

黑木耳液体菌种发酵条件的研究^{*}

孔祥辉, 张介弛, 马庆芳, 戴肖东, 张丕奇, 韩增华, 朴万华

(黑龙江省科学院 应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘要: 研究了黑木耳液体菌种最佳生产配方和最适生产条件。结果表明: 黑木耳深层发酵培养液碳源以葡萄糖为最好; 氮源以 8% 麸皮汁为最好, 其次为 0.10% ~ 0.15% 的蛋白胨; 微量元素含量为 0.1% ~ 0.3% 的 KH_2PO_4 , 0.1% ~ 0.15% MgSO_4 ; pH 值 5.0 ~ 6.0; 摇瓶装量 50 ~ 70ml/250ml 三角瓶; 摇床转速 140r/min。培养基正交实验结果表明最佳培养基配方为葡萄糖 3%, 麦麸汁 8%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.15%, 土豆汁 20%, VB_1 0.01%。

关键词: 黑木耳; 液体菌种; 发酵条件

中图分类号: S646.6 **文献标识码:** A

文章编号: 1003-8310 (2003) 06-0036-04

本文主要针对黑木耳液体菌种, 从培养基碳源、氮源、微量元素及 pH 值等方面筛选适宜的培养基配方, 从培养时间、摇瓶转速、培养液装量、接种量及所采用菌种形式等方面选择适宜的黑木耳液体菌种生产条件, 为黑木耳液体种的应用推广提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黑木耳 (*Auricularia auricula*) 黑 29 菌株。CPDA 斜面一级菌种; 液体种专用种, 均由黑龙江省科学院应用微生物研究所食用菌研究室提供。

1.1.2 培养基 基本培养基 (MM): 土豆汁 20%, KH_2PO_4 0.3%, MgSO_4 0.15%, VB_1 0.01%;

碳源筛选试验培养基: MM + 蛋白胨 0.15% + 碳源 2%; 氮源筛选试验培养基: MM + 葡萄糖 2% + 氮源 0.15% (其中麸皮汁作为氮源, 通过以往实验证明其最佳浓度为 8%); 微量元素含量试验培养基: 葡萄糖 2% + 蛋白胨 0.15% + 土豆汁 20% + VB_1 0.01% + 不同配比的微量元素; 常规培养基: MM + 蛋白胨 0.15% + 葡萄糖 2%。培养液装量试验、pH 值试验、摇瓶转速试验及还原糖、总糖、氨态氮含量测定试验等均采用常规培养基。培养液装量为 70ml/250ml 三角瓶; 自然 pH 值; 摇床转速 140r/min。正交实验培养基设计采用四因子

三水平正交表。

1.2 接种及培养 配好的培养基 70ml 装于 250ml 三角瓶中, 8 层纱布盖口, 121℃ 湿热灭菌 30min。凉后接种, 将 0.5cm² CPDA 斜面一级种 (厚 2mm) 划成 9 个小块接入, 先静止培养 48h, 适当摇动, 然后在 25℃, 140r/min 回旋式摇床摇动培养 7d。液体菌种专用种发酵接种量为发酵液的 1.2% (/), 接种后直接摇动培养 (140r/min)。

1.3 分析方法

1.3.1 菌丝量的测定: 培养液用 150 目滤网过滤, 清水冲洗三次, 收集菌丝球于 105℃ 恒重, 电子天平称重精确至 0.001g。每种培养基接种十瓶, 结果取平均值。

1.3.2 残糖测定: 采用斐林试剂法^[4]

1.3.3 氨态氮的测定: 采用甲醛法^[5]

1.3.4 pH 值测定: 用数字型 pH 自动测定仪 HANNA 测定

2 结果与分析

2.1 碳源筛选试验 碳源选择试验结果见图 1。黑木耳菌丝对碳源的利用比较广泛, 以葡萄糖为碳源最好, 其次是玉米粉、小麦粉、蔗糖和麦芽糖。纤维素为碳源较差, 木屑为碳源最不理想, 玉米粉为碳源较粘稠, 透气性差。

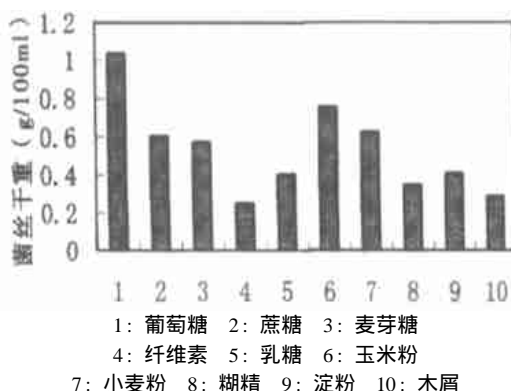


图 1 碳源选择试验

* 黑龙江省科学院基金重点项目 (项目编号 01BFCAZIC10)

收稿日期: 2003-03-27

2.2 氮源筛选试验 由图2可见, 麸皮汁 8% 作为氮源效果最好, 菌球收率高, 比蛋白胨为氮源菌丝收率高 80%。尿素, 酵母粉略次于蛋白胨, 硫酸胺为氮源最差。

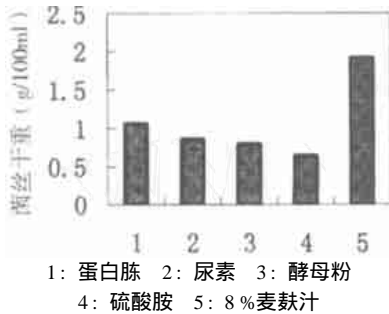


图2 氮源选择试验

2.3 微量元素含量试验 由图3可见, 磷酸二氢钾含量在 0.1% ~ 0.3% 之间, 硫酸镁在 0.1% ~ 0.3% 之间菌丝生长都比较旺盛, 而磷酸二氢钾含量若在 0.1% 以下, 硫酸镁含量在 0.05% 以下则不能充分满足菌丝生长的营养需求, 菌丝生物量较低。若磷酸二氢钾含量高于 0.2%, 硫酸镁含量高于 0.1%, 菌丝生物量已不再升高。

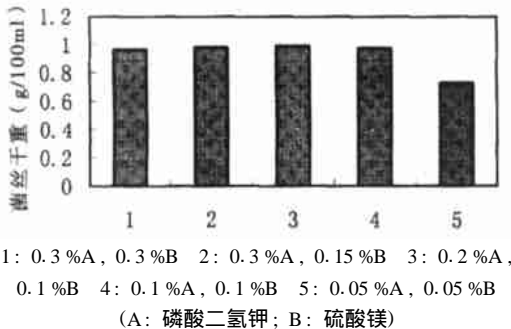


图3 微量元素的含量对菌丝生长的影响

2.4 液体培养基装量对菌丝生长的影响 由图4可见, 三角瓶装液量对菌丝生长量的影响较大, 250ml 三角瓶中装液 35 ~ 70ml 之间菌丝生长量大, 在此范围内变动, 菌丝收率并没有太大的影响。装液多于 70ml, 氧气不足, 菌丝生长受到抑制, 菌丝生物量下降。

2.5 摇瓶转速对菌丝生长的影响 由图5可见, 摇瓶转速在 140r/min - 220r/min 之间, 可以提供菌丝生长所需的溶解氧, 对菌丝生长比较有利。但是在 140r/min 增加到 220r/min, 菌丝收率增长幅度不

大, 从运转成本考虑, 140r/min 较为适宜。

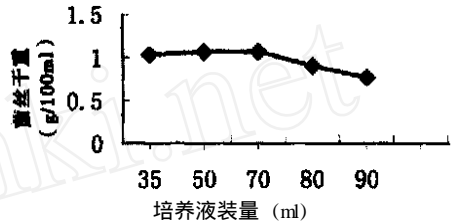


图4 培养液装量对菌丝生长的影响

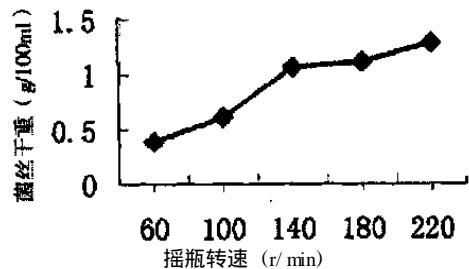


图5 摇瓶转速对菌丝生长的影响

2.6 培养液 pH 对菌丝生长的影响 其结果见图6。培养液 pH 值在 4.5 ~ 6.0 之间, 菌丝生长比较快, 而当 pH > 6.5 以后随着 pH 的增加, 菌丝生物量迅速下降, 由此可以确定黑木耳液体发酵的最适 pH 值为 5.0 ~ 6.0。

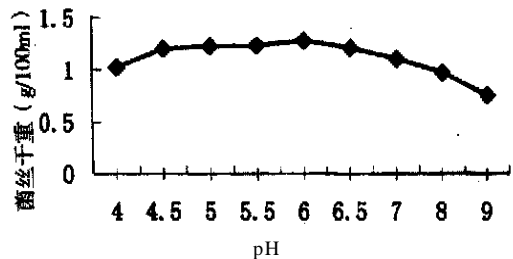


图6 培养液 pH 对菌丝生长的影响

2.7 培养基正交实验 采用正交设计法 $L_9(3^4)$ 表进行实验 (发酵条件: 25℃, 摇瓶转速 r/min, 培养液装量 70ml/100ml 三角瓶, 自然 pH, 发酵时间为 7d)

由 R 值可确定以上 4 因素影响液体发酵的顺序为 A > B > D > C, 可以看出在黑木耳液体菌种的发酵过程中, 碳源是最主要的营养因素, 其次为氮源。

表1 实验因子和水平

因子	A	B	C	D
水平	葡萄糖	麦麸汁	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	1 %	2 %	0.1 %	0.05 %
2	2 %	5 %	0.2 %	0.1 %
3	3 %	8 %	0.3 %	0.15 %

表2 各组分L₉ (3⁴) 正交实验结果

因子	A	B	C	D	菌丝干重
水平	葡萄糖	麦麸汁	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	(g/100ml)
1	1	1	1	1	0.751
2	1	2	2	2	1.119
3	1	3	3	3	1.471
4	2	1	2	3	1.187
5	2	2	3	1	1.656
6	2	3	1	2	1.857
7	3	1	3	2	1.502
8	3	2	1	3	2.122
9	3	3	2	1	2.217
	3.341	3.440	4.730	4.624	T = 11.665
	4.700	4.897	4.523	4.478	μ = T/9 = 1.296
	5.841	5.545	4.629	4.780	
/3	1.113	1.146	1.576	1.541	
/3	1.566	1.632	1.508	1.493	
/3	1.947	1.848	1.543	1.593	
R	0.834	0.702	0.033	0.100	

最佳方案: A₃B₂C₁D₃ 其次是: A₂B₂C₃D₁

由 R 值可确定以上 4 因素影响液体发酵的顺序为 A>B>D>C

2.8 液体种发酵液中还原糖、总糖、氨基氮的含量及菌丝生物量的测定

2.8.1 CPDA 斜面种发酵液中还原糖、总糖含量及菌丝生物量的变化, 见图 7。

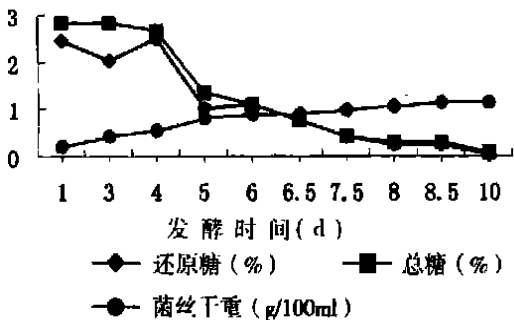


图7 CPDA 斜面种液体发酵过程中还原糖、总糖含量及菌丝生物量

2.8.2 液体种专用种发酵液中还原糖、总糖、氨基氮含量及菌丝生物量的变化, 见图 8。

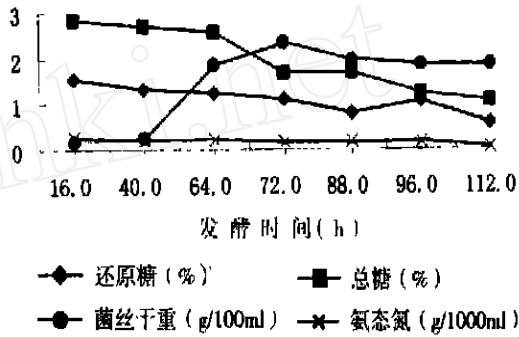


图8 液体菌种专用种发酵过程中还原糖、总糖、氨基氮含量及菌丝生物量

发酵过程中菌丝生长最旺盛的时期也是还原糖、总糖含量下降最快的时期, 说明菌丝生物量的增加与糖消耗同步进行, PDA 斜面种液体发酵 5d, 菌丝生物量增加最多, 同时糖消耗也是最快的时期, 为最佳收获时间。液体专用种液体发酵在 64 ~ 72h 糖消耗最快, 其菌丝生物量于 72h 达到最大值, 以后有轻微的下降趋势, 表明用液体专用种发酵生产液体菌种的最佳收获时间为 72h, 超过 88h 后菌丝收率下降, 而糖含量及氨基氮含量略有上升, 说明菌丝有自溶现象。

3 结论

黑木耳深层发酵培养基碳源以葡萄糖为最好; 氮源以麸皮汁为最好; 培养基正交实验结果表明最佳培养基配方为葡萄糖 3%, 麦麸汁 8%, KH₂PO₄0.1%, MgSO₄0.15%, 土豆汁 20%, VB₁0.01%, pH 值 5.0 ~ 6.0; 摇瓶装量 50 ~ 70ml/250ml 三角瓶; 摇床转速 140r/min。采用液体种专用种, 以此最佳发酵条件发酵, 所得菌球数量多, 小而均匀, 呈悬浮状态, 且发酵液不粘稠, 便于接种; 并且, 液体种专用种发酵培养液体菌种能大幅度缩短发酵周期, 效果明显好于 CPDA 斜面种。下一步工作主要进行液体菌种产实性状及生理生化方面的研究, 以确保液体种更好地为食用菌生产服务。

致谢: 本文得到了郭砚翠研究员的悉心指导, 在此深表谢忱。

[参考文献]

[1] 杨新美. 食用菌研究法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998, 99.
[2] 雷敬敷, 张玲. 香菇发酵工艺及香菇多糖的提取 [J]. 中国食用菌, 1993, 12 (3): 31.
[3] 陈士瑜. 中国食用菌生产大全 [M]. 北京: 中国农

业出版社, 1994.

- [4] 王福荣. 白酒生产分析检验 [M]. 轻工业出版社, 1981, 37 - 41.

- [5] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院. 工业发酵分析 [M]. 轻工业出版社, 1980. 31 —33.

A Study of Fermentative Conditions On Liquid Strain of *Auricularia auricula*

KONG Xiang - hui, ZHANG Jie - chi, MA Qing - fang, DAI Xiao - dong, ZHANG Pi - qi, HAN Zeng - hua, PIAO Wan - hua

(Institute of Applied Microbiology of Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China)

Abstract : To produce and apply the liquid strain of *Auricularia auricula*, we have selected suitable component of culture medium in carbon, nitrogen, trace element, pH, and selected suitable fermentative conditions such as time, rotation speed of shaker, liquid capacity, the form of strain, reduction sugar, total sugar and amino - nitrogen, et al. And using analytical technique of four factors test statistics, the results show that the most suitable composition of *Auricularia auricula* submerged culture medium is as follow: 3.0 % glucose, 8 % wheat bran, 0.1 % KH_2PO_4 , 0.15 % MgSO_4 ; pH5.0 ~ 6.0; liquid capacity 50 - 70ml/ 100ml bottle; shaker rotation speed 140r/ min. The end of fermentation is 5 ~ 6 days (Slope strain) and 64 - 72h (liquid special strain).

Key words : *Auricularia auricula*; Liquid strain; Fermentative conditions

(上接 24 页) 的有效养分偏少, 其产量及生物学效率略低, 但其成本低, 相对来讲经济效益还是显著的。

3.4 我国的食用菌产业, 近十年来飞速发展, “九五”计划指标, 到 2000 年总产量已达到 4 000 000 t^[5]。食用菌生产过后, 留有大量的废料, 一般没有重新利用, 许多地方只作为燃料处理, 这样的资源代价太高。利用平菇废料栽培灰树花可以充分利用这些资源, 栽培后的灰树花废料又可作为良好的有机肥料, 能快速地还田肥田, 实现了农业可持续发展的良性循环, 从而使我国食用菌产业的生态、社会与经济效益创最佳效果。

3.5 我们认为适合灰树花高产的配方有以下三个: 木屑 40 %, 棉籽壳 40 %, 麦麸 18 %, 生石灰

2 %; 木屑 78 %, 麦麸 10 %, 玉米粉 10 %, 生石灰 2 %; 木屑 40 %, 平菇废料 40 %, 麦麸 18 %, 生石灰 2 %。

[参 考 文 献]

- [1] 黄年来等. 18 种珍稀美味食用菌栽培 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 130
[2] 胡昭庚, 曾长华, 肖建京. 名贵食用菌栽培 [M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2000. 147 - 148.
[3] 刘松青, 武成荣. 灰树花栽培技术研究 [J]. 中国食用菌, 1999, (1): 16 - 17.
[4] 林章余, 何锦星, 林文忠. 灰树花研究综述 [J]. 福建农业科技, 1994, (6): 29 - 30.
[5] 王世东. 利用作物秸秆发展食用菌产业 [N]. 中国技术市场报, 1999 - 9 - 25.

Study on Cultivation of *Grifola frondosa* with Different Formulae

BU Qing - mei, WANG Shu - fang, LIANG Jian - guang, HU Kui - juan

(Department of Biology Science and Technology, Yantai Teachers University, Yantai 264025, China)

Abstract : Cultivation of *Grifola frondosa* with seven different formulae was studied in the paper. The results showed that: sawdust and cotton - seed hull were the main cultivation materials. If the ratio of sawdust to cotton - seed hull was one to one, the biological efficiency was the highest. If wheatbran and cornpowder was used together, the yield and the biological efficiency were improved. The waste materials of *Pleurotus ostreatus* not only were the better cultivation materials, but also had high economic, social and ecological efficiency. And three formulae of higher yield of *Grifola frondosa* were selected.

Key words : *Grifola frondosa*; Formula; Cultivation