

## 正交设计结合响应面法优化榆黄蘑液体发酵的研究

王 伟, 汪维云\*

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 通过对榆黄蘑液体发酵的单因素试验, 并结合使用正交设计和响应面法 2 种实验设计方法, 确定榆黄蘑液体发酵的最适培养基配方和最适培养条件。结果表明, 榆黄蘑液体发酵的最适培养基配方为葡萄糖 1.00%、蔗糖 1.00%、蛋白胨 0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、氯化钠 0.03%、 $\text{MgSO}_4$  0.07%、 $\text{V}_{\text{B}_1}$  0.001%; 最适培养条件是接种量 5%、250 mL 的锥形瓶装液量 150 mL、温度 27 °C、初始 pH 值 6.55 及转速 155  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**关键词:** 榆黄蘑; 培养条件; 响应面法

中图分类号: TS205.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0778-08

### Optimization of submerged fermentation for *Pleurotus citrinopileatus* Sing culture by a combination of orthogonal design with response surface method

WANG Wei, WANG Wei-yun

(School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** In this article, the optimum culture medium formula and the optimal culture conditions for *Pleurotus citrinopileatus* fermentation were determined through culture of *Pleurotus citrinopileatus* Sing using single factor experiment with a combination of orthogonal design and response surface method. The results showed the optimum culture medium formula were glucose 1.00 %, sucrose 1.00 %, peptone 0.3 %, potassium dihydrogen phosphate(kdp) 0.15 %, NaCl 0.03 %, magnesium sulfate heptahydrate 0.07 % and Vitamin B1 0.001 %; the optimal cultivation condition was as follows. Inoculation amount, 5 %; 150 mL liquid medium inoculated into a 250 mL shake flask; cultural temperature, 27 °C; initial pH value , 6.55; rotary speed , 155  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Key words:** *Pleurotus citrinopileatus* Sing; culture condition; response surface method

榆黄蘑(*Pleurotus citrinopileatus* Sing), 又名金顶侧耳, 隶属于担子菌亚门(*Basidiomycotina*), 层菌纲(*Hymenomycetes*), 伞菌目(*Agaricales*), 侧耳科(*Pleurotaceae*), 侧耳属(*Pleurotu*)<sup>[1]</sup>。其子实体呈金黄色, 色艳、味鲜且富含多种活性物质, 包括蛋白质、多糖和氨基酸等多种营养成分, 是一种美味且有药效作用的名贵食用菌。研究表明, 经常食用榆黄蘑既能降低体内胆固醇含量, 既能补充赖氨酸不足, 还可治疗肾虚阳痿和痢疾等病患<sup>[2-3]</sup>。此外, 榆黄蘑多糖还可以增强宿主对自由基、病毒、肿瘤的免疫能力<sup>[4-5]</sup>。

由于榆黄蘑营养价值很高, 近年来十分受人们的青睐, 导致其市场需求量不断增加, 价格也不断

上升。虽然人工栽培的方法是可以获得其子实体, 然而它却有生产成本高、生长周期长等缺点。为了在较短时间内获得大量菌丝体及其发酵产物, 人们开始广泛采用液体深层发酵技术<sup>[6]</sup>。随着对菌丝体和子实体组分研究的深入, 发现许多食用菌菌丝体不仅多糖含量高于子实体, 且其抗癌活性成分也高于子实体<sup>[7-8]</sup>。

本实验选用常用的榆黄蘑菌种作为实验对象, 拟用正交设计和响应面相结合的优化方式, 优化榆黄蘑摇瓶液体发酵培养基配方和培养条件, 并用小型发酵罐进行扩大化验证培养, 以确定最佳的发酵工艺条件, 为工厂规模化生产提供理论基础。

收稿日期: 2013-03-21

作者简介: 王 伟, 男, 硕士研究生。E-mail:

\* 通信作者: 汪维云, 男, 博士, 教授。E-mail: weiyunw@126.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验菌种和主要试剂

**1.1.1 试验菌种** 榆黄蘑 (*Pleurotus citrinopileatus* Sing) 试验菌种采购于黑龙江, 4℃ 保存于安徽农业大学中药与天然药物研究所。

**1.1.2 主要试剂** 蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、黄豆粉、尿素、硫酸铵、葡萄糖、D-麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、玉米粉、磷酸二氢钾、硫酸亚铁、氯化钠、硫酸镁、硫酸锌、V<sub>B1</sub>、琼脂和盐酸等。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 最佳培养基的优化** 不同碳源对发酵的影响。分别以 2.00% 的葡萄糖、蔗糖、D-麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉、1.00% 葡萄糖+1.00% 蔗糖替换基础液体种子培养基中的碳源配制 6 组培养基, 每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中, 接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重, 记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同氮源对发酵的影响。分别以 0.30% 蛋白胨、酵母粉、尿素、黄豆粉、硫酸铵替换基础液体种子培养基中的氮源配制 5 组培养基, 每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中, 接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重, 记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同无机盐及不同添加量对发酵的影响。将基

础液体种子培养基中的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 含量分别改为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25% 配制 5 组培养基; 将基础液体种子培养基中的 MgSO<sub>4</sub> 含量分别改为 0.01%、0.03%、0.05%、0.07%、0.09% 配制 5 组培养基; 向基础液体种子培养基中额外分别添加 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CaCO<sub>3</sub>、NaCl、ZnSO<sub>4</sub>, 并设置未添加额外无机盐的为对照组, 配制 5 组培养基。

每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中。接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重, 记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值, 绘制菌丝体重量随相应无机盐添加量变化的曲线。

不同生长因子对发酵的影响。分别用 0.001% V<sub>C</sub>、V<sub>B1</sub>、V<sub>B6</sub>、叶酸来配制发酵培养基各 4 组, 每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中, 接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重, 记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

正交试验优化配方。在单因素试验的基础上, 以最佳碳源、最佳氮源、无机盐、生长因子 4 个影响因子采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行正交试验, 每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中, 接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重, 记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。采用 Design Expert 8.0.6 软件对数据进行分析, 结果见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 最佳碳源 The optimal carbon source	B 最佳氮源 The optimal nitrogen source	C 无机盐 Inorganic salt	D 生长因子 Growth factor
1	1%	0.2%	0.01	0.001
2	2%	0.3%	0.02	0.002
3	3%	0.4%	0.03	0.003

表 2 试验设计因素水平

Table 2 Experimental design of RSM with 3 factors at 3 levels

水平Level	因素 Factor		
	A 初始 pH Initial pH	B 培养温度/℃ Temperature	C 转速/r·min <sup>-1</sup> Rotate speed
-1	6.5	25	130
0	7.0	27	150
1	7.5	29	170

**1.2.2 最佳培养条件的优化** 不同的初始 pH 值对发酵的影响。调节液体培养基初始 pH 值分别为 4.0、

5.0、6.0、7.0、8.0, 接种量 5%, 27℃, 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后, 过滤收集菌丝球并洗净, 于 60℃

烘箱中完全烘干后称重,记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同的装液量对发酵的影响。250 mL 锥形瓶中,分别装入 50、100、150、200 mL 培养液,每组设置 3 个平行,接种量 5%,27℃,150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后,过滤收集菌丝球并洗净,于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重,记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同的接种量对发酵的影响。分别采用 2%、5%、10%、15% 的接种量,每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中,27℃,150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后,过滤收集菌丝球并洗净,于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重,记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同的转速对发酵的影响。接种后分别在 100、125、150、和 175 r·min<sup>-1</sup> 的转速下培养,每组设置 3 个平行,接种量 5%,27℃,摇床培养 7 d 后,过滤收集菌丝球并洗净,于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重,记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

不同的培养温度对发酵的影响。选取 23℃、25℃、27℃、29℃ 和 31℃ 这 5 个温度条件下分别培养,每组设置 3 个平行各 150 mL 培养液分装于 250 mL 锥形瓶中,接种量 5%,150 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 7 d 后,过滤收集菌丝球并洗净,于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重,记录每组各瓶菌丝体重量并计算平均值。

Box-Behnken 响应面优化<sup>[9]</sup>。在单因素的基础上,选取初始 pH(A)、培养温度(B)、转速(C)共 3 个因素作为自变量,以 -1、0、1 编码自变量的试验水平,以菌丝生物量为目的指标 Y 进行 Box-Behnken 响应面优化,采用 Design Expert 8.0.6 软件来设计和分析数据,试验设计因素水平见表 2。

**1.2.3 发酵罐反应器放大** 根据优化后的最佳培养基和培养条件,确定最佳液体发酵工艺,培养基配方见正交试验结果。发酵条件为:7 L 发酵罐装液量 5 L,接种量 5%,通气量 2.5 L·min<sup>-1</sup>,罐压 0.04 Mpa,自然 pH,温度 (27±1)℃,发酵时间 120 h。培养完成后过滤收集菌丝球并洗净,于 60℃ 烘箱中完全烘干后称重。进行 3 次试验,计算平均值和相对标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳培养基的优化

**2.1.1 最佳碳源的选择** 不同微生物体内含有不同的碳源利用相关酶系,对各种碳源的利用能力也不尽相同。选取 5 种较为常用的碳源和 1 种混合碳源,

按照上述方法操作,记录菌丝体重量并计算每组平均值,结果见表 3。

表 3 不同碳源对菌丝生物量的影响  
Table 3 Effects of different carbon sources on mycelia biomass

碳源 Carbon source	菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass			平均值/g·L <sup>-1</sup> Average
	I	II	III	
葡萄糖 Glucose	8.0	8.2	7.8	8.0
蔗糖 Sugar	7.8	7.3	6.8	7.3
D-麦芽糖 D-maltose	6.5	5.2	5.4	5.7
可溶性淀粉 Soluble starch	6.1	5.8	5.5	5.8
玉米粉 Corn flour	5.2	4.1	4.2	4.5
混合碳源 Mixed carbon	8.5	8.2	8.8	8.5

表 4 不同氮源对菌丝生物量的影响  
Table 4 Effects of different nitrogen sources on mycelia biomass

氮源 Nitrogen source	菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass			平均值/g·L <sup>-1</sup> Average
	I	II	III	
蛋白胨 Peptone	8.0	8.1	8.8	8.3
酵母粉 Yeast powder	6.7	6.0	6.8	6.5
尿素 Urea	-	-	-	-
黄豆粉 Soybean flour	7.1	7.6	7.2	7.3
硫酸铵 Ammonium sulfate	1.5	1.8	1.5	1.6

注:“-”表示菌丝体生长很差或不生长,无测量意义。下同。

Note:“-” refers to the mycelia which grown poor or failed to grow, and the value could not be determined. The same below.

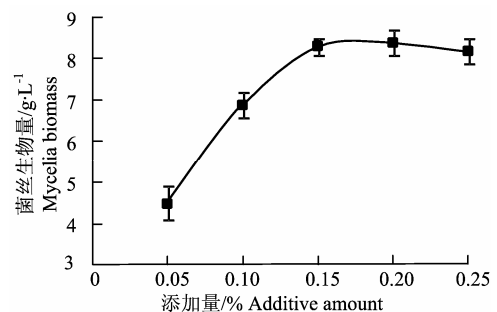


图 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对菌丝生物量的影响  
Figure 1 Effects of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on mycelia biomass

由表 3 可见,单糖、双糖等多种碳源都可以作为榆黄蘑生长发育的原料。对葡萄糖、蔗糖的利用效果最好,而对于 D-麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉的利用效果较差,菌丝体的萌发比较缓慢,生物量也相对偏低。采用混合碳源后,菌丝生物量有所提高,可能是因为葡萄糖有利于菌丝的早期萌发,当其被迅速分解利用殆尽后,蔗糖被胞外酶分解形成可继续为菌丝体利用的单糖。综合考虑利用效果和持久性这两个方面,选用 50% 葡萄糖和 50% 蔗

糖混合作为碳源。

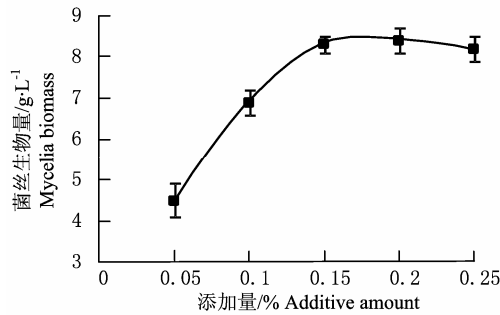


图 2  $MgSO_4$  对菌丝生物量的影响

Figure 2 Effects of  $MgSO_4$  on mycelia biomass

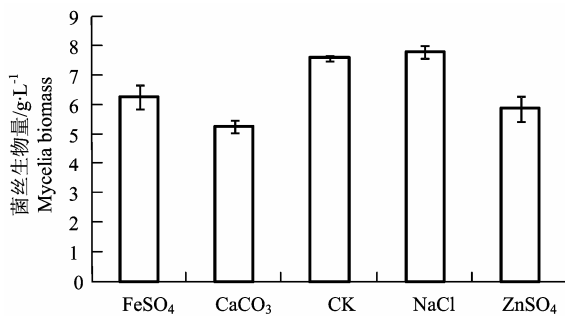


图 3 不同的无机盐离子对菌丝生物量的影响

Figure 3 Effects of inorganic salt on mycelia biomass

**2.1.2 最佳氮源的选择** 选取 5 种较为常用的碳源, 按照上述方法操作, 记录菌丝体重量并计每组算平均值, 结果见表 4。

由表 4 可知, 以蛋白胨作为氮源时, 利用效果最好, 菌丝体生物量为  $8.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对黄豆粉、酵母粉的利用效果相对次之; 而以尿素作为氮源时, 菌丝体生物量极低, 这表明榆黄蘑几乎不能利用无机氮源。因而选取蛋白胨作为氮源。

**2.1.3 最佳无机盐的选择** 在培养基中添加不同量的无机盐, 按照上述方法操作, 记录菌丝体重量并计每组算平均值, 分别绘制变化曲线, 结果见图 1 和图 2。

由图 1 可知, 菌丝体干重随着添加  $KH_2PO_4$  增加而增加, 但是添加量达到 0.15 % 后增加已不明显, 因此选择  $KH_2PO_4$  添加量为 0.15 %。

由图 2 可知, 菌丝体干重随着添加  $MgSO_4\cdot 7H_2O$  增加而增加, 但是添加量达到 0.07 % 后增加已不明显, 因此选择  $MgSO_4\cdot 7H_2O$  添加量为 0.07 %。

由图 3 可知, 向培养基中添加  $FeSO_4$ 、 $CaCO_3$ 、 $ZnSO_4$  抑制菌丝体的生长, 抑制作用  $CaCO_3 > ZnSO_4 > FeSO_4$ ; 而添加  $NaCl$  可以促进菌丝体的生长, 故选择  $NaCl$  作为无机盐添加项, 具体的添加量将在正交试验中确定。

表 5 正交实验结果

Table 5 The results of orthogonal test

组号 Code	因素 Factor				菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.8
2	1	2	2	2	6.7
3	1	3	3	3	5.9
4	2	1	2	3	9.0
5	2	2	3	1	10.3
6	2	3	1	2	9.4
7	3	1	3	2	6.8
8	3	2	1	3	7.5
9	3	3	2	1	7.7

表 6 正交实验极差分析

Table 6 The range analysis of orthogonal test

	菌丝生物量 Mycelia biomass			
	A	B	C	D
$K_1$	0.580	0.687	0.723	0.760
$K_2$	0.957	0.817	0.780	0.763
$K_3$	0.733	0.767	0.767	0.747
$R$	0.377	0.130	0.057	0.016
最佳组合 Optimal combination	$A_2$	$B_2$	$C_3$	$D_1$

表 7 初始 pH 对菌丝生物量的影响

Table 7 Effects of different initial pH values on mycelia biomass

pH	菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass			平均值/g·L <sup>-1</sup> Average
	I	II	III	
4.0	-	-	-	-
5.0	5.8	5.1	5.6	5.5
6.0	7.6	7.1	7.8	7.5
7.0	8.9	8.2	8.4	8.5
8.0	6.0	6.9	7.2	6.7

表 8 不同转速对菌丝生物量的影响

Table 8 Effects of different rotate speeds on mycelia biomass

转速/r·min <sup>-1</sup> Rotate speed	菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass			平均值/g·L <sup>-1</sup> Average
	I	II	III	
100	6.6	5.2	5.3	5.7
125	8.1	7.9	7.1	7.7
150	9.9	9.2	9.4	9.5
175	8.9	8.6	8.9	8.8

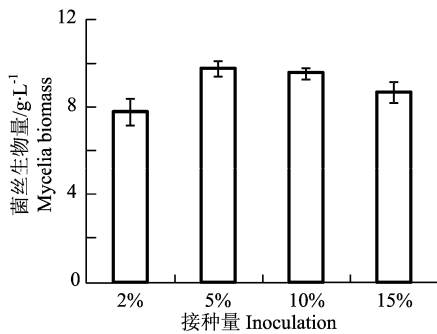


图 4 不同的接种量对菌丝生物量的影响

Figure 4 Effect of different inoculation on mycelia biomass

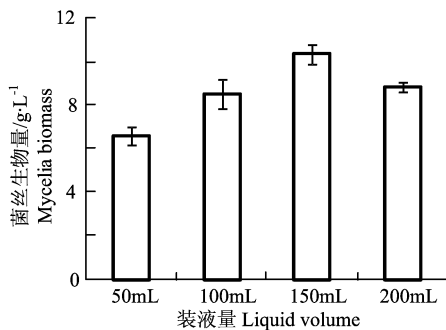


图 5 不同的装液量对菌丝生物量的影响

Figure 5 Effect of different liquid volume on mycelia biomass

**2.1.4 最佳生长因子的选择** 分析试验结果可知, 添加 0.001% 的  $V_{B1}$  可以促进菌丝体的生长, 而添加 0.001% 的  $V_{B6}$ 、 $V_C$ 、叶酸, 反而会抑制菌丝体的生长, 抑制效果: 叶酸> $V_{B6}$ > $V_C$ 。

因此, 选择  $V_{B1}$  作为最佳添加生长因子, 具体的添加量将在正交试验中确定。

**2.1.5 正交试验结果** 在单因素试验的基础上, 选

定 50% 葡萄糖+50% 蔗糖为最佳碳源, 蛋白胨为最佳氮源,  $MgSO_4$  和  $KH_2PO_4$  的添加量分别为 0.07% 和 0.15%, 按照上述方法, 最佳碳源、最佳氮源、无机盐、生长因子 4 个影响因素采用  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验。以确定碳氮比、NaCl 和  $V_{B1}$  的添加量, 采用 Design Expert 8.0.6 软件对数据进行分析, 试验因素水平设计见方法部分表 1, 试验结果见表 5 和表 6。由表 5 和表 6 可以看出, 影响生物碱获得量的主次因素为  $A>B>C>D$ , 最佳组合是  $A_2B_2C_3D_1$ , 即最佳培养基配方为葡萄糖 1.00%、蔗糖 1.00%、蛋白胨 0.3%、磷酸二氢钾 0.15%、硫酸镁 0.07%、NaCl 0.03% 及  $V_{B1}$  0.001%。

## 2.2 最佳培养条件的优化

**2.2.1 初始 pH 对发酵的影响** 由表 7 可知, 当培养液初始 pH 值为 7.0 时, 获得的菌丝体生物量最大, 达到 8.5 g·L<sup>-1</sup>, 而当 pH 值为 4.0 时, 菌丝基本不生长; pH 为 8.0 时, 生物量又有所下降, 所以推测最适初始 pH 应该是在 6.0~8.0 之间, 具体数值将在响应面试验中确定。

**2.2.2 不同转速对发酵的影响** 由表 8 可知, 当摇床转速为 150 r·min<sup>-1</sup> 时, 菌丝体生物量最大, 达到 9.5 g·L<sup>-1</sup>, 而在 100、125 r·min<sup>-1</sup> 时, 菌丝体生物量都较小, 在 175 r·min<sup>-1</sup> 时也相对有所降低, 可推测最适转速区间应是 125~175 r·min<sup>-1</sup>, 具体数值将在响应面试验中确定。

**2.2.3 不同接种量对发酵的影响** 由图 4 可知, 接种量为 5% 时菌丝体生物量最高。如果接种量太低, 会导致菌种浓度较低, 生长缓慢; 然而接种量过大,

虽然前期菌种生长速度很快,但是随着营养物质和溶氧量的减小,菌丝生长也会变得缓慢,故确定最适接种量为 5%。

**2.2.4 不同装液量对发酵的影响** 由图 5 可知,菌丝生物量随着装液量增加而增加,当装液量为 150 mL 时,菌丝体生物量最高,而当装液量为 200 mL 时,由于溶氧量减少,菌丝体生长明显减少,故确定最适装液量为 150 mL。

**2.2.5 不同培养温度对发酵的影响** 由表 9 可知,菌丝体生物量在培养温度为 27℃ 时最高,达到 9.9 g·L<sup>-1</sup>,根据经验可知,过低或过高的温度均不利于菌丝体积累代谢产物,从而导致菌丝体生物量的下降,因此应选择合适的培养温度。根据单因素试验,确定最适温度在 27℃ 上下,将在响应面试验中进一步对其优化。

**2.2.6 Box-Behnken 响应面优化** 综合分析单因素

试验的结果,且考虑到在实际提取过程中接种量和装液量不便于精确化,参与响应面优化的意义不大,故将接种量定为 5%,装液量定为 150 mL,选取初始 pH(A)、培养温度(B)、转速(C) 3 个因素作为自变量,将菌丝生物量作为目的指标 *Y*,按照上述方法进行 Box-Behnken 响应面优化,试验因素水平设计见方法部分表 2,实验安排和结果见表 10。

通过 Design Expert 8.0.6 软件对上述结果进行二次多项式回归,拟合得到一个菌丝生物量 *Y* 对 3 个因素初始 pH(A)、培养温度(B)、转速(C)的二次多项式方程,方程为:

$$Y=1.00-0.045A+0.070B+0.052C+0.015AB+0.025AC-0.005BC-0.020A^2-0.19B^2-0.055C^2, R^2=0.9578$$

对其进行方差分析,以验证此模型方程的有效性,结果见表 11。

$$R^2=0.9578, \text{修正后 } R^2=0.9036。$$

表 9 不同温度对菌丝生物量的影响

Table 9 Effect of different temperature on mycelia biomass

温度/℃ Temperature	菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass			平均值/g·L <sup>-1</sup> Average
	I	II	III	
23	5.6	5.2	6.3	5.7
25	8.1	7.7	7.3	7.7
27	10.9	9.2	9.6	9.9
29	9.0	8.4	9.3	8.9
31	7.9	7.6	7.9	7.8

表 10 响应面设计和结果

Table 10 Design and results of RSM

组号 Code	因素 Factor			菌丝生物量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia biomass
	A	B	C	
1	-1	-1	0	7.9
2	1	-1	0	7.0
3	-1	1	0	8.5
4	1	1	0	8.2
5	-1	0	-1	9.5
6	1	0	-1	7.8
7	-1	0	1	10.2
8	1	0	1	9.5
9	0	-1	-1	6.1
10	0	1	-1	8.1
11	0	-1	1	7.1
12	0	1	1	8.9
13	0	0	0	9.9
14	0	0	0	9.8
15	0	0	0	9.7
16	0	0	0	10.5
17	0	0	0	10.1

由表 11 可知,该模型  $F=17.67$ ,  $P<0.001$ , 方程模型表现为极显著,失拟项  $F=2.42$ ,

$P=0.2067>0.05$ , 失拟项表现为不显著。一次项中 *B* 对菌丝生物量影响极显著 ( $P<0.01$ ), *A*、*C* 均影响

显著 ( $P < 0.05$ ), 且  $F$  值为  $B > C > A$ , 即对菌丝生物量的影响培养温度  $>$  转速  $>$  初始 pH。二次项中  $B^2$  影响极显著,  $C^2$  影响相对显著, 二者的交互项表现为不显著, 可知各因素对菌丝生物量的影响不是单一的线性关系。修正后  $R^2 = 0.9036$ , 表明响应值数据

90.36% 的变化来自于所选择的变量, 可被此模型反映, 用此模型不能解释的数据变化仅有 9.64%, 拟合程度良好, 预测性较高, 因此该模型适合于最优培养条件的预测。

表 11 方差分析

Table 11 Results of variance analysis

分差来源	Source of variance	平方和 $SS$	自由度 $DF$	均方 $MS$	$F$	$P$ Prob $> F$
模型		0.260	9	0.028	17.67	<0.0005
A-A		0.016	1	0.016	10.08	0.0156
B-B		0.039	1	0.039	24.39	0.0017
C-C		0.022	1	0.022	13.72	0.0076
AB		0.0009	1	0.0009	0.56	0.4786
AC		0.0025	1	0.0025	1.56	0.2524
BC		0.0001	1	0.0001	0.062	0.8102
$A^2$		0.001684	1	0.001684	1.05	0.3400
$B^2$		0.15	1	0.15	94.58	<0.0001
$C^2$		0.013	1	0.013	7.93	0.0260
残差 Residue		0.011	7	0.001607		
失拟项 Lack of fit		0.00725	3	0.002417	2.42	0.2067
纯误差 Pure error		0.004	4	0.001		
总计 Total		0.27	16			

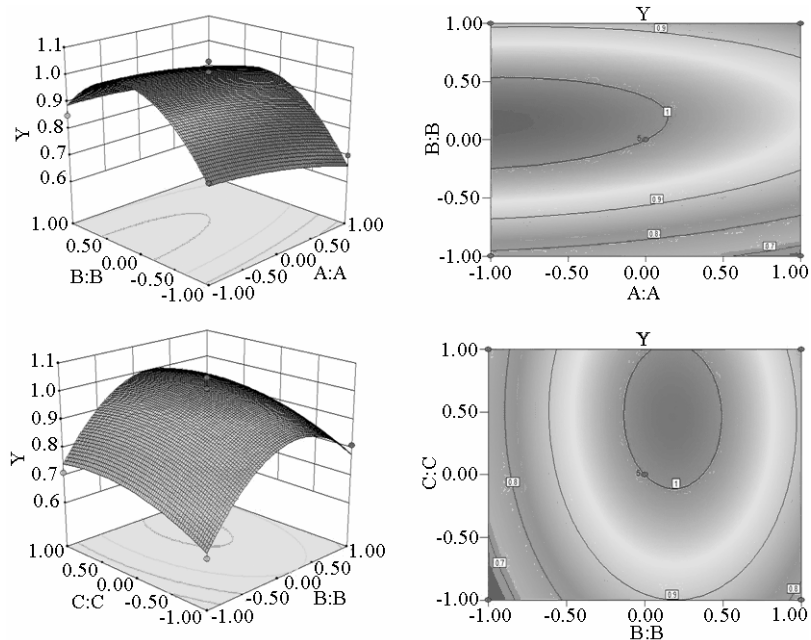


图 6 响应面 3D 图形和等高线

Figure 6 Response contour and 3D surface and by different factors

表 12 提取验证试验结果

Table 12 Results of verifying extraction experiment

组号	菌丝生物量/ $g \cdot L^{-1}$	平均值	标准偏差	相对标准偏差
Code	Mycelia biomass	Average	$SD$	$SD$
1	10.26	10.28	0.02	0.019
2	10.28			
3	10.30			

将一个因素设为中心值, 描绘出对应两因素的三维响应面图, 能直观考察各因素对菌丝生物量的影响, 结果见图 8。

由图 6 可知, 三维曲线的最高点或等高线的中心点表示菌丝生物量的最大值。通过响应面和等高线图, 可以直观的观测出各因素对菌丝生物量的影响。响应面越陡峭, 等高线越密集, 则说明该因素

对菌丝生物量影响越大。通过软件分析得到  $Y$  取最大值时  $A=-0.90$ ,  $B=0.14$ ,  $C=0.27$ , 此时初始 pH 为 6.55, 培养温度为 27.28 °C, 转速为 155.4 r·min<sup>-1</sup>,  $Y$  预测值为 1.032 39。考虑到实际测量的精确性, 将其修正为初始 pH 为 6.55, 培养温度为 27°C, 转速为 155 r·min<sup>-1</sup>, 此时  $Y$  预测值为 1.028 36, 视为等同于最大值, 即此组合为最优条件。

表 13 发酵罐验证试验结果

Table 13 Results of verifying experiment on fermenter

组号 Code	菌体总重/g Total weight of mycelia biomass	菌体含量/g·L <sup>-1</sup> Mycelia concentration	标准偏差(总重) SD(total weight)	相对标准偏差 RSD
1	45.09	9.018	2.545	0.055
2	43.60	8.720		
3	48.56	9.712		
平均值 Average	45.75	9.150		

为了检验结果的准确性, 以此组合进行 3 次验证性试验, 结果见表 12。

由表 12 可知, 3 次验证试验最终获得的菌丝生物量均值为 10.28, 与预测值接近, 其标准偏差为 2%, 相对标准偏差为 0.019, 重现性良好, 表明该模型符合试验的设计目标, 具有实际指导意义。

### 2.3 发酵罐反应器放大

使用 GUQS-7-70C 式自动气流式发酵罐, 按照相同培养基配方对优化后摇瓶工艺进行反应器放大。发酵条件为: 7 L 发酵罐装液量 5 L, 接种量 5%, 通气量 2.5 L·min<sup>-1</sup>, 罐压 0.04 Mpa, 自然 pH, 温度 (27±1) °C, 发酵时间 120 h。培养完成后过滤收集菌丝球并洗净烘干后称重。进行 3 次试验, 计算平均值和相对标准偏差, 结果见表 13。

由表 13 可知, 使用发酵罐反应器进行放大生产, 干燥菌丝体重量可达 9.15 g·L<sup>-1</sup>, 与摇瓶工艺的生产量接近, 相对标准偏差为 5.5%, 工艺较为稳定, 可用于扩大生产。

## 3 小结与讨论

综合分析单因素试验、正交试验以及响应面优化试验的结果, 最终确定榆黄蘑液体发酵的最适培养基配方为: 葡萄糖 1.00%、蔗糖 1.00%、蛋白胨 0.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%、氯化钠 0.03%、MgSO<sub>4</sub> 0.07%、V<sub>B1</sub> 0.001%; 最适培养条件为: 接种量 5%、250 mL 的锥形瓶装液量 150 mL、培养温度 27°C、初始 pH 值 6.55、转速 155 r·min<sup>-1</sup>。

该试验选择葡萄糖和蔗糖的混合碳源作为碳源, 蛋白胨作为氮源, 但是考虑到在工厂化生产中,

如果大量使用葡萄糖、蔗糖和蛋白胨作为原料, 必然导致成本过高, 可以考虑掺加一些淀粉糖浆或者豆饼粉, 而具体添加量和添加方法仍需要通过大量的试验来确定。另外这里得出的结论是摇瓶培养的条件, 也只利用发酵罐进行了简单的放大验证, 完全利用发酵罐深层培养时, 发酵条件可能会变化, 还有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 郑凤荣. 榆黄蘑液体深层发酵技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [2] 何英, 万德云, 张玉兴. 榆黄蘑提取物对保护肝脏作用的初步探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010(9): 1368-1369.
- [3] 薛冰, 金在久, 施溯筠. 榆黄蘑干品和鲜品的抗氧化性[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(3): 23-26.
- [4] Li Y R, Liu Q H, Wang H X, et al. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*[J]. BBA, 2008, 17(8): 51-57.
- [5] Chen J N, de Mejia E G. and Wu J S. Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage[J]. J Agric Food Chem, 2011. 59(13): 7092-7099.
- [6] 李延辉, 郑凤荣. 榆黄蘑液体深层培养条件的优化研究[J]. 北方园艺, 2010(4): 190-192.
- [7] 周键, 孙培龙, 赵培城, 等. 食用菌深层发酵的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 111-114.
- [8] Cui L, Liu Q H, Wang X H, et al. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(1): 81-86.
- [9] 丁双华, 叶立斌, 陈卫, 等. 响应面优化提取桑叶多酚的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 52-58.