

# 大球盖菇菌丝液体发酵培养条件的研究

孙兴荣<sup>1</sup>, 韩勇武<sup>2</sup>, 卞景阳<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316; 2. 黑龙江省农业科学院 克山分院, 黑龙江 克山 161606)

**摘要:**为了探究大球盖菇菌丝液体发酵的最佳培养基配方及培养条件,研究了碳氮源不同添加量及不同培养条件对其菌丝生长的影响。结果表明:大球盖菇菌丝液体发酵的最佳培养基配方为可溶性淀粉 2%,葡萄糖 1%,米糠 3%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20%;最适培养条件为 pH 6.5,接种量 8%,摇床转速  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,培养周期为 7 d。

**关键词:**大球盖菇菌丝体;液体发酵;培养条件

**中图分类号:**S646 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)08-0114-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0114

大球盖菇(*Stropharia rugoso-annulata* Farlow)属于担子菌门,层菌纲,伞菌目,球盖菇科,球盖菇属,是联合国粮农组织(FAO)向发展中国家推荐栽培的食用菌之一<sup>[1]</sup>。其菌肉细嫩味美,口感好,且营养丰富、大球盖菇子实体粗蛋白含量达到 25.75%、碳水化合物 45.93%、粗脂肪 2.19%、氨基酸总量为 16.72%<sup>[2]</sup>,被称作“素中之荤”的全价营养品保健食品。此外,大球盖菇子实体中还富含真菌多糖,具有抗肿瘤、预防冠心病等疾病的药用价值<sup>[3]</sup>,深受人们的喜爱。

然而,以往栽培大球盖菇所需的菌种采取固体制种技术,其制种周期长,在其菌丝生长发育过程中易污染、上层菌龄老化快,使大球盖菇的大规模生产受到影响。而液体制种具有生产周期短、菌种活力强、萌发点多、污染率低等优点,是未来规模化发展大球盖菇产业的主要方向<sup>[4]</sup>。本试验在已有工作的基础上,对大球盖菇菌丝体发酵培养基进行进一步优化,旨在为大球盖菇菌丝体工业化生产液体菌种提供经济、适用、高效的培养基配方。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 大球盖菇菌株,由黑龙江省农业科学院大庆分院食用菌研究所提供。

1.1.2 培养基 PDA 培养基<sup>[5]</sup>:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 1.6 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。种子液培养基:葡萄糖 20 g、酵母膏 2 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、蒸馏水 1 000 mL。

液体发酵培养基:可溶性淀粉 25 g、蔗糖 20 g、米糠 40 g、酵母膏 2 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、pH 7,蒸馏水 1 000 mL。

1.1.3 主要仪器和设备 立式压力灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SW-CJ-2FD 双人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司);电热恒温培养箱(宁波江南仪器厂);PHS-3C 数字型 pH 计(上海阳光试验仪器有限公司);LXJ-68-02 型离心机(上海医分仪器制造有限公司);FA1104 电子天平(上海天平仪器厂);QHZ-98B 卧式恒温振荡培养箱(华美生化仪器厂);101-1A 型数显电热鼓风干燥箱(上海沪南科学仪器联营厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种的活化 将保藏的大球盖菇母种从冰箱中取出,室温下放置 1 h,在超净工作台中,采用两点接种法,挑取大球盖菇母种菌块  $1 \text{ cm}^2$ ,快速转入斜面 PDA 培养基中,于 26℃ 电热恒温培养箱中培养 10~15 d,选取菌丝洁白、浓密、健壮、无污染的斜面试管备用。

1.2.2 种子培养液的制备 按照种子液培养基配方制作培养基,分装在 250 mL 三角瓶中,每个三角瓶中放入 10 粒直径为 3 mm 的玻璃珠<sup>[6]</sup>,高压蒸汽灭菌。灭菌后,自然冷却至室温,放入超净工作台上并将所有与接种有关的器具在紫外灯下杀菌 30 min。在无菌条件下,将活化好的菌丝体接入装有种子液培养基的三角瓶中,在 26℃ 电热

收稿日期:2016-06-22

**第一作者简介:**孙兴荣(1984-),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,硕士,研究实习员,从事食用菌栽培与液体菌研究。E-mail: dqnkysxr@126.com。

**通讯作者:**卞景阳(1980-),男,黑龙江省青冈县人,博士,助理研究员,从事作物栽培研究。E-mail: bjiy19800926@163.com。

恒温培养箱中静置培养 3 d 后,置于恒温摇床中振荡培养,培养 7 d 后,得到种子培养液。

1.2.3 发酵培养液的制备 按照液体发酵培养基配方制作培养基,用量筒量取 90 mL 发酵液倒入 250 mL 三角瓶中,每个三角瓶中放入 10 粒直径为 3 mm 的玻璃珠,进行高压蒸汽灭菌。灭菌后,自然冷却至室温,放入超净工作台上并将所有与接种有关的器具在紫外线灯下杀菌 30 min。在无菌条件下,以 10% 的接种量将菌种接入到发酵培养基中,置于 26 ℃ 恒温摇床中振荡培养,130 r·min<sup>-1</sup> 培养 7 d。

1.2.4 碳氮源最佳配比正交试验 以可溶性淀粉、葡萄糖作为碳源、米糠作为氮源,无机盐选择 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,按照 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交方法设计 4 因素 3 水平试验,以菌丝生物量为测定指标,筛选最佳培养基组合。试验因素与水平见表 1,其中米糠煮沸 30 min,3 层纱布过滤。

表 1 大球盖菇液体培养基正交试验因素水平  
Table 1 Factors and levels in four-factor and three-level orthogonal array design for optimizing the formula of medium

水平 Levels	A 可溶性淀粉/% Soluble starch	B 葡萄糖/% Glucose	C 米糠/% Rice bran	D KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /%
1	1	1	2	0.1
2	2	2	3	0.2
3	3	3	4	0.3

1.2.5 培养条件试验 将 A、B、C、D 4 因素分别进行筛选试验。

(1)pH 筛选试验:按照 1.2.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方制作培养基,每瓶装液量 90 mL,分别调至 pH5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,灭菌后以 10% 的接种量将菌种接入,然后置于 26 ℃ 恒温摇床中 130 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养,培养 7 d,考察不同 pH 对大球盖菇菌丝体生物量的影响。

(2)接种量筛选试验:按照 1.2.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方制作培养基,每瓶装液量 90 mL,调至 pH6.5,灭菌后,按体积比,向液体发酵培养基中加入 4%、6%、8%、10%、12% 的种子培养液,然后置于 26 ℃ 恒温摇床中 130 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养,培养 7 d,考察不同接种量对大球盖菇菌丝体生物量的影响。

(3)摇床转速筛选试验:按照 1.2.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方制作培养基,每瓶装

液量 90 mL,调至 pH6.5,灭菌后以 10% 的接种量将菌种接入,调节摇床转速分别为 100、115、130、145、160 r·min<sup>-1</sup>,26 ℃ 下培养 7 d,考察不同接种量对大球盖菇菌丝体生物量的影响。

(4)培养时间筛选试验:在确定了最适 pH、接种量、摇床转速后,通过 3、4、5、6、7、8 和 9 d 的发酵培养,进行抽样并测定菌丝生物量,考察不同发酵时间对大球盖菇菌丝体生物量的影响。

1.2.6 菌丝生物量的测定 发酵结束后,取 50 mL 培养液,离心得到沉淀物即菌丝体,将菌丝体用蒸馏水充分洗涤后,置于 80 ℃ 干燥箱中烘干至恒重,电子天平准确称重<sup>[7]</sup>。计算公式为:

生物量(g·L<sup>-1</sup>) = 菌丝体干重(g) × 1 000 / 50 mL。

## 2 结果分析

### 2.1 最佳碳氮源配比试验结果

通过对由可溶性淀粉添加量、葡萄糖添加量、

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计与结果

Table 2 Arrangement and experimental results of four-factor and three-level orthogonal array design

试验号	A 可溶性 淀粉/% Soluble starch	B 葡萄 糖/% Glucose	C 米 糠/% Rice bran	D KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /%	菌丝体 生物量 /(g·L <sup>-1</sup> ) Mycelium biomass
1	1(1)	1(1)	1(2)	1(0.10)	8.55
2	1	2(2)	2(3)	2(0.15)	9.22
3	1	3(3)	3(4)	3(0.20)	8.94
4	2(2)	1	2	3	12.94
5	2	2	3	1	11.55
6	2	3	1	2	11.03
7	3(3)	1(1)	3	2	10.06
8	3	2	1	3	9.87
9	3	3	2	1	10.35
T <sub>1</sub>	26.71	31.55	29.45	30.45	
T <sub>2</sub>	35.52	30.64	32.51	30.31	
T <sub>3</sub>	30.28	30.32	30.55	31.75	
k <sub>1</sub>	8.90	10.51	9.82	10.15	
k <sub>2</sub>	11.84	10.21	10.83	10.10	
k <sub>3</sub>	10.09	10.11	10.18	10.58	
R	2.94	0.40	1.01	0.48	

米糠及  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量 4 个因素自由组成的 9 组试验处理进行分析,以菌丝生物量为评价指标。比较表 2 中的极差 R 值可以看出,影响菌丝生物量的主要因素顺序为可溶性淀粉(A) > 米糠(C) >  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (D) > 葡萄糖(B),即可溶性淀粉添加量对菌丝生物量的影响最大,米糠及  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量次之,葡萄糖添加量对菌丝生物量的影响最小。确定大球盖菇菌丝体液体发酵培养基的最佳配方为  $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_2\text{D}_3$ ,即可溶性淀粉添加量 2%,葡萄糖添加量 1%,米糠添加量 3%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量为 0.20%。

## 2.2 最佳 pH 筛选结果

按照正交试验筛选出来的最佳培养基组合,即可溶性淀粉 2%,葡萄糖 1%,米糠 3%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20% 配制菌丝体发酵培养基,调节起始 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 进行试验。由图 1 可知,大球盖菇菌丝体在 pH 为 5.5~7.5 时菌丝均能生长,pH 6.5 时菌丝体生物量最高,因此,其最适生长 pH 为 6.5。

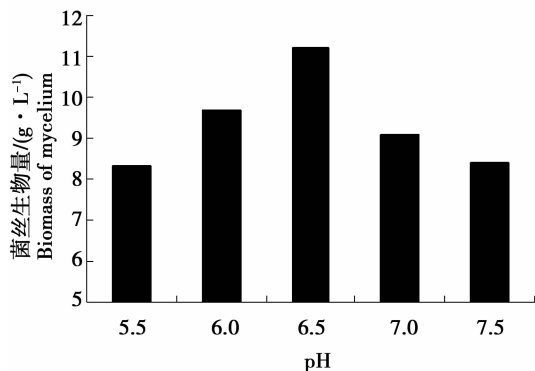


图 1 不同 pH 对菌丝生物量的影响

Fig. 1 Effect of pH on yield of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium

## 2.3 最佳接种量筛选结果

由图 2 可以看出,随着接种量的增加,大球盖菇菌丝体生物量也相应增加,当接种量为 8% 时菌丝生物量达到最大。当接种量大于 8% 时,菌丝生物量开始出现逐渐减少的趋势,可能是接种量过大使得菌体的生长过快,过稠,造成溶氧量不足,而影响发酵进程,菌丝生物量有所下降。因此,最适接种量选择 8%。

## 2.4 最佳摇床转速筛选结果

由图 3 可以看出,随着摇床转速的增大,菌丝体生物量也随之增加,转速在  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时,大球盖菇菌丝体生物量最大,达到  $10.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但当

转速进一步加大时,菌丝生物量反而下降,原因可能是剪切力过大,对菌丝的机械刺激也加大,对菌球造成破坏。因此,选择转速为  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

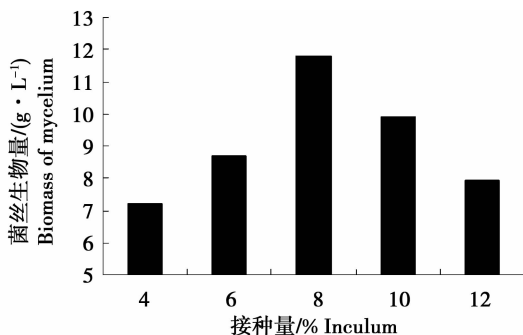


图 2 不同接种量对菌丝生物量的影响

Fig. 2 Effect of inoculum on yield of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium

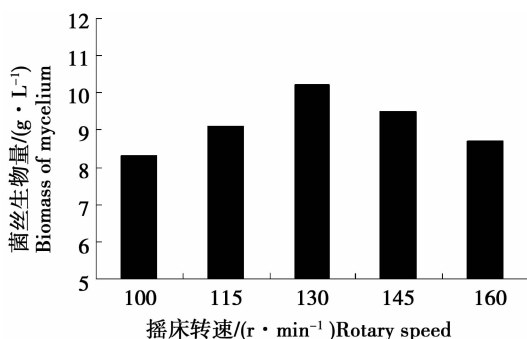


图 3 摇床转速对菌丝生物量的影响

Fig. 3 Effect of rotary speed on yield of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium

## 2.5 最佳培养时间筛选结果

由图 4 可以看出,大球盖菇菌丝体在发酵过程中,随着培养时间的延长,菌丝生物量也随之增加。当培养到第 7 天时,大球盖菇菌丝体生物量达到最大值,为  $12.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,随后菌丝生物量稍有减少,原因可能是菌丝随着培养时间的延长菌丝体开始趋于老化,继而出现自溶现象。所以,要想

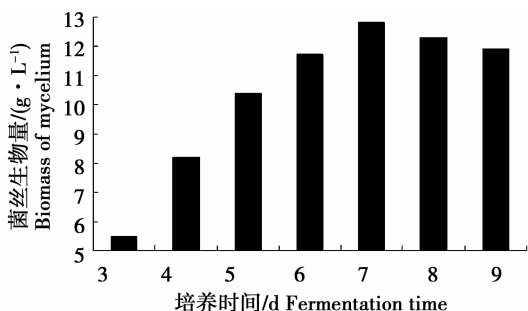


图 4 培养时间对菌丝生物量的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on yield of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium

获得最大的菌丝生物量,培养时间不宜超过 7 d。

### 3 结论与讨论

本研究首次尝试将米糠作为氮源应用到大球盖菇液体菌种生产当中,其优势在于米糠的蛋白质含量高(15%),营养丰富,且价格低廉,而且米糠的  $\text{Ca}^{2+}$  含量极低(0.07%)<sup>[8]</sup>;据闫培生<sup>[9]</sup>等报道, $\text{Ca}^{2+}$  对大球盖菇菌丝体的生长具有显著的抑制作用,因此,米糠的加入对大球盖菇菌丝体的生长是有利的,可以作为生产大球盖菇液体菌种的优良氮源。

大球盖菇菌株能利用多种碳氮源,本研究选用的碳源是可溶性淀粉及葡萄糖,其中可溶性淀粉不仅可以作为碳营养被吸收,还可以作为增稠剂来提高培养液黏度,到后期可溶性淀粉被消耗而使培养液变稀,将这样的液态菌种接种到固态培养基上透气性好,利于菌种的萌发和吃料<sup>[10]</sup>。

本研究采用正交方法  $L_9(3^4)$  设计 4 因素 3 水平试验,以菌丝生物量为测定指标,得到了大球盖菇菌丝体液体发酵菌种生产的最佳培养基配方为:可溶性淀粉添加量 2%,葡萄糖添加量 1%,米糠添加量 3%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量为 0.20%;最适培养条件: pH6.5,接种量 8%,摇床转速  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,培养周期为 7 d。在此条件下进行大球盖菇液体菌种生产可获得菌丝生物量高的液体

菌种。本试验得到的大球盖菇菌丝体液体发酵培养参数为今后开展发酵罐试验,探索大球盖菇菌丝体规模化生产的工艺条件奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 鲍蕊. 大球盖菇高产栽培关键技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [2] 王晓炜,詹巍,陶明煊,等. 大球盖菇营养成分、抗氧化活性物质分析[J]. 食用菌,2007(6):62-63.
- [3] 陈君琛,翁敏劼,赖谱富,等. 大球盖菇多糖的分子质量分布及其单糖的组成[J]. 中国农业科学,2011,44(10):2109-2117.
- [4] 杨丽维. 杏鲍菇液体菌种生产技术的研发与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [5] 马瑞霞,刘慧. 杏鲍菇液体菌种培养基的筛选及培养条件的探讨[J]. 中国农学通报,2011,27(7):452-456.
- [6] 丁米田,李灿. 食用菌液体菌种摇瓶培养操作技术要点[J]. 现代农业科学,2009,16(4):53.
- [7] 张胜友. 中国液体菌种生产新技术[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2010.
- [8] 杜红芳,窦爱丽,习其玉. 米糠的营养及在畜禽饲料中的应用[J]. 饲料广角,2007(6):38-40.
- [9] 闫培生,李桂舫,蒋家慧,等. 大球盖菇菌丝生长营养需求及环境条件[J]. 食用菌学报,2001,8(1):5-9.
- [10] 聂建军,李彩萍,杨玉画,等. 酒红球盖菇液体摇瓶培养基优化[J]. 山西农业科学,2011,39(10):1073-1075.

## Study on the Liquid Fermentation Conditions for Production of Mycelium of *Stropharia rugoso-annulata*

SUN Xing-rong<sup>1</sup>, HAN Yong-wu<sup>2</sup>, BIAN Jing-yang<sup>1</sup>

(1. Daqing Branche of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing, Heilongjiang 163316; 2. Keshan Branche of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606)

**Abstract:** In order to explore the optimum medium formula and fermentation conditions on the submerged-culture of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium, the effects of different additive amount of C-sources and N-sources and culture conditions on yield of *Stropharia rugoso-annulata* mycelium were studied. The results showed that the optimum culture medium formula of incubation was determined: soluble starch 2%, glucose 1%, rice bran 3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20%; The optimum culture condition was determined: pH6.5, inoculum 8%, rotary speed  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , fermentation time for 7 d.

**Keywords:** *Stropharia rugoso-annulata* mycelium; liquid fermentation; culture condition