

翅鳞伞培养条件响应面法优化研究

王允祥 陆兆新*

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要: 在 Plackett-Burman 实验设计结果基础上, 采用响应曲面法 (Response Surface Methodology, RSM) 对影响翅鳞伞 (*Pholiota squarrosa*) AS 5.245 发酵胞外多糖与菌丝生长的关键影响因素最佳水平范围进行了研究和探讨。通过对胞外多糖曲面方程以及菌丝干重二次多项回归方程求解得知, 在自变量培养温度、培养时间和装液量分别为 28.07℃、8.79 d 和 68.51 mL 时, 翅鳞伞胞外多糖的最大预测值为 1062.69 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 发酵醪; 27.60℃、9.42 d 和 54.20 mL 时, 该菌菌丝浓度可达 11.32 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 发酵醪; 而在 27.62℃、9.19 d 和 64.10 mL 的工艺条件下, 每毫升发酵醪则可同时获得 1,050.64 μg 的胞外多糖和 11.10 mg 的干菌丝。上述预测值不仅被统计学方法所验证, 也被后续实验所证实。

关键词: 多糖, 翅鳞伞, 优化, 响应曲面法, Box-Behnken 设计, Plackett-Burman 实验设计
中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0042-06

Optimization of Cultivation Conditions for Extracellular Polysaccharide and Mycelium Biomass by *Pholiota Squarrosa*

WANG Yun-Xiang LU Zhao-Xin*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Response surface methodology (RSM) based on a three-level three-factor Box-Behnken design of experiments was used to optimize the extracellular polysaccharide content and the mycelium biomass by submerged cultivation using *Pholiota squarrosa* AS 5.245. The critical factors selected for the investigation were temperature, time of cultivation and volume of medium, based on the results of our previous Plackett-Burman design. The objectives of this present work were to locate optimum levels of these process parameters, and to find out interactions among them for enhancement of the yield of extracellular polysaccharide and mycelium biomass. By solving the regression equation and also by analyzing the response surface contour plots, the optimal process conditions were determined: under conditions of temperature, 28.07℃; cultivation time, 8.79 d and volume of medium, 68.51 mL, the prediction of extracellular polysaccharide content (EPC) by *Pholiota squarrosa* AS 5.245 was 1062.69 μg per milliliter of fermentation liquor. While cultivation temperature, time and volume of medium were 27.60℃, 9.42 d and 54.20 mL respectively, the mycelium biomass expressed as dry cell weight (DCW) was 11.32 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. In order to simultaneously obtain the maximum yield of EPC and DCW, the above conditions would be located at 27.62℃, 9.19 d and 64.10 mL. In these conditions, the maximum predicted yield of EPC and DCW were found to be 1050.64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 11.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. These predicted values were also verified by validation experiment.

Key words: Polysaccharide, *Pholiota squarrosa*, Optimization, Response surface methodology, Box-Behnken design, Plackett-Burman design

绝大多数真菌活性物质不仅存在于子实体中, 同样也可存在于培养菌丝体和发酵液中^[1], 真菌尤其是高等担子菌已成为人们寻找新的生物活性物质一个重要源泉^[2]。笔

* 联系人 Tel: 86-025-84396583, Fax: 86-025-84395155, E-mail: fmb@njau.edu.cn

收稿日期: 2004-01-06, 修回日期: 2004-03-09

者对多种担子菌提取物抗肿瘤效应的初步研究发现,翅鳞伞 AS 5.245 胞外粗多糖对小鼠 S-180 肉瘤具有一定的抑制作用,此现象国内外未见报道。该菌发酵培养较难,为了深入了解培养温度、时间及装液量对其生长和发酵胞外多糖的影响,优化培养条件,提高进一步研究抗肿瘤机理与结构功能所需的胞外多糖含量,本研究在原有 Plackett-Burman 实验设计以及中心旋转组合设计 (Central Composite Rotatable Design, CCRD) 基础上,借助实验设计软件 Design Expert 6.0.5,采用 Box-Behnken 响应面法对上述 3 个关键影响因子的最佳水平及其交互作用作了进一步的研究和探讨。该统计学实验设计方法是一种优化生物过程的综合技术,采用该法不仅可以建立连续变量曲面模型,对影响生物过程的因子及其交互作用进行评价,确定最佳水平范围^[3],而且所需的试验组数相对较少,可节省人力物力^[4]。近年来,RSM 虽被广泛地用于众多的生物过程优化中^[5-7],但关于翅鳞伞 AS 5.245 菌株培养条件的优化,国内外却未见报道。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

Pholiota squarrosa (Pers. ex Fr.) Quel. AS 5.245: 购自中国科学院微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

种子培养基:综合马铃薯培养基;摇瓶发酵培养基:麦芽糖 9.6 g,果糖 11.5 g,酵母膏 6.0 g,胰蛋白胨 2.0 g,NaNO₃ 0.5 g,MgSO₄ 0.5 g,ZnCl₂ 38.6 mg,MnCl₂ 100.0 μg,维生素 B₁ 30.0 mg,用双蒸水定容至 1 L,pH 5.3。

1.3 菌种培养及接种

取斜面试管菌种接种于培养皿中,25℃培养 12 d 后,用 Φ10 cm 无菌打孔器从平板上打孔取菌丝接种于盛有发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,50 mL 培养液接种 1 片。

1.4 菌丝干重及胞外多糖含量测定

按照实验设计时间要求,对发酵醪减压过滤,得菌丝体和滤液。将菌丝体 80℃干燥至恒重称量,以 mg·mL⁻¹ 发酵醪计。取滤液 10.0 mL,采用 Sevag 法脱蛋白至两相界面无膜出现为止(约 10 次),取 2.0 mL 该脱蛋白液自来水流水透析 2 d,蒸馏水透析 2 d 后,取出透析液定容至 20.0 mL,采用文献方法[8]测定多糖含量,以 μg·mL⁻¹ 发酵醪计。

1.5 实验设计

Plackett-Burman 实验结果表明,影响翅鳞伞发酵产糖的主要外界因子是培养温度 ($P=0.0143$),而影响其生长的关键因素为培养时间 ($P=0.0009$) 和装液量 ($P<0.0001$)。本实验欲在研究提高胞外多糖含量的同时,对该菌的生长繁殖也同时进行探讨,以了解培养过程中该菌菌丝生长与发酵胞外多糖之间的相互关系,因此,本实验的评价指标(响应值)为发酵醪液中的胞外多糖含量(Exopolysaccharide Content, EPC)以及表示菌丝生长量的菌丝干重(Dry Cell Weight, DCW)。考察因子(自变量)培养温度、时间和装液量分别以 A、B 和 C 代之,且每一自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 编码之(见表 1)。对于影响不显著的其它参数,如摇床转速、接种量等,皆选定在原先的合适水平,140 r/min 和每 50 mL 培养液接种 1 片菌丝。

表1 实验因素水平及编码

Factor	Symbol	Coded levels*		
		-1	0	1
Temperature (°C)	A	26	28	30
Fermentation time (days)	B	7	9	11
Volume of medium (mL)	C	50	75	100

* 编码值与真实值之间的关系为：A = 培养温度 (28.0) / 2.0, B = 培养时间 (9.0) / 2.0, C = 装液量 (75.0) / 25.0

设该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为：

$$\hat{Y} = C_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{j \leq i}^n b_{ij} x_i x_j \tag{1}$$

式中 \hat{Y} 为预测响应值； x_i 和 x_j 为自变量编码值； c_0 为常数项； a_i 为线性系数； b_{ij} 为二次项系数； n 为因子数，在本实验取值3。按照 Box-Behnken 实验设计的统计学要求，需要17组试验对方程(1)的各项回归系数进行回归拟合。

2 结果与分析

实验设计及结果见表2，利用 Design Expert 软件对表2数据进行二次多元回归拟合，分别获得了翅鳞伞 EPC 预测值 \hat{Y}_{EPC} 和 DCW 预测值 \hat{Y}_{DCW} 对编码自变量培养温度、时间和装液量的二次多项回归方程(2)与方程(3)：

$$\hat{Y}_{EPC} = 1047.76 - 13.49A - 50.41B - 95.85C - 88.89A^2 - 206.75B^2 - 176.93C^2 - 124.96AB - 22.72AC - 41.18BC \tag{2}$$

$$\hat{Y}_{DCW} = 10.19 - 1.51A + 1.04B - 2.09C - 2.44A^2 - 3.13B^2 - 1.12C^2 - 1.68AB - 1.06AC + 0.067BC \tag{3}$$

表2 Box-Behnken 实验设计以及 EPC 和 DCW 的实测值与预测值

Std	Temp. (°C)	Time (days)	Medium Vol. (mL)	EPC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		DCW ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
				Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	-1	-1	0	637.10	691.06	3.24	3.42
2	1	-1	0	906.90	914.00	3.83	3.75
3	-1	1	0	847.26	840.16	8.79	8.86
4	1	1	0	617.22	563.27	2.65	2.47
5	-1	0	-1	892.70	868.56	8.36	9.18
6	1	0	-1	864.30	887.02	7.20	8.27
7	-1	0	1	745.02	722.30	8.19	7.12
8	1	0	1	625.74	649.88	2.78	1.96
9	0	-1	-1	798.98	769.16	8.06	7.06
10	0	1	-1	719.46	750.70	9.90	9.01
11	0	-1	1	691.06	659.82	1.85	2.74
12	0	1	1	446.83	476.65	3.96	4.96
13	0	0	0	1071.61	1047.76	10.32	10.19
14	0	0	0	1023.33	1047.76	10.21	10.19
15	0	0	0	1057.41	1047.76	10.36	10.19
16	0	0	0	1017.65	1047.76	10.09	10.19
17	0	0	0	1068.77	1047.76	9.97	10.19

上述两模型方程方差分析表明, 本实验所选用的 EPC 二次多项模型具有高度的显著性 ($p < 0.0001$), 校正决定系数 (r_{Adj}^2) 为 0.9411; 各项回归系数显著性检验表明: 试验因素对 EPC 的曲面效应皆显著, 培养时间和装液量的线性效应显著, 温度不显著, 而培养温度和时间的交互影响显著, 但其它皆不显著 (数据未显示)。预测菌丝生长量模型 (3) $p < 0.0006$, 其 r_{Adj}^2 为 0.8967, 且回归系数有意义。为了验证模型方程 (2) 和 (3) 的合适性及有效性, 在上述各因素实验水平范围内, 我们进行了 5 组不同组合的实际验证实验, 利用 SPSS 10.0 软件对实验结果 (数据未显示) 进行距离相关分析得知, EPC 实测值与预测值的相关系数 r 为 0.9694, 菌丝生长量为 0.9991, 证明此两模型是合适有效的, 并具有一定的实践指导意义。

2.1 胞外多糖含量 (EPC) 响应面分析与优化

方程 (2) 的响应曲面图及其等高线图见图 1 ~ 图 2, 通过该组动态图即可对两因素交互影响翅鳞伞发酵胞外多糖的效应进行分析与评价, 并从中确定最佳因素水平范围。

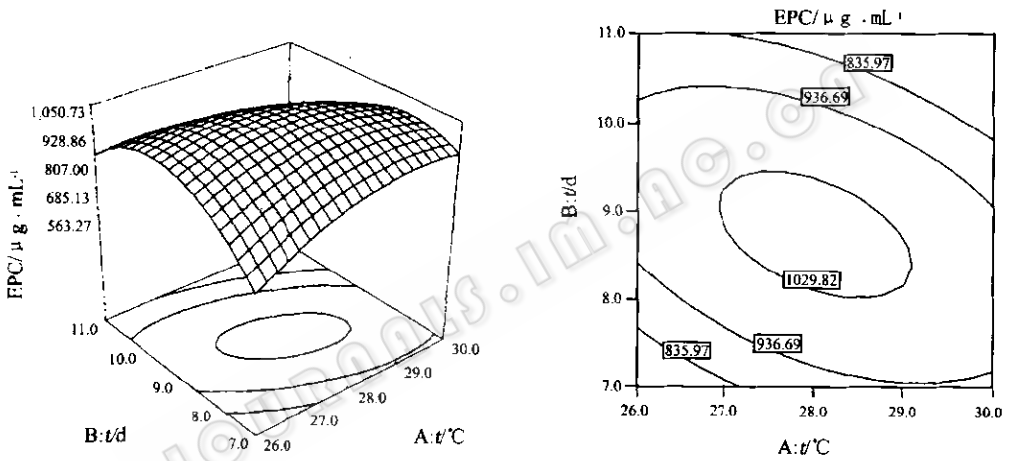


图 1 温度和培养时间交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

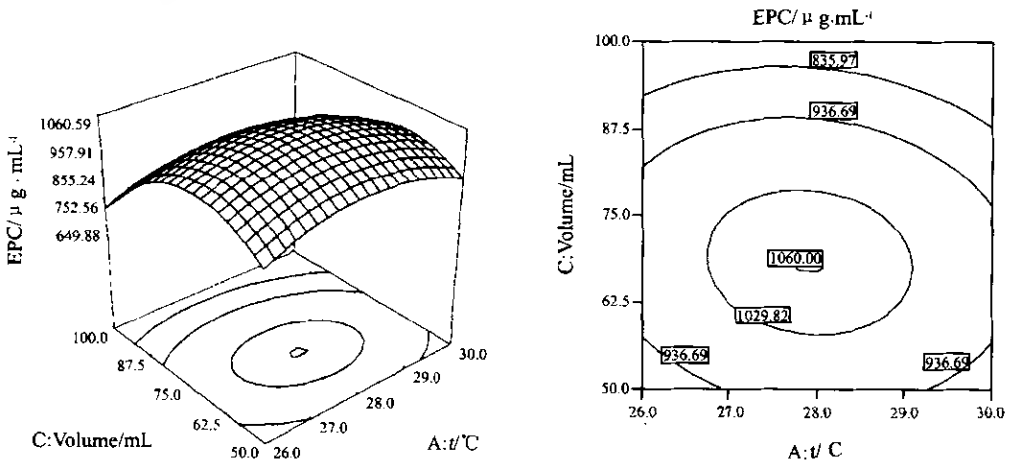


图 2 温度和装液量交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

图 1 显示了在装液量为最佳 (68.51 mL) 时, 培养时间与温度对 EPC 的交互影响效应。从其等高线图可以直观地看出此两因素的交互作用较显著, 因为等高线的形状反

映出交互效应的强弱大小，圆形表示两因素交互作用不显著，而椭圆形则与之相反^[9]。在培养温度较低时，获得较多 EPC 的时间大约在第 9.5 d，在培养温度较高时为第 8 d，由此可知，在本实验水平范围内，适当提高培养温度有利于翅鳞伞胞外多糖的产生，缩短培养时间。EPC 缓慢降低的原因可能是醪中多糖复被该菌利用之故。

在培养时间为 8.79 d 时，装液量和培养温度对 EPC 的交互影响见图 2。由图可知，装液量和培养温度对翅鳞伞 EPC 的交互作用较显著，但在整个装液量实验水平范围内，培养温度对胞外多糖的影响不显著，而较多或较少的装液量皆不利于多糖的产生。

2.2 菌丝生长量 (DCW) 响应面分析与优化

实验因素培养温度、时间及装液量对翅鳞伞 DCW 的交互影响见图 3 ~ 图 5。

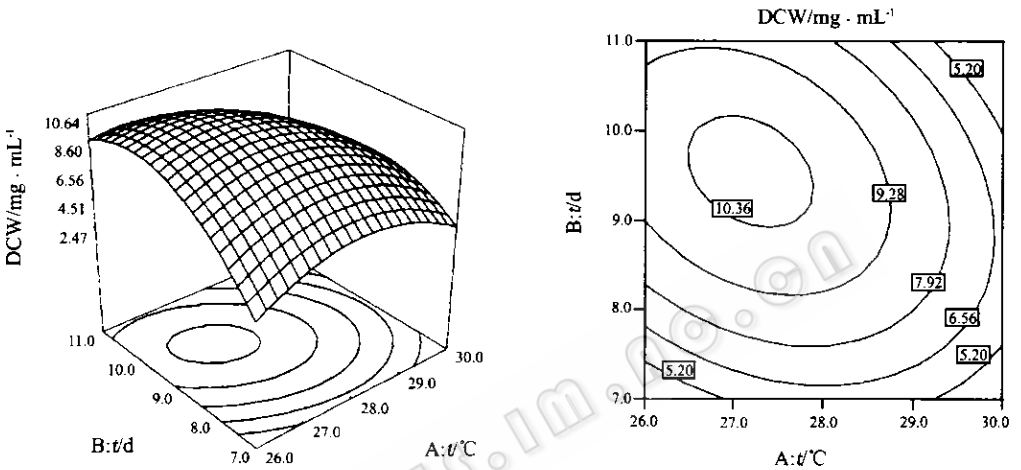


图 3 温度和培养时间交互影响 DCW 的曲面图及其等高线图

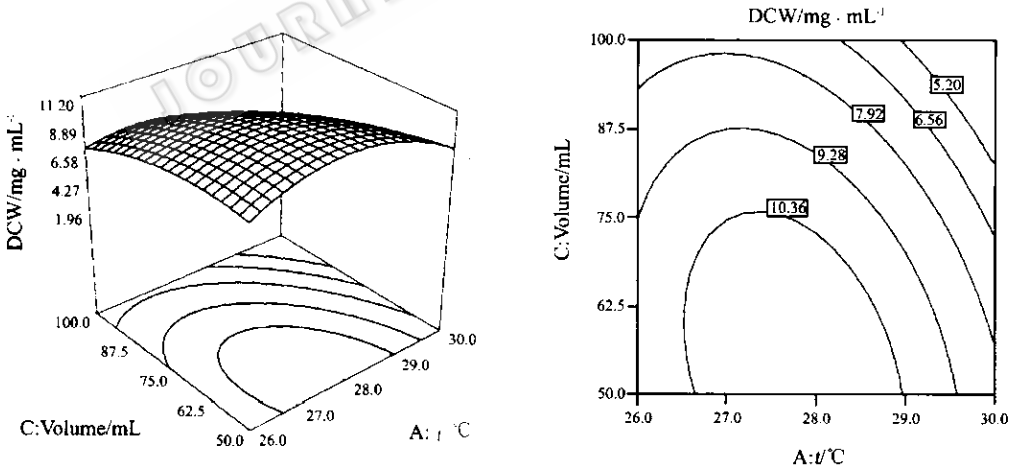


图 4 温度和装液量交互影响 DCW 的曲面图及其等高线图

由图 3 可见，在装液量为 54.20 mL 时，翅鳞伞菌丝生长的最适温度为 27.5°C 左右，在培养温度位于实验水平下限时，培养的第 7 d 至第 9.5 d 菌丝生长较快，每毫升发酵醪约增加菌丝量 5.16 mg，第 9.5 d 以后菌丝自溶，DCW 随时间延长而减少；而在培养温度位于实验水平上限时，在实验时间水平范围内，菌丝增量并不显著，基本位于 7 mg 左右。由图 4 和图 5 可见，无论是在本次实验温度水平范围内，还是在培养时间水

平范围内,翅鳞伞菌丝生长量皆随著装液量的增加而减少,说明较少的装液量有利于菌丝的生长,其原因可能是由于装液量相对增多造成培养基中溶氧不足,从而抑制了菌丝的繁殖。

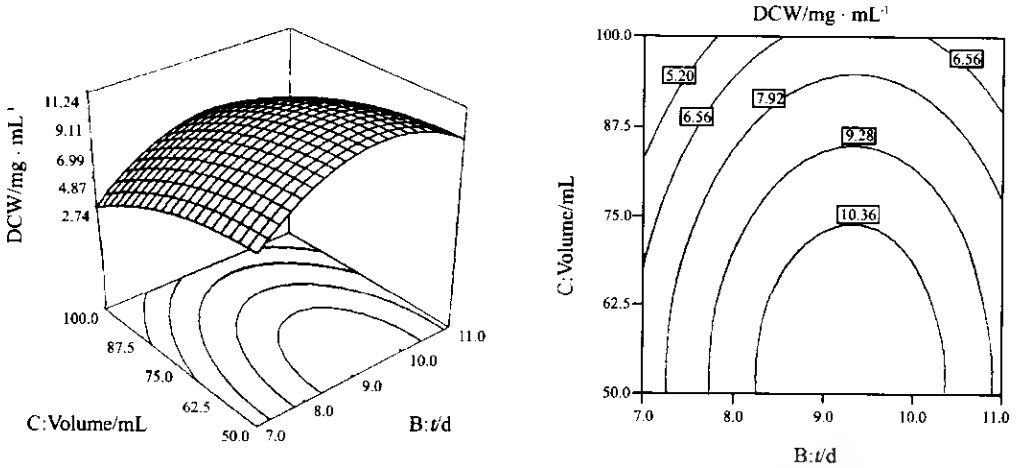


图5 培养时间和装液量交互影响DCW的曲面图及其等高线图

3 结论

本研究对影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株生长和发酵产糖的 3 个关键外界影响因素培养温度、时间和装液量的最佳水平及其交互作用进行了深入的探讨。利用统计学方法建立了该菌生长和发酵产糖的二次多项数学模型,通过对模型方程的 3-D 图及其等高线图进行研究,发现在培养温度为 $27.8^{\circ}\text{C} \sim 28.6^{\circ}\text{C}$, 培养时间为 $8.5 \sim 9 \text{ d}$ 和装液量为 $66.5 \sim 70.5 \text{ mL}$ 的工艺条件下,每毫升发酵醪中的胞外多糖含量可达 $1,060 \mu\text{g}$ 以上;而获得本次实验最大菌丝量 ($10.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 发酵醪) 的最佳条件则为 $26.4^{\circ}\text{C} \sim 28.8^{\circ}\text{C}$, $8.2 \sim 10.5 \text{ d}$ 和 $50 \sim 76 \text{ mL}$ 。利用 Design Expert 软件,分别对方程 (2) 与方程 (3) 解逆矩阵即可得知:在培养温度、时间和装液量分别为 28.07°C 、 8.79 d 和 68.51 mL 时,翅鳞伞 AS 5.245 胞外多糖的最大预测值为 $1062.69 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 发酵醪;在 27.60°C 、 9.42 d 和 54.20 mL 的工艺条件下,该菌菌丝浓度预测可达 $11.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 发酵醪。通过对两方程的联合求解即可同时获得 $1,050.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胞外多糖和 $11.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌丝量,此时培养温度、时间和装液量分别为 27.62°C 、 9.19 d 和 64.10 mL 。

参考文献

- [1] Wasser S P. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, **60**: 258 ~ 274.
- [2] Reshetnikov S V, Wasser S P, Tan K K. Int J Med Mushrooms, 2001, **3**: 361 ~ 394.
- [3] Annadurai G. Bioproc Eng, 2000, **23**: 451 ~ 455.
- [4] Ambati P, Ayyanna C. World J of Microbiol & Biotechnol, 2001, **17**: 331 ~ 335.
- [5] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年. 微生物学通报, 2002, **29** (5): 17 ~ 21.
- [6] Rodrigues R C L B, Felipe M G A, Silva J B A, et al. Proc Biochem, 2003, **38**: 1231 ~ 1237.
- [7] Kumar D, Jain V K, Shanker G, et al. Proc Biochem, 2003, **38**: 1731 ~ 1738.
- [8] 董群, 郑丽伊, 方积年. 中国药理学杂志, 1996, **31** (9): 550 ~ 553.
- [9] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. Biochem Eng J, 2001, **9**: 17 ~ 23.