

灰树花在米糠培养基上固态发酵产多糖研究

刘伟民, 徐立平, 郭春梅, 杨锁华, 张 建, 赵杰文

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 为高效利用稻谷加工副产品米糠并拟在固态发酵设备中发酵生产多糖保健食品, 以米糠为基础培养基, 对灰树花固态发酵米糠产多糖条件进行探索。针对定量米糠, 选取水分、蛋白胨、葡萄糖和 pH 值影响因素, 以总多糖含量为评价指标进行试验, 按 $L_{16}(4^5)$ 的正交试验方案得到优化培养基, 并进一步通过单因素试验选择得到较优的固态发酵工艺条件。结果表明: 优化固态培养基组成为原始米糠(水分 65%, 按原始米糠质量计)、蛋白胨 0.5%、葡萄糖 4%、pH 5.5、装样量 20g/250mL 三角瓶, 发酵条件为: 接种量 10%、培养温度 25℃、摇床转速 170r/min、培养时间 11d, 多糖得率以米糠为标准计算, 可达 4.52%。用 SPSS 软件处理数据, 得到表征多糖产量和培养基成分关系的回归方程。

关键词: 灰树花; 米糠培养基; 固态发酵; 灰树花多糖; 回归模型

Solid Fermentation of *Grifola frondosa* in Rice Bran Medium for Grifolan Production

LIU Wei-min, XU Li-ping, GUO Chun-mei, YANG Suo-hua, ZHANG Jian, ZHAO Jie-wen

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In order to effectively exploit rice bran for preparing health food containing polysaccharides through mimic solid fermentation, rice bran was used as the culture medium matrix to explore the effects of water content, peptone, glucose and pH on solid fermentation of *Grifola frondosa*. The optimal culture medium and fermentation conditions were explored by single factor and orthogonal experiments on the basis of grifolan productivity. Results indicated that the optimal medium formula was composed of rice bran as solid culture medium matrix with 65% water, 0.5% peptone, 4% glucose (by mass of rice bran) and pH 5.5. The optimal fermentation conditions were 20 g rice bran matrix in a 250 mL fermentation flask, inoculation amount of 10%, fermentation temperature of 25 °C, rotation speed of 170 r/min and fermentation time of 11 days. The yield of grifolan was 4.52% under the optimal conditions. By calculating with SPSS software, a regression model of total grifolan was achieved.

Key words: *Grifola*; rice bran medium; solid fermentation; grifolan; regression model

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0238-05

灰树花(*Grifola frondosa*)是一种珍稀的食、药兼用真菌^[1-3], 它富含维生素、真菌多糖, 并可用于富集锌、钙、磷、铁、硒等多种对人体有益的矿物质, 因而可以用于生产健康食品和医疗保健品^[4-8]。固态发酵具有对环境污染小, 单位体积内获得产物多等优点, 有其应用价值。本单位自主研发了转鼓式固态发酵设备, 具有良好的效果, 希望进一步开发出适用工艺。米糠作为稻谷加工过程中的副产品^[9-10], 将其加入固态发酵培养基中, 使其在灰树花产多糖和富集微量元素的过程中得到利用, 使工厂化固态发酵在节约土地使用和提高生产效率的同时, 降低生产成本, 本研究具有实用意义^[11-15]。采用多项式或线性回归方法建立固态发酵模型, 可更清楚揭示研究目标和影响因素之间的定量关系。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

灰树花菌种为实验室保藏菌种; 米糠由镇江市米厂提供; 所用试剂均为分析纯。

HANGPING JA2003 电子天平 上海仪器仪表厂; SHJ CA-480- II 超净工作台 上海汇龙公司; 数显生化培养箱 常州国华电器有限公司; DH2-D 冷冻恒温振荡器 江苏太仓试验设备厂; DHG-9245A 型电热鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; WFJ7200 可见光分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 固体培养基的配制

收稿日期: 2010-09-21

基金项目: 江苏省社会发展科技计划项目(BS2006037); 江苏镇江市农业支撑科技项目(NY2008043)

作者简介: 刘伟民(1964—), 男, 教授, 博士研究生, 主要从事农产品加工及贮藏研究。E-mail: liuwmwu@ujs.edu.cn

称取定量米糠放入250mL的三角烧瓶中,按米糠的质量为基准计算出加入的水分和外加的碳源、氮源后摇匀,0.1MPa高压灭菌30min。原始米糠中所含米糠多糖经测定含量较低,未做提取,供灰树花在生长中作为营养物质使用并转化掉。

1.2.2 培养方法

培养基单因素试验,250mL三角烧瓶中装入60%水分的含15g原始米糠的固体培养基,25℃、摇床转速150r/min、10%的接种量、培养7d。

正交试验的原始米糠装样量4.5g、接种量10%、转速150r/min、温度25℃、发酵时间7d。

发酵工艺条件的单因素试验参照培养基单因素试验各条件进行。某因素变动时,其他条件不变。培养基为优化培养基。

1.2.3 多糖提取^[11-14,16-18]及含量测定

将发酵后的米糠研磨,沸水提取6h,2400r/min离心20min,加耐高温淀粉酶除淀粉,降温至60℃,糖化酶除糊精,冷却,调节等电点去除蛋白质,3200r/min离心20min,取上清液用乙醇沉淀,离心,得沉淀,苯酚-硫酸法测定总多糖含量。加淀粉酶去除可能存在的少量淀粉,将其降解成糊精和麦芽糖,再在糖化酶的作用下降解成葡萄糖,溶于乙醇被除去。

$$\text{总多糖含量}/\% = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中: m 为样品中原始米糠质量; m_1 为多糖质量。

1.3 试验设计

根据水分(50%~75%)、葡萄糖(0~6%)、蛋白胨(0~1.5%)和pH值(3~6)这4个因素进行单因素试验结果,进行 $L_{16}(4^5)$ 的正交试验,按照正交设计“实用主义”的原则,暂不考虑交互作用,是否有交互作用由回归方程作基本的解释。其因素水平如表1所示,原始米糠定量为4.5g,百分比按原始米糠质量计算。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	因素			
	A 水分/%	B 葡萄糖/%	C 蛋白胨/%	D pH
1	55	2	1.25	4
2	50	5	0.5	4.5
3	60	3	0.75	5.5
4	65	4	1	5

2 结果与分析

2.1 培养基的单因素试验结果

2.1.1 碳源对固态发酵的影响

2.1.1.1 外加不同碳源对固态发酵的影响

米糠中含有碳源,但是量未必足够,外加一定的碳源会有助于灰树花的生长。试验以60%的水分含量米糠固体培养基分别加入2%的葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉及空白试验作对照,结果如图1所示。

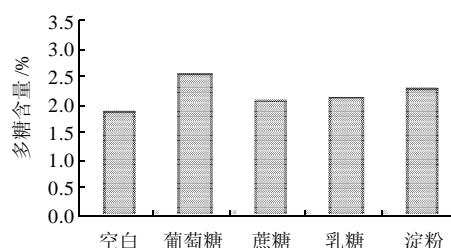


图1 碳源对多糖含量的影响

Fig.1 Effect of carbon resource on the yield of grifolan

由图1可知,外加碳源对灰树花在米糠上进行固态发酵有一定的影响,外加以上不同的碳源后都比空白的多糖含量有所增加,其中葡萄糖>淀粉>乳糖>蔗糖。故后续研究选用葡萄糖作为外加碳源。

2.1.1.2 葡萄糖添加量对固态发酵的影响

以60%水分含量米糠固体培养基分别加入质量分数为0、1%、2%、3%、4%、5%、6%的葡萄糖,结果如图2所示。

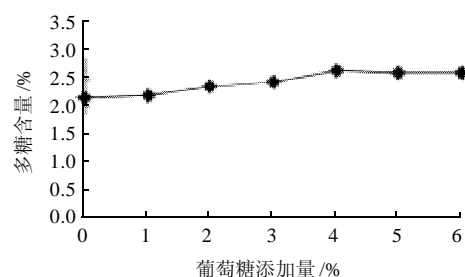


图2 葡萄糖添加量对多糖产量的影响

Fig.2 Effect of glucose content on yield of grifolans

由图2可知,随着葡萄糖含量的增加,多糖的含量也随之增加,当葡萄糖添加量为4%时达到最大,当添加量大于4%时多糖的含量有所减少。为节省生产耗费,可取较小的添加量。

2.1.2 氮源对固态发酵的影响

2.1.2.1 外加不同氮源对固态发酵的影响

氮源的不同形式是影响灰树花生长的的重要因素之一。灰树花有自己独特的酶系,对不同的氮源有不同

的利用程度。在 60% 水分含量, 4% 葡萄糖米糠固体培养基中分别加入 0.5% 的蛋白胨、牛肉膏和酵母膏作为外加氮源并与空白对照比较, 结果如图 3 所示。

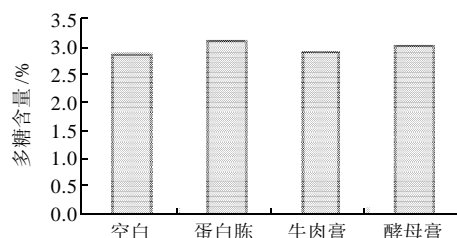


图 3 氮源对多糖产量的影响

Fig.3 Effect of nitrogen resource on the yield of grifolan

由图 3 可知, 外加的氮源中, 以蛋白胨对米糠固态发酵的影响为最大, 它们的影响大小依次为蛋白胨>酵母膏>牛肉膏, 故本研究采用蛋白胨为外加氮源。未考虑其他氮源, 原因是试验还是初步性的, 首先考虑能生长, 将来再做富含氮如麸皮便宜氮源及无机氮源的深入研究。

2.1.2.2 氮源添加量对固态发酵的影响

在 60% 的水分和 4% 葡萄糖的米糠固体培养基中分别加入质量百分数为 0%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5% 的蛋白胨, 结果如图 4 所示。

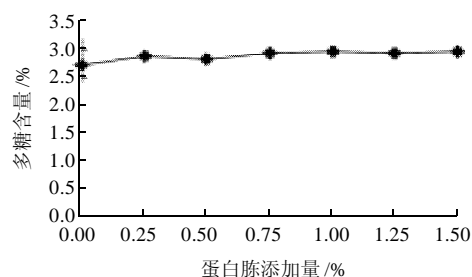


图 4 蛋白胨添加量对多糖产量的影响

Fig.4 Effect of peptone content on the yield of grifolan

由图 4 可知, 随着蛋白胨添加量的增加, 米糠固态培养基的总多糖都随之增加, 达到 1% 以后, 多糖的增加幅度不大。

2.1.3 水分对固态发酵的影响

在 4% 葡萄糖、1% 蛋白胨的米糠固体培养基上, 选用质量分数 50%、55%、60%、65%、70%、75% 的水分含量进行试验, 结果如图 5 所示。

由图 5 可知, 水分含量在 60% 时灰树花在米糠上生长最旺盛。水分含量太低不利于酶活和营养物质的传递, 然而水分含量太高时不利于空气的流动。

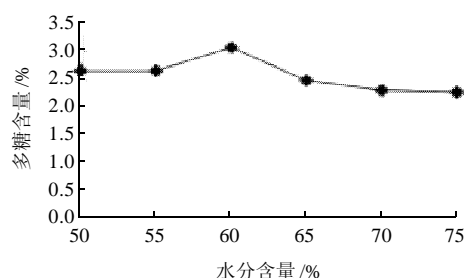


图 5 水分含量对多糖含量的影响

Fig.5 Effect of water content on the yield of grifolan

2.1.4 pH 值对发酵的影响

将 4% 葡萄糖、1% 蛋白胨、60% 水分的米糠固态培养基的起始 pH 值分别调至为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 进行试验, 结果如图 6 所示。

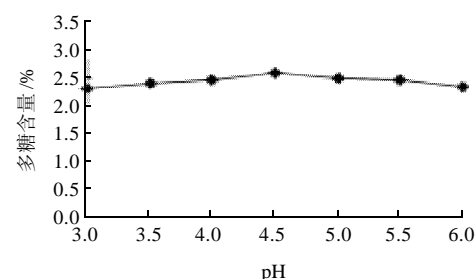


图 6 pH 值对多糖含量的影响

Fig.6 Effect of pH on the yield of grifolan

由图 6 可知, 当 pH 值达到 4.5 时, 多糖得率达到最大, pH 值过大或者过小, 都不利于灰树花在米糠固态培养基上生长。

2.2 培养基优化正交试验结果与分析

2.2.1 正交试验结果

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

试验序号	A	B	C	D	误差列	多糖含量/%
1	1	1	1	1	1	2.51
2	1	2	2	2	2	2.42
3	1	3	3	3	3	2.53
4	1	4	4	4	4	2.47
5	2	1	2	3	4	3.03
6	2	2	1	4	3	2.54
7	2	3	4	1	2	2.7
8	2	4	3	2	1	2.68
9	3	1	3	4	2	2.63
10	3	2	4	3	1	3.21
11	3	3	1	2	4	2.83
12	3	4	2	1	3	3.18
13	4	1	4	2	3	2.89
14	4	2	3	1	4	3.2
15	4	3	2	4	1	2.86
16	4	4	1	3	2	3.51

按 $L_{16}(4^5)$ 方案, 在 150r/min, 25℃ 条件下进行实验, 发酵 7d 后多糖含量如表 2 所示。

2.2.2 极差分析

以多糖含量为指标, 对正交试验结果进行极差分析, 结果如表 3 所示。

表 3 多糖含量的极差分析结果

Table 3 Rang analysis of orthogonal experiments for the yield of grifolan

因素	A 水分含量/%	B 葡萄糖添加量/%	C 蛋白胨添加量/%	D pH	误差列
k_1	2.483	2.765	2.848	2.898	2.815
k_2	2.738	2.843	2.873	2.705	2.815
k_3	2.963	2.730	2.760	3.070	2.785
k_4	3.115	2.960	2.817	2.625	2.883
极差	0.633	0.230	0.113	0.445	0.098

由表 3 可知, 4 种因素对发酵的影响大小依次为 $A > D > B > C$, 最佳培养基的配方为 $A_4B_4C_2D_3$, 即水分含量 65%、葡萄糖添加量 4%、蛋白胨添加量 0.5%、pH 5.5。

2.2.3 方差分析

以多糖含量为评价指标, 对正交试验结果进行方差分析, 结果如表 4 所示。

表 4 多糖含量的极差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiments for the yield of grifola

因素	偏差平方和	自由度	合并后均方差	F 比	F 临界值	显著性
A	0.912	3	0.304	37.54	$F_{0.05(3,6)}=4.76$	**
B	0.125	3	0.042	5.13	$F_{0.01(3,6)}=9.78$	*
C	0.028	3				
D	0.479	3	0.160	19.71		**
误差	0.020	3	0.007			
合并误差	0.050	6	0.01			
总和	1.56	15				

由表 4 可知, 水分和 pH 值对多糖含量的影响高度显著, 葡萄糖对多糖含量的影响显著, 蛋白胨的影响不显著, 被合并误差, 故在指定的水平范围内, 蛋白胨含量的变化可不考虑。

2.3 固态发酵工艺条件的选择结果

2.3.1 装样量对固态发酵的影响

由图 7 可知, 装样量较少时, 培养基中含氧量较大, 故多糖的得率会较大, 但得到的总多糖较低, 考虑生产效率选择 20g 米糠装料量。装样量超过 20g 时, 培养基中氧含量少, CO_2 不易排出, 多糖得率总体趋势变低。

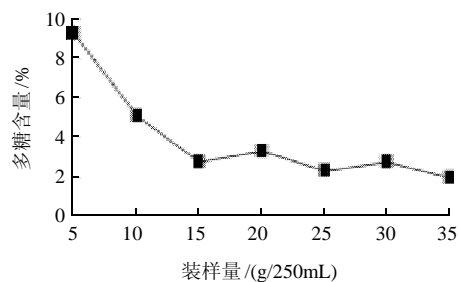


图 7 装样量对多糖含量的影响

Fig.7 Effect of flask-filling volume on the yield of grifolan

2.3.2 接种量对固态发酵的影响

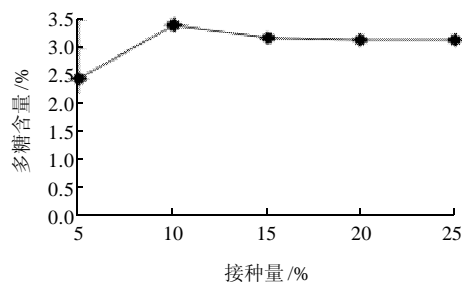


图 8 接种量对多糖含量的影响

Fig.8 Effect of inoculation amount on the yield of grifolan

由图 8 可知, 随着接种量的增加, 多糖含量也随之增加。当接种量超过 10% 时, 随着接种量的增加, 水分也随之增加, 使得灰树花生长受到抑制。综合考虑接种量和含水率, 选择接种量 10%。

2.3.3 发酵时间对灰树花固态发酵的影响

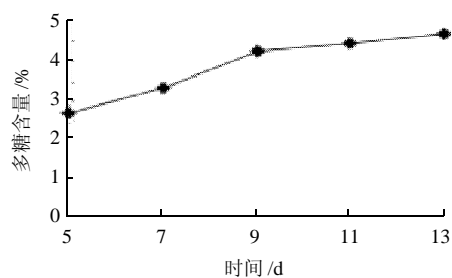


图 9 发酵时间对多糖含量的影响

Fig.9 Effect of fermentation time on the yield of grifolan

由图 9 可知, 随着生长时间增加, 发酵后的固态米糠培养基的多糖含量有所增加, 后期变缓。从经济学的角度考虑, 选择 11d 作为发酵时间。

2.3.4 温度对灰树花深层固态发酵的影响

由图 10 可知, 随着温度的增大, 灰树花的生长增加, 在温度达到 25℃ 时, 灰树花生长的速度最快。当

温度大于 25℃ 时, 灰树花长的速度逐渐减缓。故选择 25℃ 作为发酵温度。

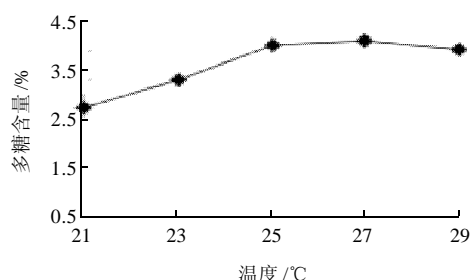


图 10 温度对多糖含量的影响

Fig.10 Effect of fermentation temperature on the yield of grifolan

2.3.5 转速对灰树花深层固态发酵的影响

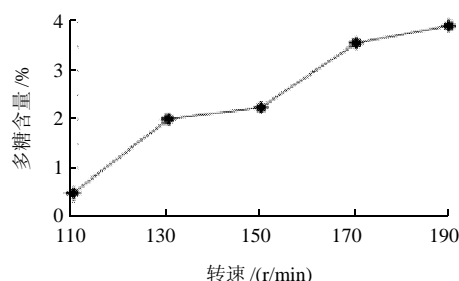


图 11 转速对多糖含量的影响

Fig.11 Effect of rotation speed on the yield of grifolan

由图 11 可知, 随着转速的增加, 多糖含量也随之增加。当转速超过 170r/min 时, 随着转速的增加, 多糖含量增加不多, 为了降低机械功率的输出, 选取 170 r/min 作为发酵过程中的摇床转速。

2.3.6 局部寻优的发酵工艺条件

根据以上试验的结果, 采用局部寻优法, 选择较好的发酵工艺条件是: 装样量 250mL 三角瓶装入 20g 米糠为基础的优化培养基, 10% 接种量、温度 25℃、摇床转速 170r/min, 培养时间 11d。以优化培养基在所选较优的工艺条件下进行固态发酵验证实验, 多糖含量(占米糠质量的百分数)为 4.52%。

2.4 多糖含量和培养基成分关系回归模型的求取

为求取固态发酵米糠培养基得到的灰树花多糖含量和培养基组成关系的模型, 利用正交试验数据, 使用 SPSS 软件选择二次多项式回归模型进行求取。得到总多糖含量与水分含量 A 和葡萄糖含量 B(其他因素利用 SPSS 回归计算得到的变量系数的 t 检验结果, 判断无显著性而剔除)的回归关系式为:

$$Y=0.188-0.518A-1.291B+2.326AB+0.408A^2$$

拟合的相关系数 R 为 0.826, 决定系数 R^2 为 0.682, 可以认为数据拟合优度较好。对方程的显著性 F 值为 5.907,

P 值为 0.009, 故回归模型高度显著。正交试验设计时首先假定没有交互作用, 而回归模型说明有交互作用, 所以正交试验的假定有局限性, 但如考虑交互作用, 需选用更大的正交表, 为克服这一不足, 可考虑采用求回归模型的方法进一步考察目标函数和变量之间的可能关系。

3 结论

通过对影响培养基的葡萄糖添加量、蛋白胨添加量、起始水分和 pH 值 4 个因素的探索, 并且根据单因素试验的结果进行正交试验, 得到优化的米糠固体培养基配方。

对固体培养条件进行研究, 得到较优的摇瓶条件。多糖得率以米糠为标准计算, 可达 4.52%。

采用 SPSS 软件, 对正交试验数据进行回归计算, 得到了总多糖与水分含量和葡萄糖含量的回归关系式。

参考文献:

- [1] 汪维云, 吴守一, 朱金华. 灰树花液体深层培养工艺研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(3): 378-382.
- [2] 刘伟民, 黄达明, 陈庶来, 等. 灰树花深层发酵培养基优化研究[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 99-102.
- [3] 黄达明, 吴其飞, 陆建明, 等. 固态发酵技术及其设备的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 87-90.
- [4] JUNG K, KIM I H, HAN D A. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93: 75-81.
- [5] MAU J L, CHANG C N, HUANG S J, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia[J]. Food Chemistry, 2004, 87: 111-118.
- [6] LIN H, SHE Y H, CASSILETH B R, et al. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity *in vitro*[J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(1): 91-99.
- [7] HSIEH C, WANG H L, CHEN C C, et al. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38: 198-205.
- [8] YANG B Y, GU Y A, JEONG Y T, et al. Chemical characteristics and immuno-modulating activities of exo-biopolymers produced by *Grifola frondosa* during submerged fermentation process[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41: 227-233.
- [9] 杨锁华, 刘伟民, 杨小明, 等. 米糠应用研究进展[J]. 粮食加工与食品机械, 2006(4): 70-75.
- [10] 代峥峥, 刘伟民. 猴头菌发酵米糠所产多糖的超声波辅助提取工艺研究[J]. 粮油加工, 2008(3): 100-103.
- [11] 汪维云. 灰树花液体深层发酵培养及微量元素富集作用研究[D]. 镇江: 江苏理工大学, 1999.
- [12] 胡祥国. 灰树花液体培养富集硒的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2005.
- [13] 杨锁华. 用灰树花发酵米糠制备多糖[D]. 镇江: 江苏大学, 2006.
- [14] 代峥峥. 猴头菌液体发酵及多糖的提取纯化研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2008.
- [15] 顾慧敏, 刘伟民, 张建. 灰树花液体发酵转化米糠制备多糖的研究[J]. 粮油加工, 2010(5): 107-110.
- [16] 胡祥国, 刘伟民, 刘姜, 等. Zn、La 对灰树花液体培养菌丝产量的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(1): 79-84.
- [17] 刘伟民, 孙琳洁, 刘姜, 等. 加铜液体培养灰树花富集有机锌的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 331-334.
- [18] 马莺, 王静, 牛天骄. 功能性食品活性成分测定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.