

文章编号:1673-1689(2006)04-0067-05

搅拌转速和通气量对灰树花深层发酵培养的影响

崔凤杰^{1,2}, 陶文沂^{1,2*}, 许泓瑜², 许正宏², 敖宗华²

(1. 江南大学 生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院生物制药研究室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用 15 L 搅拌式发酵罐研究灰树花的扩大培养条件, 主要考察了搅拌转速和通气量对灰树花菌丝量、胞外多糖产率、溶氧、菌丝形态以及发酵液粘度的影响。研究结果表明搅拌转速和通气量能显著影响灰树花的生长, 并且通过对灰树花菌丝球的大小、形态以及胞外多糖的分泌影响发酵液的粘度。并得出较为优化的培养条件为: 温度 25 ℃, 通气量 0.75 vvm, 搅拌转速 80 r/min, 装液量 60%; 在此条件下, 发酵 10 d 后, 灰树花菌丝体最大得率为 22.95 g/L, 胞外多糖的得率为 1.521 g/L。

关键词: 灰树花; 扩大培养; 搅拌转速; 通气量

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Effects of Agitation and Aeration on the Production of Mycelial Biomass and Exo-polysaccharides by *Grifola frondosa* GF9801

CUI Feng-jie^{1,2}, TAO Wen-yi^{1,2*}, XU Hong-yu², XU Zheng-hong², AO Zhong-hua²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Laboratory of Biopharmaceutics, School of biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of cultivation agitation intensity and aeration rate on the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides (EPS) by *Grifola frondosa* GF9801 in a 15 L batch fermenter were investigated in this study. Results revealed that agitation intensity and aeration rate could significantly influence the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides (EPS), the concentrations of dissolved oxygen and reducing sugars, and the broth apparent viscosities. The highest mycelial biomass (22.95 g/L) and EPS concentration (1.521 g/L) were obtained at the optimized operating condition at agitation speed (80 r/min) and aeration rate (0.75 vvm) after 10-day cultivation.

Key words: *Grifola frondosa*; batch fermentation; agitation intensity; aeration rate

丝状真菌深层发酵过程中其形态对一些代谢产物的生产有着重要的影响, 许多丝状真菌一般以

游离菌丝体或者球状生长。在扩大培养中影响菌丝体生长的因素很多, 其中搅拌剪切力等影响较为

收稿日期: 2005-09-17; 修回日期: 2005-11-11.

基金项目: 江苏省无锡市自然科学基金资助项目(NOCK030002).

作者简介: 崔凤杰(1980-), 男, 安徽阜阳人, 生物制药博士研究生; * 通讯作者。

显著^[1],特别在搅拌式发酵罐中对剪切力更大。因此,一般采用较低的搅拌速度来降低剪切力。但是许多大型真菌的培养过程粘度很大,并且对氧需求也很大^[2-3]。因此需要同时考虑必要的通气量和搅拌速度。为了满足在培养过程中菌球能紧密生长,提高传质常数,有必要对真菌发酵过程的操作条件进行优化。

近年来,药用真菌深层发酵培养得到的菌丝体和胞外多糖受到广泛的关注,由于它们所具有的各种生理活性物质,目前更多的研究集中在其药理应用^[4-6]。此外很多研究集中在药用真菌摇瓶发酵的影响因素,如培养基配方优化、培养条件的选择等方面^[7-8]。但是药用真菌的深层发酵的扩大培养目前还很少有报道。

灰树花(*Grifola frondosa*)又名栗子蘑,贝叶多孔菌,日本称舞茸,其香味浓郁,质地脆嫩,营养价值高,在民间有悠久的食用历史^[9],中国、日本以及北美等地均有分布。由于其含有诸多生物活性物质,获得了广泛关注。作者在本实验室前期工作的基础上^[10],在发酵罐上对不同的转速以及通气量进行实验,以考察它对灰树花深层发酵的影响,以期得出较佳的操作条件,为灰树花的工业放大生产提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

灰树花(*Grifola frondosa* GF9801)为作者所在实验室保藏菌种;LS-B50 型立式圆形压力蒸气灭菌锅;上海医用核子仪器厂生产;HYG-11 型转式恒温调速摇瓶柜;上海新星自动化控制设备厂生产;15 L 搅拌式发酵罐;德国产;Biostat C10-3 型生化培养箱;广东省医疗器械厂生产;721 分光光度计;上海精密科学仪器有限公司生产。

培养基:PDA 培养基(成分 g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,蛋白胨 2,KH₂PO₄ 2,MgSO₄·7H₂O 1,琼脂 20。

种子培养基(成分 g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 2,KH₂PO₄ 2,MgSO₄·7H₂O 1,麸皮浸汁 50(麸皮浸汁煮沸 30 min 八层纱布过滤),pH 自然;

发酵培养基(成分 g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 4,KH₂PO₄ 4,MgSO₄·7H₂O 2,玉米浆 1.5,pH 自然。

1.2 测定方法

1.2.1 种子培养 250 mL 摇瓶装液 100 mL,每瓶用接种铲接种黄豆大小菌丝体 10 块。25 ℃ 150 r/

min 培养 6 d,收集种子液。

1.2.2 15 L 扩大培养 发酵罐中装液量 60 %,即 10 L,接种 10 %,在温度为 25 ℃ 条件下调节不同的通气量、搅拌转速,初始 pH 自然,其中相对溶氧(%),pH、温度以及空气流速全程检测,间隔一定时间取样分析。

1.2.3 菌丝体干重和胞外多糖的测定 所取样品在 4 ℃ 以 10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀物,去离子水洗涤 3 次,真空干燥箱 60 ℃ 烘至恒重,所得即为菌丝体干重。所得滤液经 0.45 μm 滤膜过滤,滤液浓缩后,加入 3 倍体积无水乙醇,剧烈搅拌,4 ℃ 过夜沉淀,高速离心醇沉液,收集沉淀,真空干燥箱 60 ℃ 烘至恒重,所得即为胞外多糖含量。各测定指标测定两次,取其均值。

发酵参数的计算公式:菌丝体过程平均比生长速率: $V(h^{-1}) = (1/X)(dX/dt)$

胞外多糖过程平均比增加得率: $P_{p/x} = (1/X)(dP/dt)$

1.2.4 残糖测定 通过 HPLC 法测定发酵醪中残糖含量,测定条件:ZORBAX Carbohydrate (5 μm × 150 mm)柱;柱温:30 ℃;流动相:乙腈:水=70:30(V:V);进样:5 μL;以葡萄糖为标准品作标准曲线,根据样品中葡萄糖的相应峰面积计算出相应的含量。

1.2.5 菌丝体形态学观察 采用光学显微镜观察,并用数码相机拍摄相应发酵醪图片进行分析。

1.2.6 发酵液粘度分析 发酵液离心后去上清液,采用 NDJ -1 旋转黏度计,3 号转子,在 60 r/min 室温下测定粘度。

2 结果与分析

2.1 搅拌转速对灰树花生长的影响

为了考察搅拌转速对灰树花发酵过程的影响,菌体生长、胞外多糖得率、发酵液还原糖消耗以及溶氧进行跟踪检测,实验中控制搅拌转速范围为 60 ~ 120 r/min,研究结果示于图 1。不同的搅拌速度对灰树花菌丝体量的得率影响显著(见图 1(A)),其中搅拌转速在 60 ~ 100 r/min 内,随着搅拌速度的增加菌丝体量不断提高。其中搅拌转速为 100 r/min 时,灰树花菌丝体量增长最快,并且产率最高,发酵到第 9 天菌丝体得率达到 23.50 g/L。但搅拌转速升高后,菌丝体量有所下降,可能是由于高搅拌转速条件下,剪切作用力较大,菌丝易被打断,不利于菌体生长。

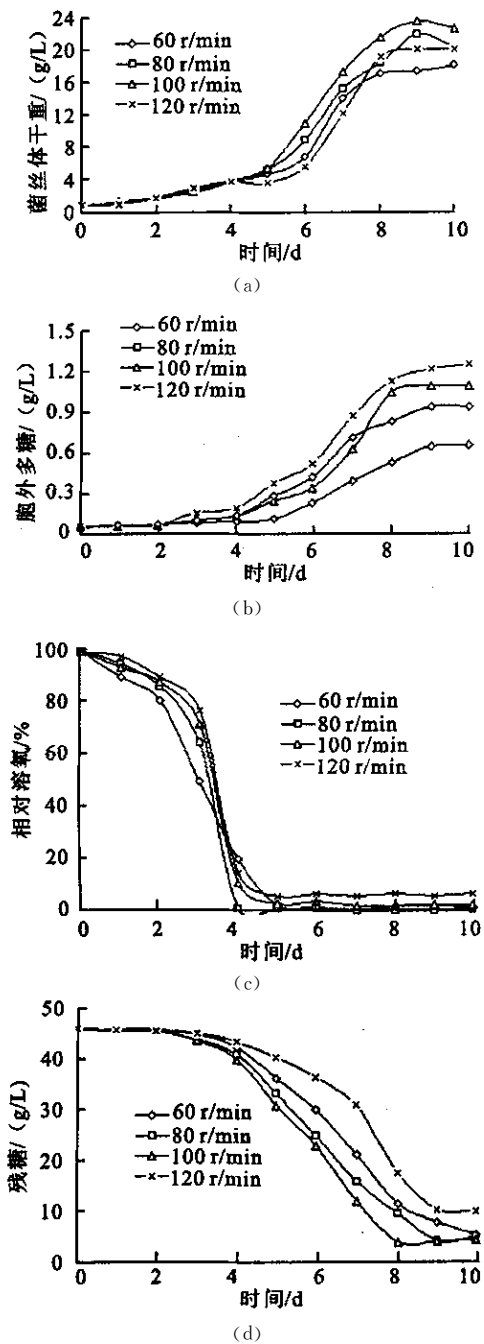


图 1 不同搅拌速度对灰树花生长的影响(a): 灰树花菌丝体干重(g/L); (b): 灰树花胞外多糖(g/L); (c): 发酵液残糖(g/L); (d): 相对溶氧(%)

Fig. 1 Time profiles of (a) mycelial biomass, (b) exopolysaccharides (EPS) production, (c) dissolved oxygen (DO), and (d) residual sugar in *G. frondosa* GF9801 using a 15 L stirred fermenter at different agitation rates

类似的生长趋势也表现在灰树花胞外多糖的得率上(图 1(B)),灰树花经过近 5 d 的培养适应期,开始大量分泌胞外多糖,在转速 80 r/min 下培养 10 d,灰树花胞外多糖得率达到最大 2.252 g/L,而其他转速(60,100,120 r/min)条件下,胞外多糖

的最大产率分别为 0.653,1.094,0.937 g/L。

从图 1(C)和(D)中可以看到,发酵液中残糖所消耗的趋势,在发酵前期(第 0~2 天)残糖量基本保持稳定,随着菌体快速生长,还原糖消耗也逐渐快速增加;溶氧的消耗规律基本相似,在快速生长期溶氧下降迅速,表明此时细胞的摄氧速率明显高于发酵液中的供氧速率。进入稳定期后,溶氧一直保持在较低的水平,这也可能由于发酵后期大量菌体生长,需要消耗大量的溶氧。

不同转速条件下,灰树花发酵动力学参数如表 1 所示,在 80 和 100 r/min 下取得菌丝体平均生长速率,分别为 0.106 86 和 0.107 57/h,而对于胞外多糖,则在 80 r/min 时产率最大,达到 0.005 93/h。

表 1 不同转速条件下的发酵参数比较

Tab. 1 Fermentation kinetics of <i>G. frondosa</i> GF9801 under the different agitation conditions				
动力学参数/(r/min)	菌丝体量/(g/dL)	胞外多糖/(g/L)	菌丝体过程平均比生长速率/h	胞外多糖过程平均比增加得率/h
60	18.11	0.653	0.096 47	0.003 30
80	20.94	1.252	0.106 86	0.005 93
100	23.7	1.094	0.107 57	0.004 59
120	20.12	0.937	0.096 57	0.004 42

2.2 搅拌转速对灰树花菌体形态及发酵液粘度的影响

实验中发现搅拌转速对灰树花菌体的生长形态有较大的影响,观测结果见表 2。

表 2 搅拌转速对灰树花菌体形态的影响

Tab. 2 The morphological change in <i>G. frondosa</i> GF9801 in a 15 L stirred-tank fermenter at different agitation rates			
搅拌转速/(r/min)	菌球直径/mm	丝状体比例	形态
60	3.5	+	紧密,小球状
80	2.2	+	较紧密,小球状
100	1.4	++	松散
120	0.9	+++	疏松,絮状

由表 2 可以看出低搅拌转速(60 和 80 r/min)下菌球直径较大,紧密,随着转速的提高,菌球直径下降并趋于松散;同时随着转速的提高,丝状菌体所占比例增大,一般丝状体方式生长时则会引出发酵前期的粘度较大,不利于营养物质和氧的溶解、传递与均匀分布,从而降低产量。通常发酵液的粘度与菌体的形态、产率以及胞外多糖的浓度相关。图 2 显示在发酵过程中,搅拌速度对灰树花发酵液的粘度的影响,搅拌速度在一定范围(60~100 r/min)内与发酵液最终粘度呈正相关,这主要由于搅

拌的剪切作用在促进菌体生长的同时,加快胞外多糖的分泌的原因. 还可以看出在转速 100 r/min 下,发酵第 4 天发酵液的粘度急剧上升,表明此时灰树花培养进入快速生长期。

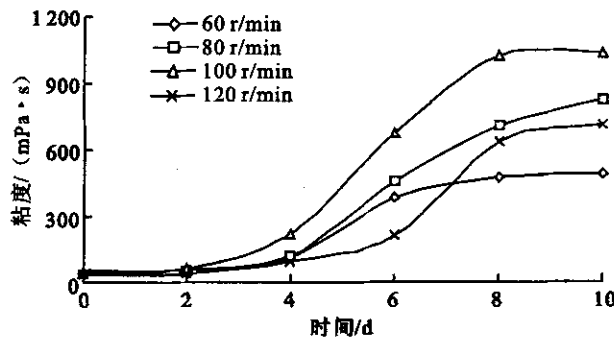


图 2 不同转速对灰树花发酵液粘度的影响

Fig. 2 The apparent viscosity of the fermentation broth *G. frondosa* GF9801 in a 15 L stirred fermenter under different agitation speeds

2.3 通气量对灰树花生长的影响

在好氧培养过程中,溶氧浓度是一个非常关键的控制参数,特别是对丝状真菌发酵的影响尤为明显,其中通气量对发酵醪的溶氧浓度起到直接的作用。在转速一定 (80 r/min) 的条件下,考察不同的通气量对灰树花生长的影响。

在搅拌转速为 80 r/min 时,通气量对灰树花生长以及发酵动力学参数的影响如图 2 和表 3 所示,在通气量为 0.5,0.75,1.0 vvm 时,最大菌丝体量为 14.51,20.54 和 21.38 g/L,较高的通气量比较有利于菌丝体的生长;而最大胞外多糖得率为 0.903,1.394 和 1.262 g/L,较高或较低的通气量均不利于胞外多糖的分泌。

对于还原糖的消耗以及发酵过程溶氧的变化,基本与搅拌转速的影响趋势相一致,通气量加大,发酵液中还原糖消耗的更为彻底,与灰树花菌丝体及胞外多糖得率的增加相对应;在通气量较大(1 vvm)的条件下,发酵后期发酵液中的溶氧仍然保持较高的浓度,因此在较大的通气量下,灰树花菌体生长较为充分。

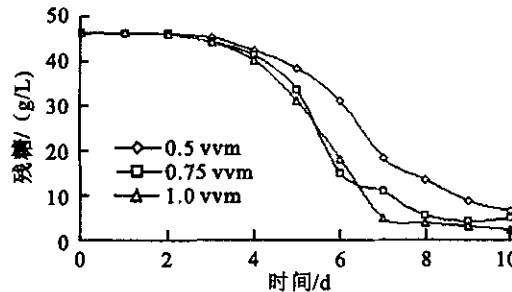
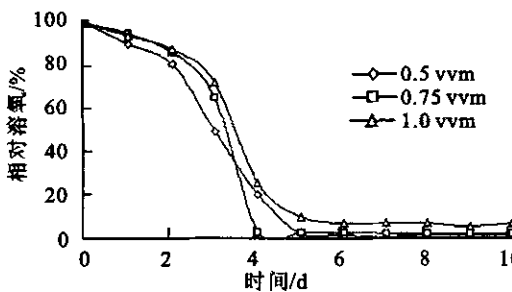
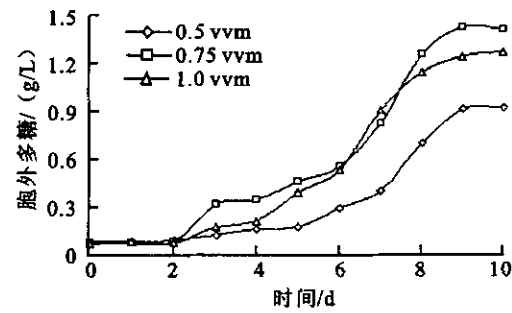
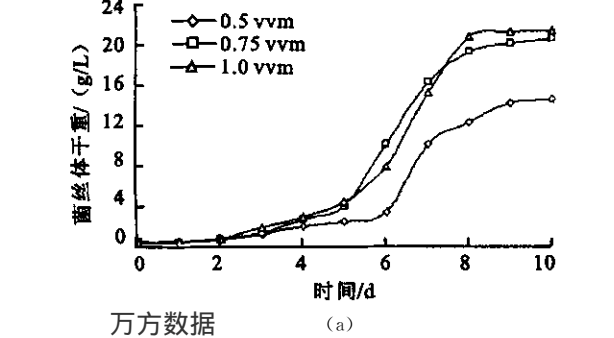


图 3 不同通气量对灰树花生长的影响

(a): 灰树花菌丝体干重(g/L); (b): 灰树花胞外多糖(g/L); (c): 发酵液残糖(g/L); (d): 相对溶氧(%)

Fig. 3 Time profiles of (a) mycelial biomass, (b) exopolysaccharides (EPS) production, (c) dissolved oxygen (DO), and (d) residual sugar in *G. frondosa* GF9801 using a 15 L stirred fermenter at different aeration rates

表 3 不同通气量条件下的发酵参数比较

Tab. 3 Fermentation kinetics of *G. frondosa* GF9801 under the different aeration conditions

动力学参数/ vvm	菌丝 体量/ (g/dL)	胞外 多糖/ (g/L)	菌丝体过程 平均比 生长速率/h	胞外多糖 过程平均比 增加得率/h
0.5	14.51	0.903	0.097 726	0.005 78
0.75	20.54	1.394	0.097 907	0.006 51
1.0	21.38	1.252	0.098 129	0.005 62

2.4 通气量对灰树花菌丝体形态及发酵液粘度的影响

对于丝状真菌发酵,通气速率对菌丝体形态有着显著的影响,过高或者过低都有可能使菌丝生长

会发生异常变化,主要表现在菌球生长大小不一,或者菌丝体碎裂,出现大量菌体碎片。通气量对灰树花发酵菌丝体形态的影响如图 4。(1~3)所示。从图中可以看出,较低的通气速度(0.5 vvm)可以得到较好的菌体形态,但是菌球大小不一,而较高的通气量(1 vvm)则导致菌球过小,并且发酵液中夹杂有异状粗体菌丝的菌丝体。可以看到通气速度对灰树花菌丝体形态影响显著。

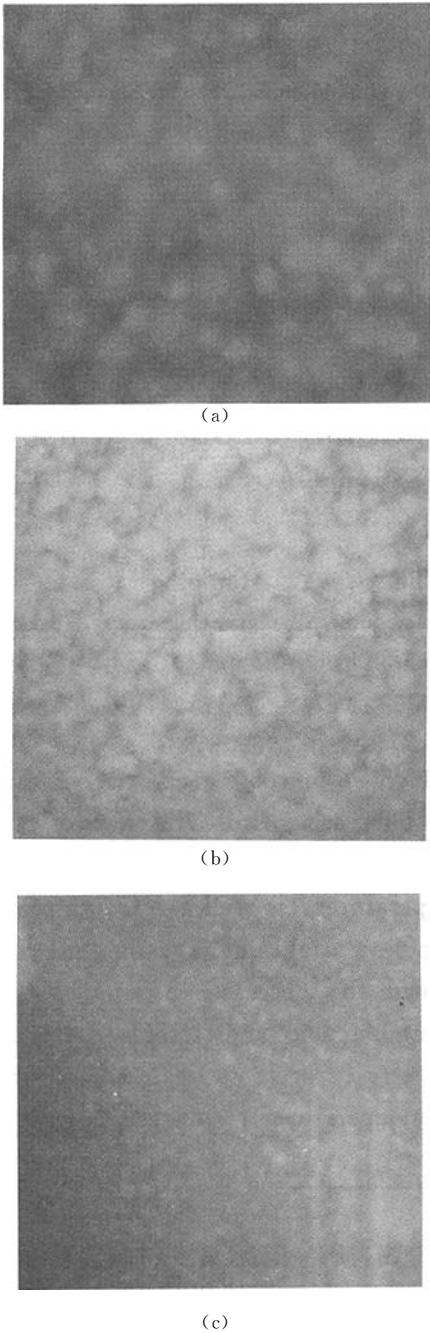


图 4 不同通气量对灰树花发酵菌丝体形态的影响
Fig. 4 The morphological change (a) 0.5 vvm, (b) 0.75 vvm, (c) 1.0 vvm in *G. frondosa* GF9801 in a 15 L stirred fermenter at different aeration rates
万方数据

通气量对发酵液粘度的影响如图 5 所示,由于在通气量为 0.75 vvm 下灰树花菌丝体和胞外多糖的得率都相对较高,因此在此条件下发酵液的粘度最高;较低的通气量(0.5 vvm)时发酵的粘度最低。一般通气量过大,会使大量泡沫逃逸,增加染菌机会,降低搅拌罐装料系数,液体蒸发多,增加粘度。因此综合以上研究结果,较佳的通气量为 0.75 vvm。

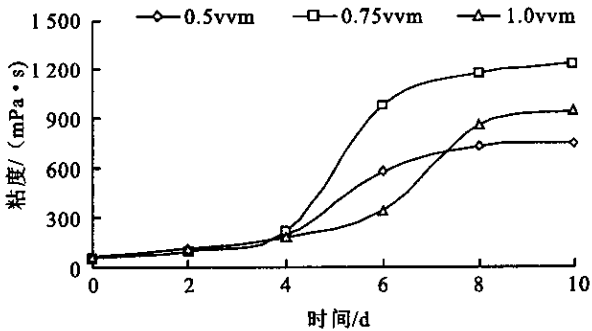


图 5 不同通气量对灰树花发酵液粘度的影响
Fig. 5 The apparent viscosity of the fermentation broth *G. frondosa* GF9801 in a 15 L stirred fermenter under different aeration speeds

3 结 论

通常在通气量一定的情况下,搅拌在发酵过程中主要起着混合和剪切作用,影响着菌丝球的大小,包括影响菌丝缠绕成球或打碎菌丝球,发酵过程中搅拌作用对菌丝球尺寸的影响,间接地影响菌球内氧及底物的消耗,同时对胞外多糖的分泌都有直接的影响,但是由于丝状真菌对搅拌剪切敏感,过高或过低的搅拌转速使菌丝体量、菌体形态以及胞外多糖的合成发生一定的变化,进而影响发酵液的粘度。本实验研究发现,在转速 80 和 100 r/min 条件下,菌丝生长较好,胞外多糖的得率也相对较高,过高或者过低的转速对菌体的生长不利。

前期实验也发现,通气量的改变对菌体的形态以及发酵液的粘度有着直接的作用。在转速固定在 80 r/min 条件下,考察了不同通气量对灰树花发酵过程的影响,结果表明过高的通气量也会导致菌丝球的大小和形态,并且在一定范围内对发酵液的粘度呈正相关。

经过对灰树花 15 L 发酵罐扩大培养过程中不同搅拌速度和通气量的研究,得出较为优化的培养条件为:温度 25 ℃,通气量 0.75 vvm,搅拌转速 80 r/min,装液量 60 %;在此条件下,发酵 10 d 后,灰树花菌丝体最大得率为 22.95 g/L,胞外多糖的得率为 1.521 g/L。
(下转第 80 页)

化链的还原途径来实现的,而 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶^[8],在微生物体内可代替 1,3-丙二醇氧化还原酶催化 3-羟基丙醛生成 1,3-丙二醇,是微生物转化甘油生成 1,3-丙二醇的另一关键酶。作者已经成功地构建了利用甘油转化为 1,3-丙二醇的重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-dhaB-yqhD)。以 50 g/L 甘油为惟一碳源的发酵培养基,经 IPTG 诱导后 1,3-丙二醇产量为 38.0 g/L;考虑到工业化生产,利用 IPTG 诱导的方法成本较高,采用温控载体

pHsh 代替原来的 pUCtac 载体,温控载体 pHsh 通过温度诱导表达,降低了生产成本。另外温控载体 pHsh 整个质粒仅为 2.3 kb,有利于增加其拷贝数和容量,可以插入较大的外源基因片断,并且外源蛋白质在大肠杆菌中高效表达后不易形成包含体,利用温控载体 pHsh 可以使编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 得到高效表达,为构建适合工业化生产 1,3-丙二醇的新型基因工程菌打下了良好的基础。

参考文献:

[1] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1,3-propanedio [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 52: 289—297.

[2] Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways [J]. **Biotechnol Prog**, 1998, 14: 116—125.

[3] Skraly F A, Lytle B L, Cameron D C. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 1: 98—105.

[4] Laffend L A, Nagarajan V, Nakamura CE, et al. Bioconversion of a fermentable carbon source to 1, 3-propanediol by a single microorganism[P]. 美国专利:USP 6025184, 2000-06-05.

[5] Nakamura C E, Whited G M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003, 14: 454—459.

[6] Joseph Sambrook, David W Russel. Molecular Cloning[M]. Washington: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[7] Johnson E A, Lin E C. *Klebsiella pneumoniae* 1, 3-propanediol; NAD⁺ oxidoreductase[J]. **J Bacteriol**, 1987, 169: 2050—2054.

[8] Emptage M, Haynie S L, Laffend L A, et al. Process for the biological production with high titer[P]. USP:USP 6514733, 2003-02-04.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 71 页)

参考文献:

[1] Cui Y Q, Van der Lans R G J M, Luyben K C A M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998, 57: 745—790.

[2] Maria P. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes [J]. **Biotechnology Advances**, 2004, 22: 189—259.

[3] Feng Y Y, He Z M, Ong S L, et al. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β-mannanase production [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 32: 282—289.

[4] Kim D H, Yang B K, Jeong S C, et al. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*[J]. **Biotechnology Letters**, 2001, 23: 513—517.

[5] Shen Y C, Chou C J, Wang Y H, et al. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *innamomum* species [J]. **FEMS Microiology Letters**, 2004, 231: 137—143.

[6] Liua J J, Huang T S, Hsu M L, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action [J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2004, 201: 186—193.

[7] 余素萍,张劲松,杨焱,等. 灵芝胞内多糖高产菌株 G7 深层发酵工艺的研究[J]. 中国食用菌,2004,6:36—39.

[8] 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.

[9] Andraea T B, Judith S S, Robert M H, et al. Mushrooms, tumors, and immunity [J]. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1999, 221: 281—293.

[10] 孙克,许正宏,敖宗华,等. 灰树花发酵条件的研究[J]. 药物生物技术, 2002, 9 (2) : 91—93.

万方数据

(责任编辑:杨 萌)