

双孢蘑菇液体菌种发酵工艺研究

黄爱荣¹ 缪礼鸿^{1*} 边银丙²

(1 武汉工业学院 生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023; 2 华中农业大学 植物科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要 通过摇瓶培养及发酵罐发酵试验, 对双孢蘑菇 2796 液体菌种发酵工艺条件进行的优化结果为: 液体发酵培养基的最佳初始 pH 值 6.5, 最适培养温度 25℃, 接种量 5%, 培养时间 5~6 d。发酵液的 pH 值与菌丝球生物量等指标可作为液体菌种发酵终点判断的依据。双孢蘑菇液体菌种传代和扩增试验结果表明, 斜面母种经 5 级传代扩增 1 万倍后菌丝仍具有较高活力。一级~五级液体菌种活力相近, 作为原种按 1% 接种量制备固体栽培菌种菌丝平均满瓶时间为 27 d, 比传统的固体原种制备栽培菌种时间缩短 25%。

关键词 双孢蘑菇 液体菌种 发酵工艺 扩大培养

文章编号 1000-8357(2009)05-0012-02

双孢蘑菇是近年来我国许多地方大力发展的一种优质草腐型食用菌。液体菌种能够克服传统的固体菌种生产周期长、菌龄不一致等缺点, 但对生产工艺及技术条件要求高, 目前多数试验仍停留在摇瓶培养阶段。为此, 笔者利用 10 L 全自动发酵罐对双孢蘑菇液体菌种的发酵工艺进行了研究, 并对不同扩增倍数的液体菌种的活力进行了比较。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株 双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 2796, 由华中农业大学菌种中心提供。

1.2 培养基 ①马铃薯完全培养基^[1]: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。用作食用菌斜面培养。②摇瓶菌种培养基: 12Be 麦芽汁 30 mL, 玉米粉 10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, VB_1 10 mg, 水 1 000 mL, pH 6.5。用于一级液体菌种的培养。③液体菌种发酵培养基: 麸皮 30 g, 玉米粉 10 g, 蛋白胨 1 g, 磷酸二氢钾 0.8 g, 硫酸镁 0.5 g, VB_1 10 mg/L, 水 1 000 mL, pH 值 6.5。用于二级~五级液体菌种及发酵罐液体菌种培养。④固体原种培养基: 小麦 97%, 粪草 1%, 石灰 1%, 石膏 1%, 含水量 63%。⑤固体栽培种培养基: 小麦 89%, 麸皮 9%, 石灰 1%, 石膏 1%, 含水量 60%, 装瓶后在瓶口盖少许稻草粉。

1.3 试验方法

1.3.1 摇瓶液体菌种制备及其活力测定 将活化的斜面母种分割成大小约 0.5 cm² 的小块, 取一小块接种到液体培养基中, 于 25℃ 先静置 24 h, 然后恒温振荡培养得一级摇瓶菌种, 再将培养好的一级摇瓶液体菌种按 10% 接种量转接到二级液体菌种摇瓶中, 依次扩大培养至五级菌种。摇瓶培养条件为: 250 mL 三角瓶装液量 100 mL 培养基, 转速 150 r/min, 25℃ 振荡培养 5~7 d。将各级液体菌种分别按 1% 接种量接种

固体栽培种培养基, 25℃ 恒温培养, 记录每瓶菌种菌丝满瓶天数, 并计算各级菌种满瓶的平均天数, 每个处理 10 瓶重复。

1.3.2 发酵罐液体菌种培养 采用 10 L 全自动气升式搅拌玻璃发酵罐, 装液量为 6 L, 按照 5% 接种量接种已经活化好的三角瓶液体菌种, 25℃ 发酵 8 d。每间隔 24 h 取样测定菌丝球生物量、菌丝球密度、菌丝球直径、还原糖含量, 并记录 pH 的变化。

1.3.3 菌丝球生物量测定 发酵液经 4 层纱布过滤, 置滤纸上吸干水分后用电子天平称菌丝球湿重。

1.3.4 不同初始 pH 值试验 从 pH 4~8.5 分设 10 个处理, 采用一级液体菌种培养基摇床培养 144 h, 培养结束后测菌丝球生物量。

1.3.5 不同发酵温度试验 从 20~29℃ 分设 5 个温度处理, 采用一级液体菌种培养基摇床培养 144 h, 培养结束后测菌丝球生物量。

1.3.6 不同接种量试验 采用液体菌种发酵培养基, 分别按 2.5%~12.5% 的接种量接入一级液体菌种, 25℃ 摇床培养 5 d, 分别测量菌丝球生物量、菌丝球密度及菌丝球直径。

1.3.7 发酵指标测定 pH 值测定以 pHS-3C 型酸度计测定 pH 值。还原糖测定取发酵液上清液按 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量。

2 结果与分析

2.1 发酵初始 pH 值对双孢蘑菇菌丝球生物量的影响 试验结果表明: 当 pH 值小于 4 或者大于 pH 8.5 的时候, 双孢蘑菇菌丝不能生长; pH 6.5 时菌丝球生物量达到最大值。当发酵初始 pH 值超过 6.5 时, 随着 pH 值的上升, 菌丝球生物量逐步降低 (图 1)。

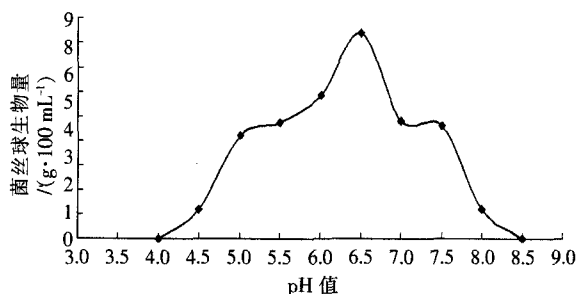


图 1 pH 值对双孢蘑菇生物量的影响

2.2 培养温度对菌丝球生物量影响 温度试验结果表明: 25℃ 时, 双孢蘑菇菌丝球生物量达 9.32 g/100 mL, 菌丝球密度达 437 个/mL, 均为最大值 (表 1)。因此, 25℃ 为双孢蘑菇 2796 液体菌种发酵的最适温度。在 21~27℃ 内, 双孢蘑菇液体菌种的生物量均较稳定, 但培养温度超过 27℃ 后, 菌丝球的生物量显著下降。

2.3 接种量对菌丝球生物量的影响 不同接种量试验结果

收稿日期: 2009-08-04

基金项目: 武汉市重大科技产业化专项 (200720112027) 资助。

* 通讯作者。

表1 培养温度对双孢蘑菇菌丝生物量的影响

培养温度/°C	菌丝球生物量/(g·100 mL ⁻¹)	菌丝球密度/(个·mL ⁻¹)	菌丝球直径/mm
21	9.10	396	1.10
23	9.13	389	1.19
25	9.32	437	1.11
27	8.49	401	1.15
29	4.72	252	1.24

表明:液体菌种接种量为5%时菌丝球生物量接种量2.5%时有明显的提高,但是接种量超过5%后的各处理之间菌丝球的生物量、直径及数量差异不大(表2)。因此,双孢蘑菇液体菌种扩大培养时接种量选择5%较为合适。与其他一些食用菌液体菌种相比^[2],这一接种量相对较低,有利于降低液体菌种生产成本。

表2 不同接种量对液体菌种生物量的影响

接种量/%	2.5	5	7.5	10	12.5
菌丝球生物量/(g·100 mL ⁻¹)	6.46	11.93	11.42	10.86	10.44
菌丝球直径/mm	2.1	1.8	1.8	1.7	1.9
菌丝球数量/(个·mL ⁻¹)	341	426	404	423	417

2.4 双孢蘑菇液体菌种发酵试验结果 采用10 L气升式发酵罐进行的液体菌种发酵试验结果表明:发酵至第5天(96 h)时,双孢蘑菇菌丝球的生物量达到最大值的88.9%,至第6天(120 h)时,发酵罐中菌丝球生物量达到最大值,随后菌丝球的生物量保持相对稳定并开始逐步下降(图2)。发酵过程中还原糖含量相对稳定,pH值在前3天变化不大,但随后则明显下降,这与金针菇的液体发酵结果相似^[3]。通过对发酵过程中pH值与菌丝球生物量等指标分析,可以将第6天确定为发酵终点,而在生产应用中,可选择发酵第5天~第6天作为液体菌种发酵终点,此时的菌丝球生物量及活性最高。

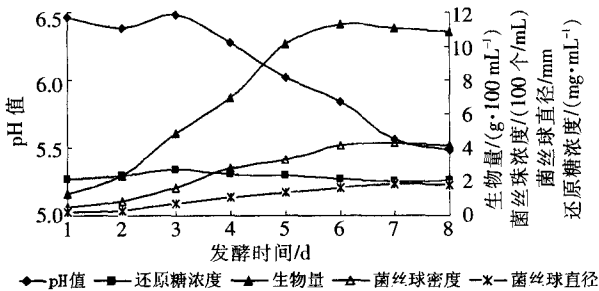


图2 双孢蘑菇发酵罐试验结果

2.5 液体菌种转接固体栽培种生长速度比较 将不同扩增倍数的液体菌种作为原种转接固体栽培种的试验结果表明:采用一级~四级液体菌种接种的菌种瓶菌丝的满瓶时间相近,除5级种之外,基本都处在一个上下5%波动区间之内,因此,液体菌种一级~四级种之间传代很稳定。接种各级液体菌种的满瓶时间皆比接种固体菌种的满瓶时间短,其平均满瓶时间为27 d,而按传统方法制备的栽培种满瓶时间为36 d,在满瓶时间上缩短了25%(图3),表明各级液体菌种均具有较好的活力。五级液体菌种的放大系数达1万倍,可满足工厂生产的需要。双孢蘑菇麦粒原种的满瓶时间一般需30 d左右^[4],而采用二级液体菌种作为原种只需10~12 d,因此,液体菌种可大大缩短双孢蘑菇原种和栽培种的制种时间。

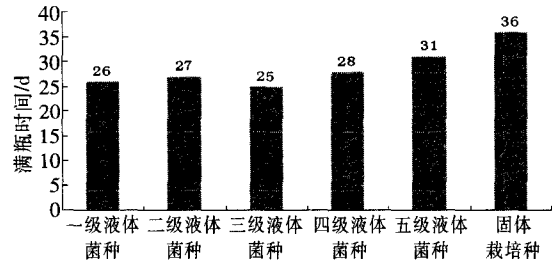


图3 液体菌种与固体菌种生长速度比较

按照传统的双孢蘑菇制种方法,1支试管斜面母种可转接6瓶750 mL原种,每瓶原种再转接40瓶左右750 mL的栽培种,故1支斜面母种可生产180 L固体栽培种。同样1支试管母种可转接20瓶一级液体菌种,每瓶装量100 mL,共2 L,按10%接种量经逐级扩大培养,每级液体菌种放大10倍,则二级~四级液体菌种扩增倍数依次为10~1 000倍,1支斜面母种生产的液体菌种量分别为20 L~2 000 L,若按1%接种量分别接种固体栽培种,则分别可生产2 000 L~200 000 L固体栽培种,是传统制种方法生产量的1 000多倍。因此,采用液体菌种作为原种制种可以保证菌种质量的均一性和稳定性。

3 小结

3.1 液体菌种具有制种周期短、菌龄一致、有利于机械化操作等优点,是食用菌工厂化生产发展的重要方向之一。研究通过摇瓶培养和发酵罐液体发酵试验,获得了适合于双孢蘑菇液体菌种发酵工艺条件为最佳初始发酵培养基pH值为6.5,最适培养温度为25°C,接种量为5%,培养时间5~6 d。pH值与菌丝球生物量可作为判断发酵终点的指标。

3.2 双孢蘑菇摇瓶液体菌种扩增试验结果表明,斜面母种经传代扩增1万倍后菌丝仍具有较高活力,可以满足液体菌种规模化生产的需要。不同扩增倍数的液体菌种传代稳定,菌丝活力相近。采用液体菌种作为原种制备双孢蘑菇固体栽培栽培菌种菌丝平均满瓶时间为27 d,比传统的固体原种制备栽培菌种时间缩短25%,1只斜面母种可生产的固体栽培种数量是传统制种方法的1 000多倍。

参考文献

[1] 吕作舟.食用菌栽培学[M].北京:高等教育出版社,2006:5.
 [2] 贾薇,张劲松,周昌艳,等.巴西蘑菇菌丝深层发酵培养条件的优化及成份分析[J].菌物系统,2002,21(4):573-579.
 [3] 王桂金.金针菇工厂化生产液体菌种[J].食用菌,2007(2):16-17.
 [4] 曲娟娟,许修宏,张大海,等.双孢蘑菇原种培养基的筛选[J].东北农业大学学报,2007,38(2):187-188.



(鸡腿菇鸡瑞菌株 文字见本期P28)