

培养基优化提高灰树花菌丝体的研究

王 玉¹, 李 政², 郝利民³, 班立桐¹

(1. 天津农学院 农学系, 天津 300384; 2. 天津工业大学 纺织学院, 天津 300160; 3. 总后勤部军需装备研究所, 北京 100010)

摘 要:为缩短灰树花菌种扩培的时间, 缩短灰树花的培养周期, 以马铃薯、葡萄糖、蛋白胨、 KH_2PO_4 、 VB_1 为因素, 设计 $L_{16}(4^5)$ 正交实验, 对灰树花液体菌种的最优发酵条件进行了研究。结果表明: 最适合液体菌种制作的培养基为(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 24, 蛋白胨 2.5, KH_2PO_4 1, VB_1 0.005; 采用优化后的培养基, 灰树花菌丝干重由原始培养基的 26 g/L 提高到 35.4 g/L。

关键词:灰树花; 培养基优化; 菌丝干重

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0190-02

灰树花(*Grifol frondosa*)具有独特的芳香味, 肉质柔软, 鲜嫩可口, 且具保健作用, 是一种有开发价值的食、药用真菌^[1]。其蛋白质含量较高, VC 含量也是同类菌的 2~5 倍, 尤其富含有机硒, 在人体中吸收利用率高达 97.5%, 可作为补硒食品^[2]。另外, 灰树花多糖作为一类非特异生物反应调节剂或抗肿瘤免疫增强剂, 具有抑制癌细胞、阻止人类免疫缺陷病毒对淋巴细胞的破坏以及降血糖、保肝等作用, 在临床上可用于癌症的免疫治疗^[3]。

目前, 食用菌菌种的生产方式主要有二种, 一是传统的固体培养, 二是液体培养。食用菌液体培养与固体培养相比具有生产周期短、菌龄一致、菌种生产成本低、接种简便、扩建容易等多种优点, 日益受到重视。现对灰树花的液体菌种制备工艺进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灰树花(*Grifol frondosa*)是由天津农学院微生物实验室保藏的菌种。

1.2 培养基

斜面、种子培养基: 葡萄糖马铃薯培养基(PDA)^[4]。

基础发酵培养基(g/L): A: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 蛋白胨 2, KH_2PO_4 1, VB_1 0.01^[5]。B: 蔗糖 30, 玉米粉 15, 豆饼粉 10, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.5, pH 值自然^[2]。C: 葡萄糖 40, 蛋白胨 5, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.5, VB_1 少量^[6]。D: 麦麸 50, 玉米粉 10, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, VB_1 0.02^[3]。E: 葡萄糖 5, KH_2PO_4 1, MgSO_4 1, VB_1 0.01^[4]。F: 葡萄糖 20, 蛋白胨 2, KH_2PO_4 2, MgSO_4 · 7H₂O 1^[7]。

1.3 试验方法

1.3.1 液体菌种的制备 从斜面上铲出 5 块 0.5 cm × 0.5 cm 大小的菌块转接于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中。在摇床上 25℃ 下 150 r/min 培养 7 d, 即为种子液。以 6%(v/v) 的接种量接种于装 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 25℃ 下 150 r/min 培养 7 d。发酵培养基成分根据试验方案逐次改变。

1.3.2 正交实验设计 见表 1。

表 1 正交实验设计

	A: 马铃薯 /g · L ⁻¹	B: 葡萄糖 /g · L ⁻¹	C: 蛋白胨 /g · L ⁻¹	D: KH_2PO_4 /g · L ⁻¹	E: VB_1 /g · L ⁻¹
1	180	18	1.5	0.8	0.005
2	200	20	2	1	0.010
3	220	22	2.5	1.1	0.015
4	240	24	3	1.2	0.020

1.3.3 菌丝干重的测量 采用细胞干重法: 取 50 mL 发酵液, 3 000 r/min 离心 20 min 收集菌丝球, 用蒸馏水洗涤 3 次, 将菌丝球置于 80℃ 下烘至恒重。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的测定

为了解菌种的生长规律, 首先对其生长曲线进行了测量, 见图 1。灰树花在第 3 天开始进入对数生长期, 菌球数量增多, 菌丝干重迅速增加。发酵到 168 h 后, 灰树花发酵进入稳定期, 菌丝量不再增加, 因此选择液体菌种最佳生产时间为 7 d。

2.2 基础发酵培养基的确定

分别选择 A~F 6 种培养基进行发酵, 结果如图 2 所示。蛋白胨作为氮源, 具有易吸收, 利于菌丝分离提取等优点。玉米粉和豆饼粉均为不溶物, 不利于吸收和传质。培养基 A 得到的菌丝干重最大, 为 26 g/L。因此, 选择配方 A 为基础发酵培养基。

2.3 最适培养基的正交实验结果

根据基础培养基的实验结果, 选择适当马铃薯、葡萄糖、蛋白胨、 KH_2PO_4 、 VB_1 进行正交设计, 结果见表 2。

第一作者简介:王五(1980-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事生物发酵研究工作。

收稿日期:2010-12-21

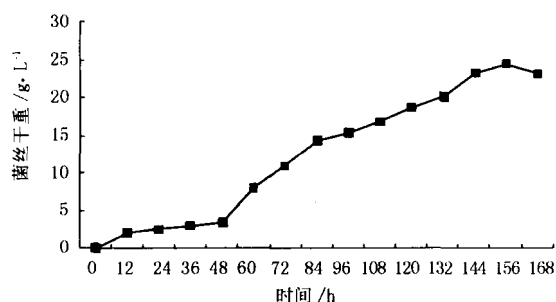


图1 菌丝重量随时间的变化曲线

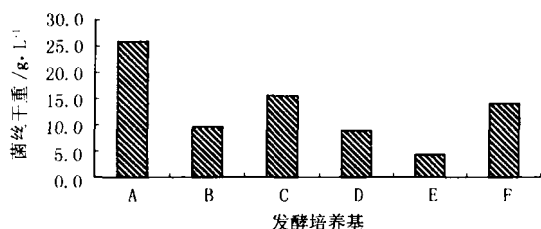


图2 不同配方对灰树花液体菌种生产的影响

表2 正交实验结果

	A:马铃薯 /g·L ⁻¹	B:葡萄糖 /g·L ⁻¹	C:蛋白胨 /g·L ⁻¹	D:KH ₂ PO ₄ /g·L ⁻¹	E:VB ₁ /g·L ⁻¹	菌丝干重1 /g·L ⁻¹	菌丝干重2 /g·L ⁻¹
1	180	18	1.5	0.8	0.005	4.691	4.768
2	180	20	2	1	0.01	3.351	3.369
3	180	22	2.5	1.1	0.015	4.550	4.568
4	180	24	3	1.2	0.02	6.501	6.587
5	200	18	2	1.1	0.02	6.324	6.544
6	200	20	1.5	1.2	0.015	5.412	5.554
7	200	22	3	0.8	0.01	7.101	7.094
8	200	24	2.5	1	0.005	9.775	9.862
9	220	18	2.5	1.2	0.01	5.186	5.258
10	220	20	3	1.1	0.005	7.124	7.066
11	220	22	1.5	1	0.02	6.521	6.322
12	220	24	2	0.8	0.015	4.980	4.956
13	240	18	3	1	0.015	6.810	6.520
14	240	20	2.5	0.8	0.02	7.780	7.820
15	240	22	2	1.2	0.005	5.730	5.860
16	240	24	1.5	1.1	0.01	5.570	5.555
\bar{x}_1	4.823	5.7725	5.54975	6.1595	6.889		
\bar{x}_2	7.2635	5.95225	5.18225	6.51825	5.319		
\bar{x}_3	5.9005	5.961	6.877	5.93325	5.3995		
\bar{x}_4	6.43875	6.74	6.81675	5.81475	6.8182		
R_j	9.762	3.87	6.779	2.814	6.28		

由表2的极差分析可知,最适培养条件为A₂B₄C₃D₂E₁,由此得出最佳配方为(g/L):马铃薯200,葡萄糖24,蛋白胨2.5,KH₂PO₄1,VB₁0.005。由极差分析

可知,发酵培养基成分中,对灰树花菌丝产量影响由大到小排列为:马铃薯>蛋白胨>VB₁>葡萄糖>KH₂PO₄。由方差分析表3可知,各因素均为显著水平,对菌丝体产量都有较大影响。

2.4 最适培养基验证试验

用所得的最适发酵培养基与初始培养基进行比较实验,检验正交实验的优化效果。优化后培养基的菌丝干重为35.4 g/L,优化前培养基菌丝干重为26 g/L,产量增加了36.2%。

表3 方差分析结果

因素	平方和	自由度	均方S	F值	F _{0.05}	显著性
A:马铃薯	24.6367	3	8.2123	1 089.879	3.24	*
B:葡萄糖	4.3758	3	1.4586	193.5799		*
C:蛋白胨	18.8148	3	6.2716	832.328		*
D:KH ₂ PO ₄	2.9581	3	0.9861	130.863		*
E:VB ₁	17.2324	3	5.7441	762.3253		*
误差	0.1206	16	0.0075			

3 结论

通过对灰树花的生长曲线和发酵培养基进行的研究,结果发现,发酵进入第5天灰树花处于指数生长期,为种子液转接的最佳时间,确定灰树花发酵周期为7 d。最优发酵培养基配方为(g/L):马铃薯200,葡萄糖24,蛋白胨2.5,KH₂PO₄1,VB₁0.005,优化后菌丝干重增加了36.2%。

参考文献

- [1] 肖春玲,李晓红. Mg²⁺对灰树花菌丝体生长的影响[J]. 生物学杂志, 2004, 21(1): 2-5.
- [2] 夏艳云. 灰树花高产栽培问答[M]. 郑州: 中原农民出版社, 2003: 56-58.
- [3] Stasinopolos S J, Seviour R J. Stimulation of exopolysaccharide production in the Fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids[J]. Biotech and Bioeng, 1990, 36: 778-782.
- [4] 雷德柱. 灰树花深层培养条件的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2001: 10-13.
- [5] 顾顺明, 孙晔, 王露江, 等. 发酵法生产灰树花菌丝体的研究[J]. 工业微生物, 2003, 33(4): 1-4.
- [6] Hirata A, Adachi Y. Monoclonal antibody to proteoglycan derived from *Grifola frondosa* [J]. Biological and Pharmaceutical [J], Bulletin, 1994, 17 (4): 539-543.
- [7] 杜巍, 华泽钊. 灰树花的深层培养工艺及其影响因素的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(2): 231-234.

Study on Improving Mycelium of *Grifola frondosa* by Optimization of Medium

WANG Yu¹, LI Zheng², HAO Li-min³, BAN Li-tong¹

(1. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. School of Textile and Clothing Polytechnic University, Tianjin 300160; 3. Quartermaster Equipment Institute of General Logistics Department of PLA, Beijing 100010)

Abstract: In order to decrease the period for culture of *Grifola frondosa*, the optimization of medium for growth of *Grifola frondosa* were studied. The potato, glucose, peptone, potassium dihydrogen phosphate and VB₁ were chosen for designing the orthogonal experiment L₁₆(4⁵) and the optimal medium were (g/L): potato 200, glucose 24, peptone 2.5, KH₂PO₄ 1 and VB₁ 0.005. Under the medium, the mycelium dry weight of *Grifola frondosa* increased to 35.4 g/L (26 g/L in initial medium).

Key words: *Grifola frondosa*; optimization of fermentation medium; mycelium dry weight