

牛肝菌胞外多糖发酵培养基的优化

王允祥 陆兆新 吕凤霞

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘 要 在 Plackett-Burman 设计实验结果基础上,采用响应曲面法对影响牛肝菌(*Boletus* sp.) ACCC 50328 发酵胞外多糖的培养基 5 个关键组成成分酵母膏(X_1)、麦芽糖(X_2)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3)、 FeSO_4 (X_4)和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (X_5)的最佳水平范围进行了研究和探讨。通过对二次多项回归方程求解得知,在上述自变量取值分别为 酵母膏 14.2 g/L、麦芽糖 22.2 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.7 g/L、 FeSO_4 66.9 mg/L、 CuSO_4 101.59 $\mu\text{g/L}$ 时,胞外多糖最大预测值为 752.079 $\mu\text{g/mL}$ (发酵醪),此预测可信度不仅被统计分析所验证,也被实践所证实。

关键词 多糖,牛肝菌,优化,响应曲面法,中心旋转组合设计

科学研究表明,绝大多数具有生物学活性的真菌多糖不仅存在于其子实体中,同样也存在于培养菌丝和发酵液中,如 PSK(商品名称 krestin)和裂褶菌素即是分别利用 *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* Cov-1 和 *Schizophyllum commune* 通过深层培养而获得的,这 2 种多糖类物质皆能增强机体的免疫力和抗癌活性^[1-3]。根据笔者对牛肝菌(*Boletus* sp.) ACCC 50328 胞外粗多糖的初步研究发现,此物对小鼠肉瘤 S180 具有一定的抑制作用(该文另发)。为了提高牛肝菌胞外多糖含量,研究在 Plackett-Burman 实验基础上,采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)对影响牛肝菌发酵胞外多糖的培养基关键因素最佳水平进行了研究和探讨,为工业化发酵生产该多糖提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

牛肝菌(*Boletus* sp.) ACCC 50328,购自中国农业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^[4];基础发酵液:葡萄糖 5 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L, pH 值自然。

1.3 发酵培养基配制

首先将需考察的关键因子麦芽糖、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 CuSO_4 和 FeSO_4 配制成一定浓度的母液,再根据实验设计要求,吸取一定体积该母液添加到 250 mL 三角瓶中,余量用基础发酵液补齐。

1.4 菌种培养及接种

取斜面试管菌种点种于培养皿中,25℃ 培养 12 d 后,用 $\Phi 10$ cm 无菌打孔器从平板上打孔取 1 片菌丝蝶接种于盛有 50 mL 发酵培养基的三角瓶中。

1.5 多糖提取及测定

第 9 d,对发酵醪减压过滤,得菌丝体和滤液。取滤液 10 mL,采用 Sevag 法脱蛋白至 2 相界面无膜出现为止,取 2 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 mL,采用文献[5]方法测定多糖含量,以 $\mu\text{g/mL}$ 发酵醪计。

1.6 实验设计

从 Plackett-Burman 实验设计结果得知,牛肝菌 ACCC 50328 菌株发酵培养基关键组成要素是葡萄糖、麦芽糖、酵母膏、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 FeSO_4 ,其中葡萄糖和 KH_2PO_4 是该菌生长所必需的。虽然研究是以此菌所分泌的胞外多糖含量为主要考查指标,但由于微生物生长和代谢的复杂性,实际研究中也必须同时考虑该菌的生长速度问题,鉴

第一作者:博士研究生,副教授(陆兆新教授为通讯作者)。

收稿时间:2003-09-26,改回时间:2004-05-25

于此,即将葡萄糖和 KH_2PO_4 作为研究的基础发酵液组成,参考牛肝菌 ACCC 50328 菌株菌丝干重动态预测图,其取值分别为:葡萄糖 5 g/L , KH_2PO_4 0.5 g/L , pH 值自然。对于影响该菌产糖和生长的外界因素,出于实际研究的可操作性,在本研究中将其作为常量,参考 Plackett-Burman 设计实验结果,其取值分别为:发酵时间 9.5 d 、发酵温度 27°C 、装液量 50 mL 、摇床转速 140 r/min 。

响应曲面法(RSM)不仅是进行优化实验的设计法,而且也是建立连续变量曲面模型的有力工具^[6,7],利用其曲面图及等高线图可直观地了解到自变量变化对变量的影响过程,并可确定影响因素的最佳水平范围^[8,9],另外,

RSM 所需的试验组数相对较少,可节省人力物力^[10,11]。如今,RSM 虽被广泛地用于众多的培养基优化中^[12~15],但对于牛肝菌 ACCC 50328 菌株发酵培养基的优化,国内外均未见报道。鉴于此,本研究将对影响该菌产糖的发酵培养基主要因子的最佳水平范围进行研究和探索,所用软件为 Design Expert (version 6.0.5, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA),实施模型为中心旋转组合设计(Central Composite Rotatable Design,CCRD),所选取的响应值为胞外多糖含量(Exopolysaccharide Content,EPC),自变量酵母膏(X_1)、麦芽糖(X_2)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3)、 FeSO_4 (X_4)和 CuSO_4 (X_5)实验水平编码分别为 -2 、 -1 、 0 、 1 、 2 ,见表 1。

表 1 实验因素水平及编码

自变量	代 号		编码水平				
	未编码	编码值	-2	-1	0	1	2
酵母膏/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_1	x_1	0	5	10	15	20
麦芽糖/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_2	x_2	7.5	15	22.5	30	37.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_3	x_3	0	1	3	5	7
$\text{FeSO}_4/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	X_4	x_4	0	20	50	80	110
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_5	x_5	50	80	110	140	170

其编码方程为: $x_i=(X_i-X_0)/\Delta X_i$,式中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的实际实验水平值, X_0 为实验水平中心点的实际值, ΔX_i 为单变量增量。

设该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$\hat{Y}_{\text{EPC}}=c_0+\sum_{i=1}^na_ix_i+\sum_{j\leq i}^nb_{ij}x_ix_j\tag{1}$$

式中 \hat{Y}_{EPC} 为预测响应值,即胞外多糖含量; 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 乃因子数,本实验中为 5。为了求得上述方程的各项回归系数,需要 32 组试验来对其进行求解,见表 2。

表 2 中心旋转组合设计以及胞外多糖含量实测值及预测值

组 别	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	$\text{EPC}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
						实验值	预测值
1	-1	-1	-1	-1	1	55.643	-0.183
2	1	-1	-1	-1	-1	455.414	506.933
3	-1	1	-1	-1	-1	316.604	307.511
4	1	1	-1	-1	1	327.709	334.810
5	-1	-1	1	-1	-1	138.928	132.016
6	1	-1	1	-1	1	560.909	570.191
7	-1	1	1	-1	1	449.861	398.530
8	1	1	1	-1	-1	200.004	256.019
9	-1	-1	-1	1	-1	283.290	279.286

续表 2

组 别	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	EPC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
						实验值	预测值
10	1	-1	-1	1	1	383.233	395.423
11	-1	1	-1	1	1	222.214	173.791
12	1	1	-1	1	-1	605.328	664.251
13	-1	-1	1	1	1	272.185	225.944
14	1	-1	1	1	-1	438.756	499.861
15	-1	1	1	1	-1	311.052	311.543
16	1	1	1	1	1	549.804	566.489
17	-2	0	0	0	0	474.847	117.224
18	2	0	0	0	0	738.585	608.609
19	0	-2	0	0	0	449.861	445.740
20	0	2	0	0	0	555.356	546.608
21	0	0	-2	0	0	488.728	489.095
22	0	0	2	0	0	433.204	420.128
23	0	0	0	-2	0	383.233	389.291
24	0	0	0	2	0	560.909	541.981
25	0	0	0	0	-2	522.042	424.456
26	0	0	0	0	2	266.633	351.349
27	0	0	0	0	0	688.613	689.806
28	0	0	0	0	0	694.166	689.806
29	0	0	0	0	0	677.508	689.806
30	0	0	0	0	0	688.613	689.806
31	0	0	0	0	0	705.270	689.806
32	0	0	0	0	0	671.956	689.806

2 结果与讨论

利用上述软件,用表 2 实验数据对方程(1)进行多元回归拟合,获得牛肝菌 ACCC 50328 菌株胞外多糖对 5 个编码自变量酵母膏(X_1)、麦芽糖(X_2)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3)、 FeSO_4 (X_4)和 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (X_5)的二次多项回归方程:

$$\begin{aligned} Y_{\text{EPC}} = & 689.8 + 122.85x_1 + 25.22x_2 + 18.67x_3 + \\ & 38.17x_4 - 18.28x_5 - 81.72x_1^2 - 48.41x_2^2 - 76.76x_3^2 \\ & - 56.04x_4^2 - 75.48x_5^2 - 44.07x_1x_2 - 19.78x_1x_3 + \\ & 19.09x_1x_4 + 10.76x_1x_5 - 12.15x_2x_3 + 14.23x_2x_4 + \\ & 10.06x_2x_5 - 7.29x_3x_4 + 88.49x_3x_5 - 30.89x_4x_5 \end{aligned} \quad (2)$$

上述方程中:

$$\begin{aligned} x_1 = & (\text{酵母膏} - 10) / 5, x_2 = (\text{麦芽糖} - 22.5) / 7.5, \\ x_3 = & [(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3] / 2, x_4 = (\text{FeSO}_4 - 50) / 30, x_5 = \\ & (\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O} - 110) / 30. \end{aligned}$$

该模型方差分析表明,本实验所选用模型具有高度的显著性($P < 0.0004$),其多元相关系数(multiple correlation coefficient, r)为 0.969 8,表明实验实测值与预测值之间具有高度的相关性(见表 2),决定系数(determination

coefficient, R^2)为 0.940 5,表明此模型拟合优度好,仅有 6% 的 EPC 总变异不能由此模型进行解释。利用 SPSS(version 10.0, SPSS Inc.)软件对该模型的实际验证结果(数据未显示)进行距离相关分析得知,其相关系数(r)为 0.997 1,证明此模型是合适有效的,并具有一定的实践指导意义。

该模型方程回归系数显著性检验表明,试验 5 因素对 EPC 的曲面效应皆显著;而麦芽糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CuSO_4 对 EPC 的线性效应不显著;对 EPC 的交互影响中,仅有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CuSO_4 显著,而其他两两交互效应不显著(数据未显示)。因所选模型不是分等级模型,故对上述二次多项方程不必进行自变数的统计选择。

通过模型方程(2)所作的响应曲面图及其等高线图见图 1~图 6。该组图直观地表示出当其他 3 个变量为实验水平中点值时,另外 2 个变量对响应值 EPC 的交互影响效应。

通过对图 1~图 6 的分析可知:低水平或高

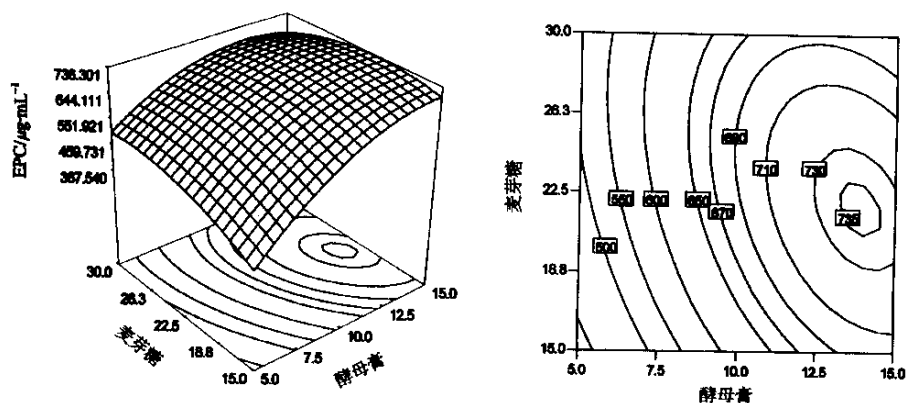


图1 酵母膏和麦芽糖交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

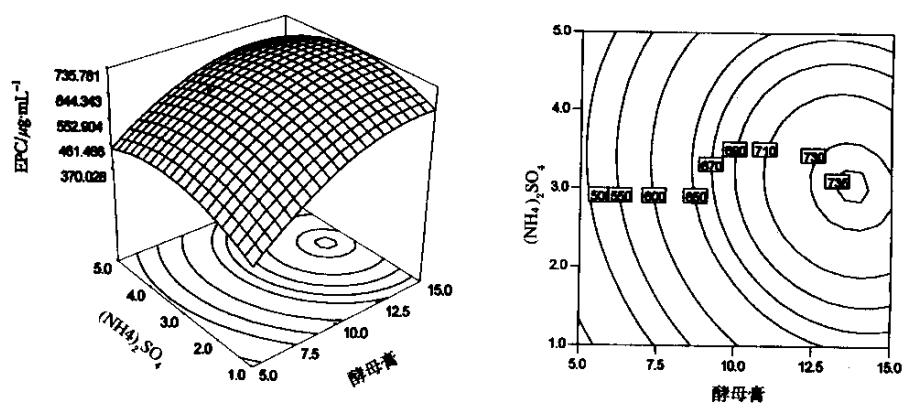


图2 酵母膏和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

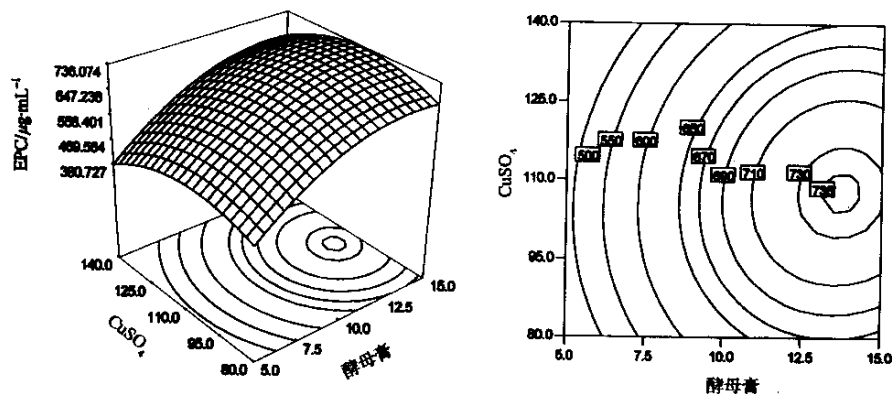


图3 酵母膏和 CuSO_4 交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

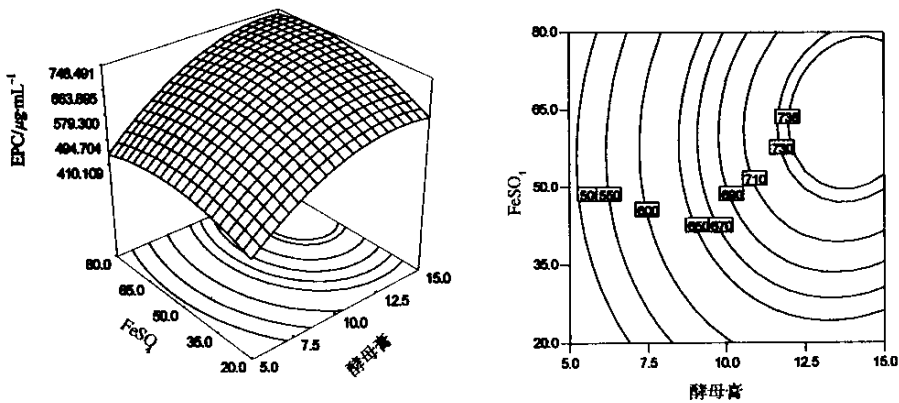


图 4 酵母膏和 FeSO₄ 交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

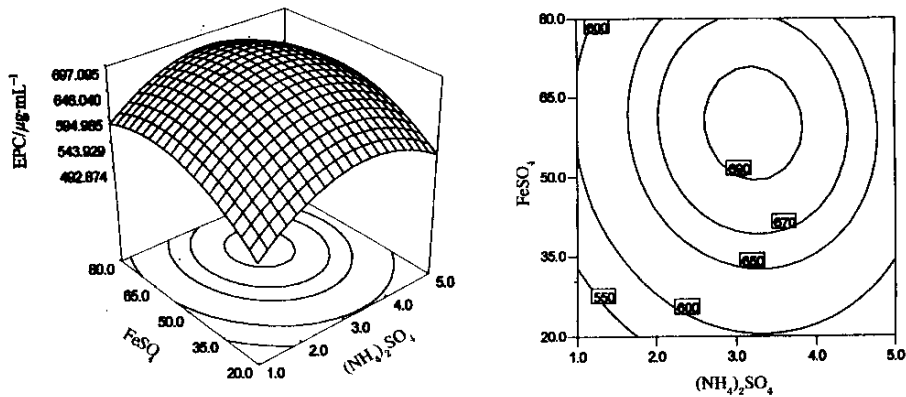


图 5 (NH₄)₂SO₄ 和 FeSO₄ 交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

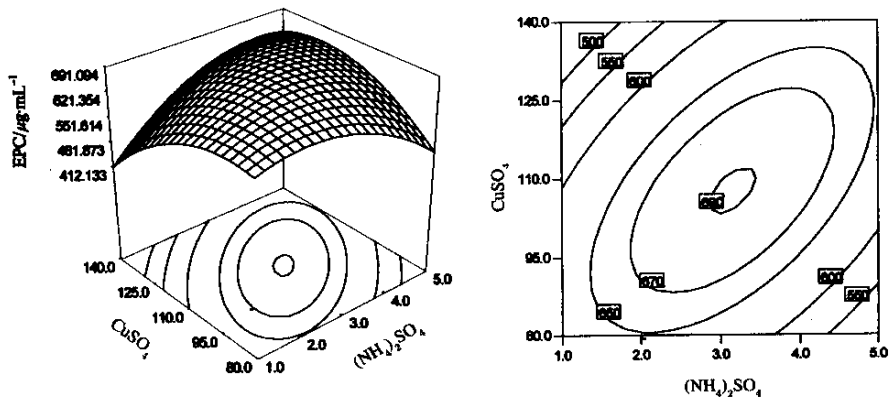


图 6 (NH₄)₂SO₄ 和 CuSO₄ 交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

水平的影响因素都不利于牛肝菌 ACCC 50328 菌株 EPC 的积累,酵母膏与麦芽糖交互作用于

该菌的 EPC,低浓度时,EPC 随着麦芽糖的增加而增加,高浓度时,随着麦芽糖的增加而减

少,该现象也间接说明了牛肝菌 ACCC 50328 菌株发酵产糖需要较高的碳氮比; CuSO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 EPC 的交互影响极显著,在 CuSO_4 为低实验水平时,EPC 随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而减少,而在高实验水平时,EPC 随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而增加,同样,在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为低实验水平时,EPC 随着 CuSO_4 浓度的增加而减少,而在高实验水平时,EPC 随着 CuSO_4 浓度的增加而增加;当酵母膏,麦芽糖 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 取值范围分别是 $12.8 \text{ g/L} \sim 15 \text{ g/L}$, $23 \text{ g/L} \sim 20.6 \text{ g/L}$, $3.3 \text{ g/L} \sim 2.8 \text{ g/L}$, $78 \text{ mg/L} \sim 50 \text{ mg/L}$, $112 \mu\text{g/L} \sim 100 \mu\text{g/L}$ 时,牛肝菌 ACCC 50328 菌株代谢分泌的胞外多糖浓度不低于 $735 \mu\text{g/mL}$,此分析结果也被后续试验所验证。

3 结 论

利用 Design Expert 软件,通过响应曲面法建立了影响牛肝菌 ACCC 50328 发酵产糖的二次多项数学模型,并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验,优化了关键因素水平,探讨了各因素间的交互作用。通过对方程(2)求解,获得胞外多糖最大预测值为 $752.079 \mu\text{g/mL}$ 发酵醪,此时发酵培养基的组成为($/\text{L}$):葡萄糖 5 g ,麦芽糖 22.2 g ,酵母膏 14.2 g ,磷酸二氢钾 0.5 g ,硫酸铵 2.7 g ,硫酸亚铁 66.9 mg ,硫酸铜 $101.59 \mu\text{g}$ 。此预测可信度不仅被统计分析所验证,也被实践所证实,该预测值与因子筛选实验中 $610.78 \mu\text{g/mL}$ 相比,每 mL 发酵醪约增加了 $140 \mu\text{g}$ 胞外多糖,由此可见,利用 RSM 法对牛肝菌 ACCC 50328 菌株发酵培养基进行优化不仅经济有效,而且切实可行。

参 考 文 献

- Hiroshi S, Takeda M. Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. Mushroom biology and mushroom products[M]. Hong Kong: The Chinese University Press, 1993. 237~245
- Hirata A, Itoh W, Tabata K et al. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58:406~407
- Cho S M, Yu S H, Shin G C. Biological activities of culture broth of some wood rotting basidiomycetes[J]. Korean J. Mycology, 1996, 24:17~24
- 周宇光. 菌种目录第三版[M]. 北京:中国农业科技出版社,1997. 231
- 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(9):550~553
- Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23:451~455
- Reddy P R M, Reddy G, Seenayya G. Production of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrients levels using response surface methodology[J]. Bioprocess Engineering, 1999, 21:497~503
- Lai L S T, Pan C C, Tzeng B K. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures[J]. Process Biochemistry, 2003, 38:1317~1326
- Gouveia E R, Baptista-Neto A, Badino A C et al. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23:157~161
- Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17:331~335
- Chen Q H, He G Q, Mokhtar A M A. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30:667~672
- 欧竑宇,贾士儒,马霞. 细菌纤维素发酵培养基的优化[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1):18~22
- 胡升,梅乐和,姚善泾. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1):13~17
- 陈宁,常高峰,张克旭. L-异亮氨酸发酵培养基的响应面法优化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2):33~37
- 王昌禄,于志萍,顾晓波. 氮源及 C/N 比对 D-核糖发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2):53~56

Optimization of Media for Exopolysaccharide Production by *Boletus* sp. ACCC 50328

Wang Yunxiang Lu Zhaoxin Lv Fengxia

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

ABSTRACT Response surface methodology (RSM) based on a five - level five - factor central composite rotatable design of experiments was used to optimize the optimal levels of five important factors , namely yeast extract (X_1) , maltose (X_2) , ammonium sulfate (X_3) , ferrous sulfate (X_4) , copper sulfate pentahydrate (X_5) . These five factors were chosen based on the results of our previous Plackett-Burman design . Using the quadratic regression model , the optimum concentration levels for obtaining 752.079 microgram exopolysaccharide per milliliter were : 14.2 g/L yeast extract , 22.2 g/L maltose , 2.7 g/L ammonium sulfate , 66.9 mg/L ferrous sulfate and 101.59 μ g/L copper sulfate pentahydrate . The predicted values were also verified by our experiment .

Key words polysaccharide , *Boletus* sp. , optimization , response surface methodology (RSM) , central composite rotatable design (CCRD)

市场
动态

山核桃油于近日投放市场

杭州临安华易绿色食品厂已成功开发出山核桃油。这种新型食用油的问世 , 将为食物烹调行业和食品加工行业提供一种高档的食品原料。

山核桃油中富含多不饱和脂肪酸 , 具有降脂活血的保健功能 , 可预防心脑血管疾病的发生 ; 含有丰富的油酸、亚油酸和亚麻酸等不饱和脂肪酸 , 这些不饱和脂肪酸占山核桃油中脂肪酸总量的 88.38% ~ 95.78% , 含量高于茶油和橄榄油。由于不饱和脂肪酸含量高 , 所以 , 山核桃油在人体内的消化吸收率比普通的食用油高。医学研究证明 , 经常食用山核桃油 , 可以降低血液中胆固醇的含量和血液的黏度 , 提高血液的流动性 , 从而达到预防冠心病等心脑血管疾病的目的。

山核桃油是以山核桃果为原料提炼而成的 , 除了可以直接烹煮食物之外 , 还可以用来生产保健食品、孕妇食品等高档食品。

山核桃乳饮料将在国内外拥有广阔的市场

山核桃仁含蛋白质 15% ~ 20%、脂类 50% ~ 60.14%、碳水化合物 15% 左右 , 还含有磷、铁、钙等金属元素及 V_{B1} 、 V_{B2} 、 V_C 、 V_E 等 , 脂肪酸以肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸为主。每 100g 核桃仁相当于 2 500g 鸡蛋或 4 500g 牛奶的营养价值。其味甘、性温 , 具有润肌、黑发、通脉、补气、化痰润肺的功能 , 是滋补健身之佳品。

我国每年核桃产量几十万吨 , 占世界产量的 10% , 目前理想的山核桃保健食品在市场上并不多见 , 除传统的炒吃、制罐头、做月饼馅、加工成核桃粉外 , 其他用途的开发尚不多见。因此 , 将山核桃仁开发研制成饮料 , 既能方便人们饮食 , 又能发挥保健作用 , 同时还可以促进山区经济的发展 , 在国内外将有广泛的市场。