

金针菇液体培养基的优化研究

郭欣欣, 樊淑华, 王永立

(周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466001)

摘要:以金针菇为试材,以菌丝体干重和菌丝球数目为考察指标,选择碳源、氮源、无机盐、维生素为影响因素,通过发酵试验和正交实验确定最佳液体种子培养基。结果表明:金针菇液体培养的最佳碳源为可溶性淀粉,最佳氮源为黄豆粉,最佳无机盐为 KH_2PO_4 ,最佳维生素为 VB_2 ;最佳培养基配方为 4% 可溶性淀粉、5% 黄豆粉、0.05% KH_2PO_4 、0.0075% VB_2 。

关键词:金针菇;液体菌种;培养基;优化

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0146-03

金针菇属真菌门担子菌亚门蘑菇目口蘑科类火菇属,又称朴菇、构菌、冬菇、毛柄类火菇、金菇等,是一种高蛋白、低热量、多糖类营养丰富的保健食品^[1]。金针菇多糖是一种良好的免疫增强剂,是金针菇的主要活性成分之一,能增强 T 细胞功能,激活淋巴细胞及吞噬细胞,促进抗体产生,诱导干扰素的形成,通过恢复和提高机体的免疫功能来抑制肿瘤的生长^[2-3]。

我国是最早进行人工栽培金针菇的国家,人工栽培金针菇方式主要为固体栽培。但是固体栽培法生产金针菇子实体受栽培条件的影响,季节性较强,生长周期长,操作繁琐。近年来,应用液体菌种技术培养食用菌菌丝体发展迅速。由于液体菌种培养产生的菌丝体所含营养物质与子实体类似,且液体菌种培养产生菌丝体的生产周期短,产量高,成本低,发菌速度快,管理方便,适宜大规模工业化生产。此外,金针菇液体菌种具有生产周期短、菌龄一致、接种便利、菌丝分散性好、流动性强、萌发快、出菇齐、成品率高等优点,更适宜于机械化操作。因此,采用制备的金针菇液体菌种栽培子实体已成为研发热点,特别是大规模工业化生产食用菌的今天,采用液体菌种栽培子实体已成为金针菇工业化生产的重要应用^[1,4-6]。该试验通过发酵试验和正交实验确定最佳液体种子培养基,旨在为金针菇液体菌种生产提供理论依据。

第一作者简介:郭欣欣(1989-),女,本科,研究方向为生物技术。

责任作者:王永立(1978-),男,河南西平人,硕士,讲师,研究方向为食品安全与检测。E-mail:wangylxiaohe@163.com。

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(12B230019);周口师范学院青年科研基金资助项目(zknuqn201124B)。

收稿日期:2013-10-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试金针菇菌种由周口市农业科学院食用菌研究中心提供。

斜面培养基(PDA):20%马铃薯、2%蔗糖、2%琼脂、0.1% KH_2PO_4 、10 mg/100mL VB_2 , pH 自然;碳源筛选基础培养基:3%黄豆粉、0.1% KH_2PO_4 、0.01% VB_2 ;氮源筛选基础培养基:0.1% KH_2PO_4 、0.01% VB_2 、2%蔗糖;无机盐筛选基础培养基:0.01% VB_2 、2%蔗糖、3%蛋白胨;维生素筛选基础培养基:0.1% KH_2PO_4 、2%蔗糖、3%蛋白胨。

供试碳源为蔗糖、乳糖、可溶性淀粉;供试氮源为黄豆粉、蛋白胨、硫酸铵;供试无机盐为 KCl 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 ;供试维生素为 VB_1 、 VB_2 、 VB_6 。

1.2 试验方法

1.2.1 斜面菌种制备 无菌条件下,将供试的菌种接入斜面培养基上,25℃恒温培养 10 d,挑选菌丝粗壮、浓密、无污染的斜面菌种,置 4℃冰箱备用^[5,7-8]。

1.2.2 最佳碳源、氮源、无机盐、维生素的筛选 在 250 mL 三角瓶中分别加入 100 mL 碳源、氮源、无机盐、维生素筛选基础培养基后,再依次分别加入 2% 的蔗糖、可溶性淀粉、乳糖,3% 的黄豆粉、蛋白胨、硫酸铵,0.1% 的 KCl 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 ,0.01% 的 VB_1 、 VB_2 、 VB_6 。每处理 3 次重复,充分混均后,0.1 MPa 压力下灭菌 30 min。无菌条件下,取 2 块约 2 cm² 生长旺盛的斜面菌种块,分别接种于各三角瓶中。静置 24 h 后摇瓶培养,在 24℃、摇床转速为 180 r/min 条件下振荡培养 8 d,观察菌丝生长状况,测量菌丝体干重^[7-8]。

1.2.3 正交实验 以各单因素试验最适条件为基础,选

择氮源(A)、碳源(B)、无机盐(C)、维生素(D)进行4因素3水平培养基浓度配比优化试验,按 $L_9(3^4)$ 进行正交实验设计,以菌丝干重为指标,确定液体菌种培养基浓度最适组合^[8-9]。每个试验3次重复,正交实验各因素及水平见表1。

表1 正交实验因素与水平

水平	因素			
	A 可溶性淀粉	B 黄豆粉	C KH_2PO_4	D VB_2
1	3	3	0.05	0.0050
2	4	4	0.10	0.0075
3	5	5	0.15	0.0100

1.2.4 菌丝体生长指标观测 菌丝生长状况的观察:摇瓶培养8 d后,观察各摇瓶中菌丝球的密度及大小。菌丝球密度大、菌丝球体积较大者,菌丝生长状况则良好。菌丝干重的测量^[7]:将培养好的菌丝体用滤纸过滤后,用蒸馏水冲洗3次,放至烘干且已称重过的培养皿中,电热恒温鼓风干燥箱中 105°C 烘干0.5 h,称重,直至2次称重的重量差不超过2 mg。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌丝生长的影响

从表2可以看出,金针菇在3种碳源培养基中都可以生长,但不同碳源条件下金针菇菌丝生长状况是不同的。对不同碳源(处理)条件下生长的菌丝干重进行方差分析及多重比较知,各处理间菌丝生物量差异极显著,说明金针菇菌丝生长对不同碳源利用能力不同,不同碳源培养基中菌丝体生物量大小依次为可溶性淀粉>蔗糖>乳糖。

2.2 不同氮源对菌丝生长的影响

从表2可以看出,根据菌丝的生长状况判断,金针菇在黄豆粉、蛋白胨等有机氮源的培养基中可以生长,但在硫酸铵无机氮源的培养基中几乎不生长。对不同氮源条件下生长的菌丝干重统计分析知,各处理间菌丝生物量差异极显著,说明金针菇菌丝对不同氮源利用能力不同,不同氮源培养基中菌丝体生物量大小依次为黄豆粉>蛋白胨>硫酸铵。

表2 不同碳、氮源条件下的菌丝干重

碳源	可溶性淀粉	菌丝生长状况	菌丝干重平均值
			$/\text{g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$
碳源	可溶性淀粉	菌丝球大,密度大	1.292 aA
	蔗糖	菌丝球中等,密度大	0.546 bB
	乳糖	菌丝球小,密度低	0.322 cC
氮源	黄豆粉	菌丝球大,密度大	1.433 aA
	蛋白胨	菌丝球中等,密度大	0.819 bB
	硫酸铵	菌丝球小,密度低	0.000 cC

注:不同小写字母表示0.05水平上差异显著,不同大写字母表示0.01水平上差异极显著。下同。

2.3 不同无机盐对菌丝生长的影响

由表3可知,金针菇在3种无机盐培养基中都可以生长,且不同无机盐对金针菇菌丝生长状况影响差异不大。尽管测量数据显示,不同无机盐培养基中菌丝干重存在差异,从高到低依次为 $\text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{K}_2\text{HPO}_4 > \text{KCl}$ 。但统计分析可知,各处理间各菌丝生物量差异不显著,说明金针菇对不同无机盐利用能力基本相同。

2.4 不同维生素对菌丝生长的影响

从表3可以看出,金针菇在 VB_1 、 VB_2 、 VB_6 都可以生长,但不同维生素对金针菇菌丝生长状况影响是不同的。对不同维生素(处理)条件下生长的菌丝干重统计分析知,各处理间菌丝体生物量差异显著,其菌丝体生物量大小依次为 $\text{VB}_2 > \text{VB}_1 > \text{VB}_6$ 。

表3 不同无机盐及维生素条件下菌丝生长情况及干重

无机盐		菌丝球生长状况	菌丝干重平均值
			$/\text{g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$
无机盐	KH_2PO_4	菌丝球大,密度大	1.287 aA
	K_2HPO_4	菌丝球中等,密度低	1.264 aA
	KCl	菌丝球小,密度低	1.221 aA
维生素	VB_2	菌丝球大,密度大	1.242 aA
	VB_1	菌丝球中等,密度大	1.112 bAB
	VB_6	菌丝球小,密度低	0.964 cB

2.5 正交实验结果

由表4可知,培养基中各因素对菌丝体生物量影响的主次顺序是B(黄豆粉)>A(可溶性淀粉)>C(KH_2PO_4)>D(VB_2);最优水平组合为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_1\text{D}_2$,即最佳的培养基为:4%可溶性淀粉,5%黄豆粉,0.05% KH_2PO_4 ,0.0075% VB_2 。

表4 培养基浓度配比的正交实验结果

序号	因素				菌丝干重 $/\text{g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$
	A 可溶性淀粉/%	B 黄豆粉/%	C KH_2PO_4 /%	D VB_2 /%	
1	1	1	1	1	0.881
2	1	2	2	2	0.912
3	1	3	3	3	1.112
4	2	1	2	3	0.900
5	2	2	3	1	1.212
6	2	3	1	2	1.355
7	3	1	3	2	0.902
8	3	2	1	3	0.996
9	3	3	2	1	0.922
K_1	0.968	0.894	1.077	1.005	
K_2	1.156	1.040	0.911	1.056	
K_3	0.940	1.130	1.075	1.003	
R	0.216	0.235	0.166	0.053	

3 结论与讨论

金针菇属于木腐生菌,适于其生长的碳源、氮源、无机盐、维生素的种类很多,基于营养要求,该试验利用正交实验确定适宜金针菇菌丝生长的最佳培养基为4%可溶性淀粉,5%黄豆粉,0.05% KH_2PO_4 , 0.0075% VB_2 ,采用此配方培养出来的金针菇菌丝球大而均匀,培养液清亮透明,具有金针菇的清香气味。

该试验在培养摇瓶初期,菌丝球数量增长缓慢,培养至第3~6天为菌丝球增长旺盛期,第7天菌丝球数量达到峰值。但随着培养液中营养成分的减少及菌丝活性的减弱,菌丝生长速度开始下降,这符合丝状真菌的一般生长规律。同时对菌丝球的形态观察结果表明,第1~3天是菌种块萌发定植期,该阶段培养液颜色清亮,菌丝片段增多,出现分枝;第4~6天菌种块沉没,培养液中菌丝球数量增多,体积增大,边缘呈绒毛状,培养液变稠;第7天菌丝球密度达峰值,但菌丝球颜色发黄,有大小不均匀的现象;此后,菌丝球边缘变得光滑,密度逐渐减效,菌丝球自溶开始加快,培养液变得稍浑浊。该结果与秦俊哲等^[10]的研究结果一致,也进一步说明该配方营养配比是恰当的。

该试验测得的菌丝体干重整体上相对于姜宁等^[7]所测结果偏小。其原因可能是在振荡发酵过程中,由于试验条件有限致使摇床温度和转速未能达到最佳状态。

另外,在制作培养基时,马铃薯块稍大,熬制时其营养成分可能没有完全释放到培养基中,导致培养基的浓度稍低。同时,试验中的药品如维生素的需要量较少,在称量的过程中存在一定的误差,这也可能是导致试验结果偏小的原因。

参考文献

- [1] 弓建国. 食用菌栽培技术[M]. 北京:化学工业出版社,2011.
- [2] 谢春芹,贾君,谢正林,等. 金针菇菌渣栽培秀珍菇试验[J]. 北方园艺,2012(9):170-172.
- [3] 蔡和晖,廖森泰,叶运寿,等. 金针菇的化学成分、生物活性及加工研究进展[J]. 食品研究与开发,2008(11):171-174.
- [4] 高淑敏. 金针菇液体菌种培养液配方筛选试验[J]. 北方园艺,2011(12):154-156.
- [5] 陈力力,吴新芬. 金针菇液态发酵培养基的筛选[J]. 生物技术,2007,17(1):73-75.
- [6] 马瑞霞,姚献华,魏志华. 白色金针菇液体菌种生产技术研究[J]. 中国食用菌,2006,24(6):16-17.
- [7] 姜宁,刘晓鹏,杨洪,等. 金针菇液体培养基优化研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(21):6429-6430.
- [8] 杨子美,郭成金. 正交设计法筛选槐耳菌丝液体培养基的研究[J]. 天津师范大学学报,2009,29(3):66-68.
- [9] 张桂春,李连梅,黄清荣,等. 榆黄菇胞外多糖液体发酵培养基的优化[J]. 西北农业学报,2005,14(2):155-157.
- [10] 秦俊哲,魏颖杰,陈合,等. 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.

Study on the Optimization of Liquid Cultural Medium of *Flammulina velutipes*

GUO Xin-xin, FAN Shu-hua, WANG Yong-li

(Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: Taking *Flammulina velutipes* as material, the factors influencing mycelium growth were screened in order to determine the best liquid strain culture medium of *Flammulina velutipes* that produce intracellular polysaccharide. The dry weight of the mycelia and the number of mycelium pellet were selected as the investigation index for determining the carbon source, nitrogen source, inorganic salt and vitamin. The fermentation test and the orthogonal test were used to analysis the four factors and to determine the optimum culture medium of liquid strain of *F. velutipes*. The results showed that the optimum carbon source for liquid culture of *F. velutipes* was soluble starch, the optimum nitrogen source was soybean flour, the optimum inorganic salt was KH_2PO_4 , and the optimum vitamin was VB_2 , and the optimum formula of culture medium was as follows: 4% soluble starch, 5% soybean flour, 0.05% KH_2PO_4 , 0.0075% VB_2 .

Key words: *Flammulina velutipes*; liquid strain; culture medium; optimization