

翅鳞伞深层发酵胞外多糖优化研究

王允祥 陆兆新* 吕凤霞

(南京农业大学食品科技学院,南京 210095)

摘 要 采用 Plackett-Burman 设计(Plackett-Burman Design, P-B)对影响翅鳞伞[*Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel.] AS 5.245 菌株发酵产糖的内在和外在相关因素进行了筛选,所选取的 20 个相关因素为葡萄糖、果糖、麦芽糖、酵母膏、胰蛋白胨、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 FeSO_4 、 MgSO_4 、 MnCl_2 、 ZnCl_2 、 FeCl_3 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 、起始 pH、发酵温度、时间和装液量。在此基础上,再采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)对影响发酵产糖的内在关键影响因素酵母膏、果糖、 MgSO_4 、麦芽糖、 ZnCl_2 和发酵基质起始 pH 值的最佳水平范围作了进一步的研究与探讨,通过对二次多项回归方程求解得知,在上述自变量分别为 6.0g/L、11.5g/L、0.5g/L、9.6g/L、38.6 mg/L 和 5.3 时,胞外多糖最大预测值为 876.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 发酵醪,此预测可信度不仅被统计分析所验证,也被实践所证实。

关键词 多糖,翅鳞伞,Plackett-Burman 设计,响应曲面法(RSM),中心旋转组合设计

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0414-09

科学研究表明,绝大多数真菌具有多种多样的生物学功能^[1,2],其生物活性物质既可存在于子实体中,也可存在于培养菌丝体和发酵液中^[3,4],真菌尤其是高等担子菌已成为人们寻找生物活性物质的一个重要源泉。在对翅鳞伞[*Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel.] AS 5.245 生物活性物质进行研究时发现,该菌胞外粗多糖对小鼠 S-180 肉瘤具有一定的抑制作用(该文另发)。由于该菌培养发酵较难,因此为了提高进一步研究所需的胞外多糖含量(Exopolysaccharide Concentration, EPC)以及为大罐发酵奠定基础,本研究分两阶段分别采用 Plackett-Burman 筛选实验和响应曲面法(Response Surface Methods, RSM)对影响该菌发酵产糖的相关影响因素进行了研究和探索。

Plackett-Burman 设计法是一种经济有效的两水平实验设计方法,该法主因素为正交设计,两因素间的交互作用仅部分与主因素产生混淆^[5]。虽然此设计方法不能考察各因子之间的交互作用,但它可以利用最少的实验次数,从众多的考察因素中快速而有效地筛选出主要的影响因子,故而被广泛地用于因子主效应的估计中^[6,7,8]。

响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)是一种优化生物过程的综合技术,采用该法可以建

立连续变量曲面模型^[9,10],对影响生物过程的因子水平及其交互作用进行优化与评价^[11,12]。与传统优化方法相比,RSM 所需的试验组数相对较少,可节省人力物力^[13],因此该法已被成功地用于培养基优化实践中^[14,15,16]。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

翅鳞伞[*Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel.] AS 5.245 购自于中国科学院微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

种子培养基:综合马铃薯培养基^[17]。

Plackett-Burman 实验发酵培养基:按照实验设计配制。

RSM 实验发酵培养基:将需考察的关键内在因子(培养基组成成分)酵母膏、果糖、 MgSO_4 、麦芽糖和 ZnCl_2 配制成一定浓度的母液,再根据实验设计要求,吸取一定体积该母液添加到三角瓶中,余量用基础发酵液补齐后,按设计要求调 pH 值。

RSM 实验基础发酵液: NaNO_3 0.5g/L,胰蛋白胨 2g/L, MnCl_2 100 $\mu\text{g}/\text{L}$,维生素 B_1 30mg/L。

1.3 菌种培养及接种

Plackett-Burman 实验:取斜面试管菌种点种于培

养皿中, 25℃培养 12d 后, 用 $\Phi 10\text{cm}$ 无菌打孔器从平板上打孔取块(即菌丝蝶), 分别接种于盛有发酵液的 250mL 三角瓶中, 接种量为 1 片/50mL 发酵液。

RSM 实验: 取 $\Phi 12\text{cm}$ 菌丝蝶接种于盛有 80mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中。

1.4 多糖提取及测定

到设计时将发酵醪减压过滤, 取滤液 10mL, 采用 Sevag 法脱蛋白至两相界面无膜出现为止(大约 10 次)取 2mL 该脱蛋白液自来水流水透析 2d, 蒸馏水透析 2d 后, 取出透析液定容至 10mL (Plackett-Burman 实验)或 20mL (RSM 实验), 采用文献 [18] 方法测定多糖含量, 以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 发酵醪计。

1.5 实验设计

1.5.1 Plackett-Burman 实验设计: 根据真菌生长所需营养要素的基本原则以及真菌发酵影响因素的一般规律, 结合相关文献报道^[19]与笔者的前期实验, 本阶段实验研究选取的内在影响因子及外在因素(变量)见表 1, 评价指标(响应值)为胞外多糖含量(EPC)和表示该菌生长量的菌丝干重(Dry Cell Weight, DCW)。本阶段实验设计、数据分析及模型建立皆由 JMP 软件(version 4.0.5, SAS Institute Inc.)辅助完成。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素水平及编码

Table 1 Level and code of variables for Plackett-Burman design

Variable	Symbols		Coded levels	
	Uncoded	Coded*	-1	1
Glucose(g/L)	X_1	x_1	5	15
Yeast extract(g/L)	X_2	x_2	2	5
Maltose(g/L)	X_3	x_3	10	20
Tryptone(g/L)	X_4	x_4	2	5
Fructose(g/L)	X_5	x_5	2	4
KH_2PO_4 (g/L)	X_6	x_6	0.5	1.5
K_2HPO_4 (g/L)	X_7	x_7	0.5	1.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	X_8	x_8	0.5	1.5
NaNO_3 (g/L)	X_9	x_9	0.5	1.5
MgSO_4 (g/L)	X_{10}	x_{10}	0.1	0.4
MnCl_2 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	X_{11}	x_{11}	50	100
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	X_{12}	x_{12}	50	100
FeSO_4 (mg/L)	X_{13}	x_{13}	50	100
ZnCl_2 (mg/L)	X_{14}	x_{14}	50	100
FeCl_3 (mg/L)	X_{15}	x_{15}	50	100
Vitamin B_1 (mg/L)	X_{16}	x_{16}	25	50
Initial pH	X_{17}	x_{17}	5	7
Temp./ $^\circ\text{C}$	X_{18}	x_{18}	24	27
Time/d	X_{19}	x_{19}	6	9
Broth content(mL)	X_{20}	x_{20}	50	100

* For statistical calculations, the independent variables were coded according to the transformation Eq: $x_i = (X_i - X_0) \Delta X_i$, where x_i is the coded value of an independent variable, X_i is the real value of an independent variable, X_0 is the real value of an independent variable at the center point, and ΔX_i is the step change value.

上表中自变量编码方程为: $x_i = (X_i - X_0) \Delta X_i$, 式中 x_i 为自变量编码值, X_i 为自变量实验水平实际值, X_0 为实验水平中心点实际值, ΔX_i 为单变量增量。

1.5.2 RSM 实验设计: 基于第一阶段实验结果, 该阶段实验研究采用中心旋转组合设计(Central Composite Rotatable Design, CCRD)法, 对影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产糖的关键内部因子进行研究和探索, 以获得影响该菌产糖量的最佳培养基组成及浓度水平范围。实验辅助软件为 Design Expert (version 6.0.5, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)。

由 Plackett-Burman 实验结果得知, 影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产糖的培养基关键因素为酵母膏、果糖、 MgSO_4 和起始 pH 值, 纵然如此, 但也须考虑到影响该菌生长的关键内在因素——麦芽糖和 ZnCl_2 , 因此在本阶段研究中实际考察的变量为酵母膏、果糖、 MgSO_4 、麦芽糖、 ZnCl_2 和发酵基质起始 pH 值, 诸因子实验水平编码分别为 -2.378、-1、0、1、2.378, 见表 2。虽然 NaNO_3 、胰蛋白胨、 MnCl_2 和维生素 B_1 与该菌生长或发酵产糖有一定的相关性, 但在第一阶段因子筛选实验中, 该 4 种因素的取值已接近最佳值, 故而可将其作为本阶段优化实验中的基础发酵液构成。依据 Plackett-Burman 实验因子水平动态预测图, 取值为 NaNO_3 0.5g/L, 胰蛋白胨 2g/L, MnCl_2 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和维生素 B_1 30mg/L。

对于影响该菌发酵产糖的关键外部因素(发酵温度)以及生长关键因素(发酵时间和装液量), 出于实际研究的可行性, 在本阶段研究中暂不探究, 其取值分别为 9d、27 $^\circ\text{C}$ 和 80mL, 摇床转速为 140r/min。

表 2 中心旋转组合设计实验因素水平及编码

Table 2 Level and code of variables for CCRD

Variable	Symbols		Coded levels					
	Uncoded	Coded*	-2.378	-1	0	1	2.378	
Yeast extract(g/L)	X_1	A	0.93	3	4.5	6	8.07	
Fructose(g/L)	X_2	B	6.55	10	12.5	15	18.45	
MgSO_4 (g/L)	X_3	C	0.09	0.3	0.45	0.6	0.81	
Maltose(g/L)	X_4	D	1.86	6	9	12	16.14	
ZnCl_2 (mg/L)	X_5	E	16.22	30	40	50	63.78	
Initial pH	X_6	F	3.62	5	6	7	8.38	

* In developing the regression equation, the six experimental variables were: $A = (X_1 - 4.5) \times 1.5$, $B = (X_2 - 12.5) \times 2.5$, $C = (X_3 - 0.45) \times 0.15$, $D = (X_4 - 9) \times 3$, $E = (X_5 - 40) \times 10$, $F = (X_6 - 6)$.

采用多元回归技术,拟合二次多项模型的 CCRD 设计见表 3。

表 3 中心旋转组合设计以及胞外多糖含量的实测值与预测值

Table 3 CCRD matrix of the six variables and the actual and predicted values of EPC

Std	A	B	C	D	E	F	EPC($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
							Actual	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	89.07	82.28
2	1	1	-1	-1	-1	-1	510.08	481.27
3	1	-1	1	-1	-1	-1	641.83	606.04
4	-1	1	1	-1	-1	-1	91.94	86.25
5	1	-1	-1	1	-1	-1	679.06	675.92
6	-1	1	-1	1	-1	-1	323.92	339.42
7	-1	-1	1	1	-1	-1	275.24	256.55
8	1	1	1	1	-1	-1	630.37	608.29
9	1	-1	-1	-1	1	-1	524.40	485.42
10	-1	1	-1	-1	1	-1	206.50	209.07
11	-1	-1	1	-1	1	-1	298.15	298.04
12	1	1	1	-1	1	-1	561.64	545.23
13	-1	-1	-1	1	1	-1	157.81	135.92
14	1	1	-1	1	1	-1	475.72	457.59
15	1	-1	1	1	1	-1	733.48	704.08
16	-1	1	1	1	1	-1	223.68	237.27
17	1	-1	-1	-1	-1	1	495.76	453.58
18	-1	1	-1	-1	-1	1	309.60	310.41
19	-1	-1	1	-1	-1	1	229.41	218.95
20	1	1	1	-1	-1	1	292.42	285.71
21	-1	-1	-1	1	-1	1	309.60	297.41
22	1	1	-1	1	-1	1	467.12	438.64
23	1	-1	1	1	-1	1	535.86	504.70
24	-1	1	1	1	-1	1	160.67	171.07
25	-1	-1	-1	-1	1	1	358.29	351.79
26	1	1	-1	-1	1	1	398.39	388.48
27	1	-1	1	-1	1	1	670.47	626.38
28	-1	1	1	-1	1	1	378.34	352.89
29	1	-1	-1	1	1	1	386.93	364.03
30	-1	1	-1	1	1	1	266.64	273.84
31	-1	-1	1	1	1	1	303.88	304.09
32	1	1	1	1	1	1	315.33	293.53
33	-2.378	0	0	0	0	0	51.84	20.27
34	2.378	0	0	0	0	0	501.49	613.93
35	0	-2.378	0	0	0	0	364.02	444.54
36	0	2.378	0	0	0	0	312.47	312.81
37	0	0	-2.378	0	0	0	355.43	389.60
38	0	0	2.378	0	0	0	395.52	442.22
39	0	0	0	-2.378	0	0	232.27	291.95
40	0	0	0	2.378	0	0	312.47	333.66
41	0	0	0	0	-2.378	0	449.94	489.00
42	0	0	0	0	2.378	0	478.58	520.39
43	0	0	0	0	0	-2.378	444.21	478.56
44	0	0	0	0	0	2.378	346.84	393.36
45	0	0	0	0	0	0	782.17	790.87
46	0	0	0	0	0	0	764.98	790.87
47	0	0	0	0	0	0	810.81	790.87
48	0	0	0	0	0	0	787.89	790.87
49	0	0	0	0	0	0	793.62	790.87
50	0	0	0	0	0	0	796.49	790.87
51	0	0	0	0	0	0	813.67	790.87
52	0	0	0	0	0	0	805.08	790.87

2 结果与讨论

2.1 翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 及 DCW 关键影响因素的确定

利用 JMP 软件对 Plackett-Burman 实验结果(数据未显示)进行方差分析,表明对翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 影响显著的因子有酵母膏($P = 0.0017$)、果糖($P = 0.0386$)、 $MgSO_4$ ($P = 0.0470$)、起始 pH($P = 0.0317$)和发酵温度($P = 0.0143$)。通过逐步回归分析获得该菌发酵产糖的最优多元一次回归方程为: $\hat{Y}_{EPC} = 363.365 + 84.155x_2 - 38.358x_4 + 43.483x_5 + 41.168x_{10} + 33.397x_{11} - 45.797x_{17} + 55.387x_{18}$,式中 \hat{Y}_{EPC} 为 EPC 预测值,由自变量编码方程可知: $x_2 = (\text{酵母膏} - 3.5)/1.5$ 、 $x_4 = (\text{胰蛋白胨} - 3.5)/1.5$ 、 $x_5 = (\text{果糖} - 3)$ 、 $x_{10} = (MgSO_4 - 0.25)/0.15$ 、 $x_{11} = (MnCl_2 - 75)/25$ 、 $x_{17} = (\text{起始 pH} - 6)$ 、 $x_{18} = (\text{发酵温度} - 25.5)/1.5$ 。影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株菌丝生长量的显著因子有麦芽糖($P = 0.0248$)、果糖($P = 0.0019$)、 $ZnCl_2$ ($P = 0.0003$)、维生素 B_1 ($P = 0.0018$)、培养时间($P = 0.0009$)和装液量($P < 0.0001$)。其最优多元一次回归方程为: $\hat{Y}_{DCW} = 3.770 + 0.371x_3 + 0.63x_5 - 0.305x_9 - 0.861x_{14} - 0.637x_{16} + 0.72x_{19} + 1.04x_{20}$,方程中 \hat{Y}_{DCW} 为 DCW 预测值, $x_3 = (\text{麦芽糖} - 15)/5$ 、 $x_5 = (\text{果糖} - 3)$ 、 $x_9 = (NaNO_3 - 1)/0.5$ 、 $x_{14} = (ZnCl_2 - 75)/25$ 、 $x_{16} = (\text{维生素 } B_1 - 37.5)/12.5$ 、 $x_{19} = (\text{发酵时间} - 7.5)/1.5$ 、 $x_{20} = (\text{装液$

量 - 75)/25。

2.2 培养基组成水平对翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 的影响

2.2.1 翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 多元二次模型方程的建立及检验:在对 Plackett-Burman 实验结果充分分析的基础上,为了最优拟合多元二次模型方程各项系数,依据统计学实验设计要求,对影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 的关键内在因素进行了 52 组试验,其结果见表 3。利用 Design Expert 软件,对该表实验数据进行二次多项回归拟合,获得翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 对酵母膏、果糖、 $MgSO_4$ 、麦芽糖、 $ZnCl_2$ 和起始 pH 值的多元二次回归方程:

$$\begin{aligned} \hat{Y}_{EPC} = & 790.87 + 124.8A - 27.69B + 11.06C + 8.77D + 6.6E \\ & - 17.91F - 83.75A^2 - 72.87B^2 - 66.28C^2 - 84.51D^2 \\ & - 50.59E^2 - 62.74F^2 - 29.89AB + 15.75AC + 2.15AD \\ & - 18.44AE - 57.64AF - 30.97BC + 1.25BD - 4.30BE \\ & - 10.2BF - 5.01CD + 32.4CE - 18.62CF - 39.2DE \\ & - 30.07DF + 10.56EF \end{aligned}$$

式中 \hat{Y}_{EPC} 为 EPC 预测值; $A \sim F$ 分别为上述 6 个自变量的编码值。因所选模型不是分等级模型,故对上述二次多项方程不必进行自变数的统计选择。

从该方程的方差分析表 4 可见,本实验所选用模型高度显著($P < 0.0001$)、拟合优度好,预测值与实测值之间具有高度的相关性(相关系数 $r = 0.9890$)、仅有约 5% 的 EPC 变异不能由该模型解释($r_{Adj}^2 = 0.9535$)。此统计分析结果也被后续试验所验证,见表 5。

表 4 翅鳞伞 AS 5.245 菌株胞外多糖二次多项模型方差分析表

Table 4 Variance analysis for the fitted quadratic polynomial model of EPC by *Pholiota squarrosa* AS 5.245

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Pr(<P)> F
Model	2268677	27	84025.09	39.77564	< 0.0001
Pure Error	1816.874	7	259.5535		
Cor Total	2319377	51			

$$r = 0.9890, r^2 = 0.9781, r_{Adj}^2 = 0.9535$$

表 5 模型验证实验

Table 5 Model validation

Std	Yeast extract (g/L)	Fructose (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	Maltose (g/L)	$ZnCl_2$ (mg/L)	Initial pH	EPC($\mu\text{g/mL}$)	
							Actual	Predicted
1	5.0	10.0	0.40	8.0	35.0	5.5	779.30	773.52
2	5.0	11.0	0.50	9.0	40.0	5.5	833.72	826.34
3	5.5	12.0	0.55	10.0	45.0	6.0	805.08	814.49
4	5.5	13.0	0.40	8.0	45.0	6.0	793.62	783.59
5	6.0	13.0	0.50	10.0	40.0	6.5	739.21	748.18
6	6.0	12.0	0.55	11.0	35.0	6.5	733.48	724.36

利用 SPSS (version 10.0, SPSS Inc.) 软件对表 5 中实测值与预测值进行距离相关分析得知, 其相关系数为 0.9728, 证明该模型极其显著且合适有效, 具有一定的实践指导意义。

上述方程的回归系数显著性检验表明: 试验各因素对 EPC 的曲面效应皆显著; 因素 C、D 和 E 对 EPC 的线性效应不显著; AB、AE、AF、BC、CE、CF、DE 和 DF 对 EPC 的交互影响显著, 而其它两两交互效应不显著, 见表 6。

表 6 胞外多糖回归方程系数显著性检验

Table 6 Regression coefficients and their significance of the quadratic model of EPC

Model term	Parameter estimate	Std. error	F value	Prob > F
Intercept	790.8694	16.2201	-	-
A-Yeast extract	124.8006	6.9837	319.3500	< 0.0001
B-Fructose	-27.6929	6.9837	15.7243	0.0006
C-MgSO ₄	11.0622	6.9837	2.5091	0.1263
D-Maltose	8.7676	6.9837	1.5761	0.2214
E-ZnCl ₂	6.5980	6.9837	0.8926	0.3542
F-Initial pH	-17.9104	6.9837	6.5772	0.0170
A ₂	-83.7510	6.0343	192.6299	< 0.0001
B ₂	-72.8657	6.0343	145.8110	< 0.0001
C ₂	-66.2839	6.0343	120.6592	< 0.0001
D ₂	-84.5104	6.0343	196.1392	< 0.0001
E ₂	-50.5889	6.0343	70.2836	< 0.0001
F ₂	-62.7399	6.0343	108.1014	< 0.0001
AB	-29.8932	8.1250	13.5364	0.0012
AC	15.7521	8.1250	3.7587	0.0644
AD	2.1480	8.1250	0.0699	0.7938
AE	-18.4371	8.1250	5.1492	0.0325
AF	-57.6383	8.1250	50.3247	< 0.0001
BC	-30.9672	8.1250	14.5265	0.0008
BD	1.2530	8.1250	0.0238	0.8787
BE	-4.2960	8.1250	0.2796	0.6018
BF	-10.2031	8.1250	1.5770	0.2213
CD	-5.0120	8.1250	0.3805	0.5431
CE	32.3992	8.1250	15.9011	0.0005
CF	-18.6161	8.1250	5.2497	0.0310
DE	-39.2012	8.1250	23.2786	< 0.0001
DF	-30.0722	8.1250	13.6990	0.0011
EF	10.5611	8.1250	1.6896	0.2060

2.2.2 翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 响应面分析与优化: 上述多元二次回归方程所作的响应面图及其等高线图见图 1~图 8。利用该组图可以对任何两因素交互影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 的效应进行分析与评价, 并从中确定最佳因素水平范围。

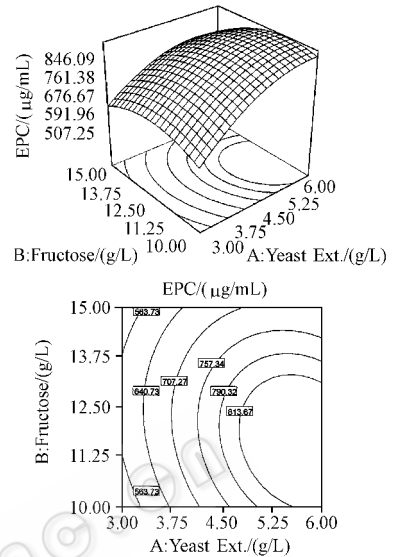


图 1 酵母膏与果糖交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig. 1 Response surface plot and its corresponding contour plot of EPC versus yeast extract and fructose concentration

图 1 显示了在麦芽糖、硫酸镁、氯化锌和起始 pH 值位于中心水平, 即 9.0 g/L、0.45 g/L、40mg/L 和 6.0 时, 酵母膏和果糖对翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 交互作用的 3-D 图及等高线图, 由图可知, 在本实验水平范围内, 随着酵母膏浓度的增大, EPC 含量增加。酵母膏浓度基本在 4.8g/L~6g/L 范围内, EPC 含量可达到本次实验中的最大值, 即每毫升发酵液含有 813.67 μ g 的 EPC。果糖既是翅鳞伞 AS 5.245 菌株菌生长所必需的, 又是影响该菌产生 EPC 的关键因子, 但由图可见, 高浓度的果糖却不利于 EPC 的形成, 只有在其浓度位于 10g/L~13g/L 范围时, 基本可获得 813.67 μ g/mL 发酵液的 EPC。

酵母膏与硫酸镁对翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 的交互影响效应见图 2。虽然硫酸镁是多数真菌生长所不可缺少的无机矿物质, 但由 Plackett-Burman 实验结果得知, 在因子实验水平范围内, 此物却不是翅鳞伞 AS 5.245 菌株生长的关键影响因子, 它仅与该菌代谢分泌 EPC 具有显著的相关性, 当其浓度在 0.39g/L~0.55g/L, 酵母膏浓度为 4.8g/L~6g/L 时, 所能获得的 EPC 不低于 813.67 μ g/mL 发酵液。

由图 3 可见, 欲获得最大 EPC 值(813.67 μ g/mL 发酵液), 所需麦芽糖浓度须在 7.5g/L~10.6g/L 范

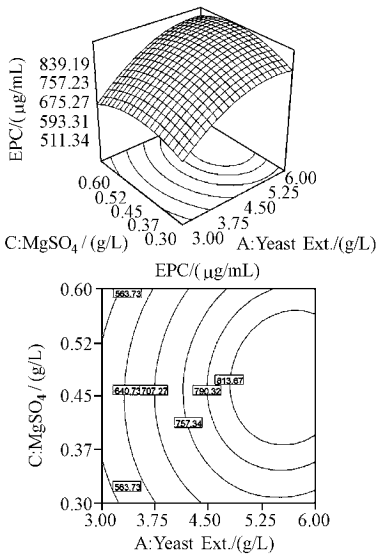


图2 酵母膏和硫酸镁交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots of EPC versus yeast extract and magnesium sulfate concentration

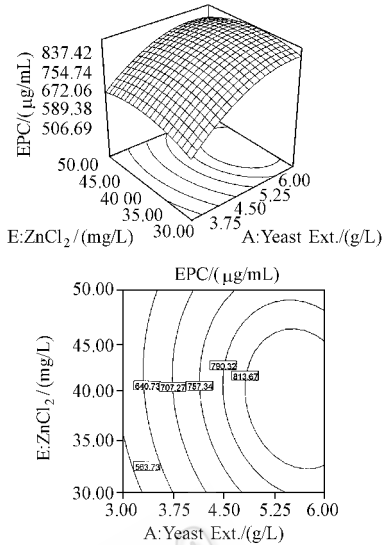


图4 酵母膏和氯化锌交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.4 Response surface and contour plots of EPC versus yeast extract and zinc chloride concentration

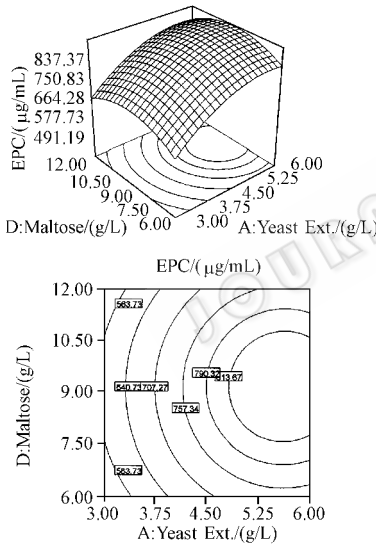


图3 酵母膏和麦芽糖交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.3 Response surface and contour plots of EPC versus yeast extract and maltose concentration

影响并不显著,在其浓度范围为 32mg/L~46mg/L 酵母膏为 4.8g/L~6g/L 时,产生的 EPC 可达本次实验最大值。

由酵母膏与起始 pH 值的交互作用图 5 可见,当起始 pH 值在 5~6.3 范围内,EPC 含量随着酵母膏浓度的增加而显著性地增加,而在 6.3~7.0 范围时,EPC 增加甚微,由于低起始 pH 值发酵基质并不利于该菌的生长,因此 EPC 的快速增加不可能由于菌丝的大量繁殖所引起;又由于有机氮源酵母膏及胰蛋白胨皆是此菌代谢分泌 EPC 的关键影响因子,由此推测在高酸度基质条件下,酵母膏快速水解成小分子肽类物质,从而导致 EPC 的积累,此现象也间接地说明了翅鳞伞 AS 5.245 菌株所产生的 EPC 可能为结合糖——糖肽。

围内,由此可见,翅鳞伞 AS 5.245 菌株代谢产生 EPC 对有机碳源麦芽糖所需浓度范围较广,这一现象的产生,与该物质并非产糖关键因子有关,由 Plackett-Burman 实验结果得知,麦芽糖仅是翅鳞伞 AS 5.245 菌株菌丝生长的主要影响因子,而对该菌发酵产糖无显著影响。

酵母膏和氯化锌对翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产糖的交互效应见图 4,由图可见,氯化锌对 EPC 的

图 6~图 8 分别显示出硫酸镁与氯化锌、麦芽糖与氯化锌以及麦芽糖和起始 pH 值对翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产生 EPC 的交互影响效应。由图 6 可见,锌离子与镁离子之间似乎存在着协同作用,即在一定浓度区域内,只有两离子浓度同时升高或同时降低,才能相对地积累较多的 EPC,当一种离子浓度升高,而另一种离子浓度降低时,相对而言,EPC 含量就会远离其最大值。但锌离子与麦芽糖之间相互作用却与上述现象恰恰相反,如图 7 所见,当锌离子浓度升高时,欲保持高含量的 EPC,则需降低培养基中麦芽糖的浓度,反之亦然。上述拮抗作用同样存在于麦芽糖与起始 pH 值之间,由图 8 可知,同时

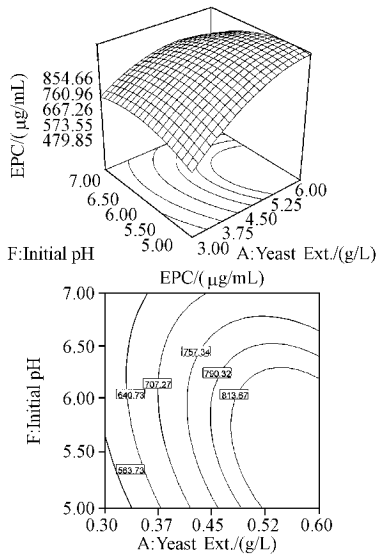


图 5 酵母膏与起始 pH 值交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots of EPC versus yeast extract concentration and initial pH

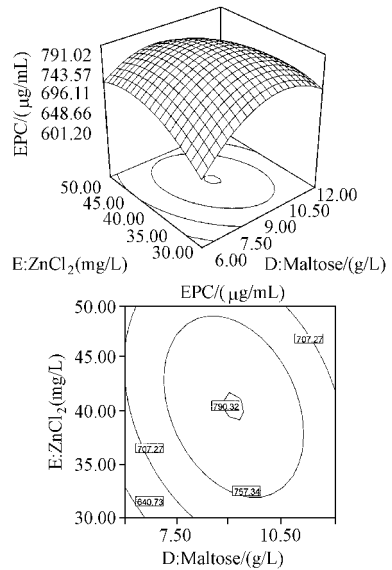


图 7 麦芽糖与氯化锌交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots of EPC versus maltose and zinc chloride concentration

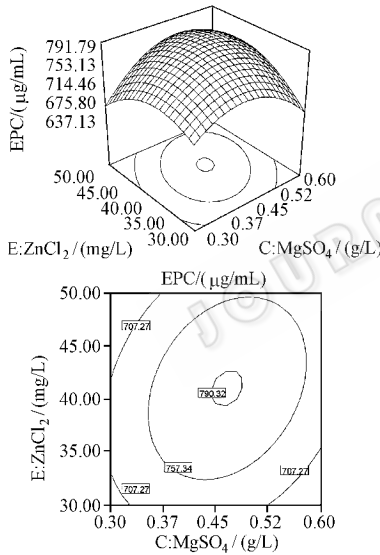


图 6 硫酸镁与氯化锌交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots of EPC versus magnesium sulfate and zinc chloride concentration

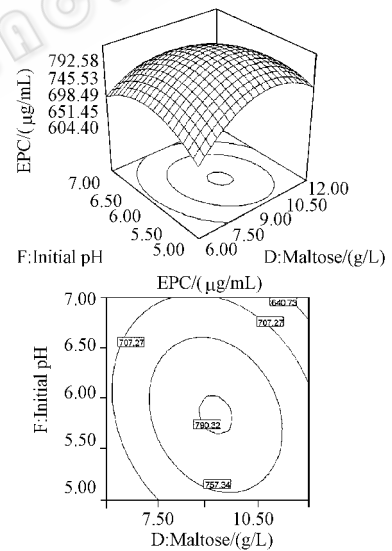


图 8 麦芽糖和起始 pH 值交互影响 EPC 的曲面图及其等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots of EPC versus maltose concentration and initial pH

升高或降低此两因素 都不利于翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产生 EPC 结合对图 5 的分析结果 基本可以认为 在发酵培养基起始 pH 值较低时 由于有机氮源的快速水解 为了保持该菌生长所需的合适碳氮比 或许更是为了合成胞外复合多糖的需要 势必要相对提高发酵基质中的麦芽糖浓度 以满足上述之需 当发酵培养基起始 pH 值近中性时 由于翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 含量降低 那么对于合成该多糖所需的麦芽糖也会随之减少 此时该菌快速生长所

需的碳源可由果糖提供 由此也可间接地认为 翅鳞伞 AS 5.245 菌株 EPC 的组成成分中含有麦芽糖的单体——葡萄糖分子。

3 结论

利用深层发酵技术生产真菌胞外多糖 虽然产物组成恒定、安全可靠、易于提取纯化且便于自动化控制 但深层发酵的内在环境(培养基的组成、浓度

水平等)以及外界条件(发酵温度、时间、接种量、通气量等)将会严重制约微生物的生长与胞外产物的积累。为了提高翅鳞伞 AS 5.245 菌株胞外多糖含量,有必要对影响该菌生长和产糖的关键因素及其水平进行优化,而在此之前,从众多的相关影响因素中筛选出主要影响因子则是至关重要的。因此,本研究首先利用 Plackett-Burman 实验设计,对影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株生长和发酵产糖的诸多相关因子进行了评价,成功地筛选出影响该菌生长和发酵胞外多糖的主要内在因素和外部因素,省时省力,快速有效。

在 Plackett-Burman 筛选实验基础上,通过响应曲面法(RSM)建立了关键内在因子影响翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵产糖的二次多项数学模型,并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验,优化了内在因素水平,探讨了各因素间的交互作用。通过对该模型方程求解得知,在各因素分别为:酵母膏 6.0g/L,果糖 11.5g/L, $MgSO_4$ 0.5g/L,麦芽糖 9.6g/L, $ZnCl_2$ 38.6mg/L,起始 pH5.3 时,可获得最大量的胞外多糖,预测为 876.32 μ g/mL 发酵醪,此预测可信度不仅被统计分析所验证,也被实践所证实。该预测值与 Plackett-Burman 筛选实验相比,每毫升发酵醪约增加了 170 μ g 胞外多糖,由此可见,利用 RSM 法对翅鳞伞 AS 5.245 菌株发酵培养基进行优化不仅经济有效,而且科学合理。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Xiao JH(肖建辉), Jiang NH(蒋依辉), Liang ZQ(梁宗琦) *et al.* Research advancements in edible and medicinal fungal polysaccharides. *Chemistry of Life* (生命的化学), 2002, **22**(2):148-151
- [2] Tan ZK(谭周进), Xie DK(谢达平). Research advancements of polysaccharomyces. *Food Science and Technology*(食品科技), 2002, **3**:10-12
- [3] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**:258-274
- [4] Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*, 2001, **3**:361-394
- [5] Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, **33**:305-325
- [6] Yu X, Hallett SG, Sheppard J *et al.* Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**:301-305
- [7] Sinha J, Panda T. Comparative analysis of optimal endoglucanase production by *Trichoderma reesei* and intergeneric fusants of *Trichoderma reesei/Saccharomyces cerevisiae*. *Bioproc Eng*, 1998, **18**:261-265
- [8] Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Proc Biochem*, 2000, **35**:539-550
- [9] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan. *Bioproc Eng*, 2000, **23**:451-455
- [10] Reddy PRM, Reddy G, Seenayya G. Production of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrients levels using response surface methodology. *Bioproc Eng*, 1999, **21**:497-503
- [11] Rastogi NK, Rashmi KR. Optimisation of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology. *Eur Food Res Technol*, 1999, **209**:57-62
- [12] Gouveia ER, Alvaro BN. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**:157-161
- [13] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing Medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, **17**:331-335
- [14] Lai LST, Pan CC, Tzeng BK. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Proc Biochem*, 2003, **38**:1317-1326
- [15] Chen QH, He GQ, Mokhtar AMA. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. *Enzyme Microb Tech*, 2002, **30**:667-672
- [16] Li C, Bai JH, Cai ZL *et al.* Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J Biotechnol*, 2002, **93**:27-34
- [17] Zhou YQ(周宇光). China Catalog of Cultures(菌种目录). 3rd ed, Beijing: China Agricultural Sciencetech Press(中国农业科技出版社), 1997
- [18] Dong Q(董群), Zheng LY(郑丽伊), Fang JN(方积年). Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharide. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 1996, **31**(9):550-553
- [19] Bai SL(白淑兰), Yan W(阎伟). A preliminary study on the mycelial pure culture characteristics of *Gyroporus cyanescens*. *Journal of Neimenggu Forestry College*(Natural science)(内蒙古林学院学报), 1997, **19**(4):8-13

Media Optimization for Exopolysaccharide by *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel. AS 5.245 on Submerged Fermentation

WANG Yun-Xiang LU Zhao-Xin* LÜ Feng-Xia

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Our previous work has indicated that mycelium growth and exopolysaccharide accumulation in submerged fermentation by *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel. AS 5.245 are strongly affected by many internal and external factors, including medium constituents and fermentation conditions. In this study, we use an effective two-phase statistical approach to enhance exopolysaccharide production. In the first phase, Plackett-Burman design was undertaken to evaluate the effects of the twenty factors, i.e., glucose, fructose, maltose, yeast extract, tryptone, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, vitamin B_1 , initial pH, the temperature, the medium volume and the duration, to the fermentation. By regression analysis, yeast extract, tryptone, fructose, $MgSO_4$, $MnCl_2$, initial pH and temperature were found to be important for exopolysaccharide production, while glucose, maltose, $NaNO_3$, $ZnCl_2$, vitamin B_1 , the duration and the volume are important to the mycelium biomass. In the second phase of the optimization process, a response surface methodology (RSM) was used to optimize the above critical internal factors, and to find out the optimal concentration levels and the relationships between these factors. Based on the results of the first phase, a five-level six-factor (yeast extract, $MgSO_4$, maltose, $ZnCl_2$ and initial pH) central composite rotatable design (CCRD) was employed. By solving the quadratic regression model equation using appropriate statistic methods, the optimal concentrations for obtaining 876.32 μg exopolysaccharide per milliliter of fermentation liquor were calculated as: 6.0g/L yeast extract, 11.5g/L fructose, 0.5g/L $MgSO_4$, 9.6g/L maltose, 38.6mg/L $ZnCl_2$ and with the initial pH 5.3. The experimental data under various conditions have validated the theoretical values.

Key words exopolysaccharide, *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel., Plackett-Burman design, response surface methodology, central composite rotatable design

Received: 09-25-2003

* Corresponding author. Tel: 86-25-84396583; Fax: 86-25-84395155; E-mail: fmb@njau.edu.cn

新抗体及酶制剂用于防病抗癌治疗

在结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤的细胞中,有一种名为“slit”的蛋白质,它可促进肿瘤新生血管快速生成,加速肿瘤的生长和转移。中国科学院上海生命科学研究院一个课题组以 slit 为目标,在实验室里成功制备一种可对付 slit 的抗体,命名为阻断性抗体 R5。将其注入患恶性黑色素瘤的实验鼠体内,5 周后发现老鼠体内给癌细胞供给营养的血管减少了 50%,肿瘤也由 1.3 g 萎缩到 0.6 g,这种抗体有望临床上用于对癌症的检测和治疗。如果某种蛋白质因子加速肿瘤的生长、生长和转移的话,针对这种“祸害之源”,除研发新型抗体之外,还有可能开发某种蛋白性的酶制剂(如某种蛋白酶等),若能在某种细菌中找到这种特定蛋白酶,则很有可能解除这种致癌蛋白质因子,加强这方面的研究很有实用价值。英国研究者开发一种生物催化方法可导致癌细胞自我死亡,并表现其专一性,只对癌细胞行之有效。尽管花了 4 年的时间研究取得这项成果,但还需要做进一步实验研究,其作用的稳定性、持效性如何?值得注意的是,美国研究者研发一种端粒酶抑制剂,可在几周内能有效减缓肿瘤形成,如果辅以常规抗癌药物,则可促进抗癌细胞生成。实验结果证明,这种端粒酶抑制剂有可能成为一种强有力的抗癌新药,现已进入前期临床试验,以促进抗癌制剂的研究与应用。重视防病、抗癌药物的研发是一方面,另一方面,防病、抗癌的保健食疗研究也不可忽视,这也是很有潜力的。为达到此目的,现代生物技术的有效应用,即将某致癌病毒的基因片段转入到食用西红柿的基因中,使其产生具有抗致癌病毒的抗体,从而可构建这种“转基因西红柿”,其果实则有“可食用植物疫苗”之功能;再加上西红柿果实本来含有丰富的番茄红素等抗氧化剂,人们常食用这种“工程西红柿”很有利于防病、防癌之保健功能。我国研究人员研究含 SARS 病毒抗体的“工程西红柿”,食用它的果实也有防治“肝炎”之效,实质上也是运用“以毒攻毒”方法在防病、抗癌方面的具体应用。

(柯为供稿)