

# 辣椒粉固态培养灵芝菌丝体的培养基优化研究

杨海军, 周小苹

(信阳农业高等专科学校, 河南 信阳 464000)

**摘 要:**以灵芝为试材,利用 Matlab 软件对辣椒粉固态培养灵芝菌丝体的培养基进行了优化研究,并采用 Plackett-Burman 法设计了培养基 7 个因素影响试验。结果表明:影响灵芝菌丝体生长的因素为大豆粉、大米粉和水;单因子试验确定了培养基中最佳的组成为大豆粉 6%、大米粉 4%、水 100%。在此优化的条件下灵芝多糖的产量达 144.7 mg/g。

**关键词:**辣椒粉;灵芝;Plackett-Burman;Matlab

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)07-0161-03

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种重要的药用真菌,具有防止动脉硬化,提高机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老等多种作用<sup>[1]</sup>,灵芝多糖是其主要的活性成分。灵芝被人们用来研制成不同的灵芝保健用品,如灵芝茶、灵芝酒、灵芝片、灵芝口服液等<sup>[2-4]</sup>。这些保健品或通过液体培养获得灵芝菌丝体,或经固体培养取得其子实体进一步加工而成。灵芝的液体培养,生产周期短,但设备投入大,提取成本较高。灵芝的固体培养一般采用椴木或有机废料(木屑、刨花等),收获其子实体,设备投入较小但生产周期较长。辣椒粉具有疏松透气的特点,可作为固态培养灵芝菌丝体的原料。辣椒粉又是一种常用的烹饪调味料,含大量膳食纤维可食用。采用辣椒粉固态培养灵芝菌丝体,通过干燥和粉碎,便可获得便于贮存的保健调味料,可使人们在日常的饮食中达到保健的作用。该法兼有灵芝液体培养生产周期短和固态培养生产设备投入小的优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌种灵芝(*Canoderma lucidum* xy05)由信阳农业高等专科学校生物技术实验室保存,为灵芝多糖生产菌种;中温淀粉酶 SUKANMY-Med 由苏柯汉生物工程有限公司生产;辣椒粉(20 目)、大豆粉(80 目)、大米粉(80 目)市购。菌种培养基:①斜面试管保藏培养基:PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)试管斜面培养基;②活化斜面试管培养基:酵母膏 1%,蛋白胨 1%,葡萄糖 0.2%,NaCl 0.25%,琼脂 2%,pH 5.5,0.1 MPa 20 min。③液体种子培养基:大豆粉 2%,酵母粉 0.2%,葡萄糖 2%,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%,pH 5.5,0.1 MPa 20 min。仪器设备:霉菌培养箱(MJX,宁波东南仪器有限公司);立式双层恒温摇床(HNY-2102C,金坛市亿通电子有限公司);超净工作台(SW-CJ-2F,苏州净化仪器厂);台式离心机(TDL-5-A,上海安亭科学仪器厂);电子分析天平(FA2004,上海良平仪器仪表有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 从斜面保藏培养基切出蚕豆大小的菌丝接种于活化斜面培养基的中部,28℃培养 5 d。

1.2.2 液体种子培养 将活化的灵芝斜面菌种切割成 1 cm<sup>2</sup> 大小的斜面菌丝块,取 2~3 块于装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,置于摇床 28℃恒温 140 r/min 振荡培养 7 d。

1.2.3 灵芝固体培养 1 000 mL 三角瓶装 100 g 固体配料,加水拌匀,pH 自然,121℃灭菌 20 min,冷却后按 10%的接种量接入液体菌种,置于霉菌培养箱中 28℃,相对湿度 70%培养 12 d。

1.2.4 Plackett-Burman 法筛选灵芝培养基成分的敏感因素 有关灵芝固态培养获得其子实体和液体培养提取灵芝活性成分文献较多,采用的培养组成差别较大。与这些培养不同的是,采用辣椒粉培养灵芝获得含灵芝活性成分的调味料,其培养基成分除了要满足菌丝体的生长需求,还必须是能食用且不能带入不良味道。按以上要求及参考文献[6-7]的基础上,初步确定了灵芝培养基的组分为大豆粉、大米粉、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>和水,然后采用 Plackett-Burman 法设计敏感因素试验以确定培养基的组分。表 1 为各固体基质组分在固体配料(7 种因素中除去水)的百分含量,固体配料其余组分为辣椒粉,水的比例为与固体配料的百分比。试验设计及方差分析采用 Matlab 2011B 软件。

### 1.3 项目测定

菌丝体灵芝多糖含量的测定:为了排除原料中淀粉

**第一作者简介:**杨海军(1971-),男,四川雅安人,硕士,讲师,研究方向为生物发酵。

**收稿日期:**2012-12-12

对测量结果的影响,对灵芝培养物加中温淀粉酶处理后,再提取菌丝体中灵芝多糖进行测定。具体方法如下:灵芝固态培养物 100 g 加水 500 mL,调节 pH 6.0,加入 0.1 mL 温淀粉酶 70℃水浴 15 min,3 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀用蒸馏水洗涤 3 次,加入 95℃热水 200 mL 浸提 2 h,浸提 2 次,合并浸提液,采用苯酚-硫酸法测定出浸提液中灵芝多糖的含量<sup>[5]</sup>,计算出每克灵芝固态培养基中灵芝多糖的毫克数。

表 1 Plackett-Burman 设计因素水平

Table 1 The factors and levels of Plackett-Burman design							
水平	大豆粉 /%	大米粉 /%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /%	MgSO <sub>4</sub> /%	CaCO <sub>3</sub> /%	水 /%	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /%
-1	4	4	0.04	0.004	0.4	60	0.8
1	6	6	0.06	0.006	0.6	90	1.2

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒粉培养基成分的确定

Matlab 是由美国 MathWorks 公司开发的集科学计算、可视化以及交互式程序设计的高科技软件,广泛应用于各行各业的科学研究中<sup>[8]</sup>。在 Matlab 中用于生成 Plackett-Burman 试验设计表的函数为 Hadamard(n),其中 n 是试验次数,为 4 的倍数。试验设计中培养基组成中需要考虑的因子数为 7,试验次数 8 的 Plackett-Burman 表为 7 列的正交表,每列对应 1 个因素后缺少误差列,无法进行方差分析,需进行重复试验。因此,最简单的方法是选用 12 次试验数 Plackett-Burman 表。在 Matlab 命令窗口,输入“Hadamard(12)”命令可产生 12 列 12 行的 Plackett-Burman 实验设计表,该表从第 2~12 列是一个 11 列 12 行的 2 水平正交设计表,可用于安排 11 个因素的试验。选用第 2 列到第 8 列安排试验,试验设计及试验结果见表 2。

表 2 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 2 Plackett-Burman experiment design matrix and experiment results								
序号	大豆粉	大米粉	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCO <sub>3</sub>	水	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	灵芝多糖 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	1	1	1	125.2
2	-1	1	-1	1	1	1	-1	91.1
3	-1	-1	1	-1	1	1	1	106.8
4	1	-1	-1	1	-1	1	1	135.2
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	63.4
6	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	113.6
7	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	85.4
8	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	114.9
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	125.2
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	97.5
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	64.3
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	114.3

用 Matlab 的 anovan 函数对试验结果进行多因素反差分析。表 3 中 P 值为所有样本取自同一群体(或取自均值相等的不同群体)的零假设成立的概率。P 值接近于 0,则认为零假设可疑并认为该列均值存在差异,即该列因素影响显著。一般 P 值小于 0.05 时,认为该因素影响显著,P 值小于 0.01 时,认为该因素高度显著。从表 3 可以看出,大豆粉和水对试验结果的影响为高度显著,大米粉对试验结果的影响为显著。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>对试验结果影响不显著,其原因是辣椒粉含微量元素丰富<sup>[9]</sup>,可充分满足灵芝菌丝体的生长。因此可确定培养基组分辣椒粉、大豆粉、大米粉和水。

表 3 试验结果方差分析

Table 3 The variance analysis of experimental results						
因素	方差	自由度	均方差	F	P	敏感
大豆粉	2 935.94	1	2 935.94	201.29	0.0001	**
大米粉	892.69	1	892.69	61.20	0.0014	*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.52	1	3.52	0.24	0.6489	Ns
MgSO <sub>4</sub>	2.90	1	2.90	0.20	0.6787	Ns
CaCO <sub>3</sub>	2.52	1	2.52	0.17	0.6989	Ns
水	2 061.94	1	2 061.94	141.37	0.0003	**
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.17	1	8.17	0.56	0.4959	Ns
误差	58.34	4	14.59			Ns

注: \*\* 高度显著, \* 显著, Ns 不显著。

### 2.2 培养基组分浓度的确定

2.2.1 大豆粉最佳浓度的确定 在表 2 的 12 次试验中,序号为 4 的灵芝多糖产量最高,其培养基组成中大米粉的含量为 4%,水为 90%。大米粉和水添加量按上述水平,改变培养基中大豆粉的含量配料进行灵芝培养。由图 1 可知,大豆粉的最佳添加量为 6%。

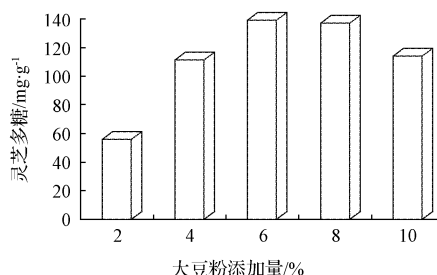


图 1 大豆粉的添加量对灵芝多糖的影响

Fig. 1 The effect of soybean powder on *Ganoderma lucidum* polysaccharide

2.2.2 大米粉最佳浓度的确定 按培养基组成中大豆粉的含量为 6%,水为 90%,不同大米粉添加量的试验结果见图 2。由图 2 可以看出,大米粉的添加量在 4% 时灵芝多糖产量最高,进一步提高大米粉的添加量,灵芝多糖的产量降低,其原因可能是大米粉中营养因子含量相对于大豆粉少,因而对灵芝的生长的促进较小。相反,在满足灵芝菌丝体营养要求的前提下,过大大米粉或大

豆粉的添加量会减少培养基的透气性而影响灵芝菌丝体的生长。

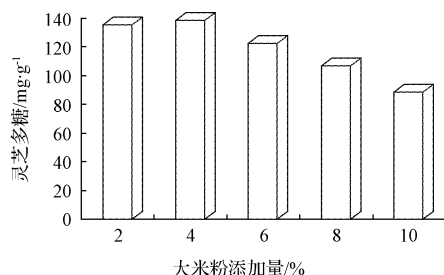


图2 大米粉的添加量对灵芝多糖的影响

Fig. 2 The effect of rice powder on *Ganoderma lucidum* polysaccharide

2.2.3 水的添加量的确定 按培养基组成中大豆粉的含量为6%,大米粉为4%,不同水添加量下的灵芝培养试验结果见图3。从图3可以看出,当水的添加量为100%时,灵芝菌丝体多糖产量最高达143.5 g/L。灵芝是喜湿性菌类,因此培养基过低的含水量不利于其生长。固体培养是静止培养,过高的水分会影响培养基的氧的传递,导致供氧不足影响灵芝菌丝体的生长。因此

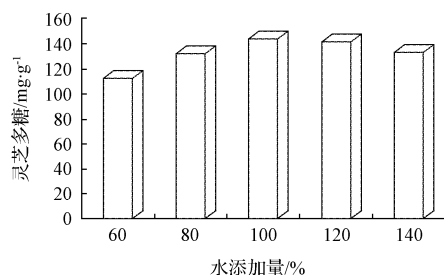


图3 水的添加量对灵芝多糖的影响

Fig. 3 The effect of water on *Ganoderma lucidum* polysaccharide

培养基中过高或过低的含水量都不利于灵芝菌丝体的生长。

通过以上试验,确定了培养基的最佳配比为:大豆粉6%,大米粉4%,水100%。培养基组分按该配比进行了5次试验,获得的灵芝多糖平均产量为144.7 g/L,与上述最大产量143.5 g/L相近,表明试验结论准确可靠。

### 3 结论

辣椒粉结构疏松,微量元素丰富,适合灵芝菌丝体的固态培养,添加合理配比的大豆粉、大米粉、水配料接种灵芝液体种子进行培养,可获得一种富含灵芝多糖、具有保健作用的辣椒粉,用于烹饪调味。采用辣椒粉作为主要原料固态培养灵芝时,其固体基质中大豆粉6%,大米粉4%,辣椒粉90%,水与固体基质的比例为1:1时灵芝菌丝体的生长效果最佳。

### 参考文献

- [1] 常明昌. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 289.
- [2] 程哲, 王广耀, 王鹤云. 灵芝乳保健饮料的研制[J]. 食用菌, 2011(6): 57-58.
- [3] 张卫国, 刘欣, 陈永泉. 固态发酵灵芝多糖营养保健口服液的研制[J]. 食品研究与开发, 2006(9): 94-96.
- [4] 叶志能, 李德远, 王斌, 等. 灵芝多糖研究进展[J]. 食品研究与开发, 2012(1): 225-228.
- [5] 杨静文, 郑洁虹, 马乃良. 灵芝多糖检测鉴定方法[J]. 现代食品科技, 2010(7): 739-741.
- [6] 李宇伟, 连瑞丽, 班强, 等. 灵芝液体发酵培养条件的响应面法优化研究[J]. 北方园艺, 2012(13): 179-182.
- [7] 杨泽涛, 李莉, 李剑梅, 等. 卫星灵芝2号深层发酵条件优化[J]. 食用菌, 2012(4): 13-15.
- [8] 张德丰. Matlab/Simulink 建模与仿真实例精讲[M]. 天津: 机械工业出版社, 2011.
- [9] 徐秋兰, 庞杰. 辣椒化学成分的开发利用[J]. 中国辣椒, 2003(1): 32-35.

## Study on Optimization of Solid Medium Containing Chili Powder for *Ganoderma lucidum* Culture

YANG Hai-jun, ZHOU Xiao-ping

(Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000)

**Abstract:** With *Ganoderma lucidum* as test material, Matlab, a kind of scientific computing software, was used to optimize the medium for *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with chili powder. Plackett-Burman method was used to design seven two-level factors experiments. The results showed that the significant factors were soybean flour, rice flour and water. In the end, single factor experiments determined the optimal compositions of culture medium were soybean powder 6%, rice 4% and water 100%. Under the optimal conditions *Ganoderma lucidum* polysaccharide yield reached up to 144.7 g/L.

**Key words:** chili powder; *Ganoderma lucidum*; Plackett-Burman; Matlab