

张安宁,刘连成. 响应面法优化香菇液体发酵条件[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):200-203.

# 响应面法优化香菇液体发酵条件

张安宁, 刘连成

(江苏食品药品职业技术学院 江苏淮安 223003)

**摘要:**在香菇液态发酵单因素试验基础上,通过响应面法对发酵条件进行优化试验,依据 Box - Behnken (BBD) 设计预测发酵的最佳条件为:接种量 12.42%、pH 值 4.96、培养温度 24.11 ℃。在转速为 160 r/min 条件下按照最佳条件培养,菌丝生物量实测值为 17.76 g/L,与理论值 17.58 g/L 相差 1.02%。

**关键词:**响应面法;液态发酵;条件优化;生物量

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0200-04

香菇 (*Lentinula edodes*) 别称香蕈、香菌等,分类上属担子菌门层菌纲伞菌目侧耳科香菇属<sup>[1]</sup>,是世界著名食用菌之一。它不仅肉质肥厚脆嫩,香气独特,而且具有很高的药用和保健价值<sup>[2-4]</sup>。我国是世界上香菇人工栽培最早的国家,也是最大的生产国。我国对香菇液态发酵工艺的研究虽有报道,但对其发酵条件的研究大多停留在单因素试验方面<sup>[5-7]</sup>,很少研究香菇液态发酵过程中各因素之间的交互作用。响应面法已被广泛应用于生物过程的优化<sup>[8-9]</sup>,但在香菇液态发酵条件研究方面报道较少。前期研究利用意杨下脚料作为主要碳源培养获得高产香菇菌种(香菇 933),并研究出该香菇菌种液态发酵培养基的适宜配方,在此基础上为进一步提高香菇产量和质量,本试验利用响应面法对其液态发酵条件进行优化,找出适合香菇菌丝生长的最佳培养条件,为香菇液体菌种培养和规模液态发酵生产研究提供理论基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌种 香菇 933 菌种,由江苏食品药品职业技术学院省级食品微生物工程实验室筛选提供。

1.1.2 主要仪器 ZQZY-HB 型全温振荡培养箱,上海知楚仪器公司生产;LDZ5-2 型高速离心机,北京京立离心机有限公司生产;JY92-II 超声波细胞粉碎仪,厦门精密仪器有限公司生产。

1.1.3 培养基 (1)母种和活化培养基:马铃薯 200 g/L(煮汁)、琼脂 20 g/L、葡萄糖 15 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L、MgSO<sub>4</sub> 1 g/L、KCl 0.5 g/L、pH 值自然。(2)液体种子和发酵培养基:蔗糖 20 g/L、酵母膏 10 g/L、MgSO<sub>4</sub> 1 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L、KCl 0.5 g/L、初始 pH 值 5~6。

### 1.2 方法

1.2.1 种子液的培养 取 500 mL 的三角瓶,加入 100 mL 液体种子培养基,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 25 min,冷却后接入蚕豆大活化后的斜面香菇菌种块,在转速为 160 r/min 的条

下 24 ℃ 恒温振荡培养 5 d,得到带有细密菌丝球的种子液。

1.2.2 菌丝体生物量的测定 将待测香菇菌丝发酵液放于离心机中,设定转速为 4 000 r/min,离心 15 min,上清液用于多糖提取。用去离子水洗涤沉淀 4 次,置于 60 ℃ 干燥至恒重,即得菌丝体生物量。

1.2.3 发酵液及香菇菌丝体总粗多糖的测定<sup>[10-11]</sup> 取上述发酵上清液加 4 倍体积 95% 乙醇,于 4 ℃ 下静置 24 h,在 5 000 r/min 下离心 15 min,沉淀用无水乙醇洗涤、低温干燥,得到发酵液粗多糖。将上述“1.2.2”称重后的香菇菌丝体超声波粉碎,加入约 20 倍体积的蒸馏水,98 ℃ 抽提 3 h,过滤并将滤液浓缩,用 4 倍体积 95% 乙醇静置 24 h,在 5 000 r/min 下离心 15 min,去上清液,沉淀用无水乙醇洗 2 次,低温干燥,即为香菇菌丝粗多糖。发酵液粗多糖和香菇菌丝粗多糖混合后称重即得总粗多糖。

1.2.4 香菇液体发酵单因素试验设计 (1)接种量处理:将装有 100 mL 液体发酵培养基的 500 mL 三角瓶,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 25 min,按不同接种量(体积比)将培养好的液体菌种接种到发酵培养基中,在转速为 160 r/min 的条件下 24 ℃ 振荡培养 3 d,每处理做 3 次平行试验,计算发酵液生物量和总粗多糖的平均值,下同。(2)pH 值处理:用 NaOH 或 HCl 调节初始发酵液的 pH 值,设置不同的 pH 值,取 100 mL 装入 500 mL 的三角瓶中,灭菌方法同(1),按 12% (体积比)的接种量将培养好的液体菌种接到发酵培养基中,在转速为 160 r/min 的条件下 24 ℃ 振荡培养 3 d。(3)温度处理:按(1)的方法量取液体发酵培养基并灭菌,将液体菌种按 12% (体积比)的接种量接种,设置不同温度,在转速 160 r/min 条件下恒温培养 3 d。(4)转速的处理:按(1)的方法量取液体发酵培养基并灭菌,将液体菌种按 12% (体积比)的接种量接种,设置不同转速(r/min)进行培养,24 ℃ 恒温培养 3 d。

1.2.5 香菇液态发酵工艺的优化设计 选择接种量、接种温度、转速 3 个因素对生物量和总多糖有显著影响的因素进行响应面试验设计,通过 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析,预测香菇液态发酵最优工艺参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种量对香菇液态发酵的影响

接种量的大小与该菌在发酵液中生长繁殖的速度有关。

收稿日期:2013-07-31

基金项目:江苏省淮安市科技支撑计划(编号:SN12056)。

作者简介:张安宁(1956—),男,江苏淮安人,教授,主要从事发酵微生物应用研究。E-mail:changanning@163.com。

接种量大,种子进入发酵液后适应快,可以缩短发酵繁殖至高峰所需时间,种子液中含有大量的水解酶,使产物合成速度加快。大接种量往往使菌种生长过快,造成营养基质缺乏或溶解氧不足而不利于发酵;接种量不足,则会引起发酵前期菌丝量少、菌体生长缓慢,使发酵周期延长,还可能产生菌丝团,导致发酵异常等。不同的接种量(3%~24%)对香菇液态发酵培养的生物量及粗多糖产量的综合影响结果见图1。结果表明,在接种量3%~12%范围内,香菇生物量与总粗多糖产量均随着接种量的增加而增加,增长趋势显著,而在接种量大于12%以后,生物量及粗多糖产量增幅不大,在产物不增加情况下增加接种量意味着增加发酵成本,因此初步确定香菇液态发酵适宜接种量为12%。

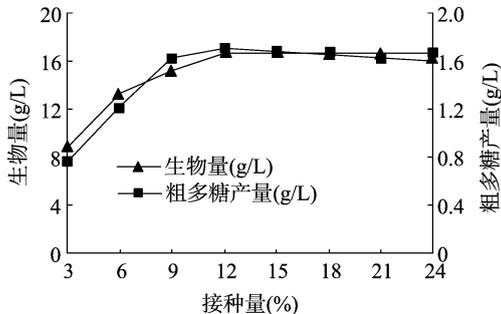


图1 接种量对菌丝体干重和粗多糖产量的影响

## 2.2 初始 pH 值对香菇液态发酵的影响

pH 值的高低直接影响菌丝体的新陈代谢,导致微生物细胞膜的电荷变化,影响代谢过程中酶的活性,从而影响生物量和多糖代谢产物。本试验设计初始发酵液不同的 pH 值 3~7.5 对香菇生物量及粗多糖产量的影响(图2),结果表明,当发酵初始 pH 值为 5.0 时,香菇菌丝体生物量与粗多糖产量均达到最大值,分别为 17.58、1.76 g/L。当 pH 值高于 5.0 时生物量与粗多糖产量下降明显,表明香菇菌丝适宜生长在偏酸性环境,pH 值 5.0 是香菇液态发酵较适 pH 值。

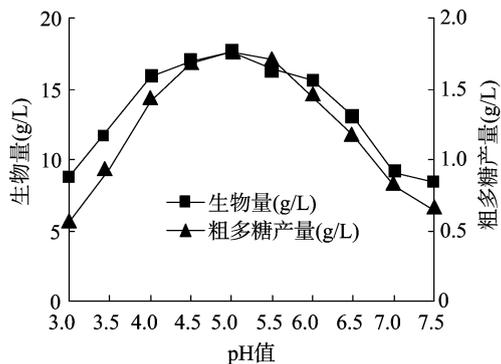


图2 pH值对菌丝体干重和粗多糖产量的影响

## 2.3 发酵温度对香菇液态发酵的影响

试验以不同发酵温度 9~36℃ 进行发酵培养,测定对香菇生物量及粗多糖产量的影响(图3),结果表明,当发酵温度从 9℃ 升至 24℃ 时,香菇生物量与粗多糖产量均随着温度升高而增加,在 24℃ 时粗多糖产量最高,为 1.77 g/L。当发酵温度超过 24℃ 时,粗多糖产量有下降趋势;当发酵温度为 27℃ 时,生物量最高,为 17.57 g/L。温度高于 27℃,生物量开始下降,因温度过高会导致微生物代谢加快,自身物质消耗

过快,生物量、粗多糖产量呈下降趋势;高温发酵生物热增速较快,可促进菌种老化,从而影响生物量增加和粗多糖的生物合成。初步选定香菇菌液体培养适宜发酵温度为 24℃。

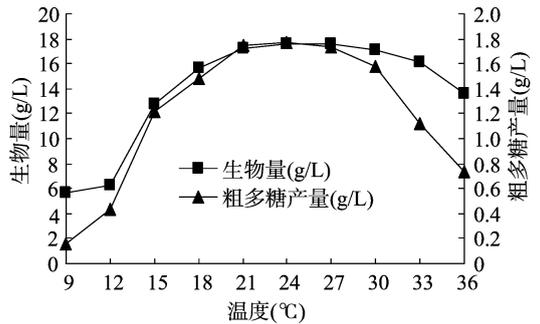


图3 培养温度对菌丝体干重和粗多糖产量的影响

## 2.4 摇床转速对香菇液态发酵的影响

不同转速(120~200 r/min)条件下,液态发酵试验结果(图4)表明,当转速从 120 r/min 升至 160 r/min 时,香菇生物量及香菇粗多糖产量呈上升趋势;当转速达到 160 r/min 时菌丝体生物量和粗多糖产量均达最高,分别为 17.45、1.73 g/L。转速超过 160 r/min 时,菌丝生物量及粗多糖产量略有下降趋势,因增加转速虽然有利于增加溶氧和通气效果,但增加了菌丝球相互间的摩擦和剪切作用,加大对菌丝球的机械刺激,从而影响生物量的增加。初步确定适合香菇菌丝生长的摇床转速为 160 r/min。

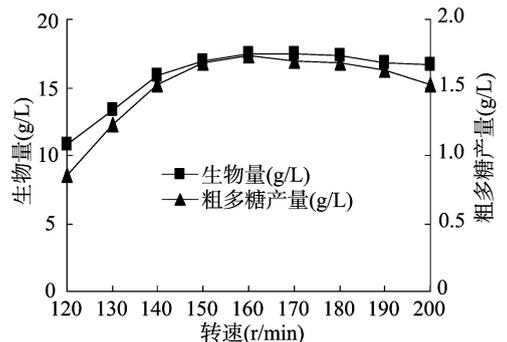


图4 摇床转速对菌丝体干重和粗多糖产量的影响

## 2.5 香菇液体发酵条件响应面法分析

从单因素试验结果看出,香菇粗多糖产量与菌丝生物量变化趋势较为一致,因此优化液态发酵条件时选择菌丝生物量作为量化指标,根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验,选取对生物量影响较大的接种量、pH 值和培养温度 3 个因素作为响应面法的试验因素,分别以 A、B、C 表示,每个因素的低、中、高试验水平分别以 -1、0、1 进行编码,试验因素水平编码如表 1 所示,Box - Behnken 设计方案及试验结果见表 2。

表 1 香菇液体发酵工艺优化设计试验因素水平编码

| 编码值 | 因素       |        |           |
|-----|----------|--------|-----------|
|     | A:接种量(%) | B:pH 值 | C:培养温度(℃) |
| -1  | 9        | 4.5    | 21        |
| 0   | 12       | 5.0    | 24        |
| 1   | 15       | 5.5    | 27        |

表2 香菇液体发酵工艺 Box - Behnken 设计方案与试验结果

| 试验号 | 编码值 |    |    | 真实值     |      |         | 生物量 (g/L) |
|-----|-----|----|----|---------|------|---------|-----------|
|     | A   | B  | C  | 接种量 (%) | pH 值 | 温度 (°C) |           |
| 1   | -1  | -1 | 0  | 9.00    | 4.50 | 24.00   | 17.09     |
| 2   | 1   | -1 | 0  | 15.00   | 4.50 | 24.00   | 17.15     |
| 3   | -1  | 1  | 0  | 9.00    | 5.50 | 24.00   | 16.94     |
| 4   | 1   | 1  | 0  | 15.00   | 5.50 | 24.00   | 17.12     |
| 5   | -1  | 0  | -1 | 9.00    | 5.00 | 21.00   | 17.34     |
| 6   | 1   | 0  | -1 | 15.00   | 5.00 | 21.00   | 17.42     |
| 7   | -1  | 0  | 1  | 9.00    | 5.00 | 27.00   | 17.29     |
| 8   | 1   | 0  | 1  | 15.00   | 5.00 | 27.00   | 17.38     |
| 9   | 0   | -1 | -1 | 12.00   | 4.50 | 21.00   | 17.23     |
| 10  | 0   | 1  | -1 | 12.00   | 5.50 | 21.00   | 17.12     |
| 11  | 0   | -1 | 1  | 12.00   | 4.50 | 27.00   | 17.30     |
| 12  | 0   | 1  | 1  | 12.00   | 5.50 | 27.00   | 17.16     |
| 13  | 0   | 0  | 0  | 12.00   | 5.00 | 24.00   | 17.60     |
| 14  | 0   | 0  | 0  | 12.00   | 5.00 | 24.00   | 17.55     |
| 15  | 0   | 0  | 0  | 12.00   | 5.00 | 24.00   | 17.58     |

利用 Design Expert 软件对表2中的响应值进行多元二次回归拟合分析,确立如下回归方程预测模型:  $Y = 17.58 + 0.051A - 0.054B + 0.0025C + 0.030AB + 0.0025AC - 0.0075BC - 0.17A^2 - 0.33B^2 - 0.046C^2$ 。

对模型回归方程各项进行方差分析,结果见表3。由表3可知,模型较显著( $P = 0.0004$ ),菌丝生物量与所考察自变量之间的线性关系显著,模型确定系数  $R^2 = 0.9860$ ;修正后确定系数  $AdjR^2 = 0.9608$ ,表明该模型能解释96.08%的变化,拟合程度较好;失拟项中  $P > 0.05$ ,影响不显著,表明所选模型适合,可以用该模型来拟合试验;一次项  $A$ 、 $B$  及二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  显著,说明对响应值影响大;在所取的各因素水平范围内,影响结果排序为 pH 值 > 接种量 > 温度。

表3 香菇液体发酵工艺响应面试验回归方程系数显著性检验

| 方差来源  | 平方和      | 自由度 | 均差       | F      | P       | 显著性 |
|-------|----------|-----|----------|--------|---------|-----|
| 模型    | 0.53     | 9   | 0.059    | 39.15  | 0.0004  | **  |
| A     | 0.021    | 1   | 0.021    | 14.02  | 0.0134  | *   |
| B     | 0.023    | 1   | 0.023    | 15.43  | 0.0111  | *   |
| C     | 0.00005  | 1   | 0.00005  | 0.033  | 0.8622  |     |
| AB    | 0.0036   | 1   | 0.0036   | 2.40   | 0.1818  |     |
| AC    | 0.000025 | 1   | 0.000025 | 0.017  | 0.9023  |     |
| BC    | 0.000225 | 1   | 0.000225 | 0.15   | 0.7143  |     |
| $A^2$ | 0.11     | 1   | 0.11     | 74.04  | <0.0001 | **  |
| $B^2$ | 0.40     | 1   | 0.40     | 265.66 | <0.0001 | **  |
| $C^2$ | 0.007756 | 1   | 0.007756 | 5.18   | 0.0120  | *   |
| 失拟项   | 0.006225 | 3   | 0.002075 | 3.28   | 0.2426  |     |
| 纯误差   | 0.001267 | 2   | 0.000633 |        |         |     |
| 总方差   | 0.54     | 14  |          |        |         |     |

注:确定系数  $R^2 = 0.9860$ ,修正后确定系数  $AdjR^2 = 0.9608$ ;

\* 为  $P < 0.05$ , \*\* 为  $P < 0.005$ 。

为研究影响因素间的曲面效应,利用 Design Expert 软件对表2数据进行多元二次回归拟合,所得到的二次回归方程的等高线及响应曲面见图5至图7。结果表明,在所选因素水平范围内,均有最大响应值出现。

图5结果表明,接种量和 pH 值对生物量的影响,响应面图可以看出接种量曲面和 pH 值曲面变化幅度均较明显,说

明接种量和 pH 值对生物量的影响较为显著,与二次回归拟合方差分析结果一致,响应面的最高点同时也是等高线中的最小图形的中心点。从等高线图可以看出,图形接近圆形,说明 pH 值和接种量交互作用不显著。

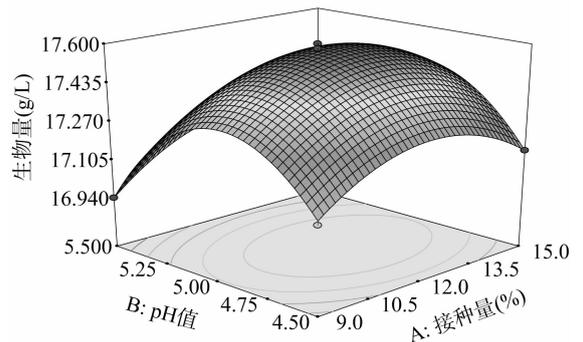
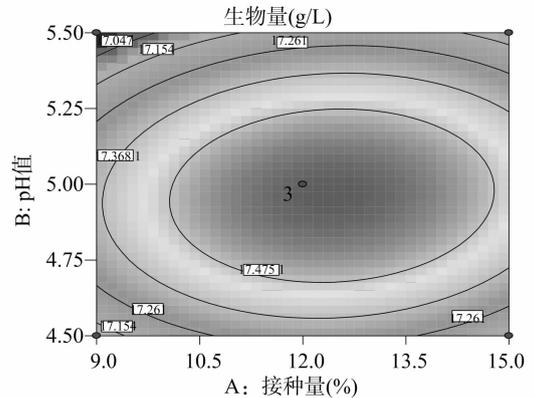


图5 接种量和pH值交互影响香菇菌丝生物量的等高线(上)及响应面(下)

图6结果表明,培养温度和 pH 值对生物量的影响,可以看出培养温度曲面变化幅度不大,pH 值曲面变化幅度较大,说明 pH 值对生物量的影响较为显著,当 pH 值和培养温度较低或较高时,都会降低香菇菌丝的生物量。从等高线图可以看出,培养温度和 pH 值交互作用相对显著。响应面的最高点同时也是等高线中的最小椭圆的中心点。

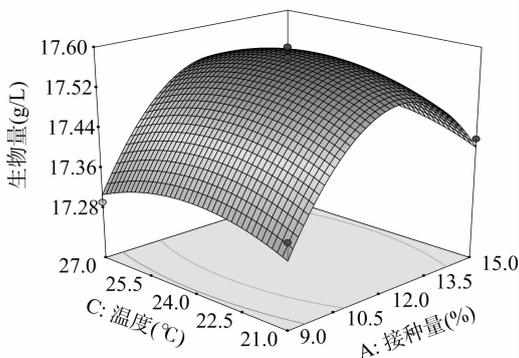
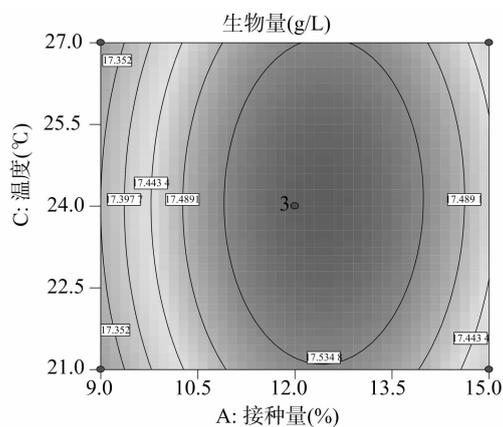


图6 培养温度和pH值交互影响香菇菌丝生物量的等高线(上)及响应面(下)

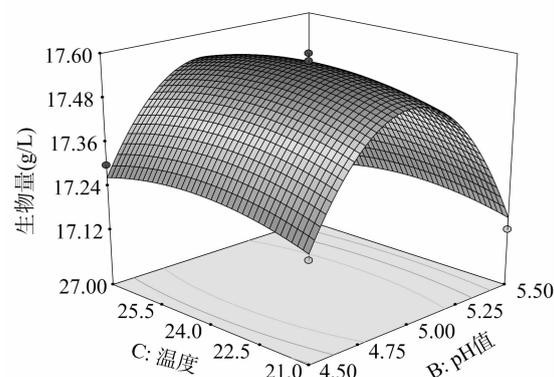
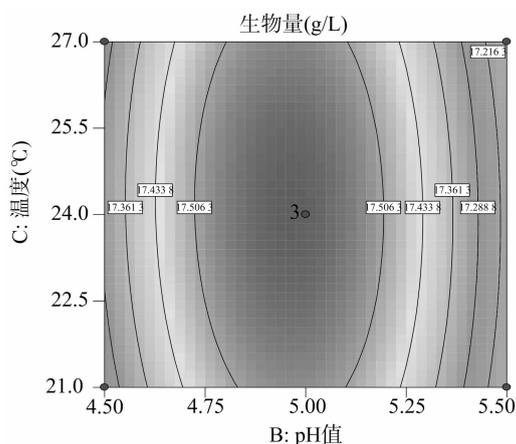


图7 接种量和培养温度交互影响香菇菌丝生物量的等高线(上)及响应面(下)

接种量和培养温度对菌丝生物量的影响见图7。从图7可见,培养温度曲面变化幅度不大,接种量曲面变化幅度较大,说明接种量对生物量的影响较为显著,对同一等高线椭圆曲线分析,接种量变化很小区域需要培养温度较大区域的变化,培养温度和接种量对菌丝生物量的交互影响相对显著。

### 2.6 最佳培养条件的预测和试验验证

根据 Design Expert 建立的数学模型进行参数的最优化分析,得出香菇液态发酵的优化条件为接种量 12.42%、pH 值 4.96、发酵温度 24.11 °C。在此条件下,香菇生物量理论上可达 17.58 g/L。为验证该法的可行性,采用上述优化发酵条件进行香菇液态发酵试验,为方便试验操作,将上述优化发酵温度调整为 24 °C,在单因素试验测得的最适转速 160 r/min 条件下,按照优化条件做 3 组平行试验,测得香菇菌丝生物量实际平均值为 17.76 g/L,试验结果与模型预测相差 1.02%。

## 3 讨论与结论

以菌丝生物量和粗多糖产量为量化指标,对香菇液态发酵的接种量、培养温度、pH 值、转速进行单因素试验,在此基础上通过响应面优化发酵试验,建立了接种量、pH 值、培养温度 3 个因素和响应值菌体生物量之间的数学模型,研究用响应面法确定香菇液态发酵条件的可行性。结果表明,建立的模型的回归效果显著,能很好地预测菌丝体的生物量。确定优化发酵条件接种量为 12.42%、pH 值为 4.96、发酵温度为 24.11 °C,按照此优化条件实测菌丝体生物量为 17.76 g/L,与理论值相差 1.02%。表明采用响应面法对试验数据进行

回归分析和条件优化能很好地预测香菇液态发酵条件,具有一定的可行性和实用价值。

### 参考文献:

- [1] 常明昌. 食用菌栽培[M]. 北京:中国农业出版社,2009:86-87.
- [2] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:3-16.
- [3] Kodama, N. Murata, Y. Asakawa, A. Maitake D-fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by milomycin-C in tumor-bearing mice[J]. Nutrition, 2005, 21, 624-629.
- [4] 盛剑秋, 杨淑英, 段芳龄. 香菇多糖的免疫调节作用研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 1998(1): 92-97.
- [5] 邵辰光, 王宇萍, 赵立勋. 香菇菌富硒液体发酵条件的优选试验[J]. 中国医药导报, 2008, 5(26): 23-24.
- [6] 吴定, 刘常金. 香菇液态深层发酵工艺研究[J]. 食品科学, 1996, (6): 46-47.
- [7] 袁彤光, 凌德全, 林汝湘. 香菇液体种深层发酵工艺及菌液接蔗渣料栽培试验[J]. 中国食用菌, 2004, 14(2): 41-43.
- [8] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社, 2002:135-142.
- [9] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报:自然科学版, 2005, 14(3): 236-239.
- [10] 张佳. 香菇多糖提取与纯化新工艺[D]. 北京:北京化工大学, 2007:27-30.
- [11] 蒋家新, 黄光荣. 香菇多糖提取工艺的研究[J]. 粮油食品科技, 2003(3): 15-17.