

## 不同搅拌速度对松口蘑菌丝体发酵的影响\*

魏元青 许正宏 许泓瑜 张宏斌 陶文沂

(江南大学生物工程学院, 无锡, 214036)

**摘 要** 在摇瓶发酵条件优化的基础上, 研究了松口蘑在 25 L 搅拌式发酵罐上的分批放大实验, 探讨了不同搅拌转速对菌丝生物量、生产强度、pH、溶氧及对菌丝形态的影响, 在发酵温度 25℃, 通风量 0.8vvm, 罐压 0.5kg/cm<sup>2</sup> 的条件下, 最佳搅拌转速为 100r/min。发酵培养 8 d 后, 发酵液由浑浊变为澄清, 上清液亮黄色, 菌丝形态呈均匀颗粒状, 菌丝生物量增加趋于平缓, 最高可达 11.5 g/L。

**关键词** 松口蘑, 深层发酵, 搅拌转速

松口蘑 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et imai) Sing.] 又名松茸, 属于担子菌纲 (Basidiomycetes)、伞菌目 (Agaricales)、口蘑科 (*Tricholomataceae*)、口蘑属 (*Tricholoma*), 是与松树共生的一种外生菌根真菌, 其味道鲜美, 香气浓郁, 具有药用价值, 研究表明其具有强身健脾、理气化痰的作用<sup>[1]</sup>。其热水浸提物能够抑制小白鼠肉瘤 180 和艾氏腹水癌的增殖等<sup>[2]</sup>, 是一种极有开发价值的药用菌。但由于松口蘑是菌根菌, 菌种的分离和培养都十分困难, 产量非常少。迄今为止, 松茸子实体的驯化栽培主要还是以半人工栽培为主, 方法主要有松茸发生林地清理法、松茸林地新菌床造成法、广岛隧道式松茸栽培法及松茸发生林地更新法<sup>[3]</sup>。近 20 多年来, 人们在培养基配方、组织分离材料、培养条件方面也进行了许多研究<sup>[4~6]</sup>。本文刘萍等人<sup>[7]</sup>的摇瓶发酵研究的基础上, 在发酵罐上对不同的转速进行实验, 以考察它对松口蘑发酵的影响, 对松口蘑的工业放大生产提供有力依据。

## 1 材料和仪器设备

### 1.1 供试菌种

松口蘑 (*Tricholoma matsutake* Sing.) 本实验室保藏。

### 1.2 主要仪器设备

LS-B50 型立式圆形压力蒸汽灭菌锅 (上海医用核子仪器厂), HYG-11 型转式恒温调速摇瓶柜 (上海新星自动化控制设备厂), 25 L 搅拌式发酵罐 (镇江东方生物工程设备有限公司), 生化培养箱 (广东省医疗器械厂), 721 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

第一作者: 博士研究生。

\* 江苏省无锡市自然科学基金资助课题 (No. CK030002)

收稿日期: 2005-03-03

## 1.3 培养基

参考刘萍等人优化的培养基<sup>[7]</sup>。

试管斜面为改良 PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 酵母膏 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 琼脂 20 g, 水定容至 1 L, pH 自然。

种子培养基: 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, 麸皮浸汁 5% (麸皮浸汁煮沸 30 min 8 层纱布过滤), CMC 0.05%, pH 自然。

发酵培养基: 玉米粉 3%, 葡萄糖 1%, 豆饼粉 1%, 酵母膏 1%, 玉米浆 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, pH 自然。

## 2 方 法

### 2.1 液态种子培养基配制

见文献<sup>[4]</sup>方法。

### 2.2 25 L 发酵罐培养

在 25 L 发酵罐中装液量 60%, 接种量 10%, 在温度 25℃, 通风量 0.8 vvm, pH 自然的条件下, 分别调节 60、100、140、160 r/min 4 种转速, 测定菌丝生物量, 绘制发酵过程曲线。

### 2.3 还原糖的测定

DNS 法<sup>[8]</sup>。

### 2.4 菌丝生物量的测定

将培养液经 4 层纱布过滤, 菌丝体经水冲洗数次后, 于 105℃ 烘干至恒重, 分析天平称重。

## 3 实验结果

### 3.1 不同搅拌速度对松口蘑生长的影响

松口蘑属于真菌门担子菌纲, 液体培养中以菌丝尖端不断向前蔓延的方式进行生长, 在通气搅拌的条件下, 菌丝体卷曲成团成为菌丝球, 要提高生长速率,

发酵初期菌丝球要体积小、数量多,以提高菌丝生长点。实验中发现,松口蘑菌丝体在搅拌过程中被剪切成小颗粒,成为新的生长点,当菌球较大后,菌球比生长速率会下降,其菌丝生物量增加缓慢。提高搅拌转速有利于增加菌丝新的增长点和溶氧效果。但由于松口蘑对剪切敏感,过高的搅拌转速使菌丝断裂成碎片,细胞破裂,菌丝难以生长,搅拌转速不宜过高,因此本文主要在发酵罐上对不同的转速进行实验,以考察它对松口蘑发酵的影响。在2.2的实验条件下,考察4种转速对松口蘑发酵过程中体系相对溶氧的变化情况、对菌体生长影响、发酵液中还原糖消耗及pH的变化,结果如图1~图5。

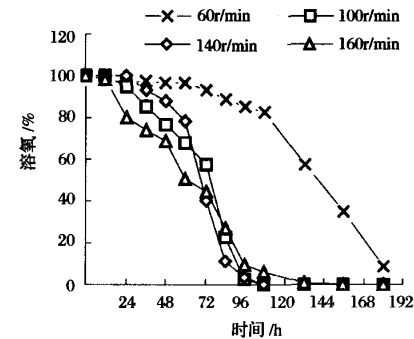


图1 不同转速对相对溶氧的影响

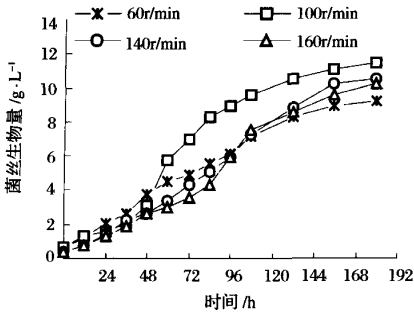


图2 不同转速对菌丝生物量的影响

从图1中可以看出,溶氧的消耗规律基本相似,在快速生长期溶氧下降迅速,表明此时细胞的摄氧速率明显高于发酵液中的供氧速率。随后一段时间内溶氧下降平稳,到发酵的第8天,从图2的菌丝生物量曲线可以看到,发酵菌丝已由迅速生长期进入稳定期,此时发酵液中的生物量达到了最大,维持菌体的新陈代谢仍需要大量溶解氧,所以此时溶氧基本为零,这表明松口蘑对溶氧有一定的要求,仍存在通过提高通风量来提高产量的潜力。

由图2可以看出,控制不同的搅拌转速对松口蘑

菌体的生长有较大的影响,并非搅拌速度越大越好,而是存在着一个最佳搅拌速度。实验发现,当转速为100 r/min时,此时的菌体生长速度最快,菌体生物量最大为11.5 g/L。结合图1相对溶氧曲线可以看到,当转速为60 r/min时,发酵前期由于菌丝生长速度缓慢,溶氧的下降曲线也随之平缓,而当转速为100 r/min和160 r/min时,前期菌丝生长较为迅速,因此溶氧也急剧下降。在发酵的后期,菌丝生物量均有一定的积累,溶氧也都下降较快。

发酵过程中培养液的pH和还原糖是微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标,是重要的发酵参数。由图3可以看出,pH变化总体趋势是逐渐降低,前48 h有微弱的下降,进入快速生长期,菌体大量消耗营养产生酸类物质,pH也快速下降。

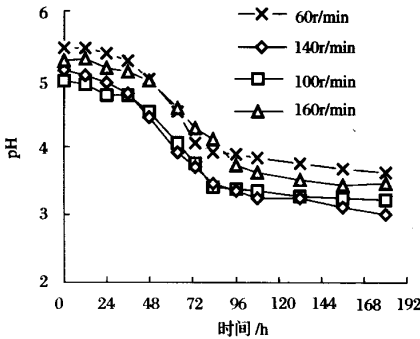


图3 搅拌转速对pH的影响

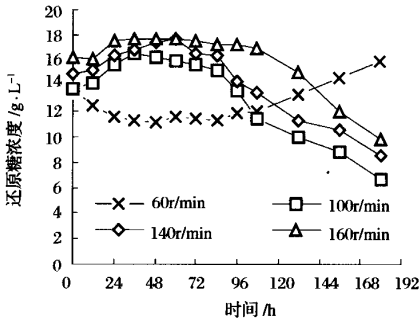


图4 搅拌转速对还原糖消耗的影响

由图4可以看出在发酵过程中,由于培养基中的玉米淀粉被菌体产生的淀粉酶系降解,增加了发酵液中还原糖含量,水解成的还原糖多于消耗的还原糖,故发酵前期还原糖量是逐渐增加的,并保持相对稳定,随着菌体快速生长,在发酵中后期,菌丝体生物量的大量增加和淀粉原料的消耗,还原糖迅速下降。但在60 r/min发酵前期还原糖并没有上升反而下降,这可能是因为松口蘑菌体前期生长缓慢,分泌的水解

酶类少,随着培养时间的延长,菌丝体逐渐生长积累,菌体分泌的淀粉酶水解玉米淀粉,而菌体生长依然较缓慢,没有充分利用水解的还原糖而导致大量积累。

### 3.2 搅拌转速对松口蘑菌体形态的影响

实验中发现搅拌转速对松口蘑菌体的生长形态有较大的影响,观测结果如表 1。

表 1 搅拌转速对松口蘑菌体形态的影响

搅拌转速/ $r \cdot \min^{-1}$	60	100	140	160
菌球直径/mm	3.2	2.0	1.3	1.1
丝状体比例	+	+	++	+++
形态	紧密, 小球状	较紧密, 小球状	松散	疏松, 絮状

由表 1 可以看出低搅拌转速下菌球直径较大,紧密,随着转速的提高,菌球直径减小并趋于松散;同时随着转速的提高,丝状体所占比例增大。当松口蘑以较小菌球方式生长时,最有利于提高目标物产量,而当松口蘑以丝状体方式生长时则会引出发酵前期的粘度较大,不利于营养物质和氧的溶解、传递与均匀分布,从而降低产量;同时也使发酵液的后处理较为困难。因此在松口蘑的发酵生产中,必须确定有效的搅拌速度,有效的搅拌速度应能够提高发酵液中的溶氧水平,均匀混合发酵液;还应能够打断菌丝(同时不断断裂严重),使之成为新的菌球的生长核心,本研究认为 100 r/min 是较好的搅拌转速。

## 4 讨 论

从图 1 和图 2 可知,搅拌转速对松口蘑生长是一个非常重要的影响因素,实验发现转速为 100r/min 菌丝生长最好,高于或地低于此转速均不理想,结合实验分析其原因可能是:①过高的搅拌转速使发酵液中菌丝生长点过多,使得菌体的生长趋向以丝状体为

主,发酵前期的粘度较大,限制了营养物质和氧的传递。②过高的剪切会使菌丝断裂严重,不利于菌体的正常生长。③当搅拌转速较低时则又会因为混合和剪切作用的不足,溶氧低,限制了松口蘑菌体的生长。

由于松口蘑是以菌丝体方式生长,生长速度相对较慢,发酵周期较长,因此在发酵过程中,特别要注意防止染菌。

在实验中发现,当发酵到后期,从第 5 天开始,溶氧几乎为零,而松口蘑的生长对溶氧有一定的需求,因此存在增大通风量来提高生产的潜力。

通过不同搅拌转速实验,结合前人的真菌发酵经验,得到松口蘑 25 L 发酵罐的条件为:装液量 60%,发酵温度 25℃,通风量 0.8 vvm,搅拌转速 100 r/min,罐压 0.5 kg/cm<sup>2</sup> 的条件下,发酵培养 8 d,发酵液由浑浊变为澄清,上清液亮黄色,菌丝生物量增加趋于平缓,最高可达 11.5 g/L。

## 参 考 文 献

- 1 周选围. 松茸资源研究概况[J]. 食用菌学报,2002 (1): 50~65
- 2 吕居娴,李映丽,李小洪,等. 具有抗肿瘤活性的真菌(续)[J]. 西北药学杂志,1995(6):269~275
- 3 潭伟. 松口蘑栽培理论及方法[J]. 食用菌学报,1994 (1):53~63
- 4 Ohta Akira. Basidiospore germination of *Tricholoma matsutake*. I. Effects of organic acids on swelling and germination of basidiospores[J]. Trans Mycol Soc, 1986 (2):167~173
- 5 Ohta Akira. A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi[J]. Trans Mycol Soc,1990 (3):323~334
- 6 Shibazaki Tatsuya, Wakayama Yoshio, Sekino Yoshihiro. Cultivation of matsutake mushroom[P]. JP:01196291, 1989
- 7 刘萍,陶文沂,许正宏,等. 松口蘑深层发酵工艺的研究[J]. 微生物学通报,2002(5):5~9
- 8 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994

## Study on Submerged Culture of *Tricholoma Matsutake*

Wei Yuanqing Xu Zhenghong Xu hongyu Zhang Hongbin Tao Wenyi

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

**ABSTRACT** On the basis of flask fermentation of *Tricholoma Matsutake*, it was cultured by 25 L-fermentor. The biomass of mycelium, dissolved oxygen, pH and the shape of mycelium were studied on the influence of different rotors. The experimental results showed that the best rotating speed was 100 r/min when the temperature was 25℃, the volume ratio of flow air was 0.8vvm and the pressure was 0.5 kg/cm<sup>2</sup>. After 8 days, the broth was transparent and yellow, the mycelium was round pellet, the biomass of mycelium reached the highest lever which was 11.5g/L.

**Key words** *Tricholoma Matsutake*, submerged culture, rotating speed