

肋脉羊肚菌液体培养条件的研究

杨芳^{1,2}, 王新风^{2,*}, 朱骏², 李刚², 刘艳文², 袁生¹

(1. 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097;

2. 淮阴师范学院生物系资源微生物研究所, 江苏 淮安 223300)

摘 要: 对肋脉羊肚菌进行液体摇瓶培养, 以菌丝干重、胞内多糖产量及其得率为筛选指标, 得到最适合肋脉羊肚菌生长的培养基条件为可溶性淀粉浓度2%、豆粕粉浓度1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 KH_2PO_4 0.05%、初始pH 7.5、培养温度28℃。培养8d后菌丝干重达16.94g/L, 胞内多糖量达0.984g/L。

关键词: 肋脉羊肚菌; 液体培养; 胞内多糖

Study on Liquid Cultivating Conditions of *Morchella costata* (Vent.) Pers.

YANG Fang^{1,2}, WANG Xin-feng^{2,*}, ZHU Jun², LI Gang², LIU Yan-wen², YUAN Sheng¹

(1. Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Institute of Resource Microorganism, Department of Biology, Huaiyin Teachers' College, Huai'an 223300, China)

Abstract: The optimization of culture of *Morchella costata* (Vent.) Pers on liquid culture was studied. With dry weight of mycelium, inopolysaccharide (IPS) output and its yield. The results showed that the concentration of starch was 2%, the chorma of lobster sauce was 1%, the concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was 0.1% and the concentration of KH_2PO_4 was 0.05%, the initial pH of culture was 7.5, and the temperature was 28 °C. The dry weight of mycelium reached 16.94 g/L, and the weight of inopolysaccharides (IPS) reached 0.984 g/L after culturing for 8 days.

Key words *Morchella costata* (Vent.) Pers; liquid culture; inopolysaccharides (IPS)

中图分类号: Q949.328.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0280-04

羊肚菌(*Morchella esculenta* L)隶属于囊菌亚门(*Ascomycotina*)、盘菌纲(*Discomycetes*)、盘菌目(*Pezizales*)、羊肚菌科(*Morchellaceae*)、羊肚菌属(*Morchella*)^[1],也叫羊肚菜、羊肚蘑、狼肚蘑、狼肚菜,日本叫编笠菌^[2]。因其菌盖表面呈许多小凹坑,外观极似羊肚而得名。Emik J在《LesMorilles》一书中记载,羊肚菌属共有28个种,分布于亚洲、欧洲、北美洲及大洋洲等国家^[3]。《中国真菌总汇》记入八种羊肚菌^[1]。但根据目前报道资料统计,我国现有羊肚菌12个种^[4]。我国野生羊肚菌主要分布于甘肃、青海、内蒙古、新疆、西藏、贵州、河南、江西、陕西、江苏等地。羊肚菌是世界上最珍贵的稀有食用菌,属高级营养滋补品,含有多种人体必需氨基酸。传统的中医认为,羊肚菌性平,味甘寒,无毒,具益肠胃、助消化、化痰理气、补肾壮阳、补脑提神等功效;现代医学研究表明,羊肚菌还具有降血脂、调节机体免

疫力、抗疲劳、抗菌、抗病毒、抑制肿瘤、减轻化疗引起的毒副作用等功效。在医学应用上具有重要价值。由于羊肚菌美味可口,香味独特,营养丰富,药用价值极高,因而倍受国内外消费者亲睐。目前国内收购价一直稳定在400~500元/kg,出口价更为昂贵^[5-9]。鉴于目前羊肚菌一直是国际市场特别是欧美市场供不应求的珍品^[10],且国内外还不能规模化地开展人工栽培,因此,实验对分离自江苏洪泽湖地区的一株野生羊肚菌——肋脉羊肚菌的培养条件进行优化,以期今后的进一步研究与合理的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肋脉羊肚菌(*Morchella costata*(Vent.)Pers.)母种 本实验室保存,采集分离自江苏盱眙。

1.2 试剂

收稿日期: 2007-10-19

基金项目: 江苏省教育厅高新产业项目(JHSD04-006); 淮安市科技局项目(SN0635); 淮阴师范学院教授基金项目(2006012)

作者简介: 杨芳(1983-),女,硕士研究生,主要从事真菌生理生化研究。E-mail: yangfang072@126.com

*通讯作者: 王新风(1964-),男,教授,主要从事生理生化研究。E-mail: hywdwxf@sohu.com

蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、葡萄糖、牛肉膏、酵母膏、尿素、硫酸铵、硝酸铵、蛋白胨、酵母浸膏、硫酸镁、磷酸二氢钾、蒽酮、浓硫酸均为国产AR级；马铃薯、鱼粉、豆粕粉、红糖、白糖均为市售。

1.3 仪器

T6新世纪紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；TDL-5000B离心机 上海安亭科学医学仪器厂；BS210S电子天平 北京赛多利斯天平有限公司；HD-930型组合式全温摇床 江苏太仓市实验仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 培养基的配制

母种培养基：去皮马铃薯20%，蔗糖2%，蛋白胨0.2%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%， KH_2PO_4 0.1%加蒸馏水至1L，琼脂1.5%~2%，自然pH，121℃，0.1035MPa灭菌20min。

液体种子培养基^[11]：去皮马铃薯10%，蔗糖3%，蛋白胨0.1%， $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.05%， KH_2PO_4 0.05%，酵母浸膏5%加蒸馏水至1L，pH5.5，121℃，0.1035MPa灭菌20min。

液体基础培养基：蛋白胨1%，葡萄糖2%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%， KH_2PO_4 0.05%，pH5.5，121℃，0.1035MPa灭菌20min。

1.4.2 菌种活化和培养

斜面菌种接菌于母种培养基平板上，25℃静置培养4~5d(菌丝可以长满平板)。将配制好的种子培养基分别以50ml每瓶装于250ml三角瓶中，灭菌，备用。取平板培养的羊肚菌菌落前端5cm内侧，用打孔器取得菌膜，放入三角瓶中25℃，180r/min避光培养3d，镜检无杂菌后接5%接种量转入基础培养基，以同样条件培养8d后收菌，备用。

1.4.3 试验方法

按基础培养基配方，分别选用8种不同的碳源、氮源进行碳、氮源比较试验；用1mol/L HCl或1mol/L NaOH溶液分别调节培养基的pH至4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、8.5进行不同pH比较试验；以10、15、18、20、25和28℃进行不同温度的比较试验。上述单因素试验结束后，以最佳碳、氮源浓度和最适pH、温度四因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，以菌丝干重、胞内多糖量和提取率作为选择标准，筛选出适合肋脉羊肚菌液体摇瓶培养最佳培养基。上述试验均采用250ml的三角瓶装入50ml培养基置于恒温摇床(转速180r/min)中避光培养。

1.5 测定方法

1.5.1 菌丝干重

取培养液在2000r/min离心10min，得菌丝球或菌丝，于65℃下烘干至恒重后，称量菌丝干重，研磨备用。

1.5.2 胞内多糖的测定^[12]

精确称取已研磨好的0.1000g干菌丝，按加水比50:1加入双蒸水，摇匀后，85℃恒温水浴浸提2h后取出用滤纸过滤，所得滤液加入三倍体积95%乙醇在-15℃下沉淀24h(调pH为7.0)。3000r/min离心15min，弃去上清液。沉淀加少量95%乙醇，再离心，重复两次，弃去上清液。将得到的沉淀用双蒸水定容至100ml，得多糖提取液。

多糖测定采用硫酸-蒽酮法^[13]。于620nm处测定吸光度，绘制葡萄糖标准曲线，得回归方程 $y=0.0084x-0.0037$ ， $R^2=0.9997$ (在糖浓度0~80μg/ml之间时吸光度与糖浓度具有良好线性关系)，计算胞内多糖得率。

1.5.3 胞内多糖的得率

$$\text{得率} = \frac{\text{胞内多糖量}}{\text{菌丝干重}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 培养基组成对液体培养肋脉羊肚菌菌丝体生物量、胞内多糖量的影响

2.1.1 碳源的筛选

在基础培养基中分别以2%的红糖、白糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉作为碳源，以1%的蛋白胨为唯一氮源，进行碳源筛选试验。

表1 不同碳源下肋脉羊肚菌菌丝干重和胞内多糖的变化($\bar{x} \pm SD$)
Table 1 Changes of dry weight of mycelium from *Morchella costata* and IPS at different carbon sources ($\bar{x} \pm SD$)

碳源	干重(g)	胞内多糖量(mg)	得率(%)
红糖	0.579±0.012	9.635±0.473	1.615±0.093
白糖	0.487±0.024	12.618±2.529	2.615±0.663
葡萄糖	0.443±0.015	16.653±7.446	3.75±1.682
果糖	0.530±0.029	12.72±1.277	2.413±0.36
蔗糖	0.550±0.129	16.708±4.714	3.369±1.638
麦芽糖	0.483±0.076	14.882±2.417	3.175±0.927
乳糖	0.555±0.049	14.371±6.168	2.55±0.884
可溶性淀粉	0.51±0.13	47.763±20.299	9.092±1.59

从表1可以看出，所试碳源对肋脉羊肚菌生长影响差异较明显。本试验条件下，红糖、果糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉作为碳源时，干重都很不错，最高的是红糖，达11.58g/L培养液，但其胞内多糖量却最低，其多糖得率也最低，故红糖不是最佳碳源；从胞内多糖量来看，可溶性淀粉的含量最高，远远高于其它碳源，高达47.763±20.299mg，得率也是最高，虽然其菌丝干重仅处于8种碳源中的中等水平，综合考

虑, 我们还是认为可溶性淀粉是适合肋脉羊肚菌生长的最佳碳源。

2.1.2 氮源的筛选

在基础培养基中分别加入 1% 的牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、尿素、鱼粉、豆粕粉、硫酸铵、硝酸铵作为氮源, 以 2% 可溶性淀粉作为唯一碳源, 进行氮源筛选试验。

表 2 不同氮源下肋脉羊肚菌菌丝干重和胞内多糖的变化 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 2 Changes of dry weight of mycelium from *Morchella costata* and IPS at different nitrogen sources ($\bar{X} \pm SD$)

氮源	干重(g)	胞内多糖量(mg)	得率(%)
牛肉膏	0.681±0.081	32.136±8.300	5.193±1.179
酵母膏	0.545±0.060	29.603±5.644	5.434±0.891
蛋白胨	0.415±0.019	26.816±4.527	6.473±1.165
尿素	0.203±0.056	11.926±2.360	6.226±2.020
鱼粉	0.385±0.021	24.639±4.977	6.398±1.203
豆粕粉	0.530±0.075	38.260±7.951	7.395±2.133
硫酸铵	0.308±0.038	5.925±1.524	1.922±0.380
硝酸铵	0.390±0.014	25.993±2.464	6.657±0.462

从表 2 可以看出, 所试氮源对肋脉羊肚菌生长影响差异较明显。本试验条件下, 牛肉膏、酵母膏、豆粕粉作为氮源时, 干重都很很好, 最高的是牛肉膏, 干重最高, 达到 13.62g/L, 其胞内多糖量是次高, 仅次于豆粕粉, 但其多糖得率一般; 从胞内多糖量来看, 豆粕粉作为氮源时, 其胞内多糖量最高, 达 38.260±7.951mg, 其多糖得率最高, 且其很便宜, 综合考虑, 我们认为豆粕粉是适合肋脉羊肚菌生长最佳氮源。

2.2 培养条件对液体培养肋脉羊肚菌菌丝体生物量、胞内多糖量的影响

2.2.1 pH 对液体培养肋脉羊肚菌菌丝体生物量、胞内多糖量的影响

从最上面两组试验中选择最佳碳源可溶性淀粉、最佳氮源豆粕粉作为固定培养基成分对培养基初始 pH 进一步筛选。

表 3 不同 pH 下肋脉羊肚菌菌丝干重和胞内多糖的变化 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 3 Changes of dry weight of mycelium from *Morchella costata* and IPS at different pH values ($\bar{X} \pm SD$)

pH	干重(g)	胞内多糖量(mg)	得率(%)
4	0.455±0.062	48.852±4.708	10.202±0.899
5	0.495±0.044	34.687±4.035	7.266±0.481
5.5	0.583±0.05	41.383±9.716	7.345±1.178
6	0.500±0.06	66.91±13.076	12.524±2.61
6.5	0.510±0.122	55.003±4.525	12.524±1.431
7	0.573±0.066	71.321±3.267	13.417±1.852
8	0.540±0.035	69.351±12.087	12.823±2.629
8.5	0.595±0.026	61.809±6.587	12.663±3.754

从表 3 可以看出, 肋脉羊肚菌在初始 pH4~8.5 之间

都能生长, 但在 pH4 和 pH5 时菌丝生长较差, 随着 pH 上升, 菌丝干重增加, 胞内多糖量也逐渐增加。当 pH 到 7 时, 菌丝胞内多糖量最高, 多糖得率也最大。

2.2.2 温度对液体培养肋脉羊肚菌菌丝体生物量、胞内多糖量的影响

从上面两组试验中选择最佳碳源可溶性淀粉、最佳氮源豆粕粉作为固定培养基成分进行进一步温度筛选试验。

表 4 不同温度下肋脉羊肚菌菌丝干重和胞内多糖的变化 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 4 Changes of dry weight of mycelium from *Morchella costata* and IPS at different temperature values ($\bar{X} \pm SD$)

温度(℃)	干重(g)	胞内多糖量(mg)	得率(%)
10	0.44±0.084	13.777±4.142	3.179±1.074
15	0.515±0.029	44.368±4.601	8.831±0.810
18	0.565±0.058	44.608±1.730	7.821±1.172
20	0.57±0.014	17.082±2.588	3.00±0.481
25	0.583±0.05	46.351±4.342	7.944±0.205
28	0.475±0.007	41.533±0.414	8.744±0.060

从表 4 可以看出, 肋脉羊肚菌在 10~28℃ 范围内均可生长。在 10~25℃ 之间, 羊肚菌的菌丝干重逐渐增加, 当温度升至 28℃ 时, 菌丝干重出现下降。羊肚菌在 25℃ 时胞内多糖量最大, 多糖得率也较高。考虑到 18℃ 和 28℃ 多糖量也很高, 因此我们选择 18、25 和 28℃ 为试验水平。

2.3 正交试验

2.3.1 正交试验因素水平

在上述单因素试验基础上, 进行四因素三水平正交试验, 各因素水平见表 5。

表 5 正交试验因素水平表
Table 5 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 可溶性淀粉(%)	B 豆粕粉(%)	C pH	D 温度(℃)
1	1	0.5	7	15
2	2	1	7.5	18
3	3	1.5	8	28

2.3.2 正交试验结果

在考虑单因素最适水平的基础上, 综合考虑它们对羊肚菌菌丝体生长和胞内多糖量的影响, 进行了正交试验, 所得试验结果见表 6。

2.4 方差分析

方差在一定程度上可说明样本波动的大小, 故可用方差来判断各因素对样本影响之程度, 用方差分析法对表 6 试验结果进行分析, 得结果见表 7。

从表 7 中可以看出, 在 0.01 水平上, 对于肋脉羊肚菌来说, 最佳碳源浓度, 最佳氮源浓度, pH 和温

表6 正交试验结果与分析
Table 6 Results and analysis of orthogonal test

试验号	因素				胞内多糖量	
	A	B	C	D	(mg)	
1	1	1	1	1	21.412	21.036
2	1	2	2	2	35.791	46.154
3	1	3	3	3	11.628	16.256
4	2	1	2	3	58.836	63.552
5	2	2	3	1	48.714	55.682
6	2	3	1	2	28.627	29.57
7	3	1	3	2	16.738	17.662
8	3	2	1	3	81.454	85.197
9	3	3	2	1	41.206	43.732
X ₁	152.277	199.235	267.295	231.782		
X ₂	284.981	352.992	289.271	174.542		
X ₃	285.989	171.019	166.68	316.923		
\bar{X}_1	25.38	33.206	44.549	38.63		
\bar{X}_2	47.497	58.832	48.212	29.09		
\bar{X}_3	47.665	28.503	27.78	52.821		
R	22.285	30.329	20.432	23.73		

表7 正交试验方差分析表
Table 7 Table of variance analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
碳源	1971.681	2	79.977	**
氮源	3197.293	2	129.691	**
pH	1424.169	2	57.768	**
温度	1710.986	2	69.402	**
误差	110.9395	9		

注：*代表显著性程度； $F_{0.05}(2,9)=4.257$ ， $F_{0.01}(2,9)=8.022$ 。

度的F值分别为79.977、129.691、57.768和69.402，均大于 $F_{0.01}(2,9)=8.022$ ，所以这些因素对试验结果的影响都极显著。其中F值的大小关系为：最佳氮源浓度>最佳碳源浓度>温度>pH，因此四个因素对肋脉羊肚菌培养影响次序为B>A>D>C。由此可见，方差分析所得主次因素与极差分析相同，故肋脉羊肚菌的最佳液体培养条件为： $A_3B_2C_2D_3$ 。但是正交方差分析表中最佳碳源浓度的第二个和第三个水平的相差很小(285.989与284.981)，甚至可以忽略不计，从经济角度出发，选择 A_2 作为实际使用的碳源浓度，即可溶性淀粉浓度2%，豆粕粉浓度1%，初始pH7.5，培养温度28℃。

2.5 基础培养基和优化培养基的比较

采用基础培养基和优化培养基分别对肋脉羊肚菌进行对照培养，其菌丝得率和胞内多糖的含量增加结果见表8。

表8 基本培养基和优化培养基对照培养
Table 8 Comparison of basic culture and optimized culture

对照	菌丝得率	胞内多糖量
基础培养基(g/L)	11.66	0.828
优化培养基(g/L)	16.94	0.984
优化比基本增加率(%)	45.28	18.87

3 讨论

肋脉羊肚菌的最佳液体摇瓶优化培养基为：可溶性淀粉浓度2%，豆粕粉浓度1%，初始pH7.5；培养条件为：28℃，180r/min遮光培养，8d可得含胞内多糖最高的菌丝体。本实验选择文献中出现的最佳值，文献[11]中认为180r/min比较适合羊肚菌的菌丝生长，快速、中速对多糖影响不明显，但转速较低时，不利于多糖生成，因此采用180r/min为最佳转速。而对于光照因素，基本所有关于羊肚菌培养条件优化的研究都认为羊肚菌培养时遮光培养效果更好，因为光对羊肚菌菌丝体生长可能有一定抑制作用。羊肚菌属于低温菌种，菌丝生长的最佳温度在18~25℃之间。但是本菌种最适温度为28℃，在对本菌种母种采集时间4月末，当日的室外最高气温达到32℃，可能由于羊肚菌种间差异，所以温度值有所差异。

参考文献：

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 薛福连. 林中一宝——羊肚菌[J]. 湖南林业, 2003(12): 36.
- [3] EMIK JACQUETANT. Les Morilles[M]. Paris: La Bibliotheque des Arts, 1984.
- [4] 任桂梅, 张少刚. 羊肚菌的研究进展[J]. 延安大学学报, 1999, 18(1): 57-65.
- [5] 张飞翔. 今后宜大力推广的珍稀名贵菌类[J]. 中国农业小康科技, 2001(4): 36.
- [6] 李焱, 温鲁. 羊肚菌的研究与开发[J]. 中国食用菌, 2003, 23(1): 6-9.
- [7] 宋淑敏, 邹作华, 王洪荫, 等. EF-11营养液的研制及其保健作用的试验研究[J]. 食品科学, 1996, 17(7): 52-57.
- [8] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲. 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.
- [9] 贾建会, 徐宝梁, 宋淑敏, 等. 羊肚菌发酵制品保健机理初探[J]. 食用菌, 1996, 18(4): 40-42.
- [10] 李鹏翔. 林中一宝——羊肚菌[J]. 蔬菜, 1999(10): 17.
- [11] 武秋立, 安家彦. 羊肚菌的液体深层培养[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 72-77.
- [12] 武秋立, 安家彦. 羊肚菌多糖提取、分离条件的选择[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 116-120.
- [13] 李群. 萘酚比色法测定羊肚菌多糖及实验评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(1): 31-32.