

文章编号:1673-1689(2005)02-0038-03

中药黄芪对发酵生产灵芝多糖的影响

王玉红^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 徐鹏¹, 章克昌^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了中药黄芪对灵芝发酵生产灵芝多糖的影响, 确定了黄芪添加的可行性及最适添加量, 并对发酵产生的粗多糖进行分析, 通过 Sephadex G-75 凝胶对粗多糖进行初步分离和研究. 结果表明: 黄芪有利于灵芝在发酵中多糖的产生, 其多糖的组分发生变化, 有可能产生新的物质.

关键词: 灵芝; 黄芪; 多糖; 生物转化

中图分类号: TQ 920. 6

文献标识码: A

The Effect of *A. mongholicum* on Polysaccharides in *Ganoderma lucidum* Fermentation

WANG Yu-hong^{1,2}, DING Zhong-yang^{1,2}, XU Peng¹, ZHANG Ke-chang^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *A. mongholicum* was added to the medium of *Ganoderma Lucidum* polysaccharides fermentation for the purpose of effective polysaccharides production. The result showed that polysaccharides production could be improved when adding proper amount of *A. mongholicum*, and the polysaccharides group II formed might be new material.

Key words: *Ganoderma lucidum*; *A. mongholicu*; polysaccharides; bio-transform

液体深层发酵技术应用于药学领域已越来越广泛, 一些研究中药现代化的学者提出了中药的发酵技术^[1]. 从生物学的观点看, 由于微生物本身的固有特点, 便于实现工业化大规模生产; 中药中大量的次生代谢产物可参与微生物的代谢, 抑制或促进微生物的生长, 中药中的活性成分也有可能被微生物转化或修饰, 产生新的物质, 为研发新药提供了一条可能的途径.

灵芝^[2] (*Ganoderma lucidum*) 为灵芝科灵芝属

药用真菌, 始载于《神农本草经》, 为滋补强壮、扶正固本的珍品, 作为药物已有悠久的历史.

黄芪^[3] 是豆科植物荚膜黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 和蒙古黄芪 (*A. mongholicum*) 的干燥根, 其中含有皂甙类、黄酮、多糖、多种氨基酸及微量元素, 具有利尿、降压、强心、提高机体免疫力和抗衰老等功效. 作者初步研究了黄芪的添加量对灵芝发酵生产多糖的影响.

收稿日期: 2004-03-08; 修回日期: 2004-04-07.

作者简介: 王玉红 (1975-), 女, 江苏连云港人, 生物工程硕士研究生.

万方数据

1 材料与方法

1.1 菌种

灵芝(*Ganoderma lucidum*),由江南大学生物资源实验室筛选保藏

1.2 斜面保藏培养基

土豆汁 20 g/dL,葡萄糖 2 g/dL,琼脂 2 g/dL, pH 值自然.

1.3 种子培养基

酵母膏 1 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,葡萄糖 2 g/dL,pH 值自然.

1.4 发酵培养基

酵母膏 1 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,葡萄糖 2 g/dL,pH 值自然.

1.5 加药培养基

发酵培养基加适量的中药黄芪(黄芪粉碎过 40 目筛).

1.6 灵芝培养方法

1.6.1 灵芝一级种子培养 250 mL 三角瓶,装液量 75 mL,接种 2~3 块黄豆粒大小的斜面菌块,于旋转式摇床培养.培养条件为:30 ℃,150 r/min 培养 7 d.

1.6.2 灵芝发酵培养条件 500 mL 三角瓶,装液量 150 mL,接种量体积分数 10%,于 30 ℃,150 r/min 培养 4~6 d^[4].

1.7 粗多糖质量浓度的测定

采用苯酚-硫酸法^[5,6],取一定量(100 mL)的发酵液,离心分离后取上清液测定其胞外粗多糖,取沉淀的菌体测定其胞内粗多糖.

1.8 多糖的 Sephadex G-75 色谱分析

色谱条件:常压常温,Sephadex G-75 自装柱(11.0 mm×400 mm)^[7,8];检测仪:8823A—紫外及 KNAUER 示差折光双检测仪;记录仪:LKB 双针式记录仪;流动相:0.05 mol/L pH 7.6 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤.

2 结果与讨论

2.1 添加的可行性

灵芝属腐生菌,胞内存在纤维素酶系,可以利用中药中的单糖、纤维等组分,而它们对灵芝的生长可能产生促进或抑制作用,灵芝亦可对中药中的某些组分进行转化或修饰^[1,9].

在原发酵培养基的基础上添加 1.5 g/dL 的黄芪进行发酵,在发酵液 pH 值达到 3.8~4.1 时结束

发酵^[4],考察其可行性,结果见表 1. 结果发现添加了黄芪后适当延长发酵时间,虽然菌体湿重和胞内粗多糖比不添加黄芪的灵芝发酵液有少许的降低,但生长基本正常,且同原灵芝发酵液相比,其多糖指标影响不大.

表 1 添加黄芪对灵芝发酵的影响

Tab. 1 The Effect of *A. mongholicum* on *Ganoderma Lucidum* fermentation

黄芪添加量/ (g/dL)	发酵 终了 pH 值	菌球湿重/ (g/dL)	胞内粗多糖质量 浓度/(mg/dL)
0(发酵 96 h)	3.8	55.2	122
1.5(发酵 120 h)	4.0	42.6	109

2.2 黄芪添加量

在上述基础上,对黄芪的最适添加量进行考察,以发酵液的 pH 值达到 3.8~4.1 时结束发酵^[4],结果见图 1.

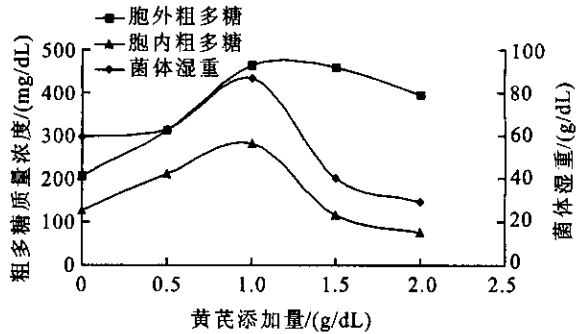


图 1 黄芪添加量对多糖生产的影响

Fig. 1 The effect of *A. mongholicum*'s concentration on polysaccharides

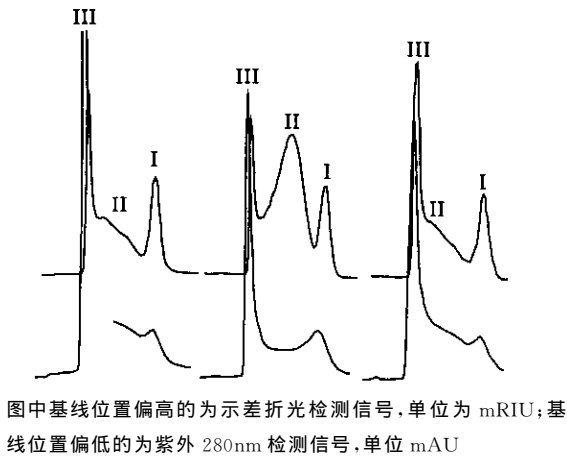
从图 1 可以看出:随着黄芪添加量的增加,发酵液中的生物量也在增加,当黄芪添加量增加到 1.0 g/dL 时,其菌体湿重达到最高,为 86.4 g/dL;再进一步添加黄芪,生物量明显下降,说明此时黄芪对灵芝发酵产生抑制.

从图 1 还可以看出,当添加 1.0 g/dL 黄芪时,发酵液中胞内和胞外粗多糖质量浓度均达到最高,分别为 281.5 mg/dL 和 463.9 mg/dL 发酵液;而进一步增加黄芪的添加量,两者均有不同程度的下降.由于黄芪本身也含有多糖成分,发酵液中胞外粗多糖的质量浓度实际上包括灵芝分泌的胞外多糖和黄芪所带入的未被利用的多糖的总和,因此,在进一步增加黄芪的添加量后虽然灵芝生长受到抑制,生物量明显下降,导致灵芝分泌的胞外多糖质量浓度的下降,但胞外粗多糖的曲线在黄芪添加量超过 1.0 g/dL 后其下降并不明显;而胞内粗多糖的质量浓度则下降幅度较大.黄芪的最佳添加量为 1.0 g/dL,在该质量浓度下黄芪对灵芝的生长和灵

芝多糖的产生均有促进作用。

2.3 灵芝胞外粗多糖的 Sephadex G-75 色谱分析

Sephadex G-75 凝胶柱对多糖的分离范围为 5 000~80 000, 比较适合于灵芝胞外多糖的分离。将粗多糖初步处理后分别上样, 所得图谱见图 2(N_1 为含 1 g/dL 黄芪的加药培养基(未发酵), N_2 为添加 1 g/dL 黄芪发酵所得的灵芝发酵液, N_3 为不添加黄芪发酵所得的灵芝液发酵)。



图中基线位置偏高的为示差折光检测信号, 单位为 mRIU; 基线位置偏低的为紫外 280nm 检测信号, 单位 mAU

图 2 Sephadex G-75 图谱

Fig. 2 Sephadex G-75 chromatogram of polysaccharides
图谱表明, 样品 N_1 , N_2 , N_3 经 Sephadex G-75 分离后, 粗分为 3 个组分。

由标准蛋白校正 Sephadex G-75 柱, 可得相对分子质量与洗脱液体积存在下列关系式:

$$\lg M_r = -0.0337V_e + 5.4099$$

其中, V_e 为洗脱体积 (mL); M_r 为相对分子质量, 所得结果见表 2。

表 2 Sephadex G-75 图谱中有关数据

Tab. 2 The main data of the main peak

样品	洗脱体积/mL			对应相对分子质量		
编号	峰 I	峰 II	峰 III	组分 I	组分 II	组分 III
N_1	14.70	21.00	41.50	82132	50373	10265
N_2	14.40	27.70	41.50	84066	29951	10265
N_3	14.00	20.50	41.00	86716	52366	10671

分析上述数据, 发现 N_2 的第二个组分所对应的相对分子质量明显降低, 由约 50 000 降至约 30 000, 且处在活性多糖的相对分子质量范围内^[2], 此组分是由于添加黄芪发酵后产生的, 可能是新的物质, 因而该组分有进一步分析研究的价值。

从相对含量的关系上, 对上述图谱进行分析, 结果见表 3。

表 3 3 种组分的相对含量分析

Tab. 3 Relative content of the three groups

样品	峰面积			相对质量分数/%		
	峰 I	峰 II	峰 III	组分 I	组分 II	组分 III
N_1	337.68	570.00	230.00	29.68	50.10	20.22
N_2	193.20	1103.20	225.00	12.70	72.51	14.79
N_3	263.04	512.00	231.84	26.12	50.85	23.03

综合图 2 及表 2, 3, 可以发现 3 个样品的组分 II 均为各自胞外多糖的主要组分, 但它们在各自多糖组分中的相对含量并不相同。添加黄芪发酵后所获得的胞外多糖组分 II 的检测信号形成的是一个基本对称的单一峰, 而其它两个样品组分 II 的峰形并不十分明显, 推断这两个组分 II 可能是相对分子质量接近的一系列多糖的混合物。同时值得注意的是, N_1 和 N_3 的组分 II 的相对分子质量接近, 而 N_2 的组分 II 的相对分子质量与前两者有着约 20 000 的差别。综上所述, 黄芪对灵芝发酵生产多糖的组分产生影响, 推测有可能有新的组分产生。

3 小 结

初步研究发现, 在发酵培养基中添加适量的黄芪能促进灵芝的生长和灵芝多糖的产生。黄芪的最适添加量为 1.0 g/dL, 此时发酵液中菌体湿重为 86.4 g/dL, 胞内和胞外粗多糖质量浓度分别达到 281.5 mg/dL 和 463.9 mg/dL。由于黄芪本身亦含有多糖成分, 发酵液中胞外粗多糖的质量浓度实际上包括灵芝分泌的胞外多糖和黄芪所带入的未被利用的多糖的总和。

用 Sephadex G-75 凝胶对胞外多糖的初步分离纯化表明: 添加黄芪发酵后所获得的胞外多糖的组分 II 的检测信号形成的是一个基本对称的单一峰; 而其它两个样品组分 II 的峰形并不十分明显, 推断这两个组分 II 可能是相对分子质量接近的一系列多糖的混合物。另外, 添加黄芪发酵后所获得的胞外多糖的组分 II 的相对分子质量与另外两者有着约 20 000 的差别。因此, 黄芪对灵芝发酵生产多糖的组分产生影响, 推测有可能有新的组分产生, 其中组分 II 有进一步分析研究的价值。

(下转第 45 页)

的效率可以构建得到用于生物转化法生产茶氨酸的工程菌.

虽然构建的重组菌产 γ -谷氨酰基转肽酶的能力有明显提高,但是与其它利用 pEtac 构建的重组菌中目的蛋白表达量的提高倍数相比,GGT 活性的提高倍数较低. GGT 是周质蛋白,因此它的翻译后的加工过程,如信号肽的切除、大小亚基的形成、蛋白质的折叠等均发生在周质空间中. 如果 GGT 前体不能顺利到达周质空间,可能造成 GGT 在胞内的积累,反馈抑制 GGT 的合成. 即使在强启动子的作用下大量提高了 GGT 前体的生成量,也会因

为 GGT 前体不能顺利转运而大部分以未切去信号肽的前体分子形式聚集在胞内或结合在内膜内侧形成包涵体. 因此翻译后的转运和加工过程也是提高大肠杆菌中 GGT 表达活性的影响因素,很可能是 GGT 前体转运效率的偏低限制了强启动子提高细胞 GGT 活性的能力. 为考察转运过程对提高 GGT 表达活性的影响,可以将既不含有自身信号肽编码序列,也不含自身启动子的 γ -谷氨酰基转肽酶基因接入同时具有强启动子和强信号肽序列的载体来表达 *ggt* 基因,以观察在强启动子和强信号肽协同作用下 γ -谷氨酰基转肽酶的表达活性.

参考文献:

[1] Hiromichi M. Salt-tolerant γ -Glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2003,32:431—438.

[2] Suzuki H. Enzyme production of theanine,an umami component of tea,from glutamine and ethylamine with bacterial γ -Glutamyltranspeptidase[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2002,31:884—889.

[3] 沈微,王正祥,唐雪明,等. 古细菌 *Pyrococcus furiosus* 高嗜热 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 中国酿造,2003,124:12—14.

[4] Suzuki H, Kumagai H, Tochikura T. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12 purification and properties[J]. **J Bacteriol**,1986,168:1325—1331.

[5] Nov agen Inc. pET System Manual[M]. Wisconsin:Novagen Inc,2000.

[6] Varuzhan H Abelian. A novel method of production of theanine by immobilized *pseudomonas nitroreducens* cells[J]. **Biosci Biotech Biochem**,1993,57(3):481—483.

[7] Suzuki H, Kumagai H. Autocatalytic processing of γ -Glutamyl transpeptidase[J]. **J Biol Chem**,2002,277:43536—43543.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 40 页)

参考文献:

[1] 庄毅. 中国药用真菌概况[J]. 中国食用菌,2001,20(2):3—5.

[2] 李师鹏,安利国. 真菌多糖免疫活性的研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(4):581—587.

[3] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.

[4] 李平作. 灵芝深层发酵生产生物活性物质的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学,1997.

[5] 何国亮. 灵芝饮品中灵芝肽多糖含量的测定[J]. 营养学报,1998,20(1):102—104.

[6] Anello J D, Baugher J E, Paul E, *et al*. Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of haemophilus influenzas type[J]. **Analytical Biochemistry**, 1997, 250: 280.

[7] 张惟杰. 复合多糖生化技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.

[8] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 北京:科学出版社,2002.

[9] 李雁群. 中药的灵芝发酵及其产物抗乙肝活性的研究 [D]. 无锡:江南大学,2004.

(责任编辑:李春丽)