

## 鸡枞菌菌丝体液体培养的研究

李筱菊 钟 恒 叶初星 林建东

(中山大学生物学系, 广州 510275)

**摘 要** 适合鸡枞菌菌丝体液体培养的培养基成分是: 淀粉 10g, 蔗糖 2g, 蛋白胨 2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15g, 最佳 C/N 为 30~40:1; 最适培养温度 26℃; pH6.4; 振荡频率 140~145r/min. 继代培养周期 8 天. 液体培养的鸡枞菌菌丝体氨基酸总量可达 273mg/g 干重, 其中 42.41% 为人体必需的氨基酸(未含色氨酸).

**关键词** 鸡枞菌, 菌丝体, 液体培养

**分类号** TS 201.3

鸡枞菌(*Termitomyces albaminosus*)是与土栖白蚁共生的野生食用菌. 它肉质细嫩、营养丰富而被视为名贵山珍, 故探索人工培养鸡枞菌早已被国内外学者所关注<sup>[1~6]</sup>. 我们曾成功分离菌台表面的小白球, 鸡枞菌菌丝体在固体培养基上生长十分缓慢, 而液体培养则大幅度提高生长速率, 且培养得到的菌丝体球的氨基酸种类和野生鸡枞菌子实体一样, 含量则普遍提高<sup>[8]</sup>. 本研究对鸡枞菌菌丝体的液体培养条件作了探索.

### 1 材料和方法

材料用菌台上分离驯化的第 5 代鸡枞菌菌丝.

培养基成分以蛋白胨为氮源<sup>[7]</sup>, 蔗糖和淀粉为碳源, 外加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为基本培养基成分, 设计 5 种培养基方案: 培养基 A: 淀粉 7g、蔗糖 2g、蛋白胨 2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15g; 培养基 B: 培养基 A 成分+麸皮浸汁 75ml; 培养基 C: 培养基 A 成分+酵母提取膏 0.05g; 培养基 D: 淀粉 10g, 其它成分同培养基 A; 培养基 D<sub>1</sub>: 淀粉 4g, 其它成分同培养基 A. 以上各种配方均加蒸馏水至 1000ml (淀粉先煮沸 5min, 使呈粘稠状; 麸皮浸汁是将 200g 麸皮在 1000ml 蒸馏水中浸泡 24h), 50ml 三角锥形瓶加培养液 20ml, 双层锡纸扎紧瓶口, 于 6.80kg/cm<sup>2</sup> 消毒 30min, 冷却后接入 0.8cm<sup>2</sup> 菌丝块后放摇床振荡培养 10 天, 振荡频率 140~145r/min, 培养温度分别为 20℃ 和 26℃.

菌丝体生长量的测定: 将培养第 2, 4, 6, 8, 10 天的培养液过滤菌丝体球, 洗涤, 45℃ 烘至恒重, 得出生长时间不同的菌丝体干重, 并测定菌丝体密度(个/ml)和直径.

培养液含糖量的测定: 取培养第 2, 4, 6, 8, 10 天的培养液各 1ml 加入 9ml 蒸馏水, 取

收稿日期: 1992-07-08

2ml 上述溶液按常规方法<sup>[12]</sup>测定含糖量。

培养液含氮量的测定:取培养第 2、4、6、8、10 天的培养液各 2ml 用凯氏定氮法测定<sup>[9]</sup>。

维生素 B 的定性测定:取 1~2ml 培养第 8 天的培养液按荧光反应法测定<sup>[12]</sup>。

氨基酸种类和含量的测定:将培养基 A、B、D3 种中的菌丝体球洗净烘干用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定氨基酸种类和含量。

培养液 pH 的测定:用精密 pH 试纸测定培养第 2、4、6、8、10 天培养液 pH 值的变化。

## 2 结果与讨论

2.1 鸡纵菌菌丝生长与外源维生素 Batra 认为人工培养鸡纵菌需要外源维生素(VH, VB<sub>1</sub>, VB<sub>2</sub>)<sup>[1]</sup>。我们在培养基中分别加入富含维生素的麸皮浸汁和酵母提取膏,均没影响鸡纵菌菌丝的生长(见表 1);培养液维生素的定性测试也发现,不含有游离态维生素的培养基 A、D、D<sub>1</sub>,经菌丝生长 8 天后,其培养液中也含有维生素 B,这是鸡纵菌菌丝生长过程中能自身合成维生素,并将其分泌到培养液中,这说明人工培养鸡纵菌不需要提供外源维生素。

表 1 外加麸皮浸汁和酵母提取膏对鸡纵菌菌丝生长量的影响

Tab. 1 Effects of yeast extract and wheat bran extract on growth of mycelium of *Termitomyces albamiosus*

培养 天数 /d	对 照			处 理					
				麸皮浸汁			酵母提取膏		
	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	9	1.4	2.25	8	1.4	1.62	14	1.2	2.26
4	12	2.8	3.79	12	2.5	3.45	15	3.2	3.25
6	15	3.5	6	17	3.0	5.05	16	3.5	5.0
8	17	3.5	6.32	19	3.5	6.1	16	4.0	5.95
10	15	4.0	5.6	17	3.5	5.5	16	4.0	5.65

2.2 培养基中 C/N 研究证明,食用菌菌丝细胞的 C/N 为 8~12:1,有人认为人工培养食用菌的培养基 C/N 为 16~24:1,这其中 50%的碳供菌丝呼吸,50%的碳组成菌丝体成分<sup>[10,11]</sup>。我们以改变淀粉的含量来调节培养基的 C/N,使它们分别为 20:1(培养基 D<sub>1</sub>),29:1(培养基 A),37:1(培养基 D),其它条件相同,培养 8 天,发现 C/N 为 37:1 时菌丝生长最好,菌球个数较多,直径较小,菌丝体干重可达 8.76mg/ml(见表 2)。也就是说在这种培养环境下,鸡纵菌菌丝的代谢活动旺盛,将营养物质转化为自身细胞,而增加个体体重;另一方面,淀粉增加了培养液的粘稠度,促使菌球分散悬浮而促进菌丝生长,我们认为鸡纵菌菌丝体的液体培养的 C/N 为 30~40:1 较为理想(见图 1)。

表 2 培养基中不同的 C/N 对鸡纵菌菌丝生长量的影响

Tab. 2 Effect of C/N value on growth mycelium of *Termitomyces albuminosus*

培养 天数	淀粉 4g C/N 20 : 1			淀粉 7g C/N 29 : 1			淀粉 10g C/N 37 : 1		
	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>	个数/ ml	直径/ mm	干重/ mg · ml <sup>-1</sup>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	1.2	1.18	9	1.4	2.25	9	1.1	2.42
4	9	2.5	2.6	12	2.8	3.79	14	2.8	4.41
6	12	3.5	5.05	15	3.5	6	16	3.2	5.63
8	12	4.0	5.63	17	3.5	6.32	20	3.2	8.76
10	11	4.0	4.75	15	4.0	5.6	20	3.0	7.75

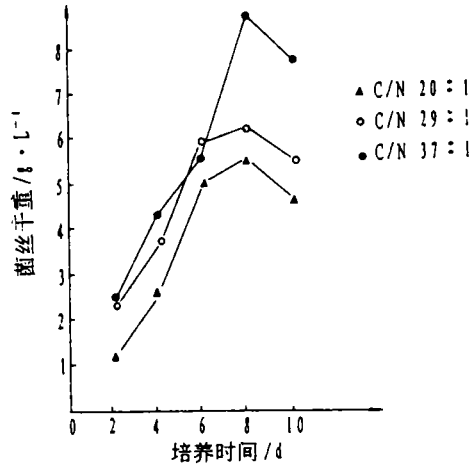


图 1 培养基中的 C/N 对菌丝体干重的影响

Fig. 1 Effects of C/N in the medium on dry weight of the mycelium

表 3 鸡纵菌菌丝培养 10 天培养液中含糖量、含氮量变化

Tab. 3 Level changes of sugar and nitrogen in the medium during culturing for 10 days

培养 天数	培养基 D <sub>1</sub>		培养基 A		培养基 D		培养基 B		培养基 C	
	含糖量	含氮量	含糖量	含氮量	含糖量	含氮量	含糖量	含氮量	含糖量	含氮量
0	5.1	0.26	7.5	0.26	11.0	0.30	8.2	0.39	7.8	0.35
2	4.0	0.18	4.6	0.17	7.5	0.16	6.8	0.18	4.1	0.18
4	1.5	0.09	1.0	0.13	3.0	0.11	4.6	0.13	2.0	0.14
6	0.3	0.06	0.2	0.07	0.3	0.06	0.25	0.07	0.3	0.09
8	0.1	0.02	0.12	0.02	0.12	0.01	0.2	0.02	0.2	0.01
10	0.1	0.02	0.12	0.02	0.12	0.01	0.2	0.01	0.2	0.01

从表 1、2 和图 1 可见培养 8 天菌丝体球干重达到最大值,以后就趋于下降;培养液的含糖量在第 8 天达到较低水平,含氮量也是这样(见表 3),也就是说到第 8 天培养液中的糖、氮消耗将尽,故 8 天为鸡纵菌菌丝体液体培养的继代培养周期,较我们实验的固体斜面或平板培养(25 天左右)大为缩短。

2.3 温度、光照和 pH 等对菌丝生长的影响 土栖白蚁巢温度较稳定,一般在 25~26 C 之间<sup>(6)</sup>,在相同培养环境中培养 8 天,20 C 菌丝体干重是 5g/L,26 C 是 6.32g/L,可见 26 C 对鸡纵菌菌丝体液体培养有利,强光会抑制食用菌菌丝生长,在相同的培养环境中培养 8 天,遮光下菌丝体干重是 5.9g/L,自然光下菌丝体干重是 6.1g/L,可见自然光对鸡纵菌菌丝体液体培养并无影响,鸡纵菌菌丝体液体培养过程 pH 发生了变化,以培养基 A 为例(见表 4),培养 2 天,使培养液的 pH 下降,到第 4 天 pH 逐渐回升,到第 8 天培养液呈中性至弱碱性,这可能是由于菌丝生长的不同时间代谢产物不同所致。

表 4 鸡纵菌菌丝培养 10 天培养液 pH 值

Tab. 4 Changes of pH value in the medium during culturing for 10 days

培养天数	0	2	4	6	8	10
pH	6.4	4.5	5.5	6.5	7.5	8.0

2.4 鸡纵菌菌丝体的氨基酸含量 鸡纵菌菌丝体各种氨基酸成分丰富,氨基酸总量可达 273.9mg/g 干重,其中 42.41% 为人体必需的 8 种氨基酸(未含色氨酸)(见表 5),主粮中缺少的赖氨酸、亮氨酸的含量很高,同时培养液中还含有多种维生素,可见鸡纵菌菌丝体的液体培养对营养、保健等食品工业有深远的意义。

表 5 鸡纵菌菌丝体氨基酸的含量

Tab. 5 Amino acid and their contents in the mycelium of *Termitomyces albuminosus*

/mg · g<sup>-1</sup>(干重)

氨基酸名称	样品中含量	氨基酸名称	样品中含量	氨基酸名称	样品中含量	氨基酸名称	样品中含量
门冬氨酸	28.7746	甘氨酸	16.0750	甲硫氨酸*	6.1320	赖氨酸*	18.9658
苏氨酸	13.2234	丙氨酸	19.4930	异亮氨酸*	14.4175	氮	11.0877
丝氨酸	11.1772	胱氨酸	2.2012	亮氨酸*	22.0139	组氨酸	7.0249
谷氨酸	39.3231	缬氨酸*	19.0851	酪氨酸	7.5032	精氨酸	17.7737
脯氨酸	15.8762			苯丙氨酸*	14.7849	色氨酸*	(未检测)

\* 为人体必需氨基酸

## 参 考 文 献

- 1 Batra L R. Insect-Fungus Symbiosis. Allanheld: Osmum & Co. 1979. 142~147
- 2 陈宛如等. 白蚁巢中小白球菌生态因子研究初报. 杭州大学学报, 1983, 10(3): 353~359
- 3 陈宛如等. 白蚁巢中生态环境与真菌优势种类. 杭州大学学报, 1986, 13(1): 69~74
- 4 Cheo C C (周家炽). A study of *collybia albuminosa* (Berk) Petch. The Termite-growing Fungus in its connection with *Aegerita Duthiei* Berk (*Termitosphaerria duthiei* (Berk) Ciferri). Science Record. 1942(1): 243~248
- 5 Cheo C C. Notes on Fungus-growing Termites in Yunnan, China. Lloydia. 1948, 11: 139~147
- 6 臧穆. 云南鸡纵菌属的分类与分布的研究. 云南植物研究, 1981, 3(3): 367~374
- 7 黄兰妹. 氮素营养对草菇生育的影响. 食用菌, 1984(5): 30~31
- 8 钟恒等. 鸡纵菌(*Termitomyces albuminosus*)小白球培养研究. 中山大学学报(自然科学版), 1991, 30(1): 163~166
- 9 黄学林等. 种子生理实验手册. 北京: 农业出版社, 1990
- 10 张长铠. 碳氮比与食用菌菌丝的生长繁殖. 食用菌, 1988(1): 13~14
- 11 张润生等. 碳氮比对平菇 HP-1 发育的影响. 食用菌, 1991(3): 16~17
- 12 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1987

## Study on Liquid Culturing for Mycelium of *Termitomyces albuminosus*

Li Xiaojun\* Zhong Heng Ye Chuxing Lin Jiandong

**Abstract** The optimal medium and culture conditions for liquid culturing mycelium of *Termitomyces albuminosus* was investigated. It was found that the medium contained 2g sucrose, 0.3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2g peptone and 10g starch was good for culturing *Termitomyces albuminosus* to generate the mycelium on shaker at 140~145 r/min. The optimal temperature for the culture was 26 C. The C/N of the medium was 30~40:1 and pH was adjusted to 6.4 before autoclaving. The mycelium can be harvested after liquid culture for 8 days. The total amount of amino acid in such as mycelium was 273.9mg/g (dry weight of the mycelium) and 42.41 percentage of which was the essential amino acids (tryptophan was not determined).

**Keywords** *Termitomyces albuminosus*, mycelium, liquid culture

\* Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275