

# 白灵菇高活力液体菌种摇瓶发酵培养条件的优化

董玉兰, 李书生, 张丽萍, 程辉彩, 习彦花, 张根伟

(河北省科学院 生物研究所, 河北 石家庄 050081)

**摘要:**以白灵菇为试材,通过摇瓶方法,以白灵菇菌丝生物量、菌球密度及萌发活力指数为检测指标,对白灵菇高活力液体菌种培养条件进行了优化研究,以期提高白灵菇液体菌种的活力。结果表明:该菌株的最适培养条件为温度 28℃,转速 180 r/min,培养时间 60 h;最佳培养基配方为 3.0%玉米粉、1.5%葡萄糖、0.3%蛋白胨、2.0%黄豆粉、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>。

**关键词:**液体菌种;培养条件;生物量;菌球密度;萌发活力

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0143-04

白灵菇(*Pleurotus nebrodensis*)是一种食药价值很高的大型真菌,又名阿魏菇,在食品、医药等方面具有广阔的开发和应用前景<sup>[1]</sup>。先进的制种技术对白灵菇

的生产和国际贸易具有重要影响,传统的由母种到栽培种的固体菌种栽培方式费时费力、生长周期长,使白灵菇大规模生产受到一定的限制,满足不了市场的需要<sup>[2]</sup>,液体菌种具有培养时间短、发菌快、菌龄整齐、接种方便等优点,可以相应地延后制种期和投料期,在华北地区实现 8 月底投料、10 月初菌丝满袋、养菌 1 个月后出菇,改变传统的 5 月初投料、秋季出菇模式,减少过夏养菌对养分的消耗,可显著提高原料利用率、降低污染、提高产量,便于实现工厂化生产,受到众多食用菌生产企业的青睐,已成为食用菌制种产业的发展趋势<sup>[3]</sup>。

食用菌液体菌种生产技术和综合食用菌及工业发

**第一作者简介:**董玉兰(1986-),女,吉林辽源人,硕士,实习研究员,现主要从事有益微生物等研究工作。E-mail: dong\_yulan@126.com.

**责任作者:**张根伟(1976-),男,河北博野人,本科,副研究员,现主要从事农业有益微生物等研究工作。E-mail: 889io@sina.com.

**基金项目:**河北省科技攻关资助项目(09235502D);河北省科学院科技计划资助项目(11326)。

**收稿日期:**2013-12-17

[6] 付光中,章超桦,吉宏武,等. 凡纳滨对虾虾头协同水解工艺的响应面优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 18-21.

[7] 申迎宾,范子剑,麻浩. 响应面法优化发芽豇豆积累-氨基丁酸工艺条

件的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 10-16.

[8] 王永菲,王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学(自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.

## Response Surface Methodology of Parsley Preservation Based on Computer Simulation

DENG Ke<sup>1</sup>, ZHANG Yu-wei<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>3</sup>

(1. Graduate School, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi 545006; 2. School of Electrical and Information Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi 545006; 3. Fangchenggang Bureau of Quality Supervision, Fangchenggang, Guangxi 538100)

**Abstract:** Choosing fresh parsley as test material, chlorophyll and water content as reference indicators, based on the univariate tests, temperature, and nutrition liquid concentration and oxidation calcium concentration such 3 factors were selected using Box-Behnken Center combination test and response surface analysis law. Prediction model of quadratic polynomial regression was simulated here and effectiveness of the model would be verified by computer simulation. So interaction on cilantro and fresh-keeping effects of the respective variable were studied. The results showed that the best preservation conditions storage temperature was 4.2℃, calcium peroxide content was 0.096 g/L and nutrient solution formula was 0.339 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 15.5 mg/L FeSO<sub>4</sub> + 0.524 g/L MgSO<sub>4</sub> + 1.23 g/L CaCl<sub>2</sub> + 0.234 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.226 mg/L Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2.79 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

**Key words:** response surface methodology; computer simulation; parsley; preservation

酵技术的一门交叉学科<sup>[4]</sup>,近年来,随着食用菌生产机械化、工厂化的发展,成为研究热点。黄爱荣等<sup>[5]</sup>在双孢蘑菇,沈敏等<sup>[6]</sup>在杏鲍菇,闫长伟等<sup>[7]</sup>在金针菇,危贵茂等<sup>[8]</sup>、李正鹏等<sup>[9]</sup>在白灵菇上进行了液体菌种发酵工艺研究,以上研究均依据生物量、菌球密度、菌球直径、气味、颜色等指标判断菌种质量,并依此进行发酵条件的优化。然而,这些指标与菌种活性相关性存在疑点,因为食用菌液体菌种活性高低是众多单一菌丝球萌发、生长的结果,并应最终体现在栽培料的封面时间和发菌速度上。卢朝亮<sup>[10]</sup>研究发现,白灵菇菌丝生物量、菌球密度大小与栽培料上的发菌速度并不一致;任海霞等<sup>[11]</sup>研究认为,白灵菇液体菌种活性与生物量、残糖、pH 值等指标有关。

目前,还没有直接证据表明菌丝球直径会对菌丝球萌发、生长速度产生显著影响,而且测定菌丝球直径很难将液体菌种中极微小菌丝球统计在内。因此,该试验在研究菌种形态与模拟栽培料培养基上的生长速度相关性基础上,以菌球密度、萌发、生长速度为主要指标,对白灵菇液体菌种培养条件进行优化,以期为实现白灵菇高活力液体菌种发酵制备提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试白灵菇由河北省科学院微生物研究室保存。

发酵培养基:2%玉米粉、1.0%葡萄糖、0.5%蛋白胨、1.0%豆饼粉、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>、pH 7.0。活力培养基:20%棉籽壳粉、5%麸皮、1%蔗糖、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2%琼脂粉、pH 自然。

### 1.2 试验方法

1.2.1 液体摇瓶培养方法 取 0.5 cm<sup>2</sup> 已活化的斜面菌丝体,接种到装有 50 mL 液体发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,28℃ 的条件下 150 r/min 振荡培养 4 d 得一级种子,用匀浆器分散菌丝体,按 8% 接种量接到各发酵培养基中,进行振荡培养。

1.2.2 单因素试验 分别对液体培养温度、培养时间、摇床转速进行单因素试验(表 1),测定菌丝生物量、菌丝球密度、菌丝球萌发活力指数<sup>[12]</sup>。

1.2.3 正交实验 在发酵培养基基础上,选用玉米粉、葡萄糖、蛋白胨和豆饼粉为碳、氮源,设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验(表 2),配制 9 种培养基,在优化条件下,确定碳氮源最佳配比<sup>[13-14]</sup>。

表 1 单因素试验

Table 1 Single factor experiment

参数	1	2	3	4	5	6	7
培养温度/℃	16	19	22	25	28	31	34
培养时间/h	12	24	36	48	60	72	84
摇床转速/r·min <sup>-1</sup>	100	120	140	160	180	200	220

表 2 正交实验因素与水平

Table 2 Factor and level of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 葡萄糖/%	B 玉米粉/%	C 蛋白胨/%	D 豆饼粉/%
1	1.0	2.0	0.3	1.0
2	1.5	2.5	0.6	2.0
3	3.0	3.0	0.9	3.0

### 1.3 项目测定

1.3.1 生物量测定 发酵结束后,取培养液 50 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集菌丝体,80℃ 干燥至恒重,用电子天平称量。

1.3.2 菌丝球密度测定 取 1 mL 培养液置于培养皿中,垫在黑纸上进行计数<sup>[15]</sup>。

1.3.3 菌丝球萌发活力指数测定 挑取 7 个菌丝球,置活力检测培养基上,25℃ 培养,观察并记录菌丝球 3 d 的萌发数和菌落直径,菌丝球萌发活力指数=菌落直径(mm)×萌发个数/萌发时间;菌种活力指数=萌发活力指数×菌丝球密度。

### 1.4 数据分析

试验数据均为 3 次重复的平均值,数据采用 Excel 进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养条件优化

2.1.1 培养温度对菌丝生物量、菌球密度及萌发活力的影响 由图 1、2 可知,菌丝生物量和菌球密度在 28℃ 培养时同时达到最大,分别为 0.91 g/100mL 和 195 个/mL,而此条件下菌丝球萌发活力 2.56,低于 25℃ 培养时的 2.72;菌种活力指数在菌丝球密度和萌发活力影响下,在 25℃ 时达到最高,为 511,略高于 28℃ 培养时的菌种活力。

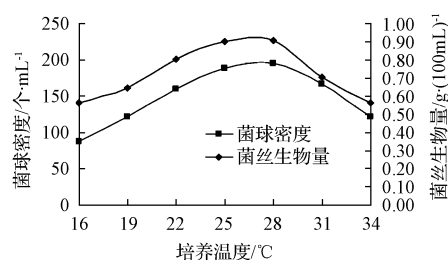


图 1 培养温度对菌丝生物量和菌球密度的影响

Fig. 1 Effect of culture temperature on biomass and density

2.1.2 培养时间对菌丝生物量、菌球密度及萌发活力的影响 由图 3、4 可知,菌丝生物量与菌球密度分别在 72 h 和 60 h 达到最大,分别为 1.018 g/100mL 和 198 个/mL,菌丝萌发活力变化较为平稳,在 60 h 达到最大 2.74;菌种活力指数在菌丝球密度和萌发活力影响下,在 60 h 达到最高,为 542。超过此发酵时间,虽然菌丝生物量还在增加,但菌液颜色变黄、菌丝球菌丝分支减少,菌种活力下降明显。

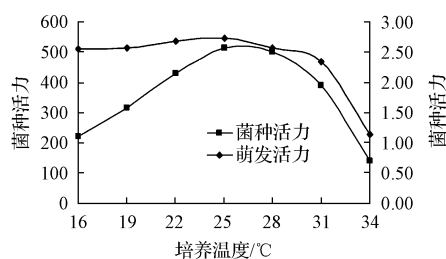


图2 培养温度对萌发活力和菌种活力的影响

Fig. 2 Effect of culture temperature on germination and strain vigor

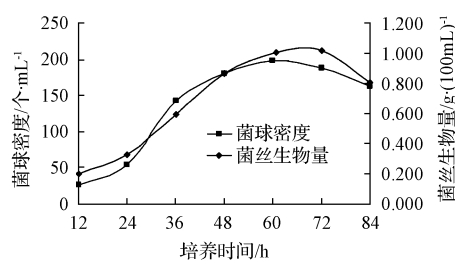


图3 培养时间对菌丝生物量和菌球密度的影响

Fig. 3 Effect of culture time on biomass and density

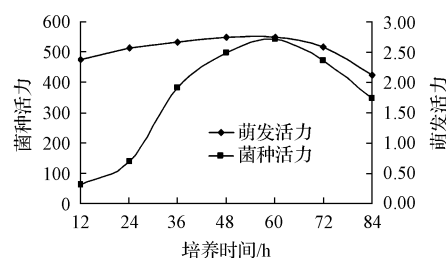


图4 培养时间对萌发活力和菌种活力的影响

Fig. 4 Effect of culture time on germination and strain vigor

2.1.3 摇床转速对菌丝生物量、菌球密度及萌发活力的影响 由图5、6可知,随着转速的提高,培养液的各项指标呈“S”形曲线增长,转速在180 r/min时,菌球密度、生物量、萌发活力和菌种活力达到最大,菌球密度最高,分别为0.969 g/100mL、194 个/mL、2.91和562。

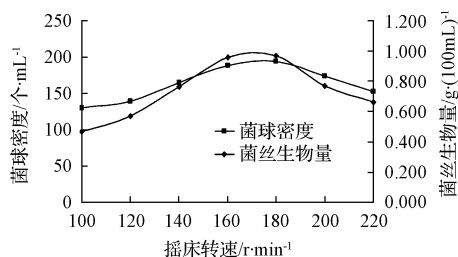


图5 摇床转速对菌丝生物量和菌球密度的影响

Fig. 5 Effect of shaking frequency on biomass and density

## 2.2 正交实验

从表3可以看出,不同组合菌球密度和萌发活力指

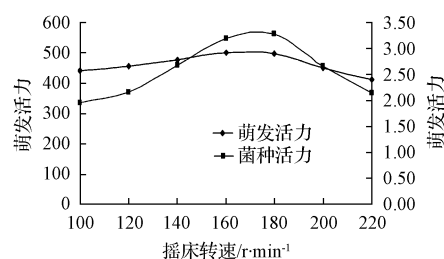


图6 摇床转速对萌发活力和菌种活力的影响

Fig. 6 Effect of shaking frequency on germination and strain vigor

数不同,最终影响菌种活力指数,各因素间的极差次序为豆饼粉>葡萄糖>蛋白胨>玉米粉,最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即最佳液体发酵培养基配方为1.5%葡萄糖,3.0%玉米粉,0.3%蛋白胨,2.0%黄豆粉,0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.1%MgSO<sub>4</sub>,pH 7.0。

表3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment for culture conditions optimization

序号	A 葡萄糖 /%	B 玉米粉 /%	C 蛋白胨 /%	D 黄豆粉 /%	菌球密度 /个·mL <sup>-1</sup>	萌发活力 指数	菌种活力 指数
1	1(1.0)	1(2.0)	1(0.3)	1(1.0)	153	2.20	336.60
2	1	2(2.5)	2(0.6)	2(2.0)	181	2.62	474.22
3	1	3(3.0)	3(0.9)	3(3.0)	182	2.67	485.94
4	2(1.5)	1	2	3	197	2.95	581.15
5	2	2	3	1	172	2.52	433.44
6	2	3	1	2	225	3.30	742.50
7	3(3.0)	1	3	2	192	2.82	541.44
8	3	2	1	3	207	3.04	629.28
9	3	3	2	1	176	2.55	448.80
K1	1 296.76	1 459.19	1 708.38	1 218.84			
K2	1 757.09	1 536.94	1 536.94	1 758.16			
K3	1 619.52	1 677.24	1 460.82	1 460.82			
R	460.33	218.05	247.56	539.32			

## 2.3 栽培试验

利用培养基配方优化过程中的白灵菇液体种,以每袋10 mL的接种量进行以棉籽壳为主的栽培料接种试验。从表4可以看出,菌种活力越高,满肩、满袋时间越短,以优化出的6号培养基接种,平均3.0 d满肩,20 d满袋,生长最快。而同期固体菌种栽培时,菌丝平均7 d满肩、41 d满袋。可见,液体菌种具有很好的萌发活性,可大大缩短生长周期。

表4 液体菌种栽培试验

Table 4 Liquid bacteria cultivation tests

培养基序号	菌种活力指数	满肩时间/d	满袋时间/d
1	336.60	6.0	23
3	485.94	4.5	22
4	581.15	4.0	21
6	742.50	3.0	20

## 3 结论与讨论

食用菌液体菌种很大程度与植物种子具有相似性,

该试验借用植物种子萌发活力测定方法测定液体菌种萌发活力。一般白灵菇液体菌种接入栽培料 1 d 即可萌发,3 d 即可封面,因此采用培养 3 d 时在棉籽壳浸汁培养基上的萌发率和菌落直径,计算菌丝球萌发活力指数,以菌丝球萌发活力指数与菌球密度的乘积表示菌种活力,更能真实体现菌种接入栽培料后的生长活力。

培养条件对液体菌种生长速度、形态、营养物质积累具有重要影响。该试验单因素试验优化摇瓶培养条件过程中,比较了温度、转速和培养时间对菌丝生物量、菌球密度、萌发活力和菌种活力的影响。结果表明,不同温度、转速条件下菌丝生物量和菌球密度具有一致性,分别在 28℃、180 r/min 同步达到最大;不同培养时间条件下,生物量较菌球密度最大值延后 12 h;菌丝球萌发活力在小于 28℃、180 r/min、72 h 条件下,变化幅度较小。这就导致菌种活力受菌球密度影响较大,但有时并不与菌丝球萌发活力同步达到最大。优化出的摇瓶培养条件为培养温度 28℃,转速 180 r/min,培养时间为 60 h,装量 50 mL/250mL 摇瓶,与任海霞等<sup>[11]</sup>、王桂芹等<sup>[16]</sup>、唐玉琴<sup>[17]</sup>、王广耀等<sup>[18]</sup>以生物量、菌球密度、菌球直径为指标优化的培养条件具有相似性。

在此基础上进行了正交实验,得到最佳培养基配方为 1.5%葡萄糖、3.0%玉米粉、0.3%蛋白胨、2.0%豆饼粉、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>,与危贵茂等<sup>[8]</sup>、李正鹏等<sup>[9]</sup>研究的白灵菇培养基配方相比,含有更高含量的氮源,这可能是由优化发酵条件检测指标不同造成的影响,也可能是采用的菌株不同造成的。栽培试验表明,液体菌种活力越高,发菌、生长速度越快,优化培养的液体菌种,可 3 d 满瓶,20 d 满袋,大大缩短了生长周期。

该试验中,显微镜观察到很多微小的菌丝球,并不容易用肉眼分辨,计算菌球直径具有相当大的难度,而且测量结果会相当不准确,因此并未将菌球直径列为检测指标,而是着重进行菌丝生物量的测定;试验发现,菌丝球密度与生物量基本呈正相关,为了简化操作,采用挑取肉眼

可见的菌丝球,测定菌球萌发活力。但显微镜下观察到的微小菌丝球是否具有萌发活力,有待进一步研究。

(该文作者还有尹淑丽,单位同第一作者。)

#### 参考文献

- [1] 张长青,王红英,张建民,等.白灵菇菌丝培养特性研究[J].江苏农业科学,2004(2):80-81.
- [2] 林杰.白灵菇栽培技术要点[J].中国食用菌,2000,19(5):28-29.
- [3] 周长青,王秀峰,李玉.白灵侧耳栽培条件下对碳源利用的规律的研究[J].中国食用菌,2009,28(1):30-32.
- [4] 范贵增,熊国真.我国食用菌液体菌种生产技术研究进展[J].江苏食用菌,1992(3):21-22.
- [5] 黄爱荣,缪礼鸿,边银丙.双孢蘑菇液体菌种发酵工艺研究[J].食用菌,2009,31(5):12-13.
- [6] 沈敏,李文生,周磊.杏鲍菇液体菌种研制与工厂化栽培应用[J].中国农技推广,2011,27(6):14-15.
- [7] 闫长伟,陈合,陈宜鼎.金针菇液体菌种筛选及培养条件的研究[J].中国食用菌,2003,22(1):35-37.
- [8] 危贵茂,钟卫民,欧阳建华.白灵菇液体菌种培养条件及栽培试验[J].食用菌学报,2005(4):47-51.
- [9] 李正鹏,魏凤娟,吴萍,等.白灵菇液体菌种培养条件研究[J].中国农学通报,2006(4):315-317.
- [10] 卢朝亮.增稠剂在白灵菇液体菌种制备中的应用初探[J].食用菌,2008(3):17-18.
- [11] 任海霞,宫志远,曲玲,等.白灵菇液体培养工艺的初步研究[J].中国农学通报,2009,25(4):183-186.
- [12] 沈维锋,姚志伟,杨群.香菇液体培养的工艺优化[J].武汉生物工程学院学报,2012,8(2):86-89.
- [13] 李灿,陈文超,郭凌.液体菌种制作关键技术[J].中国园艺文摘,2010(8):178-179.
- [14] 张一帆,陈多扬,周振辉,等.草菇液体菌种培养过程的变化和培养终点的研究[J].种子,2012,31(12):9-14.
- [15] 宋德龙,缪礼鸿,艾对元,等.双孢蘑菇工业化生产液体菌种繁育条件的优化[J].食品与发酵工业,2013,39(2):86-91.
- [16] 王桂芹,陈寿成.白灵菇菌丝生长条件的研究[J].中国食用菌,2007,26(2):37-40.
- [17] 唐玉琴.白灵菇液体培养工艺研究[J].北方园艺,2007(12):240-242.
- [18] 王广耀,董立华,栾晓娟.白灵菇液体菌种工艺研究[J].特产研究,2007(4):32-34.

## The Optimization of the High Energy Liquid Culture Conditions of *Pleurotus nebrodensis*

DONG Yu-lan, LI Shu-sheng, ZHANG Li-ping, CHENG Hui-cai, XI Yan-hua, ZHANG Gen-wei, YIN Shu-li

(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081)

**Abstract:** Taking *Pleurotus nebrodensis* as material, the appropriate liquid fermentation medium were studied by measuring the mycelial biomass, the peloton density and the amount of germination vigor index through shake flask method to enhance the vitality of *Pleurotus nebrodensis* strains of liquid. The results showed that the optimum culture conditions were as below: the culture temperature was 30℃, the optimal shaking frequency was 180 r/min and training time was 60 h. The optimum medium were 3.0% of the corn flour, glucose 1.5%, peptone 0.3%, soybean meal 2.0%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%.

**Key words:** liquid strains; culture conditions; mycelium biomass; peloton density; germination vigor