

灵芝-淫羊藿菌质总多糖量动态变化的初步研究

石凤敏¹, 佟曦然¹, 丁自勉^{1*}, 陈士林^{1,2*}, 郭宝林¹, 雷炳军³

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

3. 金寨震鸣生物科技有限公司, 安徽 金寨 237300

摘要: 目的 探讨灵芝-淫羊藿菌质发酵的工艺及总多糖的动态变化。方法 选取4个灵芝菌株, 以淫羊藿为培养基质进行固体发酵, 并利用苯酚-硫酸法测定灵芝-淫羊藿菌质的总多糖量。结果 灵芝-淫羊藿菌质总多糖量明显高于对照培养的灵芝多糖量 ($P < 0.05$); 对灵芝和淫羊藿发酵组合的多糖量进行动态变化研究, 发现灵芝菌株 A-淫羊藿菌质的发酵终点确定为21 d, 灵芝菌株 B、C 和 D 的发酵终点确定为28 d。结论 与对照培养灵芝及未发酵的淫羊藿相比, 灵芝对淫羊藿发酵可提高总多糖量3~13倍, 效果良好。

关键词: 灵芝; 淫羊藿; 多糖; 固体发酵; 苯酚-硫酸法

中图分类号: R282.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1486-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.024

Preliminary study on dynamic change of polysaccharide contents of *Ganoderma-Epimedy* fungal substance

SHI Feng-min¹, TONG Xi-ran¹, DING Zi-mian¹, CHEN Shi-lin^{1,2}, GUO Bao-lin¹, LEI Bing-jun³

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Jinzhai Zhen-ming Biological Technology Co., Ltd., Jinzhai 237300, China

Abstract: Objective To investigate the solid fermentation technology for *Ganoderma lucidum* with *Epimedium koreanum* containing medium and its practicability. **Methods** Four *G. lucidum* strains were solid fermented in *E. koreanum* containing medium. The polysaccharide contents of fermented products were tested using phenol-sulphuric acid method. **Results** The polysaccharide content of *Ganoderma-Epimedy* fungal substance was higher than that of *G. lucidum* in the control medium; By observing the dynamic changes of the polysaccharide contents in the fermented products from the drug-containing medium at different time, it was found that the end point of *Ganoderma A-Epimedy* was on the day 21 and the fermented terminal point of *Ganoderma B, C, and D* with *Epimedy* was on the day 28. **Conclusion** Compared with *G. lucidum* in the control medium, the polysaccharide contents of the fermentative combination of *Ganoderma-Epimedy* could be significantly improved by 3—13 times.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst; *Epimedium koreanum* Nakai; polysaccharide; solid fermentation; phenol-sulphuric acid method

多糖 (polysaccharide) 是普遍存在于生物有机体内的含有醛基或酮基的多羟基聚合物及其衍生物, 是存在于生物体内的除蛋白质和核酸之外的又一类重要的大分子物质^[1]。以往大量的研究证实中药多糖如灵芝多糖、黄芪多糖、当归多糖、枸杞多糖、猪苓多糖等, 具有调节免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老以及其他药理作用^[2], 而且多糖几乎无药物毒副作用, 生物医学及临床安全性高, 因此研究中

药多糖具有重要意义。

灵芝是药食两用真菌, 其滋补强壮、扶正固本、延年益寿等功效受到国内外学者的重视。淫羊藿是小檗科淫羊藿属多年生草本植物, 为我国传统补益中药。《本草纲目》记载: 茎、叶入药, 辛温无毒, 主阴痿绝伤、径中痛、益气力、强志^[3]。多糖作为灵芝及淫羊藿的主要有效成分之一, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、调血脂等药理作用^[4-6]。

收稿日期: 2012-11-26

作者简介: 石凤敏 (1983—), 女, 河北省承德人, 博士后, 研究方向为药学。E-mail: fmshi@implad.ac.cn

*通信作者 丁自勉 Tel: (010)57833260 E-mail: zmding@implad.ac.cn

陈士林 E-mail: slchen@implad.ac.cn

本实验以灵芝为发酵菌株,以淫羊藿为药性基质进行发酵培养,并对灵芝-淫羊藿菌质多糖量动态变化进行初步分析,旨在突破传统的中药组方形式和中药炮制形式,通过药用真菌对药用植物的分解代谢获取新型药材资源,实现新型“代谢组方”,为双向固体发酵理论与实践提供新依据。

1 仪器与材料

手提式压力蒸汽灭菌器 YX—280D⁺型(合肥华泰医疗设备有限公司);超净工作台(苏净集团安泰公司);AB265—S 电子分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司);YP6001 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);101—3AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);全新气流式超微粉碎机(欣镇企业有限公司);P70D20P—TF(WO)微波炉(广东格兰仕集团有限公司);RE—52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);TU—1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。无水乙醇、苯酚、硫酸、葡萄糖等试剂均为分析纯。

从15个灵芝菌株中选4个多糖量与三萜量较高的赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst. 菌株为试验样品,分别为菌株A(黄山灵芝)、菌株B(金寨本地红芝)、菌株C(美国灵芝)、菌株D(赤芝),以上菌株均由金寨震鸣生物科技有限公司提供。药材于2011年购自辽宁丹东凤城县,经笔者鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai。

2 方法与结果

2.1 培养基的制备

2.1.1 菌种活化培养基 PZSA1 的配制 采用100 g 马铃薯熬汁,10 g 白糖、1 g KH_2PO_4 、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 g 细玉米面、8 g 琼脂、加水至1000 mL,调至中性,即得。

2.1.2 对照培养基的配制 为防止木屑、棉籽壳、秸秆等固体菌材中未知复杂成分的干扰,采用液体薄层静置培养。葡萄糖20 g、蛋白胨4 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 VB_1 10 mg、加水至1000 mL,pH值自然。每瓶20 mL。

2.1.3 菌质发酵培养基(SWE) 采用淫羊藿7 g,加水20 mL,即得。

2.1.4 菌质发酵对照培养基(SLE) 采用淫羊藿干粉7 g,加对照培养基20 mL,即得。

2.2 样品制备

取4℃冷藏的4个灵芝菌种,在PZSA1平板

上28℃活化培养6~7 d。将活化成功的灵芝菌种切成0.5 cm菌片,按无菌操作接入对照培养基,SWE及SLE,每瓶1片,于25~27℃黑暗培养,相对湿度60%。分别于接种后第21、28、35、42、49天收获灵芝菌丝体及灵芝-淫羊藿菌质,50℃烘干,粉碎过备用。

2.3 标准曲线的制备

采用苯酚-硫酸法^[7]测定样品中多糖量。精密称取在105℃干燥至恒定质量的葡萄糖10.58 mg,加水溶解并定容至100 mL,即得质量浓度为105.8 μg/mL的对照品溶液。精密吸取葡萄糖对照品溶液0(空白)、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于具塞试管中,加水至2.0 mL,再加入5%苯酚1.0 mL和浓硫酸5.0 mL,摇匀,置沸水中水浴30 min,取出冰浴10 min后室温放置10 min。在490 nm处测定吸光度(A)值,以葡萄糖质量浓度为横坐标,A值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0074X+0.0233$, $r=0.997$ 。结果表明,葡萄糖对照品溶液质量浓度在5.29~52.9 μg/mL线性关系良好。

2.4 供试品溶液的制备

精确称取“2.2”项中样品1.0 g,3次重复,加水50 mL,微波高火提取2次,每次20 min。合并滤液并定容至100 mL,量取10 mL液体,加乙醇至最终的乙醇为75%,静置过夜,离心,所得沉淀物低温干燥,即得多糖。将所得多糖沉淀加水溶解并稀释至合适的质量浓度作为供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取葡萄糖对照品溶液,按“2.3”项下方法测定A值,重复测定6次,计算得A值的RSD为0.47%。

2.5.2 重复性试验 准确称取供试样品1.0 g,6份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法测定A值,计算得A值的RSD为1.24%。

2.5.3 稳定性试验 吸取完全反应后的样品溶液,490 nm处每隔20 min测1次A值,稳定考察时间2 h。计算得A值的RSD为0.86%。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取已知多糖量的样品1.0 g,6份,分别准确加入葡萄糖对照品适量。按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法测定A值,计算回收率和RSD。结果显示平均回收率为100.34%,RSD为1.44%,表明该方法稳定可靠,可用于灵芝-淫羊藿菌质多糖的提取和定量测定。

2.6 样品测定

样品按“2.4”项方法制备供试品溶液，精密吸取供试样品溶液 2.0 mL，按标准曲线项下操作，于 490 nm 处测定 A 值。数据处理使用 SPSS 11.5 for Windows 统计软件，所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对实验结果进行统计学分析，以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2.7 不同菌株多糖累积特点

观察发现，各处理在接种后 21 d 时刚好充满培养基，以此为菌质多糖测量的起点。以发酵时间为横坐标，多糖量为纵坐标，绘制灵芝菌株的多糖量的动态曲线。测定结果表明，灵芝菌株 A、B、C 和 D 在对照培养基中培养至 21 d 时多糖量最高，从第 28 天开始多糖量出现不同程度的下降 (图 1)。说明在相同基础营养的条件下，不同的灵芝菌株有相似的多糖积累模式，但菌株间仍存在量的差异，此为菌株自身固有特性，在实际应用中应注意菌株的选择。

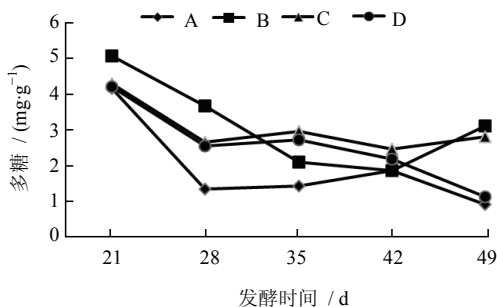


图 1 对照培养基条件下不同菌株灵芝多糖量随发酵时间的变化

Fig. 1 Polysaccharide content changes of different strains of *Ganoderma-epimedii* with fermentation time changing on control medium

2.8 不同灵芝菌株发酵淫羊藿菌质总多糖量变化的特点

在 SWE (图 2) 及 SLE (图 3) 培养条件下，所有检测值都明显高于同比对照培养，说明淫羊藿药材提供了充足的碳源，有利于灵芝菌丝进行多糖的合成与积累；观察发现灵芝菌丝在淫羊藿培养基上生长速度与对照相当，但菌丝色白且浓密粗壮，而对照培养的菌丝呈半透明白色且明显细弱。说明淫羊藿药材的次生代谢物质对灵芝菌丝生长发育起到促进作用。对未经发酵淫羊藿药材的总多糖量进行测定，质量分数为 6.85 mg/g，经过对比发现，所

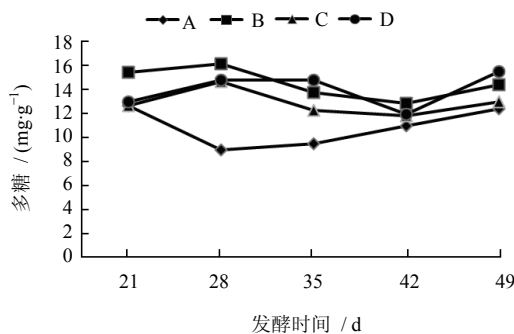


图 2 SWE 培养基条件下不同灵芝菌株发酵菌质多糖量随发酵时间的变化

Fig. 2 Polysaccharide content changes of *Ganoderma-epimedii* fungal substance with fermentation time changing on SWE medium

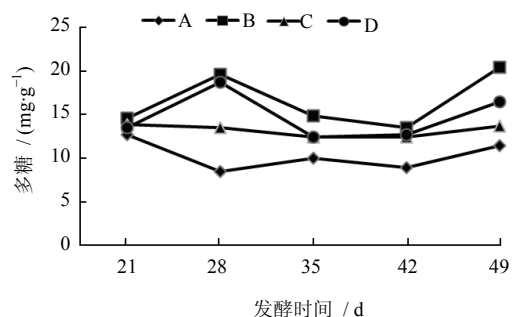


图 3 SLE 培养基条件下不同灵芝菌株发酵菌质多糖量随发酵时间的变化

Fig. 3 Polysaccharide content changes of *Ganoderma-epimedii* fungal substance with fermentation time changing on SLE medium

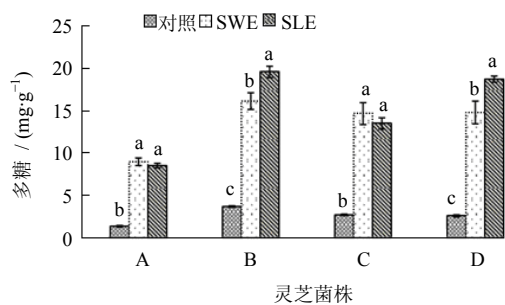
有灵芝-淫羊藿菌质总多糖检测值都明显高于此数值，说明淫羊藿药材被灵芝菌丝分解，释放或转化出更多的多糖，同时也合成了灵芝菌丝体的胞内和胞外多糖。

由图 2 及图 3 可见，菌株 A 的发酵菌质在 21 d 时多糖量最高，随着培养时间的延长呈先降后升的趋势；而菌株 B、C 和 D 的多糖量均表现为先升高再降低然后升高的趋势，且多糖量的峰值基本上出现在培养第 28 天。由此可见，不同菌株菌质多糖量随着发酵时间的变化规律及多糖合成高峰存在一定的差异：在对照培养条件下，所有供试菌株在培养 21 d 时多糖量最高；而在 SWE 及 SLE 培养条件下，菌质多糖量更多在 28 d 时达到总多糖量高峰。说明营养有限、碳源分子简单时，灵芝菌株较快完成吸收与合成；而当供给大量高相对分子质量碳源后则需要更多时间进行分解、再吸收与合成利用，因而

推迟了多糖合成峰值的出现。研究不同发酵时间及不同菌株对菌质总多糖合成量的影响是确定发酵终点的关键因素。

2.9 不同培养基对不同菌株及其发酵菌质多糖量的影响

以发酵28 d的各菌株及其发酵菌质的多糖量为目标参数，观察不同培养基对不同菌株及其发酵菌质多糖量的影响。由图4可见，在发酵28 d时，所有菌株在对照中多糖量最低，与在SWE及SLE中的菌质多糖量明显增高，差异显著 ($P < 0.05$)，细微差别表现为在菌株A和C中多糖量 $SWE > SLE >$ 对照；而在菌株B和D中多糖量 $SLE > SWE >$ 对照。说明淫羊藿药材经过灵芝菌丝代谢后可以显著提高复合总多糖的量，而由对照与SWE加合而成的SLE并未显示出更为突出的培养效率。就简化工艺、降低成本、消除对照成分残留物或代谢物对灵芝-淫羊藿菌质成分的影响而言，以SWE为优。



同一灵芝菌株，不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著
Different small letters in same *G. lucidum* strain indicate significant difference at 0.05 level

图4 不同培养基条件下灵芝菌株及其发酵菌质多糖量

Fig. 4 Polysaccharide content of *G. lucidum* strain and its *Ganoderma-Epimedii* fungal substance in different media

3 讨论

传统的固体发酵中，基质的作用是为真菌生长提供所需营养，以获得真菌本身为目的，发酵过程中基质及其变化不是收获的目标。以药用真菌发酵药性基质产生的双向固体发酵产物构成了新型中药资源^[8]，由此衍生出一系列技术问题。本研究针对发酵工程技术应用于药性菌质生产中的部分关键环节进行研究，得到以下结果：第一，必须确定所选药性基质与所选药用真菌是否适合完成双向固体发酵过程，这点在本实验中得到了肯定的结论。第二，

须对双向发酵过程及其结果的各方面进行测试分析及质量评价。本研究选取菌质多糖量为考察对象进行初步研究发现，淫羊藿药材对灵芝菌株生长有促进作用，经灵芝代谢后的灵芝-淫羊藿菌质总多糖量明显高于对照培养的灵芝多糖的量，因而确定灵芝-淫羊藿菌质为双赢优化组合。但是有关灵芝-淫羊藿菌质多糖组成特点及药理活性的研究有待深入。第三，与常规发酵工程一样，菌株的选用、培养终点的确定仍然是培养成功的关键因素。第四，为避免对双向发酵菌质特性评价与研究下游环节造成干扰，本研究专门设计了SLE培养基（对照+淫羊藿），得到添加基础碳源和氮源作用不明显的结论。这为以后集中评价灵芝与淫羊藿之间化学物质的相互作用与融合，突出研究灵芝-淫羊藿菌质药理活性排除了第3方因素。

由于灵芝在生长过程中对淫羊藿药性基质进行分解的同时还可能产生新的化学成分，因此必然在灵芝与淫羊藿两味药材原有的药用功效基础上产生新的变化。本课题组将对灵芝-淫羊藿菌质进行更深入的研究，旨在为中药、保健品、功能食品、饲料或兽药^[9]的设计与开发提供物质基础和创新点。

参考文献

- [1] 陶遵威, 郑 夺, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 148-152.
- [2] 刘 佳, 王 勇. 灵芝多糖的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 629-634.
- [3] 杜明凤, 李明军, 陈庆富. 淫羊藿属植物 PCR-RFLP 遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 562-567.
- [4] 李晓冰, 赵宏艳, 郭 栋. 灵芝多糖药理学研究进展 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 332-335.
- [5] 石凤敏, 佟曦然, 丁自勉. 灵芝多糖制备及药理研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5860-5864.
- [6] 付 亮, 袁璟亚, 周永红, 等. 淫羊藿多糖的研究进展及开发前景 [J]. 食品科学, 2012, 33(3): 261-266.
- [7] 李晓晖, 李书平, 何云庆, 等. 灵芝多糖含量测定研究 [J]. 中草药, 1997, 28(9): 530-531.
- [8] 庄 毅. 应用药用真菌新型固体发酵工程技术研制中药一类新药的建议 [J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(4): 41-42.
- [9] 李 阳, 周业飞, 虞蔚岩, 等. 药用真菌发酵产物调控肉鸡内分泌及免疫力的研究 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26(4): 16-38.