

文章编号:1673-1689(2010)06-0927-04

平菇液体菌种摇瓶和发酵罐生长动力学模型的比较

王兰青, 高玉千, 戚元成, 申进文, 邱立友*

(河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 作者选用玉米粉豆粕粉蔗糖液体培养基, 分别采用摇瓶和 40 L 全自动机械搅拌通风发酵罐培养平菇天达 300 液体菌种, 两种培养方式的菌丝体生长动力学模型均符合 Logistic 方程。摇瓶培养周期为 8 d, 最大比生长速率是 0.050 h^{-1} , 菌丝体质量浓度是 1.5001 g/dL 。发酵罐培养周期是 84 h, 最大比生长速率是 0.110 h^{-1} , 菌丝体质量浓度是 1.4750 g/dL 。应用发酵罐培养平菇天达 300 液体菌种更为高效。然而, 摇瓶培养的液体菌种菌丝球直径小, 单位体积培养液中菌丝球数量是发酵罐的 1.4 倍, 可能与发酵罐培养过程中培养液的粘度下降速度快于摇瓶有关。

关键词: 平菇; 液体菌种; 摇瓶; 发酵罐; 动力学

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Comparison of Mycelial Growth Kinetics Model for *Pleurotus ostreatus* Cultured in Shaking Flask and Fermenter

WANG Lan-qing, GAO Yu-qian, QI Yuan-cheng, SHEN Jin-wen, QIU Li-you*

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This manuscript study the difference of the fermentation kinetics of *Pleurotus ostreatus* TD300 in shask and 40 L fermentor. It was found that the mycelial growth kinetics models of both culture modes were accord with Logistic equation. Culturing period, maximum specific growth rate and mycelial concentration cultured in shaking flask were 8 d, 0.050 h^{-1} and 1.5001 g/ml , respectively. While the corresponding value changed to 84 h, 0.110 h^{-1} and 1.4750 g/ml when *Pleurotus ostreatus* TD300 cultured in fermenter, respectively. The results proven that fermentor culutre was a higher efficiency culture for *Pleurotus ostreatus*. Furthermore, pellet size and number per unite volume of liquid spawn cultured by shaking flask were smaller and higher than that by fermenter. It was probably caused by the viscosity of medium in shaking flask reduced faster than that in fermentor.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, liquid spawn, shaking flask, fermenter, kinetics

Humfeld(1948)^[1]最早报道四孢蘑菇(*Agaricus campestris*)的菌丝能够进行液体培养, 已有多

收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 河南省科技攻关项目(82102150048)。

作者简介: 王兰青(1976—), 男, 河南濮阳人, 助理研究员, 理学硕士, 主要从事发酵工程方面的研究。Email: lanqing761207@sina.com

* 通信作者: 邱立友(1963—), 男, 河南信阳人, 农学博士, 教授, 主要从事微生物学方面的研究。Email: qliyou@henau.edu.cn

种食药真菌菌丝液体发酵获得了成功,并于 20 世纪 60 年代中期后开始用作液体菌种进行食药菌的栽培^[2]。目前应用液体菌种进行栽培的食用菌已达 10 余种。与传统的固体菌种相比,液体菌种具有生产自动化和集约化程度高,生产周期短,生产成本低,在基质中接种均匀,萌发点多,萌发快,栽培周期短,大幅度提高子实体产量等优势^[3]。然而,食用菌液体菌种发酵动力学的研究报道还很少。

平菇(*Pleurotus ostreatus*)是中国栽培最为广泛的食用菌之一,产量占全国食用菌总产量的 40% 左右。平菇不仅具有很高的营养和医疗保健价值^[4-5],而且在生物修复和废弃物生物转化等领域也有重要应用^[6-7]。作者在摇瓶和 40 L 发酵罐两个规模水平上对平菇天达 300 液体菌种发酵动力学模型进行了建构和比较,发酵罐生产平菇液体菌种比生长速率高,发酵周期短,菌丝球得率高。

1 材料与方 法

1.1 菌种

平菇天达 300(*P. ostreatus* TD300):由河南省农科院食用菌研究开发中心提供。4℃保藏,使用前于室温下放置 2 d,接种到 PDA 试管斜面上,25℃培养,待菌丝满管后转接到 PDA 平皿中,25℃培养至菌丝长满平皿,用打孔器取直径 1 cm 菌块接种用。

1.2 液体培养基

采用优选的玉米粉、豆粕粉、蔗糖液体培养基,配方是:玉米粉 1 g/dL,豆粕粉 2 g/dL,蔗糖 3 g/dL,酵母粉 0.5 g/dL,磷酸二氢钾 0.1 g/dL,硫酸镁 0.05 g/dL,碳酸钙 0.2 g/dL。培养基配制后先煮沸 30 min,经 3 层纱布过滤,再分装并于 121℃灭菌 30 min。

1.3 摇瓶培养

500 mL 三角瓶装培养液量 150 mL,每瓶接入一块菌种,菌丝面朝上,25℃静止培养 24 h,然后转入摇床,25℃、150 r/min 培养 7~8 d,待菌丝球大量出现,发酵液变澄清时结束培养。发酵结束,培养液既可用于食用菌栽培的液体菌种,也可用于发酵罐培养的种子。每天取样测定培养液 pH 值、生物量和还原糖质量浓度。

1.4 发酵罐培养

采用上海宝兴生物设备工程有限公司生产的 40 L 全自动机械搅拌通风发酵罐 BIOTECH-40JS,装液系数 70%,接入摇瓶种子,接种量为培养基总体积的 7.5%。发酵条件是培养温度 25℃、搅拌转

速 160 r/min、罐压 0.04 MPa、通风量 0.7 N·m³/h 通气量。每 12 小时取样测生物量、还原糖、pH 值和溶氧,用 pH 电极和溶氧电极在线测量。

1.5 培养液中菌丝球个数、大小及菌丝体质量浓度测量

准确吸取 10 mL 发酵液于直径 9 cm 培养皿中,统计菌丝球的数量,对发酵液黏稠的样品,加适量水稀释后再计数,同时测量菌丝球大小。菌丝体质量浓度的测定方法是:培养液于 3 000 r/min 离心 10 min,去上清液后称量菌丝球鲜重;将湿菌丝球于 60℃烘箱中烘至恒重,称量菌丝球干重。

1.6 培养液 pH 值、还原糖和溶氧的测定

培养液 pH 值测定:摇瓶采用 pH 计测定,发酵罐用 pH 电极在线测量;还原糖测定:采用 DNS 法;发酵罐培养液中溶氧测定:采用溶氧电极在线测量。

2 结果与分析

2.1 摇瓶和发酵罐液体菌种发酵曲线

摇瓶和发酵罐培养液体菌种,菌丝体质量浓度曲线均为典型的 S 型曲线,见图 1,2。摇瓶培养接菌后 1~3 d,菌丝体处于适应期,生物量增长缓慢,4~7 d 加速增长,第 8 天达到最大值,为 1.500 1 g/dL,菌球最多达到 437 个/10 mL,菌丝球直径平均为 1.5 mm,见表 1。以后菌丝体开始自溶,进入衰亡期,生物量有所减少。通常选用处于生命力旺盛的指数生长期,或者是衰亡期前期的菌体作为种子,以种子培养液中的菌体量初次接近最高峰时为佳。所以,摇瓶种子的最佳培养时间为 8 d。培养基中的还原糖质量浓度在发酵过程中,先是升高,到第 4 天达到最大值 8.22%,4 d 后还原糖质量浓度迅速降低,说明菌丝体大量利用还原糖供自身增殖。

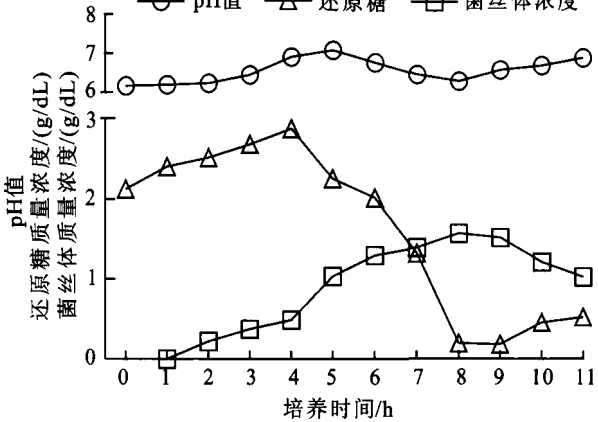


图 1 摇瓶培养平菇天达 300 发酵曲线

Fig. 1 Fermentation profile of *P. ostreatus* TD300 in shaking flask

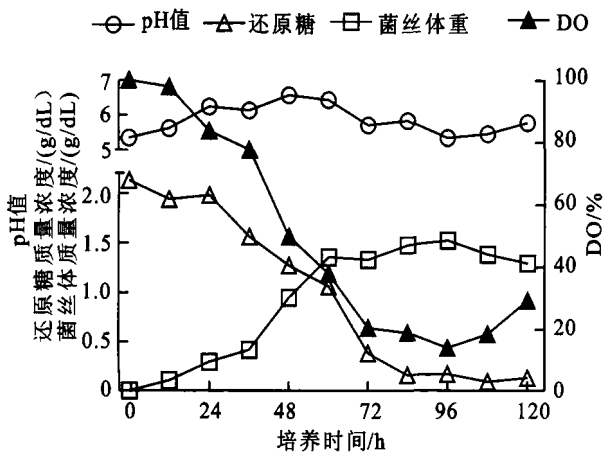


图 2 40 L 发酵罐培养平菇天达 300 发酵曲线

Fig. 2 Fermentation profile of *P. ostreatus* TD300 in fermenter

发酵罐培养平菇天达 300 接种后的 24 h, 菌丝体处于适应期, 菌丝生长缓慢, 各参数变化不大。24 h 后, 菌体快速增长, 伴随生物量的增加, 溶氧、还原糖急剧下降, pH 值则呈缓慢上升趋势, 菌丝球浓度在 84 h 达 1.475 0 g/dL, 96 h 达到最大值, 为 1.521 1 g/dL, 此后生物量逐渐减少, 说明菌丝体开始自溶, 生长进入衰减期; 溶氧值先降后升, 变化较大, 36~72 h 之间下降最为明显, 菌丝球旺盛生长大量消耗氧气。发酵过程中还原糖质量浓度呈下降趋势, 在第 24~72 h 几乎呈直线下降, 与溶氧变化相似。菌体量接近最高峰时, 菌体活力最强, 因此, 确定发酵罐的发酵时间为 84 h, 经检测 10 mL 发酵液中菌丝球数量达 320 个左右, 菌丝球直径平均 1.8 mm, 89% 以上的菌丝球直径小于 2 mm, 湿菌丝球总重达 3.5 kg, 符合液体菌种的生产要求。

表 1 摇瓶和发酵罐培养平菇天达 300 液体菌种主要发酵参数的比较

Tab. 1 Comparison of main fermentation parameter for *P. ostreatus* TD300 cultured in shaking flask and fermenter

	发酵 周期	菌丝体 质量浓度/ (g/dL)	菌丝球 直径/ mm	菌丝 球数/ (个/10mL)	$\mu_{\max}$ /h (拟合 值)
摇瓶	8 d	1.500 1	1.5*	437*	0.050
发酵罐	84 h**	1.475 0	1.8	320	0.110**

* 同列一对数据相比差异达到显著水平($p<0.05$), ** 同列一对数据相比差异达到极显著水平($p<0.01$)。

2.2 菌体生长动力学模型

描述丝状真菌 S 型生长曲线的最适动力学方程是 Logistic 方程^[8], 因此, 应用该模型来描述平菇天达 300 摇瓶和发酵罐液体培养菌丝体生长过程。

Logistic 方程见式(1):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$$
 (1)

式(1)中, $\mu_{\max}$ 为平菇菌丝体最大比生长速率; X 为菌丝体质量浓度(g/dL); t 为发酵时间; 当 $t = 0$ 时, $X = X_0$ 。

将式(1)积分得式(2):

$$X = \frac{X_0 e^{\mu_{\max} t}}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - e^{\mu_{\max} t})}$$
 (2)

利用 Origin 6.0 软件对平菇摇瓶和发酵罐培养生长的实验数据进行非线性拟合, 可得摇瓶培养时 $\mu_{\max} = 1.213 \text{ d}^{-1} (0.050 \text{ h}^{-1})$, 发酵罐培养时 $\mu_{\max} = 0.110 \text{ h}^{-1}$, 并将摇瓶实验数据 $X_0 = 0.010 4 \text{ g/dL}$, $X_{\max} = 1.500 1 \text{ g/dL}$ 和发酵罐实验数据 $X_0 = 0.012 0 \text{ g/dL}$, $X_{\max} = 1.521 1 \text{ g/dL}$ 分别代入式(2), 得平菇菌丝体生长的动力学模型方程, 见式(3)、(4)。

摇瓶培养

$$X = \frac{0.010 4 e^{1.213t}}{1 - 0.006 9 (1 - e^{1.213t})}$$
 (3)

发酵罐培养

$$X = \frac{0.012 0 e^{0.110t}}{1 - 0.007 9 (1 - e^{0.110t})}$$
 (4)

对平菇菌丝体生长的摇瓶和发酵罐实验数据进行非线性拟合, 结果见图 3, 4, 所选择的模型基本上反映了平菇菌丝体在液体中的生长情况, 其平均拟合误差分别为 3.16% 和 3.69%。

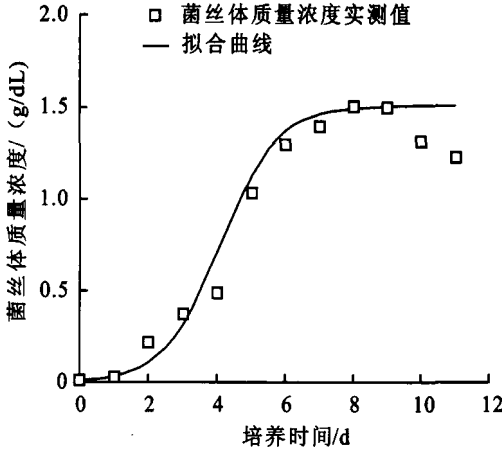


图 3 摇瓶培养平菇天达 300 液体菌种菌体生长实测值及其拟合曲线

Fig. 3 Fitting curve figure of biomass model for *P. ostreatus* TD300 in shaking flask

3 结 语

食用菌液体菌种生产常用的培养装置是摇瓶和小型发酵罐。本研究表明, 摇瓶和 40 L 发酵罐培养平菇天达 300 液体菌种, 其菌体生长动力学模型均符合 Logistic 方程, 最大菌体质量浓度没有差异, 但菌体最大比生长速率和培养周期有显著差异, 发

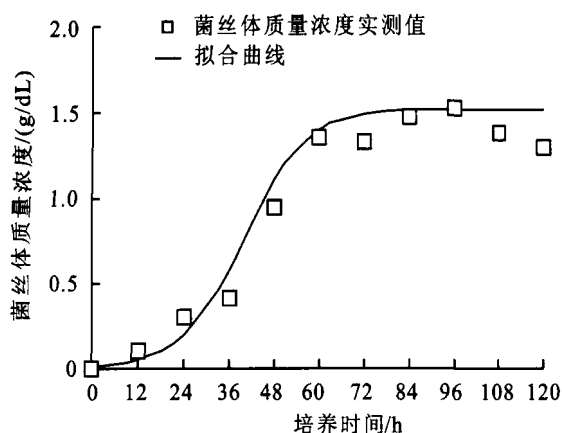


图4 发酵罐培养平菇天达300液体菌种菌体生长实测值及其拟合曲线

Fig. 4 Fitting curve figure of biomass model for *P. ostreatus* TD300 in shaking flask

酵罐培养菌体最大比生长速率是摇瓶的2.2倍,培养周期仅需84 h,而摇瓶培养周期是8 d(192 h),所以,应用发酵罐培养液体菌种更为高效。

研究发酵动力学是实现发酵过程最优控制和发酵过程放大的重要基础。由于真菌发酵培养基常采用天然原材料,如淀粉、玉米粉和豆饼粉等由于含有固形物,影响菌丝体生物量的测定。为了解决该问题,往往采用间接法,包括测定菌悬液中菌体DNA、RNA、几丁质、麦角固醇或葡萄糖胺的质量浓度,以及发酵液的CO₂释放速率、氧气消耗速率等,来估量菌丝体质量浓度^[9-10]。作者采取培养

基先经煮沸、过滤除去固形物,再进行灭菌、培养的方法,有效地减少了培养液中固形物对菌丝生物量估算的影响。同样地,由于使用天然原料,培养基中的碳源是淀粉而不是葡萄糖,在培养过程中,淀粉边被水解生成葡萄糖边被菌体利用,因此,尚没有适当的基质消耗动力学模型来描述淀粉消耗过程。

尽管摇瓶培养平菇天达300菌体生长速度慢,发酵周期长,但得到的液体菌种菌丝球直径比发酵罐小,单位体积培养液中菌丝球数量是发酵罐的1.4倍,更适于用作液体菌种。菌丝球的形成和大小受多种发酵条件的影响。表面活性剂和pH值影响到凝聚型真菌孢子表面的特性,在较高的pH值下孢子易凝结,利于菌丝球的形成,且菌丝球的直径随pH值的增加而增大。液体培养基的液体粘度与食用菌的菌球形成关系密切。粘度小,形成的菌丝球大,数量少;粘度大,形成的菌丝球小,数量多。搅拌强度越高,形成的菌丝球的直径越小,密度越大。溶氧浓度高,菌丝球直径大,溶氧浓度低,菌丝球直径小。在相同的搅拌强度下,碳源浓度高、发酵周期长,菌丝球直径大。另外,矿质元素浓度对菌丝球大小也有影响。本研究中摇瓶培养平菇天达300菌丝球直径显著小于发酵罐,可能与二者培养过程中培养液粘度的变化以及搅拌剪切作用的差别有关。

参考文献(References):

- [1] Humfeld H. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture[J]. *Science*, 1948, 107 (2780): 373.
- [2] Alain L. Production and use of liquid mushroom spawn[P]. USA Patent; 1966-11-22.
- [3] Kirchhoff B, Lelley J. Science and cultivation of edible fungi[M]. Rotterdam: Balkema, 1991: 509—516.
- [4] Gern R M, Wisbeck E, Rampinelli J R, et al. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(1): 76—82.
- [5] 韩雪, 张兰威. 双歧杆菌增殖因子的筛选及培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 69—72.
HAN Xue, ZHANG Lan-wei. The *Bifidobacteria*'s growth-promoting factors selection and the basic medium optimization[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2005, 24(4): 69—72. (in Chinese)
- [6] Rodriguez Prez S, Garca Oduardo N, Bermdez Savn R C. Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus*[J]. *Biodegradation*, 2008, 19(4): 519—526.
- [7] Locci E, Laconi S, Pompei R, et al. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: a solid-state carbon-13 NMR study[J]. *Bioresour Technology*, 2008, 99(10): 4279—4284.
- [8] 张建国, 陈晓明, 贺新生. 灵芝胞外多糖分批发酵动力学模型[J]. 生物工程学报, 2007, 23(6): 1065—1070.
ZHANG Jian-guo, CHEN Xiao-ming, HE Xin-sheng. Kinetic model for exopolysaccharides (EPS) of *Ganoderma lucidum* in batch fermentation[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(6): 1065—1070. (in Chinese)
- [9] Koutinas A A, Wang R, Webb C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 14(1): 93—100.
- [10] Brand D, Pandey A, Rodriguez-Leon J A, et al. Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation[J]. *Biotechnology Progress*, 2001, 17(6): 1065—1070.

(责任编辑:李春丽)