

鲍鱼菇发酵培养基的优化

黄清荣, 辛晓林, 刘林德, 程显好, 张焕环, 杨丽萍, 赵文婷

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘 要: 采用液体培养的方法, 从 6 种碳源和 7 种氮源中筛选出鲍鱼菇菌丝体生长较适的 3 种碳、氮源。然后选取常见的 3 种无机盐, 运用正交试验的方法, 设计三因素三水平的正交试验, 筛选出鲍鱼菇菌丝体生长和胞外多糖产生的最优液体培养基。结果表明: 利于鲍鱼菇菌丝体生长的液体培养基(g/100mL)为: 红糖 2、酵母浸粉 0.3、 MgSO_4 0.1; 利于鲍鱼菇胞外多糖产生的液体培养基(g/100mL)为: 果糖 2、牛肉膏 0.3、 KH_2PO_4 0.1。

关键词: 鲍鱼菇; 菌丝体; 胞外多糖; 碳源; 氮源; 正交试验

Optimization of Liquid Medium for *Pleurotus abalonus*

HUANG Qing-rong, XIN Xiao-lin, LIU Lin-de, CHENG Xian-hao, ZHANG Huan-huan,

YANG Li-ping, ZHAO Wen-ting

(School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: In this study, the appropriate carbon and nitrogen sources were selected from six carbon sources and seven nitrogen sources, respectively for optimizing liquid culture medium for the growth of mycelia of *Pleurotus abalonus* and the production of exopolysaccharide. The optimal fermentation medium formula was evaluated by orthogonal array design method in terms of mycelium biomass and exopolysaccharide yield. The results showed that the optimal liquid medium (100 mL) for the growth of mycelia consisted of 2 g of brown sugar, 0.3 g of yeast extract and 0.1 g of MgSO_4 . The optimal liquid medium (100 mL) for the production of exopolysaccharide was composed of 2 g of fructose, 0.3 g of beef extract and 0.1 g of KH_2PO_4 .

Key words: *Pleurotus abalonus*; mycelia; exopolysaccharide; carbon source; nitrogen source; orthogonal array design

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0203-04

鲍鱼菇(*Pleurotus abalonus*)别名台湾平菇, 隶属于担子菌亚门, 层菌纲, 伞菌目, 侧耳科, 侧耳属, 原分布于我国台湾、福建等省。其子实体肉质肥厚, 富含蛋白质、维生素及矿物质, 菌柄粗壮, 脆嫩可口, 因有其独特的鲍鱼风味, 颇受消费者的欢迎与青睐。特别是在干燥炎热的夏季, 大部分食用菌品种已无法生长, 而它却一枝独秀, 占领市场, 独领风骚, 成了人们极好的美味佳肴^[1-2]。此外, 现代医学研究证明, 鲍鱼菇子实体中含有抗肿瘤细胞多糖体, 能提高机体的免疫力, 对肿瘤细胞有较强的抑制作用^[3-4]。

本实验运用单因素分析的方法筛选出有利于鲍鱼菇菌丝体生长的碳、氮源, 然后采用正交试验的方法筛选出最适于鲍鱼菇菌丝体生长和胞外多糖产生的液体培养基配方, 为鲍鱼菇液体菌种的大规模培养和胞外多糖的研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

1.1.1 材料与试剂

鲍鱼菇由鲁东大学生命科学学院微生物实验室提供。所用化学试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基

固体斜面培养基^[5-6](g/100mL): 马铃薯 20、麦麸 3、葡萄糖 2、蛋白胨 0.5、 KH_2PO_4 0.15、 MgSO_4 0.3、琼脂 2 和 VB₁ 10mg/L(可选加)。

一级摇瓶培养基(g/100mL): 马铃薯 20、麦麸 3、葡萄糖 1、红糖 1、酵母浸粉 0.3、 KH_2PO_4 0.2、 MgSO_4 0.1 和 VB₁ 10mg/L。

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 山东省教育厅科技计划项目(J06N02); 2010 年鲁东大学大学生科技创新基金项目(10y072)

作者简介: 黄清荣(1970—), 男, 高级实验师, 硕士, 研究方向为微生物和食用菌。E-mail: ythqr801@163.com

碳源实验配方(g/100mL): 酵母浸粉 0.3、 KH_2PO_4 0.2、 MgSO_4 0.1、碳源 2(碳源分别为葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、红糖)。

氮源实验配方(g/100mL): 葡萄糖 2、 KH_2PO_4 0.2、 MgSO_4 0.1、氮源 0.3(氮源分别为麦麸、牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NH_4NO_3 ，其中麦麸为 3.0g/100mL 的麦麸滤液)。

正交试验培养基(g/100mL): 马铃薯 20、碳源 2、氮源 0.3、3 种常见的无机盐 0.1(MgSO_4 、 FeSO_4 、 KH_2PO_4)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

无菌条件下，将保藏的菌种接种至斜面，25℃条件下培养 10d 左右，待菌丝长满斜面，即可使用。

1.2.2 一级摇瓶菌种的制备

无菌条件下，从斜面上取大小约为 0.5cm² 的菌块，接种于一级摇瓶中(菌块要薄，并尽量使其漂浮在液面上)，每瓶接种 4~5 块。25℃静置培养 24h，然后放入 25℃、160r/min 的旋转式摇床上培养 10d 左右。

1.2.3 接种于碳、氮源培养基

将做好的碳、氮源培养基放入 121℃的高压蒸汽灭菌锅中灭菌 20min，冷却，然后在无菌条件下，将长好的一级摇瓶菌种接入其中，置于 25℃、160r/min 的旋转式摇床上培养 4~5d。每组设 3 个重复。

1.2.4 正交试验优化培养基

分别从碳、氮源培养实验结果中选取 3 种有利于鲍鱼菇菌丝体生长的碳、氮源，再加上 3 种常见的无机盐，设计三因素三水平的正交试验^[7-9]，以确定有利于鲍鱼菇菌丝体生长和胞外多糖产生的最适液体培养基。每组设 3 个重复。

1.2.5 指标测定

1.2.5.1 菌丝体产量的测定

将发酵液抽滤，然后将抽滤后的菌丝体放入 60℃烘箱中烘干至恒质量，用电子分析天平称质量，计算菌丝体产量。

$$\text{菌丝体产量}/(\text{mg/mL}) = \frac{\text{菌丝体干质量}/\text{mg}}{\text{发酵液体积}/\text{mL}}$$

1.2.5.2 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法^[10-12]，使用 UV-4802 型紫外-可见分光光度计在 490nm 波长处测定标准葡萄糖的吸光度(y)，以葡萄糖质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/mL}$)，求出回归方程。回归方程为： $y = -0.01913 + 0.007253x$ ($r = 0.999$)。将抽滤后的发酵液置于 4℃、10000r/min 的离心机中离心

20min，取上清液测定其吸光度并计算糖含量，再将醇沉 24h 后的发酵液离心(同上)，取上清液测其吸光度，同样根据所测上清液的吸光度计算上清液的糖含量，二者之差即为胞外多糖产量^[13]。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对鲍鱼菇菌丝体生长的影响

表 1 不同碳源菌丝体产量 SSR 检验

Table 1 SSR test for mycelium biomass from difference carbon sources

碳源	果糖	红糖	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖
菌丝体产量/ (mg/mL)	7.54 ^{aA}	6.98 ^{bA}	6.23 ^{cB}	5.25 ^{dC}	4.95 ^{dC}	4.25 ^{eD}

注：不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)；不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表 1 可知，鲍鱼菇利用各种碳源的能力是有差异的，具体利用碳源的顺序是：果糖>红糖>葡萄糖>麦芽糖>乳糖>蔗糖。由方差分析可知，鲍鱼菇在以果糖、红糖和葡萄糖为碳源的培养基中的菌丝体产量与其他碳源的培养基中的菌丝体产量的差异极显著，因此可以确定鲍鱼菇菌丝体生长较适的 3 种碳源为：果糖、红糖和葡萄糖，这与其他种类食用菌的研究结果基本一致^[14-15]。其中果糖和葡萄糖是单糖，麦芽糖、乳糖和蔗糖是二糖，单糖比二糖更有利于鲍鱼菇菌丝体的生长，可能因为菌丝能直接吸收单糖等小分子营养物质，而二糖必须由真菌细胞分泌胞外酶，经过消化将其分解为单糖后才易被吸收。红糖也有利于菌丝体生长，可能是因为红糖是一种混合物，成分比较复杂，营养元素更全面，更有利于鲍鱼菇菌丝体的生长。

2.2 不同氮源对鲍鱼菇菌丝体生长的影响

表 2 不同氮源菌丝体产量 SSR 检验

Table 2 SSR test for mycelium biomass from different nitrogen sources

氮源	酵母浸粉	牛肉膏	蛋白胨	麦麸	KNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4NO_3
菌丝体产量/ (mg/mL)	6.54 ^{aA}	5.43 ^{bB}	4.97 ^{bB}	3.40 ^{cC}	2.46 ^{dD}	1.91 ^{deDE}	1.72 ^{eE}

由表 2 可知，鲍鱼菇菌丝体生长利用氮源的能力差异比较大，具体顺序是：酵母浸粉>牛肉膏>蛋白胨>麦麸> KNO_3 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NH_4NO_3 ，其中有机氮明显好于无机氮，而且酵母浸粉明显好于其他有机氮，这与已报道^[14-15]的研究结果是一致的。可能因为真菌能够直接分解自然界中的蛋白质变成直接被吸收的氨基酸，而无机氮必须经过转换才能被菌丝体利用。由方差分析可知，鲍鱼菇在以酵母浸粉、牛肉膏和蛋白胨为氮源

的培养基中的菌丝体产量与以其他氮源的培养基的菌丝体产量差异极显著,因此可以选出鲍鱼菇菌丝体生长较适的3种氮源为酵母浸粉、牛肉膏、蛋白胨。

2.3 正交试验优化结果

根据以上不同碳源和氮源对鲍鱼菇菌丝体生长影响的实验和分析,选取了3种较优的碳源(果糖、红糖、葡萄糖)和3种较优的氮源(酵母浸粉、牛肉膏、蛋白胨),加上3种常用的无机盐(MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 FeSO_4 ,质量浓度0.1g/100mL),进行三因素三水平的正交试验,从而筛选出有利于鲍鱼菇菌丝体生长和产胞外多糖最多的液体培养基。

2.3.1 从菌丝体产量为指标的优化结果

表3 以菌丝体产量为指标的 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果

Table 3 Orthogonal array design $L_9(3^3)$ and corresponding results for optimizing fermentation medium components in terms of mycelium biomass

试验号	A 碳源	B 氮源	C 无机盐	菌丝体产量/(mg/mL)
1	1(葡萄糖)	1(牛肉膏)	1(KH_2PO_4)	4.78
2	1	2(蛋白胨)	2(MgSO_4)	3.38
3	1	3(酵母浸粉)	3(FeSO_4)	1.81
4	2(红糖)	1	2	4.74
5	2	2	3	1.75
6	2	3	1	5.44
7	3(果糖)	1	3	1.62
8	3	2	1	2.49
9	3	3	2	4.85
K_1	9.97	11.14	12.71	
K_2	11.93	7.62	12.97	
K_3	8.96	12.10	5.18	
k_1	3.32	3.71	4.27	
k_2	3.98	2.54	4.32	
k_3	2.99	4.03	1.73	
R	0.99	1.49	2.59	

表4 以菌丝体产量为指标的 $L_9(3^3)$ 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of mycelium biomass with various medium components

方差来源	离差平方和	自由度	平均离差平方和	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$	显著性
A	4.566	2	2.283	13.399	3.49	5.85	**
B	11.174	2	5.587	32.795	3.49	5.85	**
C	39.269	2	19.635	115.252	3.49	5.85	**
误差	3.407	20	0.170				
总变异	375.520	27					

由表3、4可知,C因素(无机盐)的R值最大,其次是B因素(氮源)的R值,A因素(碳源)的R值最小,因此无机盐对鲍鱼菇菌丝体生长的影响最大,碳源的影响最小。由方差分析可知,A、B、C 3个因素的F值

均大于 $F_{0.01}$,这说明碳源、氮源、无机盐3个因素对鲍鱼菇菌丝体的生长影响都极显著。有利于鲍鱼菇菌丝体生长的最优液体培养基配方为 $A_2B_3C_2$,即红糖2g/100mL、酵母浸粉0.3g/100mL和 MgSO_4 0.1g/100mL。

2.3.2 以胞外多糖为指标的优化结果

表5 以胞外多糖产量为指标 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果

Table 5 Orthogonal array design $L_9(3^3)$ and corresponding results for optimizing fermentation medium components in terms of exopolysaccharide yield

试验号	A 碳源	B 氮源	C 无机盐	胞外多糖产量/(mg/mL)
1	1(葡萄糖)	1(牛肉膏)	1(KH_2PO_4)	18.71
2	1	2(蛋白胨)	2(MgSO_4)	16.37
3	1	3(酵母浸粉)	3(FeSO_4)	18.59
4	2(红糖)	1	2	17.45
5	2	2	3	16.31
6	2	3	1	17.99
7	3(果糖)	1	3	26.03
8	3	2	1	26.63
9	3	3	2	20.48
K_1	53.67	62.19	63.33	
K_2	51.75	59.31	54.30	
K_3	73.14	57.06	60.93	
k_1	17.89	20.73	21.11	
k_2	17.25	19.77	18.10	
k_3	24.38	19.02	20.31	
R	7.13	1.71	3.01	

表6 以胞外多糖产量为指标的 $L_9(3^3)$ 正交试验方差分析

Table 6 Variance analysis of exopolysaccharide yield with various medium components

方差来源	离差平方和	自由度	平均离差平方和	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$	显著性
A	280.3076	2	140.1538	100.9803	3.49	5.85	**
B	13.3792	2	6.6896	4.8198	3.49	5.85	*
C	43.3260	2	21.6630	15.6080	3.49	5.85	**
误差	27.7587	20	1.3879				
总变异	10989.4880	27					

由表5的R值可知,A因素(碳源)对鲍鱼菇胞外多糖产量的影响最大,C因素(无机盐)的影响较小,B因素(氮源)的影响最小,即碳源的影响最大,氮源的影响最小。由表6方差分析可以看出,A、C两个因素的F值均大于 $F_{0.01}$,这说明碳源、无机盐对鲍鱼菇产多糖的影响都极显著。B因素的F值大于 $F_{0.05}$ 小于 $F_{0.01}$,说明氮源对鲍鱼菇产胞外多糖的影响显著。鲍鱼菇产胞外多糖的最优液体培养基为 $A_3B_1C_1$,即果糖2g/100mL、牛肉膏0.3g/100mL和 KH_2PO_4 0.1g/100mL。

2.4 验证实验

以培养基 $A_2B_3C_2$ 为配方时,3个重复所得鲍鱼菇菌丝体得率的平均值为5.70mg/mL,大于第6组的最大值5.44mg/mL,因此可以证明 $A_2B_3C_2$ 即红糖2g/100mL、酵母浸粉0.3g/100mL和 MgSO_4 0.1g/100mL是有利于鲍鱼菇

菌丝体生长的最优液体培养基。

以培养基 $A_3B_1C_1$ 为配方时, 3 个重复所得鲍鱼菇胞外多糖产量的平均值为 26.65mg/mL, 略大于第 8 组的最大值 26.63mg/mL, 在误差允许的范围内, 可以证明 $A_3B_1C_1$ 即果糖 2g/100mL、牛肉膏 0.3g/100mL 和 KH_2PO_4 0.1g/100mL 是鲍鱼菇胞外多糖产生最多的液体培养基。

3 讨 论

通过以上实验和分析可以得出, 鲍鱼菇菌丝体生长的最适培养基(g/100mL)为红糖 2、酵母浸粉 0.3、 $MgSO_4$ 0.1; 产胞外多糖最多的培养基为果糖 2、牛肉膏 0.3、 KH_2PO_4 0.1。其中无机盐是影响鲍鱼菇菌丝体生长的最重要因子, 而碳源是影响鲍鱼菇产胞外多糖的最重要因子。说明影响鲍鱼菇菌丝体生长的因素与影响鲍鱼菇产胞外多糖的因素不同。多糖是一种次级代谢产物, 这种次级代谢产物在菌丝体生长后期产生较多, 鲍鱼菇菌丝体的生长与胞外多糖这种次级代谢产物的合成的关系可能是非生长偶联型, 菌丝体的快速生长繁殖影响了胞外多糖的积累, 因此菌丝体培养时间的长短也应该是一个要考虑的因素。

参考文献:

- [1] 赵彦杰. 不同碳、氮源对鲍鱼菇生长的影响研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6): 858-861.
- [2] 杨大林. 一枝独秀鲍鱼菇[J]. 农业科技与信息, 2003(5): 41.
- [3] 陈红霞. 真菌多糖的活性研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(4): 460-462.
- [4] 刘艳如, 林勇, 江贤章, 等. 鲍鱼菇子实体多糖的纯化及其免疫学作用[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(4): 347-351.
- [5] 黄清荣, 辛晓林, 姜华, 等. 碳、氮浓度对黄伞深层培养的影响[J]. 河南农业科学, 2006(2): 90-92.
- [6] 黄清荣, 张恒基, 张丽, 等. 矿质元素对黄伞生长及其胞外多糖产量的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 408-413.
- [7] 贵州农学院. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 183-194.
- [8] 张勤, 张启能. 生物统计学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 281-285.
- [9] 李松岗. 实用生物统计学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2002: 396-399.
- [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11-12.
- [11] 徐光域, 颜军, 郭晓强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-346.
- [12] 郭金龙, 陈有君, 孙国琴, 等. 苯酚-硫酸法测定杏鲍菇多糖方法的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 555-558.
- [13] 宋爱荣, 王光远, 赵晨, 等. 树舌灵芝碳氮营养源利用的研究[J]. 食用菌, 2006(4): 16-17.
- [14] 陈芝兰, 张涪平. 黑脉羊肚菌菌丝的生物学特性[J]. 食用菌, 2004(6): 6-7.
- [15] 郭树凡, 李昱, 李辉. 平菇液体菌种发酵条件的研究[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2005(3): 243-245.