

# 基于液体发酵灵芝草乌相互作用的影响研究

王身艳, 陈建伟, 薛峰, 王娟红\* (南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023)

**摘要** [目的]研究在液体发酵过程中草乌与灵芝相互作用的影响。[方法]研究在灵芝液体发酵过程中初始 pH、草乌粉及草乌提取物对灵芝菌体生长、胞内外多糖的影响,以及灵芝发酵对草乌粉及草乌提取物中酯型生物碱质量分数的影响。[结果]当初始 pH 为 6 时,灵芝菌体生物量及胞内外多糖产量均达最大值,分别为 7.50、0.25、0.42 g/L;草乌粉添加量为 20 g/L 时,生物量和胞内多糖达最大,分别为 10.60 和 0.54 g/L,分别为对照的 1.96 和 2.57 倍;草乌粉添加量为 15 g/L 时,胞外多糖产量达最大,为 0.76 g/L,是对照的 2.11 倍;草乌提取物添加量为 0.87 g/L 时,生物量和胞外多糖产量达最大,分别为 11.30 和 0.72 g/L,分别是对照的 2.13 和 2.06 倍,添加量为 1.16 g/L 时,胞内多糖产量最高,达 0.57 g/L,是对照的 2.38 倍。[结论]灵芝均能降低发酵液中草乌粉、草乌提取物中的双酯型生物碱含量及增加发酵液中单酯型生物碱含量。

**关键词** 灵芝;草乌;生物碱;多糖;生物量

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)36-0161-04

## Study on Interaction between *Ganoderma lucidum* and *Aconiti kusnezoffii* Based on Submerged Fermentation

WANG Shen-yan, CHEN Jian-wei, XUE Feng, WANG Juan-hong\* (School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023)

**Abstract** [Objective] The aim was to study interaction between *Ganoderma lucidum* and *Aconiti kusnezoffii* in liquid fermentation process. [Method] This paper explored the effect of initial pH, powder and total alkaloids extract of *Aconiti kusnezoffii* on the yield of mycelium and the content of intracellular polysaccharides (IPS) and extracellular polysaccharides (EPS), studied the effect of *Ganoderma lucidum* fermentation on the content of aconitum alkaloids in the submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. [Result] The yield of biomass and the content of IPS and EPS reached 7.50, 0.25, 0.42 g/L respectively when initial pH was 6. The yield of biomass and the content of IPS reached 10.60, 0.54 g/L, and 1.96, 2.57 times compared to the control respectively by the addition of 20 g/L of *Aconiti kusnezoffii* and the content of EPS was 0.76 g/L, 2.11 times compared to the control by the addition of 15 g/L. The yield of biomass and the content of EPS reached 11.30, 0.72 g/L, 2.13, 2.06 times compared to the control respectively by the addition of 0.87 g/L of the extract of *Aconiti kusnezoffii* and the content of IPS was 0.57 g/L, 2.38 times compared to the control by the addition of 1.16 g/L of extract of *Aconiti kusnezoffii*. [Conclusion] The content of the diester-aconitum alkaloids was decreased and the content of mono-ester aconitum alkaloids was increased in *Ganoderma lucidum* submerged fermentation.

**Key words** *Ganoderma lucidum*; *Aconiti kusnezoffii*; Alkaloid; Polysaccharide; Biomass

灵芝(*Ganoderma lucidum*)具有补气安神、止咳平喘、延年益寿等功效,是药食两用的高等药用真菌。灵芝含有多种成分,多糖是主要药效成分之一。现代药理学研究发现,灵芝多糖具有免疫调节、抑制肿瘤、延缓衰老、降血脂等功效<sup>[1-4]</sup>。草乌为毛茛科植物北乌头(*Aconitum kusnezoffii* Reichb.)的干燥块根,具有祛风除湿、温经止痛的功效,临床多治疗用于风寒湿痹、关节疼痛等各种痛症,且不具有成瘾性。现代药理学研究表明,草乌具有镇痛、抗炎、抗肿瘤、麻醉止痛等作用<sup>[5-6]</sup>,其主要活性成分是乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等生物碱类成分,同时也是其毒性成分,临床上都使用草乌炮制品。近年来有研究表明,在真菌培养基中添加适量的中药<sup>[7]</sup>,可促进真菌菌体生长或提高活性成分含量,也可以有效地提高中药药效或降低毒性<sup>[8]</sup>,但中药和真菌相互影响的研究较少。王身艳等<sup>[9-11]</sup>前期研究表明,真菌固体发酵草乌和川乌后,其毒性成分降低,疗效提高。该试验将研究草乌粉和草乌总生物碱经灵芝液体发酵后,其生物碱相对含量的变化以及草乌对灵芝多糖和菌体生长的影响。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 仪器。电子天平(HX1002T 慈溪市天东衡器厂);超

净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);摇瓶机(上海市离心机械研究所);立式压力蒸汽灭菌器(上海申安试剂医疗器械厂);培养箱(上海市跃进医疗器械一厂);离心机(上海安亭科学仪器厂制造);pH计(上海精密科学仪器有限公司);岛津 LC-20AB 高效液相色谱仪, DAD 检测。

1.1.2 试剂。葡萄糖、蛋白胨、酵母浸膏、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $VB_1$ 、氨水、异丙醇、乙酸乙酯、甲醇、氯仿、三乙胺、冰醋酸、二氯甲烷、苯酚、硫酸,以上试剂均为国产分析纯;乙腈(Tedia, 色谱纯)。

1.1.3 菌种与试药。菌种:灵芝(*Ganoderma lucidum*)由南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究中心保藏。草乌为毛茛科植物北乌头(*Aconitum kusnezoffii* Reichb.)的干燥母根,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定。标准品:乌头碱 Aconitine(批号 110720-200410)、中乌头碱 Mesaconitine(批号 0799-9403)、次乌头碱 Hypaconitine(批号 0798-9403)购自中国药品生物制品检定所;苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine(批号 B-010-110316)、苯甲酰中乌头原碱 Benzoylmesaconine(批号 B-009-110316)、苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypaconine(批号 B-010-110316)购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.1.4 培养基。斜面培养基:PDA 培养基。液体种子培养基:葡萄糖 3%、黄豆粉 0.8%、酵母膏 0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%、 $KH_2PO_4$  0.1%,  $VB_1$  少量, pH 自然(约 6.0)。液体发酵培养基:葡萄糖 4%、蛋白胨 0.4%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%、

基金项目 江苏高校品牌专业建设工程项目。

作者简介 王身艳(1974-),女,江苏南京人,助理研究员,博士,从事食品与中药生物技术研究。\* 通讯作者,讲师,博士,从事肠道微生物研究。

收稿日期 2016-11-22

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{VB}_1$  少量, pH 自然(约 6.0)。以上培养基灭菌条件均为 121 °C, 灭菌 20 min。

## 1.2 方法

**1.2.1 草乌总生物碱的提取。**称取适量草乌粉末(80 目), 置洁净干燥的具塞锥形瓶中, 加氨试液, 浸润 30 min, 按 1:25 比例加入药粉量的异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合液, 称定重量, 室温超声(30 kHz)30 min 后, 静置 24 h, 取上清液, 残渣用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合液洗涤 3 次, 合并上清液, 回收溶剂, 残渣真空干燥并粉碎成 100 目细粉, 即得草乌总生物碱提取物。

**1.2.2 灵芝液体发酵培养。**将培养好的液体种子按 10% 接种量接入液体发酵培养基 250 mL 三角瓶, 装液量 100 mL, 温度 30 °C, 转速 160 r/min, 培养 7 d, 发酵结束后, 测定灵芝菌体生物量及胞内外灵芝多糖含量。

**1.2.3 起始 pH 对灵芝发酵的影响。**用盐酸或氢氧化钠将初始 pH 分别调为 3.5、4.5、5.5、6.0(自然)、6.5、7.5, 培养 7 d, 培养结束后, 测定灵芝生物量和胞内、胞外多糖的含量。

**1.2.4 不同添加量的草乌粉和草乌总生物碱对灵芝发酵的影响。**在液体发酵培养分别添加草乌粉和草乌总生物碱提取物, 草乌粉添加量分别为 5、10、15、20、25、30、35 g/L, 草乌总生物碱提取物添加量分别为 0.29、0.58、0.87、1.16、1.45、1.74、2.03 g/L(分别相当于草乌粉 5、10、15、20、25、30、35 g/L), 调节 pH 为 6, 培养 7 d, 培养结束后, 测定灵芝生物量和胞内外多糖的含量。

**1.2.5 菌体生物量的测定。**将发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用蒸馏水冲洗多次, 收集菌丝体, 并于 60 °C 烘干至恒重, 称重计算生物量: 生物量(g/L) = 菌体干重 × 1 000/发酵液体积。

**1.2.6 多糖的测定。**

**1.2.6.1 胞外多糖的测定。**取 1 mL 发酵上清液, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 充分混匀, 4 °C 冰箱中静置 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 沉淀, 取沉淀以乙醇清洗 3 次, 60 °C 除

去乙醇, 用 4 mL 蒸馏水溶解, 用苯酚-硫酸法测多糖。

**1.2.6.2 胞内多糖的测定。**取干燥的菌丝体, 研细, 加入 10 倍量蒸馏水于沸水浴中抽提 3 次, 合并提取液, 浓缩至原体积的 1/5, 加入 4 倍量 95% 乙醇, 4 °C 冰箱静置 24 h 后离心, 弃上清, 取沉淀以乙醇清洗 3 次, 60 °C 除去乙醇后, 蒸馏水溶解, 用苯酚-硫酸法测定胞内多糖含量。

**1.2.7 发酵液中生物碱的含量测定。**

**1.2.7.1 色谱条件。**固定相: Akzo Nobel Kromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: A 为缓冲液(0.2% 冰醋酸用三乙胺调节 pH 至 6.20), B 为乙腈; 梯度洗脱, 洗脱程序: 0 ~ 44 min A - B(79:21) → (65:35); 44 ~ 65 min A - B(65:35) → (60:40); 65 ~ 85 min A - B(60:40) → (20:80); 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 240 nm; 柱温 30 °C。

**1.2.7.2 对照品溶液的配制。**精密称取 Aconitine 1.12 mg、Mesaconitine 1.20 mg、Hypaconitine 4.12 mg、Benzoylaconine 1.42 mg、Benzoylmesaconine 3.10 mg、Benzoylhypaconine 3.91 mg, 分别置 5 mL 量瓶中, 加乙腈适量使溶解并稀释至刻度。分别精密量取上述溶液 0.3、0.8、0.2、0.2、0.1、0.1 mL 于同一 5 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 得对照品混合溶液的贮备液, 放置 4 °C 冰箱保存, 备用。

**1.2.7.3 供试品溶液的配制。**发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 精密量取 10 mL, 用氨水调 pH 至 10, 用氯仿萃取 3 次, 分取氯仿层, 回收氯仿, 残渣加乙腈使溶解并定容至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 滤液供 HPLC 测定用。

**1.2.7.4 线性关系的考察。**精密量取对照品混合溶液的贮备液, 用乙腈分别按 1/3、1/6、1/9、1/18 进行倍量等度稀释, 摇匀, 即得。连同贮备液按“1.2.7.1”方法分别注入高效液相色谱仪, 分别以 Aconitine、Mesaconitine、Hypaconitine、Benzoylaconine、Benzoylmesaconine、Benzoylhypaconine 对照品溶液的质量( $\mu\text{g}$ )为横坐标, 色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线(表 1)。

表 1 草乌中 6 种酯型生物碱对照品线性关系考察结果

Table 1 Linear relationship of 6 kinds of alkaloids control products in *Aconiti kusnezoffii*

化合物 Compounds	标准曲线 Standard curve	r	线性范围 Linearity range// $\mu\text{g}$
Aconitine	$Y = 580.360X - 55$	0.999 9	0.006 966 ~ 0.125 400
Mesaconitine	$Y = 412.220X + 2.281$	0.999 9	0.019 330 ~ 0.348 000
Hypaconitine	$Y = 420.922X - 1.117$	0.999 9	0.018 310 ~ 0.329 600
Benzoylaconine	$Y = 969.831X + 1.119$	0.999 9	0.006 222 ~ 0.112 000
Benzoylmesaconine	$Y = 1.284.090X - 1.322$	0.999 9	0.008 667 ~ 0.156 000
Benzoylhypaconine	$Y = 1.200.420X + 1.268$	0.999 9	0.008 689 ~ 0.156 400

## 2 结果与分析

**2.1 培养基初始 pH 对菌体生物量及胞内外多糖产量的影响** 由图 1 可见, 随着 pH 升高, 菌体生物量及胞内外多糖先呈现快速增长, 当 pH 为 6 时, 生物量及胞内外多糖产量均达最大值, 分别为 7.50、0.25、0.42 g/L, 当 pH 继续提高至 7.5 时, 菌体生物量及胞内外多糖产量均降低, 较低和较高的 pH

均不利于菌体生物量及胞内外多糖产量的提高。

**2.2 草乌粉添加量对灵芝发酵的影响** 从图 2 可看出, 草乌粉可促进灵芝菌生长, 添加量在 5 ~ 20 g/L, 草乌粉对灵芝菌体生长促进作用呈线性关系, 其中添加量为 20 g/L 时, 效果最显著, 生物量达 10.60 g/L, 是对照的 1.96 倍。草乌粉可促进灵芝多糖的产生, 添加量在 5 ~ 15 g/L, 草乌粉对灵芝胞

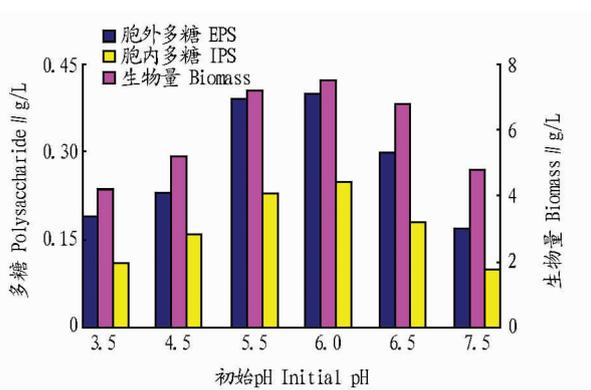


图1 初始 pH 对菌体生物量、胞内外多糖产量的影响

Fig. 1 Effects of initial pH on biomass, EPS and IPS polysaccharide yield

胞外多糖产生呈线性关系,其中添加量为 15 g/L 时,对胞外多糖产生效果最显著,产量达 0.76 g/L,是对照的 2.11 倍,添加量为 20 g/L 时,对胞内多糖产生效果最显著,产量达 0.54 g/L,是对照的 2.57 倍。

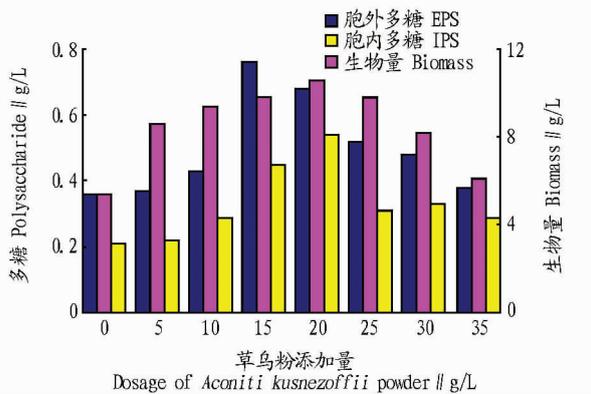


图2 草乌粉添加量对菌体生物量、胞内外多糖产量的影响

Fig. 2 Effects of dosage of *Aconiti kusnezoffii* powder on biomass, EPS and IPS polysaccharide yield

表2 草乌粉和草乌提取物在灵芝液体发酵条件下生物碱质量分数变化( $n=3$ )

生物碱 Alkaloid	草乌粉 <i>Aconiti kusnezoffii</i> powder			草乌提取物 <i>Aconiti kusnezoffii</i> extracts		
	空白对照 Blank control	发酵样品 Fermented sample	变化率 Variation rate	空白对照 Blank control	发酵样品 Fermented sample	变化率 Variation rate
Aconitine	0.039 340	0.002 177	94.5 ↓	0.037 281	0.002 551	93.2 ↓
Mesaconitine	0.106 600	0.021 450	79.9 ↓	0.100 600	0.010 950	89.1 ↓
Hypaconitine	0.080 910	0.010 680	86.8 ↓	0.083 330	0.012 730	84.7 ↓
Benzoylaconine	0.002 725	0.010 440	283.1 ↑	0.002 962	0.012 560	324.0 ↑
Benzoylmesaconine	0.009 458	0.060 090	535.3 ↑	0.010 650	0.074 880	603.1 ↑
Benzoylhypaconine	0.007 326	0.047 790	552.3 ↑	0.007 821	0.049 170	528.7 ↑

注: ↓表示质量分数降低; ↑表示质量分数增加。

Note: ↓ indicates decrease of mass fraction; ↑ indicates increase of mass fraction.

分别下降 93.2%、89.1% 和 84.7%,单酯型生物碱 Benzoylaconine、Benzoylmesaconine、Benzoylhypaconine 的相对含量均升高,分别增加 3.2、6.0 和 5.3 倍。

在灵芝发酵液中添加草乌,灵芝可降低双酯型生物碱的含量,空白对照和灵芝-草乌发酵液比较,双酯型生物碱的信号强度高,单酯型生物碱的信号强度低,灵芝发酵液中不

含乌头碱类生物碱(图4)。

2.3 草乌总生物碱提取物添加量对灵芝发酵的影响 由图3可知,添加量在 0.29 ~ 1.45 g/L 时,草乌总生物碱对灵芝菌生长具有促进作用,其中添加量为 0.87 g/L 时,效果最显著,生物量达 11.30 g/L,是对照的 2.13 倍,添加量达 1.74 g/L 时,对灵芝菌体的生长呈现抑制作用。草乌总生物碱添加量在 0.29 ~ 1.16 g/L,草乌对灵芝胞外多糖产生具有促进作用,其中添加量为 0.87 g/L 时,胞外多糖产量最大,达 0.72 g/L,是对照的 2.06 倍,添加量为 1.16 g/L 时,胞内多糖产量最高,达 0.57 g/L,是对照的 2.38 倍。

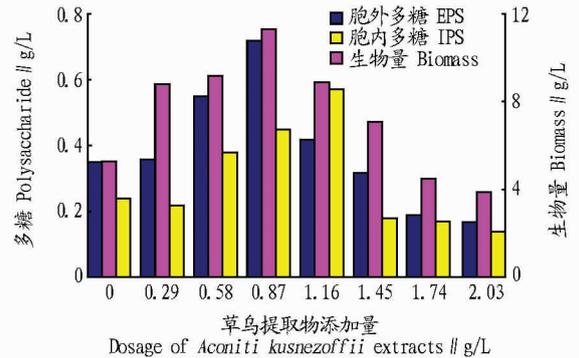


图3 草乌总生物碱提取物添加量对菌体生物量、胞内外多糖产量的影响

Fig. 3 Effects of dosage of *Aconiti kusnezoffii* extracts on biomass, EPS and IPS polysaccharide yield

2.4 草乌粉及草乌提取物在灵芝发酵条件下生物碱质量分数的变化 从表2可看出,与草乌粉+发酵培养基溶液对照相比,双酯型生物碱 Aconitine、Mesaconitine、Hypaconitine 的相对含量均有所降低,分别下降 94.5%、79.9% 和 86.8%,单酯型生物碱 Benzoylaconine、Benzoylmesaconine、Benzoylhypaconine 的相对含量均升高,分别增加 2.8、5.4 和 5.5 倍。与草乌总生物碱+发酵培养基溶液对照相比,双酯型生物碱 Aconitine、Mesaconitine、Hypaconitine 的相对含量均有所降低,

含乌头碱类生物碱(图4)。

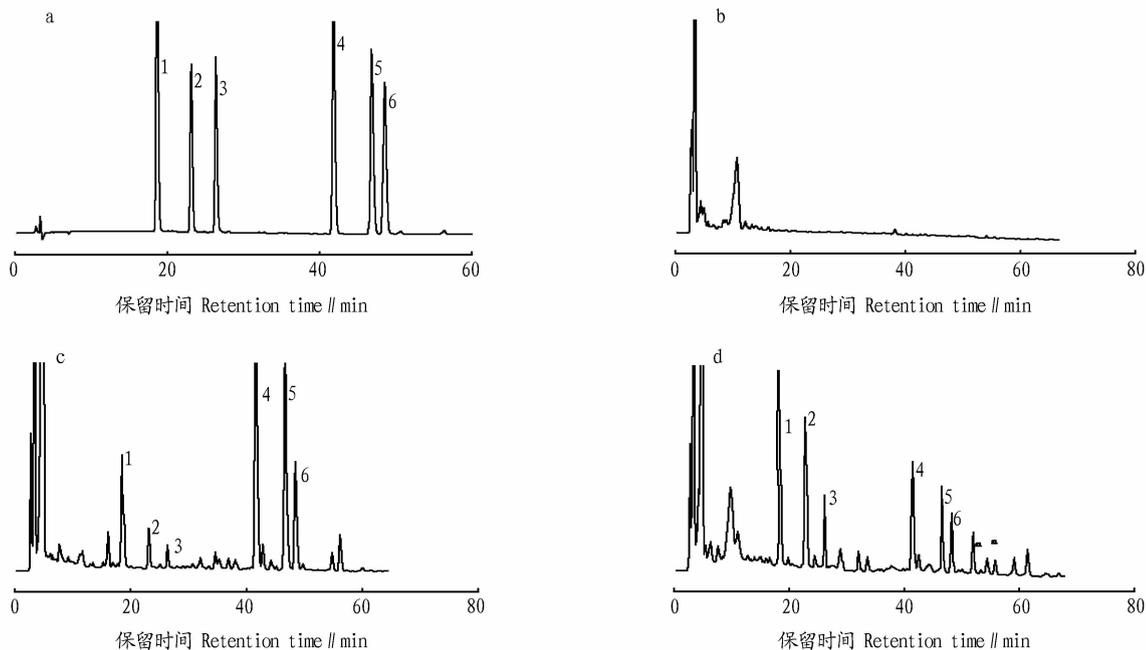
### 3 讨论

药用真菌分泌的酶可分解纤维素、淀粉、蛋白质、脂类等物质,可对培养基进行分解利用;中药中含有丰富的纤维素、淀粉、蛋白质、脂类等物质,利用中药基质进行药用真菌的深层发酵生产,同时中药中的成分(生物碱、皂苷、黄酮等)

可促进或抑制药用真菌的生长及代谢产物的生产,且药用真菌中的酶系还可能对中药中的成分进行转化;在发酵制剂中,既包含中药的成分,也包含灵芝的活性代谢产物,以及它们间相互作用产生的新成分,只要选择的中药与药用真菌菌株搭配恰当,通过中药中的成分与药用真菌生长代谢间的相互作用,完全可能起到增效的作用。

药用真菌在发酵过程中会产生丰富的酶及各种活性物质,不同的培养基、不同培养条件,产生代谢产物的种类和数

量也不同。大量的酶可使底物产生各种化学反应和各种代谢产物。草乌中主要成分是乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等双酯型生物碱,这些物质既是毒性成分又是有效成分。该试验研究灵芝液体发酵对草乌生物碱类成分的影响,以及草乌对灵芝生长及代谢产物的作用。结果表明,通过液体发酵,灵芝可以降低草乌次乌头碱、中乌头碱、乌头碱等双酯型生物碱含量,增加苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱及苯甲酰乌头碱含量,从而降低草乌的毒性。



注:a.混合对照品溶液;b.灵芝发酵液;c.空白对照;d.灵芝-草乌发酵液。1.苯甲酰中乌头碱;2.苯甲酰次乌头碱;3.苯甲酰乌头碱;4.中乌头碱;5.次乌头碱;6.乌头碱;n.未知成分。

Note: a. Mixed control solution; b. *Ganoderma lucidum* fermentation broth; c. Blank control; d. *Ganoderma lucidum*-*Aconiti kusnezoffii* fermentation broth. 1. Benzoyl mesaconitine; 2. Benzoyl hypaconitine; 3. Benzoylaconine; 4. Mesaconitine; 5. Hypaconitine; 6. Aconitine; n. Unknown component.

图4 混合对照品和供试品的HPLC图

Fig. 4 HPLC of mixed control solution and tested substance

现有研究表明,选择适当的中药加入药用真菌深层发酵基质,通过中药中的成分与药用真菌生长代谢间的相互作用可以起到增效的作用,但目前的研究多集中在中药对药用真菌生长及多糖等成分生产的影响方面<sup>[8-9]</sup>,而对于它们间的相互作用、中药成分在发酵过程中的变化及增效的机理等方面研究甚少,应是今后努力的方向。

在灵芝液体发酵中,草乌的添加量在一定范围内,对灵芝生长及胞内外多糖的产生均有促进作用,草乌总生物碱提取物添加量达0.45 g/L时,灵芝生物量及胞内外多糖产生受到抑制,是否与生物碱的毒性有关,有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] LIN Y L, LIANG Y C, LEE S S, et al. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Journal of leukocyte biology, 2005, 78(2): 533-543.  
[2] NONAK Y, SHIBATA H, NAKAI M, et al. Anti-tumor activities of the antlered form of *Ganoderma lucidum* in allogeneic and syngeneic tumor-bearing mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(9): 2028-2034.

[3] 王明宇,林志斌. 灵芝三萜类成分在体内外对小鼠免疫性肝损伤的影响[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(12): 809-812.  
[4] 范青生,胡居吾,肖小年. 菌草灵芝孢子粉对小鼠化学性肝损伤有辅助保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(S1): 39-41.  
[5] 张宏,余成浩,彭成. 草乌煎煮时间、给药剂量与抗炎镇痛功效的相关性研究[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1318-1322.  
[6] GAO T T, BI H T, MA S. The antitumor and immunostimulating activities of water soluble poly saccharides from *Radix Aconiti*, *Radix Aconiti Lateralis* and *Radix Aconiti Kusnezoffii* [J]. Natural product communications, 2010, 5(3): 447-455.  
[7] 杨海龙,陈高洪,章克昌. 利用药用真菌深层发酵加工中药[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1717-1720.  
[8] 刘亮镜,曹亮,蒋亚平,等. 马钱子经朱红栓菌发酵前后毒性及镇痛、抗炎作用的实验研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2009, 25(3): 205-208.  
[9] 王身艳,余黎,刘学湘,等. 灵芝双向固体发酵草乌后菌质抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(5): 352-356.  
[10] 王身艳,余黎,蒋亚平,等. 双向发酵对草乌中乌头碱类成分含量影响及菌质抗炎镇痛作用的初步研究[J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(4): 246-250.  
[11] 王身艳,潘扬,蒋亚平,等. 双向发酵对川乌指纹图谱及乌头碱类成分含量的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3712-3714.