

基于生物量的杏鲍菇菌株筛选及液态摇瓶发酵培养条件的优化

郑丽雪¹, 李尧尧¹, 郑雪平², 姚璐晔¹, 冀宏^{1*}

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 常熟 215500; 2. 昆山市正兴食用菌有限公司, 昆山 215300)

摘要: **目的** 筛选得到适于液态摇瓶发酵的杏鲍菇菌株, 并优化其最佳培养条件。 **方法** 采用单因素方法筛选发酵最佳培养基成分及发酵条件、采用正交试验优化最佳培养基配方、利用 Box-Behnken 中心组合试验, 对发酵过程中影响杏鲍菇菌丝生长的三个关键因素(温度、转速和发酵周期)进行优化, 最后用响应面分析方法对试验数据进行分析。 **结果** 优化后的发酵培养基组分为: 葡萄糖 3.50 g/100 mL, 胰蛋白胨 0.50 g/100 mL, 磷酸二氢钾 0.30 g/100 mL, 硫酸镁 0.20 g/100 mL, pH 自然。当发酵温度为 25 °C, 摇床转速 170 r/min, 发酵周期 7.5 d(180 h)时, 杏鲍菇菌丝体生物量(干重)达 1.687 g/100 mL。 **结论** 采用单因素、正交、响应面等试验方法筛选得到了菌株的最佳摇瓶发酵培养条件。

关键词: 杏鲍菇; 菌株筛选; 深层发酵; 正交实验; 响应面分析

Screening of strains and optimization of culture conditions with shaking flask fermentation of *Pleurotus eryngii* based on the biomass

ZHENGLi-Xue¹, LI Yao-Yao¹, ZHENG Xue-Ping², YAO Lu-Ye¹, JI Hong^{1*}

(1. College of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500 China;
2. Kunshan Zhengxing Edible Fungus Co., Ltd., Kunshan 215300, China)

ABSTRACT: Objective To screen *Pleurotus eryngii* strain suitable for shaking flask fermentation, and the best culture conditions was optimized. **Methods** The fermentation culture medium and fermentation conditions were optimized by the single factor method, the optimum medium formula was obtained by orthogonal experiment, the three key factors (temperature, speed and fermentation cycle) were optimized by Box-Behnken design principles, and the experimental data were analyzed by response surface analysis. **Results** The result showed that glucose 3.50 g/100 mL, tryptone 0.50 g/100 mL, monopotassium 0.30 g/100 mL, magnesium sulfate 0.20 g/100 mL were the best medium, pH naturally. Under the conditions of 25 °C, 170 r/min and 7.5 d (180 h), the mycelium biomass reached 1.687 g/100 mL. **Conclusion** The optimal fermentation culture conditions were screened by single factor, orthogonal and response surface experimental methods.

KEY WORDS: *Pleurotus eryngii*; strain screening; submerged fermentation; orthogonal test; response surface methodology

基金项目: 江苏省科技厅农业支撑项目(BE2013346)。

Fund: Supported by the Department of Jiangsu Province Agricultural Support Project (BE2013346)

*通讯作者: 冀宏, 教授, 博士, 主要研究方向为食用菌工程技术、技术经济及管理。E-mail: jihong@cslg.cn

*Corresponding author: Ji Hong, Professor, Changshu Institute of Technology, No.99, South third ring Road, Jiangsu 215500, China. E-mail: jihong@cslg.cn

1 引言

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)又名刺芹侧耳, 属担子菌纲(Basidiomycota)、伞菌目(Agaricales)、侧耳科(Pleurotaceae)、侧耳属(*Pleurotus*)^[1], 是适合食用菌工厂化栽培的主要品种之一。杏鲍菇形似鲍鱼, 因此得名; 杏鲍菇菌肉肥厚, 质地脆嫩, 口感绝佳; 蛋白质、碳水化合物、维生素及钙、镁、锌、铜等矿物质含量丰富^[2,3]。同时, 杏鲍菇脂肪含量低, 对人体具有抗癌、降血脂、促进胃肠消化、防止心血管病等功效^[4,5]。因此, 杏鲍菇可以说是一种非常珍贵的食用菌新品种, 市场需求量逐年增加, 市场前景广阔^[6]。

在世界范围内, 杏鲍菇主要分布于南欧、北非、中亚许多国家。而就国内来说, 四川(九寨沟、长海草地)、青海、新疆也发现杏鲍菇踪迹^[7,8]。近几年来, 我国的杏鲍菇栽培规模不断扩大。但由于生产栽培过程中对环境条件和栽培技术要求比较高, 所以, 杏鲍菇栽培通常难以达到高产优质^[9,10]。

自从 1948 年美国 Humfeld^[11]首先提出并成功地采用液体培养法培养双孢菇菌丝体以来, 利用液体深层发酵技术培养食、药用菌就引起了人们的重视。食用菌液体深层发酵具有工艺简便、菌种纯、周期短、成本低、污染少、操作简便等一系列优点^[12], 是未来食用菌菌种的主要研究方向^[13]。

目前, 关于杏鲍菇固体菌种栽培技术的研究很多, 而对于杏鲍菇液体菌种研究很少^[14,15], 王艳萍^[16]等仅对杏鲍菇液态发酵培养做了初步研究。在本实验中, 首先运用正交试验设计优化了杏鲍菇液体摇瓶发酵的培养基配方, 然后采用响应曲面分析方法确定杏鲍菇发酵的工艺条件, 旨在缩短发酵周期, 为杏鲍菇的工厂化生产打下理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验菌种

实验用斜面菌种由常熟理工学院食用菌工程技术实验室转接, 保藏。

2.1.2 种子培养基

黄豆粉 6 g/100 mL, 葡萄糖 3 g/100 mL, 胰蛋白胍 0.2 g/100 mL, 磷酸二氢钾 0.05 g/100 mL, 硫酸镁 0.05 g/100 mL, VB₁ 1 mg/100 mL。

表 1 杏鲍菇菌株编号

Table 1 Serial numbers of *Pleurotus eryngii* strains

编号	杏鲍菇菌种
A	东张保龄球状杏鲍菇
B	正兴柱状杏鲍菇
C	河北杏鲍菇
D	正兴保龄球状杏鲍菇
E	东张柱状杏鲍菇
F	脱毒杏鲍菇
G	杏鲍菇 1 号

2.1.3 发酵培养基

葡萄糖 2 g/100 mL, 胰蛋白胍 0.3 g/100 mL, 磷酸二氢钾 0.3 g/100 mL, 硫酸镁 0.15 g/100 mL, VB₁ 0.1 mg/100 mL, pH 自然。

2.2 试验方法

2.2.1 菌丝体干重测定

将杏鲍菇发酵液过 80 目不锈钢标准筛, 用蒸馏水冲洗三次, 然后将过滤所得菌丝体放入 60 °C 干燥箱中烘干至恒重, 得杏鲍菇菌丝体细胞干重(DCW)。

2.2.2 摇瓶发酵

将杏鲍菇液体菌丝体接种到发酵培养基中, 接种量为 5% (v:v), 25 °C、180 r/min 恒温振荡培养 7 d。

2.2.3 优势菌株筛选

在同等条件下, 将表 1 中 7 株杏鲍菇菌种分别接入 PDA 培养基中, 于 25 °C 培养箱中培养, 观察菌丝萌发情况。然后将活化好的杏鲍菇菌种接种到发酵培养基中进行发酵培养, 发酵结束后, 以 DCW 作为考察指标, 筛选出优势菌株。

2.2.4 发酵培养基最适碳、氮源筛选实验

2.2.4.1 不同碳源对杏鲍菇发酵产菌丝体的影响

考察葡萄糖、麦芽糖、果糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉 6 种碳源对杏鲍菇发酵菌丝体干重的影响, 确定最佳碳源。培养基组成为: 胰蛋白胍 0.3 g/100 mL、磷酸二氢钾 0.3 g/100 mL、硫酸镁 0.15 g/100 mL、碳源 2 g/100 mL、pH 自然。

2.2.4.2 不同氮源对杏鲍菇发酵产菌丝体的影响

考察牛肉膏、胰蛋白胍、酵母膏、硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾 6 种氮源对杏鲍菇发酵菌丝体干重的影响, 确定最佳氮源。培养基组成为: 葡萄糖 2 g/100 mL、磷酸二氢钾 0.3 g/100 mL、硫酸镁 0.15 g/100 mL、氮源 0.3 g/100 mL、pH 自然。

2.2.5 最适碳源、氮源、无机盐单因素试验

杏鲍菇液体发酵培养基中主要的营养成分是碳源、氮源与无机盐。因此,本实验分别选取碳源、氮源、磷酸二氢钾和硫酸镁进行单因素试验。各因素实验水平见表2。

表2 因素及水平
Table 2 Factors and the level of single-factor

因素	水平(g/100 mL)					
最佳碳源	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50
最佳氮源	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
磷酸二氢钾	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
硫酸镁	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30

2.2.6 发酵培养基正交试验

基于最佳单因素试验结果,进行四因素三水平正交试验设计,对发酵培养基成分进行优化。以DCW作为考察指标,每个试验组做三个平行。因素及水平设计见表3。

表3 正交试验因素及水平
Table 3 Factors and levels in orthogonal experiment

水平	因子			
	A(葡萄糖) g/100 mL	B(胰蛋白胨) g/100 mL	C(磷酸二氢钾) g/100 mL	D(硫酸镁) g/100 mL
1	2.5	0.5	0.25	0.15
2	3.0	0.6	0.30	0.20
3	3.5	0.7	0.35	0.25

2.2.7 发酵条件单因素试验

在最佳培养基配方的基础上,考察不同发酵周期对杏鲍菇发酵产菌丝体的影响,发酵后每隔24 h测定杏鲍菇菌丝体生物量(菌丝体干重)及发酵液pH值。

2.2.8 Box-Behnken的中心组合试验设计及响应面分析

根据Box-Behnken的中心组合设计原理,选择温度(X_1)、摇床转速(X_2)和发酵时间(X_3)为影响因子,以杏鲍菇菌丝体干重为响应值,采用响应面分析法对杏鲍菇摇瓶发酵工艺参数进行优化。实验设计见表4。

表4 编码与因子的实际浓度的对应关系

Table 4 The corresponding relation between encode and factor practical concentration

自变量	代号	编码水平		
	编码值	-1	0	1
温度	-1	24	25	26
摇床转速	0	140	160	180
发酵时间	1	6	7	8

3 结果与分析

3.1 优势菌株筛选试验结果

优势菌株筛选试验结果见图1。从图1可以看出,以DCW为考察指标,菌株E略高于其他6株菌株,从表1可知菌株E为东张柱状杏鲍菇。同时,通过观察菌株在平板上的生长情况,发现菌株E生长迅速,菌丝粗壮,适合作为工业生产用菌株。因此选择菌株E即东张柱状杏鲍菇作为进一步研究的实验菌株。

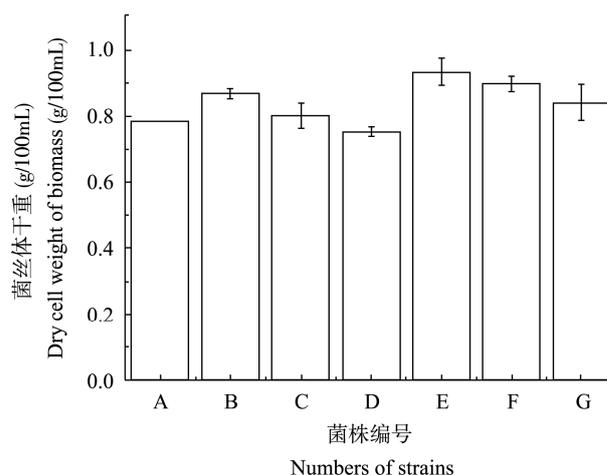


图1 发酵优势菌株筛选试验结果($n=3$)

Fig. 1 Result of screening test on superiority strain ($n=3$)

3.2 发酵培养基最佳碳、氮源试验结果

3.2.1 不同碳源对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

碳源是发酵培养基的基础,也是杏鲍菇菌丝体生长必不可少的营养因子。最佳碳源筛选试验结果见图2。结果表明,最佳碳源为葡萄糖,发酵后菌丝体生物量可达1.000 g/100 mL。其次为蔗糖,麦芽糖对杏鲍菇菌丝体生长的促进作用最小,菌丝体生物量仅为0.348 g/100 mL。这与杨桂梅^[17]、高红中等^[18]报道的实验结果不同,与王艳萍等^[16]报道的结果一致。说明不同菌株利用糖的差异很大。

3.2.2 不同氮源对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

氮源是培养基的重要组成部分。除少数几种固氮微生物外,大多数生物都需从外界获得氮源。从生理功能上来说,氮也是构成细胞的成分之一,是食用菌细胞合成蛋白质和核酸必不可少的主要原料。

最佳氮源筛选试验结果见图3。结果表明,杏鲍菇液体发酵的最佳氮源为胰蛋白胨,发酵后菌丝体生物量为1.179 g/100 mL。其次为酵母膏,硝酸钾对

杏鲍菇菌丝体生长的促进作用最小, 菌丝体生物量仅为 0.272 g/100 mL。

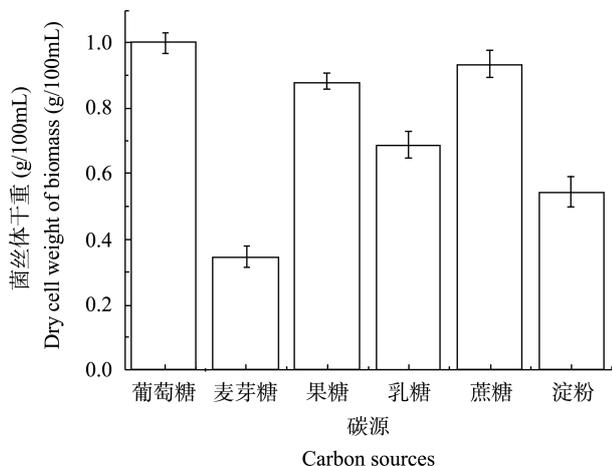


图 2 碳源对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响(n=3)

Fig. 2 Effect of carbon sources on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* (n=3)

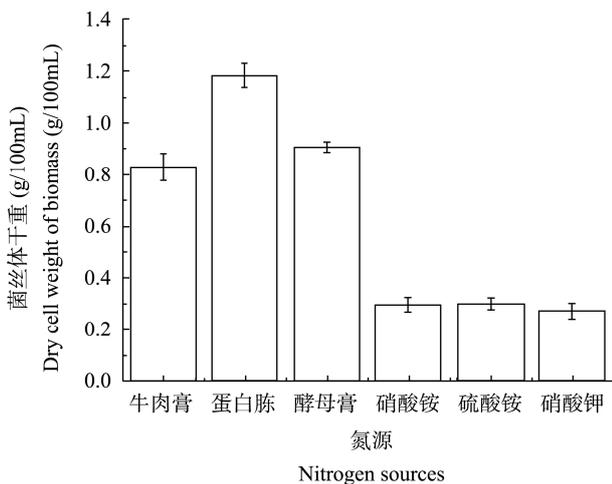


图 3 氮源对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响(n=3)

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* (n=3)

3.3 最适碳源、氮源、无机盐单因素试验结果

3.3.1 碳源质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

最佳碳源质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体发酵的影响结果见图 4。

结果表明, 当葡萄糖质量百分比浓度在 3.0 g/100 mL 时菌丝体产量达到最高, 生物量为 1.048 g/100mL, 其质量百分比浓度过低时, 杏鲍菇菌丝体产量较低, 而过高时产量又呈下降趋势。因此, 葡萄糖质量百分比过低或过高都不利于杏鲍菇菌丝体产量的提高, 故其在 2.5~3.5 g/100 mL 为宜。

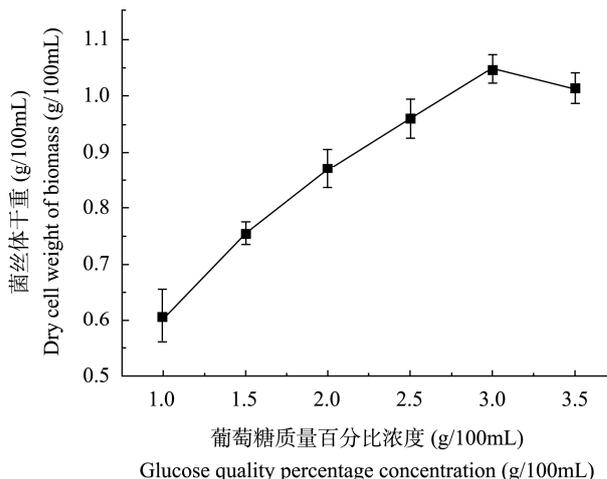


图 4 葡萄糖质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响(n=3)

Fig. 4 Effect of glucose quality percentage concentrations on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* (n=3)

3.3.2 氮源质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

最佳氮源质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体发酵的影响结果见图 5。

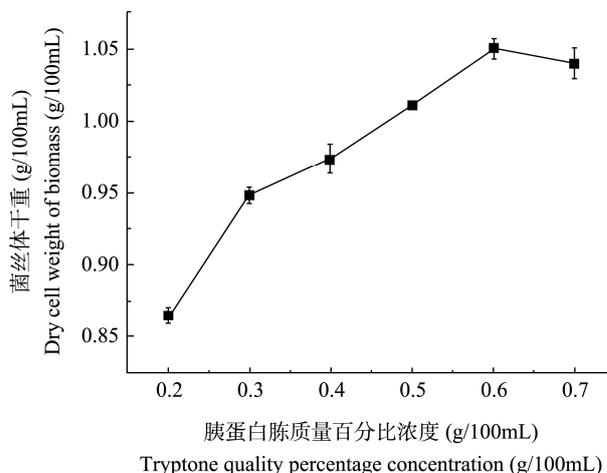


图 5 胰蛋白胨质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响(n=3)

Fig. 5 Effect of tryptone quality percentage concentrations on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* (n=3)

试验结果表明, 当胰蛋白胨质量百分比浓度达到 0.6 g/100 mL 时菌丝体产量达到最高, 生物量为 1.050 g/100 mL, 其质量百分比浓度过低时, 杏鲍菇菌丝体产量较低, 而过高时产量又呈下降趋势。综合考虑, 确定胰蛋白胨质量百分比浓度在 0.5~0.7 g/100 mL 为宜。

3.3.3 无机盐质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

3.3.3.1 磷酸二氢钾质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

磷酸二氢钾质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体发酵的影响结果见图6。

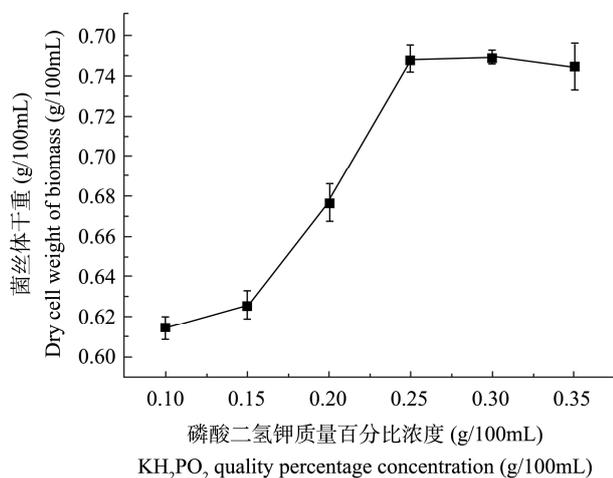


图6 磷酸二氢钾质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响($n=3$)

Fig.6 Effect of KH_2PO_4 quality percentage concentrations on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* ($n=3$)

从上图可以看出,当磷酸二氢钾质量百分比浓度达到 0.23 g/100 mL 时,菌丝体产量达到最高,为 0.749 g/100 mL,质量百分比浓度过高和过低时,都不利于杏鲍菇发酵菌丝体产量提高,故其在 0.25~0.35 g/100 mL 为宜。

3.3.3.2 硫酸镁质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响

硫酸镁质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体发酵的影响结果见图7。

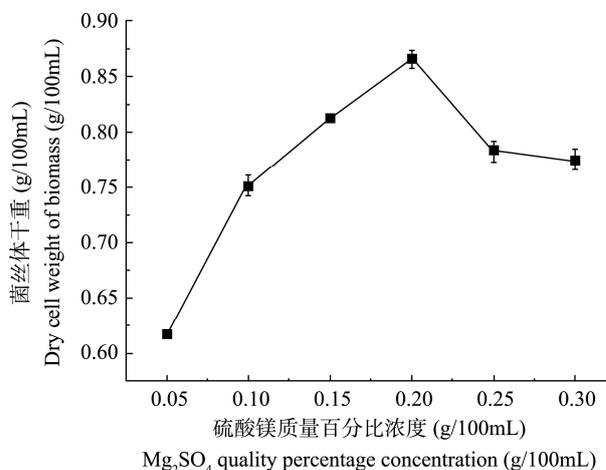


图7 硫酸镁质量百分比浓度对杏鲍菇菌丝体深层发酵的影响($n=3$)

Fig.7 Effect of MgSO_4 quality percentage concentrations on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii* ($n=3$)

从图中可以看出,当 MgSO_4 质量百分比浓度达到 0.20 g/100 mL 时,杏鲍菇菌丝体产量达到最高,为 0.866 g/100 mL,其浓度过高和过低都不利于杏鲍菇菌丝体产量的提高,故 MgSO_4 质量百分比浓度在 0.15~0.25 g/100 mL 为宜。

3.4 正交设计实验结果

正交试验结果和数据分析见表5、图8。

表5 正交实验结果与极差分析 $L_9(3^4)$
Table 5 Extreme value analysis of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

实验号	A 葡萄糖质量浓度 (g/100 mL)	B 胰蛋白胨质量浓度 (g/100 mL)	C 磷酸二氢钾质量浓度 (g/100 mL)	D 硫酸镁质量浓度 (g/100 mL)	菌丝体干重 (g/100 mL)
1	1(2.5)	1(0.5)	1(0.25)	1(0.15)	1.340
2	1	2(0.6)	2(0.30)	2(0.20)	1.457
3	1	3(0.7)	3(0.35)	3(0.25)	1.337
4	2(3.0)	1	2	3	1.510
5	2	2	3	1	1.440
6	2	3	1	2	1.443
7	3(3.5)	1	3	2	1.543
8	3	2	1	3	1.487
9	3	3	2	1	1.537
k1	1.378	1.464	1.423	1.439	
k2	1.464	1.461	1.501	1.481	
k3	1.522	1.439	1.440	1.445	
R	0.144	0.025	0.078	0.042	

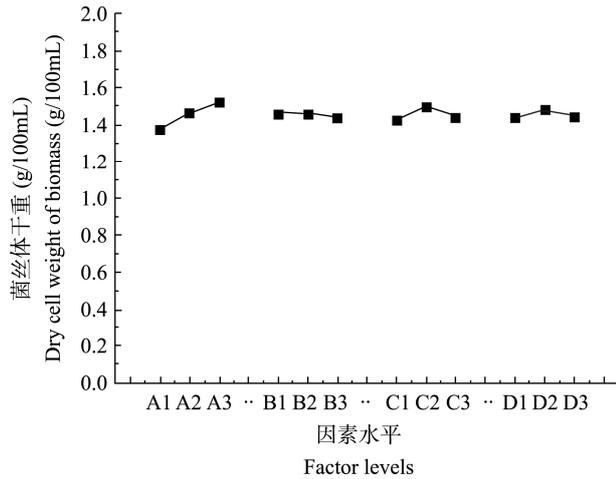


图 8 因素与指标关系趋势图

Fig. 8 Tendency chart on relation between mycelium fermentation factor and index

由表 5 可以看出, 7 号组合 $A_3B_1C_3D_2$ 所得杏鲍菇菌丝体干重最大, 为 1.543 g/100 mL。从极差分析来看, 各因子对杏鲍菇菌丝体发酵影响的主次顺序为: A(葡萄糖)>C(磷酸二氢钾)>D(硫酸镁)>B(胰蛋白胨)。从理论上讲, 培养基配方的最优组合为 $A_3B_1C_2D_2$, 即葡萄糖 3.5 g/100 mL, 胰蛋白胨 0.5 g/100 mL, 磷酸二氢钾 0.30 g/100 mL, 硫酸镁 0.20 g/100 mL。方差分析结果表明, 葡萄糖对菌丝体干重影响显著($P<0.05$)。

3.5 杏鲍菇菌丝体发酵条件(发酵周期)单因素试验结果

在发酵过程中, 每隔 24 h 测定杏鲍菇的菌丝体干重及发酵液 pH 值。综合这两个因素变化确定杏鲍菇的最佳发酵周期。结果见图 9。

从图中可以看出, 发酵 72 h 内, 杏鲍菇菌丝体干重上升较为缓慢, pH 值略有下降。3d 后, 菌丝生长进入快速生长期, 表现为菌丝体干重迅速提高, pH 值继续下降。在 7d 时, 发酵液 pH 降至最低点, 随后开始有所回升, 这时菌丝体干重虽有所增加, 但杏鲍菇生长已进入衰亡期, 之后, 菌丝体开始自溶。这标志着杏鲍菇菌丝体液态摇瓶发酵终点到达。综合比较, 最终确定杏鲍菇液态摇瓶发酵的最佳发酵周期为 7d。

3.6 响应面优化分析

3.6.1 响应面设计及结果

在单因素考察培养条件及正交设计优化培养基

实验的基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计对发酵温度、摇瓶转速及发酵周期进行响应面分析试验, 以杏鲍菇菌丝体干重为响应值。试验结果见表 6。

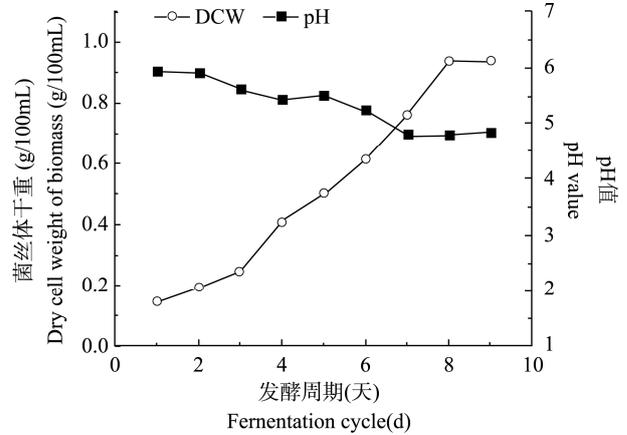


图 9 发酵周期及发酵过程 pH 值对杏鲍菇发酵产菌丝体的影响曲线

Fig. 9 Effects curve of fermentation cycle and pH value during the fermentation processes on the submerged fermentation for mycelium of *Pleurotus eryngii*

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 6 Designs and results of Box-Behnken design

试验号	X ₁ (温度/)	X ₂ (摇床转速 /r/min)	X ₃ (发酵 周期/d)	菌丝体干重 (g/100mL)
1	-1	-1	0	1.217
2	1	-1	0	1.353
3	-1	1	0	1.407
4	1	1	0	1.463
5	-1	0	-1	1.207
6	1	0	-1	1.037
7	-1	0	1	1.500
8	1	0	1	1.590
9	0	-1	-1	0.990
10	0	1	-1	1.200
11	0	-1	1	1.227
12	0	1	1	1.640
13	0	0	0	1.533
14	0	0	0	1.623
15	0	0	0	1.587
16	0	0	0	1.610
17	0	0	0	1.630

所得回归方程(编码后)如下:

$$R_1=1.60+0.014X_1+0.12X_2+0.19X_3-0.020X_1X_2+0.06$$

$$5X_1X_3+0.051X_2X_3-0.084X_1^2-0.15X_2^2-0.18X_3^2$$

通过方程显著性分析得到 $F=17.39$ 和相应的概率值 $P=0.0005$, 由方程的显著性检验可知, 该方程模型达到显著水平 ($P<0.05$), 在统计学上是有意义的。通过对实验模型的可信分析, 得到相关系数 $R^2=0.9572$, 模型相关度较好。所以可以使用该模型来分析响应值的变化。

由表 7 可知, 在一次项中, 摇床转速和发酵周期对杏鲍菇菌丝体干重的影响显著 ($P<0.05$), 而温度对

菌丝体干重影响不显著 ($P>0.05$)。在二次项中, 温度、摇床转速、发酵周期的影响都达到了显著水平。而在交互项中, 各因素的交互作用都不显著。

利用 Design Expert 软件对数据进行二次多元回归拟合^[19,20,21], 所得到的二次回归方程的响应面及其等高线图如图 10、11、12 所示, 温度、摇床转速、发酵周期及其交互作用对响应值的影响可以从图中直观地反映出来, 并确定各个因素的最佳水平。等高线形状可以反映交互作用大小。

表 7 响应面方差分析
Table 7 The variance analysis result of Response Surface Test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.72	9	0.080	17.39	0.0005
X_1	1.606×10^{-3}	1	1.606×10^{-3}	0.35	0.5728
X_2	0.11	1	0.11	23.22	0.0019
X_3	0.29	1	0.29	63.19	<0.0001
X_1X_2	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.35	0.5735
X_1X_3	0.017	1	0.017	3.68	0.0965
X_2X_3	0.010	1	0.010	2.25	0.1771
X_1^2	0.030	1	0.030	6.43	0.0389
X_2^2	0.098	1	0.098	21.45	0.0024
X_3^2	0.14	1	0.14	29.58	0.0010
残差	0.032	7	4.590×10^{-3}		
失拟项	0.026	3	8.673×10^{-3}	5.68	0.0634
纯误差	6.111×10^{-3}	4	1.528×10^{-3}		
总离差	0.75	16	总离差		

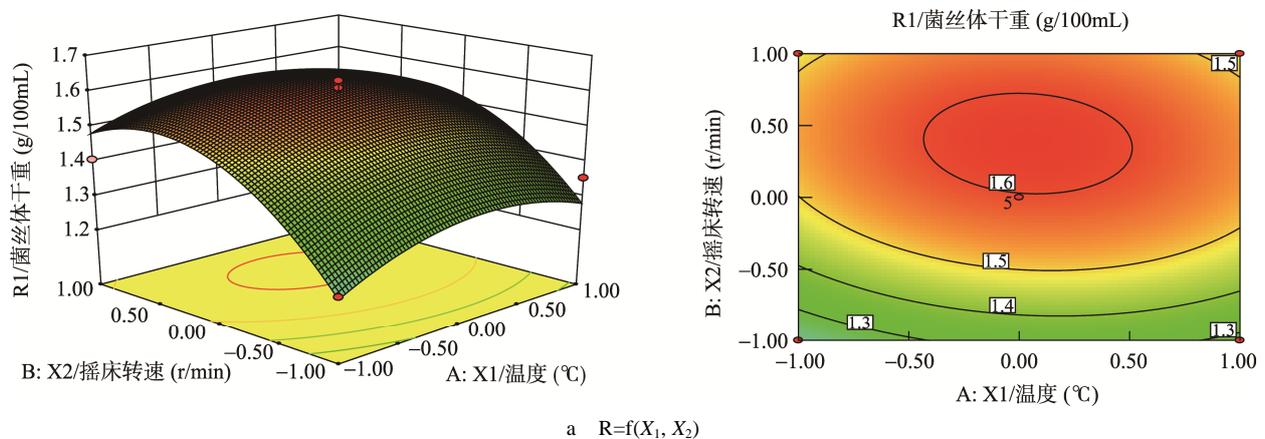


图 10 温度和摇床转速对 DCW 交互效应的响应面及其等高线图

Fig. 10 Figure of response surface and contour line of DCW vs fermentation temperature and rotation speed

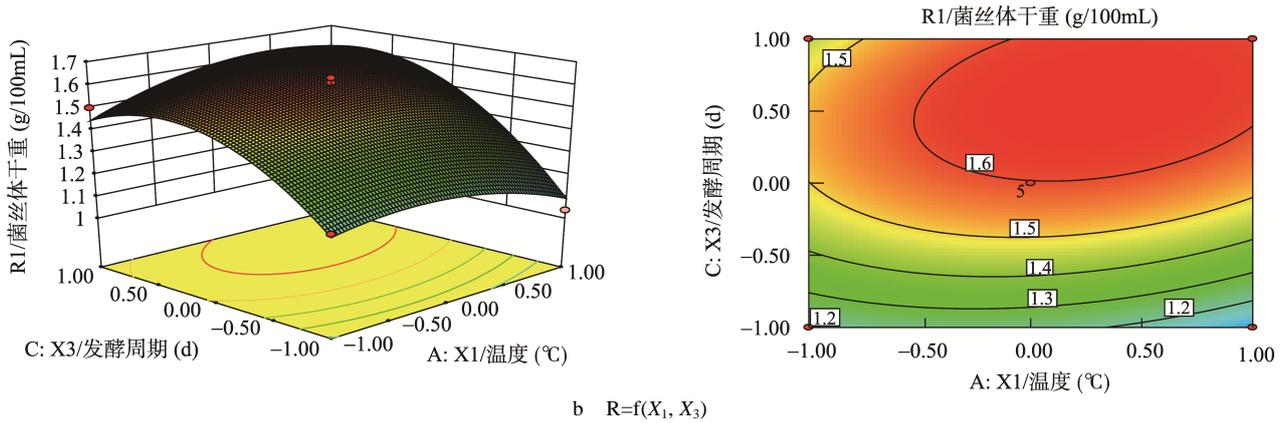


图 11 温度和发酵周期对 DCW 交互效应的响应面及其等高线图

Fig.11 Figure of response surface and contour line of DCW vs fermentation temperature and fermentation cycle

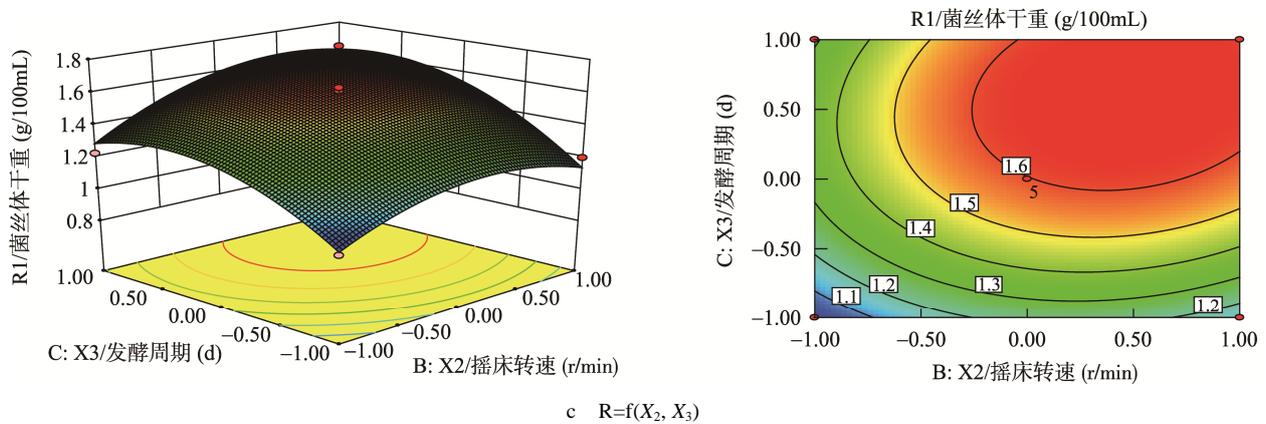


图 12 摇床转速和发酵周期对 DCW 交互效应的响应面及其等高线图

Fig. 12 Figure of response surface and contour line of DCW vs rotation speed and fermentation cycle

从上图可以看出, 发酵周期 $X_3=0$ 时, 杏鲍菇发酵菌丝体干重随着摇床转速和温度的升高而增加, 达到最大值后呈下降趋势, 从等高线的椭圆形形状可知温度与摇床转速的交互作用不显著。

从上图可以看出, 摇床转速固定在零水平时, 杏鲍菇发酵菌丝体干重随着温度和发酵周期的升高而增加, 达到最大值后呈下降趋势, 从等高线的圆形形状可知温度与发酵周期的交互作用比温度与摇床转速交互作用显著。

图 12 中, 温度水平 $X_1=0$ 时, 杏鲍菇发酵菌丝干重随着摇床转速和发酵周期的升高而增加, 达到最大值后呈下降趋势, 从等高线的椭圆形的形状可知摇床转速与发酵周期的交互作用不显著。

通过分析预测得到的稳定点(A, B, C)的代码值为(0.28, 0.47, 0.65), 为温度(A)=25.28℃, 摇床转速

(B)=169.33 r/min, 发酵周期(C)=7.65 d, 此时杏鲍菇菌丝体干重的最大估计值 $Y=1.687$ g/100 mL。考虑到实际操作便利, 确定发酵条件的最佳组合为: 温度 25℃, 摇床转速 170 r/min, 发酵周期 7.5 d(即 180 h)。在此条件下, 3 组验证实验平均结果为 1.660 g/100 mL, 比优化前提高了 81.4%。说明模型与预测值拟合较好, 回归方程为杏鲍菇深层发酵工艺模型提供了一个合适的模型。

4 结论与展望

本研究以当前国内主要杏鲍菇生产菌株为基础, 基于菌丝体干重, 从 7 种菌株中筛选出生长速度快、品质好的优质菌株。通过液态摇瓶发酵试验确定了其液体发酵的最佳培养基; 以菌丝体生物量为指标, 采用响应面分析法对液体发酵的培养条件进行优化,

具体结论如下:

(1) 以 DCW 为观测指标, 结合它们在平板拮抗实验时的生长状况, 筛选出生长速度较快、品质较好的东张柱状杏鲍菇为实验菌株。并以东张柱状杏鲍菇为进一步实验的对象, 对杏鲍菇液态摇瓶发酵的培养基组分及发酵条件进行了优化。

(2) 最适碳、氮源筛选试验结果表明, 杏鲍菇的碳源谱较广, 葡萄糖对其生长的促进作用最好, 氮源中胰蛋白胨对促进杏鲍菇菌丝体生长的作用最好。在最适碳、氮源确定的基础上, 对最适碳、碳源及磷酸二氢钾、硫酸镁进行单因素实验, 确定适宜水平范围。再通过正交设计对杏鲍菇液态摇瓶发酵的培养基成分进行了优化, 确定了最佳培养基配方: 葡萄糖 3.50 g/100mL, 胰蛋白胨 0.50 g/100 mL, 磷酸二氢钾 0.30 g/100 mL, 硫酸镁 0.20 g/100 mL, pH 自然。

(3) 对杏鲍菇液态摇瓶发酵的条件进行了优化。根据中心组合设计原理, 再运用响应面分析法对结果进行分析, 确定了杏鲍菇液态摇瓶发酵的最佳条件为发酵温度 25 °C, 摇床转速 170 r/min, 发酵周期 7.5 d(即 180 h)。在此条件下, 杏鲍菇菌丝体生物量可达 1.660 g/100 mL。

本试验为杏鲍菇菌丝体深层发酵技术的应用和工艺优化研究提供了理论基础。今后将继续开展杏鲍菇液体深层发酵工艺优化等方面工作, 如高密度发酵工艺优化等。同时, 实验室将开展关于杏鲍菇活性成分提取等方面的工作, 为开发第三代功能性食品及进一步开发新药奠定基础。

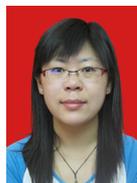
参考文献

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 43.
Huang NL. China mushroom Encyclopedia [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 43.
- [2] 颜明娟, 江枝和. 杏鲍菇营养成分的分析[J]. 食用菌, 2002, 24: 11-12.
Yan MJ, Jiang ZH. Analysis for nutritional ingredients of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible Fungi, 2002, 24: 11-12.
- [3] 张剑刚, 龚光禄, 桂阳, 等. 杏鲍菇、姬菇及茶树菇优良菌株的筛选[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(3): 33-39.
Zhang JG, Gong GL, Gui Y, et al. Screening for Excellent Strains of *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus comucopiae* and *Agrocybe pediadesi*[J]. Guizhou Agric Sci, 2013, 41(3): 33-39.
- [4] 张甫安, 朱宏发, 李明焱, 等. 珍稀菌菇实用栽培技术[M]. 香港: 香港教科文出版有限公司, 2000.
Zhang FA, Zhu HF, Li MY, et al. Practical cultivation techniques of rare fungus mushroom[M]. Hong Kong: Hong Kong's Educational, Scientific and Cultural Publishing co., Ltd, 2000.
- [5] 夏志兰. 珍稀食用菌栽培技术(二)茶树菇[J]. 湖南农业, 2001, (11): 12-14.
Xia ZL. Rare and precious edible fungus cultivation technique (2) *agrocybe cylindracea* [J]. Hunan Agric, 2001, (11): 12-14.
- [6] 俞琴, 刘民胜, 陈有容. 杏鲍菇子实体和菌丝体营养成分的比较[J]. 食用菌, 2003, (2): 7-8.
Yu L, Liu MS, Chen YR. Analysis and comparison of nutritional contents of mycelium and fruitbody of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible Fungi, 2003, (2): 7-8.
- [7] 王艳萍, 赵娜, 付丽红, 等. 杏鲍菇液态发酵培养的初步研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 30-34.
Wang YP, Zhao N, Fu LH, et al. Studies on the liquid-fermentation cultivation of *Pleurotus eryngii* [J]. China Brewing, 2012, 31(5): 30-34.
- [8] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 横断山区真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 334.
The Comprehensive Scientific Expedition to the Qinghai Tibet Plateau Chinese Academy of Science. Hengduan mountainous fungi [M]. Beijing: Science Press, 1996: 334.
- [9] 黎德荣. 杏鲍菇高产高效优质栽培试验[J]. 中国食用菌, 2012, 31(3): 22-24.
Li DR. Test of high yield cultivation of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible Fungi, 2012, 31(3): 22-24.
- [10] 张剑刚, 龚光禄, 朱国胜. 杏鲍菇的生长发育特性[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 15-18.
Zhang JG, Gong GL, Zhu GS. Growth and development characteristics of *Pleurotus eryngii* [J]. Guizhou Agric Sci, 2011, 39(2): 15-18.
- [11] 陈娟, 朱忠贵, 李萍萍. 食用菌液体发酵技术的研究进展与发展前景[J]. 食用菌, 2006, (增刊): 4-5.
Chen J, Zhu ZG, Li PP. Research progress and Prospect of technology of liquid fermentation of edible fungi [J]. Edible Fungi, 2006, (suppl): 4-5.
- [12] 蔡德华, 杨立红, 徐海英. 食用菌液体菌种制种工艺的研究[J]. 当代生态农业, 2003, Z1: 19-24.
Cai DH, Yang LH, Xu HY. Study on seed production technology of edible mushroom liquid strain [J]. Mod Ecol Agric, 2003, Z1: 19-24.
- [13] 马立芝. 杏鲍菇液体菌种培养及贮藏工艺的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Ma LZ. Research of *Pleurotus mushroom* liquid spawn cultivation

- and storage technology[D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.
- [14] 姚自奇, 兰进. 杏鲍菇研究进展[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 52-58.
Yao ZQ, Lan J. Advances in the research of *Pleurotus eryngii* [J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(1): 52-58.
- [15] 闻毛红, 朱将伟. 食用菌液体培养技术的发展与应用[J]. 现代农业科技, 2008, 19: 125-126.
Wen MH, Zhu JW. Development and application of technology of edible mushroom liquid [J]. Mod Agric Sci Technol, 2008, 19: 125-126.
- [16] 王艳萍, 赵娜, 付丽红, 等. 杏鲍菇液态发酵培养的初步研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 30-35.
Wang YP, Zhao N, Fu LH, et al. Studies on the liquid-fermentation cultivation of *Pleurotus eryngii* [J]. China Brewing, 2012, 31(5): 30-35.
- [17] 杨桂梅. 杏鲍菇液体菌种培养条件与应用试验[J]. 食用菌, 2014, (3): 1-2.
Yang GM. *Pleurotus eryngii* in liquid culture conditions and application test [J]. Edible fungi, 2014, (3): 1-2.
- [18] 高红中, 林雪娜, 王少秋, 等. 不同杏鲍菇菌株发酵条件比较研究[J]. 食用菌, 2014(2): 1-2.
Gao HZ, Lin XN, Wang SQ, et al. Comparative study on the fermentation conditions of different strains of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible fungi, 2014(2): 1-2.
- [19] 潘丽军, 陈锦权. 实验设计与数据处理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 297-298.
- Pan LJ, Chen JQ. The experimental design and data processing[M]. Nanjing: Southeast University press, 2008: 297-298.
- [20] 赫学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 38-40.
Hao XC, Yu XB, Liu ZY, et al. The response surface method in the application of optimization of microbial culture medium [J]. Food Res Dev, 2006, 27(1): 38-40.
- [21] 曲音波. 微生物技术开发原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 95-121.
Qu YB. Microbial technology development principle[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 95-121.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



郑丽雪, 硕士, 实验师, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: lixue9418@163.com



冀宏, 教授, 博士, 主要研究方向为食用菌工程技术、技术经济及管理。
E-mail: jihong@cslg.cn