

糖质溶液中发酵生产灰树花胞外多糖的研究*

雷德柱 高大维 于淑娟

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

摘要: 研究了葡萄糖浓度和 pH 值调控对糖质溶液中发酵生产灰树花胞外多糖的影响。葡萄糖浓度为 5% 时胞外多糖产量最高; 发酵液 pH 控制为 3.5~4.0 时有利于胞外多糖的合成; 并尝试了重复使用菌丝体在糖质溶液中发酵生产灰树花胞外多糖的新方法。

关键词: 灰树花, 胞外多糖, 糖质溶液, pH 调控

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0015-05

STUDIES ON PRODUCTION OF EXPOLYSACCHARIDES OF *GRIFOLA FRONDOSA* IN SACCHAROID SOLUTION

LEI De-Zhu GAO Da-Wei YU Shu-Juan

(College of Food and BioEngin, South China Univ of Tech, Guangzhou 510640)

Abstract: Effects of glucose concentration and pH-control upon production of exopolysaccharides of *Grifola frondosa* was studied. The results showed that glucose at concentration of 5% was favorable to exopolysaccharides production, and the pellets benefited from the controlled start pH as well as the controlled final pH of 3.5~4.0 to produce exopolysaccharides. Attempt on the exopolysaccharides production with recycled pellets in the saccharoid solution was also made in this work.

Key words: *Grifola frondosa*, Exopolysaccharides, Saccharoid solution, pH Control

灰树花 (*Grifola frondosa*) 多糖具有抗肿瘤^[1]、抗诱变、抗 HIV 病毒和美容等多种生物活性^[2]。其抗癌作用机理为宿主介导的机体免疫调节作用, 即通过增加巨噬细胞的吞噬作用, 促进免疫球蛋白的形成, 提高机体本身的抗病能力或增强机体对放疗、化疗的耐受性, 是一种非直接杀伤癌细胞作用^[3]。灰树花多糖的生物活性在有些方面甚至超过已经临床应用的香菇多糖、云芝多糖和裂褶菌多糖^[4]。目前, 灰树花多糖的发酵工艺国内已有报道^[5~8], 国外则几乎没有报道。一般发酵生产都具有以下特点: 由种子罐逐级放大到生产罐, 收获菌丝体或发酵液并从中提取目的产物; 发酵培养基比较复杂, 除碳源外还有氮源、无机盐、维生素及各种生长因子。这种方法占用的设备多, 因逐级培养种子而消耗的原料、能量多, 培养环节多而增加污染机会, 而且提取物含杂质较多, 精制困难。本文尝试在糖质溶液中发酵生产灰树花多糖的新方法, 以期简化发酵工艺, 提高胞外多糖产量。

1 材料与方法

1.1 仪器

恒温水浴旋转摇床, 高速冷冻离心机, 手持式 pH 计。

* 广东省“九五”科技攻关项目 (No. 1995-66-77)

收稿日期: 2000-02-05, 修回日期: 2000-09-25

1.2 试剂

葡萄糖(分析纯), 蛋白胨(生化试剂), 糊精, 甘蔗糖蜜(广东华侨糖厂), 柠檬酸(分析纯)。

1.3 灰树花菌种

购自广东省微生物研究所, 斜面培养基为 PDA, 冰箱中冷藏, 使用时经平板培养活化。

1.4 预培养

培养基为葡萄糖 20g、甘蔗糖蜜 20g、蛋白胨 2g, pH4.5, 定容 1L, 200mL 三角瓶中装入上述培养基 50mL, 用打孔器定量接入平板菌种, 26℃ 振荡培养 (140r/min) 288h 后用于扩大培养。

1.5 扩大培养

培养基为葡萄糖 20g、甘蔗糖蜜 20g、蛋白胨 6g, pH4.5, 500mL 三角瓶中装入 100mL 上述培养基, 接入经预培养的菌种, 26℃ 振荡培养 (140r/min) 144h 后用作发酵种子液。

1.6 分离菌丝体

所得培养物用等量无菌蒸馏水稀释, 3000r/min 离心 20min, 菌丝体用无菌蒸馏水洗涤后, 再用 100mL 无菌蒸馏水制成悬浮液。

1.7 发酵工艺条件

将上述菌丝体悬浮液 200mL 接入装有 80mL 培养基的 500mL 三角瓶中, 培养基组成为一定浓度的糊精、不同浓度的柠檬酸和葡萄糖。葡萄糖浓度分别设为 20g/L、50g/L、100g/L、150g/L 和 200g/L 5 个梯度; 初如 pH 值分别设为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 和 5.5 5 个梯度, 摇瓶培养 144h 后停止发酵。

1.8 灰树花胞外多糖的提取及含量测定

无水乙醇沉淀提取粗胞外多糖, 采用硫酸-酚法^[9]测定胞外多糖含量。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖浓度对菌丝体产胞外多糖的影响

为了说明培养基中葡萄糖浓度对灰树花菌丝体生产胞外多糖的影响, 在保持其他培养基成分不变, 终 pH 为 5 的情况下, 我们进行了灰树花菌丝体在不同葡萄糖浓度下生产胞外多糖的发酵试验 (图 1)。

由图 1 可知, 3 株供试菌株在不同葡萄糖浓度的培养基中都能产生胞外多糖, 当葡萄糖浓度为 5% 时, 所有菌株的胞外多糖产量都达到最大值。其原因可能是随着培养基中葡萄糖浓度的增加, 可供菌丝体用来合成胞外多糖的碳源更加充足, 胞外多糖产量随之增加, 并于葡萄糖浓度为 5% 时达到最大; 当葡萄糖浓度超过 5% 后, 培养基中的渗透压越来越高, 菌丝体不能进行正常的多糖合成和分泌活动, 直到最后基本停止生产胞外多糖。

2.2 起始 pH 值对菌丝体产胞外多糖的影响

在影响发酵过程的诸多因素中, pH 的变化对微生物的代谢过程和产物积累有极大影响, pH 值的变化及调控有着特殊的意义。实验中我们采用不同起始 pH 值的培养基,

以便观察起始 pH 对菌丝体生产胞外多糖的影响 (图 2)。

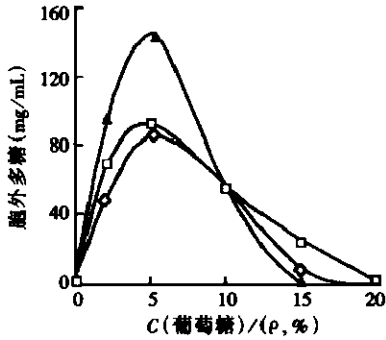


图 1 葡萄糖浓度对胞外多糖产量的影响

—○— 菌株 1, —□— 菌株 2, —▲— 菌株 3

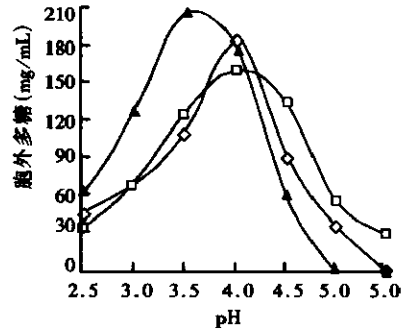


图 2 起始 pH 对胞外多糖产量的影响

—○— 菌株 1, —□— 菌株 2, —▲— 菌株 3

由图 2 可以看出, 虽然菌株 1 和菌株 2 在起始 pH 为 4.0 产胞外多糖最多 (分别为 183.7mg/100mL 和 160.6mg/100mL), 而菌株 3 在起始 pH 为 3.5 时产胞外多糖最多 (204.7mg/100mL), 但供试的 3 株菌株在初始 pH 值为 3.5~4.0 时都有较高的胞外多糖产量。起始 pH 过低不利于菌丝体生产胞外多糖 (起始 pH 为 2 时的多糖产量仅为最高产量的 1/4 左右), 起始 pH 过高时则大多不产多糖。宋爱荣等^[7]报道灰树花发酵液适宜的初始 pH 值为 8, 菌丝生长的最适 pH 为 5 左右。可能因为他们测定的目标产物是菌丝体生物量, 而我们的目标产物是胞外多糖, 所以结果不太一致。

2.3 初始 pH 为 3.4~4.0 时自然发酵过程的 pH 动态变化

为了使发酵过程中的 pH 控制易于进行, 我们对灰树花 3 号菌株在初始 pH 为 3.4~4.0 时自然发酵过程的 pH 动态变化进行了实验。

在起始 pH 3.4~4.0 范围内, 灰树花自然发酵过程中 pH 会下降。这一变化过程不是线性的, 虽然在不同 pH 值下发酵液的绝对变化数值不完全一样, 但它们有一个共同的趋势, 即在发酵的头 3d pH 下降速度逐渐加快, 随后逐渐减慢。这一结果与汪维云等^[5]先下降后回升以及宋爱荣等^[7]快→慢→快→慢的 pH 动态变化结果不完全一样。这可能与他们采用的起始 pH 是自然 pH (6.0 左右), 而且所采用的培养基中含有 KH_2PO_4 、 MgSO_4 等无机盐有关。这一结果对随后进行的控制终 pH 发酵试验有一定的参考作用, 即重点对前 3d 的发酵液 pH 进行控制。

2.4 控制最终 pH 对菌丝体产胞外多糖的影响

菌丝体生长的最适 pH 与产胞外多糖的最适 pH 往往并不一致, 大多数关于发酵过程中 pH 调节的研究都强调控制起始 pH 值, 而对发酵过程中的 pH 不加控制。实际上 pH 值的变化会引起菌丝体各种酶活性的改变, 从而影响菌体的生长和多糖的形成。李平作等^[10]报道控制灵芝液体发酵过程的 pH 值变化 (起始 pH 为 5.5, 终 pH 为 4.0), 胞外多糖产量较未控制提高了 24%。在本文的试验中, 我们不仅对起始 pH 进行控制, 而且用 1N 硫酸和 1N 氢氧化钠对发酵过程中的 pH 进行调控, 使发酵的最终 pH 值不同 (与各自的起始 pH 相同, 即维持在恒定的 pH 下进行发酵)。将发酵液的最佳 pH 值维持在 3.5~4.2 左右, 即始终保持 pH 在最佳起始 pH 值范围。这个 pH 值可能不是菌丝体生长

的最适 pH, 但有利于胞外多糖的生产。因此, 在具体的发酵过程中, 可以根据不同的目的(如收获菌丝体或胞外多糖)和不同的发酵阶段(如发酵前期和发酵后期)来控制发酵液 pH 值, 以达到最佳的发酵效果。

2.5 重复使用菌丝体发酵生产胞外多糖

为了考查第一次发酵后的菌丝体是否可以重复利用发酵生产胞外多糖, 我们进行了如下试验: 将斜面母种接入种子培养基中, 26℃下振荡培养 288h, 3000r/min 离心 20min 收集菌丝体, 用无菌蒸馏水洗涤并制成无菌悬浮液。将 20mL 菌丝体悬浮液接入装有 80mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中, 摇瓶发酵 144h 后, 测得胞外多糖含量为 1.20g/L。将第一次发酵后的菌丝体离心回收, 用无菌蒸馏水洗涤并制成无菌悬浮液, 500mL 的三角瓶中装入 80mL 与第一次发酵时相同的糖质溶液, 接种 20mL 菌丝体悬浮液, 26℃下振荡培养 144h。经过 3 次重复试验, 测得胞外多糖含量为 1.04g/L, 1.10g/L、1.07g/L, 均略低于第一次发酵的产糖水平。分析其原因, 可能是由于菌丝球部分老化, 对发酵液所产生的渗透压的耐受性有所下降。于是我们又进行了回收菌丝球补加糖质溶液的试验, 即起始发酵液的糖浓度为 3%, 分别于第 60h、72h、84h、96h 和 108h 补加葡萄糖至 5%, 其余条件不变。结果如表 1 所示。

表 1 补料对灰树花胞外多糖产量的影响

T	60h	72h	84h	96h	108h
O (g/L)	1.25	1.32	1.39	1.35	1.33
R (g/L)	1.23	1.28	1.36	1.32	1.30

注: T 为补料时间, O 为第 1 次发酵, R 为回收菌丝体发酵

表 2 菌丝体回收次数对胞外多糖产量的影响

回收次数	胞外多糖产量
1	1.36
2	1.30
3	1.14

结果表明总糖浓度一定时, 补料可提高胞外多糖产量, 补糖最佳时机为第 84h; 同时, 第一次发酵和回收菌丝体发酵的产糖水平差异缩小。

为了进一步说明菌丝体的可回收利用次数, 我们在补糖条件下分别进行了回收菌丝体 1 次、2 次和 3 次的发酵试验, 结果如表 2 所示。由表 2 看出第 3 次回收菌丝体时胞外多糖产量已有较大下降, 菌丝体回收次数以 2 次为宜。

一般情况下, 发酵液的组成成分比较复杂, 不同菌种、不同发酵时期、不同目的产物对培养基的要求都不同。本文采用糖质溶液发酵法生产胞外多糖, 有利于简化培养条件和产物提纯; 菌丝体发酵达到一定时间, 就会老化, 并发生自溶。生产中也常常以此作为终止发酵的参数指标之一。但有文献报道^[11], 发酵后期菌丝体的活性仍然较强, 底物浓度下降明显, 胞外多糖生产并没有下降趋势, 这说明菌体仍在利用生长基质合成胞外多糖。我们的试验结果也证明发酵后期的菌丝体经过处理后可重复使用生产胞外多糖。这一新的尝试对灰树花及其他食药两用菌的发酵生产具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 黄幸舒. 中国食用菌, 1994, 13 (1): 41.
- [2] 郑增涛, 周昌艳, 潘迎捷, 等. 食用菌学报, 1999, 6 (3): 54~58.

- [3] 劳华均, 闵三弟, 藏珍娣, 等. 上海农业学报, 1997, 13 (1): 25 ~ 30.
- [4] 赵 铭. 中国食用菌, 1994, 13 (6): 40.
- [5] 汪维云, 吴守一, 朱金华, 等. 生物工程学报, 1999, 15 (3): 378 ~ 382.
- [6] 陈石良, 谷文英, 许正宏, 等. 无锡轻工大学学报, 1999, 18 (6): 148 ~ 150.
- [7] 宋爱荣, 郭立忠, 段方猛, 等. 中国食用菌, 1999, 18 (3): 29 ~ 31.
- [8] 张伟心, 安庆军, 韩逢凯, 等. 食用菌, 1999, 21 (2): 8 ~ 9.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.
- [10] 李平作, 章克昌. 微生物学通报, 2000, 27 (1): 5 ~ 8.
- [11] 李平作, 章克昌. 生物技术, 1999, 9 (3): 24 ~ 26.