

黄蘑菇深层发酵条件研究

周连玉, 朱莉莉, 邓旭武, 姜蓉

(青海师范大学 生命与地理科学学院, 青海 西宁 810008)

摘要: 为科学开发黄蘑菇资源, 采用单因素试验和正交试验研究黄蘑菇的深层发酵条件。结果表明, 黄蘑菇发酵的适宜碳源为蔗糖, 适宜氮源为牛肉浸膏; 黄蘑菇深层发酵的最适培养基为 4% 蔗糖、0.1% 牛肉浸膏、0.10% KH_2PO_4 、0.10% MgSO_4 ; 适宜接种的种龄为 4 d, 接种量(移入液体菌种的体积与接种后培养液体积的比)为 15%, 发酵时间为 8 d, 在此条件下, 黄蘑菇菌丝体生物量(每 1 mL 发酵液中收集的菌丝体干重)达 1.137 mg/mL。

关键词: 黄蘑菇; 发酵条件; 菌丝体生物量

中图分类号: S576 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0110-03

Conditions in deep submerged fermentation of *Armillarialuteo viren*

ZHOU Lian-yu, ZHU Li-li, DENG Xu-wu, JIANG Rong

(College of Biology and Geography, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

Abstract: Conditions in deep submerged fermentation of *Armillarialuteo viren* was studied for exploiting *Armillarialuteoviren* resources by one-factor experiment. The results showed that the optimum carbon sources was sucrose and the optimum nitrogen sources was sucrose beef extract. The optimum medium by the orthogonal test was sucrose 4%, beef extract 0.1%, KH_2PO_4 0.10% and MgSO_4 0.10%. The fermentation conditions were as follows: seed age 4 d, inoculation rate 15%, culture time 8 d. Under these conditions, mycelium biomass could reach 1.137 mg/mL.

Key words: *Armillarialuteo viren*; fermentation condition; mycelium biomass

黄蘑菇(*Armillarialuteo virens*)分布于海拔 3 000~4 800 m 的草甸上, 主要分布于青海、西藏、甘肃、四川及河北等地, 在青海大多分布于祁连、玛沁、甘德及环湖地区典型的高寒小嵩草草甸上, 并常形成规则的蘑菇圈^[1]。黄蘑菇子实体肥厚, 风味独特, 有较高的营养与药用价值。据分析, 100 g 干菇中含粗蛋白 36.61~39.0 g、粗脂肪 14.58 g、粗纤维 8.66 g 及 18 种氨基酸、多种维生素等成分, 是一种名贵食用菌, 也是一种重要的高原生物资源^[2]。野生黄蘑菇生长的旺盛期为 7—8 月, 自然产量低, 在子实体形成之初绝大多数被大量双翅目虫卵寄生侵染, 且生长环境易遭受破坏, 产量与质量不稳定^[3]。已有的关于黄蘑菇的研究主要是分析其生态条件^[4-5]、子实体的成分^[6]以及人工驯化^[7]等。发

酵技术已广泛应用于菌类生产, 但应用于黄蘑菇的报道很少^[8]。笔者以菌丝体生物量(mg/mL, 每 1 mL 发酵液中收集的菌丝体干重)为主要指标, 对黄蘑菇深层发酵条件进行初步探索, 旨在为黄蘑菇的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

黄蘑菇菌株由青海师范大学微生物实验室提供。斜面培养基中含马铃薯(去皮)20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%, pH 自然。

基础培养基中含葡萄糖 2%、 KNO_3 0.1%、 KH_2PO_4 0.05%、 MgSO_4 0.05%。

收稿日期: 2009-07-13

作者简介: 周连玉(1976—), 女, 湖南安仁人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物研究, zly7604@163.com

1.2 方法

1.2.1 液体菌种制备

将 3 块黄豆粒大的菌块接到液体菌种培养基中,250 mL 三角瓶中装入培养液 100 mL,于 25 °C,100 r/min 摇床培养 9 d.

1.2.2 深层发酵条件的优化

(1) 最适碳源的选取.分别以 2% 的不同碳源(蔗糖、小麦粉、麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉)代替基础培养基中的碳源(葡萄糖),其他成分不变.

(2) 最适氮源的选取.以上一步试验确定的最适碳源为碳源,以 0.1% 不同氮源(牛肉浸膏、酵母浸膏、蛋白胨、黄豆饼粉、硫酸铵)代替基础培养基中氮源(硝酸钾),其他成分不变.

(3) 深层发酵培养基优化正交试验.以经单因素试验选取的最适碳源、最适氮源和基础培养基中的 2 种无机盐(KH₂PO₄、MgSO₄)进行正交试验,对黄蘑菇深层发酵培养基进行优化^[9].

(4) 最适种龄和接种量的选取.设种龄 4、6、8 d 共 3 个水平,接种量(移入液体菌种的体积与接种后培养液体积的比)5%、10%、15%、20% 共 4 个水平,观察种龄和接种量对黄蘑菇菌丝体生物量的影响.

(5) 适宜发酵时间的选取.在适宜种龄及接种量下,于发酵的第 4~9 d 分别测定黄蘑菇菌丝体生物量.

(6) 菌丝体收集.将发酵液真空抽滤,将抽滤所得菌丝体置恒温培养箱中烘干至恒重,用电子分析天平称量.

2 结果与分析

2.1 最适碳源的确定

由表 1 可见,不同碳源对菌丝体生长的影响有一定差异,以蔗糖为碳源的培养基中黄蘑菇菌丝体生物量最大,其次为葡萄糖、小麦粉.以蔗糖为碳源的黄蘑菇菌丝体生物量与以葡萄糖、小麦粉为碳源的差异不显著,而与以麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉为碳源的差异显著;以葡萄糖、小麦粉为碳源的黄蘑菇菌丝体生物量与以麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉为碳源的差异显著;所有碳源黄蘑菇菌丝体生物量均无极显著差异,因此,选取蔗糖为最适碳源.

表 1 不同碳源和氮源对黄蘑菇菌丝体生物量的影响
Table 1 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on the mycelium biomass of *Armillarialuteo viren*

碳源	菌丝体生物量/ (mg·mL ⁻¹)	氮源	菌丝体生物量/ (mg·mL ⁻¹)
蔗糖	0.682aA	牛肉浸膏	2.389aA
葡萄糖	0.540aA	酵母浸膏	1.227bB
小麦粉	0.447aA	蛋白胨	0.711cC
麦芽糖	0.371bA	黄豆饼粉	0.500dD
玉米粉	0.345bA	硫酸铵	0.230eE
可溶性淀粉	0.295bA	硝酸铵	0.157eE

2.2 最适氮源的确定

由表 1 可见,在以牛肉浸膏为氮源的黄蘑菇菌丝体生物量极显著高于其他氮源的,其次为酵母浸膏和蛋白胨,无机氮源培养基的较小.可以看出黄蘑菇菌丝对有机氮源均能较好地利用,而对无机氮源利用较差,因此,选取牛肉浸膏为最适氮源.

2.3 深层发酵培养基的优化

由表 2 可见, R_C>R_B>R_D>R_A, 即 4 因素对发酵的影响从大到小依次为 KH₂PO₄、牛肉浸膏、MgSO₄、蔗糖,最佳试验组合为 A₂B₁C₂D₂, 即由试验得出适宜黄蘑菇深层发酵的培养基组成为 4% 的蔗糖、0.1% 的牛肉浸膏、0.10% 的 KH₂PO₄、0.10% 的 MgSO₄.

表 2 深层发酵培养基优化的正交试验结果
Table 2 Results of the orthogonal test of the medium optimization for deep submerged fermentation

试验 编号	因素				菌丝体生物量/ (mg·mL ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	1(2)	1(0.1)	1(0.05)	1(0.05)	0.538
2	1(2)	2(0.2)	2(0.10)	2(0.10)	1.781
3	1(2)	3(0.3)	3(0.15)	3(0.15)	0.656
4	2(3)	1(0.1)	2(0.10)	3(0.15)	1.684
5	2(3)	2(0.2)	3(0.15)	1(0.05)	1.070
6	2(3)	3(0.3)	1(0.05)	2(0.10)	0.563
7	3(4)	1(0.1)	3(0.15)	2(0.10)	1.308
8	3(4)	2(0.2)	1(0.05)	3(0.15)	0.555
9	3(4)	3(0.3)	2(0.10)	1(0.05)	0.823
K ₁	5.949	7.059	3.312	4.861	8.977
K ₂	6.633	6.812	8.574	7.304	
K ₃	5.371	4.082	6.067	5.788	
R	1.262	2.977	5.262	2.443	

A 蔗糖质量分数(%); B 牛肉浸膏质量分数(%); C KH₂PO₄ 质量分数(%); D MgSO₄ 质量分数(%).

2.4 最适种龄和接种量的确定

不同种龄与不同接种量对黄蘑菇菌丝体生物量的影响不同(表 3). 种龄 4、6、8 d 的黄蘑菇菌丝

体生物量均以15%接种量的最高,种龄4、6、8 d中又以种龄4 d的最高,达1.088 mg/mL。种龄为4 d时,黄蘑菇菌丝体处于生命力极为旺盛的对数生长期;种龄为8 d时,接入培养液的菌体容易出现自溶,不利于发酵产量的提高。适接种量可以缩短发酵阶段菌体生长的延滞期。接种量大,生物量增加快,但接种量太大,培养基黏度增大,供氧受到限制,生物量反而减少。

表3 不同种龄和接种量的黄蘑菇菌丝体生物量

Table 3 Mycelium biomass of *Armillarioluteo viren* on different seed age and inoculation rate

种龄/d	接种量/%	菌丝体生物量/(mg·mL ⁻¹)
4	5	0.221dD
4	10	0.238dD
4	15	1.088aA
4	20	0.905bB
6	5	0.550cC
6	10	0.625cC
6	15	0.833bB
6	20	0.491cdC
8	5	0.216dC
8	10	0.460cdD
8	15	0.516cC
8	20	0.468cdC

2.5 适宜发酵时间的确定

真菌的生长繁殖分适应期、对数期、稳定期、衰退期4个阶段。发酵1~2 d时,黄蘑菇生长慢,产生的菌丝体生物量少。发酵4、5、6、7、8、9 d的黄蘑菇菌丝体生物量分别为0.481、0.615、0.680、0.786、1.137、0.764 mg/mL,可见,发酵4~5 d时的生长快,产生的菌丝体生物量较多;发酵5~7 d时生长减缓,产生的菌丝体生物量较少;发酵8 d进入稳定期,此时菌丝体生物量最大,为1.137 mg/mL。试验中黄蘑菇菌丝体生长的稳定期较短,发酵9 d就进入衰退期,此后菌丝体生物量逐渐下降,菌丝体有少许自溶,因此,宜在黄蘑菇生物量最大时终止发酵,即选取适宜发酵时间为8 d。

3 结论与讨论

本试验结果表明,黄蘑菇菌丝体深层发酵培养基的各组分最佳配比为:蔗糖4%、牛肉浸膏0.1%、KH₂PO₄ 0.10%、MgSO₄ 0.10%;最佳种龄4 d,接种量15%,发酵时间8 d。在此条件下,黄蘑菇菌丝体生物量达1.137 mg/mL。

野生黄蘑菇产量低,采挖粗放,产品附加值低,难以产生经济效益。有研究^[10-11]表明,大型真菌的菌丝体和子实体有效成分的种类和含量相似。深层发酵法生产的菌丝体及发酵液可深加工成各种类型的功能性产品,故可用以提高产品的附加值,解决野生子实体品质不佳及人工驯化栽培难以获得子实体等问题。液体培养基更利于菌种吸收营养,要进一步提高黄蘑菇深层发酵菌丝体生物量,除了对其培养基进行优化外,还必须对培养条件进行优化,所以,关于适宜培养温度、振荡速率、培养基初始pH值等^[12-13]还有待研究。

参考文献:

- [1] 刁治民. 青海草地黄绿密环菌生态学特征及营养价值研究[J]. 中国食用菌, 1997, 16(4): 21-22.
- [2] 代元, 薛文新. 草原黄蘑菇菌丝营养特性的研究[J]. 青海草业, 2001(1): 19-21.
- [3] 谢红民, 刁治民, 邓君. 青藏高原黄绿密环菌资源现状及可持续发展的研究[J]. 邵阳师范高等专科学校学报, 2005(12): 67.
- [4] 卢素锦, 李军乔. 青海黄绿密环菌植被类型及伴生植物的初步调查[J]. 食用菌, 2006(3): 4-5.
- [5] 王文颖, 王启基. 黄蘑菇的生长对草地植被及土壤的影响[J]. 草业科学, 2004(4): 34-38.
- [6] 边世平. 青海祁连黄蘑菇营养成分分析[J]. 营养学报, 2005, 27(5): 439-440.
- [7] 李渝珍. 青海野生黄绿密环菌人工驯化技术途径的探讨[J]. 青海师范大学: 自然科学版, 2005(1): 74-76.
- [8] 朱锦福, 刁治民, 王生财, 等. 不同营养条件对黄蘑菇菌丝生长的影响[J]. 青海科技, 2004(6): 28-30.
- [9] 吴占福. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 204-205.
- [10] 许旭萍, 李淑冰, 李惠珍, 等. 正红菇深层培养菌丝体与野生子实体有效成分的分析比较[J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 107-111.
- [11] 惠丰立, 杜敏华, 魏明卉, 等. 黄伞深层发酵菌丝体与子实体营养成分的分析比较[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 12-14.
- [12] 刘冬华, 刘江, 汪彬, 等. 姬松茸液体深层发酵培养条件的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(4): 475-479.
- [13] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 培养条件对激活蛋白菌菌丝干重的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(1): 76-78.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠