

文章编号:1673-1689(2006)01-0065-05

液体发酵法生产云芝胞内糖肽

余晓斌^{1,2}, 胡卫珍^{1,2}, 濮文林³

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 3. 南京老山药业股份有限公司, 江苏 南京 211811)

摘 要: 通过筛选比较 6 株云芝菌种, 获得液体发酵生产云芝糖肽的较佳菌株 CV-S, 经优化摇瓶发酵, 放大至 30 L 罐发酵, 28 °C 发酵 4 d, 菌丝体干重达 24.9 g/L, 菌丝体破碎后, 经超滤浓缩, 醇沉干燥后, 云芝胞内糖肽产率达 2.23 g/L, 糖肽总糖为 55.58%, 肽 33.53%, 经 HPLC 检测其相对分子质量高于 10 000 的有 2 个组分, 分别为 783 600 和 27 700, 所提取产品的出峰时间与标准品基本一致。

关键词: 云芝; 云芝胞内糖肽; 液体发酵

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Production of *Coriolus versicolor* Polysaccharopeptide by Submerged Fermentation

YU Xiao-bin^{1,2}, HU Wei-zhen^{1,2}, PU Wen-lin³

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. Nanjing Laoshan Pharmaceutical Co. Ltd, Nanjing 211811, China)

Abstract: By comparison of six different *Coriolus versicolor* strains, strain CV-S was selected for polysaccharopeptide production by submerged fermentation. After optimization of shake-flask culture conditions, the fermentation was scaled-up to a 30 liter fermentor. Maximal dry mycelium weight reached 24.9 g/L after cultivation for 4 days at 28 °C. Intracellular polysaccharopeptide was extracted by a series of operations of mycelium crashing, ultra-filtration concentration, ethanol precipitation and drying. The concentration of the polysaccharopeptide obtained was 2.23 g/L, total sugar content was 55.58%, and peptide content was 33.53%. High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Ultrahudrgel™ Linear 7.8 mm×300 mm columns) was used for the fractional and molecular weight (M_w) estimation of polysaccharopeptide. It was found that the M_w of two components were more than 10 000, and reached 783 600 and 27 700, respectively. HPLC retention time of extracted polysaccharopeptide was consistent with that of standard.

Key words: *Coriolus versicolor*; intracellular polysaccharopeptide of *Coriolus versicolor*; submerged fermentation

收稿日期: 2005-05-06; 修回日期: 2005-07-08.

作者简介: 余晓斌(1965-), 男, 安徽芜湖人, 副教授, 工学博士。
万方数据

云芝胞内糖肽是从担子菌纲多孔菌科云芝属真菌的菌丝体中提取的结合蛋白多糖。它具有广泛的药理作用,特别对机体的免疫功能具有调节和增强作用,是一种有效的免疫增强药。云芝胞内糖肽可预防和治疗慢性乙型肝炎、肝硬化等类肝病,也可预防和治疗多种肿瘤疾病如肝癌、乳腺癌、胃癌、食道癌、大肠癌、头颈部癌、妇科癌症等,可降低放化疗毒副反应,因此作为治疗癌症的辅助药品。此外云芝糖肽还具有镇痛、镇静、降血糖、抗乙肝病毒、以及提高抗氧化能力,清除脂质过氧化物(LPO)^[1,2]等作用。

有关云芝液体发酵已有一些报道^[7,8],但由于云芝糖肽是一个多组分复杂体系,糖肽的理化性质、生理活性与相对分子质量有很大关系,如何通过液体发酵获得大量云芝菌丝体,提取到含有较高有效成分的产品,并且符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 要求的糖肽产品,目前尚未见有关此方面文献报道。作者通过对 6 株云芝菌种筛选与比较,获得适合的菌株 CV-H 和 CV-S, CV-S 扩大至 30 L 罐液体发酵,提取获得云芝胞内糖肽,通过高效液相色谱(HPLC)检测,与云芝糖肽标准品比较,并测定其总糖、还原糖、肽含量等指标,均符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 的要求。

1 材料与方法

1.1 菌种

云芝(*Coriolus versicolor*)菌种 6 株,分别编号为 CV-B、CV-D、CV-H、CV-J、CV-L、CV-S,由作者所在研究室从全国各地收集、分离并保藏。

1.2 培养基

种子培养基:每升培养基含 20 g 葡萄糖,3 g 蛋白胨,5 g 麸皮及无机盐等。

发酵培养基:每升培养基含 30 g 葡萄糖,20 g 豆饼粉,15 g 玉米粉,6 g 蛋白胨,5 g 麸皮及无机盐等。

1.3 30 L 发酵罐的发酵条件

30 L 全自动不锈钢发酵罐由无锡三海生化工程有限公司制造;pH 值,溶氧(DO)探头为瑞士梅特勒公司产品,在线自动检测。

接种体积分数 10%、搅拌转速 150~200 r/min、通风比 1:0.8、温度 26~28 ℃、装液量 22 L、罐压 0.5 kg/cm²。

1.4 云芝胞内糖肽的提取

1.4.1 摇瓶培养胞内糖肽提取 发酵液过滤获得菌丝体,洗涤 3 次,用组织捣碎机破壁,90~100 ℃

热水煮沸 2 次,抽提 2 次,过滤得滤液,减压浓缩至原体积 1/3,加入 3 倍体积酒精沉淀,过滤干燥得胞内糖肽。

1.4.2 30 L 发酵罐胞内糖肽提取

发酵液→板框过滤→菌丝破壁→热水抽提→板框过滤→超滤浓缩→醇沉→干燥

超滤浓缩采用 UF201 超滤装置(上海弗立特实业有限公司制造),美国进口卷式膜元件,膜截流相对分子质量为 10 000,过滤面积 0.8 m²超滤膜。

1.5 菌丝体干重

取 100 mL 发酵液过滤,去离子水洗涤残渣 2 次,烘干至恒重,得菌丝体干重(g/L)。

1.6 质量指标的测定

云芝糖肽标准品购自中国药品生物制品检定所。

1.6.1 总糖测定 苯酚-硫酸法,按国家药品标准(WS-XG-021-2002)所提供的方法^[4]。

1.6.2 还原糖测定 DNS 法测定^[5]。

1.6.3 肽含量测定 国家药品标准(WS-XG-021-2002)所提供的方法。

1.6.4 相对分子质量的测定 高效液相色谱, WATERSTM 600,凝胶色谱柱为 UltrahudrgelTM Linear 7.8 mm×300 mm。

采用标准相对分子质量的葡聚糖 Dextran,相对分子质量分别为 4 600,10 000,70 000,188 000,482 000,用 0.1 mol/L NaNO₃ 溶解并过滤,进样量为 20 μL,流动相为 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液,流速 0.9 mL/min,采用示差折光检测器。用 GPC 软件绘制相对分子质量对数(lg M_w)—保留时间(t)的标准曲线,根据待测样品保留时间,由 GPC 软件计算各出峰组分的相对分子质量^[3]。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种的筛选结果

对 6 株云芝菌种 CV-H、CV-D、CV-B、CV-S、CV-J 分别进行摇瓶培养和云芝胞内糖肽的提取与检测,虽然这 6 株菌种获得的胞内糖肽在总糖、还原糖、肽含量上均符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 的要求(总糖 ≥ 35%、还原糖 < 10%、肽 ≥ 20%),但经 HPLC 检测,只有菌种 CV-S、CV-H 所制得的胞内糖肽与标准品符合。

2.2 云芝糖肽标准品相对分子质量分布及所提取产品 HPLC 检测

用不同相对分子质量的标准葡聚糖 Dextran,进样检测其保留时间 t ,用 GPC 软件绘制相对分子

质量对数($\lg M_w$)—保留时间(t)的标准曲线,得到标准相对分子质量工作曲线,见图 1。

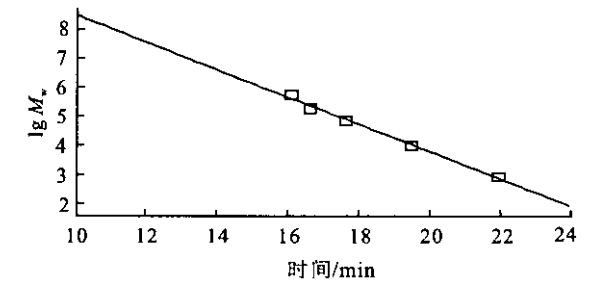


图 1 标准相对分子质量工作曲线

Fig. 1 Working curve of standard molecular weight
经线性回归,其方程为 $\lg M_w = 13.2 - 0.471 t$,相关系数为 0.9965。通过测定样品的保留时间,由标准曲线所做的线性方程,可计算样品中各组分的相对分子质量。

云芝胞内糖肽标准品经 HPLC 检测,其出峰保留时间见图 2。根据保留时间,由 GPC 软件计算各出峰组分的相对分子质量,见图 3。

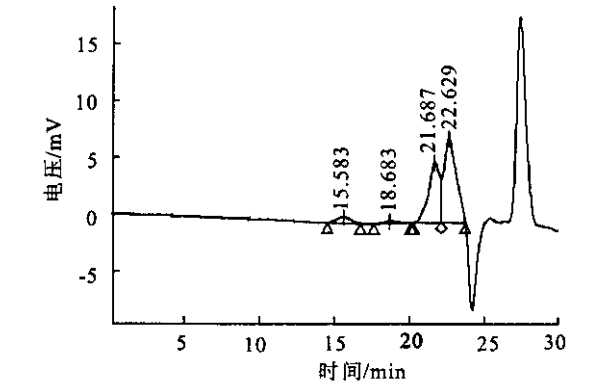


图 2 云芝糖肽标准品出峰保留时间图谱

Fig. 2 The retention time curve of standard polysaccharopeptide

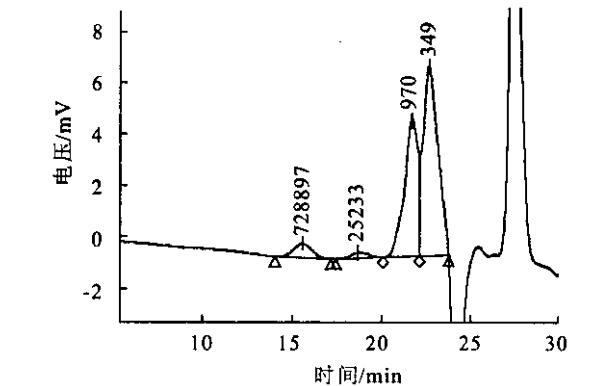


图 3 云芝糖肽标准品组分相对分子质量分布

Fig. 3 The mol. wt. distribution of standard polysaccharopeptide

一般认为,只有相对分子质量在 10 000^[6] 以上的云芝糖肽组分才可能具有功能。从图 3 可以看

出,相对分子质量在 10 000 以上的有 2 个组分,即 HPLC 图谱中的前两个峰,一个是 728 900,一个是 25 200,因此在所获得的云芝糖肽产品中,主要比对这两个峰的保留时间及所占比例。

从云芝菌 CV-S、CV-H 胞内所提取获得的糖肽样品,经 HPLC 检测,其图谱见图 4~7。

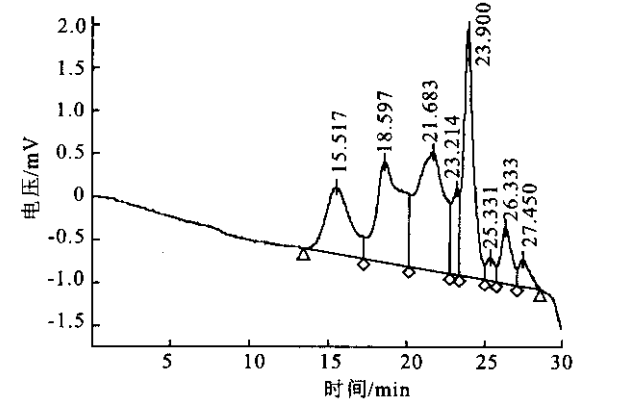


图 4 云芝 CV-S 胞内糖肽出峰保留时间图谱

Fig. 4 The retention time curve of CV-S polysaccharopeptide

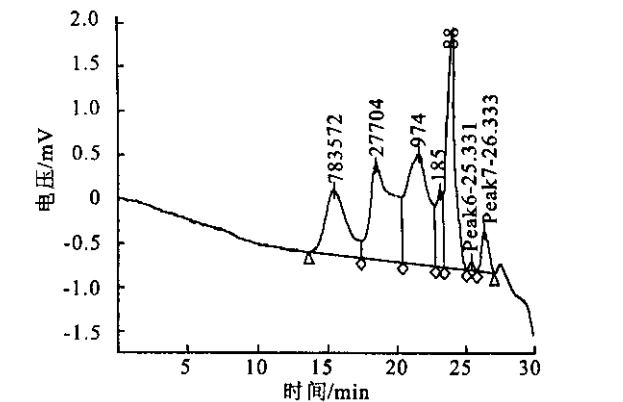


图 5 云芝 CV-S 胞内糖肽相对分子质量分布

Fig. 5 The mol. wt. distribution of CV-S polysaccharopeptide

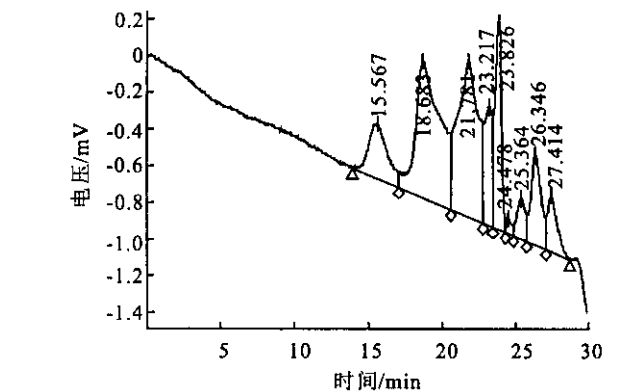


图 6 云芝 CV-H 胞内糖肽出峰保留时间图谱

Fig. 6 The retention time curve of CV-H polysaccharopeptide

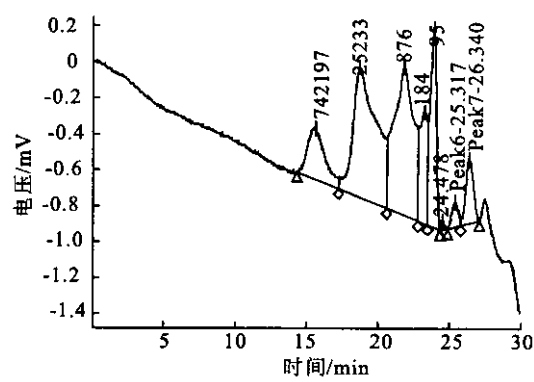


图 7 云芝 CV-H 胞内糖肽相对分子质量分布

Fig. 7 The mol. wt. distribution of CV-H polysaccharopeptide

表 1 CV-S、CV-H 所制备的胞内糖肽与标准品 HPLC 图谱对比

Tab. 1 HPLC analysis comparison of polysaccharopeptide produced by CV-S and CV-H with standard

HPLC 图谱	云芝胞内糖肽标准品	CV-S 胞内糖肽	CV-H 胞内糖肽
峰 I 保留时间/min	15.583	15.517	15.567
相对分子质量	728 897	783 572	742 197
归一化含量/%	4.42	14.12	8.77
峰 II 保留时间/min	18.683	18.597	18.683
相对分子质量	25 233	27 704	25 233
归一化含量/%	1.93	21.94	28.62

由上可见,菌种 CV-H、CV-S 提取获得的胞内糖肽与标准品的前两个峰的保留时间和相对分子质量基本一致,其中 CV-H 的峰 II 保留时间与标准品完全相同,CV-S 的峰 I 和峰 II 的归一化含量高,分别为 14.12% 和 21.94%,远高于标准品 4.42% 和 1.93%,因此对 CV-S 进行 30 L 扩大培养和提取研究。

2.3 30 L 发酵罐扩大培养

以菌种 CV-S 为种子,进行 30 L 罐发酵,其发酵过程曲线见图 8。

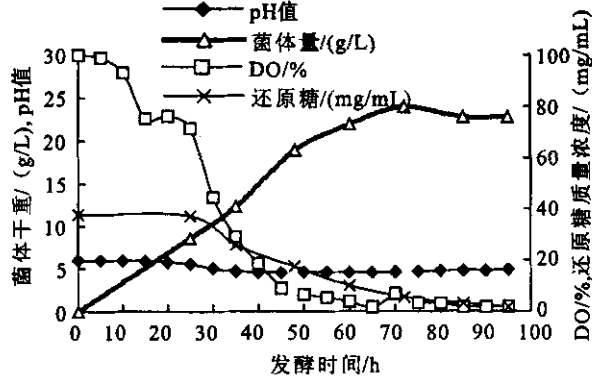


图 8 云芝 CV-S 在 30 L 罐中发酵过程曲线

Fig. 8 Fermentation curve of CV-S in 30 liter fermentor

由图 8 可见,发酵 25 h 左右,菌丝体开始进入对数生长期,溶氧急剧下降,还原糖质量浓度也开始显著下降,在发酵 20-70 h 左右时菌体处于对数生长期,发酵至 70 h 时菌丝体干重达到最大,为 24.9 g/L,之后菌体量略微有些降低。

发酵培养至 2 d 左右时,由于菌丝体大量生长,菌体代谢旺盛,培养液十分粘稠,溶氧维持在较低水平,并一直维持到发酵结束,因此可考虑提高转速和加大通风量来改善溶氧水平。发酵起始 pH 值为 5.93,培养 5 h 后,pH 值回升到 5.96,之后 pH 值持续下降,到 60 h 降到最低,为 4.54,70 h 后 pH 值开始缓慢回升,至发酵终止时 pH 值为 4.85。

根据还原糖质量浓度不再下降以及 pH 值回升的情况,终止发酵并对发酵液进行过滤,分别对发酵清液和菌丝体进行提取,获得胞外多糖和胞内糖肽,并进行检测,结果见表 2。

表 2 30 L 罐发酵所提取产品的质量检测数据

Tab. 2 Qualitative index of polysaccharopeptide produced by CV-S in 30 L fermentor

检测指标	检测结果
胞内糖肽	总糖/%
	55.58
	单糖/%
	0.46
胞外多糖	肽/%
	33.53
	得率/(g/L)
	2.23
胞外多糖	总糖/%
	36.22
	单糖/%
	0.75
胞外多糖	肽/%
	19.70
胞外多糖	得率/(g/L)
	7.85

由表 2 可见,所提取制得的云芝胞内糖肽,总糖≥35%(以葡萄糖计),单糖<10%,含肽≥20%,并经江苏省药物研究所检测,其 HPLC 图谱与标准品一致,符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 要求。此外进行了 10 批次的上罐发酵,所提取获得的胞内糖肽均符合要求,表明此发酵工艺可靠。

3 结 论

通过筛选并经 HPLC 检测验证,云芝菌 CV-H 和 CV-S 较佳,其提取获得的产品符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 要求。

CV-S 经 30 L 发酵罐扩大培养,28 ℃ 发酵液体培养 4 d,菌丝体干重达 24.9 g/L,菌丝体破碎后,经超滤浓缩,醇沉干燥后,云芝胞内糖肽产率达 2.23 g/L,总糖为 55.58%,肽含量 33.53%,经

HPLC 检测其有效成分的相对分子质量分别为 742 200 和 25 200,其归一化含量分别为 8.77%和 28.62%,高于标准品 4.42%和 1.94%。经 10 批次发酵,所获得的产品符合要求,因此该生产技术可进一步扩大。

在获得胞内糖肽的同时,可获得 7.85 g/L 胞外粗多糖,胞外多糖的功能性待进一步研究。

参考文献:

[1] 邹巧根,朱玲. 云芝糖肽的研究进展[J]. 中成药,2003,25(7):578—580.

[2] 鲁晓燕,孟凡振. 云芝糖肽药理作用进展[J]. 中国药师,1999,2(3):148—149.

[3] 杨晓彤,糜可. 不同云芝菌株及提取工艺所得结合蛋白多糖的分析比较[J]. 中国医药工业杂志,2000,31(12):545—548.

[4] 国标 WS-XG-021-2002, 国家药品标准[S].

[5] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. **Anal Chem**, 1959, 31: 426—428.

[6] T B N G. A review of research on the protein-bound polysaccharide(polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor*[J]. **Gen Pharmac**,1998,30(1):1—4.

[7] 张培玉,杨革,郑恒河. 云芝菌丝体生长的营养需求及液体发酵研究[J]. 曲阜师范大学学报 1998,24(3):65—68.

[8] 潘继红,王登,查晓红,等. 云芝深层培养及发酵液的应用研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(1):19—21.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 64 页)

[6] LIU Gang, XU Zhi-nan , CEN Peilin. A morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation[J]. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2000, 8(1):46—51.

[7] Tomaselli Scotti C, Vergoignan C, Feron G, et al. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001,7:1—5.

[8] 许旭萍,李惠珍,余晨星,等. 麦角固醇产生菌 *Torulopsis famata* 优化发酵条件的研究[J]. 生物学杂志,2002,18(2):15—17.

[9] 苏畅,夏文水,姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法[J]. 食品工业科技,2003,24(6):74—75.

[10] Frishman W H, Zimetbaum P, Nadelmann J. Lovastatin and other HMG-CoA reductase inhibitors[J]. **J Clin Pharmacol**, 1989, 29:975—982.

[11] Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, et al. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)**, 1991, 35(2): 200—205.

(责任编辑:李春丽)