

响应面法优化槐耳/板蓝根双向发酵条件

张婧, 郭明晔, 程亦雄, 周黎, 戚岑聪, 史新元*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:优化槐耳/板蓝根双向发酵条件并确定发酵终点。方法:以菌质多糖含量为响应值,采用响应面法考察温度、相对湿度、接种量对槐耳/板蓝根双向发酵条件的影响,同时确定槐耳/板蓝根菌质双向发酵终点。利用紫外分光光度法测定菌质多糖含量。结果:槐耳板蓝根菌质多糖的最佳发酵条件为温度 29.4 ℃,接种量 0.826 mL·g⁻¹,相对湿度 75.5%,菌质多糖质量分数 11.496%,与预测值(11.548%)偏差 0.45%,二项式拟合复相关系数 0.9826,所得回归模型拟合情况良好,达到设计要求;确定发酵终点 20 d。结论:响应面法可用于优选槐耳/板蓝根双向发酵条件,具有简便、预测性良好等优点。

[关键词] 槐耳;板蓝根;双向发酵;响应面法;发酵终点;紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0034-04

[doi] 10.11653/syfyj2013220034

Optimization of Bio-Solid Bidirectional Fermentation Conditions of *Trametes robiniophila* for *Isatidis Radix* by Response Surface Methodology

ZHANG Jing, GUO Ming-ye, CHENG Yi-xiong, ZHOU Li, QI Cen-cong, SHI Xin-yuan*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize bio-solid bidirectional fermentation conditions of *Trametes robiniophila* for *Isatidis Radix* and determine fermentation terminal. **Method:** Dependent variable was the content of polysaccharides, while independent variables were temperature, moisture and inoculation amount, response surface methodology was used to optimize bio-solid bidirectional fermentation conditions; Then fermentation terminal was defined. The content of polysaccharides was determined by UV. **Result:** Optimal fermentation conditions was as following: temperature 29.4 ℃, moisture 75.5%, inoculation amount 0.826 mL·g⁻¹, bias between the observed value (11.496%) and the predicted value (11.548%) of the content of polysaccharide was 0.45%, regression coefficients of binomial fitting complex model was as high as 0.9826; Terminal of bio-solid

[收稿日期] 20130524(009)

[第一作者] 张婧, 硕士, 从事发酵工程研究, E-mail: elsazhangjing@126.com

[通讯作者] *史新元, 副教授, 研究生导师, 从事中药生物技术研究, Tel: 010-84738621, E-mail: xyshi@126.com

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第2卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 666.
- [2] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 586.
- [3] 董婉茹, 刘洪毓, 丁雅光, 等. 栀子在治疗肝脏疾病中的研究进展[M]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 250.
- [4] 王伟影, 范蕾. 丽水地产栀子的质量研究[J]. 中国药业, 2012, 21(19): 19.
- [5] 吴红娟, 王清波, 谭朝阳, 等. 不同来源栀子中栀子苷

含量测定[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(5): 35.

[6] 陈红, 唐灿, 黄锐. 优选栀子提取工艺[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(1): 36.

[7] 高宝益, 裴妙荣. 高效液相色谱法测定栀子组中栀子苷含量[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(3): 212.

[8] 刘弘, 张振巍, 姬志强. 多指标综合评分法优选清热解毒口服液提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1326.

[责任编辑 仝燕]

fermentation was 20 d. **Conclusion:** Response surface methodology could be used to optimize bio-solid fermentation conditions of *T. robiniophia* for *Isatidis Radix* with good prediction.

[**Key words**] *Trametes robiniophia*; *Isatidis Radix*; bio-solid fermentation; response surface methodology; fermentation terminal; UV

药用真菌双向固体发酵工程的关键是选择具有一定活性成分的中药材作为药性基质,药性基质既能为真菌生长提供所需营养,同时其物质基础又可被真菌的生长代谢改变,从而可能产生新的性味和功能,即具有双向性,因而被称为“双向发酵”^[1-2]。若发酵组合设计正确、生产工艺合理,双向发酵可起到对中药的减毒、增效、扩效等作用^[3-4]。槐耳为已获证实的优质菌种,主成分为槐耳蛋白多糖,具有抗肿瘤、抗病毒等功效^[5]。板蓝根具有清热解毒、凉血利咽之功效,临床常用于治疗病毒性疾病及细菌性感染疾病^[6]。

工艺优化常用的实验设计方法为正交设计,但其无法得到明确的函数表达式,很难在指定区域内得到因素的最优组合和响应最佳值^[7]。响应面法是一种使实验技术与统计设计有效结合的综合处理方法,可用于确定各因素及其交互作用对非独立变量的影响,精确地表达因素和响应值间关系^[8]。本实验以槐耳板蓝根多糖为响应值,采用响应面法优化槐耳板蓝根的双向发酵工艺条件,确定发酵周期和终点,为槐耳板蓝根双向发酵体系的开发奠定基础。

1 材料

HYG-B 型全温度摇瓶柜(北京佳源兴业科技有限公司),LHS-80HC-II 型恒温恒湿培养箱(上海一恒科技有限公司),HH-56 型数显恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司),DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),UV-2100 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),TE612-L 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

板蓝根(购于北京同仁堂中药店,产地河北安国,经北京中医药大学中药学院刘颖老师鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigoica* Fort. 的干燥根),槐耳菌(东北食药真菌研究所),无水葡萄糖对照品(天津市福晨化学试剂厂,批号 20130223),麦麸(北京枣庄乡农源杂粮特产店),酵母粉(英国 Oxoid 公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

斜面培养基采用 PDA 培养基。摇瓶培养基为每 1 L 培养基含葡萄糖 4 g、麸皮 6 g、酵母粉 0.4 g、

KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g,加水配制,分装于 500 mL 锥形瓶中,每瓶装量 200 mL,于 121 °C、0.1 MPa 灭菌 30 min,备用。

2 方法与结果

2.1 槐耳-板蓝根双向发酵体系的建立

2.1.1 菌种活化 将槐耳菌接种于 PDA 试管斜面,活化 5 d 备用。

2.1.2 液体培养 将活化菌种接种于摇瓶培养基,接种量 10%,于 27 °C,140 r·min⁻¹ 培养 7 d,使之产生大量菌球,作为液体菌种。

2.1.3 双向发酵 将板蓝根打成粉,过 40 目筛,取粉末 10 g,置 500 mL 锥形瓶中,加水 12 mL,于 121 °C 灭菌 30 min,接入液体菌种,置于恒温恒湿箱中避光培养。

2.2 多糖含量的测定

2.2.1 菌质粗多糖的提取 双向固体发酵结束,取菌质,于 60 °C 干燥,粉碎称重,加 9 倍量 80% 乙醇于 85 °C 回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,以除去单糖、低聚糖及苷类等干扰性成分。药渣挥干溶剂后加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,水提液减压浓缩并定容至 100 mL。分别量取该溶液与 80% 乙醇适量,按 (2:3) 的比例混合,冷藏静置过夜,过滤,沉淀用 80% 乙醇洗涤,干燥,加水溶解并配成适应质量浓度的菌质粗多糖溶液。

2.2.2 菌质多糖的测定 采用苯酚-浓硫酸法测定^[9]。称取适量葡萄糖对照品,加水配成 0.610 g·L⁻¹ 的对照品贮备液。精密量取该贮备液 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 5.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密量取 2.0 mL 于试管中,分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,涡旋混匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,振摇 2 min,沸水浴中加热 30 min,取出,放冷至室温。取水 2.0 mL 同法处理,作为空白溶液。照《中国药典》2010 年版一部附录 VA 紫外-可见分光光度法^[10]于 489 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.0116X + 0.0002$ ($R^2 = 0.9995$),线性范围 12.2 ~ 85.4 mg·L⁻¹。精密量取菌质粗多糖溶液 2 mL,按上述方法处理,于 489 nm 处测定 A,计算样品中多糖含量。

2.3 固态发酵条件优选 以接种量、温度、相对湿

度为自变量,菌质多糖含量为响应值,设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面分析试验,其中 5 个点为零点重复,用以估计试验误差,因素水平见表 1。按 Box-Behnken 设计方案^[11]进行试验,至白色菌丝铺满瓶底药材上,发酵结束,对菌质进行多糖含量测定,采用 Design Expert 软件对试验数据进行多元回归分析,通过微分方法计算预测的最佳点,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 槐耳板蓝根菌质多糖固态发酵条件响应面分析因素水平

水平	A 温度/℃	B 接种量/mL·g ⁻¹	C 相对湿度/%
-1	25	0.6	70
0	28	1.0	80
1	31	1.4	90

用多项式回归分析对表 2 数据进行拟合,建立多元二次响应面回归模型 $Y = 384.145 - 69A - 15.788 - 47A + 3.772 - 19B - 4.290 - 21C - 0.101 - 25AB + 0.067 - 583AC - 0.029 - 937BC + 0.200 - 28A^2 + 0.081 - 719B^2 + 0.017 - 350C^2$ ($R^2 = 0.9826$)。对回归模型进行方差分析,模型 $P < 0.0001$,表明该模型在选择的回归区域内拟合很好,且相关性较好,响应值的变化有 98.26% 来源于所选因子的变化。校正决定系数 $R^2 = 0.9602$,体现出模型可信度较高,能较好地描述试验结果。方差分析表明方程的一次项 A 具有显著影响;一次项 B, C,交互项 AB, AC, BC 及二次项 A^2, B^2, C^2 均对发酵工艺具有极显著影响。各因素对响应值的影响顺序为湿度 > 接种量 > 温度。失拟项不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小,不需要引入更高次数的项,模型适当。离散系数为 3.11%,说明试验结果可靠,可用此模型对发酵工艺进行分析和预测。根据回归方程作响应曲面图,结果见图 1,响应面在底面的投影为等高线,其形状反映了 2 种因素交互影响的大小。

由图 1 可知,当发酵温度取零水平时,相对湿

表 2 耳板蓝根菌质多糖固态发酵条件响应面分析安排

No.	A	B	C	多糖质量分数/%
1	0	1	1	15.36
2	1	-1	0	15.16
3	-1	1	0	17.27
4	-1	0	-1	16.93
5	-1	-1	0	14.02
6	0	-1	-1	12.11
7	1	1	0	13.55
8	0	1	-1	16.51
9	1	0	1	17.98
10	-1	0	1	14.78
11	1	0	-1	12.02
12	0	-1	1	15.75
13	0	0	0	11.68
14	0	0	0	11.91
15	0	0	0	12.32
16	0	0	0	11.98
17	0	0	0	11.56

度-接种量的等高线为偏椭圆形,说明相对湿度与接种量的交互作用为差异显著;温度和相对湿度的等高线为椭圆形,表明二者交互作用为差异高度显著;温度与接种量的交互作用为差异显著。由曲面的弯曲程度和等高线的封闭情况可知,槐耳板蓝根菌质多糖含量的极值出现在试验因素选取范围内。对二次回归拟合方程进行偏导求解,得到极值点 $A = -0.12, B = 0.24, C = 0.31$;换算成试验条件即为温度 29.42℃,接种量 0.826 mL·g⁻¹,相对湿度 75.32%。结合实际生产考虑,调整温度 29.4℃,接种量 0.826 mL·g⁻¹,相对湿度 75.5%,在最佳发酵条件下,菌质多糖质量分数预测值 11.548%。按最佳发酵条件进行 3 次验证试验,结果槐耳板蓝根菌质多糖平均质量分数 11.496%,RSD 0.08%,与预测值的偏差 0.45%,表明预测值和实测值拟合性较好,证明优选的发酵条件稳定可行。

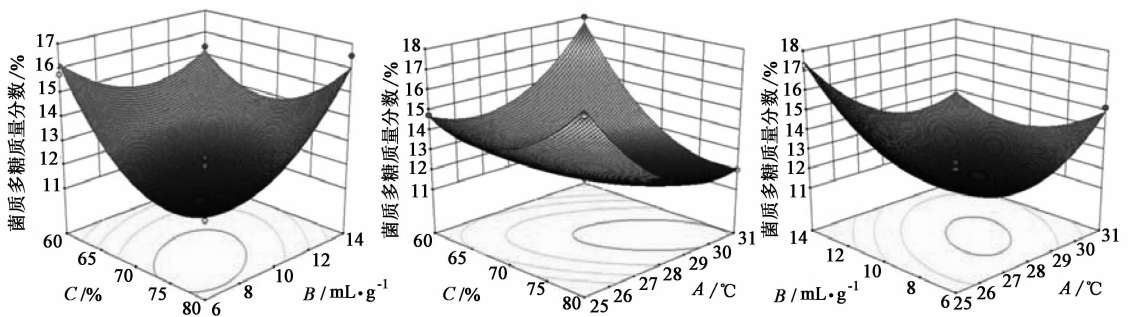


图 1 各因素交互作用对菌质多糖含量的响应曲面和等高线

表3 响应面模型的二次方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
模型	76.73	9	8.53	43.85	<0.000 1
A	2.30	1	2.30	11.83	0.010 8
B	3.99	1	3.99	20.52	0.002 7
C	4.96	1	4.96	25.52	0.001 5
AB	5.90	1	5.90	30.37	0.000 9
AC	16.44	1	16.44	84.58	<0.000 1
BC	5.74	1	5.74	29.50	0.001 0
A ²	13.68	1	13.68	70.36	<0.000 1
B ²	7.20	1	7.20	37.02	0.000 5
C ²	12.67	1	12.67	65.19	<0.000 1
残差	1.36	7	0.19		
失拟项	1.01	3	0.34	3.91	0.110 6
纯误差	0.35	4	0.09		
总离差	78.10	16			

2.4 发酵终点的确定 将槐耳-板蓝根体系发酵3, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 d, 分别按2.2.2项下方法测定菌质多糖含量。另取未接种的板蓝根基质经过相同灭菌处理放入培养箱, 相应时间取出, 作为阴性对照, 结果见图2。

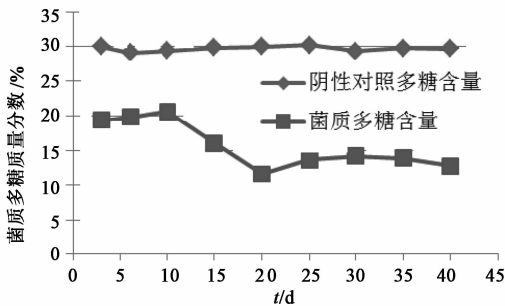


图2 槐耳板蓝根菌质多糖含量固体发酵动态变化曲线

由图2可知,随着发酵时间的延长,菌质多糖含量在发酵初期较为稳定,发酵至10 d后菌质多糖含量迅速下降,在20 d时含量达最低值(11.65%),随后趋于稳定;而阴性对照基本稳定在29.73%左右。由于槐耳在生长过程中会消耗大量板蓝根中多糖作为碳源,合成自身物质或者转化成板蓝根其他成分,故菌质多糖含量始终比阴性对照低。在发酵初期,槐耳生长较慢,多糖含量变化较小;随着发酵天数的延长,槐耳菌进入迅速生长消耗大量板蓝根多糖阶段,表现为菌质多糖含量急速下降,此时发酵体系有可能生成较多次生代谢产物。综合考虑,将菌质多糖含量最低的时间点20 d定为发酵终点。

3 讨论

以菌质多糖为响应值对槐耳板蓝根固态发酵条

件进行响应面优化分析,建立了多项数学模型并进行统计学分析,优化得到其最佳发酵条件,在此优化条件下,菌质多糖含量实测值与预测值偏差较小,说明回归模型拟合情况较好,即确定的优化方案合理有效。

温度过高或过低均会影响相应的酶活,从而降低对基质的分解效率;接种量过大会使菌体生长过快,老化也快;相对湿度较低时,基质中水分易挥发,使槐耳萌发速度慢,生长受阻,而相对湿度较高导致培养基较为潮湿,气体流通性差,也影响槐耳生长,以上问题均不利于代谢产物的生成,故确定最佳的温度、湿度、接种量对双向发酵体系非常关键,可为研究槐耳/板蓝根双向发酵过程中物质的变化情况提供参考。

[参考文献]

- [1] 张李阳,庄毅,潘扬,等. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J]. 中国食用菌,2007,26(2):3.
- [2] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌,2010,21(4):3.
- [3] 庄毅. 应用药用真菌新型固体发酵工程技术研制中药一类新药的建议[J]. 中药新药与临床药理,1995,6(4):41.
- [4] 舒任庚,庄毅,张普照,等. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):59.
- [5] 王建忠,程若川. 槐耳的研制及临床应用[J]. 井冈山医学学报,2003,10(1):15.
- [6] 陈凯,田景振,窦月,等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):275.
- [7] 陈敬,温庆果,刘韶,等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究[J]. 中草药,2012,43(11):2183.
- [8] 郑宝华. 南方红豆杉叶中活性多糖提取与纯化研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [9] 杨明,赵强强,韩丽,等. 黄芪中黄芪多糖含量的测定[J]. 中国现代中药,2011,13(7):29.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:23.
- [11] 刘训理,张楠,夏尚远. 统计优化技术在微生物发酵中的应用[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2009,40(3):465.

[责任编辑 全燕]