



刘金力,唐琳,陈思,等. 大球盖菇液体菌种培养基碳氮源及培养条件的优化[J]. 黑龙江农业科学,2019(4):94-99.

大球盖菇液体菌种培养基碳氮源及培养条件的优化

刘金力,唐琳,陈思,董亚萍,王楠楠,王伟,王彦杰

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院/寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了促进大球盖菇液体菌种扩繁,采用单因素方差分析和正交试验的方法,对菌体培养的碳源、氮源和培养条件进行优化,通过测定大球盖菇菌丝体生物量指标,研究不同碳氮源和不同培养条件对大球盖菇生长的影响。结果表明:大球盖菇最适培养基为葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,玉米粉 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,麸皮 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。优化后,大球盖菇菌丝体生物量增加了 174%,最佳培养条件是 pH6,转速 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 及培养温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。培养基和培养条件的优化可以显著促进大球盖菇菌丝的生长。

关键词:大球盖菇;液体培养基;碳氮源优化;培养基组分;菌丝体生物量

大球盖菇又称为皱环球盖菇、皱球盖菇、酒红大球盖菇。隶属于担子菌门,层菌纲,伞菌目,球盖菇科,球盖菇属,既是世界交易的十大菇品种之一,同时也是联合国粮农组织向发展中国家推荐种植的食用菌之一^[1],其具有抗肿瘤、防治冠心病、神经系统及消化系统疾病,提高免疫机能的功效^[2]。主要分布在我国西南地区的云南、四川、西藏以及东北的吉林等省区^[3]。

自 1958 年,我国开始对食用菌液体菌种培养技术进行研究,结果表明:食用菌液体菌种具有生

产周期短、菌龄整齐、接种方便、效率高、成本低、便于工厂化大规模生产等诸多优点。其恰好能够弥补固体制种对大球盖菇的限制,是规模化栽培食用菌的有效途径之一^[4]。本试验就是借用食用菌液体菌种培养技术制作大球盖菇液体菌种。

不同的培养料配比与种类对大球盖菇菌丝生长同样有着重要的影响^[5]。本试验主要研究的是不同的碳氮源和不同培养条件对大球盖菇菌丝生长生物量的影响程度大小,进而筛选出最适合大球盖菇生长的培养基配方及培养条件。通过单因素试验、正交试验和条件优化试验,以大球盖菇菌丝体生物量进行对比评价,对大球盖液体菌种配方、条件进行优化,试验预测会获得生产周期短、菌丝分散性好、萌发点多、生长快、成品率高的液体培养基配方。为工厂化、规模化生产培育大球盖菇提供更为经济、适用、高效的培养基配方及培养条件。

收稿日期:2018-11-18

基金项目:黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练计划项目。

第一作者简介:刘金力(1996-),男,在读硕士,从事农业废弃物资源化利用的研究。E-mail:961665969@qq.com。

通讯作者:王彦杰(1972-),男,博士,教授,从事农业废弃物资源化研究工作。E-mail:wangyanjie1972@163.com。

pathological changes of kidney tissue under Masson staining light microscope,kit for detection of malondialdehyde (MDA) content in kidney homogenate,glutathione S transferase (GSH),superoxide dismutase(SOD) and catalase (CAT) activity; RT-PCR was used to detect nuclear transcription-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase (HO-1) mRNA expression. The results showed that compared with Sham group,MDA content in UUO group and curcumin group increased significantly,GSH,SOD,CAT activity decreased significantly,Nrf2 and HO-1 mRNA expression increased significantly; UUO group and curcumin intervention group,turmeric the MDA content in the intervention group was significantly decreased,GSH,SOD and CAT were significantly increased,and the expression of Nrf2 and HO-1 mRNA was significantly increased. In the UUO group,the glomerular balloon space was enlarged,the arrangement was disordered,collagen fibers were increased,and fibrosis was obvious. The pathological manifestations of the curcumin intervention group were significantly less than those of the UUO group. Curcumin can alleviate renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. The mechanism may be through inducing Nrf2 expression in kidney tissue,up-regulating the levels of antioxidant enzymes such as HO-1 and SOD,and increasing the level of anti-oxidative stress in renal tissues.

Keywords:curcumin; Nrf2; interstitial fibrosis; oxidative stress

1 材料与方法

1.1 材料

大球盖菇菌种 TM-1 由黑龙江省大庆市林甸四季青食用菌研究所提供。

活化培养基: PDA 培养基。液体种子培养基: 马铃薯(浸出液) 20%、蔗糖 2%、蛋白胨 2%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%、pH6.5^[6]。基础发酵培养基: 葡萄糖 2%、蛋白胨 0.5%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%^[6]。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将所获得的原菌种接种到 PDA 培养基中培养 12 d, 使菌种活化。

1.2.2 大球盖菇液体菌种制备 取一块约 0.5~1.0 cm² 的菌种块接入盛有 200 mL 液体种子培养基的 500 mL 三角瓶中 26℃、150 r·min⁻¹ 震荡培养 14 d, 得液体菌种。

1.2.3 不同培养时间大球盖菇菌体生长量的测定 将大球盖菇液体菌种接种至基础发酵培养基中培养, 固定好其他因素不变, 待出现菌丝后, 振荡培养期间每隔 2 d 取发酵液测定菌丝量。

1.2.4 不同碳、氮源对大球盖菇菌丝体生长量的影响 基础发酵培养基中的葡萄糖分别以蔗糖、半乳糖、果糖、淀粉、玉米粉为取代物进行碳源试验; 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏、黄豆粉、米糠、麸皮取代基础发酵培养基中的蛋白胨。玉米粉、黄豆粉、米糠、麸皮均煮汁, 两层纱布过滤。

改变基础培养基中的碳、氮源用量, 研究碳、氮源用量对大球盖菇菌丝体生长的影响。针对最适碳源、氮源及无机盐浓度, 各设 6 个处理研究其对大球盖菇菌丝生长量的影响, 进而选出正交试验的 4 个因素。

1.3 混合碳氮源培养基正交试验

在单因素试验基础上, 选取葡萄糖、玉米粉、麸皮和 KH_2PO_4 4 个因素进行 $\text{L}_9(4^3)$ 正交试验; 如表 1 所示, 配制 9 种培养基, 并分别加入硫酸镁 1 g·L⁻¹, 两次重复。

1.4 不同培养条件对大球盖菇菌体生长量的影响

1.4.1 pH 对大球盖菇菌体生长量的影响 按照 1.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方配制

培养基, 500 mL 三角瓶, 每瓶装液量 200 mL, 分别调至 pH5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 灭菌后将菌种接入, 然后置于 26℃ 恒温摇床中 150 r·min⁻¹ 振荡培养, 培养 12 d, 考察不同 pH 对大球盖菇菌丝生长生物量的影响。

表 1 正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	A 葡萄糖 Glucose/ (g·L ⁻¹)	B 玉米粉 Maize flour /(g·L ⁻¹)	C 麸皮 Bran/ (g·L ⁻¹)	D KH_2PO_4 / (g·L ⁻¹)
1	10	10	3	1
2	20	20	5	2
3	30	30	7	3

1.4.2 转速对大球盖菇菌体生长量的影响 按照 1.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方制作培养基, 500 mL 三角瓶, 每瓶装液量 200 mL, pH 调至 6.0, 灭菌后将菌种接入。调节摇床转速分别为 80、100、120、140、160 r·min⁻¹, 26℃ 下培养 12 d, 考察不同转速对大球盖菇菌丝生长生物量的影响。

1.4.3 培养温度对大球盖菇菌体生长量的影响 按照 1.3 试验得到的最佳液体发酵培养基配方制作培养基, 500 mL 三角瓶, 每瓶装液量 200 mL, pH 调至 6.0, 摇床转速调至 150 r·min⁻¹, 灭菌后将菌种接入。调节培养温度分别为 22、23、24、25、26、27℃ 培养 12 d, 测定菌丝生长生物量干重, 考察不同培养温度对大球盖菇菌丝生长生物量的影响。

1.5 接种培养方法

于超净工作台中按无菌操作规程选 1.2.1 所得菌种用打孔器取样接种, 每瓶 1 块。接种后于 26℃ 条件下, 恒温摇床振荡培养 12 d。摇床振荡频率为 150 r·min⁻¹。再在超净工作台中按无菌操作规程选 1.2.2 所得菌悬液用移液枪取样接种, 每瓶 1 mL。接种后于 26℃ 条件下, 恒温摇床振荡培养 12 d, 摇床振荡频率为 150 r·min⁻¹。

1.6 菌球生物量统计

在发酵结束后, 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。计算公式:生物量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) = 菌丝体干重(g) $\times 1\,000/50\text{ mL}$ 。

1.7 数据分析

采用 Excel 2016 进行数据记录和作图,用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 大球盖菇生长曲线的测定

由图 1 大球盖菇 TM-1 生长曲线可见,12 d 之前大球盖菇生物量随着培养时间的增加而增多,12 d 之后趋于平衡,故大球盖菇液体菌生物量测定在菌种培养 12 d 时测定为最佳。

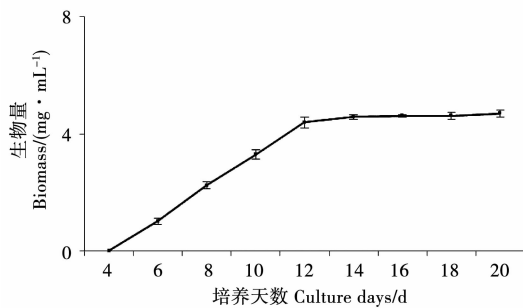


图 1 菌丝体生长曲线

Fig. 1 Growth curve of mycelium

2.2 碳源对大球盖菇菌丝体生长的影响

2.2.1 不同碳源对大球盖菇菌丝体生长的影响

不同品种的大球盖菇对碳源的要求不同^[7]。由图 2 可知,大球盖菇在供试碳源上均可生长。玉米粉处理的大球盖菇菌丝干重显著高于除淀粉外的其他碳源处理,蔗糖最不利于大球盖菇菌体的生长。

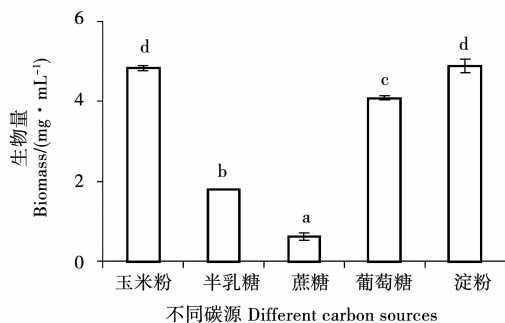


图 2 不同碳源对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

2.2.2 葡萄糖、玉米粉浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响 由图 3 可知,首先,随着培养液中葡萄糖和玉米粉浓度的增加,大球盖菇菌丝体生物量呈上升趋势;而后,随着葡萄糖和玉米粉用量的进一步增加,菌丝体生物量则明显降低。由此可见,液体培养时葡萄糖的最佳浓度为 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,玉米粉的最佳浓度为 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

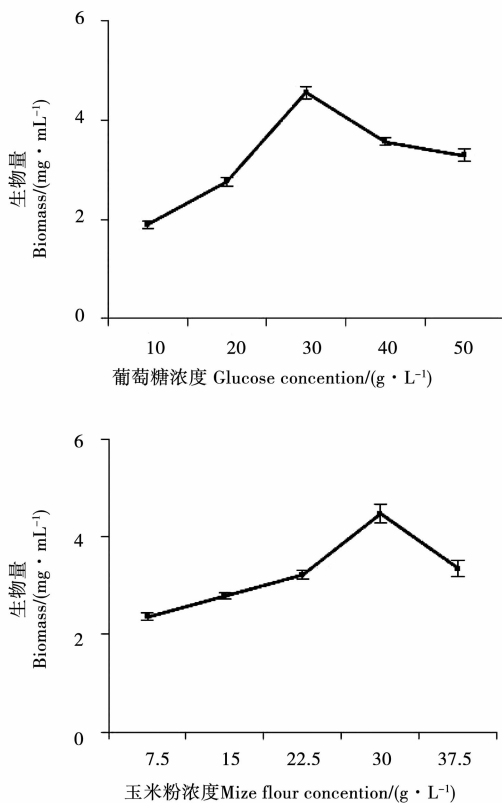


图 3 葡萄糖和玉米粉浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 3 Effects of concentration of glucose and maize flour on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

2.3 氮源对大球盖菇菌丝体生长的影响

2.3.1 不同氮源对大球盖菇菌丝体生长的影响

不同品种的大球盖菇对氮源的要求不同^[8]。由图 4 可知,大球盖菇在供试氮源上均可生长。氮源为有机氮源处理的大球盖菇菌丝干重显著高于无机氮源的处理。其中牛肉膏、麸皮和蛋白胨作为氮源时,菌丝生长生物量最高,最利于大球盖菇的生长,且三者间差异不显著,基于成本考虑本试验选择麸皮作为最优氮源进行正交试验。

2.3.2 麸皮浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响

由图 5 可以看出,首先,随着培养液中麸皮浓度

的增加,大球盖菇菌丝体生物量呈上升趋势;而后,随着麸皮用量的进一步增加,菌丝体生物量则明显降低。由此可见,液体培养时麸皮的最佳浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

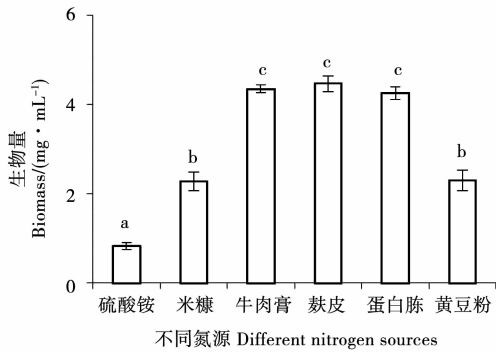


图 4 不同氮源对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 4 Effects of different nitrogen sources on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

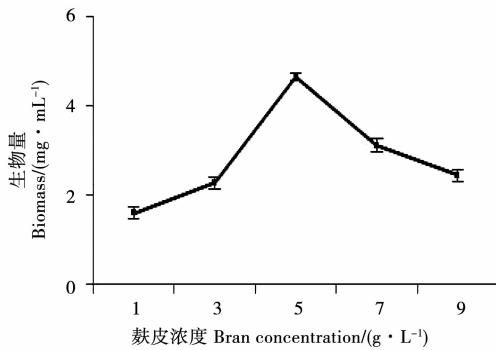


图 5 麸皮浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 5 Effects of bran concentration on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

2.3.3 无机盐浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响 由图 6 可以看出,首先,随着培养液中磷酸二氢钾浓度的增加,大球盖菇菌丝体生物量呈上升趋势;然后,随着磷酸二氢钾浓度的进一步增加,菌丝体生物量则明显降低。由此可见,液体培养时磷酸二氢钾的最佳浓度为 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而在供试浓度范围内,硫酸镁浓度对大球盖菇菌丝生长影响甚微(图 7)。

2.4 大球盖菇培养基成分正交优化

根据上述单因素试验的试验结果分析,选取葡萄糖和玉米粉作为碳源,麸皮作为氮源, KH_2PO_4 作为无机盐进行四因素 $\text{L}_9(4^3)$ 正交试验^[9]。由表 2 正交试验结果可以看出,不同组合

对大球盖菇菌丝生长生物量的影响是不一样的。各因素对大球盖菇菌丝生长生物量影响的大小依次为葡萄糖>麸皮> KH_2PO_4 >玉米粉。而极差越大,所起的作用就越大,表明葡萄糖是影响大球盖菇菌丝生长生物量最主要的因素,玉米粉对大球盖菇菌丝生长生物量的影响最小。从大球盖菇菌丝生长生物量来筛选各因素的水平值,得出最适、最优培养基组合: A2B1C2D3, 即葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 玉米粉 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 麸皮 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

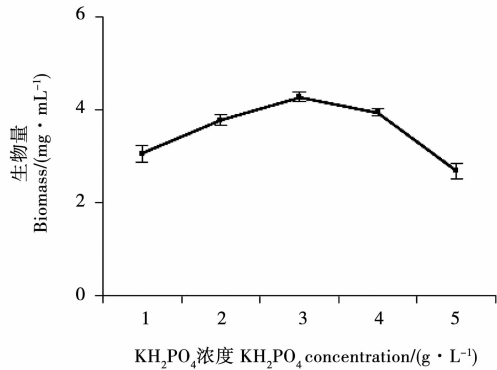


图 6 磷酸二氢钾浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 6 Effects of KH_2PO_4 concentration on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

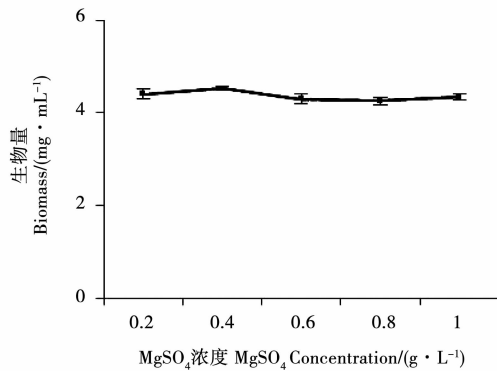


图 7 硫酸镁浓度对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 7 Effects of MgSO_4 concentration on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

2.5 pH 对大球盖菇菌丝体生长的影响

培养条件对大球盖菇的生长有不同程度的影响^[10]。如图 8 所示,大球盖菇最适生长 pH 为 6.0,可以看出大球盖菇生长适宜 pH 范围窄且偏酸。

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal results

序号 No.	A 葡萄糖 Glucose	B 玉米粉 Maize flour	C 麸皮 Bran	D KH ₂ PO ₄	生物量 Biomass/ (mg·mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	7.46
2	1	2	2	2	8.94
3	1	3	3	3	7.75
4	2	1	2	3	12.04
5	2	2	3	1	11.15
6	2	3	1	2	10.86
7	3	1	3	2	10.02
8	3	2	1	3	8.87
9	3	3	2	1	9.63
K1	24.15	29.52	27.19	28.24	
K2	34.05	28.96	30.61	28.66	
K3	28.52	28.24	28.92	29.82	
R	9.90	1.28	3.42	1.58	
F	5970.695**	120.790**	9.791	1.629	

**表示 0.01 水平差异显著。

** indicate significant difference at 0.01 level.

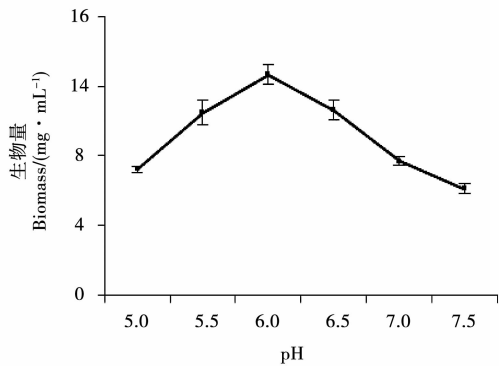


图 8 pH 对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 8 Effect of pH on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

2.6 转速对大球盖菇菌丝体生长的影响

如图 9 所示,转速升高,大球盖菇菌丝生物量随之增加,120 r·min⁻¹以后几乎趋于平稳,考虑到时间和原料成本,认定转速以 120 r·min⁻¹为宜。

2.7 培养温度对大球盖菇菌丝体生长的影响

如图 10 所示,大球盖菇生长生物量随着培养温度的增加呈先增加后降低的趋势,25 ℃时生物

量达到最大值,故培养温度以25 ℃为最佳。

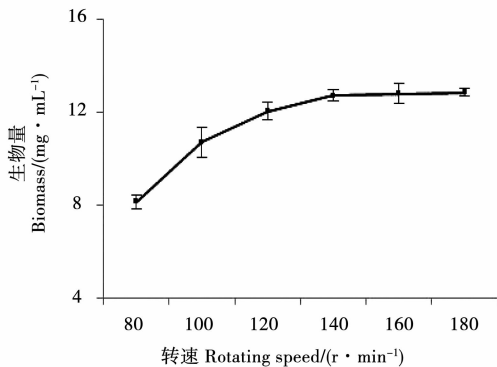


图 9 转速对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 9 Effect of rotating speed on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

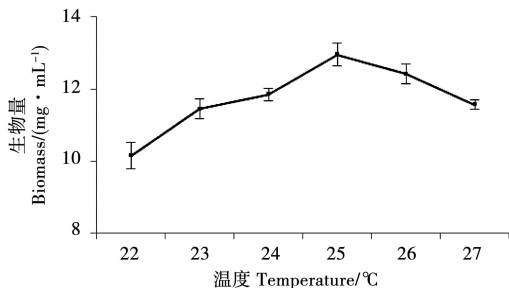


图 10 培养温度对大球盖菇菌丝体生长的影响

Fig. 10 Effects of culture temperature on mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata*

3 结论与讨论

张世敏^[11]等研究表明,碳源中蔗糖对大球盖菇的菌丝生长最有利,其次为可溶性淀粉。氮源中尿素最好,其次为蛋白胨和酵母膏;萨仁图雅^[12]等研究结果表明不同品种的大球盖菇对氮源的要求不同,且不同培养条件对大球盖菇的生长有不同程度的影响。本研究表明,碳源中玉米粉、可溶性淀粉对大球盖菇的菌丝生长最有利,其次为葡萄糖。氮源中最好的氮源是麸皮。在本试验中之所以在碳源上选择葡萄糖,是因为菌丝前期生长过程中需要单糖作为辅助碳源使菌种快速定植,使其产生纤维素酶、半纤维素酶等胞外酶。氮源上选择麸皮是出于经济原因考虑。孙清波等^[13]研究表明,培养条件的优化可以显著提高菌丝体生产量,优化后最高菌体量达到 12 g·L⁻¹;本研究表明优化培养条件可以提高菌丝体生物量,以大球盖菇菌丝生物量为标准,对玉米粉、葡萄

糖、麸皮及 KH_2PO_4 进行 $\text{L}_9(4^3)$ 正交试验,试验结果表明,当培养基含葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,玉米粉 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,麸皮 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为最优培养原料; MgSO_4 浓度影响不大,因此选取最小值 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。优化后培养 12 d 时大球盖菇菌丝体生物量比未经优化培养基生长的菌丝体增长了 174%。通过培养条件筛选试验可得出最佳培养条件是 pH6.0,摇床转速 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 及培养温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。在试验所得培养基和培养条件下进行大球盖菇液体菌种生产可获得菌丝体生物量高的液体菌种。由于本试验仅从食用菌生产常见原料上研究,其他原料对大球盖菇液体菌的生长影响还需进一步探讨,更深一步的研究。

参考文献:

- [1] He P X, Geng L J, Wang J Z, et al. Production, purification, molecular characterization and bioactivities of exopolysaccharides produced by the wine cap culinary-medicinal mushroom, *Stropharia rugosoannulata* 2 (higher Basidiomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2012, 14(4): 365-376.
- [2] Wu J, Tokuyama S, Nagai K, et al. Strophasterols A to D with an unprecedented steroid skeleton: From the mushroom *Stropharia rugosoannulata* [J]. Natural Products, 2012, 124: 1-4.
- [3] 郑文彪,吕军美,潘永柱,等.大球盖菇栽培模式比较试验[J].食用菌,2015(2):46-48.
- [4] Zhang W W, Tian G T, Geng X R, et al. Isolation and characterization of a novel lectin from the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata* [J]. Molecules, 2014, 19: 19880-19891.
- [5] 周祖法,闫静,王伟科.不同培养料配方栽培大球盖菇试验[J].浙江农业科学,2013(2):149-150.
- [6] 孙兴荣,韩勇武,卞景阳.大球盖菇菌丝体液体发酵培养条件的研究[J].黑龙江农业科学,2016(8):114-117.
- [7] 黄春燕,万鲁长,张柏松.大球盖菇菌丝生长最佳碳源研究[J].山东农业科学,2012,44(1):75-76.
- [8] 黄春燕,万鲁长,张柏松.大球盖菇菌丝生长适宜氮源研究[J].中国食用菌,2012,31(6):18-19,23.
- [9] 余海立,汪瑾雨,毛成凤.正交试验优化大球盖菇富硒发酵工艺[J].食品工业,2018,39(2):103-107.
- [10] 李正鹏,吴萍,陆晓民.大球盖菇液体菌种培养条件的研究[J].中国林副特产,2006(4):83-85.
- [11] 张世敏,和晶亮,邱立友.不同碳氮营养源和培养温度对大球盖菇菌丝生长的影响[J].微生物学杂志,2005,25(6):32-34.
- [12] 萨仁图雅,图力古尔.大球盖菇研究进展[J].食用菌学报,2005,12(4):57-64.
- [13] 孙清波,许广波,梁运江.大球盖菇液体培养基组分的优化试验[J].中国园艺文摘,2011(9):10-12.

Optimization of Carbon and Nitrogen Sources and Culture Conditions of Liquid Culture Medium of *Stropharia rugosoannulata*

LIU Jin-li, TANG Lin, CHEN Si, DONG Ya-ping, WANG Nan-nan, WANG Wei, WANG Yan-jie
(Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to promote the expansion and propagation of the liquid strains of *Stropharia rugosoannulata*, this paper optimized carbon source, nitrogen source and culture conditions with the one-way analysis of variance and orthogonal experimental design, through the determination of *Stropharia rugosoannulata* mycelia biomass index, researched effect of the different carbon source, nitrogen source and different culture conditions on *Stropharia rugosoannulata* mycelial growth. The results showed that the optimal medium was $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ maize flour, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bran, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 and MgSO_4 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. After optimization, mycelium biomass increased by 174%, the best culture conditions were pH6, rotating speed $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ and the temperature at $25\text{ }^\circ\text{C}$. The optimization of culture medium and culture conditions could significantly promote mycelial growth of the *Stropharia rugosoannulata*.

Keywords: *Stropharia rugosoannulata*; liquid medium; medium optimizing; mycelium biomass