

金针菇菌丝体深层培养工艺研究

方海洲 梁世中 陈碧坚 高孔荣

(华南理工大学生物工程研究所, 广州 510641)

在1.8L气升式发酵反应器中,研究了金针菇菌丝体深层培养工艺条件及其特性。结果表明:金针菇菌丝体深层培养可采用玉米、黄豆和糖蜜等廉价原料作主要碳氮源;最适需氧量为 $1.0-2.0 \times 10^{-7} \text{mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm}$;培养24—72h内,菌丝球生长遵循立方根规律,即 $x^{1/3} = 0.786 + 0.027t$ 。在最佳发酵条件下,摇瓶培养4天,菌丝干重达24.4mg/ml;在反应器培养4天,菌丝干重为25.7mg/ml。

关键词 金针菇; 深层培养; 气升式发酵反应器; 菌丝球

金针菇是一种营养和保健价值极高的食用菌,在国际市场销量大、售价高^[1]。但金针菇传统的生产方法是固体栽培,种子培养需20—25天,栽培周期长达70—75天,而且劳动强度大,受气候和季限制。利用深层培养法可在短时间内获得大量的金针菇菌丝体,可用于制作食用蛋白以及作为农业栽培的种子等。深层培养具有生长速率快、经济效益高的优点,是固体栽培法无法比拟的。目前,已发表的有关金针菇培养研究的文献都是着重于探索金针菇子实体的形成和高产生理生态条件,至于金针菇菌丝体深层培养的生产性研究未见报道^[2-4]。本文应用1.8L气升式发酵反应器进行了金针菇菌丝体深层培养试验。

材料和方法

(一)母种培养

供试菌株为金针菇三明一号,北京谷物油脂研究所提供。斜面培养采用综合PDA培养基,培养温度24℃,每三个月传代一次。

(二)一级种子培养基的选定

种子培养使用基础培养基I(g/L):葡萄糖10, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 调pH5.6。按照 $L_9(3^4)$ 正交试验法^[5],设计9种培养基进行摇瓶培养。其中,复合碳源为玉米粉和淀粉,复合氮源为酵母粉蛋白胨和黄豆粉,同时适量加入糖蜜。用250ml三角瓶装培养基75ml,灭菌后接入1/3斜面($\phi 18 \times 200\text{mm}$ 试管)菌丝小块,先在23—25℃静止培养24h,再置于旋转式振荡器上,130r/min、23—25℃恒温通气培养5天,测定菌丝得率和菌丝球大小。

(三)发酵培养基的选择

确定实验的基础培养基II(g/L):黄豆粉10, 酵母粉2, 蛋白胨2, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, 调pH5.6。按 $L_6(3^2)$ 正交表设计6种培养基进行摇瓶培养,使用了不同数量的玉米粉和糖蜜。用500ml三角瓶装培养基120ml,灭菌后接入10%的一级种子,在24℃、130r/min条件下,恒温振荡培养4天,测定菌

本文于1992年3月4日收到。

丝得率。

(四) 工艺条件试验

除特别说明外, 本实验的培养条件均为: 500ml 三角瓶装培养基 120ml, 接种量 10%, 摇床转速 130r/min, 温度 24℃, 一级种菌龄 6 天, 培养 4 天。对 4 个工艺参数进行考察, 即 (1), 需氧量试验, 对 8 个不同装液量 (500ml 瓶装 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200ml) 条件测定溶氧系数 K_d 值和菌丝培养试验, 确定最适需氧量; (2) 接种量, 6 个不同接种量 (2, 4, 6, 8, 10, 12%) 条件下进行培养; (3) 种子菌龄, 使用 6 个不同菌龄的种子 (4, 5, 6, 7, 8, 9 天) 进行试验; (4) 温度, 选择三个不同温度 (20, 24, 28℃)。

(五) 使用气升式发酵反应器进行培养试验

我们研制了一套 1.8L 玻璃气升式发酵反应器, 如图 1 所示。首先对三种不同喷嘴 ($\phi 1.0\text{mm}$, $\phi 0.1 \times 100\text{mm}$ 和特制喷嘴 X) 的溶氧和混合特性进行比较试验, 从中选定喷嘴结构和型式; 然后在 23—25℃ 条件下通气培养试验。设置 4 组通气量水平进行试验。其中, 第一组的通气速率自始至终维持恒定的 0.35vvm; 第二组的通气速率, 在 0—24h 为 0.3vvm, 在其后的 24—96h 为 0.4vvm; 第三组则在 0—24h 为 0.3vvm, 其后每隔 24h 递增 0.1vvm; 第四组在 0—24h 为 0.4vvm, 其后维持 0.6vvm。每隔 12h 取样测定菌丝得率。

(六) 分析方法

1. 菌丝得率测定: 培养液经过滤, 收集菌丝体, 水洗 2 次, 70℃ 烘干至恒重, 菌丝得率用 g/L 表示。

2. 菌球大小: 随机取 20 个有代表性的菌丝球, 测量其直径, 取平均值。

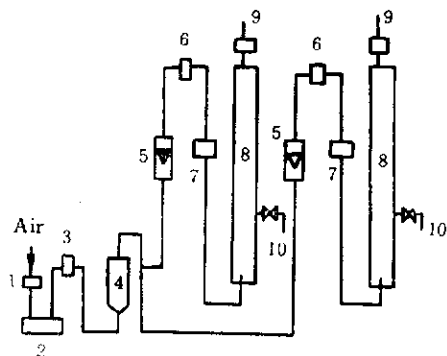


图 1 气升式发酵反应器培养装置图
Fig.1 Schematic diagram of air-lift bioreactor

1. Dust remover, 2. Air compressor,
3. QFLJW, 4. Air filter, 5. Flowmeter,
6. Superthin fiber-paper air filter,
7. Absolute air filter, 8. Air-lift fermenter,
9. Exhaust filter, 10. Sampling tube

3. 溶氧系数 K_d 值应用亚硫酸钠氧化法^[6]测定。

结果与讨论

(一) 一级种子培养基选择

正交实验结果表明, 复合碳源极差最大, 对菌丝得率和菌球直径影响最显著。随着复合碳源中玉米含量的增加, 菌丝得率增大, 菌球直径减少。一级种子培养基的较好配方为 (g/L): 玉米粉 50, 葡萄糖 10, 酵母粉 2, 蛋白胨 2, 黄豆粉 10, 糖蜜 10, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, pH 5.6。应用上述培养基进行种子培养, 菌丝得率达 21.6g/L, 菌球平均直径为 2.0mm。

(二) 发酵培养基选择

正交实验结果表明, 玉米粉对菌丝得率影响显著, 而糖蜜量影响不大。发酵培养基的较好配方是 (g/L): 玉米粉 30, 糖蜜 15, 黄豆粉 10, 酵母粉 2, 蛋白胨 2, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, pH 5.6。

用此培养基进行摇瓶培养, 菌丝得率达 23.2g/L。

(三) 摇瓶培养条件试验

当 500ml 摇瓶装液量从 80ml 增加到

200ml 时, K_L 值从 $2.47 \times 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm}$ 下降到 $0.75 \times 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm}$, 但装液量在 80—200ml 之间时, 菌丝生长均良好, 如表 1 所示。

表 1 装液量对溶氧速率和菌丝得率的影响

Table 1 Influence of liquid volume on K_L and the yield of mycelium

Contain ml/500 ml	80	120	160	200
$\text{DO}(\times 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm})$	2.42	1.80	1.23	0.75
Mycelium yield (g/L)	21.50	23.28	23.57	23.00

表 1 表明, 金针菇深层培养的需氧量为 $1-2 \times 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm}$ 。其它的工艺条件适宜范围是: 接种量 8—10%, 一级种菌龄 6 天, 培养温度 24℃。

(四) 菌丝生长动力学模型

可以假定, 在没有氧和基质限制的情况下, 菌丝球生长遵循立方根规律 (理论推导过程略):

$$x^{1/3} = x_0^{1/3} + kt$$

式中, x 表菌丝干重, k 为菌丝球立方根生长常数, t 为培养时间。

在最佳工艺条件下进行摇瓶培养, 菌丝干重、菌丝干重立方根及菌丝干重对数与培养时间的关系见图 2。从图可见, 在 24—72h 的快速生长期, 菌丝干重立方根与培养时间近似成线性关系。采用最小二乘法对此直线段进行回归, 得出菌丝球生长的动力学模型为:

$$x^{1/3} = 0.786 + 0.027t$$

此模型与实验结果吻合良好, 相关系数为 0.96, 误差小于 8%。

(五) 气升式发酵反应器培养试验

实验结果表明, 我们设计的 X 型气体分布器是最佳喷嘴型式, 产生的气泡细小, 分散与混合性能良好, 溶氧速率高。实验中还发现, 培养过程由于菌丝的增

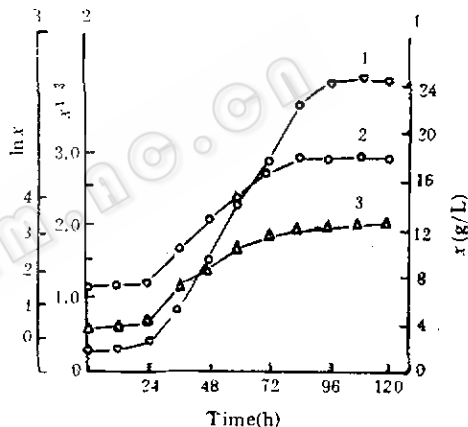


图 2 培养过程菌丝体生长情况

Fig. 2 Time course of the mycelium growth

长, 需氧量不断提高, 不同时期适宜的通风量为: 0—24h 为 0.3vvm, 24—48h 为 0.4vvm, 48—72h 为 0.5vvm, 72—96h 为 0.6vvm。

在反应器中经 4 天培养, 金针菇菌丝得率达 25.7g/L, 这表明气升式发酵反应器适用于金针菇菌丝体深层培养。

最后, 利用金针菇菌丝体深层培养液, 经特殊工艺处理, 制成金针菇营养保健饮料。还利用所得的深层培养液体菌种, 进行了金针菇固体栽培试验, 效果很好。

参 考 文 献

- [1] 黄年来, 自修食用菌, 南京大学出版社, 南京, 1987。
[2] 金荣观等: 食用菌, (4):17—18, 1988。
[3] 金荣观等: 食用菌, (5):16, 1988。
[4] 金荣观等: 食用菌, (6):15, 1988。
[5] 田口久治, Humphrey, A.E.: 化学工学, 30(10):869—875, 1966。
[6] 郭荣根: 工业微生物, (4):40—45, 1983。

Submerged Culture Production of *Flammulina velutipes* Mycelium

Fang Haizhou Liang Shizhong Chen Bijian Gao Kongrong

(Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Flammulina velutipes was cultivated in a 1.8 liter air-lift fermentor. The result showed that corn, soybean and molasses were the best economical carbon and nitrogen sources for the culture. The optimum oxygen requirement was $1.0-2.0 \times 10^{-7} \text{ mol O}_2/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{atm}$. Mycelial growth follows cubic root law, i.e., $x^{1/3} = 0.786 + 0.027t$. Under the optimum conditions, the mycelial dry weight yields for 4 days were 24.4g/L in shaking culture and 25.7g/L in air-lift fermentor cultivation.

Key words *Flammulina velutipes*, submerged culture, air-lift fermentor, mycelial pellets