C_0 为溶剂本底的

表 3 糖化反应化学模型

Table 3 Chemical model of the saccharification reaction

组别 Group	样品溶液 Sample solution (mL)	PBS 缓冲液 PBS buffer (mL)	胶原蛋白溶液 Collagen solution (mL)	果糖溶液 Fructose solution (mL)
T_0	1	8	1	0
T	1	7	1	1
C_0	0	9	1	0
C	0	8	1	1

注: C 为空白对照组, C_0 为溶剂本底; T 为样品组, T_0 为样品本底。
Note: C is the blank control group, C_0 is a blank background; T is the sample set, T_0 is the sample background.

吸光度;糖化抑制率无量纲。

1.2.9 皮肤封闭型斑贴测试方法

选择最优试验组的灵芝发酵产物进行皮肤封闭型斑贴测试。参照《化妆品安全技术规范》2015 版第七章的人体皮肤封闭型斑贴试验。招募受试者人数 32 名,有效数据 32 名。选用面积 50 mm²、深度 1 mm 的斑试器。将受试物放入斑试器小室内,用量为 0.025 mL。空白对照不置任何物质。将加有受试物的斑试器用低致敏胶带贴敷于受试者的背部,用手掌轻压使之均匀地贴敷于皮肤上,持续 24 h。分别于去除受试物斑试器后 30 min、24 h 和 48 h 按表 4 标准观察皮肤反应,并记录观察结果。本测试遵循中国国家药监局 2021 年发布的《化妆品安全评估技术导则》,所有受试者在开展试验前已签署知情同意书。

表 4 皮肤封闭型斑贴试验皮肤反应分级标准

Table 4 Grading criteria for skin reaction to skin occlusive patch test

反应等级 Level of response	皮肤反应 Skin symptom
0	阴性反应。
1	可疑反应,仅有微弱红斑。
2	弱阳性反应(红斑反应);红斑、浸润、水肿、可有丘疹。
3	强阳性反应(疱疹反应);红斑、浸润、水肿、丘疹、疱疹;反应可超出受试区。
4	极强阳性反应(融合性疱疹反应);明显红斑、严重浸润、水肿、融合性疱疹;反应超出受试区。

1.2.10 人体护肤功效测试方法

将最优试验组的灵芝发酵产物配制成水相制剂试验产品,供受试者使用。制剂配方如下:基础增稠(水 83.81%,卡波姆 0.1%,三乙醇胺 0.09%),基础防腐(丙二醇 5%,1,2-己二醇 0.5%,对羟基苯乙酮 0.5%),灵芝发酵产物 10%。招募受试者人数 12 名,有效数据 12 名。受试者每天清洁面部后,将

试验产品涂抹于面部,轻轻按摩至吸收,连续使用 6 周。分别于第 0 周、第 2 周、第 4 周、第 6 周测量受试者面部皮肤黑色素指数、皮肤颜色 b^* 值和皮肤弹性值,并用 VISIA 面部皮肤分析仪拍照。本测试遵循中国国家药监局 2021 年发布的《化妆品功效宣称评价规范》,所有受试者在开展试验前已签署知情同意书。

2 结果与分析

2.1 筛选胁迫因子

2.1.1 胁迫因子对灵芝多糖的影响

图1为各试验组灵芝发酵产物的粗多糖含量。与没有施加胁迫因子的G组相比,GA、GB、GD组的粗多糖含量比较高,但是都没有显著差异($P > 0.05$);GAB和GABD组的粗多糖含量比G组高,且具有显著性差异($P < 0.05$)。试验结果说明A、B、D三个胁迫因子有刺激灵芝菌丝体合成多糖的作用;虽然单一胁迫因子影响不显著,但是组合起来就有显著的作用。

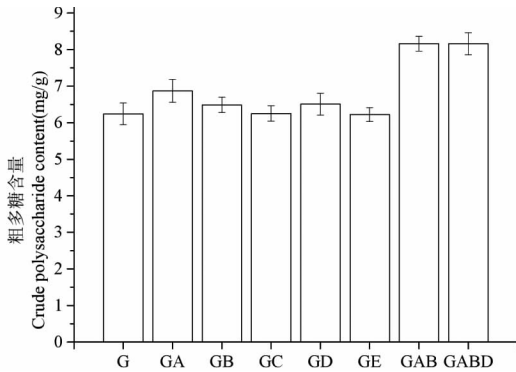


图1 灵芝发酵产物的粗多糖含量

Fig. 1 Crude polysaccharide content of *G. lucidum* fermentation product

2.1.2 胁迫因子对灵芝三萜的影响

图2为各试验组灵芝发酵产物的三萜含量。GA、GB、GAB、GABD组的三萜含量都比G组高,且都有显著差异($P < 0.05$)。GD组的三萜含量比G组略高,GABD组的三萜含量比GAB组略高,但都没有显著差异($P > 0.05$)。试验结果说明胁迫因子A、B都有刺激灵芝菌丝体合成三萜的作用;胁迫因

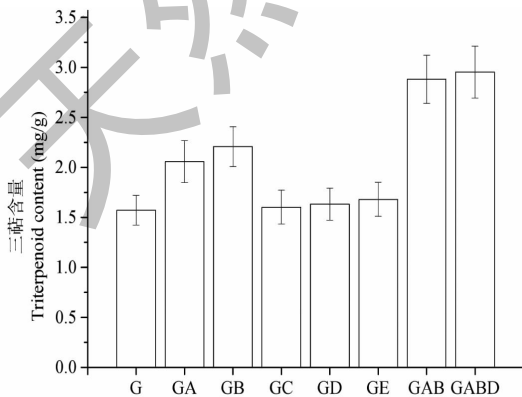


图2 灵芝发酵产物的三萜含量

Fig. 2 Triterpenoid content of *G. lucidum* fermentation product

子D可能有刺激灵芝菌丝体合成三萜的作用,但作用不显著。

2.1.3 胁迫因子对超氧阴离子自由基清除率的影响

图3为各试验组灵芝发酵产物5%稀释液的超氧阴离子自由基清除率。GB、GD组的超氧阴离子自由基清除率都比G组高,且有显著差异($P < 0.05$),说明胁迫因子B、D能够提高灵芝发酵产物的清除自由基活性。GA组与G组几乎没有差异,GB组和GAB组几乎没有差异,说明胁迫因子A对超氧阴离子自由基清除率没有影响。

比较图1、图2和图3,可见胁迫因子对超氧阴离子自由基清除率的影响与胁迫因子对灵芝多糖或灵芝三萜的影响都没有相似趋势,说明可能另有活性成分起清除超氧阴离子自由基的作用。

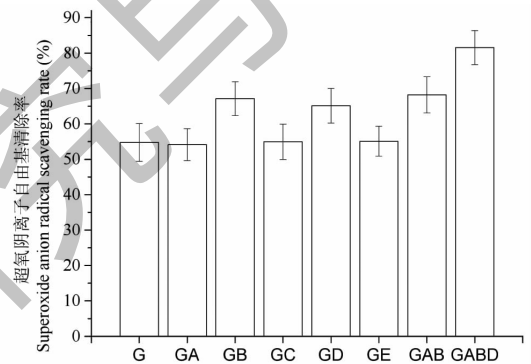


图3 灵芝发酵产物5%稀释液的超氧阴离子自由基清除率

Fig. 3 Superoxide anion radical scavenging rate of 5% dilution of *G. lucidum* fermentation product

2.1.4 胁迫因子对糖化抑制率的影响

图4为各试验组灵芝发酵产物5%稀释液的糖化抑制率。GA、GB组的糖化抑制率比G组高,但是都没有显著差异。GAB和GABD组的糖化抑制率

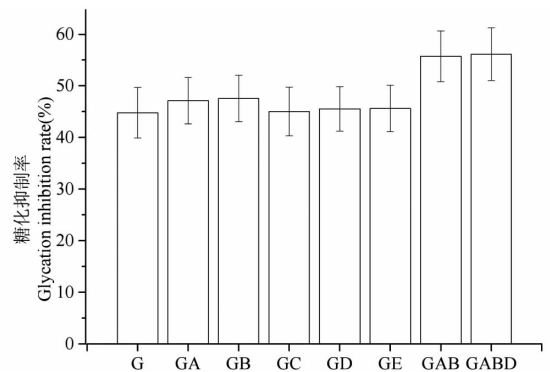


图4 灵芝发酵产物5%稀释液的糖化抑制率

Fig. 4 Glycation inhibition rate of 5% dilution of *G. lucidum* fermentation product

比 G 组高,且具有显著性差异($P < 0.05$)。试验结果说明胁迫因子 A 和 B 有提高糖化抑制率的作用;单一胁迫因子作用很弱,但是组合起来就有比较强的作用。

比较图 2 和图 4,可见胁迫因子对糖化抑制率的影响与胁迫因子对灵芝三萜的影响有相似的趋势,说明抑制糖化反应的活性成分很可能就是灵芝三萜。

综上,胁迫因子 A、胁迫因子 B、胁迫因子 D 对提高灵芝发酵产物的活性成分含量或生物活性有显著效果,最优技术方案为这三个胁迫因子的组合。

表 5 皮肤封闭型斑贴测试结果
Table 5 Skin-occlusive patch test results

组别 Group	观察时间 Observation time(h)	斑贴试验不同反应级别人数 Number of people with different levels of response in patch test				
		0	1	2	3	4
受试物 Test object	0.5	31	0	1	0	0
	24	31	0	1	0	0
	48	32	0	0	0	0
空白对照 Blank control	0.5	32	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0

表明试验产品具有减少皮肤黑色素含量(提亮)的效果。使用试验产品 6 周后,与 0 周相比,皮肤颜色 b 值下降了 4.71% 且具有统计学差异($P < 0.05$),表明试验产品具有改善皮肤发黄(祛黄)的效果。使用试验产品 2 周后,与 0 周相比,皮肤弹性值增加了 6.96% 且具有统计学差异($P < 0.05$),表明试验产品具有增加皮肤弹性(紧致)的效果。详细结果见表 6~8。VISIA 面部分析仪照片能直观地呈现受试者皮肤外观,通过照片能看到从第 0 周到第 6 周受试者皮肤逐渐变得有光泽、暗黄色逐渐褪去。

表 6 皮肤黑色素指数($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Skin melanin index($\bar{x} \pm s, n = 12$)

观察时间 Observation time	黑色素指数 Melanin index	变化率 Rate of change
0 周	615.87 ± 24.25	-
2 周	614.98 ± 26.49	-0.14%
4 周	608.01 ± 22.23**	-1.28%
6 周	612.00 ± 23.67	-0.63%

注:与 0 周相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,下同。

Note:Compared with week 0,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$,the same below.

因此,选择最优试验组 GABD 的灵芝发酵产物进行下一步人体皮肤测试。

2.2 人体皮肤测试

2.2.1 皮肤封闭型斑贴测试

32 例受试者中有 1 例出现 2 级皮肤反应,详细结果见表 5。根据《化妆品卫生规范》2007 版,可以判定受试物对人体没有皮肤不良反应。

2.2.2 皮肤功效测试

使用试验产品 4 周后,与 0 周相比,皮肤黑色素指数下降了 1.28% 且具有显著性差异($P < 0.01$),

表 7 皮肤颜色 b^* 值($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 7 Value b^* of skin color($\bar{x} \pm s, n = 12$)

观察时间 Observation time	皮肤颜色 b^* 值 Value b^* of skin color	变化率 Rate of change
0 周	20.33 ± 1.59	-
2 周	20.54 ± 2.05	1.02%
4 周	20.38 ± 2.57	0.20%
6 周	19.38 ± 2.11*	-4.71%

表 8 皮肤弹性($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 8 Skin elasticity($\bar{x} \pm s, n = 12$)

观察时间 Observation time	皮肤弹性值 Skin elasticity	变化率 Rate of change
0 周	49.08 ± 8.68	-
2 周	52.50 ± 8.51*	6.86%
4 周	51.54 ± 6.21	5.01%
6 周	53.42 ± 8.26*	8.83%

3 讨论与结论

本文通过模拟灵芝的野外生境胁迫来设计灵芝

菌丝体的液态发酵工艺。传统的开发思路只注意创造有利于菌丝体生长的培养条件,而本研究的关注点则是在发酵罐内模拟灵芝野外生境中存在的不利因素。在这个技术思路下,发酵过程被分为前后两段:前段提供适宜灵芝菌丝体生长的培养条件,目的是获得较高的生物量;后段在发酵罐内施加胁迫因子以模拟野外生境中存在的不利因素,目的是刺激灵芝菌丝体生产灵芝三萜等次级代谢产物。模拟哪些不利因素,以及如何在发酵罐内模拟野外生境胁迫是本研究的重点。

在本研究中,胁迫因子 A 的设计思路是模拟野外生境的微生物侵扰。相似地,高兴喜等学者以真菌诱导子刺激灵芝菌丝体生产三萜类物质^[9],这也是模拟野生环境中的微生物侵扰。但是真菌诱导子对人体皮肤可能有刺激性,而植物乳杆菌则在食品和化妆品领域都已有广泛应用,相比之下后者更安全。胁迫因子 B 和 C 的设计思路都是模拟野外生境的虫咬,但只有因子 B 能提高灵芝活性成分的生产量。相似地,刘高强等学者以蜚螂乙醚提取物刺激灵芝菌丝体生产三萜类物质^[10],这也是模拟野生环境中的虫咬。但是蜚螂乙醚提取物对人体皮肤可能有刺激性,而几丁质酶则是食品级酶制剂,相比之下本研究所用的胁迫因子 B 更安全。胁迫因子 D 的设计思路是模拟野外生境的温度变化。根据试验结果,虽然胁迫因子 D 对提高灵芝多糖和灵芝三萜产量的效果并不明显,但是对提高清除自由基活性却有明显的效果。说明温度升高对灵芝也可能起到了胁迫作用,只是不体现在多糖和三萜的产量上。胁迫因子 E 的设计思路是模拟野外生境的 pH 变化。但是根据试验结果,胁迫因子 E 对提高灵芝活性成分产量或生物活性都没有明显效果。

经过筛选,本研究得出的最优方案是组合使用胁迫因子 A、胁迫因子 B、胁迫因子 D。利用此方案得到的灵芝发酵产物富含灵芝多糖和灵芝三萜,具有较高的超氧阴离子自由基清除率和糖化抑制率。超氧阴离子自由基是人体中自然产生的主要的自由基,能造成细胞膜损伤、脂褐素堆积、生物大分子交联聚合、免疫功能降低,是人体内源性衰老的一个重要因素^[11-14]。人体内源性衰老的另一个重要因素则是蛋白质糖化反应(简称糖化)。糖化是游离糖自发地连接到蛋白质的过程,会降低蛋白质的稳定性和功能性,例如导致胶原蛋白交联变性而失去弹性,导致抗氧化酶、DNA 修复酶发生功能损伤^[15-17]。

因此,本研究最优方案得到的灵芝发酵产物应用在化妆品中对皮肤有抗衰老的功效,皮肤功效测试结果已对此给予了证明。

与开发产品相比,本文更重要的意义在于证明了模拟野外生境胁迫这个技术思路的可行性。该技术思路不仅适用于灵芝,很有可能也适用于其他大型真菌。

参考文献

- 1 Bao C, Xie CY. Research status of biological characteristics, liquid fermentation and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* [J]. Edible Med Mushrooms (食药菌), 2020, 28: 107-111.
- 2 Luo J, Lin ZB. Advances of pharmacological effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 574-578.
- 3 Jiang N, Xu XY, Wei W, et al. *Ganoderma lucidum* extract can resist skin tissue senility [J]. Sichuan J Zool (四川动物), 2016, 35: 585-587.
- 4 Jiang XN, Li G, Li X. Applications and development trends of *Ganoderma lucidum* in cosmetics [J]. Edible Fungi China (中国食用菌), 2019, 38: 1-5.
- 5 Qian R Z, Yang SC, Zhang GP, et al. A preliminary study in effects of *Ganoderma lucidum* unguent on microvascular blood flow and water content of the skin [J]. J Chin Microcirc (中国微循环), 1997, 2: 140-142.
- 6 Zhong LY. Study on fermentation technology of *Ganoderma* and its moisturizing efficacy evaluation [D]. Guangzhou: South China Agricultural University (华南农业大学), 2016.
- 7 Xu JQ, Cao Z, Wang R, et al. The optimization of liquid medium and technology of drink processing of *Ganoderma lucidum* [J]. Food Ind (食品工业), 2019, 40: 104-108.
- 8 Xuan HZ, Sang Q, Ma JJ. Anti-oxidation study of different bee products measured by pyrogallol autoxidation method [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2008, 4: 137-139.
- 9 Gao XX, Liu DL, Wang Y, et al. A liquid fermentation method for *Ganoderma lucidum* mycelium using fungal inducers to increase the content of ganoderic acid (一种利用真菌诱导子提高灵芝酸含量的灵芝菌丝体液体发酵方法): CN200810138571. 6 [P]. 2009-01-28.
- 10 Liu GQ, Wang XL, Han WJ. A method for preparing triterpenoid lucidone C from *Ganoderma lucidum* fermentation broth (一种从灵芝发酵液中制备三萜类物质赤芝酮 C 的方法): CN200910305177. 1 [P]. 2009-12-30.