

鸡腿菇液体发酵工艺的优化

兰蓉 杨国伟 吴志明 苑函 (北京电子科技职业学院, 北京 100029)

摘要 [目的] 对鸡腿菇液体发酵培养基和培养条件进行筛选及优化。[方法] 以鸡腿菇为供试材料, 胞外多糖和菌丝体生物量为指标, 通过单因素试验和正交试验对鸡腿菇液体发酵培养基配方及培养条件进行筛选及优化。[结果] 鸡腿菇液体发酵产胞外多糖的最佳培养基组合为: 葡萄糖2.0%, 酵母膏0.75%, CaCl_2 0.2%; 鸡腿菇液体发酵产菌丝体的最佳发酵培养基组合为: 葡萄糖2%, 酵母膏0.75%, KH_2PO_4 0.2%; 鸡腿菇液体发酵产胞外多糖和菌丝体的最佳发酵条件均为: 起始pH值7.0, 接种量20.0%, 装液量120 ml, 培养天数6 d。[结论] 该研究为鸡腿菇的进一步开发提供了科学依据。

关键词 鸡腿菇; 液体发酵; 菌丝体; 胞外多糖

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-07179-03

Optimization of Liquid Fermentation Technology for *Coprinus comatus*

LAN Rong et al (Beijing Electronic Science and Technology Vocational College, Beijing 100029)

Abstract [Objective] The aim was to screen and optimize the liquid fermentation medium and culture condition of *Coprinus comatus*. [Method] With *C. comatus* as tested material, extracellular polysaccharide and mycelial biomass as indexes, the liquid fermentation medium formula and culture condition of *C. comatus* were screened and optimized by single factor experiment and orthogonal test. [Result] The optimal composition of mediums for *C. comatus* liquid fermentation producing extracellular polysaccharide were as follows: 2.0% glucose, 0.75% yeast extract and 0.2% CaCl_2 . The optimal composition of fermentation mediums for *C. comatus* liquid fermentation producing mycelia were as follows: 2.0% glucose, 0.75% yeast extract and 0.2% KH_2PO_4 . The optimal fermentation conditions of *C. comatus* liquid fermentation producing extracellular polysaccharide and mycelia were as follows: initial pH value of 7.0, inoculation amount of 20.0%, liquid volume of 120 ml and culture time of 6 d. [Conclusion] The research provided the scientific basis for further development of *C. comatus*.

Key words *Coprinus comatus*; Liquid fermentation; Mycelia; Extracellular polysaccharide

鸡腿菇(*Coprinus comatus*), 学名毛头鬼伞, 是一种集营养、保健和食疗为一体的珍稀食用菌。据报道, 干品鸡腿菇中含有丰富的蛋白质、氨基酸、多糖和矿物元素, 而脂肪含量仅为3%左右^[1-2]。另外, 药理试验证明: 鸡腿菇还有提高机体免疫力、抑制肿瘤生长、降血糖、降血脂等多种功效^[3-4]。目前鸡腿菇的生产多采用传统的固体栽培方式, 栽培周期长、生物转化率低, 难以满足市场需求。采用液体培养方式发酵生产鸡腿菇在短时间内能产生大量的菌丝体和代谢产物, 但鸡腿菇液体发酵方面的研究报道不多^[5-6]。笔者对鸡腿菇液体发酵培养基和培养条件进行筛选及优化, 旨在为鸡腿菇的进一步开发提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 鸡腿菇菌种: 由北京薛瑞菌业公司提供。斜面培养基: 20.0% 马铃薯, 2.0% 葡萄糖, 2.0% 琼脂。液体种子培养基: 20.0% 马铃薯, 2.0% 葡萄糖。发酵基础培养基: 20.0% 马铃薯, 2.5% 葡萄糖, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 起始pH值为6.5。试剂: 葡萄糖、木糖、果糖、乳糖、蔗糖、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 NH_4Cl 、酵母粉、蛋白胨、 HCl 、 NaOH 、蒸馏水、乙醇。

1.2 设备 超净工作台(北京市昌平长城空气净化工程公司, HZQ-Q), 生化培养箱(广东省医疗器械厂, LRH 250-A), 高压灭菌锅(北京市永光明医疗器械厂, GMSX 280), 恒温摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司, HZ200L), 离心机(北京市金仪仪器制造有限公司, TDL-5), 恒温干燥箱(北京市东联哈尔滨仪器制造有限公司, HPG 9145)。

1.3 方 法

1.3.1 培养方法。

基金项目 北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200700-002002); 北京市职业院校教师素质提高工程经费资助项目。

作者简介 兰蓉(1974-), 女, 江西樟树人, 硕士, 副教授, 从事食用菌深加工产品的研究与开发。

收稿日期 2009-02-24

(1) 斜面培养。将约0.5 cm²的已活化斜面菌种接种到斜面培养基中, 27℃培养, 直至长满斜面培养基表面。

(2) 液体种子制备。250 ml 三角烧瓶中装入液体种子培养基100 ml, 接种2~3块约0.5 cm²的斜面菌种, 置于恒温摇床, 140 r/min, 25℃培养6 d, 无菌条件下用无菌长柄剪刀将摇瓶中菌球剪碎, 得液体种子。

(3) 摇瓶培养。将液体种子按10.0%(V/V)接种量接种于装有100 ml 发酵培养基的250 ml 锥形瓶中, 于25℃、140 r/min 培养7 d。

1.3.2 测定方法。

(1) 生物量的测定^[7]。采用菌丝干重法, 将发酵液3 500 r/min 离心15 min, 得到菌丝体沉淀, 将菌丝体水洗2次, 置于50℃烘干至恒重, 称重, 按下式计算生物量:

$$\text{生物量}(\text{g/L}) = \frac{\text{菌丝体干重}}{\text{菌液体积}} \times 100\%$$

(2) 胞外多糖含量的测定。发酵液3 500 r/min 离心15 min, 留上清液备用。在上清液中加入95%乙醇至乙醇终浓度为70%, 4℃下醇析过夜, 离心后将得到的沉淀50℃真空干燥至恒重, 称重, 即为多糖含量。

1.3.3 培养基的单因素试验。通过上述摇瓶培养的方式, 利用发酵基础培养基, 进行单一碳源和氮源筛选试验。

(1) 碳源筛选试验。分别用乳糖、蔗糖、果糖和木糖取代发酵基础培养基中的葡萄糖, 在其中筛选出最适碳源。

(2) 氮源筛选试验。分别用 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 NH_4Cl 、酵母粉和蛋白胨取代发酵基础培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 在其中筛选出最适氮源。

1.3.4 培养条件的单因素试验。

(1) 接种量筛选试验。在发酵基础培养基中分别接种2.5%、5.0%、10.0%、15.0%和20.0%的液体种子, 25℃、140 r/min 摇床培养7 d, 筛选出最适接种量。

(2) 装液量筛选试验。在250 ml 的锥形瓶中, 分别装入

60、90、120、150、180 ml 的发酵基础培养基,均接种10.0%的液体种子,25、140 r/min 摇床培养7 d,筛选出最适装液量。

(3) 培养时间筛选试验。100 ml 发酵基础培养基中接种10.0%的液体种子,25、140 r/min 摇床培养,分别培养5、6、7、8、9 d,筛选出最适培养时间。

(4) pH 筛选试验。分别将发酵基础培养基的起始pH值调为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0,接种量为10.0%,25、140 r/min 摇床培养7 d,筛选出最适pH。

1.3.5 正交试验。根据上述单因素试验结果,以鸡腿菇生物量和胞外多糖为指标,安排正交试验,以进一步优化鸡腿菇液体发酵培养基配方和培养条件,具体的因素和水平见表1和2。

表1 液体发酵培养基的正交试验因素水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test for the liquid fermentation medium

水平 Levels	A 碳源 葡萄糖 Carbon sources (glucose)	% B 氮源 酵母膏 Nitrogen sources (yeast extract)	C 无机盐 Inorganic salt
1	1.0	0.25	0.2% KH_2PO_4
2	2.0	0.50	0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3	3.0	0.75	0.2% CaCl_2

表2 液体发酵培养条件的正交试验因素水平

Table 2 The factors and levels of the orthogonal test for the liquid fermentation culture conditions

水平 Levels	A 起始pH值 Initial pH value	B 接种量 % Inoculation amount	C 装液量 ml Liquid volume in flask	D 培养天数 Culture days
1	6.0	10.0	90	6
2	6.5	15.0	120	7
3	7.0	20.0	150	8

2 结果与分析

2.1 培养基的单因素试验结果

2.1.1 碳源筛选试验。从图1可看出,5种碳源中葡萄糖的效果最好,菌丝体生物量和多糖产量均达到最高值,果糖、蔗糖次之,木糖最差。

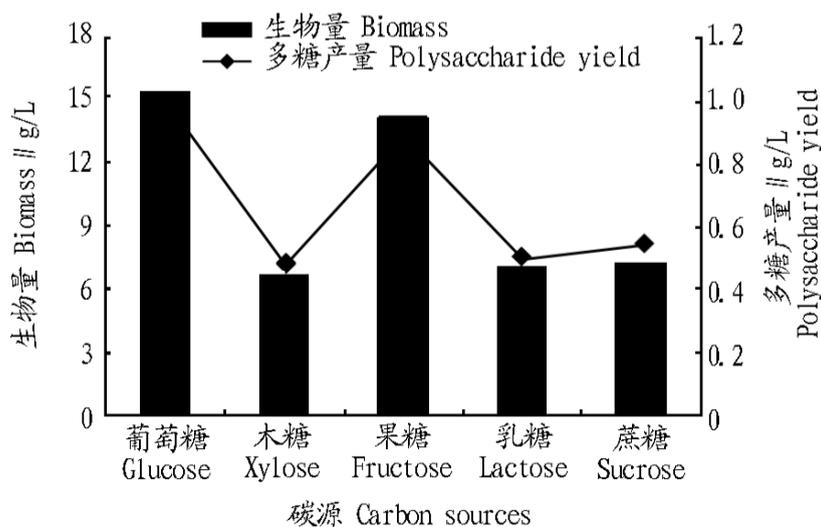


图1 碳源单因素试验结果

Fig.1 The single factor test results of carbon sources

2.1.2 氮源筛选试验。从图2可看出,6种氮源中酵母粉的效果最好,菌丝体生物量和多糖产量均达到最高值, NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 次之, NH_4Cl 最差。

2.2 培养条件的单因素试验结果

2.2.1 接种量筛选试验。从图3可看出,随着接种量的增

加,菌丝体和多糖产量也随之增加。说明在2.5%~20.0%范围内,接种量越多越好。

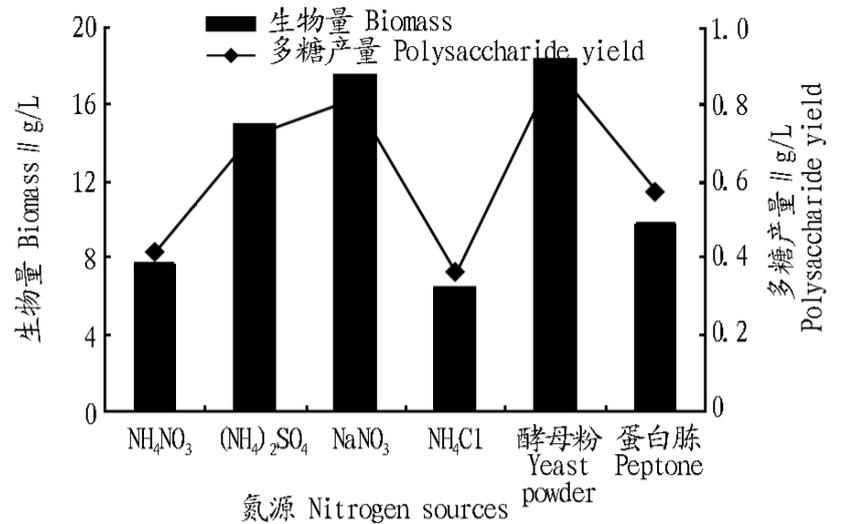


图2 氮源单因素试验结果

Fig.2 The single factor test results of nitrogen sources

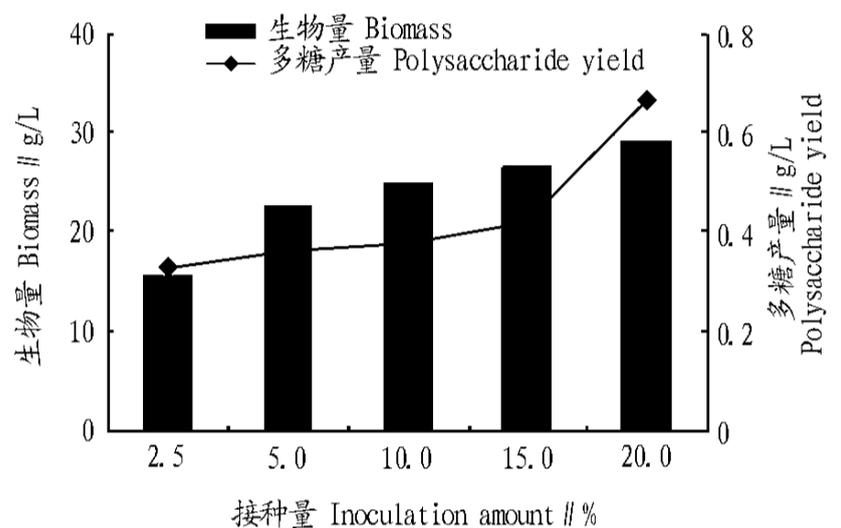


图3 接种量单因素试验结果

Fig.3 The single factor test results of inoculation amount

2.2.2 装液量筛选试验。从图4可看出,装液量为120 ml时胞外多糖含量最高,装液量为60 ml时生物量最高。装液量影响发酵液的溶氧状态,装液量增加会减少发酵过程中的通气量,不利于鸡腿菇的生长,所以菌丝体的生物量随着装液量的增多而降低。

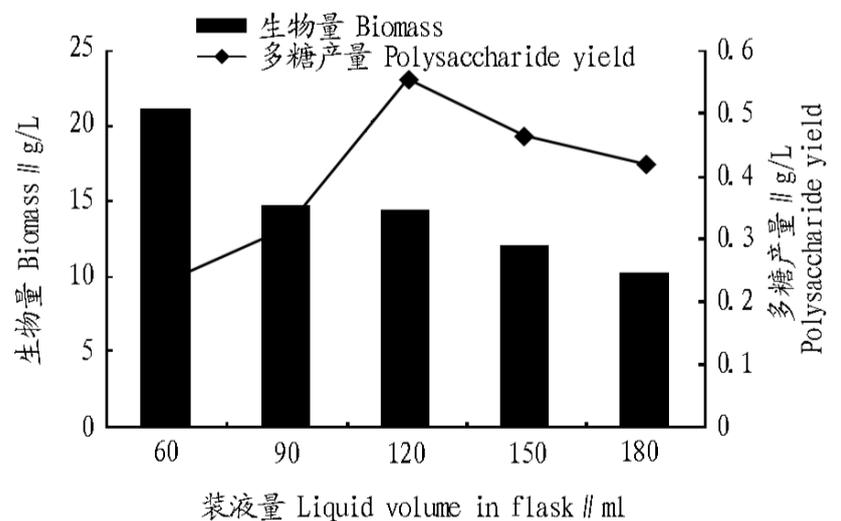


图4 装液量单因素试验结果

Fig.4 The single factor test results of liquid volume in flask

2.2.3 培养时间筛选试验。从图5可看出,随着发酵时间的延长,鸡腿菇生物量和胞外多糖产量不断增加,菌丝体生物量在6 d时达到最大值,超过6 d生物量开始下降;胞外多糖含量在7 d时达到最大值,超过7 d多糖含量开始下降。

2.2.4 pH 筛选试验。从图6可看出,pH值为6.5时效果最好,菌丝体生物量和多糖产量均达到最高值,pH值7.0次之,pH值4.0时最差。

2.3 培养基正交试验结果 鸡腿菇发酵最适培养基正交试

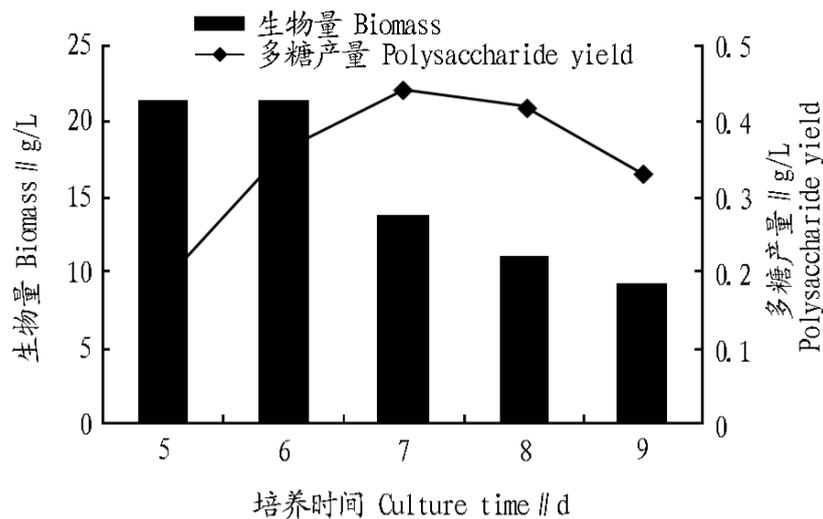


图5 培养时间单因素试验结果

Fig. 5 The single factor test results of culture time

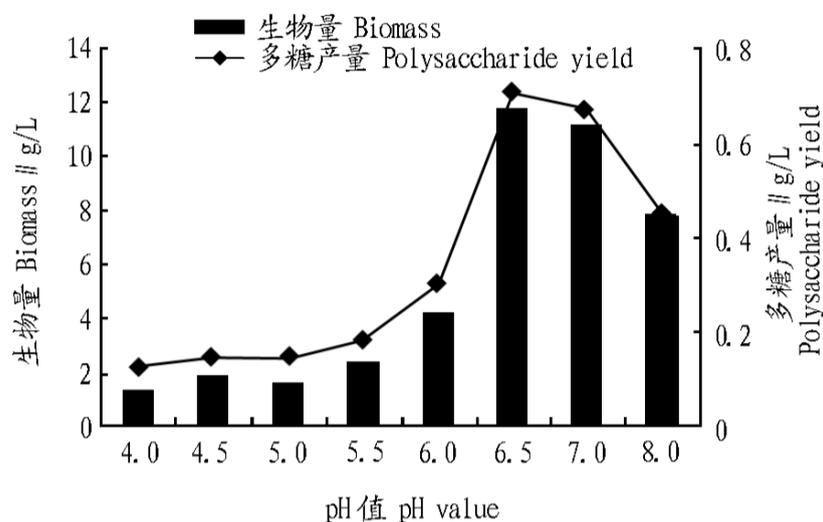


图6 pH 值单因素试验结果

Fig. 6 The single factor test results of pH value

试验结果与极差分析见表3。

表3 鸡腿菇摇瓶发酵最适培养基正交试验结果与极差分析

Table 3 The orthogonal test results and range analysis of the optimum medium for the shaking flask fermentation of Coprinus comatus

试验号 Est No.	A	B	C	胞外多糖 g/L Extracellular polysaccharide	生物量 g/L Biomass
1	1	1	1	0.781	11.822
2	1	2	2	0.794	12.060
3	1	3	3	0.837	12.820
4	2	1	2	0.746	12.560
5	2	2	3	1.283	13.770
6	2	3	1	1.641	18.220
7	3	1	3	1.207	12.990
8	3	2	1	0.873	14.340
9	3	3	2	0.896	16.020
R _{胞外多糖}	0.042	0.021	0.030		
R _{生物量}	0.262	0.323	0.160		

由表3 极差值 R 可看出, 各因素对鸡腿菇发酵产胞外多糖的影响先后顺序是A>C>B, 即碳源对胞外多糖产量的影响最大, 无机盐其次, 氮源的影响相对最弱。从优水平来看, 鸡腿菇发酵产胞外多糖的最佳培养基组合为A₂B₃C₃, 而胞外多糖产量最多的培养基组合为A₂B₃C₁。经3次重复试验验证, 得鸡腿菇发酵产胞外多糖的最佳培养基组合为A₂B₃C₃, 即葡萄糖2.0%, 酵母膏0.75%, CaCl₂0.2%。

各因素对鸡腿菇发酵产菌丝量的影响先后顺序是B>A>C, 即氮源对菌丝体生物量的影响最大, 碳源其次, 无机盐的影响相对最弱。从优水平来看, 鸡腿菇菌丝体生物量的最

佳发酵培养基组合为A₂B₃C₁, 而产菌丝体最多的培养基组合也为A₂B₃C₁, 故无需验证, 鸡腿菇菌丝体生物量的最佳发酵培养基组合为A₂B₃C₁, 即葡萄糖2.0%, 酵母膏0.75%, KH₂PO₄0.2%。

2.4 培养条件正交试验结果 鸡腿菇发酵最适培养条件正交试验结果与极差分析见表4。

表4 鸡腿菇发酵最适培养条件正交试验结果与极差分析

Table 4 The orthogonal test results and range analysis of the optimum culture conditions for the shaking flask fermentation of Coprinus comatus

试验号 Est No.	A	B	C	D	胞外多糖 g/L Extracellular polysaccharide	生物量 g/L Biomass
1	1	1	1	1	0.345	17.330
2	1	2	2	2	0.437	15.390
3	1	3	3	3	0.483	15.170
4	2	1	2	3	0.622	15.600
5	2	2	3	1	0.703	19.020
6	2	3	1	2	0.741	18.420
7	3	1	3	2	0.669	16.500
8	3	2	1	3	0.655	16.950
9	3	3	2	1	0.763	20.070
R _{胞外多糖}	0.028	0.011	0.004	0.003		
R _{生物量}	0.188	0.141	0.067	0.290		

由表4 极差值 R 可看出, 各因素对鸡腿菇发酵产胞外多糖的影响先后顺序是A>B>C>D, 即起始pH值对胞外多糖产量影响最大, 接种量其次, 培养天数的影响相对最弱。从优水平来看, 鸡腿菇发酵产胞外多糖的最佳培养条件组合为A₃B₃C₃D₂, 而胞外多糖产量最多的培养条件组合为A₃B₃C₂D₁。经3次重复试验验证, 得鸡腿菇发酵产胞外多糖的最佳培养条件组合为A₃B₃C₂D₁, 即起始pH值7.0, 接种量20.0%, 装液量120 ml, 培养天数6 d。

各因素对鸡腿菇发酵产菌丝量的影响先后顺序是D>A>B>C, 即培养天数的影响最大, 起始pH值次之, 装液量最弱。从优水平来看, 鸡腿菇菌丝体生物量的最佳培养条件组合为A₃B₃C₁D₁, 而产菌丝体最多的培养条件组合为A₃B₃C₂D₁。经3次重复试验验证, 得鸡腿菇菌丝体生物量的最佳培养条件组合为A₃B₃C₂D₁, 即起始pH值7.0, 接种量20.0%, 装液量120 ml, 培养天数6 d, 这和鸡腿菇发酵产胞外多糖的最佳培养条件一致。

3 结论

根据上述试验结果, 得出鸡腿菇液体发酵产胞外多糖的最佳培养基组合为: 葡萄糖2.0%, 酵母膏0.75%, CaCl₂0.2%; 鸡腿菇液体发酵产菌丝体的最佳培养基组合为: 葡萄糖2.0%, 酵母膏0.75%, KH₂PO₄0.2%; 鸡腿菇液体发酵产胞外多糖和菌丝体的最佳培养条件均为: 起始pH值7.0, 接种量20.0%, 装液量120 ml, 培养天数6 d。

参考文献

[1] 吴巧凤, 刘敬娟, 陈京, 等. 鸡腿菇营养成分的分析[J]. 食品工业科技, 2005, 26(8): 161-163.
 [2] 贾蕊, 刘凤兰. 鸡腿菇研究现状及发展前景[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 890-891.

在发酵时间为36~48 h 范围内,发酵48 h 达到最大值,且在这个范围内呈上升趋势,随后,随着接种量的增加水解度反而下降。这主要是因为枯草芽孢杆菌产蛋白酶具有专一性,随着水解时间延长,蛋白酶可水解的肽键逐渐减少,同时蛋白酶的活力以半衰期方式下降^[11]。

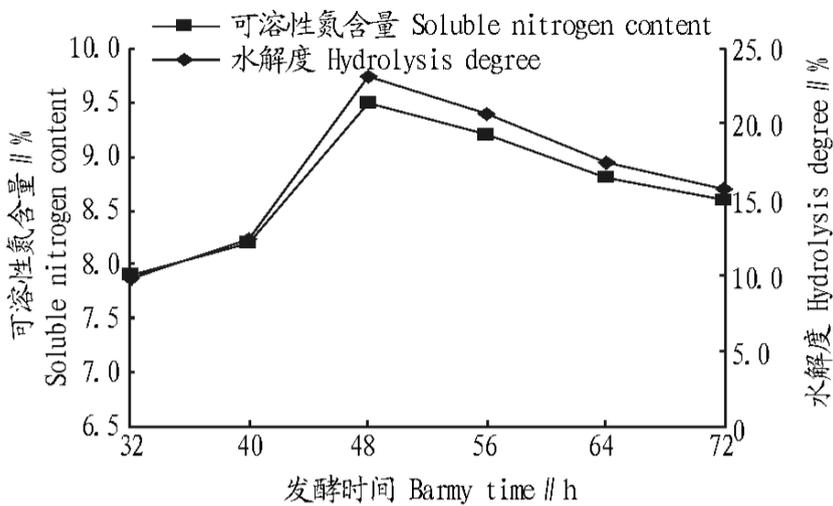


图5 发酵时间对水解度的影响

Fig.5 Effects of fermentation time on the hydrolysis degree

2.6 正交试验 单因素试验的基础上利用SPSS 进行正交组合设计,试验结果见表1。结果表明, $A_2B_2C_1D_4E_3$ 组合发酵产物的水解度最大,通过极差分析可知, $A_2B_2C_2D_4E_3$ 应是发酵猪血粉制备猪血多肽的最优工艺参数组合。最后,在此条件下发酵血粉时,所得发酵液的水解度为32.3%,因此可以得出结论:温度为30、转速为160 r/min、pH 值为7.5、接种量为6%、培养时间为50 h 时是最优的发酵组合。

2.7 血粉发酵前后的比较 从表2 可以看出,经枯草芽孢杆菌发酵后,猪血粉的蛋白质含量下降了24.05%,可溶性蛋白含量上升了53.77%,氨基酸态氮含量增加了4.44 倍。由表3 可知,发酵后的血粉呈现暗红色,且具有较浓的醇香味。

表2 猪血粉发酵前后的品质

Table 2 The quality of swine blood meal before and after fermentation

	ng/g		
猪血粉	氨基酸氮	可溶性氮	粗蛋白质
Swine blood meal	Amino nitrogen	Soluble nitrogen	Gude protein
发酵前	1.8 ±0.1	1.6 ±2.5	866.2 ±9.4
Before fermentation			
发酵后	9.8 ±0.1	16.3 ±1.6	657.9 ±16.7
After fermentation			

3 结论与讨论

(1) 从正交试验结果可知,第6 号管试验即 $A_2B_2C_1D_4E_3$

(上接第7181 页)

参考文献

- [3] 刑福国,王海霞,韩春超,等.鸡腿蘑多糖免疫功能的初步研究[J].食品科学,2003,24(6):139-141.
- [4] 杨宁波,张建民.鸡腿菇营养成分及应用价值[J].特种经济动植物,2000(5):31-32.

表3 猪血粉发酵前后感官评定^[12]

Table 3 Sensory evaluation of swine blood meal before and after fermentation

猪血粉	颜色	气味
Swine blood meal	Color	Odor
发酵前	黑褐	血腥味较浓,刺激性气味较浓
Before fermentation		
发酵后	暗红	血腥味浓,醇香味较浓,刺激性气味较淡
After fermentation		

组合发酵产物的水解度最大,通过极差分析可知, $A_2B_2C_2D_4E_3$ 应是发酵猪血粉制备猪血多肽的最优工艺参数组合,最后,用此条件发酵血粉时,所得发酵液的水解度为32.3%,因此可以得出结论:温度为30、转速为160 r/min、pH 值为7.5、接种量为6%、培养时间为50 h 时是最优的发酵组合。

(2) 经枯草芽孢杆菌发酵后,猪血粉的蛋白质含量下降,但是氨基酸态氮、可溶蛋白含量均提高,说明枯草芽孢杆菌在发酵过程中分泌蛋白酶,将大分子量蛋白质降解成氨基酸和小分子量的肽类。发酵后的血粉和发酵液的醇香味较浓,刺激性气味较淡。

参考文献

- [1] 钟耀广,南庆贤.国内外畜血研究动态[J].中国农业科技导报,2003,5(3):26-29.
- [2] 余伯良.微生物饲料生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1996:37-38.
- [3] 国家技术监督局.食品中蛋白质的测定方法(GB/T 14771-1993)[S].北京:中国标准出版社,1993.
- [4] 中国食品产业网.氨基酸态氮含量测定 ZBX 66038-87[EB/OL].(2003-09-12) www.foodqs.com.
- [5] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:67.
- [6] 何东平,张世宏,姚理,等.脱脂米糠饼制备米糠多肽的研究[J].粮食与饲料工业,2004(12):25-27.
- [7] 檀志芬,生庆海,邱泉若,等.蛋白质水解度的测定方法[J].食品工业科技,2005(7):174-175.
- [8] 熊振平.酶工程[M].北京:化学工业出版社,1989:125-127.
- [9] ADLER N S S E N J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. London:Elsevier, 1986:9-24.
- [10] 赵国华,陈宗道.蛋白质水解物苦味研究进展[J].粮食与油脂,2000(1):28-30.
- [11] 许永红.蛋白质酶法水解物苦味的控制[J].食品工业科技,1997(3):50-51.
- [12] 张水华,徐树来,王永华.食品感官分析与实验[M].北京:化学工业出版社,2006.

- [5] 朱戎,陈向,东兰进.药用真菌液体发酵研究进展[J].中药材,2003,26(1):55-57.
- [6] 刘艳芳,杨焱,张劲松,等.鸡腿蘑菌株筛选及深层发酵培养基的优化[J].食品与生物技术学报,2005,24(2):14-17.
- [7] 李正鹏,林毅,蔡永萍,等.白灵菇液体发酵工艺[J].生物学杂志,2006,23(1):28-30.