

内生真菌固体发酵提高穿山龙中薯蓣皂苷元的研究

都晓伟¹, 牟晋超¹, 孟凡佳², 刘艳¹, 李滨², 于丹¹, 吴军凯¹, 张瑜¹

1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 教学实验中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 分离提取穿山龙薯蓣内生真菌, 筛选能够发酵提高穿山龙药材中薯蓣皂苷元的菌种。**方法** 采用 PDA 培养基分离纯化穿山龙薯蓣内生真菌, 将内生真菌与 121 °C 湿热灭菌后的穿山龙药材粗粉在 28 °C 条件下固体发酵培养 15 d, 以 HPLC 法测定发酵物中薯蓣皂苷元, 并与穿山龙原药材、灭菌空白药材以及未经灭菌药材的发酵物进行比较。**结果** 分离筛选的穿山龙薯蓣内生真菌 C39 能够稳定提高灭菌后穿山龙药材中薯蓣皂苷元的水平, 提高幅度达原药材的 70%~75%。**结论** 采用固体发酵的方法可以使穿山龙薯蓣内生真菌 C39 稳定提高穿山龙药材中薯蓣皂苷元。

关键词: 穿山龙; 内生菌; 发酵; 薯蓣皂苷元

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)02-0179-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.018

Increase of diosgenin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* with solid state fermentation of endophytic fungi

DU Xiao-wei¹, MOU Jin-chao¹, MENG Fan-jia², LIU Yan¹, LI Bin², YU Dan¹, WU Jun-kai¹, ZHANG Yu¹

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The Centre of Teaching Laboratory, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To isolate and screen the endophytes from *Dioscorea nipponica* for increasing the diosgenin content in the dried rhizome by fermentation. **Methods** The endophytes were isolated and purified from *D. nipponica* in PDA culture medium. The raw powder of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* was sterilized by moist and heat condition at 121 °C, then fermented with the endophytes at 28 °C for 15 d. The diosgenin contents in the fermentation products were analyzed by HPLC and further compared with those of dried raw rhizome, sterilized dried rhizome, and the unsterilized fermented rhizome. **Results** The endophyte C39 isolated from *D. nipponica* increased the diosgenin content in sterilized dried *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* steadily in 70%—75% compared with the raw rhizome. **Conclusion** Endophyte C39 could increase the diosgenin content in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* by solide fermentation.

Key words: *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; endophyte; fermentation; diosgenin

薯蓣皂苷属于甾体皂苷, 水解后可以得到薯蓣皂苷元, 不仅具有显著的抗炎、调血脂、免疫调节、抗肿瘤、抗艾滋病等作用^[1], 而且是目前世界上合成 300 多种甾体激素和避孕药物的重要原料。我国主要以穿山龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino、盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* C. H. Wright 和黄山药 *D. panthaica* Prain et Burkill 的根茎作为提取薯蓣皂苷

的主要原料^[2]。随着制药工业的发展和国内、国际市场对薯蓣皂苷元需求量的增加, 寻找和建立获得高产量薯蓣皂苷元的新方法, 提高有限资源的利用率是保证其临床用药以及医药工业产品供应的必要途径。本研究从穿山龙薯蓣中分离提取内生菌, 经过筛选获得能够发酵提高穿山龙中薯蓣皂苷元的功能菌种, 为其生产应用提供实验基础。

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274009); 教育部博士点专项基金资助项目 (博导类 20112327110003); 黑龙江中医药大学教育部重点实验室开放基金资助项目 (S201101)

作者简介: 都晓伟 (1962—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 博士, 博士研究生导师, 主要从事药用植物生物学与药材质量研究。

Tel: (0451) 87267031 E-mail: duxiaowei@hljuem.net

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2696 PDA 检测器; 100 级洁净工作台、SPX—150C 型恒温恒湿箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); HZQ—F160 型全温振荡培养箱(哈尔滨东联科技有限公司)。

野生穿龙薯蓣植物分别采自黑龙江省帽儿山、清河、南岔以及吉林省长白山地区, 穿山龙药材购于哈药集团世一堂饮片厂, 经笔者鉴定为穿龙薯蓣 *D. nipponica* Makino 及其干燥根茎, 粉碎成 20 目粗粉。

薯蓣皂苷元对照品, 批号 1539-200001, 中国药品生物制品检定所提供; 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 试剂公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 内生真菌的分离纯化

采用组织块分离法。在无菌条件下, 将消毒过的穿龙薯蓣植物组织切去四周边缘, 接种于 PDA 培养基平板上, 同时分别将空白培养基、冲洗用无菌水和未切割组织块在相同条件下培养, 作为对照。于 28 °C 恒温培养箱中暗培养 3~7 d。待样品边缘长出新菌丝, 及时转入新配制的 PDA 固体培养基上培养。待菌落出现后, 根据菌落的形态、大小、颜色的不同, 分别挑取各菌落边缘的菌丝, 接于新的平板上继续观察培养。采用三点法逐步纯化, 并结合形态观察及对峙实验, 分离得到内生真菌 C39。

2.2 内生真菌 C39 种子液的制备

将分离纯化得到的内生真菌 C39 进行 PDA 平板培养, 用直径 6 mm 的打孔器, 在长势良好的菌落边缘处打孔, 取菌饼接种于装有 100 mL PD 培养液的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C 静止适应环境 12 h 后, 置于恒温振荡培养箱中, 130 r/min, 28 °C 培养 2 d。

2.3 固体发酵培养

称取穿山龙药材粗粉 10 g, 置 500 mL 锥形瓶中, 用 20 mL 蒸馏水润湿 12 h, 封瓶膜封口, 121 °C 湿热灭菌 30 min, 待冷却后于无菌条件下接种内生真菌 C39 种子液 2 mL, 置于恒温恒湿培养箱 28 °C 静止培养 15 d, 作为灭菌固体发酵样品。以未接任何菌种的药材粗粉同样操作, 作为药材灭菌空白。以不经过 121 °C 湿热灭菌, 采用上述固体发酵方法处理穿山龙药材粗粉, 作为未灭菌发酵样品。

2.4 薯蓣皂苷元的 HPLC 法测定

2.4.1 色谱条件

采用迪马公司的 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), C₁₈ 保护柱; 流动相为 96% 甲醇-4% 水, 等度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 206 nm。

2.4.2 线性关系考察 精密称取薯蓣皂苷元对照品适量, 加色谱纯甲醇制成 0.639 mg/mL 对照品溶液。按选定的色谱条件, 分别进样 5、10、15、20、25、30、35 μL, 测定薯蓣皂苷元的峰面积。以色谱峰面积对质量制备标准曲线, 得线性回归方程 $Y=371\,246X+349\,868$ ($r=0.999\,6$), 结果表明薯蓣皂苷元在 2.13~19.17 μg 线性良好。

2.4.3 供试品溶液的制备 将固体发酵物转移至平皿中, 50 °C 烘干 48 h, 粉碎。取 1/10 量的 10 g 药材固体发酵物, 用 10 mL 正丁醇超声提取 2 次, 每次 50 min, 合并提取液。减压回收提取液至干, 残渣加入 2.5 mol/L 盐酸 10 mL, 沸水浴回流水解 3 h, 酸水放冷后以适量氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层, 用蒸馏水洗至中性, 适量活性炭脱色。抽滤, 回收氯仿至干, 残渣加甲醇定容至 25 mL。得固体发酵物样品溶液, 备用。以同样方法处理空白对照样品, 得药材灭菌对照溶液, 备用。

2.4.4 精密度试验 精密吸取 0.639 mg/mL 薯蓣皂苷元对照品溶液, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.37%。

2.4.5 稳定性试验 取 1/10 量的 10 g 药材固体发酵物样品, 制备供试品溶液, 分别在 0、6、12、18、24 h 进样测定, 计算得薯蓣皂苷元的峰面积 RSD 值为 0.14%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 重现性试验 取 1/10 量的 10 g 药材固体发酵物样品 5 份, 制备供试品溶液, 进样, 测定薯蓣皂苷元的质量分数, 经计算得其 RSD 值为 0.47%。

2.4.7 加样回收率试验 取已知含量的穿山龙药材固体发酵物样品 5 份, (每份样品均为 1/25 量的 10 g 药材固体发酵物, 含薯蓣皂苷元 7.536 mg), 精密称定, 分别加入薯蓣皂苷元对照品 7.668 mg, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果薯蓣皂苷元平均加样回收率为 98.93%, RSD 值为 0.61%。

2.5 发酵物中薯蓣皂苷元的定性鉴别

采用上述 HPLC 色谱分析条件对穿山龙固体发酵物样品溶液中的薯蓣皂苷元成分进行测定, C39 菌与药材固体发酵产物、空白对照药材以及薯蓣皂苷元对照品的 HPLC 色谱图见图 1。可以看出, 穿山龙药材经过 C39 菌固体发酵后所提高的物质的色谱峰与薯蓣皂苷元对照品的相应峰重合, 保留时间

相同。C39 菌与穿山龙固体发酵物中薯蓣皂苷元峰的紫外吸收光谱和薯蓣皂苷元对照品的紫外吸收光谱见图 2。可以看出，两者完全相同。因此根据两者 HPLC 图谱的色谱保留时间和紫外吸收光谱图的吻合可以确定 C39 菌对穿山龙药材固体发酵后所提高的物质为薯蓣皂苷元。

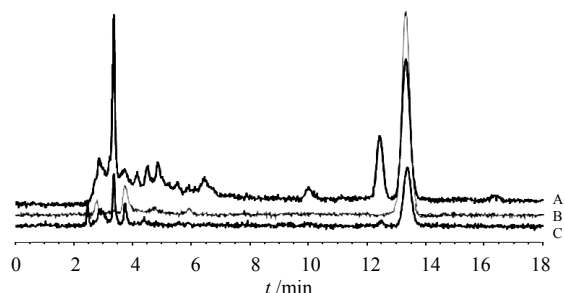


图 1 C39 菌与药材固体发酵物(A)、薯蓣皂苷元对照品(B)和穿山龙药材 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* solid fermentation product with endophyte C39 (A), diosgenin reference substance (B), and DNR (C)

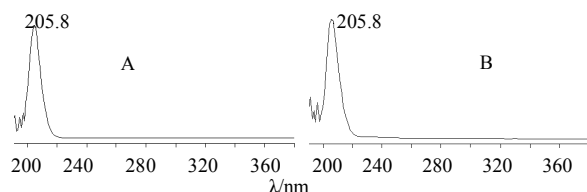


图 2 薯蓣皂苷元对照品 (A) 和 C39 菌与穿山龙固体发酵物中薯蓣皂苷元对应峰 (B) 的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV spectra of diosgenin reference substance (A) and corresponding peak in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* fermentation product with endophyte C39 (B)

2.6 发酵物中薯蓣皂苷元的提高幅度

将穿山龙药材分别与 C39 菌进行固体发酵，测定发酵物中薯蓣皂苷元，结果见表 1。可以看出，经高温灭菌后的穿山龙药材中薯蓣皂苷元的质量分数较原药材有所降低，而与 C39 菌固体发酵后，能够稳定地提高薯蓣皂苷元的质量分数，提高幅度为原药材的 70%~75%。对未经高温灭菌的药材，虽然有部分样品与 C39 菌固体发酵后薯蓣皂苷元质量分数可提高近 70%，但是由于存在大量杂菌，难以保证实验的重复性。因此，建议选择经过高温灭菌的穿山龙药材作为基质，与 C39 菌固体发酵以提高原药材中薯蓣皂苷元。

表 1 穿山龙药材经 C39 菌固体发酵处理样品中薯蓣皂苷元测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of diosgenin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* solid fermentation products with different endophyte C39 treatments (n=3)

处 理	薯蓣皂苷元	
	质量分数/(mg·g ⁻¹)	提高幅度/%
原药材	10.875	—
灭菌药材	7.365	—
灭菌发酵	18.718	72.137
未灭菌发酵	16.013	47.490

3 讨论

内生菌是一类在其部分或全部生活史中存活于健康植物组织内部、不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物^[3]。至今人们已先后从数百种药用植物中分离得到了多种内生菌，并利用内生菌自身产生或促进药用植物或药材产生了某些重要的天然活性成分^[4]，如从短叶红豆杉 *Taxus brevifoliana* Nutt. 中分离得到一株能合成抗癌物质紫杉醇的内生真菌^[5]；将长花龙血树 *Dracaena angustifolia* Roxb. 中分离得到的内生真菌接种于无生物活性的剑叶龙血树材质，可促成血脂的形成和积累^[6]。本研究利用穿山龙薯蓣内生菌固体发酵提高穿山龙药材中薯蓣皂苷元的水平，可较大地提升薯蓣类原料药材的利用率，对医药工业生产和自然资源的持续利用和保护均具有实际意义。

参考文献

- [1] 王晓鹏, 陆 羨. 薯蓣皂苷生物活性研究新进展 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2004, 26(3): 138-141.
- [2] 康阿龙, 孙文基, 汤迎爽, 等. 盾叶薯蓣资源、成分及组培学研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 附 17-附 19.
- [3] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43(10): 895-914.
- [4] 陈雪英, 都晓伟, 李 滨. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2008, 23(2): 47-51.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [6] 江东福, 马 萍, 王兴红, 等. 龙血树真菌群及其对血竭形成的影响 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(1): 79.