

# 安络小皮伞深层培养的研究

广东省微生物研究所

广州第一制药厂

对安络小皮伞菌 (*Marasmius androsaceus*) 的深层培养进行了研究。观察到该菌在深层培养条件下, 菌丝体无色、丝状、分枝有横隔。其最适发酵条件: 3% 葡萄糖为碳源和以 1% 玉米浆或花生饼粉为有机氮源, pH 4.5—6.0, 温度 22—26°C, 通气量 0.8—1.0 (V/V/分)。当 pH 降至 3.5—3.0, 残糖降至 0.5—0.4% 时, 通常 3—5 天, 即可终止发酵。

野生安络小皮伞的根状菌索, 用于治疗神经系统的疾病, 效果良好。但菌索的形成受环境条件影响很大, 因此, 产量很低, 人工栽培需时间长(一个月以上), 产量也不高。为了扩大药源, 以满足广大群众的需要, 我们研究了安络小皮伞的深层培养。

## 材料与方法

### 一、菌种

安络小皮伞菌 (*Marasmius androsaceus*), 代号 M<sub>3</sub>。1971 年 8 月分离自湖南省绥宁县高坪山区林中。低温保存, 每隔半年移植一次。

### 二、培养基

#### (一) 斜面培养基(%):

麸皮 10, MgSO<sub>4</sub> 0.05,  
麦芽糖 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1,  
琼脂 2, 灭菌后 pH 6.0。

#### (二) 发酵培养基(%):

1号:

麸皮 5, MgSO<sub>4</sub> 0.05,  
蔗糖 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1。  
自然 pH。

2号:

玉米浆 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.05,  
葡萄糖 3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1,

酵母浸汁 0.2, 灭菌后 pH 5.8。

3号:

葡萄糖 3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1,  
MgSO<sub>4</sub> 0.05, 灭菌后 pH 5.8。

4号:

葡萄糖 3, CoCl<sub>2</sub> 0.0002,  
NaCl 0.2, KCl 0.05,  
MgSO<sub>4</sub> 0.05, MnSO<sub>4</sub> 0.0016,  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, 维生素 B<sub>1</sub> 0.001,  
FeSO<sub>4</sub> 0.001, CaCO<sub>3</sub> 0.05。

灭菌后 pH 5.7。

### 三、培养条件

斜面菌种在普通恒温箱培养。温度为 24—26°C。

摇瓶液体培养在往复式摇床进行(频率 85 次/分, 冲程 11 厘米)。500 毫升三角瓶装液量 100 毫升。温度 22—26°C。

深层通气培养在发酵罐进行, 50 升种子罐装液量 30 升, 搅拌 240 次/分, 通气量 1—1.5 (V/V/分); 240 升发酵罐, 装液量 180 升, 搅拌 240 次/分, 通气量 0.8—1 (V/V/分)。温度 22—26°C。

### 四、测定方法

(一) 菌丝干重(克/100 毫升): 采用硫酸铵

本文于 1975 年 4 月 29 日收到。

盐析法或冰冻法分出菌丝体，然后于 105℃ 烘干称重。

(二) 酸碱度：用精密 pH 试纸测定。

(三) 总糖(%)：样品经消化后，用碘量法测定。

(四) 还原糖(%)：用碘量法测定。

(五) 总氮(%)：样品经消化后，用甲醛法测定。

(六) 氨基氮(%)：用甲醛法测定。

## 结果与讨论

### 一、形态观察

#### (一) 菌丝

菌丝体白色、丝状。在显微镜下观察为无色、有内含物、有横隔、具分枝，宽 2.5—3 微米，少数达 5 微米(图 1-1)。斜面培养比深层培养的菌丝可观察到更多的锁状联合。

在斜面培养与平板培养时，菌丝容易出现老化(图 2)，菌台由白色变为棕黑色(图 1-2)。

#### (二) 菌球

摇瓶液体培养时，以斜面菌种接种后，菌丝萌发、伸长和分枝，然后纵横交错，互相缠绕形成菌球。开始形成的菌球，菌丝交织疏松，“毛刺”较长，随着培养时间增长，菌球菌丝缠绕越来越紧密，“毛刺”变短，形成球形或近球形，直径多在 3—5 毫米，也有小至 1 毫米和大至 14 毫米的。菌球大小受接种物\*、培养基成份和摇床转速影响很大。接种物大，菌球大而少，培养液中沉淀的杂质或粉状物质越多，菌球的数量多而小，转速快，菌球多而小。菌球有空心和实心两种，表面具短绒毛或具放射状的“毛刺”(图 1-3)。菌球“毛刺”由菌丝互相交织而成(图 1-4)。

此外，深层发酵中，当通气量大或搅拌

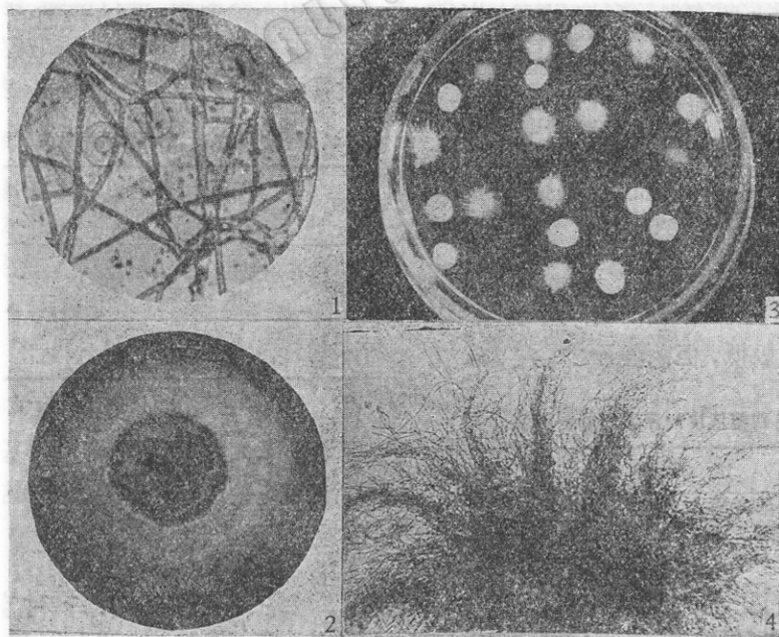


图 1 安络小皮伞形态特征

1. 菌丝，2. 菌落，3. 菌球，4. 菌球“毛刺”。

\* 接种物：指用作为种子的由斜面取出带菌丝的小块。

速度快时,只形成不定型的菌丝体,而不形成菌球。

### (三) 菌液

菌液随着培养时间的延长由混浊变为透明,由黄褐色变为淡黄色,由不粘变为粘糊状。

## 二、培养基成份对菌丝生长的影响

### (一) 碳源的种类与用量的影响

试验用发酵培养基 1 号,改变碳源,结果如表 1 所示: 4 种糖类皆能显著增加菌丝量。说明该菌不仅能利用单糖、双糖,而且也能利用多糖。根据当地的资源情况,可考虑加入适量的糖,以提高菌丝的产量。

表 1 不同碳源对菌丝生长的影响

碳 源**	麦芽糖	葡萄糖	蔗糖	可溶性淀粉	对照
菌丝干重* (克/100 毫升)	2.368	2.718	2.635	2.757	1.502

\* 由于基础培养基含有麸皮,菌球中包含有麸皮残渣,故菌丝干重偏高。

\*\* 用量均为 2%。

用发酵 2 号培养基,改变葡萄糖用量,进行摇瓶试验,结果表明: 在含 4% 葡萄糖的培养基中,菌丝量虽多,但残糖高,糖未充分利用;含 1.5% 和 2% 葡萄糖的培养基中,残糖极低,但菌丝量少;含 3% 葡

表 2 葡萄糖浓度对深层培养的影响

葡萄糖 浓度 (%)	测 定 项 目				菌丝干重 (克/100毫升)
	还原糖含量 (%)		总糖含量 (%)		
	开始	終了	开始	終了	
1.5	1.48	0.20	1.80	0.40	0.334
2	1.97	0.26	2.34	0.45	0.368
3	2.57	0.60	3.53	1.08	1.017
4	2.89	1.04	4.15	1.80	1.12

萄糖培养基中,菌丝量多,糖的利用比较充分,发酵终还原糖降低为 0.5% 左右。因此,工业生产中采用 3% 葡萄糖较为适宜(表 2)。

### (二) 氮源种类与用量的影响

以 4 号培养基为基础,分别加入有机氮源和无机氮源,进行试验,结果菌丝在有机氮中生长良好,在无机氮的氨态氮中生

表 3 不同氮源对菌丝生长的影响

氮 源**	蛋白胨	硫酸铵	硝酸钠	对 照
菌丝长势*	+++	+	-	-
菌丝干重 (克/100 毫升)	0.59	0.39	0	0

\* 生长势以“+”表示,一般分 4 级,即 +—++++ 表示由少至多,以下同。

\*\* 用量均为 2%。

长较差,在硝态氮中不能生长(表 3)。

又以发酵 3 号培养基为基础,添加蛋白胨和天然氮源,进行试验,结果菌丝在玉米浆中生长最好,酵母粉和花生饼粉次之,黄豆饼粉居三,蛋白胨最差(表 4)。

表 4 蛋白胨和天然氮源对菌丝生长的影响

氮 源	玉米浆 1%	花生饼粉 1%	黄豆饼粉 1%	酵母粉 0.35%	蛋白胨 0.15%
菌丝长势	++++	++++	+++	++++	++
菌丝干重 (克/100 毫升)	0.69	0.68*	0.39*	0.70*	0.31

\* 菌球中包含有培养基粉末、干重稍偏高。

又以发酵 3 号培养基为基础,加入不同量的花生饼粉进行试验,结果花生饼粉用量以 1% 为宜(表 5)。

## 三、培养条件对菌丝生长的影响

### (一) 温度与菌丝生长的关系

在适温条件下斜面培养 20 小时,便可

表 5 花生饼粉含量对菌丝生长的影响

花生饼粉含量 (%)	0	0.5	1	2	3
菌丝长势	—	+++	++++	++++	++++
菌丝干重 (克/100毫升)	0	0.64	0.99	1.20	0.93
菌丝形态	—	菌球大, 形状完整。	菌球大小中等, 形状完整。	菌球细, 多种形状, 不完整。	菌球细, 多种形状, 不完整。
残余花生饼粉	0	最少	较少	多	多

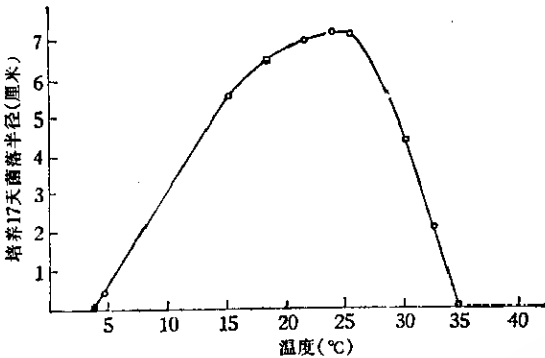


图 2 温度与菌丝生长的关系

见到新菌丝。菌丝在 5—34°C 皆能生长, 以 18—28°C 较适, 22—26°C 最适 (图 2)。菌丝在 28°C 开始老化, 超过 40°C 易于死亡, -4°C 保存 5 个月生长活力仍不丧失。

## (二) pH

用发酵 2 号培养基, 调节不同 pH 进行试验, 结果表明: pH 2.3—7.5 菌丝皆能生长, 以 pH 4.5—6.0 最适, 菌丝产量最高 (图 3)。

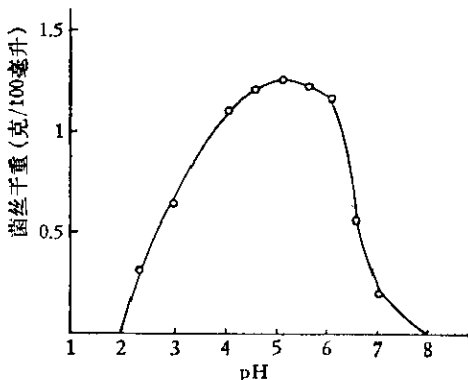


图 3 pH 值与菌丝生长的关系

由于菌丝在培养过程中产酸, 导致培养基 pH 降低, 为维持发酵液在一定时间内不致于酸性过大, 加入  $\text{CaCO}_3$  进行中和, 以 2 号发酵培养基为基础, 分别加入 0.4%、0.3%、0.2% 和不加  $\text{CaCO}_3$ 。结果加入 0.3—0.4%  $\text{CaCO}_3$ , pH 下降比对照明显减慢, 菌丝重量稍有增多 (表 6)。

表 6  $\text{CaCO}_3$  的添加对菌丝生长的作用

$\text{CaCO}_3$ (%)	发酵过程中 pH* 与菌丝变化					
	发酵 139 小时		发酵 211 小时		发酵 306 小时	
	pH	菌丝干重 (克/100毫升)	pH	菌丝干重 (克/100毫升)	pH	菌丝干重 (克/100毫升)
0.4	6.0	未测	3.8	0.9	3.7	1.45*
0.3	5.5	未测	3.8	0.86	3.5	1.19
0.2	4.5	未测	3.8	0.59	3.5	1.12
0 (对照)	4.5	未测	3.7	0.48	3.5	0.89

\* 开始: pH 6.2。

• 菌球包含较多  $\text{CaCO}_3$  粉末。

## (三) 通气量与菌丝生长的关系

用 500 毫升三角瓶, 分别装发酵 1 号培养基 70 毫升和 90 毫升进行比较, 结果 70 毫升装液量比 90 毫升装液量菌丝量明

表 7 通气量对菌丝生长的影响

培养基装液量 (毫升)	菌丝干重 (克/100 毫升)		
	发酵 6 天	发酵 9 天	发酵 13 天
70	0.1	1.08	1.35
90	0.07	0.8	1.25

显增加,说明通气条件良好时,有利菌丝生长(表7)。

#### (四) 种龄和接种量

1. 摇瓶试验,以斜面作种子时,应以新鲜菌种为好。500 毫升摇瓶接入 2 平方厘米打碎的菌丝。新鲜打碎的菌丝种能提前两天开始生长。如果接液体菌种,应取 5—6 天菌龄的菌液 2 毫升。

2. 用摇瓶液体种子接种种子罐时,选 6—7 天菌龄为宜,这时菌丝旺盛,菌球多而细,生活力强,接种量 2%。

种子罐向发酵罐转接时,种龄 3—5 天,接种量 5—10%。

### 四、培养过程

采用发酵 1 号培养基进行试验,定期测定菌丝量、pH、还原糖、总糖和氨基氮,结果(表 8)指出:摇瓶培养中培养液的 pH、还原糖、总糖、氨基氮随菌丝的增加而降低。发酵 6—9 天是菌体旺盛生长期,菌体干物质迅速积累,pH 急剧下降,养份消耗增大。发酵 10—13 天菌丝生长缓慢,

pH 下降和养份消耗减少。发酵 16 天后,菌体自溶,菌丝量减少,pH 回升。一般在第 13 天终止发酵较为有利。

表 8 菌丝生长 pH 及营养成份的变化

测定项目	发 酵 天 数					
	0	6	9	13	16	23
pH 值	5.4	4.6	3.5	3.0	4.6	5.0
还原糖 (%)	0.76	0.52	0.43	0.37	0.30	0.32
总糖 (%)	4.28	2.43	2.21	1.47	—	1.72
氨基氮 (%)	0.053	—	0.039	0.038	0.049	0.057
菌丝干重 (克/100 毫升)	—	0.1	1.10	1.35	0.85	0.9

在发酵罐中培养时只需要 3—5 天,当 pH 下降至 3.5—3.0,残糖 0.5—0.4%,菌丝稠密,发酵液粘度大,杏仁香味变淡时,即可终止发酵。

#### 参 考 资 料

Lindeberg, G.: *Über die Physiologie Ligninabbauender Bodenhymenomyceten Symbolae Botani. Upsalienses* 8 (2): 1—183.

## SUBMERGED CULTIVATION OF *MARASMIUS ANDROSACEUS*

GUANGDONG INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

GUANGZHOU No. 1 PHARMACEUTICAL FACTORY

(Guangzhou)

In order to produce the mycelium of *Marasmius androsaceus* by submerged culture technique, a study has been made on the fermentation conditions of the fungus. The mycelium of this fungus under submerged condition is colorless, filamentous, septate and branched. The following optimal conditions were verified: 3.0% glucose as carbon source with 1% cornsteep liquor or peanut meal as nitrogen source;

pH 4.5—6.0; temperature 22—26°C; rate of aeration 0.8—1.0 (V/V/min.); age of inoculum (shake flask) 6—7 days, amount of inoculum 2%; age of secondary seed culture (seeding tank) 3—5 days, amount of inoculum 5—10%. The cultivation ended at the time when the pH value dropped to 3.5—3.0 with residual sugar 0.5—0.4%, usually being 3—5 days.