

固定化猴头菌细胞的研究^{*}

尚 德 静

(辽宁师范大学生命科学学院, 大连, 116029)

摘 要 利用海藻酸钠对深层发酵的猴头菌细胞进行固定化培养,就包埋剂的最佳浓度、发酵条件及固定化猴头菌细胞在深层发酵中应用的可能性进行了探讨。结果表明,最佳海藻酸钠的质量分数为 2%, CaCl_2 质量分数为 2%,固定化猴头菌细胞在发酵培养基内的代谢与游离细胞的代谢基本一致,发酵液中氨基酸含量最高可达 800 mg/L,多糖含量最高可达 1 400 mg/L,固定化细胞可以连续使用 32~48 d,在工业生产中是可行的。

关键词 猴头菌,固定化细胞,海藻酸钙凝胶,深层发酵

猴头菌(*Hericium erinaceus*)是一种珍贵稀有、味道鲜美的食用菌。猴头菌的有效成分猴头多糖、多肽能抑制艾氏腹水癌细胞 DNA 和 RNA 的合成,尤其对胃癌、食道癌及其他消化道恶性肿瘤有特殊的疗效。作者曾采用深层发酵工艺得到猴头菌代谢产物,用以研制成了各类保健制品,其深层发酵工艺已基本确定,但猴头菌生长速度较慢,分批发酵周期长,制备菌种手续繁杂,导致成本过高。如果用固定化技术培养猴头菌细胞,在发酵終了,后处理过程简单,发酵过程容易,更省力、更节能。目前在食用菌发酵上,尚未有利用固定化技术的报道,我们以价格低廉、无毒安全、操作简便的海藻酸钠进行猴头菌的固定化的研究。

1 材料和方法

1.1 菌 株

作者分离保存的猴头菌菌种 H-901。

1.2 基本发酵培养基(质量分数)

蔗糖 3%,黄豆粉 1.5%,蛋白胨 0.1%, KH_2PO_4 0.3%, MgSO_4 0.15%, VB_1 10 mg/L, pH 自然。

1.3 固定化细胞的制备

取猴头菌一级摇瓶种子 10 mL,加入预先制备好的 100 mL 1%~4% 海藻酸钠溶液中,充分搅拌均匀,用自制制粒器将海藻酸钠-菌球液滴入无菌的 2% CaCl_2 水溶液中,使之形成乳白色、粒径 4~5 mm 左右的凝胶粒子,过夜放置 24 h,以使其充分凝胶化,后用无菌生理盐水清洗凝胶球 3 遍,备用。

1.4 发酵试验

将制备好的固定化猴头菌细胞接入 100 mL 基本发酵培养基内,于 26~28℃ 下振荡培养 160~180 r/min,24 h 取样 1 次,测定发酵液氨基酸、多糖及还原糖含量,同时将 10 mL 游离细胞接入 100 mL 基本发酵培养基内,同样条件下培养及测定。

1.5 分析方法

氨基酸测定:茚三酮法^[2];多糖测定:苯酚硫酸法^[3]。

2 结果和讨论

2.1 海藻酸钠最佳浓度的确定

首先将 CaCl_2 溶液的质量分数固定在 2%,改变海藻酸钠溶液的质量分数。

用 2%、3%、4% 的海藻酸钠凝胶固定化猴头菌细胞后,发酵产氨基酸和多糖情况见表 1 和表 2。

作者:博士,副研究员。

^{*} 辽宁省教育厅基金资助项目(No. 9112003)

收稿时间 2001-06-19,改回时间 2001-09-13

表1 海藻酸钠质量分数对固定化细胞发酵液中氨基酸含量的影响

| 时间 /h | 氨基酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | | | | | |
|----------|--------------------------------------|-----|-----|------------|-------|-------|------------|-----|-----|
| | 第1批 | | | 第2批 | | | 第3批 | | |
| | 海藻酸钠质量分数/% | | | 海藻酸钠质量分数/% | | | 海藻酸钠质量分数/% | | |
| | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 530 | 610 | 600 | 700 | 875 | 825 | 625 | 600 | 600 |
| 24 | 550 | 500 | 500 | 775 | 535 | 534 | 700 | 628 | 613 |
| 44 | 400 | 380 | 375 | 550 | 500 | 525 | 740 | 680 | 670 |
| 68 | 400 | 400 | 350 | 725 | 250 | 200 | 725 | 400 | 380 |
| 92 | 400 | 375 | 350 | 215 | 215 | 215 | 600 | 612 | 320 |
| 116 | 325 | 330 | 330 | 215 | 207.5 | 207.5 | 318 | 280 | 280 |
| 140 | 330 | 270 | 275 | 200 | 207.5 | 207.5 | 275 | 260 | 248 |
| 164 | 275 | 250 | 230 | 216.5 | 207.5 | 204 | 275 | 206 | 206 |
| 188 | 275 | 250 | 230 | 200 | 200 | 200 | 275 | 206 | 200 |

表2 海藻酸钠浓度对固定化细胞发酵液中多糖含量的影响

| 时间 /h | 氨基酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | | | | | |
|----------|--------------------------------------|------|------|------------|------|------|------------|-----|-----|
| | 第1批 | | | 第2批 | | | 第3批 | | |
| | 海藻酸钠质量分数/% | | | 海藻酸钠质量分数/% | | | 海藻酸钠质量分数/% | | |
| | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 645 | 700 | 650 | 475 | 450 | 475 | 500 | 485 | 485 |
| 24 | 1400 | 900 | 880 | 850 | 810 | 750 | 700 | 700 | 500 |
| 44 | 1400 | 1250 | 1125 | 1175 | 1160 | 1160 | 948 | 742 | 780 |
| 68 | 675 | 625 | 425 | 425 | 375 | 450 | 800 | 645 | 600 |
| 92 | 975 | 900 | 700 | 675 | 375 | 340 | 728 | 515 | 302 |
| 116 | 660 | 525 | 450 | 410 | 250 | 150 | 540 | 320 | 302 |
| 140 | 475 | 500 | 325 | 325 | 300 | 300 | 432 | 325 | 300 |
| 164 | 375 | 225 | 300 | 200 | 165 | 185 | 330 | 168 | 214 |
| 188 | 350 | 280 | 200 | 200 | 150 | 160 | 300 | 150 | 204 |

从表1和表2可看出,每批发酵氨基酸含量都以质量分数为2%的海藻酸钠包埋的猴头菌细胞最高,3%和4%时表现氨基酸含量较低;多糖含量也是以2%的海藻酸钠包埋的猴头菌细胞最高,3%和4%差一些。2项指标的结果是一致的,即2%的海藻酸钠质量分数为最合适的包埋质量分数,且凝胶球颗粒直径均为4~5 mm,结构完整,强度适合,连续使用6次未发现破裂。

2.2 固定化细胞与游离细胞发酵的比较

将固定化细胞与游离细胞分别培养在相同的培养基里,培养条件相同,它们的代谢情况见图1和图2。

从图1可以看出,固定化细胞与游离细胞发酵氨基酸的代谢趋势基本一致,固定化细胞在发酵过程中,氨基酸含量变化不明显,而且含量明显低于游离细胞,这说明包埋在海藻酸钙凝胶中的猴头菌细胞对固定化载体

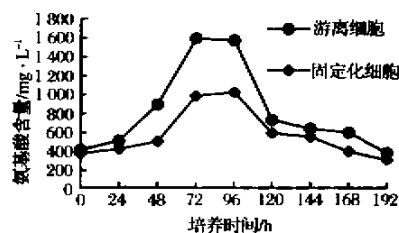


图1 固定化细胞与游离细胞发酵液中氨基酸含量的比较

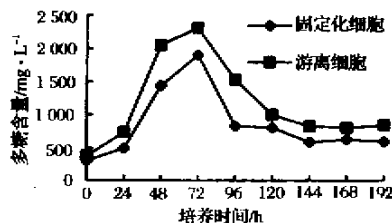


图2 固定化细胞与游离细胞发酵液中多糖含量的比较

这一微环境适应性较差。这是因为猴头菌是好氧性真菌,而固定化细胞比游离细胞多一层膜的障碍,阻碍了对氧的吸收,也阻碍了细胞对营养成分的吸取。另一方面,当猴头菌细胞被固定在凝胶球里以后,产生的蛋白酶只有少量分泌到球外,分解培养基里的蛋白质,或因代谢不旺盛,产生的蛋白酶少,因此氨基酸含量较低,而游离细胞的氨基酸含量在第 3 d 达到最高峰后一直呈下降趋势,在第 5 d 后几乎没有变化。从图 2 可以看出,固定化猴头菌细胞与游离细胞在多糖代谢上步调一致,发酵液多糖在第 3 d 都达到最高峰,而且都明显高于发酵前的多糖含量,说明固定化猴头菌细胞的多糖合成酶比较活跃,受到载体的影响较小,但固定化细胞的多糖含量比游离细胞的多糖含量稍微低一些。

2.3 温度、pH 值对固定化细胞发酵的影响

2.3.1 温度的影响

在 25~45℃ 范围内,每隔 5℃ 为 1 组,比较不同温度下的发酵情况。当温度为 28℃ 时,发酵液中氨基酸及多糖含量最高,温度低于 24℃ 或高于 32℃ 时,有效成分的量都很低,其变化趋势与游离细胞相同。

2.3.2 pH 值的影响

在 pH 6.0~8.0 范围内,每隔 pH 0.5 为 1 组,比较发酵的区别。固定化猴头菌细胞发酵的最佳 pH 值为 6.0~6.5,游离细胞的发酵最佳 pH 值也是 6.0~6.5。

2.4 固定化猴头菌细胞批次发酵的稳定性

每隔 8 d 将固定化猴头菌细胞从发酵培

养基中取出,用 3% CaCl_2 溶液洗涤数次,加强凝胶的强度,然后再将强化的凝胶球加进新的发酵培养基重新培养,进行批次发酵,共进行 6 批,48 d,结果见图 3。

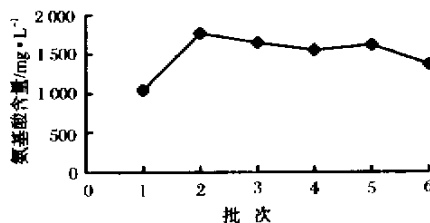


图 3 固定化猴头菌细胞的稳定性

从图 3 中可以看出,在 6 批发酵中,固定化猴头菌细胞的氨基酸含量几乎不变,说明该固定化的猴头菌细胞的活性是稳定的,且重复使用率较高。

总之,用固定化猴头菌细胞进行深层发酵得到猴头菌的有益代谢产物是可行的,可以弥补简单发酵过程中重复制备菌种的繁杂。这将为今后发酵工业实行连续化生产,自动化控制提供很大的方便。

参 考 文 献

- 1 曲立民,严复. 微生物学杂志,1985,5(1):43~47
- 2 袁军,陈家任,薛堂荣等. 生物工程学报,1993,9(1):142~146
- 3 Isao Karube. 微生物学杂志,1988,8(1):55~57
- 4 蔡武成,袁厚积主编. 生物物质常用化学分析方法. 北京:科学出版社,1982. 52~56
- 5 张惟杰主编. 复合多糖的生化研究技术. 北京:科学出版社,1978. 68~72

Study on Immobilization of *Hericium erience* Cell

Shang Dejing

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian, 116029)

ABSTRACT The fermentation process of *Hericium erience* immobilized on alginate has been reported in this paper. The optimum concentration of alginate and the optimum fermentative conditions were also studied. The results showed that the optimum concentration of alginate was 2% and CaCl_2 was 2%, the metabolic level of immobilized cell and free cell appear to be similar, the maximum amino acid content in fermented broth was 800 mg/L, polysaccharide content was 1400 mg/L. Immobilized cell can be continuously used for 32 to 48 days.

Key words *Hericium erience*, immobilized cell, calcium alginate gel, submerged fermentation