

分阶段控制温度提高胞外多糖产量

吴明霞, 赵文净

(宁德师范学院 生物系, 福建 宁德 352100)

摘要: 利用冬虫夏草头孢菌发酵生产胞外多糖, 研究不同温度下对菌体生长和胞外多糖产量的影响。结果表明: 26 °C 是菌体生长的最适温度, 28 °C 是产物积累的最适温度。在此基础上, 提出分阶段控制温度工艺。通过响应面法分析, 得到优化方案为第一阶段温度 26 °C, 变温时间 17 h, 第二阶段温度 28.5 °C, 胞外多糖产量 10.92 g/L, 比 28 °C 恒温培养提高了 25.5%。

关键词: 分阶段控制温度工艺; 胞外多糖; 响应面法

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)05—0542—05

Two-Stage Temperature Controlling Strategy For Improving the Yield of Expolysaccharide

WU Mingxia, ZHAO Wenjing

(Department of Biology, Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

Abstract: The fermentation production of expolysaccharide from *Cordyceps militaris* was studied at different temperature. The results showed that the optimal growth temperature was at 26 °C and the highest yield of expolysaccharide accumulation temperature was at 28 °C. Thus, the two-stage temperature control strategy was developed based on RSM. When pre-fermentation temperature was kept at 26 °C for 17 hours and changed to 28.5 °C, the yield increased to 10.92 g/L which was 25.5% higher than that of fermentation at single temperature at 28 °C.

Keywords: two-stage temperature control strategy, expolysaccharide, RSM

微生物胞外多糖是微生物在生长过程中产生的、存在于发酵培养基中的可溶性或不溶性多糖, 胞外多糖易与菌体分离, 可通过深层发酵实现工业化生产^[1]。近年来胞外多糖已发展成为一类新型的发酵产品, 除药用外还可作为增稠剂、悬浮剂和稳定剂, 广泛用于化工、石油开采、医药加工、食品^[2]和化妆品等领域。

温度对发酵的影响及其调节控制是影响有机体生长繁殖最重要的因素之一, 因为任何生物化学的酶促反应与温度变化有关。温度对发酵的影响是多方面且错综复杂的, 主要表现在对细胞生长、产物合成、发酵液的物理性质和生物合成等方面。一般而言, 最适发酵温度是既适合菌体生长又适合代谢合成的温度, 但最适生长温度与最适代谢合成的

收稿日期: 2014-02-08

基金项目: 福建省教育厅 A 类项目(JA12341)。

作者简介: 吴明霞(1979—), 女, 吉林白城人, 工学硕士, 讲师, 主要从事微生物代谢调控方面的研究。E-mail: wuming0224@163.com

温度往往是不一致的^[3]。目前冬虫夏草菌丝体^[4]发酵温度的研究大部分处于恒温培养阶段,对于采用分阶段控制温度工艺,提高胞外多糖产量的方法,国内外鲜有报道。作者研究冬虫夏草菌丝体分阶段控制温度工艺,以期对胞外多糖产量有显著提高。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 冬虫夏草头孢菌。

1.1.2 斜面培养基 PDA 培养基。

1.1.3 种子培养基 (g/L) 葡萄糖 20, 蛋白胨 5, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.13, 麦麸 50; pH 自然。

1.1.4 发酵培养基 (g/L) 葡萄糖 100, 蔗糖 20, K_2HPO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.12; pH 自然^[5]。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 将菌种接种于 PDA 斜面上,于 24~25 °C 下恒温培养 5~6 d, 菌丝即可长满斜面;将顶端菌丝体接种于种子培养基中,于 24 °C 摇床 160 r/min 振荡培养 48 h, 备用^[6]。

1.2.2 恒温培养 按 8% 接种体积分数将种子培养基接入装有 100 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中,置于 25、26、27、28、29 °C 的 160 r/min 摇床恒温振荡培养 48 h, 每隔 2 小时测定菌液的菌体干重及胞外多糖产量。

1.2.3 分阶段控制温度培养 按 8% 接种体积分数将种子培养基接入装有 100 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中,置于摇床 160 r/min 恒温振荡培养 48 h, 每隔 2 小时测定菌体干重及胞外多糖产量。

1.3 胞外多糖测定方法

采用苯酚-硫酸法^[7]。

1.4 菌体干重的测定

取一定量的发酵液,用已烘干并称重的滤纸过滤,用水清洗至洗液不再带有发酵液颜色为止。在 80 °C 恒温的烘箱中烘至恒质量,在干燥器中冷却至常温,称质量。

1.5 响应面法设计

以第一阶段温度、变温时间、第二阶段温度 3 个因素对胞外多糖产量的影响并用响应面法进行优化,以胞外多糖产量为响应值,试验因素编码及水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM analysis

水平	A 第一阶段温度/°C	B 变温时间/h	C 第二阶段温度/°C
-1	25	14	27
0	26	16	28
1	27	18	29

1.6 数据分析

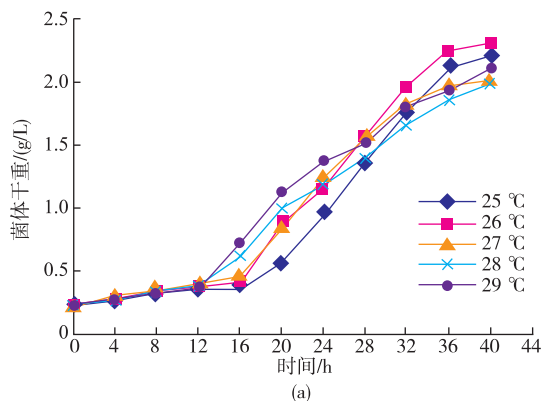
Design Expert 8.0.5.0 软件。

2 结果与分析

2.1 温度对胞外多糖产量的影响

由图 1a 可知, 25~29 °C 菌体生长出现延迟期、对数期、稳定期、衰亡期。培养温度 25 °C 时, 0~16 h 为延迟期, 菌体生长缓慢; 16 h 后菌体出现对数期, 菌体快速生长; 培养温度 29 °C 时, 0~12 h 为延迟期, 12~36 h 为对数期, 36 h 菌体进入稳定期。在温度为 29 °C 时, 延迟期缩短了 4 h, 这可能因为温度过高使菌体生长过快, 使菌体提前进入对数期。由于培养温度 26 °C 时菌体生长最好, 因此分阶段控制温度工艺选取菌体生长的最适温度 26 °C 作为第一阶段温度。

由图 1b 所示, 在菌体生长的不同阶段均有胞外多糖生成, 29 °C 时由于温度的升高使胞外多糖大量释放, 这可能由于提前进入衰亡期使菌体在稳定期胞外多糖产量下降。而 28 °C 时菌体在稳定期后期胞外多糖产量达到最高, 因此分阶段控制温度工艺选取产胞外多糖的适宜温度 28 °C 作为第二阶段温度。因为胞外多糖在菌体进入对数期开始大量释放, 因此分阶段控制温度工艺选取 16 h 作为变温时间。



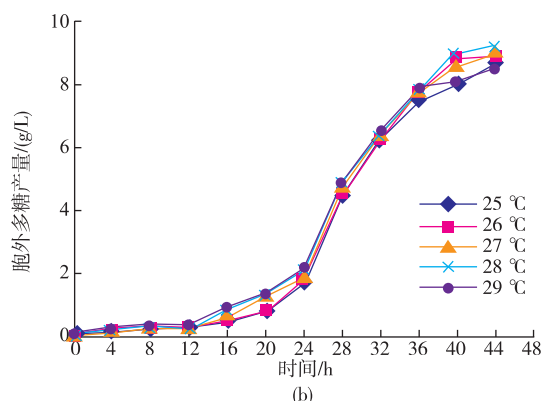


图 1 温度对菌体生长(a)和胞外多糖产量(b)的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the bacteria growth and the yield of expolysaccharide

2.2 响应面法优化方案

2.2.1 响应面分析方案及试验结果 试验因素水平及设计方案见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及设计方案和结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A 第一阶段温度/℃	B 变温时间/h	C 第二阶段温度/℃	胞外多糖产量/(g/L)
1	-1.000	-1.000	1.000	6.16
2	0.000	0.000	0.000	10.62
3	0.000	0.000	0.000	11.13
4	0.000	0.000	0.000	10.85
5	0.000	1.682	0.000	9.46
6	0.000	-1.682	0.000	6.38
7	-1.000	1.000	-1.000	5.46
8	0.000	0.000	-1.682	6.23
9	1.000	-1.000	-1.000	6.13
10	-1.682	0.000	0.000	5.23
11	0.000	0.000	0.000	10.52
12	0.000	0.000	0.000	10.36
13	1.000	1.000	1.000	8.24
14	0.000	0.000	0.000	10.58
15	-1.000	1.000	1.000	9.32
16	0.000	0.000	1.682	9.58
17	1.000	1.000	-1.000	6.46
18	1.682	0.000	0.000	7.46
19	1.000	-1.000	1.000	7.64
20	-1.000	-1.000	-1.000	4.46

2.2.2 模型的建立及显著性检验 利用 Design-Expert 8.0.5.0 软件对表 2 中试验数据进行二次多项式逐步回归拟合^[8],得到的数学模型:

$$Y=10.69+0.50A+0.75B+1.06C-0.40AB-0.28AC+0.30BC-1.63A^2-1.07B^2-1.08C^2$$

由表 3 可知,模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考察。当 $\geq F$ 值小于 0.05 时,即表示该指标显著;当 $P \geq F$ 值小于 0.001 时,即表示该指标极显著。结果表明:一次项 A、B 显著,C 极显著;二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 同样极显著;交互项 AB 显著,AC 和 BC 不显著,且失拟性 $p=0.0627 \geq 0.05$,对模型是有利的,无失拟因素存在,因此可用该回归方程代替实验真实值进行分析。

表 3 回归统计分析结果

Table 3 Regression analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F	$P \geq F$
A	3.41	1	3.41	16.67	0.002 2
B	7.72	1	7.72	37.79	0.000 1
C	15.36	1	15.36	75.17	≤ 0.000 1
AB	1.30	1	1.30	0.38	0.030 1
AC	0.64	1	.64	3.15	0.106 2
BC	0.74	1	0.74	3.61	0.086 5
A^2	38.19	1	38.19	186.88	≤ 0.000 1
B^2	16.53	1	16.53	80.90	≤ 0.000 1
C^2	16.70	1	16.70	81.70	≤ 0.000 1
模型	2.04	10	0.20		
失拟	1.67	5	0.33	4.48	0.062 7
纯误差	0.37	5	0.075		
总和	91.62	19			

通过比较回归方程中的一次项系数绝对值的大小,可判断因素影响的大小关系^[9],因此 3 个因素对胞外多糖产量影响的大小分别为:第二阶段温度 $\geq$ 变温时间 $\geq$ 第一阶段温度,由以上分析可知,各因素对胞外多糖产量的影响复杂,并非简单的线性关系。

2.2.3 响应曲面分析和优化 通过模型方程所作的响应曲面图,可直观地描述各因素对响应值的影响和各个因素间的交互作用。由图 2—4 可知,曲面均是开口向下的凸面,其中心位于所考察区域内,说明在考察的区域内存在响应值的极大值,同时响应面为高度卷曲的曲面。图 2—4 等高线可直观反映了两种因素交互作用对相应值的影响。比较图形可知,第二阶段温度是影响胞外多糖产量的最显著因素,表面等高线陡峭;变温时间次之,第一阶段温度影响最小,表现为等高线平滑,且随数值的增加而减少,响应值变化较小。

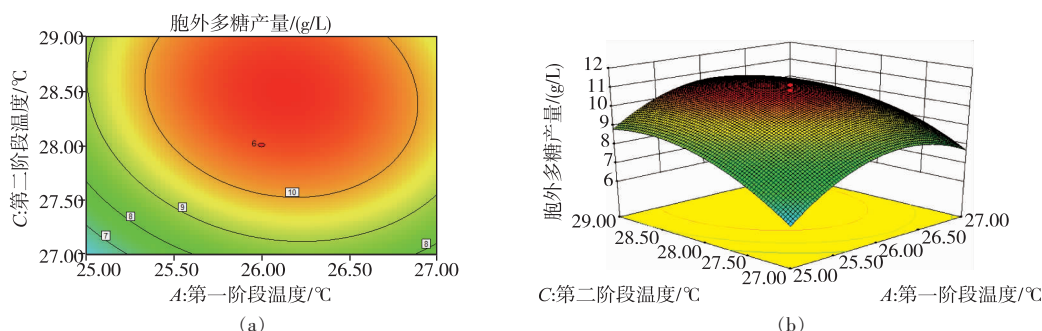


图2 第一阶段温度和第二阶段温度交互作用对胞外多糖产量的影响

Fig. 2 Effect of interaction of the first stage temperature and the second stage temperature on the yield of expolysaccharide

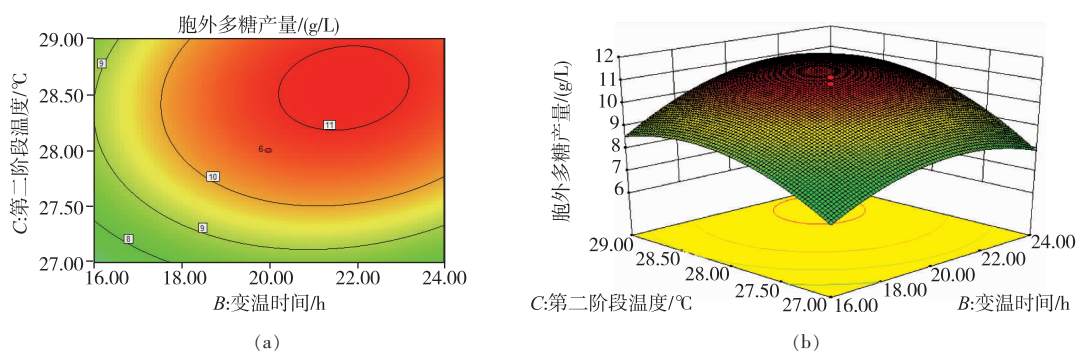


图3 变温时间和第二阶段温度交互作用对胞外多糖产量的影响

Fig. 3 Effect of interaction of the second stage temperature and time of variable temperature on the yield of expolysaccharide

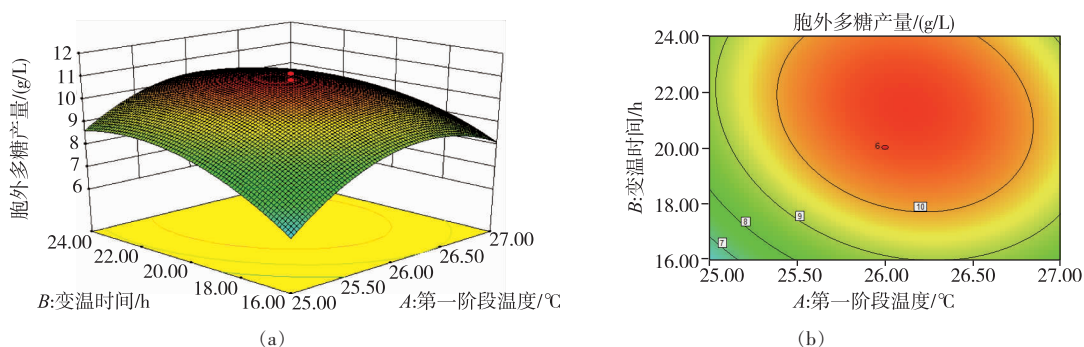


图4 第一阶段温度和变温时间交互作用对胞外多糖产量的影响

Fig. 4 Effect of interaction of the first stage temperature and time of variable temperature on the yield of expolysaccharide

通过软件分析,分阶段控制温度的最佳工艺为:第一阶段温度 26.05 °C,变温时间 16.84 h,第二阶段温度 28.54 °C,得到胞外多糖产量 11.15 g/L。

为检验 RSM 法的可靠性,采用上述最佳方案提高胞外多糖产量的试验,同时考虑实际操作的情况,将优化方案修正为第一阶段温度 26 °C,变温时间 17 h,第二阶段温度 28.5 °C 时胞外多糖产量 10.92 g/L,与实际值基本吻合,比 28 °C 恒温培养提高了 25.5%。

3 结语

1) 菌体生长和产物积累的最适温度分别为 26、28 °C。

2) 通过响应面法分析,分阶段控制温度的最佳工艺为:第一阶段温度 26 °C,变温时间 17 h,第二阶段温度 28.5 °C,胞外多糖产量 10.92 g/L,比 28 °C 恒温培养提高了 25.5%。

通过试验探讨响应面法提高胞外多糖产量优

化的可行性,结果表明,通过该法优化得到的工艺 基本准确可靠,具有一定的实用价值。

参考文献:

- [1] 吉武科,赵双枝,董学前,等. 新型微生物胞外多糖-韦兰胶的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2010(1):210-215.
JI Wuke,ZHAO Shuangzhi,DONG Xueqian,et al. Advance in the research of a new microbial exocellular polysaccharide welan gum[J]. **China Food Additives**,2010(1):210-215. (in Chinese)
- [2] Crescenzi V. Microbial polysaccharides applied interest:ongoing research activities in Europe [J]. **Biotechnology Progress**, 1955, 11:251-259.(in Chinese)
- [3] 胡雅琴. 恒温发酵与变温发酵柠檬酸过程及其比较[J]. 科技情报开发与经济,2003,13(9):203-204.
HU Yaqin. Comparison of citric acid production by fermentation with cellulose hydrolyte between constant temperature and oscillatory temperature[J]. **Sci/Tech Information Development Economy**,2003,13(9):203-204.(in Chinese)
- [4] 徐方云. 冬虫夏草及发酵虫草菌丝体的临床应用[J]. 药品评价,2005,2(4):255-265.
XU Fangyun. Clinical application of Aweto and its fermentation mycelium [J]. **Drug Evaluation**,2005,2 (4):255-265. (in Chinese)
- [5] 孙琳杰,王宇平,李友广. 冬虫夏草发酵条件的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(4):158-159.
SUN Linjie, WANG Yuping, LI Youguang. Study on fermented condition of *Cordyceps sinensis* [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2008,29(4):158-159.(in Chinese)
- [6] 陈怀宇,许延宗,王德枝,等. 北冬虫夏草菌丝体培育条件的研究[J]. 泉州师范学院学报,2008,26(2):106-109.
CHEN Huaiyu,XU Yanzhong,WANG Dezhi,et al. Study on condition of breeding *Cordyceps militaris* (L.) link mycelia[J]. **Journal of Quanzhou Normal University**,2008,26(2):106-109.(in Chinese)
- [7] 孟利,张兰威. 苯酚-硫酸法测定西藏灵菇胞外粗多糖及影响因素[J]. 理化检验-化学分册,2008,44(3):290-291,294.
MENG Li,ZHANG Lanwei. Study on tibetan mushroom *Polysaccharide* and influence factor[J]. **Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis**,2008,44(3):290-291,294.(in Chinese)
- [8] 季宏飞,许杨,李燕萍. 采用响应面法优化红曲霉固态发酵产红曲色素培养条件研究[J]. 食品科技,2008(8):9-13.
JI Hongfei,XU Yang,LI Yanping. Optimization of cultivation conditions for *Monascus* pigments by solid fermentation of *Monascus*[J]. **Food Science and Technology**,2008(8):9-13.(in Chinese)
- [9] 伍春,徐立,刘峰迟. 响应面优化新疆药桑桑皮总多酚提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(2):104-107.
WU Chun,XU Li,LIU Fengchi. Process optimization for total polyphenol extraction from the branch bark of INJIANG black mulberry by response surface methodolo[J]. **Food Science**,2011,32(2):104-107.(in Chinese)

科 技 信 息

日本撤消对非酒精饮料的储存温度要求

2015年4月2日,日本厚生劳动省发布 G/SPS/N/JPN/404 号通报:撤消对非酒精饮料的储存温度要求。

日本修订食品卫生法中食品 and 食品添加剂规格和标准。主要是针对饮料类产品,修订内容包括:撤消对非酒精饮料的储存温度要求(低于10℃)。非酒精饮料共包括四类:矿泉水、冷冻水果饮料、果汁及除以上3类以外的非酒精饮料。

该通报的批准和发布日期待定,生效日期将在发布后尽快确定。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 日本撤消对非酒精饮料的储存温度要求 [EB/OL]. (2015-4-8). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=48746>