

响应面法优化黑盖木层孔菌菌丝体液体发酵培养基研究

高婵娟, 孙 玲, 张 晶, 杨翔华, 王战勇

(辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院 辽宁 抚顺 113001)

摘要:应用 Plackett-Burman 设计法对影响液体发酵黑盖木层孔菌菌丝体产量的培养基组分进行筛选, 确定影响菌丝体产量的关键因素为玉米粉、麸皮和 VB₁。在此基础上, 采用最陡爬坡试验结合 Box-Behnken 响应面法优化黑盖木层孔菌液体发酵培养基。结果表明: 当培养基组分中玉米粉为 65 g/L、麸皮为 49.31 g/L、VB₁ 为 214.61 μg/L 时, 菌丝体产量预测值为 10.75 g/L, 最佳条件下菌丝体产量可达 11.16 g/L, 预测值与验证值吻合得较好。

关键词: 黑盖木层孔菌; Plackett-Burman 设计法; 最陡爬坡试验; 响应面法;

中图分类号: S 646.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0137-04

黑盖木层孔菌(*Phellinus nigricans*)属锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)针层孔菌属(*Phellinus*), 别名黑盖针层孔、黑木层孔菌。与之同属的桑黄(*Phellinus linteus*)是目前国际公认的生物抗癌领域中效果最好的真菌之一^[1]。相关研究显示, 黑盖木层孔菌与桑黄一样也具有较好的抗癌抗肿瘤的功能。与桑黄抗癌能力主要表现为其多糖部分^[2]相似的是黑盖木层孔菌发挥作用的组分主要也是其多糖部分^[3]。

黑盖木层孔菌和桑黄等针层孔菌属的真菌是多年生木腐菌, 受生理生态的特殊性和复杂性以及外部环境条件的影响, 在自然界中形成的子实体非常稀少, 难以成为稳定的工业产品来源。目前桑黄在国际市场上供不应求, 我国只有东北、西北和西南的少数地区能出产桑黄, 但产量极为有限。因此采用液态深层培养技术进行黑盖木层孔菌的大规模培养, 并进一步从其菌丝体中提取菌丝体多糖可起到替代桑黄进行抗癌抗肿瘤的作用^[4], 因此具有非常重要的意义。该研究采用响应面法优化黑盖木层孔菌产菌丝体液体发酵培养基, 为黑盖木层孔菌产菌丝体多糖的生产奠定了一定的理论基础和物质基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试菌种: 黑盖木层孔菌(*Phellinus nigricans*)菌种, 试验室保存。马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[5]。基本培养基: 玉米粉 30 g/L; 麸皮 20 g/L; 磷酸氢二钾 1 g/L; 磷酸二氢钾 1 g/L; 硫酸镁 1.5 g/L; VB₁ 300 μg/L; VB₂ 250 μg/L。

LDZX-40KB 立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); TDL-40C 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); ALC-1100.2 电子天平(德国赛多利斯股份公司); VIS-7220 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司); DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司); HZQ-Q 全温振荡器(中国哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); SW-CJ-1C 型医用净化工作台(上海阳光试验仪器有限公司)

1.2 试验方法

将培养于 PDA 斜面培养基上的菌丝体接种于液体发酵培养基培养, 培养结束后, 4 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 置于电热恒温鼓风干燥箱 80 °C 烘干至恒重, 称重计算菌丝体产量。

1.3 试验设计

1.3.1 Plackett-Burman 设计 在单因素试验的基础上, 选用 N=7 的 Plackett-Burman 设计对发酵培养基中的 7 个组分(玉米粉、麸皮、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、VB₁ 和 VB₂)的重要性进行考查, 每个因素取高低 2 种水平, 高水平约为低水平的 1.5 倍^[6,7]。试验选取的各因素水平取值见表 1。

第一作者简介: 高婵娟(1986), 女, 陕西咸阳人, 在读硕士, 研究方向为生物化工。

责任作者: 王战勇(1978), 男, 辽宁抚顺人, 博士, 副教授, 研究方向为生物活性物质开发。

收稿日期: 2011-02-16

表 1 Plackett-Burman 试验设计

| 符号 | 因子 | 水平 | |
|----|---------------------------|-----|------|
| | | -1 | 1 |
| A | 玉米粉/ $g \cdot L^{-1}$ | 30 | 45 |
| B | 麸皮/ $g \cdot L^{-1}$ | 20 | 30 |
| C | 磷酸氢二钾/ $g \cdot L^{-1}$ | 2 | 3 |
| D | 磷酸二氢钾/ $g \cdot L^{-1}$ | 1 | 1.5 |
| E | 硫酸镁/ $g \cdot L^{-1}$ | 1.5 | 2.25 |
| F | $VB_1/\mu g \cdot L^{-1}$ | 200 | 300 |
| G | $VB_2/\mu g \cdot L^{-1}$ | 200 | 300 |

1.3.2 最陡爬坡试验 最陡爬坡试验以 Plackett-Burman 试验值的变化方向为爬坡方向, 根据 Plackett-Burman 试验结果各因素效应值的大小确定变化步长, 最快的逼近最佳值区域。正效应的因素选取较高值, 负效应的因素选取较低值。菌丝体产量最高的处理, 即为下一步响应面分析的中心点。

1.3.3 响应面分析试验方法 采用 Box-Behnken 设计法, 对于影响菌丝体产量的显著因素进行进一步研究, 从而获得黑盖木层孔菌液体发酵产菌丝体的最佳培养基组成。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验

按照 $N=9$ 的 Plackett-Burman 设计结果见表 2 效应值及显著性分析见表 3。Plackett-Burman 试验是整个优化过程的第一步, 按表 2 进行 Plackett-Burman 试验, 利用 SAS 9.0 软件对试验结果进行方差分析。表 3 列出了 Plackett-Burman 试验各因素参数的分析结果, 由表 3 可知 麸皮对菌丝体产量的影响最为显著 ($P=0.0068$), 玉米粉 ($P=0.0158$) 对菌丝体产量影响显著, 其它因素的对菌丝体产量影响的显著性依次为: $VB_1 > 磷酸氢二钾 > VB_2 > 硫酸镁 > 磷酸二氢钾$, 模型的复相关系数 $R=0.9226$, 相关性较好。

表 2 Plackett-Burman 试验设计与结果

| 序号 | 因素 | | | | | | | 菌丝体产量 $/g \cdot L^{-1}$ |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 7.45 |
| 2 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 7.98 |
| 3 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 8.55 |
| 4 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 6.98 |
| 5 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 7.84 |
| 6 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 7.22 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 9.23 |
| 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 8.21 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 6.23 |
| 10 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 6.89 |
| 11 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 7.89 |
| 12 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 7.45 |

2.2 最陡爬坡试验

由于玉米粉和麸皮有显著正效应, 应增加; VB_1 有负效应, 应减少。这 3 个因素的变化方向及步长的试验

设计及结果见表 4。从表 4 可看出, 最优发酵条件在第 4 组试验附近, 因此以第 4 组的水平作为响应面试验的中心点, 即玉米粉 $60 g/L$, 麸皮 $45 g/L$, VB_1 $225 \mu g/L$ 。

表 3 Plackett-Burman 试验方差分析

| 序号 | 模式参数 | | | | |
|----|--------|----|---------|---------|---------------|
| | SS | DF | MS | F | $P > F$ |
| A | 2.24 | 1 | 2.24 | 16.22 | 0.0158 |
| B | 3.63 | 1 | 3.63 | 26.33 | 0.0068 |
| C | 0.26 | 1 | 0.26 | 1.87 | 0.2430 |
| D | 0.0001 | 1 | 0.00013 | 0.00096 | 0.9767 |
| E | 0.004 | 1 | 0.004 | 0.029 | 0.8725 |
| F | 0.40 | 1 | 0.40 | 2.87 | 0.1654 |
| G | 0.053 | 1 | 0.053 | 0.396 | 0.5677 |
| 模型 | 6.58 | 7 | 0.94 | 6.82 | 0.0413 |

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

| 序号 | 玉米粉/ $g \cdot L^{-1}$ | 麸皮/ $g \cdot L^{-1}$ | $VB_1/\mu g \cdot L^{-1}$ | 菌丝体产量/ $g \cdot L^{-1}$ |
|----|-----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 45 | 30 | 300 | 8.76 |
| 2 | 50 | 35 | 275 | 8.96 |
| 3 | 55 | 40 | 250 | 9.22 |
| 4 | 60 | 45 | 225 | 9.78 |
| 5 | 65 | 50 | 200 | 8.31 |
| 6 | 70 | 55 | 175 | 8.22 |
| 7 | 75 | 60 | 150 | 6.65 |

2.3 响应面分析试验

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 设计三因素三水平的响应面分析试验, 以玉米粉、麸皮和 VB_1 3 个因素为自变量, 以菌丝体产量为响应值, 根据最陡爬坡试验的结果确定试验中心和水平, 试验因素与水平的选取见表 5, Box-Behnken 试验设计及结果见表 6。

表 5 Box-Behnken 试验因素与水平

| 编码 水平 | 因素 | | |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| | X_1 玉米粉/ $g \cdot L^{-1}$ | X_2 麸皮/ $g \cdot L^{-1}$ | X_3 $VB_1/\mu g \cdot L^{-1}$ |
| -1 | 55 | 40 | 200 |
| 0 | 60 | 45 | 225 |
| 1 | 65 | 50 | 250 |

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果

| 试验号 | X_1 | X_2 | X_3 | 实测值/ $g \cdot L^{-1}$ | 预测值/ $g \cdot L^{-1}$ |
|-----|-------|-------|-------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 1 | 0 | 10.88 | 10.65 |
| 2 | 0 | -1 | 1 | 8.11 | 8.18 |
| 3 | 1 | -1 | 0 | 9.55 | 9.59 |
| 4 | -1 | 0 | -1 | 9.12 | 9.23 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 9.96 | 9.99 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 10.04 | 10.04 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 9.98 | 9.99 |
| 8 | -1 | 0 | 1 | 8.11 | 8.11 |
| 9 | 0 | 1 | -1 | 10.22 | 10.15 |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 9.56 | 9.45 |
| 11 | 0 | 1 | 1 | 8.55 | 8.89 |
| 12 | 0 | -1 | -1 | 9.52 | 9.18 |
| 13 | 1 | 0 | -1 | 9.98 | 9.99 |
| 14 | -1 | -1 | 0 | 8.22 | 8.45 |
| 15 | -1 | 1 | 0 | 9.11 | 9.07 |

表 7 Box-Behnken 试验回归方程的方差分析

| 方差来源 | SS | DF | MS | F | P>F |
|----------|---------|----|---------|--------|---------------|
| 模型 | 9.36 | 9 | 1.04 | 9.16 | 0.0126 |
| X_1 | 3.66 | 1 | 3.66 | 32.23 | 0.0024 |
| X_2 | 1.41 | 1 | 1.41 | 12.43 | 0.0168 |
| X_3 | 2.54 | 1 | 2.54 | 22.40 | 0.0052 |
| X_1X_2 | 0.0480 | 1 | 0.048 | 0.43 | 0.5426 |
| X_1X_3 | 0.087 | 1 | 0.087 | 0.77 | 0.4213 |
| X_2X_3 | 0.017 | 1 | 0.017 | 0.15 | 0.7155 |
| X_1^2 | 0.20 | 1 | 0.20 | 1.73 | 0.2459 |
| X_2^2 | 0.39 | 1 | 0.39 | 3.39 | 0.1249 |
| X_3^2 | 1.20 | 1 | 1.20 | 10.58 | 0.0226 |
| 一次项 | 7.61 | 3 | 2.54 | 12.06 | 0.008 |
| 二次项 | 0.15 | 3 | 0.051 | 0.19 | 0.9017 |
| 交互项 | 1.59 | 3 | 0.53 | 4.68 | 0.0648 |
| 失拟项 | 0.56 | 3 | 0.19 | 108.49 | 0.0091 |
| 残存误差 | 0.00347 | 2 | 0.00173 | | |
| 总和 | 9.93 | 14 | | | |

由表 7 Box-Behnken 试验回归方程的方差分析可知, 模型回归显著 ($P < 0.05$), 玉米粉和麸皮对于产量影响显著 ($P < 0.05$)。回归方程的一次项显著, 而二次项和交互项不显著。

以菌丝体产量作为指标对于进行回归拟合可以得到产量对编码自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 的回归方程 $Y = 9.99 + 0.79X_1 + 0.42X_2 - 0.68X_3 + 0.11X_1X_2 - 0.078X_1X_3 - 0.065X_2X_3 - 0.12X_1^2 - 0.44X_2^2 - 0.46X_3^2$ 。 $R = 0.9428$ 说明该模型与实际试验拟合很好, 调整后的 R 为 0.8399, 即表明模型可以解释 83.99% 的菌丝体产量的变化, 进一步说明了回归方程的拟合程度较好。

由响应面回归分析和回归方程拟合可以绘出响应面图像, 如图 1、2、3 所示。

为了确定各因素的最佳点, 对已回归的非线性模型方程求一阶偏导, 并令其等于 0 可以得到曲面的最大点, 求导方程整理求解得最适质量浓度分别为: 玉米粉 65 g/L, 麸皮 49.31 g/L, VB_1 214.61 $\mu\text{g/L}$, 菌丝体预测产量为 10.75 g/L。并且以该组分配置培养基发酵, 结果最高菌丝体产量可以达到 11.16 g/L, 从而证明该模型的预测准确性。

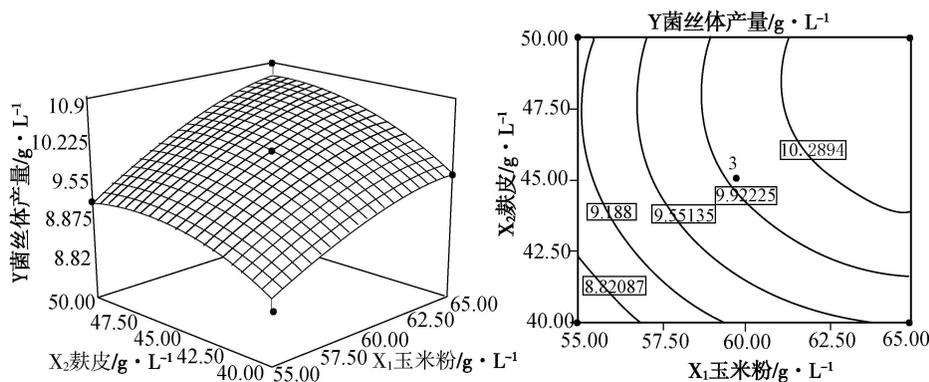


图 1 玉米粉和麸皮对菌丝体产量的影响

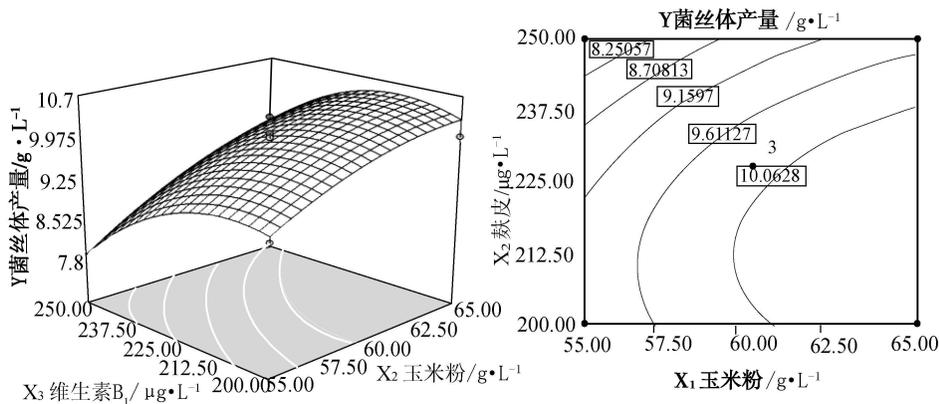


图 2 玉米粉和 VB_1 对菌丝体产量的影响

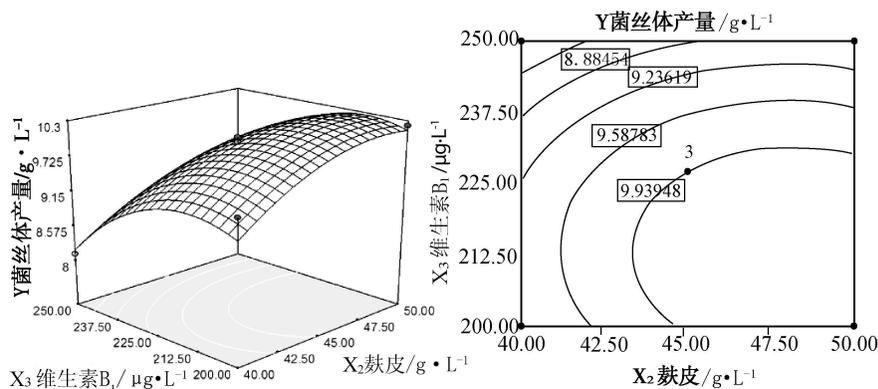


图3 麸皮和VB₁对菌丝体产量的影响

3 结论

该研究通过 Plackett-Burman 试验确定玉米粉、麸皮、VB₁ 为主要影响菌丝体产量的因素,在此基础上进行最陡爬坡试验,确定最佳响应面区域,又采用 Box-Behnken 设计,得到 3 种因素的添加量为:玉米粉 65 g/L、麸皮 49.31 g/L、VB₁ 214.61 μg/L。此条件下菌丝体产量可以达到 11.16 g/L,说明模型是比较可靠的,为进一步大规模发酵生产菌丝体并提取菌丝体多糖奠定了研究基础。

参考文献

[1] 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.

- [2] 张敏,纪晓光,贝祝春,等.桑黄多糖抗肿瘤作用[J].中药药理与临床, 2006, 22(3, 4): 56-58.
- [3] Bae J S, Janga K H, Yim H N, et al. Polysaccharides Isolated from *Phellinus gilvus* Inhibit Melanoma Growth in Mice [J]. Cancer Letters, 2005, 218: 43-52.
- [4] Li X, Jiao L, Zhang X, et al. Anti-tumor and Immunomodulating Activities of Proteoglycans from Mycelium of *Phellinus nigricans* and Culture Medium [J]. International Immunopharmacology, 2008(8): 909-915.
- [5] 沈萍.微生物学试验[M].3版.北京:高等教育出版社, 1999: 215.
- [6] 胡运权.试验设计方法[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 1997: 153-154.
- [7] 汪远征,徐雅静.SAS 软件与统计应用教程[M].北京:机械工业出版社, 2007: 129-134.
- [8] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.

Optimization of Liquid Fermentation Culture Medium for Producing *Phellinus nigricans* Mycelium by Response Surface Methodology

GAO Chan-juan, SUN Ling, ZHANG Jing, YANG Xiang-hua, WANG Zhan-yong

(College of Environmental and Biological Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun, Liaoning 113001)

Abstract: The Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of culture medium component which could affect the yields of *Phellinus nigricans* mycelium. On the basis of analyzing the statistical regression, corn flour, bran and vitamin B₁ were found to be the most important factors. Subsequently, Path of Steepest Ascent and Box-Behnken response surface methodology were employed to determine the maximum yields of *Phellinus nigricans* mycelium at the optimum concentration of key factors. The yields of *Phellinus nigricans* mycelium was found to correlate to the three parameters. The results showed that the optimal values of the three parameters were corn flour was 65 g/L, bran was 49.31 g/L and vitamin B₁ was 214.61 μg/L. The predicted value of yields was 10.75 g/L, and the actual experimental result was 11.16 g/L, which shows the results were reasonable.

Key words: *Phellinus nigricans*; Plackett-Burman design; path of steepest ascent; response surface analysis methodology