

Plackett-Burman 设计在灵芝生长及产胞外多糖主要影响因子筛选中的应用

陈志杰, 韩永斌, 沈 昌, 陈德明, 顾振新 *

(南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 本文采用 Plackett-Burman 试验设计, 选取葡萄糖、蔗糖、玉米浆干粉、蛋白胨、黄豆芽汁、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 MgSO_4 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 、谷氨酸钠 11 个对灵芝生长及产胞外多糖相关因子进行筛选。统计分析表明: 蔗糖($p=0.0119$)、磷酸二氢钾($p=0.0111$)和硫酸锌($p=0.0024$)对灵芝菌丝生长具有显著影响; 蔗糖($p=0.0165$)、磷酸二氢钾($p=0.0103$)和硫酸锌($p=0.0019$)对灵芝产胞外多糖具有显著影响。

关键词: Plackett-Burman 设计; 灵芝; 多糖; 深层发酵

Application of Plackett-Burman Design for Determining Key Factors on Mycelium Growth and Extracellular Polysaccharides Excretion of *Ganoderma lucidum*

CHEN Zhi-jie, HAN Yong-bin, SHEN Chang, CHEN De-ming, GU Zhen-xin *

(Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The Plackett-Burman design was applied to screen out the key factors from the following eleven components, namely, glucose, sucrose, corn syrup powder, peptone, soybean bud juice, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, VB_1 and sodium glutamate, which would affect the mycelium growth and extracellular polysaccharides excretion of *Ganoderma lucidum*. With JMP software (version 4.0.5, SAS Institute Inc, USA) statistical analysis was performed. It was found that sucrose ($p=0.0119$), KH_2PO_4 ($p=0.0111$) and ZnSO_4 ($p=0.0024$) were significant factors for mycelium growth; sucrose ($p=0.0165$), KH_2PO_4 ($p=0.0103$) and ZnSO_4 ($p=0.0019$) were significant factors for extracellular polysaccharides excretion of *Ganoderma lucidum*.

Key words: Plackett-Burman design; *Ganoderma lucidum*; polysaccharide; submerged fermentation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0115-03

灵芝(*Ganoderma lucidum*)为担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌,是我国名贵药用真菌,具有抗肿瘤、降低血液中胆固醇含量、抗炎症等药效^[1]。灵芝多糖是灵芝中具有重要生理功能的活性物质。灵芝液体发酵产胞外多糖的研究虽然已有一些报道,但试验中多采用单因子试验。当考察的因子较多时,就需要较多的试验且较长的周期,同时当因子间存在交互作用时会导致不可靠的结论。全因子试验虽然可以对因子交互作用进行考察,但需要大量的试验。11个二水平变量的全因子设计需要2048次试验,而Plackett-Burman(PB)试验设计是一种经济而有效的二水平试验设计方法,11个二水平变量的PB设计仅需要12次试验就可以达到良好的效果,且因子的交互作用仅部分的与主

因子发生混淆^[2]。PB试验设计目前已应用于生物工艺优化研究中,如杯伞菌产胞外多糖主要因子的筛选^[3]、产 α -葡萄糖苷酶抑制剂的主要因子的筛选^[4]、乳酸生产^[5]、脂肪酶催化 α -松油醇的酯化^[6]等研究。本试验用PB试验设计筛选出影响灵芝生长及产多糖的主要影响因子。选取葡萄糖、蔗糖、玉米浆干粉、蛋白胨、黄豆芽汁、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 MgSO_4 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 和谷氨酸钠11个对灵芝生长及产胞外多糖相关因子进行设计,旨在筛选出对灵芝生长及产多糖影响显著的因子,为其培养基的优化提供实践指导。

1 材料与方法

收稿日期: 2004-12-29

*通讯作者

作者简介: 陈志杰(1980-),男,硕士研究生,研究方向为农产品贮藏与加工。

1.1 菌种

灵芝(*Ganoderma lucidum*)品种为韩国灵芝,购自江苏省农业科学院食用菌研究所。

1.2 主要仪器设备

DZ-900 往复式摇床 江苏太仓市实验设备厂;手提式压力蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂;TDL-40B 离心机 上海安亭科学仪器厂;DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;2003型恒温磁力搅拌器 常州国华电器有限公司;FA/JA型电子天平 上海精密科学仪器有限公司;WFZ800-D3B 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司。

1.3 培养基

1.3.1 平皿培养基 采用 PDA 培养基。

1.3.2 种子培养基 葡萄糖 2%、玉米浆干粉 0.3%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.05%、pH 自然。

1.3.3 发酵培养基 按 Plackett-Burman 设计表进行,因子水平设计见表 1,运用 JMP 软件(version 4.0.5, SAS Institute Inc, USA)进行统计分析。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平范围

Table 1 Range of different factors investigated with Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	+1
A (g/L) 葡萄糖	5	20
B(g/L) 蔗糖	5	20
C(g/L) 玉米浆干粉	1	4
D(g/L) 蛋白胨	1	4
E(g/L) 黄豆芽汁	0	100
F(g/L) 磷酸二氢钾	0.5	2.0
G(g/L) 磷酸氢二钠	0.5	2.0
H(g/L) 硫酸镁	0.1	1.0
I (g/L) 硫酸锌	0.1	1.0
J (g/L) 谷氨酸钠	0.5	2.0
K(g/L) 维生素B ₁	0.01	0.05

1.4 培养条件

1.4.1 种子培养 用直径1cm的无菌打孔器在培养皿上打孔取样,分别接种2片于含有50ml种子培养液的250ml的摇瓶中,在28℃、100r/min下培养4d。

1.4.2 发酵培养 250ml的摇瓶中加入45ml发酵培养基和5ml种子培养液,在28℃、100r/min下培养5d。

1.5 测定方法

1.5.1 菌丝干重(DCW) 采用重量法,每瓶取灵芝发酵液25ml用离心机在4000r/min下离心20min后,得发酵上清液和湿菌体,湿菌体用蒸馏水洗净,转移至称量瓶中于80℃烘至恒重。

1.5.2 胞外多糖(EPS) 取发酵上清液,沸水浴5min,钝化酶活。取2ml于透析袋(MWCO, 8000~10000Da)中,磁力搅拌透析1d后,4℃透析2d。期间每8h换水一次。透析液移入容量瓶中用蒸馏水定容至25ml,用浓硫酸-苯酚法^[7]测定。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman试验设计处理及响应值

Plackett-Burman试验设计及菌丝干重和胞外多糖的响应值见表2。

2.2 灵芝菌丝生长主要影响因子的筛选

采用 JMP 软件对表2中的菌丝干重数据进行逐步回归分析,得到菌丝干重为响应值的最优回归方程为:

$$Y=8.0433+3.0217B-3.0617F-4.0633I \quad R^2=0.8342,$$

Adj $R^2=0.7721$

以上方程中: $B=(\text{蔗糖}-12.5)/7.5$, $F=(\text{磷酸二氢钾}-1.25)/0.75$, $I=(\text{硫酸锌}-0.55)/0.45$ 。

方差分析(表3)表明,所得回归方程达到极显著($p=0.0017$),失拟性检验不显著($p=0.6209$),说明该回归模型在被研究的整个回归区域拟合的很好。决定系数

表 2 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 2 Plackett-Burman experiment design and response values

Runs	A(g/L)	B(g/L)	C(g/L)	D(g/L)	E(g/L)	F(g/L)	G(g/L)	H(g/L)	I(g/L)	J(g/L)	K(g/L)	DCW(g/L)	EPS(mg/L)
1	20	20	4	4	100	2.0	2	1.0	1.0	2.0	0.05	8.04	237.49
2	5	20	1	4	100	2.0	0.5	0.1	0.1	2.0	0.01	11.34	277.61
3	5	5	4	1	100	2.0	2	0.1	0.1	0.5	0.05	5.84	260.92
4	20	5	1	4	0	2.0	2	1.0	0.1	0.5	0.01	3.50	143.55
5	5	20	1	1	100	0.5	2	1.0	1.0	0.5	0.01	8.14	339.86
6	5	5	4	1	0	2.0	0.5	1.0	1.0	2.0	0.01	1.76	57.49
7	5	5	1	4	0	0.5	2	0.1	1.0	2.0	0.05	1.85	11.35
8	20	5	1	1	100	0.5	0.5	1.0	0.1	2.0	0.05	14.66	558.30
9	20	20	1	1	0	2.0	0.5	0.1	1.0	0.5	0.05	1.57	90.30
10	20	20	4	1	0	0.5	2	0.1	0.1	2.0	0.01	22.96	632.17
11	5	20	4	4	0	0.5	0.5	1.0	0.1	0.5	0.05	16.50	738.48
12	20	5	4	4	100	0.5	0.5	0.1	1.0	0.5	0.01	4.68	96.86

注: 每个处理重复2次, DCW和EPS均为扣除空白培养基后的值。

$R^2=0.8342$, 这表明 83.42% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释。由偏回归系数及显著性检验(表 4)得到影响灵芝菌丝生长主要影响因子为: 蔗糖($p=0.0119$)、磷酸二氢钾($p=0.0111$)和硫酸锌($p=0.0024$)。

表 3 灵芝菌丝干重回归方程方差分析
Table 3 Analysis of variance for the regression equation of *Ganoderma lucidum* DCW

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值
回归	3	420.1794	140.0600	13.4196	0.0017
离回归	8	83.4955	10.4370		
Lack of fit	4	34.9570	8.7392	0.7202	0.6209
Pure error	4	48.5385	12.1346		
总变异	11	503.6749			

表 4 偏回归系数及显著性检验
Table 4 Partial regression coefficients and their significance for the DCW model of *Ganoderma lucidum*

模型项	回归系数	标准误差	t 值	p 值
截距	8.4033	0.9326	9.0100	<0.0001
蔗糖	3.0217	0.9326	3.2400	0.0119
磷酸二氢钾	-3.0617	0.9326	-3.2800	0.0111
硫酸锌	-4.0633	0.9326	-4.3600	0.0024

由表 4 各显著因素的偏回归系数可知, 在 PB 设计的二水平范围内, 蔗糖($\beta=3.0217$)对菌丝生长为正效应, 即随着蔗糖浓度的提高, 灵芝生物量呈增加趋势。磷酸二氢钾($\beta=-3.0617$)和硫酸锌($\beta=-4.0633$)对菌丝生长为负效应, 即随着磷酸二氢钾和硫酸锌浓度的提高, 灵芝生物量呈下降趋势。

2.3 灵芝胞外多糖主要影响因子的筛选

采用 JMP 软件对表 2 中的胞外多糖数据进行逐步回归分析, 得到胞外多糖为响应值的最优回归方程为:

$$Y=287.0317+98.9533B-109.1383F-148.14I$$

$$R^2=0.8358, \text{Adj } R^2=0.7742$$

以上方程中: $B=(\text{蔗糖}-12.5)/7.5$, $F=(\text{磷酸二氢钾}-1.25)/0.75$, $I=(\text{硫酸锌}-0.55)/0.45$ 。

方差分析(表 5)表明, 所得回归方程达到极显著($p=0.0017$), 失拟性检验不显著($p=0.1707$), 说明该回归模型在被研究的整个回归区域拟合的很好。决定系数 $R^2=0.8358$, 这表明 83.58% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释。偏回归系数及显著性检验如表 6 所示。由表 6 得到影响灵芝产胞外多糖主要影响因子为: 蔗糖($p=0.0165$)、磷酸二氢钾($p=0.0103$)和硫酸锌($p=0.0019$)。

由表 6 各显著因素的偏回归系数可以看出, 在 PB 设计的二水平范围内, 蔗糖($\beta=98.9533$)对灵芝产胞外多糖为正效应, 即随着蔗糖浓度的提高, 灵芝产胞外多糖呈增加趋势。磷酸二氢钾($\beta=-109.1383$)和硫酸锌

表 5 灵芝胞外多糖回归方程方差分析

Table 5 Analysis of variance for the regression equation of *Ganoderma lucidum* EPS

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值
回归	3	523780.77	174594.00	13.5748	0.0017
离回归	8	102892.96	12862.00		
Lack of fit	4	75865.76	18966.40	2.8070	0.1707
Pure error	4	27027.19	6756.80		
总变异	11	626673.73			

表 6 偏回归系数及显著性检验

Table 6 Partial regression coefficients and their significance for the EPS model of *Ganoderma lucidum*

模型项	回归系数	标准误差	t 值	p 值
截距	287.0317	32.7384	8.7700	<0.0001
蔗糖	98.9533	32.7384	3.0200	0.0165
磷酸二氢钾	-109.1383	32.7384	-3.3300	0.0103
硫酸锌	-148.1400	32.7384	-4.5200	0.0019

($\beta=-148.1400$)对灵芝产胞外多糖为负效应, 即随着磷酸二氢钾和硫酸锌浓度的提高, 灵芝产胞外多糖呈下降趋势。

3 结 论

通过 Plackett-Burman 试验设计, 从葡萄糖、蔗糖、玉米浆干粉、蛋白胨、黄豆芽汁、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 MgSO_4 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 和谷氨酸钠 11 个相关因子中筛选出了对灵芝菌丝生长及产胞外多糖均具有显著影响的因子为: 蔗糖、磷酸二氢钾和硫酸锌。实践证明, 用 PB 设计进行的灵芝生长及产胞外多糖发酵培养基组成成分筛选是一种经济而有效的试验设计方法。

参考文献:

- [1] 方庆华, 钟建江. 灵芝真菌发酵生产灵芝多糖和灵芝酸[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(3): 254-257.
- [2] Yannis L. Loukas. A Plackett-Burman screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 26: 255-263.
- [3] 王允祥. 杯伞 AS 5.112 胞外多糖发酵、生物活性及结构分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2004.
- [4] 吕凤霞. α -葡萄糖苷酶抑制剂的产生菌筛选、性质及其发酵条件的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2003.
- [5] Payot T, Chemaly Z, Fick M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations [J]. Enzyme Microb Technol, 1999, 24: 191-199.
- [6] Prami la Rao, S Divakar. Lipase catalyzed esterification of

三种致病菌在鲜榨苹果汁中的生存 / 死亡概率预测模型

李 军^{1,2}, 汪政富³, 葛毅强³, 胡小松³

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025; 2. 河北科技师范学院食品工程系, 秦皇岛 066600;
3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 采用三因素五水平中心组合试验设计(CCD), 应用二值变量描述了大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等致病菌在不同温度、pH和水分活度下的生存状况, 通过Logistic回归过程建立了生存概率与生长抑制因子之间关系的数学预测模型, 确定了其在鲜榨苹果汁中生存的限制条件, 同时分析了温度、pH和水分活度在生长临界条件下的协同作用。经过实验验证, 大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的生存概率模型的预测结果与实际测定结果基本一致, 在鲜榨苹果的水分活度下($A_w=0.98$ 左右), 生存概率 $p=0.1$ 时的等值线可以作为细菌生存的临界线, 从而确定鲜榨苹果汁中致病菌的生存临界条件。

关键词: 鲜榨苹果汁; 致病菌; 生存 / 死亡概率预测模型

Surviving Probability Modeling on the Growth/no-growth Interface of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* Henrici in Fresh Apple Juices

LI Jun^{1,2}, WANG Zheng-fu¹, GE Yi-qiang³, HU Xiao-song³

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China 2. Department of Food Engineering, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066000, China 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: By means of three five-level variables for Central Composite Design (CCD), the growth and no growth situations of three strains, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Sarcina aurea* Henrici under different conditions of temperature, pH and water activity (A_w) were studied with two-valued variables. Three mathematical models to predict the relations between the surviving probability and the growth control factors were established with Logistic Regression processing, and with the models the constraint conditions of bacteria survived in fruit juices were determined, and the coordinated effects of pH, A_w and temperature under critical conditions were analyzed. The predicted outcomes with the predicting models agreed with the experimental results for the above mentioned three bacteria. The surviving probability isoline under the conditions of 0.98 A_w with $p=0.1$ could be used as a critical line of the bacteria surviving critical conditions to identify the pathogenic bacteria in the fresh apple juices.

Key words: fresh apple juice; pathogenic bacteria; growth/no-growth probability predictive model

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0118-06

收稿日期: 2004-10-14

基金项目: 国家“十五”重大科技专项(2001BA501A21)

作者简介: 李军(1971-), 男, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工及食品安全。

α -terpineol with various organic acids application of the Plackett-Burman design[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 1125-1128.

[7] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356.