

富硒姬松茸液体培养条件的研究

杨淑云 刘朝贵 朱 凯 邓 春

(西南农业大学园艺园林学院 重庆 400716)

摘要: 采用液体摇瓶培养法, 对姬松茸 (*Agaricus blazei*) 富硒培养条件进行初步研究, 结果表明: 富硒姬松茸液体培养的最佳培养基配方为玉米粉 30g/L, 葡萄糖 20g/L, 硫酸铵 2g/L, 酵母膏 3g/L, KH_2PO_4 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, 维生素 B_1 100mg/L; 采用 1mg/L 亚硒酸钠驯化菌种, 250mL 三角瓶装量 80mL, pH7, 80r/min、培养 12d 为最佳的培养条件, 在此条件下姬松茸菌丝生物量、菌丝硒含量和富硒率分别达到了 18.6 g/L, 55.32 $\mu\text{g/g}$ 和 5.14%。

关键词: 姬松茸, 富硒, 液体振荡培养

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 01-0009-05

STUDIES ON LIQUID CULTURE CONDITIONS OF SE-ACCUMULATING *AGARICUS BLAZEI*

YANG Shu-Yun LIU Chao-Gui ZHU Kai DENG Chun

(College of Horticulture and garden, southwest Agricultural University, chongqing 400716)

Abstract: The conditions of Se-accumulating *Agaricus blazei* in submerged culture with shake flask were studied in this paper, experimental results showed that the composition of the cultural medium was as follow: corn starch 30g/L, glucose 20g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, yeast extract 3g/L, KH_2PO_4 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L and VB_1 100mg/L, that strains domesticated in slant with 1mg/L Se, 250mL conical bottle contained with 80mL liquid cultural medium, pH 7, 80r/min and 12 days of cultural period were the optimum cultural conditions, and that on such conditions, dry weight of the mycelium reached 18.6g/L, Se accumulated in the mycelium reached 55.32 $\mu\text{g/g}$ and Se accumulation rate reached 5.14%.

Key words: *Agaricus blazei*, Se-accumulated, Liquid shake culture

硒是人体必需的微量元素之一, 是谷胱甘肽过氧化物酶不可缺少的组成部分, 该酶具有保护生物膜不受脂质过氧物的影响, 不受自由基损害的作用, 它与人类健康、疾病有着密切关系, 并已成为国内外营养学和医学研究的热点问题。已有的成果表明: 人体的克山病、大骨节病、癌症、心脑血管疾病、糖尿病、不育症、机体免疫力减退和衰老过程等 40 余种疾病均与缺硒有关^[1]。人体主要依赖食物获得硒, 而生物源有机硒与无机硒相比具有吸收利用率高、安全无毒等优点, 因此开发生物源有机硒食品给机体提供硒源也是目前食品科技工作者研究的热点。近年来, 国内外研究发现, 有些食用菌具有较强的富硒能力, 能将无机硒转化为有机硒, 使之成为对人体较为理想的富硒保健品^[2,3]。

姬松茸 (*Agaricus blazei*) 又称为巴西蘑菇、小松菇, 是食药兼用真菌, 作为一种具有很大商品潜力和发展前景的食用菌新秀, 它具有提高免疫功能、抗癌、抗凝血、降血脂、安神等方面的独特疗效^[4]。姬松茸虽富含蛋白质和多糖, 但其菌丝中硒含量极低^[5], 若将无机硒在其菌丝中转化为有机硒, 融姬松茸和有机硒之长, 将具有更高的

药用价值和经济价值。目前关于姬松茸富硒发酵培养的报道甚少,且液体发酵诸因素对菌丝富硒生长的影响尚未见报道。为此本研究以姬松茸菌为载体进行富硒液体摇瓶培养,对培养基配方和培养条件进行筛选研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

姬松茸菌种由华中农大食用菌研究所提供。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 综合培养基; 液体摇瓶菌种培养基: 去皮马铃薯 200g/L, 葡萄糖 30g, 硫酸铵 3g, 酵母膏 3g, KH_2PO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, 维生素 B_1 100mg, 定容至 1L, pH 7; 基础培养基: 蔗糖 30g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, 酵母膏 3g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, 维生素 B_1 100mg, 亚硒酸钠 20mg, 定容至 1L, pH7。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化培养: 将姬松茸斜面母种接入 PDA 综合培养基中, 于 25℃ 下活化培养 7d。

1.3.2 液体菌种培养: 500mL 摇瓶装量 100mL, 接种 2 块 0.5cm^2 等量菌块, 置于 25℃, 80r/min 的振荡器中培养, 8d 后, 将长满姬松茸菌丝球的一级菌种接入各组实验培养基中, 上摇床。

1.3.3 样品制备: 发酵结束后, 3,000 r/min 离心 15min, 再将菌丝球冲洗干净, 供测定菌丝生物量和硒含量。

1.3.4 菌丝体干重测定: 将冲洗净后菌丝球于 60℃ 烘干至恒重, 用电子天平称量干重。

1.3.5 硒含量测定: DAN 荧光法^[6,7]。

1.3.6 糖含量测定: 苯酚-硫酸法^[8]。

1.3.7 富硒率计算方法: $\text{富硒率}(\%) = \frac{(\text{富硒菌丝中硒含量} - \text{空白对照菌丝硒含量}) \times \text{菌丝干重}}{\text{发酵液中添加硒总量}} \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 富硒姬松茸液体发酵培养基筛选

以去蔗糖的基础培养基为基质, 分别加入葡萄糖 30g/L、豆饼粉 30g/L、去皮马铃薯 200g/L、玉米粉 30g/L 进行碳源筛选实验, 250mL 三角瓶装量 100mL, 接种量 10%, 于 25℃, 80r/min 的往复式振荡器中培养。以去硫酸铵的基础培养基为基质, 分别加入 3g/L 的硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、蛋白胨进行氮源筛选实验, 其它培养条件同上。由实验结果(见表1)可看出, 富硒姬松茸液体培养以玉米粉为碳源, 菌丝生物量和富硒率均最高, 效果最好, 其次是马铃薯、豆饼粉、葡萄糖, 而且玉米粉较为价廉易得, 因此生产上选用玉米粉为碳源较合适; 氮源实验以硫酸铵效果最好, 其次是酵母膏、氯化铵、硝酸铵和蛋白胨, 其中蛋白胨的效果与不加氮源无明显差别, 可能由于姬松茸菌丝体不能利用蛋白胨所致。

采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验设计, 对上述实验筛选出的对姬松茸富硒生长影响最大的碳源(玉米粉)与氮源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)和无机盐(KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)进行浓度优化选择实验(培养基其它成分: 葡萄糖 20g/L, 酵母膏 3g/L, 亚硒酸钠 20mg/L, 维生素

B₁100mg/L)。由表 2 的正交实验结果又可看出, 富硒姬松茸液体培养中菌丝生长的最适培养基组成为 A₂B₃C₁D₂, 即玉米粉 30g/L、(NH₄)₂SO₄ 3g/L、KH₂PO₄ 2g/L、MgSO₄·7H₂O 1g/L; 而富硒效果最好的培养基组成为 A₂B₂C₁D₂, 即玉米粉 30g/L、(NH₄)₂SO₄ 2g/L、KH₂PO₄ 2g/L、MgSO₄·7H₂O 1g/L, 进一步实验证实姬松茸富硒生长的最适培养基组成为 A₂B₂C₁D₂。另外, 正交实验还说明碳源对姬松茸富硒生长的影响最大。

表 1 碳、氮源对姬松茸富硒生长的影响

碳、氮源 (g/L)	葡萄糖 30	豆饼粉 30	玉米粉 30	马铃薯 200	硫酸铵 3	氯化铵 3	硝酸铵 3	酵母膏 3	蛋白胨 3
菌丝干重 (g / L)	10.9	12.5	18.5	16.3	16.6	14.3	12.8	14.8	5.6
富硒量 (μg/g)	40.65	38.92	41.60	45.79	46.79	50.76	35.85	50.62	14.94
富硒率 (%)	2.22	2.43	3.85	3.73	3.88	3.63	2.29	3.74	0.40

表 2 L₉ (3⁴) 正交实验结果及分析

实验号	玉米粉 A (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ B (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O C (g/L)	KH ₂ PO ₄ D (g/L)	水平组合	菌丝干重 k (g/L)	富硒量 (μg/g)	富硒率 j (%)
1	10	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	14.8	35.06	2.59
2	10	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	16.8	41.77	3.51
3	10	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	15.7	38.92	3.06
4	30	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	17.2	44.57	3.83
5	30	2	3	1	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	17.4	47.65	4.15
6	30	3	1	2	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	19.4	49.23	4.78
7	50	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	17.3	45.93	3.97
8	50	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	18.3	50.73	4.64
9	50	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	17.8	42.61	3.73
I _k	47.3	49.3	52.5	50.0		I _k + II _k + III _k = 618.8		
II _k	54.0	52.5	51.8	53.5				
III _k	53.4	52.9	50.4	51.2				
I _j	15.8	16.4	17.5	16.7				
II _j	18.0	17.5	17.3	17.8		I _j + II _j + III _j = 17.2		
III _j	17.8	17.6	16.8	17.1				
R _k	2.2	1.2	0.7	1.1				
I _i	9.16	10.39	12.01	10.53				
II _i	12.76	12.30	11.13	12.26		I _i + II _i + III _i = 137.28		
III _i	12.40	11.63	11.18	11.53				
I _i	3.05	3.46	4.00	3.51				
II _i	4.25	4.10	3.71	4.09		I _i + II _i + III _i = 3.81		
III _i	4.13	3.88	3.72	3.84				
R _i	1.20	0.64	0.29	0.58				

2.2 富硒姬松茸液体培养条件的优化

2.2.1 菌种驯化实验: 分别以含硒 0、1、2、4、6、8、10、15、20mg/L 的 PDA 综合培养基对姬松茸菌种进行驯化培养, 待菌丝长满管后, 挑取 0.5cm² 的驯化母种接到装量 100mL 的 250mL 三角瓶 (每瓶装 15 粒玻璃珠) 中, 于 25℃, 80r/min 的恒温振荡器进行液体菌种培养。10d 后, 采用 250mL 三角瓶装量 100mL (采用最佳培养基配方), 接种

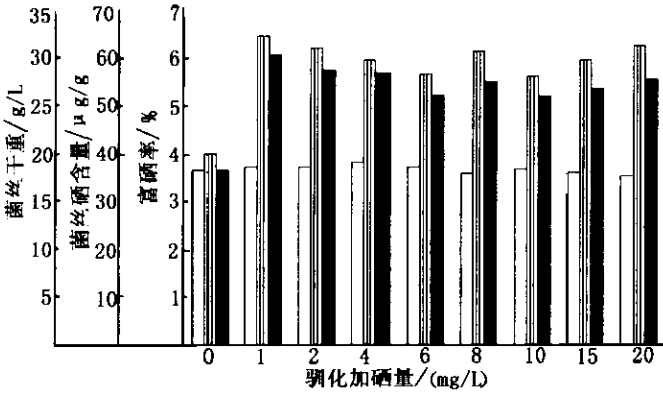


图1 菌种加硒驯化对姬松茸高硒生长的影响

□ 菌丝干重, ▨ 菌丝硒含量, ■ 菌丝富硒率

量 10%，添加硒 20mg/L，置于 25℃，80r/min 的往复振荡器中进行液体发酵培养，每个处理设 3 个重复。结果见图 1。由图 1 可看出，添加硒驯化菌种对其生物量影响不大，但能明显提高其富硒量和富硒率，且采用 1mg/L 的硒驯化菌种效果最好，富硒率比空白对照提高 166%。可

见，通过驯化菌种人为的造成高硒环境有利于增强姬松茸菌丝体的富硒能力，提高其富硒量和富硒率。

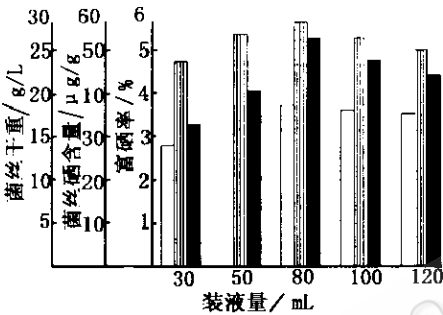


图2 装液量对姬松茸富硒生长的影响

□—菌丝干重, ▨—菌丝硒含量, ■—菌丝富硒率

2.2.2 溶解氧实验：采用 250mL 三角瓶，装液量分别为 30mL、50mL、80mL、100mL、120mL 每个装液量设 3 个重复。溶解氧实验结果表明，姬松茸富硒发酵过程中菌丝富硒生长对通气量的要求较严格，250mL 三角瓶装量 80mL 时，菌丝生物量和富硒率分别达到了 18.2g/L 和 5.04%，且明显高于其它装量。

2.2.3 pH 实验：调节初始 pH 分别为 4、5、6、7、8 进行姬松茸富硒液体培养，每个 pH 值设 3 个重复。结果表明姬松茸富硒菌丝对酸碱适应性能力强，在 pH4 ~ 8 范围内都能正常生长，且菌丝生物量、富硒率差别不大，其中 pH 为 7 时，菌丝生物量、富硒量和富硒率均最高，分别为 18.6g/L，53.94μg/g 和 5.02%。

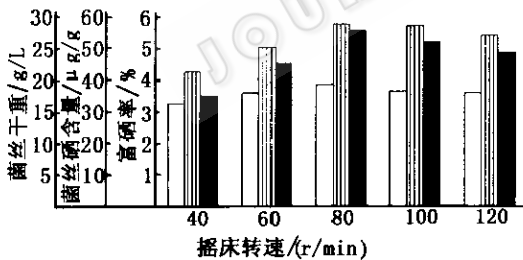


图2 装液量对姬松茸富硒生长的影响

□ 菌丝干重, ▨ 菌丝硒含量, ■ 菌丝富硒率

2.2.4 摇床转速实验：分别采用 40r/min、60r/min、80r/min、100r/min、120r/min 的振荡速度进行富硒培养，每个转速设 3 个

重复。从结果（图 3）可以看出，转速增加，通气量增大，溶解氧量增大，菌丝生物量和富硒量均增加，当转速达到 80r/min 时姬松茸菌丝富硒生长最好，菌丝生物量最大，且富硒率明显高于其它转速。超过 80r/min，随着转速的增大，菌丝球数量增多，但菌丝球减小，不利于生物量的积累和硒的吸收与转化，且转速太快易造成污染。因而可确定 80r/min 为富硒姬松茸液体培养的最佳转速。

2.2.5 培养时间实验：采用上述实验筛选出的最佳培养条件进行姬松茸富硒培养，分别在培养的第 3d、5d、7d、10d、12d、15d 取出培养物进行测定，每次取 3 瓶。由图 4 可知，发酵 12d 后，菌丝生长基本停止，生物量趋于稳定，这是由于培养基中某种营养物质逐渐被消耗完所致，由此初步判断第 12d 为发酵终点。另外，发酵液的总糖、

还原糖含量与菌丝生物量和富硒率的变化情况存在着一定的负相关性, 因此从发酵液的总糖和还原糖含量也可判断发酵终点。从发酵开始总糖含量 (3.84%) 一直下降至发酵终点 (第 15d 时总糖含量 0.76%), 第 12d (总糖含量 0.82%) 与第 15d 的测定结果相比变化很小; 还原糖的变化最初低 (仅 0.65%), 随着发酵的进行而增加, 第 5d 时最高 (达到 0.91%), 而后逐渐降低, 10d 后迅速降低, 第 2d 时含量从 10d 时的 0.67% 降到 0.12%, 第 15d 时为 0.10%, 这可能是因为发酵初期菌丝分解淀粉的能力强, 产生的还原糖大于被利用的还原糖, 发酵中期则分解产生和被利用的还原糖基本相当, 因而达到平衡状态, 随着淀粉底物被消耗和富硒菌丝的生长, 发酵末期迅速下降。生产上综合考虑菌丝生物量、富硒量和经济效益等因数, 可确定富硒姬松茸液体培养的最佳时间为 12d。

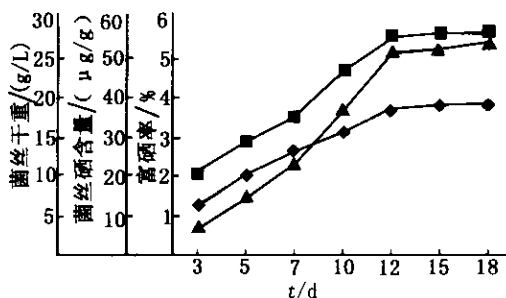


图 4 培养时间对姬松茸富硒生长的影响

—◆— 菌丝干重, —■— 菌丝硒含量,
—▲— 富硒率

3 结论

根据单因素实验和正交实验筛选出富硒姬松茸液体培养的最佳培养基配方: 玉米粉 30g、葡萄糖 20g、硫酸铵 2g、酵母膏 3g、 KH_2PO_4 2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g、维生素 B_1 100mg, 定容至 1L。

在上述实验基础上对富硒姬松茸液体培养条件进行优化, 得出结论: 采用 1mg/L 的亚硒酸钠驯化菌种, 250mL 三角瓶装量 80mL, pH7, 于 80r/min 的水浴恒温振荡器中培养 12d 为最佳培养条件, 在此条件下姬松茸菌丝生物量、菌丝硒含量和富硒率分别达到了 18.6g/L、55.32μg/g 和 5.14%。菌种驯化实验结果说明, 种子进行加硒驯化能显著提高姬松茸的富硒特性, 这是食用菌富硒培养的重要工艺条件之一。

参考文献

- [1] 吴法先. 山西医药研究, 1989, 3 (1~2): 41.
- [2] 陈乃光. 山东农业科学, 1994, 9 (2): 72~75.
- [3] 魏 华, 谢俊杰, 傅金衡, 等. 食用菌, 1996, 18 (3): 7~8.
- [4] 陈智毅, 李清兵, 吴娱明, 等. 中国食用菌, 2001, 20 (4): 4~6.
- [5] 李开本, 陈体强, 徐 洁, 等. 食用菌学报, 1999, 6 (1): 55~57.
- [6] 王光亚, 周瑞华, 孙淑庄, 等. 营养学报, 1985, 7 (1): 39~45.
- [7] 刘胜杰, 周瑞华, 殷太安, 等. 营养学报, 1985, 7 (2): 142~147.
- [8] 杨新美. 食用菌研究法. 北京: 中国农业出版社, 1998. 148~149. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>