

运用多元数学模型优化灰树花发酵培养基组成的研究*

崔凤杰^{1,2} 许泓瑜² 许正宏² 敖宗华² 陶文沂^{1,2}

1(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡,214036) 2(江南大学生物工程学院生物制药研究室,无锡,214036)

摘 要 利用 Box-Behnken 3×3 设计优化了影响灰树花深层发酵菌丝体和胞外多糖生产的主要培养基组成,碳源(葡萄糖)、氮源(蛋白胨)和无机盐(KH_2PO_4),响应面分析结果表明,各因素及其交互作用对响应值灰树花菌丝体和胞外多糖产量均存在显著的相关性。通过典型性分析,获得最大菌丝体量(17.61 g/L)时,培养基组成为:葡萄糖 45.2 g/L , KH_2PO_4 2.97 g/L , 蛋白胨 6.58 g/L , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L 和玉米浆 15 g/L ;而获得最佳胞外多糖量(1.326 g/L)时的培养基组成为:葡萄糖 58.6 g/L , KH_2PO_4 4.06 g/L , 蛋白胨 3.79 g/L , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L 和玉米浆 15 g/L 。与其他实验组的结果相比,优化后的灰树花菌丝体与胞外多糖的量都有较大的增加。15 L 发酵罐扩大培养的结果表明,在优化培养基组成的条件下,扩大培养后的菌丝体产量最大值达 22.50 g/L 。

关键词 灰树花, 深层发酵, 培养基优化, 响应面, Box-Behnken

灰树花(*Grifola frondosa*)又名栗子蘑,贝叶多孔菌,日本称舞茸^[1]。由于其具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖及免疫调节等诸多生理活性^[2],目前受到广泛关注。以往药用真菌大多采用固体栽培技术进行生产,栽培4~6个月出菇^[3],但是近些年来,深层发酵培养药用真菌技术由于其具有发酵周期短、产品质量稳定以及占地面积小等优点逐渐获得认可^[4],同时还能生产同样具备一定活性的胞外多糖^[5]。

目前对药用真菌的生长和目的产物的产量进行优化的研究已有许多^[5,6]。响应曲面法(RSM)是统计设计实验技术的合成^[7],尽管已被广泛地应用于诸多发酵条件优化中,但关于灰树花菌株的生长条件以及培养基组成的优化,国内外还未曾见报道。

前期研究发现^[8~9],灰树花生长的最适碳氮源分别为葡萄糖和蛋白胨,并且影响灰树花菌丝体和胞外多糖产量的主要因素有碳源(葡萄糖)、氮源(蛋白胨)和无机盐(KH_2PO_4)。文中主要采用响应曲面法优化灰树花发酵培养基组成。

1 材料与方法

1.1 材 料

灰树花(*Grifola frondosa* GF9801)为本实验室保藏菌种;LS-B50型立式圆形压力蒸气灭菌锅,上海医用核子仪器厂;HYG-11型转式恒温调速摇瓶柜,上海新星自动化控制设备有限公司;15 L 搅拌式发

酵罐,Biostat C10-3,德国博朗公司;生化培养箱,广东省医疗器械厂;高速离心机 HITACHI CR22G,日本 HITACHI 公司;SIGMA 高速离心机,美国 SIGMA 公司;真空浓缩仪 BUCHI Rotavapor R-200,瑞士 BUCHI 公司;冷冻干燥仪, EZ585Q, 美国 FTS System 公司;高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L ,葡萄糖 20 g/L ,蛋白胨 2 g/L , KH_2PO_4 2 g/L , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L ,琼脂 20 g/L 。种子培养基:葡萄糖 20 g/L ,蛋白胨 2 g/L , KH_2PO_4 2 g/L , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L ,玉米浆 15 g/L , pH 自然。

1.2.2 种子培养

采用 250 mL 摇瓶,装液量 100 mL ,每瓶用灭菌的自制接种铲接种黄豆大小的菌丝体 10 块。 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 150 r/min 培养 6 d,收集种子液。

1.2.3 菌丝体干重和胞外多糖的测定

所取样品在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以 $10\ 000 \text{ r/min}$ 高速离心 10 min ,收集沉淀物,用去离子水洗涤 3 次,真空干燥箱 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重,所得即为菌丝体干重。所得滤液进 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,浓缩后,加入 3 倍体积无水乙醇,剧烈搅拌, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜沉淀,高速离心醇沉液,收集沉淀,真空干燥箱 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重,所得即为胞外多糖含量。各测定指标测定 2 次,取其均值。

1.2.4 响应曲面法实验设计

主要考察碳源(葡萄糖)、氮源(蛋白胨)和无机盐(KH_2PO_4)3 因素组成对灰树花菌丝体量和胞外多糖

第一作者:博士研究生(陶文沂教授为本文通讯作者)。

* 江苏省无锡市自然科学基金资助项目(No. CK030002)

收稿日期:2005-12-05

含量的影响, 并采用 SAS (SAS Package, Version 8.01)对实验数据进行回归分析。每一自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 各自变量的编码如表 1 所示。按照 Box-Behnken 实验设计^[13]的统计学要求, 各组实验的安排见表 2。实验中各模型通过最小二乘法拟合二次多项方程可以表达为:

$$Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j (1)$$

其中 Y 为响应值(灰树花菌丝体量和胞外多糖量), A_0, A_i, A_{ii}, A_{ij} 为方程系数, $X_i, X_j (i=1, 3; j=1, 3; i \neq j)$ 为自变量编码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 R^2 表达, 其统计学上的显著性由 F 值检验; 采用 SAS 典型性分析预测灰树花菌丝体量和胞外多糖量的最大值以及获得最大值时培养基的

组成。

3 结果与讨论

3.1 灰树花菌丝体量的响应面优化

表 2 中所示为不同发酵培养基组成下, 响应值菌丝体量和胞外多糖的相应变化。其中第 5 组菌丝体量最低(5.90 g/L), 第 12 项中测得菌丝体量为最大值(16.69 g/L)。

表 1 试验因素水平及编码

变量/g·L ⁻¹	代码	编码水平		
		-1	0	1
葡萄糖	X ₁	10	30	50
KH ₂ PO ₄	X ₂	1	3	5
蛋白胨	X ₃	1	4	7

表 2 Box-Behnken 试验设计

组别	变量 编码水平			响应值					
	X ₁	X ₂	X ₃	菌丝体量/g·L ⁻¹			胞外多糖含量/g·L ⁻¹		
				I	II	平均值	I	II	平均值
1	-1	-1	0	8.12	8.75	8.43±0.45	0.751	0.814	0.782±0.045
2	-1	1	0	14.80	14.19	14.49±0.43	0.872	0.877	0.874±0.004
3	1	-1	0	13.51	13.58	13.55±0.05	1.257	1.014	1.136±0.171
4	1	1	0	16.04	15.90	15.97±0.10	1.243	1.248	1.246±0.005
5	0	-1	-1	5.88	5.93	5.90±0.04	0.689	0.711	0.700±0.016
6	0	-1	1	15.85	15.63	15.73±0.16	0.988	1.014	1.002±0.019
7	0	1	-1	13.01	13.08	13.05±0.05	0.975	0.922	0.948±0.037
8	0	1	1	16.41	16.43	16.42±0.01	1.168	1.163	1.166±0.003
9	-1	0	-1	9.78	10.34	10.06±0.39	0.537	0.606	0.572±0.048
10	1	0	-1	12.40	12.51	12.45±0.08	1.181	1.182	1.182±0.001
11	-1	0	1	12.76	12.56	12.66±0.14	0.905	0.887	0.896±0.013
12	1	0	1	16.75	16.64	16.69±0.09	1.214	1.166	1.190±0.034
13	0	0	0	16.04	16.03	16.03±0.01	1.156	1.150	1.153±0.004
14	0	0	0	15.69	17.72	15.71±1.43	1.178	1.177	1.178±0.001
15	0	0	0	15.97	15.98	15.97±0.02	1.159	1.174	1.166±0.011

表 3 灰树花菌丝体量回归方程系数取值及结果分析

Term	Coefficients estimated	P	t-statistic
Intercept	15.93	<0.000 1 * *	27.28
A ₁	1.63	0.006 1 * *	4.55
A ₂	2.04	0.002 3 * *	5.71
A ₃	2.51	0.000 9 * *	7.01
A ₁₂	-1.31	0.054 7	-2.50
A ₁₂	-0.91	0.131 8	-1.80
A ₁₃	0.41	0.451 8	0.82
A ₂₂	-1.50	0.035 7 *	-2.85
A ₂₃	-1.62	0.024 2 *	-3.19
A ₃₃	-1.65	0.025 8 *	-3.13

* * 在 1% 水平显著; * 在 5% 水平显著。

通过 F 检验, 回归模型的 $P < 0.01, R^2 = 0.964 9$, 表明拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 能准确地预测实际情况。回归方程常数项和系数的 t 值分析结果如表 4 所示, 分析表明, 在 $P < 0.05$

下, $A_1, A_2, A_3, A_{22}, A_{23}$ 和 A_{33} 显著, 其中常数项高度显著 ($P < 0.01$), 并且存在显著的交互项 ($X_2 X_3$)。因此综合考虑, 由显著项所组成的菌丝量预测值 $Y_{biomass}$ 对自变量葡萄糖 (X_1)、 KH_2PO_4 (X_2)、蛋白胨 (X_3) 的多元回归方程(2):

$$Y_{biomass} = 15.93 + 1.63X_1 + 2.04X_2 + 2.51X_3 - 1.50X_1^2 - 1.62X_2X_3 - 1.64X_3^2 \quad (2)$$

方程(2)中系数 A_3 较大, 表明 X_3 (蛋白胨) 的浓度对菌丝体量的增加最有显著性意义, 并且一次项系数为正值, 可以认为一次线性方程主要对菌丝体量起到正作用, 而部分二次项 (A_{22}, A_{33}) 和交互项 (A_{23}) 则对其起到负作用。

模型的三维曲线图和与之对应的等高线图可比较直观地解释各变量和变量之间对响应值的影响。

等高线图同时可以揭示出各变量之间交互作用的显著性。在葡萄糖含量保持固定的情况下, KH_2PO_4 (X_2) 和蛋白胨 (X_3) 对菌丝体量的影响模型的三维曲线图如图 1 所示, 通过所对应的等高线图(图 2), 可以清楚看到, KH_2PO_4 (X_2) 和蛋白胨 (X_3) 的交互作用可以显著地影响灰树花菌丝体量, 当二者在一定范围内(蛋白胨 = 5.53 ~ 5.93 g/L, coded as 0.51 ~ 0.64; KH_2PO_4 = 3.63 ~ 3.85 g/L, coded as 0.32 ~ 0.43)时, 菌丝量可以得到最大值, 为 17 g/L。当 2 因素高于或者低于这个范围时, 均不能再提高菌体量。其他因素之间(KH_2PO_4 -葡萄糖, 蛋白胨-葡萄糖)的相互作用于灰树花菌丝体量趋势与图 1 和图 2 类似。与前期工作结果基本相符。

典型性分析是能求出响应面的拐点, 并能判断它是最大点、最小点还是鞍形点的数学手段。采用典型性分析实验结果, 发现所求出的为最大点(7.61 g/L)。最优条件下的培养基中含葡萄糖 45.2 g/L, KH_2PO_4 2.97 g/L 和蛋白胨 6.58 g/L。

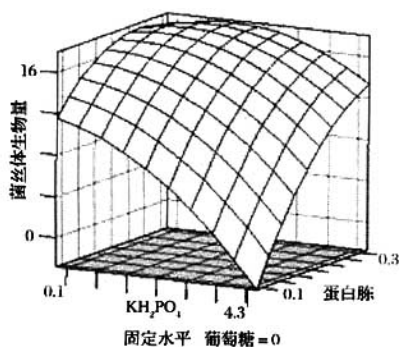


图 1 蛋白胨与 KH_2PO_4 对灰树花菌丝体量影响的响应面图

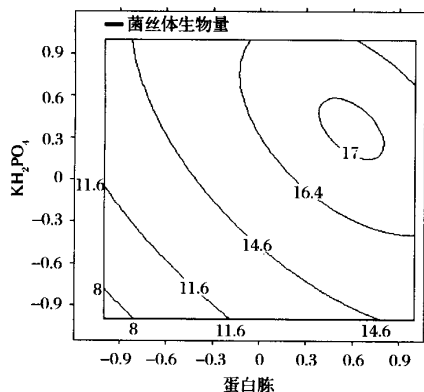


图 2 蛋白胨与 KH_2PO_4 对灰树花菌丝体量影响的等高线图

3.2 灰树花胞外多糖量的响应面优化

将表 2 中灰树花胞外多糖产量进行回归分析, 方差分析该回归模型显著; 相关系数为 97.60 %。显著性分析说明, 各因素的一次项、二次项以及 X_1X_3 的交互项也显著影响胞外多糖合成。因此由显著项所组成的菌丝量预测值 $Y_{\text{exo-polymer}}$ 对自变量葡萄糖 (X_1)、 KH_2PO_4 (X_2)、蛋白胨 (X_3) 的多元回归方程 (3):

$$Y_{\text{exo-polymer}} = 1.164 + 0.204X_1 + 0.077X_2 + 0.106X_3 - 0.074X_1^2 - 0.081X_2^2 - 0.079X_1X_3 - 0.130X_3^2 \quad (3)$$

由方程可以看出, 该模型中各因素的一次项对灰树花胞外多糖的合成具有正影响, 而二次项和交互项则呈负影响。

根据模型方程 (3) 可以作出响应曲面图及其等高线图。同样, 根据一系列图可评价实验因素对灰树花胞外多糖的两两交互作用, 并可以确定各个因素的最佳水平范围。比如培养基中 KH_2PO_4 和蛋白胨的浓度对灰树花胞外多糖产量的影响如图 3 所示, 蛋白胨的浓度在 4.91 ~ 5.59 g/L、 KH_2PO_4 在 3.70 ~ 4.23 g/L 范围内, 灰树花胞外多糖量变化不大, 但超过这个范围, 灰树花多糖产量呈急剧下降的趋势。典型性分析结果表明, 灰树花多糖在葡萄糖、 KH_2PO_4 和蛋白胨浓度分别为 58.6 g/L, 4.06 g/L 和 3.97 g/L 时能获得最大值(1.326 g/L)。

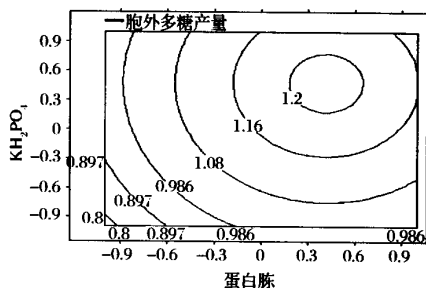


图 3 蛋白胨与 KH_2PO_4 对灰树花胞外多糖量影响的等高线图

3.3 模型验证

为了验证灰树花菌丝体量(方程 2)和胞外多糖模型(方程 3)的合适性和有效性, 需要对该模型在最优化的培养基组成条件下进行验证实验。灰树花菌丝体量的最佳培养基组成为: 葡萄糖 45.2 g/L, KH_2PO_4 2.97 g/L, 蛋白胨 6.58 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, 玉米浆 15 g/L, 3 次实验结果均值为 17.83 ± 0.17 g/L, 基本与模型预测值(17.61 g/L)相符。

同样,通过3次实验来考察获得最大胞外多糖产量的发酵培养基组成:葡萄糖 58.6 g/L, KH_2PO_4 4.06 g/L, 蛋白胨 3.79 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, 玉米浆 15 g/L, 实验结果表明,测定值为 1.321 ± 0.058 g/L, 也与模型预测值一致。表明此2模型是合适有效的,并具有一定的实践指导意义。

4 结 论

本研究利用统计学方法建立了灰树花菌丝生长和发酵胞外多糖的二次多项数学模型。通过对模型方程的3D图及其等高线图进行分析,获得了影响该菌生长与发酵产糖的最佳培养条件,并利用模型方程对该菌生长与发酵产糖趋势进行了预测。响应曲面法可以为其他药用真菌的生长及发酵胞外多糖培养条件进行优化提供参考依据。

参 考 文 献

- 1 Andrea T B, Judith S S, Robert M H, et al. Mushrooms, tumors, and immunity. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine [J]. 1999, 221: 281~293
- 2 Inoue A, Kodama N, Nanba H. Effect of maitake (*Grifola*

frondosa) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25: 536~540

- 3 Solomons G L. Submerged culture production of mycelial biomass [J]. Filamentous Fungi, 1975(1): 249~264
- 4 Kim D H, Yang B K, Jeong S C, et al. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus* [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23: 513~517
- 5 Tang, Y J, Zhong J J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharides and ganoderic acid [J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 31: 20~28
- 6 Wang Y X, Lu Z X. Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* Spp. ACCC50328 [J]. Proc Biochem, 2005, 40: 1 043~1 051
- 7 Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960 (2): 456~475
- 8 孙克,许正宏,敖宗华,等.灰树花发酵条件的研究[J].药物生物技术,2002(2):91~93
- 9 孙克,许正宏,敖宗华,等.营养条件对灰树花胞外多糖的影响[J].无锡轻工大学学报,2002,21:273~276

Optimization of the Medium Composition for Production of Mycelial Biomass and *exo*-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 Using Response Surface Methodology

Cui Fengjie^{1,2} Xu Hongyu² Xu Zhenghong² Tao Wenyi^{1,2}

1(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

2(Laboratory of Biopharmaceutics, School of biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT In this work, a three-level Box-Behnken factorial design was employed combining with response surface methodology (RSM) to optimize the medium composition for the production of the mycelial biomass and *exo*-polymer in submerged cultures by *Grifola frondosa* GF9801. A mathematical model was developed to show the effect of each medium composition and their interactions on the production of mycelial biomass and *exo*-polymer. The model estimated that a maximal yield of mycelial biomass (17.61 g/L) could be obtained when the concentrations of glucose, KH_2PO_4 , peptone were set at 45.2 g/L, 2.97 g/L, 6.58 g/L, respectively; while a maximal *exo*-polymer yield (1.326 g/L) could be achieved when setting concentrations of glucose, KH_2PO_4 , peptone at 58.6 g/L, 4.06 g/L and 3.79 g/L, respectively. These predicted values were also verified by validation experiments. Compared with the values obtained by other runs in the experimental design, the optimized medium resulted in a significant increase in the yields of mycelial biomass and *exo*-polymer. Maximum mycelial biomass yield of 22.50 g/L was achieved in a 15-L fermenter using the optimized medium.

Key words *Grifola frondosa*, submerged culture, medium optimization, response surface methodology, Box-Behnken design