

文章编号:1009-038X(2004)06-0096-04

美味牛肝菌深层发酵条件的优化及成分分析

邓百万, 陈文强

(陕西理工学院陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001)

摘要: 对美味牛肝菌(*Boletus edulis*)深层发酵条件及菌丝体主要营养成分进行了分析研究, 结果表明, 最适培养基配方为: 葡萄糖 30.0 g, 玉米粉 20.0 g, 酵母膏 7.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g; 最优发酵条件的初始 pH 值 5.2~5.8, 振荡速度 180 r/min, 培养温度 27 °C, 100 mL 三角瓶装液量 60 mL. 并对美味牛肝菌深层培养菌丝体中蛋白质成分、灰分、脂肪、粗纤维、矿物质及多糖等进行了测定和分析。

关键词: 美味牛肝菌; 深层发酵; 优化; 成分分析

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Study on Submerged Fermentation and Analysis of Main Components of *Boletus edulis*

DENG Bai-wan, CHEN Wen-qiang

(Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: This paper explores the suitable fermentation conditions affecting the mycelia growth of *Boletus edulis*. Experimental results indicated that the optimum composition of the fermentation medium is as following: glucose 30.0 g, Corn meal 20.0 g, yeast extract 7.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, VB_1 0.01 mg and CaCO_3 2.0 g. The highest yield of mycelia was obtained under the conditions when the shaker rotation speed, pH, temperature and medium loading amount were controlled at 180 r/min, 5.2~5.8, 27 °C, and 60 mL/100 mL, respectively.

Key words: *Boletus edulis*; submerged fermentation; optimum; components analysis

美味牛肝菌(*Boletus edulis* Bull. ex Fr.)俗称大脚菇, 属层菌纲, 伞菌目, 牛肝菌科, 牛肝菌属, 分布于四川、云南、福建、陕西等地。其菌肉厚而细软, 味道鲜美, 营养丰富, 是人们最喜欢的野生食用菌之一^[1,2]。长期食用能增强机体免疫能力, 具抗肿瘤、抗突变、降血脂、抗病毒等作用。该菌提取物对小白鼠肉瘤 180 的抑制率为 100%, 对艾氏腹水癌的抑制率为 90%^[3,4]。该菌还产生腺嘌呤、胆碱和腐

胺等生物碱, 可药用, 是“舒筋丸”的成分之一, 可治疗腰腿疼痛, 手足麻木, 筋骨不舒, 四肢抽搐, 是一种食药兼用的山珍品^[5]。由于美味牛肝菌是菌根菌, 目前不能人工栽培, 野生资源不能满足人们的需要, 液体发酵获得营养菌丝取代子实体是解决这一问题的有效办法。为此, 对美味牛肝菌深层发酵条件进行了优化研究, 对菌丝体主要营养成分及质量进行了分析测定, 为开发利用真菌资源提供参考依据。

收稿日期: 2004-02-12; 修回日期: 2004-03-25.

基金项目: 陕西省教育厅专项科研项目(99JK109)资助课题。

作者简介: 邓百万(1963-), 男, 陕西眉县人, 副教授。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 美味牛肝菌子实体采自陕西省佛坪县三官庙乡。

1.1.2 菌种 美味牛肝菌由陕西省资源生物重点实验室食药菌种保藏中心提供。

1.1.3 培养基

1) 母种培养基: 葡萄糖 20.0 g, 马铃薯 200.0 g, 麸皮 100.0 g, KH_2PO_4 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, VB_1 10 mg, 琼脂 20.0 g, 水 1 000 mL^[5]。

2) 单因子基础培养基: 碳源基础培养基: 酵母粉 5.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g; 氮源基础培养基: 葡萄糖 20.0 g, 玉米粉 20.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g。

1.2 方法

1.2.1 美味牛肝菌菌丝体液体培养

1) 菌种活化: 配制 CPDA 培养基, 分装试管, 121.3 ℃ 30 min 灭菌, 放置斜面, 接种美味牛肝菌母种, 在 28 ℃ 培养, 待菌丝满管后备用。

2) 液体培养: 配制液体培养基, 100 mL 三角瓶装液量 60 mL, 121.3 ℃ 30 min 灭菌, 接活化菌种。在初始 pH 值 4.6~5.8, 振荡速度 180 r/min, 培养温度 26 ℃ 条件下, 进行液体发酵培养。

3) 菌丝生物量的测定: 发酵后的菌丝体经离心过滤并用纯净水冲洗 3 次, 再用滤纸吸至不滴水, 用天平精确称重。

4) 成分测定的材料处理: 菌丝冲洗干净→烘干 (80 ℃)→粉碎→过 40 目筛→备用。

1.2.2 成分测定

- 1) 灰分测定: 采用重量法^[6]。
- 2) 粗蛋白含量测定: 采用微量凯氏定氮法^[6]。
- 3) 粗脂肪含量测定: 采用索氏提取法^[6]。
- 4) 粗纤维含量测定: 采用重量法^[7]。
- 5) 多糖含量测定: 采用苯酚-硫酸法^[8]。
- 6) 氨基酸含量测定: 采用 FDBN 柱前衍生高效液相色谱法 (HPLC-1100 型)。层析柱: Zorbax C18; 流动相: 磷酸二氢钾和乙腈水溶液 [V(水): V(乙腈)=45: 55]。

2 结 果

2.1 发酵培养基的筛选

2.1.1 碳源对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响

以酵母粉 5.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50 mg, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g 为单因子基础培养基, 分别以 20.0 g 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、果糖、麦芽糖并附加玉米粉 20.0 g 为碳源, 以基础培养基为对照, 接活化菌种 1.0 cm², 振荡培养, 测定不同碳源对营养菌丝生长的影响 (见表 1)。

表 1 不同碳源对营养菌丝生长的影响
Tab.1 Effect of different carbon sources on the growth of nutrient mycelia

碳 源	菌丝生物量/(g/L)
葡萄糖	120
蔗糖	96
乳糖	80
甘露醇	75
麦芽糖	112
果糖	107

表 1 表明, 以葡萄糖、麦芽糖、果糖等作为碳源时, 液体发酵菌丝生物量皆高。在这些碳源中, 以葡萄糖为碳源的培养基中菌丝体生物量最高, 为 120 g/L, 菌丝球体积小, 均匀, 密度高。以乳糖、甘露醇等为碳源的培养基中美味牛肝菌菌丝生长较差, 说明这些碳源为非常用糖物质。确定葡萄糖为美味牛肝菌发酵最适碳源。

2.1.2 氮源对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响

以葡萄糖 20.0 g, 玉米粉 20.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g 为单因子基础培养基, 分别以 5.0 g 的 NH_4NO_3 、 KNO_3 、米糠、豆饼粉、酵母浸出膏、牛肉膏、蛋白胨和水解乳蛋白为氮源, 以基础培养基为对照, 接活化菌种 1.0 cm², 振荡培养, 测定不同氮源对营养菌丝生长的影响, 结果见表 2。

表 2 不同氮源对营养菌丝生长的影响
Tab.2 Effect of different nitrogen sources on the growth of nutrient mycelia

氮 源	菌丝生物量/(g/L)
酵母浸出膏	140
牛肉膏	132
蛋白胨	75
水解乳蛋白	86
豆饼粉	32
米糠	43
NH_4NO_3	28
KNO_3	36

表2表明,在附加不同氮源培养基中,有机氮源比无机氮源更有利于菌丝生长,以酵母浸出膏为氮源的培养基中菌丝生物量最高,为140 g/L,菌丝球体积大小适中,均匀。在以米糠、豆饼粉, NH_4NO_3 、 KNO_3 为氮源的培养基中菌丝生长较差,虽然米糠、豆饼粉为有机氮源,但含氮量要低于其它有机氮源,说明培养基中含氮量较低的有机氮源不是美味牛肝菌菌丝生长的最适氮源。因此,确定酵母浸出膏为美味牛肝菌发酵最适氮源。

2.1.3 培养基成分综合实验 以葡萄糖和玉米粉为碳源,酵母浸出膏为氮源,添加 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。根据极差分析结果,影响菌丝体得率的大小关系分别为 $A > C > D > B$ 。各因子的最佳水平组合是 $A3B3C2D1$, 因此确定发酵培养基配方为:葡萄糖 30.0 g, 玉米粉 20.0 g, 酵母浸出膏 7.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, VB_1 0.01 mg, CaCO_3 2.0 g。

2.2 发酵条件实验

2.2.1 pH 值对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响

将培养液分别调 pH 值为 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 接斜面菌种 1.0 cm^2 , 在 26 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min, 100 mL 三角瓶装液量 60 mL, 振荡培养 6 d. 测定 pH 值对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响(见图1)。

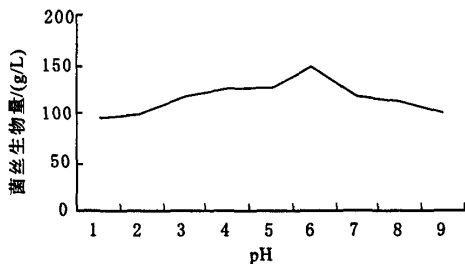


图1 pH 值对美味牛肝菌生长的影响

Fig. 1 pH effect on the growth of *Boletus edulis* mycelia

图1表明,在 pH 值 < 4.6 , $\text{pH} > 5.8$ 时,菌丝生物量呈下降趋势。在 pH 值为 5.2~5.8 之间,菌丝体生长速度维持在较高水平,菌丝生物量较高。因此,美味牛肝菌液体发酵最适 pH 值范围为 pH 值 5.2~5.8。

2.2.2 振荡速度对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响 选择 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210 r/min 不同振荡速度,接斜面菌种 1.0 cm^2 , 在 26 $^{\circ}\text{C}$, pH 值 5.4, 100 mL 三角瓶装液量 60 mL, 振荡培养 6 d. 测定振荡速度对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响(见图2)。图2表明,不同振荡速度对美味牛肝菌丝生

物量有明显的影响。随着转速的升高,菌丝生物量升高,在 180 r/min 达到较高,继续增加振荡速度,菌丝生物量增加不明显。因此,美味牛肝菌液体发酵最适振荡速度为 180 r/min。

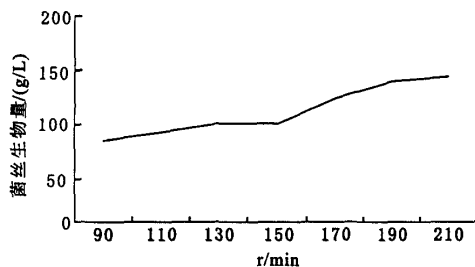


图2 振荡速度对美味牛肝菌生长的影响

Fig. 2 The stirred speed effect on the growth of *Boletus edulis* mycelia

2.2.3 培养温度对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响 选择 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 $^{\circ}\text{C}$ 发酵温度,接斜面菌种 1.0 cm^2 , 在 pH 值 5.4, 180 r/min, 100 mL 三角瓶装液量 60 mL, 振荡培养 6 d. 测定培养温度对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响(见图3)。

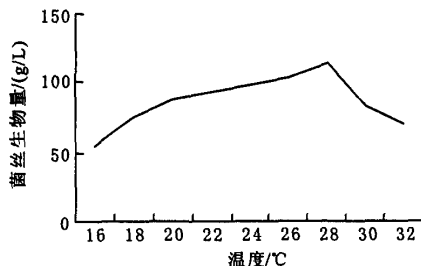


图3 培养温度对美味牛肝菌生长的影响

Fig. 3 The temperature of fermentation effect on the growth of *Boletus edulis* mycelia

图3表明,不同温度对菌丝生物量有明显的影响。菌丝生物量在一定范围内随温度的升高而增高,28 $^{\circ}\text{C}$ 时菌丝生物量达最高,为 102.8 g/L,超过 28 $^{\circ}\text{C}$ 菌丝生物量则下降。因此,美味牛肝菌液体发酵最适培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.4 装液量对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响

100 mL 三角瓶中分别选择 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 mL 装液量,接斜面菌种 1.0 cm^2 , 在 pH 值 5.4, 180 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,振荡培养 6 d. 测定装液量对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响(见图4)。

图4表明,随着装液量的增加菌丝生物量随之增加,装液量在 60 mL 以上时,菌丝发酵产生难闻的气体;低于 60 mL 时,菌丝生物量较低。因此,美味牛肝菌液体发酵最适装液量为 60 mL。

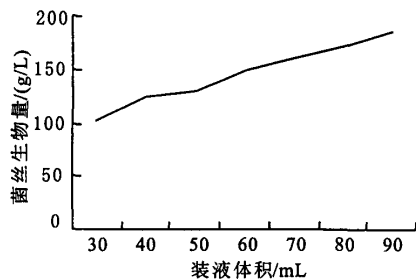


图 4 装液量对美味牛肝菌营养菌丝生长的影响
Fig. 4 The medium loading effect on the growth of *Boletus edulis* mycelia

2.3 美味牛肝菌菌丝体主要营养成分测定分析
2.3.1 美味牛肝菌菌丝体主要营养成分 表 3 结果表明,菌丝体含有丰富的蛋白质、多糖和适量的脂肪、纤维和灰分。菌丝体中的粗蛋白和粗脂肪质量高于野生子实体^[9]。特别是粗多糖质量显著高于担子菌纲 8 种真菌中的粗多糖^[10]。

表 3 美味牛肝菌菌丝中主要营养成分及质量
Tab. 3 The mineral elements and contents of nutrient mycelia of *Boletus edulis*

营养成分	质量分数/%
灰分	5.26
粗蛋白	26.46
粗脂肪	6.48
粗纤维	8.23
粗多糖	10.62
碳水化合物	42.95

2.3.2 美味牛肝菌菌丝体中氨基酸种类及质量 表 4 结果表明,美味牛肝菌菌丝体因方法所限未检出色氨酸,在所测定的 17 种氨基酸中,必需氨基酸和非必需氨基酸种类齐全。100 g 美味牛肝菌丝体中必需氨基酸质量是 5 732.25 mg,必需氨基酸占氨基酸总量的 37.08%。美味牛肝菌丝体中必需氨基酸的质量普遍高于子实体中必需氨基酸的质量^[11]。

3 结 论

美味牛肝菌对供试碳源都有不同程度的利用,说明该菌对单糖、双糖、多糖和糖醇都能利用,但以葡萄糖的利用率较高。美味牛肝菌的菌丝体对铵态

表 4 100 g 美味牛肝菌丝体氨基酸种类及质量
Tab. 4 The types and contents of amino acid in mycelia of *Boletus edulis*

必需氨基酸	氨基酸质量/mg	非必需氨基酸	氨基酸质量/mg
Thr	1021.84	Glu	2731.01
Val	1141.77	Ser	753.10
Leu	385.34	Cys	238.79
Ile	831.07	Gly	713.40
Met	149.45	His	1124.32
Lys	1124.31	Ala	1181.04
Phe	1078.47	Arg	499.74
		Pro	617.69
		Asp	1554.66
小计	5732.25	Tyr	312.17
合 计			15458.17

氮很难利用,而对有机氮的利用率高,其中以使用酵母浸出膏和牛肉膏等时其菌丝生长速度较快。尤其是酵母浸出膏,可促进菌丝大量生长,且菌丝球均匀,密度高。培养基中加入 CaCO₃对培养基 pH 值起调节作用,Ca²⁺对菌丝生物量的转化有促进作用。无机盐 KH₂PO₄和 MgSO₄·7H₂O,质量比以 2:1 的比例添加时其菌丝生物量较高。

正交试验的最适培养基是:葡萄糖 30.0 g,玉米粉 20.0 g,酵母浸出膏 7.0 g,KH₂PO₄ 2.0 g,MgSO₄·7H₂O 1.0 g,VB₁ 0.01 mg,CaCO₃ 2.0 g。美味牛肝菌深层培养的最适发酵条件的初始 pH 值 5.2~5.8,振荡速度 180 r/min,培养温度 28 ℃,100 mL 三角瓶装液量 60 mL。

美味牛肝菌深层培养的菌丝体主要营养成分质量普遍高于野生子实体^[11],其中粗蛋白、粗脂肪和粗多糖质量明显高于子实体。从对食品高蛋白含量要求的角度分析,美味牛肝菌菌丝体的营养价值优于子实体。按干重计,菌丝体含有 17 种氨基酸,100 g 美味牛肝菌丝体中氨基酸总量是 15 458.17 mg,必需氨基酸占氨基酸总量的 37.08%,以缬氨酸质量最高。美味牛肝菌深层培养的菌丝体富含氨基酸这一特性证实,可通过深层发酵解决美味牛肝菌野生资源不足的矛盾来满足人们对蛋白食品和营养保健品日益增长的需求。

(下转第 102 页)

2.3 渗透稳定剂的影响

分别用 0.6 mol/L 的蔗糖、甘露醇、山梨醇和 NaCl 来配制高渗缓冲液和高渗再生培养基,以研究不同的渗透稳定剂对原生质体形成和再生的影响.原始菌液为 7.0×10^8 CFU,缓冲液 pH 值为 5.8,工具酶为 Celluclast 1.5 L,结果见表 3.

表 3 渗透稳定剂的影响

Tab.3 Effect of osmotic stabilizers

稳定剂 种类	原生质体 产生率/%	原生质体 再生率/%
蔗糖	57.1	12.5
甘露醇	55.7	7.7
山梨醇	42.8	6.7
NaCl	38.5	3.4

从表 3 可见,本实验结果与其他研究者报道的结果“在真菌原生质体形成和再生中有机稳定剂的效果好于无机稳定剂,有机稳定剂中蔗糖的效果最好,甘露醇的效果次之”是一致的.

2.4 pH 值的影响

为研究不同的 pH 值对酵母菌原生质体形成和再生的影响,作者用 0.6 mol/L 的蔗糖配制高渗缓冲液和高渗再生培养基,研究缓冲液 pH 值分别为 5.8,6.8,7.2 时酵母菌原生质体的产生率和再生率,原始菌液为 5.6×10^8 CFU.工具酶用 Celluclast 1.5 L,酶处理时间为 1 h,结果见表 4.

表 4 pH 值的影响

Tab.4 Effect of pH

pH 值	原生质体 产生率/%	原生质体 再生率/%
5.8	57	12.5
6.8	55	10
7.8	25	4

以 Celluclast 1.5 L 为工具酶时,在酸性条件下,原生质体的产生率和形成率均比较高,其中 pH 5.8 和 pH 6.8 原生质体产生率几乎无差异,但是原生质体的再生率还是有一定差异的,pH 值为 5.8 时的再生率明显高于 pH 值为 6.8 时的再生率.在 pH 值超过 7.0 后,无论是原生质体的产生率还是原生质体的再生率均大幅度降低,这种情况与酵母菌喜好在偏酸性的环境中生长是一致的.

3 结 论

纤维素酶 Celluclast 1.5 L 可以作为酵母菌原生质体的形成和再生中使用的工具酶,最佳条件是:以 pH 5.8 的磷酸缓冲液配制的 0.6 mol/L 蔗糖液为高渗稳定剂,质量分数 8% 的酶液处理 1 h,菌龄 6 h,酶处理后在加 0.6 mol/L 蔗糖的完全培养基上再生 24 h.在这样的条件下,原生质体产生率与再生率与用蜗牛酶做工具酶类似.

参考文献:

[1] Lin L F, Levin R E. Relative effectiveness of yeast cell wall digesting enzymes on *Yarrowia lipolytica* [J]. *Microbios*, 1990, 63 (255): 109—115.
[2] Byong Kak Kim. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *lentinus lepideus* [J]. *Life Sciences*, 2000, 66(14): 1359—1367.
[3] 单志萍,姜文候,孟好. 丝状真菌三孢布拉霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. 江苏食品与发酵, 1999, (3): 11—14.
[4] 王庚,杜连祥. 新月弯孢霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. 微生物通报, 1999, 26(1): 21—23.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 99 页)

参考文献:

[1] 王立泽,叶家栋,游庄信,等. 食用菌栽培[M]. 合肥:安徽科技出版社,1998.
[2] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 153—155.
[3] 唐薇,鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及抗 S-180 肿瘤的效应[J]. 西南师大学报(自然科学版), 1999, (4): 478.
[4] 赵国华,陈宗道,李志孝,等. 活性多糖研究新进展[J]. 食品与发酵, 2001, 27(7): 45—48.
[5] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998. 212—213.
[6] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社,1978. 9—10.
[7] 贾身茂,张金霞. 食用菌标准汇编(一)[M]. 北京:中国标准出版社,1997. 107—109.
[8] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物营养测定法[M]. 北京:人民卫生出版社,1991.
[9] 何培新. 名特新食用菌 30 种[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
[10] 扬革. 担子菌纲 8 种真菌的营养成分[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2): 174.
[11] 应建浙,卯晓岚,马启明. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京:科学出版社,1987.

(责任编辑:杨 勇)