

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.03.005

基于富硒条件下高温型香菇的液体培养基优化^①

乔艳明¹, 柳林², 陈文强¹

1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000;

2. 安康学院 现代农业与生物科技学院, 陕西 安康 725000

摘要: 筛选适宜高温型香菇菌丝生长的 Na_2SeO_3 质量浓度, 优化其最佳的富硒液体发酵培养基, 拟为富硒香菇的相关产品开发提供参考依据。以高温型香菇 Q12 菌株为试材, 根据菌丝生长状况确定最佳的 Na_2SeO_3 质量浓度, 通过 Plackett-Burman 设计试验、最陡爬坡试验、Box-Behnken 响应面分析试验及验证试验得到其在富硒条件下的最佳液体发酵培养基。结果表明: 富硒条件下香菇 Q12 菌株液体发酵的最佳培养基组合: 玉米粉 39.74 g、红糖 15.70 g、牛肉粉 5.00 g、麦麸 15.00 g、 KH_2PO_4 0.80 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g、 Na_2SeO_3 30.00 mg/L, 利用该培养基发酵得到的香菇菌丝生物量为 57.56 g/L, 比优化前提高了 1.30 倍。数学模型的预测值与试验观察值相符, 相对误差约为 5.95%, 响应面法优化富硒条件下高温型香菇的液体发酵培养基可行。

关键词: 香菇; 富硒; 高温型; 液体培养基; 响应面法

中图分类号: S646.1⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)03-0034-08

硒被认为是人体必需的微量元素之一, 可以预防和治疗肿瘤^[1]、癌症^[2]等多种疾病。由于地域环境等因素影响, 膳食中硒含量的差异较大, 导致我国民众多处于缺硒状态^[3]。香菇(*Lentinula edodes*)是食用真菌中重要的成员之一, 它可以将有机的无机硒转化为无毒的有机硒, 有利于人体的吸收和利用^[4]。目前, 液态发酵技术生产的食用菌液体菌种, 已在食用菌的规模化和机械化栽培中得到了广泛应用^[5]。利用该技术生产的富硒香菇菌丝体、发酵液和子实体是提取硒多糖和硒蛋白的原料, 可以应用于多糖药物和保健品的生产^[6]。研究表明, 富硒香菇的发酵培养基组成直接决定菌丝体的生物量与代谢产物的积累, 且因香菇的温型不同导致差异较大^[7]。因此, 对富硒条件下香菇的液体发酵培养基进行探索具有极高的研究和应用价值。

目前, 富硒香菇的相关研究仍处于起步阶段。林琳等^[8]的研究表明, 香菇对无机硒具有极强的耐受和富集能力, 利用 Na_2SeO_3 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的液体培养基发酵可以得到有机硒质量分数为 230 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的菌丝体, 高于对照组 114 倍。相关的富硒产品开发仍然停留在实验阶段, 例如利用富含硒蛋白和硒多糖的香菇菌丝体制备具有特殊保健功能的富硒奶粉^[9]等。此外, 我国主栽香菇品系繁多, 适用于富硒香菇液体种生产的发酵培养基鲜有报道。彭浩等^[10]优化了香菇南山 1 号的富硒液体发酵培养基: 黄豆粉 6.0 g/L、玉米粉 30.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L 和 Na_2SeO_3 60 mg/L。秦巴山区是我国的香菇主产区之一, 其温润的气候条件非常适合高温型香菇的栽培, 适合其富硒营养强化的液体发酵培养基仍未有研究。

本研究以秦巴山区主栽的高温型香菇 Q12 菌株为试材, 根据菌丝生长状况确定最佳的 Na_2SeO_3 质量浓度, 通过 Plackett-Burman 设计试验、最陡爬坡试验、Box-Behnken 响应面分析试验及验证试验得到其在

① 收稿日期: 2016-11-29

基金项目: 陕西省“13115”科技创新工程计划项目(2008ZDGC-04)。

作者简介: 乔艳明(1990-), 男, 陕西渭南人, 硕士, 主要从事微生物资源开发利用研究。

通信作者: 柳林, 副教授。

富硒条件下的最佳液体发酵培养基, 以期对富硒香菇的相关产品开发提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试香菇 Q12 菌株: 由陕西省食药菌工程技术研究中心提供. 该菌株属高温早熟袋栽品种, 7—8 月出菇, 出菇天数 90 d, 出菇温度 25 °C, 温度高时子实体中等, 温度低时子实体大型, 但产量下降; 子实体茶褐色, 菌柄短, 菌盖中厚, 抗高温能力强, 抗杂菌能力弱, 是秦巴山区夏季高温香菇的主栽品种.

基础培养基为: 玉米粉 20.00 g、红糖 10.00 g、牛肉粉 5.00 g、麦麸 10.00 g、 KH_2PO_4 3.00 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50 g、 H_2O 1.00 L 和 pH 自然.

主要试剂和仪器: KH_2PO_4 、 Na_2SeO_3 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 均为分析纯; 牛肉粉、琼脂购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 麦麸、红糖和玉米粉(均为食品级)市购; 试验用水为纯化水; TB-214 电子分析天平(北京赛得利斯仪器系统有限公司); LRH-250-GS 数显式恒温培养箱(广东省医疗器械厂); ZHWY-210 2C 数显式恒温摇床(上海志成有限公司).

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化

无菌条件下, 取香菇 Q12 菌丝 0.5 cm², 点植于综合马铃薯培养基(CPDA)斜面, 28 °C 将菌丝培养至满管, 4 °C 冰箱保藏备用.

1.2.2 平板富硒驯化

称取 Na_2SeO_3 , 配制质量浓度为 1.00 mg/mL 的母液, 4 °C 保藏备用. 以 10 mg/L 为质量浓度梯度, 配制 Na_2SeO_3 质量浓度为 0.00~110.00 mg/L 的基础固体培养基. 取 0.5 cm² 大小的菌丝点植于制备好的含有不同 Na_2SeO_3 质量浓度的平板中央, 每种处理做 5 个重复, 28 °C 倒置培养 8 d, 每 24 h 记录菌丝生长情况.

1.2.3 菌丝平均生长速度的计算

从菌丝点植处向平板边缘画直线, 该点至菌落边缘距离为菌丝总长度, 取平均值. 菌丝平均生长速度 = 菌丝总长度的平均值 / 培养天数.

1.2.4 生物量的测定

配制液体培养基, 取 1.0 cm² 大小的香菇菌丝接种, 静置 24 h 后于 28 °C、160 r/min 摇床发酵 20 d. 将发酵液抽滤, 用电子天平称湿重. 菌丝生物量 = 菌丝球湿重(g) / 发酵液总体积(L).

1.2.5 Plackett-Burman 试验

以玉米粉(X_1)、红糖(X_2)、麦麸(X_3)、牛肉粉(X_4)、 KH_2PO_4 (X_5)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_6)等 6 个因素为研究对象(其他因素取空值), 进行 Plackett-Burman 试验, 按表 1 和表 4 配制液体培养基, 每种处理设 5 个重复, 菌丝生物量(Y)取平均值, 并采用 Minitab 15 软件对数据进行统计分析.

表 1 Plackett-Burman 试验设计表

因 素/ (g · L ⁻¹)	水 平		
	-1	+1	
X_1	玉米粉	20.00	30.00
X_2	红糖	5.00	10.00
X_3	麦麸	10.00	15.00
X_4	牛肉粉	5.00	7.50
X_5	KH_2PO_4	2.00	3.00
X_6	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00	1.50

1.2.6 最陡爬坡试验

依据 Minitab 15 软件对 Plackett-Burman 试验的分析结果, 将正效应显著性因素的值逐步增加, 负效应显著性因素的值逐步减小, 进行最陡爬坡试验, 以期寻找最佳响应区域. 对于影响无统计学意义但使生

物量升高的因素取“+1”水平, 影响无统计学意义且使生物量降低的因素取“-1”水平。

1.2.7 Box-Behnken 试验

依据最陡爬坡试验结果, 对影响显著的因素(玉米粉 X_1 、红糖 X_2 、 KH_2PO_4 X_5)进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验, 因素和水平编码如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 试验设计表

因素/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	水 平		
	-1	0	1
X_1 玉米粉	30.00	40.00	50.00
X_2 红糖	10.00	14.00	18.00
X_5 KH_2PO_4	0.80	1.40	2.00

1.2.8 数据处理与分析

利用 Minitab 15 软件对最佳富硒浓度筛选试验结果和 Plackett-Burman 试验结果进行方差分析, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对 Box-Behnken 试验结果进行分析。

2 结 果

2.1 香菇 Q12 菌株最佳富硒浓度的筛选

香菇 Q12 菌株在基础固体培养基中 28 °C 培养, 每隔 24 h 记录菌丝生长情况, 结果如表 3 所示。试验结果表明, 在不同 Na_2SeO_3 质量浓度下, 香菇 Q12 菌株的生长速度不同; 低质量浓度 Na_2SeO_3 对菌丝生长有促进作用, 当 Na_2SeO_3 质量浓度小于 30 mg/L 时, 菌丝生长速度随 Na_2SeO_3 质量浓度增加而缓慢增加; 高质量浓度 Na_2SeO_3 对菌丝生长有抑制作用, 当 Na_2SeO_3 质量浓度大于 30 mg/L 时, 菌丝生长速度随 Na_2SeO_3 质量浓度增加而逐渐降低; 当 Na_2SeO_3 质量浓度等于 30 mg/L 时, 菌丝生长速度达到最大, 为 0.56 ± 0.005 mm/d。因此, 香菇 Q12 菌株最佳富硒质量浓度为 30 mg/L。

表 3 香菇 Q12 菌株在不同 Na_2SeO_3 质量浓度下的生长速度

序号 (不同 Na_2SeO_3 质量浓度 mg/L)	菌丝生长速度/($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)					平均生长速度/ ($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)
	1	2	3	4	5	
0.00	0.50	0.51	0.51	0.51	0.50	0.51 ± 0.005
10.00	0.51	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52 ± 0.005
20.00	0.53	0.53	0.53	0.53	0.54	0.53 ± 0.004
30.00	0.56	0.56	0.55	0.55	0.56	0.56 ± 0.005
40.00	0.54	0.54	0.54	0.54	0.53	0.54 ± 0.004
50.00	0.50	0.52	0.51	0.52	0.52	0.52 ± 0.010
60.00	0.49	0.49	0.49	0.48	0.49	0.49 ± 0.004
70.00	0.46	0.47	0.46	0.47	0.46	0.46 ± 0.005
80.00	0.44	0.44	0.45	0.44	0.44	0.44 ± 0.004
90.00	0.44	0.42	0.43	0.43	0.43	0.43 ± 0.007
100.00	0.42	0.42	0.42	0.41	0.42	0.42 ± 0.004
110.00	0.41	0.41	0.40	0.40	0.41	0.41 ± 0.005

2.2 Plackett-Burman 设计试验结果

进行 $n=12$ 的 Plackett-Burman 试验, 考察玉米粉 (X_1)、红糖 (X_2)、麦麸 (X_3) 牛肉粉 (X_4)、 KH_2PO_4 (X_5)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_6) 等 11 个因素 ($X_7 - X_{11}$ 为空值) 对菌丝生物量 (Y) 的影响, 试验结果如表 4 所示。采用 Minitab 15 软件对试验结果(已编码单位)进行分析, 结果如表 5 所示。表 4 和表 5 结果表明, 对菌丝生物量影响显著的因素为玉米粉 (X_1)、红糖 (X_2) 和 KH_2PO_4 (X_5)。其中, X_1 与 X_2 增加时, 菌丝生物量增加有统计学意义 ($p < 0.05$), 为正效应因素。而 X_5 增加时, 菌丝生物量降低有统计学意义 ($p < 0.05$), 为负效应因素。

表 4 Plackett-Burman 试验设计及响应值

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	$Y/(g \cdot L^{-1})$
1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	53.23
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	42.34
3	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	50.82
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35.79
5	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	55.85
6	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	57.42
7	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	30.98
8	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	50.66
9	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	47.19
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	41.04
11	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	47.50
12	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	34.21

表 5 Plackett-Burman 实验分析结果(已编码单位)

项	效应	系数	系数标准误	T	p
常量		45.670	1.126	40.56	0.000
X_1 玉米粉	10.523	5.261	1.126	4.67	0.005
X_2 红糖	9.114	4.557	1.126	4.05	0.010
X_3 麦麸	-0.264	-0.132	1.126	-0.12	0.911
X_4 牛肉粉	-1.632	-0.816	1.126	-0.72	0.501
X_5 KH_2PO_4	-7.989	-3.994	1.126	-3.55	0.016
X_6 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.376	0.188	1.126	0.17	0.874

2.3 最陡爬坡试验结果

为了将响应面拟合逼近其最佳响应区域,更好地反映出真实情况,在 Plackett-Burman 试验基础上,将玉米粉(X_1)和红糖(X_2)的值逐步增加, KH_2PO_4 (X_5)的值逐步减小(其他的因素取值为:牛肉粉 5.00 g/L、麦麸 15.00 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.00 g/L),进行最陡爬坡试验,试验设计及结果如表 6 所示.表 6 结果表明,在红糖 14.00 g/L、玉米粉 40.00 g/L 和 KH_2PO_4 1.40 g/L 时,香菇 Q12 菌株的菌丝生物量最大为 47.37 g/L,应将此作为最佳响应区域.

表 6 最陡爬坡试验设计及结果

序号	X_1	X_2	X_5	Y
	玉米粉/(g · L ⁻¹)	红糖/(g · L ⁻¹)	KH_2PO_4 /(g · L ⁻¹)	菌丝生物量/(g · L ⁻¹)
1	30.00	10.00	2.00	45.16
2	35.00	12.00	1.70	46.09
3	40.00	14.00	1.40	47.37
4	45.00	16.00	1.10	45.53
5	50.00	18.00	0.80	40.98
6	55.00	20.00	0.50	38.46

2.4 Box-Behnken 试验设计与分析

根据表 2 中的因素水平设计,利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平 Box-Behnken 试验,结果如表 7 所示.表 7 的结果分析见 2.5 和 2.6.

表 7 Box-Behnken 中心组合因素水平编码表

序号	因 素			Y 菌丝生物量/(g·L ⁻¹)
	X ₁ 玉米粉	X ₂ 红糖	X ₅ KH ₂ PO ₄	
1	-1	-1	0	35.60
2	+1	-1	0	51.68
3	-1	+1	0	43.05
4	+1	+1	0	50.62
5	-1	0	-1	51.17
6	+1	0	-1	50.28
7	-1	0	+1	34.62
8	+1	0	+1	49.39
9	0	-1	-1	38.86
10	0	+1	-1	51.29
11	0	-1	+1	41.39
12	0	+1	+1	34.10
13	0	0	0	53.80
14	0	0	0	56.03
15	0	0	0	57.82
16	0	0	0	52.86
17	0	0	0	56.52

2.5 回归模型方差分析结果

以 X_1 , X_2 和 X_5 为变量, Y 为响应值, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 7 数据进行处理, 得到表 8 回归方程方差分析表. 表 8 结果表明, X_1^2 项有统计学意义; X_1 , X_5 , X_1X_5 , X_2X_5 , X_2^2 , X_5^2 项极有统计学意义, X_2 , X_1X_2 无统计学意义. 模型 p 值为 0.000 1, 可信度水平为 99.99%, 因此模型有意义, 二次回归方程可靠. 失拟项无统计学意义(p 值 0.459 7 > 0.05), 说明试验操作可信. 另外从 F 值得到 X_1 , X_2 和 X_5 对 Y 的影响顺序: $X_1 > X_5 > X_2$, 即玉米粉 > KH₂PO₄ > 红糖. 利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行非线性的二次多项式拟合, 得到的预测模型如下:

$$Y = -161.91165 + 2.38475X_1 + 18.59919X_2 + 46.00764X_5 - 0.053228X_1X_2 + 0.65292X_1X_5 - 2.05453X_2X_5 - 0.026058X_1^2 - 0.47262X_2^2 - 17.87431X_5^2$$

表 8 回归分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	984.56	9	109.40	25.84	0.000 1	**
X_1	176.00	1	176.00	41.58	0.000 4	**
X_2	16.63	1	16.63	3.93	0.087 9	
X_5	128.79	1	128.79	30.43	0.000 9	**
X_1X_2	18.13	1	18.13	4.28	0.077 2	
X_1X_5	61.39	1	61.39	14.50	0.006 6	**
X_2X_5	97.25	1	97.25	22.98	0.002 0	**
X_1^2	28.59	1	28.59	6.75	0.035 5	*
X_2^2	240.77	1	240.77	56.88	0.000 1	**
X_5^2	174.34	1	174.34	41.19	0.000 4	**
残差	29.63	7	4.23			
失拟项	13.11	3	4.37	1.06	0.459 7	
纯误差	16.52	4	4.13			
总离差	1014.19	16				

$$R^2 = 0.9708$$

$$R_{\text{Adj}}^2 = 0.9332$$

注: ** 为差异极有统计学意义($p < 0.01$); * 为差异有统计学意义($p < 0.05$).

2.6 响应面及等高值分析结果

利用回归方程分析结果绘制香菇 Q12 菌丝生物量随各因素变化的响应曲面图, 由响应曲面图知玉米粉、红糖、KH₂PO₄ 3 个因素对菌丝生物量的影响(图 1、图 2 和图 3). 每个响应曲面分别代表着两个独立因素之间的交互作用, 另一因素保持在 0 水平. 图 1 结果显示, 在低红糖条件下, 随着玉米粉质量浓度增

加, 菌丝生物量呈缓慢增加至平稳趋势; 在高红糖条件下, 随着玉米粉质量浓度增加, 菌丝生物量呈先缓慢增加至平稳后略有下降趋势; 在低玉米粉质量浓度较低条件下, 随着红糖的增加, 菌丝生物量呈先迅速增加至平稳后缓慢下降趋势; 在高玉米粉质量浓度较高条件下, 随着红糖的增加, 菌丝生物量呈先缓慢增加至平稳后缓慢下降趋势. 图 2 结果显示, 在低 KH_2PO_4 质量浓度条件下, 随着玉米粉质量浓度增加, 菌丝生物量呈先略有上升后略有下降趋势; 在高 KH_2PO_4 质量浓度条件下, 随着玉米粉质量浓度增加, 菌丝生物量呈迅速上升至平稳趋势; 在低玉米粉质量浓度条件下, 随着 KH_2PO_4 质量浓度增加, 菌丝生物量呈先迅速上升至平稳后略有下降趋势; 在高玉米粉质量浓度条件下, 随着 KH_2PO_4 质量浓度增加, 菌丝生物量呈先缓慢上升至平稳后缓慢下降趋势. 图 3 结果显示, 在低 KH_2PO_4 质量浓度条件下, 随着红糖质量浓度增加, 菌丝生物量呈先迅速上升至平稳后略有下降趋势; 在高 KH_2PO_4 质量浓度条件下, 随着红糖质量浓度增加, 菌丝生物量呈先缓慢上升至平稳后迅速下降趋势; 在低红糖质量浓度条件下, 随着 KH_2PO_4 质量浓度增加, 菌丝生物量呈先缓慢上升至平稳后缓慢下降趋势; 在高红糖质量浓度条件下, 随着 KH_2PO_4 质量浓度增加, 菌丝生物量呈先略有上升至平稳后迅速下降趋势.

为了降低生产成本, 尽可能采用有机廉价的原料, 采用 Design-Expert 8.0.6 对最优结果进行预测. 在“criteria”选项中选择 KH_2PO_4 的质量浓度为最小值, 玉米粉和红糖的质量浓度为平均值, 菌丝生物量为最大值, 得到富硒条件下香菇 Q12 菌株液体发酵培养基的最佳配方: 玉米粉 39.74 g/L、红糖 15.70 g/L、牛肉粉 5.00 g/L、麦麸 15.00 g/L、 KH_2PO_4 0.80 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g/L 和 Na_2SeO_3 30.00 mg/L, 利用该培养基得到的香菇 Q12 菌丝生物量的拟合值为 54.33 g/L.

2.7 验证试验

采用最优培养基配方做验证性试验, 最终得到香菇 Q12 菌丝生物量为 57.56 g/L, 其菌丝形态如图 4. 在初始培养条件下香菇 Q12 菌丝生物量为 44.40 g/L, 优化后提高了 1.30 倍. 实测值与拟合值相比, 相对误差约为 5.95%. 结果表明, 该模型的可靠性较高, 可以很好地预测试验结果, 响应面法优化富硒条件下香菇 Q12 菌株液体培养基是可行有效的.

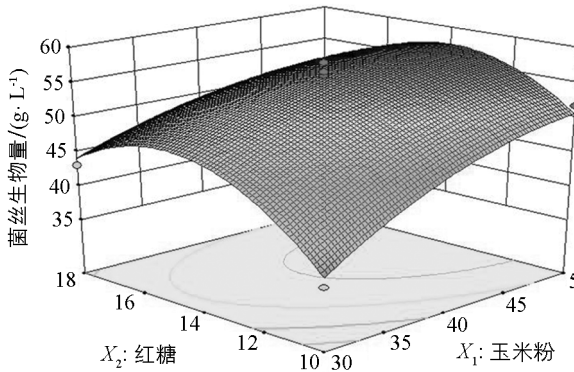


图 1 菌丝生物量在红糖和玉米粉交互影响下的响应面图

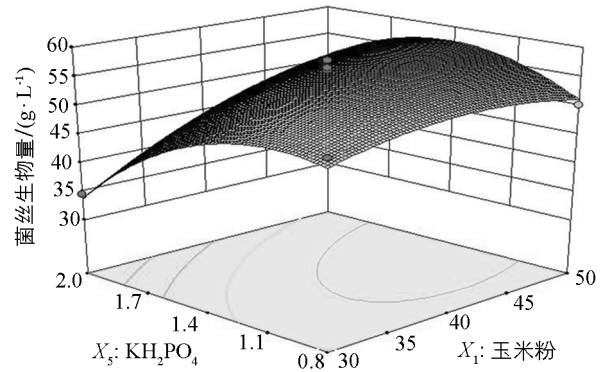


图 2 菌丝生物量在 KH_2PO_4 和玉米粉交互影响下的响应面图

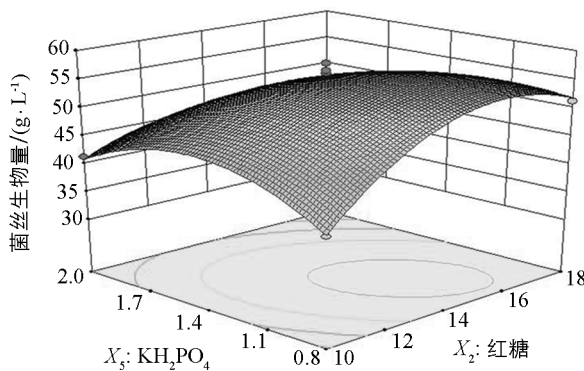


图 3 菌丝生物量在 KH_2PO_4 和红糖交互影响下的响应面图

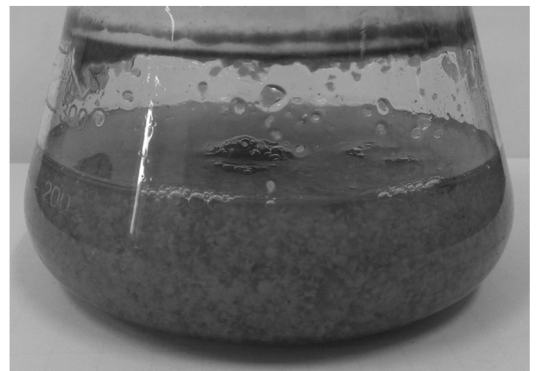


图 4 富硒条件下香菇 Q12 菌株的菌丝形态

3 讨论

研究表明,香菇菌丝对硒的耐受和富集能力较强^[11].本研究以 Na_2SeO_3 为无机硒源,考察高温型香菇 Q12 菌株在不同 Na_2SeO_3 质量浓度梯度下的生长速度,发现低质量浓度对其菌丝生长有一定的促进作用,质量浓度过高对其菌丝生长有抑制作用,这与彭浩等^[10]的研究结论相同.并且由于香菇菌种的差异,其耐硒能力差异较大,香菇 Q12 菌株耐受 Na_2SeO_3 的最佳质量浓度为 30.00 mg/L.彭浩^[10]等对香菇“南山 1 号”菌株进行富硒驯化,其耐受 Na_2SeO_3 的最佳质量浓度均为 60 mg/L.

另外在优化生产工艺的过程中,响应面试验比正交试验有更多的优势^[12],如可以考察因素的交互作用、结果更加可靠等^[13-15].本研究考察了玉米粉、红糖等 6 个因素对菌丝生物量的影响,并得到相应的预测模型,发现香菇 Q12 菌株的菌丝在碳源的利用过程中先消耗结构简单的红糖(双糖),再消耗结构复杂的玉米粉,这与微生物碳源代谢的基本规律一致.各因素间的交互作用结果显示, KH_2PO_4 是香菇菌丝生长过程中必要的无机盐,在一定浓度范围内 KH_2PO_4 可以促进香菇菌丝的生长^[16].在富硒香菇菌丝体的发酵生产中,菌丝生物量是衡量液体种质量的关键因素之一.陈文强等^[5]对香菇南山 1 号菌株的液体发酵工艺进行研究,得到的菌丝生物量为 51.004 g/L.本研究得到香菇 Q12 菌株在富硒条件下的菌丝生物量为 57.56 g/L,比香菇南山 1 号菌株多 12.85%,得到香菇菌丝的生物量高、菌丝球小、密度大且大小均匀,同时原料成本低廉且发酵工艺简单,可为高温型富硒香菇的液体种生产提供理论参考.富硒条件下,发酵得到的食用菌菌丝体可作为胞内硒多糖、硒蛋白提取的原料,这在孟凡云^[17]和丁健峰^[18]的研究中得到了较好的证明;本研究得到的富硒香菇菌丝生物量高,可作为胞内硒多糖和硒蛋白提取的原料.研究表明,在食用菌的富硒发酵过程中,会在发酵液中代谢大量的胞外硒多糖等活性成分^[19],而且香菇发酵液中的多糖产量和菌丝中的多糖产量相当^[20].香菇 Q12 菌株的硒多糖等活性成分的提取工艺还有待进一步探索.

4 结论

本研究通过单因素试验确定了香菇 Q12 菌株的最佳富硒质量浓度 Na_2SeO_3 30.00 mg/L;利用响应面分析法结合生产实际得到了香菇 Q12 菌株的最佳液体培养基配方:玉米粉 39.74 g/L、红糖 15.70 g/L、牛肉粉 5.00 g/L、麦麸 15.00 g/L、 KH_2PO_4 0.80 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g/L 和 Na_2SeO_3 30.00 mg/L,可为高温型富硒香菇液体种的生产提供参考,以及为香菇硒多糖等活性成分的提取提供依据.

参考文献:

- [1] CAO S, DURRANI F A, TÓTH K, et al. Se-Methylselenocysteine Offers Selective Protection Against Toxicity and Potentiates the Antitumour Activity of Anticancer Drugs in Preclinical Animal Models [J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 110(7): 1733-1743.
- [2] CAI X L, WANG C, YU W Q, et al. Selenium Exposure and Cancer Risk: an Updated Meta-Analysis and Meta-regression [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 1-18.
- [3] 杜秉健,唐晓双,翟晓娜,等.具有抗抑郁功效食品营养因子的研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(5): 212-220.
- [4] 孙中涛,王汉忠,孙凤鸣,等.硒在香菇体内的生物转化及硒蛋白的生物活性 [J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(8): 57-60.
- [5] 陈文强,乔艳明.响应面法在香菇液体种生产工艺优化中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(18): 290-294, 319.
- [6] JEFF I B.香菇多糖的系统分析及抗肿瘤活性研究 [D].长春:东北师范大学,2014.
- [7] 乔艳明.富硒条件下香菇液体培养基优化及硒多糖提取工艺 [D].汉中:陕西理工大学,2016.
- [8] 林琳,谢必峰,施巧琴.富硒香菇的深层培养及其特性 [J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 1998, 14(3): 80-84.
- [9] 孙中涛,王汉忠,闫艳春,等.富硒香菇功能性奶粉的研制 [J]. *食品科学*, 2003, 24(3): 76-80.
- [10] 彭浩,乔艳明,陈文强,等.用 $L_9(3^4)$ 正交实验筛选富硒香菇液体培养基 [J]. *北方园艺*, 2014(15): 152-157.
- [11] 乔伟,陈文强,彭浩,等.富硒香菇发酵液中硒多糖提取工艺的响应面优化 [J]. *北方园艺*, 2017(12): 157-162.
- [12] 万明,徐玲霞,张菊,等.雄烯二酮生产菌耐底物突变株 MN_4 生物转化培养基优化 [J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 40(3): 239-244.

- [13] 洪金艳, 李洪军, 甘奕, 等. Box-Behnken 响应面法优化葛花与枳椇子中总黄酮提取工艺的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(10): 186-192.
- [14] 尹延霞, 朱奇峰, 刘汉杰, 等. 中心组合实验设计响应面法优化 α 淀粉酶抑制剂筛选条件 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2015, 40(4): 83-88.
- [15] 加列西·马那甫, 德娜·吐热汗, 王文全. 模拟废水中多元酚类降解率的响应面优化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(1): 144-149.
- [16] 康健, 王海华, 左斌, 等. 不同浓度 $MgSO_4$ 和 KH_2PO_4 对香菇液体培养生长量的影响 [J]. 中国食用菌, 2001, 20(2): 35-37.
- [17] 孟凡云. 羊肚菌胞外多糖与胞内硒多糖抗氧化活性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [18] 丁健峰. 羊肚菌富硒深层发酵工艺及产物功能性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [19] 郝龙. 茶树菇胞外多糖及胞内硒多糖的提取优化和抗氧化研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [20] 活泼. 香菇深层发酵液和香菇子实体营养成分比较 [J]. 浙江科技学院学报, 2003, 15(2): 94-96.

Optimizing the Liquid Medium of High Temperature Type *Lentinus edodes* Under Se-Enriched Condition

QIAO Yan-ming¹, LIU Lin², CHEN Wen-qiang¹

1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-Tech University, Hanzhong Shaanxi 723000, China;

2. School of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang Shaanxi 725000, China

Abstract: In order to provide reference for the development of shiitake mushroom-related products, the most suitable concentration of Na_2SeO_3 for the mycelial growth of the high temperature type shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) strain Q12 was selected and its Se-enriched liquid medium was optimized. Through the experiments of initial experimental design of Plackett-Burman, path of steepest ascent, Box-Behnken design and response surface analysis, the optimum liquid fermentation medium of 'Q12' under Se-enriched condition was shown to be corn meal 39.74 g + brown sugar 15.70 g + powdered beef 5.00 g + wheat bran 15.00 g + KH_2PO_4 0.80 g + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.00 g + Na_2SeO_3 30.00 mg/L. On this optimized fermentation medium, the mycelial biomass of 'Q12' was as high as 57.56 g/L, which was 1.30 times higher than that on the un-optimized medium. The predicted values of a mathematical model were consistent with the experimental observations, the relative error being about 5.95%, and it was, therefore, concluded that the response surface method is feasible for the optimization of Se-enriched liquid medium of high temperature type *L. edodes* strains.

Key words: *Lentinus edodes*; Se-rich; high temperature type; liquid medium; response surface method

责任编辑 包颖

