

灵芝菌丝体和发酵液有效成分及含量分析

南京大学生物系(210008) 李兆兰* 郑 涛

摘要 研究了南京紫金山·灵芝*Ganoderma lucidum*菌丝体及发酵液的有效成分及其含量。结果表明,菌丝体中碱提多糖为2%,水提多糖为0.64%,发酵液多糖为0.1%。菌丝体含17种氨基酸,总量为14.7%,发酵液含29种氨基酸,总量0.93%。菌丝体含23种微量元素,发酵液含17种微量元素。

关键词 灵芝 灵芝多糖 发酵 含量测定

近年来认为灵芝所含多糖可能是其重要有效成分。灵芝多糖能增强小鼠腹腔巨细胞的吞噬功能,促进蛋白质和核酸的形成。国外亦报道了灵芝多糖是其抗小鼠S-180肉瘤的有效成分。随着中药药理活性物质的深入探讨,其中微量元素日益受到人们的重视^[1~4],微量元素与多种疾病的发生与发展有关系,故作者对灵芝中微量元素进行了测定。

灵芝菌丝体与发酵液的充分利用,为灵芝开辟了一条新的药用途径。我们对南京紫金山的灵芝进行了组织分离,获纯菌株926,经鉴定,证实分离成功。

1 材料和方法

1.1 菌种:灵芝(赤芝)*Ganoderma lucidum* 926菌株,从南京紫金山栎树林中采集,子实体经组织分离、纯化,获纯菌株926。

1.2 培养基:母种斜面培养基-PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)。

固体培养基(长于实体):甘蔗渣75%,麸皮21%,蔗糖1%,过磷酸钙1.2%,黄豆粉1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, VB_1 0.2%。

液体培养基:豆饼粉2%,蔗糖4%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.015%, CaCO_3 1%。

1.3 多糖提取与测定:

1.3.1 多糖提取:①碱提法:灵芝菌丝体加入1mol/L NaOH,在60℃水浴中浸提3~4h,过滤,滤液加入等体积95%乙醇沉淀,过滤,醇洗沉淀物3次,Sevag法脱蛋白,流水透析,得菌丝体多糖。

②水提法:灵芝菌丝体加入适量水,沸水浴中提取3~4h,过滤,滤液加入2倍体积95%乙醇沉淀,离心,弃去上清液,醇洗,脱蛋白,透析,得菌丝体水溶性多糖。发酵液用乙醇直接沉淀,离心过滤,醇洗,脱蛋白,透析,得发酵液多糖。

1.3.2 多糖含量测定——蒽酮法或苯酚-硫酸法:精密配制梯度的葡萄糖标准溶液,用蒽酮法在620nm处测OD值,用苯酚-硫酸法在490nm处测OD值,绘制标准曲线。

样品多糖含量测定:碱提与水提菌丝体多糖、发酵液多糖各取50mg,定容100ml,蒽酮法或苯酚-硫酸法测定,记录OD值,重复2次,所测OD值从标准曲线上查得相应的多糖浓度。

多糖的红外光谱测定:多糖样品用KBr压片,在NICOET-170SXFT型红外光谱仪上于中红外区(4000~400 cm^{-1})测定吸收光谱。

1.4 氨基酸测定:Waters-Tag氨基酸自动分析仪,484紫外检测器,波长254nm,流动相

*Address: Li Zhaolan, Department of Biology, Nanjing University, Nanjing

A液B液缓冲液进行梯度洗脱。

1.5 微量元素测定：美国J-A1100 63道真空型电感偶合等离子发射光谱仪，配用PDP11—23计算机。

2 结果与讨论

2.1 灵芝多糖：测定结果表明，碱提粗多糖为2%（100g菌丝体中含多糖量），其中的纯多糖占粗多糖9.4%。水提粗多糖为0.64%，纯多糖占16%。碱提得率高于水提，碱提多糖呈黄色，水提多糖呈白色。从工艺上评价，碱提需耗用大量NaOH，还要HCl调pH，增加工艺步序。水提无以上缺点，但酒精的用量比碱提多1倍。

多糖的红外光谱分析（图）显示了多糖特征吸收峰，在3200~3600cm⁻¹出现一种宽峰是O-H的伸缩振动，在1650~1500cm⁻¹有一强吸收峰为N-H的变角振动，在1450cm⁻¹的吸收峰为C-H的变角振动。

2.2 菌丝体与发酵液的氨基酸含量：见表1、2、3。

2.3 微量元素含量：见表4。菌丝体含22种微量元素，其中8种是必需微量元素，以Zn、Fe、Mn的含量较高。有毒元素Cd的含量低于中毒剂量。发酵液含17种微量元素，其中8种是

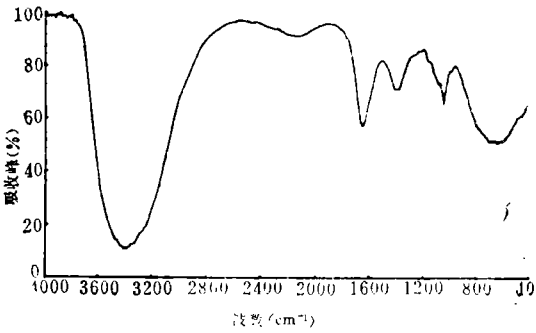


图 灵芝多糖红外光谱图

表1 灵芝菌丝体中氨基酸含量分析（mg/g）

氨基酸	m mol	mg	%	氨基酸	m mol	mg	%
天冬氨酸	0.150	20.0	13.64	酪氨酸	0.027	4.91	3.35
谷氨酸	0.215	31.60	21.55	缬氨酸	0.053	6.26	4.27
丝氨酸	0.066	6.91	4.71	蛋氨酸	0.007	2.58	1.76
甘氨酸	0.100	7.48	6.10	胱氨酸	0.017	0.81	0.66
组氨酸	0.022	3.34	2.28	异亮氨酸	0.041	5.40	3.68
精氨酸	0.108	18.87	12.87	亮氨酸	0.081	10.66	7.27
苏氨酸	0.032	3.77	2.57	苯丙氨酸	0.044	7.21	4.92
丙氨酸	0.071	6.33	4.32	赖氨酸	0.025	3.67	2.51
脯氨酸	0.059	6.82	4.65	色氨酸	/	/	/

表2 灵芝发酵液中氨基酸含量分析（mg/ml）

氨基酸	m mol	mg	%	氨基酸	mmol	mg	%
磷酸丝氨酸	3.06	0.57	3.75	精氨酸	5.09	0.89	6.24
天冬氨酸	0.61	0.08	0.75	脯氨酸	1.01	0.12	1.23
谷氨酸	6.08	0.89	7.39	1-甲基组氨酸	/	/	/
α-氨基脂肪酸	0.12	0.02	0.15	3-甲基组氨酸	0.11	0.02	0.13
羧脯氨酸	2.06	0.27	2.53	α-氨基丁酸	0.73	0.08	0.89
磷酸乙醇胺	0.18	0.03	0.22	酪氨酸	4.37	0.09	5.35
丝氨酸	2.40	0.25	2.95	缬氨酸	1.64	0.19	2.01
天冬酰胺	8.82	1.17	10.81	蛋氨酸	0.12	0.02	0.14
甘氨酸	3.83	0.29	4.70	胱氨酸	0.04	0.01	0.05
β-丙氨酸	/	/	/	半胱氨酸	0.06	0.01	0.07
牛磺酸	/	/	/	异亮氨酸	1.03	0.14	1.27
组氨酸	1.30	0.20	1.60	亮氨酸	0.09	0.01	0.11
γ-氨基丁酸	1.42	0.15	1.75	羟赖氨酸-1	0.41	0.08	0.51
脯氨酸	0.44	0.08	0.54	羟赖氨酸-2	/	/	/
苏氨酸	27.06	3.22	33.17	苯丙氨酸	0.53	0.09	0.65
丙氨酸	3.73	0.33	4.57	色氨酸	0.62	0.13	0.76
β-氨基异丁酸	/	/	/	鸟氨酸	3.36	0.57	4.12
肌肽	/	/	/	赖氨酸	1.30	0.19	1.59

表3 灵芝菌丝体和发酵液各类氨基酸含量比较

测试项目		含量(%)	占氨基酸总量(%)
氨基酸总量	菌丝体 g/100g	14.70	
	发酵液 g/100ml	1.089	
必需氨基酸总量	菌丝体 g/100g	4.00	27.20
	发酵液 g/100ml	0.40	26.73
支链氨基酸总量	菌丝体 g/100g	2.29	15.5
	发酵液 g/100ml	0.035	3.22
芳香族氨基酸总量	菌丝体 g/100g	1.21	8.22
	发酵液 g/100ml	0.088	8.10
精氨酸	菌丝体 g/100g	1.88	12.80
	发酵液 g/100ml	0.089	8.19

必需,以Zn、Mn含量较高。发酵液中不含有毒元素Cd、Pb。

2.4 讨论:灵芝菌丝体中含有高量支链氨基酸和低量芳香族氨基酸,这种氨基酸模式比较理想,1975年Fischer等发现慢性肝功能异常或肝硬化患者,其氨基酸代谢发生异常,主要是血浆支链氨基酸的含量降低和芳香族氨基酸含量升高,因进入脑中的色氨酸和5-羟色胺是受血浆中的支链氨基酸调节的,而肝病患者由于血浆中支链氨基酸的降低,大量的色氨酸和5-羟色胺被脑吸收,二者在脑内的浓度增加,导致肝昏迷。鉴于慢性肝病和肝硬化患者均有血浆氨基酸型式异常,故Fischer等首先提出输注高支链氨基酸,低芳香族氨基酸的葡萄糖混合液,使血浆氨基酸水平正常化,获得改善精神神经症状,缓解病情。针对灵芝菌丝体含有高量支链氨基酸和低量芳香族氨基酸特点,可用以临床治疗慢性肝病和肝硬化患者。使紊乱的血浆氨基酸水平正常化。

灵芝菌丝体的精氨酸相当高为1.88%, (100g干菌丝体的含量), 高于云芝(1.54%)、猴头(1.10%)、香菇(1.25%)、金针菇(1.61%)等真菌菌丝体中精氨酸含量,特别是金针菇的精氨酸含量高,但低于灵芝的精氨酸含量。紫金山灵芝菌丝体氨基酸总量(14.7%)远远高出泰山灵芝子实体氨基酸含量(4.57%)^[5]。

在灵芝的菌丝体和发酵液中,磷的含量相当丰富,磷具有镇静安神作用,灵芝对神经衰弱和顽固失眠的疗效与磷的作用有着密切关系。

参 考 文 献

- 1 湖南医药工业研究所. 中草药通讯, 1979, 10 (5): 1
- 2 侯翠英. 中草药通讯, 1979, 10 (6): 4
- 3 陆文儒, 等. 灵芝. 第二版. 北京: 科学出版社, 1983.122
- 4 丁恒山. 中国药用孢子植物. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 409
- 5 王洪存, 等. 食用菌, 1991, 5: 7
(1993-05-24收稿)

(上接第31页)

参 考 文 献

- 1 柴本甫, 等. 中西医结合杂志, 1987, 7(7): 420
- 2 金惠铭, 等. 中西医结合杂志, 1985, 5(5): 270
- 3 王新德执笔. 中华神经精神科杂志, 1986, 21(1): 6
- 4 Lewis, P J, et al. Lancet, 1981(1): 559
- 5 李承珠, 等. 中西医结合杂志, 1983, 3(5): 297
- 6 Dougherty J H, et al. Lancet, 1981(1): 821
(1992-12-03收稿)

表4 灵芝菌丝体和发酵液的微量元素含量分析

元素	含量(ppm)		元素	含量(ppm)	
	菌丝体	发酵液		菌丝体	发酵液
Al	280.4	174.1	Li	<0.006	/
Ba	18.3	12.9	Mg	0.19%	1.06
Ca	0.84%	0.38%	Mn	67.4	52.2
Be	<0.001	/	Mo	<0.005	1.92
Cd	<0.002	/	Na	8.75%	2.22%
Co	<0.003	0.99	Ni	1.45	/
Cr	8.82	9.95	P	0.26%	1.92%
Cu	25.2	12.9	Pb	7.25	/
Fe	667.9	0.35	Sr	87.7	24.5
K	0.10%	2.88%	Ti	6.11	/
V	0.38	0.57	Se	<0.050	3.85
Zn	63.6	66.6	Ge	<0.010	/

Analysis of Active Constituents in Mycelium and Fermentation Broth of Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

Li Zhaolan and Zheng Tao

Active constituents in mycelium and fermentation broth of *Ganoderma lucidum* were determined. Results showed that the amount of polysaccharides obtained from mycelium by 1mol/L NaOH extraction and hot-water extraction were 2% and 0.64% respectively, while the fermentation broth contains 0.1% polysaccharide. The mycelium contains 17 kinds of amino acids, totalling at 14.7%. The fermentation broth contains 29 kinds of amino acids, totalling at 0.93%. The mycelium and fermentation broth contain 22 and 17 kinds of trace elements respectively, predominately P, Fe, Zn and Ca.

(Original article on page 17)

Effects of Daphnetin on Activities of Protein Kinase A and Protein Kinase C in Vitro

Xu Xueping, Xiao Dianmo, Zhou Wenhua, et al

Daphnetin, isolated from *Daphne koreana* Nakai, has been reported to dilate blood vessels, inhibit thrombosis and have antiinflammatory effect. In this study, type I and type II protein kinase A partially purified from rat skeletal muscle and protein kinase C from rat brain were incubated with varying concentrations of daphnetin. Type II protein kinase A was significantly inhibited by daphnetin at the concentration of 0.0056 μ mol/L, while type I protein kinase A and protein kinase C were inhibited at the concentrations of 5.6 μ mol/L and 56 μ mol/L, respectively. The results indicated that daphnetin might be used as a specific inhibitor of type II protein kinase A.

(Original article on page 23)

Protective Effect of "Compound Antioxidant Herb" on Rat Gastric Injury Caused by Stress

Li Yifan, Shi Jin, Lu Binghuai, et al

Protective effect of Chinese medicinal herbs against gastric stress injury was studied. The compound antioxidant prescription used was composed of ten herbs, each of which had proven antiperoxidation action. Bound-soaked rats were used as victims of stress injury. In the two groups of rats under protection of the "prescription and injection of salvia" the indexes of gastric mucosa injury were 8.50 ± 2.31 and 19.00 ± 4.25 , LPO in serum were 10.74 ± 0.94 and 11.80 ± 1.06 nmol/ml respectively. Both were significantly decreased as compared with the control group (39.00 ± 6.50 , LPO 19.06 ± 1.10 nmol/ml). These results signified that the antioxidant medicinal herbs, especially in compounded form, may prevent gastric stress injury.

(Original article on page 26)