

# 灰树花深层发酵培养基的研究

裘娟萍 孙培龙 朱家荣 钟卫鸿

(浙江工业大学生物与环境学院 杭州 310014)

**摘要:** 灰树花具有较宽广的碳源谱和氮源谱,其最佳碳源为马铃薯汁加葡萄糖,最佳氮源为麸皮。在有生长促进剂-板栗壳煮汁作用下,菌丝的增产率达 140%。培养基的氮源种类和生长促进剂对菌丝生长具显著的影响,两者交互作用明显。培养基中碳源浓度过高不利于菌丝的生长。灰树花深层发酵的较佳培养基为 QF 培养基:葡萄糖 60g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g 板栗壳煮汁 150g, 水 1L。

**关键词:** 灰树花, 发酵, 培养基

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0275-04

## STUDY ON MEDIUM OF SUBMERGED CULTURE FOR *GRIFOLA FRONDOSA*

QIU Juan-Ping, SUN Pei-Long, ZHU Jia-Rong, ZHONG Wei-Hong

(Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

**Abstract:** *Grifola frondosa* takes advantage of rich sources of carbon and nitrogen. The optimum carbon source and nitrogen source are potato juice with glucose and wheat bran respectively. When there was a growth promoter-juice of Chinese chestnut shell in the medium, the mycelial growth rate reach 140%. The kinds of nitrogen and growth promoter influenced mycelial growth obviously, and there were obvious effects with each other, too. The concentration of carbon source was too high in the medium was unfavorable to growth. In addition, the better submerged culture medium of *Grifola frondosa* was QF: glucose 60g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g, juice of Chinese chestnut shell 150g, water 1L.

**Key words:** *Grifola frondosa*, Fermentation, Medium

灰树花是一种珍奇食用菌,据报道灰树花子实体的营养价值比香菇高<sup>[1]</sup>。国内外有关专家多年研究证实;灰树花具有增强机体免疫力,抑制肿瘤、病毒,降低血压等功效;从灰树花深层发酵液和菌丝体中提取的多糖与子实体中提取的多糖具有同样的抑制肿瘤、提高机体免疫功能的作用<sup>[1~3]</sup>。用深层发酵法生产灰树花的菌丝体并开发相应产品,不仅可使灰树花生产工业化,更有意义的是深层发酵应用廉价的农副产品作原料不需砍伐木材,可以保护生态环境。

灰树花深层发酵的关键是培养基。本文对培养基的碳源、氮源及生长促进剂进行了选择,对培养基碳源、氮源的浓度,培养基各成分的交互作用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 灰树花 (*Grifola frondosa*) 由福建省三明市食品工业研究所提供。

收稿日期: 1999-02-01, 修回日期: 1999-06-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**1.1.2 培养基:** (1) 平板培养基 (以下简称 SF 培养基): PDA 培养基 1L 加蛋白胨 10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g. (2) 固体种子培养基: 杂木屑 340g, 棉籽壳 340g, 麸皮 100g, 玉米粉 100g, 土壤 100g, 葡萄糖 20g, 石膏 10g, 水 630g. (3) 液体种子培养基 (以下简称 MF 培养基): PDA 1L 加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g, 板栗壳煮汁 150g. (4) 摇瓶发酵培养基 (以下简称 HF 培养基): MF 中加 2% 的麸皮. (5) 发酵培养基 (以下简称 QF 培养基).

## 1.2 方法

**1.2.1 平板培养法选择碳源及氮源:** 在不同培养基平板中央接种适量菌丝, 25℃ 培养 10d, 用游标尺测菌丝长度. 溶解培养基, 热水充分洗涤, 60℃ 烘干后测菌丝干重.

**1.2.2 摇瓶试验选择培养基成分:** 摇瓶装量: 100mL / 250mL 三角瓶; 12 层纱布作通气塞; 25℃; 摇床转速 100r/min; 接种量 10%; 培养时间 7d.

**1.2.3 种子液制备:** 斜面菌丝块接入固体培养基 (250mL 三角瓶装量约 30g), 25℃ 培养 15d, 用不锈钢匙挑约 2g 至 MF 液体中 (装量 150mL / 500mL 三角瓶, 25℃, 100r/min) 培养 5d.

**1.2.4 生物量测定:** (1) 离心分离法: 发酵液 3500r/min, 离心 20min, 菌丝体 60℃ 烘至恒重, 称干重. (2) 过滤分离法: 发酵液用 100 目的尼龙滤布, 菌丝体 60℃ 烘至恒重, 称干重.

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳源的选择

SF 培养基中马铃薯和葡萄糖改成不同的碳源物质 (糖含量 4%), 用平板法选择碳源, 结果证实灰树花的碳源谱较广, 有葡萄糖、番薯粉、马铃薯、玉米粉、可溶性淀粉、麦芽汁、大米粉、果糖、蔗糖等. 用相同的培养基对前 5 种碳源进行摇瓶复筛. 经生物量测定得知, 葡萄糖是最佳的单一碳源, 菌丝干重达 0.68g/100mL, 但马铃薯与葡萄糖组成的复合碳源菌丝干重达 0.91g/100mL.

### 2.2 氮源的选择

以 PDA 为基础培养基进行不同氮源 (含量: 1% 水解液) 初筛、复筛, 结果发现麸皮、花生粉、蚕蛹粉、蛋白胨、豆饼粉是灰树花生长较佳的氮源, 其中麸皮最好, 菌体干重达 1.68g/100mL; 而尿素、菜籽饼粉为较差氮源.

### 2.3 生长促进剂的选择

在 PDA 培养基中添加一些植物煮汁或其它有机物, 用摇瓶试验这些物质对灰树花生长的促进作用, 结果见表 1.

表1 生长促进剂的促进作用

生长促进剂	菌丝干重	菌丝增产率 ([菌丝干重-对照]/对照)
15% 板栗壳煮汁	1.01	140%
15% 枇杷叶煮汁	0.3	-28%
0.15% 酵母膏	0.68	62%
15% 杂木屑煮汁	0.5	19%
15% 棉子壳煮汁	0.67	59%
1.5% 豆油	0.48	14%
15% 土壤煮汁	0.62	47%
PDA 对照	0.4	0

由表 1 可见, 板栗壳对灰树花生长具有明显的促进作用, 酵母膏和棉子壳对灰树花的生长也具一定的促进作用. PDA 培养基中添加板栗壳煮汁及无机盐建立了 MF 培养基.

### 2.4 培养基成分的组合试验

通过单因素试验, 选出了较佳的碳源、氮源和生长促进剂各 3 种. 用正交试验进行组合试验, 结果见表 2.

(1) 对组合试验进行直观分析和偏差分析: 最佳组合与最优组合均为葡萄糖、麸皮和板栗壳. (2) 由表 2 的极差可见, 碳源、氮源和生长促进剂对产量的影响大小为  $C > A > B$ , 但差异不明显.

### 2.5 培养基碳氮比试验

**2.5.1 固定碳源比例改变氮源比例:** 以 MF 为基础培养基, 添加不同浓度的麸皮, 结果增加培养基中氮含量有利于菌丝干重的增加. 但当麸皮含量大于 3% 时, 发酵终止时培养基仍浑浊, 这说明麸皮没有完全被利用. 因此麸皮含量可取 3%.

表2 培养基成分的不同组合对菌丝含量的影响

试验号	A因素 (碳源)	B因素 (氮源)	C因素 (生长促进剂)	Sel	菌丝干重 (g/100mL)
1	20%马铃薯	1.0%蛋白胨	15%板栗壳煮汁	1	1.26
2	20%马铃薯	1.0%花生粉水解液	0.15%酵母膏	2	0.82
3	20%马铃薯	1.0%麸皮水解液	15%棉子壳煮汁	3	0.99
4	5%葡萄糖	1.0%蛋白胨	0.15%酵母膏	3	0.88
5	5%葡萄糖	1.0%花生粉水解液	15%棉子壳煮汁	1	1.77
6	5%葡萄糖	1.0%麸皮水解液	15%板栗壳煮汁	2	2.86
7	4%番薯粉	1.0%蛋白胨	15%棉子壳煮汁	2	0.98
8	4%番薯粉	1.0%花生粉水解液	15%板栗壳煮汁	3	1.23
9	4%番薯粉	1.0%麸皮水解液	0.15%酵母膏	1	1.16
K1	3.07	3.12	5.35	4.19	
K2	5.51	3.82	2.84	4.66	
K3	3.37	5.01	3.74	3.10	
k1	1.02	1.04	1.78	1.40	
k2	1.84	1.27	0.95	1.55	
k3	1.12	1.67	1.25	1.03	
R	0.82	0.63	0.83	0.52	

表3 L<sub>2</sub>(2)<sup>7</sup>正交表表头设计

水平因素	A(碳源)	B(氮源)	A×B	C(促进剂)	A×C	B×C	D
I	3%葡萄糖+ 20%马铃薯汁	3%麸皮水解液		15%板栗壳煮汁			
II	6%葡萄糖	2%花生粉水解液		0.15%酵母			

表4 培养基成分交互试验结果

试验号因素	A	B	A×B	C	A×C	B×C	D	菌丝干重 (g/100mL)		合计
								I	II	
1	1	1	1	1	1	1	1	1.29	1.48	2.77
2	1	1	1	2	2	2	2	1.15	0.95	2.1
3	1	2	2	1	1	2	2	1.10	0.99	2.09
4	1	2	2	2	2	1	1	0.81	0.71	1.51
5	2	1	2	1	2	1	2	1.63	1.33	2.96
6	2	1	2	2	1	2	1	1.10	1.00	2.10
7	2	2	1	1	2	2	1	0.89	0.88	1.86
8	2	2	1	2	1	1	2	1.27	1.12	2.39
K1	8.48	9.93	9.12	9.68	9.35	9.64	8.25			
K2	9.31	7.86	8.67	8.11	8.44	8.15	9.54			
k1	2.12	2.48	2.28	2.42	2.34	2.41	2.06			
k2	2.33	1.96	2.17	2.03	2.11	2.04	2.38			
R	0.21	0.52	0.11	0.39	0.23	0.37	0.32			

2.5.2 固定氮源比例改变碳源比例:以 HF 为基础培养基,改变其中葡萄糖的含量,观察不同碳

氮比对灰树花生长的影响,结果培养基中葡萄糖浓度以 6% 为宜,菌丝量达 1.74%,碳氮比过

高不利于菌丝的生长。

## 2.6 培养基成分的交互试验

对培养基成分的组合试验进行方差分析, 结果说明碳源、氮源和生长促进剂对产量影响不显著。这与单因素试验结果不符, 说明培养基的各种成分之间存在着一定的交互效应。选  $L_8(2)^7$  正交表考察培养基中碳源、氮源和生长促进剂之间的交互作用。表头设计见表 3, 试验结果见表 4。

培养基成分交互试验结果的方差计算结果说明: (1) 氮源对菌丝量影响特别显著, 生长促进剂对菌丝产量有显著的影响。氮源与生长促进剂之间的交互作用比较大。(2) A 因素的两种水平(葡萄糖 + 马铃薯和葡萄糖)对产量影响不大, 为简化工艺可以选择 2 水平: 葡萄糖。(3) 比

较氮源与生长促进剂之间的不同组合对菌丝产量的影响, 以  $B_1C_1$  为佳。因此灰树花深层发酵培养基中主要成分的最佳组合为 6% 葡萄糖、3% 麸皮、15% 板栗壳煮汁; 由此建立了 QF 培养基。

## 2.7 培养基验证试验

QF 培养基经 4 次试验平均生物量达 1.65g/100mL。

## 参 考 文 献

- [1] 吴学谦. 江苏食用菌, 1994, 15(4): 29~30.
- [2] 黄幸纾. 中国食用菌, 1994, 13(1): 41~43.
- [3] 赵铭泽. 中国食用菌, 1994, 13: 6.
- [4] Adachi K, Nanba H, Otsuka M *et al.* Chem. Pharm. Bull, 1988, 36(3): 1000~1006.
- [5] Ohno N, Adachi Y, Suzuki I *et al.* Chem. Pharm. Bull, 1986, 34(4): 1709~1715.