

茯苓摇瓶液体发酵复合药性培养基及其化学成分研究

李 羿¹, 杨 胜¹, 李 晨¹, 杨万清¹, 万德光^{2*}

1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610083

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 筛选茯苓摇瓶液体发酵最适复合药性培养基, 并对复合药性发酵茯苓的化学成分进行研究。**方法** 在不同复合药性培养基中进行茯苓摇瓶液体发酵, 测定其胞外多糖和菌丝体产量。根据复合药性发酵茯苓化学成分的理化性质进行提取分离和定量测定。**结果** 在发酵基础培养基中添加 0.75% 薏苡仁和枸杞子组成最适复合药性培养基, 茯苓菌丝体干质量达 14.29 g/L, 茯苓胞外多糖达 8.22 g/L。药性发酵茯苓中总多糖、总糖、总灰分、氨基酸总量分别为 25.35%、45.73%、4.79%、21.43%。**结论** 不同种类和不同数量的中药材组成的复合药性培养基对茯苓摇瓶液体发酵有较大影响, 为其液体发酵产业化提供理论依据。

关键词: 茯苓; 摇瓶液体发酵; 复合药性培养基; 胞外多糖; 氨基酸

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1519-04

Compound medicinal medium of flask liquid fermentation of *Poria cocos* and its chemical constituents

LI Yi¹, YANG Sheng¹, LI Chen¹, YANG Wan-qing¹, WAN De-guang²

1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: **Objective** To screen the optimum compound medicinal medium for flask liquid fermentation of *Poria cocos* and study the chemical constituents in compound medicinal fermented *P. cocos*. **Methods** *P. cocos* was flask liquid fermented in different compound medicinal media and the exocellular polysaccharide and dry weight of mycelium were detected. The chemical constituents were isolated and detected according to the physicochemical properties. **Results** The optimum medicinal fermentation medium was adding 0.75% *Coicis Semen* and *Lycii Fructus* into fermentation basic medium. In the optimum compound medicinal fermentation medium, the dry weight of *P. cocos* mycelium was 14.29 g/L and the exocellular polysaccharide was 8.22 g/L. The total polysaccharides, total saccharides, total ashes, and total amino acids in compound medicinal fermented *P. cocos* were 25.35%, 45.73%, 4.79%, and 21.43%, respectively. **Conclusion** Different kinds and amounts of traditional Chinese medicinal materials (TCMM) in compound medicinal fermentation medium have various effects on flask liquid fermentations of *P. cocos*. The chemical constituents in compound medicinal fermented *P. cocos* are studied to provide a theoretical basis for its industrialization of liquid fermentation.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; flask liquid fermentation; compound medicinal fermentation medium; exocellular polysaccharide; amino acid

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的菌核, 有利水渗湿、健脾安神的功效。茯苓为常用中药材, 市场需求量巨大。过度采挖野生茯苓导致其资源逐渐枯竭; 人工栽培茯苓需消耗大量的松材, 对生态环境造成严重的破坏。因此, 亟需寻找野

生茯苓和人工栽培茯苓的代用品。液体发酵可实现茯苓的工业化生产, 缩短生产时间, 节省大量的松材, 对我国植物资源和生物多样性保护意义重大。现代发酵工程技术已广泛应用于药用真菌的培养^[1-2], 推动了其工业化生产和资源的科学开发利用。

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 四川省教育厅科研基金项目 (09ZC031); 四川省科技厅项目 (2006J13-150)

作者简介: 李 羿 (1969—), 男, 四川成都人, 副教授, 博士, 从事发酵中药及中药品种、品质的研究。

Tel: (028)68289198 13688305707 E-mail: lychengdu@yahoo.com.cn

*通讯作者 万德光 E-mail: wandeguang@163.com

网络出版时间: 2012-07-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120706.1715.007.html>

药用真菌培养基和培养条件对其发酵水平有重要影响。在营养培养基中添加单味中药材组成的培养基称为药性培养基,药性培养基中的中药活性成分将通过对药用真菌的生长代谢的调控影响其发酵,药性培养基对药用真菌液体发酵影响的研究已成为热点^[3-7]。笔者曾研究了薏苡仁、黄芪等9种单味中药材对茯苓摇瓶液体发酵的影响,结果表明黄芪、金银花和丹参对茯苓菌丝体生长有抑制作用,而薏苡仁、甘草、淡竹叶、桑叶、灵芝和枸杞子则对茯苓的菌丝体生长有促进作用^[8]。在营养培养基中添加2味或2味以上中药材组成的培养基称为复合药性培养基。本实验将2味中药材粉末添加到营养培养基中组成复合药性培养基,研究其对茯苓摇瓶液体发酵的影响。同时,对在复合药性培养基中经摇瓶液体发酵后获得的复合药性发酵茯苓的化学成分进行了研究。

1 仪器与材料

超净工作台(苏净集团安泰公司);全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);Sartorius BP121S型电子天平;Beckman J2—HS型离心机;氨基酸自动分析仪;灰分测定装置;FW 177型粉碎机;纯水仪(Human Power III);GGX—9火焰原子吸收光谱仪(北京地质仪器厂);WOS—20型无油空气压缩机(天津天伟医疗器械有限公司)。

茯苓菌株 P6 冷冻甘油菌由成都医学院药学院生药教研室筛选保存。

酵母浸膏、蛋白胨为 Oxoid 产品;葡萄糖化学对照品(批号 08336-9501,中国药品生物制品检定所);苯酚(重蒸); K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaOH、葡萄糖、盐酸、氯仿、丁醇、乙醇、丙酮、乙醚、硝酸和过氧化氢等试剂均采用国产分析纯;微量元素测定用水为 18.3 M Ω 高纯水。

基础培养基:葡萄糖 20 g,酵母浸膏 4 g,蛋白胨 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,初始 pH 5.5,蒸馏水 1 L。

营养培养基:葡萄糖 20 g,酵母浸膏 3.5 g,蛋白胨 4.5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,初始 pH 5.5,蒸馏水 1 L。

薏苡仁 *Coicis Semen*、桑叶 *Mori Folum*、甘草 *Glycyrrhizae Radix*、灵芝 *Ganoderma*、淡竹叶 *Lophatheri Folum* 和枸杞子 *Lycii Fructus* 均购于成都杏林大药房,经成都中医药大学万德光教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版规定;粉碎过 60 目

筛,60 ℃烘干至恒定质量后装入有塞瓶中,贴上标签,放入干燥器内备用。

2 方法与结果

2.1 菌种液制备

将 50 mL 基础培养基装入 250 mL 三角瓶,按 0.5%比例接种冷冻甘油菌,25 ℃摇瓶振荡培养 2 d 作为摇瓶液体发酵菌种备用。

2.2 摇瓶液体发酵

将制备的薏苡仁等中药材粉末按一定量加入到发酵基础培养基中,1.05 kg/cm²,121.3 ℃灭菌 20 min。冷却至室温,按 6%比例接入菌种液,培养温度 26 ℃,摇瓶装量 60 mL (250 mL 三角瓶),150 r/min 摇瓶振荡培养 7 d。

2.3 检测指标

2.3.1 胞外多糖纯化与称量 胞外多糖纯化与称量参照文献方法^[9]。

2.3.2 菌丝体制备与称量 发酵液 6 000 r/min 离心 15 min 后收集沉积的菌丝球,60 ℃烘干至恒定质量后用电子天平称定质量。

2.3.3 复合药性发酵茯苓水溶性多糖和碱溶性多糖测定 复合药性发酵茯苓粉末水溶性多糖和碱溶性多糖的测定参照文献方法^[10]。

2.3.4 复合药性发酵茯苓总糖测定 用苯酚-硫酸法测定总糖量^[11],以葡萄糖为对照品。

2.3.5 复合药性发酵茯苓灰分测定 复合药性发酵茯苓总灰分的测定按中华人民共和国国家标准 GB/T 8306-2002,其水溶性灰分的测定按中华人民共和国国家标准 GB/T 8307-2002,其酸不溶性灰分的测定按中华人民共和国国家标准 GB/T 8308-2002。

2.3.6 复合药性发酵茯苓氨基酸测定 复合药性发酵茯苓氨基酸的测定按中华人民共和国国家标准 GB/T 5009.124-2003。

2.3.7 复合药性发酵茯苓微量元素测定 复合药性发酵茯苓微量元素的测定参照文献方法^[12]。

2.4 添加单味中药材的药性培养基对茯苓摇瓶液体发酵的影响

按 1%比例将薏苡仁、甘草、淡竹叶、桑叶、灵芝和枸杞子 6 味中药材粉末分别加入营养培养基中组成药性培养基,研究其对茯苓摇瓶液体发酵菌丝体和胞外多糖产量的影响(空白试验为在不添加中药的营养培养基进行摇瓶液体发酵,其他条件均相同),结果见表 1。在茯苓菌丝体产量方面,6 味

表 1 单味中药材的药性培养基对茯苓发酵的影响

Table 1 Effects of medicinal media with single

TCMM on fermentation of *P. cocos*

药性培养基	菌丝体 / (g·L ⁻¹)	胞外多糖 / (g·L ⁻¹)
空白	11.77	5.31
薏苡仁	13.79	8.27
甘草	12.23	7.70
淡竹叶	12.42	7.14
桑叶	12.55	7.28
灵芝	13.27	8.14
枸杞子	13.04	9.59

中药对茯苓的菌丝体生长均有促进作用, 菌丝体产量较空白对照增加了 3.91%~17.16%, 其中以薏苡仁最为显著; 在茯苓胞外多糖产量方面, 6 味中药均有利于胞外多糖产量的提高, 胞外多糖产量较空白对照提高了 34.46%~80.60%, 其中以枸杞子最为显著。

2.5 添加 2 味中药材的复合药性培养基对茯苓摇瓶液体发酵的影响

将制备的薏苡仁、甘草、淡竹叶、桑叶、灵芝和枸杞子 6 味中药材粉末分别按 1:1 的比例添加到营养培养基中组成复合药性培养基 (添加中药材的总量为复合药性培养基的 1%), 研究其对茯苓摇瓶液体发酵菌丝体和胞外多糖产量的影响, 结果见表 2。在 15 种复合药性培养基中, 添加薏苡仁和枸杞子的复合药性培养基为最优复合药性培养基, 其菌丝体干质量达 13.71 g/L, 胞外多糖达 9.21 g/L。

2.6 不同薏苡仁和枸杞子添加量对茯苓摇瓶液体发酵的影响

将制备的薏苡仁和枸杞子粉末按 1:1 的比例添加到营养培养基中组成复合药性培养基, 改变其添加量, 按 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.50% 和 2.00% 比例将薏苡仁和枸杞子粉末分别加入营养培养基中, 研究不同薏苡仁和枸杞子添加量对茯苓摇瓶液体发酵菌丝体和胞外多糖产量的影响。结果见表 3。薏苡仁和枸杞子添加量过高或过低都会影响茯苓生长和胞外多糖分泌。当薏苡仁和枸杞子添加量为 2.00% 时胞外多糖产量最高达 9.81 g/L; 当薏苡仁和枸杞子添加量为 0.75% 时菌丝体产量最高达 14.29 g/L。茯苓摇瓶液体发酵茯苓胞外多糖达最高值和菌丝体产量达最大值的薏苡仁和枸杞子添加量并不相同。综合考虑茯苓菌丝体产量、胞外多糖产量及液体发酵成本, 笔者认为薏苡仁和枸杞子添加

表 2 复合药性培养基对茯苓发酵的影响

Table 2 Effects of compound medicinal media

on fermentation of *P. cocos*

复合药性培养基	菌丝体 / (g·L ⁻¹)	胞外多糖 / (g·L ⁻¹)
空白	11.80	5.28
薏苡仁+甘草	13.31	7.93
薏苡仁+淡竹叶	13.38	7.52
薏苡仁+桑叶	13.46	7.41
薏苡仁+灵芝	13.66	8.12
薏苡仁+枸杞子	13.71	9.21
甘草+淡竹叶	12.21	7.52
甘草+桑叶	12.48	7.35
甘草+灵芝	12.74	7.87
甘草+枸杞子	12.60	8.23
淡竹叶+桑叶	12.56	7.11
淡竹叶+灵芝	12.83	7.56
淡竹叶+枸杞子	12.84	8.32
桑叶+灵芝	12.95	7.62
桑叶+枸杞子	12.80	8.61
灵芝+枸杞子	13.32	8.79

表 3 薏苡仁和枸杞子不同添加量对茯苓发酵的影响

Table 3 Effects of different amounts of *Coicis Semen*

and *Lycii Fructus* on fermentation of *P. cocos*

复合药性培养基	添加量 / %	菌丝体 / (g·L ⁻¹)	胞外多糖 / (g·L ⁻¹)
空白	—	11.72	5.23
薏苡仁+枸杞子	0.25	12.15	5.82
	0.50	13.04	6.73
	0.75	14.29	8.22
	1.00	13.76	9.27
	1.50	11.51	9.73
	2.00	10.44	9.81

量为 0.75% 是最适添加量。在此条件下, 茯苓菌丝体干质量达 14.29 g/L, 茯苓胞外多糖产量达 8.22 g/L。

2.7 复合药性发酵茯苓多糖、灰分、氨基酸和微量元素测定

复合药性发酵茯苓水溶性茯苓多糖提取率为 6.97%, 碱溶性茯苓多糖提取率为 18.38%, 总多糖提取率为 25.35%。药性发酵茯苓总糖质量分数为 45.73%。笔者认为总多糖提取率和总糖质量分数方面之间存在着较大差异, 一方面可能因为复合药性发酵茯苓粉末中单糖和寡糖占总糖的比例较高, 另一方面可能因为复合药性发酵茯苓的多糖提取工艺

还需优化,以期提高多糖提取率。

提取率 = 茯苓多糖质量 / 茯苓样品质量

复合药性发酵茯苓总灰分 4.79%, 水溶性灰分 0.065%, 酸不溶性灰分 0.623%。复合药性发酵茯苓氨基酸的测定结果见表 4。药性发酵茯苓微量元素的测定结果见表 5。

表 4 复合药性发酵茯苓中氨基酸的量

Table 4 Determination of amino acids in compound medicinal fermented *P. cocos*

名 称	质量分数 / %	名 称	质量分数 / %
门冬氨酸	1.84	异亮氨酸	0.93
苏氨酸	1.17	亮氨酸	1.36
丝氨酸	0.83	酪氨酸	0.68
谷氨酸	2.33	苯丙氨酸	1.14
甘氨酸	1.01	赖氨酸	1.27
丙氨酸	1.46	组氨酸	0.64
胱氨酸	0.77	精氨酸	1.15
缬氨酸	2.13	脯氨酸	2.14
蛋氨酸	0.58	总量	21.43

表 5 复合药性发酵茯苓微量元素的量

Table 5 Determination of trace elements in compound medicinal fermented *P. cocos*

元素	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	元素	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
K	621.20	Fe	40.30
Ca	55.30	Cr	0.20
Mn	11.40	Zn	2.30
Mg	102.10	Pb	0.50
Cu	5.50	Cd	0.01

3 讨论

每种中药材都含有约数百种不同的化学成分,不同化学成分对茯苓生长代谢有抑制或促进作用。在加强药性培养基中适宜中药材底物筛选的同时,也应开展中药材底物对液体发酵影响作用机制的研究。笔者推测薏苡仁促进茯苓生长的作用机制可能是脂肪酸与茯苓细胞膜结合后,增强了其从培养基中摄取营养物质的能力。相对于药性培养基,添加了 2 味或 2 味以上中药材的复合药性培养基的化学成分更复杂,在高温灭菌过程中还有可能产生新化学成分,其对茯苓生长代谢调控的作用机制也更复杂。利用多味中药材所含化学物质的协同互补性来促进茯苓菌丝体生长和胞外多糖分泌的研究还有待

进一步深入。同时,加强茯苓液体发酵的发酵动力学研究,根据液体发酵中碳源和氮源消耗速率来动态补充碳源和氮源,有效解决葡萄糖浓度或氮源浓度过高或过低抑制茯苓生长的难题,提高茯苓液体发酵的水平。

笔者对复合药性发酵茯苓中多糖、总糖、总灰分、水溶性灰分和酸不溶性灰分的量进行了测定,并测定了其氨基酸和微量元素的种类和质量分数。笔者拟在本研究基础上,加强对复合药性发酵茯苓中多糖、三萜类化合物提取分离及结构鉴定的研究,开展药效学实验揭示其药效的物质基础,为制定完善复合药性发酵茯苓的质量控制打下基础。本研究工作的展开,将有力地推动茯苓液体发酵产业化的进程,促进茯苓等药用真菌资源的科学开发与可持续利用。

参考文献

- [1] 李 羿, 万德光. 发酵工程技术在中国药用真菌培养上的应用 [J]. 药物生物技术, 2010, 17(2): 177-180.
- [2] 项小燕, 郑爱芳, 谢 翎. 不同金属离子对竹黄液体发酵的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 164-166.
- [3] 杨海龙, 章克昌. 以薏苡仁为基质的灵芝液体发酵—I. 培养基优化 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(4): 6-10.
- [4] 刘 媛, 丁重阳, 章克昌, 等. 10 种中药对灵芝液体发酵的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 123-126.
- [5] 陈丽华, 章克昌. 8 味中药对黑木耳发酵的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 104-109.
- [6] 赵 亮, 张大为, 吴天祥. 苦荞、天麻对灰树花深层发酵产胞外多糖的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(4): 115-117.
- [7] 王贞佐, 呼海涛, 张 锐, 等. 中药对冬虫夏草发酵的影响 [J]. 食品科技, 2006, 31(2): 8-11.
- [8] 李 羿, 李 晨, 游元元, 等. 不同药性培养基对茯苓液体发酵的影响 [J]. 药物生物技术, 2011, 18(2): 129-132.
- [9] 李 羿, 万德光, 杨 胜. 茯苓发酵液中多糖的提取分离 [J]. 化学研究与应用, 2006, 18(9): 1099-1101.
- [10] 李 羿, 万德光, 刘忠荣, 等. 发酵茯苓菌丝体和天然茯苓多糖的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 667-669.
- [11] 李 俊, 韩向晖, 李仲洪, 等. 茯苓多糖的提取及含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2000, 17(1): 49-50.
- [12] 李 羿, 杨万青. 火焰原子吸收光谱法测定茯苓中微量元素 [J]. 化学研究与应用, 2011, 23(9): 1278-1280.