

牛排菇 SB65 菌株液体培养基和 培养条件的优化

何培新¹, 秦慧迪¹, 安正方¹, 李政伟²

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 洛阳奥吉特食用菌开发有限公司, 河南 洛阳 471022)

摘要:通过单因素实验和均匀设计对牛排菇 SB65 菌株的液体菌种培养基和培养条件进行了优化。优化后的培养基配方为(w/v):蔗糖 5.5%, 酵母浸粉 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 1%, NaCl 0.714 7%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%; 液体培养条件为:初始 pH = 7.2, 培养温度 28 °C, 培养时间 12 d, 摇床转速 160 r/min, 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶, 接种量 8% (v/v)。在优化的培养基和培养条件下进行培养, 菌丝体的生物量为 4.579 g/L。

关键词:牛排菇; 液体菌种培养基; 菌丝体生物量; 培养条件

中图分类号:S646 文献标志码:A DOI:10.3969/j.issn.2095-476X.2013.01.003

Optimization of fermentation liquid medium and culture conditions of portabella mushroom (*Agaricus brunnescens*) SB65 strain

HE Pei-xin¹, QIN Hui-di¹, AN Zheng-fang¹, LI Zheng-wei²

(1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Luoyang Aojite Mushroom Development Co., Ltd., Luoyang 471022, China)

Abstract: The liquid medium and culture conditions of portabella mushroom (*Agaricus brunnescens*) SB65 strain were optimized by single-factor experiments and uniform design. The optimized medium were as follows (w/v): sucrose 5.5%, yeast extract 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 1%, NaCl 0.714 7%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1% and the optimized culture conditions were as follows: initial pH = 7.2, culture temperature 28 °C, culture period 12 d, rotation rate 160 r/min, medium volume 50 mL per 250 mL flask and seed volume 8% (v/v). Under the optimized medium and culture conditions, the biomass of tested strain was 4.579 g/L.

Key words: portabella mushroom (*Agaricus brunnescens*); liquid spawn medium; biomass; culture condition

0 引言

褐蘑菇 (*Agaricus brunnescens* Peck) 是双孢蘑菇 (*A. bisporus*) 的近缘种, 是伞菌属另一个广泛人工栽

培的大型真菌^[1-2]。褐蘑菇盖大柄粗, 菌肉肥厚, 细嫩鲜美, 浓郁适口, 耐贮性好, 产品深加工前景广阔。褐蘑菇含有多糖、三萜类化合物、活性多肽等生理活性物质, 具有增强免疫力、抗癌、降血脂和降血

收稿日期:2012-11-15

基金项目:河南省科技攻关项目(122102110134)

作者简介:何培新(1970—),男,河南省商丘市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为食品生物技术。

糖等多种功效,具有较高的食用和药用价值^[3-7].牛排菇是褐蘑菇的开伞成熟菇体形式,在欧美、日本和我国香港等国家和地区受到普遍欢迎,出口市场广阔,栽培前景看好.我国的褐蘑菇人工栽培主要采用二次发酵料床架式栽培模式,层播或穴播麦粒种等固体菌种,液体菌种的应用较少.液体菌种具有生产周期短、萌发点多、发菌一致、发菌速度快等优点,在食用菌制种与栽培中应用潜力较大.然而,在褐蘑菇人工栽培中还很少使用液体菌种.本文拟对牛排菇 SB65 菌株液体培养的培养基和培养条件进行优化,以期对液体菌种的制备和应用提供理论和技术支持,推动褐蘑菇人工栽培的发展.

1 实验

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株 牛排菇 SB 菌株由洛阳奥吉特食用菌开发有限公司提供.

1.1.2 培养基 PDA 培养基(马铃薯 20%,葡萄糖 2%,蛋白胨 0.2%,琼脂 2%)用于菌种培养和保藏;种子培养基(蔗糖 3.5%,酵母浸粉 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%)用于液体菌种种子的培养和 pH 调整、培养温度和溶解氧(装液量)的优化;碳源优化基础培养基(碳源 3.5%,酵母浸粉 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%),氮源优化基础培养基(蔗糖 3.5%,氮源 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%)和无机盐优化基础培养基(蔗糖 3.5%,酵母浸粉 0.3%,无机盐 0.15%)用于液体培养基的优化.除溶解氧优化特别注明外,其他测定的培养基装样量 w/v 均为 50 mL/250 mL 三角瓶.

1.1.3 主要仪器及试剂 1) 主要仪器:FS—280A 手提式压力蒸汽灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司产;LX—C50L 不锈钢立式压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司产;SN—CJ IFD 超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产;SPX—160 B—2 恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司产;JYT—5 QYC200 恒温振荡摇床,上海福玛实验设备有限公司产;HZQ—F160 全温振荡培养箱,太仓市实验设备厂产;85—2 恒温磁力搅拌器,江苏省金坛市中大仪器厂产;AL204/01 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)公司产;PH—2C 实验室 pH 计,上海理达仪器厂产;RE—52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产;SHB—3 循环水多用真空泵,

郑州杜甫仪器厂产;101A—1 型电热恒温鼓风干燥箱,上海市实验仪器总厂产.

2) 试剂:蔗糖,天津市瑞金特化学品有限公司产;葡萄糖,天津市恒星化学试剂制造有限公司产;麦芽糖,中国惠兴生化试剂有限公司产;乳糖,北京奥博星生物技术责任有限公司产;木糖,北京市化学试剂厂产;可溶性淀粉,天津市恒星化学试剂制造有限公司产;牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉,北京双旋微生物培养基制品厂产; KNO_3 ,国药集团化学试剂有限公司产; NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,广东汕头市西陇化工厂产;NaCl,天津市化学试剂一厂产; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,广东光华化学厂有限公司产; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,天津市化学试剂三厂产; $MnCl_2$,天津市瑞金特化学品有限公司产.以上试剂均为分析纯(AR).马铃薯为市售.

1.2 实验方法

1.2.1 液体培养种子的制备 打取活化培养的菌种块 2 cm^2 ,接种种子培养基,26 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 6 d.加入灭菌的磁珠和适量玻璃珠,使用磁力搅拌器搅拌 2 h,将培养物打碎,作为液体培养的种子.种子的接种量为 8%.

1.2.2 检测指标 抽滤液体培养物获得湿菌丝体;湿菌丝体 70 $^{\circ}C$ 恒温干燥 24 h,得到干燥菌丝体;称重干燥菌丝体,为菌丝生物量.

1.2.3 适宜培养时间的确定 采用发酵培养基,26 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 3 d,5 d,7 d,10 d,12 d,14 d,18 d,测定菌丝生物量,确定菌丝体培养适宜时间.

1.2.4 单因素实验 采用相应的基础培养基,26 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 12 d,测定蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、木糖和可溶性淀粉等碳源物质,牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉、 KNO_3 和 NH_4NO_3 等氮源物质, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 和 $MnCl_2$ 等无机盐对供试菌株菌丝体生长的影响.采用发酵培养基,26 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 12 d,测定 pH 值 6.0,6.4,6.8,7.2,7.6 和 8.0 对菌丝体生长的影响.发酵培养基接种后,在 20 $^{\circ}C$,25 $^{\circ}C$,28 $^{\circ}C$ 和 30 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 12 d,测定菌丝生物量,确定培养温度对菌丝体生长的影响.发酵培养基装液量分别为 30 mL/250 mL,50 mL/250 mL,70 mL/250 mL,100 mL/250 mL 和 120 mL/250 mL,26 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养 12 d,确定溶解氧对菌丝体生长的影响.所有处理设 3 个对照,实验

数据分析采用统计学软件 SPSS 进行。

1.2.5 液体培养基的均匀设计法优化 在单因素实验的基础上,采用均匀设计法进一步优化液体培养基。共设立 6 个因素,每个因素均为 10 个水平,采用均匀设计表 $U_{10}(10^6)$ [8] 优化。其他液体培养条件为:温度 28 °C,旋转式摇床转速 160 r/min,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,培养时间 12 d。

2 结果与讨论

2.1 菌丝体适宜培养时间

供试菌株的液体培养菌丝生长曲线见图 1。从图 1 可以看出,供试菌株液体培养 12 d 菌丝生物量最大,之后随着培养时间的延长,菌丝干重没有明显增加,因而该菌株的适宜培养时间为 12 d。

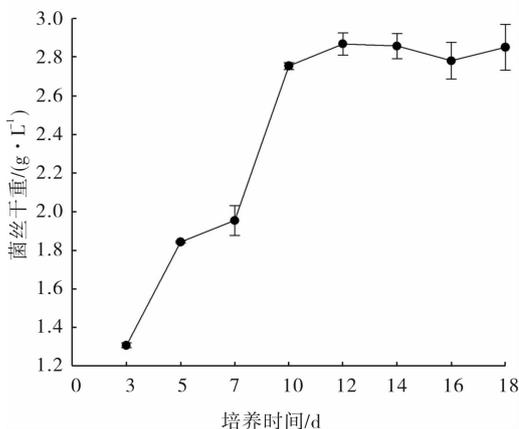


图 1 供试菌株液体培养的菌丝生长曲线

2.2 单因素实验

2.2.1 碳源和氮源对菌丝体生长的影响 不同碳源和氮源物质对供试菌株菌丝体生长的影响见表 1。从表 1 可以看出,测试的不同碳源物质中,蔗糖得到的菌丝生物量最高,其次为葡萄糖和可溶性淀粉,乳糖最差,故采用蔗糖为碳源进行后面的研究;在测试的不同氮源物质中,酵母浸粉得到的菌丝生物量最高,牛肉膏次之,硝酸铵最低,所以采用酵母浸粉进行后面的研究。

2.2.2 无机盐对菌丝体生长的影响 不同无机盐对供试菌株菌丝体生长的影响见图 2。从图 2 可以看出,与对对照相比,培养基中添加 NaCl, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 均促进了供试菌株的菌丝生长。可能是由于使用浓度过大或抑制供试菌株的生理活动,培养基中添加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 MnCl_2 降低了供试菌株的菌丝生物量。

表 1 碳源和氮源物质对供试菌株菌丝体生长的影响

碳源	菌丝干重	氮源	菌丝干重
乳糖	1.80 ± 0.007 2	胰蛋白胨	2.31 ± 0.000 2
蔗糖	2.64 ± 0.051 2	酵母浸粉	2.93 ± 0.001 8
果糖	2.19 ± 0.005 0	硝酸铵	1.31 ± 0.001 9
葡萄糖	2.34 ± 0.135 2	蛋白胨	2.45 ± 0.000 2
可溶性淀粉	2.21 ± 0.145 2	牛肉膏	2.75 ± 0.147 5
麦芽糖	2.12 ± 0.109 0	硝酸钾	1.12 ± 0.031 2

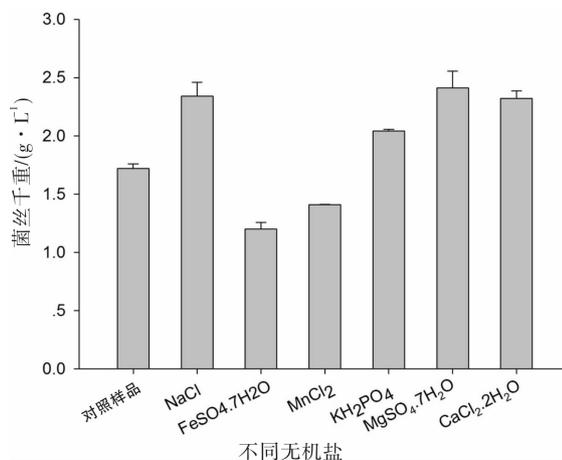


图 2 无机盐对供试菌株菌丝体生长的影响

2.2.3 菌丝体生长的适宜温度 不同测试温度对供试菌株菌丝体生长的影响见图 3。从图 3 可以看到,供试菌株在 28 °C 培养收获的菌丝生物量最高,因而其菌丝体生长的最适温度为 28 °C,高于 ZM-j2 菌株的 20 °C [9]。陈仁财等 [10] 报道的引自日本的 ZM-1 菌株的菌丝生长的最适温度也为 20 °C,李春艳等 [11] 报道的褐菇 L 菌株的菌丝生长最适温度为 20 ~ 22 °C,均低于本文研究的牛排菇 SB65 菌株,原因可能是由于该菌株经过几年的栽培应用,适应了经常出现的较高培养温度。

2.2.4 初始 pH 对菌丝体生长的影响 不同初始 pH 对供试菌株菌丝生长的影响见图 4。从图 4 可知,供试菌株在初始 pH 为 7.2 的培养基培养时,收获的菌丝生物量最高,因而该菌株培养的培养基最适初始 pH 为 7.2,与棕色蘑菇 ZM-j2 菌株一致 [9]。此外,褐菇 L 的菌丝生长最适 pH 为 6.0 ~ 7.0 [11], ZM-1 菌株为 6.0 [10],稍低于牛排菇 SB65 菌株,表明褐蘑菇不同栽培菌株间存在着细微的生理差异,同时也更加充分地说明了针对不同的主栽品种,细致研究其生物学特性的必要性。

2.2.5 装样量(溶解氧)对菌丝体生长的影响 装

样量反映了液体培养基的溶解氧的量. 溶解氧对供试菌株菌丝体生长的影响见图5. 从图5可以看出, 装液量为30 mL/250 mL时收获的菌丝生物量最大, 50 mL/250 mL次之, 但两者数据相差较小. 考虑到培养基的利用效率, 采用装液量50 mL/250 mL进行液体培养.

2.3 液体培养基的优化

均匀设计法优化液体培养基的实验结果见表2.

表中, X_1 — X_6 及 Y 分别为蔗糖、酵母浸粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 $NaCl$ 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 和菌丝生物量.

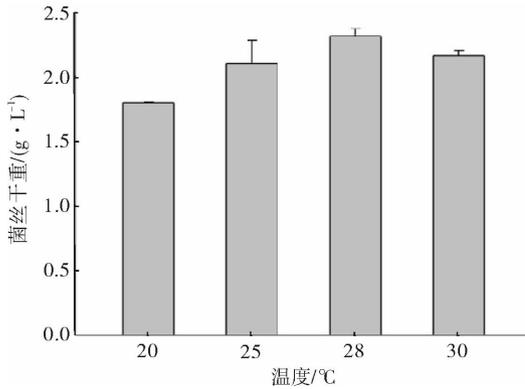


图3 温度对供试菌株菌丝体生长的影响

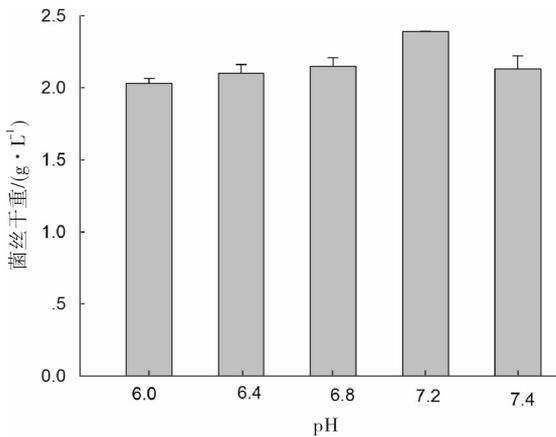


图4 初始 pH 对菌丝体生长的影响

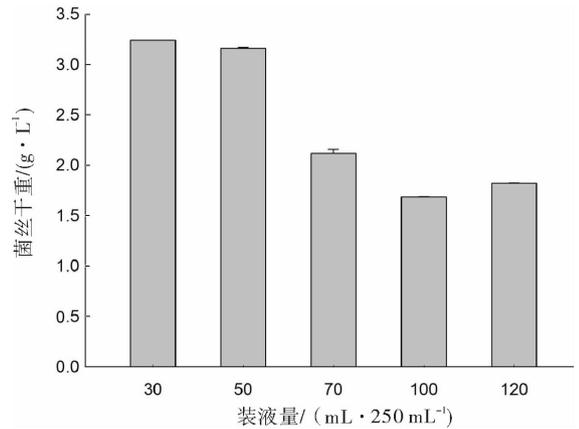


图5 装液量对菌丝体生长的影响

对表2的数据采用 DPS(date processing system version 7.05) 软件进行二次多项式逐步回归分析, 并对该模型进行显著性检验, 结果见表3. 得到的回归方程为

$$Y = 1.752 + 1.635X_5 + 0.055X_1^2 - 1.957X_5^2 - 0.543X_1 \cdot X_3 + 0.215X_1 \cdot X_5 + 0.527X_2 \cdot X_4 + 1.673X_3 \cdot X_6$$

相关系数 $R = 0.9999$, F 值 = 1961.7753, 显著水平 $P = 0.0005$, 剩余标准差 $S = 0.0119$. 这说明该方程能很好地拟合试验菌株液体培养过程.

从回归方程求得最佳参数为: 蔗糖 5.5%, 酵母浸粉 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 1%, $NaCl$ 0.7147%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%. 验证实验表明, 采用优化培养基在优化条件下培养, 菌丝体生物量为 4.579 g/L, 高于均匀设计中的 10 组结果, 表明该优化结果具有明显的指导意义; 但与回归模型的预测值 4.9044 还有一定的误差, 相对误差为 6.635%.

3 结论

通过单因素实验和均匀设计法获得了牛排菇

表2 $U_{10}(10^6)$ 均匀设计方案与实验结果

序号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	$X_4/\%$	$X_5/\%$	$X_6/\%$	$Y/(g \cdot L^{-1})$
1	1.0	0.2	0.15	0.5	0.7	1.0	2.37
2	1.5	0.4	0.30	1.0	0.3	1.0	2.76
3	2.0	0.6	0.45	0.4	1.0	0.9	2.39
4	2.5	0.8	0.05	0.9	0.6	0.9	3.08
5	3.0	1.0	0.20	0.3	0.2	0.8	2.73
6	3.5	0.1	0.35	0.8	0.9	0.8	2.85
7	4.0	0.3	0.50	0.2	0.5	0.7	2.92
8	4.5	0.5	0.10	0.7	0.1	0.7	3.17
9	5.0	0.7	0.25	0.1	0.8	0.6	3.66
10	5.5	0.9	0.40	0.6	0.4	0.6	3.74

表3 实验数据的二次多项式逐步回归法处理结果

因素	偏相关	T 检验	显著水平 P
X_5	0.995 7	15.250 4	0.000 6
X_1^2	0.998 9	29.919 8	0.000 1
X_5^2	-0.998 0	22.504 1	0.000 2
$X_1 \cdot X_3$	-0.997 5	19.904 3	0.000 3
$X_1 \cdot X_5$	0.997 8	21.474 5	0.000 2
$X_2 \cdot X_4$	0.998 4	24.981 1	0.000 1
$X_3 \cdot X_6$	0.995 3	14.559 4	0.000 7

SB65 菌株液体培养最佳培养基配方和适宜培养条件. 最佳培养基配方为:蔗糖 5.5%, 酵母浸粉 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 1%, NaCl 0.714 7%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%, 培养基的最初 pH 为 7.2, 培养温度 28 °C, 装液量 50 mL/250 mL, 摇床转速 160 r/min, 接种量 8%. 在该培养基和培养条件下, 液体振荡培养 12 d, 菌丝生物量为 4.579 g/L. 本研究对牛排菌液体菌种的开发利用奠定了理论和技术基础.

参考文献:

[1] Malloch D. *Agaricus brunnescens*: the cultivated mushroom

[J]. *Mycologia*, 1976, 68(4):910.

[2] Malloch D, Castle A, Hintz W. Further evidence for *Agaricus brunnescens* Peck as the preferred name for the cultivated *Agaricus* [J]. *Mycologia*, 1987, 79(6):839.

[3] 李娜. 褐蘑菇多糖提取及含量的测定[J]. 光谱实验室, 2009, 26(1):43.

[4] 刘莹. 褐蘑菇子实体活性多肽提取工艺[J]. 食用菌, 2009(4):10.

[5] 黄静, 沈芳, 闫晗, 等. 褐蘑菇总三萜化合物提取工艺的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2010(10):135.

[6] 刘莹, 李芳亮, 刘政, 等. 褐蘑菇碱提物降血糖作用研究[J]. 生物技术, 2009, 19(6):82.

[7] 刘莹. 褐蘑菇碱提物降血脂作用研究[J]. 食品工业科技, 2010(7):336.

[8] 章银良. 食品与生物实验设计与数据分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010.

[9] 杨永彬. 棕色蘑菇菌株(ZM-j2)生物学特性研究[J]. 食用菌, 2011(6):19.

[10] 陈仁财, 杨淑云, 兰家细. 棕色蘑菇一号菌丝生物学特性研究[J]. 福建农林科技, 2009(5):41.

[11] 李春艳, 贾志成, 赵慧斌. 褐蘑菇菌丝体主要生长因子研究[J]. 食用菌, 2008(2):13.

(上接第6页)

[35] 刘烜, 郑文杰, 赵卫东, 等. 转基因大豆 DNA 检测芯片的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2):132.

[36] 许嘉. 利用生物芯片技术检测转基因农作物[D]. 上海: 复旦大学, 2007.

[37] 范树国, 邱璐. 生物芯片在食品安全检测中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1):101.

[38] 路兴波, 武海斌, 王敏, 等. 转基因玉米转化体特异性寡核苷酸芯片检测方法的研制[J]. 作物学报, 2009, 35(8):1432.

[39] 刘国信. 我国研制成功监测肉类药残智能系统[J]. 肉

类工业, 2005(9):38.

[40] Zuo P, Ye B C. Small molecule microarrays for drug residue detection in foodstuffs[J]. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2006, 54(19):6978.

[41] Ilaria L, Caterina T, Isabella S, et al. An antibody-based microarray assay for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ [J]. *Mycotoxin Research*, 2009, 25(4):193.

[42] 黄吉光, 诸世楠, 彭杰, 等. 基于生物芯片技术的食品安全管理[J]. 经济与管理, 2012(5):77.