

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0389 - 04

姬松茸深层发酵培养基的优化

王六生, 谷文英

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:通过姬松茸碳氮源筛选的单因素实验,确定玉米粉、蔗糖为碳源,豆粕粉、麸皮汁为氮源;在此基础上,进行了碳氮源质量浓度及比例实验、摇瓶发酵正交实验,优化培养基配方,确定姬松茸摇瓶发酵培养基的最佳配方为:玉米粉 1.5 g/dL,蔗糖 0.5 g/dL,麸皮汁 0.5 g/dL,豆饼粉 2.0 g/dL.

关键词:姬松茸;深层发酵;培养基优化

中图分类号:Q 815

文献标识码:A

Optimization of Submerged Fermentation Medium of *Agaricus blazei* Murill

WANG Liu-sheng, GU Wen-ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to screening an optimum culturing medium of *Agaricus blazei* (AbM), single factor test in culturing utensil was carried out. The results showed that maize powder and sucrose were good carbon sources, and soybean powder and wheat bran extracts were nitrogen sources. Then their concentrations and the ratio of carbon and nitrogen were discussed. Through orthogonal test, an optimum formula for submerged fermentation was proposed as follows: maize powder 1.5%, sucrose 0.5%, bran extracts 0.5%, soybean powder 2%.

Key words: *Agaricus blazei* Murill; submerged fermentation; medium optimization

姬松茸又名巴西蘑菇(*Agaricus blazei* Murill),属伞菌目蘑菇科蘑菇属的大型食用真菌,分布于南美洲的巴西、秘鲁等地,1965年传入日本,经人工栽培获得成功^[1]。20世纪80年代以来,日本科学家相继发现巴西蘑菇中含有多种生物活性物质,在抗肿瘤、抗病毒、提高机体免疫功能等方面均有较好功效,尤其在抗肿瘤方面效果显著,活性高于其它食用菌。以巴西蘑菇多糖或蛋白多糖为样品注入小鼠体内,发现其对某些肿瘤的抑瘤率可以达到90%左右^[2,3]。目前,巴西蘑菇仍局限于固体栽培,液态深

层发酵报道较少,但是灵芝、香菇等食用菌的液态深层发酵技术已经实现工业化生产,获得显著的经济效益。作者对姬松茸液态深层发酵的培养基进行了优化筛选,成功进行了姬松茸的液体培养。

1 材料与方法

1.1 菌种

姬松茸斜面菌种,市售,作者所在实验室保存。

1.2 材料

葡萄糖,甘露糖,半乳糖,乳糖,麦芽糖,果糖,

收稿日期 2001-12-06; 修订日期 2002-04-25.

作者简介:王六生(1977-),男,安徽怀宁人,工学硕士。

万方数据

木糖,鼠李糖,阿拉伯糖,蔗糖,棉籽糖,硫酸铵,硝酸钠,磷酸二氢钾,硫酸镁均为国产分析纯试剂;酵母膏,牛肉膏,蛋白胨,维生素 B_1 为生化试剂;可溶性淀粉,蔗糖(用于二级摇瓶)为化学纯试剂;玉米粉,豆饼粉过60目筛,麸皮汁为麸皮煮沸20 min后用6层纱布过滤制得。

1.3 主要仪器

WSZ-84-73型高压蒸汽消毒器,无锡第二医疗器械厂产品;SW-CJ-1F型超净无菌工作台,苏州安泰空气技术有限公司产品;SP-250A型生化培养箱,南京实验仪器厂产品;HYG-II型恒温调速摇床,上海欣蕊自动化设备有限公司产品;LD4-2型离心机,北京医用离心机厂产品;101-1型电热鼓风干燥箱,上海沪南科学仪器联营厂产品;752型紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品;320S型酸度计,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司产品;FA1004型电子天平,上海精密科学仪器有限公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 培养基的配制

综合PDA培养基(g/dL):土豆汁20,葡萄糖2.0,麸皮汁1.0,酵母膏0.2,蛋白胨0.2, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4$ 0.1。

发酵基础培养基(g/dL):葡萄糖2,蛋白胨0.4, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4$ 0.1, VB_1 0.05,添加2%琼脂。

一级种子培养基(g/dL):玉米粉1.0,葡萄糖1.0,麦芽糖1.0,麸皮汁1.0,蛋白胨0.2,酵母膏0.2。

二级发酵培养基(g/dL):玉米粉1.0~2.0,麸皮汁0~1.0,蔗糖0~1.0,豆饼粉1.0~2.0。

1.4.2 培养方法

1)斜面培养:用接种铲从试管母种中切出蚕豆大小的菌丝块接种于空白斜面的中部,于25℃活化培养5 d。

2)一级种子培养:将已经活化的斜面菌种用接种铲切成黄豆大小的菌丝块,接种于液体种子培养基中,每100 mL接种5块,500 mL三角瓶装培养基100 mL,自然pH值,于25℃,160 r/min,培养4 d。

3)二级摇瓶培养:将已经培养约4 d的一级摇瓶种子以10%接种量接入装液量为100 mL的250 mL三角瓶中,自然pH,于25℃,160 r/min摇瓶培养4 d。

4)碳源利用实验:用果糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、阿拉伯糖、棉籽糖、可溶性淀粉、玉米粉代

替基础培养基中的葡萄糖,在直径9 cm的培养皿中26℃条件下进行生长实验,培养4 d后记录其菌落直径及菌丝密度。

5)氮源利用实验:采用以上的基础培养基,分别以酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸钠、麸皮、米糠、豆饼粉为氮源,在直径9 cm培养皿中26℃条件下进行培养,4 d后记录其菌落直径及其菌丝密度。

6)碳氮源质量浓度及碳氮比实验:采用以上的二级摇瓶实验培养方法。

7)正交实验:采用二级摇瓶实验培养方法。

1.4.3 测定方法

1)菌丝干重测定:取100 mL发酵液用4层纱布过滤后,用自来水洗涤3次,再用蒸馏水洗涤1次,然后将菌丝在60℃下烘12 h称重。

2)胞外多糖的测定:取100 mL发酵液于3000 r/min下离心10 min,于上清液中加入3倍体积的乙醇,置冰箱中过夜,然后离心取沉淀得粗多糖,60℃烘干后,用电子天平称重。

3)还原糖测定:采用3,5-二硝基水杨酸法^[4]。

2 结果与分析

2.1 单因素实验筛选最佳碳氮源

2.1.1 姬松茸对不同的碳源利用实验

不同的碳源对姬松茸菌丝生长促进的作用不一致,实验结果见表1。

表1 碳源对姬松茸菌丝生长的影响

Tab.1 The effects of carbon source on growing of AbM

碳源	菌落直径/cm	菌丝密度	碳源	菌落直径/cm	菌丝密度
葡萄糖	5.6	++++	乳糖	3.8	+++
果糖	5.7	+++	阿拉伯糖	5.0	+
麦芽糖	6.5	+++++	棉子糖	6.2	+++
蔗糖	6.3	+++	可溶性淀粉	6.3	++++
半乳糖	5.0	++	玉米粉	6.8	+++++

从表1实验结果看来,姬松茸对单糖、双糖、寡糖以及多糖均能利用,对醛糖和酮糖的利用情况没有显著差异,单糖中的葡萄糖、果糖均是姬松茸菌丝生长的良好碳源,双糖中的麦芽糖是姬松茸的优良碳源,能显著促进姬松茸的生长,其中玉米粉、麦芽糖的菌落半径明显大于乳糖、半乳糖等的菌落半径,就菌丝密度看来,以玉米粉、麦芽糖为最好,果糖、半乳糖、乳糖、阿拉伯糖则较差。综合考虑菌丝生长速度、菌丝密度以及生产成本等因素,选用玉

米粉及蔗糖作为姬松茸的生长碳源。

2.1.2 姬松茸对不同的氮源利用实验

不同氮源对姬松茸菌丝体生长有不同程度的促进作用,结果如表 2。

表 2 氮源对姬松茸菌丝体生长的影响

Tab.2 The effects of nitrogen source on growing of AbM

氮源	菌落直径/cm	菌丝密度	氮源	菌落直径/cm	菌丝密度
酵母膏	5.8	+++++	硝酸钠	3.5	+
牛肉膏	6.6	++++	麸皮	6.2	++++
蛋白胨	6.0	++++	米糠	6.0	+++
硫酸铵	4.2	++	豆饼粉	6.5	++++

同灵芝、灰树花等其它食用菌一样,姬松茸对有机氮源的利用优于无机氮源,有机氮源中的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨等有机复合氮源的利用情况较好。此外,对豆饼粉、麸皮等天然氮源的利用情况也较好。综合评价姬松茸对各氮源的利用情况,酵母膏、豆饼粉最好,牛肉膏、蛋白胨、麸皮次之,米糠较差,硫酸铵、硝酸钾最差。实验选用廉价的豆饼粉、麸皮作为姬松茸发酵的氮源。

2.2 碳氮源质量浓度及碳氮比实验

碳、氮源的质量浓度直接影响到微生物的营养需求及代谢产物对微生物的生长抑制等。如氮源过多会引起菌丝生长过于旺盛,不利于代谢产物的积累。碳源不足,又容易引起菌体衰老和自溶^[5]。此外,食用菌的深层发酵还要考虑到培养基的粘度,微生物的质量浓度过大,易造成溶氧不足。碳氮源比会改变微生物的代谢流向从而对微生物的生长造成影响。为便于计算及排除其它因素的干扰,采用葡萄糖 2 g/dL, 3 g/dL, 4 g/dL;蛋白胨 0.2 g/dL, 0.4 g/dL, 0.6 g/dL 的质量浓度梯度,再外加磷酸二氢钾 0.2 g/dL,硫酸镁 0.1 g/dL,进行碳氮源质量浓度及碳氮源质量浓度比实验,结果见表 3。

从表 3 可以看出,姬松茸在碳氮源质量浓度比为 5:1 时,较有利于姬松茸的生长,当碳源质量浓度由 2 g/dL 到 3 g/dL、相应的氮源质量浓度由 0.4 g/dL 变成 0.6 g/dL 时,姬松茸的生物量没有同比增长,说明姬松茸的碳源质量浓度达到 2 g/dL 以上时,姬松茸的生长就要受到一定的限制。当碳源质量浓度过低时,菌丝生长受阻,而碳源质量浓度过高时,则粘度增加,减少了培养基中的溶氧,也会使菌丝生长受到影响。进一步优化实验碳源的质量浓度,选择在 2~3 g/dL 之间较为合适,此实验结果和潘继红等研究结果相似^[6]。

表 3 碳氮源质量浓度及碳氮比对姬松茸液态深层发酵的影响

Tab.3 The effects of the concentration and the ratio of C、N on the submerged fermentation of AbM

实验号	葡萄糖质量浓度/(g/dL)	蛋白胨质量浓度/(g/dL)	生物量/g
1	2.0	0.2	0.366
2	2.0	0.4	0.441
3	2.0	0.6	0.421
4	3.0	0.2	0.368
5	3.0	0.4	0.381
6	3.0	0.6	0.536
7	4.0	0.2	0.349
8	4.0	0.4	0.425
9	4.0	0.6	0.524

2.3 正交实验优化培养基的组成

以上的单因子实验初步表明,玉米粉、蔗糖、豆饼粉、麸皮汁为姬松茸生长的较佳营养因子,可以促进姬松茸在固体培养基中的生长。为了考察这些因子的协同作用,以及在液体培养时的生长利用状况,选用玉米粉、蔗糖、豆粕粉和麸皮汁等 4 个因子,各取 3 个水平,在摇瓶中进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,其实验设计与分析结果见表 4 和表 5 以及图 1、图 2。

表 4 正交实验因子 $L_9(3^4)$ 水平表

Tab.4 The factors and level of orthogonal test

水平	玉米粉质量浓度 A/(g/dL)	蔗糖质量浓度 B/(g/dL)	麸皮汁质量浓度 C/(g/dL)	豆饼粉质量浓度 D/(g/dL)
1	1	0	0	1
2	1.5	0.5	0.5	1.5
3	2.0	1.0	1.0	2.0

从极差分析结果来看,豆饼粉对生物量的影响最为显著,玉米粉对生物量的增加影响次之;当玉米粉由 1 g/dL 增加到 2 g/dL 时,生物量增加了 0.187 g,即增加部分的转化效率为 18.7%。蔗糖有先增加后下降的趋势,这可能是由于当蔗糖增加到一定的程度,碳源含量过高,或碳氮源质量浓度比不适宜,影响了它的生长。麸皮汁质量浓度当增加到 0.5 g/dL 后,其对增加生物量和胞外多糖的贡献就变得不明显。因为实验培养基所选用的玉米粉和豆饼粉溶解性差、粘度大,当质量浓度增加到一定值时,造成培养基溶氧下降,使菌丝生长受阻,所以出现了生物量先上升,后反而下降的情况。从减小

培养液的粘度考虑,同时考虑到蔗糖是速效碳源,可用部分蔗糖代替玉米粉作为碳源.再结合前面的可溶性碳氮源的质量浓度比实验,选定姬松茸的二级摇瓶最佳配方为:玉米粉 1.5 g/dL,蔗糖 0.5 g/dL,麸皮汁 0.5 g/dL,豆饼粉 2 g/dL.

表 5 正交实验结果与分析

Tab.5 The results and analysis of orthogonal test

实验号	因 素				菌丝干重/ (g/dL)	胞外多糖 质量浓度/ (g/dL)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	0.856	0.125
2	1	2	2	2	1.161	0.169
3	1	3	3	3	1.274	0.178
4	2	1	2	3	1.326	0.194
5	2	2	3	1	1.057	0.157
6	2	3	1	2	1.134	0.142
7	3	1	3	2	1.304	0.183
8	3	2	1	3	1.416	0.204
9	3	3	2	1	1.132	0.166
K_1	3.291	3.486	3.406	3.045		
K_2	3.517	3.634	3.619	3.599		
K_3	3.852	3.54	3.635	4.012		
k_1	1.097	1.162	1.135	1.015		
k_2	1.172	1.211	1.206	1.200		
k_3	1.284	1.18	1.212	1.339		
R	0.187	0.049	0.076	0.323		
K_1	0.472	0.502	0.471	0.448		
K_2	0.493	0.530	0.529	0.494		
K_3	0.553	0.486	0.518	0.576		
k_1	0.157	0.167	0.157	0.149		
k_2	0.164	0.177	0.176	0.165		
k_3	0.184	0.162	0.173	0.192		
R	0.027	0.015	0.019	0.043		

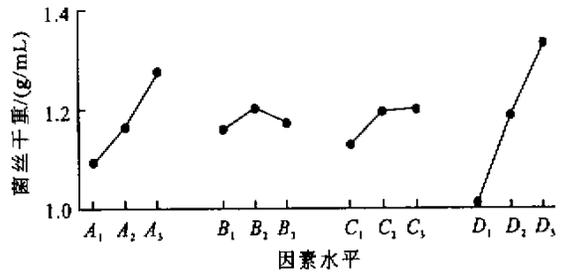


图 1 实验因素与指标趋势

Fig.1 Effects of factors on biomass

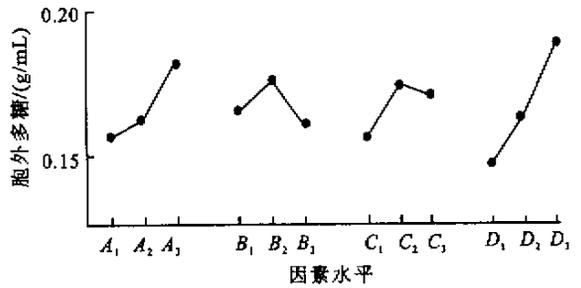


图 2 实验因素与指标趋势

Fig.2 Effects of factors on extracellular polysaccharides

3 结 论

1)用廉价的玉米粉、蔗糖、豆饼粉、麸皮为原料进行姬松茸的液体培养,用二级摇瓶筛选的最佳配方,在自然 pH 值、160 r/min、26 °C 条件下培养 4 d,生物量可以达到 1.43 g/dL,胞外粗多糖达 0.167 g/dL.

2)培养基筛选实验所选用的摇瓶发酵培养条件,如 pH 值、温度、装液量、摇瓶转速需通过实验进一步优化选择.

3)在姬松茸的液态培养过程中,培养基筛选的参考指标为生物量和胞外粗多糖,因为多糖是姬松茸中的主要活性物质,培养基的优化应围绕促进多糖的生物合成展开.

参考文献:

[1] 黄年来.巴西蘑菇值得研究推广[J].中国食用菌,1994,13(1):11-13.
 [2] TAKASHI MIZUO, JOSHIHIKO HAGIWARA. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54(11): 2889-2896.
 [3] MASASHI MIZUNO. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1999, 47(4): 707-714.
 [4] 张惟杰.复合多糖研究技术[M].上海:上海科学出版社,1987.
 [5] 梁峙.食用菌深层液体发酵参数控制的研究[J].食品科学,2001,22(1):38-41.
 [6] 潘继红.灵芝液体培养需求的探讨[J].食用菌学报,1997,4(1):31-34.