

利用通用旋转组合设计优化赤灵芝母种培养基的研究

弓建国

(集宁师范学院 生化系 内蒙古 乌兰察布 012000)

摘要:为解决赤灵芝生产中多次无性繁殖而常出现菌种老化和退化问题,优选适合赤灵芝母种的培养剂。利用四因素五水平二次通用旋转组合设计,研究葡萄糖、蛋白胨、硫酸镁、磷酸二氢钾对赤灵芝菌丝的长速、干重的影响。结果表明:葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) 4 因素中,对赤灵芝菌丝长速的效应为葡萄糖>蛋白胨>酵母粉>无机盐;对菌丝干重的效应为葡萄糖>酵母粉>无机盐>蛋白胨。获得赤灵芝菌丝的长速> 1.31 cm/d,菌丝干重> 26.09 mg/tube,用葡萄糖 16.37 ~ 17.05 g/L,蛋白胨 1.617 ~ 1.689 g/L、酵母粉 1.872 ~ 2.056 g/L、无机盐($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) 2.352 ~ 2.706 g/L。

关键词:赤灵芝;菌丝长速;菌丝干重

中图分类号: S 567.3⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)04-0193-04

赤灵芝在生产应用中经多次无性繁殖或受其它条件的影响,常出现菌种老化和退化的问题,接种后菌丝生长缓慢,菌丝纤细、稀疏,栽培出的赤灵芝出现变形和畸形。因此,优化培养基进行菌种复壮是常采取的措施^[1-7]。目前优化培养基研究主要集中在液体发酵,而且多数是单因素研究^[8-14],而利用通用旋转组合设计研究赤灵芝培养基还未见报道。试验在前期试验的基础上^[15],采用四因素五水平二次通用旋转组合设计,对影响赤灵芝菌丝长速和菌丝干重的重要因素进行研究,筛选赤灵芝母种培养基的最佳用量比例^[16-17],以为当地菌种产业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

赤灵芝菌种为当地栽培的主要品种,由内蒙古集宁师院微生物实验室提供。

1.2 试验设计

通过正交试验进行相关分析可知^[15],对赤灵芝菌丝生长量具有显著影响的营养因子是葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$)。试验采用 4 因素 5 水平 2 次通用旋转回归组合设计方法^[18-19],设葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐 4 个试验因子,各 5 个水平,31 个处理组合,各因子设计水平见表 1。

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研究工作。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:2009-11-20

A:基础培养基配方马铃薯 200 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL;B:试验培养基配方葡萄糖,蛋白胨,酵母粉、无机盐($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) 4 种原料按表 1 用量加到基础培养基内。按二次通用旋转组合表设计出 31 个配方,每配方重复 10 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^[20]。

表 1 试验因素及编码值

因素	间距	编码水平				
		2	1	0	-1	-2
X1 g/L (葡萄糖)	5	25	20	15	10	5
X2 g/L (蛋白胨)	0.75	3	2.25	1.5	0.75	0
X3 g/L 酵母粉	0.75	3	2.25	1.5	0.75	0
X4 g/L	1	4	3	2	1	0

1.3 试验指标的测定^[21]

1.3.1 菌丝生长速度 将等量的菌种接入已编号的试验培养基中,于 25℃下恒温培养,菌种萌发后每天测菌丝双向生长速度。

1.3.2 菌丝干重 将生长一定时期的供试试管于 100℃加热融化,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,80℃烘至恒重称重。

2 结果与分析

2.1 建立模型

对试验结果运用 DPS 软件进行统计分析^[22-24],以葡萄糖(X1)、蛋白胨(X2)、酵母粉(X3)、无机盐(X4)($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) 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。

表 2 四因素二次通用旋转组合设计试验结果及结构矩阵

					菌丝长速		菌丝干重							菌丝长速		菌丝干重	
NO	X1	X2	X3	X4					NO	X1	X2	X3	X4				
1	1	1	1	1	1.64	29.85			17	-2	0	0	0	0.67	16.6		
2	1	1	1	-1	1.55	27.75			18	2	0	0	0	0.88	27.88		
3	1	1	-1	1	1.5	28.07			19	0	-2	0	0	0.78	18.68		
4	1	1	-1	1	1.18	23.3			20	0	2	0	0	1.21	20.05		
5	1	-1	1	1	1.56	26.15			21	0	0	-2	0	1.06	19.35		
6	1	-1	1	-1	1.4	25.6			22	0	0	2	0	1.41	29.93		
7	1	-1	-1	1	1.41	25.15			23	0	0	0	-2	0.99	23.63		
8	1	-1	-1	-1	1.18	22.63			24	0	0	0	2	1.37	28.58		
9	-1	1	1	1	1.38	29.88			25	0	0	0	0	1.38	33.83		
10	-1	1	1	-1	1.32	25.38			26	0	0	0	0	1.73	35.53		
11	-1	1	-1	1	1.3	25.68			27	0	0	0	0	1.98	36.38		
12	-1	1	-1	-1	1.26	20.43			28	0	0	0	0	1.77	36.8		
13	-1	-1	1	-1	1.25	22.78			29	0	0	0	0	1.56	28.28		
14	-1	-1	1	-1	1.08	21.528			30	0	0	0	0	1.64	31.05		
15	-1	1	-1	1	0.96	23.63			31	0	0	0	0	1.378	26.75		
16	-1	1	-1	-1	0.76	17.55											

$Y_{(1)} = 1.63429 + 0.10542X_1 + 0.09958X_2 + 0.09708X_3 + 0.08458X_4 - 0.17326X_1^2 - 0.11826X_2^2 - 0.05826X_3^2 - 0.07201X_4^2 - 0.05563X_1X_2 + 0.00813X_1X_3 + 0.02063X_1X_4 - 0.02063X_2X_3 - 0.01563X_2X_4 - 0.01938X_3X_4$

$Y_{(2)} = 32.66000 + 1.83958X_1 + 1.16708X_2 + 1.82042X_3 + 1.53625X_4 - 2.33406X_1^2 - 3.05281X_2^2 - 1.73406X_3^2 - 1.36781X_4^2 - 0.39938X_1X_2 - 0.13313X_1X_3 - 0.44313X_1X_4 + 0.5143X_2X_3 + 0.39188X_2X_4 - 0.64187X_3X_4$

经方差检验: 模型(1) $F_1 = 0.863$, P 值 > 0.1 ($P = 0.582$), $F_2 = 3.657$, P 值 < 0.01 ($P = 0.0095$), 模型(2) $F_1 = 0.285$, P 值 > 0.1 ($P = 0.9752$), $F_2 = 5.670$, P 值 < 0.01 ($P = 0.0011$)。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著, 试验所建立的模型与实际值拟合程度较好, 可以用模型进行优化分析(表 3)。交互项影响不显著, 故不作分析。

表 3 回归系数显著性检验结果

系数	p-值 (菌丝长速)	p-值 (菌丝干重)	系数	p-值 (菌丝长速)	p-值 (菌丝干重)
X1	0.03	0.0398	X1X2	0.32	0.6968
X2	0.0388	0.1748	X1X3	0.8827	0.8964
X3	0.0434	0.0416	X1X4	0.7085	0.6657
X4	0.074	0.08	X2X3	0.7085	0.6164
X2	0.0006	0.0069	X2X4	0.7768	0.7022
X22	0.0101	0.0009	X3X4	0.7254	0.5328
X32	0.17	0.0351	F2	0.0095	0.0011
X42	0.0947	0.0881	F1	0.582	0.9752

注 $P < 0.1$ 为准显著; $P < 0.05$ 为显著 $P < 0.01$ 为极显著。

2.2 主因子分析

2.2.1 试验因子对菌丝长速的影响 由回归方程显著性检验结果可知, 模型(1) X_1 、 X_2 、 X_3 系数达显著, X_1^2 、 X_2^2 的系数达极显著, X_4 、 X_4^2 达准显著, X_3^2 系数不显著。可见, 在该试验条件下, 葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、

无机盐 ($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) 对菌丝长速均有显著影响。因为二次回归通用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 $b_1 > b_2 > b_3 > b_4$, 即在该试验条件下, 对菌丝长速的影响葡萄糖 $>$ 蛋白胨 $>$ 酵母粉 $>$ 无机盐。

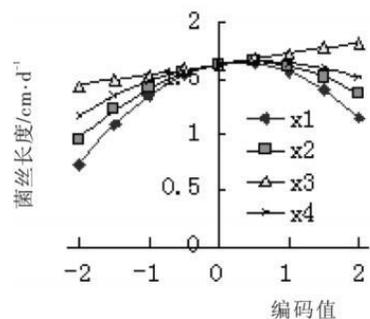


图 1 试验因子对菌丝长速的影响

二次项系数 $|b_1| > |b_2| > |b_4| > |b_3|$, 且二次项系数均为负值, 表明 4 项试验因子都具有最佳值, 用量过多或不足都会影响菌丝长速的变化。

根据二次回归通用旋转设计原理, 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:

$$Y_1 = 1.63429 + 0.10542X_1 - 0.17326X_1^2 - 0.05563X_1X_2 + 0.00813X_1X_3 + 0.02063X_1X_4$$

$$Y_2 = 1.63429 + 0.09958X_2 - 0.11826X_2^2 - 0.05563X_1X_2 - 0.02063X_2X_3 + 0.01563X_2X_4$$

$$Y_3 = 1.63429 + 0.09708X_3 - 0.05826X_3^2 + 0.00813X_1X_3 - 0.02063X_2X_3 - 0.01938X_3X_4$$

$$Y_4 = 1.63429 + 0.08458X_4 - 0.07201X_4^2 + 0.02063X_1X_4 + 0.01563X_2X_4 - 0.01938X_3X_4$$

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、无机盐用量的增加而呈抛物线增加,即葡萄糖、蛋白胨、无机盐用量达最高长速对应值时,再增加用量长速反而降低,而酵母粉随着用量的增加菌丝长速呈直线状态,说明还未达到最大值。但葡萄糖的用量在 0 编码前,长速基本呈直线增加,0 编码后渐进增加,达到 1 编码后基本不再增加,表明葡萄糖是限制菌丝生长的主要因子。

2.2.2 试验因子对菌丝干重的影响 由回归方程显著性检验结果可知,模型(2) X_1 、 X_3 的系数达显著, X_4 的系数达准显著。二次项系数 $|b_1| > |b_3| > |b_4| > |b_2|$,且二次项系数均为负值,而 X_{12} X_{22} 达极显著, X_{32} 达显著, X_{42} 达准显著。表明 4 项试验因子都具有最佳值,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 因子在 0 编码前随着用量的增加而干重呈抛物线增加,0 编码后随用量的增加而蛋白胨的干重显著下降,但是葡萄糖、酵母粉、无机盐几乎达到 1 编码后才下降,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 > 酵母粉 > 无机盐 > 蛋白胨。

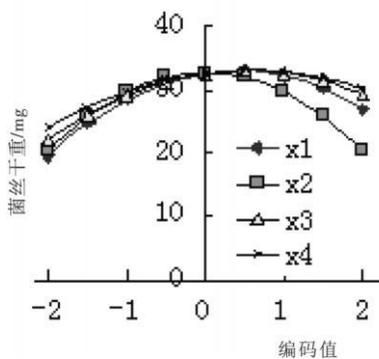


图2 试验因子对菌丝干重的影响

3 模型的优化

试验条件下获得菌丝最快长速 $Y = 1.84$ cm/d 的组合方案: $X_1 = 0, X_2 = 0, X_3 = 2, X_4 = 1$ 。获得菌丝最大干重 $Y = 26.09$ mg/tube 的组合方案: $X_1 = 0, X_2 = 0, X_3 = 1, X_4 = 1$ 。但对实际生产而言, Y 并不一定代表生产上的最优,为了寻求现实可行的优化用量方案,采用决策频数分析法,在 $-2 < X < 2$ 区间经 DPS 软件运算求得在 95% 置信区域内菌丝长速 > 1.31 cm/d 组合方案 134 套。菌丝干重大于 26.09 mg/tube 的 77 套。因此,培养基最佳优化用量方案如表 4 所示。

表 4 培养基优化用量方案^[25-27]

项目	编码值			
	X_1 (g)	X_2 (g)	X_3 (g)	X_4 (g)
菌丝长速 > 4.41 cm/d	0.157 ~ 0.410	0.251 ~ 0.555	0.496 ~ 0.922	0.353 ~ 0.706
菌丝干重 > 104.36 mg / 总量	0.274 ~ 0.583	~0.157 ~ 0.157	0.350 ~ 0.741	0.343 ~ 0.800
交集范围	0.274 ~ 0.410	0.157 ~ 0.251	0.496 ~ 0.741	0.353 ~ 0.706
最优配比方案	16.37 ~ 17.05	1.617 ~ 1.688	1.872 ~ 2.056	2.353 ~ 2.706

4 结论

该试验条件下培养基用量中,对菌丝长速的效应为葡萄糖 > 蛋白胨 > 酵母粉 > 无机盐。获得菌丝长速 > 1.31 cm/d。对菌丝干重的效应为葡萄糖 > 酵母粉 > 无机盐 > 蛋白胨,菌丝干重 > 26.09 mg/tube,用葡萄糖 16.37 ~ 17.05 g/L,蛋白胨 1.17 ~ 1.688 g/L,酵母粉 1.872 ~ 2.056 g/L,无机盐 2.353 ~ 2.706 g/L。

参考文献

- [1] 白永莉,李军.不同配方培养基栽培灵芝试验[J].北方园艺,2006(5):147.
- [2] 初洋,倪新江.灵芝培养基的筛选[J].安徽农业科学,2008,36(5):1924-1925.
- [3] 班立桐,王文治,周文寰,等.灵芝 G9 菌种培养基配方和栽培料筛选试验[J].天津农业科学,2005,11(4):27-28.
- [4] 韩向红,王明诚,王海珠,等.几种栽培灵芝菌丝体生长营养条件之初探[J].海南师范学院学报(自然科学版),2003,16(2):88-92.
- [5] 蔡爱群,吴基.松杉灵芝母种培养基的筛选[J].食用菌,2007,29(3):27-28.
- [6] 芦站根.南韩灵芝母种培养基的筛选研究[J].衡水学院学报,2008,10(4):58-60.
- [7] 蒋冬花.培养基配方与栽培方式对灵芝产量和质量的影响[J].海南大学学报(自然科学版),2001,19(1):76-79.
- [8] 孙金旭,朱会霞,王敏,等.灵芝真菌液体发酵培养基优化研究[J].现代食品科技,2007(12):51-53.
- [9] 陈志杰,顾振新.糙米为主要原料的灵芝深层发酵培养基优化[J].中国食品学报,2008(4):14-15.
- [10] 武忠伟,许桂芳,赵现芳,等.韩芝液体深层发酵培养基的优化研究[J].氨基酸和生物资源,2007,29(4):29-32.
- [11] 夏志兰,喻桃生,周连玉,等.灵芝液体发酵条件的优化研究[J].微生物学杂志,2007,27(2):10-15.
- [12] 高玉荣,卢艳明.灵芝菌丝液体深层发酵培养基的研究[J].中国酿造,2006(1):18-20.
- [13] 刘冬,李世敏.灵芝菌丝体深层液体发酵培养基研究[J].微生物学杂志,2001,21(2):15-17.
- [14] 董洪新,梁建光,曲红静,等.灵芝菌丝体深层培养特性研究[J].江苏农业科学,2004(4):88-89.
- [15] 弓建国,郭美兰,穆俊祥,等.赤芝母种培养基优化研究[J].集宁师专学报,2008,30(4):53-55.
- [16] 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 -葡聚糖发酵培养基优化[J].酿酒科技,2007(4):32-36.
- [17] 李书倩,马淑凤,李铁超,等.回归模型优化白灵菇深层发酵工艺[J].保鲜与加工,2006,6(3):40-42.
- [18] 厚义,肖俊璋.试验研究及统计分析[J].西安:世界图书出版社,1998.
- [19] 杨义群.回归分析及多元分析在农业上的应用[M].西安:天则出版

社, 1990.

[20] 弓建国, 郭美兰, 穆俊祥, 等. 平菇母种培养基优化研究[J]. 集宁师专学报, 2007, 29(4): 39-41.

[21] 郭智, 牛长满, 张福元. 杏鲍菇母种培养基优化试验[J]. 食用菌, 2005, 27(1): 23-24.

[22] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2006.

[23] 甘桂兰, 程新, 李昆太. DPS 数据处理软件在发酵培养基优化中的应用[J]. 中国酿造, 2008(11): 69-71.

[24] 苏国成, 黄爱涛, 蔡慧农, 等. DPS 数据处理系统在 L-鸟氨酸发酵培养基优化中的应用[J]. 食品科学, 2006(10): 402-406.

[25] 韩翔, 檀根甲. 瓜蒌炭疽菌培养基优化研究[J]. 安徽农业大学学报, 2005(2): 27-30.

[26] 肖雷, 姚菁华. 优化发酵条件提高灵芝多糖产率的研究[J]. 食品科技, 2007(8): 43-45.

[27] 杨炎, 刘艳芳, 张劲松, 等. 赤芝 G2 深层发酵优化模式的研究[J]. 食用菌学报, 2004(3): 43-47.

The use of Universal Design Optimization Rotation of the Medium of *Ganoderma lucidum* Research Home

GONG Jiar-guo

(Department of Biochemistry of Jining Inner Mongolia Normal University, Wulanchabu, Neimenggu 012000)

Abstract: To address the production of *Ganoderma lucidum* on many occasions and often appear asexual strain aging and degradation, optimal for the cultivation of *Ganoderma lucidum* Mother kinds of agents. The use of four-factor five-level design of the second general rotation studied glucose, peptone, yeast powder, magnesium sulfate, potassium dihydrogen phosphate mycelium of *Ganoderma lucidum* and long speed, the impact of dry weight. Under the conditions of this experiment, glucose, peptone, yeast powder, inorganic salts ($MgSO_4 \cdot KH_2PO_4$) four factors, the speed of the *Ganoderma lucidum* mycelia long the effects of glucose > peptone > yeast powder > salts. The effect of the dry weight of glucose > yeast powder > salts > peptone. Mycelium of *Ganoderma lucidum* was long speed > 1.31 cm/d, dry weight of mycelium > 26.09 mg/tube, and glucose 16.37 ~ 17.05 g/L, peptone 1.617 ~ 1.689 g/L, yeast powder 1.872 ~ 2.056 g/L, inorganic Salt 2.352 ~ 2.706g/L.

Key words: *Ganoderma lucidum*; hyphal long speed; dry weight of mycelium

怎样喝茶有利健康

1. 因人用茶 茶叶味苦性寒, 具有清热解暑, 润肺化痰, 利尿通尿的功用。年青体壮的人, 适量饮茶可以降低火去燥, 年老体弱者, 往往虚寒血弱, 长久用茶容易损耗元气, 甚至会诱发疾病, 因此应少喝茶。

2. 对症用茶 茶叶含咖啡因、鞣质、茶碱等, 对中枢神经有强兴奋作用, 因此, 失眠的人睡觉前不宜饮茶, 心动过快的冠心病人不适宜

茶; 心动过慢的病人适宜饮茶, 提高心率。消化性强的人不宜饮茶, 消化不良, 腹内积食者适宜饮茶, 对于支气管哮喘, 胆绞痛患者适量饮茶可以减轻痛苦, 因为茶碱能松弛平滑肌, 胖人适宜饮茶。

3. 清淡为佳 浓茶刺激作用很强, 可以引起失眠, 头痛, 呕吐, 而且茶的抗菌作用会随着浓度增大而降低。

4. 冷饮对弊 不饮冷茶喝温茶, 体内的火气能因茶的凉性而下降, 自尿排出, 喝热茶, 则茶的凉性借体内火气而升散, 使人神思爽快, 耳聪目明, 喝冷茶, 不仅无清热化痰功效, 而且有滞寒, 聚痰的坏处。

5. 空腹不饮 空腹饮茶是不良的习惯, 腹中无物时, 茶性直入脏腑, 冷脾胃, 对身体有害。