

外生菌根真菌——厚环乳牛肝菌 发酵条件的研究*

王学聘 赵志鹏 郭秀珍

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 本文对外生菌根真菌——厚环乳牛肝菌(*Suillus grevillei* (Kl.) Sing.) 8001菌株的发酵条件进行了研究。其中培养基初始 pH 以 4.5~5.6 为宜, 装液量选为 150 ml/500 ml 三角瓶, 该菌株不需要特殊的碳源和氮源。14 L 发酵罐液体深层发酵结果表明, 8001 菌株具有发酵周期短、生长迅速、易于工业化生产等特点。本研究为外生菌根菌剂的大规模工业化生产提供了理论依据。

关键词 外生菌根; 厚环乳牛肝菌; 发酵条件

外生菌根是高等真菌同某些植物的根系形成的一种相互有益的共生联合体。它可使植物获得更多的矿物质养分, 特别是促进对难溶磷的吸收, 并具有一定的抗病和抗逆性功能。目前在外生菌根的应用研究中, 美国已采用液体发酵技术生产出数种外生菌根菌剂, 在林业上应用的效果较为理想^[1]。我国这方面的研究开展得较少, 童竞新等曾采用液体通气方法扩大培养彩色豆马勃, 用于接种国外松, 取得了较好的效果^[2]。

本实验在一系列筛选的基础上, 选择了一株对寄主植物既有生长促进作用, 又有抗病效应的 8001 菌株^[3,4], 对其进行了发酵条件的研究, 目的在于采用液体深层发酵生物技术, 为外生菌根菌剂的大批量工业化生产提供依据。

一、材料与方 法

(一) 实验菌株与培养基

1. 菌株 厚环乳牛肝菌(*Suillus grevillei* (Kl.) Sing.), 系从北京地区 30 年生油松林内采集分离^[4]。

2. 培养基 实验采用 PDA 培养基和改良 MMN 培养基^[1]。

(二) 摇瓶发酵条件试验

采用 500 ml 三角瓶盛一定量的改良 MMN 培养基, 在 TZ-2 型台式往复旋转振荡器上振荡培养, 振幅 2~3 cm, 频率 130 次/min, 培养温度 25±1℃, 接种量为每瓶接种直径

本文于 1989 年 12 月 22 日收到。

*本研究为国家“七五”重点科技攻关项目生物技术专题(75-71-07-07)的部分工作。中国林科院分析中心和林研所 杨飞溢先生分析样品; 焦苗珍同志参加部分工作, 特此致谢。

为 8 mm 的菌丝块 3 块。每个处理重复 3 次，培养周期为 5 天。

(三) 发酵罐液体深层发酵^[6]

采用日本 L.E.MARUBISHI Co. Ltd. 生产的 MJ-N-14L 发酵装置,使用改良 MMN 培养基,进行二级发酵。接种量为 4%,搅拌速度为 150 rpm,培养温度为 25 ± 1 °C,通风量为 5 L/min。

(四) 菌丝体生物量测定

取 100 ml 发酵液,经抽滤,烘恒重(105 °C, 6 h)用下列公式计算生物量:菌丝干物重(g)/100 ml 发酵液。

(五) 发酵液中全氮及有机碳的测定

经一定时间培养后,取一定量的发酵液,6 000 rpm 离心 20 min,取上清液作为样品。全氮测定采用凯氏定氮法,使用瑞士 BüCHI-322 全自动定氮仪。有机碳测定采用重铬酸钾法。

(六) 发酵液中糖及氨基酸的测定

在发酵 18、42、66 h 后,分别从发酵罐中取样,经 5 000 rpm 离心后,用 Waters 244 HPLC 高压液相色谱仪进行测定。

1. 糖的测定 色谱条件为:柱: Sugar park-1, 流动相: H₂O, 流速: 0.7 ml/min, 检测器: R₂:4X, 柱温: 90 °C。

2. 氨基酸的测定 色谱条件为:柱: μ -BondaPaRc pnenyl, 流动相: 35% CH₃OH, 流速: 1.2 ml/min, 检测器: UV280 nm \times 0.1 AuFS。

二、结 果

(一) 培养初始 pH

由图 1 可见,8001 菌株的培养基最适 pH(灭菌前)在 4.5~5.6 之间,其生物量可达 0.8 g/100 ml 以上。

(二) 振荡与静止培养

由表 1 可知,振荡培养的生物量明显高于静止培养,说明振荡培养更有利于菌丝体的生长。

表 1 培养方式对菌丝体生物量的影响

培养方式	pH	生物量(g/100 ml)
振荡培养	4.5	0.82
静止培养	4.5	0.21

(三) 不同装液量试验

从图 2 得知,随着装液量由 75 ml 增加到 200 ml,8001 菌株的最终生物量无明显变

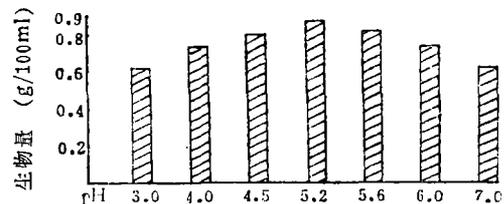


图 1 培养基 pH 对菌丝体生物量的影响

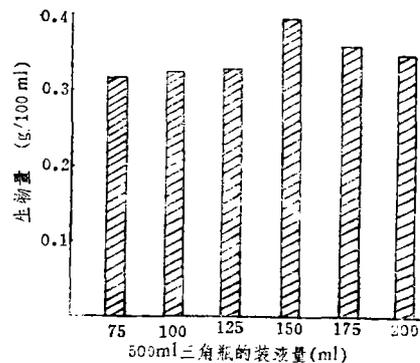


图 2 装液量对菌丝体生物量的影响

化,装液量达150 ml时,其生物量最大,为0.38 g/100 ml。因此,500 ml 三角瓶装液量以150 ml 为宜。

(四) 碳源试验

在500 ml 三角瓶中盛 150 ml MMN₂培养液,并分别加入12种碳源。从表 2 可知,其生物量均比对照有所增加,其中甘露糖、木糖、半乳糖、玉米浆、阿拉伯糖和葡萄糖的生物量高出对照10倍以上,淀粉高出 8 倍。

(五) 氮源试验

从表 3 可见,无机氮源中氨态氮比硝态氮效果明显,其中硫酸铵的生物量比对照高出 3 倍;有机氮生物量均比对照高,其中酵母粉、干酪素和酵母浸膏高出18倍以上。

(六) 14L 发酵罐发酵试验

发酵过程中 pH 呈下降趋势,最终 pH 4.0 左右。培养基中全氮、有机碳含量的变化呈下降趋势。生物量在发酵第 4 天达到高峰(图 3)。但所测的生物量比实际菌丝体生物量低,因为在发酵过程中,发酵罐挡板与罐壁之间截留了相当一部份菌丝体,而未能进行测定。

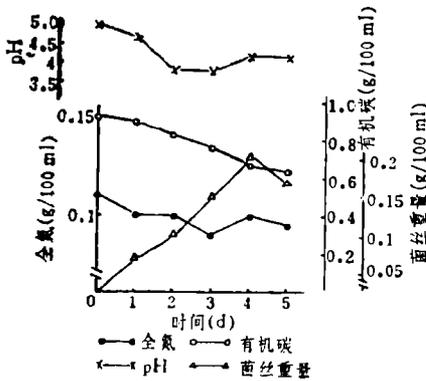


图 3 发酵过程中 pH、全氮、有机碳、菌丝体生物量的变化

表 2 碳源对生物量的影响

(单位: g/100 ml)

碳源	生物量	碳源	生物量
葡萄糖	0.175	乳糖	0.076
阿拉伯糖	0.200	甘露醇	0.060
甘露糖	0.370	糊精	0.076
木糖	0.300	淀粉	0.123
半乳糖	0.250	玉米浆	0.250
蔗糖	0.077	对照	0.015
麦芽糖	0.077	碳水平为 1%	

表 3 氮源对生物量的影响

(单位: g/100 ml)

氮源	生物量	氮源	生物量
NH ₄ NO ₃	0.030	牛肉膏	0.195
NH ₄ Cl	0.016	蛋白胨	0.114
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.052	干酪素	0.323
KNO ₃	0.002	酵母浸膏	0.305
NaNO ₃	0.006	尿素	0.068
Ca(NO ₃) ₂	0.016	酵母粉	0.480
对照	0.016	氮水平为 1%	

(七) 发酵液中糖与氨基酸的组成

从所测定的糖的变化来看,发酵过程中蔗糖消耗较多,发酵末期略微回升。其它 3 种糖在发酵 18 h 后都有所下降,在发酵末期均略有回升(表 4)。

表 4 发酵液中糖的变化

(单位: mg/100 ml)

发酵时间 (h)	蔗糖	葡萄糖	果糖	三糖	总糖
0	51.66	1596.00	69.85	42.44	1759.95
18	17.48	755.44	22.74	17.10	812.76
42	2.339	1391.49	48.27	45.53	1487.63
66	13.99	1392.22	52.69	52.86	1511.76

在发酵过程中,发酵液氨基酸总量呈下降趋势(表 5),其中丝氨酸、甘氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、精氨酸均呈下降趋势,而丙氨酸和色氨酸则略有增加。

表5 发酵液中氨基酸的变化 (单位: mg/100 ml)

发时 酵间 (h)	天门 氨酸冬	苏 氨酸	丝 氨酸	谷 氨酸	甘 氨酸	丙 氨酸	缬 氨酸	蛋 氨酸	氨异 酸亮	亮 氨酸	酪 氨酸	氨苯 酸丙	组 氨酸	赖 氨酸	精 氨酸	色 氨酸	总 计
0	48.90	15.50	19.50	58.00	42.80	37.50	33.30	5.80	13.70	50.90	15.10	21.20	25.80	46.90	33.50	17.50	495.90
18	48.90	14.00	16.00	51.70	22.20	36.00	32.20	5.80	13.10	46.90	12.70	24.10	21.90	44.30	50.10	15.75	435.65
42	49.60	15.10	18.10	62.50	26.00	36.00	32.70	5.10	14.20	48.60	12.70	26.70	26.70	39.50	33.50	7.20	454.00
66	49.95	14.10	16.20	59.40	23.85	42.75	28.20	3.90	13.05	42.45	12.15	24.45	22.95	43.20	30.15	20.71	447.46

三、讨 论

1. 通过对外生菌根真菌8001菌株发酵条件的研究得知, 它具有生长周期短, 生长旺盛, 发酵工艺易于控制, 无需特殊的碳、氮源等诸多优点。该菌株进行工业化生产是可行的, 但需进行降低制剂生产成本的研究。

2. 采用14L 发酵罐进行菌根真菌液体深层发酵条件的研究表明, 随着培养基全氮、有机碳在发酵过程中的消耗, 培养基 pH 下降而生物量呈上升趋势, 这一结果与真菌的生理代谢规律相一致。至于发酵过程中氨基酸和糖的变化与真菌生长代谢的关系有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 郭秀珍等, 1989, 林木菌根及应用技术, 中国林业出版社, 7。
- [2] 董竞新等, 1983, 纯培养彩色豆马勃菌丝体接种国外松研究初报, 林业科学, 19(3):332。
- [3] 郭秀珍等, 1981, 松树某些外生菌根真菌对防治油松猝倒病的作用, 云南植物研究, 3(3):359~366。
- [4] Zhao, Z. P. et al., 1988, Preliminary selection of ectomycorrhizal fungi with resistance to *Rhizoctonia solani*, Proceedings of Second European Symposium on Mycorrhizae, Czechoslovak Academy of Sciences, Czechoslovak.
- [5] Song, C. H. et al., 1987, A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*, *Mycologia*, 79: 866~876.

STUDIES ON FERMENTATIVE CONDITIONS OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS—*SUILLUS GREVILLEI*

Wang Xuepin Zhao Zhipeng Guo Xiuzhen)

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract Among the fermentative conditions of *Suillus grevillei* (Kl.) Sing., optimum initial pH was 4.5~5.6, optimum working volume of 500 ml Erlenmeyer-flask was 150 ml. It is no need for the growth of *S. grevillei* to be supplied with special carbon and nitrogen sources. Study on liquid fermentation of *S. grevillei* in 14-litre fermentor demonstrated that *S. grevillei* had many advantages for producing commercial ectomycorrhizal inocula by industrial fermentation, such as short fermentation period, fast-growing rate and easy manipulation etc.

Key words ectomycorrhizae; *Suillus grevillei*; fermentative conditions