

文章编号:1673-1689(2005)04-0038-04

## 用 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选裂褶菌液体培养基

陈文强<sup>1</sup>, 邓百万<sup>1</sup>, 陈永刚<sup>2</sup>, 江海<sup>1</sup>, 彭浩<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001; 2. 陕西东盛生物制品有限公司, 陕西汉中 723000)

**摘要:** 用正交设计试验方法对裂褶菌(*Schinophyllum commune* Fr.)进行了液体培养基的筛选研究. 结果表明,裂褶菌液体培养基的最适配方为:马铃薯 200 g,麸皮 100 g,葡萄糖 30 g,酵母膏 1.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g,  $\text{CaCO}_3$  3 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L.

**关键词:** 裂褶菌; 正交设计; 筛选; 液体培养基

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

### Selection of Liquid Medium for *Schinophyllum commune* by $L_9(3^4)$ Orthogonal Design

CHEN Wen-qiang<sup>1</sup>, DENG Bai-wan<sup>1</sup>, CHEN Yong-gang<sup>2</sup>, JIANG Hai<sup>1</sup>, PENG Hao<sup>1</sup>

(1. Shanxi Key Laboratory of Bio-Resources, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001; 2. Shaanxi Topsun Biological Products Co. Ltd. Hanzhong 723000)

**Abstract:** This paper studied the optimal liquid medium for *Schinophyllum commune* cultivation. The results showed that the optimal liquid medium for *Schinophyllum commune* cultivation contains the following componets (in g/L): potato 200, wheat bran 100, glucose 30, yeast extract 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,  $\text{CaCO}_3$  0.1, and  $\text{VB}_1$  0.1.

**Key words:** *Schinophyllum commune*; orthogonal design; selection; liquid medium

裂褶菌(*Schinophyllum commune*)属真菌门,担子菌亚门,非褶菌目,裂褶菌科,裂褶菌属,是一种食(药)用真菌. 别名白参(云南)、树花(陕西). 子实体小型,菌盖白色至灰色,菌肉薄,白色,分布广泛. 现代医学发现,裂褶菌子实体中有机酸含量丰富,含有抗肿瘤,抗菌素增效剂和消炎的裂褶菌多糖. 民间用于治疗小儿盗汗,妇女白带增多,神经衰弱,头昏耳鸣等症;裂褶菌在食品、医药、卫生、生物化学等方面应用广泛<sup>[1]</sup>. 作者从其基本营养条件入手,用  $L_9(3^4)$  正交设计试验方法筛选出适宜裂褶

菌丝生长的液体培养基,为确立裂褶菌液体培养的条件和开发利用这一珍贵的真菌资源提供依据.

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 供试菌种 裂褶菌(*Schinophyllum commune*)由陕西省资源生物重点实验室食药菌种保藏中心提供.

#### 1.1.2 培养基

1) 母种培养基:马铃薯 200 g,麸皮 100 g,

收稿日期:2005-02-28; 修回日期:2005-03-08.

基金项目:陕西省教育厅专项科研基金(99JK109)资助课题.

作者简介:陈文强(1957-),男,陕西洋县人,理学学士,副教授.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g, 琼脂 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L.

2) 基础培养基: 马铃薯 200 g, 麸皮 100 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g,  $\text{CaCO}_3$  3 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L.

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制

1) 母种培养基配制: 用常规方法;

2) 液体培养基的配制: 试验所用的玉米粉、黄豆粉均过 40 目筛, 马铃薯、麸皮均需煮出汁, 常规方法灭菌、备用<sup>[2]</sup>.

1.2.2 菌种活化培养 试管母种接种后, 置于(28±1)℃下培养, 待菌丝长满斜面后备用.

1.2.3 菌丝体培养 以基础培养基作对照, 分别选用 5 种不同的碳源(葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、玉米粉)和 5 种不同的氮源(蛋白胨、酵母膏、

玉米浆、黄豆粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 配制成 10 种不同的培养基. 每种碳源或氮源作为一种处理, 每种处理重复 6 次<sup>[3]</sup>. 于 100 mL 三角瓶中分别加入各种液体培养基 10 mL, 高温灭菌后冷却至室温, 无菌操作条件下每瓶接入约 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的活化菌种一块, 使菌丝向上悬浮于液面, 置于培养箱中, 在(28±1)℃静置培养 8 d 至终点.

1.2.4 菌丝生物量的测定 培养后的菌丝体经过滤并用纯净水冲洗 3 次, 再用滤纸吸至不滴水, 用电子天平称重.

2 结果与分析

2.1 不同碳源培养基对裂褶菌丝生长的影响

在基础培养基中加入 3.0 g/L 蛋白胨, 再分别加入 20.0 g/L 葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、玉米粉进行碳源筛选试验, 结果见表 1.

表 1 不同碳源培养基中裂褶菌丝的生物量

Tab. 1 Mycelial mean yield in the media with different carbon sources

各重复培养基	菌丝的生物量 (g/L)				
	葡萄糖 $A_1$	可溶性 淀粉 $B_1$	蔗糖 $C_1$	乳糖 $D_1$	玉米粉 $E_1$
1	1.512 4	0.784 6	0.622 7	1.312 5	1.285 5
2	1.621 5	1.089 7	0.741 9	1.738 5	1.199 1
3	1.498 7	1.062 5	0.652 4	0.703 9	0.292 8
4	1.657 5	0.889 0	0.601 8	0.970 0	0.260 4
5	1.537 8	1.125 7	0.689 7	2.604 5	0.230 9
6	1.673 1	1.205 1	0.621 7	0.778 6	0.453 2
$\Sigma X$	9.500 0	6.156 6	3.930 2	8.100 0	3.700 0
$X_i$	1.600 0	1.000 0	0.700 0	1.400 0	0.600 0

表 1 表明, 裂褶菌对供试碳源都有不同程度的利用, 其中以葡萄糖最好, 菌丝生长速度快, 菌团大, 菌丝生物量高. 以乳糖作为碳源也显示出较高的生物量, 玉米粉居末. 裂褶菌在不同碳源液体培养基中菌丝生物量由多到少的顺序依次是葡萄糖 > 乳糖 > 可溶性淀粉 > 蔗糖 > 玉米粉. 经  $F$  值检验,  $F = S_A^2 / S_e^2 = 29.457 0$ ,  $F > F_{0.05}(2, 15)$ ,  $F > F_{0.01}(2, 15)$  重复间差异达到 1% 的显著水平<sup>[4]</sup>. 应用 LSR 分析, 结果见表 2.

表 2 表明, 5 种供试碳源对裂褶菌丝的生物量都有影响, 葡萄糖与玉米粉达到了 1% 的显著水平, 葡萄糖与蔗糖、乳糖与玉米粉、乳糖与蔗糖也达到了较为显著的水平; 蔗糖和玉米粉差异不显著. 可见裂褶菌对碳源利用程度的大小顺序依次是: 葡萄糖 > 乳糖 > 可溶性淀粉 > 蔗糖 > 玉米粉. 根据不同

碳源培养基中裂褶菌丝的生长状况和生物量, 可确定葡萄糖为最佳碳源.

表 2 不同碳源对菌丝生物量影响的差异统计表

Tab. 2 The difference of mycelial mean yield in the media with different carbon sources 单位(g/L)

项目	葡萄糖 $A_1$	乳糖 $D_1$	可溶性 淀粉 $B_1$	蔗糖 $C_1$	玉米粉 $E_1$
$X_i$	1.600 0	1.400 0	1.000 0	0.700 0	0.600 0
$X_i - E_1$	1.000 <sup>++</sup>	0.800 <sup>++</sup>	0.400 0	0.100 0	
$X_i - C_1$	0.900 <sup>0++</sup>	0.700 <sup>0++</sup>	0.300 0		
$X_i - B_1$	0.600 <sup>0++</sup>	0.400 0			
$X_i - D_1$	0.200 0				

注: ++ 差异极显著 ( $p < 0.01$ ,  $q$  检验); + 差异显著 ( $p < 0.05$ ,  $q$  检验).

## 2.2 不同氮源培养基对裂褶菌丝生长的影响

在基础培养基中加入 20 g/L 葡萄糖,再分别加

入 3 g/L 蛋白胨、玉米浆、黄豆粉、酵母膏和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  进行氮源筛选实验,结果见表 3.

表 3 不同氮源培养基中裂褶菌丝的平均生物量

Tab. 3 Mycelial mean yield in the media with different nitrogen sources

各重复培养基	菌丝的生物量 (g/L)				
	蛋白胨 $A_2$	酵母膏 $B_2$	玉米浆 $C_2$	黄豆粉 $D_2$	硫酸铵 $E_2$
1	1.446 3	1.9817	2.110 0	1.957 5	1.258 7
2	1.515 2	2.0050	1.907 5	1.897 8	1.305 6
3	1.697 0	2.4512	1.625 7	2.107 0	1.402 5
4	1.603 5	1.8758	1.797 8	2.301 5	1.451 8
5	1.657 5	2.1070	1.802 5	1.878 5	1.352 0
6	1.581 5	2.2255	1.956 1	2.088 1	1.489 0
$\Sigma X$	9.500 10	12.600 0	11.200 0	12.230 4	8.259 6
$X_i$	1.600	2.100 0	1.9000	2.000 0	1.400 0

表 3 表明,裂褶菌对供试氮源都有不同程度的利用,其中以酵母膏最好,菌丝生长速度快,菌团大,菌丝生物量高.以黄豆粉作为氮源也显示出较高的生物量,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  居末.裂褶菌在不同氮源液体培养基中菌丝生物量由多到少的顺序依次是:酵母膏>黄豆粉>玉米浆>蛋白胨> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .经  $F$  值检验,  $F = S_A^2/S_e^2 = 26.776 2$ ,  $F > F_{0.05}(4, 27)$ ,  $F > F_{0.01}(4, 27)$ .应用 LSR 分析,结果见表 4.

表 4 不同氮源对菌丝生物量影响的差异统计表

Tab. 4 The difference of mycelial mean yield in the media with different nitrogen sources 单位(g/L)

项目	酵母膏 $B_2$	黄豆粉 $D_2$	玉米浆 $C_2$	蛋白胨 $A_2$	硫酸铵 $E_2$
$X_i$	2.100 0	2.000 0	1.900 0	1.600 0	1.400 0
$X_i - E_2$	0.700 0 <sup>++</sup>	0.600 0 <sup>++</sup>	0.500 0 <sup>+</sup>	0.2000	
$X_i - A_2$	0.500 0 <sup>+</sup>	0.400 0 <sup>++</sup>	0.300 0		
$X_i - C_2$	0.200 0	0.100 0			
$X_i - D_2$	0.100 0				

++ 差异极显著 ( $p < 0.01$ ,  $q$  检验); + 差异显著 ( $p < 0.05$ ,  $q$  检验)

表 4 表明,5 种供试氮源对裂褶菌丝的生物量都有影响,其中酵母膏与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 黄豆粉与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 酵母膏与蛋白胨达到了较为显著的水平;黄豆粉和玉米浆差异不显著,原因是黄豆粉不溶于水,过滤不净,影响试验结果.各供试氮源对裂

万方数据

褶菌丝生物量影响差异程度的顺序依次是酵母膏>黄豆粉>玉米浆>蛋白胨> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .根据不同氮源培养基中裂褶菌丝的生长状况和生物量,可确定酵母膏为最佳氮源.

## 2.3 裂褶菌液体培养基成分综合试验

以葡萄糖为碳源,酵母膏为氮源,添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 马铃薯 200 g, 麸皮 100 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g,  $\text{CaCO}_3$  3 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L.对裂褶菌液体培养基进行  $L_9(3^4)$  正交试验,结果见表 5,6.

表 5 因子水平表

Tab. 5 The different level and factors

水平	葡萄糖 质量浓度/ (g/L) $A$	酵母膏 质量浓度/ (g/L) $B$	磷酸二氢钾 质量浓度/ (g/L) $C$	硫酸镁 质量浓度/ (g/L) $D$
1	10	1	3	1
2	20	3	5	2
3	30	5	7	3

表 6 表明,葡萄糖在 3 水平,酵母膏在 1 水平,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在 2 水平,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  在 1 水平菌丝生物量最高.因此,各因子的最佳水平组合为:  $A_3 B_1 C_2 D_1$ .极差分析表明:影响裂褶菌丝生物量的大小关系为  $A > D > C > B$ .所以,最终确定在该试验中裂褶菌液体培养基最佳配方为:马铃薯 200 g, 麸皮 100 g, 葡萄糖 30 g, 酵母膏 1.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g,  $\text{CaCO}_3$  3 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L.

表6  $L_9(3^4)$  正交试验结果分析Tab. 6 The analysis of result with the orthogonal test of  $L_9(3^4)$ 

培养基 编号	葡萄糖 A	酵母膏 B	磷酸二 氢钾 C	硫酸镁 D	菌丝生物量 $\Sigma(n=6)$
1	1	1	1	1	18.239 4
2	1	2	2	2	16.222 6
3	1	3	3	3	16.598 2
4	2	1	2	3	21.317 7
5	2	2	3	1	22.854 6
6	2	3	1	2	18.831 9
7	3	1	3	2	26.763 5
8	3	2	1	3	17.984 2
9	3	3	2	1	29.008 3
K1	51.060 2	66.320 6	55.055 5	70.102 3	
K2	63.004 2	57.061 4	66.548 6	61.818 0	
K3	73.756 0	64.438 4	66.216 3	55.900 1	
k1	8.510 0	11.053 4	9.175 9	11.683 7	187.820 4
k2	10.500 7	9.510 2	11.091 4	10.303 0	
k3	12.292 7	10.739 7	11.036 1	9.316 7	
R	3.782 7	1.543 2	1.915 5	2.367 0	

## 3 结 论

以裂褶菌为材料进行液体培养基的筛选<sup>[5,6]</sup>, 结论如下:裂褶菌对供试碳源都有不同程度的利用,葡萄糖利用率最高,蔗糖和玉米粉利用较差;对供试氮源也有不同程度的利用,酵母膏和黄豆粉的利用率较高,蛋白胨和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 利用较差。通过  $L_9(3^4)$  正交设计试验筛选裂褶菌液体培养基的最配方是:马铃薯 200 g,麸皮 100 g,葡萄糖 30 g,酵母膏 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{VB}_1$  0.1 g,  $\text{CaCO}_3$  3 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L,如果考虑到经济价值等因素,可用黄豆粉代替酵母膏作为氮源,其菌丝生物量不会有较大的下降。

## 参考文献:

- [1] 黄年来,杨庆尧,张甫安,等. 中国食用菌百科[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 119.
- [2] 陈文强,邓百万. 两种食用菌液体发酵培养基筛选的初步研究[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(3):22-25.
- [3] 林亲雄,陈京元. 碳源和氮源对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报,2002,9(1):9-12.
- [4] 俞渭江. 生物统计附实验设计[M]. 北京:中国农业出版社,1980. 14-228.
- [5] 赖萍,黄彦珍,林跃鑫. 巴西革耳 *Lentinus striguellus* 深层发酵的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,10(28):35-39.
- [6] 李阜棣,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 37-55.

(责任编辑:李春丽)

(上接第37页)

## 参考文献:

- [1] 张嗣良. 发酵过程多水平问题及其生物反应器装置技术研究[J]. 中国工程科学, 2001,3:37-45.
- [2] 唐军,蔡水洪,叶勤. 克鲁斯假丝酵母分批发酵生产甘油的代谢流分布[J]. 高校化学工程学报,2002,16:58-63.
- [3] Jin S, Ye K, Shimizu K. Metabolic pathway analysis of recombinant *saccharomyces cerevisiae* with a galactose-inducible promoter based on a signal flow model approach[J]. *J Biosci & Bioeng*, 1995, 80:541-551.
- [4] Takiguchi N, Shimizu H, Shioya S. An on-line physiological state recognition system for the lysine fermentation process based on a metabolic reaction model[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55:170-181.
- [5] 王树青,元英进. 生化过程自动化技术[M]. 北京:化学工业出版社,1999. 110-113.
- [6] Shimizu H, Takiguchi N, Tanaka H. A maximum production strategy of lysine based on a simplified model derived from a metabolic reaction network[J]. *Metabolic Engineering*, 1999, 1:299-308.
- [7] 杨艳,陈奎发,李春. 谷氨酰胺产生菌 NS611 的代谢流分析[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(2):38-43.
- [8] Park S M, Sinskey A J, Stephanopoulos G. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55:864-879.
- [9] Savinell J M, Palsson B O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization-I. Development of mathematical formalism [J]. *J Theor Biol*, 1992, 154:421-454.
- [10] Atkinson K. Elementary numerical analysis [M]. New York: Wiley & Johnsons, 1985.

(责任编辑:李春丽)