

doi:10.11937/bfyy.20164845

黑木耳液体培养基配方优化

李 超, 李 红, 张 敏

(辽宁省农业科学院 食用菌研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以“辽黑木耳1号”为试材,采用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交优化实验,研究了不同碳源氮源和接种量对黑木耳菌丝生物量的影响,以期筛选出最佳黑木耳菌丝液体培养基配方。结果表明:黑木耳液体培养的最佳培养基配方为葡萄糖2.0%,酵母膏1.0%,磷酸二氢钾0.3%,硫酸镁0.15%,最佳接种量为10%,该条件下菌丝生物量可达 $12.3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:黑木耳;液体培养基;配方

中图分类号:S 646.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)16-0170-04

黑木耳 (*Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underwood) 属担子菌纲木耳目木耳科木

耳属,又名木蛾、树耳、树蕈、黑耳、云耳,单生或群生。黑木耳味道独特,脆嫩爽口,营养丰富,食药兼备,被现代营养学家誉为“素中之荤”,世界上称之为“中餐中的黑色瑰宝”^[1-2]。由于黑木耳可食、可药、可补,消费者对此的需求量越来越大。

辽宁省黑木耳栽培规模日益扩大,液体菌种

第一作者简介:李超(1976-),男,硕士,副研究员,研究方向为食用菌育种及栽培。E-mail:lnnkylxy@163.com.

收稿日期:2017-03-20

Effect of Plaster Content on Sterilized Raw Material
Cultivation of *Pleurotus ostreatus*

WEN Qing, LIU Qiumei, MA Haojia, ZHU Wei, SUN Xiankai, SHEN Jinwen
(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: Via the method of the sterilized cotton seed hull cultivation, *Pleurotus ostreatus* ‘New 831’ was chosen as the experimental material to study the effect of six plaster contents (0%, 1%, 2%, 3%, 4% and 5%) on the growth and development, infection rate, the biological efficiency of *P. ostreatus*, thus to obtain the optimal plaster content for the sterilized raw material cultivation of *P. ostreatus*. The results showed that the mycelial growth vigor of *P. ostreatus* reduced with the increasing content of plaster. The mycelial growth rate increased firstly and then decreased with the plaster content increased, the fastest growth rate occurred at 3% plaster content. Infection rates significantly reduced by adding plaster. The biological efficiency increased firstly and then decreased with the increasing content of plaster, and the highest biological efficiency was obtained at 1% plaster content. The comprehensive results indicated that the optimal plaster content in sterilized cotton seed hull cultivation was 1%.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; edible fungi; sterilized raw material cultivation; plaster; biological efficiency; Ca^{2+}

在实际生产中广泛应用,随着设施化和集约化程度的提高,黑木耳种植企业、合作社以及菇农对黑木耳液体菌种的制作技术提出了更高的要求,现对黑木耳液体培养基配方进行了深入研究,旨在探索黑木耳液体培养基的最佳组成,为黑木耳产业发展提供更好的技术依据^[3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“辽黑木耳 1 号”来源于辽宁省农业科学院食用菌研究所。

液体培养基配方:碳源 20 g,氮源 10 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 1.5 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 液体菌种培养方法

向 250 mL 摇瓶中装入液体培养基 100 mL,置于 HZQ-Q 智能型全温振荡器中振荡培养,转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,培养周期 120 h。

1.2.2 黑木耳菌丝体生物量的测定

将培养好的菌丝体装入离心管中, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,弃上清,用去离子水洗涤沉淀 3 次,置于 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重,得菌丝体生物量,记录分析。

1.2.3 不同碳源试验

分别以乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉为碳源,以蛋白胨为氮源,其它培养基成分不变,在 0.12 MPa , $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 25 min 后,培养黑木耳菌丝体,120 h 后测定菌丝生物量。试验设 3 次重复。

1.2.4 不同氮源试验

分别以酵母膏、蛋白胨、硫酸铵、黄豆粉、麦麸煎汁(麦麸煮沸后计时 20 min,纱布过滤后澄清液)为氮源,葡萄糖为碳源,其它培养基成分不变,在 0.12 MPa , $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 25 min 后,培养黑木耳菌丝体,120 h 后测定菌丝生物量。试验设 3 次重复。

1.2.5 接种量对菌丝体生物量的影响

黑木耳接种量分别以 5%、10%、15%、20% 接种于液体培养基上,250 mL 三角瓶装液量为 100 mL, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下恒温振荡培养 96 h,然后测定其菌丝生物量,试验设 3 次重复。

1.2.6 培养基配方优化试验

采用 $L_9(3^4)$ 设计,以最佳碳源、最佳氮源、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 为因子进行 $L_9(3^4)$ 正交实验^[4],对培养基成分进行优化,确定黑木耳液体培养基最优配方(表 1)。 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡培养 96 h,转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,然后测定黑木耳菌丝体生物量,试验设 3 次重复。

表 1

正交实验因素和水平

Table 1

Factors and levels of orthogonal experiment

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

水平 Level	因素 Factor			
	A 葡萄糖 Glucose	B 酵母膏 Yeast extract	C 硫酸镁 Magnesium sulfate	D 磷酸二氢钾 Monopotassium phosphate
1	10.0	4.0	1.5	2.0
2	20.0	7.0	2.0	3.0
3	30.0	10.0	2.5	4.0

2 结果与分析

2.1 不同碳源对黑木耳菌丝量的影响

由图 1 可知,黑木耳菌丝对葡萄糖的利用效果最佳,平均生物量达 $9.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其次是乳糖、麦芽糖和蔗糖,淀粉的利用效果表现最差。因此,选择葡萄糖作为黑木耳菌丝生长的适宜碳源。

2.2 不同氮源对黑木耳菌丝量的影响

由图 2 可知,酵母膏作为黑木耳液体菌种的供试氮源时,菌丝体生物量最高,达到 $11.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其次是蛋白胨、黄豆粉和麦麸煎汁,黑木耳对硝酸铵的利用最差,表明黑木耳对有机氮源的利用要强于无机氮源。因此,选择酵母膏为黑木耳菌丝生长的适宜氮源。

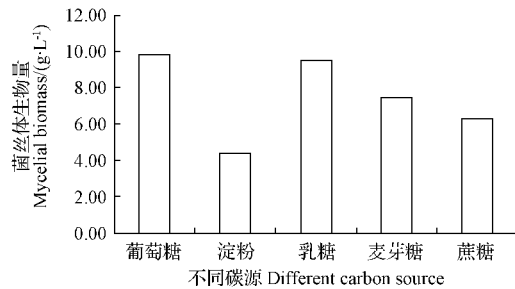


图1 不同碳源对黑木耳菌丝体生物量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon source on mycelial biomass

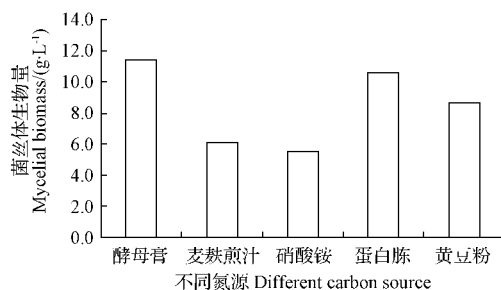


图2 不同氮源对黑木耳菌丝体生物量的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen source on mycelial biomass

2.3 接种量对黑木耳菌丝体生物量的影响

由图3可知,当接种量小于10%时,菌丝生物量随着接种量的增加而逐渐增大,当接种量大于10%时,菌丝生物量的值趋于稳定,并未明显增加。试验表明,接种量过大,菌种活性下降。综合考虑菌种质量、生产可实践性以及经济因素,选择10%为最佳接种量。

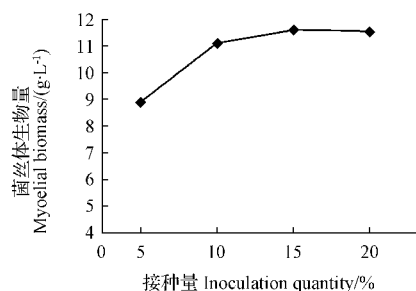


图3 接种量对黑木耳菌丝体生物量的影响

Fig. 3 Effect of different inoculation quantity on mycelial biomass

2.4 黑木耳液体菌种培养基优化的正交实验

由表2可以看出,在4个营养因素之中,对黑木耳菌丝体生物量影响程度的大小排列依次为A>B>D>C。从正交实验结果可知,各因素水平优选的较佳培养基配方为A₂B₃C₁D₂,培养96 h后平均菌丝体生物量可达12.3 g·L⁻¹,结果非常理想。

表2 正交实验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验编号 Number	因素 Factor				菌丝体生物量 Mycelial biomass /(g·L ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	6.6
2	1	2	2	2	7.4
3	1	3	3	3	8.8
4	2	1	2	3	10.2
5	2	2	3	1	10.6
6	2	3	1	2	12.3
7	3	1	3	2	9.5
8	3	2	1	3	9.7
9	3	3	2	1	10.1
K ₁	22.94	26.46	28.72	27.48	
K ₂	33.24	27.83	27.82	29.35	
K ₃	29.47	31.36	29.11	28.82	
X ₁	7.646 7	8.820 0	9.573 3	9.160 0	
X ₂	11.080 0	9.276 7	9.273 3	9.783 3	
X ₃	9.823 3	10.453 3	9.703 3	9.606 7	
R	3.433 3	1.633 3	0.430 0	0.623 3	

2.5 验证试验

采用上述最佳液体菌种培养基配方进行验证试验,测得黑木耳菌丝体生物量为12.55 g·L⁻¹,与试验值的相对误差为2.03%,说明该正交实验合理可靠。

3 结论与讨论

试验结果表明,碳源是组成黑木耳液体培养基的主要成分之一,诸多因素中,对菌丝生物量的影响是最为重要的,它为黑木耳细胞提供了碳素和碳架,也是微生物生命活动能量来源的必要途径。黑木耳既可以利用单糖和双糖等小分子碳源,又可以利用成分复杂的复合碳源,在效果上表现为单糖>双糖>多糖。氮源是食用菌细胞合成蛋白质和核酸的主要原料,在深层发酵中起着重要的作用。增加一定的氮源,可以明显促进菌丝体的生长^[4-7]。在试验中黑木耳对有机氮源利用

最佳,对无机氮源的利用效果不好,其机理有待于进一步深入研究。

无机盐是构成菌丝体的重要成分,作为酶的组成部分,调节培养基的渗透压,pH 和氧化还原电位等,对于黑木耳液体发酵,无机盐的种类选择与用量还有很大的研究空间。

生长因子对微生物正常代谢必不可少,且又不能用简单的碳源或氮源自行合成,生长因子对生物量增加的影响以及菌丝体活性的影响,将在今后的工作中进一步深入研究,另外,其它生长因子包括碱基、卟啉及其衍生物、甾醇、胺类、氨基酸等作用效果也有必要深入探讨。

培养条件也是黑木耳液体菌种制作的重要因素^[8-9],分析和建立温度、湿度、pH 及接种量共同作用的交互模型,是今后的工作重点和方向。

液体菌丝培养方便快捷,菌龄一致性好,可控性强,非常有利于菌种改良,适合工厂化生产和加工,对于黑木耳液体菌丝培养的生物活性、安全性以及作为菌种应用的稳定性、抗性也需要在实践中不断探索。

参考文献

[1] 李玉. 中国黑木耳[M]. 长春: 长春出版社, 2001.

[2] 梁延海,张萍,赵雪岭,等. 液体菌种在黑木耳栽培中应用效果分析[J]. 防护林科技, 2004(5): 33-34.

[3] 张恒银,孙艳丽,徐良,等. 黑木耳液体深层发酵培养基的初步筛选[J]. 食用菌, 2006(5): 13-14.

[4] YOON S J, YU M A, PYUN Y R, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains apolysaccharide with anti-coagulant activity mediated by antithrombin[J]. Thrombosis Research, 2003, 112(3): 151-158.

[5] WU Q, TAN Z P, LIU H D, et al. Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(3): 284-288.

[6] CHEN G, LUO Y C, JI B P, et al. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(6): 103-108.

[7] MA Z, WAN J, ZHANG L, et al. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-ludae* as potential anti-tumor agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 977-983.

[8] 孟丽君,王芳,张玉萍. 黑木耳液体菌种的制备条件及应用研究[J]. 食用菌, 2009(6): 25-26.

[9] 王谦,贾震. 不同条件对黑木耳液体深层发酵的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2011, 31(1): 74-78.

Formula Optimization of *Auricularia auricula* Liquid Spawn

LI Chao, LI Hong, ZHANG Min

(Edible Fungi Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The single factor analysis and $L_9(3^4)$ orthogonal test were applied to get the best formula of *Auricularia auricula* liquid spawn. The results showed that the optimal composition of *Auricularia auricula* liquid spawn were as follows: glucose 2.0%, yeast extract 1.0%, KH_2PO_4 0.3%, MgSO_4 0.15%. The optimal inoculation quantity of *Auricularia auricula* was 10%, in these conditions, the biomass could be achieved $12.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: *Auricularia auricula*; liquid spawn; formula