

金针菇菌丝生长的营养需求及液体发酵研究

杜世彧 党阿丽 王凤云

(黑龙江省科学院应用微生物研究所 哈尔滨 150010)

摘要 金针菇菌丝体液体培养表明, 淀粉、玉米粉是适宜的碳源, 黄豆粉、酵母粉、蛋白胨是适宜的氮源。采用正交设计考察了培养基的营养成分及其最适浓度。除碳、氮源外, V_{B1} 及 K、P、Mg、S 等元素也是金针菇菌丝体生长所必需的营养因子。适宜的碳氮比(C/N)为 21~24:1。本研究建立的有实用价值的液体发酵培养基配方是(%): 玉米粉 4.0、葡萄粉 1.0~2.0、黄豆粉 1.5、 KH_2PO_4 0.1~0.15、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05。

关键词 金针菇菌丝体, 碳氮比, 液体发酵培养基, 正交设计

长期以来, 研究者们对金针菇 (*Flammulina velutipes*) 的研究重点放在遗传育种、子实体的形成和高产的生态生理上, 虽然国内相继也有些关于金针菇深层发酵的研究报道^[1,2], 但对其菌丝体的营养需求的研究较少, 特别是对金针菇菌丝体液体培养基中的重要参数——最适碳氮比的研究尚未见报道。本实验室进行了金针菇菌丝体在液体培养时对碳、氮源等营养素的需求及其碳氮比的研究, 进而采用正交设计^[3]对液体发酵培养基配方做了筛选, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

本实验室从搜集和本所保存的 20 株金针菇双核株和 2 株单核株中筛选出适于液体培养的双核菌株 94B2 作为主要试验株。

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基: PDA 斜面培养基用于母

黑龙江省资助项目

1996-03-19收稿

种保藏。

综合马铃薯汁培养基(%)：马铃薯(煮汁) 20, 葡萄糖 2.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 蛋白胨 0.2, VB_1 (硫胺素) 0.001~0.005, 琼脂 2。用于母种活化培养。

1.2.2 液体培养基：不同碳源试验的基础培养基(%)：蛋白胨 0.5, VB_1 0.005, VB_2 (核黄素) 0.0005, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05。按2%分别加各碳源。

不同氮源试验的基础培养基(%)：葡萄糖 4.0, VB_1 0.005, VB_2 0.0005, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05。按每100ml培养液加0.069g氮量的各氮源, pH调至6.0。

碳氮比(C/N)试验的培养基(%)：葡萄糖 4.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源, 变化其在培养基中的含量以构成不同的碳氮比。

液体发酵正交试验培养基：因素和水平见结果。玉米粉、黄豆粉、豆粕粉过50目筛。

1.3 培养方法和培养条件

500ml三角瓶装液50ml; 每瓶接入活化的母种斜面 2cm^2 (在培养基筛选的正交试验中按10%接种量接液体菌种); 培养温度 24°C ; 一般静置培养1d后振荡培养6~7d, 收获菌丝体; 旋转式摇床, 200r/min, 偏心距2.5cm。

1.4 测定与观察

测定菌丝体干重：收取的发酵醪以2500r/min离心或纱网过滤获得菌丝球, $70\sim 80^\circ\text{C}$ 下烘干达恒重, 以每100ml发酵醪中菌丝体干重(g/100ml)计。

测定发酵液pH值, 必要时用斐林氏法测总糖和还原糖含量变化。

观察菌丝球形态和数量; 观察发酵液的颜色、气味、液固相状况及显微镜检查, 剔除污染。

2 结果和讨论

2.1 不同碳源对菌丝生长的影响

12种糖、糖醇类物质对金针菇菌丝体液体培养的结果(表1)表明, 以多糖可溶性淀粉

表1 不同碳源对金针菇菌丝生长的影响

碳源	菌丝干重 (g/100ml)
可溶性淀粉	0.626
糊精	0.525
棉籽糖	0.442
蔗糖	0.338
麦芽糖	0.258
乳糖	0.202
甘露糖	0.314
果糖	0.272
葡萄糖	0.347
木糖	0.238
山梨醇	0.350
甘露醇	0.318
玉米粉	0.551
空白对照(未加碳源)	0.074

最好, 其次是糊精; 乳糖、木糖最差; 其余大部分居中。单糖中以葡萄糖为好, 双糖中以蔗糖

表2 不同氮源对金针菇菌丝生长的影响

氮源	菌丝干重 (g/100ml)
酵母粉	1.014
蛋白胨	0.782
干酪素	0.322
L-甘氨酸	0.316
L-精氨酸	0.260
L-亮氨酸	0.176
L-天冬氨酸	0.302
L-苯丙氨酸	0.204
L-酪氨酸	0.326
L-组氨酸	0.193
L-脯氨酸	0.217
脲	0.255
KNO_3	0.198
NH_4Cl	0.180
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.192
· 钼酸铵	0.119
黄豆粉	1.183
空白对照(未加氮源)	0.173

为好, 叁糖棉籽糖也是较好的碳源。金针菇菌丝体在两种糖醇中也生长良好。菌丝在空白对照中几乎没有继续生长; 在玉米粉(对照)中的生长量与在可溶性淀粉或糊精中相当, 玉米粉可作为金针菇菌丝体液体发酵培养基的廉价易得的碳源。

2.2 不同氮源对菌丝生长的影响

13种有机氮源和4种无机氮源对金针菇菌丝体生长影响的试验结果见表2。所试氮源中以酵母粉最好, 其次是蛋白胨; 在钼酸铵中菌丝生长最差。总的看, 有机氮源优于无机氮源, 有机氮源中含复合氨基酸的氮源显著好于单一氨基酸氮源, 但所用干酪素水溶性差, 其生长促进作用远不如酵母粉和蛋白胨。比较各单一氨基酸的生长作用, 相差不大。无机氮源

KNO_3 、 NH_4Cl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 生长作用相近, 菌丝在钼酸铵中生长受到抑制。菌丝在没加氮源的空白对照中生长微弱, 在黄豆粉对照中生长得十分好, 生长量与在酵母粉中相当, 黄豆粉或豆粕粉可作为金针菇菌丝体液体培养基的廉价易得的氮源。

2.3 培养基中的碳氮比(C/N)

以4%葡萄糖作碳源, 不同含量的硫酸铵作氮源构成不同C/N系列及其金针菇菌丝生长的生物量见表3。不同的碳氮比对菌丝生长的支持程度有显著差别, 呈现出近似正态分布。液体培养基较适宜的碳氮比范围在17~24:1, 适宜的碳氮比在21(~24):1, 同一般所说多数食用菌最适碳氮比在20左右相接近。

2.4 C/N、 V_{B1} 、无机盐的正交试验

表3 不同C/N对金针菇菌丝生长的影响

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
葡萄糖 (g/50ml)	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
$(NH_4)_2SO_4$ (g/50ml)	0	0.080	0.100	0.125	0.143	0.167	0.200	0.250	0.333	0.500	1.000
C/N		42.7	34.8	27.4	24.3	20.8	17.3	13.8	10.3	6.9	3.4
菌丝干重(g/100ml)	0.523	0.862	0.818	0.834	1.340	1.892	1.213	0.865	0.862	0.877	0.761

表4 C/N、 V_{B1} 、无机盐对金针菇菌丝生长的影响

因素	V_{B1}			$MgSO_4$			KH_2PO_4			$(NH_4)_2SO_4$		
	0	0.001	0.005	0	0.05	0.1	0	0.1	0.15	0.3	0.35	0.4
水平 (%)	0	0.001	0.005	0	0.05	0.1	0	0.1	0.15	0.3	0.35	0.4
菌丝干重 (g/100ml)	1.230	1.310	1.475	1.288	1.404	1.324	0.880	1.308	1.829	1.462	1.257	1.297
R值		0.245			0.116			0.949		0.205		

表5 筛选液体发酵培养基的正交试验及结果

因素	玉米粉			葡萄糖			豆粕粉			酵母粉		
	2.0	3.0	4.0	0	1.0	2.0	0.5	1.0	1.5	0	0.2	0.4
水平 (%)	2.0	3.0	4.0	0	1.0	2.0	0.5	1.0	1.5	0	0.2	0.4
菌丝干重 (g/100ml)	2.330	3.097	3.341	2.649	2.866	3.252	2.684	2.848	3.235	2.922	2.922	2.923
R值	1.011			0.603			0.551			0.001		

采用正交表 $L_9(3^4)$ 考察主要的无机盐(K、P、Mg、S等元素)和主要生长刺激因子 V_{B1} 对金针菇菌丝生长的影响, 同时对简单对比法所得的最适碳氮比进行验证。此正交设计列出四个变化因素: V_{B1} 、 $MgSO_4$ 、 KH_2PO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ (固定葡萄糖在4%)。因素的水平 and 结果见表4。

从R值上看, KH_2PO_4 影响显著, 其次是 V_{B1} 。观察各因素的水平的影响表明, 缺少 KH_2PO_4 和 / 或 V_{B1} 的配方组之菌丝干重小; 培养基中 KH_2PO_4 适宜含量为0.15%, 小于此浓度则菌丝生长量减少, 说明K、P是金针菇菌丝生长的必需元素; V_{B1} 也是金针菇菌丝生长

所必需的生长因子, 其适宜浓度至少在0.005%; $MgSO_4$ 适宜浓度在0.05%左右。此正交试验再次证明了表3中的简单对比试验的结果, 即葡萄糖4%、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%时有利于金针菇菌丝充分生长, C/N在23左右。

2.5 液体发酵培养基的筛选

采用正交表 $L_9(3^4)$ 筛选液体发酵培养基, 固定 KH_2PO_4 0.15% 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% 两种成分, 考察的因素、水平及结果见表5。测取菌丝产量和菌丝球数作为指标。R值分析表明, 影响菌丝产量的主要因素是玉米粉, 是金针菇菌丝体生长所需营养物的主要来源。玉米粉在4.0%、葡萄糖在2.0%、豆粕粉在1.5%水平时菌丝产量最高, 而酵母粉没显示任何影响, 说明有玉米粉和豆粕粉存在时可不用酵母粉。影响菌丝球形成的主要成分是玉米粉和豆粕粉, 两者除与构成适宜的碳氮比有关外, 也提高了培养液的粘度。粘度(粘性拉力)达到一定程度才易导致菌丝球的形成和使菌丝球变小, 这与其他人的报道是一致的。

为考察培养基中三个主要成分(玉米粉、葡萄糖、黄豆粉)之间的交互作用, 选用交互正交表 $L_8(2^7)$ (表略)。方差分析表明, 这三个因子的影响都是显著性的(F值), 依次为玉米粉、黄豆

粉、葡萄糖; 显示菌丝产量高的水平同表5中的结果完全一致。而三个交互列的数据展示出三个因子中任何二者之间的交互作用都无显著性。从生物转化效率分析看(数据未列入), 葡萄糖在1.0%时高于在2.0%时的转化效率, 而玉米粉和黄豆粉两因素的转化效率与菌丝产量指标相一致。综上分析确定液体发酵培养基配方为: 玉米粉4.0%、葡萄糖1.0~2.0%、黄豆粉1.5%、 KH_2PO_4 0.15%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%。参照Castro等对碳氮比的计算方法^[4], 此配方中的碳氮比在21~24:1, 与表3、表4中所观测的最适碳氮比结果是一致的。如此配方的培养基在进一步的5000ml摇瓶深层发酵试验得到很好地验证, 一般菌丝产量都在3.0g(干重)/100ml发酵液, 高达47.5g(湿重)/100ml发酵液; 且产生可观的胞外多糖174.7mg(多糖干粉)/100ml上清液。深层发酵工艺研究详见另文。

参 考 文 献

- [1] 宋士良, 杨瑞长. 食品与发酵工业, 1992, 6: 8~14.
- [2] 方海洲, 梁世中. 生物工程学报, 1993, 9(4): 379~382.
- [3] 杜世璋, 卢东升, 朴相浩. 中华微生物学和免疫学杂志, 1982, 2(2): 105~110.
- [4] 金建康译. 国外食用菌, 1992, 2: 15~16.

NUTRITIONAL REQUIREMENTS AND A SUBMERGED CULTURE MEDIUM FOR THE MYCELIAL GROWTH OF *FLAMMULINA VELUTIPES*

Du Shiyu Dang Ali Wang Fengyun

(Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010)

Abstract Submerged mycelial culture of *Flammulina velutipes* showed that starch, corn flour were the adequate carbon sources, and yeast powder, soya flour and peptone were the adequate nitrogen sources. Nutritional ingredients and their adequate concentrations in medium were investigated by orthogonal devices. VB1 and the elements K, P, Mg, S also were essential additives, in addition to carbon and nitrogen sources, for the mycelial growth. The adequate C:N ratio in medium was 21~24:1. This work developed the effective submerged culture medium (%): corn flour 4.0, glucose 1.0~2.0, soya flour 1.5, KH_2PO_4 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05.

Key words *Flammulina velutipes* mycelium, C:N ratio, Submerged culture medium, Orthogonal devices