

尖顶羊肚菌液体培养条件的研究

邢增涛¹, 孙芳芳², 刘景圣³

(¹ 农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海); 农业部食用菌遗传育种重点开发实验室;
上海市农业遗传育种重点实验室; 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201106;

² 南京农业大学资环学院, 南京 210095; ³ 吉林农业大学食品科技学院, 长春 130118)

摘要: 尖顶羊肚菌液体静止培养的优化培养基为:蔗糖 4%, 胰蛋白胨 0.4%, 酵母粉 0.15%, 天门冬酰胺 0.08%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 1.45g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.48g/L, VB_1 25mg/L, $CaCl_2$ 0.013g/L, 微量元素溶液 1.0mL/L。培养基初始 pH 7.0, 装量 50mL/250mL, 接种量 2%, 培养温度 26℃。培养 10d 菌丝体生物量可达 12.64g/L。

关键词: 尖顶羊肚菌; 液体静止培养; 生物量; 正交实验

中图分类号: S646.703.6

文献标识码: A

羊肚菌属 (*Morchella*) 隶属于子囊菌纲 (Ascomycetes), 盘菌目 (Pezizales), 羊肚菌科 (Morchellaceae) [1]。世界上已经发表的羊肚菌属有 33 个种 (包括亚种和变种), 分布于亚洲、欧洲、北美洲及大洋洲等地区。据报道, 我国目前已经发现的羊肚菌有 11 个种, 分布在我国西北、西南、华中、华南和华东等地。据《本草纲目》记载, 羊肚菌具有“甘寒无毒, 益肠胃, 化痰理气”的特性和功效。现代研究也表明, 羊肚菌不仅具有一定的食用价值, 还具有抗疲劳、免疫调节等功效 [2~4]。尽管目前国内外都有羊肚菌栽培成功的报道, 但依然没有实现羊肚菌的商业化人工栽培。国内不少研究人员利用野生羊肚菌或羊肚菌菌丝体研制和开发了羊肚菌腐乳、羊肚菌保健胶囊、羊肚菌饮料和羊肚菌杏食品等食品或保健食品 [5~8], 受到了人们普遍欢迎。为了更好地开发和利用这一优质食用菌资源, 我们筛选出了适合液体生产的羊肚菌菌种, 同时对其液体培养条件进行了优化, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

羊肚菌 (*Morchella esculenta*) 菌株 0469、0464、0463、1209, 粗柄羊肚菌 (*Morchella crassipes*) 菌株 1208 和尖顶羊肚菌 (*Morchella conica*) 菌株均由中国微生物菌种保藏中心管理委员会农业微生物中心上海食用菌分中心提供。

收稿日期: 2004-10-19 原稿; 2004-11-29 修改稿

基金项目: 上海市农业科学院发展基金项目“羊肚菌双歧杆菌混菌发酵技术的研究”的部分内容

作者简介: 邢增涛 (1971-), 男, 2001 年毕业于南京农业大学食品科技学院, 博士, 助研, 主要从事食用菌生理生化和食用菌产品质量检测的研究, 发表主笔论文 4 篇。

1.2 培养基

1.2.1 菌种保藏培养基 PDA 粉(美国 DIFCO 公司产品)39g,加蒸馏水至 1L,pH 自然,121℃ 灭菌 15 min,制成斜面培养基。

1.2.2 基础培养基 胰蛋白胨 2.0g/L,酵母粉 1.0g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5g/L,KH₂PO₄ 1.45g/L,Na₂HPO₄·2H₂O 0.48g/L,VB₁ 25mg/L,CaCl₂ 0.013g/L,微量元素溶液(FeC₆H₅O₇·5H₂O 4.8g/L,ZnSO₄·7H₂O 2.64g/L,MnCl₂·4H₂O 2g/L,CoCl₂·6H₂O 0.4g/L,CuSO₄·5H₂O 0.4g/L)1.0mL/L。

1.2.3 液体发酵种子培养基 PDB 粉 美国 DIFCO 公司产品 24g,加蒸馏水至 1L,pH 自然,121℃ 灭菌 15min。

1.2.4 液体发酵菌种筛选用培养基 1.2.2 基础培养基加葡萄糖 20g/L,pH6.5,121℃ 灭菌 15min。

1.2.5 液体发酵培养基 正交试验因素与水平见表 1。实验中通过对培养基中碳氮源优化后进行配制。

表 1 试验因素和水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors(%)			
	A 蔗糖 A Sucrose	B 胰蛋白胨 B Tryptone	C 酵母粉 C Yeast extract powder	D 天门冬酰胺 D L-Asparagine
1	2.0	0.4	0.05	0.04
2	4.0	0.8	0.10	0.06
3	6.0	1.2	0.15	0.08

1.3 羊肚菌的培养

1.3.1 菌种活化 将所有保藏菌种分别接种在新鲜的 PDA 平板培养基上,26℃ 培养 1 周,进行菌种活化和复壮。将培养好的菌种保藏在 4℃ 冰箱中待用。

1.3.2 固体菌种均质化 取新鲜的 PDA 平板菌种,用打孔器在菌落边缘取直径 1.0cm 的菌种块。用加有定量无菌水的均质器在无菌条件下将接入菌种筛选培养基或种子培养基的菌种块打碎,26℃ 避光静止培养 10d。

1.3.3 液体菌种均质化 在培养条件优化和液体发酵实验中,首先将液体静止培养的菌丝于无菌条件下过滤,并用无菌水洗涤菌丝,然后用均质器将菌丝充分打碎,再用移液器定量接种。

1.4 生物量的测定

静止培养 10d 后,培养液经 40 目尼龙布过滤,菌丝体经蒸馏水冲洗数次后,冷冻干燥至恒重,电子天平称量菌丝体干重。

2 结果与分析

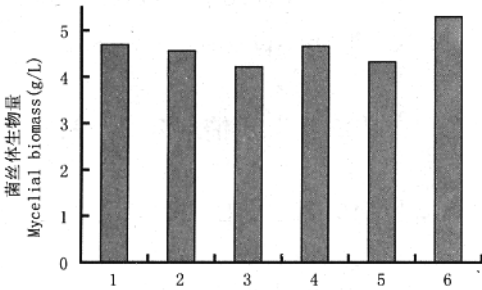
2.1 菌种的筛选

将 6 个受试菌株分别接入装有 50mL 液体发酵菌种筛选培养基的 250mL 三角瓶中,26℃ 避光静止培养 10d,测定菌丝体干重,筛选出最佳的液体发酵用菌种。从图 1 可以看出,尖顶羊肚菌在液体培养条件下的菌丝体生物量最大,因此,选择尖顶羊肚菌作为后试菌株。

2.2 培养基组成对液体培养尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

2.2.1 碳源的筛选 在基础培养基中分别加入 2% 的葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、玉米粉作为碳源,以 0.4% 的胰蛋白胨为氮源,进行碳源筛选实验。

从图 2 可以看出,尖顶羊肚菌对蔗糖的利用效果较好,而对玉米粉的利用率却非常低,因此选蔗糖作为尖顶羊肚菌液体发酵用碳源。



1~3、5:羊肚菌菌株 0469、0464、0463、1209
4:粗柄羊肚菌 1208 6:尖顶羊肚菌
1~3 5:*M. esculenta* strains 0469、0464、0463、1209
4:*M. crassipes* 1208 6:*M. conica*

图 1 液体发酵用羊肚菌菌株的筛选

Fig. 1 The selection of *Morchella* strains for submerged culture

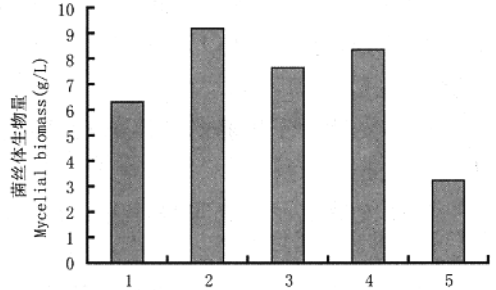
2.2.2 氮源的筛选 在基础培养基中分别加入 0.4% 的麸皮、玉米蛋白粉、豆粕粉、胰蛋白胨、硝酸铵、硫酸铵作为氮源,以 2% 的葡萄糖作为碳源,进行氮源筛选实验。

从图 3 可以看出,尖顶羊肚菌利用胰蛋白胨的效果较好,但对无机氮的利用率相对较低,因此选胰蛋白胨作为尖顶羊肚菌液体发酵用氮源。

2.2.3 正交试验结果 据报道,天门冬酰胺对食用菌液体发酵具有很好的促进作用,酵母粉不仅会影响食用菌液体发酵的菌丝体生物量,也会影响发酵液的风味。因此,除选用蔗糖作为碳源,胰蛋白胨作为氮源外,为了考察天门冬酰胺和酵母粉对尖顶羊肚菌液体发酵的影响,设计了四因素三水平正交试验。

采用 $L_9(3^4)$ 正交表,试验结果见表 2。培养基中的其它成分为: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 1.45g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.48g/L, VB_1 25mg/L, $CaCl_2$ 0.013g/L,微量元素溶液 1.0mL/L。

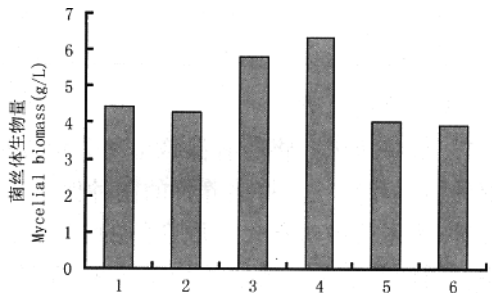
由表 2 可以看出,四因素中以 B 因素(胰蛋白胨)极差最大,即胰蛋白胨对尖顶羊肚菌液体发酵菌丝体生物量的影响最大,D 因素(天门冬酰胺)的影响最小。最优培养基为: $B_1A_2C_3D_3$,



1:葡萄糖 2:蔗糖 3:可溶性淀粉
4:麦芽糖 5:玉米粉
1:Glucose 2:Sucrose 3:Soluble starch
4:Maltose 5:Corn meal

图 2 不同碳源对尖顶羊肚菌液体发酵菌丝体生物量的影响

Fig. 2 The effect of different carbon sources on the mycelial biomass of submerge-cultured *M. conica*



1:麸皮 2:玉米蛋白粉 3:豆粕粉
4:胰蛋白胨 5:硝酸铵 6:硫酸铵
1:Wheat bran 2:Corn protein powder
3:Soybean cake powder 4:Tryptone
5:Ammonium nitrate 6:Ammonium sulphate

图 3 不同氮源对液体培养尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

Fig. 3 The effect of different nitrogen sources on the mycelial biomass of submerge-cultured *M. conica*

即 4%蔗糖 0.4%胰蛋白胨 0.15%酵母粉 0.08%天门冬酰胺。

表 2 正交试验结果

Table 2 The results of the orthogonal test

试验编号 Experiment nos.	因素 Factors				菌丝体生物量 Mycelial biomass(g/50mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.3141
2	1	2	2	2	0.3109
3	1	3	3	3	0.2923
4	2	1	2	3	0.5707
5	2	2	3	1	0.4440
6	2	3	1	2	0.3389
7	3	1	3	2	0.5726
8	3	2	1	3	0.3921
9	3	3	2	1	0.3809
K1	0.3058	0.4858	0.3484	0.3797	
K2	0.4512	0.3823	0.4208	0.4075	
K3	0.4485	0.3374	0.4363	0.4184	
R	0.1454	0.1484	0.0879	0.0387	

2.3 初始 pH 对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

分别选择初始 pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 进行试验,结果见图 4。从图 4 可以看出,尖顶羊肚菌菌丝在初始 pH4.0~7.0 之间都能生长,最适 pH7.0。pH 高于 7.0 会影响尖顶羊肚菌菌丝的生长。pH 低于 4.0 则会抑制尖顶羊肚菌菌丝的生长。

2.4 培养基装量对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

使用 250mL 三角瓶作为培养容器,培养基装量为 25mL、50mL、75mL、100mL、125mL 和 150mL,26℃ 避光静止培养 10d,结果见图 5。从图 5 可以看出,当装量在 25mL/250mL 时,液体静止培养 10d 的菌丝体生物量最大,达 14.3g/L。尖顶羊肚菌为好气菌,液体静止培养装瓶量越小,培养基与空气的接触面积相对越大,尖顶羊肚菌的菌丝就更容易生长。因此,在液体培养生产尖顶羊肚菌菌丝时必须重视通气量。

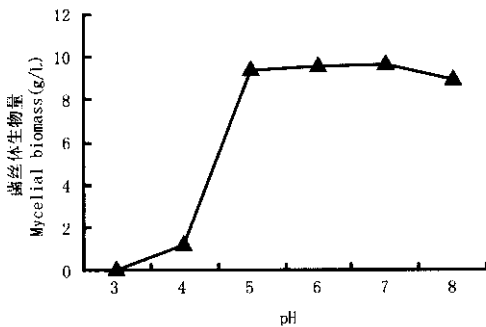


图 4 初始 pH 对液体培养尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

Fig. 4 The effect of initial pH on the mycelial biomass of submerge-cultured *M. conica*

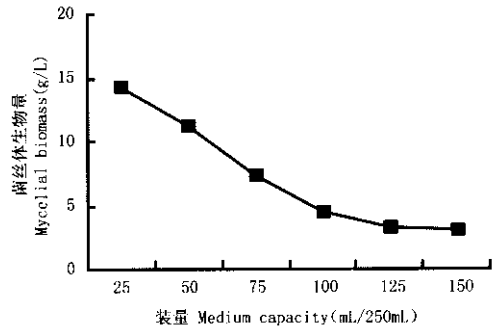


图 5 培养基装量对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

Fig. 5 The effect of medium capacity on the mycelial biomass of submerge-cultured *M. conica*

2.5 接种量对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

以培养基装量 50mL/250mL ,接种量 1%、2%、4%、6%、8% 和 10% 进行试验 ,结果见图 6。从图 6 可以看出 ,接种量对液体静止培养尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响并不大 ,接种量 2% 和接种量 10% 的菌丝体生物量基本相当。因此 ,在实际生产中选择 2% 的接种量。

2.6 培养时间对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

分别收集液体静止培养 2、4、6、8、10d 的尖顶羊肚菌菌丝体进行检测 ,结果见图 7。

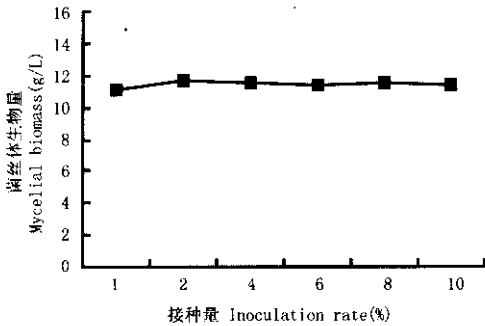


图 6 接种量对尖顶羊肚菌菌丝体生物量的影响

Fig. 6 The effect of inoculation rate on the mycelial biomass of submerge-cultured *M. conica*

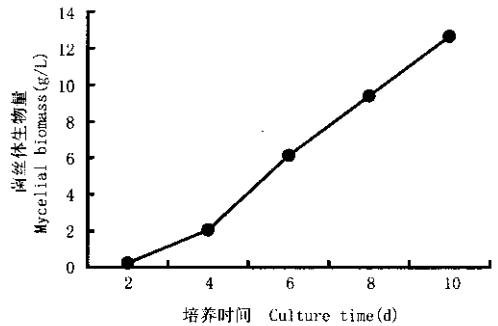


图 7 液体静止培养尖顶羊肚菌菌丝的生长曲线

Fig. 7 The growth curve of static submerge-cultured *M. conica* mycelia

从图 7 可以看出 ,接种 4d 后尖顶羊肚菌菌丝就开始快速生长 ,第 10 天 ,菌丝体生物量达 12.64g/L。

3 结论

经试验 ,筛选出尖顶羊肚菌为适于液体培养的菌种。尖顶羊肚菌液体振荡培养时 ,菌丝体极易形成菌团或大菌球 ,菌团或菌球内外菌丝体因吸收营养成分或氧气的不同 ,其生长状态和代谢情况必然存在一定的差异 ,不能真实地反映不同生长因素对尖顶羊肚菌菌丝生长的影响。因此 ,本研究选择静止培养研究尖顶羊肚菌菌丝的生理生化特征。

初步确定了尖顶羊肚菌菌丝液体静止培养条件。优化培养基为 :蔗糖 4% ,胰蛋白胨 0.4% ,酵母粉 0.15% ,天门冬酰胺 0.08% , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L , KH_2PO_4 1.45g/L , $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.48g/L , VB_1 25mg/L , $CaCl_2$ 0.013g/L ,微量元素溶液 1.0mL/L。初始 pH7.0 培养基装量 50mL/250mL ,接种量 2% ,培养温度 26℃。培养 10d 后菌丝体生物量可以达到 12.64g/L。试验为我们进一步研究尖顶羊肚菌发酵液促进双歧杆菌生长的能力或开发双歧杆菌和尖顶羊肚菌双菌保健产品打下了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [2] Duncan CJ, Pugh N, Pasco DS, et al. Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta* [J]. J Agric Food Chem 2002, 50(20): 5683~5685.
- [3] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲, 等. 羊肚菌抗疲劳作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 17~18, 32.
- [4] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲, 等. 羊肚菌免疫调节作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 12~13, 20.

- [5] 张 珍. 羊肚菌复合保健乳饮料的研制[J]. 甘肃农业大学学报, 2001, 36(4):421~424.
 [6] 蒋和林, 任祥琴. 羊肚菌保健胶囊的开发[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(2):16~19.
 [7] 王秀云. 羊肚菌腐乳的酿造研究[J]. 中国酿造, 1999(4):30~30.
 [8] 路等学, 李成一. 羊肚菌杏食品的研制[J]. 甘肃轻纺科技, 1997(1):21~23.

Studies on the Submerge-Cultured Conditions of *Morchella Conica*

XING Zeng-tao¹, SUN Fang-fang², LIU Jing-sheng³

(¹Supervision and Testing Center for Edible Fungi Quality(Shanghai), Ministry of Agriculture, P. R. China;
 Key Laboratory of Edible Fungus Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, P. R. China;
 Key Laboratory of Agriculture Genetics and Breeding of Shanghai;
 Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;
²Food Science and Technology College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
³Resource and Environment College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The experimental results showed that the optimized medium for static submerge-cultured *Morchella conica* was composed of sucrose 4%, tryptone 0.4%, yeast extract powder 0.15%, L-asparagine 0.08%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 1.45g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.48g/L, VB_1 25mg/L, $CaCl_2$ 0.013g/L, and element solution 1.0mL/L. And the optimal initial pH, medium capacity, inoculation rate and culture temperature were 7.0, 50mL/250mL, 2% and 26°C respectively. And the mycelial biomass of *Morchellaconica* can reach as high as 12.64g/L after inoculation 10 days.

Key words: *Morchella conica*; Static submerge-culture; Mycelial biomass; Orthogonal test

《食用菌学报》2005 年征订启事

《食用菌学报》系由国家科委批准,全国公开发行的学术类刊物。主要为食用菌专业教学和科研人员、生产单位的技术人员及供销外贸系统和领导机关的专业干部提供食用菌遗传育种、驯化栽培、菇房管理、栽培材料、病虫害防治、生理生化及产后加工等方面的最新研究成果。


《食用菌学报》为季刊,16开本,64页,每期5.00元。2005年出版4期,全年30.00元(含平寄邮资,需挂号者另加12.00元)。自办发行。本编辑部尚有少量1994年~2004年余刊。1994年二期15.00元(含平寄邮资);1995~2004年每年四期为30.00元(含平寄邮资)。欢迎读者直接向本编辑部订阅。

汇款地址:上海市北翟路2901号 上海市农业科学院信息所 《食用菌学报》编辑部
 邮政编码:201106

开户银行:农行长宁区北新泾支行

帐号:3283-00873000886

尖顶羊肚菌液体培养条件的研究

作者: [邢增涛](#), [孙芳芳](#), [刘景圣](#)
作者单位: [邢增涛\(农业部食用菌产品质量监督检验测试中心\(上海\);农业部食用菌遗传育种重点开发实验室;上海市农业遗传育种重点实验室;上海市农业科学院食用菌研究所,上海,201106\)](#), [孙芳芳\(南京农业大学资环学院,南京,210095\)](#), [刘景圣\(吉林农业大学食品科技学院,长春,130118\)](#)
刊名: [食用菌学报](#) 
英文刊名: [ACTA EDULIS FUNGI](#)
年,卷(期): 2004,11(4)
被引用次数: 10次

参考文献(8条)

1. [路等学](#); [李成一](#) 羊肚菌杏食品的研制 1997(01)
2. [王秀云](#) 羊肚菌腐乳的酿造研究 1999(04)
3. [蒋和林](#); [任祥琴](#) 羊肚菌保健胶囊的开发 1999(02)
4. [张珍](#) 羊肚菌复合保健乳饮料的研制[期刊论文]-[甘肃农业大学学报](#) 2001(04)
5. [孙晓明](#); [张卫明](#); [吴素玲](#) 羊肚菌免疫调节作用研究[期刊论文]-[中国野生植物资源](#) 2001(02)
6. [孙晓明](#); [张卫明](#); [吴素玲](#) 羊肚菌抗疲劳作用研究[期刊论文]-[中国野生植物资源](#) 2001(01)
7. [Duncan CJ](#); [Pugh N](#); [Pasco DS](#) Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*[外文期刊] 2002(20)
8. [黄年来](#) [中国食用菌百科](#) 1993

引证文献(10条)

1. [陈立位](#), [柴红梅](#), [黄兴奇](#), [赵永昌](#) 羊肚菌属真菌菌丝及菌核多态性研究进展[期刊论文]-[中国食用菌](#) 2011(2)
2. [纪亚君](#) 羊肚菌研究概况[期刊论文]-[青海畜牧兽医杂志](#) 2010(1)
3. [江洁](#), [盖萌](#) 羊肚菌菌丝体液体培养产胞外多糖条件的研究[期刊论文]-[食用菌](#) 2010(3)
4. [谢占玲](#), [何智媛](#), [唐龙清](#), [王学鲁](#), [朱海梅](#), [杨家华](#), [洒威](#) 五株羊肚菌碳、氮源及适合发酵菌株的筛选[期刊论文]-[食用菌学报](#) 2009(1)
5. [王广耀](#), [蒋晓成](#), [程喆](#) 羊肚菌菌种分离及母种培养基的筛选[期刊论文]-[北方园艺](#) 2009(9)
6. [李树森](#), [陈文强](#), [邓百万](#), [谭福祥](#), [梁军龙](#) 秦巴山区羊肚菌的栽培试验初报[期刊论文]-[食用菌](#) 2008(2)
7. [欧超](#), [王娣](#), [张兆轩](#), [李正鹏](#), [蔡永萍](#), [林毅](#) 羊肚菌液体深层发酵条件[期刊论文]-[食品与生物技术学报](#) 2007(2)
8. [熊艳](#), [车振明](#) 羊肚菌液体发酵培养的研究现状和展望[期刊论文]-[食品研究与开发](#) 2007(1)
9. [王莹](#), [孙永海](#), [王笑丹](#), [孟祥艳](#) 粗柄羊肚菌菌丝体液体培养条件的优化[期刊论文]-[食用菌](#) 2007(6)
10. [白文](#), [刘景圣](#), [邢增涛](#) 羊肚菌发酵液培养双歧杆菌的特性研究[期刊论文]-[农产品加工·学刊](#)

2006(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_syjxb200404008.aspx