

邓功成,赵 洪,高礼安,等. 灰树花菌丝体液体发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):216-218.

灰树花菌丝体液体发酵条件优化

邓功成,赵 洪,高礼安,李永波,马 媛,黎娇凌,李 静

(黔南民族师范学院生命科学系,贵州都匀 558000)

摘要:采用现代液体发酵技术和正交试验方法,研究碳源、氮源、pH 值和时间等发酵条件对灰树花菌丝体干重的影响,并对发酵条件进行了优化组合。结果表明:灰树花菌丝体液体发酵条件较优组合碳源为玉米粉 4%,氮源为豆粕粉 0.2%,起始 pH 值 7.0,发酵时间 6 d,菌丝产量最高为 12.120 g/L。

关键词:灰树花;菌丝体;液体发酵

中图分类号: S646.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0216-03

灰树花(*Grifola frondosa*)别称贝叶多孔菌、栗子蘑、千佛菌、重菇、莲花菇、舞茸等^[1],在真菌分类系统中属于 Basidiomycotina, Hymenomyces, Aphyllophorales, Polyporaceae, *Grifola*^[2]。其子实体富含人体必需的氨基酸、多种维生素和微量元素,具有较高的营养价值,幼时肉质柔软,脆嫩味美,深受人们青睐;灰树花子实体还含 β -葡聚糖,有预防糖尿病、抗肿瘤和抗艾滋病病毒的作用,有较高的药用价值^[3],是有开发前景的珍稀食用大型真菌,被人们视为食用菌中的珍品。由于自然界中的野生灰树花数量极少,并逐年减少,人工栽培目前还未实现规模生产,目前采用液体发酵技术^[4]是获得灰树花菌丝体和发酵产物的重要手段,探索碳源、氮源、pH 值和时间等条件对灰树花菌丝体液体发酵的影响,为工业化生产提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 灰树花(*Grifola frondosa*),由黔南民族师范学院微生物实验室提供。

1.1.2 培养基 (1)改进 PDA 培养基。在 PDA 培养基配方中加入 0.2% 酵母膏。(2)完全培养基(液体)。配方为:葡萄糖 2%,蛋白胨 0.2%,磷酸二氢钾 0.046%,磷酸氢二钾 0.1%,硫酸镁 0.05%,维生素 B 10.003 mg/100 mL, pH 值 6.5。(3)液体种子培养基。配方同(1),去掉培养基中的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 种子制备 (1)斜面种子(一级种)制备。由保藏菌株常规转管于“1.1.2”改进 PDA 培养基繁殖而成;(2)液体种子制备。用 250 mL 三角瓶装“1.1.2”液体种子培养基 100 mL,无菌条件接入约 0.5 cm × 0.5 cm 灰树花一级种 3 片,置 25 ℃,150 r/min 恒温振荡培养器培养 5 d,即为液体菌种。

1.2.2 灰树花菌丝体液体发酵单因素试验

1.2.2.1 灰树花菌丝体生长曲线绘制 用 250 mL 三角瓶作培养容器,装“1.1.2”完全培养基 100 mL,共装 30 瓶,常规高压灭菌后,无菌条件接种 10 mL 液体菌种,置恒温振荡培养器于 25 ℃、150 r/min 条件培养,从接种培养 1 d 后开始,每天取 3 瓶,测量发酵液 pH 值和菌丝干重,共观察 10 d。

以下单因子试验用 250 mL 三角瓶作培养容器,装相应培养基 100 mL,无菌条件接种 10 mL 液体菌种,置恒温振荡培养器于 25 ℃、150 r/min 条件培养 6 d 后,测量发酵液 pH 值和菌丝干重。

1.2.2.2 碳营养试验 用单糖(甘露醇、山梨醇)、双糖(麦芽糖、蔗糖)、多糖(玉米粉、可溶性淀粉、马铃薯粉)。分别代替“1.1.2”完全培养基中的葡萄糖,以不加碳源为对照,共 9 个处理(包括葡萄糖),重复 3 次。

1.2.2.3 氮营养试验 选用有机氮:酵母膏、尿素、甘氨酸、豆粕粉。无机氮:氯化铵、硫酸铵、硝酸铵分别代替“1.1.2”(2)培养基中的蛋白胨,以不加氮源为对照,共 9 个处理(包括蛋白胨),重复 3 次,观测不同氮源对灰树花菌丝生长的影响。

1.2.2.4 pH 值试验 用“1.1.2”完全培养基,用 10% NaOH 和 10% HCl 调 pH 值,设 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 等 8 个梯度处理,3 次重复,观测不同 pH 值对灰树花菌丝生长的影响。

1.2.3 菌丝体发酵条件优化正交试验 根据单因素试验结果,采用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验^[5]优化发酵条件。

1.2.4 测定方法

1.2.4.1 菌丝干重测定方法 将发酵液置于 3 000 r/min 条件,离心 10 min 后,去上清液,用无菌水充分清洗菌丝体至无培养液后,再置于 3 000 r/min 条件,离心 10 min,取菌丝体置于吸水纸上吸干表面水分后,放入干净的培养皿中,置 60 ℃ 恒温干燥箱内将其烘干至恒重,用电子天平称其干重。

1.2.4.2 pH 值测定 采用 pH S-25A 型数字酸度计测量发酵液 pH 值。

2 结果与分析

2.1 灰树花菌丝体液体发酵单因素试验结果

2.1.1 灰树花菌丝体生长曲线 以培养时间为横坐标,菌丝

收稿日期:2013-04-12

基金项目:贵州省教育厅自然科学重点项目[编号:黔教合 KY(2012)067 号];黔南民族师范学院微生物学重点学科资助项目(编号:2011,6)。

作者简介:邓功成(1955—),男,重庆大足人,硕士,教授,从事微生物学与植物保护教学和研究。E-mail: denggc@yeah.net。

干重为纵坐标得灰树花菌丝体生长曲线(图 1)。菌丝在完全培养基中培养 3 d 后进入增长期,6 d 菌丝干重达最高,1 L 发酵液中菌丝体干重为 7.672 g,培养 8 d 菌丝干重明显下降。结果表明:作为灰树花菌丝体液体发酵生产液体种子培养 5 d 为宜,收获菌丝需培养 6 d,收获代谢产物需培养 8 d。

在发酵体系中 pH 值随发酵时间的增加而下降,pH 值由初始 6.5 至 10 d 降为 3.9(图 2),可能是由于菌体代谢过程中产生有机酸等物质所致。

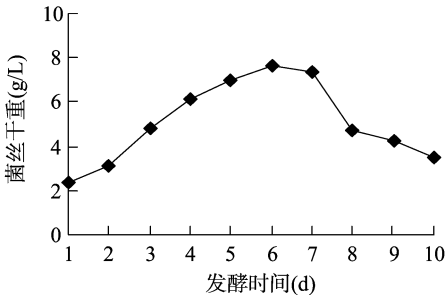


图1 灰树花菌丝体生长曲线

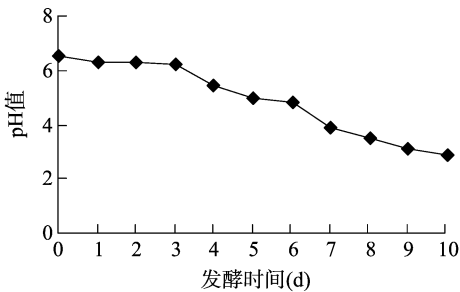


图2 灰树花菌丝体发酵体系中pH值变化曲线

2.1.2 碳源对灰树花菌丝体生长的影响 表 1 结果表明,灰树花菌丝体对碳源的利用比较广泛,单糖、双糖、多糖都能利用。在供试的单糖中,利用葡萄糖最好,1 L 发酵液菌丝干重达 6.627 g,对甘露醇、山梨醇利用较差;在供试的双糖中,灰树花菌丝体对麦芽糖的利用最好,1 L 发酵液中菌丝干重为 6.442 g,蔗糖仅为 3.231 g;在供试的多糖中,玉米粉是灰树花菌丝体最好碳源,1 L 发酵液中菌丝干重为 5.895 g,其次是马铃薯粉,可溶性淀粉最差。统计结果分析,不同碳源对灰树花菌丝体生长的影响存在极显著差异。葡萄糖是供试碳营养中菌丝干重最高的碳源,但它的菌丝干重与麦芽糖、玉米粉没有显著差异,从经济成本考虑,玉米粉作为碳源,来源广泛,成本低廉,经济实惠,在规模化生产中可选用玉米粉作为灰树花菌丝体液体发酵的碳源。

供试的不同碳源起始 pH 值均为 6.5,发酵终止 pH 值为 4.4~4.9,pH 值呈下降趋势,可能是发酵体系中氧气消耗和有机酸积累所致。

2.1.3 氮源对灰树花菌丝体生长的影响 表 2 结果显示,灰树花菌丝体对供试的有机氮和无机氮都可利用,总体上看菌丝体对有机氮的利用好于无机氮。在供试的有机氮营养中,灰树花菌丝体对豆饼粉的利用最好,1 L 发酵液中菌丝体干重为 6.322 g,其次是酵母膏,再次是蛋白胨,对甘氨酸和尿素的利用都较差,菌丝干重接近对照。灰树花菌丝体对供试的 3 种无机氮源利用较差,菌丝干重均较低,1 L 发酵液菌丝干

表 1 不同碳源对灰树花菌丝体干重的影响

碳源	发酵终止 pH 值	菌丝干重 (g/L)	菌丝干重差异显著性	
			0.05	0.01
葡萄糖	4.9	6.627	a	A
麦芽糖	4.7	6.442	a	A
玉米粉	4.5	5.859	a	A
马铃薯粉	4.5	4.046	b	B
可溶性淀粉	4.7	3.975	b	B
山梨醇	4.7	3.288	bc	B
蔗糖	4.4	3.231	bc	B
甘露醇	4.7	3.103	c	B
对照	4.5	1.474	d	C

注:方差分析 $F=41.147^{**}$ 。

表 2 不同氮源对灰树花菌丝体干重的影响

碳源	发酵终止 pH 值	菌丝干重 (g/L)	菌丝干重差异显著性	
			0.05	0.01
豆饼粉	4.31	6.322	a	A
酵母膏	3.82	3.519	b	B
蛋白胨	3.27	3.271	bc	B
硫酸铵	3.29	2.362	c	C
氯化铵	3.10	2.285	c	C
硝酸铵	3.12	2.152	cd	C
甘氨酸	3.27	1.751	cd	C
尿素	3.21	1.520	d	C
对照	3.06	1.131	d	D

注:方差分析 $F=45.796^{**}$ 。

重在 2.4 g 以下。供试氮源的菌丝干重经方差分析和多重比较,豆饼粉与其他氮源间存在极显著差异,豆饼粉价廉物美,生产上可选用豆饼粉作为灰树花菌丝体液体发酵的氮源。

2.1.4 pH 值对灰树花菌丝体生长的影响 试验结果表明,灰树花菌丝体对 pH 值的适应范围较广,发酵起始 pH 值 3~10 范围内均能生长(图 3)。培养 6 d 后,起始 pH 值 6 处理菌丝干重最高,达 6.753 g/L。发酵体系的酸碱度对菌丝吸收营养物质的影响很大,pH 值通过影响细胞膜的通透性、细胞膜结构的稳定性、物质的溶解性和电离性影响营养物质的吸收,从而影响微生物的生长速率及菌丝体的产量。

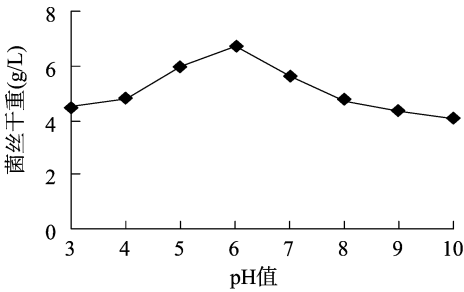


图3 不同pH值对灰树花菌丝体干重的影响

2.2 灰树花菌丝体液体发酵条件优化

根据单因素试验结果,综合考虑原料来源和经济成本,选择玉米粉作为碳源(A)、豆饼粉作为氮源(B)、pH 值(C)、发酵时间(D)等 4 因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以菌丝体干重为评价指标,对灰树花菌丝体液体发酵条件进行优化。试验设

计见表 3、表 4。

从表 4 看出,处理 7 发酵条件组合的菌丝体量最高。表明发酵较优条件为:碳源玉米粉,浓度为 4%;氮源豆饼粉,浓度为 0.2%;起始 pH 值为 7;培养时间 6 d。正交试验结果经方差分析,试验处理间菌丝产量有极显著差异。碳源玉米粉 $R=5.170$ 为最大,说明灰树花菌丝体液体发酵碳源对菌丝体产量的影响比其他因素大。根据表 4 各因素 R 值的大小,把各因素对灰树花菌丝体液体发酵产量的影响主次排列(图 4)。

表 3 灰树花菌丝体液体发酵 $L_9(3^4)$ 正交试验设计因素及水平

水平	因素			
	A:碳源 玉米粉(%)	B:氮源 豆饼粉(%)	C:pH 值	D:发酵时间 (d)
1	2	0.2	5	5
2	3	0.3	6	6
3	4	0.4	7	7

表 4 灰树花菌丝体液体发酵条件优化 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

处理	A	B	C	D	菌丝干重 (g/L)	F
1	1	1	1	1	5.381	39.300 **
2	1	2	2	2	7.451	
3	1	3	3	3	6.629	
4	2	1	2	3	9.847	
5	2	2	3	1	10.215	
6	2	3	1	2	10.362	
7	3	1	3	2	12.120	
8	3	2	1	3	11.684	
9	3	3	2	1	11.163	
k_1	6.487	9.116	9.142	8.920		
k_2	10.141	9.783	9.487	9.978		
k_3	11.657	9.385	9.655	9.387		
R	5.170	0.667	0.513	1.058		

3 讨论与结论

灰树花菌丝体液体发酵对碳源的适应较广,但灰树花菌

主 次

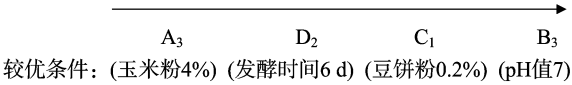


图 4 灰树花菌丝体液体发酵试验因素主次排列与较优条件

丝体在葡萄糖碳源中生长最好,菌丝体干重最高,符合一般真菌对碳源需求的特点。试验结果,玉米粉是灰树花菌丝体液体发酵良好的碳源,虽然菌丝干重不及葡萄糖高,但经统计分析玉米粉作碳源与葡萄糖作碳源菌丝体产量没有显著差异,玉米粉价格低廉,取材容易,在工业化生产中可以代替葡萄糖作为碳源。

灰树花菌丝体液体发酵对氮源的适应较广,有机氮利用好于无机氮。灰树花菌丝体在豆饼粉纯天然的氮源中生长好于蛋白胨、酵母膏等价格较贵的氮源物质,菌丝干重最高。可能是豆饼粉含有丰富的蛋白质及多种生长刺激因子,还可能是灰树花菌丝体分泌的蛋白酶比较适合这类天然植物蛋白,相关机理还有待进一步深入研究,生产上完全可利用这类农副产品作为灰树花液体发酵的氮源物质,对再生资源的开发利用,延长产业链,节约成本有重要意义。

试验结果,灰树花菌丝体液体发酵条件较优组合为:玉米粉作碳源,浓度为 4%;豆饼粉作为氮源,浓度为 0.2%,发酵起始 pH 值为 7,培养时间为 6 d,在 25℃ 温度条件下,菌丝产量干重最高,达 12.120 g/L。

参考文献:

[1] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 1998:65.
[2] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学[M]. 北京:中国林业出版社,1984:224-231.
[3] Xiao Z Z, Wu S X. The effect of *Grifola frondosa* polysaccharide on immune function in mice[J]. Medicinal Plant, 2010, 1(10): 52-54.
[4] 朱华玲,班立桐,徐晓萍,等. 食用菌发酵的应用研究进展[J]. 江西农业学报, 2012, 24(4): 80-83.
[5] 李春喜,邵云,姜丽娜. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社, 2008:273.

《江苏农业科学》启用期刊在线采编系统

为促进编辑工作现代化,规范稿件编审流程,缩短稿件处理周期,我刊于 2013 年 6 月启用期刊在线采编系统。目前该系统主要包括作者在线投稿查稿系统、专家在线审稿系统、编辑在线办公系统,可以实现作者投稿查稿、专家审稿、编辑处理来稿的网络化。

在线采编系统操作便捷,作者仅需登录 <http://www.jsnykx.cn>,进入主页,便可以了解本刊的有关详细信息,完成注册投稿,并可随时查询稿件的处理状态。

专家可在线完成审稿,上传审稿意见。编辑部综合专家审稿意见及作者修改情况确定录用结果。该系统有助于编辑部为作者、审稿专家提供更人性化的服务,提高审稿、编辑、出版的效率。

作者在线投稿主要有以下步骤:(1)作者注册,获取用户名和密码;(2)查看《投稿须知》和《投稿声明》;(3)上传稿件和附件;(4)填写稿件信息和作者信息。作者在使用系统投稿的过程中如果遇到问题,请及时与编辑部联系。

《江苏农业科学》编辑部