

DOI:10.11937/bfyy.201608038

响应面法优化蛹虫草菌液体发酵条件

秦 鹏, 王 龙, 路 等 学, 韩 融 冰, 赵 玉 卉

(甘肃省科学院 生物研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘 要:以蛹虫草菌(*Cordyceps militaris*)为试材,用单因素试验筛选适宜温度后,利用响应面法优化培养基,最后用优化的条件和培养基进行摇床6 d和摇床6 d+静置培养10 d的液体发酵试验,研究不同培养条件下蛹虫草菌液体发酵后菌丝体产率以及静置培养对虫草素积累量的影响。结果表明:蛹虫草菌适宜温度为25℃,优化培养基为蔗糖4.34%、酵母粉3.06%、硫酸亚铁0.027%、磷酸二氢钾0.2%、硫酸铵0.04%、硫酸镁0.13%、维生素B₁0.08%、硫酸锌0.06%;摇床6 d和摇床6 d+静置10 d后,发酵液中的菌丝体产率分别为2.568 g/100mL和3.389 g/100mL,后者菌丝体产率比初始培养基增加了1.73倍,而虫草素积累量分别达到568.329 μg/mL和862.893 μg/mL,后者比初始培养基中增加了1.56倍。

关键词:蛹虫草;菌丝体;响应面;虫草素

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0138-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)属虫草科虫草属,含有虫草素、虫草酸、虫草多糖、麦角甾醇等多种药用活性成分,有抗癌、抗病毒、清除自由基、提高免疫力等功能^[1-3],研究证实蛹虫草菌丝体主要的活性成分含量与野生虫草菌大致相同,某些成分高于野生虫草菌^[4],虫草素是蛹虫草标志性的活性成分之一^[5]。目前,液体发酵技术是开发和利用多种活性成分的重要且高效的途径,但国

内外尚缺乏有效的针对蛹虫草菌液体发酵的多种活性产物的评价体系。而菌丝体产率和多种活性成分在一定的发酵周期内呈正相关关系^[6-7]。因此,以蛹虫草液体发酵后菌丝体产率为指标,首先筛选菌株适宜温度,再利用响应面法优化培养基,最后,利用优化条件和培养基进行发酵试验,测定发酵液虫草素含量,再以摇床培养6 d+静置培养10 d的培养方式进一步提高虫草素含量,以期蛹虫草菌丝体液体发酵产虫草素的工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为蛹虫草菌,购自中科院微生物研究所。斜面和平皿培养基均为营养琼脂。初始培养基:酵母粉

第一作者简介:秦鹏(1984-),男,硕士,助理研究员,研究方向为食(药)用菌菌学。E-mail:kingkerberos@163.com.

责任作者:赵玉卉(1983-),女,本科,助理研究员,研究方向为食用菌学。E-mail:yuhuizhao51@163.com.

基金项目:甘肃省科学院青年科技创新基金资助项目(2014QN-07);甘肃省科学院青年科技创新基金资助项目(2015QN-02)。

收稿日期:2015-12-18

The results showed that with the improvement of N concentration, plant height, total root length, root surface area, root volume, number of root forks, number of root tips all increased first and then decreased, leaf number, leaf area and stem diameter decreased; Pn, Tr and Gs rose and then dropped, Ci continuously dropped; the contents of photosynthetic pigment, soluble protein, soluble sugar, proline, and the activities of POD and SOD all showed a trend of first increasing and then decreasing, the content of NO₃⁻-N and the activity of CAT increased, while the content of MDA decreased. The study indicated that optimal N supply (5.00—10.00 mmol/L) could promote plant shoot and root growth, enhance photosynthesis, raise the contents of osmotic adjustable substances, reduce the content of MDA, and promote the activities of antioxidant enzymes, which was in favor of the growth of plant and strengthened their adaptability to the adverse environments. The growth and physiological metabolism activity was limited in different extent when the N supply was in short (0.00—0.50 mmol/L) or excessive (15.00 mmol/L) conditions.

Keywords: *Pennisetum* sp.; nitrogen levels; growth characteristics; photosynthesis; osmotic adjustment; membrane lipid peroxidation

1%、蔗糖 2.5%、市售纯净水。液体发酵培养基:市售纯净水。试剂:虫草素标准品(中国药品生物制品检定所);液相色谱所用甲醇为色谱纯,水为市售纯净水,其它试剂均为市售分析纯。

供试仪器:HZQ-QX 空气恒温振荡器(北京东联哈儿仪器制造有限公司);SPJ-150 生化培养箱(上海君竺仪器制造有限公司);0.22 μm 有机相过滤器(上海密粒膜分离技术有限公司);Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);ELGA MK2 超纯水器(北京格瑞恩科技发展有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 适宜温度试验 于平板菌落中心同一半径处用打孔器取 3 mm 的菌块接种到平皿培养基,置于 5、10、15、20、25、30℃ 黑暗条件下培养 9 d 后测定菌落直径。

1.2.2 培养基优化 利用 Plackett-Burman 试验方法从 8 个试剂因素中筛选 3 种关键因素,利用最陡爬坡试验逼近响应面设计中心点,最后利用 Box-Behnken 方法优化培养基。再利用优化培养基摇床振荡培养 6 d+静置培养 10 d,测定发酵液虫草素产率。响应面设计软件采用 Minitab 和 Design-Expert。

1.2.3 菌丝体及虫草素产率的测定 用 3 层纱布过滤发酵液收集菌丝体,将菌丝体置于 60℃ 烘箱中至恒重,用于菌丝体产率的测定。虫草素的测定采用反相液相色谱法,Zorbax SB C18 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相为甲醇/水(体积比 15:85);流速 1 mL/min;柱温 35℃;进样量 20 μL ,检测波长 260 nm。

1.3 数据分析

试验数据采用均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 软件的 LSD 方法进行多重检验。制图采用 Origin 软件。

2 结果与分析

2.1 菌株的适宜温度

由图 1 可知,25℃ 为菌株生长适宜温度,优于其它处理温度($P<0.001$),30℃ 为致死温度。

表 1

Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 1

Results of Plackett-Burman design

序号 No.	硫酸铵 Ammonium sulfate	酵母粉 Yeast powder	硫酸锌 Zinc sulfate	磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate	硫酸镁 Magnesium sulphate	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	蔗糖 Sucrose	维生素 B ₁ Vitamin B ₁	菌丝体产率 Yield of mycelium
1	0.04(-1)	3(+1)	0.02(-1)	0.1(-1)	0.05(-1)	0.09(+1)	4.2(+1)	0.18(+1)	1.362
2	0.12(+1)	2(-1)	0.02	0.1	0.13(+1)	0.09	4.2	0.08(-1)	1.186
3	0.12	3	0.02	0.2(+1)	0.05	0.03(-1)	2.8(-1)	0.18	1.323
4	0.12	3	0.02	0.2	0.13	0.03	4.2	0.08	1.752
5	0.04	2	0.02	0.2	0.13	0.09	2.8	0.18	1.038
6	0.04	3	0.06(+1)	0.1	0.13	0.03	2.8	0.08	1.363
7	0.12	2	0.06	0.1	0.05	0.03	4.2	0.18	1.34
8	0.04	3	0.06	0.2	0.05	0.09	4.2	0.08	1.636
9	0.12	2	0.06	0.2	0.05	0.09	2.8	0.08	0.956
10	0.04	2	0.02	0.1	0.05	0.03	2.8	0.08	1.163
11	0.04	2	0.06	0.2	0.13	0.03	4.2	0.18	1.589
12	0.12	3	0.06	0.1	0.13	0.09	2.8	0.18	1.168

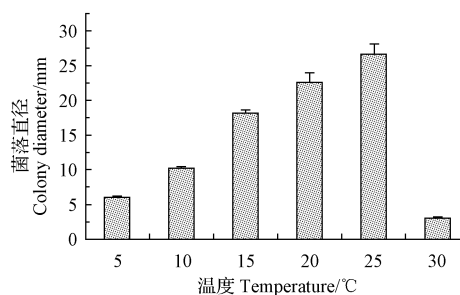
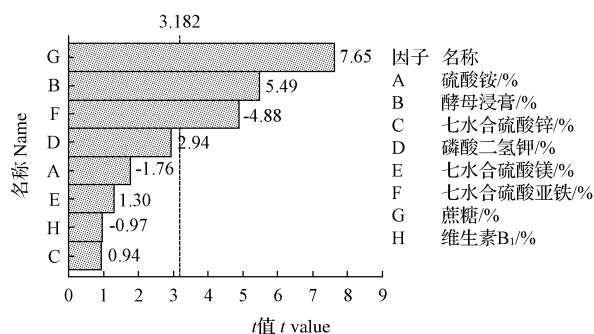


图 1 温度对菌株的影响

Fig. 1 Influence of temperature on strain

2.2 培养基优化

2.2.1 Plackett-Burman 试验 8 个因素分别取高(+)、低(-) 2 个水平,运用 Plackett-Burman 方法筛选出对菌丝体产率有较大影响的因素,由图 2 可知,3 个关键因素为蔗糖、酵母粉、硫酸亚铁。Plackett-Burman 试验设计及结果见表 1,模型 $R^2=0.9770$,调整 $R^2=0.9158$,说明模型可信。



注:A~H 分别表示了硫酸铵、酵母粉、硫酸锌、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸亚铁、蔗糖、维生素 B₁。

Note: A~H were ammonium sulfate, yeast powder, zinc sulfate, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulphate, ferrous sulfate, sucrose, vitamin B₁, respectively.

图 2 0.05 水平下标准化效应

Fig. 2 Standardized effect at 0.05 level

2.2.2 最陡爬坡试验 根据 Plackett-Burman 试验结果中关键因素的效应值大小及其因素水平,选取合适的步长进行最陡爬坡试验。图 2 为 0.05 水平下各因素的 t 值的绝对值分布,纵坐标为各因素 t 值的绝对值按从小到大的顺序依次排列,横轴为 t 值,3.182 分割线为 0.05 水平下 t 值的临界值,当因素 t 值绝对值超过临界值时,该因素将被选出作为关键因素。蔗糖、酵母粉、硫酸亚铁质量浓度取值见表 2,其它组分依据图 2 的效应值的性质,正效应、负效应因素分别取高、低水平质量浓度。由表 2 结果可知,第 4 组的菌丝体产率达到最大,因此第 4 组中蔗糖、酵母粉、硫酸亚铁质量浓度为响应面设计的中心点。

表 2 最陡爬坡试验及结果

Table 2 Experimental design and the results of steepest ascent method %

序号 No.	蔗糖 Sucrose	酵母粉 Yeast	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	菌丝体产率 Yield of mycelium
1	3.15	2.25	0.075	0.983
2	3.50	2.50	0.060	0.989
3	3.85	2.75	0.045	1.745
4	4.20	3.00	0.030	2.561
5	4.55	3.25	0.015	1.912

2.2.3 响应面优化培养基 运用 Box-Behnken 方法设计试验(表 3)。响应面模型 3D 图如图 3 所示,固定蔗糖、酵母粉、硫酸亚铁中的 1 种因素后,其它 2 种因素对菌丝体产率的响应值均出现极大值。由表 4 方差分析可知,蔗糖、酵母粉、硫酸亚铁分别对菌丝体产率有极显著的影响,蔗糖、酵母粉交互效应对菌丝体产率有极显著的影响,酵母粉、硫酸亚铁交互效应有显著的影响,蔗糖、硫酸亚铁交互效应的影响不显著。编码的回归模型为: $Y = 2.59 + 0.13A + 0.14B - 0.062C - 0.091AB + 0.012AC - 0.058BC - 0.13A^2 - 0.22B^2 - 0.16C^2$, Y 表示菌丝体产率。模型 $R^2 = 0.9870$, 调整 $R^2 = 0.9636$,

说明模型拟合度好且能解释 96.36% 的菌丝体产率变异。失拟项 0.303 5,差异不显著。响应面设计结果的 Cook' D 值均 <1 ,说明结果中不存在强影响点。因此,该模型可以用来分析和预测菌丝体产率的变化。为了得到菌丝体产率最大值,对模型的 A、B、C 变量依次求一阶偏导,得到 3 个方程,联立方程可得 3 个因子的质量浓度,即蔗糖 4.34%、酵母粉 3.06%、硫酸亚铁 0.027%。优化培养基则为蔗糖 4.34%、酵母粉 3.06%、硫酸亚铁 0.027%、磷酸二氢钾 0.2%、硫酸铵 0.04%、硫酸镁 0.13%、维生素 B₁ 0.08%、硫酸锌 0.06%,利用该培养基和优化条件进行试验验证,菌丝体产率 2.568 g/100mL,与预测值接近,误差仅为 1.2%。最后利用优化培养基进行摇床振荡培养 6 d 和摇床 6 d+静置 10 d 的液体发酵试验,菌丝体产率分别达到 2.568 g/100mL 和 3.389 g/100mL,虫草素积累量分别达到 568.329 $\mu\text{g/mL}$ 和 862.893 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Results of Box-behnken design %

序号 No.	蔗糖 Sucrose	酵母粉 Yeast	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	菌丝体产率 Yield of mycelium
1	3.85	3.00	0.045	2.102
2	4.20	3.25	0.045	2.242
3	4.20	2.75	0.045	2.032
4	4.20	3.25	0.015	2.502
5	4.20	3.00	0.030	2.592
6	3.85	3.25	0.030	2.272
7	4.20	3.00	0.030	2.522
8	4.55	3.00	0.045	2.382
9	3.85	2.75	0.030	1.891
10	4.55	3.25	0.030	2.392
11	3.85	3.00	0.015	2.232
12	4.20	3.00	0.030	2.552
13	4.55	2.75	0.030	2.356
14	4.55	3.00	0.015	2.463
15	4.20	2.75	0.015	2.058

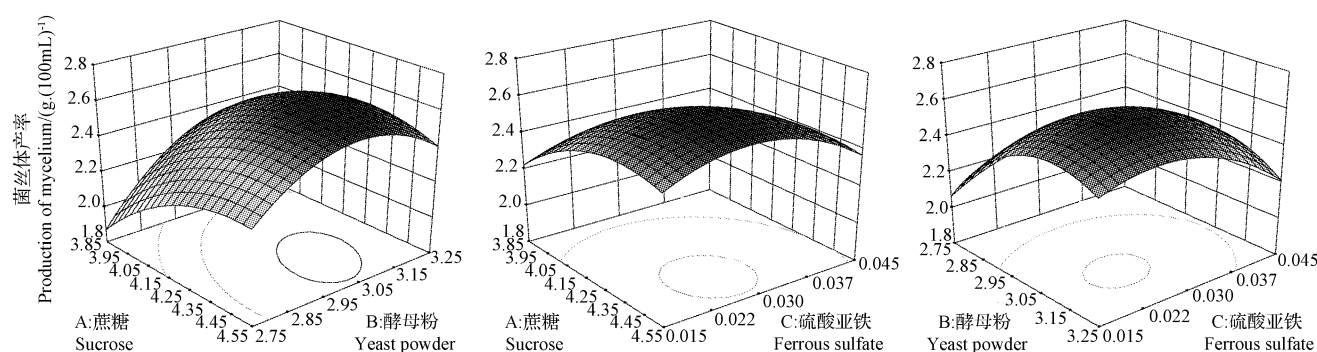


图 3 $Y = f(A, B)$ 、 $Y = f(A, C)$ 和 $Y = f(B, C)$ 的响应面

Fig. 3 Response surface plot of $Y = f(A, B)$, $Y = f(A, C)$, $Y = f(B, C)$

表 4 响应面模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for response surface model

来源	平方和	均方	F 值	P 值
Source	Sum of square	Mean square	F value	P value
模型 Model	0.661 7	0.073 5	42.189	0.000 3 **
A	0.142 3	0.142 3	81.662	0.000 3 **
B	0.148 8	0.148 8	85.377	0.000 2 **
C	0.031 0	0.031 0	17.789	0.008 3 **
AB	0.033 3	0.033 3	19.112	0.007 2 **
AC	0.000 6	0.000 6	0.331	0.590 3
BC	0.013 7	0.013 7	7.855	0.037 9 *
A ²	0.064 6	0.064 6	37.080	0.001 7 **
B ²	0.175 9	0.175 9	100.961	0.000 2 **
C ²	0.092 8	0.092 8	53.256	0.000 8 **
失拟项 Lack of fit	0.006 8	0.002 3	2.445	0.303 5

注:A表示蔗糖,B表示酵母粉,C表示硫酸亚铁;**表示差异很显著($P < 0.01$),*表示差异显著($P < 0.05$)。

Note:A,sucrose. B,yeast powder. C,ferrous sulfate. ** means difference at 0.01 level. * means difference at 0.05 level.

3 结论

以菌丝体干重产率为指标,菌株适宜生长温度为 25℃。经响应面优化的培养基为蔗糖 4.34%、酵母粉 3.06%、硫酸亚铁 0.027%、磷酸二氢钾 0.2%、硫酸铵 0.04%、硫酸镁 0.13%、维生素 B₁ 0.08%、硫酸锌 0.06%;利用优化培养基进行摇床培养 6 d 和摇床 6 d + 静置 10 d 的液体发酵试验,菌丝体产率分别达到 2.568 g/100mL 和 3.389 g/100mL,后者比初始培养基菌丝体产率增加了 1.73 倍,而虫草素积累量分别达到 568.329 $\mu\text{g/mL}$ 和 862.893 $\mu\text{g/mL}$,后者比初始培养基

虫草素积累量增加了 1.56 倍。国内液体发酵虫草素积累量较低,在 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 以下^[8],而蛹虫草的药用价值不仅仅存在于单一活性成分,多种活性成分的协同作用才能发挥更大的功效,目前对蛹虫草菌液体发酵产多种活性成分的研究及评价体系不完善,希望后续的研究能在这方面有所突破。

参考文献

- [1] LIN Y W,CHIANG B H. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*[J]. Process Biochemistry,2008,43(3):244-250.
- [2] REN Z H,CUI J H,HUO Z R,et al. Cordycepin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation by reducing p65 transcriptional activity,inhibiting I κ B α phosphorylation, and blocking IKK γ ubiquitination[J]. International Immunopharmacology,2012,14(4):68-703.
- [3] CHEN Y,YANG S H,HUENG D Y,et al. Cordycepin induces apoptosis of C6 glioma cells through the adenosine 2A receptor-p53-caspase-7-PARP pathway[J]. Chemico-Biological Interactions,2014,216(5):17-25.
- [4] 林群英,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):154-157.
- [5] TULI H S,SHARMA A K,SANDHU S S,et al. Cordycepin:A bioactive metabolite with therapeutic potential[J]. Life Sciences,2013,93(23):863-869.
- [6] 钟思敏,杜梅,陈往滨,等. 蛹虫草菌丝产虫草素液体培养条件的研究[J]. 菌物学报,2011,30(2):229-234.
- [7] 周广麒,万晓星,侯友松,等. 蛹虫草液态深层发酵的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(8):39-43.
- [8] 刘艳芳,唐庆九,顾俊杰,等. 北冬虫夏草深层发酵高产虫草素工艺的优化[J]. 上海农业学报,2010,26(3):26-30.

Optimization of Fermentation Conditions Mycelium Production by *Cordyceps militaris* Using Response Surface Methodology

QIN Peng,WANG Long,LU Dengxue,HAN Rongbing,ZHAO Yuhui
(Institute of Biology,Gansu Academy of Sciences,Lanzhou,Gansu 730000)

Abstract: It was experimented to screen suitable temperature for *Cordyceps militaris* mycelium. After that,liquid medium was optimized by response surface method. Finally,using the optimized conditions,the mycelium was statically fermented 10 days after 6 days shaking-flask culture,compared with 6 days shaking-flask culture,in order to understand production of *Cordyceps militaris* mycelium under different culture conditions and the effect of static fermentation on cordycepin production. The results showed that optimal conditions by one-factor experiment were dark at 25℃. Optimal liquid medium by response surface was sucrose 4.34%,yeast extract 3.06%,FeSO₄ 0.027%,KH₂PO₄ 0.2%,(NH₄)₂SO₄ 0.04%,MgSO₄ 0.13%,vitamin B₁ 0.08%,ZnSO₄ 0.06%. The yield of mycelium by *cordyceps militaris* in the optimal medium increased 1.73 times compared with that in initial medium and reached 2.568 g/100mL,while the yield of mycelium reached 3.389 g/100mL with two-stage culture. And the results of two-stage culture showed that the yield of cordycepin increased 1.56 times more that in initial medium and reached 862.893 $\mu\text{g/mL}$,compared with 568.329 $\mu\text{g/mL}$ of only 6 days shaking-flask culture.

Keywords: *Cordyceps militaris*; mycelium; response surface; cordycepin