

## 灰树花液体深层培养工艺研究

汪维云 吴守一 朱金华

(江苏理工大学生物与环境工程学院 镇江 212013)

**摘 要** 对灰树花进行了液体深层培养试验,结果表明:液体培养基碳源以豆粉+麸皮、玉米粉+麸皮和氮源以蛋白胨、牛肉膏等较适宜菌丝生长的物质,确定了灰树花深层培养的液体培养基配方;并研究了培养条件对菌丝生物量的影响,得出了培养液 pH 在 5.30~6.00 和通气量为 1:(1.00~1.40)的条件下,菌丝生物量达到最大。

**关键词** 灰树花, 深层培养, 碳源, 氮源

**分类号** Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0378-82

灰树花(*Grifola frondosus*)属多孔菌属,亦称贝叶多孔菌,别名千佛菌,莲花菌,栗蘑,在日本称为“舞茸”。子实体肉质,重叠成丛;柄白色,多菜花状分枝,顶端分化贝状灰褐色叶片;子实层多孔,白色;孢子无色。灰树花鲜嫩可口,营养丰富,香气浓郁,人体必需氨基酸含量高,是一种食药两用很有开发前途的珍贵真菌。据报道其营养价值明显高于香菇(*Lentinus edodes*),据农业部质检中心和中国预防医学科学院与食品卫生研究所分析,100g 灰树花含蛋白质 31.5g(其中 18 种氨基酸总量为 18.68g,必需氨基酸占 45.5%),脂肪 1.7g,粗纤维 10.7g,碳水化合物 49.69g,灰分 6.41g;富含多种有益矿物质,维生素含量丰富,灰树花中还含有 8%的灰树花多糖,其主要功用是抗癌防癌。<sup>[1~10]</sup>随着森林的减少,野生资源的破坏,灰树花已成为食用菌中的珍稀品种。灰树花多糖及有效成分目前均从子实体中提取,远远跟不上市场的需求,灰树花采用液体深层培养的技术还未见有报道。为此,我们进行了灰树花的液体深层培养及工艺试验,期望为液体培养技术在灰树花上的应用提供一定的理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验菌株

灰树花(*Grifola frondosus*)9801 菌株由华中农业大学菌种实验中心提供。菌种保存在 PDA 培养基上,培养温度为 25℃,保藏温度为 4℃。

#### 1.2 母种培养基

在 PDA 基础培养基上,添加 5% 麸皮、0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{MgSO}_4$ 。

#### 1.3 液体基础培养基

葡萄糖 0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g、 $\text{MgSO}_4$  0.2g、 $\text{CaCO}_3$  0.1g、 $\text{ZnSO}_4$  0.02g、 $\text{FeSO}_4$  0.02g、 $\text{CuSO}_4$  0.02g 加水溶至 100mL,VB<sub>1</sub>、VC 和 VB<sub>6</sub> 各 10mg/L。

收稿日期:1998-06-04,修回日期:1998-12-01。

## 1.4 培养设备

1.4.1 THZ-82A 来复式恒温振荡器转速为 180r/min 上海跃进医疗器械厂。

1.4.2 GY-70 型气升式发酵罐(种子罐 7L、发酵罐 70L)本所研制。

## 1.5 分析方法

1.5.1 培养液还原糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[11]</sup>。

1.5.2 培养液中的菌丝生物量测定: 取 10mL 培养液于 3000r/min 离心 15min, 用分析天平称重。

## 2 结果和讨论

### 2.1 液体培养基配方试验

2.1.1 碳源对菌丝生长的影响: 基础培养基添加 0.3% 蛋白胨, 分别再添加 2% 玉米粉、2% 豆粉、2% 小麦脱脂胚芽粉、2% 麸皮、1% 玉米粉 + 1% 麸皮、1% 豆粉 + 1% 麸皮在振荡器上培养 4d, 测菌丝生物量, 结果(见图 1)可以看出, 豆粉 + 麸皮作为碳源, 菌丝生长量最大, 菌丝球多, 均匀(6); 小麦脱脂胚芽粉作为碳源的菌丝量最小, 菌丝球少, 直径较大(3); 结果为豆粉 + 麸皮及玉米粉 + 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: 在基础培养基上, 添加 1% 豆粉、1% 麸皮作碳源; 再分别加蛋白胨、酵母浸出汁、硫酸铵、尿素、草酸铵、牛肉膏进行液体培养试验, 培养 4d, 测菌丝生物量, 结果(见图 2)得知, 无机铵盐作氮源, 灰树花菌的利用较差, 其中草酸铵的效果最差; 而有机氮象蛋白胨、牛肉膏的利用效果较好。

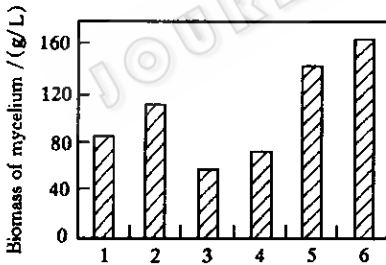


图 1 碳源与菌丝生物量的关系

Fig.1 Relationship between carbon sources and biomass of mycelium

1. Corn powder, 2. Bean powder, 3. Defat wheat plumule flour, 4. Bran, 5. Corn powder + bran, 6. Bean powder + bran

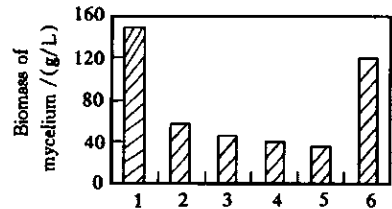


图 2 氮源与菌丝生长量的关系

Fig.2 Relationship between nitrogen sources and biomass of mycelium

1. Peptone, 2. Yeast extract, 3. Ammonium sulfate, 4. Urea, 5. Ammonium oxalate, 6. Beef cream

2.1.3 无机盐对菌丝生长的影响: 以 1% 豆粉、1% 麸皮、0.5% 葡萄糖、0.3% 蛋白胨、 $VB_1$ 、 $VB_6$  和 VC 各 10mg/L 为基础培养基, 再分别添加无机盐进行液体培养试验, 在 25℃ 和转速为 180r/min 下培养 4d, 测菌丝生物量, 结果(见图 3)可看出, 培养基中加  $Na^+$  对灰树花菌丝生长的影响不利,  $Mg^{2+}$  对灰树花菌丝生长的影响最大, 添加  $Mg^+$  和

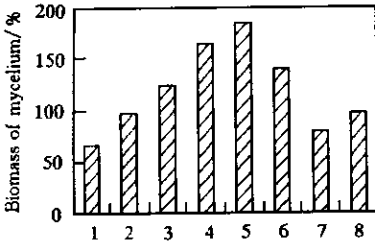


图 3 无机盐与菌丝生长量的关系  
Fig. 3 Relationship between inorganic salts and biomass of mycelium

Conc. of salts/%

1.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 +  $\text{CaCO}_3$  1 +  $\text{NaCl}$ ,
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 +  $\text{FeSO}_4$  0.02 +  $\text{ZnSO}_4$  0.02,
3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 +  $\text{FeSO}_4$  0.02 +  $\text{ZnSO}_4$  0.02 +  $\text{CuSO}_4$  0.02,
4.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 +  $\text{CaCO}_3$  1 +  $\text{ZnSO}_4$  0.02 +  $\text{CuSO}_4$  0.02,
5.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 +  $\text{CaCO}_3$  1 +  $\text{MgSO}_4$  0.5 +  $\text{FeSO}_4$  0.02 +  $\text{CuSO}_4$  0.02,
6.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 +  $\text{MgSO}_4$  0.5 +  $\text{ZnSO}_4$  0.02 +  $\text{CuSO}_4$  0.02,
7.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 +  $\text{FeSO}_4$  0.02 +  $\text{ZnSO}_4$  0.02 +  $\text{CuSO}_4$  0.02 +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1,
8. Not inorganic salts(CK)

压入发酵罐(装料量 50L)中进行培养,并对菌液在最后一级的培养进行 pH、总糖、菌丝生物量及 pH 和通气量等对菌丝生物量的影响进行研究。

**2.2.1 培养过程 pH 的变化:** 从图 4 中可以看出, pH 值开始逐渐下降,至一定值后又逐渐回升。根据我们对菌丝的取样检查发现 pH 值在最低点时也是细胞生长的对数期向稳定期转变的时期。因此,可以把培养过程中 pH 值的变化作为判断培养终点的指标之一。

**2.2.2 培养过程中总糖及菌丝生物量的变化:** 培养过程中总糖变化对应着细胞生长消耗的过程见图 5。从图中看出,菌丝生物量达到最大是在培养 50h 后。而 pH 值的最低点是在培养后 35h,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,而菌丝浓度还在缓慢增加,根据我们的经验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,糖的消耗和菌丝量的增加主要发生在对数生长期。

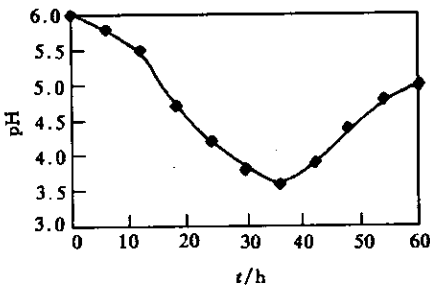


图 4 培养过程中 pH 变化的情况  
Fig. 4 Variation of pH in culture process

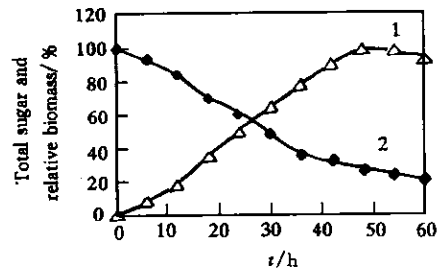


图 5 发酵过程中总糖及菌丝生物量的变化情况  
Fig. 5 Variations of total sugar and biomass of mycelium in culture process  
1. Relative biomass; 2. Total sugar

2.2.3 pH和通气量对菌丝生物量的影响:从图6和图7可以看出,通气量在1:0.80~1.40 V/V的范围内,当pH值在4.70~6.50的范围内,菌丝均能正常生长;pH值在5.30~6.00菌丝生物量积累最多。从上面结果知,灰树花适宜在微酸性的培养基中生长,是好氧性的食用菌种类,这与资料报道,灰树花是目前人工栽培菇中需氧量最大的菇类<sup>[11]</sup>相一致。

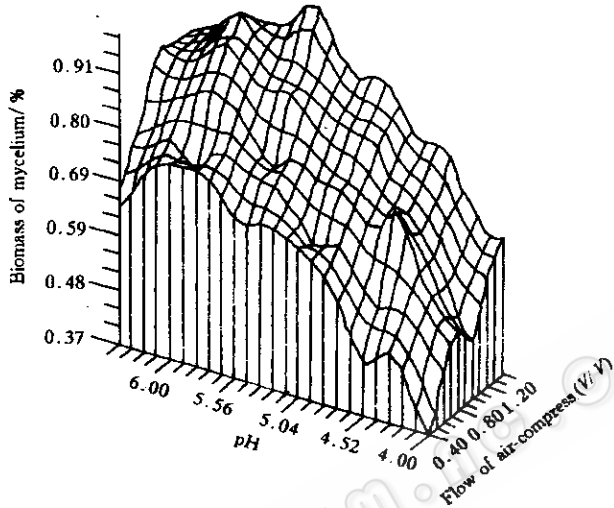


图6 pH和通气量对菌丝生物量的影响

Fig.6 Effect of pH and flow of air on biomass of mycelium

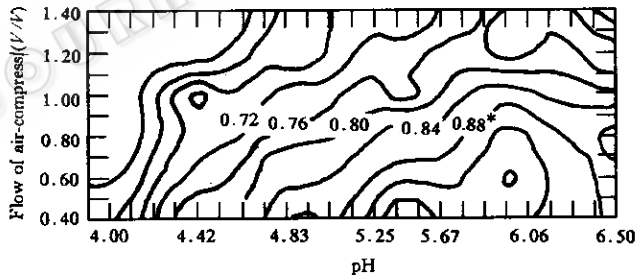


图7 pH和通气量对菌丝生物量影响的等高线图

Fig.7 Contour map of effect of pH and flow of air on biomass of mycelium

\* Biomass of mycelium / %

对实验结果进行回归分析,所得回归方程为:

$$y = -0.2603 + 0.3194x_1 + 0.1355x_2$$

式中:y——菌丝相对生长量,  $x_1$ —通气量,  $x_2$ —pH值

经显著性检验:

最终方程的复相关系数:  $R = 0.8271$

最终方程的剩余标准差:  $S = 0.0732$

最终方程的检验统计量:  $F = 50.2275$

$> F_{0.01} = 5.78$  有显著性差异。故可作出结论: pH 和通气量对菌丝量的影响是很显著的。

### 参 考 文 献

- [1] 裘鹤萍, 孙培龙, 钟卫鸿. 中国食用菌, 1998, 17(3): 31~33.
- [2] 黄幸纤. 中国食用菌, 1994, 13(1): 41~43.
- [3] 彭 红. 食用菌, 1998, 20(4): 2~4.
- [4] 郭 倩. 食用菌, 1998, 20(4): 10.
- [5] 王世远, 赵国强. 中国食用菌, 1994, 13(4): 36~37.
- [6] 吴经纶, 林金枝. 食用菌学报, 1997, 4(2): 33~39.
- [7] T. Suzuki. *Chem. Pharma. Bull.*, 1989, 37(2): 410~413.
- [8] H. Nanaba. *Chen. Pharma. Bull.*, 1987, 35(3): 1136~1168.
- [9] N. Ohno. *Chem. Pharma. Bull.*, 1986, 34(6): 2555~2560.
- [10] 農耕と円芸編. 図解キノコの栽培百科. 東京: 誠文堂新光社, 1983(昭和 58 年): 196~200.
- [11] 北京大学生物化学教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1983: pp. 22~24.

## Studies on Submerged Culture Process of *Grifola frondosus*

Wang Weiyun Wu Shouyi Zhu Jinhua

(*Institute of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Sci. & Tech., Zhenjiang 212013*)

**Abstract** By submerged culture experiment, *Grifola frondosus*, the results showed that the optimum carbon source are been powder + bran and corn flour + bran, the optimum nitrogen source are peptone and beef cream, the optimum inorganic salts are  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , and  $\text{CuSO}_4$ , of which are befitted to mycelia growing. The research on culture conditions of *Grifola frondosus* were carried out by submerged culture. At pH 5.30~6.00 and the flow of air-compress at 1:(1.00~1.40) the biomass of mycelia reached the highest level. Thereby, the ingredients of liquid media and culture conditions of *Grifola frondosus* were determined and the base was settled for further research in future.

**Key words** *Grifola frondosus*, submerged culture, carbon source, nitrogen source