

文章编号 :1009-038X(2004)04-0024-04

黄伞菌丝深层发酵的培养条件

惠丰立, 魏明卉, 杜敏华, 刘征

(南阳师范学院 生物系 河南 南阳 473061)

摘 要 :采用摇瓶培养法对黄伞菌丝深层发酵培养条件进行了研究. 通过正交试验初步确定黄伞菌丝深层发酵适宜的培养基组成为 :葡萄糖 3 g/dL ,牛肉膏 1.5 g/dL , K_2HPO_4 0.5 g/dL , $MgSO_4$ 0.1 g/dL. 该菌株最适培养条件为 :培养温度 25 ℃ ,起始 pH 值 5.0 ,接种体积分数 15% ,发酵周期 10 d. 在优化的试验条件下 ,进行摇瓶发酵 ,菌丝干重达 11.16 g/L.

关键词 :黄伞 ;深层发酵 ;菌丝

中图分类号 :Q 939.96

文献标识码 :A

Submerged Fermentation Conditions of *Pholiota adiposa*

HUI Feng-li, WEI Ming-hui, DU Min-hua, LIU Zheng

(Department of Biology, Nanyang Teachers' College, Nanyang 473061, China)

Abstract : The submerged fermentation conditions of *Pholiota adiposa* were studied with shake flask culture method. The optimal content of culture medium obtained through orthogonal designs was as follows : glucose 3 g/dL , beef extract 1.5 g/dL , K_2HPO_4 0.5 g/dL , and $MgSO_4$ 0.1 g/dL. The optimal cultivation conditions of *Pholiota adiposa* were : initial pH 5.0 , culture temperature 25 ℃ , fermentation time 10 d , and inoculating amount 15% . Under the optimal conditions , the dry weight of mycelia reached 11.16 g/L fermentation liquid.

Key words : *Pholiota adiposa* ; submerged fermentation ; hyphae

黄伞[*Pholiota adiposa* (Fr.) Quel.] , 又名柳蘑、黄蘑、多脂鳞伞 , 是担子菌纲伞菌目球盖菇科鳞伞属的一种名贵食药兼用真菌. 黄伞子实体不仅含有丰富的营养物质 , 如蛋白质、脂肪、纤维素及多种维生素和无机盐 , 而且还含有多糖、麦角固醇和胡萝卜素等多种生物活性物质^[1]. 黄伞活性多糖抗癌作用明显 , 对小白鼠肉瘤 180 和艾氏腹水癌的抑制率达 80% ~ 90% , 还可预防葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎杆菌和结核杆菌感染^[1,2]. 其所含有的麦角甾醇能

抑制肿瘤血管的生成 , 而肿瘤血管生成抑制药物的开发也是当前肿瘤研究的热点和肿瘤治疗的新方向^[3,4].

目前 , 我国和日本已对黄伞的人工驯化栽培进行了研究 , 但由于对黄伞的生物学特性了解不够完全 , 人工栽培子实体生产周期长 , 产量低 , 因而未得到全面开发^[1,5,6]. 为此 , 十分有必要对黄伞的深层发酵工艺进行研究 , 以使用发酵的菌丝体替代子实体作为食品、保健品或药品的原料.

收稿日期 2003-11-10 ; 修回日期 2003-12-23.

基金项目 河南省自然科学基金项目资助课题.

作者简介 惠丰立 (1965-) , 男 , 河南唐河人 , 病毒学硕士研究生 , 副教授.

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种 黄伞(*P. adiposa*)由河南省生物研究所真菌试验厂提供.

1.1.2 培养基

1)斜面培养基(组分 g/dL):马铃薯 20 ,葡萄糖 2 ,酵母粉 0.5 ,琼脂 2. pH 值自然.

2)种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 3 ,玉米粉 2 ,酵母粉 0.5 , K_2HPO_4 0.3 , $MgSO_4$ 0.15. pH 值自然.

3)基础发酵培养基(组分 g/dL):葡萄糖 3 ,酵母粉 0.5 , K_2HPO_4 0.3 , $MgSO_4$ 0.15. pH 值自然.

1.2 培养方法

1.2.1 菌种活化 将保存菌种用接种针接入斜面培养基上 ,24 ℃ 恒温培养 12 d.

1.2.2 种子制备 从活化菌种中取 3 ~4 块大小相同的菌块 (0.5 cm × 0.5 cm) ,接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中 ,24 ℃ 振荡(150 r/min)培养 6 d.

1.2.3 摇瓶培养 将培养好的种子以体积分数 10% 的接种量接入盛有 90 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中 ,24 ℃ 振荡(150 r/min)培养 6 d.

1.3 分析方法

1.3.1 菌丝干重的测定 发酵结束后 ,将发酵液用 40 目尼龙布过滤 ,菌丝体经蒸馏水冲洗数次后 ,在 45 ~ 50 ℃ 的条件下烘干至恒重 ,电子天平称菌丝体干重.

1.3.2 还原糖的测定 采用 DNS 法^[7].

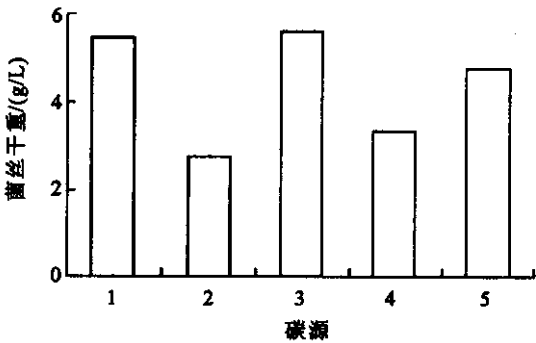
1.3.3 pH 值的测定 采用 pH S-3C 精密酸度计测定.

2 结果与分析

2.1 培养基组成的确定

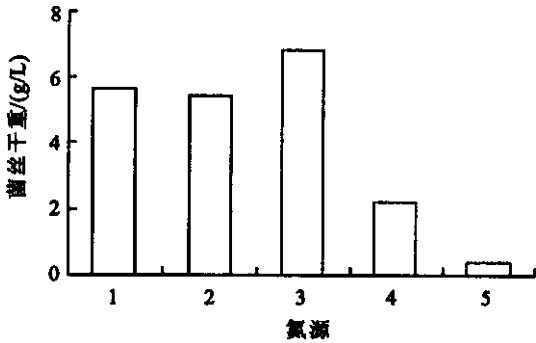
2.1.1 碳源的筛选 在基础发酵培养基中分别加入 5 种不同碳源 ,以取代基础培养基中的葡萄糖进行碳源试验. 从图 1 可以看出 ,黄伞菌丝深层发酵以葡萄糖、果糖作为碳源效果较好 ,其次是乳糖、麦芽糖和蔗糖 ,因此正交试验选用葡萄糖为碳源.

2.1.2 氮源的筛选 在基础发酵培养基中分别加入 3 种有机氮和 2 种无机氮 ,以取代基础培养基中的酵母粉进行氮源试验. 由图 2 可知 ,在黄伞菌丝深层发酵中 ,有机氮源明显优于无机氮源 ,其中以牛肉膏作为氮源效果最好 ,其次是酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵 ,因此正交试验选用牛肉膏为氮源.



1. 葡萄糖 2. 蔗糖 ;3. 果糖 ;4. 麦芽糖 ;5. 乳糖
图 1 不同碳源对菌丝生长的影响

Fig.1 Effect of carbon resources on the growth of mycelia



1. 酵母粉 2. 蛋白胨 ;3. 牛肉膏 ;4. $(NH_4)_2SO_4$;5. $NaNO_3$
图 2 不同氮源对菌丝生长的影响

ig.2 Effect of nitrogen source on the growth of mycelia

2.1.3 培养基优化 选用葡萄糖作为碳源 ,牛肉膏作为氮源 , K_2HPO_4 和 $MgSO_4$ 作为无机盐 ,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验 ,试验安排及结果见表 1.

表 1 正交试验结果及极差分析

Tab.1 The results and extreme value analysis of the orthogonal test

试验号	葡萄糖 质量浓度 A/(g/dL)	牛肉膏 质量浓度 B/(g/dL)	K_2HPO_4 质量浓度 C/(g/dL)	$MgSO_4$ 质量 浓度 D/ (g/dL)	菌丝 干重/ (g/L)
1	1	0.5	0.1	0.1	3.17
2	1	1.0	0.3	0.2	3.71
3	1	1.5	0.5	0.3	4.74
4	3	0.5	0.3	0.3	4.42
5	3	1.0	0.5	0.1	6.86
6	3	1.5	0.1	0.2	6.80
7	5	0.5	0.5	0.2	4.67
8	5	1.0	0.1	0.3	5.61
9	5	1.5	0.3	0.1	6.14
K_1	11.62	12.26	15.58	16.17	
K_2	18.08	16.18	14.27	15.18	
K_3	16.42	17.68	16.27	14.77	
R	6.46	5.42	2.00	1.40	

试验结果表明,葡萄糖的极差最大,其次是牛肉膏和 K_2HPO_4 , $MgSO_4$ 的极差最小,各因素对菌丝干重影响的主次顺序为 $A > B > C > D$.

为了进一步考察各因素对菌丝干重的影响,进行了方差分析(见表2).从方差分析看,葡萄糖、牛肉膏和 K_2HPO_4 在 99% 的置信度下对指标的影响均极显著, $MgSO_4$ 在 95% 的置信度下对指标的影响显著,此结果与极差的直观分析一致.因此 4 种因素最佳组合为:葡萄糖 3 g/dL,牛肉膏 1.5 g/dL, K_2HPO_4 0.5 g/dL, $MgSO_4$ 0.1 g/dL.

表 2 正交试验方差分析

Tab.2 Variance analysis of the orthogonal test					
方差来源	自由度	平方和	方差	F 值	显著性
A	2	0.1507	0.0754	153.67	**
B	2	0.1047	0.0524	106.79	**
C	2	0.0137	0.0069	14.01	**
D	2	0.0071	0.0035	7.19	*
误差	8	0.0039	0.0005		

注: $F_{0.95}=4.46$, $F_{0.99}=8.65$.

2.2 起始 pH 值对菌丝生长的影响

分别用 5% 的 NaOH 和 0.2 mol/L HCl 将发酵培养基的起始 pH 值调到 3 4 5 6 7 进行试验,结果见图 3.图 3 表明,黄伞菌丝在偏酸性条件下生长较好.当起始 pH 值为 5 时,菌丝干重最高,起始 pH 值过高或过低都对菌丝生长不利,因此选择起始 pH 值为 5 左右最佳.

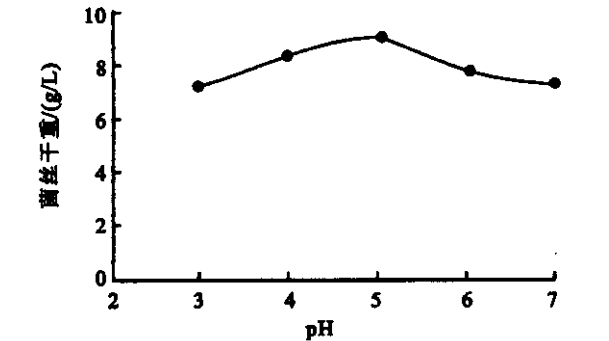


图 3 起始 pH 值对菌丝干重的影响

Fig.3 Effect of initial pH values on dry weight of mycelia

2.3 接种量对菌丝生长的影响

在发酵培养基中分别接入体积分数为 5% , 10% ,15% 20% 的液体种子进行试验,结果见图 4.从图 4 可以看出,接种量以体积分数 15% 为宜.接种量过小,菌丝生长缓慢;接种量过大,菌丝初期生

长繁殖迅速,过早达到发酵终点.

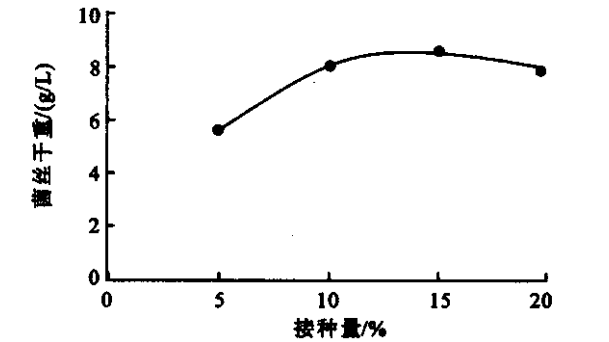


图 4 接种量对菌丝干重的影响

Fig.4 Effect of inoculation volume on the dry weight of mycelia

2.4 培养温度对菌丝生长的影响

将已接种的摇瓶分别置于 23 24 25 26 ℃ 下进行试验,结果见图 5.由图 5 可知,菌丝在 23 ~ 26 ℃ 范围内均能生长.发酵温度低,菌丝生长速度慢;温度过高,菌丝生长不良.只有在 25 ℃ 时菌丝生长最好,因此最适发酵温度为 25 ℃.

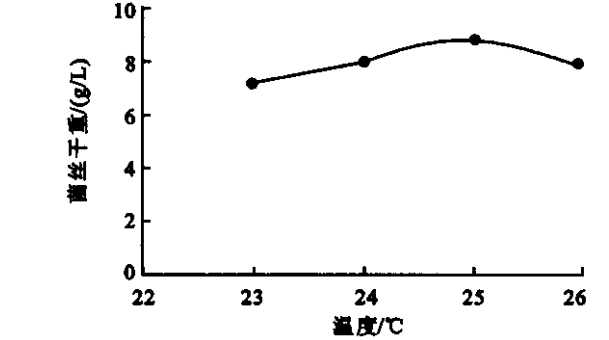


图 5 培养温度对菌丝干重的影响

Fig.5 Effect of culture temperature on the dry weight of mycelia

2.5 摇瓶发酵周期试验

在 500 mL 摇瓶中,采用上述已确定的最佳发酵条件进行发酵试验,以确定最适发酵周期,结果见图 6.从图 6 可以看出,在发酵过程中,随着培养时间的延长,菌丝干重不断增加,到第 10 天达到最大值 11.16 g/L,此后若再继续培养,则因溶氧量降低,菌体老化自溶,导致菌丝干重下降.还原糖质量浓度在发酵开始后的前 4 d 下降较快,在 4 ~ 10 d 内维持一定的还原糖质量浓度并缓慢下降,到第 12 天还原糖质量浓度降到最低水平.发酵液 pH 值在整个发酵过程中呈下降趋势,可能是菌体代谢产生有机酸等物质所致.因此,发酵周期以 10 d 比较适宜.

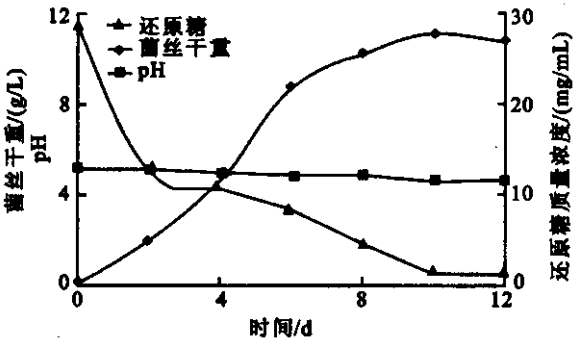


图 6 黄伞菌丝摇瓶发酵生长曲线

Fig. 6 Growth curve of *Pholiota adiposa* in shaking flask culture

3 结 论

1)在碳源、氮源筛选的基础上,通过正交试验初步得出黄伞菌丝深层发酵较佳培养基配方为:葡萄糖 3 g/dL,牛肉膏 1.5 g/dL, K_2HPO_4 0.5 g/dL, $MgSO_4$ 0.1 g/dL.

2)单因子试验表明,黄伞菌丝深层发酵最适培养条件为:培养温度 25 ℃,起始 pH 值 5.0,接种量 15%,发酵周期 10 d.在优化的试验条件下,进行摇瓶发酵,菌丝干重达 11.16 g/L.

参考文献：

[1] 苏延友. 泰山黄伞的优质高产栽培及加工技术[J]. 中国实用菌 2003 22(1) :45 - 48.

[2] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京 :中国农业出版社 ,1993. 142.

[3] Takeshi T , Kawagish H , Hiromichi O. Isolation of an antiitumor compound from *Agaricus blazei* murill and its mechanism of action [J]. *J Nutr* 2001 131(4) :1409.

[4] 甘彦欢. 抗肿瘤药物开发新方向——肿瘤血管生成抑制剂[J]. 医药导报 2001 20(9) 25.

[5] 张剑斌, 徐连峰, 董希文, 等. 黄伞的生物学特性及人工驯化栽培技术[J]. 防护林科技 2000 (4) 67 - 68.

[6] 崔颂英, 杨玉娜, 曲波. 野生黄伞 Ph-1 的生物学特性及栽培技术[J]. 食用菌 2003 (1) :13 - 14.

[7] 张惟杰. 糖复合生化研究技术[M]. 杭州 :浙江大学出版社 ,1999. 6 - 7.

(责任编辑 :李春丽)

(上接第 23 页)

参考文献：

[1] 高福成. 食品分离重组工程技术[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1998.

[2] Majeti N V , Ravi Kumar. A review of chitin and chitosan application[J]. *Reactive & Functional Polymers* 2000 46 :1 - 27.

[3] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京 :化学工业出版社 2003.

[4] 杜予民. 甲壳素化学与应用进展[J]. 武汉大学学报(自然科学版) 2000 46(2) :181 - 186.

[5] 汪志君. 碱量法测定壳聚糖中的氨基[J]. 化学世界 1986 27(1) 22 - 23.

[6] 林瑞洵, 蒋苏洪, 张慕珊. 脱乙酰度测定方法[J]. 化学通报 1992 3 :39.

[7] 陈洁, 杨方琪. 甲壳素脱乙酰度的测定方法[J]. 无锡轻工业学院学报 1993 12(3) 255 - 259.

[8] 贾之慎, 李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. 化学世界 2001 (5) 240 - 241.

(责任编辑 :杨 萌)