

文章编号:1673-1689(2005)02-0014-04

鸡腿蘑菌株筛选及深层发酵培养基的优化

刘艳芳, 杨焱*, 张劲松, 唐庆九

(上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201106)

摘要: 对 4 个鸡腿蘑菌株进行了发酵筛选, 选出生物量较高的菌株农林鸡腿蘑(NL), 并通过单因素试验, 确定玉米粉、蔗糖为碳源, 麸皮为氮源; 在此基础上, 以筛选的碳源、氮源和无机盐 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为考察因素, 以生物量为主要指标利用正交试验优化培养基配方比例, 确定鸡腿蘑摇瓶发酵培养基最佳配方为: 玉米粉 4 g/dL, 蔗糖 2 g/dL, 麸皮 4 g/dL, KH_2PO_4 0.1 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dL.

关键词: 鸡腿蘑; 深层发酵; 培养基优化

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Screening of *Coprinus comatus* Strains and Optimization of the Submerged Fermentation Medium

LIU Yan-fang, YANG Yan*, ZHANG Jin-song, TANG Qing-jiu

(Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: The screening of four *Coprinus comatus* strains in submerged fermentation showed that NL was the highest in mycelia biomass. In order to screen the optimum culturing medium of NL, single factor test in culturing utensil was carried out. The result showed that maize powder and sucrose could be used as the carbon sources, and wheat bran as the nitrogen sources. Then, in the orthogonal test, C-sources, N-sources and inorganic salts KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were considered as influencing factors, and the mycelia biomass as the major performance index. The optimum medium components were as follows: maize powder 4%, sucrose 2%, wheat bran 4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%.

Key words: *Coprinus comatus*; submerged fermentation; medium optimization

鸡腿蘑, 学名毛头鬼伞 [*Coprinus comatus* (Mueller, ex Fr.) S. F. Gray], 属鬼伞科 (Coprinaceae)、鬼伞属 (*Coprinus*)^[1~3]. 鸡腿蘑味甘滑性平, 有益脾胃、清新安神、通肠利便等功效. 据阿斯

顿大学(英国)报道, 鸡腿蘑含有治疗糖尿病的有效成分^[4], 而且有研究证实鸡腿蘑富含氨基酸和不饱和脂肪酸, 具有降低血脂的功效^[5]. 另有研究表明, 鸡腿蘑粗多糖具有较高的抗肿瘤及提高机体免疫

收稿日期: 2004-05-27; 修回日期: 2004-09-03.

基金项目: 上海市农业科学院青年科技基金项目(农青年科技 2003 第(06)号)资助课题.

作者简介: 刘艳芳(1980-), 女, 山东曲阜人, 实习研究员, 农学学士; * 通讯作者.

万方数据

力等功效^[6]。由此可见,鸡腿蘑具有较好的食用价值和药用价值,是一种极具开发潜力和应用前景的食用菌。目前国内对鸡腿蘑的驯化栽培研究得比较多,但对鸡腿蘑深层发酵方面的研究较少^[7,8]。与传统的人工栽培相比,深层发酵有周期短、易控制、成本低等优点。作者对鸡腿蘑几个菌株进行了发酵筛选,并对优良菌株的发酵培养基进行了优化。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

鸡腿蘑斜面菌株 4 个,YN:云南鸡腿蘑;NL:农林鸡腿蘑;W:魏鸡腿蘑;CC:鸡腿蘑,均由上海农科院食用菌研究所菌种保藏中心获得。

1.2 实验材料

硝酸铵、硝酸钾、氯化铵、葡萄糖、甘露醇、蔗糖、糊精、可溶性淀粉均为分析纯;麦芽糖、酵母膏、蛋白胨为生化试剂;麸皮、玉米粉和豆饼粉均为提取液,煮沸 1 h 后用纱布过滤制得。

1.3 主要仪器

TOMY/SS-325 型高压灭菌锅,SA-1480-Ⅱ型超净无菌工作台,LRH-250 型生化培养箱,DKY-Ⅱ型恒温调速回转式摇床,DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱,FA2004N 型分析天平,UV-7504C 型紫外分光光度计。

1.4 基本培养基

1.4.1 斜面培养基 PDA 培养基:土豆 20 g/dL,葡萄糖 2 g/dL,琼脂 2 g/dL。

1.4.2 液体培养基 玉米粉 3 g/dL,蔗糖 2 g/dL,麸皮 3 g/dL,KH₂PO₄ 0.2 g/dL,MgSO₄·7H₂O 0.1 g/dL,pH 值自然。

1.4.3 氮源筛选培养基 蔗糖 3 g/dL,KH₂PO₄ 0.2 g/dL,MgSO₄·7H₂O 0.1 g/dL,pH 值自然。分别以硝酸铵、硝酸钾、氯化铵、酵母膏、蛋白胨、麸皮、豆饼粉为氮源,添加量为 2 g/dL。

1.4.4 碳源筛选培养基 麸皮 2 g/dL,KH₂PO₄ 0.2 g/dL,MgSO₄·7H₂O 0.1 g/dL,pH 值自然。分别以葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、蔗糖、糊精、可溶性淀粉和玉米粉为碳源,添加量为 3 g/dL。

1.5 培养方法

1.5.1 种子液制备 将斜面菌种分割成黄豆大小,接种到液体培养基中,250 mL 三角瓶装液量 100 mL,于 25~28 ℃,150 r/min 振荡培养 7 d 得一级种。将已经培养好的一级种以体积分数 10% 接种到同样液体培养基中,500 mL 三角瓶装液量 200 mL,在与一级种同样条件下培养 7 d 得种子液备用。

1.5.2 培养基筛选 将制备好的种子液用快速匀浆机破碎后,按体积分数 10% 接种量接种到不同的碳氮源培养基及正交试验筛选培养基中,250 mL 三角瓶装液量 100 mL,相同条件下进行培养,5 d 后收集菌丝体。

1.5.3 混合碳氮源培养基正交试验 根据单因素试验筛选结果,并考虑到低投入高产出的原则,选用玉米粉和蔗糖作为复合碳源,麸皮作为氮源,磷酸二氢钾和硫酸镁作为无机盐,按 L₉(3⁴)设计四因素三水平试验,9 个组合,3 次重复,优化培养基配方见表 1。

Tab. 1 Factors and levels of the orthogonal test					g/dL
水平	因 素				
	A 玉米粉	B 蔗糖	C 麸皮	D KH ₂ PO ₄ + MgSO ₄	
1	2	1	2		0.1+0.1
2	3	1.5	3		0.2+0.1
3	4	2	4		0.2+0.2

1.6 测定方法

1.6.1 发酵菌丝体生物量的测定 细胞干重法,取 100 mL 发酵液,蒸馏水洗涤 3 次,收集菌丝体,65 ℃烘干称重。

1.6.2 菌丝体多糖含量测定 将干燥的菌丝体用沸水提取 3 h,分别用 DNS 法和苯酚硫酸法测定还原糖及总糖含量。

多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量。

2 结果与分析

2.1 不同鸡腿蘑菌株的发酵筛选

采用相同的培养基和培养条件分别对 4 个不同的鸡腿蘑菌株进行深层发酵培养,培养 7 d 后获得相应的菌丝体,并对其生物量和菌丝体胞内多糖产量(菌丝体生物量×胞内多糖质量分数)进行了分析,结果见图 1。

由图 1 可以看出,NL 生物量和菌丝体胞内多糖产量均为最高,YN 和 CC 的生物量较高,但菌丝体胞内多糖产量比较低,W 菌丝体胞内多糖产量较高,但生物量却最低,因此综合考虑选取 NL 作为研究对象,进行深层发酵培养基的优化。

2.2 鸡腿蘑对氮素营养的利用

氮源是食用菌细胞合成蛋白质和核酸必不可少的主要原料,鸡腿蘑可利用的氮源比较广泛。不同氮源对鸡腿蘑菌丝生长的影响见图 2。从图 2 可以看出,鸡腿蘑对有机氮源的利用优于无机氮源,

而且其对麸皮、豆饼粉等天然氮源的利用情况也较好,其中以麸皮为氮源培养时菌丝体生物量最高.因此,选用廉价的麸皮作为鸡腿蘑发酵的氮源.

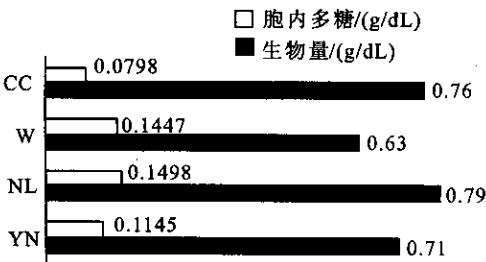
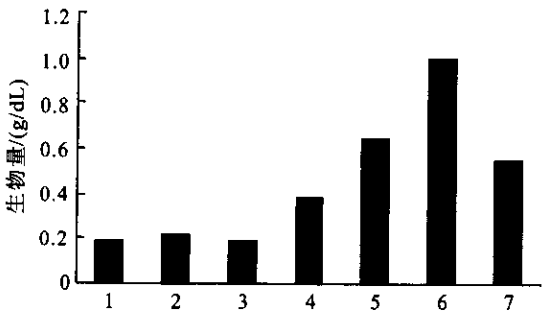


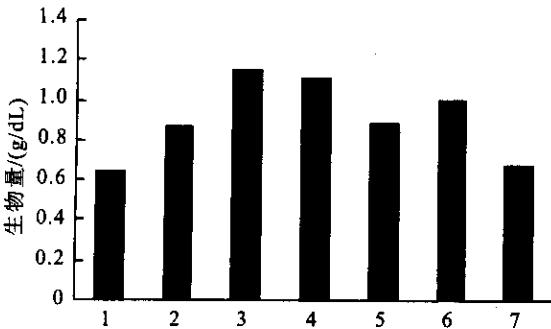
图 1 不同鸡腿蘑菌株生物量和多糖产量的比较
Fig. 1 The comparison of biomass and polysaccharide yield of different *Coprinus comatus* strains



1. NH₄NO₃; 2. KNO₃; 3. NH₄Cl; 4. 酵母膏; 5. 蛋白胨;
6. 麸皮; 7. 豆饼粉
图 2 氮源对菌丝体生物量的影响
Fig. 2 Effect of nitrogen sources on the mycelial biomass

2.3 鸡腿蘑对碳素营养的利用

碳源是发酵培养基的基础,它既能被菌丝体利用合成细胞结构,又是菌丝体产生各种代谢产物和细胞内贮藏物质的主要原料.对部分碳源的筛选结果见图 3.



1. 葡萄糖; 2. 甘露醇; 3. 麦芽糖; 4. 蔗糖; 5. 糊精; 6. 可溶性淀粉; 7. 玉米粉
图 3 碳源对菌丝体生物量的影响
Fig. 3 Effect of carbon sources on the mycelial biomass

结果表明,鸡腿蘑对麦芽糖、蔗糖等双糖的利用较好,其中以在麦芽糖为碳源的培养基中菌丝体生物量最大,达 1.15 g/dL;对糊精和可溶性淀粉等

多糖的利用其次,对天然碳源玉米粉的利用较差,并且在以葡萄糖为碳源培养时其生物量最低.由于麦芽糖和蔗糖价格较贵,在发酵过程中大量应用不符合生产中低投入、高产出的原则,因此作者选用廉价的天然碳源玉米粉和蔗糖作为复合碳源,降低成本.

2.4 正交试验优化培养基的组成

根据单因素试验结果,选取玉米粉、蔗糖、麸皮和无机盐 KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O 为考察对象.利用正交试验对鸡腿蘑发酵培养基进行了优化,结果见表 2 和图 4,5. 由表 2 正交数据极差分析结果(其中 R_i 代表生物量极差, R_j 代表菌丝体胞内多糖含量极差, R_k 代表菌丝体胞内多糖产量极差)可知,各因素对菌丝生物量的影响大小依次为 A>C>B>D,对菌丝体胞内多糖含量的影响大小依次为 B>D>C>A,对菌丝体胞内多糖产量的影响大小依次为 B>A>C>D.

表 2 培养基各组分 L ₉ (3 ⁴) 正交试验结果							
Tab. 2 Results of the orthogonal test							
试验号	A	B	C	D	生物量/(g/dL)	多糖质量分数/%	多糖产量/(g/dL)
1	1	1	1	1	0.6116	28.36	0.1734
2	1	2	2	2	0.7743	31.10	0.2408
3	1	3	3	3	0.9906	35.48	0.3515
4	2	1	2	3	0.6999	22.31	0.1561
5	2	2	3	1	1.1366	33.11	0.3763
6	2	3	1	2	0.9134	37.66	0.3440
7	3	1	3	2	1.0985	25.90	0.2845
8	3	2	1	3	0.9772	29.98	0.2930
9	3	3	2	1	1.1949	36.46	0.4357
I	0.7922	0.8033	0.8341	0.9810			
II	0.9166	0.9627	0.8897	0.9287			
III	1.0902	1.0330	1.0752	0.8892			
R _i	0.2980	0.2297	0.2411	0.0918			
i	31.65	25.52	32.00	32.64			
ii	31.03	31.40	29.99	31.55			
iii	30.78	36.53	31.50	29.26			
R _j	0.87	11.01	2.01	3.38			
(1)	0.2552	0.2047	0.2701	0.3285			
(2)	0.2921	0.3034	0.2775	0.2898			
(3)	0.3377	0.3771	0.3374	0.2669			
R _k	0.0825	0.1724	0.0673	0.0616			

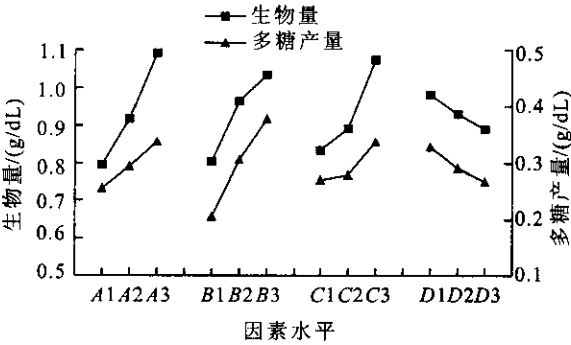


图 4 实验因素与指标趋势

Fig. 4 Effects of factors on biomass

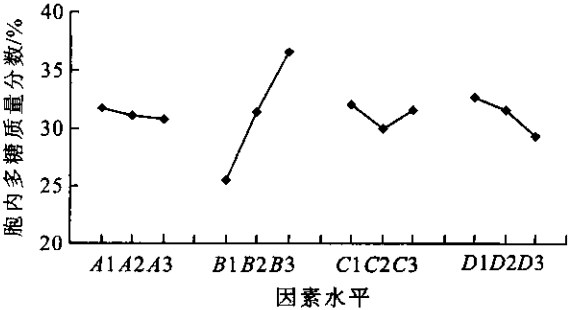


图 5 实验因素与指标趋势

Fig. 5 Effects of factors on intracellular polysaccharides content

从发酵菌丝体生物量来考察各因素水平值, A 可取 A3, B 可取 B3, C 可取 C3, D 可取 D1; 从发酵菌丝体胞内多糖产量来考察各因素水平值, A 可取 A3, B 可取 B3, C 可取 C3, D 可取 D1; 从发酵菌丝体胞内多糖含量来考察各因素水平值, A 可取 A1, B 可取 B3, C 可取 C1, D 可取 D1. 由图 4 可以看出, 菌丝体胞内多糖产量主要受生物量的影响, 二

者变化趋势相同. 因此, 以菌丝体生物量和胞内多糖产量为指标确定最佳培养基为 A3B3C3D1, 即玉米粉 4 g/dL, 蔗糖 2 g/dL, 麸皮 4 g/dL, KH_2PO_4 0.1 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dL.

3 讨 论

结果表明, 不同鸡腿蘑菌株发酵所得菌丝体生物量和胞内多糖质量分数之间有一定差异. 在所选 4 个菌株中农林鸡腿蘑 (NL) 生物量和多糖产量均为最高.

对碳、氮源的筛选结果表明, 农林鸡腿蘑可利用的碳氮源比较广泛, 但有差异. 对碳源来说, 农林鸡腿蘑对双糖的利用较好, 对有机碳源的利用比较差, 对单糖的利用最差. 对于氮源来说, 农林鸡腿蘑对有机氮源和天然氮源的利用较好, 对天然氮源麸皮的利用最好.

正交试验结果显示, 在农林鸡腿蘑菌株 NL 的深层发酵培养基中, 玉米粉是影响农林鸡腿蘑菌丝体生物量的主要因素, 蔗糖是影响其菌丝体胞内多糖质量分数的主要因素, 而且农林鸡腿蘑菌丝体胞内多糖质量分数不随生物量的增加而增加, 且两者间无明显相关性, 但胞内多糖产量主要受菌丝体生物量的影响, 两者变化趋势一致. 另外, 随着培养基中无机盐添加量的增加, 农林鸡腿蘑菌丝体生物量和胞内多糖质量分数均呈下降趋势, 这表明少量无机盐可促进农林鸡腿蘑菌丝体的生长和胞内多糖的积累, 若添加量过多, 会抑制其生长.

参考资料:

[1] 邵立平. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.
[2] 黄年来. 自修食用菌学[M]. 南京: 南京大学出版社, 1987.
[3] 应建浙, 赵继鼎, 卯晓岚, 等. 食用菌[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
[4] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
[5] 赖普辉, 田光辉, 周选围. 鸡腿蘑的营养成分研究[J]. 汉中师范学院学报, 1998, 16(2): 45—47.
[6] 李师鹏, 苏蕾. 鸡腿蘑多糖的提取及其免疫活性抗肿瘤活性的研究[J]. 中国商办工业, 2000, (1): 44—45.
[7] 杨梅, 邓象斌. 鸡腿菇菌丝生长研究[J]. 食用菌, 2001, (3): 6—7.
[8] 赵后美, 何佳, 侯军. 鸡腿蘑深层发酵培养基的研究[J]. 食用菌, 2002, (1): 7—8.

(责任编辑: 李春丽)