

文章编号:1673-1689(2005)03-0052-05

## 牛肝菌生长与发酵主要影响因子的鉴别

王允祥<sup>1,2</sup>, 周云<sup>1</sup>, 常银子<sup>1</sup>, 陆兆新<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院 食品与药学学院, 浙江 临安 311300; 2. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 采用 Plackett-Burman 设计法, 分别研究了影响牛肝菌 (*Boletus* sp.) ACCC 50328 菌丝生长和发酵产糖的 21 个相关因素。结果表明, 影响牛肝菌 ACCC 50328 菌株菌丝生长速度的主要因子为葡萄糖、麦芽糖、酵母膏、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、发酵温度、发酵时间及装液量; 影响该菌株胞外多糖含量的主要因子为麦芽糖、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4$  和发酵时间。

**关键词:** 胞外多糖; 牛肝菌; 深层发酵; Plackett-Burman 设计; 优化

中图分类号: Q 935

文献标识码: A

## Determination of the Most Important Factors Affecting the Mycelium Biomass and Exopolysaccharide Yield in Submerged Fermentation

WANG Yun-xiang<sup>1,2</sup>, ZHOU Yun<sup>1</sup>, CHANG Yin-zi<sup>1</sup>, LU Zhao-xin<sup>2</sup>

(1. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Mycelium biomass and polysaccharide accumulation in submerged fermentation by *Boletus* sp. ACCC 50328 are strongly influenced by many internal and external factors, namely medium constituents and fermentation conditions. The Plackett-Burman technique was applied in the present investigation to design experiments, build models, and evaluate importance of the twenty-one selected factors. By the statistical regression analysis, the significant factors affecting the mycelium biomass and exopolysaccharide yield in submerged fermentation of *Boletus* sp. ACCC 50328 were: glucose, maltose, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, ammonium sulfate, ferrous sulfate, temperature, fermentation time and broth content; and maltose, yeast extract, ammonium sulfate, copper sulfate pentahydrate, ferrous sulfate and fermentation time, respectively.

**Key words:** exopolysaccharide; *Boletus* sp.; submerged fermentation; Plackett-Burman design; optimization

现代科学研究表明, 真菌多糖具有多种多样的生物学功能<sup>[1,2]</sup>, 其生物活性物质既可存在于子实体中, 也可存在于培养菌丝体和发酵液中<sup>[3,4]</sup>。真菌尤其是高等担子菌已成为人们寻找生物活性物质

的一个重要源泉<sup>[5]</sup>。现今筛选并证实有抗肿瘤效应的真菌种类及其数量业已远远超过其它生物种类<sup>[6]</sup>。

深层发酵的内部环境(如培养基的组成、质量

收稿日期: 2004-02-12; 修回日期: 2005-01-20.

作者简介: 王允祥(1962-), 男, 安徽蚌埠人, 教授, 工学博士。

浓度等)及外界条件(如发酵温度、时间、接种量、通气量等)将会严重制约微生物的生长与胞外产物的积累,为了解牛肝菌生长与发酵之间的相互关系,提高胞外多糖含量,有必要对影响该菌生长和产糖的关键因素进行优化.而在此之前,从众多的相关影响因素中筛选出主要影响因子则是至关重要的.传统的单次单因子(one-factor-at-a-time)优化实验是通过保持其它因子水平不变,而研究其中一个因子的变化规律时,这种方法当考察的因子较多,需要太多的实验和较长的实验周期<sup>[7]</sup>,且对于具有交互作用的多因子实验还可能导致不可靠的甚至是错误的结论<sup>[8,9]</sup>.虽然全因子试验(Full factorial design)可以解决这一问题,但由于该设计法所需的试验次数为 $2^n$ ( $n$ 为试验因子数),随着 $n$ 的增加,试验次数呈指数增加,费时费力<sup>[10,11]</sup>. Plackett-Burman设计(Plackett-Burman Design, PB)法是一种经济而有效的两水平实验设计方法,该法主因素为正交设计,两因素间的交互作用仅部分的与主因素产生混淆<sup>[12]</sup>,因此,可以利用最少次数的实验对因子的主效应进行较为精确的估计.虽然该法不能考察各因子之间的交互作用,但它可从众多的考察因素中快速而有效地筛选出主要的影响因子<sup>[13]</sup>.这种设计方法已被广泛应用于实际研究中<sup>[14,15]</sup>.

本研究采用 Plackett-Burman 设计法,从 21 个相关因素中,成功地筛选出了影响牛肝菌菌丝生长和产糖量的关键影响因素,为进一步优化培养基组成及发酵条件提供理论基础与实践依据.

## 1 材料与方 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<sup>[16]</sup>;发酵培养基:按照实验设计配制.

### 1.3 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,取  $\phi$ 10 cm 无菌打孔器从平板上打孔取块(即菌丝蝶),接种于盛有发酵液的 250 mL 三角瓶中,接种量为 1 块/50 mL 发酵液.

### 1.4 菌丝生长量及胞外多糖含量测定

至设计时间对发酵液减压过滤,得菌丝体和滤液.菌丝体 80℃干燥至恒重称量,以菌丝干重(mg/干)与发酵液计.取滤液 10 mL,采用 Sevag 法

脱蛋白至两相界面无膜出现为止(12次),取 2 mL 该脱蛋白液用自来水流水透析 2 d,又用蒸馏水透析 2 d 后,取出透析液定容至 20 mL,采用文献<sup>[17]</sup>方法测定多糖质量浓度,以  $\mu\text{g/mL}$  发酵液计.

### 1.5 实验设计

根据真菌生长所需营养要素的基本原则及真菌发酵影响因素的一般规律,结合相关文献报道<sup>[18]</sup>与作者的前期实验,本研究选取的 21 个考察因素及其代号、编码水平见表 1,其响应值表示菌丝生长量的菌丝干重(Dry Cell Weight, DCW)和胞外多糖含量(Exopolysaccharide Content, EPC).采用 JMP 软件(version 4.0.5, SAS Institute Inc.)进行实验设计、数据分析及模型的建立.

表 1 实验因素水平及编码

Tab.1 Level and code of variables chosen for the Plackett-Burman design

变 量	代 号		因 子 水 平	
	未编码	编码*	-1	1
葡萄糖质量浓度/(g/L)	$X_1$	$x_1$	10.0	20.0
酵母膏质量浓度/(g/L)	$X_2$	$x_2$	5.0	10.0
麦芽糖质量浓度/(g/L)	$X_3$	$x_3$	10.0	20.0
胰蛋白胨质量浓度/(g/L)	$X_4$	$x_4$	5.0	10.0
果糖质量浓度/(g/L)	$X_5$	$x_5$	10.0	20.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 质量浓度/(g/L)	$X_6$	$x_6$	0.5	1.5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ 质量浓度/(g/L)	$X_7$	$x_7$	0.5	1.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度/(g/L)	$X_8$	$x_8$	0.5	1.5
$\text{NaNO}_3$ 质量浓度/(g/L)	$X_9$	$x_9$	0.5	1.5
$\text{MgSO}_4$ 质量浓度/(g/L)	$X_{10}$	$x_{10}$	0.1	0.4
$\text{MnCl}_2$ 质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	$X_{11}$	$x_{11}$	50.0	100.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	$X_{12}$	$x_{12}$	50.0	100.0
$\text{FeSO}_4$ 质量浓度/(mg/L)	$X_{13}$	$x_{13}$	10.0	40.0
$\text{CaCl}_2$ 质量浓度/(mg/L)	$X_{14}$	$x_{14}$	10.0	40.0
$\text{FeCl}_3$ 质量浓度/(mg/L)	$X_{15}$	$x_{15}$	10.0	40.0
维生素 $\text{B}_1$ 质量浓度/(mg/L)	$X_{16}$	$x_{16}$	25.0	50.0
起始 pH 值	$X_{17}$	$x_{17}$	5.0	7.0
发酵温度/℃	$X_{18}$	$x_{18}$	24.0	27.0
发酵时间/d	$X_{19}$	$x_{19}$	6.0	9.0
装液体积/mL	$X_{20}$	$x_{20}$	50.0	100.0
摇床转速/(r/min)	$X_{21}$	$x_{21}$	120.0	180.0

注:表中自变量编码方程为: $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$ ,其中  $x_i$  为自变量编码值; $X_i$  为自变量实验水平实际值; $X_0$  为实验水平中心点实际值; $\Delta X_i$  为单变量增量(Step change).

### 2 结果与讨论

#### 2.1 牛肝菌菌丝生长量(DCW)主要影响因子确定

利用上述软件对表2中的DCW数据进行方差分析表明,该数据具有统计学意义(P=0.0020)。通过逐步回归分析得牛肝菌菌丝生长量最优多元线性回归方程(α=0.05):

$$\hat{Y}_{DCW} = 1.4764 - 0.0871x_1 - 0.1893x_2 - 0.1207x_3 - 0.1357x_6 + 0.0929x_8 + 0.2471x_{13} + 0.1136x_{18} + 0.6671x_{19} - 0.2929x_{20} \quad (1)$$

式中 $\hat{Y}_{DCW}$ 为DCW预测值;由自变量编码方程可知, $x_1 = (\text{葡萄糖} - 15)/5, x_2 = (\text{酵母膏} - 7.5)/2.5, x_3 = (\text{麦芽糖} - 15)/5, x_6 = (\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1)/0.5, x_8 = ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1)/0.5, x_{13} = (\text{FeSO}_4 - 25)/15, x_{18} = (\text{发酵温度} - 25.5)/1.5, x_{19} = (\text{发酵时间} - 7.5)/1.5, x_{20} = (\text{装液量} - 75)/25.$

对回归方程(1)进行方差分析表明,该方程极显著(P < 0.0001),而且各因子系数均有意义(P < 0.05)。其拟合优度可通过校正决定系数(R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>)和相关系数(r)来体现,此方程R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>值为0.9490,表明DCW 94.9%的变异分布在方程的9个因子中,总变异中仅有5.1%不能由该模型来解释;r = 0.9830表明,DCW的实测值与预测值(见表2)之间具有较好的拟合度。

用此方程对牛肝菌DCW最佳预期值及合意性进行分析,结果见图1。由该动态预测图可知,当葡萄糖为10 g/L、酵母膏5 g/L、麦芽糖10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L、FeSO<sub>4</sub> 40 mg/L、装液量50 mL、发酵温度27℃、发酵时间9 d时,牛肝菌DCW的预测值可达3.42 mg/mL发酵醪,其概率为98%。也即欲得到较多的菌丝体,需取上述前5个因素实验水平下限值和后4个因素实验水平上限值。

表2 DCW和EPC的实验结果及预测值

Tab.2 Experimental and predicted values of DCW and EPC by *Boletus* sp.

组别																						菌丝干重/ (mg/mL)		胞外多糖 质量浓度/(μg/mL)	
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>5</sub>	x <sub>6</sub>	x <sub>7</sub>	x <sub>8</sub>	x <sub>9</sub>	x <sub>10</sub>	x <sub>11</sub>	x <sub>12</sub>	x <sub>13</sub>	x <sub>14</sub>	x <sub>15</sub>	x <sub>16</sub>	x <sub>17</sub>	x <sub>18</sub>	x <sub>19</sub>	x <sub>20</sub>	x <sub>21</sub>	实验值	预测值	实验值	预测值
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	1.16	42.44	30.28
2	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	1.98	1.96	383.91	396.49
3	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	1.04	0.97	229.19	236.93
4	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	2.62	2.42	387.87	388.32
5	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	0.81	0.80	216.61	232.05
6	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	1.91	1.99	403.41	408.46
7	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	1.26	1.28	223.43	210.75
8	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	2.66	2.63	535.62	545.44
9	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	1.81	1.76	542.18	528.52
10	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	0.55	0.49	192.84	190.65
11	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	1.51	1.58	214.85	217.03
12	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	1.32	1.34	453.04	440.35
13	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	2.98	2.91	487.02	482.08
14	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0.54	0.62	269.00	274.04
15	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	0.30	0.04	69.39	81.54
16	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	2.91	2.94	375.54	392.57
17	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2.19	2.20	351.77	350.51
18	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1.41	1.49	133.04	167.86
19	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	2.64	2.62	377.53	376.04
20	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	0.86	0.91	84.18	43.97
21	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	2.49	2.55	565.66	528.21
22	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	0.32	0.30	224.09	236.67
23	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	1.39	1.14	274.28	289.18
24	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	0.35	0.47	397.47	361.1
25	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	1.04	1.23	411.21	435.02
26	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	1.98	1.79	438.50	414.69
27	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	0.09	0.10	373.12	371.86
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	1.48	1.68	487.49	514.05

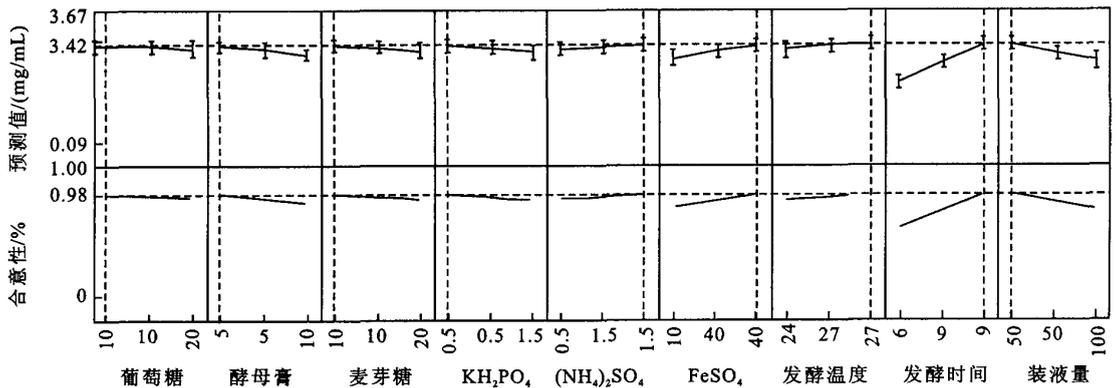


图 1 牛肝菌菌丝干重最大预期值及合意性

Fig. 1 Predicted value and desirability for DCW of *Boletus* sp.

2.2 牛肝菌发酵胞外多糖(EPC)主要影响因子的确定

方差分析表明,表 2 中牛肝菌 EPC 的实测值具有统计学意义 ( $P = 0.0010$ ). 对 EPC 影响显著的因子有酵母膏 ( $P = 0.0004$ )、麦芽糖 ( $P = 0.0035$ )、 $(NH_4)_2SO_4$  ( $P = 0.0481$ )、 $FeSO_4$  ( $P = 0.0132$ )、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ( $P = 0.0029$ ) 和发酵时间 ( $P < 0.0001$ ). 通过逐步回归分析 ( $\alpha = 0.05$ ), 牛肝菌发酵胞外多糖最优多元一次回归方程为

$$\hat{Y}_{EPC} = 326.5956 + 52.0256x_2 + 34.9157x_3 + 18.5682x_8 + 36.2593x_{12} + 26.0990x_{13} + 116.3159x_{19} \quad (2)$$

式中  $x_2 = (\text{酵母膏} - 7.5)/2.5$ ,  $x_3 = (\text{麦芽糖} - 15)/5$ ,  $x_8 = ((NH_4)_2SO_4 - 1.0)/0.5$ ,  $x_{12} =$

$$(FeSO_4 - 75)/25, x_{13} = (CuSO_4 \cdot 5H_2O - 25)/15, x_{19} = (\text{发酵时间} - 7.5)/1.5.$$

上述方程 (2) 方差分析表明,此方程极显著 ( $P < 0.0001$ ), 相关系数  $r$  值为 0.975, 表明 EPC 的实测值与预测值间拟合度好, 约有 6% 的实验数据可变性不能用此模型解释 ( $R_{adj}^2 = 0.937$ ), 而且各因子系数均有意义 ( $P < 0.05$ ). 方差分析表及方程系数显著性检验表未显示.

牛肝菌 EPC 最佳预期值及合意性分析结果见图 2. 由该动态预测图可知, 当影响牛肝菌 EPC 的 6 个关键因素皆为上限时, 即酵母膏为 10 g/L, 麦芽糖 20 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1.5 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100  $\mu\text{g/L}$ ,  $FeSO_4$  40 mg/L, 发酵 9 d 时, EPC 预测可达 610.78  $\mu\text{g/mL}$  发酵醪, 其可能性约为 98%.

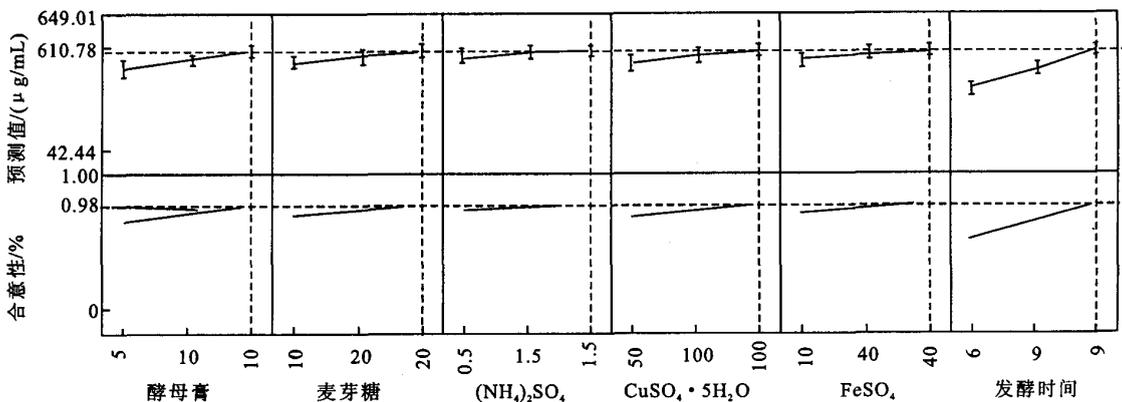


图 2 牛肝菌胞外粗多糖最大预期值及合意性

Fig. 2 Predicted value and desirability for exopolysaccharide by *Boletus* sp.

3 结论

综合分析牛肝菌 ACCC 50328 菌株 DCW 及 EPC 的关键影响因素, 可见在本次实验水平范围

内, 影响该菌生长的主要因子与发酵胞外多糖的并不完全相同; 虽然低质量浓度有机碳源(葡萄糖 10 g/L+麦芽糖 10 g/L) 和氮源(酵母膏 5 g/L) 对此菌生长有促进作用, 但却不利于糖的积累; 欲提高 EPC, 不仅要有较高质量浓度的麦芽糖 (20 g/L) 和

酵母膏(10 g/L),而且还须有一定量的  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$ ,其中机理有待于进一步探讨;DCW 及 EPC 也有相同趋势效应的影响因素,如高质量浓度的速效氮源( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 g/L)和长时间的培养(9 d)即有利于菌丝量的增加又有利于糖的积累。

通过采用 Plackett-Burman 设计,仅用了 28 组实验,即从 21 个相关因素中同时筛选出了影响牛

肝菌 DCW 和 EPC 的主要影响因子,通过动态预测图直观地了解到各因子的效应趋势及大致水平范围,为进一步优化牛肝菌发酵培养基组成及工艺参数提供了重要的理论依据与实践基础.结果证明,该统计学实验方法对影响微生物生长与发酵关键因素的筛选,不仅快速有效,而且科学合理。

## 参考文献:

- [1] 肖建辉, 蒋依辉, 梁宗琦, 等. 食药真菌多糖研究进展[J]. 生命的化学, 2002, 22(2):148-151.
- [2] 谭周进, 谢达平. 多糖的研究进展[J]. 食品科技, 2002, (3):10-12.
- [3] Cun Z, Mizuno T, Ito H, *et al.* Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*[J]. **J Jpn Soc Food Sci Technol**, 1994, 41:724-732.
- [4] Cho S M, Yu S H, Shin G C. Biological activities of culture broth of some wood rotting basidiomycetes. Antimicrobial, plant growth regulatory, antitumor, and enzymatic activities[J]. **Korean J Mycol**, 1996, 24:17-24.
- [5] Reshetnikov S V, Wasser S P, Tan K K. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides[J]. **Int J Med Mushrooms**, 2001, 3:361-394.
- [6] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 60:258-274.
- [7] Sen R, Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 47: 358-363.
- [8] 刘建忠, 熊亚红, 翁丽萍, 等. 生物过程的优化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(增刊):132-137.
- [9] Li C, Bai J H, Cai Z L. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology [J]. **J Biotechnol**, 2002, 93:27-34.
- [10] 何桢, 潘越, 刘子先, 等. 因子试验, RSM 与田口方法的比较研究[J]. 机械设计, 1999, (10):1-4.
- [11] Demeo M, Laget M, Phan-Tan-Luu R, *et al.* Application of experimental designs for optimization of medium and culture conditions in fermentation [J]. **Biosci**, 1985, 4:99-102.
- [12] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. **Biometrika**, 1946, 33: 305-325.
- [13] Pujari V, Chandra T S. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Eremothecium ashbyii*[J]. **Proc Biochem**, 2000, 34:31-37.
- [14] Kalil S J, Maugeri F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. **Proc Biochem**, 2000, 35:539-550.
- [15] Lai 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]. **Proc Biochem**, 2003, 38:1317-1326.
- [16] 周宇光. 菌种目录第三版[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 231.
- [17] 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.
- [18] 白淑兰, 阎伟. 黄空柄牛肝菌菌丝体纯培养条件下营养生理特性的初步研究[J]. 内蒙古林学院学报(自然科学版), 1997, 19(4):8-13.

(责任编辑:杨勇)