

DOI:10.11937/bfyy.201612038

响应面法优化青海野生双孢菇发酵培养基

余 梅¹, 焦迎春², 孙 旭², 余 刚², 邱冬梅², 高淑敏³

(1. 青海普兰特药业有限公司, 青海 西宁 810007; 2. 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016; 3. 青海省农林科学院, 青海 西宁 810016)

摘 要:以野生青海双孢菇(*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach)为试材,以胞外多糖含量为响应值,在单因素试验的基础上,采用4因素4水平响应面分析法,研究了培养基中不同营养因子对其菌丝代谢胞外多糖含量的影响,以确定最佳野生双孢菇发酵培养基。结果表明:最优培养基为甘露醇 19.83 g·L⁻¹,蛋白胨 6.35 g·L⁻¹,维生素 B₂ 1.61 g·L⁻¹,硫酸亚铁 0.42 g·L⁻¹,胞外多糖含量最高可达 2.002 g·L⁻¹,与试验模型预测值基本一致。

关键词:响应面法;青海野生双孢菇;胞外多糖;培养基;优化

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0152-06

青海野生双孢菇(*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach)在分类上隶属于真菌界(Kingdom Fungi)担子菌门(Basidiomycota)无隔担子菌纲伞菌目(Agaricales)伞菌科(Agaricaceae)双孢菇属(*Agaricus*),又称“草原一号”,为双孢菇变种^[1]。真菌多糖是一种新内源活性物质,主要来源于各种真菌子实体、发酵液、菌丝体,具有较强的抗缺氧、抗病毒、抗肿瘤、降糖降脂、提高免疫力和抗衰老等多种生物活性^[2]。目前,对青海野生双孢菇的研究主要集中在菌种驯化、栽培、液体菌种制备等方面^[3],而对以胞外多糖为目标产物的发酵培养基的研究尚鲜见报道。

响应面法可通过影响因子不同水平及其交互作用进行优化与评价,已广泛用于发酵培养基优化和模型建立中,现以青藏高原的特色资源野生双孢菇为试材,以胞外多糖为目标产物,利用响应面法优化发酵培养基组成以提高其胞外多糖的产量,以期对青海野生双孢菇胞外多糖的开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青海野生双孢菇斜面菌种由青海省农林科学院提供。固体斜面培养基:200 g 土豆,20 g 葡萄糖,5 g

蛋白胨,20 g 琼脂,1 000 mL 水,pH 自然^[4]。液体种子培养基:同上,不加琼脂。基础发酵培养基:同上。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养 菌种活化^[5]:将保存于4℃冰箱中的“草原一号”菌种取出,置于室温下48 h,接种于新鲜的PDA固体斜面培养基上,置于20℃恒温培养箱中避光培养7 d;种子液的制备:取1 cm²大小的活化斜面菌种2~3块,接种至液体种子培养基中(100 mL·(250 mL)⁻¹三角瓶),摇床振荡培养10 d(25℃,150 r·min⁻¹);发酵培养:按10%接种量(V/V)将“草原一号”液体种子接于新鲜液体发酵培养基中(80 mL·(150 mL)⁻¹三角瓶),放入摇床振荡培养(25℃,150 r·min⁻¹),培养7 d。

1.2.2 胞外多糖提取 采用乙醇沉淀法提取多糖^[6]。

1.2.3 单因素试验 分别以20 g·L⁻¹的甘露醇、葡萄糖、乳糖、蔗糖、麸皮、小麦、稻草等为碳源;分别以蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、硝酸钾、尿素、硫酸铵等为氮源;分别以0.01 g·L⁻¹维生素 B₁、复合维生素 B、维生素 B₂、维生素 B₁₂、维生素 C 为生长因子;分别以0.5 g·L⁻¹硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙、硫酸铝、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰为微量元素,考察其对青海野生双孢菇产胞外多糖影响。

1.2.4 响应面试验 在单因素试验基础上,采用SAS软件设计响应面试验,以甘露醇、蛋白胨、维生素 B₂、硫酸镁为考察变量,以胞外多糖含量为响应值,进行响应面分析,以确定发酵多糖最佳培养基配方。具体试验设计见表1。

1.3 项目测定

胞外多糖测定采用苯酚硫酸法^[9]。

第一作者简介:余梅(1977-),女,青海海东人,本科,工程师,研究方向为食品药品开发。E-mail:651313646@qq.com。

责任作者:焦迎春(1973-),女,河北景县人,硕士,教授,研究方向为食品发酵工程。E-mail:jyc_22@163.com。

基金项目:微生物代谢国家重点实验室开放课题资助项目(MMLKF14-05);国家自然科学基金资助项目(31460391);青海省科技厅1020资助项目(2013-N-506)。

收稿日期:2016-03-04

表 1 试验因素水平及编码^[7-8]

Table 1 The factor levels in the orthogonal experiment $g \cdot L^{-1}$

编码水平 Code	因素 Factors			
	A 甘露醇	B 蛋白胨	C 维生素 B ₁₂	D 硫酸亚铁
-1 level	10	4	1	0.2
+1 level	30	8	2	0.6
-alpha	0	2	0.5	0
+alpha	40	10	2.5	0.8

1.4 数据分析

采用 SAS 软件(8.12 版)进行响应面数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 碳源种类对多糖含量的影响 由图 1 可知,甘露醇为碳源的胞外多糖含量为 $0.449 g \cdot L^{-1}$,果糖为碳源种类时青海野生双孢菇胞外多糖含量为 $0.504 g \cdot L^{-1}$,果糖的价格远高于甘露醇,不利于工业化大生产,故选择甘露醇为最佳碳源。

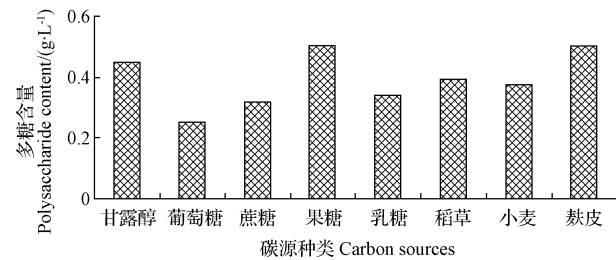


图 1 碳源种类对胞外多糖的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources types on the polysaccharide content

2.1.2 碳源添加量对多糖含量的影响 利用 LSD 法对试验数据进行多重比较,由表 2 可知,当甘露醇添加量为 $20 g \cdot L^{-1}$ 时,与各因素间均达到极显著差异水平,因此确定最优甘露醇添加量为 $20 g \cdot L^{-1}$ 。

表 2 甘露醇对多糖含量影响的多重比较(LSD 法)^[10]

Table 2 Effect of mannitol on the polysaccharide content by multiple comparison table method(LSD)

甘露醇浓度 Content of mannitol /($g \cdot L^{-1}$)	平均数 Average \bar{x} /($g \cdot L^{-1}$)	$\bar{x}-0.773$	$\bar{x}-0.778$	$\bar{x}-0.874$	$\bar{x}-0.874$
20	0.886	0.113 **	0.108 **	0.012 **	0.012 **
25	0.874	0.101 **	0.096 **	0	
30	0.874	0.101 **	0.096 **		
35	0.778	0.005			
15	0.773				

$MS_e=0.000\ 08$ $LSD_{0.05}=0.005\ 2$ $LSD_{0.01}=0.007\ 3$

注: * 表示差异显著; ** 表示差异极显著。下同。

Note: ; * indicates significant difference; ** indicates highly significant difference.

The same below.

2.1.3 氮源种类对多糖含量的影响 由图 2 可知,当以蛋白胨作为氮源种类时,青海野生双孢菇的胞外多糖含量达到最大值,酵母膏次之,综合考虑,选择蛋白胨作为最佳氮源。

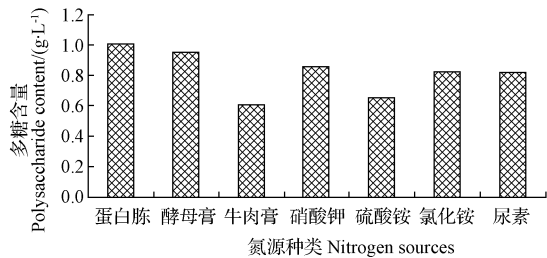


图 2 氮源种类对胞外多糖含量的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources types on the polysaccharide content

2.1.4 氮源添加量对多糖含量的影响 利用 LSD 法对试验数据进行多重比较,由表 3 可知,当蛋白胨添加量为 $6 g \cdot L^{-1}$ 时,与各因素间的比较均达到了差异显著或极显著的程度($5 g \cdot L^{-1}$ 除外)。因此确定最优蛋白胨添加量为 $6 g \cdot L^{-1}$ 。

表 3 蛋白胨添加量对多糖含量的影响多重比较(LSD 法)

Table 3 Effect of peptone on the polysaccharide content by multiple comparison table method(LSD)

蛋白胨浓度 Content of peptone /($g \cdot L^{-1}$)	平均数 Average \bar{x} /($g \cdot L^{-1}$)	$\bar{x}-0.864$	$\bar{x}-0.891$	$\bar{x}-0.895$	$\bar{x}-0.920$
6	0.956	0.092 **	0.065 *	0.061 *	0.036
5	0.920	0.056 *	0.029	0.025	
7	0.895	0.031	0.004		
8	0.891	0.027			
4	0.864				

$MS_e=0.000\ 5$ $LSD_{0.05}=0.051$ $LSD_{0.01}=0.074$

2.1.5 维生素种类对多糖含量的影响 由图 3 可知,当维生素种类为 B₁₂ 时,菌丝代谢胞外多糖含量达到最高值 $0.992 g \cdot L^{-1}$ 。

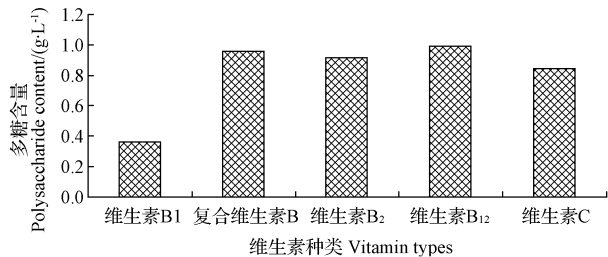


图 3 维生素种类对胞外多糖含量的影响

Fig. 3 Effect of vitamin types on the content of polysaccharide

2.1.6 维生素添加量对多糖含量的影响 利用 LSD 法对试验数据进行多重比较,由表 4 可知,当维生素 B₁₂ 添加量为 1.5 g · L⁻¹ 时,与各因素间的比较均达到了差异

极显著的程度。因此确定最优维生素 B₁₂ 添加量为 1.5 g · L⁻¹。

表 4 维生素 B₁₂ 添加量对多糖含量影响的多重比较(LSD 法)

Table 4 Effect of vitamin B₁₂ content on the polysaccharide content by multiple comparison table method(LSD)

维生素 B ₁₂ 含量 Content of vitamin B ₁₂ /(g · L ⁻¹)	平均数 Average \bar{x} /(g · L ⁻¹)	$\bar{x}-0.805$	$\bar{x}-0.839$	$\bar{x}-0.946$	$\bar{x}-0.955$	$\bar{x}-0.987$
1.5	1.154	0.349 **	0.315 **	0.208 **	0.199 **	0.167 **
1.0	0.987	0.182 **	0.148 **	0.041	0.032	
2.0	0.955	0.15	0.116 **	0.009		
0.5	0.946	0.141 **	0.107 *			
2.5	0.839	0.034				
3.0	0.805					

$MS_e=0.0145$ $LSD_{0.05}=0.076$ $LSD_{0.01}=0.111$

2.1.7 微量元素种类对多糖含量的影响 由图 4 可知,当以硫酸亚铁为微量元素时,菌丝代谢胞外多糖含量达到最高值 0.925 g · L⁻¹,因此,选择硫酸亚铁为最佳微量元素。

2.1.8 微量元素添加量对多糖含量的影响 利用 LSD 法对试验数据进行多重比较,由表 5 可知,当硫酸亚铁添加量为 0.4 g · L⁻¹ 时,与各因素水平间的比较均达到了差异极显著的程度(0.3 g · L⁻¹ 除外)。因此确定硫酸亚铁最优添加量为 0.4 g · L⁻¹。

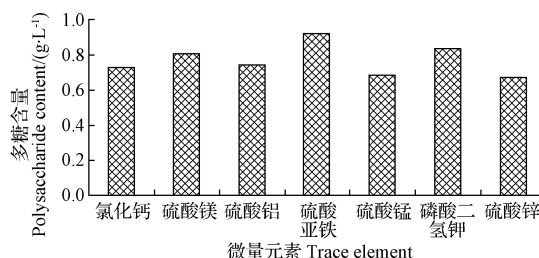


图 4 微量元素种类对胞外多糖含量的影响

Fig. 4 Effect of trace elements types on the polysaccharide content

表 5 硫酸亚铁添加量对多糖含量影响的多重比较(LSD 法)

Table 5 Effect of FeSO₄ content on the polysaccharide content by multiple comparison method(LSD)

FeSO ₄ 含量 Content of FeSO ₄ /(g · L ⁻¹)	平均数 Average \bar{x} /(g · L ⁻¹)	$\bar{x}-0.476$	$\bar{x}-0.781$	$\bar{x}-0.839$	$\bar{x}-0.946$	$\bar{x}-0.951$	$\bar{x}-1.006$
0.4	1.095	0.619 **	0.314 **	0.256 **	0.149 **	0.144 **	0.089
0.3	1.006	0.530 **	0.225 **	0.167 **	0.060	0.055	
0.5	0.951	0.475 **	0.170 **	0.112 *	0.005		
0.6	0.946	0.470 **	0.165 **	0.107 *			
0.7	0.839	0.363 **	0.058				
0.8	0.781	0.305 **					
0.2	0.476						

$MS_e=0.0075$ $LSD_{0.05}=0.099$ $LSD_{0.01}=0.144$

2.2 响应面优化结果

2.2.1 多糖响应面结果与分析 试验需要考察 4 个因素,以多糖含量为响应指标,利用 SAS 软件进行试验设计,共 30 个试验组,其中共有 6 组中心试验,结果见表 6。

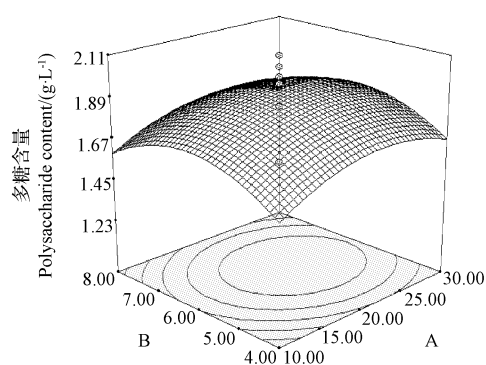
2.2.2 回归模型建立及方差分析 根据表 7 的显著性检验可知,模型的一次项 C(0.01 < P ≤ 0.05) 有显著影响,各因素的二次项(P < 0.01) 有极显著影响,对结果进行回归拟合分析,胞外多糖预测值(Y) 对应自变量甘露醇(A)、蛋白胨(B)、维生素 B₁₂(C)、硫酸亚铁(D) 的二元回归方程为: $Y(g \cdot L^{-1}) = -2.766 + 0.507A + 0.552B + 2.419C + 2.495D - 2.343 \times 10^{-4}AB - 1.137 \times 10^{-3}AC + 0.015719AD - 0.017687BC - 0.025781BD +$

$0.11688CD - 1.218 \times 10^{-3}A^2 - 0.042 \times 10^{-3}B^2 - 0.714C^2 - 3.569D^2$, 模型的确定系数 $R^2 = 0.776$, 说明该方程可以从一定程度上(超过 77%) 解释数据的可变性。

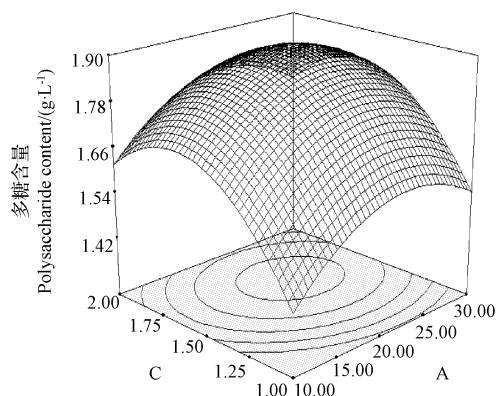
2.2.3 等高线图分析 根据回归方程绘制响应面等高线图(图 5)。模型的一次项 A、B 差异不显著(P > 0.05), C 差异显著(P < 0.05); 二次项 A²、B²、C²、D² 差异极显著(P < 0.01), 说明试验因子对响应值不是简单的线性关系; 交互项不显著, 说明所选因素之间的交互作用不明显, 对试验相关的影响不显著, 应用该模型时可以不考虑因素间的交互作用。由各因素的相关系数可知, 4 个因素对响应值影响的顺序为 C > A > B > D, 即维生素 B₁₂ > 甘露醇 > 蛋白胨 > 硫酸亚铁。综上所述,

产胞外多糖化最优培养基配方为甘露醇 $19.83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $6.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、维生素 B_{12} $1.61 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸亚铁

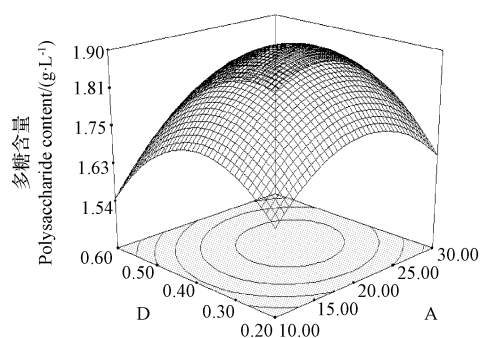
$0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，在此条件下，试验模型预测胞外多糖最高值为 $1.918 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



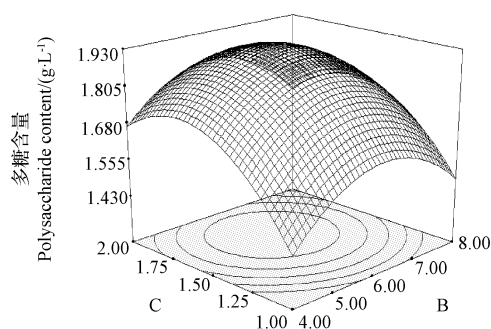
(a)甘露醇与蛋白胨交互影响的等高线
Contour line of correlation between mannitol and peptone



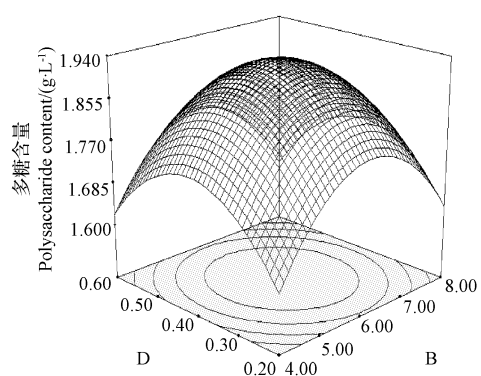
(b)甘露醇与维生素 B_{12} 交互影响等高线
Contour line of correlation between mannitol and vitamin B_{12}



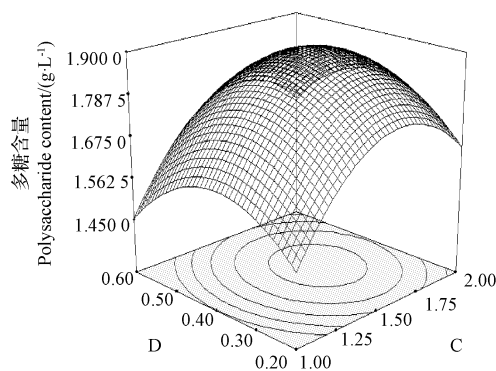
(c)甘露醇与硫酸亚铁交互影响等高线
Contour line of correlation between mannitol and iron sulfate



(d)蛋白胨与维生素 B_{12} 交互影响等高线
Contour line of correlation between peptone and vitamin B_{12}



(e)蛋白胨与硫酸亚铁交互影响等高线
Contour line of correlation between peptone and iron sulfate



(f)维生素 B_{12} 与硫酸亚铁交互影响等高线
Contour line of correlation between vitamin B_{12} and iron sulfate

图5 各因素对胞外多糖交互影响

Fig. 5 Effect of experimental factors on polysaccharide

表 6 多糖响应面试验结果

Table 6 Polysaccharide response surface test results $g \cdot L^{-1}$

	A	B	C	D	多糖含量
	甘露醇	蛋白胨	维生素 B ₁₂	硫酸亚铁	Polysaccharide
	Mannitol	Peptone	Vitamin B ₁₂	Iron sulfate	content
1	40	6	1.5	0.4	1.631
2	30	4	1.0	0.2	1.107
3*	20	6	1.5	0.4	2.108
4	10	4	1.0	0.6	1.131
5	20	10	1.5	0.4	1.238
6	10	8	2.0	0.6	1.321
7	10	8	2.0	0.2	1.357
8	20	6	1.5	0	1.345
9	30	8	2.0	0.2	1.250
10	20	6	2.5	0.4	1.500
11	10	8	1.0	0.6	1.119
12	10	4	1.0	0.2	0.975
13	0	6	1.5	0.4	1.393
14*	20	6	1.5	0.4	1.997
15*	20	6	1.5	0.4	1.845
16	10	4	2.0	0.2	1.524
17	20	6	1.5	0.8	1.512
18	30	8	2.0	0.6	1.596
19	20	2	1.5	0.4	1.417
20	30	4	2.0	0.6	1.381
21*	20	6	1.5	0.4	2.048
22	30	8	1.0	0.6	1.035
23	10	4	2.0	0.6	1.068
24	30	8	1.0	0.2	1.512
25	30	4	2.0	0.2	1.369
26	30	4	1.0	0.6	1.250
27*	20	6	1.5	0.4	1.962
28	10	8	1.0	0.2	1.262
29*	20	6	1.5	0.4	1.548
30	20	6	0.5	0.4	1.071

注:“*”为中心试验点。

Note:“*” is center testing point.

表 7 多糖回归方程模型的方差分析^[10]

Table 7 Polysaccharide regression equation model of analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value	Significance
模型	2.170	14	0.160	3.430	0.008	**
A	0.062	1	0.062	1.480	0.243	
B	3.480×10^{-3}	1	3.480×10^{-3}	0.083	0.777	
C	0.230	1	0.230	5.410	0.034	*
D	6.100×10^{-4}	1	6.100×10^{-4}	0.015	0.905	
A ²	0.410	1	0.410	9.720	0.007	**
B ²	0.770	1	0.770	18.460	0.000 6	**
C ²	0.870	1	0.870	20.840	0.000 4	**
D ²	0.560	1	0.560	13.330	0.002	**
R ²	0.776					

2.2.4 响应面验证试验 以响应面获得的最佳培养基进行青海野生双孢菇液体培养,试验重复 3 次,以最初的未优化的培养基为对照,试验组胞外多糖含量均值为 $2.002 g \cdot L^{-1}$,对照多糖含量为 $1.637 g \cdot L^{-1}$,优化后的提高率达到 22.30%。利用 LSD 法对试验数据进行多重

表 8 验证试验的多重比较(LSD 法)

Table 8 Verification testing in multiple comparison table method(LSD)

因素	多糖含量			平均数	$\bar{x}-1.637$
Factor	Polysaccharide content/($g \cdot L^{-1}$)			Average (\bar{x})	
A ₁ (最佳组合)	1.985	2.105	1.915	2.002	0.365 **
A ₂ (空白)	1.589	1.641	1.682	1.637	
$MS_e=0.007\ 6\ LSD_{0.05}=0.076\ LSD_{0.01}=0.140$					

比较,结果表明 A₁ 和 A₂ 间的比较达到了显著性差异。

3 结论

单因素试验结果表明,最佳碳源为甘露醇,最适添加量为 $20 g \cdot L^{-1}$;蛋白胨是最佳氮源,最适添加量为 $5 g \cdot L^{-1}$;维生素以 B₁₂ 最优,最适添加量为 $1.5 g \cdot L^{-1}$;硫酸亚铁是最佳微量元素,最适添加量为 $0.4 g \cdot L^{-1}$ 。以单因素试验的结果为响应面试验的中心值点,进行响应面试验,获得产胞外多糖最优培养基为甘露醇 $19.83 g \cdot L^{-1}$ 、蛋白胨 $6.35 g \cdot L^{-1}$ 、维生素 B₁₂ $1.61 g \cdot L^{-1}$ 、硫酸亚铁 $0.42 g \cdot L^{-1}$,试验模型预测多糖最高值为 $1.918 g \cdot L^{-1}$,验证试验胞外多糖含量均值为 $2.002 g \cdot L^{-1}$,与模型预测值基本一致。

参考文献

- [1] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:109.
- [2] 任启伟. 蒙古口蘑液体发酵及菌丝体多糖提取的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2011.
- [3] 彭秀科,高淑敏,刘海林,等. 青海野生双孢菇菌种培养基筛选试验[J]. 食用菌,2015(3):20-21.
- [4] 刘晓鹏,姜宁,马琼,等. 双孢菇深层发酵工艺优化的研究[J]. 食品工业科技,2014,21(35):211.
- [5] 毛勇. 深层发酵双孢菇胞外多糖的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [6] 程俊文,贺亮,李肖娟,等. 响应面法优化灵芝胞外多糖的发酵工艺条件[J]. 中国林福特产,2014(3):1-4.
- [7] HUANG Y, YUAN Y L, ZHOU Z D, et al. Optimization and evaluation of chelerythrine nanoparticles composed of magnetic multiwalled carbon nanotubes by response surface methodology[J]. Applied Surface Science, 2013,10(11):148.
- [8] HUY X N, BAE W, GUNADI T, et al. Using response surface design for optimizing operating conditions in recovering heavy oil process, Peace River oil sands[J]. Journal of Petroleum Science and Gineering, 2014, 2(12):1016.
- [9] 王光亚. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,2002.
- [10] YE L, YANG M, XU L, et al. Optimization of inductive angle sensor using response surface methodology and finite element method[J]. Measurement, 2013,11(48):17.

Optimizing of Culture Medium of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach for Extracellular polysaccharide Production by Response Surface Methodology

YU Mei¹, JIAO Yingchun², SUN Xu², YU Gang², QIU Dongmei², GAO Shumin³

(1. Qinghai Plateau Pharmaceutial Co. Ltd., Xining, Qinghai 810007; 2. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 3. Agro-forestry Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810016)

不同激素配比对白及愈伤组织诱导、增殖和分化的影响

徐德林¹, 沈 访², 钱 刚¹, 乔晓颖², 储士润², 李 林¹

(1. 遵义医学院 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医学院 第一临床学院, 贵州 遵义 563000)

摘 要:以白及为试材,以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,研究了愈伤组织诱导、增殖和分化培养基中的最佳激素种类和浓度配比。结果表明:在 MS 中添加 6-BA $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2,4-D $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时白及愈伤的诱导率最高,达 89.89%。2,4-D 是诱导白及愈伤生成的关键激素,而在基本培养基中单添加 6-BA 时并不能诱导愈伤组织的生成,同时添加 2,4-D 和 6-BA 能有效促进愈伤的诱导,且愈伤诱导率随着 2,4-D 浓度的增加而逐渐增加,但优质愈伤率也随之降低。添加 6-BA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2,4-D $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的增殖培养基中愈伤细胞的增殖率最高,30 d 的增殖倍数达 7.457。在分化培养基中添加 NAA 和 TDZ 有利于白及愈伤组织分化,分化率随着二者浓度的增加而增加,且 NAA 的促分化效果优于 TDZ。MS+2,4-D $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳分化培养基,分化 30 d 时其分化率为 86.67%。

关键词:白及;愈伤组织;诱导;增殖;分化;培养基配方

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0157-05

白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.)是医药、工业、园艺的重要原材料。白及假鳞茎是一种常用的中药材,具有抗菌、止血收敛、消肿生肌之功效^[1-3],能通过影响巨噬细胞来提高伤口的愈合能力^[4]。近年的药理学研究还发现,白及能合成大量的超氧化物,具有抗菌镇痛及抑制癌细胞增殖作用^[1,5]。此外,白及还被广泛用

作护肤化妆品、高档卷烟烟蒂胶、工业糊料、浆丝绸、浆纱、涂料、酿酒等工业原料。由于市场需求不断增加,白及的价格持续增高。然而,白及野生资源已日渐枯竭,已被我国列为珍稀濒危的中药物种,同时也被国际贸易公约(CITES)附录二录入加以保护^[6]。因此,建立与优化白及药用品种的组织快繁体系不仅已成为白及的产业化种植过程中迫切需要解决的重大问题,也是保护白及野生资源的重要手段。

前人关于白及的组织快繁多以种子^[7]、腋芽^[8]等为外植体直接诱导出幼苗,利用白及种子诱导出愈伤组织并建立快繁体系的文献报道甚少^[7]。该研究以白及种子为供试材料,在 MS、1/2MS 培养基中添加不同配比的激素,比较不同激素对白及愈伤组织的诱导、质量、增殖等的影响,最终建立优化白及的快繁体系,为白及中药现代化进程中标准化生产奠定物质和试验基础。

第一作者简介:徐德林(1981-),男,博士,副教授,研究方向为中药材遗传育种。E-mail:xudelinq2000@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31560079);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合 ZY 字[2013]3002 号);贵州省科技厅、遵义医学院、遵义市科技局联合基金重点资助项目(黔科合 LH 字[2014]7549 号);贵州省教育厅 2013 年大学生创新创业训练计划资助项目(201410661019);遵义医学院 2013 年大学生创新资助项目(院发[2013]6516)。

收稿日期:2016-02-14

Abstract: Taking *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach as material, the content of extracellular polysaccharide as the response value, on the basis of single factor experiment, the effect of different nutritional factors on the content of extracellular polysaccharide were researched by the response surface methodology with 4 factors and 4 levels to determined the optimum culture medium. The results showed that the best culture medium for fermentation extracellular polysaccharide of the *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach was mannitol $19.83\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, peptone $6.35\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vitamin B₂ $1.61\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, iron sulfate $0.42\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the highest production of extracellular polysaccharide reached $2.002\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which was identical to the response surface prediction value.

Keywords: response surface methodology; *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach; extracellular polysaccharide; culture medium; optimizing