

平菇菌丝液体培养基的优化

曹秀敏, 胡巍, 张子豪, 刘颖, 陈银银, 石玉* (武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 湖北武汉 430205)

摘要 [目的] 研究平菇菌丝液体培养基的最佳配方。[方法] 以平菇为试材, 以菌丝干重为检测指标, 筛选液体发酵培养基的最佳碳源和氮源, 通过单因素试验和正交试验, 研究供试菌株液体发酵的最佳培养基配方。[结果] 供试菌株液体发酵的最佳培养基配方: 马铃薯淀粉 4%、酵母粉 0.100%、硫酸镁 0.15%、磷酸氢二钾 0.2%。[结论] 供试菌株在优化培养基配方条件下, 菌丝干重有显著提高, 为平菇液体菌种的培养和规模化栽培提供了理论依据。

关键词 平菇; 液体培养基; 培养条件优化; 菌丝干重

中图分类号 S646.1⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)21-0015-03

Optimization of Liquid Medium for Mycelium Culture of *Pleurotus ostreatus*

CAO Xiu-min, HU Wei, ZHANG Zi-hao et al (College of Food and Biotechnology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan, Hubei 430205)

Abstract [Objective] To study the optimal formula of liquid medium for mycelium culture of *Pleurotus ostreatus*. [Method] Taking *P. ostreatus* as experimental materials, mycelial dry wet was selected for detection index, the optimum carbon source and nitrogen source has been chosen with fermentation medium to maximize mycelia growth. The optimal test strain liquid fermentation medium formula was determined by univariate test and orthogonal test. [Result] The optimal formula was 4% of potato flour, 0.100% of yeast extract, 0.15% of magnesium sulfate and 0.2% of dipotassium hydrogen phosphate. [Conclusion] The mycelium biomass of the tested strain was increased significantly under the condition of the optimal formula, which provided a theoretical basis for the cultivation of liquid strains and large-scale cultivation of *P. ostreatus*.

Key words *Pleurotus ostreatus*; Liquid medium; Culture conditions optimization; Mycelial dry weight

平菇 (*Pleurotus ostreatus*), 又名侧耳, 属担子菌亚门、伞菌目、口蘑科、侧耳属, 是一种最常见的灰色食用菇^[1-3]。平菇味道鲜美、老少皆宜, 含有多种人体需要的多糖^[4]、维生素、氨基酸和矿物元素, 是人们喜爱的一种低油脂、高蛋白的健康食物^[5], 平菇含有的生物活性成分具有提高机体免疫力、延缓衰老、抗疲劳、抗肿瘤、调节血糖、调节血脂、化学预防等重要作用^[6-9]。由于平菇具有较高的食用以及药用价值, 深受消费者青睐, 市场需求量也不断增加。

平菇栽培方法很多, 国内主要有瓶栽、袋栽、箱筐栽培、室内大床栽培、阳畦栽培、段木栽培和连续生产工艺等^[10]。虽然平菇栽培一般采用固体栽培, 但很多研究表明: 液体培养具有生产周期短、菌种纯度高、萌发点多、发菌快和生产成本低等优点, 是食用菌生产发展的方向^[11-12]。液体菌种生产主要取决于培养基配比是否优良, 必须含有各种菌丝生长所需的恰当的营养、水分和适宜的酸碱度, 它直接影响着平菇的产量和经济效益^[13]。笔者对平菇液体培养基进行筛选, 以期对平菇液体菌种的培养和规模化栽培提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 供试平菇菌种保存于武汉设计工程学院实验教学中心; 马铃薯淀粉和麦芽糖, 购于超市; 蔗糖、葡萄糖、酵母浸粉、牛肉膏、蛋白胨、氯化铵、磷酸氢二钾、七水硫酸镁等试剂皆为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器 DHG-914385-III 电热恒温鼓风干燥箱、HH-6 恒温水浴锅、AL104 电子天平、TG16-WS 高速台式离心机、SPX-150C 恒温恒湿箱、SPX-250B-D 全温振荡培养

箱、SW-GJ-2G 超净工作台。

1.3 培养基与培养方法 PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、水 1 000 mL。

基础液体培养基: 蔗糖 3%、酵母粉 0.1%、硫酸镁 0.15%、磷酸氢二钾 0.3%。

将斜面菌种转接至装有 100 mL 基础液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 25 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 5 d, 制成菌悬液, 以 10% 的接种量转接入 100 mL 发酵培养基中, 25 ℃ 培养 5 d。

1.4 最适碳源、氮源筛选

1.4.1 碳源试验。 配制不加蔗糖的基础液体培养基, 分别以 3% 葡萄糖、蔗糖、马铃薯淀粉和麦芽糖为碳源, 每个处理设置 3 个重复, 充分混匀后, 115 ℃ 灭菌 30 min。无菌条件下将活化菌种按 10% 的接种量接入, 于 25 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 5 d。培养好的菌液用 4 层纱布过滤, 再用蒸馏水冲洗干净, 置于 60 ℃ 电热恒温鼓风干燥箱中烘干至恒重, 测定菌丝干重。

1.4.2 氮源试验。 配制不加酵母粉的基础液体培养基, 分别以 0.1% 酵母粉、蛋白胨、牛肉膏和氯化铵为氮源, 其他同“1.4.1”。

1.4.3 最适碳源质量分数的选择。 配制不加蔗糖的基础液体培养基, 分别以质量分数 1%、2%、3%、4%、5% 的马铃薯淀粉为碳源, 其他同“1.4.1”。

1.4.4 最适氮源质量分数的选择。 配制不加酵母粉的基础液体培养基, 分别以质量分数 0.050%、0.075%、0.100%、0.125%、0.150% 的酵母粉为氮源, 其他同“1.4.1”。

1.5 最适培养基的正交试验设计 根据单因素试验结果, 以马铃薯淀粉、酵母粉、硫酸镁、磷酸氢二钾 4 个因素设计 4 因素 3 水平的正交试验, 以试验菌株菌丝干重为检测指标,

基金项目 国家级大学生科技创新项目(201614035001)。

作者简介 曹秀敏(1996—), 女, 河北沧州人, 从事资源微生物研究。

* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事环境微生物研究。

收稿日期 2018-03-15

筛选平菇的最佳培养基组成,试验因素和水平见表1。

表1 液体培养基配方优化正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for optimization of liquid medium formula

水平 Level	因素 Factor			
	马铃薯淀粉 Potato starch (A)	酵母粉 Yeast powder (B)	硫酸镁 Magnesium sulfate (C)	磷酸氢二钾 Dipotassium phosphate (D)
1	3	0.050	0.15	0.2
2	4	0.100	0.20	0.3
3	5	0.150	0.25	0.4

2 结果与分析

2.1 最适碳源、氮源筛选结果

2.1.1 碳源对菌丝干重的影响。碳元素是平菇生物体制造自身有机物的重要营养元素,同时也是生物体新陈代谢能量的最主要供给物质^[14]。采用蔗糖、麦芽糖、马铃薯淀粉和葡萄糖作为研究碳源的对象。由图1可知,不同的碳源对平菇生长影响有差异,以马铃薯淀粉为碳源时菌丝干重略高于其他几种碳源,为9.39 g/L。平菇对不同碳源的利用程度大小依次为马铃薯淀粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖,因此选用马铃薯淀粉作为最佳碳源。

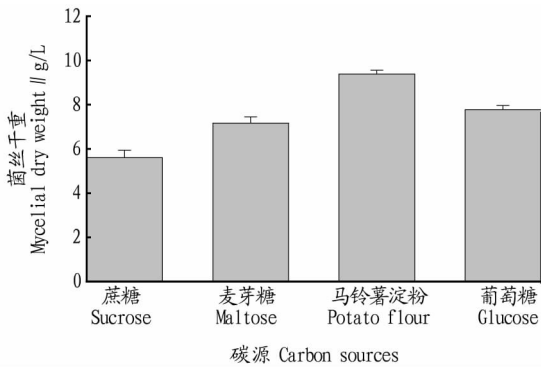


图1 不同碳源对菌丝干重的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on mycelial dry weight

2.1.2 氮源对菌丝干重的影响。由图2可知,平菇菌株可以利用不同种类的氮源,不同氮源对平菇菌丝干重影响较大,其中平菇对酵母粉的利用最好,菌丝干重达8.28 g/L。这是由于酵母粉拥有细胞生长所需的多种营养物质,可以很好地维持菌体生长^[15]。因此选取酵母粉作为最佳氮源。

2.1.3 可溶性淀粉含量对菌丝干重的影响。由图3可知,不同浓度的马铃薯淀粉对菌丝干重的影响较大,随着马铃薯淀粉含量的增加,菌丝干重呈先上升后下降的趋势,在马铃薯淀粉含量较低时,菌丝干重明显偏低。当马铃薯淀粉含量为4%时,菌丝干重达到最大值(9.59 g/L)。因此,最佳马铃薯淀粉含量初步确定为4%。

2.1.4 酵母粉含量对菌丝干重的影响。由图4可知,不同含量的酵母粉对菌丝干重的影响较大,随着酵母粉含量的增加,菌丝干重呈先上升后下降的趋势,在酵母粉含量较低时,菌丝干重明显偏低,随着酵母粉含量增高,菌丝干重显著增

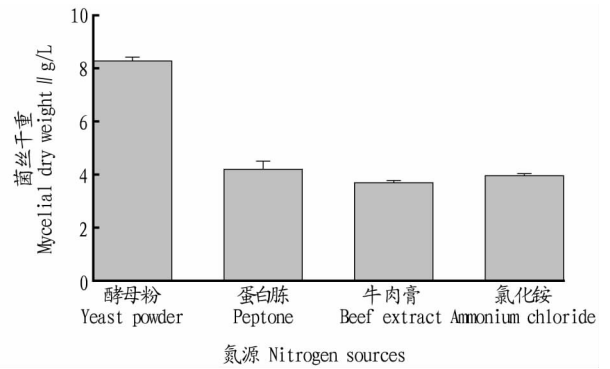


图2 不同氮源对菌丝干重的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on mycelial dry weight

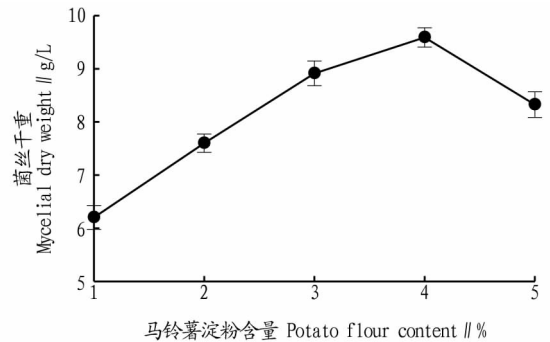


图3 马铃薯淀粉含量对菌丝干重的影响

Fig. 3 Effect of different potato flour content on mycelial dry weight

加。当酵母粉含量为0.100%时,菌丝干重达到最大值(8.44 g/L)。因此,最佳酵母粉含量初步确定为0.100%。

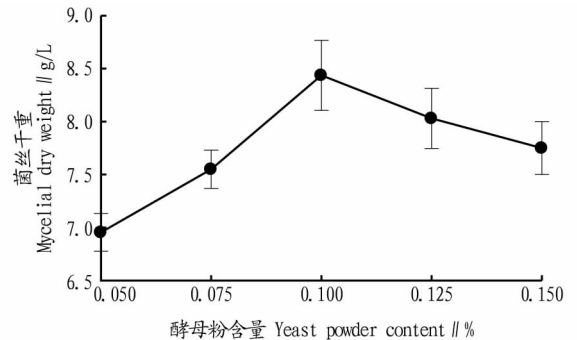


图4 酵母粉含量对菌丝干重的影响

Fig. 4 Effect of different yeast powder content on mycelial dry weight

2.2 平菇液体发酵培养最佳培养基配方的确定由表2可知,各因素极差大小依次为D、B、C、A,说明磷酸氢二钾对平菇的菌丝干重影响最大,其次是酵母粉和葡萄糖。通过以上分析,可以得到最优水平组合为A₂B₂C₁D₁,即培养基各组分分别为马铃薯淀粉4%、酵母粉0.100%、硫酸镁0.15%、磷酸氢二钾0.2%。

2.3 菌丝最优培养基的验证试验结果验证试验结果表明,组合A₂B₂C₁D₁培养基条件下平菇菌丝干重平均值达11.66 g/L,而正交表中的A₂B₂C₃D₁培养基条件下平菇菌丝干重平均值为10.37 g/L,证明该组合为平菇菌株发酵培养的最佳培养基组成。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal experiment design and result

序号 No.	马铃薯 Potato (A)	酵母粉 Yeast powder (B)	硫酸镁 Magnesium sulfate (C)	磷酸氢二钾 Dipotassium phosphate (D)	菌丝干重 Mycelial dry weight g/L
1	1	1	1	1	8.76
2	1	2	2	2	7.64
3	1	3	3	3	5.34
4	2	1	2	3	5.89
5	2	2	3	1	10.37
6	2	3	1	2	7.37
7	3	1	3	2	7.15
8	3	2	1	3	8.18
9	3	3	2	1	7.45
k_1	7.247	7.267	8.103	8.860	
k_2	7.877	8.730	6.993	7.387	
k_3	7.593	6.720	7.620	6.470	
R	0.630	2.010	1.110	2.390	

3 结论

培养基的组成成分以及各成分的浓度是影响平菇菌丝转化率的重要因素,直接影响着菌丝干重的大小。该研究以平菇为试材,以菌丝干重为检测指标,通过对常用碳源、氮源进行筛选,确定了发酵培养基的最佳碳源和氮源,马铃薯淀粉为最佳碳源,酵母粉为最佳氮源,通过单因素试验和正交试验,研究了供试平菇菌株的最优发酵培养基配方:马铃薯淀粉 4%、酵母粉 0.100%、硫酸镁 0.15%、磷酸氢二钾 0.2%。该试验获得的培养基配方具有配制简单、产菌丝量多的优

点,可作为工厂化菌种生产的主要配方进行推广。

参考文献

- [1] 盛春鸽,王延锋,潘春磊,等. 糙皮侧耳杂交后代遗传多样性分析[J]. 北方园艺,2015(4):149-151.
- [2] 吴雪君,安琪,戴玉成. 糙皮侧耳(平菇)菌株 CCEF89 的生理生化研究[J]. 菌物学报,2015,34(4):621-631.
- [3] 邹亚杰,张美敬,仇志恒,等. 侧耳属真菌菌经济利用的研究进展[J]. 菌物学报,2015,34(4):541-552.
- [4] RADZKI W,ZIAJA-SOŁTYS M,NOWAK J,et al. Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom[J]. LWT-Food Science and Technology,2016,66:27-33.
- [5] 刘焯潼,陈秋生,刘连强,等. 平菇对重金属铅和镉吸收富集规律研究[J]. 食品工业,2015,36(10):223-226.
- [6] 许佳妮,张剑飞,袁娅,等. 不同培养基对平菇香气成分的影响[J]. 食品科学,2015,36(4):86-91.
- [7] 刘西周. 一株野生灰树花菌丝体液体培养基正交方法筛选[J]. 北方园艺,2015(21):152-154.
- [8] OOI V E C,LIU F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides[J]. International journal of medicinal mushrooms,1999,1(3):195-206.
- [9] ZHANG J J,MENG G Y,ZHAI G Y,et al. Extraction,characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum* [J]. International journal of biological macromolecules,2016,82:432-439.
- [10] 王永立,谷志想. 响应面分析法优化平菇液体菌种培养基的研究[J]. 周口师范学院学报,2015,32(5):129-133.
- [11] 陈今朝,戴玄,谭永忠,等. 平菇液体种子培养基优化[J]. 江西农业大学学报,2008,30(5):915-918.
- [12] 陆建明,张锡凤. 食用菌液体菌种制备的研究进展[J]. 中国食用菌,2003,22(6):15-17.
- [13] 刘碧容,温海祥. 不同培养基对平菇菌丝体生长的影响研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版),2006,24(1):74-76.
- [14] 安琪,吴雪君,吴冰,等. 不同碳源和氮源对金针菇降解木纤维纤维素酶活性的影响[J]. 菌物学报,2015,34(4):761-771.
- [15] 王琴,黄嘉玲,黎奋欣,等. 酵母抽提物的生产技术进展[J]. 现代食品科技,2013,29(7):1747-1750,1701.
- [6] JARUCHOKTAWEECHAI C,SUWANBORIRUX K,TANASUPAWATT S, et al. New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026[J]. J Nat Prod,2000,63(12):984-986.
- [7] HEINDL H,WIESE J,THIEL V,et al. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats[J]. Systematic and applied microbiology,2010,33(2):94-104.
- [8] ROMANENKO L A,UCHINO M,KALINOVSKAYA N I,et al. Isolation phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial,hemolytic and surface activities[J]. Microbiological research,2008,163(3):633-644.
- [9] SANTOS O C S,PONTES P V M L,SANTOS J F M,et al. Isolation,characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil[J]. Research in microbiology,2010,161(7):604-612.
- [10] 李越中,陈琦. 海洋微生物资源及其产生生物活性代谢产物的研究[J]. 生物工程进展,2000,20(5):28-31.
- [11] 李影林. 培养基手册[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1991:370.
- [12] 孟庆龙,陈晓琳,张明. 一种使用酶标仪快速测定细菌素效价的方法[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(8):685-687.
- [13] 袁丽红. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社,2010:77-86.
- [14] 朱林江,李崎. 环境胁迫诱导的细胞适应性突变[J]. 遗传,2014,36(4):327-335.
- [15] 郑忠辉,陈连兴,黄耀坚,等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生微生物的抗菌活性[J]. 台湾海峡,1998,17(4):439-444.
- [16] TAECHOWISAN T,PEBERDY J F,LUNYONG S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity[J]. World journal of microbiology and biotechnology,2003,19(4):381-385.
- [17] BRASIER C M. Fungal species in practice:Identifying species units in fungi[M]//CLARIDGE M F,DAWAH H A,WILSON M R,et al. Species:The units of biodiversity. London:Chapman & Hall,1997:135.
- [18] SUN W,DAI S K,JIANG S M,et al. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea[J]. Antonie van leeuwenhoek,2010,98(1):65-75.
- [19] NITHYANAND P,INDHUMATHI T,RAVI A V,et al. Culture independent characterization of bacteria associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar[J]. World journal of microbiology and biotechnology,2011,27(6):1399-1406.
- [20] NITHYANAND P,MANJU S,PANDIAN S K. Phylogenetic characterization of culturable Actinomycetes associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from Gulf of Mannar[J]. FEMS Microbiology Letters,2011,314(2):112-118.
- [21] GOODFELLOW M,FIEDLER H P. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics[J]. Antonie van leeuwenhoek,2010,98(2):119-142.

(上接第4页)