

蜜环菌液态发酵培养基及补料分批发酵工艺的优化

刘宇, 龚思慧, 彭楠, 葛向阳*

(华中农业大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉, 430070)

摘 要 通过对蜜环菌液态发酵培养基和 2 m³ 发酵罐生产工艺的优化, 得到蜜环菌适宜的培养条件为: 玉米粉 60 g/L, 豆粕 20 g/L, 无水乙醇 3 mL/L, V_{B1} 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, α-淀粉酶 0.1 g/L, 初始 pH 3.0, 当摇瓶种子培养到第 6 天, 菌丝量 19.24 g/L 时, 移种到 50 L 发酵罐, 培养 8 d, 其菌丝量可达 26.80 g/L。200 L 种子发酵罐培养 6 d, 其菌丝量为 15.35 g/L, 此时可转入下一级培养, 2 m³ 发酵罐发酵采用补料发酵的方式, 培养 8 d, 其菌丝量可达 22.65 g/L。

关键词 蜜环菌; 培养基; 补料分批培养; 生产工艺

蜜环菌属于担子菌门、担子菌纲、伞菌目、白蘑科、蜜环菌属, 是药食兼用的真菌, 与天麻和猪苓都存在着共生关系^[1-2], 目前生产蜜环菌的工艺主要有固体栽培、固体发酵以及液体深层发酵。固体栽培主要是为了获取子实体, 固态发酵主要是为了获取菌丝和菌索, 而液体深层发酵能实现药用真菌工业化大生产^[3], 且液态发酵产物中富含倍半萜类化合物、多糖、核苷类化合物、氨基酸等多种有效成分, 具有镇静^[4]、催眠^[5]、安神及抗惊厥^[6]等调节中枢神经的作用, 还有抗凝血、保护心肌^[7]、调节心脑血管^[8]等生理活性。随着人们对蜜环菌发酵产物和药理作用的不断研究, 围绕蜜环菌液态发酵产物研发的产品种类也渐渐多样化, 如以发酵浓缩液为原料制备成的脑心舒口服液^[9]; 以菌丝体烘干磨成细粉压片的蜜环菌片; 以菌丝体和发酵液一起煮沸浓缩而成的蜜环菌糖浆和健脑露^[10]。

蜜环菌液态发酵具有广泛的发展空间和研究价值, 其产物菌丝体和发酵液中含有多种生理活性物质, 但少有工业化生产的报道, 多集中在实验室摇瓶培养阶段, 其产物分别为菌丝体、胞内多糖和胞外多糖^[11-14]。

本文首先优化了蜜环菌摇瓶阶段发酵培养基及工艺条件, 选取了以豆粕和玉米粉等廉价底物作为培养基, 在单因素实验基础上, 进行了正交实验, 并利用此最优培养基, 对摇瓶进行了生长曲线的测定, 确定

最优移种时间, 进行了 50 L 发酵分批培养, 最终以 200 L 发酵罐作为种子罐, 实现了 2 m³ 发酵罐工业化生产。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

蜜环菌 (*Armillaria mellea*) m4, 华中农业大学食用菌保藏中心。

1.1.2 培养基

固体试管培养基: 下层, 80 g/L 麸皮与 40 g/L 玉米粉混匀, 煮成糊状后填于试管底部 5~7 cm 高; 上层, 马铃薯 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, 琼脂 17 g/L, pH 自然。待麸皮下层装入后向试管内倒入 5 mL 上层培养基 (华中农业大学食用菌保藏中心提供)。

活化培养基: 糊精 30 g/L, 葡萄糖 30 g/L, 蛋白胨 16 g/L, 无水乙醇 3 mL/L, VB₁ 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, pH 3.0。

摇瓶种子培养基: 玉米粉 60 g/L, 豆粕 20 g/L, 无水乙醇 3 mL/L, VB₁ 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, α-淀粉酶 0.1 g/L, pH 3.0。

发酵培养基: 玉米粉 30 g/L, 豆粕 10 g/L, 无水乙醇 3 mL/L, VB₁ 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, α-淀粉酶 0.1 g/L, pH 3.0。

1.2 主要仪器

HQL150B 恒温摇床, 武汉中科科仪技术发展有限责任公司; 101 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海索谱

第一作者: 硕士研究生 (葛向阳副教授为通讯作者, E-mail: gxy@mail.hzau.edu.cn)。

基金项目: 中央高校基本科研业务费 (2662015PX199)

收稿日期: 2015-12-28, 改回日期: 2016-02-17

仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,鸿雁医疗器械制造有限公司;50 L 发酵罐,200 L 发酵罐,2 m³ 发酵罐,南京汇科生物工程设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种初始培养

活化初始培养:糊精 30 g/L,葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 16 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, pH 自然, 100/250 mL 分装,用接种铲挖取固体试管菌索 3~4 块接种到培养基中, 28 ℃, 160 r/min 培养 7~10 d 左右。

摇瓶种子初始培养:糊精 30 g/L,蛋白胨 10 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L, pH 自然, 200/500 mL 分装,接种 10% 的活化初始培养基, 28 ℃, 160 r/min 培养 6 d。

1.3.2 菌丝量的测定

移取一定体积含有菌丝体的发酵液,过 60 目筛,用自来水缓缓冲洗培养基组分直至洗净,于 60 ℃ 烘箱烘干菌丝体至恒重,其质量与发酵液体积之比则为菌丝量。

1.3.3 碳源的优化

用于筛选的有速效碳源葡萄糖、蔗糖,迟效碳源糊精、玉米粉,添加量为 30 g/L。对于迟效碳源,向其中加入 0.1 g/L α-淀粉酶,煮沸 10 min。用 10 g/L 蛋白胨作为氮源底物,发酵完后以菌丝量为指标,选择最适的碳源;其次选取最优碳源后,添加量为 20、30、40、50、60、70 g/L,用 10 g/L 蛋白胨作为氮源底物,发酵完后以菌丝量为指标,选择最适的碳源添加量。

1.3.4 氮源优化

用于筛选的可食用氮源有蛋白胨、酵母浸粉、胰蛋白胨、豆粕,添加量为 10 g/L。用 30 g/L 糊精作为碳源底物,选择最适的氮源;其次选取最优氮源后,添加量为 5、10、15、20、25、30 g/L,用 30 g/L 糊精作为碳源底物,选择最适的氮源浓度。

1.3.5 乙醇添加量优化

选取最优的碳氮源及其浓度,接种前选择无水乙醇添加量为 0、3、6、9、12 mL/L,发酵完后以菌丝量为指标,选择最适的乙醇添加量。

1.3.6 生长因子 V_{B1} 添加量优化

选取最优的碳氮源及其浓度,接种前 V_{B1} 添加量为 0、0.01、0.03、0.05 g/L,发酵完后以菌丝量为指标,确定最佳 V_{B1} 添加量。

1.3.7 发酵初始 pH 优化

用 1 水合柠檬酸、碳酸钠调节优化好的培养基初

始 pH 至 3、4、5、自然(不调 pH),发酵完毕后以菌丝量为指标,确定最适发酵液初始 pH。

1.3.8 发酵条件的正交试验优化

在单因素的基础上,选取了对菌丝量积累影响较大的碳源浓度、氮源浓度、乙醇浓度以及 V_{B1} 添加量为影响因素,以菌丝量作为评价指标,采用 L₉(3⁴) 正交表优化。正交实验的因素水平安排见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A(玉米粉)/ (g · L ⁻¹)	B(豆粕)/ (g · L ⁻¹)	C(乙醇)/ (mL · L ⁻¹)	D(V _{B1})/ (g · L ⁻¹)
1	50	20	0	0.01
2	60	25	3	0.03
3	70	30	6	0.05

1.3.9 装液量优化

配置优化好的培养基,500 mL 摇瓶的装液量依次为 100、150、200、250、300 mL,发酵完后以菌丝量为指标,确定最适装液量。

1.3.10 摇瓶种子液生长曲线测定

摇瓶活化培养:挖取固体试管菌索 3~4 块接种于活化培养基中, 28 ℃ 培养,摇床转速为 160 r/min。

种子摇瓶培养:按接种量为 10% 接种活化培养液于种子培养基中, 28 ℃ 培养,摇床转速为 160 r/min。

1.3.11 发酵罐培养

50 L 发酵罐分批培养:种子液经摇瓶培养成熟后,按 10% 的接种量接种于 50 L 发酵罐, 28 ℃ 培养,转速为 160 r/min。

2 m³ 发酵罐补料培养:由摇瓶种子按 10% 的接种量接种于 200 L 发酵罐中培养 6 d,在转入 2 m³ 发酵罐中 28 ℃ 培养,补料期间转速为 50 r/min,补料完后转速为 80 r/min。

2 结果与分析

2.1 发酵条件的优化

2.1.1 碳源种类及其添加量对菌丝量的影响

蜜环菌可以使用多种碳源,碳源优化结果见图 1 和图 2。由图 1 可知,相比速效碳源,迟效碳源类的多糖均有较好的利用效果,其中以玉米粉效果最好,故最适碳源为玉米粉。由图 2 可知,当玉米粉添加量低于 60 g/L 时,随着碳源浓度的增加,菌丝产量也增加,当玉米粉浓度为 60 g/L 时,菌丝产量最高,因此

选择 60 g/L 作为最佳碳源浓度。

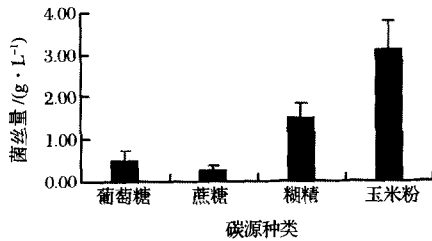


图1 碳源对菌丝量的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on biomass

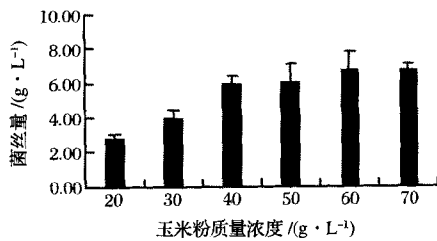


图2 碳源添加量对菌丝量的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources addition quantity on biomass

2.1.2 氮源种类及其添加量对菌丝量的影响

氮源是微生物合成氨基酸、蛋白质、核酸的主要成分。氮源种类以及浓度对蜜环菌生物菌丝量的影响结果见图3和图4。由图3可知,最优氮源为豆粕,且由图4可知豆粕质量浓度在25 g/L时菌丝量最大,因此选择25 g/L作为最佳氮源浓度。

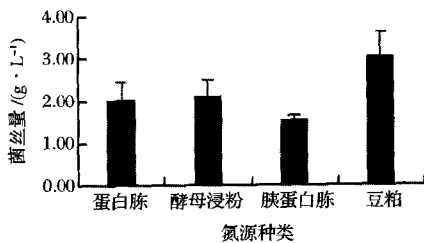


图3 氮源对菌丝量的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on biomass

2.1.3 乙醇以及生长因子 V_{B1} 添加量对菌丝量的影响

有文献报道,少量的乙醇可以促进蜜环菌菌丝生长,而 V_{B1} 作为糖类代谢酶的辅酶,可以促进蜜环菌代谢,增加蜜环菌菌丝体的生长,其添加量对菌丝量的影响结果见图5和图6。由图5可知最佳乙醇添加量为3 mL/L,由图6可知随着 V_{B1} 的添加量的增

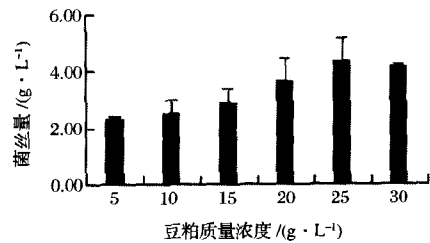


图4 氮源添加量对菌丝量的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen sources addition quantity on biomass

加,蜜环菌生物菌丝量就越大,当浓度大于0.03 g/L时,蜜环菌生物菌丝量趋向于稳定,故 V_{B1} 最适添加量为0.03 g/L。

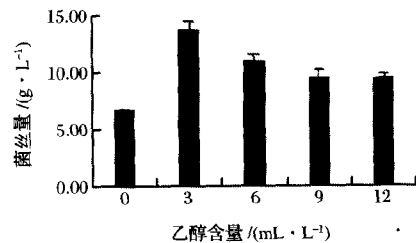


图5 无水乙醇添加量对菌丝量的影响

Fig. 5 Effects of ethanol addition amount on biomass

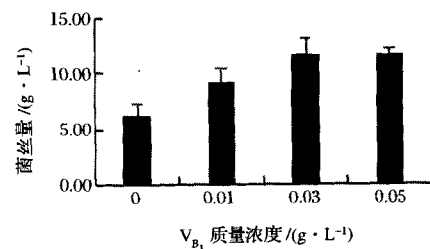


图6 V_{B1} 添加量对菌丝量的影响

Fig. 6 Effects of V_{B1} addition amount on biomass

2.1.4 发酵初始 pH 对菌丝量的影响

通过预实验发现发酵初始 pH 值为2或7时,蜜环菌基本不生长。初始 pH 对菌丝量的影响结果见图7。由图7可知蜜环菌适宜在偏酸性环境下生长,最适发酵初始 pH 值为3。

2.1.5 培养基正交实验结果

4 因素 3 水平正交实验结果见表2。由表2的极差 R 可知,影响菌丝量的主次因素为: D > C > B > A, 即 V_{B1} 浓度对蜜环菌菌丝的生长影响较大,其次是乙醇添加量和豆粕浓度,玉米粉浓度的影响最小。通过 K 值的大小可知,最优条件为: A₂B₁C₂D₂, 即玉

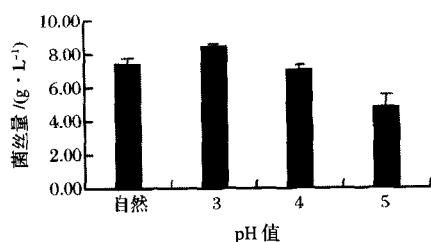


图7 初始 pH 对菌丝量的影响

Fig. 7 Effects of initial pH on biomass

米粉添加量为 60 g/L、豆粕为 20 g/L,乙醇添加量为 3 mL/L, V_{B_1} 添加量为 0.03 g/L。在此条件下进行摇瓶培养,菌丝量可达 17.67 g/L。

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

序号	A(玉米粉)/ (g · L ⁻¹)	B(豆粕)/ (g · L ⁻¹)	C(乙醇)/ (mL · L ⁻¹)	D(V_{B_1})/ (g · L ⁻¹)	菌丝量/ (g · L ⁻¹)
1	1	1	1	1	12.63
2	1	2	2	2	13.67
3	1	3	3	3	11.92
4	2	1	2	3	15.12
5	2	2	3	1	10.91
6	2	3	1	2	13.85
7	3	1	3	2	12.83
8	3	2	1	3	12.55
9	3	3	2	1	11.72
K_1	12.740	13.527	13.010	11.753	
K_2	13.293	12.377	13.503	13.450	
K_3	12.367	12.497	11.887	13.197	
R	0.926	1.150	1.616	1.697	

2.1.6 装液量对菌丝量的影响

装液量主要通过影响溶氧影响微生物的生长,其结果见图 8。

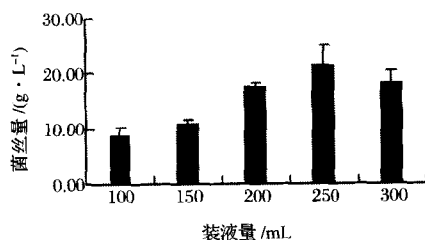


图8 装液量对菌丝量的影响

Fig. 8 Effects of media volume on biomass

由图 8 可知装液量在 100 ~ 150 mL 菌丝量随装液量的增加变化趋势不明显,当达到 250 mL 时菌丝量最大,故最佳装液量为 250/500 mL。

2.2 种子液摇瓶培养

基于优化好的蜜环菌最适培养基,接种 10% 的活化培养液于摇瓶种子培养基中,为了确定最优的移种时间,对其生长曲线进行测定,结果见图 9。由图 9 可知,经过 11 d 培养后,其种子液的菌丝量能达到 36.88 g/L。当摇瓶培养到第 6 天,此时蜜环菌处于生长对数期,菌丝量为 19.24 g/L,可作为下一级发酵培养的种子。

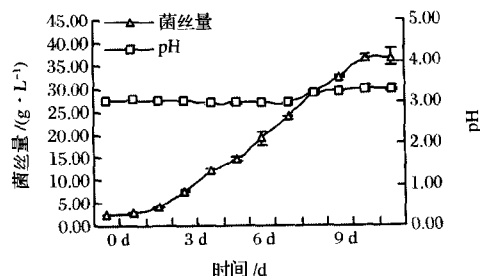


图9 摇瓶生长曲线

Fig. 9 Growth curve of shake flask

2.3 50 L 发酵罐分批培养

小试采用高浓度培养基,上罐发酵起泡现象严重,必须大量添加消泡剂,抑制了菌体的生长,此外 50 L 发酵罐工艺是针对种子的,其生物量并不需要最大,而是保证足够纯度和活力,因此上罐发酵培养基碳氮源含量减半。按 10% 的接种量接种处于生长对数期种子液于 50 L 发酵罐(装液量为 25 L) 28 °C 培养,转速为 160 r/min,通气量为 1.33 vvm,其生长曲线测定结果见图 10。由图 10 可知蜜环菌发酵培养 8 d 时,其菌丝量仍然可达 26.80 g/L。

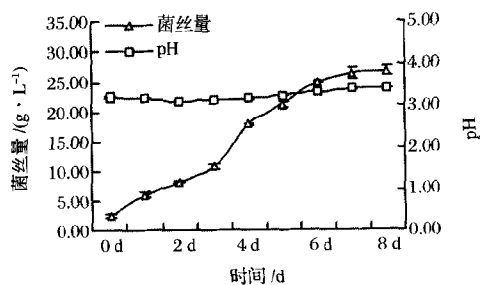


图10 50 L 发酵罐生长曲线

Fig. 10 Growth curve of 50 L fermentor

2.4 2 m³ 发酵罐补料培养

摇瓶种子液培养 6 d 后转入 200 L 种子罐(装液量为 100 L),接种量为 10%, 28 °C 培养,转速始终为 160 r/min,培养过程中通过对溶氧的控制,选择培养初期通气量为 0.47 vvm,72 h 后通气量为 0.80 vvm。

培养结果见图 11。由图 11 可知其最佳移种时间为第 6 天,此时菌丝量为 15.35 g/L,且处于生长对数期,转入 2 m³ 发酵罐培养,采用补料发酵工艺,补料发酵罐的起始培养基为 600 L,28 ℃ 培养,培养 24 h 菌丝量为 2.60 g/L,此时补料 100 L 发酵培养基,培养 48 h 菌丝量为 3.82 g/L,此时补料 100 L 发酵培养基,培养 72 h 菌丝量为 5.85 g/L,此时补料 100 L 发酵培养基,由于培养过程中转速过大时,其产生的剪切力不利于菌丝体的形成,故补料期间转速为 50 r/min,72 h 后转速为 80 r/min,通气量始终为 0.47 vvm。其培养菌丝量变化结果见图 12,补料发酵工艺主要是通过增加其相对接种量,培养前期进行补料发酵,使菌丝体大量积累,降低染菌风险,且使菌体保持一定生长活力,利于后期更大工业化生产研究。由图 12 可知,发酵培养 8 d 时,其菌丝量可达 22.65 g/L,且发酵液颜色变为红褐色,pH 开始上升,菌丝生长缓慢,即可终止发酵。

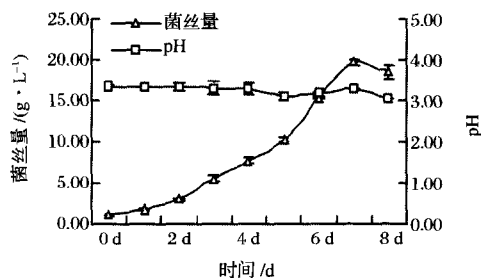


图 11 200 L 发酵罐生长曲线

Fig. 11 Growth curve of 200 L fermentor

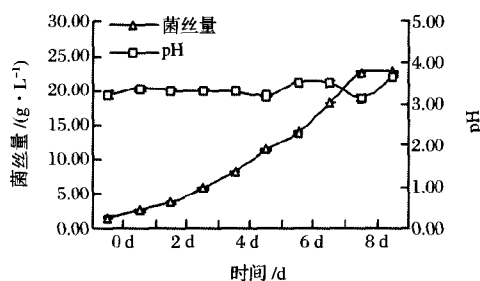


图 12 2 m³ 发酵罐生长曲线

Fig. 12 Growth curve of 2 m³ fermentor

3 结论

(1)通过单因素试验和正交试验,得出蜜环菌最适培养基为:玉米粉 60 g/L,豆粕 20 g/L,无水乙醇 3 mL/L, V_{B1} 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O

0.75 g/L、α-淀粉酶 0.1 g/L, pH 3.0。

(2)当摇瓶种子培养到第 6 天,此时处于生长对数期,可进行下一级发酵培养的孢子。50 L 发酵罐培养,转速为 160 r/min,通气量为 1.33 vvm,经过 8 d 培养,其菌丝量可达 26.80 g/L。

(3)以 200 L 发酵罐进行种子培养,转速始终为 160 r/min,培养初期通气量为 0.47 vvm,72 h 后通气量为 0.80 vvm,培养 6 d,其菌丝量为 15.35 g/L,转入下一级培养;2 m³ 发酵罐采用补料发酵的方式,28 ℃ 培养,补料期间转速为 50 r/min,72 h 后转速为 80 r/min,通气量始终为 0.47 vvm,发酵培养 8 d 时,其菌丝量可达 22.65 g/L,当发酵液颜色变为红褐色,pH 开始上升,菌丝生长缓慢,即可终止发酵。

参考文献

- [1] 程显好,郭顺星.蜜环菌子实体的诱导和发生条件[J].菌物学报,2006,25(2):302-307.
- [2] 顾雅君,张瑞英.蜜环菌发育[J].中国食用菌,2008(5):56-56.
- [3] 杨海龙.药用真菌深层发酵生产技术[M].北京:化学工业出版社,2009.
- [4] RADHIKA B, STRECKER R E, THAKKAR M M, et al. Adenosine and sleep-wake regulation[J]. Progress in Neurobiology, 2008,73(6):379-396.
- [5] 曲卫敏,孙宇,许奇,等.腺苷和睡眠觉醒调节[J].生物物理学报,2011(1):5-17.
- [6] DUNWIDDIE T V, WORTH T. Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1982, 220(1):70-6.
- [7] 吴镜湘,徐美英.腺苷心肌保护作用研究进展[J].中国心血管杂志,2002(5):364-366.
- [8] 王丽凤,综述,郑延松,等.腺苷在心血管疾病中的应用[J].中华现代临床医学杂志,2005,15:857-860.
- [9] 刘振丽,卞慕唐.脑心舒口服液镇静安眠作用的研究[J].中药新药与临床药理,1992(2):25-26.
- [10] 刘景圣,袁媛,田忠华.蜜环菌的活性成分研究及其在功能性食品中的应用[J].食品科学,2003,24(6):165-168.
- [11] 曹文琴,徐锦堂.蜜环菌子实体的液体培养[J].中药材,1992(11):3-4.
- [12] 谭周进,谢达平,王征,等.蜜环菌胞外多糖的发酵条件研究[J].微生物学通报,2002,29(3):33-37.
- [13] 程显好,刘林德,董洪新,等.蜜环菌菌丝体液体培养条件的优化[J].中药材,2007,30(5):509-512.
- [14] 刘景圣.蜜环菌催眠功能优良菌株筛选和发酵工艺优化研究[D].吉林:吉林农业大学,2005.

(下转第 197 页)

Aroma characterization of Cabernet sauvignon wine from Loess Plateau with quantitative description analysis and GC-O/MS

XI Yan-ru¹, TANG Ke¹, XU Yan^{1*}, WANG Dong^{1*},
WANG Qing-wei², ZHANG Hui-ning²

1 (Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; State Key Laboratory of Food Science & Technology;
Centre for Brewing Science and Enzyme Biotechnology, School of Biotechnology Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (Chateau Rongzi Company Ltd., Linfen 041000, China)

ABSTRACT Quantitative description analysis (QDA) was conducted to analyze two Cabernet sauvignon red wine from two different regions (TYP, SLP) of loess plateau slope. The aroma active compounds were extracted by liquid-liquid extraction (LLE) extraction. Gas chromatography - olfactometry (GC-O) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were adopted to identify aroma active compounds. 54 and 55 kinds of aroma compounds were respectively detected in these two cabernet sauvignon wines from loess plateau. The compounds with high aroma intensity ($FD \geq 81$) in TYP wine were ethyl acetate, ethyl lactate, ethyl caprate, 2, 3-butanedione, isobutyric acid, β -damascenone, trans-nerolidol, 3-(Methylthio) propanal, furfural, and β -butyrolactone. While, lactic acid ethyl ester, ethyl caprylate, 3-hydroxy ethyl butyrate, hexyl hexanoate, ethyl caprate, 2, 3-butanedione, acetic acid, isobutyric acid, butyric acid, citronellol, β -damascenone, trans-nerolidol, phenethyl acetate, phenethyl alcohol, 3-(Methylthio) propanal, and 3-methylthio-propanol and furfural made great contributions to aroma of SLP wine. QDA results showed that TYP Cabernet sauvignon wine had the aroma of black currant and dried prune and smoked. While SLP cabernet sauvignon wine was relative fruity, flowery and honey. This study provides basic data and theoretical basis for further study of the characteristics of Cabernet wine from Loess Plateau.

Key words The Loess Plateau; Cabernet sauvignon; gas chromatography-olfactometry (GC-O); gas chromatography mass spectrometry (GC-MS); aroma

(上接第 191 页)

Optimization of *Armillaria mellea* liquid fermentation medium and feed-batch fermentation technology

LIU Yu, GONG Si-hui, PENG Nan, GE Xiang-yang^{*}

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Through optimizing the *Armillaria mellea* liquid fermentation medium and 2 m³ fermentation tank production process, the optimum medium for *Armillaria mellea* was medium containing corn flour of 60 g/L, soybean powder of 20 g/L, ethanol of 3 mL/L, V_{B_1} of 0.03 g/L, KH_2PO_4 of 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ of 0.75 g/L, α -amylase of 0.1 g/L with the initial pH 3.0. The best breeding time for next step fermentation was 6 d. After fermentation in 50 L fermentor for 8 d, the biomass could reach 26.80 g/L. After fermentation in 200 L fermentor for 6 d, the biomass was 15.35 g/L. Fermentation can be moved to the next step at this point, 2 m³ fermentor with supplementary fermentation. After fermentation for 8 d, the biomass could reach 22.65 g/L.

Key words *Armillaria mellea*; culture medium; feed-batch fermentation; production technology