

利用 SAS 软件优化桑黄发酵培养基

林百全 余晓斌

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘 要 利用 SAS 软件对桑黄菌的发酵培养基进行研究。首先, 运用 Plackett-Burman 设计法筛选出影响粗多糖产量的主要因素, 继而采用中心组合设计及响应面分析确定主要影响因子的最佳浓度。通过试验发现, 当豆饼粉 3.7%、玉米浆 0.6%、 CaCl_2 0.27% 时, 胞外粗多糖产量达到最大值 6.78 g/L, 较优化前的 5.24 g/L 提高了 29.4%。另外还对其胞外多糖含量、分子质量进行了测定。

关键词 桑黄菌, 响应面, 多糖

桑黄菌(*Phellinus linteus*)属担子菌亚门多孔菌科木层孔菌属^[1]。现代医学研究表明, 桑黄含有多糖、黄酮、香豆素类化合物、落叶松萜酸、麦角甾醇、甘氨酸等多种有效成分^[2-4]。Hwan-Mook KIM 等^[5]用 *Phellinus linteus* 的菌丝体胞外多糖(EPS)进行免疫学实验, 发现 EPS 不仅能够使 T 细胞增殖, 而且对不同类抗原的 T 细胞也有增殖作用, 并且增强了毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

桑黄是目前国际公认的生物抗癌领域中药效非常好的药用真菌^[6]。近年来, 国内外关于桑黄的药理作用的研究很多, 而液态发酵生产桑黄胞外多糖的报道并不多。韩国学者 Hwang 等^[7]通过液态发酵生产的胞外多糖产量为 3.3 g/L; 国内的樊锦艳^[8]对桑黄胞外多糖生产培养基只做了初步的研究, 优化后胞外多糖产量 2.18 g/L。文中主要采用 SAS 软件对桑黄菌的液态发酵培养基做了较深入研究, 以提高桑黄胞外多糖的产量。

1 材料与方法

1.1 材 料

桑黄菌株(*Phellinus linteus*)由本实验室筛选保存。

1.2 方 法

1.2.1 粗多糖含量测定

粗多糖含量: 取除去菌丝体的培养液离心, 留上清液, 将上清液浓缩至 1/5, 加乙醇沉淀。洗涤后, 60℃ 烘干称重, 计算公式为:

$$\text{粗多糖含量(g/mL)} = \frac{\text{粗多糖干燥物重(g)}}{\text{培养液取样体积(mL)}}$$

多糖测定: 采用苯酚-硫酸法^[9]。

1.2.2 相对分子质量测定

采用高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC), WATER-

S TM600 测定多糖相对分子质量。色谱条件: 色谱柱为 Ultrahydrogel Linear (7.8×300)mm 双柱串联, 进样量 100 μL, 流动相为 0.1 mol/L 硝酸钠溶液, 体积流量为 0.9 mL/min, 柱温 45℃, 示差折光检测器检测。

1.2.3 蛋白质质量测定

Folin-酚试剂法^[10], 以牛血清白蛋白为标准品。

1.2.4 发酵培养基优化方法

利用 SAS 软件设计二水平实验分析各因素的主效应。继而根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 进一步进行 3 因素 3 水平响应面分析试验。发酵培养基中其他组成为 (g/L): 蔗糖 40、玉米粉 10、麸皮 3、 KH_2PO_4 2。试验重复 3 次, 获得的胞外粗多糖产量响应值平均值用 SAS' RSREG 程序进行分析。

2 结果与讨论

2.1 二水平设计

用 SAS 软件的二水平设计分析蔗糖、豆饼粉、玉米粉、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、麸皮 6 个因素的主效应, 其他因素不变, 以胞外粗多糖产量的变化为响应值。试验结果表明豆饼粉、玉米浆粉、 CaCl_2 对多糖产量有显著影响。因此, 利用响应面分析对豆饼粉、玉米浆粉、 CaCl_2 3 个培养基组分进行更深入研究。

2.2 响应面分析

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 进一步进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 实验因素水平设计如表 1, 15 个试验点给出的实验结果如表 2。15 个实验点可以分为 2 类, 其一是析因点, 自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点, 共有 12 个析因点; 其二是 0 点, 为区域的中心点, 0 点试验重复 3 次, 用以估计试验误差。

根据表 2 的实验结果, 用 SAS 统计分析软件进行多元回归分析和方差分析。从方差分析表 3 中可以看出, 方程一次项、二次项的影响都是显著的, 交互

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2006-06-29, 改回日期: 2006-08-21

表 1 响应面分析试验因素水平表

因 素	水 平		
	-1	0	1
X_1 (豆饼粉)/%	3	3.5	4
X_2 (玉米浆粉)/%	0.4	0.6	0.8
X_3 (CaCl_2)/%	0.2	0.25	0.3

表 2 实验方案与结果

实验号	X_1	X_2	X_3	粗多糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	-1	-1	0	4.26
2	-1	1	0	5.45
3	1	-1	0	5.9
4	1	1	0	6.24
5	0	-1	-1	4.56
6	0	-1	1	6.03
7	0	1	-1	4.25
8	0	1	1	6.05
9	-1	0	-1	4.56
10	1	0	-1	4.96
11	-1	0	1	6.12
12	1	0	1	6.38
13	0	0	0	6.54
14	0	0	0	6.46
15	0	0	0	6.68

项作用影响不显著,故交互项可以省略。因此,各具

体试验因子对响应值的影响并不是简单的线性关系。经回归拟合后,试验因子对响应值的影响可用回归方程表示为:

$$Y = 6.56 + 0.386 25 \times X_1 + 0.155 \times X_2 + 0.781 25 \times X_3 - 0.407 5 \times X_1 \times X_1 - 0.69 \times X_2 \times X_2 - 0.647 5 \times X_3 \times X_3。$$

该模型可信度见表 4,其中复相关系数的平方 $R^2=0.9218$,说明由这 3 个因素及其二次项能解释 Y 变化的模型拟合程度很好。

表 3 方差分析表

回归项	自由度	平方和	复相关系数平方	F 值	大于 F 的概率
一次项	3	6.268 525	0.654 8	10.20	0.024 1
平方项	3	2.272 493	0.237 4	3.70	0.046
交互项	3	0.212 750	0.022 2	0.35	0.795 0
总回归	9	8.753 768	0.914 4	4.75	0.074 0

表 4 模型可信度分析

均 值	5.629 333
复相关系数的平方	0.921 8
复相关系数	0.781 1
模型误差的平方根	0.410 116
变异系数	7.285 336

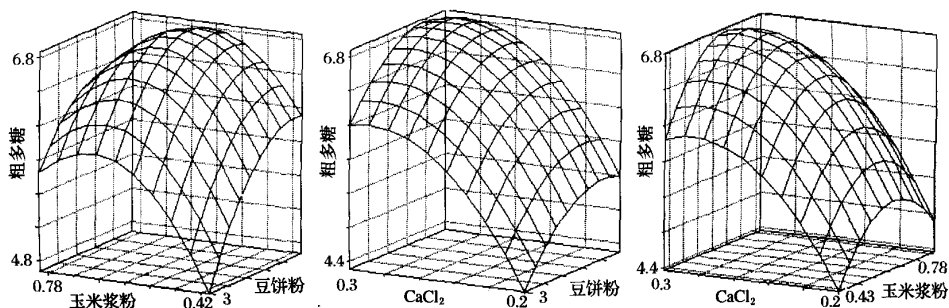


图 1 交互项因素响应面图

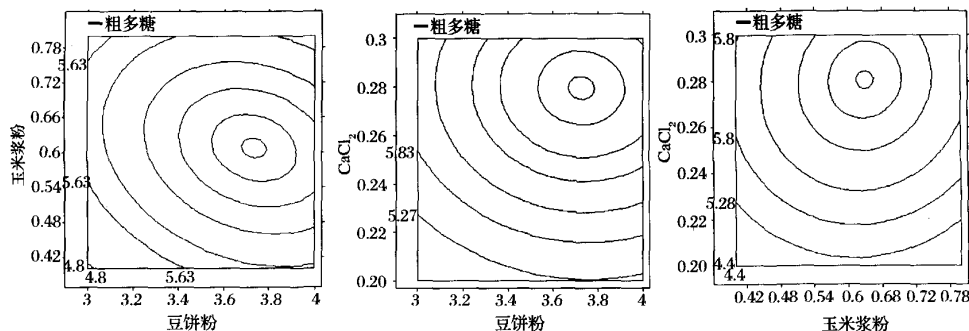


图 2 交互项等高线图

2.3 响应因子水平的优化

由图 1 的响应面可看出 X_1 、 X_2 、 X_3 存在极值点,对 Y 进行岭脊分析^[11],分析可知,3 个因素的最

优试验点 (X_1 、 X_2 、 X_3) 代码值 (0.409、-0.012、0.483) 即 (3.70、0.60、0.27),此时 Y 取最大值 6.85 g/L。也可用拟合的二次方程分别对 X_1 、 X_2 、 X_3 求

偏导,得出方程组,然后解方程组,分别求出 X_1 、 X_2 、 X_3 和 Y ,此方法比较繁琐且得出的结果可能是响应面的鞍点,并不一定是极值点。等高线图 2 中,曲线越陡峭表示因素的效应越大,能揭示出各因素对胞外多糖产量影响的显著性。

在以上优化的稳定点进行验证试验,共进行 3 批次 250 mL 摇瓶试验。证明预测值 6.85 与试验平均值 6.78 是非常接近的。

2.4 胞外多糖性质初步分析

2.4.1 多糖含量测定

优化后最佳试验点发酵获得的胞外粗多糖采用硫酸-苯酚法测定其多糖含量为 42.8%,Folin-酚试剂法测定其蛋白含量为 26.5%。

2.4.2 多糖分子质量测定

多糖的活性在很大程度上取决于其分子质量大小。一般来说分子质量在 100~200 ku 之间的多糖片段有较高的生物活性。采用高效凝胶过滤色谱法测定了桑黄胞外多糖,根据曲线 $\text{Log MW} = 13.2 - 0.471 \text{ tR}$ 及它们各自的保留时间,用 GPC 软件计算出分子质量(MW),色谱图见图 3。

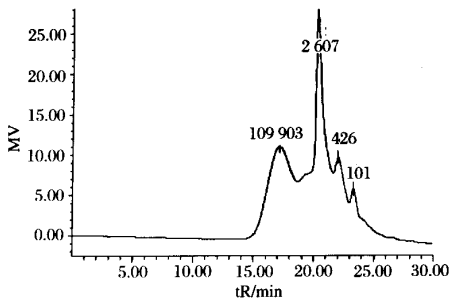


图 3 桑黄胞外多糖色谱图

由图 3 可见,桑黄胞外多糖主要有 2 个峰,相对分子质量分别为 109.9 ku 和 2.6 ku,第 1 个峰可能具有一定生物活性。

3 结 论

实验证明运用 RSM 方法对桑黄发酵培养基进行优化是非常有效的。部分重复因子试验能对各因子的主效应进行评价并能有效地找出主效应。通过响应面分析法建立各因素与响应值之间的数学模型,可以直观地看出各因素及各因素之间的作用,进而对培养基进行有针对性的调整,提高了工作效率。

结合非显著影响因子水平值,培养基配方可确定为(g/L):蔗糖 40,玉米粉 10,豆饼粉 37,玉米浆粉 6,麸皮 3, KH_2PO_4 2, CaCl_2 2.7。胞外粗多糖产量较优化前的 5.24 g/L 提高了 29.4%,达到 6.78 g/L。

虽然高效凝胶过滤色谱法测定的多糖肽的相对分子质量只是一个相对值,不是一个真正的相对分子质量,但在一定流动相浓度下作为桑黄多糖的质量控制还是可取的。测定结果有一个峰可能具有生物活性,但其免疫调节能力有待动物实验证明。

参 考 文 献

- 1 池玉杰,潘学仁. 七种木层孔菌属真菌的培养特性[J]. 菌物系统,2001,20(3):378~380
- 2 莫顺燕,杨永春,石建功. 桑黄化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):239~341
- 3 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995
- 4 杨云鹏,岳德超. 中国药用真菌[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1981. 44
- 5 Kim H M, Han S B, Oh G T, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus* [J]. Int J Immunopharmac, 1996, 18(5): 295~303
- 6 戴玉成. 药用担子菌—鲍氏层孔菌(桑黄)的新认识[J]. 中草药,2003,34(1):94~95
- 7 Hye Jin Hwang, Sang Woo Kim, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33:309~319
- 8 樊锦艳,王秋颖. 桑黄胞外多糖生产培养基的初步研究[J]. 食品科技,2004(2):93~96
- 9 张惟杰. 复合多糖生化研究概述[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987. 6~7
- 10 蔡武城,袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京:科技出版社,1982. 93~96
- 11 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002

SAS Application in Studies on Medium Optimization of *Phellinus linteus*

Lin Baiquan Yu Xiaobin

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

ABSTRACT SAS system was used to optimize the medium components for crude exopolysaccharides production by *Phellinus linteus*. Firstly, the prime factors affecting crude exopolysaccharides yield were selected by means of Plackett-Burman design; Then, a central composite design was used to optimize the prime factors and the results were shown in response surface plots. When the medium comprised soybean cake 3.7%, corn steep powder 0.6%, CaCl_2 0.27%, the crude exopolysaccharides yield could reach 6.78 g/L, Which was 29.4% higher than the control. In addition, the content and the molecular weight of exopolysaccharides were determined.

Key words *Phellinus linteus*, response surface experiments, exopolysaccharides