

灵芝胞外生物活性多糖的 pH 控制发酵

李平作 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

摘要: 灵芝深层发酵过程中 pH 值对灵芝胞外多糖形成的影响。结果表明起始 pH 为 5.5 时, 有利于胞外多糖的形成, 找到了一种有效的 pH 控制发酵策略, 当发酵过程中控制 pH4.0 时, 胞外多糖的产量最大, 达到 2.32g/L, 较未控制提高了 24%。另外, 还对胞外多糖的生物活性进行了检测, 结果表明抗肿瘤活性平均达到 51.2%, 且能明显提高小鼠的免疫力。

关键词: 灵芝, pH 控制发酵, 胞外多糖, 生物活性

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-005-04

STUDIES ON pH CONTROLLED FERMENTATION OF BIOACTIVE EXOPOLYSACCHARIDES BY *GANODERMA LUCIDUM*

LI Ping-Zuo ZHANG Ke-Chang

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

Abstract: The effect of fermentation pH upon exopolysaccharides production by *Ganoderma lucidum* was studied in a 2L fermentor. The results showed that initial pH5.5 was favorable to exopolysaccharides production. Through an effective strategy of pH controlled fermentation at pH4.0, the maximum yield of exopolysaccharides, 2.32g/L, was obtained, and the yield of exopolysaccharides increased by 24% compared with the pH uncontrolled fermentation.

The bioactivities of exopolysaccharides were also assayed. The results showed that exopolysaccharides could inhibit the growth of Sarcoma 180 in mice, and the average inhibition ratio (i.p. 10mg/kg for 10 days) was 51.2%; the immunological activity of mice could be significantly improved.

Key words: *Ganoderma lucidum*, pH controlled fermentation, Exopolysaccharides, Bioactivities

目前, 灵芝多糖的抗肿瘤及免疫活性已得到人们的广泛关注^[1]。通过深层发酵大规模生产生物活性多糖是目前灵芝开发利用技术的热点。灵芝子实体多糖和发酵过程中产生的胞内和胞外多糖都是有效多糖, 这已被国内外的研究者所证实^[2,3]。从生产过程来看, 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控制提高胞外多糖的产量。pH 为影响多糖合成的基本因

素之一^[4], 但大多数的研究都停留在调节起始 pH, 发酵过程 pH 不加控制^[5]。实际上 pH 值的变化会引起灵芝多糖发酵过程中各种酶活性的改变, 从而影响菌体的生长和多糖的形成^[6]。因此, 本实验以胞外多糖为目标产物, 通过控制发酵过程中 pH 来寻找多糖形成的最适 pH, 以提高灵芝胞外多糖的产量。同时对胞外多糖的生

物活性进行了检测,为产品开发提供了依据。

功能的影响进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种:灵芝(*Ganoderma lucidum*),分离自野生子实体灵芝。

1.1.2 培养基:斜面培养基:PDA;种子培养基:葡萄糖 30g,酵母膏 2g, KH_2PO_4 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g,以自来水定容到 1L。起始 pH5.5。发酵培养基:葡萄糖 35g,酒糟 20g, KH_2PO_4 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g,以自来水定容到 1L。

1.1.3 主要试剂:苯酚,氢氧化钠,无水乙醇等皆为分析纯。

1.1.4 主要仪器及设备:Hitachi 高速冷冻离心机:日本;恒温干燥箱:连云港医疗器械设备厂;7230 分光光度计:上海分析仪器厂;2L 玻璃发酵罐(带溶氧和 pH 电极):瑞典;回转式恒温调速摇床柜:上海新星自动化控制设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵过程中 pH 控制策略:首先让发酵在未控制 pH 的条件下进行,当发酵液 pH 降到某一特定的 pH 时(我们选取 pH5.5, 5.0, 4.5, 4.0),通过自动流加 1mol/L 的 NaOH 来确保后续的发酵在控制的 pH 下进行。

1.2.2 深层发酵:2L 发酵罐中装入 1.4L 灭菌培养基,接种量 10%,转速 450r/min, 30℃ 发酵 96h。

1.2.3 胞外多糖提取及测定:发酵液经离心分离(6000r/min, 20min),向上清液中加入无水乙醇至 60%(v/v),沉淀经乙醚洗涤后,利用硫酸苯酚法测定多糖含量^[7]。

1.2.4 总酸测定:按参考文献[8]进行。

1.2.5 生物量测定:发酵液 100mL 经离心分离(6000r/min, 20min),菌体经蒸馏水多次洗涤,然后置 80℃ 烘箱中干燥 24h 称重。

1.2.6 灵芝多糖生物活性检测^[9,10]:抗肿瘤活性:以小鼠肉瘤 S180 为肿瘤模型,胞外多糖样品按高、中、低剂量于腋下注射给药,连续给药 10d,于第 11d 处死小鼠取瘤块,称瘤重,计算抑制率。免疫活性:以小鼠腹腔巨噬细胞吞噬

2 结果与讨论

2.1 灵芝发酵过程中的代谢特性

由图 1 中可以看出, pH 值的变化与生物量、多糖的变化趋势明显不同,发酵后期 pH 的变化较小,多糖的形成速度较快,表明 pH 与胞外多糖的形成有关。这为 pH 控制发酵提供了依据。即通过控制发酵过程中 pH 就有可能找到一个最佳 pH,使胞外多糖的产量提高。

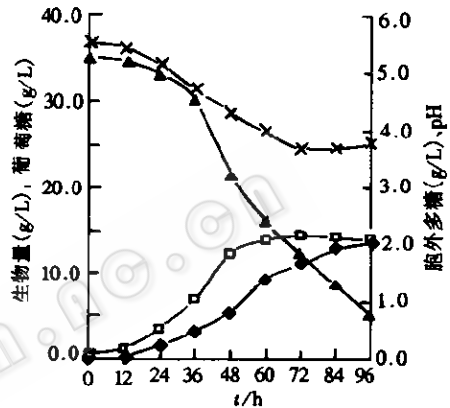


图1 灵芝胞外多糖发酵进程曲线

—□— 生物量, —▲— 葡萄糖,
—◆— 胞外多糖, —×— pH

2.2 起始 pH 对灵芝发酵过程中胞外多糖产量的影响

由表 1 中可以看出当起始 pH 为 5.5 时,生物量及胞外多糖的产量最高;而当起始 pH 高于 6.5 或低于 4.5 时,生物量及胞外多糖的产量都开始下降。其原因可能来自两个方面:一是在 pH 大于 6.5 或小于 4.5 时,抑制了菌体的生长,种子的延滞期延长;另一方面是发酵过程中副产物的形成量增加,使多糖生成量减少^[6]。

表1 起始pH对灵芝胞外多糖的影响

pH	发酵时间(h)	生物量(g/L)	胞外多糖(g/L)
7.5	120	10.4	1.78
6.5	108	12.6	1.86
5.5	96	14.1	1.98
4.5	90	13.4	1.82
3.5	80	11.2	1.39
6.0	96	13.8	1.87

2.3 pH控制发酵对灵芝胞外多糖形成的影响

由图2中可以看出,当控制pH为4.0时,胞外多糖的产量最高,达到2.32g/L,较未控制时的1.87g/L提高了24%。当控制pH5.5时多糖产量最低,但生物量最大,这说明适合于多糖形成的pH与适合于菌体生长的pH并不一致^[5]。另外,在pH4.0~5.5的范围内,pH越高有机酸的生成量越大,有机酸的产生使得碳源由合成多糖转向形成有机酸,这带来了两方面的负面效应:一是碳源浪费,二是酸的浓度高遏制了多糖的形成^[6]。

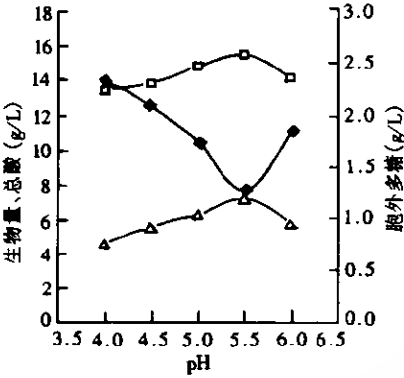


图2 pH控制对生物量、多糖及总酸的影响

—□— 生物量, —△— 总酸, —◆— 多糖

图3显示了pH对发酵生产强度及比生产强度的影响,表明在控制pH为4.0时,发酵生产强度及比生产强度最高,这一结果对于发酵过程的设计是极为重要的。

2.4 灵芝发酵胞外多糖生物活性检测

2.4.1 对小鼠S180的抑瘤作用:由表2可以看

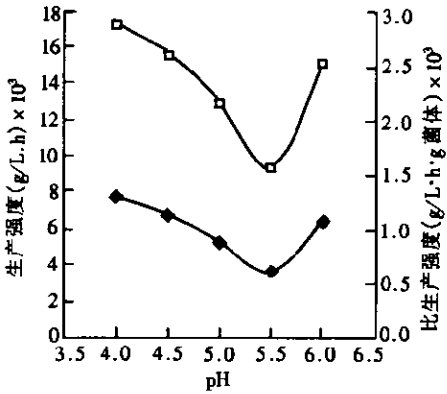


图3 pH控制对发酵生产强度及比生产强度的影响

—□— 生产强度, —◆— 比生产强度

表2 样品对小鼠S180的抑瘤作用 (n=6) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

	剂量(mg/kg)	瘤重(g)	抑瘤率(%)	显著性(P)
对照		3.38 ± 0.57		
环磷酰胺	25	1.18 ± 0.27	65.1	<0.01
样品 a	1	2.36 ± 0.52	30.2	<0.05
样品 b	5	2.01 ± 0.26	40.5	<0.01
样品 c	10	1.65 ± 0.38	51.2	<0.01

出,胞外多糖样品具有较明显的抑瘤效果($P < 0.01, 0.05$),其抑瘤率达51.2%。而且剂量与抑瘤率之间呈直线关系。

2.4.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用:由表3中可以看出,环磷酰胺能明显抑制小鼠腹腔MΦ的吞噬杀菌功能,其抑制率分别达到51.1%,55.8%($P < 0.01$)。而灵芝胞外多糖样品能明显提高小鼠腹腔MΦ的吞噬杀菌功能,除样品a外,其余都与对照组有统计学意义,且剂量与吞噬率杀菌率呈线性关系。

表3 样品对小鼠腹腔MΦ吞噬杀菌功能的影响 (n=6) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

	剂量(mg/kg)	吞噬率(%)	显著性(P)	杀菌率(%)	显著性(P)
对照组		42.5 ± 5.6		17.2 ± 2.8	
环磷酰胺组	25	20.8 ± 3.9	<0.01	7.6 ± 0.8	<0.01
样品 a	1	52.1 ± 9.0	>0.05	20.7 ± 3.1	>0.05
样品 b	5	56.3 ± 6.9	<0.05	28.3 ± 1.9	<0.01
样品 c	10	62.9 ± 5.4	<0.01	33.1 ± 3.8	<0.01

灵芝胞外多糖发酵起始pH为5.5时,有利于胞外多糖产量的提高;而通过控制发酵过程中的pH值,一方面找到了多糖形成的最适pH,同时也证明这种控制策略能够较明显地提高胞

外多糖的产量,提高幅度达24%。

运用肿瘤动物模型(S180)测定了灵芝胞外多糖样品3个剂量组的抑瘤效果,其抑瘤率均在30%以上。根据新药审批办法规定,说明灵

芝发酵胞外多糖对小鼠 S180 实体瘤有较好的抗肿瘤作用,符合抗癌药物筛选标准。灵芝发酵胞外多糖能明显增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬和杀菌能力,提高机体的免疫功能,与化疗药物相比,显示了其抗肿瘤的优越性。另外,动物实验结果显示剂量与生物活性呈明显的线性关系趋势,故应继续进行加大样品剂量的实验,以进一步验证其生物活性与剂量的关系。

参 考 文 献

- [1] Jong S. C., Birmingham. J. M. *Advances in Applied Microbiology*, 1992, 37:101~134.
- [2] Sone Yoshiaki, *et al.* *Argric. Biol. Chem.*, 1985, 49:

2641~2653.

- [3] 陈国良,陈晓清. *中国食用菌*, 1994, 4(14): 7~8.
- [4] McNeil B, Kristiansen B, Seviour, R. J. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 33:1210~1212.
- [5] Wernau W C, *Dev. Ind. Microbiol.*, 1985, 26:263~269.
- [6] Yuchun Wang Brian McNeil. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17:124~130.
- [7] Dubois M *et al.* *Analyt. Chem.*, 1956, 28:350~356.
- [8] 天津轻工业学院主编. *工业发酵分析*, 北京:轻工业出版社, 1979, 32~33.
- [9] 徐叔云主编. *《药理实验方法学》*, 北京:人民卫生出版社, 1982, 1423~1142.
- [10] 张丹,林培英,潘竞锵等. *中国药理学通报*, 1989, 5(1): 37~40.