

香菇液体培养的工艺研究

秦秀丽

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要: 运用单因素对比试验和正交试验, 对香菇液体培养基的碳、氮营养源以及最佳配方和培养条件进行了优化研究, 筛选出最佳碳源为麦芽糖, 最佳氮源为麸皮, 确定最佳培养基配方为麸皮 80%、麦芽糖 3%、 MgSO_4 0.15%、 KH_2PO_4 0.1%; 最佳培养条件为 pH 值 5.5, 摇瓶装液量 100 mL/250 mL, 接种量 15%, 摇瓶转速 160 r/min。该研究为香菇液体发酵生产提供借鉴和理论依据。

关键词: 香菇; 液体培养; 培养基; 正交试验

中图分类号: S 646.1⁺2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0227-03

香菇是著名的食药两用菌, 其香味浓郁, 营养丰富, 具有较高的药用价值。据分析其菌体内蛋白质的含量为 18.6%, 脂肪 4.8%, 碳水化合物 71%, 粗纤维 9.6%, 并且含有人体必需的 8 种氨基酸, 以及多种维生素和矿物质元素^[1]。能够增强机体免疫力, 预防和治疗多种疾病, 具有防癌、抗癌和降血压、降胆固醇以及促进钙质吸收等功效^[2], 是集营养、保健、药用于一身保健食品。目前香菇生产普遍采用的固体代料栽培, 其生产周期长, 工艺繁琐, 需投入大量的人力、物力。液体培养具有生产周期短, 菌丝生长快, 短时间能够得到大量的菌丝体和代谢产物, 并适于工厂化生产等特点^[3], 可以利用其菌丝体及发酵液生产保健品和提取有效成分, 是发展香菇生产的一条崭新途径。而进行液体发酵生产最关键的是所用的液体培养基的配方是否优良, 培养条件是否适宜, 它直接决定着香菇菌丝体的生长和代谢产物的形成, 而目前这方面的研究还很少。为此, 对香菇液体浅层培养工艺进行初步研究, 旨在为香菇液体发酵生产提供借鉴和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 供试香菇试管菌种由吉林农业科技学院食用菌实验室提供。

1.1.2 主要仪器和设备 AIR-TECH 超净工作台(苏净集团安泰公司); LRH-150B 生化培养箱(广东省医疗器械厂); HZQ-X100 型恒温振荡培养箱(哈尔滨市东明有限公司); YXQ-SG41.280 电热手提式压力蒸汽灭菌

锅(上海生银医疗仪器仪表厂); 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 以及试管和三角瓶等常用玻璃仪器。

1.1.3 试剂 葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 为分析纯; 蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、可溶性淀粉、琼脂为生化试剂; 黄豆芽、玉米粉、麦麸为食品级。

1.1.4 培养基 菌种活化培养基斜面加富 PDA 培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.15%, 琼脂为 2%。常规方法灭菌处理后备用。种子液体培养基: 马铃薯 20%, 酵母膏 2%, 葡萄糖 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, KH_2PO_4 0.1%, pH 值 6.0。碳源供试培养基: 酵母膏 1%、 MgSO_4 0.15%、 KH_2PO_4 0.1%、pH 值 6.0, 分别加入供试碳源。氮源供试培养基: 麦芽糖 3%、 MgSO_4 0.15%、 KH_2PO_4 0.1%、pH 值 6.0, 分别加入各种供试氮源。

1.2 方法

1.2.1 供试菌种的活化 在无菌条件下, 用接种铲从香菇试管菌种上切取 1 cm² 的菌块接种至菌种活化培养基上, 25℃ 恒温培养 10 d, 挑选菌丝洁白、粗壮、浓密、无污染的斜面试管作为供试菌种。

1.2.2 液体菌种的制备 取 100 mL 种子液体培养基装入 250 mL 的三角瓶中, 灭菌后在无菌条件下接入 0.5 cm² 香菇斜面菌种 4 块, 放入振荡培养箱中, 在 25℃ 下静止培养 24 h, 然后在转速为 160 r/min, 温度为 25℃ 的条件下, 振荡培养 12 d 时终止培养^[4], 得到液体菌种。

1.2.3 培养方法 分别取供试培养基 100 mL, 装入 250 mL 的三角瓶中, 灭菌后在无菌条件下, 以 10% 的接种量接入液体菌种, 置于振荡培养箱中, 在 25℃ 条件下, 转速为 160 r/min, 振荡培养 12 d 终止培养。

1.2.4 菌丝干重的测定 将培养液用 100 目的滤网过滤, 取菌丝体, 然后用蒸馏水冲洗 3 遍, 放在已烘干与称

作者简介: 秦秀丽(1966-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为微生物和食药两用菌, 现从事微生物及食药两用菌的教学及科研工作。E-mail: qinxuili88@126.com。

收稿日期: 2009-01-27

重的培养皿上,放入干燥箱中,在 80℃下烘干至恒重,然后用电子天平称取菌丝体干重(生物量)^[5]。

表 1 不同碳源的水平 %

水平	玉米粉	可溶性淀粉	麦芽糖	葡萄糖	蔗糖
1	2	2	1	1	1
2	4	4	2	2	2
3	6	6	3	3	3

1.2.5 碳、氮营养源的筛选试验 在碳源和氮源供试培养基中,分别加入不同的供试碳源和氮源进行单因素对比试验,供试碳源为玉米粉、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖,供试氮源为麦麸、黄豆芽、酵母膏、蛋白胨、NH₄NO₃,每个处理设 3 个水平(见表 1、2),每个水平重复 3 次。该试验所用的玉米粉和麦麸先用水浸泡

30 min,再用水煮沸 5 min,用 6 层纱布过滤取滤液;黄豆芽用水煮沸 20 min,再用 4 层纱布过滤取滤液。

表 2 不同氮源的水平 %

水平	麦麸	黄豆芽	酵母膏	蛋白胨	NH ₄ NO ₃
1	40	40	1	1	0.2
2	60	60	2	2	0.5
3	80	80	3	3	1

1.2.6 香菇液体培养基最佳配方的筛选试验 根据碳、氮源筛选试验的结果,以选出的最佳碳、氮源以及无机盐(MgSO₄·KH₂PO₄)为试验因素,设计 L₉(3⁴)正交试验(见表 3),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。

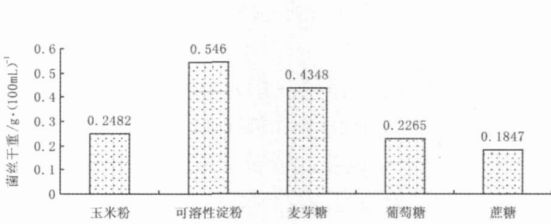


图 1 不同碳源对香菇菌丝生物量的影响

表 3 液体培养基正交试验因素及水平 %

因素	A: 麸皮	B: 麦芽糖	C: MgSO ₄	D: KH ₂ PO ₄
水平				
1	40	1	0.1	0.1
2	60	2	0.15	0.15
3	80	3	0.2	0.2

1.2.7 培养条件的筛选试验 以筛选出的最佳配方为培养基,以装液量、pH 值、接种量、转速为因素,设计 L₉(3⁴)正交试验(见表 4),以菌丝生物量为指标,每组试验重复 3 次,确定最佳培养条件。

表 4 培养条件正交试验因素及水平

因素	A: 装液量/mL	B: pH 值	C: 接种量/%	D: 转速/(r · min ⁻¹)
水平				
1	100	4.5	10	140
2	120	5.5	15	160
3	140	6.5	20	180

2 结果与分析

2.1 不同碳源对香菇菌丝生物量的影响

由图 1 可知,不同碳源对香菇菌丝生物量影响是不同的。香菇菌丝对小分子的有机碳源的利用效果较好,以麦芽糖作为碳源时,菌丝生物量最大,葡萄糖次之;香菇菌丝对可溶性淀粉的利用最差。因此,通过试验筛选出适合香菇菌丝生长的最佳碳源为麦芽糖,其次为葡萄糖。

2.2 不同氮源对香菇菌丝生物量的影响

由图 2 可知,香菇菌丝对有机氮源的利用较好,对

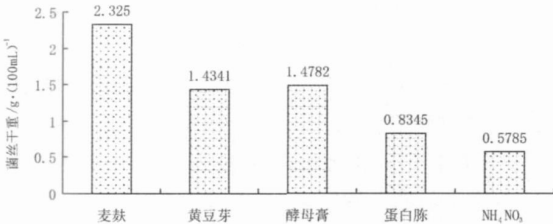


图 2 不同氮源对香菇菌丝生物量的影响

无机氮源 NH₄NO₃的利用最差。而以麦麸作为氮源时,菌丝生物量最高,豆芽汁、酵母膏次之,再次是蛋白胨。从经济方面考虑,豆芽汁与酵母膏相比,具有来源广泛、价格低廉等特点,因此,通过试验筛选出适合香菇菌丝生长的最佳氮源为麦麸,其次为豆芽汁。

2.3 液体培养基最佳配方的确定

由表 5 可知,不同组合之间香菇菌丝生物量是不同的,以 A3B3C2D1 组合的生物量最高。从表 5、图 3 可以看出,影响香菇菌丝生长的主次因素排序为麸皮>麦芽糖>KH₂PO₄>MgSO₄,所以,培养基最适合组合为 A3B3C2D1,即培养基的最佳配方为麸皮 80%、麦芽糖 3%、MgSO₄ 0.15%、KH₂PO₄ 0.1%。

表 5 液体培养基正交试验结果

序号	A: 麸皮/%	B: 麦芽糖/%	C: MgSO ₄ /%	D: KH ₂ PO ₄ /%	菌丝干重 / (g · (100mL)⁻¹)
1	1	1	1	1	0.347
2	1	2	2	2	0.435
3	1	3	3	3	0.472
4	2	1	2	3	1.528
5	2	2	3	1	1.770
6	2	3	1	2	1.948
7	3	1	3	2	1.696
8	3	2	1	3	2.341
9	3	3	2	1	2.738
\bar{X}_1	0.418	1.19	1.55	1.63	
\bar{X}_2	1.748	1.515	1.57	1.45	
\bar{X}_3	2.273	1.719	1.31	1.35	
R	1.855	0.529	0.25	0.28	

2.4 培养条件的确定

由表 6 可知,在不同的培养条件下菌丝生物量是不同的,以 A1B2C2D2 组合的生物量最高。从表 6 和图 4 可以看出,影响香菇菌丝生长的主次因素排序为 pH 值>接种量>装液量>转速。所以,确定培养条件最适合组合为 A1B2C2D2,即装液量为 100mL/ 250mL, pH 值 5.5,接种量 15%,转速 160 r/ min。

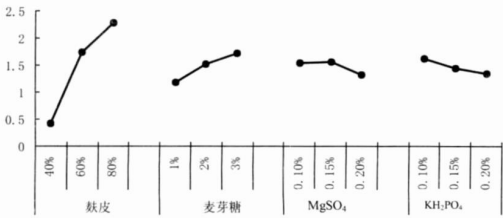


图 3 液体培养基正交试验极差趋势图

表 6 培养条件正交试验结果					
序号	A _i 装液量/ mL	B _i pH 值	C _i 接种量/ %	D _i 转速/ r · min ⁻¹	菌丝干重 / g · (100mL) ⁻¹
1	1	1	1	1	2.280
2	1	2	2	2	3.445
3	1	3	3	3	2.732
4	2	1	2	3	2.594
5	2	2	3	1	2.741
6	2	3	1	2	2.348
7	3	1	3	2	2.425
8	3	2	1	3	2.712
9	3	3	2	1	2.452
\bar{X}_1	2.819	2.433	2.446	2.491	
\bar{X}_2	2.561	2.966	2.830	2.739	
\bar{X}_3	2.530	2.511	2.633	2.728	
R	0.289	0.533	0.384	0.248	

3 结论与讨论

通过单因素对比试验,筛选出适合香菇菌丝生长的液体培养基的最佳碳源为麦芽糖,其次为葡萄糖,最佳

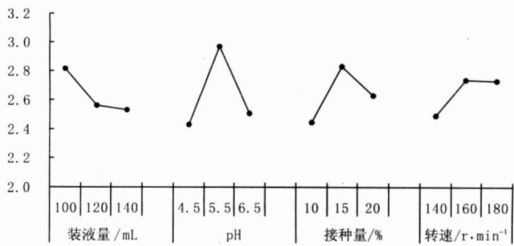


图 4 培养条件正交试验极差趋势图

氮源为麦麸,其次为豆芽汁。通过培养基最佳配方的正交试验,筛选出适合香菇菌丝生长的液体培养基最佳配方为麸皮 80%、麦芽糖 3%、MgSO₄ 0.15%、KH₂PO₄ 0.1%;通过培养条件正交试验,确定最适宜的培养条件为液体培养基 pH 值 5.5,装液量为 100mL/ 250mL,接种量 15%,转速 160 r/ min。

从理论上讲葡萄糖(单糖)应比麦芽糖(双糖)更容易被菌丝吸收,但在该研究中以麦芽糖为碳源时,香菇菌丝生物量最高,说明香菇菌丝对麦芽糖比葡萄糖吸收的效果更好。但麦芽糖是以双糖直接被吸收还是分解成单糖后被吸收,有待于进一步研究探讨。该试验所用的麦麸严格地说是一种复合氮源,其成分复杂,所含有的营养成分更能满足香菇菌丝对营养的需求,以此为氮源菌丝生长快,生物量高,并且价格低廉,是香菇液体培养基首选的原料。

参考文献

[1] 常明昌. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 68.
[2] 刘栋, 钱建亚. 香菇多糖抗肿瘤作用研究现状[J]. 中国食用菌, 2003, 22(2): 6-7.
[3] 朱戎, 陈向东. 药用真菌液体发酵研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(1): 58-60.
[4] 鹿桂花, 周海燕, 武香. 一号香菇液体发酵工艺优化[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 79-82.
[5] 孟艳琼, 宋敏. 杏鲍菇液体深层发酵工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2003(3): 109-113.

Technical Research on the Liquid Cultivation of Mushroom

QIN Xiu-li

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101, China)

Abstract: Through experiment of single element contrast and orthogonal experiment, an optimized research was carried out on the resource of carbon and nitrogen, the best formula and cultivating condition of liquid culture medium of mushroom. Malt sugar was decided as the best carbon resource, bran as the best nitrogen resource. The best formula of culture medium was 80% bran, 3% malt sugar, 0.15% MgSO₄ and 0.1% KH₂PO₄. The best cultivating condition was pH value 5.5, shake flask content 100 mL/ 250 mL, inoculum concentration 15%, shake flask speed 160 r/ min. The research provided mushroom liquid fermentation production with a theoretical basis and guidance.

Key words: Mushroom; Liquid cultivation; Ulture medium; Orthogonal experiment