

# 灵芝菌发酵基质的条件优化及菌质活性物质的分析

陈丽艳, 杨晓旭, 慕菲, 曹思思, 王伟明\*  
(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

**[摘要]** **目的:**通过灵芝菌与玉米须、玉米芯的双向固体发酵,形成新的药性菌质,并对其活性成分进行分析。**方法:**以不同配比的玉米须和玉米芯为基质,以活性物质多糖和三萜的含量为指标考察菌质的最佳培养基配比,分别采用紫外分光光度法、薄层色谱法和高效液相色谱法进行定性及定量分析。**结果:**玉米须和玉米芯以1:0,1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,0:1配比,用灵芝菌发酵,形成的菌质多糖含量递增,三萜含量递减;薄层色谱结果显示,与发酵前对比,发酵后色谱斑点由红色转为蓝绿色荧光,并随着玉米须在培养基中比重增加而斑点越明亮;高效液相色谱结果显示,发酵后原有一些物质峰减弱或消失,并生成新的物质。**结论:**以玉米须-玉米芯1:5作为基质产生的菌质长势及活性成分含量最高,发酵前后菌质的物质组成有明显改变。

**[关键词]** 灵芝菌; 玉米须; 发酵

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0106-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080106

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000038.html>

**[网络出版时间]** 2014-02-07 15:23

## Optimal Conditions for Fermentation of *Ganoderma lucidum* and Analysis of the Active Components of the New Fungal Substance

CHEN Li-yan, YANG Xiao-xu, QI Fei, CAO Si-si, WANG Wei-ming\*  
(Heilongjiang Traditional Medical Academy of Sciences, Harbin 150036, China)

**[Abstract]** **Objective:** Corn silk and cob were fermented by *Ganoderma lucidum* with two-way pattern solid-state fermentation technique and produced new substance, the active compositions were investigated. **Method:** The optimal ratio of medium was selected according to the changes of polysaccharides and triterpene after fermented. Qualitative and quantitative analysis were established using UV, TLC and HPLC. **Result:** *Ganoderma lucidum* was fermented in the media of corn silk and corn cob at 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 0:1 ratio respectively. The content of polysaccharides increased and the content of triterpene decreased in turn. The result of

**[收稿日期]** 20130726(012)

**[基金项目]** 黑龙江省科技攻关项目(GA12C102)

**[第一作者]** 陈丽艳, 硕士, 副主任药师, 从事中药新药及保健食品的研究与开发, Tel:0451-55665478, E-mail: cly9998@163.com

**[通讯作者]** \*王伟明, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药及保健食品研发, Tel:0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2531.
- [5] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 67卷第1分册[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 53.
- [6] 李泽南. 《本草纲目》酸浆考释[J]. 时珍国医国药, 1995, 6(4): 3.
- [7] 徐国均, 徐璐珊, 何宏贤, 等. 中国药材学. 下册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 1161.
- [8] 陈重明, 黄胜白. 本草学[M]. 南京: 南京工学院出版社, 1988: 221.
- [9] 谈献和, 姚振生. 药用植物学[M]. 上海: 上海科学出版社, 2009: 227.
- [10] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1961: 670.

[责任编辑 邹晓翠]

TLC demonstrated that the color of TLC spot changed from red into blue-green fluorescence after fermentation, and the spot became brighter with increasing proportion of corn silk. The result of HPLC exhibited that some peaks of *G. lucidum* became weak or disappeared, and some new peaks were found. **Conclusion:** The new medical fungal substance grew best and contained the highest content of active components with the medium containing corn silk-corn cob (1:5), and the composition of the fungal substance changed significantly after fermentation.

[**Key words**] *Ganoderma lucidum*; corn silk; fermentation

灵芝属多孔菌科药用真菌,一直被用来治疗肝病、高胆固醇、高血脂等疾病<sup>[1-2]</sup>,被称为“扶正固本,滋补强壮”的珍贵药材,近代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<sup>[3]</sup>。

玉米须是禾本科玉蜀黍属植物玉米的花柱和柱头<sup>[4]</sup>,是一种传统的中草药,味甘,性微温,源于《滇南本草》,在《中药大辞典》中也有记载,并且是《中华人民共和国卫生部药材标准》收录的常用药材品种之一,具有平肝、利胆、利尿、泄热之功效,广泛用于肝炎、胆道结石、糖尿病、高血压等多种疾病的治疗<sup>[5-6]</sup>。

中药发酵是现代生物技术和中药学的完美结合,利用微生物强大的分解转化物质的能力,保护中药活性成分免遭破坏,提高中药药效和活性成分的含量,节省药源,减毒增效,并为中药活性成分结构修饰提供了新途径。陈丽艳等<sup>[7]</sup>用猴头菌发酵刺五加增强了抗疲劳作用。郑林等<sup>[8]</sup>用灵芝与丹参双向固体发酵形成药性菌质,治疗血瘀模型小鼠效果显著。谷坤睿等<sup>[9]</sup>探索甘草渣和14种不同的灵芝菌株的复合型双向发酵,结果表明,经过灵芝菌发酵的菌质多糖含量有不同程度的提高,但利用玉米须和玉米芯发酵灵芝菌的研究尚未曾报道。

本研究采用玉米须和玉米芯不同配比作为固体培养基,用灵芝菌发酵,并通过考察其长势、生物转化量、活性物质含量确定其最佳发酵条件,通过薄层色谱法与高效液相色谱法对三萜类活性物质进行初步分析,为灵芝菌固体发酵开辟新的途径。

## 1 材料

玉米须由哈尔滨东金现代农业股份有限公司提供,批号1209016,产地黑龙江,经黑龙江省中医药科学院吴秉纯教授鉴定其为禾本科玉蜀黍属植物玉米 *Zea mays* L. 的花柱和柱头。灵芝菌种 *Ganoderma lucidum* 由黑龙江省微生物研究所提供,编号 ACCC50044。LY 型 N 系列电子天平(上海精密科学仪器有限公司),HNY-2102C 型恒温培养振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司),YA. ZDI-5 型不锈

钢断水自控蒸馏器(上海申安医疗器械厂),UV-1604 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),WD9403A 型紫外仪(北京六一仪器厂),KE·WEI 型电热恒温水浴锅,Waters 高效液相色谱仪。香草醛(天津佳惠)、蒽酮(北京化工厂)、马铃薯葡萄糖肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司),硫酸、冰醋酸、甲醇、95%乙醇、石油醚(60~90℃)、甲酸乙酯、甲酸等试剂均为分析纯,齐墩果酸对照品(批号110709-201206)和灵芝对照药材(批号120968-201107)均购自中国食品药品检定研究院。

## 2 方法与结果

**2.1 灵芝菌液体种的制备**<sup>[10]</sup> 取马铃薯葡萄糖肉汤培养基 35 g,加 1 000 mL 蒸馏水溶解,分装 5 个锥形瓶,每瓶 200 mL,每瓶加玻璃球 30 个,121℃ 灭菌 20 min,放冷,取斜面保存的菌种,用无菌蒸馏水溶解,接种至新配制的液体培养基中,于 28℃,110 r·min<sup>-1</sup>,摇床培养 7~10 d,即可接种使用。

**2.2 固体培养基的配制及培养** 玉米须和玉米芯分别以 0:1,1:0,1:1,1:2,1:3,1:4,1:5 比例混合做为固体培养基,共 7 组,依次标记 A~G,每组平行 5 袋,加 2 倍水浸泡,灭菌,冷却,每袋接种 **2.1** 灵芝菌液 6 mL,于 28℃ 培养 60 d,定期观察菌体生长情况,待成熟期即为发酵菌质,开袋风干粉碎备用。

**2.3 发酵菌质中三萜和多糖的含量测定**

**2.3.1 总三萜标准曲线的制备**<sup>[11]</sup> 精密称取干燥至恒重的齐墩果酸 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇定容得标准液。准确吸取标准液 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL 于具塞试管,水浴加热挥去溶剂,加 0.4 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液及 1 mL 高氯酸密封,70℃ 加热 25 min,取出,冰水冷却,加冰醋酸 5 mL 摇匀,550 nm 下测吸光度。根据测定结果以齐墩果酸质量为横坐标绘制标准曲线,其线性回归方程  $Y = 9.8536X + 0.1013$  ( $R^2 = 0.9996$ )。

**2.3.2 多糖标准曲线的制备**<sup>[12]</sup> 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 20 mg,加蒸馏水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,配成 0.2 g·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖标准溶液,分别精密吸取标准液 1,2,3,4,5 mL 置于

10 mL 量瓶中,以蒸馏水定容摇匀得对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液 1.0 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,将试管置于冰水浴中,分别向试管中加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 4 mL,待各管加完后同时摇匀,置于沸水浴中加热 10 min,冷水浴迅速冷却至室温放置 10 min,于 620 nm 处测吸光度。另精密吸取蒸馏水 1 mL,同法操作作为空白对照。根据测定结果以葡萄糖浓度 ( $g \cdot L^{-1}$ ) 为横坐标,计算回归方程为  $Y = 10.185X + 0.0039 (R^2 = 0.9999)$ 。

**2.3.3 总三萜供试品溶液的制备** 未发酵的玉米须和玉米芯分别标记为样品 H, I, 分别称取样品 A, B, C, D, E, F, G, H, 各 4 g, 加 8 倍量的 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次滤液蒸干,用甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中作为供试品溶液,测定吸光度。

**2.3.4 多糖供试品溶液的制备** 上述样品滤渣挥干乙醇后加 12 倍蒸馏水,100 °C 提取 2 次,每次 3 h,合并滤液加蒸馏水定容至 100 mL,再分别吸取 1 mL 定容至 25 mL 量瓶作为供试品溶液,测定吸光度。

**2.4 最佳培养基配比的考察** 通过紫外分光光度法检测各配比培养基产生的菌质多糖和三萜含量,通过加权分析确定两种活性物质含量均相对较高的最佳培养基配比(表 1)。

表 1 不同配比培养基得到的菌质中多糖和三萜含量

样品	须芯配比	三萜/%	多糖/%	加权平均
A	0:1	0.1253	2.3125	1.0016
B	1:0	0.5518	1.4513	1.2189
C	1:1	0.4102	1.0318	0.7210
D	1:2	0.2169	1.6339	0.9254
E	1:3	0.3461	1.8112	1.0787
F	1:4	0.2495	2.0178	1.1337
G	1:5	0.2706	2.1924	1.2315
H	未发酵玉米须	0.8277	1.4101	1.1189
I	未发酵玉米芯	0.3065	5.1364	2.7215

由表 1 可见,随着玉米芯占培养基比重越来越多,多糖含量升高,三萜含量减少;而玉米须占培养基比重越多,菌质中三萜含量升高,多糖含量减少。B 菌质是单纯玉米须发酵生长速度较慢,是由于玉米须有抑菌作用<sup>[14-15]</sup>;A 菌质是单纯玉米芯发酵只能供菌体生长的营养源支撑,没有玉米须中所能提供的药用价值,因此 C-G 菌质按三萜和多糖各 50% 加权平均计算,得到结果是 G 菌质(须:芯 = 1:5)为最佳发酵培养基配比。

**2.5 薄层色谱的对比分析**

**2.5.1 对照药材溶液的制备** 取灵芝对照药材 4 g,加乙醇 32 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,重复 3 次残渣加甲醇 25 mL 使溶解定容,制成对照药材溶液。

**2.5.2 薄层鉴别** 照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版附录 VI B)进行灵芝总三萜的定性鉴别,吸取上述 2.3.3 中 A-I 9 种供试品溶液及灵芝对照药材溶液各 50 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 °C)-甲酸乙酯-甲酸(15:10:1)的上层溶液为展开剂,在同一层析缸中同时展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

由图 1 可见,各条带几乎在 Rf = 0.62 处有明显斑点,未发酵的玉米须 H 呈红色斑点,明显区别于其他各样品,而发酵后 B 红色斑点消失,变为蓝绿色荧光,说明发酵后对比发酵前有某种物质的转化或生成新的物质。除对照药材 O 斑点外,以灵须菌质 C(1:1)和发酵的玉米须 B 的斑点最为清楚明亮,此外,未发酵玉米芯 I 斑点较淡,发酵后 A 的斑点较未发酵 I 明显,说明此斑点所代表成分来自于灵芝菌丝体。

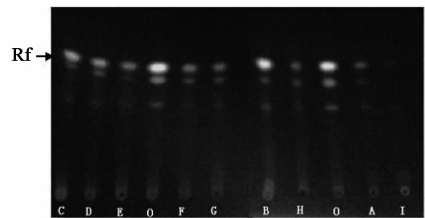


图 1 发酵前后各样品薄层色谱图(“O”为灵芝对照药材)

**2.6 高效液相色谱分析<sup>[13]</sup>**

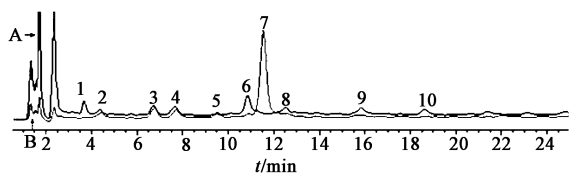
**2.6.1 色谱条件** 乙腈(A),0.8% 醋酸-水(B),梯度洗脱(0~10 min,10%~20% A;10~30 min,20%~25% A;30~50 min,25%~30% A;50~60 min,30%~10% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,UV 检测波长 254 nm,柱温室温,进样量 30 μL。

**2.6.2 样品溶液的制备** 样品选用玉米须-玉米芯(1:3)为基质及发酵菌质。

分别取发酵前后的基质及菌质各 50 g,加乙醇 400 mL,加热回流 1 h,提取 3 次,合并滤液,蒸干,残渣加 20 mL 蒸馏水溶解,再加 20 mL 石油醚(60~90 °C)萃取,取上清液,蒸干,残渣加甲醇 5 mL 定容,溶液用 0.45 μm 滤膜过滤后用于液相检测。实验平行 3 次,得到稳定的发酵前后液相对比图谱。

**2.6.3 高效液相色谱** 如图 2,排除前 4 min 溶剂峰,1,5,8,9,10 号峰是未发酵基质分别在保留时间为 3.667,10.847,12.534,15.841,18.620 min 处出

现的明显峰,发酵后这4种物质被分解转化。2,3,4号峰在保留时间分别为4.408,6.769,7.718 min处发酵前后有共同物质峰出现,峰面积基本相同,说明这两种物质相对比较稳定,没有被微生物酶解。5号和7号峰是发酵后菌质产生的新物质峰,而且11.55 min出现的7号峰相对百分含量达到36.85%,可进一步对其进行分离纯化及结构鉴定,并进行药理活性研究。由于25 min后无明显特征峰出现,因此未截取25~60 min的液相图谱。



A. 未发酵基质; B. 发酵后灵须菌质

图2 发酵前后基质与菌质的HPLC对比

### 3 讨论

中药发酵是中药学与微生物学两门学科的重要结合点之一。玉米须作为药性基质提供灵芝生长的营养物质,灵芝菌在生长代谢过程中产生的酶,与基质中的玉米须发生生物化学反应,使玉米须中原有物质被修饰或分解,产生底物衍生物或新的成分,同时产生的菌质是真菌菌丝体利用玉米须基质构造专性产物,生物转化作用改变玉米须单一基质的药效,产生生物级联放大效应。其中,玉米须经灵芝菌转化后使一些大分子转化为多种活性小分子,更利于吸收,且提高药效<sup>[16]</sup>。

本实验采用马铃薯葡萄糖肉汤培养基培养液体灵芝菌种,菌体长势良好,菌球分布均匀。固体发酵条件成熟,菌体生长及产物稳定。通过紫外分光光度法确定各配比发酵菌质中有效物质含量,得出最优培养基;通过薄层色谱法和高效液相色谱法对各物质进行定性及定量检测,从TLC斑点的颜色变化和液相中不同保留时间的峰的改变,证明发酵前后培养基内物质成分有很大改变,两者相辅相成,缺一不可。对于新生成的物质还需进一步提纯及结构鉴定以确定是否为新发现的化合物,为新药开发提供了思路,今后还将通过药理学方法对比分析发酵菌质与玉米须、玉米芯及灵芝的活性,为该菌质的应用提供依据。

### [参考文献]

[1] Boh B, Berovic M, Zhang J, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds [J]. *Biotechnol Annu Rev*, 2007, 13:265.

[2] Oluba, Olarewaju M Olusola, Augustine O Eidangbe, et al. Modulation of lipoprotein cholesterol levels in *Plasmodium berghei* malarial infection by crude aqueous extract of *Ganoderma lucidum* [J]. *Cholesterol*, 2012, 12(83):1.

[3] Liu Yujun, Shen Jie, Xia Yongmei, et al. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(3):1210.

[4] 中华人民共和国卫生部药材标准委员会. 中华人民共和国卫生部药材标准. 1部[S]. 北京:人民卫生出版社:1986.

[5] 徐燕,梁敬钰. 玉米须的化学成分研究[J]. *中草药*, 2006, 37(6):831.

[6] Wenzhu Zhaoa, Yongguang Yina, Zhipeng Yua. Comparison of anti-diabetic effects of polysaccharides from corn silk on normaland hyperglycemia rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50:1133.

[7] 陈丽艳,金爽,张迎,等. 猴头菌发酵炮制中药刺五加对小鼠抗疲劳作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):102.

[8] 徐淑蓓,刘书来,丁玉庭. 多菌种复合发酵对灵芝菌产胞外多糖的影响[J]. *浙江工业大学学报*, 2012, 40(4):428.

[9] 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.

[10] GAO Wengeng. The production of *Ganoderma lucidum* by solid-state fermentation using corn as substrate [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, 23(7):422.

[11] 黄生权,姚松君,刘翠玲,等. 不同生长期的灵芝三萜含量测定及变化规律研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(8):1015.

[12] 赵龙,阮美娟,秦学会,等. 蒽酮-硫酸法测定慈姑中多糖的含量[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(12):118.

[13] 丁平,梁英娇,罗进辉,等. 灵芝中6种主要三萜酸类成分的HPLC定量分析[J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(11):822.

[14] 钟有添,陈玉帅,毛晓洁,等. 玉米须抗菌活性的初步研究[J]. *赣南医学院学报*, 2008, 28(4):477.

[15] Neucere, Joseph N. Inhibition of *Aspergillus favus* growth by silk extracts of resistant an susceptible corn [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(8):1982.

[16] 陈丽艳,张迎,金爽,等. 黄芩经侧耳菌和黑曲霉发酵后黄酮类成分的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5):63.

[责任编辑 顾雪竹]