

接种细胞密度是影响植物单细胞平板培养植板率的又一重要因素。从实验结果看,植板率随接种细胞密度的增大而提高。但是,接种细胞密度越大,细胞之间的距离越小,细胞分裂不久,形成的克隆就彼此长合在一起,这就给分离起源于单细胞的无性系带来很大困难。因此,以筛选高产细胞株为目的设计植物单细胞平板培养时,不能为了提高植板率盲目增大接种密度,而应在保证适度植板率的前提下,改

善其它培养条件,尽可能降低接种细胞密度,以便分离起源于单细胞克隆。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:人民卫生出版社,1978:186
- 2 王太霞,李景原. 植物杂志,1997,3:9
- 3 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京:科学出版社,1995:150

(1999-10-12 收稿)

灵芝菌发酵培养基的优化及灵芝胞外多糖的分离纯化

南京理工大学化工学院(210094) 孙东平* 潘 锋 史小丽 杨树林

摘 要 用正交法研究了不同条件对灵芝菌生长影响,从中选出了灵芝菌液体深层发酵的优化培养基:葡萄糖 3.6%,蛋白胨 0.4%,pH 6.0,酵母膏 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,Vit B₁ 0.005%,每升发酵液产生干菌丝体 15.6 g,粗多糖 0.72 g。经葡聚糖凝胶层析对灵芝胞外多糖进行了分离纯化,共有 5 个组分,并用红外光谱、紫外光谱、气相色谱等手段进一步分析了灵芝胞外多糖的组成,结果表明灵芝胞外多糖系由甘露糖、果糖、葡萄糖通过糖 β -D-糖苷键构成。

关键词 灵芝 发酵 多糖 分离纯化

Selection of Optimal Medium and Extraction and Purification of *Ganoderma lucidum* Extracellular Polysaccharide

Chemical School of NUST (Nanjing 210094) Sun Dongping, Pan Feng, Shi Xiaoli and Yang Shulin

Abstract Optimal medium for deep layer fermentation of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst was selected and conditions for the isolation and purification of its extracellular polysaccharide studied for the purpose to develop a new source for the production of this valuable TCM. Factors influencing the growth of *G. lucidum* on different media were studied by orthogonal experimental design and polysaccharide isolated and purified by Sephadex gel filtration. The structural composition was analysed by UV, IR and GC chromatography. The best medium for the fermentation was found to be composed of glucose 3.6%, peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5% and VB₁ 0.005%, at a pH value of 6.0. 15.6 g dry mycellia and 0.72 g crude polysaccharide per liter can be obtained from the fermentation broth. The polysaccharide was composed of glucose, D-fructose and mannose. The method needs further scale up study.

Key words *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst fermentation polysaccharide isolation and purification

灵芝是我国古代劳动人民用之已久的一类珍贵的药用真菌,具有补中、固肾、补肺、止血的功用,对多种慢性病有一定疗效。灵芝多糖对肉瘤 S₁₈₀、肿瘤 AH-B、埃利希氏腹水瘤及腺瘤具有明显的抑制活性,并能迅速恢复和提高机体免疫能力,治疗爱滋病的报道更引人瞩目,掀起了一场“灵芝研究热”^[1]。

灵芝及其多糖广泛应用在医药、食品等领域,市

场需求量与日俱增,但目前灵芝多糖的生产几乎都是从子实体中提取,灵芝野生资源缺乏,人工栽培的周期长(2~3 个月以上),占地面积大,又受季节限制,从而影响了灵芝的充分利用,而利用深层培养技术生产灵芝,周期短(7~10 d)、成本低、产量大,具有工业化的生产前景,选取合适的培养基、适当的分离纯化方法,提取灵芝多糖是本研究的最终目的。我

* Address: Sun Dongping, College of Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing

孙东平 男,1970 年生,江苏灌云人,现为南京理工大学化工学院博士研究生,讲师,主要从事糖化学及微生物生理、生化研究工作,发表学术论文多篇,参与国家自然科学基金等多项科研工作。

们对发酵培养基优化及灵芝多糖提取的工艺进行了深入研究,不仅多糖获得了分级分离,而且对多糖组成成分也进行了分析。

1 灵芝培养基的优化

1.1 菌株:紫芝 G⁹⁸⁹菌株由中国轻工食品发酵研究所提供。

1.2 最优化培养基的筛选:将保存的菌种从 4℃ 的冰箱中取出,在 28℃ 下活化,然后在无菌操作台上用接种针将母种接至 PDA 培养基上,置于培养箱中(28℃ 以下)培养 1 周。然后将其接种至种子培养基中,放置于摇床上(28℃, 120 r/min)发酵 1 周。下摇床后,将种子接到正交实验培养基中发酵 1 周(见表 1)。

表 1 正交实验优化培养基

瓶号	碳源	氮源	起始 pH 值	菌丝体干重(g)	粗多糖干重(g)
1 [#]	3.6%葡萄糖	0.4%蛋白胨	5.0	1.562 0	0.071 9
2 [#]	3.6%葡萄糖	0.4%黄豆粉	6.0	1.020 2	0.057 2
3 [#]	3.6%葡萄糖	0.4%硫酸铵	7.0	0.460 3	0.016 4
4 [#]	3.6%蔗糖	0.4%蛋白胨	6.0	0.599 8	0.006 7
5 [#]	3.6%蔗糖	0.4%黄豆粉	7.0	0.489 3	0.039 8
6 [#]	3.6%蔗糖	0.4%硫酸铵	5.0	0.387 3	0.019 9
7 [#]	3.6%麦芽糖	0.4%蛋白胨	7.0	1.358 3	0.044 2
8 [#]	3.6%麦芽糖	0.4%黄豆粉	5.0	1.274 1	0.047 6
9 [#]	3.6%麦芽糖	0.4%硫酸铵	6.0	0.572 9	0.047 1

接种量:8 毫升/瓶;摇床转速:120 r/min;温度:28℃;其余成分:KH₂PO₄ 0.1%, Vit B₁ 0.005%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%。

将 1 周后的发酵液离心(20℃, 3 000 r/min)10 min,离心后的上清液在水浴锅中浓缩(60℃),浓缩液中加入等体积 85% 工业酒精沉淀,放置于冰箱中过夜。然后将浓缩液离心(20℃, 3 800 r/min),将离心的沉淀物放置于烘箱中(80℃ 以下),烘干并称重,即得胞外粗多糖产量。离心后得到的菌丝体放置于烘箱中(80℃ 以下)烘干,称重。

1.3 发酵参数的测定:利用 DNS 法测定发酵液中还原糖的变化^[3],利用蒽酮法测定发酵液中总糖的变化^[4];利用甲醛滴定法测定发酵液中氨基氮的变化^[5];以及利用 pH 计测定发酵液中 pH 值的变化。

1.4 灵芝的菌丝体形态:本实验用 H-800 透射电镜对灵芝菌丝体的形态进行观察(如图 1 所示),灵芝菌丝体长势茂盛,菌丝很饱满。

1.5 灵芝胞外多糖的提取分离纯化:将依前述方法得到的粗多糖加热水溶解,然后趁热真空抽滤,滤液冷却后加入氯仿与正丁醇以 4:1 混合液,搅拌,再离心,离心后取上层多糖水溶液加入活性炭脱色,过滤的清液用 85% 工业酒精沉淀,然后用丙酮,无水乙醇依次洗涤,在真空干燥器中干燥得总多糖。

1.6 多糖组分分析^[6]:Sephadex G-200 柱层析,流



图 1 灵芝菌丝体电镜照片

速 0.5 mL/min,洗脱剂为 0.5 mol/L NaCl 溶液,多糖用蒽酮法检测。

1.7 多糖组成分析:裁剪 10 cm×23 cm 的新华滤纸,在滤纸的底端 3 cm 处用铅笔划线作为样品的起点线,用毛细管分别吸取待测样品及葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、甘露糖等单糖溶液,在样品的起点线上每隔 2 cm 点一个样,将点好样品的滤纸悬挂在盛有乙酸乙酯-水-吡啶(60:20:25)展层剂的层析缸中,密闭层析缸饱和,然后将其底部浸入展层,用苯胺-二苯胺系统显色(即苯胺 4 g,二苯胺 4 mL,85%的磷酸 70 mL),用吹风机吹干后,放置于烘箱中,105℃ 烘烤 5 min。其中待测样品是粉碎后溶于 1 mol/L 硫酸中,封管,然后在沸水浴中水解 6 h,加入 BaCO₃,中和硫酸后过滤即得。

2 结果与讨论

2.1 最优培养基的筛选:根据对正交实验培养基发酵所得到的粗多糖及菌丝体进行统计分析,得出氮源是主要因素,碳源其次,pH 值影响最小,并且由于黄豆粉中含糖,影响发酵参数的测定,而较酸的环境也不利于微生物的生长。故最后确定的较优化的组合为:碳源为葡萄糖 3.6%,氮源为蛋白胨 0.4%,pH 值 6.0,酵母膏 0.2%,KH₂PO₄ 0.1%,MgSO₄ · 7H₂O 0.05%,Vit B₁ 0.005%。每升发酵液产干菌丝体 15.6 g,粗多糖产量达 37.5 g/kg 干菌体。

2.2 发酵过程中参数的变化:通过跟踪测定发现发酵过程中还原糖逐渐减少,这是因为灵芝在不断地利用还原糖(即葡萄糖),到发酵终点,葡萄糖几乎全被利用完。总糖只是在极小的范围内波动,即虽然还原糖被不断消耗了,但还原糖又被转变为其它的糖类,总糖含量始终不变;氨基氮先是在很小范围内变化,然后逐渐降低,因为刚开始灵芝生长缓慢,蛋白质的生成与消耗几乎持平,随后灵芝生长旺盛,蛋白

质呈逐渐下降趋势;pH 值是不断降低的,说明在发酵中有酸类物质分泌到胞外,即灵芝酸。

2.3 胞外多糖的分离纯化:通过紫外分析可知,我们所得到的灵芝多糖在 260 nm 及 280 nm 处无吸收峰,也就是说无核酸及蛋白质存在,基本上证明多糖无其他杂质,且通过发酵得到的多糖提取率为 37.5 g/kg 干菌体,比文献报道^[2]34.4 g/kg 干菌体有提高。

2.4 胞外多糖组分的层析分析:通过凝胶层析所得到的洗脱曲线见图 2。

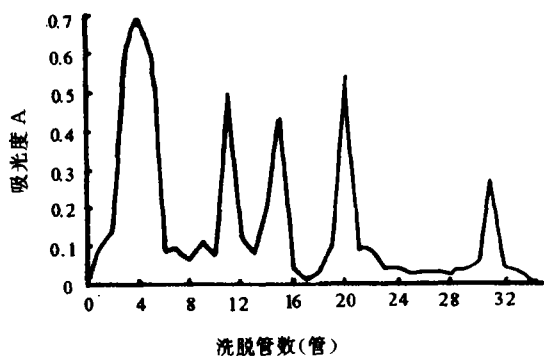


图 2 胞外多糖的洗脱曲线

从图 2 可以看出,胞外多糖的成分复杂,分子量大小不一,共有 5 个组分。

2.5 多糖的单糖组成分析:

2.5.1 纸层析:通过纸层析测定 Rf 值与已知单糖比较可知灵芝胞外多糖组分是由葡萄糖、甘露糖、果糖组成的。

2.5.2 胞外多糖红外分析:通过胞外多糖红外光谱看出 840 cm^{-1} 及 761 cm^{-1} 附近无吸收峰,892 cm^{-1} 处有吸收峰,表明灵芝胞外多糖具有 β -D-糖苷键;800 cm^{-1} 处有一微弱的吸收峰表明有甘露糖存在;1110 cm^{-1} 处有吸收表明灵芝多糖的单糖为六元环结构;3400 cm^{-1} 处的强吸收峰为糖分子中缔三羟

基的伸缩振动吸收峰。

2.5.3 气相色谱分析:将胞外多糖组分 1 的酸水解液乙酰化后作气相色谱,其结果如表 2 所示。乙酰化方法是:取 20 mg 灵芝多糖溶于 3 mL 5 mol/L 硫酸中,封管在沸水中水解 8 h,水解液加入适量 BaCO_3 中和,过滤。滤液中加入 15 mg NaBH_4 ,放置过夜,然后加入适量乙酸分解过量的 NaBH_4 ,重复 4 次。将上面得到的溶液在 105 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘干,冷却后转入真空耳塞管,加入 1 mL 乙酸酐,0.5 mL 吡啶,然后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 h,反应液冷却后加入 1 mL 水,放入表面皿中蒸发至干。最后用 1 mL 氯甲烷提取,提取液可直接进行气相色谱分析(见表 2)。

表 2 胞外多糖的气相色谱分析

保留时间 (min)	峰面积	含量 (%)	校正因子
3.232	3973	5.214	1.000E+000
3.813	219	0.287	1.000E+000
4.250	615	0.807	1.000E+000
5.548	71389	93.691	1.000E+000
合计	76196	100.00	

从表 2 我们可以看出,灵芝胞外多糖组分 1 是由 3 种单糖组成的,结合纸层析的结果可知灵芝胞外多糖中含有甘露糖、果糖、葡萄糖,其中果糖是首次报道。

参考文献

- 1 黄为群,吴其威,黄瑞珊,等.上海交通大学学报,1994,28(2):83
- 2 罗立新,姚汝华,周少奇.食品工业科技,1998,(3):6
- 3 孙东平.液体发酵红曲的应用研究.南京大学硕士研究毕业论文,1997:19
- 4 袁玉荪,朱婉华,陈钧辉.生物化学实验.北京:高等教育出版社,1995:13
- 5 袁玉荪,朱婉华,陈钧辉.生物化学实验.北京:高等教育出版社,1995:65
- 6 张承圭,王传怀,袁玉荪,等.生物化学仪器分析.北京:高等教育出版社,1990:203

(1999-11-24 收稿)

(上接第 898 页)

醇棕榈酸酯一致^[5a]。由此,确证 IV 为 β -香树脂醇棕榈酸酯。

化合物 V:白色晶体,mp 200 $^{\circ}\text{C}$ ~201 $^{\circ}\text{C}$ 。IR ν_{max} cm^{-1} : 3320 (-OH), 2900, 2800, 1460, 1384, 1362, 1050, 1100。EI-MS m/z : 427 [$\text{M}^+ + 1$], 409 [$\text{M} - \text{OH}$] $^+$ 。 ^{13}C NMR 图谱显示有 8 个甲基(28.42, 15.60, 15.51, 16.80, 26.25, 28.05, 33.32, 23.75), 10 个亚甲基(38.85, 27.08, 18.40, 32.80, 23.61, 27.36, 26.25, 46.97, 34.85, 37.25), 5 个次甲基(79.08, 55.35, 47.78, 121.65, 47.40), 7 个季碳(38.75, 40.09, 37.25, 145.25, 42.01, 32.80,

31.06), 145.25 和 121.65 显示有一个双键存在,其 ^{13}C NMR 与文献报道的 β -香树脂醇一致^[5b],故推测其结构为 β -香树脂醇。

致谢:云南大学生物系胡志浩教授鉴定植物样品,在此衷心感谢!

参考文献

- 1 Subarnas A, Tadano T. J Pharm Pharmacol, 1993,45(6):545
- 2 刘明生,谷黎红,陈英杰,等.中国药物化学杂志,1993,3(1):42
- 3 Holland H, Diakow P R, Taylor G J, et al. Can J Chem, 1978, 56(24):3121
- 4 齐一萍,郭驿民,夏志林,等.中国中药杂志,1996,21(4):234
- 5 龚运淮.天然有机化合物的 ^{13}C -核磁共振位移.昆明:云南科技出版社,1986:131,129

(1999-11-02 收稿)