

响应面法优化茯苓菌丝体总三萜的液态发酵工艺

高学玲, 杨素云, 严云梅, 申慧

(安徽农业大学 茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为了探索茯苓 *Poria cocos* 5.78 液态发酵生产菌丝体总三萜的最佳工艺参数, 在单因子实验的基础上, 应用 Plackett-Burman 设计从 11 个因素中筛选出具有显著效应的初始 pH 值、VB₁、转速、温度 4 个因素, 采用响应面分析方法对影响茯苓菌丝体总三萜含量的关键因素最佳水平范围作了研究。结果表明, 茯苓液态发酵生产菌丝体总三萜的最佳工艺参数为: 初始 pH 5.45、VB₁ 7.3 mg/L、转速 132 r/min、温度 26.6 °C。在此条件下进行验证试验, 茯苓菌丝体总三萜含量为 7.06%, 比优化前提高近 35%。

关键词: 茯苓; 液态发酵; 菌丝体总三萜; 响应面设计

中图分类号: TQ 920.1

文献标志码: A

文章编号: 1673—1689(2012)10—1112—08

Optimical Liquid Fermentation Conditions of Total Triterpenoids from *Poria cocos* Mycelium by Response Surface Methodology

Gao Xue-ling, YANG Su-yun, YAN Yun-mei, SHEN Hui

(College of Tea & Food Science And Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract: On the basis of single factor experiments, initial pH, VB₁, rotation speed and culture temperature were selected as independent variables to optimize liquid fermentation conditions of total triterpenoids from *Poria cocos* mycelium. Using RSM design analysis, the optimal liquid fermentation conditions were achieved and listed as follows: initial pH 5.45, VB₁ 7.3 mg/L, rotation speed 132 r/min, culture temperature 26.6 °C. Under these conditions, the yield of intracellular total triterpenoids reached 7.06%, which increased about 35% than before.

Keywords: *Poria cocos*, liquid fermentation, total triterpenoids of mycelium, response surface methodology

茯苓(*Poria cocos* (Schw.) wolf)俗称茯菟、茯灵、松薯等, 为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核, 属真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、卧孔属^[1]。茯苓是我国传统的食药两用真菌, 其主要化学成分包括β-茯苓聚糖、三萜、蛋白质、脂肪酸及树胶等。此外, 茯

苓还含有麦角固醇、胆碱、组氨酸、卵磷脂、腺嘌呤、β-茯苓聚糖分解酶、蛋白酶及钾、钙、钠、镁等无机元素^[2-4]。茯苓三萜类化合物是茯苓中主要化学成分之一, 目前已从茯苓干燥菌核、茯苓皮和菌株培养液中提取分离得到 54 种三萜类成分, 主要包括羊

收稿日期: 2011-11-01

作者简介: 高学玲(1967—), 女, 安徽滁州人, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。E-mail: sharling@ahau.edu.cn

毛甾-8-烯型三萜、羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜、3,4-开环-羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜、3,4-开环-羊毛甾-8-烯型三萜、三环二萜类、齐墩果烷型三萜等6种类型^[5-6];研究发现,茯苓三萜类化合物具有抗炎、抗惊厥、抗癫痫、抗氧化、抗肿瘤、清除自由基及免疫调节等作用^[7-12]。因此,茯苓具有较高的药学价值。

我国人工栽培茯苓已有1500多年历史,但传统栽培方法生产茯苓菌核存在生产周期长、产量低、松材消耗量大等缺点,用液体发酵技术生产茯苓菌丝体,周期短、成本低、产量大,从茯苓菌丝体和发酵液中提取茯苓多糖等活性物质,可较好地解决人工种植茯苓的替代问题,节约了大量的木材,对我国资源和生物多样性的保护有着重要的意义。目前国内外对茯苓液态深层发酵研究主要集中在增加菌丝体产量和胞内多糖上^[13-15],而对茯苓液态发酵生产三萜类化合物的研究尚未见报道。响应面设计是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法^[16],试验时,可以通过Plackett-Burman试验设计筛选对试验具有显著影响的因素进行响应面设计,从而减少试验次数^[17]。作者在前期单因素试验研究的基础上,利用响应面设计优化茯苓液态发酵生产菌丝体总三萜的工艺参数,为液态发酵生产茯苓三萜化合物的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

茯苓 5.78(*Poria cocos* 5.78):由安徽农业大学植物保护学院提供。

1.2 培养基

1.2.1 种子液态培养基(g/L) 葡萄糖 30.0,酵母浸出粉 3.9,蛋白胨 5.1, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.5, VB_1 0.005; pH 值自然。

1.2.2 基础发酵培养基(g/L) 葡萄糖 30.0,酵母浸出粉 10.0, KH_2PO_4 2.0, MgSO_4 1.0, VB_1 0.005, 玉米粉 20.0; pH 值自然。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面培养基 PDA 培养基。

1.3.2 种子液培养 250 mL 三角瓶装种子培养基 60 mL, 121 °C、0.1 MPa 灭菌 20 min, 接种摇瓶培养, 摇床转速 150 r/min, 温度 26 °C, 一级种子摇瓶

培养 7 d, 二级种子摇瓶培养 3 d, 各级种子的体积分数均为 10%。

1.3.3 基础发酵培养 250 mL 三角瓶装基础发酵培养基 60 mL, 以体积分数 10 % 的接种量接入二级种子液, 摇床转速 150 r/min, 温度 28 °C, 培养时间 11 d。

1.4 茯苓菌丝体总三萜提取及测定

1.4.1 茯苓菌丝体总三萜提取 发酵液经 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌丝体, 60 °C 烘干至恒重。准确称取粉碎样 100.0 mg, 加入 5.0 mL 甲醇, 超声 1 h, 过滤, 收集滤液, 定容至 25 mL, 即为待测样品溶液^[18]。

1.4.2 茯苓菌丝体总三萜测定 参照文献^[19]的方法, 以熊果酸为标准品, 采用香草醛-高氯酸显色法测定茯苓菌丝体总三萜的质量分数。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计

在基础摇瓶试验的基础上, 选用 $N=12$ 的 Plackett-Burman 设计对茯苓液态发酵工艺中的 11 个因素(葡萄糖、蛋白胨、玉米粉、初始 pH、装液量、接种量、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 VB_1 、转速、温度)的重要性进行考查, 试验设计及结果见表 1。

用 Design Expert 软件对试验数据进行处理, 比较各因素的效应值及重要性评价, 结果见表 2。

由表 2 和表 3 可知, 初始 pH、 VB_1 、转速和温度 4 个因素为主要影响因素, 其影响值分别为 15.66%、18.34%、53.19% 和 8.17%。模型回归极显著 ($P<0.000\ 1$), $R^2=0.953\ 5$, 调整后的 $R^2_{\text{Adj}}=0.926\ 9$, 说明该模型与实际实验拟合较好, 误差较小; 本实验 C.V. 值为 4.31%, 信噪比 Adeq Precision 为 17.04, 表明模型的可信度较高。

2.2 最陡爬坡试验

由表 2 可以看出, 要提高茯苓菌丝体总三萜的含量, 初始 pH、 VB_1 和温度取值应增加, 转速的取值应减小。这 4 个显著因素的变化方向及步长的试验设计及结果见表 4。

从表 4 可以看出, 最佳发酵工艺条件在第 4 组与第 5 组试验附近, 因此以第 4 组的水平作为响面试验的中心点, 即初始 pH 5.4, VB_1 7 mg/L, 转速 130 r/min, 温度 26.5 °C。

表 1 $N=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计及结果Tab.1 Design matrix and experimental results of Plackett-Burman design as $N=12$

运行序	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	总三萜质量分数/%
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	4.26
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	5.45
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	5.79
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	6.24
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	4.56
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	6.03
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	4.25
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	6.05
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4.56
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	4.96
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	6.87
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.39

每组试验平行 3 次,结果取平均值

表 2 试验因素水平的选择、偏回归系数及效应值

Tab.2 Levels, partial regression and effects of experimental variables

编码	因素	水平		系数估计值	标准差	效应	贡献值/%
		低(-1)	高(1)				
X_1	葡萄糖质量浓度/(g/L)	30	36	-0.071	0.067	-0.014	0.75
X_2	蛋白胨质量浓度/(g/L)	9	10	-0.11	0.067	-0.23	1.94
X_3	玉米粉质量浓度/(g/L)	20	25	-0.002 5	0.067	-0.005	0.000 9
X_4	初始 pH 值	4	5	0.32	0.067	0.65	15.66
X_5	装液量/mL	60	80	-0.096	0.067	-0.19	1.37
X_6	接种体积分数/%	7.5	9	-0.011	0.067	-0.022	0.017
X_7	KH_2PO_4 质量分数/(g/L)	1.6	2	0.019	0.067	0.038	0.055
X_8	MgSO_4 质量浓度(g/L)	0.8	1	-0.059	0.067	-0.12	0.52
X_9	VB_1 质量浓度/(mg/L)	5	6	0.35	0.067	0.70	18.34
X_{10}	转速/(r/min)	150	180	-0.60	0.067	-1.20	53.19
X_{11}	温度/℃	24	26	0.23	0.067	0.47	8.17

表 3 回归模型的方差分析

Tab.3 ANOVA for selected factorial model and analysis of experimental variables

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	7.68	4	1.92	35.87	<0.000 1	显著
初始 pH	1.26	1	1.26	23.56	0.001 8	
VB1	1.48	1	1.48	27.59	0.001 2	
转速	4.28	1	4.28	80.03	<0.000 1	
温度	0.66	1	0.66	12.29	0.009 9	
残差	0.37	7	0.054			
所有项	8.05	11				
R^2	0.953 5					
Adj R^2 (调整)	0.926 9					
变异系数	4.31%					
信噪比	17.04					

表 4 最陡爬坡试验设计及结果 *

Tab.4 Design and results of the steepest ascent search experiment

运行序	初始 pH 值	VB ₁ 质量浓度/(mg/L)	转速/(r/min)	温度/℃	总三萜质量分数/%
1	4.8	4	100	25.0	4.48
2	5.0	5	110	25.5	5.28
3	5.2	6	120	26.0	6.12
4	5.4	7	130	26.5	6.83
5	5.6	8	140	27.0	6.51
6	5.8	9	150	27.5	5.82
7	6.0	10	160	28.0	5.07

2.3 响应面分析试验

2.3.1 预测模型的建立和回归分析检验

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,利用 Design Expert 软件设计四因素三水平的响应面试验,以初始 pH、VB₁、转速和温度 4 个因素为自变量,总三萜含量为响应值,根据最陡爬坡试验的结果确定试验中心和水平,试验因素水平设计见表 5、结果见表 6。

表 5 Box-Behnken 试验因素水平

Tab.5 Levels of Box-Behnken experiments

因素	编码	水平		
		-1	0	1
初始 pH	A	5.0	5.4	5.8
VB ₁ /(mg/L)	B	5	7	9
转速/(r/min)	C	110	130	150
温度/℃	D	25	26.5	28

表 6 Box-Behnken 试验结果
Tab.6 Results of Box-Behnken experiments

运行序	初始 pH	VB ₁ /(mg/L)	转速/(r/min)	温度/℃	总三萜质量分数/%	预测值
1	-1	-1	0	0	3.87	3.95
2	1	-1	0	0	4.09	4.28
3	-1	1	0	0	4.85	4.71
4	1	1	0	0	5.21	5.17
5	0	0	-1	-1	4.15	4.22
6	0	0	1	-1	4.94	4.98
7	0	0	-1	1	4.95	4.96
8	0	0	1	1	5.07	5.05
9	-1	0	0	-1	4.79	4.81
10	1	0	0	-1	4.54	4.57
11	-1	0	0	1	4.58	4.58
12	1	0	0	1	5.6	5.61
13	0	-1	-1	0	4.15	4.05
14	0	1	-1	0	4.28	4.40
15	0	-1	1	0	4.09	4.00
16	0	1	1	0	5.18	5.30
17	-1	0	-1	0	4.47	4.48
18	1	0	-1	0	4.69	4.58
19	-1	0	1	0	4.58	4.61
20	1	0	1	0	5.38	5.30
21	0	-1	0	-1	3.61	3.54
22	0	1	0	-1	5.29	5.22
23	0	-1	0	1	4.81	4.81
24	0	1	0	1	4.77	4.77
25	0	0	0	0	6.98	6.90
26	0	0	0	0	6.89	6.90
27	0	0	0	0	6.85	6.90
28	0	0	0	0	6.82	6.90
29	0	0	0	0	6.94	6.90

根据表 6 中的结果,运用 Design Expert 软件对其进行二次回归分析,拟合得到的回归方程: $Y=6.90+0.20A+0.41B+0.21C+0.20D+0.035AB+0.14AC+0.32AD+0.24BC-0.43BD-0.17CD-1.03A^2-1.34B^2-$

$1.12C^2-0.97D^2$
回归方程的方差分析及模型显著性分析结果见表 7。

表 7 回归方程的方差分析及系数显著性检验

Tab.7 ANOVA analysis and coefficients significant test for regression equation

来源	自由度	参数估计值	系数标准差	均方差	F 值	P 值
模型	14	6.90	0.048	1.88	161.08	<0.000 1
A	1	0.20	0.031	0.47	40.04	<0.000 1
B	1	0.41	0.031	2.05	175.39	<0.000 1
C	1	0.21	0.031	0.54	46.36	<0.000 1
D	1	0.20	0.031	0.50	43.14	<0.000 1
AB	1	0.035	0.054	0.005	0.42	0.527 8
AC	1	0.14	0.054	0.084	7.19	0.017 9
AD	1	0.32	0.054	0.40	34.50	<0.000 1
BC	1	0.24	0.054	0.23	19.71	0.000 6
BD	1	-0.43	0.054	0.74	63.27	<0.000 1
CD	1	-0.17	0.054	0.11	9.60	0.007 9
A ²	1	-1.03	0.042	6.89	589.77	<0.000 1
B ²	1	-1.34	0.042	11.60	992.22	<0.000 1
C ²	1	-1.12	0.042	8.15	697.24	<0.000 1
D ²	1	-0.97	0.042	6.16	527.17	<0.000 1
残差	14			0.012		
失拟项	10			0.015	3.47	0.12
纯误差	4			0.004 2		
R ²	99.38%					
Adj.R ² (调整)	98.77%					

从表 7 可以看出,模型回归极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P>0.05$), $R^2=99.38\%$,调整后的 R^2 为 98.77% ,说明回归方程的拟合程度较好,误差较小,可信度较高。

回归方程的一次项 A、B、C 和 D 对茯苓菌丝体总三萜得率有极显著影响,4 个因素的影响顺序依次为: $B>C>D>A$ 。此外,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 及交互项中的 A^*C 、 A^*D 、 B^*C 、 B^*D 和 C^*D 对茯苓菌丝体总三萜得率也有显著影响,这表明试验因子对响应值的变化相对复杂,不是简单的线性关系。

2.3.2 培养因素间交互作用分析和最优发酵条件的确定 为了进一步研究相关变量之间的交互作用及确定最优点,通过绘制响应面图来进行可视化的分析。图 1 分别给出了 6 组以茯苓菌丝体总三萜含量为响应值的趋势图,每组图中设定 2 个变量,另外 2 个变量固定在优化水平。从等高线图可以直观地反映出两变量交互作用的显著程度,图 1a 中

等高线接近圆形,表明初始 pH 与 VB_1 两者交互作用不显著;图 1b~f 中的等高线呈椭圆形,表明两者交互作用显著。

综上所述,进一步对实验模型进行典型性分析,以获得最大茯苓菌丝体总三萜含量时的液态发酵的最佳工艺参数,利用回归方程分别对各自的变量求一阶偏导数,建立方程组得到: $A=0.125$, $B=0.15$, $C=0.1$, $D=0.067$,即初始为 pH 5.45, VB_1 为 7.3 mg/L ,转速为 132 r/min ,温度为 $26.6\text{ }^\circ\text{C}$ 时,茯苓菌丝体总三萜含量理论最大值为 6.90% 。

2.4 验证试验

为验证模型的准确性,采用上述最佳工艺条件对试验结果进行验证,得到茯苓菌丝体总三萜质量分数为 7.06% ,与理论预测值接近,而优化前茯苓菌丝体总三萜质量分数是 5.23% 。所以,利用响应面设计来优化深层发酵工艺条件是可行的、有效的。

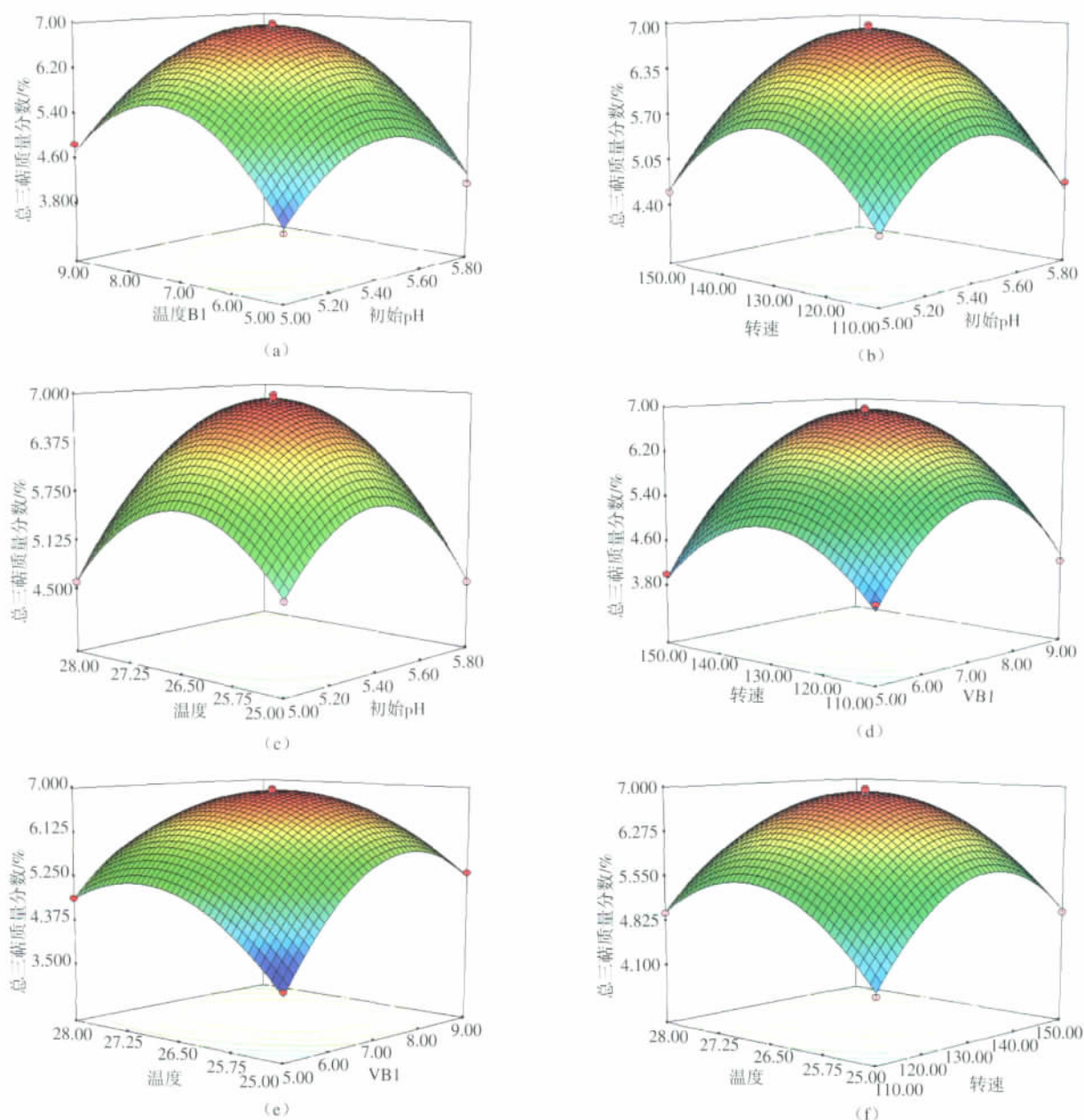


图 1 响应面立体分析图

Fig.1 Dimensional surface using response surface method

3 结语

在单因素试验的基础上,结合 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 的中心组合设计对茯苓 5.78 (*Poria cocos* 5.78) 的液态发酵工艺参数进行了优

化,得到最佳发酵工艺参数为:初始 pH 5.45、VB₁ 7.3 mg/L、转速 132 r/min、温度 26.6 °C。在优化工艺条件下进行验证试验,茯苓菌丝体总三萜质量分数为 7.06%,比优化前提高近 35%,从而证实了回归方程的有效性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 仲兆金,刘浚. 衍生法分离茯苓三萜[J]. 中药材,2002,25(4):247-250.

- ZHANG Zhao-jin, LIU Jun. Triterpenes isolated from *Poria cocos* by Derivations [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2002, 25(4): 247-250. (in Chinese)
- [3] 王德淑, 张敏. 茯苓中微量金属元素的测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(4): 30-31.
WANG De-shu, ZHANG Min. Determination of micro-amount metal elements in *Poria cocos* [J]. **Research and Practice of Chinese Medicines**, 2003, 17(4): 30-31. (in Chinese)
- [4] 蔡为荣, 王岚岚, 尹修梅, 等. 茯苓保健醋的研制[J]. 中国调味品, 2001, (3): 21-23.
CAI Wei-rong, WANG Lan-lan, YIN Xiu-mei, et al. Study on tuckahoe vinegar [J]. **Chinese Condiment**, 2001, (3): 21-23. (in Chinese)
- [5] 金惠. 茯苓调节免疫功能活性物质及指纹图谱研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.
- [6] Akihisa T, Uchiyama E, Kikuchi T, et al. Anti-tumor-promoting effects of 25-methoxyporicic acid A and other triterpene acids from *Poria cocos* [J]. **Journal of Natural Products**, 2009, 72(10): 1786-1792.
- [7] 郑艳, 杨秀伟. 茯苓三萜类化合物在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1596-1601.
ZHENG Yan, YANG Xiu-wei. Absorption of triterpenoid compounds from Indian bread (*Poria cocos*) across human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2008, 33(13): 1596-1601. (in Chinese)
- [8] GinerLarza E M, Manez S, GinerPons R M, et al. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A (2) activity of extracts from lanostane-rich species [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000, 73(1-2): 61-69.
- [9] Akihisa T, Nakamura Y, Tokuda H, et al. Triterpene acids from *Poria cocos* and their anti-tumor-promoting effects [J]. **Journal of Natural Products**, 2007, 70(6): 948-953.
- [10] 张琴琴, 王明正, 王华坤, 等. 茯苓总三萜抗惊厥作用的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 6(7): 712-714.
ZHANG Qin-qin, WANG Ming-zheng, WANG Hua-kun, et al. Anti-convulsant Effect of Triterpene from *Poria cocos* [J]. **Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease**, 2009, 6(7): 712-714. (in Chinese)
- [11] ZHOU Liang, ZHANG Yao-chun, Leslie Adell Gapter, et al. Cytotoxic and antioxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos* [J]. **ChemInform**, 2009, 40(13): 188.
- [12] Ríos J L. Chemical Constituents and Pharmacological Properties of *Poria cocos* [J]. **Planta Med**, 2011, 77: 681-691.
- [13] CHEN Xiao-ping, CHEN Yan, LI Shui-bing, et al. Simultaneous extraction of polysaccharides from *Poria cocos* by ultrasonic technique and its inhibitory activities against oxidative injury in rats with cervical cancer [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2010, 79(2): 409-413.
- [14] Mei Kuang Lu, Jing Jy Cheng, Cha Yui Lin, et al. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory effect of a water-soluble 1,6-branched 1,3- α -D-galactan from cultured mycelia of *Poria cocos* [J]. **Food Chemistry**, 2010, 118(2): 349-356.
- [15] Qilin Huang, Yong Jin, Lina Zhang. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2007, 70(3): 324-333.
- [16] 张广臣, 雷虹, 何欣, 等. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 111-113.
ZHANG Guang-chen, LEI Hong, HE Xian, et al. Modern mathematical statistical methods in optimization of fermentation medium [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 36(5): 111-113. (in Chinese)
- [17] 张益波, 赵艺, 柴玉爽, 等. 统计学分析方法在普鲁兰发酵培养基优化中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 403-409.
ZHANG Yi-bo, ZHANG Yi, Chai Yu-shuang, et al. Statistical optimization of fermentation medium for pullulan by *Aureobasidium pullulans* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(3): 403-409. (in Chinese)
- [18] 林庚申, 张小青, 魏铁铮, 等. 桦褐孔菌三萜类物质的提取与含量测定[J]. 菌物学报, 2007, 26(3): 396-403.
LIN Geng-shen, ZHANG Xiao-qing, WEI Tie-zheng, et al. Extraction and determination of triterpenoids from *Phaeoporus obliquus* [J]. **Mycosystema**, 2007, 26(3): 396-403. (in Chinese)
- [19] 沈思, 李孚杰, 梅光明, 等. 茯苓皮三萜类物质含量的测定及其抑菌活性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 96-98.
SHEN Si, LI Fu-jie, MEI Guang-ming, et al. Study on content determination and antibacterial effects of triterpenes from sclerotia of *Poria cocos* [J]. **Food Science**, 2009, 30(1): 96-98. (in Chinese)