

灰树花液体深层培养条件的研究^{*}

杜 巍, 李元瑞, 袁 静, 王丽华, 过利敏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对灰树花进行深层培养, 结果表明, 液体培养基以玉米粉+ 麸皮、蛋白胨及牛肉膏为较好的碳源和氮源, 无机盐 $MgSO_4$ 、 KH_2PO_4 、 $FeSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 的组合有利于灰树花菌丝的生长。通过正交试验及培养过程中各因素对菌丝生物量影响的研究, 确定了发酵罐深层培养的最佳工艺条件, 并得出 pH 值在 5.50~ 6.50, 通气量体积比在 1.00~ 1.40 时, 菌丝生物量积累最多。

[关键词] 灰树花; 深层培养; 菌丝生物量

[中图分类号] S567.3⁺90.48

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0110-05

灰树花(*Grifola frondosa*), 隶属于担子菌亚门层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、树花菌属, 又名贝叶多孔菌、栗子蘑, 日本称“舞茸”^[1]。其子实体肉质, 鲜嫩可口, 营养丰富, 香气浓郁。据国家农业部质检中心和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所检测, 灰树花(干)含蛋白质 315.0 g/kg (其中含 18 种氨基酸, 总量为 186.6 g/kg, 人体必需氨基酸占 45.5%), 脂肪 17.0 g/kg, 粗纤维 107.0 g/kg, 碳水化合物 496.9 g/kg, 灰分 64.1 g/kg 及多种有益矿物质和维生素^[2~4], 同时, 还含有 80 g/kg 左右具有生物活性的多糖, 其主要功效是抗肿瘤, 抗 HIV 病毒, 调节血糖、血脂, 降血压和保肝^[4~7]。因此, 灰树花是一种食药两用, 很有开发前途的珍贵真菌。目前灰树花多糖及有效成分均从子实体中提取, 远远跟不上市场的需求, 进行深层发酵可通过调节培养基组成、发酵温度、时间等, 在短时间内得到大量真菌菌丝体。分析表明, 发酵得到的真菌菌丝体与农业栽培得到的真菌实体在化学组成或生理功能上均很相似^[7~11], 这就为灰树花产品的开发、研制提供了原料保障, 且深层发酵仅使用廉价的农副产品作为原料, 不需砍伐木材, 可以保护生态环境, 对实现高效农业及高新生物技术产业化具有重要的理论意义。本研究通过对灰树花液体深层培养条件的研究, 旨在确定影响灰树花深层发酵的关键因素, 以期能为深层发酵技术在灰树花上的应用提供理论依据, 同时为灰树花产品的开发和研制奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

灰树花 HSH3 菌株, 由西北农林科技大学食品科学与工程学院微生物教研室提供。

1.2 母种培养基

在 PDA 基础培养基上, 添加麸皮 60.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L。

1.3 液体基础培养基

葡萄糖 1.0 g, 麦芽糖 0.5 g, KH_2PO_4 0.1 g, $MgSO_4$ 0.05 g 加水溶解至 100 mL, V_{B_1} , V_{B_6} 和维生素 C 各加 10.0 mg/L。

1.4 培养设备

TSHZ-A 型恒温振荡器由上海跃进医疗器械厂生产; GUJS-15B 自控发酵罐由江苏镇江东方生物技术公司研制。

1.5 测定方法

1.5.1 还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸法^[5]。

1.5.2 菌丝生物量的测定 取 50 mL 培养液于离心机(转速 4 000 r/min)中离心 20 min, 湿菌丝体在烘箱(100℃)中烘干 3 h, 分析天平称重^[5,7]。

1.5.3 pH 值测定 METTLER TOLEDO pH 电极测定。

1.5.4 溶氧值测定 DO 电极测定(DO 电极由中科院上海冶金研究所研制生产)。

1.5.5 通气量体积比 通气量体积比为每分钟通入发酵罐的空气体积与发酵罐中发酵液体积的比

* [收稿日期] 2001-09-04

[作者简介] 杜 巍(1973-), 男, 甘肃天水人, 在读博士, 主要从事食品科学研究。

值。FG- I 型气体流量计测定。

1.6 摇瓶发酵试验

不同类型的培养基分装在 250 mL 摇瓶中, 每瓶装 100 mL, 接入 7 块菌种片(每片直径为 1 cm), 起始 pH 值自然, 摇床转速为 150 r/min, 25 ℃ 下在恒温振荡器上培养 5 d, 测菌丝生物量。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的优化

2.1.1 碳源对菌丝生长的影响 液体基础培养基添加 2.0 g/L 蛋白胨, 再分别添加玉米粉 20.0 g/L, 豆粉 20.0 g/L, 麸皮 22.0 g/L, 玉米粉 10.0 g/L + 豆粉 10.0 g/L, 玉米粉 10.0 g/L + 麸皮 10.0 g/L, 豆粉 10.0 g/L + 麸皮 10.0 g/L, 将不同碳源的液态培养基分装, 进行摇瓶发酵试验, 结果见图 1。

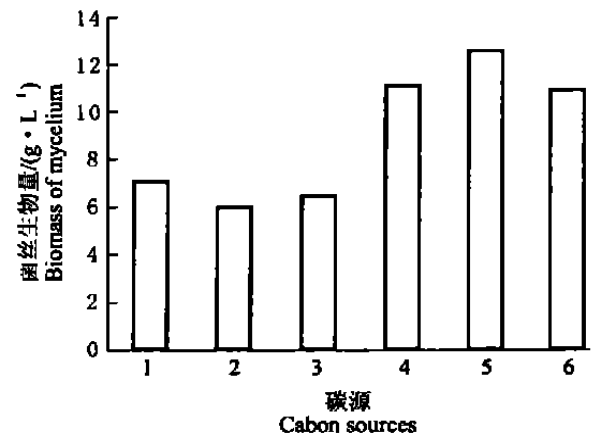


图 1 碳源与菌丝生物量的关系

1. 玉米粉; 2. 豆粉; 3. 麸皮; 4. 玉米粉+ 豆粉;
5. 玉米粉+ 麸皮; 6. 豆粉+ 麸皮

Fig. 1 Relation between carbon sources and biomass of mycelium

1. Corn powder; 2. Bean powder; 3. Bran;
4. Corn powder+ Bean powder; 5. Corn powder+ Bran;
6. Bean powder+ Bran

从图 1 可以看出, 玉米粉 10.0 g/L + 麸皮 10.0 g/L 作为碳源, 菌丝生物量最大, 菌丝球多、均匀; 以豆粉 20.0 g/L 作为碳源的菌丝生物量最小, 菌丝球少, 直径较大; 结果认为玉米粉+ 麸皮是灰树花菌丝生长的较好碳源。

2.1.2 氮源对菌丝生长的影响 液体基础培养基添加玉米粉 10.0 g/L + 麸皮 10.0 g/L, 再分别添加 7 种不同的水溶性氮源各 2.0 g/L (见表 1), 将含有不同氮源的液态培养基分装, 进行摇瓶发酵试验, 结

果见表 1。

表 1 不同氮源对菌丝生物量的影响

Table 1 Effect of different N Nitrogen sources on biomass of mycelium

序号 No.	氮源 Nitrogen sources	菌丝生物量/(g·L ⁻¹) Biomass of mycelium
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.021
2	尿素 Urea	1.345
3	NH ₄ Cl	2.021
4	酵母粉 Yeast powder	10.022
5	牛肉膏 Beef cream	11.625
6	蛋白胨 Pep tone	11.961
7	NH ₄ NO ₃	2.874

表 1 结果显示, 灰树花菌株对无机氮源利用不好, 而有机氮源中以蛋白胨、牛肉膏的利用效果最好。

2.1.3 无机盐对菌丝生长的影响 以玉米粉 10.0 g/L, 麸皮 10.0 g/L, 蛋白胨 2.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, 麦芽糖 5.0 g/L, V_{B1}, V_C 和 V_{B6} 各 10.0 mg/L 为基础培养基, 再分别按可溶性无机盐的序号 (表 2) 加入不同的无机盐, 进行摇瓶发酵试验, 结果见图 2。

表 2 可溶性无机盐

Table 2 Soluble inorganic salt

序号 No.	无机盐 Inorganic salt
1	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L
2	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + NaCl 0.5 g/L
3	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + FeSO ₄ 0.2 g/L
4	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + FeSO ₄ 0.2 g/L + ZnSO ₄ 0.2 g/L
5	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + FeSO ₄ 0.2 g/L + ZnSO ₄ 0.2 g/L + CuSO ₄ 0.2 g/L
6	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + FeSO ₄ 0.2 g/L + ZnSO ₄ 0.2 g/L + CuSO ₄ 0.2 g/L + CaCl ₂ 1.0 g/L
7	MgSO ₄ 0.5 g/L + KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L + FeSO ₄ 0.2 g/L + ZnSO ₄ 0.2 g/L + CuSO ₄ 0.2 g/L + Na ₂ SO ₄ 0.25 g/L
8	FeSO ₄ 0.2 g/L + ZnSO ₄ 0.2 g/L + CuSO ₄ 0.2 g/L + Na ₂ SO ₄ 0.25 g/L
9	无无机盐 No inorganic salt (CK)

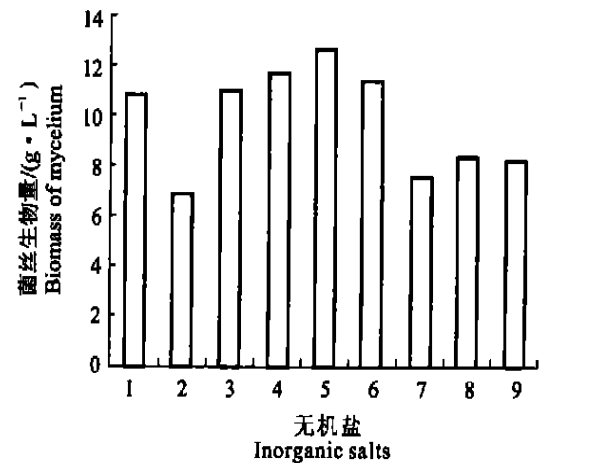


图 2 无机盐与菌丝生物量的关系

Fig. 2 Relation between inorganic salts and biomass of mycelium

从图 2 可知,培养基中添加 Na^+ 对灰树花菌丝的生长不利, Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} 对灰树花菌丝生长的影响很大,能促进菌丝的生长;同时,灰树花菌丝的生长对 Fe , Zn , Cu 等均有要求。从试验结果中可知, $\text{MgSO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4 + \text{CuSO}_4$ 对灰树花菌丝生长最有利。

2 2 发酵罐深层培养工艺条件的优化

摇瓶培养好的液体菌种待用,以发酵温度、起始pH、发酵罐的机械搅拌转速、液体接种量为影响因素,通过四因素三水平的正交试验确定在发酵罐中灰树花深层培养的最佳条件,结果见表 3。

表 3 试验方案与结果分析
Table 3 Testing scheme and result analysis $L_9(3^4)$

试验号 No.	因 素 Factor				菌丝生物量/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Biomass of mycelium
	培养温度/ Culture temperature A	起始pH 值 Original pH B	转速/($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) Rotation speed C	接种量/% Putting in volume quantity D	
1	1(20)	1(4.5)	1(100)	1(5)	4.470
2	1(20)	2(5.5)	2(150)	2(10)	5.894
3	1(20)	3(6.5)	3(200)	3(15)	4.285
4	2(25)	1(4.5)	2(150)	3(15)	12.357
5	2(25)	2(5.5)	3(200)	1(5)	7.743
6	2(25)	3(6.5)	1(100)	2(10)	14.974
7	3(30)	1(4.5)	3(200)	2(10)	10.033
8	3(30)	2(5.5)	1(100)	3(15)	8.412
9	3(30)	3(6.5)	2(150)	1(5)	9.925
K_1	14.649	26.860	27.856	22.138	$\Sigma = 78.093$
K_2	35.074	22.049	28.176	30.901	
K_3	28.370	29.184	22.061	25.054	
k_1	4.883	8.953	9.285	7.379	
k_2	11.691	7.350	9.392	10.300	
k_3	9.457	9.726	7.354	8.351	
优水平 Excellent level	A_2	B_3	C_2	D_2	
R_j	6.808	2.376	2.038	2.921	
主次顺序 Primary and secondary sequence			ADBC		

从表 3 可以看出,4 个因素影响灰树花菌丝生物量的大小关系为 $A > D > B > C$,温度的影响最大,转速的影响最小;在发酵罐中灰树花深层培养的最佳条件组合为 $A_2B_3C_2D_2$,即:最佳发酵温度 25 ,起始 pH 值 6.5,搅拌转速 150 r/min,接种量 10%。

最低点时也是细胞生长对数期(快速生长期)向稳定期转变的时期,这时菌丝生长最为旺盛,菌丝粗壮,菌丝球数量多。因此,在灰树花的深层培养过程中,可以把 pH 值的变化作为判断培养终点的参考指标之一。

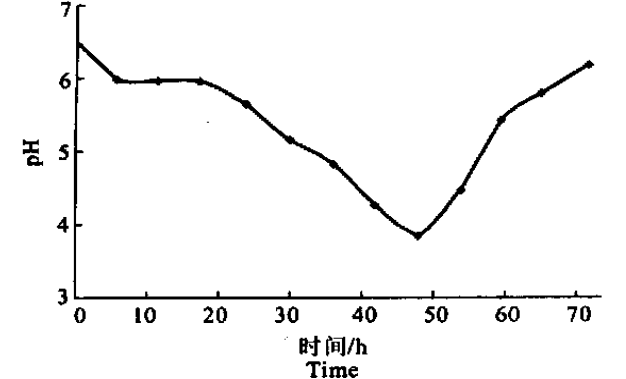


图 3 培养过程中 pH 变化的情况

Fig 3 Variation of pH in culture process

2 3 灰树花深层发酵过程中各因素的变化

2 3 1 pH 的变化规律 从图 3 可以看出,随着培养时间的延长,pH 值开始逐渐下降,至 4 左右后又逐渐回升,据试验中对菌丝的取样检查,发现 pH 值

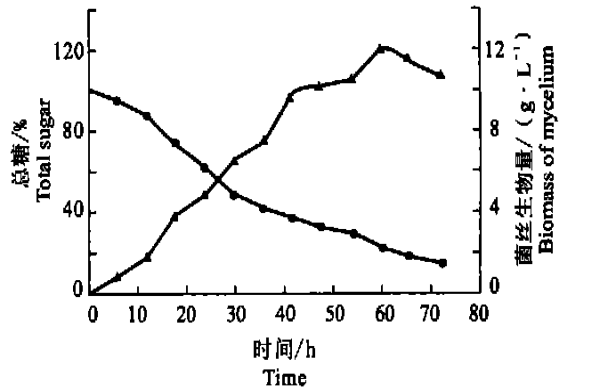


图 4 深层培养过程中总糖和菌丝生物量的变化情况

- · - 总糖; - ▲ - 菌丝生物量

Fig 4 Variation of total sugar and biomass of mycelium in culture process

- · - Total sugar; - ▲ - Biomass of mycelium

2.3.2 总糖及菌丝生物量的变化 培养过程中总糖变化对应着菌丝生长消耗的过程, 见图4。从图4中可以看出, 菌丝生物量达到最大是在培养60 h后。而pH值的最低点是在培养50 h左右, 这是因为菌丝细胞生长进入稳定期, 细胞的代谢作用逐渐减弱, 而菌丝的浓度还在缓慢增加, 因此, 菌丝浓度达到最大值应该晚于pH值最低点出现的时间。以上结果表明, 糖的消耗和菌丝的增加主要发生在对

数生长期。

2.3.3 pH和通气量对菌丝生物量的影响 通过pH值和通气量体积比的两因子随机区组试验, 研究pH和通气量对菌丝生物量的影响。试验的pH值为4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5和7.0, 通气量体积比为0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2和1.4, 在优化的深层培养条件下, 发酵72 h, 试验结果见图5。图5中曲线上的各数字表示所对应的菌丝生物量(g/L)。

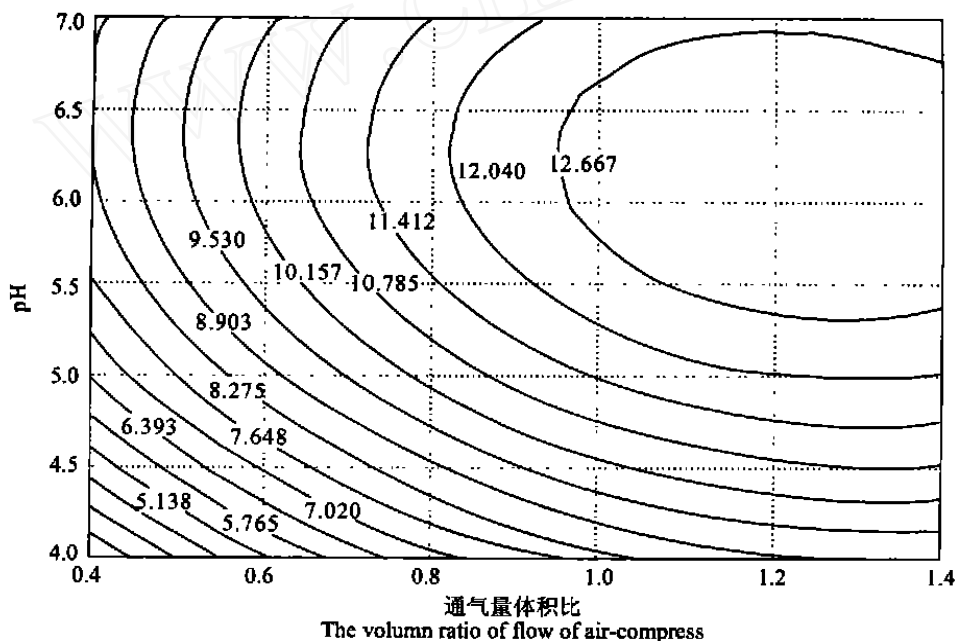


图5 pH和通气量对菌丝生物量影响的等高线图

Fig 5 Contour map of effect of pH and flow of air on biomass of mycelium

从图5可以看出, pH值在4.50~6.50, 通气量体积比在0.80~1.40时, 菌丝均能正常生长; pH值在5.50~6.50, 通气量体积比在1.00~1.40时菌丝生物量积累最多。由此可知, 灰树花适宜在微酸性的培养基中生长, 是一种好氧型的食(药)用菌。

对上述试验结果进行回归分析, 所得回归方程为:

$$y = 0.2321 + 5.4545X_1 + 0.9808X_2$$

式中, y 为菌丝相对生长量(干重); X_1 为通气量; X_2 为pH值。

经显著性检验: 最终方程的复相关系数 $R = 0.7209$; 剩余标准差 $S = 0.0921$; 检验统计量 $F = 11.362 > F_{0.01} = 5.78$, 有显著性差异。故可作出结论: pH和通气量对深层发酵过程中灰树花菌丝体生长的影响是很显著的。

3 结 论

在灰树花的深层培养中, 玉米粉 10.0 g/L + 麸皮 10.0 g/L 是较好的碳源, 蛋白胨 2.0 g/L 、牛肉膏 2.0 g/L 是较好的氮源, 加入无机盐的组合为 $\text{MgSO}_4 0.5 \text{ g/L} + \text{KH}_2\text{PO}_4 1.0 \text{ g/L} + \text{FeSO}_4 0.2 \text{ g/L} + \text{ZnSO}_4 0.2 \text{ g/L} + \text{CuSO}_4 0.2 \text{ g/L}$ 时, 有利于灰树花菌丝的生长。

灰树花在发酵罐中进行深层培养的最佳条件是发酵温度 25°C , 起始pH值6.5, 搅拌转速 150 r/min , 接种量10%。

灰树花深层培养过程中, pH和通气量对菌丝的生长有极显著的影响, pH值在5.50~6.50, 通气量体积比在1.00~1.40时, 菌丝生物量积累最多。

[参考文献]

- [1] 张光亚 中国常见食用菌图谱[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1999
- [2] 郑建仙 功能性食品(第一卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995
- [3] 郑建仙 功能性食品(第二卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [4] 邢增涛, 周昌艳, 潘迎捷, 等. 灰树花多糖研究进展[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 54- 58
- [5] 杨新美 食用菌研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [6] 汪维云, 朱金华. 食用菌液体深层发酵技术研究进展及展望[J]. 中国食用菌, 1998, 17(2): 11- 12
- [7] 裘娟萍, 孙培龙, 朱家荣, 等. 灰树花深层培养基的研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 275- 278
- [8] Hirata A, Adachi Y. Monoclonal antibody to proteoglycan derived from *Grifola frondosa*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1994, 17(4): 539- 543
- [9] Ohno N, Hayashi M. Effect of glucans on the antitumor activity of grifolan[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(50): 2149- 2151
- [10] Nanba H, Hamaguchi A, Kuroda H. The chemical structure of antitumor polysaccharide in fruitbodies of *Grifola frondosa*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35(3): 1162- 1168
- [11] Ohno N, Adachi Y. Characterization of the antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(4): 1709- 1715

Study on the conditions of submerged culture of *Grifola frondosa*

DU Wei, LI Yuan-rui, YUAN Jing, WANG Lihua, GUO Limin

(College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: By submerged culture of *Grifola frondosa*, the results showed the optimum carbon source was corn powder + bran, the optimum nitrogen source was peptone and beef cream and the optimum inorganic salt was the combination of $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$ in liquid culture medium, which was beneficial to mycelium growing. By orthogonal experiments and the research on the influencing factors of biomass of mycelium, the best technical condition of submerged culture was gained. In addition, at pH 5.50- 6.50 and the volume ratio of flow of air-compress at 1.00- 1.40, the biomass of mycelium reached the highest level.

Key words: *Grifola frondosa*; submerged culture; biomass of mycelium