

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202406017



鹿茸菇液体菌种培养过程中 生理指标的变化规律

彭汇涵, 于海玲, 王明元, 杨苗, 万雨欣

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 鹿茸菇菌丝采用液体摇瓶培养, 分别测定菌丝生物量、菌丝球数量、菌丝球直径、发酵液 pH 值、还原糖和氨基氮质量浓度, 淀粉酶活性、纤维素酶活性、漆酶活性等生理指标。结果表明: 鹿茸菇培养过程中菌丝生物量和菌丝球数量在第 10 天达到最大值, 分别为 $2.33, 106 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 菌丝球直径随培养时间延长而持续变大; 还原糖与氨基氮质量浓度先增加而后逐渐降低; 淀粉酶及纤维素酶活性最大值分别为 $0.17, 0.10 \text{ nkat}$, 漆酶胞外酶活性呈现明显上升趋势; 摇瓶培养第 8~10 天的液体菌种生物量达到最大 ($0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 液体菌种培养终点应控制在第 8~10 天, 此时菌种活力最高, 可用于发酵罐扩繁培养。

关键词: 鹿茸菇; 液体培养; 还原糖; 胞外酶

中图分类号: S 646

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0667-06

Change Laws of Physiological Indexes of *Lyophyllum decastes* Liquid Strains Cultivation Process

PENG Huihan, YU Hailing, WANG Mingyuan,
YANG Miao, WAN Yuxin

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The mycelia of *Lyophyllum decastes* is cultured in liquid shake flasks. The physiological indexes such as mycelium biomass, the mycelium ball numbers, the mycelium ball diameters, the pH value of fermentation broth, the mass concentrations of reducing sugar and amino nitrogen, the enzymatic activities of amylases, cellulases and laccases are measured separately. The results show that the mycelium biomass and the mycelium ball numbers both reach the maximum values which are $2.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $106 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively on the 10th day. The mycelium ball diameter continues to increase with the extension of cultivation time. The mass concentrations of reducing sugars and amino nitrogen increase firstly and then decrease gradually. The maximum enzyme activities of amylase and cellulase are 0.17 and 0.10 nkat respectively, while the laccase extracellular enzyme activity increases significantly. The biomass of liquid bacterial strains reaches maximum of $0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on the 8th-10th day in shake flask cultivation, and the end point of the liquid culture should be controlled at the 8th-10th when the activity of the strain is the highest at this time and it can be used for fermenter propagation culture.

Keywords: *Lyophyllum decastes*; liquid culture; reducing sugar; extracellular enzyme

鹿茸菇, 学名荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*), 又称荷叶蘑, 属伞菌目、白蘑科、离褶伞属。鹿茸菇菌盖呈现类似鹿茸的形状, 拥有独特的医疗作用与药用价值^[1]。鹿茸菇营养价值极高, 其子实体和菌丝的蛋

收稿日期: 2024-06-17

通信作者: 于海玲(1989-), 女, 讲师, 博士, 主要从事园艺植物栽培与管理的研究。E-mail: yuhl@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省厦门市科技计划项目(3502Z20226030); 福建省星火项目(2021S0036, 2022S0050)

白质质量分数约为 20%,28%,脂肪质量分数约为 1.5%,3.0%,多糖质量分数约为 4.0%,1.8%^[2-4],其中, β 1,3-*D* 葡聚糖、 β 1,6-*D* 葡聚糖^[5]可起到良好的抗菌作用,在治疗糖尿病和特异性皮肤炎、降低胆固醇、预防肿瘤癌症方面有明显作用^[6],因此,鹿茸菇在当今的市场中有着巨大的发展潜力。

菌种质量会影响菌丝的生长及后续出菇情况,研究食用菌液体培养过程中的生理指标变化规律,可以进一步明确菌种生长过程中的质量变化情况,确定发酵终点,为液体菌种的最佳培育时间提供参考。戴建清^[7]发现双孢蘑菇菌种在培养至第 8 天时的菌丝生物量、菌丝球直径及菌丝球个数均达到峰值,同时培养液中的各种胞外酶及活性物质质量浓度也达到最高。刘海娟等^[8]发现白灵菇液体发酵菌种最佳培养时间为第 5 天,从而有效缩短栽培周期。余昌霞等^[9]发现草菇液体菌种培养终点在 84~96 h,从而大大缩短了草菇菌种所需的活化时间。殷书平等^[10]发现香菇液体菌种最佳培育时间为 8~9 d。但目前,尚未有对鹿茸菇菌液体培养过程中生理指标变化规律的研究。

以往对于液体菌种发酵终点的研究,将菌丝生物量作为主要衡量指标^[11]。然而,除了菌丝生物量外,还有一些重要的生理指标可表征菌种活力,有研究认为菌丝生物量与菌丝活力之间并没有必然联系,只是反应发酵状态的指标之一^[12]。因此,本文对鹿茸菇液体菌种培养过程中生理指标的变化规律进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌种选择

鹿茸菇菌种由福建省厦门市如意食用菌生物高科技有限公司提供。

1.2 培养基的配置

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:40 g 马铃薯葡萄糖琼脂粉末,加入 1 000 mL 蒸馏水溶解,在 121 ℃,高压下,灭菌 20 min,冷却倒平板,备用。

马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)培养基:25 g 马铃薯葡萄糖肉汤,加入 1 000 mL 蒸馏水溶解,在 121 ℃,高压下,灭菌 20 min,备用。

1.3 鹿茸菇菌种的活化

将鹿茸菇菌种接种到 PDA 培养基中,在 28 ℃的电热恒温培养箱中培养 2 周,备用。

1.4 液体培养

取 100 mL 的 PDB 培养液于 250 mL 锥形瓶中,在 121 ℃下,灭菌 20 min,待培养液冷却后,接种 2 块菌块(1 cm² 活化的 PDA 菌种)。在 24 ℃,180 r·min⁻¹下,振荡培养液,每隔 2 d 随机取 3 个锥形瓶检测各项指标。

1.5 菌丝球的测定

取 20 mL 发酵液于 50 mL 离心管中,在 4 ℃,12 000 r·min⁻¹下离心 20 min,蒸馏水洗涤 3 次沉淀菌丝,在 65 ℃下烘干至恒质量。取 4 mL 培养液于平皿中计数菌丝球数量。取 2 mL 发酵液,随机选取测量菌丝球最长和最短长度,取平均值记为菌丝球直径。

1.6 发酵液 pH 值的测定

采用 pH 计测定发酵液的 pH 值。

1.7 还原糖及氨基氮质量浓度的测定

采用二硝基水杨酸法(DNS)法测定还原糖质量浓度^[13-14],采用茚三酮法测定氨基氮质量浓度^[15]。

1.8 纤维素酶、淀粉酶、漆酶活性的测定

根据文献^[15-16]测定纤维素酶活性。1 个酶活单位为每分钟释放出 1 mg 葡萄糖需要的酶量。根据文献^[15]中的方法测定淀粉酶活性。1 个酶活单位定义为每分钟生成 1 μ mol 葡萄糖需要的酶量。根据文献^[17]的方法测定漆酶酶活性。1 个酶活单位定义为每分钟内催化氧化 1 μ mol 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)需要的酶量。

1.9 菌种活力的测定

将培养时间为 2,4,6,8,10,12 d 的液体菌种再次进行液体培养,接种量为体积分数 4%液体培养基,在 24 ℃,180 r·min⁻¹下,振荡培养 6 d,取样计算菌丝生物量及菌丝球数量。

2 实验结果与分析

2.1 菌丝球的变化情况

不同培养时间鹿茸菇菌丝球变化情况,如图 1 所示。图 1 中: ρ 为菌丝生物量; n 为菌丝球数量; D 为菌丝球直径。由图 1 可知:在培养过程前 6 d 中,菌丝生物量增加缓慢,第 6~10 天鹿茸菇菌丝生物量增长加快,第 10~12 天菌丝生物量增长趋于稳定,菌丝生物量达到最高峰值(环境峰值, $2.33\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);在培养过程中,菌丝球数量稳步增长,第 10 天达到最大值为 $106\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,与菌丝生物量变化一致,第 10 天后营养成分减少,菌丝活性下降,菌丝球数量减少;菌丝球直径持续增加,前 8 d 增长较为缓慢,第 8~10 天增长迅速,在后期菌丝球边缘出现明显绒毛,第 12 天达到最大值为 5.84 mm ,菌丝球表面呈现光滑状态。

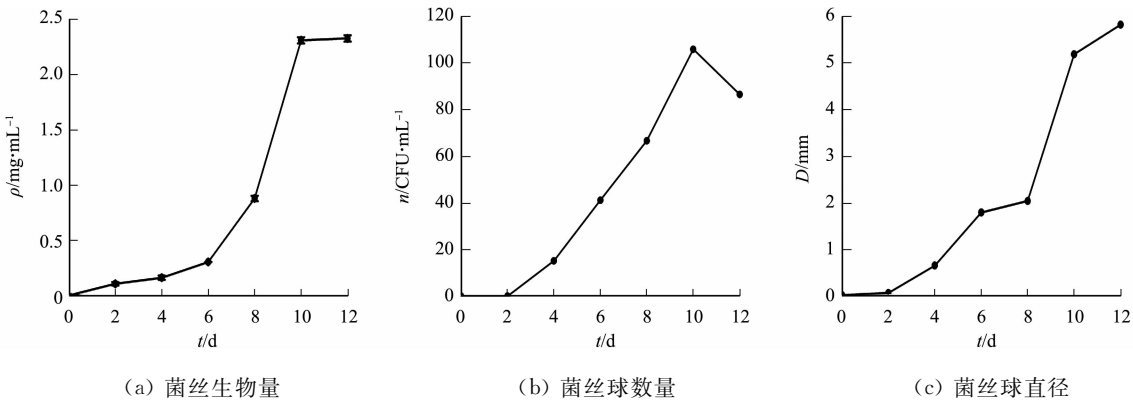


图 1 不同培养时间鹿茸菇菌丝球变化情况

Fig. 1 Change situation of *Lyophyllum decastes* mycelium ball at different culture times

2.2 不同培养时间菌液 pH 值的变化情况

菌液 pH 值会随着菌丝的生长而变化,影响菌丝胞外酶活性及细胞膜内外电位差,从而影响培养液中的营养物质吸收。不同培养时间鹿茸菇培养液 pH 值的变化情况,如图 2 所示。由图 2 可知:由于菌丝生长分解葡萄糖,使丙酮酸迅速积累,pH 值在第 0~2 天呈现下降趋势;而后菌丝产生代谢生成碱性物质,pH 值在第 2~6 天小幅回升;酸性代谢物质在培养液中持续累积,pH 值在第 6~10 天下降至最低值 1.93;第 10 天后,菌丝生长步入平缓,还原糖消耗,部分老化菌丝自溶后释放氨基酸等碱性物质,pH 值出现上升趋势。

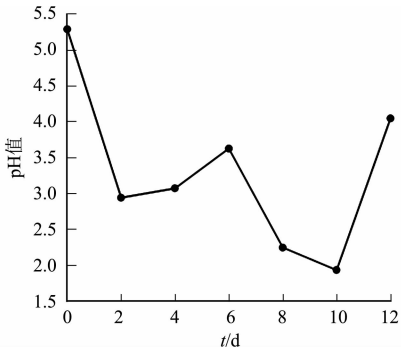
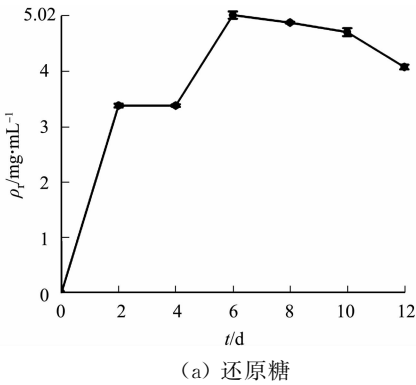


图 2 不同培养时间鹿茸菇培养液 pH 值的变化情况

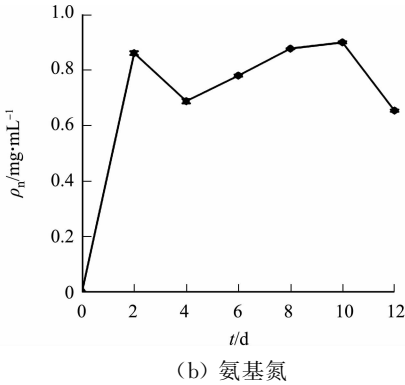
Fig. 2 Change situation of pH values of *Lyophyllum decastes* culture liquid at different culture times

2.3 还原糖及氨基氮质量浓度变化情况

还原糖与氨基氮质量浓度变化曲线,如图 3 所示。图 3 中: ρ_r , ρ_n 分别为还原糖、氨基酸的质量浓度。



(a) 还原糖



(b) 氨基氮

图 3 还原糖与氨基氮质量浓度变化曲线

Fig. 3 Change curves of reducing sugar and amino nitrogen mass concentrations

由图 3 可知:鹿茸菇菌液中还原糖质量浓度在第 0~6 天呈上升趋势,第 6 天达到峰值 $5.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;鹿茸菇菌液中氨基氮质量浓度在第 2~4 天呈下降趋势,随着菌丝生长,胞外酶分泌增多,培养基内氮源生成大于消耗,呈上升趋势,在第 10 天达峰值 $0.89\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,后再次下降;第 10 天后,鹿茸菇菌丝生物量达到最大开始趋于平缓,不断消耗培养基内大量含氮物质,氨基氮质量浓度呈下降趋势。

2.4 不同培养时间菌液中胞外酶活性变化情况

在培养过程中,胞外酶会将基料中的营养成分转化为自身的物质,胞外酶活力的高低决定着鹿茸菇对培养基料中物质的降解速率。不同培养时间鹿茸菇菌液中胞外酶活性变化情况,如图 4 所示。图 4 中: z_a 为淀粉酶活性; z_c 为纤维素酶活性; z_l 为漆酶活性。由图 4 可知:淀粉酶与纤维素酶活性均呈先上升后下降趋势,淀粉酶活性于第 6 天达到峰值 0.17 nkat ;纤维素酶于第 10 天达到峰值 0.10 nkat ;漆酶在培养过程时间内,整体一直处于较快的上升趋势,第 0~6 天增长缓慢,第 6~10 天增长迅速,第 10~12 天相对趋于稳定。

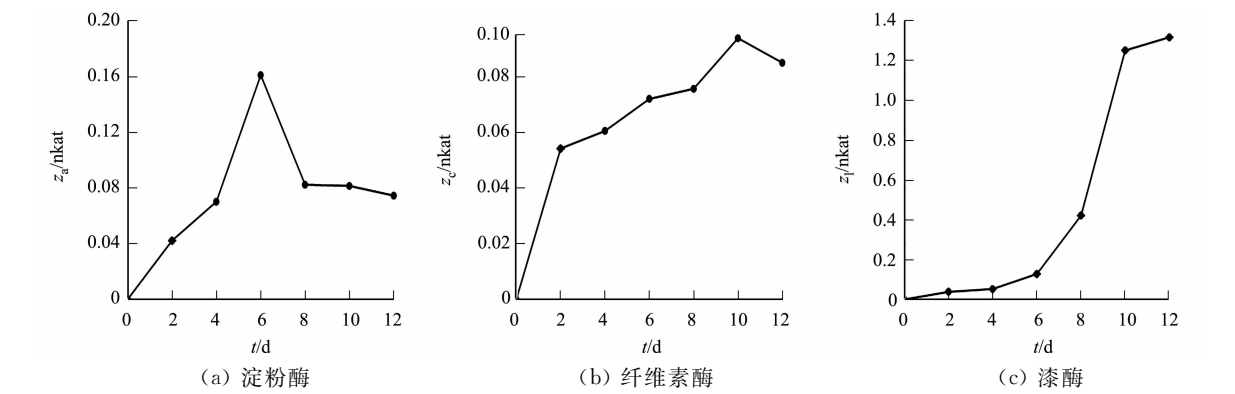


图 4 不同培养时间鹿茸菇菌液中胞外酶活性变化曲线

Fig. 4 Curves of extracellular enzyme activities change of *Lyophyllum decastes* bacterial liquid at different culture times

2.5 不同培养时间液体菌种活力验证

为进一步探究鹿茸菇液体菌种最佳培养时间,将培养时间为 2,4,6,8,10,12 d 的液体菌种再次进行为期 12 d 的液体培养,不同培养时间菌丝生物量与菌丝球数量,如图 5 所示。

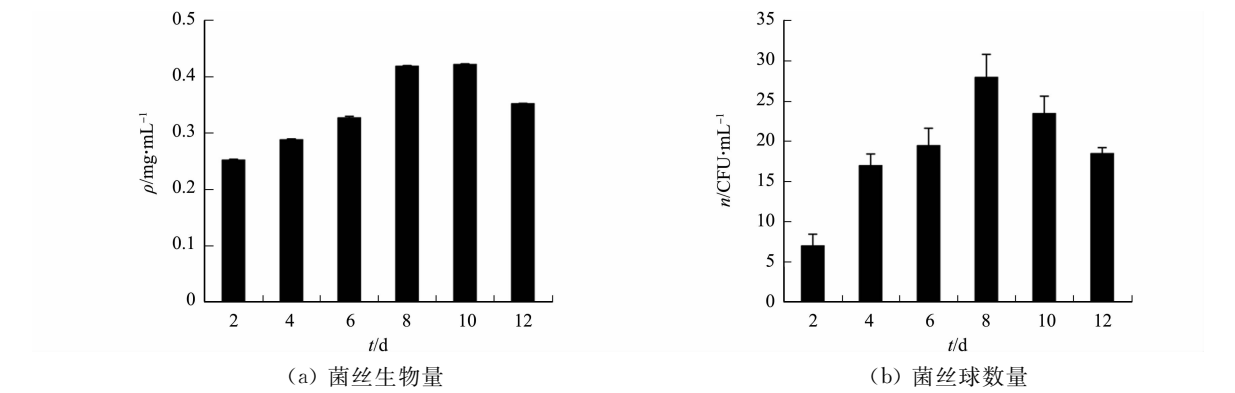


图 5 不同培养时间菌丝生物量与菌丝球数量

Fig. 5 Mycelium biomass and mycelium ball numbers at different culture times

由图 5 可知:液体菌种再次培养 8,10 d 的得到的菌丝生物量最大,分别为 $0.41, 0.42\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,与液体菌种培养 2,4,6,12 d 得到的菌丝生物量的差异有统计学意义($P<0.05$);第 8 天的液体菌种再次培养得到的菌丝球数量最大,为 $28\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,与液体菌种培养 2,4,6,8,10,12 d 得到菌丝生物量的差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,在液体培养第 8~10 天的鹿茸菇菌种更适宜作为发酵罐工厂化培养的种源。

3 结论

在鹿茸菇液体培养过程中,当培养第 0~3 天时,由于菌种需要适应新的生长环境,其菌丝生物量(图 1

(a)、菌丝球数量(图 1(b))及菌丝球直径(图 1(c))没有明显增长,此结果与余昌霞等^[9]对草菇、伍晋雨^[18]对灵芝与金针菇的研究结果一致。在培养中后期,菌丝生物量、菌丝球数量、菌丝球直径、氨基氮质量浓度(图 3(b))等生理指标在培养第 10 天均达到峰值。随着培养液中营养成分的减少及菌丝开始老化和菌丝活性减弱,其生理指标开始逐渐下降,到第 12 天,菌丝普遍老化,并产生自溶现象,此结果与殷书平^[10]研究的香菇理化指标变化趋势相似,第 8~10 天的鹿茸菇菌丝活力最高,此结果与单灿灿等^[19]对鹿茸菇菌种活力的研究结果一致。在整个培养过程中,菌丝生物量,菌丝球数量及菌丝球直径在培养的时间为第 0~10 天均处于稳定上升状态,第 10 天之后开始维持稳定甚至有所下降,由此预测鹿茸菇菌丝最适宜接种并进行下一步培养的时间约为第 8~10 天。

在液体培养及生理指标检测中,培养初期,胞外酶尚未分泌,菌丝增长缓慢,培养中期,菌丝生长逐渐旺盛,还原糖质量浓度变化呈现升高趋势,在第 6 天达到峰值,此时由于菌丝大量繁殖,致使培养基中环境承载量即将达到饱和,菌丝对于碳源的利用逐渐大于产出,形成还原糖质量浓度下降趋势。培养液 pH 值在整个培育过程中的变化趋势整体呈现先降低、后升高的趋势,在无人为干扰情况下,鹿茸菇菌丝在生长过程中通过代谢调节环境 pH 值,此过程在段应策等^[20]测定香菇最适生长 pH 值实验中得到相似验证,在培养第 10~12 天时,由于菌丝老化,停止生长繁殖,代谢减缓并开始自溶释放胞内氨基酸等物质,培养液 pH 值呈现一段上升趋势。胞外酶会将培养基中的营养成分转化为自身需要的物质,胞外酶的酶活性大小影响着其对培养基成分的降解速率,同时也影响着鹿茸菇对营养物质的吸收率。在培养过程中,鹿茸菇中漆酶的酶活性相较于淀粉酶及纤维素酶的酶活性变化非常明显(图 4),在第 10 天时达到快速增长巅峰,随后缓慢变化增加。漆酶是降解木质素大分子物质的主要酚氧化酶,能加速木质素芳香族高分子化合物的分解,提供菌丝所需的营养,漆酶酶活性越高,菌株分解木质素的能力越强^[21]。鹿茸菇的漆酶酶活性较另外两种胞外酶变化更加明显,因此,漆酶在鹿茸菇胞外酶中具有较高酶活。牛鑫等^[22]在鹿茸菇漆酶基因测定中也同样得出此结论,并从基因方面对此进行进一步验证。由于漆酶分解木质素会提供菌丝生长的部分能量,使纤维素酶及淀粉酶变化幅度不高。纤维素酶及淀粉酶的微小变化趋势与戴建清^[7]研究的双孢蘑菇的胞外酶变化趋势具有相似性。

在菌种活力验证方面,将培养不同时间的菌种进行二次培养,结果表明,再次培养的第 8,10 天鹿茸菇菌种生物量达到最大,分别为 0.41,0.42 mg · mL⁻¹。柯丽娜等^[23]研究证明杏鲍菇工厂化最适合发酵种为培养第 10 天的菌种,与文中鹿茸菇的最佳发酵菌种时间相近,表明培养第 8~10 天的菌种进行二次发酵,更有利于提升发酵水平,有利于鹿茸菇工厂化阶段的菌种繁育,可为鹿茸菇工厂化生产液体菌种扩繁提供重要参考。

参考文献:

[1] 王碧卿. 鹿茸菇的栽培现状与营养保健价值[J]. 食品安全导刊,2023(6):104-106. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2023.06.067.

[2] GÜLSENTEL M, OZTURK M, DURU A. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents [J]. Pharmaceutical Biology, 2015, 53(6): 824-830. DOI:10.3109/13880209.2014.943245.

[3] 席亚丽, 茆爱丽, 王晓琴, 等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白质营养价值评价[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 603-607. DOI:10.13346/j.mycosystema.2010.04.023.

[4] 张凤培, 徐慧, 邱绍峰, 等. 鹿茸菇多糖抗氧化保肝研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(11): 92-100. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0891.

[5] CLELAND C L. Integrating recent advances in neuroscience into undergraduate neuroscience and physiology courses[J]. Advances in Physiology Education, 2002, 26: 271-277. DOI:10.1152/advan.00044.2002.

[6] UKAWA Y, ITO H, HISAMATSU M. Antitumor effects of (1→3)-βD-glucan and (1→6)-βD-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimaji (*Lycophyllum decastes* Sing.) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 98-104. DOI:10.1016/s1389-1723(00)80041-9.

[7] 戴建清. 双孢蘑菇 W192 液体菌种摇瓶培养过程中的生理生化分析[J]. 福建农业学报, 2021, 36(2): 182-187. DOI:10.19303/j.issn.1008-0384.2021.02.007.

[8] 刘海娟, 刘利娟, 郑素月, 等. 白灵菇液体发酵条件优化[J]. 北方园艺, 2021(18): 125-131. DOI:10.11937/bfyy.

20210531.

[9] 余昌霞,陈明杰,李正鹏,等. 草菇 9715 液体菌种培养过程的生理变化及培养终点[J]. 微生物学通报,2020,47(2):665-672. DOI:10.13344/j. microbiol. china. 190261.

[10] 殷书平,程贤利,陈文强. 香菇液体发酵过程中生理指标的检测分析[J]. 北方园艺,2016(8):142-144. DOI:10.11937/bfyy. 20160839.

[11] 任亚倩,庄孟颖,刘兴健,等. 绣球菌双向液体发酵条件优化及其菌丝体多糖抗氧化活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(12):146-154. DOI:10.13207/j. cnki. jnwafu. 2022. 12. 016.

[12] 王逸初,白妍,贺晓龙,等. 北虫草液体菌种培养基优化及胞外多糖抗氧化性初探[J]. 延安大学学报(自然科学版),2024,43(1):1-7. DOI:10.13876/J. cnki. ydnse. 230114.

[13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry,1959,31(3):426-428. DOI:10.1007/s00216-022-04312-z.

[14] WOOD I P,ELLISTON A,RYDEN P,*et al.* Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay[J]. Biomass and Bioenergy,2012,44:117-121. DOI:10.1016/j. biombioe. 2012. 05. 003.

[15] 揭广川,陈红杰,李必金. 微波辅助复合酶法提取草菇中的风味物质[J]. 食品与机械,2015,31(1):164-166,243. DOI:10.13652/j. issn. 1003-5788. 2015. 01. 038.

[16] 王玉万,王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物学通报,1989,16(13):137-140,187. DOI:10.13344/j. microbiol. china. 1989. 03. 004.

[17] YU Hailong,XU Yuqin,NI Yonghao,*et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose from waste paper fibers by cationic polymers addition[J]. Carbohydrate Polymers,2018,200:248-254. DOI:10.1016/j. carbpol. 2018. 07. 079.

[18] 伍晋雨. 灵芝与金针菇液态单培养和共培养中胞外多糖的比较研究[D]. 厦门:厦门大学,2020. DOI:10.27424/d.cnki. gxmd. 2020. 004094.

[19] 单灿灿,叶典章,郭宇,等. 响应面法优化鹿茸菇液体菌种发酵配方[J]. 福建农业学报,2023,38(6):723-731. DOI:10.19303/j. issn. 1008-0384. 2023. 06. 011.

[20] 段应策,胡姿仪,杨帆,等. pH 和缓冲作用对香菇菌丝生长的影响[J]. 中国农业科学,2020,53(22):4683-4690. DOI:10.3864/j. issn. 0578-1752. 2020. 22. 014.

[21] 吉军,张玉璵,肖鑫,等. 白假鬼伞漆酶基因家族鉴定及表达模式[J]. 植物生理学报,2023,59(11):2027-2038. DOI:10.13592/j. cnki. ppj. 100641.

[22] 牛鑫,梁倩倩,宋利茹,等. 荷叶离褶伞漆酶的基因预测及其生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2021,40(增刊 1):2232-2243. DOI:10.13417/j. gab. 040. 002232.

[23] 柯丽娜,袁烽,陈炎腾,等. 液体菌种栽培杏鲍菇不同后熟期对菌丝生长和产量的影响[J]. 福建农业科技,2023,54(4):48-51. DOI:10.13651/j. cnki. fjnykj. 2023. 04. 007.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)