

白灵菇液体培养工艺研究

唐玉琴

(吉林农业科技学院 生物工程系, 吉林 吉林 132101)

摘要: 研究通过各种试验方法确定出白灵菇液体培养最适的碳源、氮源和培养条件, 为白灵菇菌种的液体培养提供科学依据。

关键词: 白灵菇; 液体培养; 正交试验

中图分类号: S 646.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0240-03

白灵菇(*Pleurotus ferulae*)又名白灵侧耳、阿魏侧耳等。其子实体脆嫩可口, 香味浓郁, 营养价值高。据测定, 其中蛋白质含量为 14.7%、脂肪 4.31%、粗纤维 15.4%、碳水化合物 43.2%、灰分 4.8%, 且含有人体必需的 8 种氨基酸、维生素及多种有益于健康的矿物质元素, 是一种珍稀的天然保健食品^[1-3]。并具有消积、杀虫、镇咳、消炎、防止妇科肿瘤等药效。现代药理学表明, 白灵菇中所含的真菌多糖能增强人体免疫功能, 是一种食药兼具的优质食用菌^[3,4]。液体浅层培养技术比传统的食用菌生产方式有明显的优越性, 在短时间内能产生大量菌丝体和代谢产物。目前对白灵菇的研究主要集中在固体培养方面, 对白灵菇浅层培养研究很少, 更没有把白灵菇液体浅层培养应用到生产中, 只停留在实验室阶段, 该研究对白灵菇液体浅层培养工艺进行初步研究, 旨在为白灵菇进一步开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 白灵菇由吉林农业科技学院食用菌实验室提供。

1.1.2 主要仪器 HZQ-X100 型恒温振荡培养箱(哈尔滨市东明有限公司); BCM-1000 型净化工作台(苏州生产); pH 8000(EUTECH 公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); 不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器(上海申安仪器有限公司)。

1.1.3 培养基 斜面综合培养基: 马铃薯 20%, 琼脂 2%, 葡萄糖 2%, 麦麸 5%, 蛋白胨 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.15%, VB_1 10 mg/L。按比例称量, 拌匀, 分装于试管, 灭菌, 接种, 在 25℃条件下培养 8 d。种子液体培养基: 玉米粉 3%, 麦麸 2%, 葡萄糖 2%, 蛋白

胨 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, VB_1 10 mg/L, 豆油 0.03%。碳源供试培养基: 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.1%, 豆油 0.03%, VB_1 0.01%。再分别加入各种碳源。氮源供试培养基: 蛋白胨 0.5%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.1%, 豆油 0.03%, VB_1 0.01%, 再分别加入各种氮源。

1.2 培养方法

取 250 mL 的三角瓶装培养基 100 mL, 在 1.5 kg/cm², 灭菌 30 min, 冷却后, 在无菌条件下将斜面菌种切割成小块, 接种到液体种子培养基的三角瓶中, 每支斜面接 4 瓶, 在 25℃条件下静置 24 h, 再置于恒温振荡器中, 25℃条件下培养, 转速为 180 r/min, 培养 8 d。以此作为液体培养基的液体菌种, 以 10%的接种量转接新摇瓶, 直接放在恒温振荡器中, 转速为 180 r/min, 在 25℃条件下, 培养 6 d。

1.3 检测方法

1.3.1 生物量的测定 采用细胞干重法^[5,7], 取 5 mL 的培养液, 40 目过筛, 菌丝体经蒸馏水充分洗涤, 80℃真空干燥至恒重, 电子天平准确称重, 生物量(kg/m³) = (DCB/V) × 106, 其中 DCB: 细胞干重(kg), V: 取样体积(mL)。

1.3.2 pH 的测定 取培养液 5 mL, 采用便携式 pH 计直接测量。

2 试验因素

2.1 碳源选择的单因素试验

碳源是液体培养基的基础, 它既是细胞结构的重要组成部分, 又是菌体产生各种代谢产物和细胞内贮藏物质的主要原料。在研究中, 选葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、玉米粉、山梨醇等碳源进行单因素试验, 确定出合适的碳源。

2.2 氮源选择的单因素试验

氮源是食用菌细胞合成蛋白质和核酸必不可少的主要原料, 在浅层培养过程中起着非常重要的作用。在研究中, 选黄豆粉、蛋白胨、麦麸、尿素、硝酸钾、硫酸铵等

作者简介: 唐玉琴(1964), 女, 吉林德惠人, 教授, 从事微生物及食用菌的研究及开发。E-mail: swgcldl@126.com。

收稿日期: 2007-07-20

氮源进行单因素试验,确定出合适的氮源。

2.3 培养基最佳碳、氮源的选择

根据不同碳、氮源选择单因素试验的结果,选择较好的碳、氮源各2个为试验因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,配制9种培养基,以菌丝生物量为指标,每个试验组3次重复,取平均值。

2.4 培养条件的选择

为确定最佳培养条件,在研究中,选pH、转速、装液量、接种量等4因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以菌丝生物量为指标,每组试验重复3次。

3 结果与分析

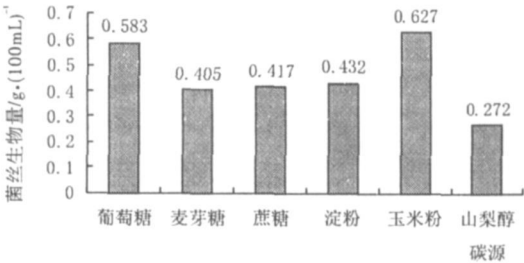


图1 不同碳源对白灵菇生物量的影响

选黄豆粉、蛋白胨、麦麸、尿素、硝酸钾、硫酸铵等氮源进行单因素试验,不同氮源对白灵菇菌丝生物量的影响见图2。从图2可以看出,白灵菇对无机氮的利用不佳,其中以黄豆粉作为氮源时,菌丝生物量最高,蛋白胨次之,从经济方面考虑,黄豆粉作为农产品来源方便,具有成本低廉等特点,同时蛋白胨作为生长因素有利于菌丝的生长,缩短培养周期,因此,选择黄豆粉和蛋白胨作为氮源进行碳、氮源选择的正交试验。

3.3 培养基碳、氮源最佳组合的确定

表1 碳、氮源正交试验设计				
因素	A: 葡萄糖/ %	B: 玉米粉/ %	C: 蛋白胨/ %	D: 黄豆粉/ %
1	1.0	2.0	0.2	1.0
2	1.5	2.5	0.3	2.0
3	2.0	3.0	0.4	3.0

表2 碳、氮源正交试验结果					
序号	A: 葡萄糖 / %	B: 玉米粉 / %	C: 蛋白胨 / %	D: 黄豆粉 / %	生物量 / g · (100mL) ⁻¹
1	1	1	1	1	1.215
2	1	2	2	2	1.427
3	1	3	3	3	1.438
4	2	1	2	3	1.569
5	2	2	3	1	1.386
6	2	3	1	2	1.781
7	3	1	3	2	1.526
8	3	2	1	3	1.613
9	3	3	2	1	1.398
K1	1.360	1.437	1.536	1.333	
K2	1.579	1.475	1.465	1.578	
K3	1.512	1.539	1.450	1.540	
R	0.219	0.102	0.086	0.245	

3.1 不同碳源对白灵菇菌丝生物量的影响

选葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、玉米粉、山梨醇等碳源进行单因素试验,不同碳源对白灵菇菌丝生物量的影响见图1。由图1可知,白灵菇对碳源的要求并不苛刻,既能利用成分复杂的复合碳源,也能利用单糖和双糖等小分子碳源,以玉米粉作碳源,菌丝生物量最高,葡萄糖次之,山梨醇最小,葡萄糖作为一种速效碳源,可被菌体直接利用,能够缩短延迟期。因此,选择玉米粉和葡萄糖作为碳源进行碳、氮源选择的正交试验。

3.2 不同氮源对白灵菇菌丝生物量的影响

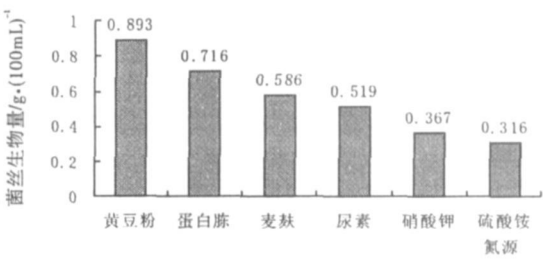


图2 不同氮源对白灵菇菌丝生物量的影响

表3 碳、氮源正交试验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F比	F 临界值	显著性
A: 葡萄糖/ %	0.075	2	5.172	4.320	*
B: 玉米粉/ %	0.016	2	1.103	4.320	
C: 蛋白胨/ %	0.013	2	0.897	4.320	
D: 黄豆粉/ %	0.104	2	7.172	4.320	*
误差	0.03	4			

由表2可知,不同组合之间菌丝生物量是不同的,各因素不同水平的最佳组合为 $A_2B_3C_1D_2$,从图3可以看出,在各因素中,主次因素为黄豆粉>葡萄糖>玉米粉>蛋白胨,由表3可以看出,葡萄糖、黄豆粉加入量对菌丝生物量有着极其显著的影响,玉米粉、蛋白胨的加入量对菌丝生物量影响不明显,所以确定培养基最适合组合为 $A_2B_3C_1D_2$,即葡萄糖1.5%,玉米粉3%,蛋白胨0.2%,黄豆粉2%。

3.4 培养条件的确定

基础液体培养基中的葡萄糖分别以玉米粉、可溶性淀粉、麦芽糖、蔗糖、山梨醇为取代物进行碳源单因素试验;以黄豆粉、麦麸、尿素、硝酸钾、硫酸铵取代基础液体培养基中的蛋白胨,其添加量根据各自的氮含量相对于0.5%蛋白胨的全氮量折合而成。玉米粉、黄豆粉、麦麸均煮汁,四层纱布过滤。根据不同碳、氮源对白灵菇菌丝生物量的影响单因素试验的结果,选择较好的碳源(葡萄糖、玉米粉)、氮源(蛋白胨、黄豆粉)的添加量为试验因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以菌丝生物量为指标,确定培养基碳、氮源最佳组合。正交试验设计见表1,结果见表2,方差分析见表3,极差分析趋势见图3。

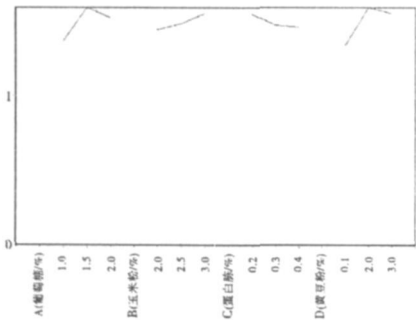


图3 碳、氮源正交试验极差分析趋势图

试验中,选 pH、转速、装液量、接种量等 4 因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以菌丝生物量为指标,确定最佳培养条件。正交试验设计见表 4,结果见表 5,方差分析见表 6,极差分析趋势见图 4。

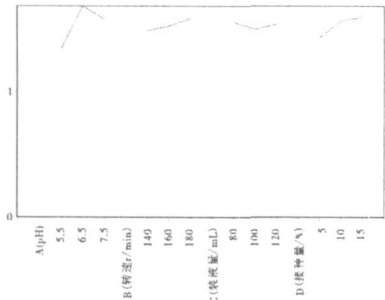


图4 培养条件正交试验极差分析趋势图

表 4 培养条件正交试验设计

水平	因素	A: pH	B: 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	C: 装液量/mL	D: 接种量/%
1		5.5	140	80	5
2		6.5	160	100	10
3		7.5	180	120	15

表 5 培养条件正交试验结果

序号	A: pH	B: 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	C: 装液量/mL	D: 接种量/%	生物量/ $g \cdot (100mL)^{-1}$
1	1	1	1	1	1.215
2	1	2	2	2	1.327
3	1	3	3	3	1.458
4	2	1	2	3	1.669
5	2	2	3	1	1.583
6	2	3	1	2	1.792
7	3	1	3	2	1.576
8	3	2	1	3	1.653
9	3	3	2	1	1.498
X1	1.333	1.487	1.553	1.432	
X2	1.681	1.521	1.498	1.565	
X3	1.576	1.583	1.539	1.593	
R	0.348	0.096	0.055	0.161	

由表 5 可知,不同的培养条件菌丝生物量是不同的,各因素不同水平的最佳组合为 $A_2 B_3 C_1 D_2$,从图 4 可以看出,在各因素中,主次因素为 $pH > \text{接种量} > \text{转速} > \text{装液量}$,由表 6 可以看出, pH 值对菌丝生物量有着极其显著的影响,接种量、转速、装液量对菌丝生物量影响不明显,所以确定培养基最适合组合为 $A_2 B_3 C_1 D_2$,即 pH 6.5,接种量 10%,转速 180 r/min,装液量为 80 mL。

表 6 培养条件正交试验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A: pH	0.191	2	8.953	3.460	*
B: 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	0.014	2	0.656	3.460	
C: 装液量/mL	0.005	2	0.234	3.460	
D: 接种量/%	0.045	2	2.109	3.460	
误差	0.06	6			

4 结论

通过碳源选择的单因素试验,得出适合白灵菇液体培养的碳源是玉米粉和葡萄糖。

通过氮源选择的单因素试验,得出适合白灵菇液体培养基的氮源是黄豆粉和蛋白胨。

通过培养基最佳碳、氮源的选择,得出最佳碳、氮源组合为玉米粉 3%,葡萄糖 1.5%,黄豆粉 2%,蛋白胨 0.2%。

通过培养条件的选择,得出最佳培养条件为摇瓶装液量 80 mL/250mL,接种量 10%,pH 为 6.5,摇瓶转速 180 r/min,在 25℃培养 8 d。

参考文献

[1] 潘崇环.珍稀食用菌栽培与名贵野生菌的开发利用[M].北京:中国农业出版社,2006:120.
[2] 王世东.食用菌[M].北京:中国农业大学出版社,2005:254-255.
[3] 秦俊哲.食用菌栽培学[M].西北农林科技大学出版社,2003:245.
[4] 董洪新.白灵菇液体培养条件研究初报[J].生物技术通报,2004(5):48-51.
[5] 蔺银鼎,马艳弘.竹荪液体培养基优化配方筛选及培养基营养变化特性的研究[J].食用菌学报,2000(7):18-24.
[6] 陈石良.灰树花富硒培养研究[J].食用菌学报,2000(7):27-31.
[7] 李阜楙,胡正嘉.微生物学[M].中国农业出版社,2002.
[8] 朱戎,陈向,东兰进.药用真菌液体发酵研究进展[J].中药材,2003,26(1):55-57.
[9] 张长青,王红英,张健民,等.适宜白灵菇菌丝生长条件的研究[J].特产研究,2003,25(4):12-14.
[10] 张红伟.白灵菇栽培新技术[J].中国食用菌,2002,21(2):26-27.
[11] 宋爱荣.pH 对灰树花液体深层发酵的影响[J].中国食用菌,1999(8):26-31.

Technology of Liquid Culture about *Pleurotus ferulae*

TANG Yu-qin

(Jilin Agricultural Technology College Department of Bioengineering, Jilin 132101, China)

Abstract: Used various experimental methods to determined the best carbon、nitrogen and conditions about liquid culture from *Pleurotus ferulae*. It could provide the scientific basis for liquid culture from *Pleurotus ferulae*.

Key words: *Pleurotus ferulae*; Liquid culture; Orthogonal experiment