

皱柄白马鞍菌液体摇瓶培养条件优化^{*}

王俊明^a, 胡景江^a, 武杭菊^a, 曹支敏^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 通过摇瓶液体培养试验, 对皱柄白马鞍菌液体深层培养中培养基成分、pH 值、装液量及摇床转速、培养时间等对菌丝体生长的影响进行了对比研究。结果表明, 适宜的培养条件为: 培养基含小麦粉 20 g/L、硫酸氨 2 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.46 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L, 最适 pH 5.5~6.5, 装液量 300~400 mL/L, 接种量 5 mL 培养菌液, 温度 26~28℃; 摇床转速 100 r/min, 培养时间 7 d。适宜条件下最大菌丝生物量可达 5.867 g/L。

[关键词] 皱柄白马鞍菌; 液体摇瓶培养; 菌丝体; 生物量

[中图分类号] S646.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0223-04

Optimization of liquid submerged culture conditions for the mycelial growth of *Helvella crispa* Fr

WANG Junming^a, HU Jing-jiang^a, WU Hang-ju^a, CAO Zhimin^b

(a College of Life Sciences, b College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The culture conditions of *Helvella crispa* Fr. in shake flask liquid culture were investigated in the experiment. Results showed that the optimal medium of liquid submerged culture was as follows: wheat flour 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 0.46 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L; when the medium capacity was 300~400 mL/L, and the seed (about 5 mL) was inoculated, the shake flask culture experiment was carried out at 26~28℃, pH 5.5~6.5 in a shake incubator with a rotation rate 100 r/min for 7 days. The maximum mycelial biomass was as high as 5.867 g/L.

Key words: *Helvella crispa* Fr.; liquid submerged culture; mycelium; biomass

液体培养是食用菌培养的一种, 即将菌种培养在发酵罐或圆锥瓶内, 通过不断通气搅拌或振荡, 使菌体在液体营养液中繁育的方法。液体培养能在短期内获得大量的菌体和代谢物, 不仅可生产液体菌种用于栽培食用菌子实体, 而且还可以直接用于医药和食品工业上生产药品、调味品、饮料等^[1-3], 是近代大规模生产微生物产品的基本方法^[4]。采用液体培养生产的食用菌菌丝体, 其营养成分(蛋白质、氨基酸、维生素等)含量类似于子实体, 有的甚至超过人工栽培的子实体^[5-6]。

皱柄白马鞍菌属于子囊亚门(A scomyzcotina)、盘菌纲(D iscomycetes)、盘菌目(Pezizales)、马鞍菌科(Helvellaceae)、马鞍菌属(*Helvella*)^[7]。《中国真菌总汇》共记载了 18 种马鞍菌, 其中皱柄白马鞍菌是最常见的唯一可食用的马鞍菌。该菌在我国分布较广, 目前还没有马鞍菌人工驯化栽培的报道, 且传统的固体栽培周期长, 占地面积大, 又受季节和原料的限制, 使其不能得到充分利用。本试验对皱柄白马鞍菌液体摇瓶培养条件进行了探索, 以为开发利用马鞍菌提供科学依据。

* [收稿日期] 2006-02-14

[基金项目] 教育部优秀博士论文基金资助项目(200057)

[作者简介] 王俊明(1979-), 男, 山西朔州人, 在读博士, 主要从事植物生态生理研究。

[通讯作者] 胡景江(1957-), 男, 陕西定边人, 教授, 主要从事植物及微生物生理研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 皱柄白马鞍菌(*Helvella crispa* Fr.)菌种,由采自秦岭火地塘的皱柄白马鞍菌子实体分离获得。

1.1.2 培养基 (1)固体培养基。内含葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, V_{B_1} 微量, 琼脂 18 g/L, pH 5.5。(2)种子培养基 I (蔡氏培养基)。内含葡萄糖 30 g/L, $NaNO_3$ 3 g/L, KCl 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, pH 5.5。(3)种子培养基 II (基础培养基)。含蛋白胨 2 g/L, 葡萄糖 20 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.46 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, pH 5.5。(4)碳源供试培养基。含去碳源基础培养基+不同供试碳源 20 g/L, 碳源包括葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、小麦粉、玉米粉、山梨醇。以无碳源为对照^[8-9]。(5)氮源供试培养基。含去氮源基础培养基+不同供试氮源 2 g/L, 氮源包括蛋白胨、酵母粉、尿素、谷氨酸、牛肉膏、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 KNO_3 。以无氮源为对照^[8-9]。(6)发酵培养基。以种子培养基为基础培养基,通过培养基成分对菌丝体生物量影响的试验优化培养基,依次筛选较好的碳源、氮源及培养基的初始 pH,用于优化培养条件。

上述培养基按要求分装后在 0.101 3 MPa、121 条件下高压蒸汽灭菌 25 min。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 (1)固体平板菌种培养。将供试菌株接种于固体培养基,26 培养 15 d 后备用。(2)摇瓶种子培养。用打孔器于无菌条件下打取平板上培养 15 d 的菌丝体 5 块(直径 0.5 cm),接种于装有 100 mL 种子培养基 I 的 250 mL 摇瓶中,置恒温振荡器中(26 , 110 r/min)培养 10 d;取培养菌液 5 mL 再次接种于装有 100 mL 种子培养基 II 的 250 mL 摇瓶中,恒温振荡器中(26 , 110 r/min)培养 7 d^[10]。(3)摇瓶液体培养。在 250 mL 摇瓶中分别装 30, 50, 75, 100 和 125 mL 基础培养基,接种在种子培养基 II 中培养 7 d 的菌液 5 mL,置 26 恒温振荡器中分别于 50, 100 和 150 r/min 培养 7 d,并依次优化装液量及摇床转速,每次优化后的结果进入随后的条件优化试验。

1.2.2 不同碳源对菌丝体生物量的影响 将基础培养基中的碳源分别换成 20 g/L 的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、小麦粉、玉米粉或山梨醇 8 种碳源,以无碳源为对照,用 250 mL 三角瓶装液 100 mL,接入 5 mL 液体种子,pH 为 5.5,在 26 、 110 r/min 摇床振荡培养 7 d,测定菌丝体生物量。

1.2.3 不同氮源对菌丝体生物量的影响 将基础培养基中的氮源分别换成 2 g/L 的蛋白胨、酵母粉、尿素、谷氨酸、牛肉膏、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 或 KNO_3 8 种氮源,以无氮源为对照,培养条件和测定方法同 1.2.2。

1.2.4 不同 pH 及装液量对菌丝体生物量的影响 以 pH 梯度供试培养基^[11-12]为基础培养基(碳、氮源分别为小麦粉和 $(NH_4)_2SO_4$),装液量分别为 200, 300, 400 和 500 mL/L,用 1 mol HCl 和 1 mol NaOH 调节 pH 至 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0 和 11.0,接种液体种子 5 mL (10 d 菌龄),于 26 、 110 r/min 摇瓶振荡培养 7 d,收集菌丝体,测定菌丝体生物量。

1.2.5 培养时间及装液量对菌丝体生物量的影响 pH 为 5.5,其他培养条件同 1.2.4,测定皱柄白马鞍菌在整个液体培养过程(2~ 11 d)中菌丝体生物量的变化。

1.2.6 装液量及摇床转速对菌丝体生物量的影响 装液量为每 250 mL 摇瓶分别装 30, 50, 75, 100 和 125 mL 基础培养基,摇床转速分别设定为 50, 100 和 150 r/min,其他培养条件同 1.2.5,然后分别测定装液量和摇床转速对菌丝体生物量的影响^[13]。

1.2.7 菌丝体生物量的测定^[12] 过滤后的菌丝体经蒸馏水冲洗数次后,于 60 干燥至恒重,用分析天平称其质量。

1.2.8 酸碱度测定 用 PHS-3C 精密 pH 计检测。

2 结果与分析

2.1 碳源对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

碳源是影响皱柄白马鞍菌菌丝生长的重要因素,以种子培养基 II 为基础,依次测定不同供试碳源对菌丝体生物量的影响,结果见表 1。由表 1 可以看出,菌丝体生物量较高的碳源有小麦粉、麦芽糖和淀粉,其中以小麦粉作碳源,其菌丝体生物量可达到 5.21 g/L。而无碳源时,菌丝体的生物量仅为 0.77 g/L。

2.2 氮源对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

从表 1 可以看出,当氮源为蛋白胨、谷氨酸

(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 时, 菌丝体都可以较好生长, 其中以谷氨酸为氮源菌丝体生物量最大, 可达 5.33 g/L; (NH₄)₂SO₄ 次之, 为 4.84 g/L。从培养基的成

本及生产实用角度考虑, (NH₄)₂SO₄ 是理想的氮源。无氮源时, 菌丝体生物量仅为 1.12 g/L。

表 1 碳源和氮源对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

Table 1 Effect of carbon and nitrogen sources on the myceliai biomass of <i>H. elvella crista</i> Fr				g/L
碳源 Carbon sources	菌丝体生物量 Mycelial biomass	氮源 Nitrogen sources	菌丝体生物量 Mycelial biomass	
葡萄糖 Glucose	2.98	蛋白胨 Protein peptone	4.06	
蔗糖 Sucrosum	2.23	酵母粉 Yeast powder	2.67	
麦芽糖 Maltobiose	5.20	尿素 Carbamide	3.96	
果糖 Fructose	1.10	谷氨酸 Glutamate	5.33	
淀粉 Starch	4.45	牛肉膏 Beef extract	2.14	
山梨醇 Glucitol	2.62	NH ₄ NO ₃	2.62	
小麦粉 Wheat flour	5.21	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.84	
玉米粉 Matze flour	2.21	KNO ₃	4.24	
无碳源 Non-carbon	0.77	无氮源 Non-nitrogen	1.12	

2.3 pH 值及装液量对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

由表 2 可见, 皱柄白马鞍菌在液体培养过程中, 菌丝体在 pH 为 4.0~8.0 时均能生长, 其生长最适

pH 为 6.0, 且在 pH 为 5.5~6.5 时均表现出良好的生长态势。另外, 相同 pH 下不同装液量的菌丝体生物量也存在差异, 这说明装液量可能是通过影响氧气供应来影响菌丝体代谢, 由此影响 pH 值。

表 2 不同 pH 值及装液量对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

Table 2 Effect of pH and medium capacity on the myceliai biomass of <i>H. elvella crista</i> Fr													g/L
装液量/ (mL · L ⁻¹) Medium capacity	pH												
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	10.0	11.0
200	2.85	3.48	4.54	5.23	5.47	5.41	4.76	4.01	3.20	2.06	1.81	1.09	0.78
300	3.05	3.78	4.94	5.53	5.79	5.50	4.82	4.21	3.10	2.16	1.71	1.02	0.73
400	3.05	3.68	4.89	5.56	5.72	5.31	4.76	4.11	2.96	2.12	2.11	1.04	0.74
500	2.95	3.28	4.04	4.83	5.07	5.01	3.76	3.21	2.20	1.56	1.11	0.89	0.58

2.4 培养时间及装液量对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

由表 3 可知, 不同装液量摇瓶中菌丝体的生物量表现出了相同的变化趋势, 即培养 1~7 d 时菌丝

体生物量急速增长, 到第 7 天时几乎接近最大值, 8~10 d 时保持相对稳定(或缓慢增加), 到第 11 天时有所降低。从菌丝体的生物量和培养周期考虑, 合理的培养时间应为 7 d。

表 3 不同培养时间及装液量对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

Table 3 Effect of culture time and medium capacity on the myceliai biomass of <i>H. elvella crista</i> Fr											g/L
装液量/(mL · L ⁻¹) Medium capacity	培养时间/d Culture time										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
200	1.24	2.21	3.36	4.68	5.42	5.47	5.49	5.49	5.46	5.23	
300	1.23	2.32	3.53	4.79	5.31	5.79	5.82	5.83	5.83	5.73	
400	1.25	2.29	3.56	4.82	5.37	5.72	5.74	5.74	5.74	5.70	
500	1.21	2.04	3.13	4.07	5.01	5.07	5.08	5.07	5.06	4.98	

2.5 装液量和摇床转速对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

由表 4 可见, 装液量和转速均会不同程度影响

皱柄白马鞍菌菌丝体的生长。在 100 r/min 转速下, 装液量为 300 mL/L 时, 菌丝体生物量最高, 达 5.867 g/L; 装液量为 400 mL 次之, 为 5.700 g/L。

为了提高摇瓶的利用率,一般液体培养的装料系数应在 50%~70%,因此装液量应在 300~400 mL/L。当摇床转速设置在 100 r/min 时,各个装液量的菌丝体生物量均明显高于其他转速。综上所述并结合生产实际,摇瓶的装液量应设定为 300~400 mL/L,而摇床转速应设定为 100 r/min 左右。

表 4 摇瓶装液量及摇床转速对皱柄白马鞍菌菌丝体生物量的影响

Table 4 Effect of medium capacity and rotation rate on the mycelial biomass of *H. elvella crispa* Fr. g/L

装液量/ (mL · L ⁻¹) Medium capacity	摇床转速/(r · min ⁻¹) Rotation rate		
	50	100	150
120	4 400	5 000	3 923
200	4 180	5 260	3 467
300	3 520	5 867	3 300
400	2 980	5 700	3 500
500	1 680	5 312	2 720

2.6 不同装液量及转速下培养液的终止 pH

在液体培养过程中,菌丝体生长对营养成分的吸收利用和转化,以及相关代谢产物的释放,都会使培养基的 pH 值发生变化。从表 5 可以看出,在不同装液量及不同转速的液体深层培养过程中,pH 值均随装液量的增加而减小。这表明在供氧量降低的条件下,菌丝体的代谢会导致培养液 pH 值降低。因此在皱柄白马鞍菌液体深层培养过程中,如以菌丝体为培养目的,则应适当调控培养液的 pH 值。

表 5 不同装液量及不同转速下培养液的终止 pH

Table 5 The final pH of submerged culture on the different medium capacity and different rotation rate

装液量/ (mL · L ⁻¹) Medium capacity	摇床转速/(r · min ⁻¹) Rotation rate		
	50	100	150
120	4.82	5.26	4.84
200	4.81	5.24	4.80
300	4.73	5.02	4.72
400	4.47	4.81	4.70
500	4.19	4.58	4.71

3 结论与讨论

在皱柄白马鞍菌液体深层培养过程中,适宜的碳源有小麦粉、麦芽糖和淀粉,氮源有谷氨酸、硫酸铵、硝酸钾和蛋白胨等,从生产成本以及菌丝的生长量综合考虑认为,最适的碳、氮源应为小麦粉和硫酸氨。通过摇瓶液体培养试验,确定皱柄白马鞍菌适宜的培养基内含小麦粉 20 g/L,硫酸氨 2 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.46 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L。

在摇瓶液体培养过程中,pH 值、装液量和摇床

转速等对皱柄白马鞍菌的菌丝体生物量都有明显影响。本试验结果表明,皱柄白马鞍菌在 pH 为 5.5~6.5 时均表现出良好的生长势态,最适 pH 值为 6.0。但培养液的 pH 值随着菌丝体的生长和代谢发生改变,同时装液量和摇床转速也会影响 pH 值,因此,在以菌丝体生物量为目标的液体培养过程中,应适当控制培养液的 pH 值。本研究的最适碳源及 pH 值变化与已有的报道^[11,13]存在一定差异,这可能与皱柄白马鞍菌自身的代谢特点有关,有待进一步研究。

装液量和摇床转速是影响液体深层培养中供氧状况的主要因素,从本试验结果可以看出,随着装液量增加,菌丝体的生物量呈降低趋势,而且在低转速(50 r/min)条件下生物量的降低极为显著,这表明皱柄白马鞍菌菌丝体的生长需要相对充足的供氧量。摇床转速过低会影响培养液的供氧状况,而过高则会影响菌丝体的生长。从摇瓶的利用率以及菌丝体的生物量综合考虑,适宜的装液量应为 300~400 mL/L,摇床转速宜设为 100 r/min。

接种量会影响培养周期,本试验结果表明,装液量在 300~400 mL/L、接种 5 mL 种子培养菌液,于 pH 5.5~26、恒温振荡器 100 r/min 培养 7 d,可获得最大菌丝生物量。

【参考文献】

- [1] 张松. 食用菌学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000: 90-99.
- [2] 陈声, 张桂祥. 食用菌的栽培和发酵[M]. 北京: 化学工业出版社, 1993: 127-155.
- [3] 杨庆尧. 食用菌生物学基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 169-173.
- [4] 张雪岳. 食用菌学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1988.
- [5] 张华山, 许剑秋. 美味牛肝菌液体深层培养工艺条件的探索[J]. 氨基酸和生物资源, 1999, 21(3): 23-25.
- [6] 阿历索保罗 C J, 明斯 C W, 布莱克韦尔 M. 菌物学概论[M]. 姚一建, 李玉, 译. 北京: 中国农业出版社, 2002: 370-371.
- [7] 上海农业科学研究院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [8] 何培新, 张定法, 王振河, 等. 皱柄白马鞍菌生物学特性研究[J]. 河南职业技术学院学报, 2001, 29(1): 25-27.
- [9] 邓功成, 刘朝贵. 鸡腿蘑菌丝体液态培养条件研究[J]. 食用菌, 2004(2): 7-9.
- [10] 宫志远, 于淑芬, 曲玲. 阿魏蘑菌丝生长的培养要求及环境条件研究[J]. 中国食用菌, 2002(5): 38-40.
- [11] 马文珍, 杨新美. 黑木耳菌丝液体培养的工艺及其应用[J]. 华中农业大学学报, 1987, 6(3): 253-261.
- [12] 侯华民, 徐泽平. 贝叶多孔菌液体培养生长因子的研究[J]. 中国食用菌, 2002(4): 42-43.
- [13] 肖建辉, 刘金伟. 江西虫草液体深层培养条件优化[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 26-31.