

杨树菇深层液体发酵培养基及培养条件的优化

柴新义^{1,2}, 王四宝¹, 樊美珍¹

(1 安徽农业大学 虫生菌研究中心, 安徽 合肥 230036; 2 滁州学院 化学与生命科学系, 安徽 滁州 239012)

[摘 要] 探索了培养基组分和培养条件对杨树菇菌丝体生物量的影响。结果表明, 杨树菇液体发酵培养基的最优组合为: 40 g/L 蚕蛹粉, 20 g/L 可溶性淀粉, 2 g/L KH_2PO_4 和 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 最优培养条件为: 装液量 320 mL/L, 接种量 100 mL/L, pH 6.5, 摇床转速 180 r/min, 在 (25 ± 0.5) 条件下恒温振荡培养 8 d, 菌丝体生物量可达 0.03 g/mL。

[关键词] 杨树菇; 液体发酵; 培养条件; 菌丝体生物量

[中图分类号] Q939.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0117-04

杨树菇 (*Agrocybe aegerita*) 又名柱状田头菇、柳松菇、柳环菌, 具有降低血压、胆固醇之功效, 其干子实体入药可治胃冷、胃炎水肿、小便不利等疾病^[1], 并具有抗肿瘤、提高机体免疫力的作用^[2-3]。目前, 杨树菇栽培以固体栽培为主^[4], 但由于受环境、区域、季节的限制, 栽培条件不容易控制, 且易受病虫害影响, 人工培养子实体周期长、产量低、质量不稳定^[3,5], 不易大批量工业化生产, 因而难以满足市场需求。液体深层发酵培养具有生产周期短、条件易控制、产量高、质量稳定、可常年连续化生产等特点。但关于杨树菇液体深层发酵的研究报道较少^[6]。本试验研究了培养基组合和培养条件对杨树菇菌丝体生物量的影响, 以为杨树菇深层液体发酵工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种 杨树菇菌种由安徽农业大学虫生菌研究中心提供。

1.1.2 培养基 种子斜面培养基: PDA 培养基; 液体菌种培养基: 土豆 200 g/L, 白砂糖 20 g/L, 自然 pH 值。

1.1.3 氮源试验 基础培养基: 20 g/L 葡萄糖, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 氮源: 蛋白胨、蚕蛹粉(煮汁)、黄豆粉、酵母粉、尿素。

1.1.4 碳源试验 基础培养基: 20 g/L 蚕蛹粉, 2

g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 碳源: 葡萄糖、白砂糖、可溶性淀粉、半乳糖、麦芽糖。

1.2 液体发酵培养

1.2.1 碳、氮源及培养基优化试验 在 250 mL 三角瓶中装入液体培养基 100 mL, 菌种接入量为 100 mL/L, 置于转速 180 r/min、温度 (25 ± 0.5) 的摇床上, 恒温培养 7 d, 测定菌丝体生物量(干重), 每组 3 个重复, 取平均值。

1.2.2 摇瓶发酵培养条件的优化试验 以最优组合配制杨树菇液体发酵培养基, 接种后置于转速 180 r/min、温度 (25 ± 0.5) 的摇床上, 根据不同试验要求恒温培养 7~15 d。

1.3 测定方法

1.3.1 培养液 pH 值的测定 采用 818 型 pH 测试仪测定。

1.3.2 菌丝体生物量的测定 用真空泵和抽滤瓶对杨树菇液体发酵培养物进行抽滤, 用蒸馏水反复冲洗多次后收集湿菌体, 置于 60℃ 电热鼓风干燥箱中烘干至恒重后称重, 得菌丝体生物量干重, 所得发酵液用于测定还原糖含量。

1.3.3 还原糖含量测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[7]测定。

1.4 数据处理

用 DPS 数据处理系统软件^[8]对试验数据进行处理, 通过多重比较分析处理间的差异。

〔收稿日期〕 2005-11-14

〔基金项目〕 安徽农业大学虫生菌研究中心资助项目; 安徽高等学校青年教师科研资助项目(2005jq1128)

〔作者简介〕 柴新义(1978-), 男, 安徽宿州人, 讲师, 硕士, 主要从事微生物资源开发研究。

〔通讯作者〕 樊美珍(1944-), 女, 安徽合肥人, 教授, 博士生导师, 主要从事虫草资源研究。

2 结果与讨论

2.1 培养基组分对杨树菇菌丝体生物量的影响

2.1.1 氮源 在氮源试验的基础培养基中, 分别加入蛋白胨、蚕蛹粉(煮汁)、黄豆粉、酵母粉、尿素各20 g/L, 以菌丝体生物量为衡量指标, 研究不同氮源对杨树菇菌丝体生物量的影响, 结果见表1。表1表

表1 不同氮源、碳源对杨树菇菌丝体生物量的影响

Table 1 Effects of different nitrogen and carbon sources on biomasses

氮源 N nitrogen	菌丝体生物量/(g·mL ⁻¹) Biomasses	碳源 Carbon	菌丝体生物量/(g·mL ⁻¹) Biomasses
蛋白胨 Peptone	0.017 5±0.02 a A	葡萄糖 Glucose	0.019 0±0.02 a A
蚕蛹粉 Silkworm powder	0.016 5±0.02 a A	白砂糖 Granulated sugar	0.011 5±0.06 b B
黄豆粉 Soybean powder	0.010 5±0.03 b B	麦芽糖 Maltose	0.011 0±0.03 b B
酵母粉 Yam powder	0.015 0±0.02 a AB	可溶性淀粉 Soluble starch	0.017 0±0.04 a A
尿素 Carbamide	0.004 0±0.01 c C	半乳糖 Galactose	0.010 0±0.02 b B

注: 同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P < 0.01$), 不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。表3同。

Note: Table entries followed by different upper- or lower-case letters in each column were different at the significance level of $P < 0.01$ or $P < 0.05$ based on Duncan's new multiple range test

2.1.2 碳源 在碳源试验的基础培养基中分别加入葡萄糖、白砂糖、可溶性淀粉、半乳糖、麦芽糖各20 g/L, 以菌丝体生物量为衡量指标, 研究不同碳源对杨树菇菌丝体生物量的影响, 结果见表1。表1表明, 不同碳源对杨树菇菌丝体生物量的影响顺序依次为葡萄糖>可溶性淀粉>白砂糖>麦芽糖>半乳糖, 其中葡萄糖和可溶性淀粉对杨树菇菌丝体生物量的影响差异不显著, 但与其他碳源之间差异达极显著水平。从经济角度考虑, 选取可溶性淀粉作为杨树菇液体发酵培养基的最佳碳源。

明, 不同氮源对杨树菇菌丝体生物量的影响顺序依次为蛋白胨>蚕蛹粉>酵母粉>黄豆粉>尿素, 其中蛋白胨、蚕蛹粉、酵母粉对杨树菇菌丝体生物量的影响差异不显著, 但与其他氮源之间差异达极显著水平。考虑到蛋白胨的价格较蚕蛹粉昂贵, 因此选取蚕蛹粉作为杨树菇液体发酵培养基的氮源。

2.1.3 培养基成分的优化 以可溶性淀粉为碳源, 蚕蛹粉为氮源, 以 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为无机盐进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 试验设计及结果见表2。

由表2可知, 影响杨树菇菌丝体生物量的大小顺序为 $B > A > C > D$, 说明可溶性淀粉对杨树菇菌丝体生物量的影响最大, 其次为蚕蛹粉, 无机盐 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对菌丝体生物量的影响最小。由表2可见, 杨树菇菌丝体深层液体发酵的最优培养基是组合 $A_3B_1C_2D_1$, 即40 g/L 蚕蛹粉、20 g/L 可溶性淀粉、2 g/L KH_2PO_4 和1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

表2 不同培养基组合对杨树菇菌丝体生物量的影响

Table 2 Analysis of orthogonal experiment of medium ingredients with biomasses as target

组合 Combinations	蚕蛹粉/ (g·L ⁻¹) A	可溶性淀粉/ (g·L ⁻¹) B	KH_2PO_4 / (g·L ⁻¹) C	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / (g·L ⁻¹) D	菌丝体生物量/(g·mL ⁻¹) Biomasses			
					I	II	III	平均值 Average
1	1(20)	3(40)	1(1)	1(1)	0.014 9	0.016 7	0.014 5	0.015 4
2	1(20)	2(30)	2(2)	2(2)	0.023 2	0.022 5	0.020 9	0.022 2
3	1(20)	1(20)	3(3)	3(3)	0.020 4	0.023 5	0.021 5	0.021 8
4	2(30)	3(40)	2(2)	3(3)	0.016 0	0.015 2	0.015 1	0.015 4
5	2(30)	2(30)	3(3)	1(1)	0.016 7	0.018 1	0.016 4	0.017 1
6	2(30)	1(20)	1(1)	2(2)	0.023 3	0.024 2	0.020 2	0.022 6
7	3(40)	3(40)	3(3)	2(2)	0.019 3	0.017 6	0.018 4	0.018 5
8	3(40)	2(30)	1(1)	3(3)	0.026 1	0.023 3	0.024 2	0.020 5
9	3(40)	1(20)	2(2)	1(1)	0.027 6	0.026 2	0.026 4	0.026 7
K_1	3 559.9	2 953.9	3 746.1	3 550.7				
K_2	3 303.8	3 829.2	3 861.4	3 792.5				
K_3	4 182.4	4 263.0	4 438.6	3 702.9				
K_I	0.395 5	0.328 2	0.416 2	0.394 5				
K_{II}	0.367 1	0.425 5	0.429 0	0.421 4				
K_{III}	0.464 7	0.473 7	0.382 1	0.411 4				
R	0.097 6	0.145 5	0.046 9	0.026 9				

2 2 杨树菇摇瓶发酵培养条件的优化

2 2 1 起始 pH 值对杨树菇菌丝体生物量的影响

按 40 g/L 蚕蛹粉、20 g/L 可溶性淀粉、2 g/L KH_2PO_4 和 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的最优组合配制杨树菇液体发酵培养基, 用稀酸或稀碱调节 pH 值分别为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 在接种量 100 mL/L, 温度 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 摇床转速 180 r/min 条件下振荡培养 7 d, 以菌丝体生物量为指标, 研究起始 pH 值对菌丝体生物量的影响, 结果见图 1。图 1

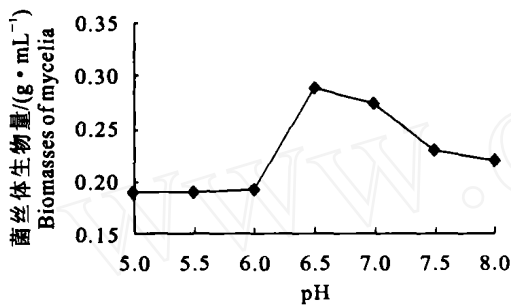


图 1 不同起始 pH 值对杨树菇菌丝体生物量的影响
Fig. 1 Effects of initial pH value on biomasses of mycelia

2 2 3 接种量对杨树菇菌丝体生物量的影响 在其他条件不变, 接种量分别为 50, 100, 150, 200 mL/L 条件下振荡培养 7 d, 以菌丝体生物量为指标, 研究接种量对菌丝体生物量的影响, 结果见表 3。

表 3 不同接种量对杨树菇菌丝体生物量的影响

Table 3 Effects of different inoculated volumes on biomasses

接种量/ (mL · L ⁻¹) Inoculated volume	菌丝体 生物量/ (g · mL ⁻¹) Biomasses	接种量/ (mL · L ⁻¹) Inoculated volume	菌丝体 生物量/ (g · mL ⁻¹) Biomasses
50	0.017 4 ± 0.02 b B	150	0.025 5 ± 0.02 a A
100	0.024 4 ± 0.01 a A	200	0.026 5 ± 0.01 a A

表 3 表明, 随着接种量的增加杨树菇菌丝体生物量逐渐提高, 当接种量由 50 mL/L 增加到 100 mL/L 时, 菌丝体生物量提高了 20.7%; 接种量由 100 mL/L 增加到 150 mL/L 时菌丝体生物量提高了 13.9%; 而接种量从 150 mL/L 增加到 200 mL/L 时菌丝体生物量仅提高了 8.9%。新复极差分析结果表明, 接种量 100, 150, 200 mL/L 之间菌丝体生物量差异不显著, 但极显著高于 50 mL/L 接种量。考虑到工业化大批量生产的实际, 以 100 mL/L 接种量最佳。

2 2 4 培养时间对杨树菇菌丝体生物量及发酵液中还原糖含量的影响 按 40 g/L 蚕蛹粉、20 g/L 可溶性淀粉、2 g/L KH_2PO_4 和 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

表明, 杨树菇在 pH 5.0~8.0 均能生长, 其最适起始 pH 值为 6.5。

2 2 2 装液量对菌丝体生物量的影响 在其他条件不变, 液体发酵培养基装液量分别为 240, 320, 400, 480, 560, 640 mL/L 条件下振荡培养 7 d, 以菌丝体生物量为指标, 研究装液量对菌丝体生物量的影响, 结果见图 2。图 2 表明, 杨树菇液体发酵过程中, 装液量为 320 mL/L 时菌丝体生物量最高。因此装液量以 320 mL/L 最佳。

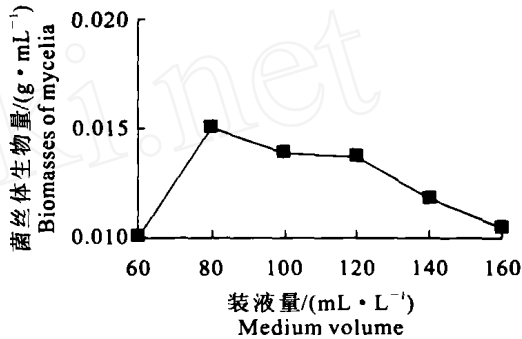


图 2 装液量对杨树菇菌丝体生物量的影响
Fig. 2 Effects of different culture volumes on biomasses of mycelia

的最优培养基组合配制杨树菇液体发酵培养基, 在 pH 6.5, 装液量为 320 mL/L, 接种量 100 mL/L, 温度 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 摇床转速 180 r/min 条件下振荡培养。从第 3 天开始取样, 每次 3 个重复, 连续培养 13 d, 测定杨树菇菌丝体生物量, 抽滤后的发酵液测定还原糖含量, 结果见图 3。

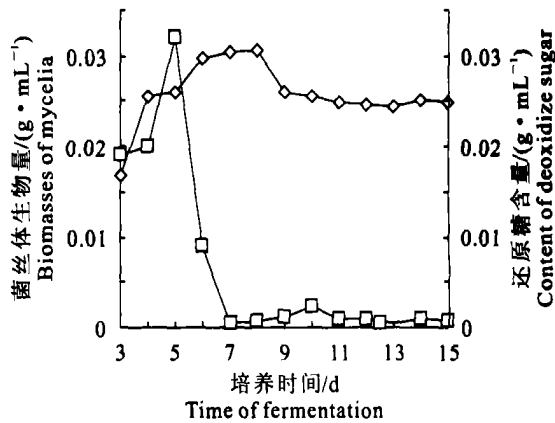


图 3 培养时间对杨树菇菌丝体生物及还原糖含量的影响
- - - 菌丝体生物量; - □ - 还原糖含量
Fig. 3 Effects of fermentation time on the changes of biomasses and deoxidize sugar
- - - Biomasses mycelia; - □ - Content of deoxidize sugar

由图3可知,发酵前期菌丝体生物量增加迅速,到第8天达到顶峰,为 0.03 g/mL ,随后菌丝体生物量下降并趋于稳定,以杨树菇菌丝体为生产目标,则发酵培养8 d为最佳培养终止时间。由图3还可知,在发酵过程中,发酵液还原糖含量在第5天达到高峰,之后迅速下降,在培养后期又稍有回升。这可能是由于随着发酵的进行,发酵培养基中可溶性淀粉

被很快分解利用,可溶性淀粉水解速度大于菌丝体生长对其的利用速度,造成还原糖积累,所以在第5天还原糖含量达到最高峰,随着可溶性淀粉的耗尽,还原糖含量急剧下降到最低值,但到后期部分老化的菌丝体开始自溶,为新生的菌丝体提供糖类物质,因而还原糖含量又略有回升。

[参考文献]

- [1] Miyazaki T, Oikawa N, Yamada H. Studies on fungal polysaccharides XX. Galactomannan of *Condyceps sinensis* [J]. Chem Pharm Bull, 1977, 25(12): 3324-3328
- [2] 温海洋, 张景问, 肖洪文. 液体摇瓶菌种的生理与应用研究[J]. 食用菌, 1998(1): 15-17.
- [3] 方可武, 方忠文, 方忠玉. 香菇液体菌种研究与栽培应用技术探讨[J]. 食用菌, 1995(4): 5-8
- [4] 郑毅, 余望, 施巧琴, 等. 茶薪菇人工栽培及营养分析[J]. 中国食用菌, 1999, 18(5): 13-14
- [5] 许旭萍, 李惠珍. 柱状田头菇菌丝体生理特征的研究[J]. 食用菌, 1996(2): 20-22
- [6] 陈群, 李秀芹. 柱状田头菇液体发酵条件的研究及多糖含量的测定[J]. 中国食用菌, 2001, 20(3): 29-31
- [7] 贾薇, 张劲松, 周昌艳. 巴西蘑菇深层发酵培养条件的优化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 85-87.
- [8] 唐启义, 冯明光. 2002实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1-648

Studies on the optimal cultivation of *Agrocybe aegerita*'s liquid fermentation

CHAI Xin-yi^{1,2}, WANG Si-bao¹, FAN Mei-zhen¹

(1 Research Center on Entomogenous Fungi, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China;

2 Chemistry and Life Scientific Department, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239012, China)

Abstract: Ingredients of medium and fermentation conditions of *Agrocybe aegerita* were studied. The experimental results showed that the compositions of optimal fermentation medium were as follows: 40 g/L silkworm powder, 20 g/L soluble starch, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and the dry biomasses reached 0.03 g/mL with culture volumes 320 mL/L , inoculated volume 100 mL/L , pH 6.5, 180 r/min, temperature 25°C , and cultivation 8 d.

Key words: *Agrocybe aegerita*; liquid-state fermentation; fermentation condition; biomasses of mycelia