

茶树菇液体发酵条件研究

刘 敏¹, 卢 红², 黄 媛 媛², 荣 群², 王 谦¹

(1. 河北大学 生物技术研究中心, 河北 保定 071002; 2. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘 要:以茶树菇为试材,采用液体摇瓶培养法,通过单因素试验、正交实验,以菌丝体生物量为主要指标,对茶树菇液体发酵培养基配方及培养条件进行优化。结果表明:最适宜的培养基配方为葡萄糖 3.0%、豆饼粉 1.0%、酵母膏 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10%、 KH_2PO_4 0.10%。适宜的茶树菇液体培养条件为起始 pH 6.0~7.0、培养温度 25~28 °C、摇床转速 150~180 r·min⁻¹。

关键词:茶树菇;液体培养基;培养条件;优化;菌丝体鲜重

中图分类号:S 646.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)11-0142-03

茶树菇(*Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing)属层菌纲、伞菌目、粪锈伞科、田头菇属^[1],又名茶薪菇,原生于南方的油茶树上,故俗称茶树菇。茶树菇味道鲜美,盖嫩柄脆,香气浓郁,营养丰富^[2],是一种集高蛋白、低脂肪、营养、保健于一身的绿色食品^[3]。根据国家食品质量监督检验中心(北京)检验报告,每 100 g(干品)含蛋白质 14.2 g,纤维素 14.4 g,总糖 9.93 g;含钾 4 713.9 mg,钠 186.6 mg,钙 26.2 mg,铁 42.3 mg^[4]。茶薪菇富含蛋白质、氨基酸、矿质元素,且有清热、平肝、明目之药用功效,可以利尿、健脾、防癌、抗衰老、降血压,是一种具有较高开发价值的珍稀食用菌^[5]。

目前,食用菌生产过程中大多使用的是固体菌种,与固体菌种相对应的是液体菌种。液体培养技术主要用于 2 个方面,一是生产液体菌种;二是生产菌丝体以及发酵液有效成分的提取^[6]。利用食(药)用菌液体发酵,可以在较短时间内获得大量菌丝体及其发酵产物,由于这一过程周期短、产量高、成本低、工艺设备简单,因此在食用菌生产中具有广阔的应用前景^[7]。

目前关于茶树菇液体发酵的报道很少,为此该试验采用液体摇瓶培养法,以菌丝体鲜重为指标,对茶树菇液体发酵过程中培养基配方及培养条件进行优化,旨在为茶树菇液体发酵生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茶树菇菌株‘茶-1’系河北大学食药用真菌研究

所保藏菌种。PDA 培养基:马铃薯 20.0%、葡萄糖 2.0%、琼脂 2.0%,pH 自然。一级液体培养基:马铃薯 20.0%、麸皮 3.0%、葡萄糖 2.0%、酵母膏 0.3%、 KH_2PO_4 0.10%、 MgSO_4 0.10%、pH 自然,用于培养一级液体菌种^[7]培养。基础二级液体培养基:葡萄糖 2.0%、蛋白胨 1.0%、酵母膏 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10%、 KH_2PO_4 0.10%。

1.2 试验方法

1.2.1 一级液体菌种的制备方法 按照一级液体培养基配方进行配制,250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL,通过无菌操作取 5 块大小约为 0.5 cm×0.5 cm 活化后的茶树菇菌种块进行接种,28 °C 静置培养 24 h 后,28 °C、180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 7 d,得茶树菇一级液体菌种,然后以 10% 的接种量转接于制备好的二级液体培养基中。

1.2.2 不同碳源筛选试验 分别用蔗糖、玉米粉、可溶性淀粉代替基础培养基中的葡萄糖作为培养基的碳源,浓度为 2.0%,250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL,121 °C 灭菌 30 min,接种量为 10%,于 25 °C、180 r·min⁻¹ 的条件下恒温振荡培养 7 d,测定菌丝体鲜重。每处理做 3 次重复。以 80 目铜丝网过滤称重测定菌丝体鲜重^[8]。

1.2.3 不同氮源筛选试验 分别用硫酸铵、豆饼粉、麸皮代替基础培养基中的蛋白胨作为培养基的氮源,浓度为 1.0%,250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL,121 °C 灭菌 30 min,接种量为 10%,于 25 °C、180 r·min⁻¹ 的条件下恒温振荡培养 7 d,测定菌丝体鲜重。每个处理做 3 次重复。

1.2.4 碳、氮源正交实验 以葡萄糖、豆饼粉、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 为试验因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,试验因素水平见表 1,以菌丝体鲜重为指标,共计 9 个处理,每处理做 3 次重复。

第一作者简介:刘敏(1985-),女,硕士,实验师,现主要从事食药用真菌研究与开发等研究工作。E-mail:liumin870115@163.com.

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队资助项目。

收稿日期:2015-12-16

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	A 葡萄糖 Glucose	B 豆饼粉 Soybean cake	C MgSO ₄ · 7H ₂ O	D KH ₂ PO ₄
1	1.0	0.5	0.10	0.10
2	2.0	1.0	0.15	0.15
3	3.0	1.5	0.20	0.20

1.2.5 初始 pH 筛选试验 用 1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液和 1 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液将各瓶培养基分别调成不同的 pH, 使初始 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。接种后, 25 ℃、180 r · min⁻¹ 振荡培养 7 d, 测定菌丝体鲜重。菌丝体鲜重按照马瑞霞^[6]的方法测定, 可以实时检测发酵动态, 是较干重测定更为实用的快速测定方法。

1.2.6 培养温度筛选试验 接种后, 将摇瓶置于 19、22、25、28、31 ℃ 的条件下, 150 r · min⁻¹ 进行振荡培养 7 d, 测定菌丝体鲜重。

1.2.7 适宜摇床转速筛选试验 接种后, 摇床转速分别为 120、150、180、210 r · min⁻¹, 振荡培养 7 d 后, 测定菌丝体鲜重。

1.3 数据分析

数据采用 SPSS 软件进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对茶树菇液体培养的影响

由表 2 可知, 在 4 种供试的碳源中, 以葡萄糖为碳源培养茶树菇结果最优, 菌丝体生物量最大, 达到 24.631 2 g · (100mL)⁻¹, 并且与其它几个碳源存在极显著性差异, 所以选择葡萄糖作为茶树菇液体培养的主要碳源。

表 2 不同碳源对茶树菇液体菌丝体培养的影响

Table 2 Effect of different carbon source on liquid culture of

Agrocybe aegerita (Brig.) Sing

碳源 Carbon source	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight/(g · (100mL) ⁻¹)
葡萄糖 Glucose	24.631 2 ± 0.536 1aA
蔗糖 Sucrose	22.085 3 ± 0.045 0bB
玉米粉 Corn flour	21.802 5 ± 0.036 0bB
可溶性淀粉 Soluble starch	11.860 1 ± 0.033 7cC

注: 出菌丝体鲜重数值为平均值 ± 标准误; 英文大小写字母表示 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 的差异显著性, 下同。

Note: Values are the means ± SD; different lowercase and capital letters represent significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, the same below.

2.2 不同氮源对茶树菇液体培养的影响

由表 3 可知, 在 4 种供试氮源中, 以豆饼粉为氮源, 培养茶树菇结果最优, 菌丝体生物量最大, 达到 26.074 6 g · (100mL)⁻¹, 所以选择豆饼粉作为茶树菇液体培养的主要氮源。

表 3 不同氮源对茶树菇液体菌丝体培养的影响

Table 3 Effect of different nitrogen source on liquid culture of

Agrocybe aegerita (Brig.) Sing

氮源 Nitrogen source	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight/(g · (100mL) ⁻¹)
蛋白胨 Peptone	25.631 2 ± 0.988 1bB
硫酸铵 Ammonium sulfate	17.726 0 ± 0.376 5dD
豆饼粉 Soybean cake powder	26.074 6 ± 0.024 6aA
麸皮 Wheat bran	21.346 7 ± 0.137 8cC

2.3 碳氮源正交实验结果

由表 4 的正交实验结果可知, 茶树菇液体培养中影响菌丝体鲜重的 4 个因素由强到弱依次为 B>A>C>D, 即豆饼粉>葡萄糖>MgSO₄ · 7H₂O>KH₂PO₄。从正交实验结果直观分析, 各因素水平最优的理论组合为 A₃B₂C₁D₁, 即葡萄糖 3.0%、豆饼粉 1.0%、MgSO₄ · 7H₂O 0.10%、KH₂PO₄ 0.10%, 菌丝体鲜重最大。而试验处理最优结果却是 A₃B₂C₁D₃。因此需要做验证试验。

表 4 L₉(3⁴) 正交实验结果Table 4 Results of orthogonal experiment on L₉(3⁴)

处理 Treatment	A 葡萄糖 Glucose	B 豆饼粉 Soybean cake powder	C MgSO ₄ · 7H ₂ O	D KH ₂ PO ₄	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight /(g · (100mL) ⁻¹)
1	1	1	1	1	14.623 1
2	1	2	2	2	18.757 3
3	1	3	3	3	15.626 4
4	2	1	2	3	15.446 1
5	2	2	3	1	19.146 2
6	2	3	1	2	21.703 1
7	3	1	3	2	13.391 4
8	3	2	1	3	28.437 2
9	3	3	2	1	27.473 4
k ₁	16.336	14.487	21.588	20.414	
k ₂	18.765	22.114	20.559	17.951	
k ₃	23.101	21.601	16.055	19.837	
r	6.765	7.627	5.533	2.463	

由表 5 可知, 组合 A₃B₂C₁D₁ 条件下茶树菇的菌丝体鲜重达 28.452 9 g · (100mL)⁻¹, 略优于试验处理 8。因此确定茶树菇最佳液体培养基配方组合为葡萄糖 3.0%、豆饼粉 1.0%、MgSO₄ · 7H₂O 0.10%、KH₂PO₄ 0.10%。

表 5 验证试验结果

Table 5 The results of proof test

菌丝体鲜重	
	Mycelium fresh weight/(g · (100mL) ⁻¹)
A ₃ B ₂ C ₁ D ₁	28.452 9
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	28.437 2

2.4 不同初始 pH 对茶树菇液体培养的影响

由表 6 可知, 茶树菇在培养基 pH 6.0 时, 菌丝体鲜重最大, 与 pH 7.0 不存在显著性差异, 与其它 pH 存在显著性差异, 所以, pH 6.0~7.0 是茶树菇液体培养较为适宜的 pH。

表 6 不同 pH 对茶树菇液体菌丝体鲜重的影响

Table 6 Effect of different pH on the mycelial fresh weight of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing

pH	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight/(g · (100 mL) ⁻¹)
4.0	16.157 0±0.414 2dD
5.0	18.471 3±0.255 8cC
6.0	28.094 1±0.086 1aA
7.0	27.365 4±0.084 0aA
8.0	25.041 3±0.137 4bB

2.5 不同培养温度对茶树菇液体培养的影响

由表 7 可知,随温度不断升高,菌丝体生物量不断增加,当液体培养的温度为 28 ℃时菌丝体鲜重最大为 28.640 3 g · (100mL)⁻¹,与温度为 25 ℃时不存在显著性差异,与其它温度条件存在显著性差异,所以,25~28 ℃是茶树菇液体培养较为适宜的温度。

表 7 不同温度对茶树菇液体菌丝体鲜重影响的多重比较

Table 7 Effect of different temperature on the mycelial fresh weight of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing

温度 Temperature/℃	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight/(g · (100mL) ⁻¹)
19	17.525 3±0.160 7dD
22	22.509 1±0.080 3cC
25	28.526 8±0.025 8aA
28	28.640 3±0.179 3aA
31	23.553 9±0.269 7bB

2.6 不同摇床转速对茶树菇液体培养的影响

由表 8 可知,随着转速的不断增大,通气量增大,溶氧量增大,当摇床转速为 150 r · min⁻¹时,菌丝体鲜重最大为 26.553 9 g · (100mL)⁻¹,与 180 r · min⁻¹时不存在显著性差异,与其它转速存在显著性差异,所以 150~180 r · min⁻¹是茶树菇液体培养较为适宜的摇床转速。

表 8 不同摇床转速对茶树菇液体菌丝体鲜重影响的多重比较

Table 8 Effect of different rotate speed on the mycelial fresh weight of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing

转速 Rotate speed/(r · min ⁻¹)	菌丝体鲜重 Mycelium fresh weight/(g · (100mL) ⁻¹)
120	15.626 4±0.189 4cC
150	26.553 9±0.721 6aA
180	26.440 3±0.051 0aA
210	19.146 2±0.239 0bB

3 结论

该研究通过碳源、氮源的单因素试验和正交实验,最终确定茶树菇适宜的液体培养基配方为葡萄糖 3.0%,豆饼粉 1.0%,酵母膏 0.2%,MgSO₄ · 7H₂O 0.10%,KH₂PO₄ 0.10%。该试验还从起始 pH、培养温度以及摇床转速 3 个方面对茶树菇的液体培养条件进行了单因素试验,表明茶树菇液体培养适宜的条件为起始 pH 6.0~7.0、培养温度 25~28 ℃、摇床转速 150~180 r · min⁻¹。

参考文献

- [1] 邱敦莲,刘本洪,肖在勤,等. 茶树菇原生质体的分离和再生以及单核菌株的筛选[J]. 西南大学学报(自然科学版),2008,30(12):117-120.
- [2] 暴增海,马桂珍,张建臣. 茶薪菇的生物学特性及开发利用[J]. 北方园艺,2007(5):230-231.
- [3] 李志军,田雪梅. 两个茶薪菇菌株胞外酶活性的测定与分析[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2009,26(3):191-193.
- [4] 暴增海,杨辉德,王莉. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2010:162-172.
- [5] 马瑞霞. 不同配方培养料对茶薪菇生长的影响[J]. 北方园艺,2009(9):213-215.
- [6] 苗秉义,邵坤. 茶树菇液体培养碳氮源的筛选[J]. 现代农业科技,2009(19):89-90.
- [7] 周键,孙培龙,赵培城,等. 食用菌深层发酵的研究进展[J]. 微生物学通报,2003,30(6):111-114.
- [8] 甄世梅,杨树德,于兰兰,等. 茶树菇液体发酵培养基的优化[J]. 食用菌,2010(7):92-95.

Study on the Liquid Fermentation Condition of *Agrocybe aegerita* (Brig.) SingLIU Min¹, LU Hong², HUANG Yuanyuan², RONG Qun², WANG Qian¹

(1. Research Center of Biotechnology Engineering, Hebei University, Baoding, Hebei 071002; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

Abstract: Taking *Agrocybe aegerita* as test material, the liquid fermentation condition of *Agrocybe aegerita* in submerged culture with shake flask were studied according to the index of mycelium fresh weight by single factor experiment and quadrature experiment. The results showed that the optimal liquid culture medium was as follows: glucose 3.0%, soybean cake powder 1.0%, yeast extract 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.10%, KH₂PO₄ 0.10%. The optimal culture condition were initial pH 6.0—7.0, temperature 25—28 ℃, shaking rate 150—180 r · min⁻¹.

Keywords: *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing; culture medium; culture condition; optimization; mycelium fresh weight