

利用响应面法优化灰树花胞外多糖的培养基

李 政¹, 王 玉², 郝利民³

(1. 天津工业大学 纺织学院, 天津 300387; 2. 天津农学院 农学系, 天津 300384; 3. 中国人民解放军总后勤部军需装备研究所, 北京 100010)

摘 要:为了提高灰树花胞外多糖的产量,应用响应面分析方法对灰树花培养基进行了优化。通过对模型方程的响应曲面图及其等高线图进行分析。结果表明:影响该菌发酵产糖的优化培养基(g/L): KH_2PO_4 2、 MgSO_4 1、 VB_1 0.02、麦麸 50、葡萄糖 20、玉米浆 23.8、玉米粉 19.7、豆饼粉 5.2。在该培养基下胞外多糖产量为 2.44 g/L,比优化前的培养基产量提高了 75.22%。

关键词:灰树花;胞外多糖;响应面;培养基

中图分类号:S 646.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)11-0113-04

灰树花(*Grifol frondosa*)为担子菌门伞菌纲多孔菌目薄孔菌科树花菌属的一种大型真菌^[1-2]。灰树花富含多糖、维生素、氨基酸、蛋白质、无机盐等营养成分,是一种药、食两用菌^[3]。近年来的研究发现,灰树花中富含的多糖类物质具有明显的抗氧化^[4]、抗诱变、抗衰老、调节免疫、抑制肿瘤^[5]、抗 HIV、保肝护肝等生理活性作用^[6-8]。为了提高灰树花胞外多糖的产量,该研究应用响应面分析方法对灰树花产多糖培养基进行了优化。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 灰树花(*Grifol frondosa*):天津农学院微生物实验室保藏菌种。

1.1.2 培养基 斜面、种子培养基:葡萄糖马铃薯培养基-PDA(g/L):马铃薯 200、葡萄糖 20、蛋白胨 2、 KH_2PO_4 2、 MgSO_4 1、 VB_1 0.1^[3],斜面培养基中再加入 20 g/L 的琼脂。发酵培养基(g/L): KH_2PO_4 2、 MgSO_4 1、 VB_1 0.02、麦麸 50、葡萄糖 20、玉米浆、玉米粉、豆饼粉、pH 自然^[3],其中玉米浆、玉米粉和豆饼粉的量随设计的不同而不同。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的制备 从斜面上铲出 5 块约 0.5 cm×0.5 cm 的菌块转接于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中。在摇床上 25℃ 下 150 r/min 培养 7 d,即为种子液。以 6%(v/v)的接种量接种于装 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,25℃ 下 150 r/min 培养 7 d。

1.2.2 胞外多糖的测量 发酵液 8 000 r/min 离心 15 min,取上清,边搅拌边加入 3 倍体积无水乙醇,剧烈搅拌,4℃ 冰箱中醇析 24 h。然后 8 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,真空干燥箱 60℃ 真空干燥得粗胞外多糖。

1.2.3 Plackett-Burman 设计 Plackett-Burman 设计法是 20 世纪中、后期发展起来的一种近饱和的二水平实验设计方法。它基于非完全平衡块原理,能用最少试验次数估计出因素的主效应,从众多的考察因素中快速有效地筛选出最重要的几个因素以供进一步研究。该试验选用试验次数 $N=12$,对 8 个因素即麦麸、玉米粉、葡萄糖、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 VB_1 、玉米浆和豆饼粉进行考察,分别对应于表 1 中 A、B、D、E、G、H、J 和 K 列。每个因素取低水平“-1”和高水平“+1”(低水平-1 为原始培养条件,高水平+1 取低水平的 1.25 倍)。另设 3 个虚拟列,对应于表 1 中的 C、F 和 I 列,考察试验误差。各因素对应的水平取值见表 2。

表 1 $N=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
2	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
10	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
11	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
12	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1

第一作者简介:李政(1978-),男,博士,讲师,现主要从事纺织相关生物发酵方面的研究工作。E-mail:lizheng@tjpu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21006072,31171662)。

收稿日期:2012-03-07

表 2 Plackett-Burman 设计中各个因素对应的水平值

因素		水平/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
		+1	-1
A	麦麸	62.5	50.0
B	玉米粉	12.5	10.0
D	葡萄糖	25.0	20.0
E	KH_2PO_4	2.5	2.0
G	MgSO_4	1.25	1.0
H	VB_1	0.025	0.02
J	玉米浆	12.5	10.0
K	豆饼粉	12.5	10.0

1.2.4 Box-Behnken 设计 响应面分析法(RSA)是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法。Box-Behnken 设计法每个因素取 3 个水平,以(-1,0,+1)编码。该试验在 Plackett-Burman 设计试验的基础上,根据 Box-Bohnken 的中心组合设计原理,以玉米浆、玉米粉和豆饼粉 3 个因素为自变量,分别记为 X_1 、 X_2 、 X_3 (表 3)。设计了三因素三水平共 15 个试验点的响应面分析试验,在中心值重复 3 次试验,试验设计见表 4。

表 3 试验因素、水平编码表

因素	水平/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		
	-1	0	+1
X_1 玉米浆	15	20	25
X_2 玉米粉	10	15	20
X_3 豆饼粉	5.0	7.5	10

表 4 Box-Behnken 试验设计方案

试验点	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	0	-1
3	-1	0	+1
4	-1	+1	0
5	0	-1	-1
6	0	-1	+1
7	0	+1	-1
8	0	+1	+1
9	+1	-1	0
10	+1	0	-1
11	+1	0	+1
12	+1	+1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验

据表 1 的 PB 试验设计,灰树花所产胞外多糖的量($\text{Y/g} \cdot \text{L}^{-1}$)见表 5。通过 SAS 软件分析,得出各因素的 t 值和可信度水平,从而得出对灰树花胞外多糖的量影响较为显著的 3 个因素。一般选择可信度大于 85% 以上的因素作为重要因素。经分析,玉米浆、玉米粉和豆饼粉 3 个因素的可信度大于 85%,是试验涉及的 8 个考察对象中最为显著的 3 个因素,对灰树花产胞外多糖影响较显著,作为重要因素进行下一步优化。

表 5 Plackett-Burman 试验结果

试验点	$\text{Y/g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1.3921
2	1.2452
3	1.3041
4	1.3121
5	1.5721
6	1.2916
7	1.1310
8	1.1635
9	1.1434
10	1.2217
11	1.2819
12	1.4333

2.2 Box-Behnken 试验

2.2.1 Box-Behnken 试验 据表 4 的 BB 试验设计,灰树花所产胞外多糖的量($\text{Y/g} \cdot \text{L}^{-1}$)见表 6。

表 6 Box-Behnken 试验结果

试验点	$\text{Y/g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1.3387
2	1.8261
3	1.5864
4	1.9407
5	0.6808
6	1.2343
7	2.1228
8	1.2991
9	0.9089
10	0.9284
11	1.9052
12	2.6606
13	2.0982
14	2.3568
15	2.2547

2.2.2 二次回归拟合及方差分析 采用 SAS 的 RSREG(响应面回归)对数据进行二次回归拟合,建立二次响应面回归模型,并进而寻求最优响应因子水平。分析结果如表 7、8、9、10 所示。由表 7 可知,复相关系数的平方 $R^2=0.9295$,说明由这 3 个因素及其二次项能解释 Y 变化的 92.95%,同时模型误差根 $S=0.262607$,得出的此回归方程拟合程度较好。由表 8 可知,一次项、二次项、交互项和总回归各项对灰树花合成的胞外多糖量(Y)的贡献大小分别为:0.0178、0.0299、0.0457 和 0.0206。经 F 检验,回归方程中一次项、二次项及交互项是显著的,说明响应面分析所选的 3 个因素(玉米浆、玉米粉和豆饼粉)主效应显著。由表 9 可知, $\text{Pr}=0.1439$,不显著,说明不需要引入更高次项,模型中无异常点,模型规定恰当。由表 10 可知,拟合的二次回归方程为: $Y = 2.236567 - 0.036100X_1 + 0.482563X_2 + 0.058363X_3 - 0.148533X_1^2 + 0.287425X_1X_2 - 0.375808X_2^2 + 0.109379X_3X_1 - 0.116513X_3X_2 - 0.172655X_3^2$ 。由方程可看出,该模型中因素 X_2 (玉米粉)、 X_3 (豆饼粉)的一次

表 7 变量 Y 的岭脊分析

反应变量均数	1.676113
模型误差根	0.262607
复相关系数的平方	0.929500

表 8 方差分析表

回归项	自由度	平方和	F 值	大于 F 的概率
一次项	3	1.900608	9.19	0.0178
平方项	3	1.467544	7.09	0.0299
交互项	3	1.174591	5.68	0.0457
总回归	9	4.542742	7.32	0.0206

表 9 失拟检验结果分析

回归项	自由度	平方和	F 值	大于 F 的概率
失拟项	3	0.310882	6.11	0.1439
纯误差项	2	0.033930		
总误差项	5	0.344812		

表 10 回归方程中回归系数的估计值

参数	参数估计	标准误	T-检验	大于 T 的概率
X_1	-0.036100	0.092846	-0.39	0.7134
X_2	0.482563	0.092846	5.20	0.0035
X_3	0.058363	0.092846	0.63	0.5572
X_1^2	-0.148533	0.136665	-1.09	0.3267
$X_2 X_1$	0.287425	0.131303	2.19	0.0802
X_3^2	-0.375808	0.136665	-2.75	0.0403
$X_3 X_1$	0.304125	0.131303	2.32	0.0684
$X_3 X_2$	0.344300	0.131303	-2.62	0.0470
X_3^3	-0.526508	0.136665	-3.85	0.0120

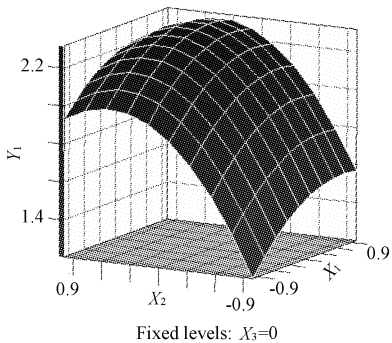


图 1 X_1 、 X_2 对灰树花胞外多糖产量影响模型的响应曲面图及等高线图

表 11 响应面规范分析

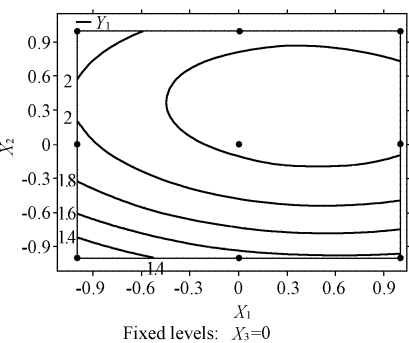
试验因子	X_1	X_2	X_3	估计值	稳定点类型
编码值	0.76	0.95	-0.035	2.4508	最大值
真实值/ $g \cdot L^{-1}$	2.38	1.97	0.52		

2.3 模型验证

由于试验方案中没有最优配方,需要对最优培养基进行验证试验。胞外多糖最优培养基组成为(g/L): KH_2PO_4 2、 $MgSO_4$ 1、 VB_1 0.02、麦麸 50、葡萄糖 20、玉米浆 23.8、玉米粉 19.7、豆饼粉 5.2。在该培养基下进行验证试验,结果证明预测值 2.4508 g/L 与验证试验平均值 2.4397 g/L ,该产量比优化前培养基多糖产量提高了 75.22%,表明该模型是合适有效的。

项对灰树花胞外多糖的合成具有正影响,而 X_1 (玉米浆)的一次项对灰树花胞外多糖的合成呈负影响;各因素的二次项对灰树花胞外多糖的合成均具有负影响;交互项中 X_1 与 X_2 、 X_1 与 X_3 对灰树花胞外多糖的合成具有正影响,而 X_2 与 X_3 对灰树花胞外多糖的合成呈负影响。

2.2.3 响应面分析及最优培养基成分的确定 根据模型方程可以作出响应曲面图及其等高线图。可较直观地解释各变量和变量之间对响应值的影响,等高线图同时可以揭示出各变量之间交互作用的显著性。可评价试验因素对灰树花胞外多糖合成的两两交互作用,并可以确定各个因素的最佳水平范围。该试验中,通过回归方程来绘制分析图,考察所拟合的相应曲面的形状。在豆饼粉(X_3)含量保持固定的情况下,玉米浆(X_1)和玉米粉(X_2)对胞外多糖产量影响模型的响应曲面图以及它所对应的等高线图见图 1。由图 1 可知,玉米浆(X_1)和玉米粉(X_2)的交互作用可以显著影响胞外多糖产量,其它因素之间的相互作用,对于胞外多糖产量影响趋势的响应曲面图及相应的等高线图与图 1 类似。通过 SAS 软件的分析得到响应面规范分析结果,见表 12。由各因素间的响应曲面图及表 11 可知,当 3 个主因素 X_1 、 X_2 、 X_3 取值分别为 2.38、1.97、0.52 g/L 时,回归模型存在稳定点,且为最大值,胞外多糖产量 Y 的最大估计值为 2.4508 g/L 。



3 结论

灰树花多糖具有重要的药用价值,为了提高灰树花胞外多糖的产量,该研究应用响应面分析方法对灰树花培养基进行了优化。优化后的培养基为(g/L): KH_2PO_4 2、 $MgSO_4$ 1、 VB_1 0.02、麦麸 50、葡萄糖 20、玉米浆 23.8、玉米粉 19.7、豆饼粉 5.2。在该培养基下胞外多糖产量为 2.44 g/L ,比优化前的培养基产量提高了 75.22%。该结果对于灰树花多糖的生产具有重要的价值。

参考文献

[1] 灰树花. 维基百科[DB/OL]. <http://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%81%B0%E6%A8%B9%E8%8A%B1>.
[2] 潘辉,王瑞娟,李正鹏,等. 工厂化栽培灰树花菌株的筛选研究[J]. 北方园艺,2011(1):188-191.

影响红枣幼茎组培增殖因子的研究

杨 伟¹, 杨 宇², 徐崇志², 高疆生^{1,2}

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团
塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以灰枣、骏枣的幼嫩茎段为外植体,研究了不同有机添加物对红枣组培继代增殖的影响。结果表明:外植体灭菌采用酒精处理 20 s、升汞处理 10 min,茎段污染率低,平均出芽数比较高;灰枣初代培养基:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,骏枣初代培养基:MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;灰枣继代培养基:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,骏枣继代培养基:MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;最适有机添加物为水解酪蛋白,在灰枣和骏枣的继代培养中的添加浓度分别为 400 mg/L 和 500 mg/L。

关键词:灰枣;骏枣;组织培养;有机添加物;继代培养

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0116-04

枣树的组织培养研究始于 20 世纪 70 年代末,1978 年山东农学院首次利用枣胚乳培养获得三倍体植株^[1]。

第一作者简介:杨伟(1986-),男,在读硕士,研究方向为果树种质资源。E-mail:yangweitau@sina.cn。

责任作者:高疆生(1959-),男,本科,教授,硕士生导师,研究方向为果树种质资源。

基金项目:“973”计划前期研究专项资助项目(2010CB134406)。

收稿日期:2012-03-09

之后,中国科学院植物所利用组织培养方法诱导酸枣产生胚状体^[2]。张福泉等^[3]以坛坛枣当年生幼嫩茎段为试材获得枣树组培苗。目前为止,利用枣树的营养器官进行组织培养是最简单且有效的方法。对于茎尖、茎段培养,一般来说,材料体积小培养较困难,成苗所需时间长,而培养材料体积大的容易培养成功。但体积大,消毒困难,所以在枣树快繁中接种的茎尖或带腋芽的茎段一般为 1.0 cm 左右。

[3] 王玉,李政,郝利民,等.培养基优化提高灰树花菌丝体的研究[J].北方园艺,2011(4):190-191.

[4] Mau J L, Chang C N, Huang S J, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia [J]. Food Chemistry, 2004, 87(1): 111-118.

[5] Chan J, Chan E, Chan S W, et al. Enhancement of *in vitro* and *in vivo* anticancer activities of polysaccharide peptide from *Grifola frondosa* by chemical modifications [J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(11): 1114-1120.

[6] Lin E S. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Grifola frondosa* TFR1073 and their antioxidant and antiprolifer-

ative activities [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(3): 555-561.

[7] Illana-Esteban C. The fungus maitake (*Grifola frondosa*) and its therapeutic potential [J]. Revista Iberoamericana de Micología, 2008, 25(3): 141-144.

[8] Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, et al. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1- \rightarrow 3)- β -D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa* [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 1994, 7(12): 1554-1560.

Optimization of Medium for Improving Exo-polysaccharide of *Grifola frondosa* by Response Surface Methodology

LI Zheng¹, WANG Yu², HAO Li-min³

(1. College of Textiles, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387; 2. Department of Agronomy, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384; 3. The Quartermaster Equipment Institute of the General Logistics Department of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100010)

Abstract: In order to increase the production of exo-polysaccharide of *Grifola frondosa*, the optimization of medium by response surface methodology (RSM) was studied. The results showed the optimal medium was (g/L): KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, VB_1 0.02, wheat bran 50, glucose 20, corn steep liquor 23.8, corn powder 19.7, soybean cake powder 5.2. Under the medium, the exo-polysaccharide of *Grifola frondosa* was 2.44 g/L, which was increased 75.22% than that of initial medium.

Key words: *Grifola frondosa*; exo-polysaccharide; response surface methodology (RSM); medium