

云芝菌丝体悬浮液的流变特性及其在培养过程中的变化

贾凌云 冯朴荪 谢健 赵岩

(大连理工大学化工学院化学工程研究所, 大连 116012)

近年来,一些名贵药用真菌富含营养物质和保健作用,日益受到人们的重视和需要。改变从资源稀缺的野生子实体中提取的现状,通过菌丝体的大规模培养,从中获取多糖或其它有价值的组分,已成为当前名贵真菌利用技术发展的热点。高等真菌菌丝体悬浮液呈现特殊的非牛顿流型,与常见的化工物料或抗生素生产等发酵液有很大区别,它对实现菌丝体的大规模悬浮液培养的反应器选型、设计和操作,以及反过来通过制约剪切力场与混合状态对菌丝体的生长、形态和代谢都有很大影响,为此,有必要对这类真菌菌丝体悬浮液的流变特性进行系统的考察^[1-5]。本文以已经有工业规模悬浮培养的云芝真菌为典型实例,考察在培养过程中菌丝体悬浮液的流变特性及主要影响因素。

材料与 方法

(一) 菌种及培养基

菌种:云芝(*Coriolus versicolor*),由东北师范大学生物系提供。

斜面培养基(g/L):玉米粉40,葡萄糖20, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75, 蛋白胨20, 琼脂20。

液体培养基(g/L):葡萄糖30, 蛋白胨10, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5, NaCl 0.1, 维生素 B_1 3×10^{-6} 。

(二) 种液制备及培养方法

种液制备:菌种由斜面接种至液体培养基中,置于250ml烧瓶在26℃、150r/min条件下培养,约7-8天后,对烧瓶中的菌丝团用玻璃珠进行一次击碎操作,按击碎时间长短来控制

以后培养过程中菌球大小和均一程度。把经过破碎之后的悬浮液以15-20%的比例加入新鲜的液体培养基中作为种液。

培养方法:将种液分别引入500ml三角瓶(120r/min)和2.5L容积的气升环流反应器中进行培养。从菌球破碎后的继代培养起计算培养日期。由于这两种培养方式菌丝体所处的流体力学环境比较和缓,对生长和代谢无不良影响。

(三) 流变曲线的测定

测量菌丝体悬浮液流变特性的仪器是用同轴转杯粘度计,由国产的NDJ-2(上海天平仪器厂出产)改装成,具有无级变速的宽量程,使之测量满足要求。测量池由水夹套保持25℃恒温。

在测量过程中,菌丝体悬浮液在环流间隙随转杯转动时,菌丝体受剪切力场的作用有一重新调解和排列的过程,出现初始扭矩读数较大,随后很快降至一稳定值,尤其在菌种浓度高时,落差较大。我们认为初始阶段的扭矩读数更反映悬浮液的真实情况,所以下面的测定结果均取自初始阶段的读数。

(四) 菌丝体悬浮液固含率的测定

取菌丝体悬浮液100ml,在8000r/min的条件下,离心25min,此时菌体十分密实,精确量取清液体积 v ,用下式计算得出固含率:

$$\epsilon_s = \frac{100 - v}{100} \times 100\% \quad (1)$$

(五) 培养液中多糖含量的测定

取一定量的培养液(悬浮液的液相),首先用斐林氏法测定葡萄糖含量,然后再将培养液用盐酸水解后,用斐林氏法确定出总糖含量,

本文于1991年9月2日收到。

两者之差值,即认为是培养液中所含多糖量。

结 果

(一) 云芝悬浮培养液的流变特性及其变化

流体的流变特性一般通过剪切力与剪切速率之间的关系来描述^[6],典型的非牛顿型流体模型有:

$$\text{Bingham模型} \quad \tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma} \quad (2)$$

假塑性模型(Pseudoplastic model)

$$\tau = k\dot{\gamma}^n (n < 1) \quad (3)$$

膨胀模型(Dilatant model)

$$\tau = k\dot{\gamma}^n (n > 1) \quad (4)$$

$$\text{Casson模型} \quad \sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + k_c \sqrt{\dot{\gamma}} \quad (5)$$

为了更直观地表现流体的粘性,有时用表观粘度来反映。本文的表观粘度沿用公式:

$$\eta_a = \tau/\dot{\gamma} \quad (6)$$

云芝菌丝体的摇瓶培养是一个典型的悬浮

培养过程,严格说摇床振幅及转速影响摇瓶内的流动状态,从而影响菌丝体形态,尤其是成球大小及密实程度,我们把摇床固定在20mm振幅和120r/min的常用条件下,种液分装若干个500ml三角瓶中,每瓶含种液200ml。培养4—5天,菌丝体浓度可以由接种时的2g(干重)/L增加到15g(干重)/L左右,固相体积固含率可以达到54%。由于云芝菌丝体悬浮液比较粘稠,菌丝体的比重与培养液的比重很接近(云芝菌丝体比重为1.002—1.010g/L,培养液比重约为1.009g/L),因此整个流变曲线测定过程中一般不会有菌丝体沉降现象出现。摇瓶培养不同时期菌丝体悬浮液流变特性测定的典型结果如图1所示,相应的流变模型列于表1中。从这些实验测定结果可以明显地看到:云芝菌丝体在液体培养进程中,粘度逐渐增加,均属于非牛顿型流体,其流变模型存在着从Bingham流型到Casson流型到屈服假塑性流型的转变。

表1 不同培养时期云芝菌丝体悬浮液及培养液的流变模型

菌 丝 体 悬 浮 液			
培养时间(h)	流 变 模 型		$\tau_0 (N \cdot m^{-2})$
15	Bingham	$\tau = 0.75 + 0.055\dot{\gamma}$	0.75
39	Bingham	$\tau = 3.13 + 0.09\dot{\gamma}$	3.13
63	Casson	$\sqrt{\tau} = 3.54 + 0.24\sqrt{\dot{\gamma}}$	12.5
111	屈服假塑性流	$\tau = 50.5 + 15.3\dot{\gamma}^{0.299}$	50.5
培 养 液			
培养时间(h)	流 变 模 型		$\tau_0 (Nm^{-2})$
15	Bingham	$\tau = 0.46 + 0.018\dot{\gamma}$	0.46
39	Bingham	$\tau = 1.26 + 0.021\dot{\gamma}$	1.26
63	Casson	$\sqrt{\tau} = 1.32 + 0.12\sqrt{\dot{\gamma}}$	1.74
111	屈服假塑性流	$\tau = 2.46 + 0.98\dot{\gamma}^{0.9}$	2.46

云芝真菌在气升环流反应器中培养、生长情况大致与摇瓶一致。对不同培养时间测定的菌体悬浮液流变曲线,如图2所示,流变模型公式列于表2。从图2和表2同样明显地表现出菌丝体悬浮液的流变特性有一个从Bingham流型到Casson流型到屈服假塑性流型的转变。看来,这种特性是云芝菌丝体悬浮液所固有的,主要取决于菌丝体的含量、形态及培养液流体性质。

实验中观察到,随着培养进程,云芝菌丝体浓度增长很快,可以使固含率达到54%。此时悬浮液接近于凝胶体了。菌丝的形态尽管接种前做了破碎处理,但在培养过程中很快形成菌球,它是由生长的菌丝体缠绕而成,菌球的四周延伸出很多菌丝,这种现象又使得菌球之间易产生相互缠绕,形成一种类似网络的结构。这种网络结构的强弱与延伸出的菌丝的长度、菌球的密度、菌丝体本身的营养与生长状态等许

表 2 气升环流反应器中培养云芝悬浮液的流变模型

培养时间(h)	流变模型		$\tau_0(Nm^{-2})$
23	Bingham	$\tau = 0.5 + 0.0102\dot{\gamma}$	0.50
47	Casson	$\sqrt{\tau} = 1.79 + 0.295\sqrt{\dot{\gamma}}$	3.20
71	Casson	$\sqrt{\tau} = 2.08 + 0.33\sqrt{\dot{\gamma}}$	7.18
95	屈服假塑性流	$\tau = 8.60 + 1.93\dot{\gamma}^{0.64}$	8.60

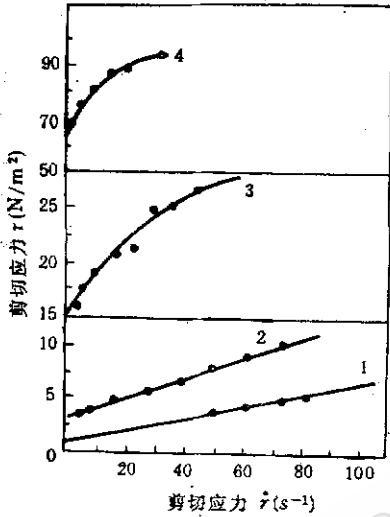


图 1 摇瓶培养云芝悬浮的流变曲线
培养时间
1. 15h; 2. 39h; 3. 63h; 4. 111h

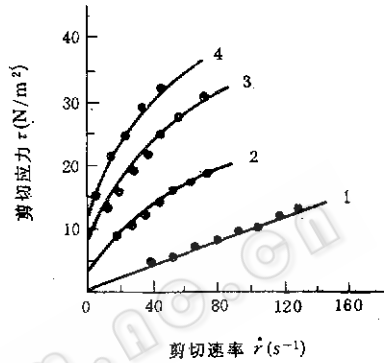


图 2 气升环流反应器培养云芝悬浮液的流变曲线
培养时间
1. 23h; 2. 47h; 3. 71h; 4. 95h

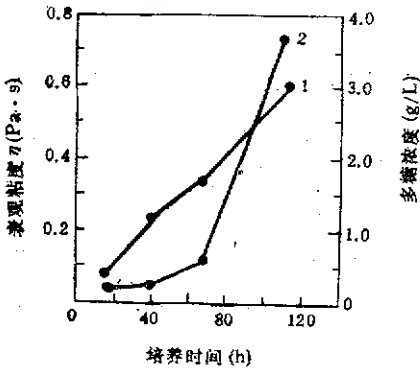


图 3 培养液中多糖与表观粘度随时间变化曲线
1. 多糖浓度; 2. 表观粘度

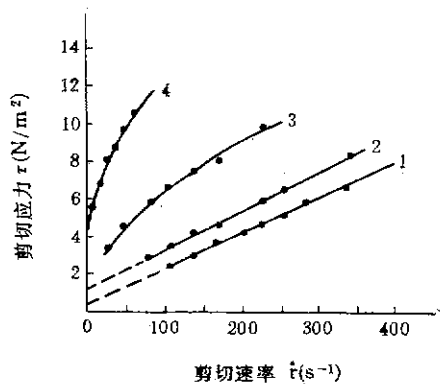


图 4 摇瓶培养云芝液的流变曲线
培养时间: 1. 15h; 2. 39h; 3. 63h; 4. 111h

多因素有关^[7]。显微镜观察可以看到,在培养初、中期由于营养充足、菌丝体丰满、柔韧。在培养后期,菌丝体变得瘦细、折断较多。菌

球状态还与所处的流体力学环境有密切关系。当流动和缓时,菌球较松散,流体搅动剧烈时,菌球生长密实,网络结构亦遭不同程度的破坏。

这种菌丝体生长状况和成球形态对悬浮液流变特性的影响，目前还难于定量来描述它。

(二) 液体培养过程中, 云芝培养液的流变曲线及其变化

云芝液体培养过程中, 培养液的粘度和流变特性亦有很大变化。这主要是由于云芝菌丝体在生长过程中不断分泌出一些结合有蛋白质的多糖体, 这种大分子物质使培养液粘性增

加。我们将摇瓶培养液多糖浓度及表观粘度随培养进程的变化, 标绘于图 3, 可以看到基本上是相应增长; 不同培养时间培养液的流变曲线标绘于图 4, 其相应的流变模型公式列于表 1。

(三) 菌丝体固含率及菌球大小对悬浮液流变特性的影响

菌丝体含量的增加, 按通常的概念是使流

表 3 不同固含率云芝悬浮液的流变模型

菌球平均直径 $d=0.73\text{mm}$ 云芝悬浮液			
$\epsilon_s(\%)$	流 变 模 型		$\tau_0(\text{Nm}^{-2})$
12.6	Casson	$\sqrt{\tau} = 0.829 + 0.247 \sqrt{\dot{\gamma}}$	0.687
14.6	Casson	$\sqrt{\tau} = 1.224 + 0.210 \sqrt{\dot{\gamma}}$	1.498
15.5	Casson	$\sqrt{\tau} = 1.255 + 0.230 \sqrt{\dot{\gamma}}$	1.575
22.0	Casson	$\sqrt{\tau} = 2.613 + 0.255 \sqrt{\dot{\gamma}}$	6.828
23.8	Casson	$\sqrt{\tau} = 2.972 + 0.230 \sqrt{\dot{\gamma}}$	8.836
31.2	屈服假塑性流	$\tau = 34.0 + 23.5\dot{\gamma}^{0.278}$	34.00
菌球平均直径 $d=1.40\text{mm}$ 云芝悬浮液			
15.5	Casson	$\sqrt{\tau} = 1.458 + 0.243 \sqrt{\dot{\gamma}}$	2.126

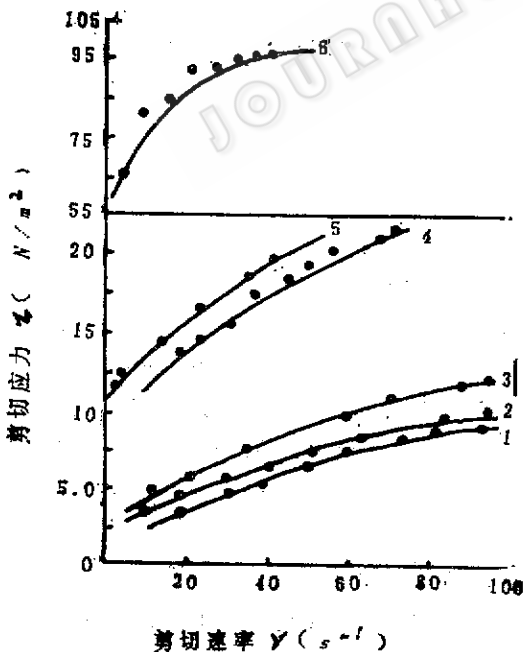


图 5 悬浮液不同固含率对流变曲线的影响
固含率%: 1. 12.6; 2. 14.6; 3. 15.5;
4. 22.0; 5. 23.0; 6. 31.2

体的固性增强, 但更主要的是使菌丝体之间形成网络结构的作用增强, 这就使悬浮液的粘度显著增高, 而且呈现突出的非牛顿流型。以往对霉菌菌丝体悬浮液流变特性的研究中, 得到的表观粘度基本上与菌丝体浓度的平方成正比^[8, 9]。在我们的实验中, 曾测定过几组在培

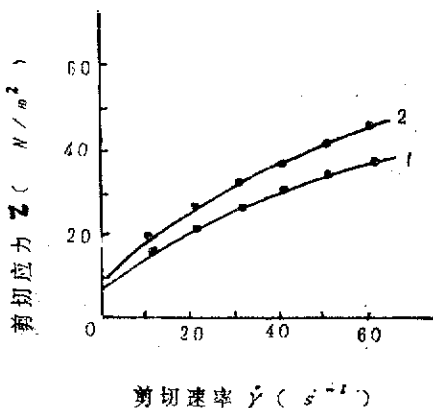


图 6 不同菌球直径的流变曲线
菌球平均直径mm
1. 0.73; 2. 1.40

养液相同、菌球的大小和形态基本相同,只是悬浮液固含率不同的情况下悬浮液的流变曲线,典型结果如图5所示,其流变模型公式列于表3。屈服应力随固含率增加显著,存在着如下关系

$$\tau_0 \propto \epsilon^{4.17}$$

还需要指出,当固含率较大时,悬浮液流变模型亦可能改变,不再与培养液的流型一致。如表3中,当固含率为31.2%时,流型就呈现为屈

服假塑性流型。实验结果表明,云芝真菌悬浮液固含率的增加对流变特性的影响程度要比霉菌的情况大得多。

菌球大小对悬浮液流变特性也有不容忽视的影响。对相同培养液、菌丝体浓度、营养条件培养出来的菌丝,只是对成球大小不同的悬浮液的流变特性进行了对比测定,典型结果如图6所示。由图可见,菌球尺寸大的悬浮液粘性大,同是Casson流型(见表3),其屈服应力要高出0.35倍。

参 考 文 献

- [1] Metz, B. N., Kossen, W. F. et al.: *Advance in Biochem. Eng.*, 1:104—156, 1979.
- [2] Suidam Van, J. C. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23:111—148, 1981.
- [3] 张书元, 丁健椿: 华东化工学院学报, 15:478—484, 1989.
- [4] Grant, A. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 34:731—740, 1989.
- [5] Roles, J. A. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16:181, 1974.
- [6] 冈小天(日): 《生物流变学》, 科学出版社, 1988.
- [7] Michaels, A. S. et al.: *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 7:153, 1962.
- [8] Deindoerfer, et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 2:165, 1960.
- [9] Solomous, G. L., Weston, G. O.: *Biotechnol. Bioeng.*, 3:1, 1961.

Rheological Behaviors of Mycelial Filaments Suspensions of *Coriolus versicolor* and Variation of Rheological Behaviors during Cultivation

Jia Lingyun Feng Pusun Xie Jan Zao Yan

(Laboratory of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

In the present paper, the rheological behaviors of mycelial filament suspensions of *Coriolus versicolor* in liquid suspended culture, have been measured. Experimental results are showed that the rheological behaviors of the mycelial filaments suspension exhibited obviously as a non-Newtonian fluid. At different suspended culture age, the rheological model of the suspension have an alternation in paper sequence from Bingham model to Casson model to pseudoplastic model with yield stress. Furthermore, we have inspected influences of the culture substrate, solid-content and size of mycelial filaments particles on suspension rheological behaviors.

Key words Rheological behaviors; *Coriolus versicolor*; suspended culture.