

灵芝胞外多糖深层发酵培养基的优化

李平作 徐 柔 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院,无锡 214036)

摘要 研究了营养性因子对灵芝多糖深层发酵的影响,结果表明葡萄糖、玉米粉、酒糟、酵母膏和麸皮有利于胞外多糖的形成。C/N比实验表明,较高的 C/N比有利于胞外多糖的形成。进一步的正交优化实验确定了灵芝多糖深层发酵的最佳培养基组成(g/L)为:酒糟 80(含水量 7%),葡萄糖 10,玉米粉 10,麸皮 5。在 25 L 发酵罐上灵芝发酵胞外多糖的最高产量是 2.91 g/L。

关键词 灵芝;胞外多糖;营养性因子;正交实验;深层发酵

分类号 TQ920.1/TQ920.9

0 前 言

目前,灵芝深层发酵所产生的胞内多糖和胞外多糖都是有效多糖,这已被国内外的研究者所证实^[1~5]。而且,从整个多糖产品的生产过程看,以胞外多糖为主要目标产物,可以简化生产工艺,提高生产效率。尤其是便于通过发酵过程的优化来提高胞外多糖的产量。因此,本实验以胞外多糖为目标产物,通过优化发酵培养基的组成来提高胞外多糖的产量。酒糟是酒精厂的发酵副产品,是一种再生资源,酒糟中含有较丰富的营养成分,有利于菌体的生长和多糖的形成,以它为发酵原料来生产多糖是再生资源生物转化的有效途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 灵芝(*Ganoderma lucidum*)由作者所在再生资源研究室筛选保存。

1.1.2 碳源

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、木糖 上海来泽精细化工厂提供;

酒糟 徐州酿酒总厂提供;

玉米粉 无锡酶制剂厂提供。

1.1.3 氮源

麸皮、豆饼粉 无锡酶制剂厂提供;

酵母膏、蛋白胨、尿素、硫酸铵 上海东海制药厂提供。

1.2 主要仪器设备

Hitachi 高速冷冻离心机 日本进口产品;

25 L 机械搅拌发酵罐 生物工程学院自制;

回转式恒温调速摇床柜 上海新星自动化控制设备成套厂产品

1.3 实验方法

1.3.1 种子培养

1) 斜面培养基 PDA.

2) 液体种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20; 玉米粉 10; 麸皮 5; KH_2PO_4 1.5; MgSO_4 2.5.

3) 液体种子培养: 将斜面菌种转接到 250 mL 三角瓶, 装液量 80 mL, 30°C 和 150 r/min 条件下培养 7 d. 以 10% 的接种量转到 500 mL 三角瓶中培养 3~4 d 作为发酵罐接种物.

1.3.2 深层发酵 25 L 发酵罐中培养基体积 12.5 L, 发酵温度 30°C , 通风量: $0.75 \text{ m}^3/\text{h}$, 搅拌转速 180 r/min, 接种量 1.25 L, 发酵时间 96 h.

1.3.3 细胞干重法测定生物量 见文献 [6], 按下式计算生物量 (g/L):

生物量 = $(\text{DCW} / V) \times 10^6$. 式中 DCW 为细胞干重 (g); V 为取样体积 (mL).

1.3.4 乙醇沉淀法测定粗多糖 见文献 [1, 7].

2 结果与讨论

2.1 营养性因子对灵芝多糖深层发酵的影响

2.1.1 碳源 由图 1 可以看出, 葡萄糖及成分较复杂的复合碳源 (玉米粉及酒糟) 有利于菌丝体的生长和胞外多糖的分泌, 这与有关的报道相一致^[1-3]. 其原因可能来自两方面, 一是酒糟等碳源中含有的其它营养成分 (各种维生素类等) 有利于菌体的生长; 二是酒糟中含有的纤维素、半纤维素和核苷酸类物质作为菌丝体胞外多糖合成的前体诱导物而促使胞外多糖的大量合成. 吴东儒^[8], Setherland I W^[10] 在他们的论述中指出核苷酸类物质能够作为多糖合成的前提物来调节多糖的形成.

2.1.1 氮源 由图 2 可以看出, 以酵母膏、麸皮为氮源时, 生物量及胞外粗多糖产量较高; 以有机氮源进行灵芝深层发酵时菌体生物量及胞外菌球多糖的产率都明显高于无机氮源, 可见灵芝菌丝体对有机氮源的利用能力要优于无机氮源. 作者认为 NH_4^+ 的存在不利于灵芝多糖的形成.

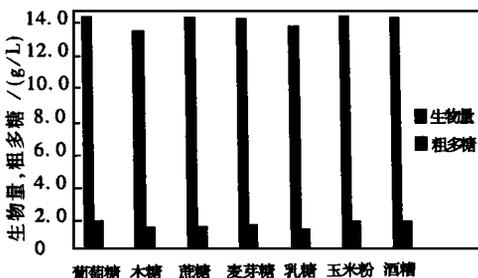


图 1 碳源对灵芝多糖深层发酵的影响

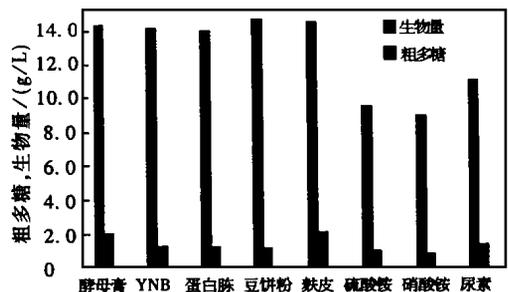


图 2 氮源对灵芝多糖深层发酵的影响

2.2 C/N比对灵芝多糖深层发酵的影响

2.2.1 碳源浓度的影响 由表 1可以看出,葡萄糖质量浓度太高和太低都不利于胞外多糖产率的提高,太低时营养基质用于长菌体的比例增加;在葡萄糖质量浓度大于 60 g/L时,延滞期要滞后 24 h左右,这表明较高质量浓度碳源对菌体生长具有抑制作用。因此灵芝多糖发酵的碳源质量浓度应控制在 20~ 40 g/L。

2.2.2 氮源质量浓度的影响 由表 2可以看出,氮源质量浓度太高时,生物量明显提高,胞外多糖产量下降;在氮源质量浓度太低时,菌体生长不良,多糖产量也下降。只有在适宜的氮源质量浓度(1~ 3 g/L)下,菌体才能够兼顾其生长和多糖的形成。

从上面的实验结果我们可以看出,较高 C/N比有利于灵芝胞外多糖形成。

表 1 葡萄糖质量浓度对灵芝多糖深层发酵的影响

葡萄糖浓度 / (g/L)	发酵时间 / h	生物量 / (g/L)	粗多糖 / (g/L)
20 (C/N = 45)	84	13.8	1.53
40 (C/N = 90)	96	13.6	1.86
60 (C/N = 135)	144	13.1	1.82
80 (C/N = 180)	156	13.4	1.87

表 2 酵母膏浓度对灵芝多糖深层发酵的影响

酵母膏浓度 / (g/L)	发酵时间 / h	生物量 / (g/L)	粗多糖 / (g/L)
1 (C/N = 134)	96	12.4	1.57
3 (C/N = 45)	96	13.6	1.98
5 (C/N = 27)	84	14.8	1.35
7 (C/N = 19)	84	14.3	1.34

2.3 正交实验优化发酵培养基

由上述的营养因子实验及 C/N比实验可以看出,培养基的组成及各成分间的比例对菌体生长和多糖产量有较大的影响,根据已有的实验结果,考虑到再生资源的利用,我们通过正交实验优化发酵培养基组成。实验安排及实验结果见表 3和表 4。

表 3 实验因子及水平 $L_9(3^4)$ g/L

水平	因子			
	A(酒糟)	B(玉米粉)	C(葡萄糖)	D(麸皮)
1	50	0.5	1.5	1
2	65	1.0	1.0	0.75
3	80	1.5	0.5	0.5

表 4 正交实验结果 $L_9(3^4)$ g/L

实验号	因子				多糖 (y)	总和		
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	1.95	1.80	2.10	5.85
2	1	2	2	2	2.10	1.95	2.55	6.60
3	1	3	3	3	1.95	2.10	2.40	6.45
4	2	1	2	3	1.65	1.80	2.40	5.85
5	2	2	3	1	1.50	1.35	2.10	4.95
6	2	3	1	2	1.20	1.14	1.26	3.60
7	3	1	3	2	2.10	2.10	1.95	6.75
8	3	2	1	3	2.55	2.55	2.40	7.50
9	3	3	2	1	1.50	1.95	1.95	5.40
Ij	18.9	18.45	16.95	16.20				
IIj	14.4	19.05	17.85	16.95	T = 52.95			
IIIj	19.65	15.45	18.15	19.80	平均 = 1.96			
Sj	1.793	0.826	0.087	0.801	SS _t = 4.95			
极差	5.25	3.60	1.20	2.85				

由上表可以看出酒糟的极差最大,其次是玉米粉、麸皮和葡萄糖,这说明酒糟对胞外粗多糖的影响最大。为直观地反应各因子对指标的影响,作出因子和实验指标的关系图 3~ 6。

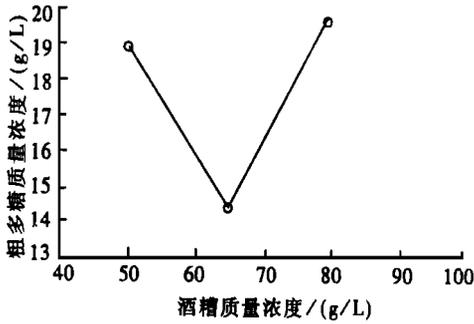


图 3 酒糟对指标的影响

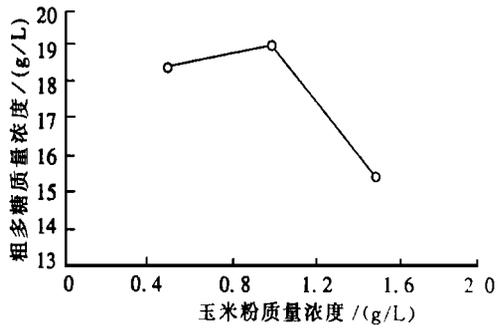


图 4 玉米粉对指标的影响

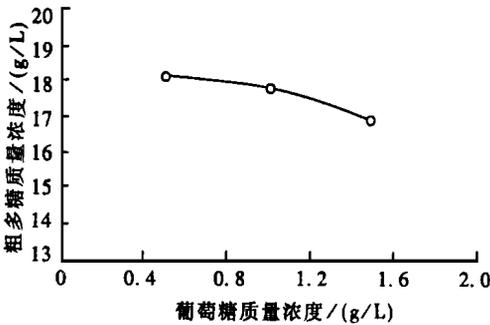


图 5 葡萄糖对指标的影响

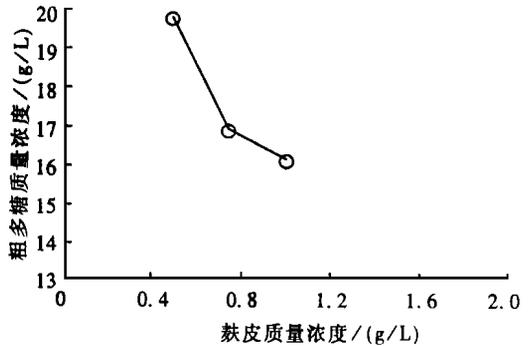


图 6 麸皮对指标的影响

由图中可以看出葡萄糖的极差最小,因而图形的波动最小;而酒糟的极差最大,其图形的波动也最大,对指标的影响也就越大。各因素的主次顺序为:

主 $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ 次
A B D C

进一步考察各因子对指标的影响,作者进行了方差分析,见表 5。

从表 5 的方差分析结果中

表 5 正交实验的方差分析

方差来源	方差平方和	自由度	均方差	F	显著性
A	1.793	2	0.8965	11.7	**
B	0.826	2	0.413	5.4	*
C	0.087	2	0.0435		
D	0.801	2	0.4005	5.2	*
误差	1.44	18	0.08		
总误差*	1.527	20	0.0764		

注: $F_{0.95}(2, 20) = 3.49$, $F_{0.99}(2, 20) = 5.85$

可以看出,因子 A 在 99% 的置信度下对指标的影响高度显著;因子 B 和 D 在 95% 的置信度下对指标的影响显著。因此培养基的最佳组合是 A₃, B₂, C₂, D₃, 即酒糟 80 g/L(含水量 75%), 葡萄糖 10 g/L, 玉米粉 10 g/L, 麸皮 5 g/L。在此组合下,在 25 L 的发酵罐上经 60% 乙醇沉淀,胞外多糖的最高产量达 2.35 g/L。

3 结 论

1) 碳源实验结果显示,葡萄糖、玉米粉和酒糟有利于胞外多糖的形成,其原因可能与复合碳源中含有的多糖合成前提物质有关。氮源实验表明,酵母膏和麸皮是较适宜的灵芝深层

发酵氮源,而无机氮源不利于灵芝菌体的生长

2) C/N 比实验表明,较高的 C/N 比有利于胞外多糖的形成

3) 正交优化实验确定的灵芝多糖深层发酵的最佳培养基组成 (g/L) 为: 酒糟 80(含水量 7%), 葡萄糖 10, 玉米粉 10, 麸皮 5. 在此组合下, 在 25 L 的发酵罐上发酵胞外多糖 (6% 乙醇沉淀部分) 的最高产量是 2.35 g/L, 加上 30% 乙醇沉淀部分 (0.56 g/L), 共计 2.91 g/L, 已超过目前文献报道的最高值 2.8 g/L.

参 考 文 献

- 1 李平作. 灵芝深层发酵生产生物活性物质的研究. [博士论文]. 无锡轻工大学, 1997
- 2 Bohn John A, BemMiller James N. (1-3)-(-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohydrate Polymers, 1995, 28: 3-14
- 3 三崎旭. β -glucan の 制造法 び 用途. 日本, 公开特许公报, 60-188402, 1985
- 4 Usui T, Iwasaki Y, Hayashi K, et al. Antitumor activity of water-soluble β -glucan elaborated by *Ganoderma ap-planatum*. Agric Biol Chem, 1984, 45: 323-326
- 5 陈国良. 灵芝有效成分研究进展. 中国食用菌, 1994, 4(14): 7
- 6 Pielken Petra, Stahmann Peter, Sahn Hermann. Increase in gucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33: 1-6
- 7 Miyazaki T, Nishijima M. Studies on Fungal Polysach XXVII. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 3611
- 8 吴东儒主编. 糖类的生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1987: 518
- 9 Setherland I W. Extracellular polysaccharides. Adv Microb Physiol, 1982, 23: 79-145

Medium Optimization for Extrapolysaccharides Production by Submerged Fermentation of *G. lucidum*

Li Hngzuo Xu Rou Zhang Kechang

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract Some nutritional factors affecting the submerged fermentation of *G. lucidum* were investigated, and the result showed that distilled grain, corn powder, glucose, wheat bran, yeast extract and high C/N ratio were all favorable to the extracellular polysaccharide formation. The optimum medium for industrial scale fermentation was obtained by orthogonal test, and it had the following composition (g/L): distilled grain (contain 7% water), 80; glucose, 10; corn powder, 10; and wheat bran, 5. The maximum crude extracellular polysaccharides yield was found to be about 2.91 g/L in 25 L fermentor.

Key words *G. lucidum*; extrapolysaccharides; nutritional factors; orthogonal test; submerged fermentation

(责任编辑: 秦和平)