

云芝糖肽液体发酵条件及其提取工艺研究

李岩, 肖亚聪, 李艳艳

广东岭南职业技术学院 广东广州

【摘要】 本文研究内容主要是对于云芝糖肽液体培养、HPGFC的测定, 以筛选有效成分和糖肽含量相对较高的云芝菌株, 并对培养基进行优化, 在30L发酵罐当中进行扩充方法的实验。相关的结果显示, 在30L发酵罐当中, 发酵时间长达96小时之后, 菌体的净重量可以达到每升24.29g, 而糖肽的产量可以达到每升1.63g。并且, 根据相关的测定发现, 所提取的糖肽出峰时间与对照品的时间相对一致, 蛋白质含量、含糖量与国家药品管理标准也相吻合, 这就为云芝糖肽工业化的发酵提供了有力的基础支撑。本文主要对于云芝糖肽液体发酵条件及其提取工艺展开了探究。

【关键词】 云芝; 糖肽; 液体发酵; 提取工艺

【基金项目】 广东省中医药局课题《云芝糖肽液体发酵条件及其提取工艺研究》课题编号20202165

Research on liquid fermentation conditions and extraction technology of Yunzhi glycopeptide

Yan Li, Yacong Xiao, Yanyan Li

Guangdong Lingnan Vocational and Technical College, Guangzhou, Guangdong

【Abstract】 The research content of this paper is mainly for the determination of Yunzhi glycopeptide liquid culture and HPGFC, in order to screen Yunzhi strains with relatively high content of active ingredients and glycopeptides, optimize the medium, and expand the method in a 30L fermenter experiment of. Relevant results showed that in the 30L fermenter, after the fermentation time was as long as 96 hours, the net weight of the bacteria could reach 24.29g per liter, and the yield of glycopeptides could reach 1.63g per liter. In addition, according to relevant measurements, it was found that the peak time of the extracted glycopeptides was relatively consistent with the time of the reference substance, and the protein content and sugar content were also consistent with the national drug management standards, which provided the industrial fermentation of Yunzhi glycopeptides. strong foundation support. In this paper, the liquid fermentation conditions and extraction process of Yunzhi glycopeptides were mainly explored.

【Keywords】 Yunzhi; glycopeptides; Liquid fermentation; Extraction process

引言

云芝糖肽系从担子菌纲多孔菌科云芝属真菌云芝或培养的菌丝中提取纯化的结合蛋白多糖、良好的生物效果调整剂, 有明显的镇痛, 抗肿瘤、免疫调节、抗氧、促进多种细胞因子的抗b型肝炎病毒, 产生和一位老年疾病症状的改善等的作用。采用液体发酵培养, 可快速生产云芝糖肽, 缩短固体发酵培养时间, 节约生产成本。目前, 几个文献云灵芝液体发酵的云芝糖肽的生产报告, 而且在国内也有几个企业生产该产品, 但老板糖的性质、生理活性

和分子量很大关系, 并且最近, 国家药品监督管理局药品标准的新规定, 因此, 液体发酵提取有效成分高, 让国家药品标准的方法得到满足产品问题进行研究是非常重要的, 而且在国内也被报告得一。本实验结合了液体培养和高速液体凝胶过滤层析法(HPGFC)两种方法来筛选优良菌株。同时对培养基进行优化, 扩大为30L发酵槽, 进行液体发酵实验, 提取云芝糖肽进行检测, 与对照品进行比较。

1 材料与方法

1.1 菌种的确定

从不同产地收集到 6 株云芝菌株, 并对其进行。

1.2 培养基及培养条件

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20、玉米粉 10、麸皮 5、蛋白胨 3、磷酸二氢钾 1.5、硫酸镁 0.2; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30、玉米粉 15、豆饼粉 20、蛋白胨 1、麸皮 7.5、磷酸二氢钾 3、硫酸镁 0.2; 培养条件: 转速 150r/min, 温度 28C, 装液量 100mL/250mL 三角瓶, 培养 96h。

1.3 30L 发酵罐发酵条件

30L 全自动不锈钢发酵罐, 接种量 10%, 转速 150~200r/min, 通风量 0.8v/v/m, 温度 26~28C, 装液量 22L, 罐压 0.5kg/cm²。

1.4 菌丝胞内糖肽的提取

各菌株培养得到了潮湿的菌丝身体洗净后过滤, 加上水, 烈日炎炎, 热水提取 2 小时, 过滤, 后面滤干, 从热水中 1h 的提取, 过滤, 浓缩, 再加上工业用 95%酒精沉淀, 沉淀物干燥, 得到了胞内糖肽。

2 结果与讨论

2.1 不同云芝菌株液体培养比较

实验表明, 从 6 个菌株中获得的云芝胞内糖肽的产量存在差异。其中, h、y 和 LS 3 株糖肽产量在 0.7g/L 以上, JN、DA 和 SY 3 株糖肽产量在 0.7g/L 以下。从多糖类含量来看, y 最高, LS 其次; 蛋白质含量 LS 最高, DA 最低。因此发现 y、LS 和 H 3 株菌株活力高, 糖肽产量、多糖含量和蛋白质含量高, 可作为下一步研究的起始菌株。

2.2 分子测定结果比较

虽然云芝胞内糖肽的凝胶过滤层析的峰形相似, 但其分子量及其分布有差异, 因此需要控制其分子量。从[峰值]来看, y 提取物的分子量最大, 为 827692Da; LS 提取物的分子量其次; h 提取物的分子量最小, 为 737807Da。从峰值 II 来看, IS 提取物的分子量最大为 27593Da; h 提取物的分子量其次; y 提取物的分子量最小, 只有 7485Da。与对照品比较, y 提炼物分子量为 2 以上的高峰, 而是 h 提取物和 is 提取物的最初的两个顶点的保持时间和分子量都是对照品的最初的两个顶点的保持时间和分子量几乎完全一致, 而且满足了要求。

HPGFC 测定的多糖类分子量是一个相对值, 并不是真正的分子量, 但是在恒定迁移相浓度下, 作

为云芝胞内糖肽的质量控制是优选的。因此, 根据对照品的分子量, 峰值 I 被认为是有效活性成分峰值。h 和 ls 的两株菌株从得到的云芝糖化肽胞内的顶点 ii 分子量都在这个范围内, 对照品一致, 但国家药品标准中有关糖的分子量和分子量分布的测定方法(国家药典 2000 年版二部附录 vh)显示, 江苏省药物研究所的检测, 从菌株 is 提取的云芝糖化肽胞内更是满足了要求, 所以知道了 ls 菌株次作为试验菌株的选择了。

2.3 培养基的优化

从胞内糖肽的产量来看, 随着玉米粉添加量的增加, 胞内糖肽的产量也随之增加。但是, 玉米粉的含量从 1.5%上升到 2%时, 胞内糖肽的产量有所下降, 同时希碘液中检测到的地方, 蓝色, 而且发酵液中的玉米粉几乎枯竭了。另外, 当葡萄糖为单碳源时, 其菌体容易连结菌球, 影响菌体的生长和物质交换; 另一方面, 添加粗原料碳源玉米粉后, 菌球直径减少, 发酵液中丝状体比例增加, 减少了培养基中氧的传递和传递物质的阻力, 有利于菌体的生长和多糖的生成。

农副业产品豆饼粉、黄豆粉、蚕蛹粉均用于发酵, 可产生云芝胞内糖肽。特别是以豆饼粉为氮源时, 胞内糖肽的生产量最高, 蚕蛹粉最差。这可能是由于云芝分泌的蛋白酶适合豆饼粉这样的植物蛋白质。因此, 本实验选择了豆饼粉+蛋白胨作为氮源。因为碳源和氮源的浓度比, 即 C/N 比, 影响基质进入人体细胞后的代谢流程, 影响菌体的生长和多糖的合成, 同时也影响多糖的含量和蛋白质的含量。被国家药品标准规定, 总糖单糖和蛋白质的含量, 为实现多次实验, 发酵培养液在葡萄糖 1~3%、玉米 1.5%、豆糕粉 2%, 麸质 0.75%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.02%确认。

2.4 30L 发酵罐的扩大培养

云芝在生长过程中, 经过短暂的调整期进入快速增长期, 此时发酵液逐渐粘稠, 发酵 70h 时菌体量达到最大。然后进入衰退期; 溶解氧下降很快, 发酵 50h 时降低, 之后几乎没有变化。这说明菌体生长旺盛; 还原糖在 25h 时开始显著下降, 并维持在较低水平直到发酵结束; 随着时间的推移, pH 值最低降至 4.46, 这主要是云芝菌体随着发育、生长、繁殖, 大量营养基质代谢分解, 有机酸蓄积, pH 值

下降。之后的阶段 pH 值为 4.5, 云芝在这个阶段进行糖肽合成。

3 小结

实践中已经证明, 只有获得高活力、生产性能优良的菌株, 才能发酵和生产成功, 降低生产成本。本实验根据液体培养和 HPGFC 测定结果, 以糖肽产量、多糖含量、蛋白质含量和液相色谱为主要参考指标, 确定菌株 IS 是液体深层发酵的首选菌株。

通过对发酵培养基进行优化, 确定 LS 的发酵培养基配方为葡萄糖 3%、玉米粉 1.5%、豆饼粉 2%、麸质 0.75%、磷酸二氢钾 0.3%、硫酸镁 0.02%。30 ℃ 1 发酵槽的发酵结果, 28 ℃ 发酵 4 d, 菌体干重 24.29 g / l, 细胞内糖肽产量达到 1.63 g / l, 得到的细胞内糖肽的总糖含量为 50.41%, 单糖的含量为 0.53%, 蛋白质含量为 35.77%。

参考文献

- [1] 云芝胞内糖肽治疗抗结核药物致肝损害的临床观察[J]. 沈明, 赵攀, 钱春芳. 临床肺科杂志. 2012(10)
- [2] 微波法提取鼠尾藻多糖的工艺研究[J]. 黎庆涛, 潘路路, 黄康宁, 杜玉兰, 李震宇. 天然产物研究与开发. 2011(06)
- [3] 云芝多糖对小鼠免疫性肝损伤保护作用及机制的研究[J]. 钟萍, 王云甫, 李萍. 中国现代医学杂志. 2011(31)
- [4] 云芝菌株遗传多样性的 ISSR 分析 (英文) [J]. 杨晓莉, 李国杰, 李赛飞, 文华安. 菌物学报. 2010(06)
- [5] 高压均质法提取云芝胞内糖肽[J]. 钱强, 陆震鸣, 许泓瑜. 食用菌. 2010(03)
- [6] 云芝胞内糖肽联合阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎 30 例[J]. 邓琪, 顾锡炳. 实用肝脏病杂志. 2009(06)
- [7] 张艳娇. 云芝糖肽的液体发酵条件研究[J]. 饮食保健, 2018, 5(020):74.
- [8] 王福清, 王福华, 殷红. 一种云芝糖肽制备的方法:, CN103408645B[P]. 2017.
- [9] 李岩, 周艺, 杨凤琼, 等. 一种云芝糖肽的提取及分级提

纯工艺:, CN104262503A[P]. 2015.

- [10] 梁晓婷. 云芝糖肽水提醇沉提取工艺[J]. 食品安全导刊, 2017(05X):1.
- [11] 陈惠, 郑惠华, 刘广建, 等. 云芝液体发酵高产多糖菌株及其选育方法:, CN105219657A[P]. 2016.
- [12] 代向向. 云芝生物转化无机硒生产富硒云芝糖肽的研究[D]. 上海师范大学, 2015.
- [13] 张圆, 孙玉娣, 刘璇, 等. 云芝糖肽化学成分的研究进展[J]. 中国食用菌, 2021, 40(8):5.
- [14] 曹宝臣, 贾存江, 袁峰. 一种高质量的云芝糖肽的提取方法:, CN110713513A[P]. 2020.
- [15] 曾化伟, 郑惠华, 梁伟, 等. 云芝菌液体发酵培养基的筛选[J]. 河北科技师范学院学报, 2015, 29(1):5.
- [16] 陈惠, 郑惠华, 刘广建, 等. 云芝液体发酵高产多糖菌株及其选育方法:, 2018.
- [17] 黄勇婷, 江静文, 陆雪丽, 等. 云芝液体培养产胞外多糖条件的研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2015.
- [18] 吴宽, 米伟丽, 吴云锋. 云芝糖肽发酵条件的响应面法优化试验[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(1):4.
- [19] 马猛华, 徐国华, 岳宗翠, 等. 一种云芝糖肽及其脂质体:, CN102911279B[P]. 2015.
- [20] 施学辉. 云芝糖肽对放疗中食管癌患者细胞免疫功能的保护作用[J]. 1993 年 02 卷 4 期, 241-243 页, ISTIC PKU CSCD, 2021.

收稿日期: 2022 年 3 月 8 日

出刊日期: 2022 年 5 月 27 日

引用本文: 李岩, 肖亚聪, 李艳艳, 云芝糖肽液体发酵条件及其提取工艺研究[J]. 国际医药研究前沿, 2022, 6(1): 128-130.

DOI: 10.12208/j.imrf.20220034

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS