

利用正交旋转组合法优化平菇培养基研究

弓建国

(内蒙古集宁师范学院 生物系, 内蒙古 集宁 012000)

摘 要:利用二次回归正交旋转组合设计,研究了葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐($MgSO_4$, KH_2PO_4)对平菇菌丝的长速、干重的影响。结果表明:葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐4种成分中,对平菇菌丝长速效应为葡萄糖>蛋白胨>无机盐>酵母粉。对平菇菌丝干重效应为葡萄糖>无机盐>蛋白胨>酵母粉,获得菌丝长速>5.91 mm/d,菌丝干重>109.84 mg/总量,用葡萄糖 18.865~19.735 g/L、蛋白胨 1.83225~1.98975 g/L、酵母粉 0.8685~1.6185 g/L、无机盐 2.604~2.7000 g/L。

关键词:菌丝长速;菌丝干重;正交旋转组合设计

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0168-03

为解决平菇产量下降、品质欠佳、转代次数不明、适应性差等菌种退化问题,定期对优良平菇品种进行提纯复壮以保持原品种的优良生育特性十分重要,其中筛选母种培养基是主要的措施之一^[1-2]。因为培养基成分和配比合适与否,对菌种生长发育有很大的影响^[3-4]。为此,采用四因素五水平二次正交旋转组合设计来确定培养平菇母种最佳用量比例。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

平菇菌种由集宁师院微生物实验室分离获得。

1.2 试验设计

采用四因素五水平二次回归正交旋转组合设计方法^[5-6],设葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐($MgSO_4$, KH_2PO_4)4个试验因子,各5个水平,36个处理组合,各因子设计水平见表1。

表1 试验因素及编码值

因素	间距	编码水平				
		2	1	0	-1	-2
葡萄糖 $x_1/g \cdot L^{-1}$	5	25	20	15	10	5
蛋白胨 $x_2/g \cdot L^{-1}$	0.75	3	2.25	1.5	0.75	0
酵母粉 $x_3/g \cdot L^{-1}$	0.75	3	2.25	1.5	0.75	0
$MgSO_4$ KH_2PO_4 $x_4/g \cdot L^{-1}$	1	4	3	2	1	0

1.3 试验方法

基础培养基配方:马铃薯 200 g、琼脂 18 g、水 1 000 mL。培养基配方:将葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、硫酸

镁、磷酸二氢钾原料按表1用量加到基础培养基内。按二次回归正交旋转组合表设计出36个配方,每配方重复8次,每次重复10 mL,装好试管后,高压灭菌30 min之后,将其摆成大小相同的斜面^[7]。

1.4 测定内容

菌丝生长速度:将等量的菌种接入已编号的培养基中,于25℃下恒温培养,每天测菌丝生长速度。菌丝干重:将生长一定时期的供试试管于100℃下加热15 min融化,趁热将其用单层纱布过滤,用热水反复冲洗获得菌丝,将其置于纱布上于80℃烘至恒重称重^[8]。

2 结果与分析

2.1 模型建立

根据表2数据,运用DPS软件进行统计分析^[9],以葡萄糖(X_1)、蛋白胨(X_2)、酵母粉(X_3)、无机盐(X_4)($MgSO_4$, KH_2PO_4)4项为决策变量,分别以菌丝长速和干重为目标函数,建立数学模型如下:

$$Y_{(1)} = 7.17500 + 0.86250X_1 + 0.49583X_2 + 0.21250X_3 + 0.41250X_4 - 0.58021X_1^2 - 0.41771X_2^2 - 0.49271X_3^2 - 0.40521X_4^2 - 0.00625X_1X_2 + 0.06875X_1X_3 - 0.01875X_1X_4 + 0.00625X_2X_3 - 0.00625X_2X_4 - 0.15625X_3X_4; \\ Y_{(2)} = 140.61667 + 25.71208X_1 + 10.43958X_2 + 4.55542X_3 + 13.02542X_4 - 15.42552X_1^2 - 11.66927X_2^2 - 12.02802X_3^2 - 7.03677X_4^2 + 1.23437X_1X_2 - 3.79562X_1X_3 + 0.31062X_1X_4 - 2.74313X_2X_3 - 1.36188X_2X_4 - 2.98187X_3X_4.$$

经方差检验,模型(1) $F_1 = 1.278$, P 值>0.1($P = 0.3035$), $F_2 = 3.085$, P 值<0.05($P = 0.0173$)。模型(2) $F_1 = 1.398$, P 值>0.1($P = 0.2478$), $F_2 = 6.486$, P 值<0.01($P = 0.0004$)。说明各模型与实际值的拟合程度均达到了显著水平,表明未控制因素对试验结果的影响不显

作者简介:弓建国(1954-),男,副教授,现主要从事生物及农艺方面的教学工作。E-mail: gongjianguo8886382@163.com。
基金项目:内蒙古高等学校科研资助项目(Nj09206)。
收稿日期:2009-10-15

著,试验所建立的模型与实测值拟合程度较好,可以用显著性检验,结果见表 3。
模型进行优化分析^[10-12]。并将各模型偏回归系数进行

表 2 四因素二次正交旋转组合设计试验结果及结构矩阵

No	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	菌丝长度/mm·d ⁻¹	菌丝干重/mg	No	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	菌丝长度/mm·d ⁻¹	菌丝干重/mg
1	1	1	1	1	7.8	150.14	19	0	-2	0	0	3.3	53.54
2	1	1	1	-1	7.4	134.85	20	0	2	0	0	5.6	94.64
3	1	1	-1	1	7.7	166.4	21	0	0	-2	0	3.9	68.97
4	1	1	-1	-1	6.3	124.74	22	0	0	2	0	4.4	76.34
5	1	-1	1	1	7.1	137.18	23	0	0	0	-2	3.9	62.14
6	1	-1	1	-1	6.4	115.4	24	0	0	0	2	5.1	123.1
7	1	-1	-1	1	6.6	124.3	25	0	0	0	0	7.9	147.2
8	1	-1	-1	-1	5.5	105.2	26	0	0	0	0	8.2	125.4
9	-1	1	1	1	5.7	98.2	27	0	0	0	0	8.1	164.1
10	-1	1	1	-1	5.2	89.1	28	0	0	0	0	5.7	147.3
11	-1	1	-1	1	5.7	87.1	29	0	0	0	0	5.3	110.8
12	-1	1	-1	-1	4.3	68.7	30	0	0	0	0	6.3	157.6
13	-1	-1	1	1	4.9	91.4	31	0	0	0	0	8.1	167.4
14	-1	-1	1	-1	4	66.08	32	0	0	0	0	8.1	154.3
15	-1	-1	-1	1	4.7	75.68	33	0	0	0	0	7.8	142.3
16	-1	-1	-1	-1	3.6	35.64	34	0	0	0	0	8	139.8
17	-2	0	0	0	2.8	16.37	35	0	0	0	0	6.4	120.5
18	2	0	0	0	4.8	101.76	36	0	0	0	0	6.2	110.7

2.2 主因子分析

2.2.1 培养基成分对菌丝长速的影响 由回归方程显著性检验结果可知,模型(1)X₁ 的系数达极显著,X₂²、X₃²达显著,X₂、X₄、X₂²、X₄²达准显著。可见,在该试验条件下,葡萄糖、蛋白胨、无机盐对菌丝长速均有显著影响。因为二次回归正交旋转设计所得到的回归模型是经无量纲编码线性代换后求得的,所以其偏回归系数已经标准化,偏回归系数的大小可直接反映变量对菌丝长速的影响程度。依据模型(1)一次项所得 b₁>b₂>b₄>b₃,即在该试验条件下,对菌丝长速的影响葡萄糖大于蛋白胨,蛋白胨大于无机盐,而无机盐又大于酵母粉。二次项系数|b₁|>|b₃|>|b₂|>|b₄|,且二次项系数均为负值,表明 4 种培养基成分都具有最佳值,用量过多或不足都会影响菌丝的长速。根据二次回归正交旋转设计原理,对二次回归模型采用“降维法”得出单因子对菌丝长速的效应方程:Y₁=7.17500+0.86250X₁-0.58021X₂²-0.41771X₂²-0.49271X₃²-0.40521X₄²-0.00625X₁X₂+0.06875X₁X₃-0.01875X₁X₄;Y₂=7.17500+0.49583X₂-0.41771X₂²-0.00625X₁X₂+0.00625X₂X₃-0.00625X₂X₄;Y₃=7.17500+0.21250X₃-0.49271X₃²+0.06875X₁X₃+0.00625X₂X₃-0.15625X₃X₄;Y₄=7.17500+0.41250X₄-0.40521X₄²-0.01875X₁X₄-0.00625X₂X₄-0.15625X₃X₄。按模型作图,由图 1 可知,菌丝长速在-2<X<2 时,随葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐用量的增加而呈抛物线增加,即葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐用量达最高长速对应值时,超量后长速反而下降,但葡萄糖在 0 编码前,长速基本呈直线增加,0 编码后渐进增加,达到 1 编码后呈下降趋势,表明

表 3 回归系数显著性检验结果

系数	P-值 (菌丝长速)	P-值	系数	P-值 (菌丝长速)	P-值 (菌丝干重)
X ₁	0.0016	0.0001	X ₁ X ₂	0.9831	0.8202
X ₂	0.0498	0.0266	X ₁ X ₃	0.8159	0.4869
X ₃	0.3823	0.31	X ₁ X ₄	0.9494	0.9544
X ₄	0.0979	0.0072	X ₂ X ₃	0.9831	0.6144
X ₁ ²	0.0104	0.0006	X ₂ X ₄	0.9831	0.802
X ₂ ²	0.0557	0.0057	X ₃ X ₄	0.5978	0.5841
X ₃ ²	0.0264	0.0046	回归	0.0173	0.0004
X ₄ ²	0.0628	0.0776	失拟	0.3035	0.2478

注:P<0.1 为准显著 P<0.05 为显著;P<0.01 为极显著。

葡萄糖是限制菌丝生长的主要因子。
2.2.2 培养基成分对菌丝干重的影响 由回归方程显著性检验结果可知,模型(2)X₁、X₄、X₁²、X₂²、X₂²达极显著,X₂达显著,X₄²达准显著。二次项系数|b₁|>|b₄|>|b₂|>|b₃|,且二次项系数均为负值,表明 4 种培养基成分都具有最佳值,用量过多或不足都会影响菌丝干重的变化。从图 2 可看出,4 种成分在 0 编码前随着用量的

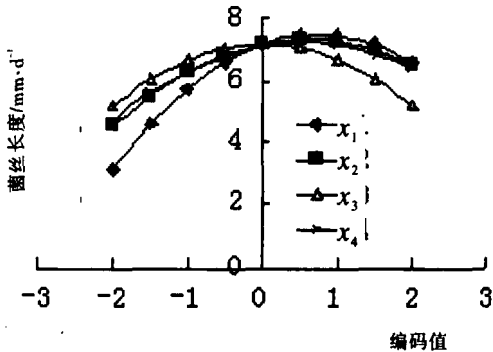


图 1 培养基成分对菌丝长速的影响

增加而干重呈抛物线增加,0 编码后随酵母膏、蛋白胨用量的增加而干重下降,而葡萄糖、无机盐的用量达到

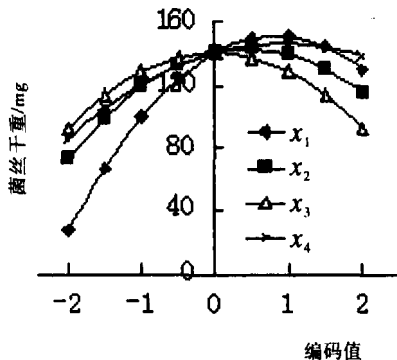


图 2 培养基成分对菌丝干重的影响

1 编码后干重才呈下降趋势。可见,在该试验条件下,葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐对菌丝的干重均有显著影响。其影响程度葡萄糖>无机盐>蛋白胨>酵母粉。

表 4 培养基优化用量方案

项目	编码值 (code)			
	X ₁ /g	X ₂ /g	X ₃ /g	X ₄ /g
菌丝长速>5.91 mm/d	0.643~0.947	0.443~0.839	-0.174~0.174	0.3000~0.7000
菌丝干重>109.84 mg/总量	0.773~1.073	0.271~0.653	-0.158~0.158	0.604~1.000
交集范围	0.773~0.947	0.443~0.653	-0.158~0.158	0.604~0.7000
最优配比方案	18.865~19.735	1.83225~1.98975	0.8685~1.6185	2.604~2.7000

3 培养基的优化

该试验条件下平菇菌丝获得最大长速 $Y=7.54$ mm/d 的组合方案, $X_1=1, X_2=1, X_3=0, X_4=1$; 平菇获得最大干重 $Y=156.89$ mg/总量的组合方案, $X_1=1, X_2=0, X_3=0, X_4=1$, 但对菌种生产而言, Y 并不一定代表生产上最优, 为了寻求现实和可行的优化措施, 采用决策频数分析法进一步分析, 在 $-2 \leq X \leq 2$ 区间经 DPS 软件运算求得在 95% 置信区域内获得菌丝长速大于 5.91 mm/d 组合方案 78 套, 干重大于 109.84 mg/总量

组合方案 91 套, 因此, 培养基最佳优化用量方案如表 4 所示^[13-14]。

4 结论

该试验条件下葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐 ($MgSO_4, KH_2PO_4$) 4 种成分中, 对平菇菌丝长速效应为葡萄糖>蛋白胨>无机盐>酵母粉。对平菇菌丝干重效应为葡萄糖>无机盐>蛋白胨>酵母粉, 获得菌丝长速>5.91 mm/d, 菌丝干重>109.84 mg/总量, 用葡萄糖 18.865~19.735 g/L、蛋白胨 1.83225~1.98975 g/L、酵母粉 0.8685~1.6185 g/L、无机盐 2.604~2.7000 g/L。

参考文献

- [1] 张西铭. 平菇菌种分离复壮的几种有效方法食用菌[J]. 食用菌, 1996 (6): 17.
- [2] 郝光明, 于保春. 平菇菌种衰退原因与防止方法研究[J]. 中国食用菌, 1996(6): 36.
- [3] 贺晓龙, 韩涛, 任桂梅, 等. 平菇母种培养基筛选研究[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2004(3): 71-72.
- [4] 刘碧容, 温海洋. 不同培养基对平菇菌丝体生长的影响研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2006(1): 74.
- [5] 李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [6] 茆诗松, 周纪芳. 试验设计[M]. 北京: 中国统计出版社, 2004.
- [7] 刘振祥, 张胜. 食用菌栽培技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [8] 郭智, 牛长满, 张福元, 等. 杏鲍菇母种培养基优化研究[J]. 食用菌, 2005(1): 23.
- [9] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [10] 王惠, 吴兆亮, 童应凯, 等. 应用二次回归正交旋转组合设计优化黄霉素发酵培养基[J]. 食品研究与开发, 2006(6): 19-22.
- [11] 朱战波, 刘宇, 贾永全, 等. 二次正交旋转组合设计优化罗伊乳杆菌发酵培养基[J]. 中国生物制品学杂志, 2008(6): 527-530.
- [12] 刘晓永, 王强, 刘红芝, 等. 基于二次正交旋转回归试验的酵母 β -葡萄糖苷酶发酵培养基优化[J]. 酿酒科技, 2007(4): 32-36.
- [13] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药·抗生素杂志分册, 1999, 20(2): 58.
- [14] 赵丽坤, 郭会灿. 微生物培养基优化方法概述[J]. 石家庄职业技术学院学报, 2008(4): 50-52.

Study on Use of Orthogonal Rotation Combination Medium Optimization of *Pleurotus ostreatus*

GONG Jian-guo

(Inner Mongolia Jining Normal University, Jining, Inner Mongolia 012000)

Abstract: The use of quadratic regression orthogonal rotation design, the effect of glucose, peptone, yeast extract, inorganic salts ($MgSO_4, KH_2PO_4$) on growth rate, dry weight of *Pleurotus ostreatus* mycelium were studied. The result showed that glucose, peptone, yeast extract, inorganic salts of four components of *Pleurotus ostreatus* mycelia-speed effect of long-glucose>peptone>Inorganic salts>yeast. Dry weight of mycelium of *Pleurotus ostreatus* effect for glucose>salts>peptone>yeast, hyphal length velocity was>5.91 mm/d, dry weight of mycelium>109.84 mg/total, with glucose 18.865~19.735 g/L, peptone 1.83225~1.98975 g/L, yeast extract, 0.8685~1.6185 g/L, salt 2.604~2.7000 g/L.

Key words: hyphal long speed; dry weight of mycelium; orthogonal rotation combination design