

羊肚菌的液体深层培养

武秋立 安家彦

(大连轻工业学院生物与食品工程学院 大连 116034)

**摘 要** 对羊肚菌菌丝体进行液体深层培养,以菌丝干重和胞外多糖得率为指标,确定了羊肚菌最佳液体种子培养基为:土豆 10%、蔗糖 3%、蛋白胨 0.1%、酵母膏 0.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%。羊肚菌发酵的最优培养基为:蔗糖 4%、麸皮 2%、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{MgSO}_4$  0.15%和酵母膏 0.5%。最优培养条件为:接种量 10%、摇床转速 180 r/min、温度 24℃、pH5.5。培养 5 d,菌丝产量可达 7.005 g/L,胞外多糖产量达 1.245 g/L。

**关键词** 羊肚菌 液体深层培养 菌丝体 胞外多糖

羊肚菌又名羊肚蘑、羊肚菜、阳雀菌等,属真菌中子囊菌亚门(Ascomycotina),盘菌目(Pezizales),羊肚菌科(Morchellaceae),羊肚菌属(*Morchella*)<sup>[1]</sup>。羊肚菌营养丰富,其氨基酸含量为各食用菌之首,羊肚菌多糖是其主要的有效成分之一,具有增强肌体免疫力,抗疲劳,抗病毒,抑制肿瘤等诸多作用<sup>[2,3]</sup>。

野生羊肚菌因气候、海拔、温度、湿度、土壤等环境因素影响,产量极少,价格十分昂贵<sup>[4]</sup>。但羊肚菌深层发酵不受环境因素的影响,易控制,效率高,价格便宜,适合工业化生产<sup>[4]</sup>。文中以菌丝得率和胞外多糖得率为衡量指标,采用正交试验和单因素水平对照试验方法,确定了在液态培养条件下,适合羊肚菌菌丝生长和多糖生成的种子培养基、发酵培养基及发酵培养条件,以期对羊肚菌的进一步研究提供必要的研究基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

羊肚菌 As5.620,由中科院微生物研究所提供。

1.2 原料处理

土豆汁:新鲜无芽土豆,去皮,切丝,加水煮沸 1 h,用 2 层纱布过滤,取汁。

黄豆芽汁:黄豆芽加水煮沸 30 min,过滤取汁。

麸皮、玉米粉、米糠:50℃温水浸泡 30 min,用 2 层纱布过滤,取汁。

1.3 培养基及培养方法

斜面培养基:采用 PDA 培养基,即 200 g 土豆的煮出滤汁 20 g 葡萄糖 3 g 蛋白胨 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  补水至 1 000 mL,加 20 g 琼脂。加热融化,装试管,121℃灭菌 30 min,在无菌室中斜面接种 As5.620 菌,22℃培养。

基本液体种子培养基:蔗糖 2%,酵母膏 0.5%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,pH5.5。500 mL 三角瓶每瓶装 200 mL,121℃灭菌 30 min。在无菌室中将活化的菌种接种到液体种子培养基中,22℃,180 r/min 摇床培养 3 d。

基本发酵培养基:4%蔗糖,0.5%酵母膏,0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.2%尿素,pH5.5(用 1 mol/L HCl 调节)。500 mL 三角瓶每瓶装 200 mL,121℃灭菌 30 min。在无菌室中用灭过菌的吸管吸取摇床培养的种子培养液 30 mL 加到 200 mL 发酵培养基中,22℃,180 r/min 摇床培养 5 d。

1.4 测试方法

1.4.1 羊肚菌胞外多糖的测定

取 30 mL 发酵液,3 000 r/min 离心 15 min。上清液中加入 3 倍体积的乙醇,放入冰箱冷冻室内,低温静置 12 h,3 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液。将沉淀溶于 20 mL 去离子水中,移至 1 000 mL 容量瓶中,用去离子水定容,再用硫酸-萘酚法测吸光值<sup>[5]</sup>,根据葡萄糖标准曲线计算出浓度。

1.4.2 菌丝得率的测定

取发酵液 30 mL,在 3 000 r/min 下离心 15 min,沉淀下来的菌丝用去离子水清洗 2~3 次,于 80℃下烘干 2 h 至干透,然后用分析天平称重。

干菌丝体得率(g/L)=  $\frac{m}{V} \times 1000$   
式中:m 为干菌丝体质量(g);V 为发酵液体积(mL)。

2 结果与讨论

2.1 发酵种子培养基的选择

发酵的种子液的质量直接影响发酵菌丝得率和多

第一作者 硕士研究生。  
收稿时间 2003-11-05

糖得率。因此 ,首先对种子液的培养条件进行选择 ,正交试验设计如表 1。酵母膏、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的浓度和培养方法按基本种子培养基。正交试验分析结果如表 2。方差分析结果如表 3。

表 1 种子培养的试验因素和水平

水 平	因 素		
	土豆 A/%	蔗糖 B/%	蛋白胨 C/%
1	0	1	0.1
2	10	2	0.2
3	20	3	0.3

由于种子培养的主要目的是得到一定量适用于接种的菌丝 ,因此 ,以菌丝得率为衡量种子培养基的主要指标。通过表 3 可以看出 ,蔗糖浓度对菌丝生长影响显著。表 2 表明 ,得到最大的菌丝干重的培养基为土豆 10%、蔗糖 3%、蛋白胨 0.1% ,其主次因素为蔗糖>土豆>蛋白胨。结合基本种子培养基确定优化种子培养基为 :土豆 10%、蔗糖 3%、蛋白胨 0.1%、酵母膏 0.5% ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% ,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05% ,pH5.5。利用优化种子培养基与基本种子培养基进行对照试验 ,

表 3 正交试验方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	F <sub>α</sub>	显著性
A	1.452	2	0.726	4.186	F <sub>0.05</sub> (2,4)=6.94	*
B	1.706	2	0.853	7.613	F <sub>0.01</sub> (2,4)=18.00	
C	0.060	2	0.030	0.174		
误差 e	0.633	2	0.317			
误差 e <sup>△</sup>	0.694	4	0.173			
总和	3.851	8				

3 个平行样取平均值 ,结果如表 4。

由表 4 可以看出 ,优化后 ,种子液菌丝得率提高了

表 4 基本种子培养和优化种子培养对照

对 照	试验结果	
	菌丝得率/(g·L <sup>-1</sup> )	菌丝生长情况
基本种子培养	1.087	菌丝缠绕成块 ,深棕色 ,不易接种
优化种子培养	2.621	菌丝分散成小球 ,有多个生长点 ,米黄色 ,易接种

表 2 各组分 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验的极差分析结果

试验号	因 素				菌丝得率 /g·L <sup>-1</sup>
	A	B	C	误差列 D	
1	1	1	1	1	0.375
2	1	2	2	2	0.631
3	1	3	3	3	0.860
4	2	1	2	3	0.782
5	2	2	3	1	1.372
6	2	3	1	2	2.620
7	3	1	3	2	1.141
8	3	2	1	3	0.807
9	3	3	2	1	1.809
k <sub>1</sub>	1.866	2.298	3.802	3.556	T = 10.397
k <sub>2</sub>	4.774	2.810	3.222	4.392	
k <sub>3</sub>	3.757	5.289	3.373	2.449	
$\bar{k}_1$	0.622	0.766	1.267		
$\bar{k}_2$	1.591	0.937	1.074		
$\bar{k}_3$	1.252	1.763	1.124		
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>		
R	0.969	0.997	0.193		
主次		B>A>C			

141.1% ,菌丝生长情况也明显好于基本种子培养。

2.2 发酵培养基及培养条件的选择

影响发酵培养的因素很多 ,如碳源、氮源、无机盐、生长因子、温度、pH 值、摇床转速、接种量等 ,因此采用单因素水平对照试验选出最佳碳源、氮源和辅助碳源及其最适浓度。

同样利用单因素水平对照试验对接种量、温度、pH 和摇床转速进行选择 ,以确定最佳培养条件。试验方案设计如表 5。

表 5 试验方案设计表

试验组号	因 素	试 验 号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	碳源/%	葡萄糖 4	蔗糖 4	玉米粉 4	麸皮 4	米糠 4	麦芽汁 4				
2	蔗糖/%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	辅助碳源/%	玉米粉 1	米糠 1	麸皮 1	空白 0						
4	麸皮/%	1	2	3	4	5	6				
5	氮源/%	黄豆芽 2	蛋白胨 0.2	尿素 0.2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.2					
6	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7			
7	接种量/%	5	10	15	20						
8	转速/r·min <sup>-1</sup>	210	180	100							
9	pH 值	4	5	6	7	8					
10	温度/℃	20	22	24	26	28					

以上 10 组试验只改变 1 种因素,其他与基本发酵培养相同,发酵培养到第 5 天结束,每种培养基设 3 个重复,分别以菌丝得率 and 多糖得率的平均值为衡量指标,结果如图 1~图 10。

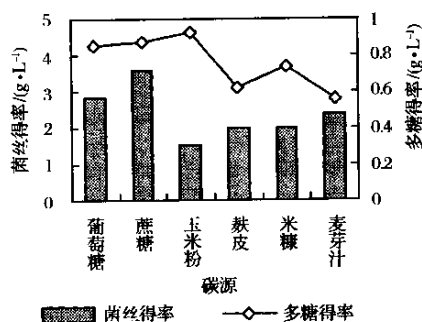


图 1 碳源对菌丝生长和多糖生成的影响

由碳源选择试验(图 1)可以看出,羊肚菌对普通的碳源都能利用。玉米粉对羊肚菌多糖生成有促进作用,但不利于菌丝的生长。在以葡萄糖、蔗糖为碳源的培养液中菌丝得率 and 多糖得率都比较高,但因为它们都是速效碳源,菌丝生长初期过于旺盛,而后期有自溶现象。因此选定蔗糖为基本碳源,在玉米粉、麸皮和米糠中选辅助碳源,同时第 4 号为空白对照样,即不加辅助碳源,结果如图 2 所示。可以看出,与不加辅助碳源的对照样相比,麸皮作为辅助碳源可明显促进羊肚菌菌丝及多糖的生成。

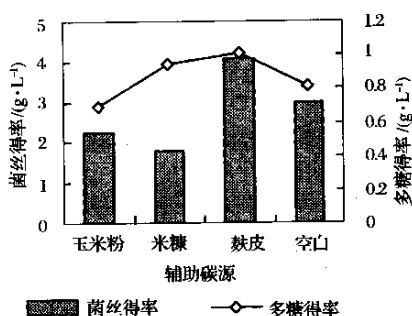


图 2 辅助碳源对菌丝生长和多糖生成的影响

图 3 和图 4 分别为蔗糖浓度和麸皮浓度的选择,由图可知,当蔗糖浓度 1%~4% 时,菌丝得率逐渐上升,5%~10% 时菌丝得率变化不明显,但当蔗糖浓度过高时,菌丝有明显自溶现象,而麸皮浓度为 2% 时,菌丝得率较高。以多糖生成为目的时,蔗糖在 3% 和 4% 时比较高,而麸皮在 2% 以上增加幅度不大,且从节省培养基用料等因素方面考虑,最终选定蔗糖浓度为 4%,麸皮浓度为 2%。并用食用蔗糖代替试剂蔗糖进行培养,获得了同样的培养结果。

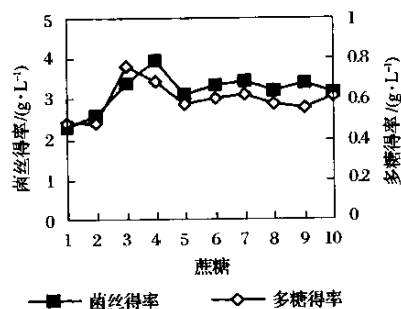


图 3 蔗糖浓度对菌丝生长和多糖生成的影响

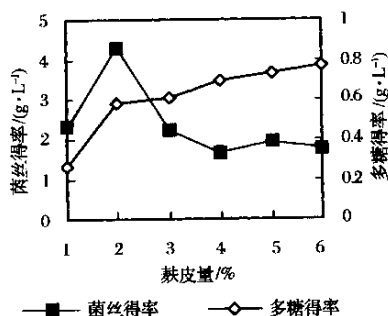


图 4 麸皮浓度对菌丝生长和多糖生成的影响

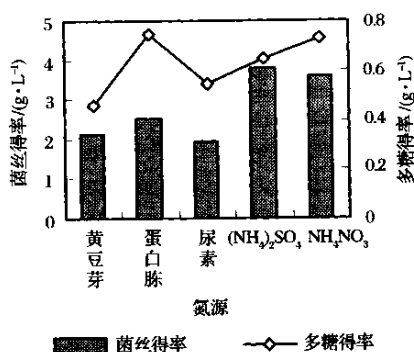


图 5 氮源对菌丝生长和多糖生成的影响

培养基氮源选择如图 5,有机氮源蛋白胨有利于多糖的生成,但菌丝产量低,若综合考虑菌丝和多糖,则选无机氮源  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  或  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  使培养基偏酸性不利于培养基的 pH 值保持稳定,因此选  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  做氮源。图 6 为  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  的浓度选择,当浓度为 0.2%~0.4% 时,菌丝得率比较高,0.5%~0.7% 时,菌丝量下降。而  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度为 0.3% 时,明显有利于多糖的生成。可以确定培养基氮源为 0.3% 的  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  较好。

图 7 为接种量的选择结果,接种量分别为 15% 和

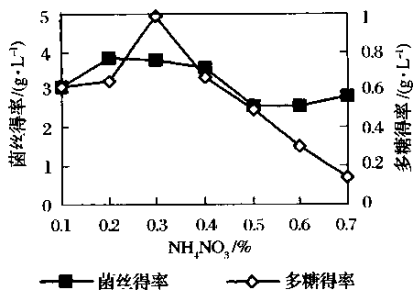


图6 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 浓度对菌丝生长和多糖生成的影响

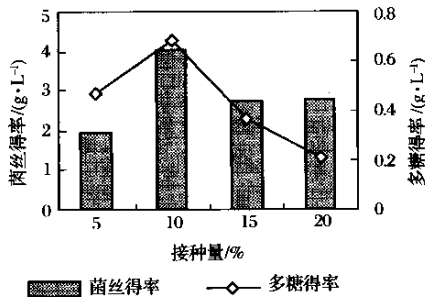


图7 接种量对菌丝生长和多糖生成的影响

20%时,发酵前期菌丝生长过于旺盛,培养基营养成分迅速消耗,导致发酵后期菌丝生长缓慢,不利于代谢产物多糖的生成。而接种量为10%时对菌丝和多糖有明显促进作用。摇床的转速对菌丝生长状态和菌丝球的形成有明显影响作用,转速慢时,菌丝趋于分散生长,特别在种子培养阶段,分散菌丝有利于形成更多新的生长点,但不利于通氧,因此菌丝生长缓慢;当转速过快时,菌丝缠绕过密,形成球、块,同样不利于生长。试验分快、中、慢3档,即210、180、100 r/min 分别进行培养,结果如图8。180 r/min 比较适合羊肚菌的菌丝生长,快速、中速对多糖影响不明显,但转速较低时,不利于多糖生成。因此,确定180 r/min 为最佳转速。

用2mol/L NaOH和2mol/L HCl 调节培养基的pH值分别为4、5、6、7、8,图9为5天发酵结束时的测定结果,pH5时可促进菌丝生长,pH6时有利于多糖生成,而培养基的自然pH值偏酸,约为5.5,因此采用培养基自然pH值5.5即可。

将已接种的摇瓶分别在20、22、24、26、28℃培养,结果发现羊肚菌在20~28℃内均能生长。发酵温度低,生长的较慢,在24~28℃时,羊肚菌菌丝生长的均较好,没有明显差别。胞外多糖在24℃时得率最高,温度过高,多糖得率反而下降。因此,确定羊肚菌最佳培养温度为24℃。

对于培养基无机盐KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和生长因子酵母膏的浓度采用正交试验选择。各因子的试验水平如表6。

表6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、酵母膏的因素水平表

水 平	因 素		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / %	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O/ %	酵母膏/ %
	A	B	C
1	0.05	0.05	0.2
2	0.1	0.1	0.5
3	0.15	0.15	0.8

表7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>和酵母膏的浓度选择正交表

试验号	因 素			试验结果	
	A	B	C	菌丝得率 /(g·L <sup>-1</sup> )	多糖得率 /(g·L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	3.583	0.396
2	1	2	2	6.655	0.789
3	1	3	3	7.519	0.641
4	2	1	2	5.099	0.802
5	2	2	3	4.475	1.104
6	2	3	1	4.625	0.34
7	3	1	3	6.119	0.745
8	3	2	1	6.682	0.258
9	3	3	2	5.923	0.403
菌 丝 干 重	K <sub>1</sub>	17.757	14.801	14.890	
	K <sub>2</sub>	14.199	17.812	17.677	
	K <sub>3</sub>	18.724	18.067	18.113	
	$\bar{K}_1$	5.919	4.934	4.963	
	$\bar{K}_2$	4.733	5.937	5.892	
	$\bar{K}_3$	6.241	6.022	6.038	
	优水平	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	
	R	1.508	1.089	1.074	
	主次	A>B>C			
	K <sub>1</sub>	1.826	1.943	0.994	
多 糖 得 率	K <sub>2</sub>	2.246	2.151	1.994	
	K <sub>3</sub>	1.406	1.384	2.49	
	$\bar{K}_1$	0.609	0.648	0.331	
	$\bar{K}_2$	0.749	0.717	0.665	
	$\bar{K}_3$	0.469	0.461	0.830	
	优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	
	R	0.280	0.256	0.499	
	主次	C>A>B			
	K <sub>1</sub>	1.826	1.943	0.994	
	K <sub>2</sub>	2.246	2.151	1.994	

由表7可以看出,以菌丝指标衡量最优为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,以多糖衡量为C<sub>3</sub>A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>,两者结合并根据主次顺序选A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.15%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%和酵母膏0.8%。但当酵母膏浸出汁浓度为0.8%时,培养出的菌丝呈棕色,而当浓度为0.5%时,培养出的菌丝呈米黄色,且菌丝香味更明显,所以选酵母膏浸出汁的浓度为

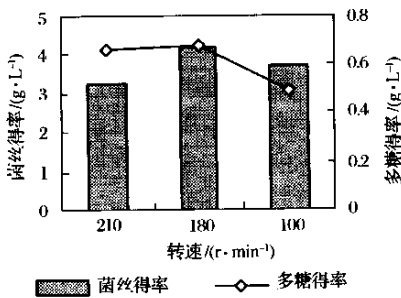


图8 转速对菌丝生长和多糖生成的影响

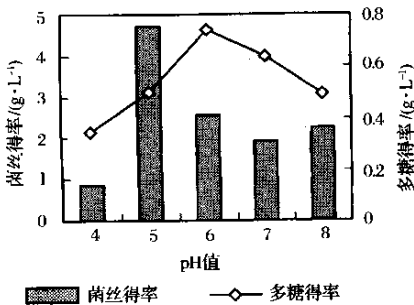


图9 pH值对菌丝生长和多糖生成的影响

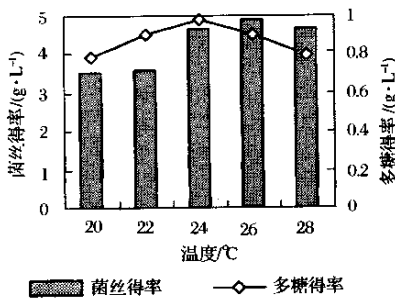


图10 温度对菌丝生长和多糖生成的影响

0.5%。

综上所述 羊肚菌发酵的最优培养基为 蔗糖 4%、  
麸皮 2%、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0.15%和酵母膏 0.5% 最优培养条件为 接种量 10%、

摇床转速 180 r/min、温度 24℃、pH 5.5。利用试验选出的  
最优种子及发酵培养基、培养条件与基本种子及发酵  
培养基、培养条件进行对照试验,发酵培养到第 5 天结  
束,每种培养基设 3 个重复,取平均值,结果如表 8。

表 8 基本培养基和优化培养基对照培养

对照	菌丝得率	多糖得率
基本培养	3.995 g/L	0.682g/L
优化培养	7.005 g/L	1.245 g/L
优化比基本增加率	75.3%	82.6%

可以说明,通过筛选所获得的羊肚菌液体深层培养  
基和培养条件确实有利于菌丝生长和多糖生成。

3 结 论

羊肚菌优化种子培养基为:土豆 10%、蔗糖 3%、蛋  
白胨 0.1%、酵母膏 0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0.05%。发酵的最优培养基为:蔗糖 4%、麸皮 2%、  
NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%和  
酵母膏 0.5% 最优培养条件为:接种量 10%、摇床转速  
180 r/min、温度 24℃、pH 5.5。对照试验结果显示,优化  
培养菌丝得率为 7.005 g/L,多糖得率为 1.245 g/L,菌丝  
得率比基本培养提高 75.3%,多糖得率提高 82.6%。

参 考 文 献

1 沙业雄. 羊肚菌的研究进展[J]. 食用菌, 1990, 12  
(2):3~4  
2 张广伦,张卫明,李 玉. 羊肚菌的研究与利用[J].  
中国野生植物资源, 1999, 18(1):1~3  
3 刘作喜,王永吉. 羊肚菌栽培新技术与深层发酵技  
术[J]. 中国野生植物资源, 1999(4):29~33  
4 孙晓明,吴素玲. 羊肚菌菌丝体深层发酵小试研究  
[J]. 江苏食品与发酵, 2000(2):4~8  
5 李 群. 蒽酮比色法测定羊肚菌多糖及试验评价  
[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(1):31~32  
6 龙正海. 羊肚菌的研究及其应用开发前景[J]. 中国  
生化药物杂志, 1997, 18(3):160~162  
7 Ower R. Notes on the development of the morel ascocarp:  
*Morchella esculenta*[J]. Mycologia, 1982, 74(1):142  
~143

2004 年中国油菜籽将增产 9%

据农业部市场预警系统监测,预计 2003 年全国油料种植面积比上年有所增加,油料产量呈增长态势,  
油料中油菜籽种植面积增加 1.5%,其中双低油菜面积占总面积的 69%,油菜籽产量增长 9%。

市场  
动态