

液体羊肚菌浅层发酵培养基的优化研究

王广耀¹, 董立华², 张红³

(1. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101; 2. 扶松县漫江农业站, 吉林 扶松 134500; 3. 扶余县新源镇农业技术推广站, 吉林 扶余 131200)

摘要: 通过单因子和正交试验, 对羊肚菌液体发酵培养基进行优化筛选, 并根据羊肚菌菌丝体生物量来确定最佳培养基。结果表明: 对羊肚菌菌丝体生长的最佳的液体发酵培养基配方: 麦芽糖 3.0%、酵母膏 4.0%、 $MgSO_4$ 0.1%、 KH_2PO_4 0.15%。

关键词: 羊肚菌; 菌丝生物量; 液体发酵

中图分类号: S 646.703.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)07-0173-03

羊肚菌 [*Morchella esculenta* (L.) Pars] 属真菌中子囊菌亚门^[1], 俗称羊肚菜、羊肚蘑。因其菌盖表面有许多小凹坑, 酷似羊肚而得名, 它已被公认为是一种珍贵的野生食药兼用大型真菌。羊肚菌富含蛋白质、氨基酸、多糖、维生素和多种矿物质以及丰富的脂肪酸^[2], 还具有帮助消化、化痰理气、补肾壮阳及补脑提神等功效, 是一味良好的传统中药^[3]。由于羊肚菌的人工栽培存在着既要造成原基形成的营养生理先决条件, 又要有效的诱导有性过程的发生这样的双重困难, 所以至今仍不能进行羊肚菌子实体的大规模工业化生产。然而, 研究发现, 羊肚菌的菌丝体所含成分以及所具有的功效都与子实体相似, 而且还能较好的保持子实体独特的风味, 适合液体培养, 许多学者便转向对菌丝体进行液体培养研究^[4]。这样一来, 菌丝体发酵技术便成为解决资源问题的最佳途径, 给羊肚菌的产业化生产开辟了一条新路, 羊肚菌的液体发酵技术也为人们所看好, 现对羊肚菌的基本营养进行研究, 旨在有效地开发利用这一珍贵的真菌资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 羊肚菌试管母种由吉林农业科技学院食用菌实验室提供。

1.1.2 培养基 PDA 培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, pH 值自然。按比例称好, 拌匀, 分装于试, 灭菌, 接种。培养条件: 25℃培养 10 d。液体种子培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 蛋白胨 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, VB₁ 10 mg/L, 豆油 0.03%。碳、氮源供试培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 磷酸二氢

钾 0.15%, 硫酸镁 0.15%, 豆油 0.03%, VB₁ 0.01%, 再分别加入各种碳、氮源。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 取 250 mL 的三角瓶装培养基 100 mL, 在 1.5 kg/cm^2 , 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, 每支斜面试管中接 2 瓶, 在 25℃条件下静置 24 h, 再置于摇床中, 25℃条件下培养, 转速为 160 rpm, 培养 8 d。然后以此为液体发酵培养基的液体菌种, 以 5% 的接种量转接新摇瓶, 直接放在全温摇床中, 在 25℃不同转速条件下, 培养 5 d。

1.2.2 检测方法 生物量的测定—细胞干重法^[5]。取 10 mL 的发酵液, 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/m^3) = (DCB/V) × 10⁶ (DCB—细胞干重(kg), V—取样体积(mL))。

1.2.3 试验设计 碳源试验设计: 在碳源供试培养基中, 分别加入不同的供试碳源进行单因素对比试验, 供试碳源为马铃薯(煮汁)、玉米粉、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖, 每个处理设 3 个水平(见表 1), 每个水平重复 3 次。以菌丝生物量为指标, 筛选出液体培养基最佳碳源。氮源试验设计: 在氮源供试培养基中, 分别加入不同的供试氮源进行单因素对比试验, 供试氮源为大豆粉、酵母膏、蛋白胨、 KNO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、尿素, 每个处理设 3 个水平(见表 2), 每个水平重复 3 次。以菌丝生物量为指标, 筛选出液体培养基最佳氮源。正交试验设计: 根据碳、氮源试验结果, 选出最佳碳源、最佳氮源以及无机盐。($MgSO_4$ 、 KH_2PO_4) 为试验因素, 设计 $L_9(3^2)$ 正交试验, 配制 9 种培养基, 每个试验组 3 次重复, 以菌丝生物量为指标, 取平均值, 优化出最佳的羊肚菌液体培养基配方。

第一作者简介: 王广耀(1971-), 男, 硕士, 实验师, 现主要从事食用菌研究工作。

收稿日期: 2009-12-31

表 1 不同碳源水平 %

水平	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	玉米粉	马铃薯	可溶性淀粉
1	1	1	1	5	10	1
2	2	2	2	10	20	2
3	3	3	3	15	30	3

表 2 不同氮源水平 %

水平	蛋白胨	酵母膏	大豆粉	(NH ₄) ₂ SO ₄	尿素	KNO ₃
1	1	1	10	0.1	0.1	0.1
2	2	2	20	0.2	0.2	0.2
3	3	3	30	0.3	0.3	0.3

2 结果与分析

2.1 不同碳源对羊肚菌菌丝生物量的影响

由图 1 可知, 在培养基中分别加入不同碳源, 羊肚菌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, 其中以麦芽糖作碳源, 菌丝生物量最高, 玉米粉次之, 可溶性淀粉最小。因此, 选择麦芽糖作为碳源进行正交试验。

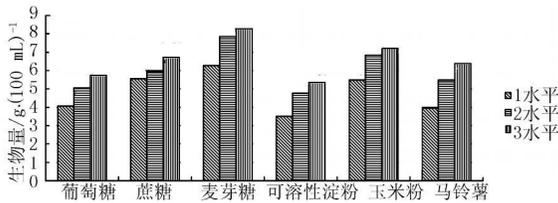


图 1 不同碳源对羊肚菌菌丝生物量的影响

2.2 不同氮源对羊肚菌菌丝生物量的影响

从图 2 可以看出, 在培养基中分别加入不同氮源, 羊肚菌在蛋白胨、黄豆粉、酵母膏中均能很好的生长, 而在尿素、硫酸铵、硝酸钾中生长不良, 说明羊肚菌对无机氮的利用不佳, 其中以酵母膏作为氮源时, 菌丝生物量最高, 黄豆粉次之, 酵母膏作为生长因子有利于菌丝的生长, 缩短发酵周期。因此, 选择酵母膏作为氮源进行正交试验。

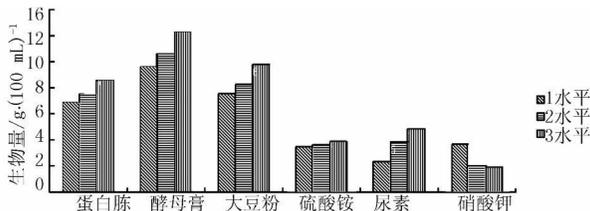


图 2 不同氮源对羊肚菌菌丝生物量的影响

2.3 正交试验优化最佳液体培养基的配方

根据单因子试验中的结果, 选择出了最适碳源麦芽糖、最适氮源酵母膏, 再添加 MgSO₄、KH₂PO₄ 2 种无机盐, 进行 3 个水平 4 个因子的正交试验(见表 3)。根据

正交试验的结果, 由表 4 可以看出, 不同组合之间菌丝生物量是不同的, 各因素间的极差次序为麦芽糖 > KH₂PO₄ > MgSO₄ > 酵母膏, 极差越大, 起的作用就越大, 这说明麦芽糖浓度对生物量影响最大, KH₂PO₄ 次之, 从菌丝体生物量来考察各因素水平值, A 可取 A₂, B 取 B₃, C 取 C₁, D 取 D₂, 因此选定最适合羊肚菌液体发酵培养基组合为 A₂B₃C₁D₂, 即麦芽糖 3.0%, 酵母膏 4.0%, MgSO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.15%。

表 3 正交试验的因素和水平 %

水平	A(麦芽糖)	B(蛋白胨)	C(MgSO ₄)	D(KH ₂ PO ₄)
1	2.0	2.0	0.1	0.1
2	3.0	3.0	0.15	0.15
3	4.0	4.0	0.2	0.2

表 4 正交试验结果表

序号	A(麦芽糖)	B(酵母膏)	C(MgSO ₄)	D(KH ₂ PO ₄)	生物量/g·(100mL) ⁻¹
1	1	1	1	1	7.984
2	1	2	2	2	8.327
3	1	3	3	3	8.862
4	2	1	2	3	9.153
5	2	2	3	1	10.481
6	2	3	1	2	13.760
7	3	1	3	2	11.815
8	3	2	1	3	10.142
9	3	3	2	1	9.734
K ₁	25.173	28.952	31.886	28.199	
K ₂	33.394	28.950	27.214	33.947	
K ₃	31.691	32.356	31.158	28.157	
R ₁	8.391	9.651	10.629	9.400	
R ₂	11.131	9.650	9.071	11.357	
R ₃	10.564	10.785	10.386	9.386	
R	2.74	1.135	1.558	1.971	

3 结论

根据液体培养基的原则和方法, 采用单因素试验, 优选出适合羊肚菌液体培养的碳源是麦芽糖, 氮源是酵母膏。

由羊肚菌液体发酵培养基的正交试验可知, 最佳的配方为: 麦芽糖 3.0%, 蛋白胨 4.0%, MgSO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.15%。

参考文献

[1] 马向东, 陈红歌. 食用菌栽培新技术[M]. 开封: 河南大学出版社, 2002: 270.
 [2] 徐锦堂, 孙冬平. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997.
 [3] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲, 等. 羊肚菌抗疲劳作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 12-13, 17-18.
 [4] 赵桂云, 马庆斌. 羊肚菌液体培养基配方的研究[J]. 食用菌, 2002(6): 15-16.
 [5] 简银鼎, 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.

广东道地中药何首乌的组织培养

姚焱, 汪珍春, 王小兰, 张平, 田长恩

(广州大学 植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室, 广州大学 生命科学院, 广州 510006)

摘要:以广东德庆何首乌为试材, 研究叶片的愈伤组织诱导分化及茎尖的增殖快繁技术。结果表明:以 MS 为基本培养基, 2,4-D 是诱导愈伤组织的必需激素, 1~2 mg/L 有利于叶片愈伤组织诱导;分化培养基 BA 1~2 mg/L+ NAA 0.5~1 mg/L 浓度组合分化能力低, 未分化成芽;培养基 BA 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 对茎尖不定芽的诱导效果较好;生根培养基 1/2 MS, 生根率 100%。

关键词:何首乌; 道地药材; 组织培养; 快繁

中图分类号:S 567.23⁺ 9.035(265) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)07-0175-03

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.) 为蓼科(Polygonaceae)多年生落叶草本植物, 其体内含有蒽醌类、二苯乙烯苷类、卵磷脂等多种有效成分^[1], 是我国重要的滋补肝肾中药, 也是广东省重点发展的药材之一^[2]。目前, 为了便于何首乌工业化提取及生产快繁, 已进行了许多组织培养方面的研究^[3-5]。但是我国何首乌资源分布广泛, 遗传背景复杂, 以往的研究结果由于材料间的遗传背景差异而缺乏普遍适用性; 另外, 前人对材料选择比较随机, 许多是野生采集, 离体培养前普遍缺乏对何首乌材料品质方面的筛选和鉴定, 因此降低了研究材料和结果的进一步利用价值。

我国中医界历来视广东德庆何首乌为道地药材。

第一作者简介:姚焱(1972), 女, 河南开封人, 博士, 副教授, 现从事植物遗传育种和生物技术研究工作。E-mail: yaoyanm@163.com。

通讯作者:田长恩(1964), 男, 湖北宣恩人, 博士, 教授, 现从事分子遗传学研究。

基金项目:广州大学科研创新团队资助项目。

收稿日期:2010-01-08

经过不同研究者对各产地何首乌的成分质量的鉴定分析, 广东德庆产何首乌中的二苯乙烯苷类、蒽醌类成分均居首位^[6,8], 证明它是优质的何首乌中药资源, 也是进行何首乌遗传育种的重要材料。目前, 还没有针对广东德庆何首乌进行组织培养研究的报道。因此, 现选用经过品质鉴定的德庆何首乌优质种源^[8], 进行组织培养快繁方面研究, 为今后有目的的生产及何首乌遗传育种奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.), 引自广东德庆县何首乌生产基地。

1.2 叶片愈伤组织诱导

采集植株上幼嫩叶片, 经蒸馏水冲洗干净后, 70%酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水漂洗 3~4 次, 最后将叶片接种在培养基上。以 MS 为基本培养基, 设置 2,4-D(0.5, 1, 2 mg/L) 与 BA(0.5, 1, 2 mg/L) 的浓度组合, 共 16 处理, 每处理 3 次重复, 每重复接种 8 块叶片。黑暗培养, 温度(25±1)℃。

The Study of Optimization Conditions about Fermentation Medium Shallow of *Morchella*

WANG Guang-yao¹, DONG Li-hua², ZHANG Hong³

(1. Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101; 2. Manjiang Agriculture Center, Fusong, Jilin 134500; 3. Xinguan Agricultural Technology Extension Station, Fuyu, Jilin 131200)

Abstract: The optimization conditions about fermentation medium shallow of *Morchella* was studied by the single factor and the orthogonal tests. The best medium was determined according to *Morchella* mycelium biomass. The results showed that the best formula of liquid fermentation medium as following: 3.0% maltose, 4.0% yeast extract, 0.1% MgSO₄, 0.15% KH₂PO₄.

Key words: *morchella*; *mycelial* biomass; liquid fermentation