

DOI:10.11937/bfyy.201608039

# 香菇液体发酵过程中生理指标的检测分析

殷书平<sup>1</sup>, 程贤利<sup>2</sup>, 陈文强<sup>3</sup>

(1. 陕西医药控股集团生物制品有限公司, 陕西 汉中 723000; 2. 汉中职业技术学院 药学与医学技术系, 陕西 汉中 723000; 3. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

**摘 要:**以香菇 66<sup>#</sup> 菌株为试材, 采用液体发酵方法, 研究了菌丝球数量、pH 值、还原糖含量、氨基氮含量、纤维素酶活性、漆酶活性、蛋白酶活性等对香菇菌丝生长主要生理指标的影响。结果表明: 当香菇菌株在 26℃、160 r/min 摇床振荡培养至第 8 天时, 菌丝球数量最多。此时, 发酵液 pH 6.5, 还原糖和氨基氮含量分别为 47.12 mg/100mL 和 11.87 mg/100mL, 纤维素酶活性、漆酶活性和蛋白酶活性分别为 1.25、0.023、0.18 U。

**关键词:**香菇; 液体发酵; 还原糖; 氨基氮; 酶活性

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0142-04

香菇(*Lentinus edodes*)属担子菌纲、伞菌目、口蘑科、香菇属。研究表明, 香菇的子实体中含有多种有效活性成分<sup>[1-3]</sup>, 可用于保健、医疗等领域<sup>[4-5]</sup>。另外, 香菇在液体发酵过程中会产生多糖<sup>[6]</sup>、淀粉酶和漆酶<sup>[7]</sup>等多种具有生理活性的物质。

香菇作为食用菌生产的支柱产业之一, 其液体菌种的生产工艺是提高香菇生产效率的关键<sup>[8]</sup>。秦俊哲<sup>[9]</sup>对金针菇液体菌种培养过程的检测指标进行了初步研究, 其结果对金针菇液体菌种工厂化生产的技术控制提供了参考。有关香菇菌种液体培养技术的研究报道较多<sup>[10-11]</sup>, 目前尚缺乏有效控制发酵过程的生理指标和技术参数, 对液体发酵过程中影响香菇菌丝生长的生理指标尚鲜见研究报道。

该研究以香菇菌株为试验材料, 通过对香菇液体发酵过程中的菌丝球数量、pH 值、还原糖含量、氨基氮含量、纤维素酶活性、漆酶活性、蛋白酶活性等影响菌丝生长的主要生理指标进行研究, 旨在为香菇的液体发酵和液体种的生产制备提供理论参考依据。

**第一作者简介:**殷书平(1968-), 男, 陕西商洛人, 本科, 副主任技师, 研究方向为生物制药的研发及管理。E-mail: sp\_yinQA@126.com

**责任作者:**陈文强(1956-), 男, 陕西汉中, 本科, 教授, 硕士生导师, 研究方向为微生物资源的保护与利用。E-mail: wenqiangc@126.com

**基金项目:**陕西省“13115”科技创新工程计划资助项目(2008IDGC-04)。

**收稿日期:**2015-12-16

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株香菇 66<sup>#</sup> 由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

供试仪器: SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); LRH-250-GS 型数显式恒温培养箱(广东省医疗器械厂); SHZ-B 型水浴恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂); ZHWY-210 2C 型数显式恒温摇床(上海志成有限公司); WFIJ2000 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); PHS-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司); TB-214 型电子分析天平(北京赛得利斯仪器系统有限公司)。

供试试剂: 马铃薯、麸皮(均为食品级)市购; 酵母膏(北京奥博星生物技术有限责任公司); 羧甲基纤维素钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司); 3,5-二硝基水杨酸(上海展云化工有限公司); 葡萄糖、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、NaOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、甲醛、福林酚、三氯乙酸等均为分析纯。

供试培养基: 1) 斜面培养基(CPDA), 土豆(去皮) 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.0 g、维生素 B<sub>1</sub> 10.0 mg、H<sub>2</sub>O 1.0 L、琼脂 12.0 g、初始 pH 自然; 2) 液体发酵培养基, 葡萄糖 10.0 g、麦麸 20.0 g、酵母膏 3.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g、H<sub>2</sub>O 1.0 L、初始 pH 自然。

### 1.2 试验方法

1.2.1 原种的活化 配制斜面培养基, 接种香菇 66<sup>#</sup> 菌

株,28℃培养至菌丝满管,备用。

1.2.2 发酵培养 配制液体发酵培养基 7 200 mL,分装于 500 mL 三角瓶中,每瓶装量 200 mL,共计 36 瓶。取香菇 66# 菌株 0.5 cm<sup>2</sup> 菌块接种,静置 24 h,26℃、160 r/min 振荡培养。从摇床培养的第 1 天起,每天同一时间取 3 瓶分别检测各项指标,求平均值。

### 1.3 项目测定

1.3.1 菌丝球计数 将发酵液摇匀,立刻取发酵液 10 mL 于平皿中,将 100×100 的方格纸衬于皿下,计数。

1.3.2 pH 值的测定 取发酵液 50 mL 于烧杯中,用 PHS-3C 型精密酸度计检测 pH 值。

1.3.3 还原糖含量的测定 采用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸法)<sup>[12]</sup>测定。

1.3.4 氨基氮含量的测定 采用甲醛滴定法<sup>[13]</sup>测定。

1.3.5 羧甲基纤维素酶(CMC 酶)活性的测定 采用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸法)<sup>[14]</sup>测定。

1.3.6 漆酶活性的测定 采用 ABTS 法<sup>[14]</sup>测定。

1.3.7 蛋白酶活性的测定 取 2.0 mL 发酵液,在 4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即为粗酶液。粗酶液蛋白酶活性的测定、蛋白酶活性定义和计算公式均参照文献<sup>[15]</sup>方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 香菇液体发酵过程中菌丝球数量

每 24 h 取出 3 瓶,用方格计数法测定每瓶香菇发酵液中菌丝球的数量,求平均值。图 1 显示,香菇液体发酵过程中,0~4 d 菌丝球数量增长缓慢;5~7 d 菌丝球数量增长较快;第 8 天,香菇液体发酵过程中的菌丝球数量达到最多,为 380 个/100mL;随着发酵时间的增加,菌丝的数量开始缓慢减少。

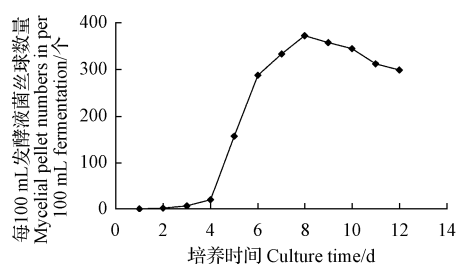


图 1 香菇液体发酵过程中菌丝球数量的变化

Fig. 1 Variation of mycelial pellet numbers in liquid fermentation process of *L. edodes*

### 2.2 香菇液体发酵过程中 pH 值

每 24 h 取出 3 瓶,用精密酸度计测定每瓶香菇发酵液的 pH 值,求平均值,由图 2 可知,香菇液体发酵过程中,pH 值总体呈先减小后增加的趋势,但是变化范围较小,基本稳定在 6.3~7.2。结合菌丝球数量的变化,香菇液体发酵过程中的最适 pH 值为 6.5。

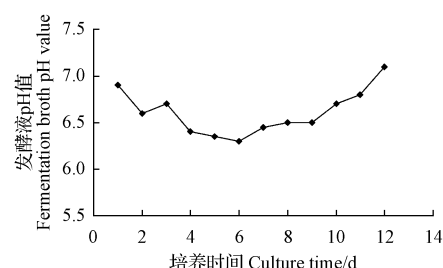


图 2 香菇液体发酵过程中 pH 值的变化

Fig. 2 Variation of pH value in liquid fermentation process of *L. edodes*

### 2.3 香菇液体发酵过程中还原糖含量

每 24 h 取出 3 瓶,用 DNS 法测定每瓶香菇发酵液中还原糖的含量,求平均值,从图 3 可以看出,香菇液体发酵过程中,随着发酵时间的增加,还原糖含量呈先增大后减少的趋势,第 6 天时,还原糖含量达到最大值,为 55.43 mg/100mL;7~8 d 还原糖含量缓慢减少,之后便迅速减少;当菌丝球数量最多时(第 8 天),还原糖的含量为 47.12 mg/100mL。

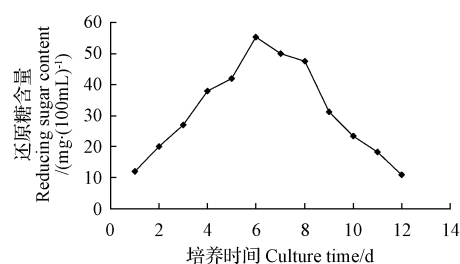


图 3 香菇液体发酵过程中还原糖含量的变化

Fig. 3 Variation of reducing sugar content in liquid fermentation process of *L. edodes*

### 2.4 香菇液体发酵过程中氨基氮含量

每 24 h 取出 3 瓶,用甲醛滴定法测定每瓶香菇发酵液中氨基氮的含量,求平均值,图 4 显示,香菇液体发酵过程中,氨基氮含量的变化趋势和菌丝球数量的变化趋势基本一致;0~5 d 氨基氮含量增长缓慢;5~8 d 氨基氮含量达到最大值,为 11.87 mg/100 mL;随着发酵时间

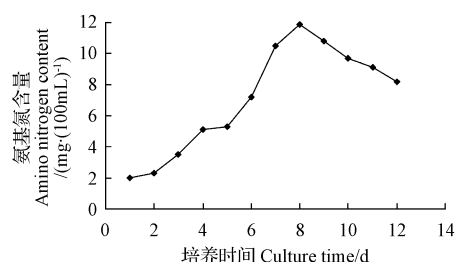


图 4 香菇液体发酵过程中氨基氮含量的变化

Fig. 4 Variation of amino nitrogen content in liquid fermentation process of *L. edodes*

的增加,氨基氮含量呈直线下降的趋势;当菌丝球数量最多时(第8天),氨基氮含量为11.87 mg/100mL。

### 2.5 香菇液体发酵过程中酶的活性

每24 h取出3瓶,分别用DNS法、ABTS法和福林酚法测定每瓶香菇发酵液中的纤维素酶、漆酶和蛋白酶活性,求平均值。表1和图5显示,香菇液体发酵过程中,1~3 d纤维素酶活性较低且增加缓慢;4~7 d迅速

表1 香菇液体发酵过程中纤维素酶、漆酶和蛋白酶的活性

Table 1 The activity of cellulase, laccase and protease in liquid fermentation process of *L. edodes*

培养时间 Culture time/d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
纤维素酶活性 Cellulase activity/U	0.16	0.18	0.25	0.36	0.57	0.89	1.25	1.25	0.92	0.80	0.79	0.62
漆酶活性 Laccase activity/U	0	0.012	0.012	0.014	0.014	0.017	0.023	0.023	0.019	0.018	0.017	0.016
蛋白酶活性 Protease activity/U	0	0.07	0.12	0.13	0.16	0.18	0.18	0.18	0.17	0.15	0.13	0.13

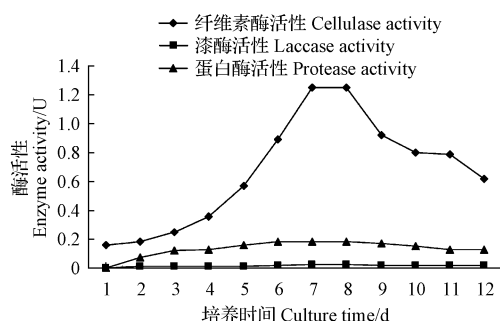


图5 香菇液体发酵过程中酶活性的变化

Fig. 5 Variation of enzyme activity in liquid fermentation process of *L. edodes*

### 3 讨论与结论

研究表明,在香菇液体发酵过程中,第8天菌丝球数量最多,氨基氮含量、纤维素酶活性、漆酶活性以及蛋白酶活性均最大,pH值为6.5;第6天还原糖含量最大,之后开始下降;氨基氮含量的变化趋势和菌丝球数量的变化趋势基本一致,第8天之后氨基氮含量下降。因此,发酵终点应控制在第8天,pH值控制在6.5。此时,香菇液体发酵过程中的菌丝球数量、pH值、还原糖、氨基氮含量等生理指标的测定,可有效检测香菇液体种的制备过程。

目前,有关食用菌液体发酵生理指标检测的研究报道甚少。郭艳艳等<sup>[16]</sup>研究了液体培养条件下,不同培养条件对斑玉蕈菌丝产漆酶、锰过氧化物酶、木素过氧化物酶、木聚糖酶、纤维素酶的影响,发现不同培养条件对菌丝生长和多种酶活性有很大影响。李守勉等<sup>[17]</sup>研究发现,不同碳、氮源对秀珍菇菌丝体产胞外纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、漆酶、愈创木酶酚、多酚氧化酶的活性影响差异较大。庞杰等<sup>[18]</sup>认为,食用菌菌种活性评价并非取决于单一指标,生理活性指标的采用因菌种的不同而有所差异。由于该研究所检测的酶活性较为单一,

增加;7~8 d时纤维素酶活性达到最高值,为1.25 U,之后便迅速下降。漆酶活性的变化趋势不明显,呈先增大后减小的趋势,7~8 d时,漆酶活性达到最高值,为0.023 U。蛋白酶活性的变化趋势不明显,呈先增大后减小的趋势,6~8 d时,蛋白酶活性达到最高值,为0.18 U。当菌丝球数量最多时(第8天),纤维素酶活性、漆酶活性、蛋白酶活性分别为1.25、0.023、0.18 U。

采用其它指标作为香菇液体发酵过程的参考还有待进一步研究并完善。

### 参考文献

- [1] 张洪涛,赵小亮,范尊晓,等.香菇子实体中水溶性多糖 LFI 和 LFII 的分级精制及其结构表征[J].食品与发酵工业,2014,40(11):1-7.
- [2] 程湛,杨宇迪,匡绮蓉,等.香菇肽提取优化及其体外抗氧化醒酒活性[J].中国食品学报,2015,15(4):93-102.
- [3] 李小凡,王常青,菅艳,等.香菇柄中水溶性蛋白的提取及组成分析[J].食品工业科技,2015,36(9):343-345.
- [4] 关秀文,韦炳邓,杨军,等.香菇多糖对5-FU抑制胃癌细胞增殖的影响及可能机制[J].中国生化药物杂志,2014,34(8):81-83.
- [5] 顾琼艳,吴美媛.香菇多糖联合氟尿嘧啶体内抗肝肿瘤作用的研究[J].中国药师,2015,18(3):400-403.
- [6] 乔艳明,陈文强,邓百万,等.秦巴山区香菇胞外多糖高产菌株的筛选[J].北方园艺,2015(8):137-142.
- [7] 王艳梅,吴艳,王雅珍,等.香菇菌富硒液体发酵及三种胞外酶活性变化[J].长春师范大学学报,2015,34(6):62-65.
- [8] 陈文强,乔艳明.响应面法在香菇液体种生产工艺优化中的应用[J].食品工业科技,2015,36(18):290-294.
- [9] 秦俊哲.金针菇液体菌种培养过程检测指标的研究[J].食用菌学报,2003,10(1):12-16.
- [10] 金红,杨孝丽,任灿,等.食用菌深层发酵物中生物活性物质含量的比较[J].食品研究与开发,2015,36(3):93-96.
- [11] 魏雅冬,王广慧,郭海滨,等.香菇液体发酵培养基的优化研究[J].北方园艺,2015(12):136-138.
- [12] 王勇,高苇,张春祥,等.液体培养条件下绿色木霉 Tr9701 胞外酶及还原糖动态变化研究[J].华北农学报,2015,30(4):226-230.
- [13] 赵媛,蒯立杰,吕佼,等.山杏仁酱油发酵工艺的优化[J].食品工业科技,2015,36(5):240-242.
- [14] 安琪,吴雪君,吴冰,等.不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响[J].菌物学报,2015,34(4):761-771.
- [15] 李诗雯,刘雅丽,刘晶晶,等.牛磺酸对米曲霉蛋白酶活性影响的初步研究[J].食品工业科技,2015,36(17):253-255.
- [16] 郭艳艳,阮玲云,冯宏昌,等.不同营养条件下斑玉蕈菌丝生长及产酶特性[J].菌物学报,2014,33(3):697-705.
- [17] 李守勉,李明,田景花,等.不同碳、氮源营养对秀珍菇菌丝体生长及其胞外酶活性的影响[J].北方园艺,2014(2):143-145.
- [18] 庞杰,孙国琴,朱晓清,等.食用菌菌种活性评价指标研究概述[J].食用菌,2015,23(1):31-32.

# 青藏高原特有植物独一味 繁育系统初步研究

金 兰

(青海师范大学 生命与地理科学学院,青海 西宁 810008)

**摘 要:**以青海玉树独一味为试材,采用野外观测和试验测定相结合的方法,研究了独一味以开花物候、OCT、P/O、花粉活力、柱头可授性为基础的繁育系统类型。结果表明:独一味开花物候期为5—7月,OCT为4、P/O为1 645、雌雄异熟,有性繁育系统初步确定为部分自交亲和,异交,需要传粉者。

**关键词:**独一味;繁育系统;开花物候

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0145-05

独一味(*Lamiophlomis rotata* (Benth) Kudo)属唇形科中的一个单型属独一味属植物<sup>[1]</sup>,由于该物种分布面较窄,在中国主要分布于西藏、青海的玉树果洛藏区、甘肃的甘南藏区、四川西部,云南西北部呈少量的零星分布<sup>[2]</sup>,因而,有学者把它列为青藏高原特有的植物<sup>[3]</sup>。近几年来,由于独一味产品规模化大量生产,人为的滥采滥挖等因素的影响,该物种已濒临灭绝,2000年已经将独一味列为一级濒危藏药品种<sup>[3]</sup>。目前,许多研究人员

对独一味研究主要集中在临床应用、成分分析等方面,对其繁育的系统研究很少,通过独一味人工繁殖的研究发现,独一味自然结实率很低,该试验以分布于青海玉树国营牧场的独一味自然居群为研究对象,初步研究了花的生物学特性、不同海拔开花物候、花粉胚珠比、杂交指数及自然结实率,旨在进一步研究独一味的繁殖特性及种子形成机制,为更好的利用和保护这一濒临灭绝的物种资源提供初步的理论参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验地设在青海省玉树州玉树国营牧场中,位于北纬33°27'99",东经96°52'86",总面积为55 hm<sup>2</sup>,平均海拔4 400 m,气候为高原大陆性凉温半干旱气候,光能丰富,

**作者简介:**金兰(1965-),女,硕士,教授,现主要从事高原中藏药及其生理等研究工作。E-mail:qhjinlan@163.com.

**基金项目:**青海省科技厅资助项目(2015-Z-Y06)。

**收稿日期:**2015-12-16

## Detection and Analysis of Physiological Indexes of *Lentinula edodes* in Liquid Fermentation Process

YIN Shuping<sup>1</sup>, CHENG Xianli<sup>2</sup>, CHEN Wenqiang<sup>3</sup>

(1. Shaanxi Pharmaceutical Holding Group Biological Products Co. Ltd., Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Department of Pharmaceutical and Medical Technology, Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong, Shaanxi 723000; 3. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract:** Taking *Lentinula edodes* 66<sup>#</sup> as test material, using the method of liquid fermentation, the main physiological indexes (mycelial pellet numbers, pH value, reducing sugar content, amino nitrogen content, cellulase activity, laccase activity, protease activity) affecting the mycelial growth of *Lentinula edodes* was studied. The results showed that mycelial pellet numbers of *Lentinula edodes* was the most under the conditions with 26°C, 160 r/min in the rotary vibrator for 8 days. At this time, pH value of fermentation solution was 6.5, reducing sugar content was 47.12 mg/100mL, amino nitrogen content was 11.87 mg/100mL, cellulase activity was 1.25 U, laccase activity was 0.023 U, and protease activity was 0.18 U.

**Keywords:** *Lentinula edodes*; liquid fermentation; reducing sugar; amino nitrogen; enzyme activity