

松口蘑深层发酵工艺的研究

刘 萍 陶文沂 许正宏 敖宗华 孙志浩 尹光耀

(江南大学生物工程学院生物制药研究室 无锡 214036)

摘要: 对松口蘑深层发酵工艺进行系统研究。通过正交试验初步确定松口蘑适宜的培养基组成: 玉米粉 30g, 葡萄糖 10g, 豆饼粉 10g, 玉米浆 10g, KH_2PO_4 1g, 定容至 1L。适宜发酵条件: 最适生长温度为 25℃, 摇瓶转速为 160 r/min, 最适 pH 为 5.0, 最适接种量为 10%, 装液量 120mL/500mL 摇瓶培养 10d, 菌体生物量达 12.94g/L。

关键词: 松口蘑, 菌丝体, 深层发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0005-05

DEEP FERMENTATION TECHNIQUE OF TRICHOLOMA MATSUTAKE MYCELIUM

LIU Ping TAO Wen-Yi XUE Zheng-Hong AO Zhong-Hua SUN Zhi-Hao

(School of biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The deep fermentation technique of *Tricholoma matsutake* is systemically studied in this paper firstly. The best culture determined by orthogonal test is 3g/L of cornflour, 1g/L of glucose, 1g/L of bean cake flour, 1mL/L of corn steep liquid, 1g/L of KH_2PO_4 . The best fermenting condition is: 25℃, rotating speed 160 r/min, pH5.0, inoculating amount 10%, 120mL culture medium per 500mL flask. Under these conditions, the mycelia reach 12.94g/L after fermenting 12d.

Key words: *Tricholoma matsutake*, Deep fermentation, Process

松口蘑 (*Tricholoma matsutake* Sing.) 又称松茸, 松草, 松蘑, 是一种名贵的食用菌, 日本人称之为“菇中之王”。其菇体肥厚, 香气宜人, 肉质鲜美。具有强身、益肠胃、止痛、理气化痰和驱虫等功效^[1]。其所含多糖类物质对小白鼠肉瘤 S-180 的抑瘤率可达 91%^[2], 从子实体中提取的蛋白质在体外具有杀伤多种癌细胞的作用, 其抑癌 IC_{50} 为 8~14ng/mL, 此抗癌活性在所有天然产物中也是较高的^[3]。但是由于松口蘑是菌根性活体外共生菌, 目前还不能进行人工栽培, 而对半人工栽培的林地树龄也有一定的要求, 为它的栽培带来困难^[4]。另外, 由于近年来松口蘑子实体大部分以较高价格出口到日本, 因而从其子实体中提取其抗肿瘤蛋白质成本较高。本文采用松口蘑菌丝体深层发酵技术, 成功地生产出菌丝体, 为大量生产松口蘑菌丝及其抗肿瘤活性物质打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

松口蘑购自上海农业科学院菌种保藏中心。

1.2 培养基

1.2.1 母种培养基: PDA 综合培养基。从母种试管中切出蚕豆大小的菌丝块接种于斜

收稿日期: 2001-05-21, 修回日期: 2001-09-04

面的中部,于25℃培养10d。

1.2.2 液体种子培养基: 葡萄糖 20g, 蛋白胨 2.5g, 酵母膏 2.5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, VB_1 0.1g, 麸皮浸汁 50g, CMC 0.5g, 定容至 1L, pH 自然。

1.2.3 发酵培养基基本成分: 玉米粉 (A), 玉米粉 + 葡萄糖 (1%) (B), 葡萄糖 (C), 黄豆粉 (D), 玉米浆 (E), 酵母膏 (F), 无机盐 (G)。

1.3 正交试验设计

参照文献[5],以碳源、氮源、无机盐、生长因子为基本因子,每个因子选取3个水平,用 $L_{27}(3^3)$ 正交表设计培养基组合,得到27种培养基,其中碳源因子又分为3种,共得到81种组合培养基。

表1 正交试验设计

序号	玉米粉	黄豆粉	玉米浆	酵母膏	无机盐	序号	玉米粉	黄豆粉	玉米浆	酵母膏	无机盐
1	A1	D1	E1	F1	G1	15	A2	D2	E3	F1	G2
2	A1	D1	E2	F2	G2	16	A2	D3	E1	F3	G2
3	A1	D1	E3	F3	G3	17	A2	D3	E2	F1	G3
4	A1	D2	E1	F2	G3	18	A2	D3	E3	F2	G1
5	A1	D2	E2	F3	G1	19	A3	D1	E1	F1	G1
6	A1	D2	E3	F1	G2	20	A3	D1	E2	F2	G2
7	A1	D3	E1	F3	G2	21	A3	D1	E3	F3	G3
8	A1	D3	E2	F1	G3	22	A3	D2	E1	F2	G3
9	A1	D3	E3	F2	G1	23	A3	D2	E2	F3	G1
10	A2	D1	E1	F1	G1	24	A3	D2	E3	F1	G2
11	A2	D1	E2	F2	G2	25	A3	D3	E1	F3	G2
12	A2	D1	E3	F3	G3	26	A3	D3	E2	F1	G3
13	A2	D2	E1	F2	G3	27	A3	D3	E3	F2	G1
14	A2	D2	E2	F3	G1						

注:各成分添加量如下(g/L): (1) A1=10, A2=20, A3=30; D1=2.5, D2=5, D3=10; E1=0, E2=5, E3=10; F1=0, F2=2.5, F3=5; G1=1 KH_2PO_4 , G2=1 KH_2PO_4 + 0.5 MgSO_4 , G3=1 KH_2PO_4 + 0.5 MgSO_4 + 1 FeSO_4 ; (2) 玉米粉 (A) 可被葡萄糖 + 玉米粉 (B) 或葡萄糖 (C) 代替

按常规方法制备种子菌液,250mL三角瓶装培养基50mL,于25℃,150r/min摇瓶培养7d。

1.4 液体培养条件的确定

采用优化后的培养基,在500mL三角瓶中,按温度20℃、25℃、30℃和35℃,振荡频率80、120、160、200r/min,接种量5%、10%、15%、20%,500mL三角瓶中分别装入40、60、80、100、120、140、160、180、200mL培养基,于pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5的条件下分5组进行试验。

1.5 发酵周期的确定

在优化培养条件下,用500mL三角瓶装上述优化组合的培养基100mL,振荡培养12d,测定不同发酵时间内的菌丝干重、还原糖和pH值,以确定最适发酵周期。

1.6 菌丝干重测定

发酵结束后,将培养液经40目尼龙布过滤,菌丝体经水冲洗数次后,于60℃烘干至恒重,由分析天平称重。

1.7 还原糖

采用DNS法。

2 结果与分析

2.1 优化发酵培养基的确定

81 种组合培养基所得到的松口蘑生长量及分析结果见表 2。经统计学分析得出各因子在不同水平的菌丝体产量见表 3 和图 1。由表 3 可以看出, 以玉米粉加葡萄糖为碳源的 B、D、E、F、G 因子组合, 在 K1、K2、K3 水平, 其菌丝干重皆高于另外 2 组因子组合, 说明碳源种类与菌丝产量之间的关系极为密切。经方差分析发现, 碳源因子和玉米浆是极显著因子, 黄豆粉也是影响菌丝产量的显著因子。从表 3 还可以看出, 获得最大产量的各因子的值分别为 B3、D3、E3、G3, F 对菌丝产量的影响很小, 可以作为误差忽略不计, 因此可推出优化培养基配方为: 玉米粉 3%, 葡萄糖 1%, 豆饼粉 0.5%, 玉米浆 1%, KH_2PO_4 0.1%。此组合在 81 种培养基中未出现, 随后在相同条件下选取 27 号培养基与此培养基做验证试验, 每一配方 3 个重复, 其菌丝干重分别为 $1.15 \pm 0.03\%$, $1.32 \pm 0.15\%$, 说明在可供选择的因子水平中, 该组合是最好的, 此正交试验方法在培养基优化过程中是有效的。

表 2 培养基配方及菌丝产量

序号	玉米粉	玉米粉 + 葡萄糖	葡萄糖	序号	玉米粉	玉米粉 + 葡萄糖	葡萄糖
1	0.365	0.375	0.213	15	1.049	1.1088	0.521
2	0.421	0.5005	0.284	16	0.66	0.8631	0.598
3	0.584	0.6487	0.276	17	0.947	1.1588	0.611
4	0.395	0.5138	0.321	18	0.993	1.0345	0.709
5	0.569	0.6924	0.366	19	1.031	1.1002	0.654
6	0.575	0.6509	0.298	20	0.849	0.9859	0.623
7	0.618	0.654	0.401	21	1.166	1.1625	0.71
8	0.592	0.657	0.423	22	0.753	0.9702	0.733
9	0.842	0.981	0.465	23	0.907	1.0229	0.911
10	0.513	0.6561	0.513	24	0.945	1.1751	0.812
11	0.452	0.4674	0.429	25	0.863	0.9774	0.71
12	0.723	0.8695	0.544	26	0.911	0.9855	0.812
13	0.702	0.762	0.488	27	0.958	1.1922	0.874
14	0.833	0.9101	0.699				

注: 菌丝干重 (g/100mL)

表 3 不同水平试验因子松口蘑菌丝体生长量

水平	试 验 因 子				
	A	D	E	F	G
K1	4.961	6.104	5.9	6.928	7.227
K2	6.872	6.728	6.481	6.365	6.216
K3	8.383	7.384	7.835	6.923	6.773
	B	D	E	F	G
K1	5.672	6.865	6.871	7.967	8.463
K2	7.931	7.906	7.379	7.607	7.183
K3	9.871	8.703	9.224	7.9	7.828
	C	D	E	F	G
K1	3.047	4.246	4.631	4.857	5.226
K2	5.112	5.149	5.158	4.926	4.854
K3	6.839	5.603	5.209	5.215	4.918

注: 菌丝干重 (g/100mL)

由图1看出,各因子对松口蘑菌丝产量影响强度由大到小依次为B(玉米粉3%,葡萄糖2%),E(玉米浆),D(豆饼粉),G(微量元素0.1%KH₂PO₄),F(酵母膏)。

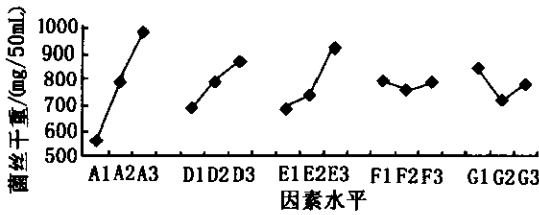


图1 试验因素与指标趋势图

综上所述,初步确定松口蘑适宜培养基组成为:玉米粉30g,葡萄糖20g,豆饼粉10g,玉米浆10g,KH₂PO₄1g,定容至1L。以下摇瓶培养条件试验均用本培养基组成。

2.2 摇瓶发酵条件的优化

2.2.1 培养温度对菌丝生物量的影响:

采用优化后培养基,将已接种摇瓶分别置于20℃、25℃、30℃和35℃下,150r/min振荡培养7d后,测定培养温度对菌丝得率影响,结果发现,松口蘑菌丝在20℃~30℃范围内均能生长。发酵温度低,生长速度慢;温度过高,生长不良,只有在25℃左右菌丝生长最好,因此,25℃左右为松口蘑的最佳培养温度。

2.2.2 摇瓶转速对菌丝生长的影响:将500mL摇瓶分别置于80,120,160,200r/min等不同的摇瓶转速下,培养7d。结果表明,摇瓶转速的大小对松口蘑的菌丝生长有明显影响。一般随着转速的增大,通气量增大,剪切力增大,菌丝球数量增多,有利于菌丝的生长;当转速达到200r/min时,则因剪切力过大,菌丝生长不良,菌丝干重不再随之增加。因此,以160r/min为较适宜的转速。

2.2.3 培养基起始pH值对菌丝生长的影响:分别以5%NaOH和0.2mol/LHCl将培养基调成不同pH值,26℃,150r/min,振荡培养6d后,菌丝体干重结果见表4。

表4 pH值对菌丝生长的影响

起始pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	pH自然
终点pH	3.15	3.25	3.48	3.47	3.46	3.51	3.43
菌丝干重 (mg/100mL)	1162	1185	1256	1077	924	899	1293

表4结果表明,松口蘑在偏酸性的环境中生长较好,菌丝干重高,其最适pH值为4.5~5.0,该pH值与培养基的自然pH5.0相近。

2.2.4 接种量对菌丝生长的影响:在培

培养基中分别接入5%,10%,15%,20%的一级摇瓶液体种子,在25℃,150r/min条件下,培养7d后,测菌丝干重,结果表明,当接种量小于10%时,随着接种量的增大,菌丝得率明显增大;但超过10%以后,接种量对菌丝干收率及多糖产量的影响差异不大;因此,接种量以10%为好。

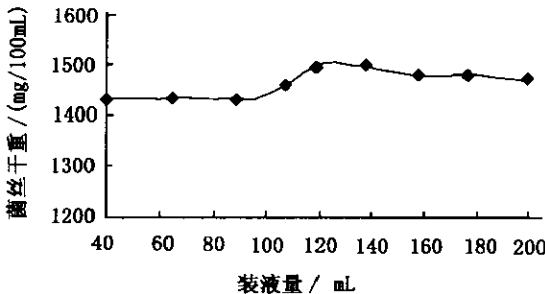


图2 不同装液量对菌丝生长量的影响

2.2.5 摇瓶装量对菌丝生长的影响:

在500mL的摇瓶中装入不同量的培养基,结果见图2。菌丝生长量与装液量呈正相关,随着装液量的增加,菌体生长量逐渐增多,在120mL装液量时达到最大值。在此之后,随着装液量的增加,每100mL菌丝干重稍下降,说明该菌对溶氧有一定的要求,120mL/500mL装液量时较适于菌丝生长。

2.2.6 摇瓶发酵周期试验: 用 500mL 三角瓶装上述优化组合的培养基 100mL, 在 25℃, 160r/min 条件下, 振荡培养 12d, 测定不同发酵时间内的菌丝干重、还原糖和 pH 值, 以确定最适发酵周期, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 在发酵过程中, 随着培养时间的延长, 菌丝量不断增加, 到第 10d 达最大值, 每 100mL 发酵液中菌丝干重为 1.294g, 再继续培养, 则因溶氧量降低, 菌体老化自溶, 导致菌丝得率缓慢下降。还原糖含量在发酵前期显著降低直至第 4d, 在 4~8d 后维持一定的还原糖浓度并缓慢下降, 在 12d 还原糖浓度降到最低水平, 而且碘-碘化钾测定不出淀粉的存在。发酵液 pH 值由初始 4.5 到第 10d 降为 pH3.2, 可能是菌体代谢产生有机酸等物质所致。因此, 发酵周期达 10d, 可结束发酵。根据以上发酵条件的优化, 确定松口蘑菌丝体发酵适宜条件为: 最适生长温度为 25℃, 摇瓶转速为 160 r/min, 最适 pH 为 5.0, 最适接种量为 10%, 装液量 120mL/250mL 摇瓶培养 10d, 菌体生物量达 12.94g/L。

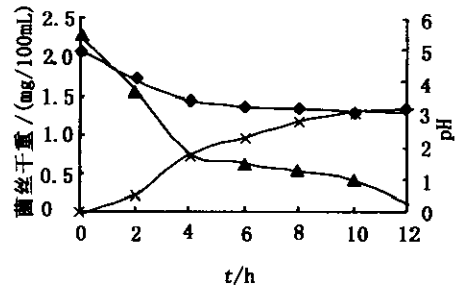


图 3 松口蘑菌丝体摇瓶发酵生长曲线

—▲— 糖含量 / (mg/mL),
× 菌丝干重 / (g/100mL), ◆ pH

3 讨论

由于松茸目前尚不能进行人工栽培, 而其优良的口味及药效又吸引人们的注意力, 因此在 70 至 80 年代人们便开始进行松茸液体培养的研究。池川哲郎 (1980 专利) 利用含葡萄糖和酵母提取物的培养基进行松口蘑 IF06951-6935 的液体培养研究。在 24℃ 好氧状态下培养 5 周, 获得生长良好的菌丝体^[6]。山崎璋 (1998) 认为液体法培养基表面产生大量泡沫致使培养效率低下, 他用含马铃薯淀粉、市售液体尿素及脱脂乳粉制成糊状培养基, 在 10℃~18℃ 振荡培养 3 周, 松口蘑菌丝显著增殖^[7]。芝崎达也 (1989) 用酵母浸膏葡萄糖培养基静置后振荡培养 3 周后获得生长良好的菌丝体培养液^[8]。本文作者在正交试验确定松口蘑适宜的培养基组成和培养条件的前提下, 进行菌丝体发酵实验, 在确定的条件下培养 10d, 菌体生物量达 12.94g/L。

参考文献

- [1] 王伯徽. 食品工业 (台湾), 1991, 23 (1): 42~46.
- [2] 杨新美. 中国食用菌栽培学. 北京: 农业出版社, 1988.155.
- [3] Yukio K, Akihiro M. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 94 80699.
- [4] 谭伟. 食用菌学报, 1994, 1 (1): 53~63.
- [5] 徐继初主编. 生物统计及试验设计. 北京: 农业出版社, 1992.
- [6] 池川哲郎. 制癌物质之制造法. 公开特许公报, 1980-68293.
- [7] 山崎璋. 担子菌-子ノウ菌类之菌丝体培养法. 公开特许公报, 1998.127273.
- [8] 芝崎达也. 担子菌类菌丝集合体之制造方法. 公开特许公报, 1989.196291.