

文章编号: 1001-7453(1999)03-0062-04

灵芝发酵过程中胞外多糖快速测定模型的建立

李平作,徐 柔,章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘要:建立了灵芝深层发酵过程中胞外多糖质量浓度和发酵上清液相对粘度之间关系的数学模型,从而找到了一种通过测定发酵过程中上清液相对粘度来检测胞外多糖含量的方法。模型具有较好的拟合性,平均相对误差在 4.4% 左右。

关键词:灵芝;胞外多糖;相对粘度;深层发酵

中图分类号: Q-332 文献标识码: A

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^[1,2]。从整个多糖产品的生产过程来看,以胞外多糖为主要目标产物。目前用于多糖测定的方法主要是酒精沉淀后经干燥称重法、硫酸苯酚法或蒽酮硫酸法测定总糖^[3],方法费时,酒精用量大。Catley^[4]等报道的标记闪烁计数法、Imshenetskii^[5]等报道的浊度法,只是酒精沉淀法的修饰,没有从根本上简化,加快发酵液中多糖含量的测定速度。探针检测^[6]不失为一种快速简便的测定方法,但需专一性的工具酶和高质量的氧电极,对于我们现有的条件并不合适。为了快速检测发酵液中的多糖含量,有必要建立一种快速实用的粗多糖测定方法。多糖是生物大分子物质,在发酵过程中随着胞外多糖含量的增加,发酵上清液的粘度也在增加,这两者之间如能建立起某种定量关系,则通过测定粘度即可计算出多糖的含量。基于此,作者对灵芝发酵过程中胞外多糖的快速测定模型进行了探索。

1 材料与方 法

1.1 材 料

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

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基: PDA。

2) 种子培养基 (kg/m^3): 葡萄糖 20,玉米粉 10,麸皮 5, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5。

收稿日期: 1998-09-05;修订日期: 1999-02-28

作者简介: 李平作 (1967年 4月生),男,山东莱阳人,工学博士。

3) 发酵培养基 (kg/m^3): 酒糟 (含水量 75%) 80, 葡萄糖 10, 玉米粉 10, 麸皮 5.

1.2 发酵工艺

斜面菌种 \rightarrow 一级种子培养 (250 mL 的三角瓶装液量 75 mL, 摇瓶转速 150 r/min, 30°C 培养 144 h) \rightarrow 二级种子培养 (500 mL 的三角瓶装液量 150 mL, 其它工艺要点同一级种子培养) \rightarrow 深层发酵 (装料系数 70%, 接种量 10%, 搅拌转速 180 r/min, 通风量 1: 0.75, 30°C 发酵 96 h).

1.3 主要仪器设备

奥式 (Ostwald) 毛细管粘度计; Hitachi 高速冷冻离心机; 2 L 容积玻璃发酵罐 (带溶氧和 pH 电极); 本院自制 25 L 容积机械搅拌式发酵罐.

1.4 分析方法

1.4.1 多糖测定 取 100 mL 发酵液以 6 000 r/min 离心 20 min, 向上清液中分别加入无水乙醇至原发酵液占体积分数为 30% 和 60%, 置冰箱中过夜, 离心后将沉淀物以硫酸苯酚法测定总糖^[1,3].

1.4.2 相对粘度测定 在恒温 (30°C) 条件下分别测定去离子水的流出时间 (t_0) 和发酵上清液的流出时间 (t_1), 按下式^[7]计算相对粘度:

$$\text{相对粘度} = t_1 / t_0.$$

2 结果与讨论

2.1 2 L 容积玻璃发酵罐中胞外多糖测定模型的建立

由于多糖是高分子的多聚物, 因此使得发酵液变成一种胶体体系, 具有一定的粘度. 因为溶液的粘度一般是随溶液浓度的递升而增高, 所以灵芝深层发酵过程中粘度的变化就有可能反映多糖质量浓度的变化, 这样就能够通过检测发酵液粘度的大小来判断多糖含量的高低, 因此作者测定了发酵过程中胞外多糖质量浓度和相对粘度随发酵时间的变化情况, 见图 1.

由图 1 可以看出, 胞外多糖的质量浓度与发酵上清液的粘度变化趋势基本一致, 都是发酵前期 (48 h 以前) 变化小, 发酵中后期升高快, 因此有可能在两者之间建立起某种数学关系. 作上清液相对粘度与胞外多糖质量浓度关系图 (图 2), 并进行趋势回归, 得到胞外多糖质量浓度与上清液相对粘度之间的模型方程 (1).

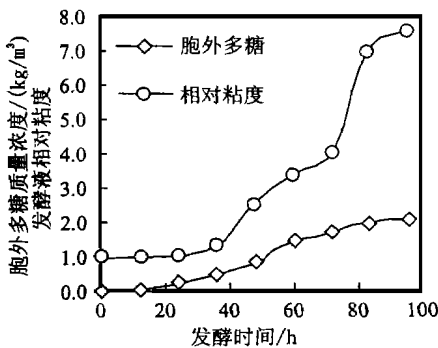


图 1 2 L 发酵罐中胞外多糖质量浓度和发酵液相对粘度随时间的变化曲线

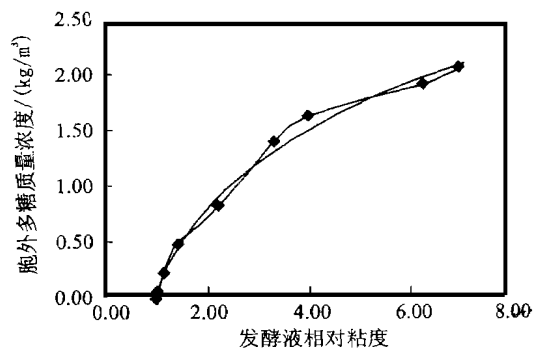


图 2 2 L 发酵罐中胞外多糖质量浓度与发酵液相对粘度的关系曲线

$$y = 1.13 \ln(x) \quad (1)$$

$$R = 0.98$$

式中, y 是胞外多糖质量浓度, x 是发酵上清液的相对粘度, R 是回归系数。

2.2 25 L机械搅拌发酵罐中胞外多糖测定模型的建立

从模型方程的回归情况看,其相关性并不十分理想。原因可能与发酵时取样的不均一性,以及发酵过程中随着取样次数的增加,发酵液的体积变化较大有关。因此又进行了25 L容积发酵罐实验,结果见方程(2)及图3。

$$y = 1.24 \ln(x) \quad (2)$$

$$R = 0.99$$

由实验结果可以看出,在25 L容积发酵罐中胞外多糖的质量浓度与发酵液相对粘度具有很好的相关性,相关系数达到0.99。

2.3 模型的验证

为进一步检验模型方程(2)的实验误差,对预测值和实测值进行了比较,结果见表1。

由表可以看出,模型与实际测量结果的拟合性较好,相对误差约4.4%,这表明能够通过测定相对粘度的方法来快速测定胞外多糖的含量。

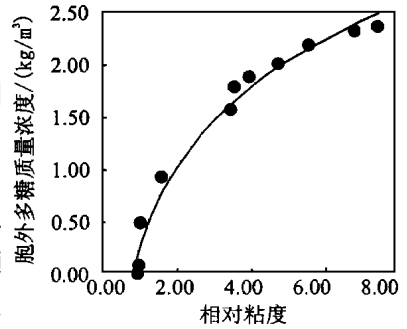


图3 25 L发酵罐胞外多糖产率与相对粘度的关系曲线

表1 模型预测值与实际测量值的比较(25 L发酵罐)

相对粘度	胞外多糖质量浓度/(kg/m³)		相对误差
	预测值	实测值	
7.50	2.50	2.35	+ 6.3%
6.88	2.41	2.31	+ 4.3%
5.45	2.13	2.17	- 1.8%
4.64	1.97	2.02	- 2.3%
4.00	1.80	1.86	- 3.2%
3.62	1.69	1.77	- 5.2%
3.08	1.50	1.56	- 3.8%
1.64	0.85	0.92	- 7.6%
			4.4% (均值)

3 结 论

1) 通过对灵芝发酵过程中胞外多糖质量浓度和上清液粘度的回归分析,建立了发酵液相对粘度与胞外多糖质量浓度关系的数学模型,从而找到了一种简便快速的测定灵芝深层发酵过程中胞外多糖质量浓度的方法,极大地提高了实验效率。该方法的平均相对误差在4.4%左右,因而较准确。作者已经利用该方法进行了菌种的筛选复壮和发酵过程检测。

2) 随着反应器的放大,模型的拟合性越来越好。从本实验的2 L容积发酵罐和25 L容积发酵罐的实验结果可以看出,后者比前者的相关性好,其原因可能是在25 L容积发酵罐上取样时发酵液体积变化所带来的实验误差减少。作者也曾把2 L罐的实测值与25 L发酵罐的模型预测值进行比较,相对误差在6%左右。这也说明了本实验中所建立的方程具有较好的适用性,有可能运用于工业化生产中的在线检测。

3) 在实际运用该方法时,应该注意对不同组成的培养基、不同类型的反应器,模型方程中的参数值不同。通过多次实验建立起相应条件下的模型方程,即可将该方法运用于此条件下的发酵过程检测。

4) 由于发酵液相对粘度除与多糖质量浓度有关外,还与多糖分子式量有关,在80 h时粘度的急速增加,表明此时产生的多糖分子式量较大,因而多糖质量浓度和发酵液相对粘度之间不是一线性关系。

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 [D].无锡: 无锡轻工大学, 1997.
- [2] MIYAZAKI T, NISHIJIMA M. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* [J]. Chem Pharma Bull, 1982, 29 3611~ 3614
- [3] DUBOIS M, GIUES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances [J]. J Anal Chem, 1956, 28 350~ 357
- [4] CATELEY B J. Utilization of carbon sources by pullularia pullulans for the elaboration of extracellular polysaccharides [J]. Appl Microbiol. 1971, 22 641~ 649
- [5] IMSHEN ETSKII A A, Kondrateva T F. Rapid method of quantative determination of pullulan in culture fluid of pullularia pullulans [J]. Mikrobiologiya, 1978, 47 566~ 568
- [6] RENNENBERG R, KAISER G, SCHELLER F, et al. Enzyme sensor for pullulan and pullulanase activity [J]. Biotechnol Lett, 1985, 7 809~ 812
- [7] 张惟杰主编.复合多糖生化研究技术 [M],上海: 科学技术出版社, 1987. 100~ 102

A Model for Fast Assaying Extrapolysaccharides Concentration During the Fermentation of *G. lucidum*

LI Ping-zuo, XU Rou, ZHANG Ke-chang

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract A model between extracellular polysacchride concentration and the relative viscosity of the culture supernatant during the submerged fermentation of *G. lucidum* was set up, and a quick method was presented by measuring the relative viscosity of culture superllatant to obtain the extracellular polysacchrides, with an average error around 4.4% .

Key words *G. lucidum* ; extrapolysaccharides; relative viscosity; submerged fermentation