

## 苦荞对灵芝发酵生产灵芝酸的影响

王玉红 丁重阳 章克昌

(江南大学生物工程学院生物资源研究室, 无锡, 214036)

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

**摘 要** 研究了苦荞的添加对灵芝酸发酵的影响。结果证明,苦荞有利于灵芝发酵液中灵芝酸的产生,从而间接地证明灵芝对苦荞的生物转化可能会有增效作用。

**关键词** 灵芝,灵芝酸,苦荞,HPLC

灵芝酸是近年来发现的灵芝中除多糖外的另一类具有明显药理活性的化合物,有止痛、镇静、抑制组织胺、解毒、保肝、毒杀肿瘤细胞等功能<sup>[1]</sup>。在化学结构上属于四环三萜类化合物,是由 2 个分子的焦磷酸合欢酯(EPP)尾接尾缩合成鲨烯酯,经闭和转位成三萜化合物,其分子中含有羧基的统称为灵芝酸<sup>[2]</sup>。苦荞麦俗称苦荞,是一种药食两用植物,具有降压降脂的功能。通过向培养基中加入苦荞有可能增强灵芝的特殊疗效。文中研究了苦荞的添加对灵芝发酵生产灵芝酸的影响。

## 1 材料与方法

## 1.1 菌 种

灵芝(*Ganoderma lucidum*):本实验室筛选保存。

## 1.2 种子培养

斜面培养基:PDA。

液体种子培养基:酵母膏 1%,蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,pH 自然。

液体种子培养方法:250 mL 摇瓶装量 100 mL,接种 2~3 块黄豆粒大小的斜面菌块,置于旋转式摇床,转速 150 min,30℃培养 7 d。

## 1.3 深层发酵

基础培养基:同种子培养基。

苦荞培养基:基础培养基中适量添加苦荞。

## 1.4 发酵液中灵芝酸的提取

有机溶剂提取法。

1.5 灵芝酸的萃取<sup>[3]</sup>

取浓缩过的提取液→水饱和正丁醇萃取 3 次→合并萃取液→真空蒸干→粗灵芝酸

## 1.6 灵芝酸的定性分析

1.6.1 柴可夫斯基反应(Salkowaki)<sup>[4]</sup>

取少量样品溶于适量  $\text{CCl}_4$  中,沿试管壁加入到浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中,若两液面交界处变为深红色或棕红色,说明有三萜类化合物存在。

1.6.2 李伯曼反应(Libermann-Burchard)<sup>[4]</sup>

取少量样品溶于适量醋酐中,沿试管壁加入到浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中,若两液面交界处呈红色并逐渐变为深绿色,说明有三萜类化合物存在。

1.6.3 HPLC 分析<sup>[3]</sup>

色谱柱为 Lichro CART<sup>®</sup>250—4(C 18 柱),紫外检测波长为 254 nm,流动相缓冲液见表 1。

1.6.4 灵芝酸的测定<sup>[5,6]</sup>

将提取的灵芝酸样品溶于适量的甲醇,以甲醇为空白在紫外分光光度计上测定吸光度,粗灵芝酸含量由下式计算

$$\text{灵芝酸(g/L)} = (A \times 0.1317 - 0.0028) \times 0.75 \times n$$

式中  $A$  为 OD 值; $n$  为稀释倍数。

表 1 HPLC 的流动相缓冲液

时间/min	流速/mL·min <sup>-1</sup>	A/%	B/%
开始	1.0	100	0
10.0	1.0	54	46
10.5	1.0	0	100
11.5	1.0	0	100
12.0	1.5	0	100
12.5	1.5	100	0
20.0	1.5	100	0
20.5	1.0	100	0

A 液:11.45 mL 无水乙酸钠溶于 1 L 超纯水中,取此液 940 mL 加入色谱纯乙腈 60 mL;

B 液:取 600 mL 乙腈,加超纯水至 1 000 mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方式添加苦荞对灵芝酸生成的影响

苦荞的营养丰富,将其按 A、B、C、D 不同的方式加入到灵芝的培养基中,对灵芝酸的发酵有一定的影响。其结果见表 2。

表 2 不同添加方式对灵芝酸的影响

添加方式	灵芝酸/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
A(对照)	0.134
B	0.137
C	0.168
D	0.243

从表 2 中可看出, B、C、D 的灵芝酸含量都比对照高,尤其是 D 的灵芝培养液中灵芝酸含量明显增加。可见,苦荞对灵芝发酵产灵芝酸有一定的促进作用。

### 2.2 苦荞添加量对灵芝发酵的影响(表 3)

表 3 在培养基中添加不同比例的苦荞对灵芝发酵的影响

苦荞加 入量 /%	发酵液 pH 值	84 h		发酵液 pH 值	96 h	
		灵芝酸/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胞外	胞内		灵芝酸/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胞外	胞内
0.0	4.20	0.089	0.148	3.98	0.128	0.239
0.5	4.26	0.193	0.227	4.12	0.147	0.206
1.0	4.20	0.150	0.236	4.06	0.166	0.294
1.5	4.15	0.179	0.248	3.99	0.153	0.338
2.0	4.16	0.133	0.230	4.22	0.151	0.246

由表 3 的结果可看出,加 1.5% 苦荞时,灵芝酸的含量最高,同时可看出,胞内(菌丝体)的灵芝酸含量远高于发酵液中含量。

### 2.3 定性分析

将得到的灵芝酸提取液分别进行柴可夫斯基反应(Salkowaki)和李伯曼反应(Libermann-Burchard),两液面交界处都呈现颜色反应,说明有三萜类化合物存在。

### 2.4 HPLC 分析

马礼金<sup>[3]</sup>等利用 Thymol 作外标,在紫外检测波长为 254 nm 处,对灵芝酸子实体及菌丝体中的灵芝酸进行了高压液相分析,得出了 7 个明显的峰,本实验通过对 4 种方式(A、B、C、D),在 1.5% 的苦荞添加量下得到的灵芝酸粗提液采用相同的分析条件,进行了分析,其结果见图 1~图 4。

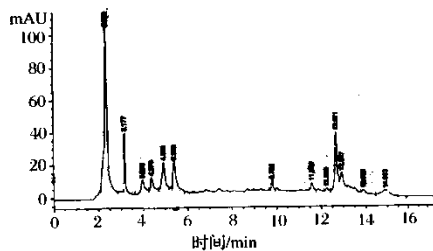


图 1 A 的粗灵芝酸的 HPLC 图

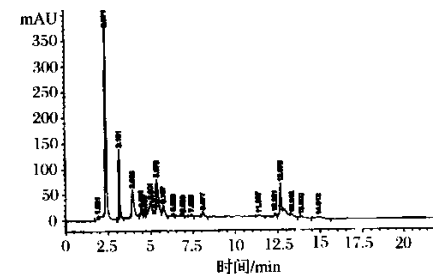


图 2 B 的粗灵芝酸的 HPLC 图

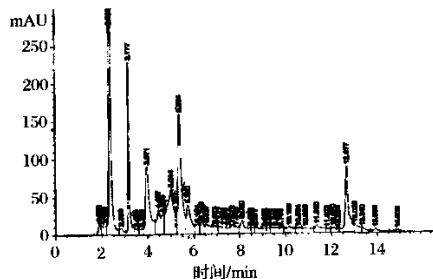


图 3 C 的粗灵芝酸的 HPLC 图

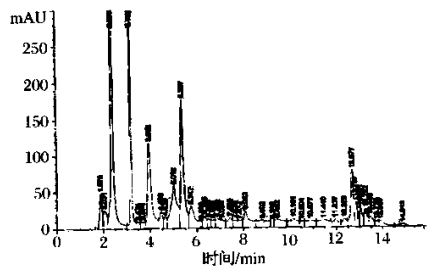


图 4 D 的粗灵芝酸的 HPLC 图

表 4 图中的主要峰的保留时间及对应的峰面积

编号	保留时间/min					总计
	2.358	3.177	4.930	5.398	12.671	
	峰 面 积					
A	926.33	121.03	147.88	167.34	205.30	1567.88
B	1705.98	452.96	509.97	502.74	289.04	3460.69
C	3384.22	880.92	1158.44	1635.92	974.89	8034.39
D	3488.32	1132.40	1058.93	1670.34	813.56	8163.55

从图 1~图 4 及表 4 中可看出,各图都有 5~7

个相同的明显的峰,这些峰的保留值与文献报道的基本相同,而且总峰面积占绝对的优势,从而初步判定提取液中主要是灵芝酸。同时将图 1 和图 2、3、4 进行比较还可以发现,图 2、3、4 的主要峰的峰值和图 1 相比都明显增加。进一步证明苦荞对灵芝发酵生产灵芝酸有明显的促进作用。

### 3 讨 论

用微生物转化中药及其他有生物活性物质成为近年来的研究热点,笔者在灵芝发酵液中添加苦荞,发现能促进灵芝酸的产生,同时确定了较适合的苦

荞添加量为 1.5%,此时发酵产灵芝酸效果最好。用 HPLC 等检测,进一步证明了苦荞对灵芝发酵生产灵芝酸有明显的促进作用。关于添加苦荞的灵芝发酵,其生理功能是否如预期的那样会有增效作用还有待于进一步的动物实验结果验证。

### 参 考 文 献

- 1 Liu G-T et al. Chem Med J, 1979, 92: 496 ~ 500
- 2 王宪楷. 天然药物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988
- 3 马礼金等. 中国食用菌, 1997, 17(1): 3 ~ 5
- 4 中国医学科学院研究所编. 薄层层离及其在中草药分析中的应用. 北京: 科学出版社, 1978
- 5 李平作. 江南大学博士论文, 1997
- 6 白芳静. 江南大学硕士论文, 2000



## 我国灵芝产品将首获国际市场通行证

历时 2 年多,经过反复的药理成分鉴定和功能测试后,我国首家液态浓缩剂型灵芝保健产品——山人灵芝液,已于日前正式通过美国食品药品监督管理局(FDA)的技术检测,第一批山人灵芝液将于 2004 年 3 月在美国、韩国原装上市。

1995 年,重庆山人生物工程有限公司就针对我国灵芝保健品市场 90% 的产品都是冲剂类、胶囊类的特点,与中科院微生物研究所就国内首家液态浓缩剂型灵芝保健品的研发展开了相关的技术合作。山人灵芝液采用的是精选的、不含有任何灭菌剂、杀虫剂的赤芝菌种,并运用传统医学与现代生物工程技术相结合的方法高倍浓缩而成。由于其萃取技术科技含量高,所以在通过 FDA 成分检测时每 100mL 灵芝液中所含的灵芝多糖成分高达 4.8 ~ 6.3g,这也正是山人灵芝液能顺利通过检测的主要原因。

有关专家认为,首家灵芝保健品获得 FDA 检测,标志着我国的灵芝保健产品将正式取得国际市场“通行证”,有千年历史的中国灵芝产品从此将可以进入国际市场。

### 欢迎订阅

#### 2004 年《中外葡萄与葡萄酒》杂志

《中外葡萄与葡萄酒》杂志是中国酿酒工业协会和山东省酿酒葡萄科学研究所主办的国内唯一一份有关葡萄与葡萄酒的科技期刊,它是葡萄与葡萄酒行业人士总结经验,切磋技艺,发表论文,交流信息的咨询园地。杂志宣传国家有关葡萄、葡萄酒的方针政策,普及中外葡萄、葡萄酒的科学知识,推广新品种,新技术,新工艺,新设备;交流科技信息,市场营销信息。是一份内容丰富、技术先进、可读性强的国内期刊。

杂志为双月刊,双月末发行,彩页丰富,印刷装帧精美,每期定价 9.5 元,全年 57.00 元(含邮费)。需挂号邮寄者,每册另加 2 元,全年另加 12 元。还有部分“中国葡萄、葡萄酒 50 年”特刊,定价 30 元(含邮费)。

本刊编辑部常年办理汇款订阅业务。请订户汇款时用正楷字体详细写明您的邮政编码、地址、姓名、订数。订户如需要发票请注明索取。

地址:山东济南工业南路 103 号 邮编 250100

电话(0531)8524875 传真(0531)8923371

E-mail: vinewine@jn-public.sd.cninfo.net

#### 2004 年《上海调味品》改为双月刊

#### 欢迎订阅 邮发代号 4-598

《上海调味品》受到广大读者的喜爱,不断发展,2004 年由季刊改为双月刊,刊名改为《食品与调味》,现正在审批。

该刊办刊宗旨是:反映食品、调味品行业的最新科技成果,以及调味品在食品行业及其相关领域的应用和推广,以推动科、工、贸的有效联接和协调发展,使之在反映科技信息、指导生产、引导消费、推广科研成果方面,发挥积极的作用。

《上海调味品》主要栏目有:导读、高层来风、专家论谈、热点报道、市场剖析、品牌战略、创新展台、企业家心声、百味调和、世界之窗、国际供求、食界新星、食市排行榜、信息双通道、美食谭等。

《上海调味品》为双月刊,每双月 10 日出版,大 16 开本 48 页,全彩版,单价 6 元,全年 36 元。

国际标准刊号 ISSN1007-9521,国内统一刊号 CN31-1290/TS。

本刊地址:上海市外马路 1469 号,邮编:200011,电话(021)63146743

欢迎赐稿 欢迎投放广告