

张炎灼, 吴 俐, 沈恒胜, 等. 富硒秀珍菇液体培养菌丝生长规律的动态分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (4): 400-404.

ZHANG Y-Z, WU L, SHEN H-S, et al. Mycelium Development of *Pleurotus geesteranus* Singer in Selenium-enriched Medium [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (4): 400-404.

富硒秀珍菇液体培养菌丝生长规律的动态分析

张炎灼, 吴 俐, 沈恒胜, 陈君琛, 孔智伟

(福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003)

摘 要: 为研究亚硒酸钠添加水平为 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 秀珍菇液体培养菌丝体动态变化规律, 采用 $3 \times 10 \text{ L}$ 的全自动控制发酵罐液体培养秀珍菇富硒菌丝。选择发酵罐培养的生物生长量、培养环境、发酵液营养水平等动态因素, 以菌球直径、菌球密度、液体培养基 pH 值、溶氧量、可溶性糖、可溶性蛋白等为测定指标, 确定秀珍菇富硒液体培养菌丝体动态变化规律。结果显示: 富硒组与对照组生长趋势基本一致, 生物量、菌球直径、菌球密度三者随培养时间呈增长趋势, 且变化显著相关。72 h 培养结束时, 对照组与富硒组生物量分别为 1.92、1.81 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 菌丝硒含量分别为 4.99、45.37 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 富硒培养生物有机硒转化率为 53.37%。随培养时间的变化, 对照组与富硒组培养液中可溶性糖与可溶性蛋白含量的动态变化趋势相对一致, 显示随着菌丝体的生长不断被消耗, 呈现不断下降趋势。

关键词: 秀珍菇; 液体培养; 变化规律; 硒

中图分类号: S 646.9

文献标识码: A

Mycelium Development of *Pleurotus geesteranus* Singer in Selenium-enriched Medium

ZHANG Yan-zhuo, WU Li, SHEN Heng-sheng, CHEN Jun-chen, KONG Zhi-wei

(Institute of Agriengineering Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Development of *Pleurotus geesteranus* Singer mycelia in the submerged medium containing $3 \mu\text{g}$ added selenium (Se) per mL was studied in a $3 \times 10 \text{ L}$ auto-control fermentor. Biological characteristics, culture environment and medium nutrition including the diameter and density of the mycelial spheres, as well as the pH, DO, total soluble sugar and protein of the medium were monitored to determine the effect of the selenium addition. The results showed that (a) the mycelial growth was basically the same with or without the Se addition, (b) the biomass as well as the sphere's diameter and density increased with incubation time, and (c) a significant correlation existed among the factors. At the end of 72h culture, the biomass in CK and Se groups were 1.92 and 1.81 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the Se content of mycelium in the treatment group was 45.37 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ with an Se bioconversion efficiency of 53.37%. During incubation, the total soluble sugar in the culture medium slowly increased initially followed by a decline, but the total soluble protein remained constant on a decreasing trend.

Key words: *Pleurotus geesteranus*; submerged culture; mycelial development; selenium addition

利用生物的营养代谢途径, 实现从无机硒到有机硒营养元素的生物转化富集, 是硒营养资源开发领域近年来的热点研究方向之一。生物转化包括动物代谢转化、植物代谢转化和微生物代谢转化等形

式。在微生物富硒代谢转化中, 食用菌的液体培养转化技术, 以其培养时间短、胞外代谢产物营养丰富、转化率高等优点而被研究者关注^[1-6]。试验发现, 秀珍菇 *Pleurotus geesteranus* 菌丝体不仅富含

收稿日期: 2012-01-15 初稿; 2012-02-25 修改稿

作者简介: 张炎灼 (1985-), 男, 硕士, 研究方向: 功能营养食品资源 (E-mail: zyzeric2000@163.com)

通讯作者: 沈恒胜 (1955-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 农业资源循环利用与生物转化技术 (E-mail: hsh87@hotmail.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2009R10033-4); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIF-Y05)

食用菌多糖、氨基酸、人体必需的矿物质等人体所需的营养成分^[5-9],并已报道筛选出对培养基中硒营养转化代谢能力较强的富硒菌株。对秀珍菇液体培养的富硒水平研究表明,菌丝对液体培养基中的亚硒酸钠的生理耐受敏感临界浓度区间为 $3.0\sim 5.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,在这个耐受敏感临界浓度区间内,秀珍菇可以完成正常的营养生长与有效的硒营养代谢,低于这个浓度区间富硒效果不明显,超过这个浓度区间则出现对秀珍菇菌丝生长的抑制作用。因此,利用液体培养技术,在菌丝富硒营养代谢生长的耐受敏感区间内,通过特定硒添加量条件培养秀珍菇富硒菌丝体,并动态观察分析秀珍菇富硒菌丝的营养生长变化规律,以期为实现对无机硒的生物转化和菌丝体的生长效果最大化提供技术依据。本试验采用 $3\times 10\text{ L}$ 的全自控发酵罐培养设备,动态比较对照组与富硒组的pH与溶氧量培养环境因子以及营养水平等因素的变化,秀珍菇菌丝体生物生长量与最终秀珍菇菌丝体的有机硒生物转化效率,从而分析探讨秀珍菇菌丝营养体在液体培养条件下的富硒效率与营养生长变化关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株秀珍菇菌株 *P. geesteranus* 由福建省农业科学院农产品加工研究中心提供。

1.1.2 培养基 采用平板活化、液体母种、生产菌种的多级制种方法^[9],参照前期研究结果确定亚硒酸钠加入量^[8],各级培养基组分分别为:①PDA平板活化改良培养基:经典PDA培养基组方的基础上,增加酵母粉0.15%、硫酸镁0.15%、磷酸二氢钾0.3%、维生素B₁0.01%;②一级液体母种培养基:麦麸3%(过滤)、玉米粉3%(过滤)、葡萄糖2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B₁0.01%、酵母粉0.15%;③二级液体诱导菌种培养基:用蔗糖代替一级液体菌种中的葡萄糖,加入亚硒酸钠 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;④营养生长液体培养基:成分同二级液体菌种培养基,亚硒酸钠添加量为 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 液体母种制备 采用250 mL的三角瓶,装入100 mL一级母种培养基,121℃灭菌20 min,冷却至室温后,接入平板活化培养的秀珍菇菌块(直径0.8 cm×8块),置于 $(25\pm 0.5)^\circ\text{C}$,转速为 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的全温振荡培养箱中培养4 d,制得一级液体母种;采用同样方法,在每100 mL二级

液体种培养基中接入10%的一级液体母种,置于相同培养条件下培养3 d,达到菌球密集均匀,作为二级液体母种用于发酵罐富硒液体培养生产^[6]。

1.2.2 发酵罐液体培养 采用镇江东方生物工程技术有限责任公司的全自动控制 $3\times 10\text{ L}$ 发酵罐实施液体培养。首先对发酵罐系统整体实施:(1)管路经 $0.2\sim 0.4\text{ MPa}$ 蒸汽消毒30 min;(2)发酵罐罐体 $0.1\sim 0.2\text{ MPa}$ 的蒸汽空消30 min;(3)发酵罐中营养生长培养基实消。

用于营养生长的培养基制备、实消、接种:发酵罐中,加入按照配方称量制备的营养生长液体培养基母液,按其浓度配比加入所需加水量的80%~90%,并加入消泡剂0.1%;与罐体蒸汽空消方法相同,再进行 $0.1\sim 0.2\text{ MPa}$ 蒸汽实消30 min。受系统灭菌过程中产生的罐内灭菌蒸汽水的充盈,灭菌完成时,发酵罐中的液体培养基基本达到所需量。待罐内液体冷却至 25°C 时,调整溶氧基准值,在接种口火焰灭菌,按照10%接种量快速接入二级液体母种,同时添加适量无菌水使培养液到达预定培养量。设定发酵罐培养温度为 25°C ,转速为 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,发酵罐进气口压力 0.2 MPa ,出气口压力为 0.08 MPa ,空气流速为 $8\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2.3 动态分析取样 分别以添加亚硒酸钠和不加硒的液体培养组为富硒处理组(Se组)与对照组(CK组),每组设3次重复;参考文献[10-11]确定0、12、24、30、36、42、48、60、72 h动态分析取样时间,分别记为Se-t或CK-t。定时从培养罐出料口分别采集富硒组培养液和对照组培养液各100 mL,并进行各项指标的分析检测。

培养罐采样方法:采样前先用 $0.1\sim 0.2\text{ MPa}$ 的蒸汽对出料口进行30 min的灭菌,灭菌结束后,先舍弃前一小段放出的样品,接着采集样液,采样结束后,按采样前灭菌的步骤对出料口灭菌,防止污染。所取每个样品经充分混合均分为2份,一份样品用于测定菌球直径、菌球密度等菌丝生长相关指标,另一份样品经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,沉淀物经冷冻干燥,测定生物量,上清液用于测定可溶性固型物、可溶性糖、可溶性蛋白等营养成分含量。

1.3 分析方法

1.3.1 pH和DO测定 由发酵罐微电脑控制自动测定。

1.3.2 菌丝生长及生物量测定 生物量测定:经 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,重复洗涤3次,冷冻干燥(-45°C 、真空度为15 Pa)48 h后测定菌丝生物量;菌球直径测定:通过显微镜目镜测微尺,

在同一样片中随机测量 10 个菌球直径, 取其算术平均值作为该时刻菌球的平均直径^[12]; 菌球密度测定: 用移液管准确吸取 1 mL 发酵液于培养皿中进行计数, 然后计算出每毫升中菌球的个数^[13]。

1.3.3 培养液营养水平分析 经 $5\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 采用糖度计测定可溶性固形物; 采用苯酚—硫酸法测定可溶性糖; 采用 280 nm 紫外分光光度法^[14]测定可溶性蛋白。

1.3.4 硒营养代谢转化效率分析 在发酵罐培养的结束期, 即动态分析的最后取样点, 分别测定富硒处理组 (Se 组) 与对照组 (CK 组) 培养液与菌丝体中的 Se 含量。测定方法采用分光光度法测定样品硒含量^[15]。

1.4 统计分析

试验数据用 Excel 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌丝营养生长动态变化

经过 72 h 发酵罐液体培养, 测得菌丝营养生长的生物量、菌球直径、菌球密度 (表 1)。比较对照组与富硒组的菌丝生长生物量、菌球直径、菌球密度 3 个指标含量的差异, 结果显示, 虽然对照组培养液的单位菌球数量显著高于富硒培养组, 但 2 组在菌丝生长生物效率和平均菌球直径方面没有

显著差异。表明在培养液中添加 $3\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的亚硒酸钠, 不会抑制秀珍菇菌丝体的正常生长繁殖。

发酵罐液体培养过程显示, 接种后, 随液体基质旋转搅动培养, 菌丝萌发延伸、菌丝球形成, 菌球数量、菌球直径随培养进程发展, 构成菌丝生物量增长的动态变化。如图 1 发酵罐菌丝培养生物量发展趋势所示, 富硒组与对照组的菌丝生长动态规律基本一致, 随着菌球形成、个体增大, 菌丝体生物量也同步增加, 初始的 24~30 h 菌丝生长变化缓慢, 其后, 当菌球密度和菌球增长同时加快时, 生物量随之大量增加; 尤其培养 48 h 后, 菌丝细胞分裂繁殖, 新的菌球形成与快速增长, 直至 72 h。此时, 罐体内发酵液浓稠, 菌球密度与生物量增长曲线达到最大值, 而菌球平均直径增长曲线呈现降低趋势, 说明相对发酵罐培养空间, 发酵液菌球数量已达最佳分布密度, 液体发酵培养过程应适时终止。比较图 1 菌球密度、菌球发育与生物量的增长曲线可见, 在发酵培养的过程中, 菌丝球密度、体积呈规律性增加, 前者的增长曲线与菌丝生物量增长曲线变化更相似。富硒组与对照组相互比较, 富硒组生物量略大于对照组, 显示适当含量的添加硒元素, 不仅没有抑制菌丝体的生长, 而且还对菌丝体的生长有所促进, 以致培养过程中富硒组的生物量有所增加。

表 1 菌丝体生物量、菌球直径、菌球密度含量及显著性差异

Table 1 Differences on biomass, diameter and density of mycelium spheres during incubation

处理	生物量/ ($\times 10^2\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	菌球直径/ mm	菌球密度/ (个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	$1.92 \pm 0.51\text{ a}$	$0.98 \pm 0.09\text{ a}$	$122.0 \pm 1.58\text{ a}$
富硒组	$1.81 \pm 0.51\text{ a}$	$1.01 \pm 0.05\text{ a}$	$108.0 \pm 0.51\text{ b}$

注: 同列数据带有不同小写字母者, 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 培养液 pH 值与溶氧量 (DO 值) 动态变化

图 2 显示的是富硒液体培养过程中, $3 \times 10\text{ L}$ 发酵罐平行培养环境的 pH 值与 DO 值动态变化的趋势图。pH 值与 DO 值曲线反映了发酵罐动态培养过程中, 培养环境中理化指标随培养时间不同而发生的变化。分析这 2 个环境因素的变化发现, 富硒组和对照组在 72 h 内的培养过程中, pH 值动态变化趋势一致, 变化区间值在 4.5~5.5, 液体培养初期, pH 值缓慢上升至 24 h 左右, 24~36 h pH 值下降明显, 而后 pH 值稳定在 5 左右; 富硒组和对照组的 DO 值变化趋势同样相似, 接种培养后的 DO 值持续下降至 30 h 的培养时长左右, 可

能由于接种后液体菌种中菌丝体和胞外酶快速适应培养环境与定植转化营养代谢的生理活动加强, 消耗掉培养液中大量溶解氧所致。培养 30~70 h, 菌丝的营养代谢与生长繁殖趋于稳定, 培养液中的溶氧值缓慢回升。

2.3 培养液营养物含量的动态变化

随着液体培养进行, 培养液中的可溶性糖、可溶性蛋白等营养物质发生着质和量的改变, 其中包括来自于培养液底物尚未被菌丝体代谢消耗的部分, 以及由菌丝胞外代谢过程形成的代谢中间产物部分。动态分析培养液中可溶性营养成分的变化, 可间接反映出液体培养环境中菌丝体的生长发育及

生物量的动态变化。图3显示随着液体培养过程的展开, 液体培养基中可溶性糖与可溶性蛋白质的动态变化, 总体显示对照组与富硒组的两者可溶性营养成分的变化趋势相似。以0时培养液中的可溶性糖含量为基点, 接种后至30 h培养期, 2组观测值均出现在24 h低谷后回升, 可能与液体菌种的接种后定植代谢消耗, 以及培养初期菌丝萌发缓慢

生长对培养基大分子碳源降解代谢产物有关, 此期, 菌丝生长利用量小于其水解代谢量; 而后菌丝生长繁殖加快, 营养代谢消耗需求增加, 可溶性糖含量呈下降趋势。与之相应的培养液可溶性氮含量则随培养期延伸呈缓慢降低, 显示该培养试验, 菌丝体对培养介质中氮营养一直处在消耗状况。

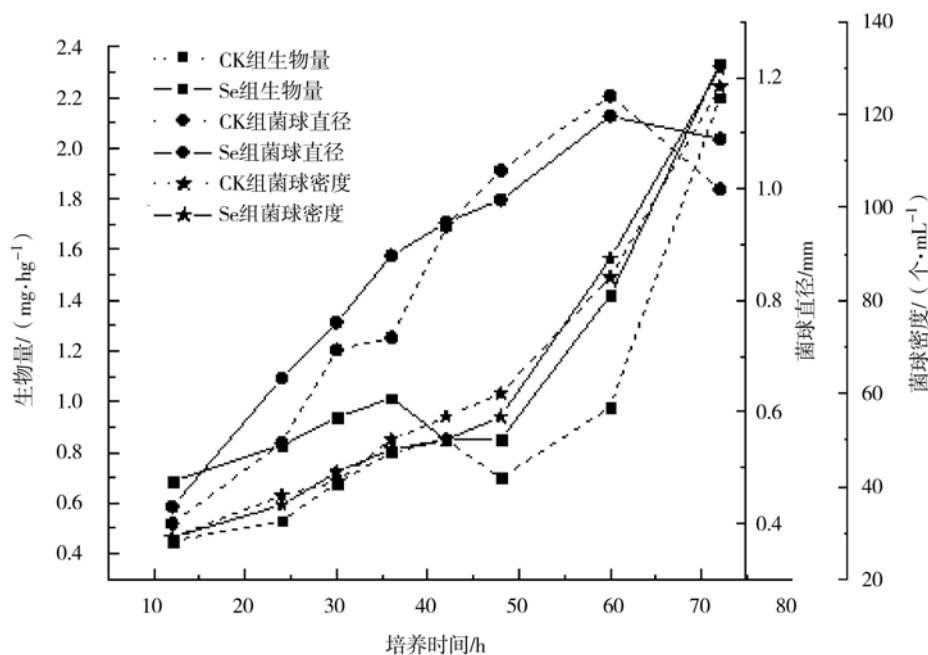


图1 菌球直径与菌球密度与生物量的动态变化

Fig. 1 Changes on biomass, diameter and density of mycelium spheres

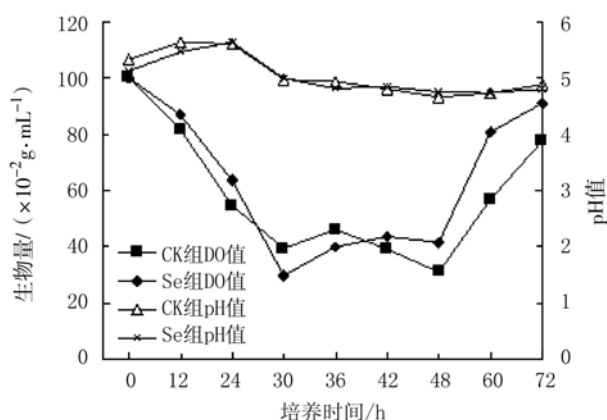


图2 发酵罐培养液的 pH 值与 DO 值的动态变化

Fig. 2 Changes on pH and DO of culture medium

2.4 液体培养各指标的相关性分析

液体培养各指标的相关性分析结果可见, 菌丝生物量增长与菌球数量增长的相关性 ($r^2=0.951$)

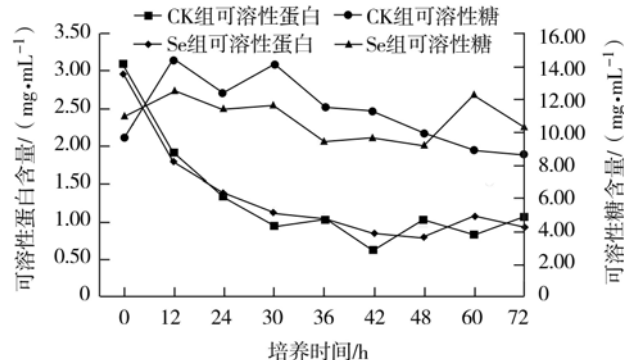


图3 可溶性糖与可溶性蛋白含量的动态变化

Fig. 3 Soluble sugar and protein in culture medium

大于菌球直径增长 ($r^2=0.579$), 而菌球直径的增长则与培养介质中的可溶性蛋白 ($r^2=-0.818$)、可溶性糖 ($r^2=-0.657$) 都呈显著的负相关 (表2)。结合菌丝生物量增长因素、培养环境的 pH 与 DO 观测值以及培养介质的可溶性糖与氮营养的动

态趋势分析,影响发酵罐富硒液体培养生物效率的氮营养水平要求高于可溶性碳营养水平,且培养初期有效促进菌球密度提高的培养条件显得尤为重要。

表 2 液体培养各指标的相关性分析
Table 2 Correlations among culture indices

	生物量	菌球直径	菌球密度	可溶性蛋白	可溶性糖
生物量	1	0.579*	0.951**	-0.315	-0.452
菌球直径		1	0.748**	-0.818**	-0.657**
菌球密度			1	-0.430	-0.563*
可溶性蛋白				1	0.568*
可溶性糖					1

注:**表示差异极显著($P<0.01$),*表示差异显著($P<0.05$)。

2.5 硒吸收转化率

液体培养富硒秀珍菇菌丝体的生物有机硒转化效率与菌丝生物量以及菌丝中的硒含量有关。当发酵液中亚硒酸钠的添加量在 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,硒的添加含量达到 $1.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。秀珍菇菌丝体经过发酵罐 72 h 的液体转化,对照组与富硒组的菌丝生物量与菌丝中硒含量分别为 1.92、1.81 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 4.99、45.37 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。对照组菌丝硒来源与其诱导培养的二级液体菌种接入量有关,因此,修正后的富硒组菌丝硒含量为对照组的 8 倍多,硒的转化率为 53.37%。说明以亚硒酸钠添加量为 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的添加水平进行秀珍菇富硒液体培养,不仅没有抑制秀珍菇的生长,而且具有较高的生物有机硒转化效率。

3 讨 论

本研究利用发酵罐液体培养秀珍菇富硒菌丝体,经过 72 h 的培养,对照组与富硒组的菌丝生物量分别为 1.92、1.81 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,生物量无显著差异;2 组的培养环境因素与培养液可溶性糖与可溶性蛋白营养水平的动态变化趋于相对一致;说明 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的亚硒酸钠添加水平,没有抑制秀珍菇菌丝体生长,且培养过程中生物量、菌球直

径与菌球密度三者呈现显著的相关性。液体培养的富硒秀珍菇菌丝硒含量达到 45.37 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,菌丝体的硒营养生物转化率可达 53.37%。本研究对发酵罐液体培养的环境因子(pH 值、DO 值)与营养水平(可溶性糖、可溶性蛋白)动态变化规律的观测分析,对进一步扩大发酵罐培养秀珍菇富硒菌丝的生产技术优化提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 陈娟. 食用菌液体培养参数优化及接种装置研究 [D]. 南京: 江苏大学, 2006.
- [2] 王莲芳. 富硒食用菌中硒含量的测定及赋存形态研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [3] 许峰. 大球盖菇富硒液体培养条件优化及抗氧化能力初步研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2006.
- [4] 陈虎富. 硒灵芝液体深层培养及营养成分分析 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [5] 沈恒胜, 陈君琛, 汤葆莎, 等. 秀珍菇生物富硒及富集水平 [J]. 食用菌学报, 2009, 16 (4): 35—38.
- [6] 吴俐, 沈恒胜, 陈卫伟, 等. 膳食纤维液体培养基对秀珍菇富硒转化效率的影响 [J]. 福建农业学报, 2011, 26 (2): 241—245.
- [7] 杨梅, 沈炎芬, 石磊, 等. 秀珍菇深层培养条件及菌丝体氨基酸组分分析 [J]. 食用菌学报, 2007, (1): 11—12.
- [8] 覃宝山, 覃勇荣, 刘倩, 等. 板栗苞壳栽培的平菇和秀珍菇主要营养成分分析 [J]. 贵州农业科学学报, 2009, 37 (12): 81—83.
- [9] 于加平, 赵荣, 林瑶, 等. 杏鲍菇秀珍菇榆黄蘑中微量元素的光谱测定 [J]. 食用菌学报, 2009, (4): 71—72.
- [10] 邓超, 邬敏辰. 茶树菇深层发酵条件的研究 [J]. 江苏食品与发酵, 2005, (2): 7—9.
- [11] 吴俐. 油茶枝液体培养茶树菇代谢产物的抗氧化活性 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [12] 袁丽梅, 张书军, 杨敏, 等. 应用气升式反应器培养草酸青霉菌菌丝球的研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (3): 393—395.
- [13] 黄清荣, 梁建光, 姜华, 等. 大杯伞深层培养条件的研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15 (2): 100—104.
- [14] 许学书, 周家春, 王宏, 等. 小梅鱼水解过程中的分析方法研究 [J]. 食品科学, 2000, 21 (9): 40—42.
- [15] 王莲芳. 富硒食用菌中硒含量的测定及赋存形态研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2007.

(责任编辑: 柯文辉)