

王殿振,贺晓龙,赵瑞华,等.红平菇液体培养条件的优化[J].江苏农业科学,2017,45(9):105-108.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.028

红平菇液体培养条件的优化

王殿振¹,贺晓龙^{1,2},赵瑞华^{1,2},房云云¹,任桂梅^{1,2},刘月芹¹

(1.延安大学生命科学学院,陕西延安 716000; 2.陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心,陕西延安 716000)

摘要:为了优化红平菇液体培养条件,更好应用于生产实践,本试验采用 Box-Behnken 中心组合试验和响应面分析法,以温度、pH 值、维生素 B₁ 含量为自变量,以红平菇菌丝体干质量为响应值进行了优化。先分别探究了不同因素对其生长的影响,确定最佳水平,然后采用响应面法拟合出最佳培养条件,最后结合实际验证得出了红平菇液体菌种的适宜培养条件。结果表明,红平菇液体培养适宜条件,培养温度为 32 ℃,pH 值为 6.0,维生素 B₁ 含量为 16.0 mg/L。在上述条件下,红平菇菌丝体干质量达 10.19 mg/mL,与方程预测 10.34 mg/mL 结果一致,比优化前 7.554 mg/mL 提高了 34.895%,表明所得模型有一定的生产实践指导意义。

关键词:红平菇;菌丝干质量;液体培养基;响应面

中图分类号:S646.1⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0105-04

红平菇(*Pleurotus djamor*),在真菌分类学上属于真菌门层菌纲伞菌目侧耳科侧耳属,别称红侧耳、桃红平菇^[1-3],是热带、亚热带地区木腐菌类,菌丝生长快,出菇早,产量高,子实体色泽鲜艳,味道鲜美,是一种“能吃能观赏”的珍稀蕈菌^[4]。红平菇子实体营养丰富,属于低脂肪、高蛋白的健康食品,纤维素含量达到 25% 以上^[5];含多种人体必需和非必需的氨基酸、维生素和矿物质,具有抗肿瘤、抗菌、提高机体免疫力等功能;产量与生物学效率高^[6-8]。

目前,红平菇虽然在国内已被广泛研究,1991 年,河北农业大学园艺系李明等从泰国曼谷农业大学引进了 1 株高温型 T-红平菇,通过 3 年的研究,掌握了该菌株的生物学特性,取得了一定的研究进展^[9]。赖万年曾进行过红平菇深层发酵培养的研究^[10],但关于红平菇液体培养方面的报道还很少,而相对于传统制种和栽培方式而言,液体培养技术具有不可比拟的优势,更容易满足大规模工厂化生产的需求,是食用菌产业化发展的必然趋势。本试验旨在通过对红平菇在不同维生素 B₁ 浓度、不同 pH 值、不同温度时应用响应面法进行液体培养条件的优化,为红平菇液体培养提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 红平菇菌种由延安大学生命科学学院食用菌实验室提供。

1.1.2 培养基 固体培养基:称取去表皮洋葱 200 g,切片,沸水煮 30 min,8 层纱布过滤,取滤液,加入已称量好的药品(葡萄糖 20 g、酵母膏 5 g、磷酸二氢钾 1.5 g、硫酸镁 0.5 g、维

生素 B₁ 10 mg、琼脂 15 g),加热搅拌溶解,定容,分装试管(8 mL/管),121 ℃灭菌 30 min,无菌检验,备用。

液体培养基:方法同上,去掉琼脂,配成后装入三角瓶(规格为 150 mL)中,50 mL/瓶,121 ℃灭菌 30 min,无菌检验,备用。

1.1.3 试剂 DNS 试剂:取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸和 262 mL 2 mol/L 的氢氧化钠溶液加到含 192 g 酒石酸钾钠的热溶液中,再加 5 g 苯酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加蒸馏水定溶至 1 000 mL,于棕色瓶中待用^[11]。

1 mg/mL 葡萄糖标准溶液:葡萄糖干燥至恒重,准确称取 1.00 g 葡萄糖,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化 将母种接种于斜面培养基中,于 25 ℃培养 8 d,制得活化菌株。

1.2.2 菌种培养 将活化后的菌种制成菌悬液,并且接种于液体培养基中,每瓶接种 1 mL,于 25 ℃、180 r/min 条件下恒温振荡培养。

1.2.3 生长曲线的绘制 葡萄糖标准曲线的绘制试验见表 1。以葡萄糖含量为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 1)。

还原糖含量测定:按表 2 添加试剂,摇匀,沸水浴 5 min,取出迅速放入冷水中,降到室温时,加蒸馏水定容至 25 mL,摇匀,测定吸光度 $D_{550\text{ nm}}$ 。

菌丝干质量的测定:滤纸烘干至恒质量,质量记为 m_1 ;每天取 3 个三角瓶,真空泵抽滤,得到菌丝体与菌液,菌液放在冰上用于还原糖的测定,菌丝与滤纸烘干至恒质量称量,质量记为 m_2 。 $m_2 - m_1$ 即为菌丝干质量。

根据还原糖含量的变化和菌丝干质量的变化绘制菌丝生长曲线。

1.2.4 单因素试验 温度对菌丝生长的影响:将菌悬液接种于液体培养基中,分别置于 20、25、30、35、40 ℃条件下培养,培养结束后测定还原糖和菌丝干质量,每个温度设 3 个重复。

pH 值对菌丝生长的影响:接种方法同上,pH 值设 5 个梯

收稿日期:2016-03-24

基金项目:延安大学博士科研计划(编号:YDBK2013-3);延安市科学技术研究发展计划(编号:2014CCZH-09)。

作者简介:王殿振(1989—),男,河南濮阳人,硕士研究生,主要从事应用微生物及食用菌学研究。E-mail:340680760@qq.com。

通信作者:赵瑞华,博士后,讲师,主要从事生物技术与食用菌研究。

E-mail:zhaohua506@sohu.com。

表 1 葡萄糖标准曲线的绘制

试管号	试剂 (mL)		
	葡萄糖标准液	蒸馏水	DNS
1	0.0	2.0	3.0
2	0.2	1.8	3.0
3	0.4	1.6	3.0
4	0.6	1.4	3.0
5	0.8	1.2	3.0
6	1.0	1.0	3.0
7	1.2	0.8	3.0
8	1.4	0.6	3.0
9	1.6	0.4	3.0
10	1.8	0.2	3.0

注:沸水浴 5 min,取出迅速放入冷水中,降到室温时,加蒸馏水定容至 25 mL,摇匀。1 号试管为空白对照,记录吸光度 $D_{550\text{ nm}}$ 。

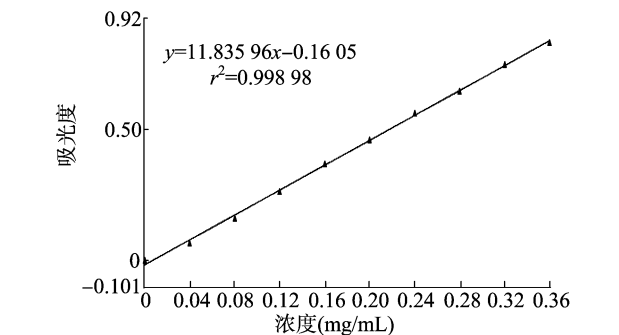


图1 葡萄糖标准曲线

表 2 还原糖含量的测定

试管号	试剂 (mL)		
	滤液	蒸馏水	DNS
1	0.0	2.0	3.0
2	0.1	1.9	3.0
3	0.1	1.9	3.0
4	0.1	1.9	3.0
5	0.1	1.9	3.0
6	0.1	1.9	3.0

注:1 号试管作为空白对照,测定其他试管的吸光度,然后取平均值记为还原糖含量,以后每天重复上述步骤。

度;pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,培养结束后测定还原糖和菌丝干质量,每个梯度设 3 个重复。

维生素 B₁ 浓度对菌丝体生长的影响:接种方法同上,维生素 B₁ 浓度设 5 个梯度,分别为 0、5、10、15、20 mg/L,培养结束后测定还原糖和菌丝干质量,每个梯度设 3 个重复。

1.2.5 响应面法优化试验 根据单因素试验结果,优化最佳条件的范围,采用 Box - Behnken 试验设计原理^[12],运用 Design Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平响应面试验,分别以影响最大的因素为自变量,菌丝干质量为响应值。Box - Behnken 试验因素水平见表 3。

2 结果与分析

2.1 红平菇基础试验

2.1.1 红平菇生长曲线 从图 2 可以看出,红平菇在培养后

表 3 试验因素水平及编码

水平	因素		
	A:温度(℃)	B:pH 值	C:维生素 B ₁ 含量(mg/L)
-1	A ₋₁	B ₋₁	C ₋₁
0	A ₀	B ₀	C ₀
+1	A ₊₁	B ₊₁	C ₊₁

2 d 开始生长,8 d 左右生长速率达到最大,10 d 菌丝干质量达到最大,菌丝干质量整体曲线呈增长趋势,继续培养菌丝体干质量基本保持不变,符合其生长规律。故确定红平菇液体培养最佳时间为 8 d。

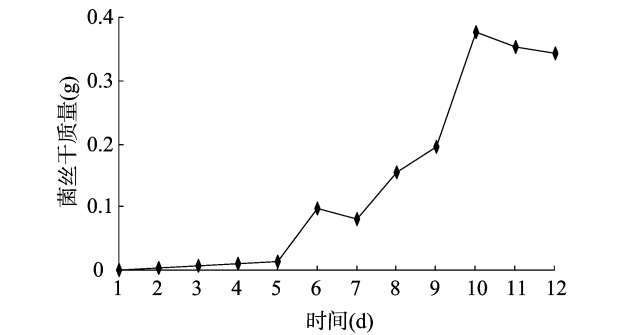


图2 菌丝干质量变化

2.1.2 红平菇还原糖含量测定 从图 3 可以看出,在前 2 d 还原糖含量呈下降趋势,这可能是培养基经高温灭菌后,某些淀粉类物质降解的还原糖为红平菇菌丝体的初期生长提供速效碳源,在 2 ~ 12 d,还原糖含量整体呈上升趋势,但在 4 d 时含量急剧下降,变化比较明显,可能是碳源物质的消耗和菌丝体数量的增长,使得培养后期还原糖含量下降。

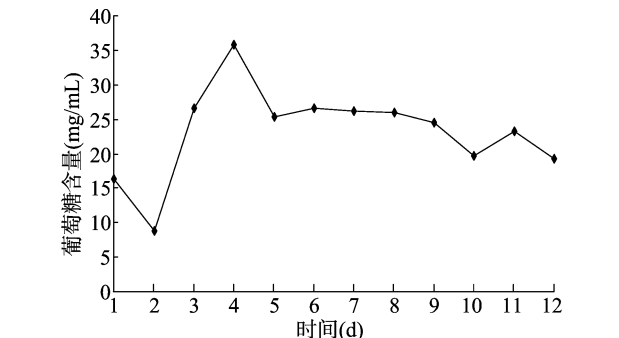


图3 葡萄糖含量变化

2.2 单因素试验

2.2.1 不同温度对红平菇菌丝体生长的影响 从图 4、图 5 可以看出,在温度为 20 ~ 35 ℃ 时,随着温度提高菌丝干质量呈上升趋势,还原糖含量呈下降趋势,可能是菌丝体生长旺盛,还原糖消耗较快;当温度高于 35 ℃ 时菌丝干质量下降,生长速度明显减慢,还原糖含量也开始上升,可能是菌丝体活力下降,还原糖消耗减慢。表明红平菇在温度为 35 ℃ 时生长最好。

2.2.2 不同 pH 值对红平菇菌丝体生长的影响 从图 6、图 7 可以看出,pH 值在 4 ~ 6 时,随 pH 值增加菌丝干质量呈上升趋势,还原糖含量呈下降趋势;pH 值为 6 时,菌丝干质量达到最大,还原糖含量也较低。pH 值在 6 ~ 8 时,菌丝干质量和还原糖含量都降低。表明红平菇最适 pH 值为 6。

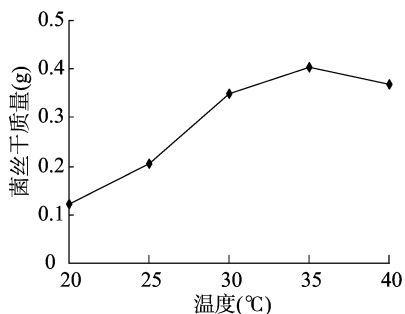


图4 不同温度对红平菇菌丝干质量的影响

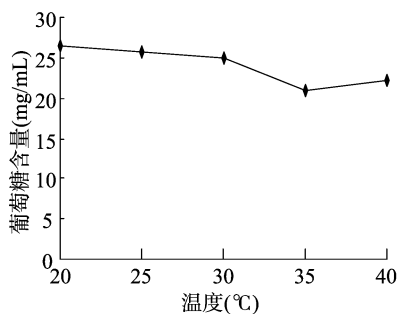


图5 不同温度对红平菇还原糖含量的影响

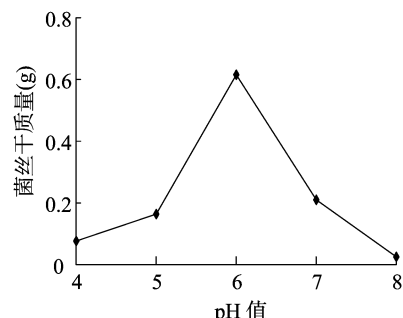


图6 不同 pH 值对红平菇菌丝干质量的影响

2.2.3 不同浓度维生素 B₁ 对红平菇菌丝体生长的影响 从图8、图9可以看出,维生素 B₁ 浓度为 0~15 mg/L 时,菌丝干质量随着维生素 B₁ 浓度的增加呈上升趋势,还原糖含量呈下

降趋势;浓度为 15~20 mg/L 时红平菇菌丝干质量下降,还原糖含量有所增加。试验结果表明,红平菇最适维生素 B₁ 浓度为 15 mg/L。

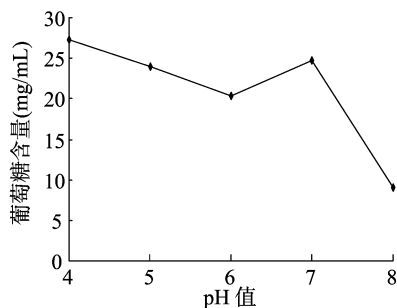
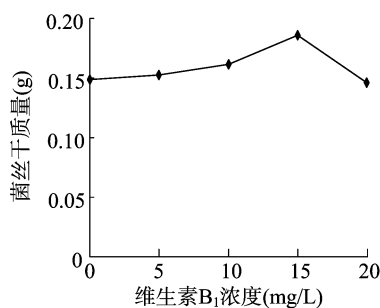
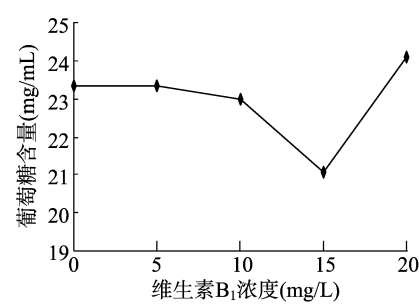


图7 不同 pH 值对红平菇还原糖含量的影响

图8 不同维生素 B₁ 浓度对红平菇菌丝干质量的影响图9 不同维生素 B₁ 浓度对红平菇还原糖含量的影响

2.3 响应面优化试验

2.3.1 Box - Behnken 设计方案及试验结果 在单因素试验结果基础上,根据 Box - Behnken 中心组合设计原理,以温度、pH 值、维生素 B₁ 含量为自变量,以红平菇菌丝干质量为响应值,进行响应面分析试验,试验设计及结果见表 4。

表 4 Box - Behnken 中心组合试验设计及结果

Std	Run	A: 温度(°C)	B: pH 值	C: 维生素 B ₁ (mg/L)	菌丝干质量(g/50 mL)
13	1	35	6.0	15	0.298
10	2	35	6.5	12	0.082
12	3	35	6.5	18	0.198
16	4	35	6.0	15	0.305
3	5	32	6.5	15	0.466
17	6	35	6.0	15	0.265
11	7	35	5.5	18	0.136
5	8	32	6.0	12	0.339
14	9	35	6.0	15	0.223
2	10	38	5.5	15	0.014
6	11	38	6.0	12	0.024
8	12	38	6.0	18	0.018
9	13	35	5.5	12	0.092
4	14	38	6.5	15	0.016
15	15	35	6.0	15	0.305
7	16	32	6.0	18	0.459
1	17	32	5.5	15	0.443

2.3.2 回归方差分析 由表 4 数据拟合的全变量编码水平的二次回归方程(1)菌丝干质量 = $-7.877\ 05 - 0.145\ 55A +$

$$3.020\ 82B + 0.358\ 61C - 3.389\ 50 \times 10^{-3}AB - 3.527\ 75 \times 10^{-3}AC + 0.011\ 944BC + 2.152\ 73 \times 10^{-3}A^2 - 0.255\ 17B^2 - 9.847\ 17 \times 10^{-3}C^2。$$

从表 5 可以看出,对红平菇菌丝干质量所建立的二次多项模型具有显著性;失拟项不显著($P=0.654\ 3>0.05$),表明回归方程拟合充分,可以用此模型对红平菇菌丝生长进行分析。显著性检验表明,温度对菌丝干质量极显著,维生素 B₁ 含量对菌丝干质量影响显著,pH 值对菌丝干质量影响显著,各因子对菌丝干质量的影响程度为: A(温度) > C(维生素 B₁) > B(pH 值)。各交互项按影响大小排序依次为 AC、BC、AB,表明不同因素对菌丝干质量的影响不是简单线性关系。

2.3.3 响应面分析 根据回归曲线作出的响应面曲面图和等高线图可直观地考察出不同因素对菌丝体干质量的影响,等高线图的形状反映出因素交互影响的强弱,椭圆形或马鞍形的等高线图表示交互影响显著,而圆形图则表示不显著,结果见图 10、图 11、图 12,温度与维生素 B₁ 的交互影响极显著,温度与 pH 值的交互影响显著,pH 值与维生素 B₁ 的交互影响不显著。

2.3.4 回归模型预测优化值 根据回归方程(1)分别求 3 个自变量的一阶偏导并查出对应真实值分别为 A = 32 °C、B = 6.09、C = 16.23 mg/L,菌丝干质量预测值为 10.28 mg/mL。

2.3.5 优化工艺条件的验证 考虑实际的可操作性,对优化工艺参数修正温度为 32 °C、pH 值为 6.00、维生素 B₁ 含量为 16.00 mg/L,对回归优化模型的条件进行验证,结果表明,菌丝干质量为 10.19 mg/mL,与方程预测一致,表明所得模型有一定的生产实践指导意义。

表 5 Box - Behnken 试验设计回归方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.400	9	0.045	43.07	<0.000 1	显著
A:温度	0.330	1	0.330	321.36	<0.000 1	
B:pH 值	7.476×10^{-4}	1	7.476×10^{-4}	0.72	0.424 4	
C:维生素 B ₁	9.339×10^{-3}	1	9.339×10^{-3}	8.99	0.020 0	
AB	1.034×10^{-4}	1	1.034×10^{-4}	0.099	0.761 6	
AC	4.032×10^{-3}	1	4.032×10^{-3}	3.88	0.089 5	
BC	1.284×10^{-3}	1	1.284×10^{-3}	1.24	0.303 1	
A ²	1.581×10^{-3}	1	1.581×10^{-3}	1.52	0.257 3	
B ²	0.017	1	0.017	16.49	0.004 8	
C ²	0.033	1	0.033	31.82	0.000 8	
误差	7.276×10^{-3}	7	1.039×10^{-3}			
失拟项	2.228×10^{-3}	3	7.425×10^{-4}	0.59	0.654 3	不显著
纯误差	5.048×10^{-3}	4	1.262×10^{-3}			
总和	0.410	16				

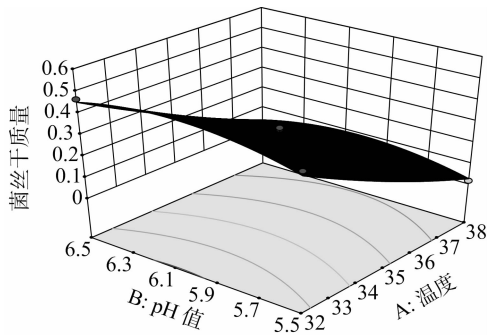


图10 温度和 pH 值影响菌丝干质量的曲面

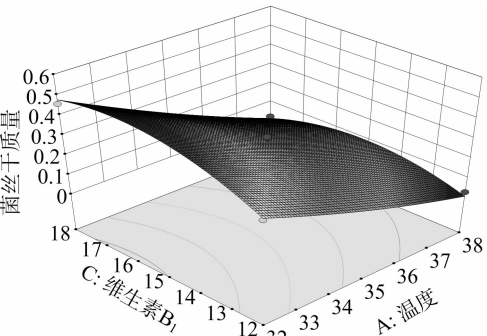


图11 温度和维生素 B₁ 对菌丝干质量影响的曲面

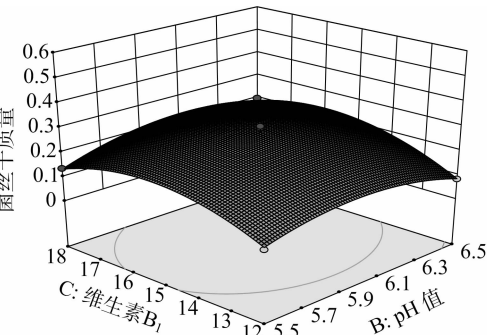


图12 pH 值和维生素 B₁ 对菌丝干质量影响的曲面

3 讨论

本试验采用响应面设计获得红平菇液体培养最优条件:培养温度为 32 ℃, pH 值为 6.0, 维生素 B₁ 含量为 16.0 mg/L。在最优条件下,红平菇菌丝干质量可达到了 10.19 mg/mL,比优化前 7.554 mg/mL 提高了 34.895%。试验结果表明,在红平菇液体菌种培养的过程中,响应面法能有效地优化培养条件。

国内外不少学者通过响应面分析法在培养基优化方面取得了良好效果。本试验通过响应面分析,以菌丝干质量为响应值,采用回归拟合方程,并通过方差分析获得了最佳培养条件,为今后红平菇液体培养提供了技术依据。

参考文献:

[1] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京:科学出版社,1998:2-3.
[2] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京:农业出版社,1988.
[3] 常明昌. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:121-124.
[4] 黄年来. 18 种珍稀美味食用菌栽培[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
[5] 张其昌,黄谚谚,赖万年,等. 红平菇 RQ-1 营养成分分析[J]. 食用菌,1995(4):12.
[6] 刘智会. 红平菇液体菌种栽培技术和营养成分分析与多糖提取工艺[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2006.
[7] 柳会珍. C903 红平菇家庭式菌种制作技术[J]. 今日科技,1996(10):9-10.
[8] 周伟峰. 红平菇的人工栽培[J]. 中国食用菌,2000,12(6):24-25.
[9] 李明,哈保茹,刘殿林. T-红平菇生物学特性的研究[J]. 食用菌,1995(4):18-19.
[10] 赖万年. 红平菇的深层发酵培养及其色氨酸的测定[J]. 闽西职业大学学报,2000(3):50-51.
[11] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.
[12] Liang R J. Optimization of extraction process of *Glycyrrhiza glabra*, polysaccharides by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers,2008,74(4):858-861.