

PDA 培养基改良配方的研究

杨 勇¹,张凤英¹,陈 岑²

(1.江西农业大学食品学院,江西 南昌 330045;2.江西省宜春市第二中学,江西 宜春 336600)

摘 要: 通过单因素和正交试验对 PDA 培养基配方进行改良。改良后的 PDA 培养基为在 PDA 基础培养基中添加牛肉膏 0.35%,酵母膏 0.45%,玉米汁 3.50%。同一米根霉菌株分别用改良 PDA 和基础 PDA 培养,结果表明,用改良 PDA 培养的菌种糖化酶活力为 1374 U/g,基础 PDA 培养的糖化酶活力为 1190 U/g。

关键词: PDA; 糖化酶活力; 改良; 菌丝

中图分类号: Q93-3; Q55; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)04-0029-03

Study on the Improved Formula of PDA Culture Medium

YANG Yong¹, ZHANG Fengyin¹ and CHEN Qin²

(1.College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045;

2. Yichun No.2 Middle School, Yichun, Jiangxi 336600, China)

Abstract: The formula of PDA culture mediums was improved by single factor test and orthogonal test as follows: 0.35 % beef extract, 0.45 % yeast extract, and 3.5 % corn juice were added in PDA basic culture mediums. *Rhizopus oryzae* strain was cultured by improved PDA and basic PDA respectively in the experiment and the results showed that glucoamylase activity of *Rhizopus oryzae* cultured by improved PDA was 1374 U/g and that by basic PDA was only 1190 U/g.

Key words: PDA; glucoamylase activity; improved; mycelium

土豆培养基(简称 PDA)是最常用的霉菌培养基。土豆块茎中含淀粉 15%~25%,蛋白质 2%~3%,脂肪 0.7%,粗纤维 0.15%,还含有丰富的钙、磷、铁、钾等矿物质及维生素 C、维生素 A 和 B 族类维生素,营养丰富,所以常用于食品发酵类霉菌的培养。新鲜的土豆营养物质丰富,但由于季节限制大部分时间都买不到新鲜土豆,长时间保藏会使土豆中的营养物质流失,而且土豆蒸煮后各种营养素的流失导致其营养成分含量降低,会对霉菌的生长繁殖产生一些不良影响,例如导致霉菌丝长的细小、不够旺盛、暗淡无光等,从而影响菌株产酶活力。

鉴于此,本实验拟用食品酿造工业常用的米根霉菌为模式菌种,以保藏土豆为原料,通过单因素和正交试验^[1]分别对 PDA 配方进行改良研究。以期研究出原料廉价易得,营养又能完全满足菌种生长且制备方法简便的培养基,为酿造企业及相关的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:米根霉 2-2 试管种,均由江西农业大学食品科

基金项目:江西省教育厅项目资助(GJJ11408)。

收稿日期:2012-02-20

作者简介:杨勇(1986-),男,湖北人,硕士研究生,专业为农产品加工及贮藏工程。

通讯作者:张凤英,女,研究员,主要从事食品微生物发酵研究。

优先数字出版时间 2011-03-12;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120312.1620.008.html?uid=>。

学与工程学院微生物实验室提供。

原料:土豆、玉米、桔子、麸皮;市售。

药品:酵母膏、牛肉膏、蛋白胨(生化试剂);无水硫酸铜、次甲基蓝、酒石酸钾钠、氢氧化钠、亚铁氯化钾、无水葡萄糖、冰醋酸、醋酸钠、可溶性淀粉,试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的制备

PDA 基础培养基:200 g 土豆,洗净去皮切成小块,加水 1000 mL 煮沸 25 min;纱布过滤,滤液加水补足 1000 mL,再加入 20 g 葡萄糖及 20 g 琼脂,加热让其充分溶解即可。

1.2.2 改良 PDA 培养基单因素试验

在 PDA 基础培养基中,分别添加不同比例的牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、桔子汁、玉米汁等,然后灭菌倒平板,编号;冷凝后将米根霉孢子点接在培养皿中央,同时做空白对照,30℃培养 16 h 时进行第一次观察并记录菌落直径及生长状态,24 h 时进行第二次观察记录。

1.2.3 改良 PDA 培养基正交试验设计

通过单因素试验对菌落生长状况进行比较后,确定出菌丝生长较好的因素水平,采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,运用DPSv6.55统计软件处理,采用新复极差法进行统计处理与显著性验证,以确定PDA最佳改良配方。

1.2.4 根霉菌生产性能的测定^[2]

将麸皮和水以2:1进行混合,分装到三角瓶中。经高压灭菌后,将用改良PDA或基础PDA培养的根霉菌接种到相应的三角瓶中,30~32℃培养2d,取出麸皮培养物装入无菌袋中烘干,然后测定培养物的糖化酶活力。酶活力越高,生产性能越好。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对PDA培养基上米根霉生长的影响

氮源是影响霉菌生长繁殖的主要因子之一。通过添加不同氮源观察米根霉培养16h和24h后的菌落特征及生长状况,以确定不同氮源对PDA平板培养基上米根霉生长繁殖的影响,从而确定改良培养基的最优氮源。

2.1.1 牛肉膏

米根霉在添加牛肉膏的PDA培养基上的生长特征见表1。由表1可知,牛肉膏添加比例在0.1%~0.3%内随着牛肉膏添加量的增加,菌落直径也随之增大;比例在0.3%~0.5%时随着牛肉膏量的增加菌落直径随之变小。可见米根霉在梯度为0.3%的牛肉膏培养基上的生长较其他梯度好,生长16h后,菌落直径可达59mm,且菌丝较粗,亮白光泽;24h后产孢子数量增加明显,菌株繁殖力较强。

表1 添加牛肉膏的PDA培养基上米根霉的生长特征

牛肉膏梯度 (%)	菌落直径(mm)		24 h 菌落特征
	16 h	24 h	
对照	50	82	菌丝稠密,细小,无光泽,有孢子
0.1	52	79	菌丝细小,无光泽,有孢子
0.2	52	83	菌丝细小,有光泽,有孢子
0.3	59	长满平皿	菌丝粗壮,有光泽,孢子量多
0.4	55	78	菌丝较粗壮,较光泽,孢子量较少
0.5	46	69	菌丝细小,暗黄无光泽,孢子量很少

2.1.2 蛋白胨

米根霉在添加蛋白胨的PDA培养基上的生长特征见表2。由表2可知,米根霉的生长速度(直径大小)随着蛋白胨梯度的增加总体无明显变化。整体上菌丝细小杂乱,产孢子量较少,菌落直径最大只有51mm;与在加牛肉膏平板上相比生长速度较慢,总体看蛋白胨对米根霉的生长没有较明显的影响。其原因可能是米根霉生长对氮源具有选择性,对蛋白胨中氮的利用率相对较低。

2.1.3 酵母膏

米根霉在添加酵母膏的PDA培养基上的生长特征见表3。

表2 添加蛋白胨的PDA培养基上米根霉生长特征

蛋白胨梯度 (%)	菌落直径(mm)		24 h 菌落特征
	16 h	24 h	
对照	49	长满平皿	菌丝稠密细小,无光泽,有孢子
0.5	47	73	菌丝杂乱细小
0.6	43	68.3	菌丝杂乱细小,有孢子
0.7	50	79	菌丝细小稠密,有少量孢子
0.8	50	77.6	菌丝稠密细小,较光泽,有少量孢子
0.9	49	75	菌丝较粗壮,较光泽,有少量孢子
1.0	51	80.5	菌丝较粗壮,较光泽,较稠密

表3 添加酵母膏的PDA上米根霉生长特征

酵母膏梯度 (%)	菌落直径(mm)		24 h 菌落特征
	16 h	24 h	
对照	50	长满平皿	菌丝稠密细小,无光泽,孢子较少
0.1	53	长满平皿	菌丝稠密细小,较有光泽,有较多孢子
0.2	60	长满平皿	菌丝较粗壮,较有光泽,有较多孢子
0.3	63	长满平皿	菌丝粗壮,有光泽,有较多孢子
0.4	67	长满平皿	菌丝粗壮,有光泽,有大量孢子
0.5	61	长满平皿	菌丝粗壮,有光泽,有较多孢子

由表3可知,酵母膏对米根霉生长的影响较大,在添加酵母膏的培养基上米根霉菌丝生长粗壮,亮白有光泽,稠密度适中。酵母膏添加量为0.1%~0.4%时,随着添加量的增加,菌落直径也随之增大;添加量为0.4%,培养16h时,菌落直径可达67mm,比加牛肉膏的最大菌落直径多8mm,与加蛋白胨相比最大菌落直径相差达16mm,菌丝也更粗壮、更亮白。24h时各梯度的培养基中都长出较多孢子,因此,选择酵母膏和牛肉膏为氮源进行下一步正交试验。

2.2 桔子汁对米根霉生长的影响

米根霉在加桔子汁的PDA上培养16h和24h后菌落特征及生长状况见表4。

表4 添加桔子汁PDA上米根霉生长状况

桔子汁梯度 (%)	菌落直径(mm)		菌落特征
	16 h	24 h	
对照	48	长满平皿	菌丝稠密细小,无光泽,孢子较少
2	47	71	菌丝细小稀薄,暗淡,有少量孢子
4	45	70	菌丝细小稀薄,较暗淡,
6	49	79	菌丝细小稀薄,有少量孢子
8	44	62	菌丝细小稀薄,有孢子
10	48	76	菌丝细小稀薄,较光泽,有孢子

由表4可知:与对照相比,桔子汁对米根霉的影响较小。在添加量为6%的PDA上生长16h时的菌落直径最大达49mm,菌落直径最小为44mm,菌丝细小、暗淡无光、生长较弱。整体上看,加桔子汁对米根霉生长基本无益。

2.3 玉米汁对PDA培养基上米根霉生长的影响

玉米含有较多的硒和镁,还含有丰富的赖氨酸、纤维素、木质素以及谷胱氨酸。这些营养物质可作为根霉菌生

长繁殖所需的生长因子。通过观察米根霉在加玉米汁的 PDA 上培养 16 h 和 24 h 后的菌落特征及生长状况,研究玉米汁对米根霉生长的影响,结果见表 5。

表 5 添加玉米汁的 PDA 上米根霉生长状况

玉米汁梯度 (%)	菌落直径(mm)		菌落特征
	16 h	24 h	
对照	49	长满平皿	菌丝稠密细小,无光泽,孢子较少
2	50	长满平皿	菌丝稠密细小,较光泽,有孢子
4	53	长满平皿	菌丝粗壮光亮,疏密适中,孢子较多
6	47	82	菌丝粗壮光亮,疏密适中,孢子较多
8	47	81	菌丝细小,有光泽,较稀疏,有孢子
10	48	77	菌丝细小,有光泽,较稀疏,有孢子

由表 5 可知,整体上米根霉在含玉米汁的 PDA 上菌丝生长疏密适中,较亮白,生长速度较快,说明玉米汁对米根霉的生长有较明显的促进作用。添加量在 4 % 时,菌丝粗壮、亮白,培养 16 h 时菌丝直径最大达到 53 mm,与对照菌落直径相差达到 4 mm;24 h 时长出大量黑孢子,菌株活力较强。所以选取玉米汁进行下一步正交试验。

2.4 改良 PDA 培养基的正交优化

经单因素试验比较确定,分别添加 4 % 玉米汁、0.3 % 牛肉膏、0.4 % 酵母膏的 PDA 培养基明显有利于米根霉的生长繁殖,菌株生长好就会达到良好的产酶效果。因此,实验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验在基础 PDA 中同时添加玉米汁、酵母膏、牛肉膏,以期获得最佳改良 PDA 培养基配方及此配方下菌株产糖化酶的结果。因素水平安排见表 6,产糖化酶正交实验结果见表 7。

表 6 改良 PDA 培养基配方正交试验因素水平表

水平	因素		
	A:玉米汁(%)	B:牛肉膏(%)	C:酵母膏(%)
1	3.5	0.25	0.35
2	4.0	0.30	0.40
3	4.5	0.35	0.45

由表 7 可知,各因素影响米根霉糖化酶活力的主次顺序为 C(酵母膏) > A(玉米汁) > B(牛肉膏),C(酵母膏)对米根霉糖化酶力影响最大,具有显著影响(方差分析显示 $P < 0.05$),其次是 A(玉米汁),最后为 B(牛肉膏)。直观分析表明,糖化酶活力最高的最佳培养基配比是 $A_1B_3C_3$,即在基础 PDA 中同时添加玉米汁 3.5 %、牛

表 7 改良 PDA 培养基配方试验结果

实验号	实验因素				糖化酶活力 (U/g)
	A	B	C	D(空列)	
1	1	1	1	1	1134
2	1	2	2	2	1074
3	1	3	3	3	1374
4	2	1	2	3	1234
5	2	2	3	1	1144
6	2	3	1	2	890
7	3	1	3	2	1286
8	3	2	1	3	1126
9	3	3	2	1	1138
k_1	1194.00	1218.00	1050.00	1138.67	
k_2	1089.33	1114.67	1148.67	1083.33	
k_3	1183.33	1134.00	1268.00	1244.67	
R	104.67	103.33	218.00	154.67	

注: k_1 , k_2 , k_3 为各因素水平的平均值。

肉膏 0.25 %、酵母膏 0.45 %。

2.5 验证试验

根据正交试验结果,将同一菌株分别用改良 PDA 和基础 PDA 培养,然后检测其糖化酶活力。改良 PDA 所培养菌株的糖化酶活力为 1374 U/g,基础 PDA 培养的糖化酶力为 1190 U/g。结果表明,经改良的 PDA 培养基更适合米根霉生长繁殖。

3 结论

在单因素试验基础上,通过对牛肉膏、酵母膏、玉米汁进行 3 因素 3 水平正交试验,经方差分析后得出改良配方:PDA 基础培养基中添加牛肉膏 0.25 %、玉米汁 3.5 %、酵母膏 0.45 %,有利于米根霉的生长和产酶。

通过对比试验可知,同一菌株分别用改良 PDA 和基础 PDA 培养,用改良 PDA 培养的菌产糖化酶活力为 1374 U/g,基础 PDA 培养的菌株糖化力为 1190 U/g。总之改良后的 PDA 培养出的米根霉菌的生产性能相比于普通 PDA 得到明显改善。

参考文献:

- [1] 肖怀秋,李玉珍.微生物培养基优化方法研究发展[J].酿酒科技[J],2010(1):90-94.
- [2] 陈卫平,等.制曲工艺[M].南昌:江西科学技术出版社,1993:231-236.

(上接第 28 页)

酿酒师应针对酒样的实际情况,查找原因来改善酒体酸缺陷。

参考文献:

- [1] Meilgaard M. Flavor and threshold of beer volatiles[J].Technical Quarterly,Master Brewers'Association of the Americas,1974,11:87-89.

- [2] Engan S. Organoleptic threshold values of some organic acids in beer[J].Journal of the Institute of Brewing,1974,80:162-163.
- [3] 董霞,李崎,顾国贤.啤酒有机酸类物质研究进展[J].酿酒,2003,30(6):63-65.
- [4] 陈慧,张彦青,张茜,等.未除气与除气淡爽型啤酒中 9 种有机酸的阈值[J].食品与发酵工业,2011,35(5):175-180.