

# 不同装液量对金顶侧耳液体摇瓶培养的影响

吴祖峰<sup>1,2</sup>, 杨家荣<sup>1</sup>, 朱书伟<sup>3</sup>

(1. 西北农林科技大学 研究生院 陕西 杨陵 712100; 2. 河南科技大学 林学院 河南 洛阳 471003; 3. 南阳市农科所 河南 南阳 473083)

**摘 要:**以食用菌金顶侧耳为试验研究对象;用综合PDA(马铃薯 20 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3.0 g, 水 1 000 mL, pH 自然)为液体培养基;以(25±1)℃, 180 r/min 为气浴恒温振荡器的温度和振荡速率。设定了 60、80、100、120、140 mL 5 个不同的装液量。经过 7 d 的摇瓶培养, 过滤发酵液, 得到菌丝体和粗酶液。再通过测定菌丝体烘干后的生物量, 以及测定粗酶液中多酚氧化酶和漆酶活性, 得出了:装液量为 100 mL, 菌丝体烘干生物量明显大于其他装液量;装液量为 140 mL, 有利于多酚氧化酶的分泌, 酶的活力较强, 并且其活力随装液量的递增而变强。装液量为 100 mL, 有利于漆酶的分泌, 酶的活力较强, 不同装液量的菌丝生长都在第 6 天出现了高峰期, 其中以装液量为 100 mL/250 mL 时, 其菌丝球数量较多。

**关键词:**金顶侧耳; 菌丝生物量; 液体摇瓶培养; 装液量; 多酚氧化酶; 漆酶

中图分类号:S 646.1<sup>+</sup>4; S 603.6 文献标识码:A 文章编号: 1001-0009(2007)11-0209-03

金顶侧耳又名金顶蘑、玉皇蘑、黄金菇、榆黄蘑, 其子实体质脆, 菌肉肥厚, 营养丰富, 味道好。在金顶侧耳生物学特性和栽培技术研究方面有较多的研究报道, 而在液体发酵方面报道较少。研究测定了不同装液量对金顶侧耳液体摇瓶培养的影响, 现将试验结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

金顶侧耳: 河南科技大学林学院园艺研究所食用菌实验室保存提供。

### 1.2 液体培养基的配方

马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3.0 g, pH 自然。

### 1.3 磷酸缓冲液的配制

称取 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 71.64 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 制成母液 A (0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液)。同理, 称取 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 27.6 g 或 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 31.21 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 制成母液 B (0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液)。再分别吸取 12.3 mL 的母液 A 和 87.7 mL 的母液 B, 将其混匀用蒸馏水稀至 200 mL, 即可配成 pH 为 6.0 的磷酸缓冲液。

### 1.4 乙酸缓冲液的配制

吸取 0.2 mol/L 乙酸液 11.5 mL, 将其稀释至

1 000 mL, 制成母液 A (0.2 mol/L 乙酸液)。称取 C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na 16.4 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 制成母液 B (0.2 mol/L 乙酸钠溶液)。再分别吸取 25.5 mL 的母液 A 和 24.5 mL 的母液 B, 将其混匀用蒸馏水稀至 100 mL, 即可配成 pH 为 4.6 的乙酸缓冲液。

### 1.5 液体菌种培养

将配制好的液体培养基分装于 100 mL/250 mL 三角瓶(瓶内提前放入玻璃珠)中。灭菌冷却后, 于净化工作台上接入已经纯化的直径为 0.5 cm, 菌龄 7 d 的平板菌种 3 片。然后将其放入(25±1)℃的恒温培养箱中静止 24 h, 再置入(25±1)℃ 180 r/min 气浴恒温振荡器上振荡培养 7 d。

### 1.6 液体摇瓶培养

将液体培养基按不同装液量梯度(60、80、100、120、140 mL)分别装入 250 mL 的三角瓶(瓶内提前放入玻璃珠)中。灭菌冷却后, 于净化工作台上接入体积分数为 5% 的液体菌种。然后放在(25±1)℃, 220 r/min 气浴恒温振荡器内振荡培养 7 d, 设 3 个重复。

### 1.7 菌丝球个数的计数

将三角瓶放入气浴恒温振荡器中培养, 次日下午 2 时开始, 每隔 24 h 在净化工作台上逐瓶精确提取 1 mL。在显微镜下, 用血数计数板进行菌丝球的计数。

### 1.8 菌丝生物量的测定

将发酵液用 60 目铁丝网过滤, 滤液备用。菌丝体用蒸馏水冲洗 2 次, 取出玻璃珠后, 全部转移到烘干的培养皿中。后放入 65℃ 恒温鼓风干燥箱内干燥至恒重。用电子天平称重、记录。计算公式: 菌丝生物量(g/100 mL) = 菌丝干重(g) / 发酵液体积(mL) × 100。

第一作者简介: 吴祖峰(1969-), 河南罗山县人, 本科, 西北农林科技大学在读硕士, 讲师, 主要从事食用菌生物学特性及栽培技术教学与研究工作, 现为河南科技大学林学院教师。

收稿日期: 2007-06-18

1.9 粗酶液的制备

将滤液,在离心机上以 10 000 r/min 的转速,离心 10 min。取其上清液备用即可。

1.10 多酚氧化酶活性的测定

吸取粗酶液 0.1 mL,分别加入 pH 6.0 的磷酸缓冲液 3.4 mL,10 mmol/L 邻苯二酚 0.5 mL,充分摇匀。放入水温是 30℃的水浴锅中水浴 30 min,取出。在波长为 400 nm 处测其 OD 值并记录,设 3 个重复。以沸水灭活处理(10 min)的酶液为对照。直接以 OD 值表示酶活力。

1.11 漆酶活性的测定

吸取粗酶液 0.1 mL,分别加入 pH 4.6 的磷酸缓冲液 3.4 mL,邻联甲苯胺 0.5 mL。充分摇匀。放入水温是 30℃的水浴锅中水浴 30 min,取出。在波长为 600 nm 处测其 OD 值并记录,设 3 个重复。以沸水灭活处理(10 min)的酶液为对照。直接以 OD 值表示酶活力。

2 结果与分析

2.1 不同装液量下每天菌丝球生长情况

金顶侧耳菌丝体经过 7 d 的摇瓶培养后,不同装液量下每天菌球个数的变化情况如表 1。在该试验中,菌丝球的峰值都出现在第 6 天;在峰值期时,装液量 100 mL 的每毫升菌丝球个数相对而言高于其他组;第 1~5 天菌丝球个数增加的幅度都比较大,第 5~6 天增加的幅度小一些,第 6 天达到高峰值,第 6~7 天开始缓慢减小;装液量为 100 mL 时,其菌丝球在第 1 天至第 6 天,增加的幅度比其他组相对大一些;而且在高峰值期时,其每毫升菌球个数比较多(见表 1)。

表 1 不同装液量下菌丝球个数与天数的关系

装液量 /mL	天数 个/mL						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
60	28	67	104	285	347	478	403
80	37	81	145	343	448	534	464
100	45	94	173	412	594	673	607
120	51	106	216	341	421	517	453
140	57	118	196	356	417	509	435

2.2 装液量对菌丝生长的影响

金顶侧耳菌丝体经过 7 d 的摇瓶培养后,菌丝生长情况(表 2)。在该试验中,装液量为 100 mL/250 mL 时菌丝生物量较大,80 mL/250 mL 次之。该试验中,当装液量从 60~100 mL 间,菌丝生物量随着装液量的增加而呈递增趋势,其中 60 mL 时为 5 组中烘干菌丝生物量较小的组,在 60~80 mL 间的递增幅度比 80~100 mL 间的幅度较大些;当装液量为 100 mL 时,烘干菌丝生物量达到高峰值;当装液量超过 100 mL 时,烘干菌丝生物量随着装液量的增加而减小(见表 2)。

2.3 装液量对多酚氧化酶活力的影响

金顶侧耳菌丝体经过 7 d 的摇瓶培养后,测其粗酶液的多酚氧化酶活力情况。在试验中,装液量为 60 mL 时多酚氧化酶活力较强,装液量为 140 mL 时活力较弱。该试验中,装液量在 60~100 mL 之间,多酚氧化酶活力增强幅度比较大,而 100~140 mL 之间,其活力增强的幅度较小。因此随着装液量的增加,多酚氧化酶的活力也逐渐增加(见表 3)。

表 2 不同装液量对菌丝生长的影响

装液量/mL	发酵液体积/mL	菌丝干重/g	菌丝生物量/g·(100mL)-1(均值)
60	45	0.25	0.576
	45	0.26	
	47	0.28	
80	63	0.44	0.734
	65	0.48	
	64	0.49	
100	84	0.65	0.783
	85	0.68	
	85	0.66	
120	102	0.72	0.707
	103	0.73	
	106	0.75	
140	125	0.81	0.676
	124	0.84	
	125	0.85	

表 3 不同装液量对多酚氧化酶分泌的影响

	60 mL	80 mL	100 mL	120 mL	140 mL
I	0.047	0.184	0.298	0.336	0.353
II	0.045	0.203	0.309	0.330	0.360
III	0.047	0.193	0.291	0.327	0.357
平均值	0.046	0.193	0.299	0.333	0.357

2.4 装液量对漆酶活力的影响

金顶侧耳菌丝体经过 7 d 的摇瓶培养后,测其粗酶液的漆酶活力情况。装液量为 100 mL 时漆酶活力较强,140 mL 时活力较弱。装液量在 60~100 mL 之间,漆酶活力呈递增趋势,而在 100~140 mL 之间,其活力递减。并且装液量为 60~80 mL 时的酶活力比 120 mL 和 140 mL 的较大(见表 4)。

表 4 不同装液量与对漆酶分泌的影响

	60 mL	80 mL	100 mL	120 mL	140 mL
I	0.387	0.476	0.546	0.374	0.295
II	0.413	0.473	0.559	0.377	0.302
III	0.420	0.470	0.561	0.376	0.311
平均值	0.407	0.473	0.555	0.376	0.306

3 结论

3.1 5 种装液量每毫升的菌丝球个数都随着培养时间的增加而增加。相同的时间和条件下,能培养出较多的液体菌种,将为实际生产节约原料。由于试验选用的三角瓶为 250 mL,200 mL 和 500 mL 的情况尚待研究。同时由于金顶侧耳菌丝球大小不一,有的直径比 10 mL 的移液管的内径还大,以实验室现有的条件尚无好的提取仪器,这就造成了提取的障碍和误差。根据现有条件改

装 1.5 mL 离心管, 制成一个提取装置, 在一定程度减小了误差。

3.2 烘干菌丝生物量以 100 mL/250 mL 为中心, 向两边递减。这说明金顶侧耳菌丝体对溶氧有较高的要求。但是 60 mL 装液量组因为振荡较为剧烈, 反而影响了菌丝的正常生长。说明装液量的不同, 其菌丝生长也不同(用菌丝生物量衡量)。由于确定生物量对液体培养很重要, 试验的结果对现实生产有一定的参考价值。至于其他型号的三角瓶培养情况如何以及每天都测定其生物量, 尚待进一步研究。在进行过滤试验中, 用传统的过滤方法(用几层纱布)会造成一些菌丝体粘在纱布上, 使每毫升菌丝生物量减少。通过预示试验的摸索与寻找, 觉得用 60 目的钢丝网过滤效果比较好一些, 至于还有没有更好的方法, 需要进一步试验。

3.3 通过对培养液多酚氧化酶活力的测定可知, 随着装液量的增加, 其活力呈递增趋势。间接的证明了“金顶侧耳菌丝体对溶氧有较高的要求”的结论。这个测定为该菌种的液体培养提供一个参考数据。

3.4 漆酶活力测定结果表明: 漆酶活力以 100 mL/250 mL 为中心, 分别向两边递减, 表明装液量对漆酶活力有

较大的影响。该测定也为金顶侧耳液体培养提供一些参考。

总之, 整个试验结果表明: 当装液量 100 mL/250 mL 时, 该菌种生长较好, 可做为金顶侧耳菌种液体培养适宜的装液量(三角瓶为 250 mL)。

参考文献

[ 1 ] 王谦, 闫蕾蕾, 王永利 等. 金顶侧耳的深层液体培养及相关检测[ J ]. 菌物系统, 2002 21(1): 102-106.

[ 2 ] 金宗瀛, 周宗俊. 榆黄蘑发酵液的抗衰老研究[ J ]. 北京联合大学学报(自然版), 1991, 5(2): 8-12.

[ 3 ] 金建康. 鉴定侧耳属种的方法-胞外漆酶同工酶和单胞配对亲和性测定[ J ]. 江苏农业学报, 1994, 10(3): 11-17.

[ 4 ] 张桂春, 李绍龙, 王淑芳, 等. 金顶侧耳液体培养基的优化筛选[ J ]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006(3): 349-353.

[ 5 ] 王谦, 闫蕾蕾, 王永利 等. 金顶侧耳的深层液体培养及相关检测[ J ]. 菌物系统, 2002(1): 102-106.

[ 6 ] 闫蕾蕾, 王谦. 金顶侧耳菌丝体提取物的动物免疫增强功能初探[ J ]. 中国食用菌, 2002(1): 38-39.

[ 7 ] 张影, 包海鹰, 李玉. 珍贵食药菌金顶侧耳研究现状[ J ]. 吉林农业大学学报, 2003(1): 54-57.

[ 8 ] 聂宗平, 陈明雪, 杨发琴, 等. 金顶侧耳菌丝营养特性初步研究[ J ]. 食用菌, 2005(6): 8-9.

Effects of Different Volume of Medium to the *Pleurotus Citrinileatus* Culture with Shake Flask

WU Zu-feng<sup>1, 2</sup>, YANG Ja-rong<sup>1</sup>, ZHU Shu-wei<sup>3</sup>

(1. Northwest Agriculture and Forestry Science and Technology University, Shannxi, Yanglin 712100, China; 2. Henan University of Science and Technology, Henan, Luoyang 471003, China; 3. Agricultural Institute of Nanyang, Henan, Nanyang 473083, China)

**Abstract:** In this study *pleurotus citrinopileatus* were collected as material; General PDA (potato 20 g, 20 g glucose, magnesium sulfate 1.5 g, 3.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, water 1000 mL, PH natural) for the testing of liquid growth media; To (25±1)℃, 180 r/min oscillator for gas bath thermostatic temperature and vibration rate. 60 mL, 80 mL, 100 mL, 120 mL, 140 mL set of five different loading liquid volume. After seven days of training if bottles, fermentation liquid filtration, and has been hypha rough enzyme fluid. Through the measurement hypha drying after biomass, and measurement of liquid crude enzyme Polyphenol oxidase and paint Meihuo nature drawn: (1) the volume of 100 mL with liquid, hypha drying biomass significantly greater than other quantity; (2) to 140 mL volume with liquid, the secretion conducive Polyphenol oxidase, the enzyme active strong. With its installed capacity and the incremental and reactive change strong. (3) with the volume of 100 mL liquid, the secretion conducive to paint enzyme, the enzyme active stronger. At the same time the ball started to mycelium observation that; in seven days if bottles training process, different equipment mycelium growth in the volume of liquid, six days after a peak, with the volume of liquid for 100mL/250mL installed, the mycelium ball that sinks more.

**Key words:** *Pleurotus citrinopileatus* sing; Mycelium biomass; Submerged culture; With the volume of liquid; *Polyphenol oxidase*; *Laccase*