

# 响应面法优化凤丹内生真菌发酵工艺探究

张培良, 许凤清, 王国凯, 王刚, 马宗慧, 刘海涛, 韩婧, 吴娟, 吴培云

(安徽中医药大学药学院现代中药安徽省工程技术研究中心, 安徽, 合肥 230012)

**摘要:**目的 研究响应面法优化一株凤丹优势内生真菌发酵工艺。方法 在单因素试验结果的基础上, 运用响应面法设计, 对凤丹优势内生真菌发酵工艺进行优化。结果 最优发酵工艺为蔗糖含量  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母浸膏含量  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在该条件下, 发酵所得的菌丝体实际生物量为  $1.647 \text{ g}$ 。结论 实验所得数据的多元回归模型与实际情况较好拟合, 表明该优化工艺稳定可靠, 通过响应面法最终获得了凤丹内生真菌最优发酵工艺。

**关键词:** 响应面法; 凤丹; 内生真菌; 发酵工艺

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2018.12.011

## Optimizing the fermentation process of dominant endophytic fungus isolated from *Paeonia ostii* by response surface method

ZHANG Peiliang, XU Fengqing, WANG Guokai, WANG Gang, MA Zonghui, LIU Haitao, HAN Jing, WU Juan, WU Peiyun

(Pharmacy School, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Engineering Research Center of Modernized Chinese Material, Heifei, Anhui 230012, China)

**Abstract: Objective** Optimizing the fermentation process of one dominant endophytic fungus that separated from *Paeonia ostii* by response surface method. **Methods** On the basis of single factor experiment results, optimizing the fermentation process of dominant endophytic fungus separated from *Paeonia ostii* through using the response surface method design. **Results** Sucrose content  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , yeast extract content  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  content  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  content  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  is the best fermentation process. And the actual biomass of mycelium from fermentation is  $1.647 \text{ g}$  at that condition. **Conclusion** The regression model of the data obtained from the experiment can better fitting with actual situation, and the optimized process is stable and reliable, and the best process for the fermentation of strain *Fusarium oxysporum* from *Paeonia ostii* was described through the response surface method in this study.

**Key words:** Response surface method; *Paeonia ostii*; Endophytic fungus; Fermentation process

丹皮始载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>, 作为安徽省四大道地药材之一, 其道地产区主要分布于安徽铜陵、南陵等地。《中药大辞典》明文记载: “安徽省铜陵凤凰山所产丹皮质量最佳”, 故道地产区出产的丹皮又称为凤丹皮, 其原植物又称为凤丹 (*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang)。丹皮具有抗菌、抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、降血糖、抗凝血、抗心律失常、抗高血压、增强免疫功能、抗脑缺血再灌注性损伤、镇静、保肝<sup>[2-14]</sup>等作用。

近年来植物内生真菌已成为国内外研究的热点领域, 且对凤丹内生真菌的研究较少<sup>[15]</sup>。鉴于内生真菌与宿主植物之间特殊的生物学关系, 且内生真菌能够产生与宿主植物相同或相似的活性成分, 开展对植物中优势内生真菌的研究极具意义。前

期的研究确定凤丹根皮中内生真菌优势种群为 *Fusarium*<sup>[16]</sup>。本研究 2017 年 8—11 月采用响应面分析法对凤丹一株优势内生真菌 *Fusarium oxysporum* 的发酵条件进行优化, 为其进一步研究提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** *Fusarium oxysporum* 菌株分离于新鲜的凤丹根皮, 并交由上海生工生物工程有限公司进行分子鉴定, 经过基因测序对比后鉴定为 *Fusarium oxysporum* (GenBank: KT271765.1), 保存于安徽中医药大学天然药化教研室。

十万分之一电子天平 (赛多利斯仪器系统有限公司); SPT-P250C 智能生化培养箱 (合肥华德利科学器材有限公司); QHZ-98A 型全温振荡培养箱 (常州普天仪器制造有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌丝体的制备** 将保存于斜面试管中的真菌 *F. oxysporum* 转接于活化培养基中,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养 5 d, 沿菌落边缘用打孔器打取 6 mm 菌片, 备用。

基金项目: 安徽省高校自然科学基金重点项目 (KJ2017A294)

通信作者: 吴培云, 女, 副教授, 研究方向为药物分析, E-mail: peiyun-

wu@sina.com

称取一定量的马铃薯葡萄糖肉汤培养基粉末,加一定比例的水混合均匀,倒入 250 mL 锥形瓶中,每个锥形瓶中 100 mL 液体培养基,然后不同的锥形瓶中再分别加入不同含量的蔗糖、酵母浸出膏、 $\text{KH}_2\text{PO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_3$ ,灭菌 20 min,待冷却后,将上述打孔的菌片用镊子挑取 2~3 片放入液体培养基中,平板摇床  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  培养发酵 7 d 后,抽滤,得到菌丝体。

**1.2.2 菌丝体生物量的测定** 菌体生长过程中发生代谢,产生次生代谢产物,菌体的生长可促进次生代谢产物含量的增加。将培养 7 d 的发酵培养基抽滤,分离出菌丝体,于  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  真空干燥箱中烘干至恒重,记录其重量。

**1.2.3 响应面分析法实验设计** (1) 单因素实验设计:分别以蔗糖、酵母浸出膏、 $\text{KH}_2\text{PO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_3$  加入量为考察指标进行单因素实验设计。(2) Box-Behnken 实验设计:以单因素实验及相关参考文献为依据来设定 Box-Behnken 实验设计中各因素的水平,以菌丝体生物量为响应值,对影响菌丝体生物量的 4 个因素进行优化,同时,根据单因素实验得出响应面中心水平(0)本应为蔗糖( $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、酵母浸出膏( $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_3$ ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),但此时发现若按照此中心水平作响应面设计,则“蔗糖”因素的“1”水平为空,“ $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ”和“ $\text{K}_2\text{HPO}_3$ ”两个因素的“-1”水平为空,因此,为了完成完整的响应面设计,从实际角度出发,最终 RSM 实验设计因子水平见表 1。并使用 Design-Expert 8.05b 对数据进行处理分析。

表 1 响应面分析因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
蔗糖	10	20	30
酵母浸出膏	2	4	6
$\text{KH}_2\text{PO}_3$	1	2	3
$\text{K}_2\text{HPO}_3$	1	2	3

## 2 结果

**2.1 单因素实验** 实验结果见图 1,由结果可知,综合考虑,四个因素的最优值分别确定为 30、4、1、1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 Box-Behnken 实验设计

**2.2.1 实验结果和分析** 采用 RSM 实验设计对菌株的发酵条件进行优化,试验因素包括蔗糖、酵母浸出膏、 $\text{KH}_2\text{PO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_3$  4 个因素,并以单因素实验结果为中心水平,进行四因素三水平的响应面优化实验,确定最佳发酵条件。使用 Design expert

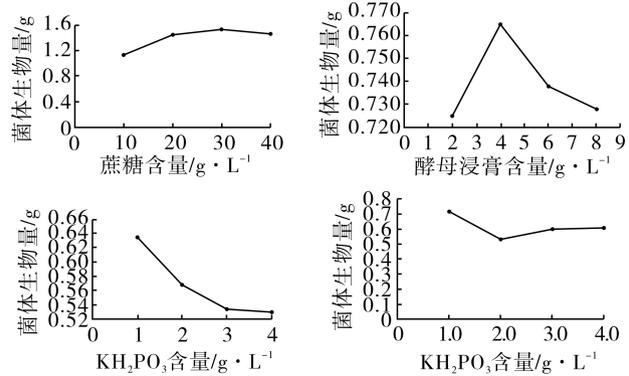


图 1 4 种因素对菌丝体生物量影响的趋势图

8.05b 统计软件对实验所得数据进行多元回归拟合,得到菌丝体生物量对 A、B、C、D 四因素的二次多项式回归方程:

$$\begin{aligned} \text{菌丝体生物量} = & 1.54 + 0.097A + 0.003746B - \\ & 0.049C - 0.040D - 0.056AB + 0.021AC + 0.028AD - \\ & 0.022BC - 0.020BD - 0.002152CD - 0.25A^2 - \\ & 0.037B^2 - 0.0009988C^2 + 0.016D^2 \end{aligned}$$

对上述模型进行方差分析发现,一次项中的蔗糖(A)、 $\text{KH}_2\text{PO}_3$ (C)对响应值菌丝体生物量的影响极显著( $P < 0.001$ );二次项中酵母浸膏( $B^2$ )对菌丝体生物量的影响较显著( $P = 0.0464$ );交互项中蔗糖和酵母浸膏(AB)交互效应对菌丝体生物量的影响显著( $P = 0.0048$ );失拟项  $P = 0.9018$ ,不显著;回归方程的显著性检测显示极显著( $P < 0.0001$ ),校正确定系数  $R^2 = 0.9771$ ,表明上述模型的拟合程度较高, $R^2_{\text{adj}} = 0.9543$ 说明上述方程能较好的反映 A、B、C、D 四个因素与菌丝体生物量的关系,CV = 2.33% 表示总变异中只有 2.33% 不能运用此方程进行解释,因此,该模型可被用来对影响菌丝体生物量的最佳条件筛选试验进行预测,见表 2,3。

**2.2.2 响应面图与等高线图分析** 图 2A 说明蔗糖含量和酵母浸膏含量之间的交互作用显著;当蔗糖含量较小,菌丝体生物量随酵母浸膏含量的增大表现为上升,当蔗糖含量达到一定值,菌丝体生物量随着酵母浸膏含量的增大表现为先上升后下降;当酵母浸膏含量不变,菌丝体生物量随着蔗糖含量的增大表现为先上升后下降。图 2B 说明蔗糖含量和  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  含量之间的交互作用不显著;当蔗糖含量不变,菌丝体生物量随着  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  含量的增大而下降;当  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  含量不变,菌丝体生物量随着蔗糖含量的增大表现为先上升后下降。图 2C 说明蔗糖含量和  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  含量之间交互作用显著; $\text{K}_2\text{HPO}_3$  含量较小时,菌丝体生物量随着蔗糖含量的增大变

表 2 响应面实验设计结果

编号	A: 蔗糖	B: 酵母浸膏	C: KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	D: K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	菌丝体生 物量
1	0.000	1.000	0.000	-1.000	1.600
2	1.000	0.000	-1.000	0.000	1.402
3	-1.000	0.000	1.000	0.000	1.143
4	0.000	1.000	-1.000	0.000	1.569
5	1.000	0.000	1.000	0.000	1.333
6	0.000	-1.000	-1.000	0.000	1.511
7	0.000	-1.000	0.000	1.000	1.505
8	-1.000	1.000	0.000	0.000	1.187
9	1.000	-1.000	0.000	0.000	1.413
10	1.000	0.000	0.000	1.000	1.377
11	0.000	1.000	1.000	0.000	1.450
12	0.000	0.000	1.000	-1.000	1.588
13	0.000	0.000	0.000	0.000	1.565
14	0.000	0.000	0.000	-1.000	1.570
15	-1.000	0.000	-1.000	0.000	1.298
16	-1.000	-1.000	0.000	0.000	1.065
17	0.000	-1.000	1.000	0.000	1.501
18	0.000	1.000	-1.000	0.000	1.569
19	-1.000	0.000	0.000	1.000	1.120
20	1.000	1.000	0.000	0.000	1.312
21	0.000	0.000	-1.000	-1.000	1.637
22	1.000	0.000	0.000	-1.000	1.443
23	-1.000	0.000	0.000	-1.000	1.297
24	0.000	1.000	0.000	1.000	1.479
25	0.000	-1.000	0.000	0.000	1.500
26	0.000	0.000	1.000	1.000	1.461
27	0.000	0.000	-1.000	1.000	1.591
28	0.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.572
29	0.000	0.000	1.000	-1.000	1.488

表 3 回归模型方差分析

Source	SS 值	df	MS 值	F 值	P 值
Model	0.670	14	0.048	42.730	<0.000 1
A	0.110	1	0.110	102.470	<0.000 1
B	1.847 × 10 <sup>-4</sup>	1	1.847 × 10 <sup>-4</sup>	0.170	0.690 0
C	0.034	1	0.034	30.380	<0.000 1
D	0.022	1	0.022	19.560	0.000 6
AB	0.012	1	0.012	11.170	0.004 8
AC	1.849 × 10 <sup>-3</sup>	1	1.849 × 10 <sup>-3</sup>	1.660	0.218 4
AD	3.080 × 10 <sup>-3</sup>	1	3.080 × 10 <sup>-3</sup>	2.770	0.118 5
BC	2.534 × 10 <sup>-3</sup>	1	2.534 × 10 <sup>-3</sup>	2.280	0.153 6
BD	1.332 × 10 <sup>-3</sup>	1	1.332 × 10 <sup>-3</sup>	1.200	0.292 5
CD	2.437 × 10 <sup>-5</sup>	1	2.437 × 10 <sup>-5</sup>	0.022	0.884 5
A <sup>2</sup>	0.250	1	0.250	226.680	<0.000 1
B <sup>2</sup>	5.317 × 10 <sup>-3</sup>	1	5.317 × 10 <sup>-3</sup>	4.780	0.046 4
C <sup>2</sup>	4.410 × 10 <sup>-6</sup>	1	4.410 × 10 <sup>-6</sup>	0.004	0.950 7
D <sup>2</sup>	9.824 × 10 <sup>-4</sup>	1	9.824 × 10 <sup>-4</sup>	0.880	0.363 5
Residual	0.016	14	1.113 × 10 <sup>-3</sup>		
Lack of Fit	0.011	12	8.822 × 10 <sup>-4</sup>	0.350	0.901 8
Pure Error	5.000 × 10 <sup>-3</sup>	2	2.500 × 10 <sup>-3</sup>		
Cor Total	0.680	28			

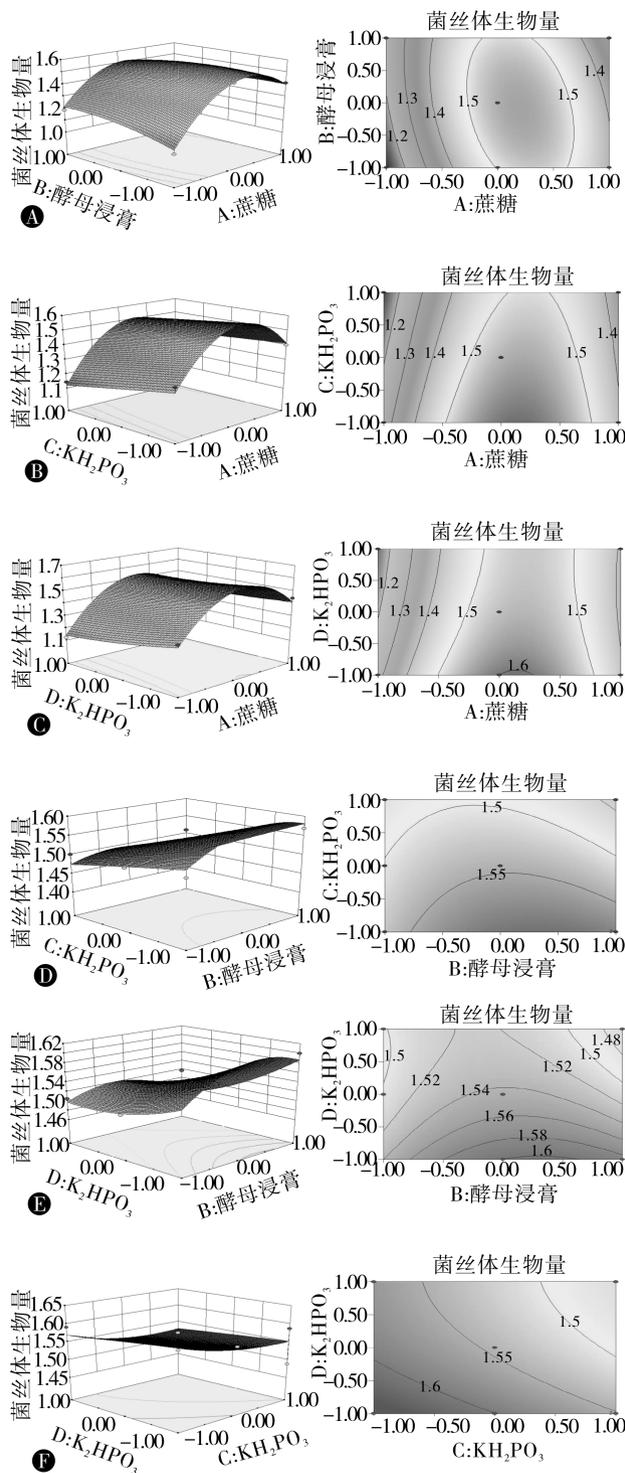


图 2 各交互作用对菌丝体生物量影响的响应曲面

为先上升后下降;K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 含量一定时,菌丝体生物量随着蔗糖的增大表现为上升趋势,当蔗糖含量达到一定时,菌丝体生物量随着蔗糖含量的增大趋于平缓。图 2D 说明酵母浸膏含量和 KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 含量之间交互作用不显著;酵母浸膏含量一定时,菌丝体生物量随着 KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 含量的增大而上升;KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 含量一定时,菌丝体生物量随着酵母浸膏含量的增加

趋于平缓。图 2E 说明酵母浸膏含量和  $K_2HPO_3$  含量之间交互作用显著;酵母浸膏含量一定时,菌丝体生物量随着  $K_2HPO_3$  含量的增大而下降; $K_2HPO_3$  含量一定时,菌丝体生物量随着酵母浸膏含量的增大表现为先上升后下降。图 2F 说明  $KH_2PO_3$  含量和  $K_2HPO_3$  含量之间交互作用不显著; $KH_2PO_3$  含量一定时,菌丝体生物量随着  $K_2HPO_3$  含量的增大而下降; $K_2HPO_3$  含量一定时,菌丝体生物量随着  $KH_2PO_3$  含量的增大而下降。

**2.2.3 验证性试验** 使用 Design Expert 8.05b 对回归方程进行求解,得出最优发酵工艺为:蔗糖含量  $20.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母浸膏含量  $5.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $KH_2PO_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_2HPO_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 菌丝体生物量预测值为  $1.66079 \text{ g}$ 。考虑实际情况,确定最优发酵工艺为:蔗糖含量  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母浸膏含量  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $KH_2PO_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_2HPO_3$  含量  $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

按照上述工艺,平行发酵 3 瓶发酵液,测定实际平均菌丝体生物量为  $1.647 \text{ g}$ ,与预测值之间偏差较小,表明此回归模型能与实际情况较好拟合。

### 3 讨论

微生物的发酵是一个非结构化、曲线的复杂过程,在发酵工业中,发酵培养基的优化对发酵水平的提高起着举足轻重的作用<sup>[17]</sup>。响应面法试验设计,克服了正交设计只能处理离散的水平值,而无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷,并能减少试验次数,分析几种因素间的交互作用,以达到较全面地反映各因素水平的效果<sup>[18-20]</sup>。为了获得最佳的发酵条件本实验采用响应面法,将因素与结果的关系进行多项式拟合,优选出最佳促菌丝体生物量的发酵工艺。首先采用单因素试验确定因素水平,进一步应用响应面分析法考察因素对菌丝体生物量的影响,采用二次回归设计菌丝体生物量回归模型,验证试验表明了该模型的可靠性。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部) [S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:172.
- [2] VASILIKI PAPANDEOU, PROKOPIOS MAGIATIS, IOANNA CHINO, et al. Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia* taxa [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 81 (1): 101-104.
- [3] CHEN BD, NING ML, YANG GS. Effect of Paeonol on Antioxidant

and Immune Regulatory Activity in Hepatocellular Carcinoma Rats [J]. *Molecules*, 2012, 17 (4): 4672-4683.

- [4] YU-TING TSENG YT, YA-YUN HSU, YU-TZU SHIH, et al. Paeonol attenuates microglia-mediated inflammation and oxidative stress-induced neurotoxicity in rat primary microglia and cortical neurons [J]. *Shock*, 2012, 37 (3): 312-318.
- [5] 戴敏, 訾晓梅, 彭代银, 等. 丹皮酚抗鹌鹑实验性动脉粥样硬化作用 [J]. *中国中药杂志*, 1999, 24 (8): 488-490.
- [6] OU YT, LI QW, WANG JJ, et al. Antitumor and Apoptosis Induction Effects of Paeonol on Mice Bearing EMT6 Breast Carcinoma [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2014, 22 (4): 341-346.
- [7] LIU JP, WANG SY, FENG L, et al. Hypoglycemic and Antioxidant Activities of Paeonol and Its Beneficial Effect on Diabetic Encephalopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats [J]. *J Med Food*, 2013, 16 (7): 577 - 586.
- [8] PIN-KUEI FU, CHIEH-LIANG WU, TUNG-HU TSAI, et al. Anti-Inflammatory and Anticoagulative Effects of Paeonol on LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012 (6): 837513.
- [9] 张金花, 熊永爱. 丹皮酚对大鼠缺血性心律失常及其心肌细胞 miRNA-1 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (5): 129-132.
- [10] 张金艳, 赵乐, 李贻奎, 等. 丹皮酚对自发性高血压大鼠动脉血压和血流量的影响及其与血管舒缩相关的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (24): 4903-4907.
- [11] 王建杰, 董航, 罗文哲, 等. 丹皮酚对 EMT6 乳腺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. *实验研究*, 2013, 10 (27): 17-19.
- [12] 杨青, 武继彪, 张岫美. 丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症细胞因子的作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2010, 31 (2): 111-113.
- [13] 刘爱敏, 武海军, 杨玉梅. 丹皮酚的镇痛作用 [J]. *包头医学院学报*, 2004, 20(2): 99-100.
- [14] WU J, XUE X, ZHANG B, et al. The protective effects of paeonol against epirubicin-induced hepatotoxicity in 4T1-tumor bearing mice via inhibition of the PI3K/ Akt/NF-kB pathway [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 244: 1-8.
- [15] 郑艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 等. 凤丹内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (1): 45-50.
- [16] 张培良, 王国凯, 郁阳, 等. 不同生长时期凤丹内生真菌的分离鉴定及其多样性研究 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35 (5): 78-82.
- [17] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37 (6): 894-903.
- [18] 俞娟, 刘劲松, 王刚, 等. 响应面法优化马兰多糖提取工艺研究 [J]. *中成药*, 2015, 37 (1): 222-225.
- [19] 赵强, 余四九, 王廷璞, 等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究 [J]. *草业学报*, 2012, 21 (4): 206-214.
- [20] 林建原, 季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13 (2): 83-90.

(收稿日期:2018-04-31, 修回日期:2018-06-08)