

# 灰树花深层发酵工艺条件的研究

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:** 灰树花摇瓶发酵较佳条件: QF培养基, 25℃, pH4.5, 装量 60mL/500mL 三角瓶, 转速 100r/min。在种子培养基中加 0.4% 的 CMC, 可增加种子液菌丝的生长点, 从而提高菌丝量。在 10L 气升式发酵罐上放大试验, 菌丝量对初糖的生物转化率在 24% 以上, 对耗糖的转化率达 435%。菌丝体中多糖含量达 10.2%, 发酵液中多糖含量为 1.38%。

**关键词:** 灰树花, 发酵, 多糖

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0033-03

## STUDIES ON THE TECHNOLOGICAL CONDITIONS FOR SUBMERGED CULTURE OF *GRIFOLA FRONDOSA*

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

(College of Biology & Environment, Zhejiang University of Technology HangZhou 31004)

**Abstract:** The better conditions for flask fermentation of *Grifola frondosa* are: QF medium, 25℃, pH4.5, filled volume 60mL/500mL flask, rotated speed 100rpm. When 0.4% CMC is added to medium, the growing point of mycelia can increase and the biomass is rised. Scale-up test has done in 10 litre airlift bioreactor. The rate of biotransformation between biomass and original sugar or between biomass and consuming sugar is over 24% or up to 435%. In mycelium the polysaccharide content is 10.2%. In culture fluid the polysaccharide content is 1.38%.

**Key word:** *Grifola frondosa*, Fermentation, Polysaccharide

灰树花多糖具多种保健功能, 市场需求量不断提高, 为解决栽培效率低、减少森林砍伐, 用深层发酵生产灰树花多糖是一条有效的途径。为使灰树花在一一定的培养基上迅速生长产生大量的多糖需要给予合适的工艺条件。本文用摇瓶试验探索温度、pH、通气量、培养基粘度、菌龄及接种量对菌丝体生长的影响, 以确定深层发酵的工艺条件。对获得的灰树花深层发酵的较佳培养基配方和有关的工艺条件用 2L 台式搅拌发酵罐和 10L 气升式发酵罐进行放大试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 灰树花 [*Grifola frondosa* (Dicks. ex Fr) S. F. Gray] 由福建省三明市食品工业研究所提供。

**1.1.2 培养基:** 液体种子培养基 (以下简称 MF 培养基): PDA 1L 加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g, 板栗壳煮汁 150.0g。摇瓶发酵培养基 (以下简称 HF 培养基): MF 中加 2% 的麸皮。发酵培养基 (以下简称 QF 培养基): 葡萄糖 60.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,

MgSO<sub>4</sub> 0.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, 板栗壳煮汁 150g, 麸皮 20g, 水 1L。

## 1.2 方法

1.2.1 平板培养法选择发酵温度: 在 PDA 平板上接种一个菌丝球, 置不同温度下培养, 定时用游标尺测量菌丝长度。

1.2.2 摇瓶试验条件: 摇瓶装置: 100mL/500mL 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 搅拌罐发酵条件: 2L 搅拌发酵罐: 装量 1.5L, 搅拌 150r/min, 通气量 1: 0.5, 温度 25℃, 7~9d, 接种量 10%。

1.2.4 气升式发酵罐发酵条件: 10L 气升式发酵罐: 装量 8L, 罐压 0.05MPa, 温度 25℃, 通风量 160L/min, 接种量 10%, 培养时间 7d。

1.2.5 多糖测定: 蒽酮法<sup>[1]</sup>。

1.2.6 菌丝体干重测定: 见参考文献[2]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵温度的选择

PDA 平板上的菌体在 5℃~35℃ 的条件下培养, 每个温度 3 个平板, 定时测量其菌丝的平均长度, 结果见表 1。

表 1 不同培养温度对菌丝生长速率的影响

时间 (d)	温度 (℃)						
	5	10	15	20	25	30	35
0	0	0	0	0	0	0	0
3	1.05	1.89	2.75	2.85	3.55	2.94	1.18
8	2.02	3.14	8.45	11.40	16.13	12.65	2.89
10	2.41	3.47	10.76	13.07	23.03	15.50	3.18
12	2.59	4.62	14.97	18.27	25.81	20.06	3.47
14	3.15	5.33	20.38	24.45	30.38	26.60	3.93
平均生长速率 (mm/d)	0.23	0.38	1.46	1.75	2.17	1.9	0.28

注: 表内数据为菌丝体长度 (mm)

由表 1 可见灰树花在 5℃~35℃ 的温度范围内均可生长, 但最适温度为 25℃。

### 2.2 培养基 pH 的选择

用不同 pH 的 MF 培养基, 摇瓶试验培养基 pH 值对灰树花菌丝体生长的影响, 结果灰树花菌丝生长的最适 pH 值在 4.5~5.0, 菌丝干重达 1.49g/100mL, 比 pH5.0~5.5 高 19%, 比 pH4.0~4.5 高 32%。

### 2.3 通气量的选择

2.3.1 不同培养基装量的影响: 用不同装量的 MF 培养基研究通气量对灰树花生长的影响, 发酵液菌丝干重换算成 100mL 发酵液的菌丝干重, 结果培养基装量在 60mL/500mL 三角瓶时生物量最重, 达 1.44g/100mL。但培养基装量小于 100mL 时菌丝易衰

老,待发酵至5d时,菌丝球上的刺突明显减少,而大于100mL装量的摇瓶菌丝球上刺突仍很多,有继续生长的趋向,可见减少装量,提高溶氧可加速菌丝的生长,但菌丝易衰老,故培养种子时通气量不宜太大,培养液装量应大于100mL。

**2.3.2 通气塞厚度的影响:**用装量为100mL/500mL三角瓶的MF培养基,改变通气塞纱布的层数观察通气量对灰树花生长的影响。结果通气塞的纱布层数由8层增至14层对菌丝干重的影响并不大,增至20层菌丝干重仅下降17%。鉴于灰树花发酵周期长,适当增加通气塞厚度可避免发酵过程中杂菌通过通气塞进入摇瓶。

## 2.4 培养基粘度的选择

在发酵过程中,灰树花仍以菌丝尖端不断向前蔓延的方式进行生长,由于通气搅拌使培养液不断翻滚,从而菌丝体卷曲成团称菌丝球,菌丝越长,卷成的菌丝球越大。为提高灰树花的生长速率,发酵初期发酵液中菌丝球的体积要小,数量要多,这样菌丝生长点多,生物量才会提高。在对其他食用菌的深层发酵研究中,人们早已认识到菌丝球的大小和数量多少与培养基的粘性抗力以及生物物理上的剪切作用有关,为此,我们在MF培养基中添加不同量的CMC,研究培养基的粘性抗力对灰树花生长的影响,结果见表2。

表2 培养基粘度对灰树花生长的影响

CMC含量 (g/mL)	菌丝干重 (g/mL)	菌球直径 (mm)
0	1.10	1.8-2.0
0.08	1.16	1.8~2.0
0.24	1.20	1.2~1.5
0.40	1.55	1.0~1.5
0.56	0.92	0.7~1.0
0.72	0.90	0.5~1.0

从表2可见,培养基中添加CMC,提高培养基粘度有利于菌球变小,但粘度太大会影响氧气的传递,菌球虽小,生物量反而下降,为此培养基的粘度以添加0.4%左右的CMC的为宜。

## 2.5 接种量的选择

在PDA液体培养基进行不同接种量试验,结果接种量从4%~10%,对灰树花菌丝干重的影响≤10%,接种量由12%增至20%,菌丝干重增加85%。

## 2.6 2L 搅拌罐试验

用台式发酵罐试验QF培养基及据摇瓶试验结果设计的发酵条件,结果菌丝干重达1.22g/100mL。

## 2.7 10L 气升式发酵罐试验

用QF培养基,据摇瓶试验及搅拌罐发酵结果设计的发酵条件,在10L气升式发酵罐上进行放大试验,结果菌丝干重达1.85g/100mL,菌丝体中多糖含量达10.2%,发酵液中多糖含量为1.38%。

可见,灰树花应用本研究确定的工艺条件,深层发酵得菌丝体量对初糖的转化率达24%~29.5%,对耗糖量的转化率达435%,菌丝体中多糖含量达10.2%,发酵液中多糖含量为1.38%。

## 参 考 文 献

- [1] 张维杰.《复合多糖生化研究技术》.上海:上海科技出版社,1987.
- [2] 袁娟萍,孙培龙,朱家荣,等.微生物学通报,2000,27(4):275~278.