

# 海藻酸钠固定灵芝细胞对胞外三萜类产量的影响

董玉玮, 汤步伟, 苗敬芝, 曹泽虹

(徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008)

**摘 要:** 采用海藻酸钠和氯化钙对灵芝细胞进行固定, 研究包埋法固定灵芝细胞的工艺条件, 探讨固定化工艺对灵芝胞外三萜类产量的影响。结果表明: 固定灵芝细胞的最佳工艺条件为: 4.5% 海藻酸钠、2.2%  $\text{CaCl}_2$ 、培养基 pH 值自然, 接种 40 个固定化小球, 28℃、110r/min 培养 12d, 胞外三萜类产量为  $(49.53 \pm 1.37) \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。固定化灵芝细胞较未固定细胞, 具有更好的耐酸、耐碱性, 长时间培养仍具有较高的产三萜类能力, 回收利用次数可达 5 次。

**关键词:** 灵芝; 三萜类; 固定化; 海藻酸钠; 氯化钙

## Immobilization of *Ganoderma lucidum* in Sodium Alginate Beads and Effect on Extracellular Triterpene Production

DONG Yu-wei, TANG Bu-wei, MIAO Jing-zhi, CAO Ze-hong

(College of Food (Biological) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

**Abstract:** In this study, *Ganoderma lucidum* were immobilized by sodium alginate and calcium chloride. Immobilization conditions of *Ganoderma lucidum* using entrapment method were studied. The effects of immobilization conditions on triterpenes yield were also evaluated. The results showed the optimal conditions of immobilization of *Ganoderma lucidum* by sodium alginate were as follows: 4.5% of sodium alginate, 2.2% of calcium chloride, nature pH, 40 immobilized beads, 28 °C, 110 r/min, cultured 12 days, the highest triterpenes yield was  $(49.53 \pm 1.37) \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ . Immobilized cells had better acid and alkali resistance, higher triterpenes yield after long time culture than non-immobilized cell. It can be recycled five times.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; triterpenoids; immobilization; sodium alginate; calcium chloride

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0234-04

被誉为“四大菌王”、“九大仙草”之一的灵芝(*Ganoderma lucidum*), 作为药食兼用的瑰宝, 近年来, 随着灵芝子实体的栽培和菌体生物发酵的生产, 使得灵芝在中药、保健品、功能性食品上的应用更为普遍<sup>[1]</sup>。三萜类作为灵芝保肝、抗肿瘤的重要活性物质<sup>[2-3]</sup>, 目前已分离到 100 多种, 其产量已成为鉴定灵芝品种优劣的重要指标之一<sup>[4]</sup>。传统灵芝栽培工艺受季节和原材料的限制, 子实体产量低, 不能满足需要; 单一的液体发酵技术虽然可以在一定程度上提高灵芝活性物质产量, 但也存在投入成本高、产量不稳定等不足。固定化细胞技术是液体发酵技术与固定化酶技术的有机结合, 是利用物理或化学手段将游离细胞定位于限定的空间区域并使其保持活性可以反复使用的一种技术, 较液体发酵技术, 可以提高微生物的催化活性, 缩短生产周期, 降低成本, 增加产量, 因而工业化生

产前景广阔<sup>[5-7]</sup>。固定化真菌细胞技术已取得一些研究成果, 凸显出很多优势<sup>[8-9]</sup>, 但该项技术在灵芝上的应用还极少。本实验探讨固定化灵芝细胞的工艺条件, 及其对三萜类产量的影响, 为合理开发灵芝资源, 提高灵芝三萜类产量提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、培养基与试剂

赤灵芝 003 为徐州工程学院微生物学实验室保存的高产三萜类菌株; 马铃薯 市售。

PDA 斜面培养基: 按照 GB 4789.15—2010《食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数》配制, 用于菌种的复苏及保存; 可溶性淀粉培养基: 可溶性淀粉 3%、酵母膏 1%、葡萄糖 1.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%; 再生培养基: 蛋白胨 0.1%、牛肉膏 0.5%、葡

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目(09KJD180008); 徐州工程学院校级科研项目(XKY2008228)

作者简介: 董玉玮(1980—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: dongyuwei66@163.com

葡萄糖 2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.046%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%、琼脂 2%、 $\text{VB}_2$  和  $\text{VB}_6$  少量<sup>[10]</sup>。

齐墩果酸标准品 昆明科翔生物科技有限公司；所用其他试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌种培养

取一小块菌种接种于斜面培养基上，28℃培养 144h，活化 1 次。接种活化后的菌块于可溶性淀粉培养基中，250mL 摇瓶 80mL 装液量，28℃、110r/min 摇床培养 5d。

### 1.2.2 灵芝细胞的固定化

选取长势较好的灵芝菌丝，放入玻璃珠打散细胞后，加入一定质量分数的海藻酸钠溶液( $V_{\text{灵芝菌液}}:V_{\text{海藻酸钠溶液}}=1:3$ )，充分混匀后，用 7 号针头吸取混合液滴入一定质量分数的  $\text{CaCl}_2$  溶液中，形成固定化小球，直径约 2~3mm，放入 4℃冰箱静置 2h，再放入 28℃恒温箱 2h 固定完全。取出后用甘露醇溶液冲洗 2 次，滤纸吸干后放入可溶性淀粉培养基，250mL 摇瓶 80mL 装液量，28℃、110r/min 摇床培养一定时间<sup>[11]</sup>。

### 1.2.3 灵芝胞外三萜类产量的测定

#### 1.2.3.1 胞外三萜类的提取

正丁醇中加蒸馏水于分液漏斗中充分混匀，静置过夜，上层即为水饱和正丁醇。取发酵液 15mL，用 3 倍体积的水饱和正丁醇萃取 3 次，合并正丁醇提取液，减压蒸干，加 4mL 95% 乙醇溶解，备用<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.3.2 标准曲线的制作

精确称取 10mg 齐墩果酸，置于 50mL 的容量瓶中，加甲醇定容至刻度。取试管 6 支，分别加入齐墩果酸溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，用甲醇补至 1mL，加 5% 香草醛溶液(香草醛 5g，加入冰醋酸 100mL 溶解) 2mL，高氯酸 5mL，混匀后 60℃水浴 20min，置凉水中 15min，各加冰醋酸 5mL，于波长 550nm 处测吸光度，绘制标准曲线。

#### 1.2.3.3 比色法测定三萜类产量

分别取待测样品溶液 1mL 于试管中(设 3 个重复)，加 5% 香草醛溶液 2mL、高氯酸 5mL 混匀后，60℃水浴 20min，置凉水中 15min，加冰醋酸 5mL，于波长 550nm 处测定吸光度<sup>[12]</sup>。根据标准曲线计算灵芝胞外三萜类产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质量分数海藻酸钠对胞外三萜类产量的影响

分别取 3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5% 的海藻酸钠溶液，2.1% 氯化钙，pH 值自然，制备固定

化细胞小球。接种 50 个固定化小球于可溶性淀粉培养基，28℃培养 11d，测定胞外三萜类产量，重复 3 次，结果见图 1。

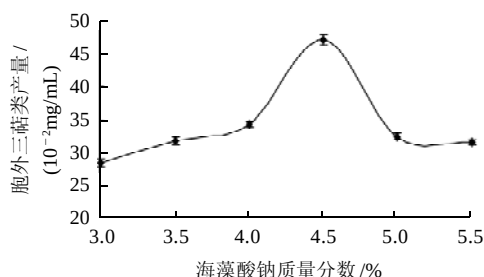


图1 海藻酸钠质量分数对灵芝细胞胞外三萜类产量的影响  
Fig.1 Effect of sodium alginate concentration on extracellular triterpene yield

从图 1 可以看出，随着海藻酸钠质量分数的增大，胞外三萜类产量先增大后减小。当海藻酸钠质量分数小于 4.5% 时，固定化小球较易破裂，被固定化的灵芝菌丝新陈代谢较快，容易衰老，因此三萜类产量较少。当海藻酸钠质量分数大于 4.5% 时，固定化小球阻碍了细胞对营养物质的吸收，三萜类产量也较低。当海藻酸钠质量分数为 4.5% 时，胞外三萜类产量最高，为  $47.20 \times 10^{-2}\text{mg/mL}$ 。

### 2.2 不同质量分数氯化钙对胞外三萜类产量的影响

分别取 1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6% 的氯化钙溶液，4.5% 的海藻酸钠溶液，pH 值自然，制备固定化细胞小球。接种 50 个固定化小球于可溶性淀粉培养基，28℃培养 11d，测定胞外三萜类的产量，重复 3 次，结果见图 2。

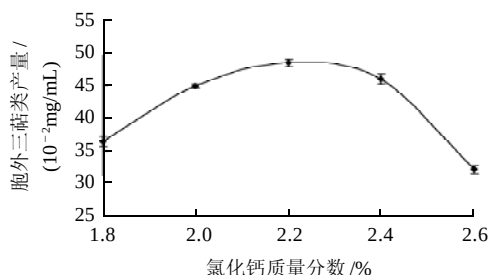


图2 氯化钙质量分数对灵芝细胞胞外三萜类产量的影响  
Fig.2 Effect of calcium chloride concentration on extracellular triterpene yield

从图 2 可以看出，随着氯化钙质量分数增大，胞外三萜类产量先增大后减小。当氯化钙质量分数小于 2.2% 时，海藻酸钙外壁较薄，菌丝新陈代谢较快，易

衰老,胞外三萜类产量较少。当氯化钙质量分数大于2.2%时,海藻酸钙外壁较厚,不利于营养物质的传递,胞外三萜类产量较少。当氯化钙质量分数为2.2%时,胞外三萜类产量最高,为  $48.48 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。

### 2.3 培养时间对未固定化、固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响

采用4.5%海藻酸钠和2.2%氯化钙对灵芝细胞进行固定化,pH值自然,接种50个固定化小球于可溶性淀粉培养基,28℃培养,分别测定未固定化、固定化灵芝细胞4~16d时胞外三萜类产量,重复3次,结果见图3。

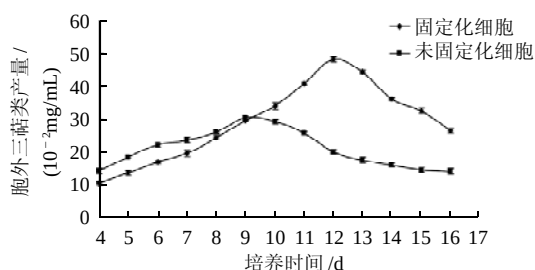


图3 培养时间对固定化前后灵芝细胞胞外三萜类产量的影响  
Fig.3 Effect of culture time on extracellular triterpenoid yield of non-immobilized and immobilized *Ganoderma lucidum*

从图3可以看出,随着培养时间的延长,固定化、未固定化灵芝细胞胞外三萜类产量都先增大后减小,分别在第12、9天,三萜类产量达到最大值,分别为  $48.13 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$  和  $30.26 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。固定化灵芝细胞培养前期(4~8d),细胞生长较慢,海藻酸钙白色钙化外壁明显,三萜类产量较少,且低于未固定化细胞,这是由于固定化工艺会在一定程度上损伤细胞,影响其生长,细胞需要一定时间适应固定化后的环境;培养中期(9~13d),海藻酸钙白色钙化外壁透明度、光泽度增加,固定化小球直径增大,表明灵芝细胞已经适应固定后的生长环境,活性增加,三萜类产量增加明显,高于未固定化细胞;培养后期(14~16d),海藻酸钙外壁更加通透、稀薄,细胞老化程度加剧,形成的三萜类物质也逐渐被细胞作为营养物质重新吸收利用,培养液黏稠度增加,生长环境质量下降,三萜类产量逐渐降低,但仍高于未固定化细胞。

### 2.4 pH值对未固定化、固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响

分别调节培养基pH值为1.5~12.5,采用4.5%海藻酸钠和2.2%氯化钙对灵芝细胞进行固定化,接种50个固定化小球于可溶性淀粉培养基,28℃培养12d,未固

定化细胞28℃培养9d,分别测定未固定化、固定化灵芝细胞胞外三萜类产量,重复3次,结果见图4。

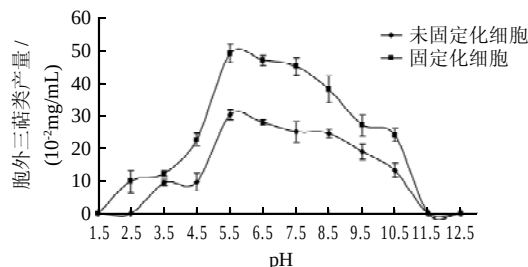


图4 pH值对固定化前后灵芝细胞胞外三萜类产量的影响  
Fig.4 Effect of culture pH on extracellular triterpenoid yield of non-immobilized and immobilized *Ganoderma lucidum*

从图4可以看出,随着pH值增加,未固定化、固定化灵芝细胞胞外三萜类产量都先增大后减小,都在pH5.5(培养基自然pH值)时,达到最高,分别为  $30.26 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$  和  $49.17 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。强酸、强碱性条件对灵芝细胞生长均有抑制作用,固定化后在一定程度上可以保护细胞,因此相同pH值条件下,固定化后灵芝细胞胞外三萜类产量都高于未固定化细胞,表现出较好的耐酸、耐碱性。但是当pH值大于6.5后,由于氢离子减少,古罗糖醛酸与甘露糖醛酸不足以形成分子间桥联<sup>[13]</sup>,所以碱性条件对固定化细胞影响较大,三萜类产量减少明显。

### 2.5 回收次数对固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响

采用4.5%海藻酸钠,2.2%  $\text{CaCl}_2$ ,pH值自然,接种50个固定化小球于可溶性淀粉培养基,每次28℃培养12d,取出固定化小球,加入新鲜培养基继续培养,测定每次发酵液胞外三萜类产量,重复3次,结果见图5。

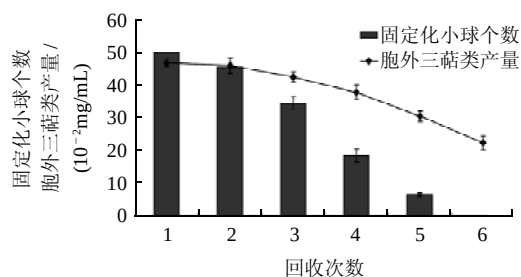


图5 回收次数对固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响  
Fig.5 Effect of repeated use on extracellular triterpenoid yield of immobilized *Ganoderma lucidum*

从图5可以看出,回收5次后,固定化灵芝细胞仍然具有一定的产胞外三萜类的能力,可回收性能良

好。随着回收次数增加,不断有固定化小球发生破裂,尤其是回收3次以后,破裂数明显增多,同时小球体积增大,第5次回收后,小球直径均在1.5~2.5cm,海藻酸钙膨胀能力已近极限,因此第6次回收后,剩余固定化小球在培养过程中均破裂,但游离细胞仍具有产胞外三萜类的能力,因此仍可测出胞外三萜类产量。

#### 2.6 接种量对固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响

采用4.5%海藻酸钠,2.2%氯化钙固定灵芝细胞,pH值自然,分别接种10、20、30、40、50、60、70个固定化小球,28℃培养12d,测定胞外三萜类的产量,重复3次,结果见图6。

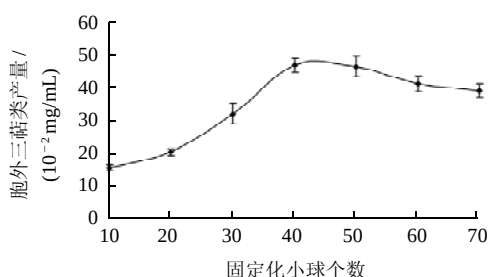


图6 接种量对固定化灵芝细胞胞外三萜类产量的影响

Fig.6 Effect of inoculum size on extracellular triterpenoids yield of immobilized *Ganoderma lucidum*

从图6可以看出,随着接种量的增加,胞外三萜类产量先增大后减小,接种量较低时,菌丝生长速度慢,接种量高则会相互竞争营养,氧气急剧消耗,造成生长过剩,不利于胞外三萜类的积累,当接种40个固定化小球时,胞外三萜类产量达到最高,为 $47.01 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。

#### 2.7 固定化灵芝细胞最佳条件

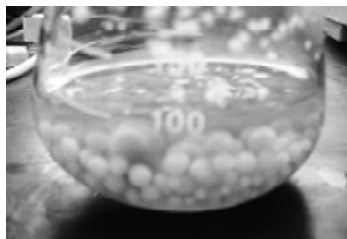


图7 最佳固定化工艺条件下的灵芝菌球形态

Fig.7 Mycelium pellets of *Ganoderma lucidum* immobilized under optimum conditions

根据海藻酸钠固定化灵芝细胞的最佳工艺条件:4.5%海藻酸钠,2.2%  $\text{CaCl}_2$ , pH值自然,接种40个

固定化小球,28℃、250mL摇瓶80mL装液量,110r/min培养12d,重复3次,胞外三萜类产量为 $(49.53 \pm 1.37) \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ ,固定化灵芝菌球形态见图7。固定化小球平均半径约为3~4mm,大小均一,透明度、光泽度较好。由于固定化工艺能够形成高度密集而体积小的生产菌集合体,同时细胞膜、细胞壁和海藻酸钙载体都存在着扩散限制作用,有利于集中、高效的利用营养物质,因此固定化后细胞生长、增殖能力提高,抗逆性增强,老化速度降低,细胞寿命延长,稳定性增加,可长时间反复使用。

### 3 结论

海藻酸钠固定灵芝细胞最佳工艺条件为:4.5%海藻酸钠,2.2%  $\text{CaCl}_2$ , pH值自然,接种40个固定化小球,28℃、250mL摇瓶80mL装液量,110r/min培养12d,胞外三萜类产量为 $49.53 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$ 。固定化灵芝细胞较未固定细胞具有更好的耐酸、耐碱性,长时间培养仍具有较高的产胞外三萜类能力,回收利用次数可达5次。

#### 参考文献:

- [1] 冯道俊. 灵芝的化学成分、功效与药理作用[J]. 特种经济动植物, 2006(8): 39-40.
- [2] 魏晓霞, 李鹏, 许建华, 等. 灵芝三萜组分GLA体内外抗肿瘤作用的研究[J]. 福建医科大学学报, 2010, 44(6): 417-420.
- [3] 唐庆九, 季哲, 郝瑞霞, 等. 灵芝中性三萜类成分的抗肿瘤作用[J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 60-64.
- [4] 崔月花, 章克昌. 灵芝三萜皂苷(GTCL1)的体外抗氧化作用[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 49-53.
- [5] 石小霞, 褚可成, 陈志梅, 等. 固定化细胞技术及其应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 380-385.
- [6] 李冀新, 张超, 高虹. 固定化细胞技术应用研究进展[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(6): 5-7.
- [7] 王人悦. 固定化细胞技术及其应用前景[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 210-216.
- [8] 陈智理, 杨昌鹏, 郭静婕. 固定化酵母发酵生产香蕉菠萝复合果酒的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20732-20734; 20745.
- [9] 周桂, 何子平, 谢金彩. 双载体法固定化黑曲霉发酵产壳聚糖酶的研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 29(5): 104-107.
- [10] 赵明文, 王晨光, 鲍鹏, 等. 不同灵芝菌株体中三萜与多糖含量的比较[J]. 中国食用菌, 2003, 22(2): 43-46.
- [11] 梁峙, 赵孝华. 海藻酸钠固定化酵母菌的应用研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(12): 34-35.
- [12] 余素萍. 灵芝深层发酵生产生物活性物质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [13] 陈明木, 王春英, 庞杰, 等. 海藻酸钙凝胶特性影响因素的探讨[J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(3): 4-6; 11.