

## 二株茶薪菇菌丝多糖深层发酵的培养特征比较与条件控制

张筱梅, 朱维红, 贾春风

(河北保定学院 生化系, 河北 保定 071000)

**摘要:**以2株茶薪菇为试材,研究比较了其多糖深层发酵的培养特征及发酵的控制条件。结果表明:茶薪菇多糖发酵罐深层培养以26℃, pH 6.5, 150~250 r/min 搅拌, 0.03~0.05 MPa 罐压, 0.2~0.4 m<sup>3</sup>/h 通风, 发酵96 h 较适宜;菌丝胞内多糖达937~1 080 mg/g。2个菌株罐批培养多糖高峰期与摇瓶一致,但产量略高,较固体栽培子实体多糖高1.3~1.5倍,时间缩短12倍。比较发现,菌株U27厚垣孢子数量较多,液体培养效果较好,摇瓶种子菌球小而齐,直径1.0~2.0 mm,密度(1.5~2.5)×10<sup>3</sup> 个/mL,液体深层发酵的菌丝多糖达1 080 mg/g,为子实体多糖的1.5倍,是1株良好的多糖深层发酵的生产菌株。

**关键词:**茶薪菇;深层发酵;多糖;培养特征;比较

**中图分类号:**S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0127-03

茶薪菇 (*Agrocybe chaxingu*) 是我国近年来开发、且深受市场欢迎的珍稀食药两用真菌,其味纯清香,祛湿补肾,健脾利尿,其多糖具抗肿瘤、降血脂、抗衰老等功效<sup>[1]</sup>。最新研究表明,茶薪菇细胞多糖凝集素含量极高,是其它菇类的数倍,凝集素可增强细胞免疫活性,提高机体抗癌作用,因此近年来茶薪菇多糖研究进入快速发展阶段<sup>[2-3]</sup>。

茶薪菇多糖可从子实体或菌丝体中提取,子实体固体栽培周期长,受季节限制,且用工多、成本高,出菇温度窄,产量不稳定;液体培养生产周期短,菌龄一致,菌种成本低,便于管理,易于实现工业化生产。但摇瓶培养,容量小,工时多,不适宜扩大生产。因此,研究茶薪菇多糖标准化生产过程,探讨发酵罐扩大生产规模基础工艺条件,对于促进茶薪菇产品多元化开发,加快工业产品转化步伐具有重要意义。现对2株茶薪菇多糖发酵的培养特征进行比较,旨在探讨茶薪菇多糖发酵罐深层发酵条件及其条件控制,以期工业扩大发酵提供试验数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试菌株 U27、S10 由保定学院实验室选育保藏。

**第一作者简介:**张筱梅(1957-),女,教授,研究方向为食药两用真菌应用。E-mail:zhxm06@163.com.

**基金项目:**河北省教育厅计划指导资助项目(Z2011106);河北省自然科学基金资助项目(C2013104055);河北省科技厅科技计划资助项目(12236308)。

**收稿日期:**2014-09-12

母种培养基(%):玉米碎粒3.0,麦麸2.5,葡萄糖2.0,琼脂2.0。原种培养基(%):棉子皮82.0,麦麸13.0,玉米粉3.0,红糖1.0,石膏1.0,料水比1:(1.3~1.4)。液体种子培养基(%):酵母膏1.0,麦麸3.0,玉米碎粒2.0,豆粉1.5,葡萄糖2.0, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.05, pH 6.5。液体发酵培养基(%):酵母膏0.5,麦麸2.0,玉米粒3.0,豆粉1.0,葡萄糖2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.05, pH 6.5。固体栽培培养基(%):棉籽皮88,麦麸10,玉米粉2,红糖1,石膏1, pH 6.5。消泡剂:新鲜豆油。仪器设备:20 L 自控不锈钢发酵罐, HZQ-Q 全温振荡器, TU1901 双光束紫外分光光度计, OLYMPUS 荧光显微镜, 恒温水浴, 电热鼓风烘干箱等。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 斜面保藏菌种经多次活化备用。

1.2.2 种子及液体培养 采用250 mL三角瓶,每瓶装量100 mL,接种量8%, 26℃、180 r/min 震荡培养4~6 d 备用。

1.2.3 发酵罐培养 20 L 发酵罐, 75%装液量, 8%接种量, 置于26℃, 150~250 r/min, 0.03~0.07 MPa, 0.2~0.6 m<sup>3</sup>/h 条件下, 发酵120~144 h。

1.2.4 固体栽培 采用聚丙烯塑料袋,每袋干料300 g, 原料灭菌后接种, 26℃避光培养60 d, 常规条件出菇, 头潮子实体菌盖开伞前采收, 风干后冰箱贮藏备用<sup>[4-5]</sup>。

#### 1.3 项目测定

菌丝球大小数量测定:5 mL 发酵液于培养皿(Φ60 mm)显微镜下观察计数,取20个菌球直径、大小平

均测量值。菌丝球干重测定:50 mL 发酵液 100 目筛过滤,蒸馏水洗 3 次,50℃烘干后称重。pH 值测定采用 pH 酸度计;还原糖含量测定采用斐林氏滴定法;氨基氮含量测定采用甲醛滴定法;多糖提取及其测定:分别称取烘干的茶薪菇摇瓶和罐菌丝球及栽培子实体,粉碎后 100 目过筛,采用热水浸提法得到粗多糖,经蒽酮-硫酸法测多糖含量<sup>[6]</sup>。

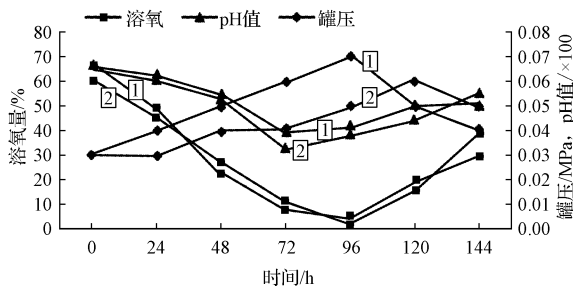
## 2 结果与分析

### 2.1 发酵种子培养特征比较

试验表明,2 株菌株斜面母种生长特征差异较小,26℃培养 5~7 d 均长满白色浓密菌丝,菌苔形态、菌丝长速无差异;26℃摇瓶 180 r/min 液体培养 4~6 d 生长良好,外观菌球色乳白,悬浮性好(震荡后静置 5 min 不下沉),培养液呈半透明状,但菌球大小及培养密度有所不同。其中菌株 1 厚垣孢子形成早,数量较多,液体培养菌球较小,大小均一整齐,平均直径 1.0~2.0 mm,密度 $(1.5\sim2.5)\times10^3$  个/mL;菌株 2 厚垣孢子数量略少,菌球大小不一,小球较多直径 1.5~2.5 mm,大球较少直径 3.5~4.5 mm,平均密度 $(0.6\sim1.0)\times10^3$  个/mL。

### 2.2 发酵 pH 值与溶氧条件的比较与控制

发酵过程中 2 株菌株的 pH 值及溶氧量变化规律相似,表现为先降后升,发生时间较一致。接种 18 h 后 pH 值开始下降,24 h 为 6.0~6.2,发酵 72~96 h 降至 3.7~4.0,120 h 回升至 4.5~5.0(图 1)。溶氧变化亦呈现一定规律性,在一定条件下(0.03~0.05 MPa 罐压,0.2~0.4 m<sup>3</sup>/h 通风),150 r/min 搅拌,发酵 2 h 后 2 株菌株溶氧均开始下降,其中菌株 1 溶氧略低,表明菌丝需氧量较大,随后降速加快,36 h 达到 3%~5%,甚至出现-0.8%~-2.0%的短暂负值,发酵中其罐压持续平稳升高,96 h 高至 0.0 MPa,随后溶氧回升,144 h 升至 38.5%,罐压降至 0.05 MPa;菌株 2 发酵 48 h 溶氧快速下降,其后变化与菌株 1 相近,但最高罐压仅 0.06 MPa,且较菌株 1 迟后 24 h。



注:1 代表菌株 U27;2 代表菌株 S10,下同。

图 1 发酵中罐压溶氧 pH 值的变化

Fig. 1 Pressure, dissolved oxygen and pH value throughout fermentation process

研究发现,罐溶氧量与搅拌转速及通风量密切相关,增加搅拌或提高空气流速,溶氧量迅速升高。发酵初始 100 r/min 搅拌,溶氧 50%~60%,48~72 h 搅拌提至 200 r/min,溶氧维持在 15%~25%,96 h 升至 250 r/min,溶氧 2.0%~3.0%,但搅拌转速过高可导致菌丝断裂。镜检发现 0.05 MPa 罐压,0.2 m<sup>3</sup>/h 通风下,以 300 r/min 转速持续 1 h,菌球直径有所减小,菌丝片段增加,表明高转速对茶薪菇培养不利。此外空气流速过快,罐压超过 0.06 MPa,菌球有所收缩,亦不利菌丝生长。总之茶薪菇多糖发酵溶氧控制以 150~250 r/min,罐压 0.03~0.05 MPa,空气流量 0.2~0.4 m<sup>3</sup>/h 较好。

### 2.3 发酵中检测指标变化与多糖产量比较

发酵中 2 株菌株的糖、氮、干重及多糖变化规律出现明显的一致性。由图 2 可以看出,2 株菌株还原糖变化均呈现升-降-升规律,24 h 前还原糖小幅上调至 19.5 g/L,发酵 24~48 h 缓慢降低,48~72 h 急速下降,120 h 还原糖量最低至 0.5~0.7 g/L,随后略回调在 0.7~0.9 g/L 之间。氨基氮变化出现先降后升特点,其中 1 号株氨基氮变化幅度略大,72~96 h 最低降至 7~10 g/L,120 h 后开始回升,144 h 速升至 29 g/L;2 号菌株变化幅度稍小。发酵中菌球干重与多糖含量亦均呈现先升后降规律,48~72 h 快速增加,96 h 二项指标均达到峰值,其中 1 号株干重及多糖增加较快,菌球干重 17.6 g/L,多糖达 1 080 mg/g,分别较 2 号株增加 13.5%及 13.2%,表明该株较适宜发酵罐多糖液体培养,120 h 后 2 菌株干重及多糖量回落下降。试验亦表明,茶薪菇发酵罐菌丝生长停滞期在 16~22 h,较摇瓶培养(9~13 h)略长,这可能与停菌体进入新培养环境的适应性及代谢调整有关。

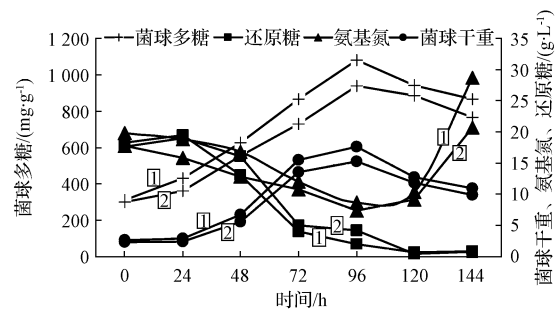


图 2 发酵中还原糖、氨基氮、菌球干重、菌球多糖的变化

Fig. 2 Reducing sugar, amino nitrogen, dry weight of fungus ball and fungus ball polysaccharide throughout fermentation process

### 2.4 茶薪菇子实体与菌丝体多糖比较

由图 3 培养方式来看,2 株菌株菌丝球(摇瓶及发酵罐)多糖产量均明显高于子实体,尤以发酵罐培养更显著,其中菌株 1(U27)罐菌丝多糖达 1 080 mg/g,为子实

体多糖的 1.5 倍,菌株 2(S10)多糖达 937 mg/g,为子实体多糖 1.3 倍。其次 2 株菌株比较,菌株 1 子实体多糖含量略低于菌株 2,但液体菌球多糖含量明显高于菌株 2,表明 1 号株更适于液体多糖发酵。从时间上看,若以 96 h 发酵罐培养,60 d 子实体固体栽培周期计算,发酵罐多糖生产时间较子实体栽培时间缩短了 12 倍,同时液体发酵不受季节环境等因素限制,便于分批连续进行,有利实现工业化自控式大规模生产,因此液体发酵是茶薪菇进行多糖生产的一条良好途径。

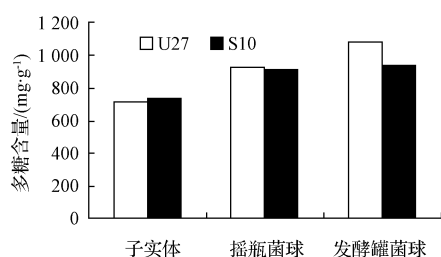


图 3 子实体、摇瓶与发酵罐多糖含量比较

Fig. 3 Comparison of polysaccharide yield between cultivation of fruiting bodies, shake flask and batch fermentation

### 3 结论与讨论

该试验结果表明,2 株茶薪菇均适宜进行液体深层多糖发酵,表现为菌丝生长快,多糖产量高,其中以菌株 U27 效果较好,其厚垣孢子形成早,数量较多,液体培养菌球较小,大小均一整齐,直径 1.0~2.0 mm,密度  $(1.5\sim2.5)\times10^3$  个/mL,4 d 发酵多糖产量达 1 080 mg/g,

达子实体多糖的 1.5 倍,是一株良好的多糖深层发酵的生产菌株。2 株菌株经发酵罐多次分批培养表明,茶薪菇多糖发酵以 26℃,pH 6.5,150~250 r/min 转速,0.03~0.05 MPa 罐压,0.2~0.4 m<sup>3</sup>/h 风量控制条件较适宜。该条件下菌丝生长迅速,多糖产量高。

2 株菌株发酵罐培养试验表明,茶薪菇菌丝多糖发酵周期以 96 h 较好,此时菌丝干重较高,还原糖变化不大,pH 值略有升高,多糖含量维持在一个较高水平。研究认为,茶薪菇菌丝多糖发酵终点判断为一综合性指标<sup>[7]</sup>,当茶薪菇多糖发酵 96 h 左右,pH>5.0,还原糖降至 0.7~0.9 g/L,氨基氮升至>20.0 g/L,菌丝干重下降,液泡明显增多变大时,发酵终点已到,应及时结束发酵过程。

### 参考文献

- [1] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:243-254.
- [2] 张筱梅,苗晓燕. 猴头菌多糖的研究与开发[J]. 保定学院学报,2010(3):76-79.
- [3] 党建章,何宗智,郑雄敏. 茶薪菇深层培养及其营养成分分析[J]. 食用菌学报,1999,6(3):37-39.
- [4] 张筱梅,张焕英,张渊. 茶薪菇多孢快速育种简报[J]. 中国食用菌,2008(3):14-16.
- [5] 刘招龙,阮毅,张维瑞,等. '古茶 2 号'茶薪菇新品种的配套栽培技术研究[J]. 农学报,2012(8):53-55.
- [6] 苗晓燕,陈萍,张筱梅,等. 微波酶解协同提取猴头菌丝体多糖工艺[J]. 食品科学,2010(2):94-97.
- [7] 李芳杰,薛建伟,刘晓光. Nisin 工业生产发酵终点的判断[J]. 农业机械,2012(27):129-131.

## Culture Characteristic Comparison and Condition Control of Fermentation of Two Polysaccharides *Agrocybe chaxingu*

ZHANG Xiao-mei, ZHU Wei-hong, JIA Chun-feng

(Department of Biochemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Taking two samples of polysaccharides *Agrocybe chaxingu* as material, the culture characteristic and control condition of fermentation were compared. The results showed that a suitable condition of 26℃, pH 6.5, 150—250 r/min stir, 0.03—0.05 MPa pressure, 0.2—0.4 m<sup>3</sup>/h airflow, and a duration of 96 hours to produce 937—1 080 mg/g of polysaccharide. Tank batch culture shared the same peak period of polysaccharide as that of bottle shaking, but yielded slightly higher. Compared against solid cultivation of fruiting bodies, they yielded 1.3—1.5 times more polysaccharide, and the duration has been shortened by 12-fold. By comparison, the U<sub>27</sub> had more chlamydospore, and was more suitable for liquid culture was discovered. By bottle shaking, the fungus balls were small and neat, with diameters between 1.0 and 2.0 mm, density between  $(1.5\sim2.5)\times10^3$ /mL. The submerged fermentation in liquid yielded up to 1 080 mg/g polysaccharide, which was 50% more than that of fruiting, and was proved to be a healthy choice of polysaccharide submerged fermentation.

**Keywords:** *Agrocybe chaxingu*; submerged fermentation; polysaccharide; culture characteristic; compare