

赵 洪,李 静,向 旭,等. 红汁乳菇菌丝体液体发酵条件的优化研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(14):167-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.14.030

红汁乳菇菌丝体液体发酵条件的优化研究

赵 洪¹, 李 静¹, 向 旭¹, 高礼安², 邓功成¹

(1. 黔南民族师范学院生物科学与农学院, 贵州都匀 558000; 2. 黔南民族师范学院旅游与资源环境学院, 贵州都匀 558000)

摘要:采用液体发酵技术和正交试验方法,研究碳源、氮源、起始 pH 值和发酵时间等发酵条件对红汁乳菇菌丝体干质量的影响,并对发酵条件进行优化。结果表明,红汁乳菇菌丝体液体发酵条件的较优组合为碳源为马铃薯粉,浓度为 3%;氮源为酵母膏,浓度为 0.3%;起始 pH 值为 6.0;发酵时间 5 d。在 27 °C 条件下,该组合菌丝体干质量最高,为 10.094 g/L。

关键词:红汁乳菇;菌丝体;液体发酵;工艺优化;正交试验

中图分类号: S646.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)14-0167-03

红汁乳菇(*Lactarius hatsutake*),别称紫菌、松毛菌,属担子菌亚门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)红菇科(Russulaceae)乳菇属(*Lactarius*)大型真菌^[1]。红汁乳菇为菌根食用菌,目前尚不能人工栽培。红汁乳菇菌丝体可以与马尾松等植物形成菌根^[2],对松树的生长有促进作用,可提高松树抗环境胁迫能力已得到普遍认同。有研究者对红汁乳菇子实体的生境及发生规律开展了调查和研究^[3-5],对其子实体的营养成分进行了测定^[6]。笔者所在研究团队对红汁乳菇菌丝体的营养特性和单因子生长条件等进行了研究^[7-8]。采用液体发酵技术是获得红汁乳菇菌丝体和发酵产物的重要手段,探索液体发酵条件对红汁乳菇菌丝体生长的影响,可为大规模的菌丝体生产提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 红汁乳菇由黔南民族师范学院微生物实验室提供。

1.1.2 培养基 PDA 培养基配方:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。完全培养基(液体)配方:葡萄糖 2.000%,蛋白胨 0.200%,磷酸二氢钾 0.046%,磷酸氢二钾 0.100%,硫酸镁

0.050%,维生素 B₁ 0.003 mg/100 mL,pH 值 6.5。液体种子培养基配方同 PDA 培养基,但不加琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 种子制备 斜面种子(一级种)制备:将采集的新鲜子实体带回实验室,采用组织分离法获得母种,经转接获得一级种。液体种子制备:用 250 mL 三角瓶,装入 100 mL 液体种子培养基,在无菌条件下接入约 5 mm × 5 mm 红汁乳菇一级种 1 块,置于恒温振荡培养箱内,于 27 °C,150 r/min 条件下培养 5 d,制成液体菌种。

1.2.2 红汁乳菇菌丝体液体发酵单因子试验

1.2.2.1 红汁乳菇菌丝体的生长曲线 用 250 mL 三角瓶作培养容器,装入 100 mL 完全培养基,常规高压灭菌后,在无菌条件下接入 10 mL 液体菌种,置恒温振荡培养箱内,于 27 °C,150 r/min 条件下培养,接种培养 1 d 后,每天取 3 瓶,测量菌丝体干质量和发酵液的 pH 值。

1.2.2.2 碳源筛选试验 分别用山梨醇(单糖),麦芽糖、蔗糖(双糖),玉米粉、马铃薯粉(多糖)代替完全培养基中的葡萄糖,筛选不同碳源对红汁乳菇菌丝生长的影响。试验共设 6 个处理(包括葡萄糖),3 次重复。

1.2.2.3 氮源筛选试验 分别用酵母膏、尿素、甘氨酸(有机氮),氯化铵、硫酸铵、硝酸铵(无机氮)代替完全培养基中的蛋白胨,筛选不同氮源对红汁乳菇菌丝生长的影响。试验共设 7 个处理(包括蛋白胨),3 次重复。

1.2.2.4 发酵起始 pH 值试验 采用完全培养基,设置 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 等 6 个处

收稿日期:2019-08-23

基金项目:贵州省科学技术基金[编号:黔科合 LH 字(2014)7425]。

作者简介:赵 洪(1968—),男,贵州瓮安人,副教授,主要从事生态学教学和环境生态及资源开发研究。E-mail:732140126@qq.com。

理,3 次重复,用 10% NaOH 和 10% HCl 调节 pH 值,观测不同发酵起始 pH 值对红汁乳菇菌丝生长的影响。

1.2.3 菌丝体液体发酵条件优化试验 根据单因子试验的结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[9],优化液体发酵条件。

1.2.4 试验测定方法 发酵液用涤纶布过滤,放入 60 ℃ 电热恒温干燥箱内烘 48 h,用电子天平称量菌丝的干质量;用精密 pH 试纸、pHS-25A 型数字酸度计同时测定发酵液的 pH 值。

2 结果与分析

2.1 红汁乳菇菌丝体液体发酵单因子试验结果

2.1.1 红汁乳菇菌丝体的生长曲线 以培养时间为横坐标,菌丝干质量为纵坐标绘制菌丝体的生长曲线。由图 1 可以看出,红汁乳菇菌丝体的生长过程,基本上与种群在有限环境中连续增长的逻辑斯谛曲线相符合^[10],1~2 d 为增长的开始期,2~3 d 为加速期,5~7 d 为饱和期,5 d 时菌丝干质量最高。因此,其菌丝体的液体培养时间为 5 d 即可。

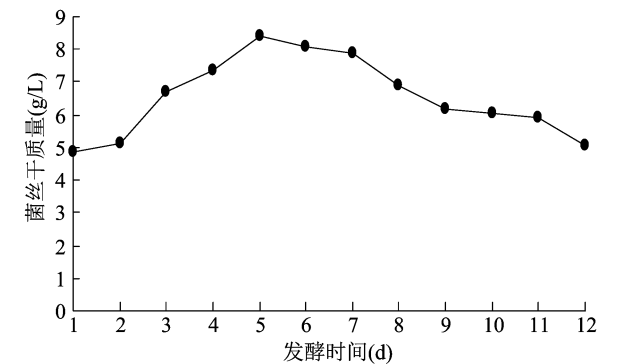


图1 红汁乳菇菌丝体生长曲线

液体发酵体系中 pH 值随发酵时间的延长,由发酵初始时的 6.5 降至 4 左右(图 2),这可能是发酵代谢过程中产生的有机酸导致的。

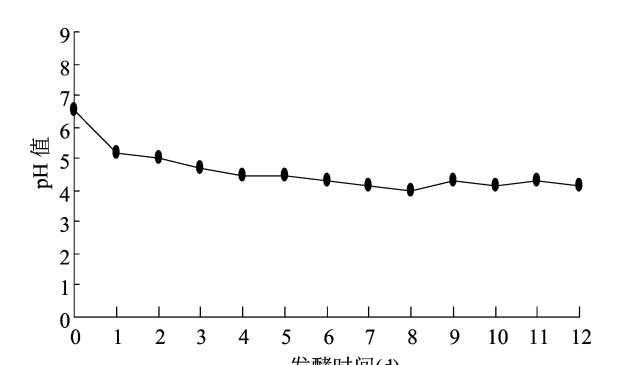


图2 红汁乳菇菌丝体发酵体系中的 pH 值变化曲线

2.1.2 碳源对红汁乳菇菌丝体生长的影响 由表 1 可知,红汁乳菇菌丝体对碳源的利用较广,单糖、双糖和多糖都可以利用。在供试的碳源中,对葡萄糖的利用最好,发酵液菌丝干质量最高,达 8.082 g/L;其次为马铃薯粉,发酵液菌丝干质量为 7.391 g/L;山梨醇最差。对不同供试碳源处理的菌丝干质量进行方差分析可知,葡萄糖与麦芽糖、蔗糖、山梨醇等碳源差异显著,但与马铃薯粉、玉米粉没有显著差异,若进行规模化生产,从经济成本考虑可选择马铃薯粉或玉米粉作为红汁乳菇菌丝体液体发酵的碳源。

表 1 不同碳源对红汁乳菇菌丝体干质量的影响

碳源	发酵终止 pH 值	菌丝干质量(g/L)
葡萄糖	4.3	8.082 Aa
马铃薯粉	4.2	7.391 ABab
玉米粉	4.5	6.196 ABab
麦芽糖	4.2	5.413 ABb
蔗糖	4.3	5.352 ABb
山梨醇	4.3	4.851 Bb

注:数据后不同大小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。表 2、表 3 同。

2.1.3 氮源对红汁乳菇菌丝体生长的影响 由表 2 可知,红汁乳菇菌丝体对供试的有机氮和无机氮都能利用。在供试的氮源中,对酵母膏的利用最好,发酵液菌丝干质量达 7.155 g/L,其次为蛋白胨,对甘氨酸的利用最差。对不同供试氮源处理的菌丝干质量进行方差分析可知,供试的有机氮和无机氮的一些种类之间,发酵液的菌丝干质量差异不显著,表明红汁乳菇菌丝体对氮源的利用较广泛。

表 2 不同氮源对红汁乳菇菌丝体干质量的影响

氮源	发酵终止 pH 值	菌丝干质量(g/L)
酵母膏	4.2	7.155 Aa
蛋白胨	3.8	6.813 ABa
硝酸铵	4.3	5.630 ABab
氯化铵	4.5	5.461 ABab
硫酸铵	3.8	5.168 ABab
尿素	4.2	4.102 ABb
甘氨酸	4.2	3.739 Bb

2.1.4 发酵起始 pH 值对红汁乳菇菌丝体生长的影响 由表 3 可知,红汁乳菇菌丝体对发酵环境的 pH 值适应范围较广,液体发酵的起始 pH 值在 3.0~8.0 都能生长。培养 6 d 后,发酵起始 pH 值

为 5.0 的处理菌丝体的干质量最大,为 7.283 g/L。这说明红汁乳菇菌丝体在中性或偏酸性的环境中生长较好。

表 3 不同发酵起始 pH 值对红汁乳菇菌丝体干质量的影响

起始 pH 值	发酵终止 pH 值	菌丝干质量 (g/L)
5.0	4.0	7.283 Aa
6.0	4.0	7.227 Aa
7.0	4.2	6.805 Aab
8.0	4.2	6.393 Aab
4.0	3.5	4.831 Ab
3.0	3.3	4.688 Ab

2.2 红汁乳菇菌丝体液体发酵条件优化

根据单因子试验结果,综合考虑原料的成本,试验选择马铃薯粉作为碳源,酵母膏作为氮源。选择马铃薯粉浓度(A)、酵母膏浓度(B)、pH 值(C)、发酵时间(D)等 4 因子进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,用菌丝体干质量作为评价指标,对红汁乳菇菌丝体液体发酵进行优化,试验设计见表 4。

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表

水平	因子			
	A	B	C	D
1	1%	0.1%	5	5 d
2	2%	0.2%	6	6 d
3	3%	0.3%	7	7 d

从表 5 可以看出,处理 9 发酵条件组合的菌丝体干质量最高。表明菌丝液体发酵较为优化的发酵条件为 $A_3B_3C_2D_1$,即碳源马铃薯粉浓度为 3%,氮源酵母膏浓度为 0.3%,起始 pH 值为 6.0,发酵时间 5 d。碳源马铃薯粉 $R=4.552$,为最大,表明碳源对液体发酵菌丝体干质量的影响较其他发酵因子大,是影响红汁乳菇菌丝体液体发酵干质量的关键性因子。

3 结论与讨论

红汁乳菇菌丝体液体发酵对碳源的利用较广,葡萄糖是供试碳源中菌丝干质量最高的碳源,符合真菌对碳营养需求的一般特征,本试验以马铃薯粉、玉米粉作供试碳源,虽菌丝干质量没有葡萄糖高,但经统计分析其与葡萄糖无显著差异,若进行规模化生产,从经济成本考虑可选择马铃薯粉或玉米粉作红汁乳菇菌丝体液体发酵的碳源。红汁乳

表 5 优化 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

处理	A	B	C	D	菌丝干质量 (g/L)
1	1	1	1	1	4.735
2	1	2	2	2	3.470
3	1	3	3	3	3.605
4	2	1	2	3	8.633
5	2	2	3	1	7.303
6	2	3	1	2	6.734
7	3	1	3	2	6.964
8	3	2	1	3	8.409
9	3	3	2	1	10.094
k_1	3.937	6.777	6.626	7.377	
k_2	7.557	6.394	7.399	5.723	
k_3	8.489	6.811	5.957	6.882	
R	4.552	0.417	1.442	1.655	

菇菌丝体对氮源的利用较广泛,对供试的有机氮和无机氮都能利用,对酵母膏的利用最好,其次为蛋白胨,可用它们作为红汁乳菇菌丝体液体发酵的氮源。红汁乳菇菌丝体对发酵环境的起始 pH 适应范围较广,但菌丝体在中性或偏酸性的环境中生长较好,说明红汁乳菇菌丝体充分适应了我国南方酸性的土壤环境。

研究表明,红汁乳菇菌丝体液体发酵条件的较优组合为马铃薯粉作碳源,浓度为 3%;酵母膏作氮源,浓度为 0.3%;起始 pH 值为 6.0;发酵时间为 5 d。在 27 ℃ 温度条件下,菌丝体干质量最大,达 10.094 g/L。

参考文献:

- [1] 刘润进,陈应龙. 菌根学[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [2] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京:农业出版社,1993.
- [3] 刘建成,陈先玉,李文艺. 湘西红汁乳菇的分布及生态研究[J]. 中国食用菌,1995,14(6):36-37.
- [4] 罗惟希,廖洪初,万伍华,等. 赣西红汁乳菇生态调查[J]. 食用菌,2005(4):7-8.
- [5] 李 刚,李玲玲. 资兴市红汁乳菇生态调查[J]. 中国食用菌,1995,14(3):19-20.
- [6] 邓百万,杨海洲,李志洲,等. 红汁乳菇子实体营养成分的测定与分析[J]. 食用菌学报,2004,11(1):49-51.
- [7] 赵 洪,邓功成. 红汁乳菇菌丝体营养特性研究[J]. 食用菌,2008,30(6):9-10.
- [8] 邓功成,赵 洪,高礼安,等. 红汁乳菇菌丝体液态发酵条件研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):238-240.
- [9] 李春喜,王志和,王林文. 生物统计学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2000.
- [10] 牛翠娟. 基础生态学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2015.