

黑木耳液体深层发酵培养基的筛选

于海洋, 王延锋*, 史磊, 潘春磊, 盛春鸽, 王金贺, 刘姿彤, 张鹏, 董雪梅

(黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 黑龙江牡丹江 157041)

摘要 为了得到更多的发酵产物, 采用单因素分析和正交实验, 研究黑木耳在发酵过程中营养成分对菌丝体形态、生物量及多糖含量的影响。结果表明, 最佳碳源为葡萄糖; 最佳氮源为酵母浸膏; 添加无机盐效果更佳。在以上条件下进行黑木耳液体深层发酵, 所获得的生物量及多糖含量最高。

关键词 黑木耳; 发酵; 营养条件; 培养基

中图分类号 S646.6 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)08-0046-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Screening of Submerged Fermentation Medium of *Auricularia heimuer*

YU Hai-yang, WANG Yan-feng, SHI Lei et al (Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

Abstract To get more fermentation products, the single factor analysis and orthogonal test were applied to explore the best conditions for fermentation of black fungus. The effects of nutrient components on mycelium morphology, biomass and polysaccharide contents in the process of *Auricularia heimuer* fermentation were studied. The results showed that the best carbon source was glucose, the best nitrogen source was yeast extract, and the effect of adding inorganic salt was more obvious. When conducting deep black fungus fermentation under these conditions, biomass and total income of polysaccharide contents were both the highest.

Key words *Auricularia heimuer*; Fermentation; Nutritional conditions; Culture medium

黑木耳^[1] (*Auricularia heimuer* F, Wu, B.K.Cui & Y.C.Dai) 又名木耳、云耳、树耳、树蕈、黑耳等, 属担子菌纲 (Basidiomycetes), 主要分布在东亚地区, 我国大多生长在北方, 子实体呈褐色, 光滑或略有褶皱, 通过固体栽培得到的子实体或液体发酵所获得的菌丝体中均含有蛋白质、多糖等大量活性物质, 具有增强机体免疫功能、补血、补脑、抗衰老、抗凝血和抑制肿瘤生长等保健效果和药用功效^[2-3], 也因此获得“素中之荤”的美誉^[4-5]。

笔者利用 100 L 生物反应器 (发酵罐) 进行黑木耳液体种深层发酵培养试验, 选取影响液体发酵的生长营养因子, 研究不同因子对黑木耳液体发酵培养的菌丝体生物量及胞外粗多糖含量的影响, 筛选确定黑木耳液体发酵的最佳培养基配方, 为黑木耳液体发酵的研究及液体菌种的应用推广提供理论基础和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株。黑木耳 (*Auricularia heimuer*) 品种为“牡丹江 2 号”, 由黑龙江省农业科学院牡丹江分院选育、保藏、提供。

1.1.2 试剂。葡萄糖、麦芽糖、琼脂均购自天津市永大化学试剂有限公司; 可溶性淀粉、硫酸铵、氯化铵、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、蔗糖均购自天津市化学试剂供销公司; 蛋白胨购自天津市英博生化试剂有限公司; 酵母浸膏购自天津市永大化学试剂有限公司; 无水乙醇、 KH_2PO_4 等其他试剂均为分析纯; 红糖、马铃薯、豆饼粉、麦麸、玉米粉等均购自农贸市场。

基金项目 现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-20); 中央引导地方科技发展专项资助项目 (ZY16B08, ZY18C08)。

作者简介 于海洋 (1986—), 女, 黑龙江牡丹江人, 研究实习员, 硕士, 从事食 (药) 用菌遗传育种研究。* 通信作者, 研究员, 博士, 从事食 (药) 用菌遗传育种、栽培与菌渣综合利用研究。

收稿日期 2018-11-13

1.1.3 仪器。SW-CJ-2F 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); SPX-150BⅢ生化培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); YXQ-LS-100A 全自动立式电热压力蒸汽灭菌器 (济南来宝医疗器械有限公司); YP1201N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); 101A-S 型数显不锈钢电热鼓风干燥箱 (上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司); FSYC-1 回旋式振荡器 (大连富森科技有限公司); FS-100 液体菌种培养器 (大连富森科技有限公司); 其他试验设备为一般常规仪器。

1.1.4 培养基。PDA 培养基: 马铃薯 200 g (去皮), 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 mL, 121 ℃ 灭菌 30 min; 种子培养基: 葡萄糖 2.00%, 蔗糖 1.00%, 蛋白胨 0.30%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, 维生素 B₁ 微量, 121 ℃ 灭菌 30 min; 发酵培养基: 葡萄糖 3.00%, 蛋白胨 0.30%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, 维生素 B₁ 微量, 121 ℃ 灭菌 30 min。

1.2 试验方法

1.2.1 种子培养。将活化的斜面菌种分割成小块在无菌条件下接种至种子液培养基中, 1 000 mL 锥形瓶装液量为 400 mL, 25 ℃, 160 r/min 培养 7 d^[6]。

1.2.2 液体发酵培养。将发酵培养完全的种子液以 10% 的接种量接种至 250 mL 的液体发酵培养基中, 锥形瓶装液量为 100 mL, 25 ℃, 160 r/min 培养 7 d^[7]。

1.2.3 菌丝体的收集。用 4 层纱布过滤发酵培养达到终点的培养液, 获取菌丝体, 用蒸馏水重复清洗菌丝体 3 次, 静止 30 min, 105 ℃ 恒温干燥箱烘干至恒重, 分析天平称重^[8]。

1.2.4 胞外粗多糖的测定。将发酵液过滤后真空浓缩至原体积的 1/5, 加入发酵液 3 倍体积的无水乙醇后放入 4 ℃ 冰箱静置 24 h 取出放置离心机中 4 000 r/min 离心 5 min 得沉淀, 将沉淀冷冻干燥得粗多糖, 计算胞外粗多糖得率^[9]。

1.2.5 发酵罐培养试验。菌种于 25 ℃ 条件下火焰法接入发酵罐中,发酵罐培养前空消 60 min,实消 50 min,100 L 发酵罐装液量为 90 L 发酵培养基,加入 0.01% 消泡剂通气量为 0.5~1.0 V/V · min,加热功率 7 850 W,25 ℃ 条件下无菌培养 8 d,对发酵终点的培养基生物量、粗多糖等测定^[10]。

1.2.6 正交试验(培养基配方优化试验)。以葡萄糖、酵母浸膏、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O 4 个因素采用 L₉(3⁴) 设计进行正交试验^[12]。根据单因素培养规律,黑木耳粗多糖含量随着生物量的增加而增大,因此正交试验以生物量为指标对培养基的组成及各组分之间的比例,营养成分进行优化(表 1)。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and level of L ₉ (3 ⁴) orthogonal experiment				
水平 Level	因素 Factor			
	葡萄糖 Glucose %	酵母浸膏 Yeast extract %	MgSO ₄ ·7H ₂ O %	KH ₂ PO ₄ %
1	2.00	0.20	0	0
2	3.00	0.30	0.05	0.05
3	4.00	0.40	0.10	0.10

2 结果与分析

2.1 不同碳源对黑木耳液体发酵菌丝体生物量及胞外粗多糖量的影响 由图 1 可知,葡萄糖、红糖、可溶性淀粉、麦芽糖、蔗糖等不同碳源对黑木耳液体发酵菌丝体生物量和粗多糖含量的影响存在明显差异,以葡萄糖作为唯一碳源时,黑木耳液体发酵的生物量和胞外粗多糖量均能达到最高,其次为蔗糖和麦芽糖,这与前人结果保持一致^[11]。因此,确定葡萄糖为黑木耳液体发酵培养基的最佳碳源。

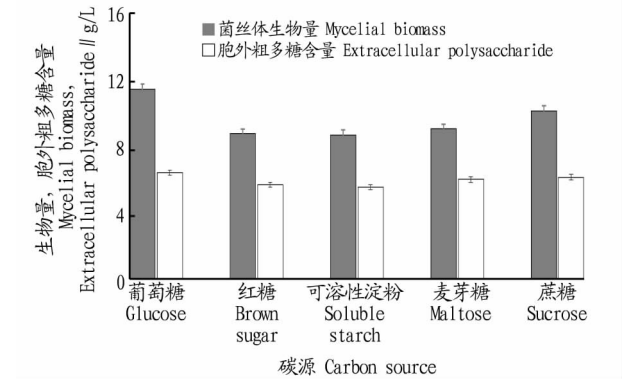


图 1 碳源对黑木耳菌丝体生物量和胞外粗多糖量的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on biomass and extra-cellular polysaccharide of *Auricularia heimuer* mycelia

2.2 不同氮源对黑木耳液体发酵菌丝体生物量及胞外粗多糖量的影响 由图 2 可知,以 3.00% 葡萄糖作为碳源,以蛋白胨、酵母浸膏、麸皮、豆饼粉、硫酸铵、氯化铵等为不同氮源对黑木耳液体发酵菌丝体生物量和胞外粗多糖含量都具有一定的促进作用,添加有机氮源的菌丝球直径和分散程度明显优于添加无机氮源。其中,以酵母浸膏作为氮源时,黑木耳菌丝体生物量和胞外粗多糖含量均能够达到最高,豆饼粉、蛋白胨作为氮源略低。以硫酸铵、氯化铵作为氮源时的生物量和粗多糖含量明显最低。

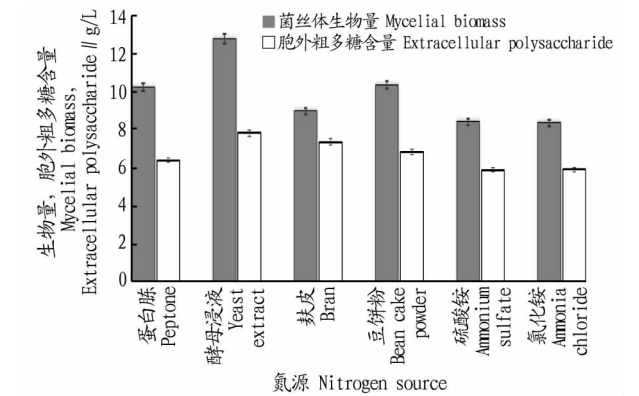


图 2 氮源对黑木耳菌丝体生物量和胞外粗多糖量的影响

Fig.2 Effects of different nitrogen sources on biomass and extra-cellular polysaccharide of *Auricularia heimuer* mycelia

2.3 无机盐对黑木耳液体发酵菌丝体生物量及胞外粗多糖量的影响 由表 2 可知,在确定了黑木耳液体发酵培养的最佳碳源、最佳氮源的条件下,以不添加 MgSO₄·7H₂O 和 KH₂PO₄ 为对照,测定不同含量无机盐对黑木耳液体发酵生物量和胞外粗多糖含量的影响。结果表明,添加少量无机盐能够促进黑木耳液体发酵菌丝体的生长和胞外粗多糖含量的积累。

表 2 无机盐对黑木耳菌丝体生物量和胞外粗多糖量的影响

Table 2 Effects of Inorganic salt on biomass and extracellular polysaccharide of *Auricularia heimuer* mycelia

试验编号 No. of experiment	MgSO ₄ ·7H ₂ O %	KH ₂ PO ₄ %	菌丝体生物量 Mycelial biomass g/L	胞外粗多糖含量 Extracellular polysaccharide g/L
1	0.05	0.05	12.78	7.35
2	0.05	0	12.69	7.08
3	0	0.05	12.73	7.17
4(CK)	0	0	12.71	7.01

2.4 正交试验结果 由表 3 可知,极差分析葡萄糖对黑木耳液体发酵培养的影响最大,其次为硫酸镁,酵母浸膏对培养基组分的影响最小,多重比较分析得出 4、6 号处理的液体发酵培养基配比最合理,并且差异不明显。但由于酵母浸膏对菌丝体的生长影响最小,因此确定 4 号处理为最佳配比,最终确定黑木耳培养基的最佳培养基配方为葡萄糖 3.00%,酵母浸膏 0.20%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,KH₂PO₄ 0.10%,利用黑木耳最佳培养基配方进行液体深层发酵培养,获得生物量为 13.11 g/L,胞外粗多糖含量为 7.86 g/L,将发酵液作为液体菌种接种到三级菌袋中观察发现,36 h 后菌丝萌发。

3 结论与讨论

黑木耳对碳源的利用率相较于其他因素更为广泛,单糖、双糖、多糖均能够被利用,葡萄糖作为单糖被利用的效果最明显,生物量和粗多糖含量均能达到最高,这说明黑木耳在液体发酵的过程中对小分子单糖、双糖的利用率高于结构复杂的多糖;黑木耳在发酵过程中对有机氮源的利用率高于单一的无机氮源,这有可能是因为有机氮源中含有大量的有

机化合物,水解后更易被吸收,更易合成细胞中的蛋白质和核酸,这与其他食用菌液体发酵培养的生长规律一致^[13-14]。试验中酵母浸膏作为氮源的利用率效果最好,其次为豆饼粉、蛋白胨、麸皮。在工业生产中,考虑到成本等问题,可以选取麸皮、豆饼粉等氮源代替酵母浸膏或按照一定比例添加作为复合氮源使用;无机盐在黑木耳液体发酵的过程中起到调节渗透压、氧化还原电位等作用,添加少量的无机盐能够促进菌丝体和多糖的形成。

表 3 正交试验结果与分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal experiments					
处理编号 Number of treatment	因素 Factor				菌丝体生物量 Mycelial biomass g/L
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	11.94 cB
2	1	2	2	2	12.63 bA
3	1	3	3	3	12.61 bA
4	2	1	2	3	13.07 aA
5	2	2	3	1	12.74 bA
6	2	3	1	2	12.88 abA
7	3	1	3	2	12.73 bA
8	3	2	1	3	12.64 bA
9	3	3	2	1	12.71 bA
K ₁	37.18	37.74	37.46	37.39	
K ₂	38.69	38.01	38.41	38.24	
K ₃	38.08	38.20	38.08	38.32	
k ₁	12.39	12.58	12.49	12.46	
k ₂	12.90	12.67	12.80	12.75	
k ₃	12.69	12.73	12.69	12.77	
R	0.503	0.150	0.317	0.310	

注:多重比较采用 Duncan 新复极差法;同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),同列不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),相同字母表示差异不显著
Note:Duncan's new multiple range method was adopted for multiple comparisons;different small letters in the same column indicated significant differences($P<0.05$);different capital letters in the same column indicated highly significant differences($P<0.01$);the same letters in the same column indicated no differences

食用菌液体发酵技术随着理论基础和应用技术研究的深入已经取得了一定的进展,在液体培养过程中能够产生与

子实体相同的生理活性物质,与此同时却能够缩短生长周期。利用液体发酵技术获得的菌丝体无论是作为菌种进行工业化生产还是直接用来制备药物、保健品等都具有一定的发展前景。目前,像松茸等一些没有被驯化的野生菌可以通过液体发酵的方式获得菌丝体和代谢产物,以此来弥补因为子实体缺乏而停滞对这些野生菌的开发利用,黑龙江省农业科学院牡丹江分院食用菌研究所与牡丹江友邦科技股份有限公司正在合作开展相关研究。因此,液体发酵技术今后在医疗、保健、科研等方面都具有广阔的应用前景和发展潜力^[15]。

参考文献

[1] 吴芳,戴玉成.黑木耳复合群中种类学名说明[J].菌物学报,2015,34(4):604-611.
[2] SHANG D J,LI Y,WANG C,et al.A novel polysaccharide from Se-enriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells[J].Oncology reports,2011,25(1):267-272.
[3] WU Q,TAN Z P,LIU H D,et al.Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice[J].International journal of biological macromolecules,2010,46(3):284-288.
[4] 李玉.中国黑木耳[M].长春:长春出版社,2001.
[5] 李超,李红,张敏.黑木耳液体培养基配方优化[J].北方园艺,2017(16):170-173.
[6] 柴新义,倪赞鹏,于士军,等.黑木耳菌丝体液体发酵富硒条件优化及其多糖抗氧化活性[J].浙江农业学报,2017,29(11):1903-1911.
[7] 乔双连,彭林,丁重阳,等.液体发酵条件对灵芝菌体形态及胞外多糖活性的影响[J].食品与生物技术学报,2014,23(10):1070-1076.
[8] 刘建荣,顾雅君,张瑞英.黑木耳的富硒发酵[J].河北省科学院学报,2014,31(3):63-67.
[9] 张晓娜,李云波,鲁云凤,等.产紫杉醇内生真菌和食用菌液体发酵多糖含量比较研究[J].食品科技,2017,42(5):185-187.
[10] 王谦,冀宏,汪虹,等.香菇的发酵研究及相关检测[J].食用菌学报,1999,6(1):1-4.
[11] 孔祥辉,张弛,马庆芳,等.黑木耳液体菌种发酵条件的研究[J].中国食用菌,2003,22(6):36-39.
[12] YOON S J,YU M A,PYUN Y R,et al.The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin[J].Thrombosis research,2003,112(3):151-158.
[13] 柴新义,王四宝,樊美珍.杨树菇深层液体发酵培养基及培养条件的优化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(11):117-120.
[14] 谢意珍,周静文,李崇.黑木耳液体发酵条件的优化及发酵物的降血脂功能[J].食用菌学报,2008,15(2):47-50.
[15] 王谦,刘敏,李天月.食用菌液体菌种培养技术的研究与应用[J].医学研究与教育,2011,28(6):62-65.
[30] 刘昭,韩继刚,李晓青,等.‘凤丹’种子成熟过程中脂肪酸的累积规律[J].经济林研究,2015,33(4):75-80.
[31] 马雪情,刘春洋,黄少峻,等.牡丹籽粒发育特性与营养成分动态变化的研究[J].中国粮油学报,2016,31(5):71-75,80.
[32] 李晓青,刘庆华,刘昭,等.不同地区凤丹种子含油率和脂肪酸组成分析[C]//张启翔.中国观赏园艺研究进展(2013).北京:中国林业出版社,2013:15-18.
[33] LIU Y A,KING D J,ZIBRIK D,et al.Decreasing linoleic acid with constant α -linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men[J].The journal of nutrition,2007,137(4):945-952.
[34] 苏杭.亚油酸和 α -亚麻酸的摄入比例对体内炎症因子及高度不饱和脂肪酸合成通路的影响[D].无锡:江南大学,2018.

(上接第 45 页)

[24] 徐恒恒,黎妮,刘树君,等.种子萌发及其调控的研究进展[J].作物学报,2014,40(7):1141-1156.
[25] OHLROGGE J B.Design of new plant products:Engineering of fatty acid metabolism[J].Plant Physiol,1994,104(3):821-826.
[26] 王晓晨.小球藻油脂积累的影响条件及油脂提取方法的研究[D].广州:华南理工大学,2013.
[27] 陈俊杰,汤佳,陈辉,等.油茶优良无性系‘闽43’和‘闽60’果实发育过程中油脂积累规律的研究[J].热带作物学报,2016,37(11):2133-2137.
[28] 张凌云,王小艺,曹一博.油茶果实糖含量及代谢相关酶活性与油脂积累关系分析[J].北京林业大学学报,2013,35(4):55-60.
[29] 单秀峰,徐方旭.低温贮藏对甜玉米采后生理品质的影响[J].沈阳师范大学学报(自然科学版),2015,33(4):507-510.