

# “草原一号”液体菌种培养基的响应面优化

焦迎春<sup>1</sup>, 余梅<sup>2</sup>, 邱冬梅<sup>1</sup>

(1. 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海普兰特药业有限公司, 青海 西宁 810007)

**摘要:**以1株野生菌株“草原一号”为研究对象,采用单因素试验和响应面试验法,研究培养基中不同营养因子对菌丝体生物量的影响。结果表明:甘露醇 29.47 g/L,蛋白胨 7.39 g/L,复合维生素 B<sub>1</sub> 1.02 g/L,硫酸镁为 0.6 g/L,菌丝体生物量最高可达到 25.023 g/L,与试验模型预测值一致。

**关键词:**“草原一号”;液体菌种;培养基;响应面;生物量

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0139-04

“草原一号”(Agaricus bisporus (Lange) Imbach. sp)在分类上隶属于真菌界(Kingdom Fungi)、担子菌门(Basidiomycota)、无隔担子菌纲、伞菌目(Agaricales)、伞菌科(Agaricaceae)、双孢菇属(Agaricus)<sup>[1]</sup>,又称草原雪蘑,为双孢菇变种<sup>[2]</sup>。其子实体中等大小,单生或丛生。菌盖白色,有鳞片,人工栽培条件下鳞片少或无。菌肉白色,伤后变成淡红色,菌褶初为粉红色,后变褐色或深褐色。孢子褐色,光滑,孢子印深褐色。

“草原一号”营养价值高,含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、氨基酸、维生素和矿物质,其中蛋白质含量可达 40%,是青藏高原特有的药食同源真菌,不仅具有降血压、提神消化的作用,还有预防坏血病、肿瘤,促进伤口愈合作用,并对肝炎、肝硬化也有辅助疗效<sup>[3]</sup>。目前青海省农林科学院已成功开展了“草原一号”的驯化、栽培、推广工作,但对“草原一号”菌丝体液体培养条件的优化研究较少,该试验采用响应面试验方法,对“草原一号”菌丝体液体培养基不同的营养成分进行了探究,以期“草原一号”液体菌种的生产与应用及其深层发酵生产提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 供试菌种“草原一号”斜面菌种由青海省农林科学院提供。

**第一作者简介:**焦迎春(1973-),女,河北景县人,硕士,教授,研究方向为食用菌资源的开发利用。E-mail:jyc\_22@163.com.

**基金项目:**青海省科技厅 1020 资助项目(2013-N-506);国家自然科学基金资助项目(31460391)。

**收稿日期:**2015-09-25

1.1.2 培养基 固体斜面培养基:200 g 土豆,20 g 葡萄糖,5 g 蛋白胨,20 g 琼脂,1 000 mL 水,pH 值自然<sup>[4]</sup>。液体种子培养基:同上,不加琼脂。基础发酵培养基:同上。

### 1.2 试验方法

1.2.1 发酵方法 菌种活化<sup>[5]</sup>:将保存于 4℃ 冰箱中的“草原一号”菌种取出,置于室温下 48 h,接种于新鲜的 PDA 固体斜面培养基上,置于 20℃ 恒温培养箱中避光培养 7 d<sup>[6]</sup>。种子液的制备:取 1 cm<sup>2</sup> 大小的活化斜面菌种 2~3 块,接种至液体种子培养基中(100 mL/250mL 三角瓶),摇床振荡培养 10 d(25℃,150 r/min)。发酵培养:按 10%接种量(V/V)将“草原一号”液体种子液接种于新鲜液体发酵培养基中(80 mL/150mL 三角瓶),放入摇床振荡培养(25℃,150 r/min)7 d。

1.2.2 单因素试验 通过查阅资料结合预试验结果,分别选择甘露醇为最佳碳源,蛋白胨作为最佳氮源,复合维生素 B<sub>1</sub> 为最适生长因子,硫酸镁为最适微量元素,试验浓度分别见表 2~5。

1.2.3 响应面试验设计 以菌丝体生物量为检测指标<sup>[7]</sup>,对甘露醇、蛋白胨、复合维生素 B<sub>1</sub>、硫酸镁等因素进行响应面分析,具体试验设计见表 1。

表 1 试验因素水平及编码<sup>[8]</sup> g/L

编码水平	因素			
	A 甘露醇	B 蛋白胨	C 复合维生素 B <sub>1</sub>	D 硫酸镁
-1 Level	10	4	1.0	0.2
+1 Level	30	8	2.0	0.6
-Alpha	0	2	0.5	0.0
+Alpha	40	10	2.5	0.8

## 1.3 项目测定

菌丝体生物量采用细胞干重法<sup>[6]</sup>,取发酵液于 3 000 r/min 下离心 15 min,收集菌丝体,并用蒸馏水洗涤 3 次后,将菌丝体放在已干燥好的培养皿中,置于 60℃ 烘箱中烘至恒重。

## 1.4 数据分析

采用 SAS 软件对数据结果进行分析,并绘制各因素间等高线图。

## 2 结果与分析

## 2.1 单因素试验结果

2.1.1 碳源对生物量的影响 菌丝体生物量随着甘露醇的增加而不断增加,甘露醇达到 20 g/L 时,生物量达最大值,后生物量随着甘露醇的增加而下降,因此确定甘露醇 20 g/L 为最适加量。采用 LSD 法对试验结果进行多重比较分析表明,甘露醇加量为 20 g/L 时,除 25 g/L 外,与各因素间的比较均达到了差异显著水平。

2.1.2 氮源对生物量的影响 前期生物量随着蛋白胨的增加不断增加,当蛋白胨添加量为 6 g/L 时,菌丝体生物量达到最大值,随后随着蛋白胨的增加,生物量呈下降趋势,因此,确定为蛋白胨最适加量为 6 g/L。经多重比较分析,蛋白胨加量为 6 g/L 时,除 5 g/L 外,与各因素间的比较均达到了差异极显著水平。

2.1.3 复合维生素 B<sub>1</sub> 对生物量的影响 生物量随着复合维生素 B<sub>1</sub> 的增加而不断增加,当复合维生素 B<sub>1</sub> 为 1.5 g/L 时,生物量达到最大值,随后随着复合维生素 B<sub>1</sub> 的增加,生物量逐渐下降。因此确定 1.5 g/L 为复合维

生素 B<sub>1</sub> 最适加量。采用 LSD 法进行多重比较分析,复合维生素 B<sub>1</sub> 添加量为 1.5 g/L 时,除 1.0 g/L 外,与各因素间的比较均达到了差异显著或极显著水平。

表 2 甘露醇添加量对生物量的影响  
多重比较表(LSD 法)

甘露醇浓度 /(g·L <sup>-1</sup> )	平均数 $\bar{x}$ /(g·L <sup>-1</sup> )	$\bar{x}-13.663$	$\bar{x}-14.489$	$\bar{x}-19.929$	$\bar{x}-20.332$
20	20.631	6.968 **	6.142 **	0.702 *	0.299
25	20.332	6.669 **	5.843 **	0.403	
30	19.929	6.266 **	5.440 **		
15	14.489	0.826 **			
35	13.663				
MS <sub>e</sub> =0.795 LSD <sub>0.05</sub> =0.529 LSD <sub>0.01</sub> =0.742					

注:\* 表示差异显著,\*\* 表示差异极显著;以下同。

表 3 蛋白胨添加量对生物量的影响  
多重比较表(LSD 法)

蛋白胨浓度 /(g·L <sup>-1</sup> )	平均数 $\bar{x}$ /(g·L <sup>-1</sup> )	$\bar{x}-10.662$	$\bar{x}-11.52$	$\bar{x}-11.695$	$\bar{x}-12.487$
6	13.278	2.616 **	1.758 **	1.583 **	0.791
5	12.487	1.825 **	0.967 *	0.792	
7	11.695	1.033 *	0.175		
8	11.520	0.858 *			
4	10.662				
MS <sub>e</sub> =0.136 LSD <sub>0.05</sub> =0.851 LSD <sub>0.01</sub> =1.238					

2.1.4 微量元素对生物量的影响 生物量随着硫酸镁的增加而不断增加,当硫酸镁为 0.4 g/L 时,生物量达到最大值,随后硫酸镁增加,生物量明显下降,因此,确定 0.4 g/L 为硫酸镁最适加量。利用 LSD 法进行多重比较表明,当硫酸镁添加量为 0.4 g/L 时,除 0.5 g/L 外,与各因素间的比较均达到了差异极显著水平。

表 4 复合维生素 B<sub>1</sub> 添加量对生物量的影响多重比较表(LSD 法)

复合维生素 B <sub>1</sub> 浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	平均数 $\bar{x}$ /(g·L <sup>-1</sup> )	$\bar{x}-11.204$	$\bar{x}-12.07$	$\bar{x}-12.828$	$\bar{x}-13.095$	$\bar{x}-13.419$
1.5	14.228	3.024 **	2.158 **	1.400 **	1.133 *	0.809
1.0	13.419	2.215 **	1.349 **	0.591	0.324	
2.0	13.095	1.891 **	1.025 *	0.267		
0.5	12.828	1.624 **	0.758			
2.5	12.070	0.866				
3.0	11.204					
MS <sub>e</sub> =0.16 LSD <sub>0.05</sub> =0.922 LSD <sub>0.01</sub> =1.342						

表 5 硫酸镁添加量对生物量的影响多重比较表(LSD 法)

微量元素浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	平均数 $\bar{x}$ /(g·L <sup>-1</sup> )	$\bar{x}-5.839$	$\bar{x}-9.979$	$\bar{x}-10.529$	$\bar{x}-11.246$	$\bar{x}-13.145$	$\bar{x}-14.777$
0.4	15.835	9.996 **	5.856 **	5.306 **	4.589 **	2.690 **	1.058
0.5	14.777	8.938 **	4.798 **	4.248 **	3.531 **	1.632 **	
0.6	13.145	7.306 **	3.166 **	2.616 **	1.899 **		
0.7	11.246	5.407 **	1.267 **	0.717			
0.3	10.529	4.690 **	0.550				
0.8	9.979	4.140 **					
0.2	5.839						
MS <sub>e</sub> =0.179 LSD <sub>0.05</sub> =0.922 LSD <sub>0.01</sub> =1.292							

## 2.2 响应面优化结果

2.2.1 响应面试验结果 试验考察 4 个影响因素,以生

物量为响应值,利用 SAS 软件来进行试验设计,共需 30 组试验,其中共有 6 组中心试验,结果见表 6。

表 6 响应面试验方案及结果

序号	A 甘露醇	B 蛋白胨	C 复合维生素 B <sub>1</sub>	D 硫酸镁	生物量
1	40	6	1.5	0.4	19.840
2	30	4	1.0	0.2	13.993
3	20	6	1.5	0.4	21.435
4	10	4	1.0	0.6	15.286
5*	20	10	1.5	0.4	22.548
6	10	8	2.0	0.6	16.675
7	10	8	2.0	0.2	13.195
8	20	6	1.5	0	19.756
9	30	8	2.0	0.2	21.508
10	20	6	2.5	0.4	20.905
11	10	8	1.0	0.6	14.863
12	10	4	1.0	0.2	15.515
13	0	6	1.5	0.4	9.690
14*	20	6	1.5	0.4	24.433
15	20	6	1.5	0.4	19.550
16*	10	4	2.0	0.2	21.943
17*	20	6	1.5	0.8	24.263
18	30	8	2.0	0.6	19.455
19	20	2	1.5	0.4	18.729
20	30	4	2.0	0.6	16.288
21*	20	6	1.5	0.4	21.218
22*	30	8	1.0	0.6	23.079
23	10	4	2.0	0.6	22.210
24	30	8	1.0	0.2	18.005
25	30	4	2.0	0.2	17.280
26	30	4	1.0	0.6	22.753
27	20	6	1.5	0.4	22.910
28	10	8	1.0	0.2	13.413
29	20	6	1.5	0.4	18.633
30	20	6	0.5	0.4	17.497

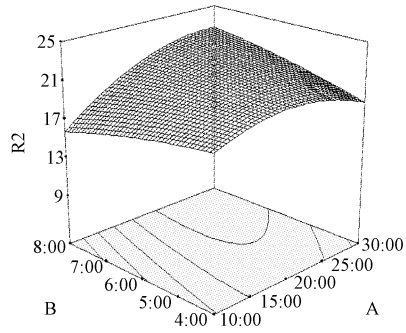
注：“\*”为中心试验点。

2.2.2 回归模型建立及方差分析 根据表 7 的显著性分析结果,A 因素的一次项、二次项以及 AB 的交互项对菌丝体生物量的合成有极显著影响( $P<0.01$ )。对结果进行回归拟合分析,菌丝体生物量预测值(Y)对应自变量甘露醇(A)、蛋白胨(B)、复合维生素 B(C)、硫酸镁(D)的二元回归方程为: $Y(g/L)=-9.665\ 50+0.646\ 32A+0.275\ 83B+22.061\ 83C+15.984\ 79D+0.089\ 19AB-0.228\ 06AC+0.181\ 91AD-0.543\ 81BC+0.022\ 65BD-8.970\ 62CD-0.099\ 96A^2-0.099\ 96B^2-3.036\ 96C^2-1.427\ 86D^2$ ,模型的确定系数  $R^2=0.761\ 8$ ,说明该方程可以从一定程度上(超过 76%)解释该模型数据的可变性。

表 7 生物量回归方程模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	301.61	14	21.54	3.43	0.012 0	显著
A	65.21	1	65.21	10.37	0.005 7	**
AB	50.91	1	50.91	8.10	0.012 3	*
A <sup>2</sup>	95.73	1	95.73	15.23	0.001 4	**
纯误差	22.58	5	4.52			
总和	395.90	29				

2.2.3 等高线图分析 经软件分析可知,生物量优化最佳组合为:甘露醇 29.47 g/L,蛋白胨 7.39 g/L,复合维生素 B<sub>1</sub> 1.02 g/L,硫酸镁为 0.6 g/L,在此条件下,生物量的预测最高值为 21.363 g/L。



注:R2 为生物量,下同,

图 1 甘露醇与蛋白胨交互影响的等高线图

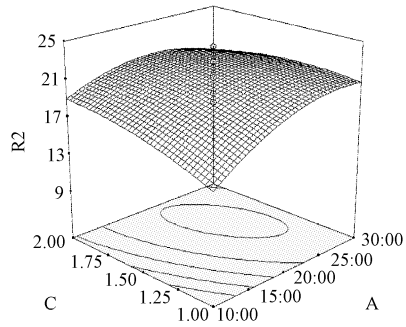


图 2 甘露醇与复合维生素 B<sub>1</sub> 交互影响的等高线图

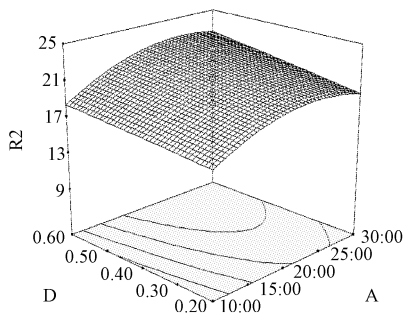


图 3 甘露醇与硫酸镁交互影响的等高线图

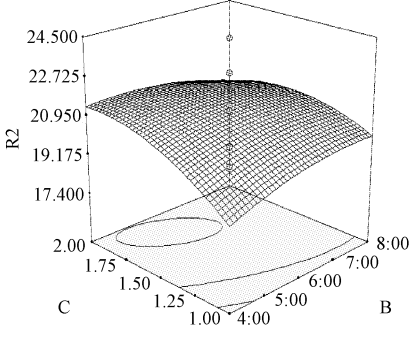


图 4 蛋白胨与复合维生素 B<sub>1</sub> 交互影响的等高线图

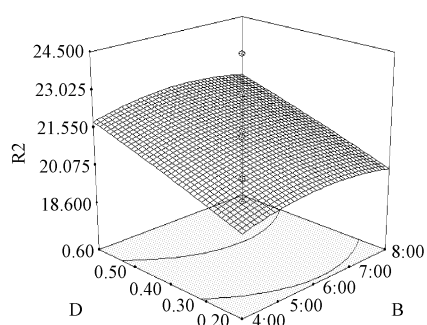
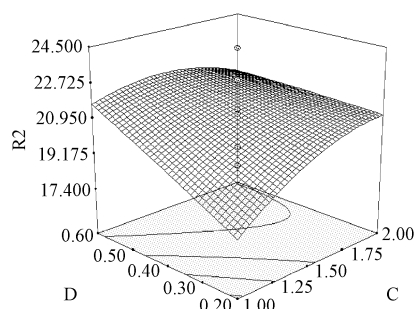


图5 蛋白胨与硫酸镁交互影响的等高线

图6 复合维生素B<sub>1</sub>与硫酸镁交互影响的等高线

2.2.4 验证试验 以响应面获得的最佳培养基做3次平行试验,以最初的未优化的培养基为对照,进行“草原一号”液体培养,其菌丝生物量均值为25.023 g/L(对照菌丝生物量均值为17.485 g/L),优化后的提高率达到22.30%。利用LSD法对试验数据进行多重比较,结果表明,A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>间的比较达到了差异显著水平。

表8 生物量最佳组合对生物量的影响

多重比较表(LSD法)

处理因素	原始数据			平均数 $\bar{x}$	$\bar{x}-17.485$
A <sub>1</sub> (最佳组合)	24.986	24.842	25.240	25.023	7.538*
A <sub>2</sub> (对照)	16.985	17.526	17.945	17.485	
MS <sub>e</sub> =29.442    LSD <sub>0.05</sub> =6.6998    LSD <sub>0.01</sub> =8.267					

### 3 结论

单因素试验结果表明,甘露醇最适加量为20 g/L,蛋白胨最适加量为5 g/L,复合维生素B<sub>1</sub>最适加量为1.5 g/L,硫酸镁最适加量为0.4 g/L。以单因素试验的结果为响应面试验的中心,优化液体菌种培养基的最佳组合:甘露醇29.47 g/L,蛋白胨7.39 g/L,复合维生素B<sub>1</sub>1.02 g/L,硫酸镁为0.6 g/L,在此条件下,生物量最高达25.023 g/L,优化后菌丝生物量提高率为22.30%。

### 参考文献

- [1] 任启伟. 蒙古口蘑液体发酵及菌丝体多糖提取的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2011.
- [2] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 109.
- [3] 刘晓鹏, 姜宁, 马琼, 等. 双孢菇深层发酵工艺优化的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 21(35): 211.
- [4] 彭秀科, 高淑敏, 刘海林, 等. 青海野生双孢蘑菇菌种培养基筛选试验[J]. 食用菌, 2015(3): 20-21.
- [5] 陈帅君, 黄亮, 王玉, 等. 棕色蘑菇菌丝液体培养基的优化[J]. 北方园艺, 2015(8): 150-152.
- [6] 毛勇. 深层发酵双孢菇胞外多糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [7] 程俊文, 贺亮, 李肖娟, 等. 响应面法优化灵芝胞外多糖的发酵工艺条件[J]. 中国林福特产, 2014(3): 1-4.
- [8] LUCIA Z, PETR B. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose[J]. Fungal Ecology, 2012, 5(5): 481-489.

## Optimizing of the Response Surface Composite Experiment in the Culture Medium of the Liquid of 'Prairie Strains No. 1'

JIAO Yingchun<sup>1</sup>, YU Mei<sup>2</sup>, QIU Dongmei<sup>1</sup>

(1. Department of Biological Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Qinghai Plateau Pharmaceutical Co. Ltd., Xining, Qinghai 810007)

**Abstract:** Taking 'Prairie Strains No. 1' as the research object, using the single factor test method and combining with the response surface composite experiment method, different nutritional factors impact on the mycelium biomass was investigated. The results showed that grassland best fermentation culture medium for the No. 1: mannitol was 29.47 g/L, peptone was 7.39 g/L, vitamin B<sub>1</sub> complex was 1.02 g/L, magnesium sulfate was 0.6 g/L, mycelium biomass was the highest, could reach 25.023 g/L, and the response surface prediction were basically identical.

**Keywords:** *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, sp; liquid strain; culture medium; the response surface composite; biomass