

银耳深层培养的研究*

林树钱 沈国华 付妹治

(福建省三明地区真菌研究所, 福建)

银耳 (*Tremella fuciformis* Berk.) 是一种珍贵的药用真菌。为便于大量生产应用, 我们从 1971 年开始, 对银耳进行深层培养、药理和临床等研究。本文主要报道银耳深层培养的研究结果。

材料与 方法

一、试验菌株

采用银耳子实体孢子弹射分离的方法, 经进一步纯化后, 分离得到的 Tr-71 菌株。

二、培养基

1. 斜面培养基 (%): 马铃薯 (去皮) 20, 蔗糖 2, 琼脂 2, pH 自然。

2. 摇瓶种子培养基 (%): 马铃薯 (去皮) 20, 蔗糖 2, 硫酸铵 0.2, pH 自然。

3. 种子罐培养基 (%): 同摇瓶种子培养基。

4. 发酵罐培养基 (%): 马铃薯 8, 蔗糖 2, 玉米淀粉 0.5, 蛋白胨 0.4, 硫酸铵 0.2, pH 自然。

三、培养方法

1. 斜面培养: 温度 28℃, 培养 5—7 天。

2. 摇瓶种子培养: 一级种子培养采用 500 毫升三角瓶, 装液量为 100 毫升, 置于 220 转/分的旋转式摇瓶机上振荡培养 36—48 小时, 温度 28℃, 二级种子培养采用 500 毫升三角瓶, 装液量 800 毫升, 置于往复式摇床上 (96 次/分, 振幅 55 毫米) 振荡培养 48—56 小时, 温度 28℃ ± 2, 接种量 12% (体积/体积)。

3. 种子罐: 采用 40 升不锈钢罐, 投料 24 升。接种量为 5% (体积/体积)。搅拌转速 220 转/分, 通气量为 1:1 (体积/体积/分), 罐压

* 参加试验的还有黄兰妹、林金枝、游兰英、洪震同志。并承福州市中心化验室电镀拍照。一并感谢。

0.4—0.5 公斤/厘米²，温度 28℃±2，培养 48—56 小时。

4. 发酵罐：采用 500 升不锈钢罐，投料 300 升，接种量 10%，搅拌速度 180 转/分，通气量 1:1 (体积/体积/分)，罐压 0.4—0.5 公斤/厘米²，温度 28℃±2，培养 72—96 小时。

5. 摇瓶发酵条件试验：采用 500 毫升三角瓶，装液量 100 毫升，接种量 5% (体积/体积)，温度 28℃，培养 72 小时，每组试验四个重复，取平均值做为结果。

四、发酵终点的判断

目前银耳的有效成份尚未确定，所以发酵终点暂以菌体形态、数量、氮、碳源的消耗指标综合考虑来确定。

五、测定方法

- 1. 菌量：采用红血球计算法 (血球计数板为 XB-K-25 型，0.1 毫米，1/400 毫米²)
- 2. 酸碱度：用 25 型酸度计测定。
- 3. 还原糖：采用斐林法测定。
- 4. 可溶性氨基酸：用甲醛法测定。

试验结果

一、菌体形态的观察

银耳孢子在马铃薯-蔗糖培养基或液体培养液中，以芽殖方式产生大量的酵母状分生孢子或称节孢子 (俗称芽孢)。见图 1。

芽孢初期菌落呈乳白色，后期呈金黄色。芽殖开始时，自母芽孢长出一个突起 (称芽体)，

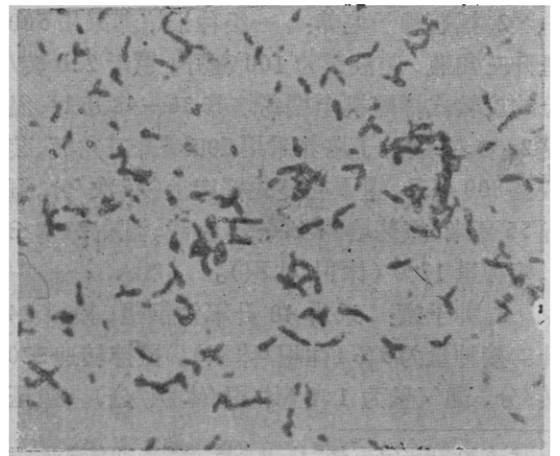


图 1 银耳的节孢子，×280 倍

随着细胞内核的分裂，一部份细胞核进入芽体，另一部份细胞核仍留在母细胞内，芽体逐渐长大，最后脱离母芽孢发育成一个新个体。在显微镜下观察可以看到单个或双个 (芽孢与母体) 以及多个链状的卵圆形芽孢 (见图 2—5)。其个

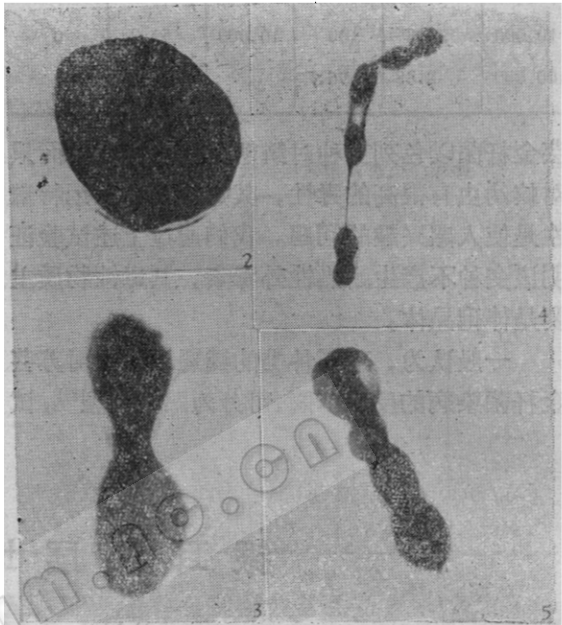


图 2—5 其中图 2，电镜，单个芽孢，18000 倍。图 3，双个芽孢，电镜，11000 倍。图 4，双个链接芽孢，电镜，1800 倍。图 5，链状芽孢，电镜 3000 倍。

体的大小随着培养条件不同而异，但一般直径在 2—8 毫米之间，从未染色的片中可观察到原生质中存在空胞及小颗粒。

二、深层发酵中不同营养成分对银耳芽孢生长的影响

1. 不同碳源对银耳芽孢产量的影响：结果见表 1。

结果说明蔗糖和葡萄糖为银耳芽孢生长的最适碳源。

2. 不同氮源对银耳芽孢产量的影响：结果见表 2。

表 2 说明氮源以蚕蛹粉，酵母浸膏效果最好。

3. 不同培养基组成对银耳芽孢产量的影响：结果见表 3。培养基自然 pH。

结果表明，用五号培养基发酵制备银耳芽孢最好。

表 1 不同碳源对银耳芽孢产量的影响*

碳源名称	葡萄糖	蔗糖	半乳糖	乳糖	棉籽糖	玉米淀粉	地瓜粉	木薯粉
芽孢产量 (亿个/毫升)	18.60	28.40	11.73	5.98	4.95	4.45	2.12	1.65

* 基础培养基(%): 蛋白胨 1, 酵母浸膏 0.5, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 碳源用量 2。

表 2 不同氮源对银耳芽孢产量的影响*

氮源名称	酵母浸膏	蛋白胨	玉米浆	牛肉膏	硫酸铵	蚕蛹粉**	花生饼粉**	麸皮**
氮源用量 (%)	0.5	1	1	1	0.5	5	5	5
芽孢产量 (亿个/毫升)	14.20	6.90	2.90	3.80	2.00	16.60	3.00	6.00

* 基础培养基(%): 葡萄糖 2, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.05。

** 煮 20 分钟后过滤, 取滤液配制。

表 3 不同培养基组成对银耳芽孢产量的影响

培养基序号	培养基成份及重量 (%)	芽孢产量 (亿个/毫升)
一	马铃薯 20, 蔗糖 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.1	17.72
二	黄豆饼粉 2, 蔗糖 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.1	6.27
三	玉米粉 2, 蔗糖 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.1	4.47
四	玉米粉 1, 蔗糖 2, 酵母粉 0.5, 蛋白胨 0.2, MgSO_4 0.06, KH_2PO_4 0.1	16.65
五	黄豆饼粉 2, 蔗糖 2, 蛋白胨 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, KH_2PO_4 0.05, CaCO_3 0.2, NaCl 0.25	21.65

表 4 培养基不同 pH 值对银耳芽孢产量的影响

不同 pH 值	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
芽孢产量 (亿个/毫升)	5.52	5.82	5.82	10.95	16.67	16.12	20.45	23.90	20.07	21.75	14.62

三、深层发酵条件试验

3. 不同菌龄对芽孢产量的影响: 结果见表 6。

1. 培养基灭菌前不同 pH 试验: 结果见表 4。

4。

结果表明: 培养基 pH 在 2.5 到 7.5 之间芽孢均可生长, 但最适生长 pH 为 6.0。

2. 通气量对银耳芽孢产量的影响: 结果见表 5。

表 5 不同通气量对银耳芽孢产量的影响

培养液装量 (毫升)	50	100	150	200
芽孢产量 (亿个/毫升)	22.27	20.65	15.05	12.57

结果表明, 在 500 毫升三角瓶中, 培养液装量 50 毫升比 200 毫升可提高产量 0.8 倍。

表 6 不同菌龄对银耳芽孢产量的影响

不同菌龄 (小时)	24	36	48	60
芽孢产量 (亿个/毫升)	2.33	33.0	23.32	15.65

结果表明最适菌龄为 36 小时。

4. 不同接种量对银耳芽孢产量的影响: 结果见表 7。

表 7 表明, 芽孢生长的最适接种量为 5—10%。

5. 消沫剂加入量对芽孢产量的影响: 结果见表 8。

表 7 不同接种量对芽孢产量的影响

接种量 (%)	1	2	5	10	15
产 量 (亿个/毫升)	2.72	15.12	22.34	21.48	16.62

表 8 消沫剂豆油加入量对芽孢产量的影响

加 油 量 (%)	对 照 组	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.5
芽孢产量 (亿个/毫升)	16.50	19.37	14.35	12.00	12.00	9.08	7.55

表 8 指出, 豆油加入量为 0.05% 时的芽孢产量比对照组增加 11.51% 左右, 且芽孢产量随着加油量的增加而减少。

四、发酵工艺

1. 摇瓶种子标准: ①菌体形态, 生长密集, 芽体多, 芽孢为单个、双个或多个链状排列, 略小, 着色深。②含菌数量在 15—20 亿个/毫升。③ pH 值 4.0—4.5。④生长周期 48—56 小时。⑤平板培养无染菌。

2. 种子罐种子标准: 同摇瓶种子。

3. 发酵终点标准: ①菌体形态, 芽孢数量增加不显著, 密集, 芽体几乎脱落于母体, 多为大小不一的单个。②菌数在 20—25 亿个/毫升。③发酵周期为 72—96 小时。④残糖低于 1%, 氨基氮低于 0.2 毫克/毫升。

4. 发酵过程中菌体形态变化的观察: 结果见表 9。

5. 发酵过程中代谢的变化: 发酵过程中每

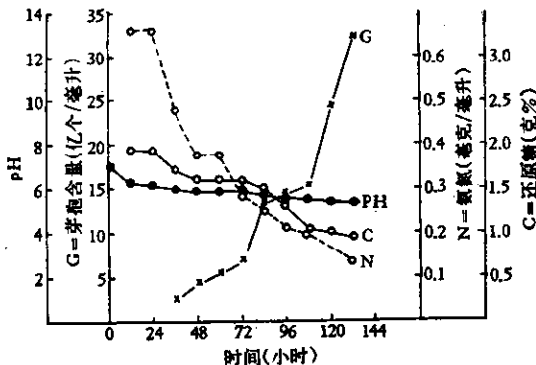


图 6 发酵过程的代谢曲线

表 9 发酵过程中芽孢形态的变化

培养时间 (小时)	菌 体 形 态
12—36	芽孢多为单体, 粗壮, 孢内充满原生质, 着色深芽体少。
36—72	芽孢密集, 单个, 双个或多个链状排列, 略小, 着色深, 芽体多。
72—86	芽孢密集, 芽体脱落母体, 多为单个大小不一的芽孢, 少有双个或多个排列。
86—120	芽孢数量增加不显著, 形态无明显变化。

隔 12 小时测定碳、氮含量及 pH 值, 结果见图 6。

图 6 表明, 银耳芽孢对氮源利用快, 特别是发酵初期在 48 小时内, 氨基氮明显下降, 而 pH 值较为稳定。因此在培养基中适当提高氮源或在发酵过程中补料, 值得进一步研究。

讨 论

在不同培养基组成对芽孢产量影响的试验中, 说明五号培养基最适。但在实验罐中的发酵结果表明, 泡沫较多, 不易控制。而采用马铃薯-蔗糖培养基较容易控制, 产量也较稳定。但考虑到用 20% 的马铃薯投料不很经济, 故降低为 8% 的马铃薯并配合其他辅助的氮、碳源, 这在实际中是可行的。

参 考 文 献

- [1] 张之荫: 抗菌素, 4: 58—65, 1977。