

论 著

(药学研究)

# 灵芝菌固体发酵感冒清热颗粒药渣的主要活性物质变化研究

张庆明, 徐云燕, 陈美惠, 孙志伟, 苏 华

**【摘要】 目的** 采用固体发酵技术,研究灵芝菌固态发酵感冒清热颗粒药渣过程中的主要活性物质变化,为感冒清热颗粒药渣的再利用提供依据。**方法** 以多糖、灵芝酸和黄酮类化合物为检测指标,考察药渣粒径、药渣浓度、固液比和培养时间等因素对灵芝菌发酵感冒清热颗粒药渣的影响。**结果** 结合单因素和正交实验结果表明,当固液比 1:2,粒径 30 目、10% 药渣,发酵 30 d 时,获得的多糖和灵芝酸含量最高。**结论** 多糖和灵芝酸是灵芝菌固态发酵感冒清热颗粒药渣产生的活性物质,发酵参数的变化显著影响了发酵过程两种活性物质的产量,为中药渣资源的再利用提供了合理依据。

**【关键词】** 灵芝菌;感冒清热颗粒药渣;双向发酵;多糖;灵芝酸

**【中图分类号】** Q815 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)06-0616-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.06.014

## Study on the changes of main active substances in *Ganoderma lucidum* solid fermentation Ganmao Qingre Granule drug residue

ZHANG Qing-ming, XU Yun-yan, CHEN Mei-hui, SUN Zhi-wei, SU Hua

(Department of Preparations, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes of main active components in solid fermentation process of *Ganoderma lucidum* and Ganmao Qingre dreg residue, and then provide a basis for the reuse of Ganmao Qingre dreg residue. **Methods** The effects of main fermentative parameters including drug residue concentration, solid-liquid ratio, and particle size on the yield of active compounds by using the contents of polysaccharide, ganoderic acid, and flavonoids as the detection index. **Results** The results obtained from single factor and orthogonal experiments showed that the content of polysaccharide and ganoderic acid was the highest, when the mixture was fermented for 30 days with the 1:2 ratio of solid to liquid, the 30 mesh particle size and 10% residue. **Conclusion** Polysaccharides and *Ganoderma lucidum* acid are the main active substances produced by *Ganoderma lucidum* solid fermentation Ganmao Qingre Granule drug residue. The changes of fermentation parameters significantly affect the yield of the two active substances in the fermentation process.

**【Key words】** *Ganoderma lucidum*; Ganmao Qingre dreg residue; bi-directional fermentation; polysaccharide; ganoderic acid

## 0 引 言

灵芝(*Canoderm lucidum*)俗称灵芝草,是一种珍贵的药用真菌。目前的研究表明,灵芝主要药用成分为,灵芝多糖、灵芝酸、腺苷、氨基酸、微量元素、纤维素等,因而具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗炎镇痛、抗血栓、抗动脉硬化等作用<sup>[1]</sup>。随着我国中药

基金项目:南京军区南京总医院院管课题(2017042)

作者单位:210002 南京,东部战区总医院(原南京军区南京总医院)

制剂科(张庆明、徐云燕、陈美惠、孙志伟、苏 华)

通信作者:苏 华, E-mail: suhuash@sina.com

事业的发展以及人们对保健方面的重视程度日益增长,中药生产加工过程中产生的药渣也逐渐增多。依据“药用真菌双向发酵工程”的理论,利用灵芝菌对中药渣进行发酵再利用,已成为目前研究热点之一。近年来,研究者构建了妇科千金片药渣、三七药渣等和灵芝菌的双向发酵体系<sup>[2]</sup>,研究了最佳的发酵工艺和发酵过程中主要活性物质的变化。笔者前期利用灵芝菌发酵玄七痛痹胶囊药渣,探讨了不同培养基组成及发酵条件对多糖、灵芝酸和皂苷等活性物质产量的影响,并且还在多糖组份和灵芝酸组份中发现了新物质的生成<sup>[3-4]</sup>。然而,我国中药的种类繁多,现有研究远不能满足药渣资源再发酵利用的需要<sup>[5-6]</sup>。

感冒清热颗粒是我院内制剂,用于疏风散寒、解表清热,其组成成分为荆芥穗、苦地丁、芦根及防风等,主要活性物质有黄酮化合物及多糖。该药物在临床使用中受到了患者的广泛好评,用量日益增加,与此同时,药渣产量巨大,目前还未有感冒清热颗粒药渣综合再利用的报道。本研究基于双向发酵理论<sup>[7]</sup>,研究灵芝菌在感冒清热颗粒药渣上的发酵特性,优化发酵工艺,探究发酵过程中主要活性物质的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 设备** SW-CJ-1D 超净工作台、303-3 型电热培养箱、CP224C 电子天平、GI54DWS 型高压灭菌锅、RE-85C 旋转蒸发仪、TGL-18MS 型离心机、紫外分光光度计。

**1.2 中药渣** 感冒清热颗粒药渣由本院生产车间提供,湿物料经烘干、粉碎过筛后备用。经检测所用药渣中主要成分的质量分数如下:蛋白质 17.2%,粗纤维 37.3%,粗多糖 3.1%,总黄酮 10.6%。

### 1.3 培养基

**1.3.1 平板培养基** 马铃薯浸取液 1 L,葡萄糖 35 g,无水  $\text{MgSO}_4$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,琼脂粉 15 g,调 pH 至 6.5,于 121 °C 灭菌 30 min。

**1.3.2 种子培养基** 葡萄糖 300 g,酵母粉 5 g,玉米浆冻干粉 2 g,无水  $\text{MgSO}_4$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g。

**1.3.3 固体发酵培养基** 以麸皮与药渣为培养基质,添加一定量的水。

**1.4 培养方法** 从灵芝斜面培养基上挑取一块约 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的菌种接种到平板培养基中,于 28 °C 下恒温培养 5 d。将活化后的菌种接种到装液量为 50 mL 的种子液培养基中,置于恒温空气浴振荡器中,

28 °C、转速 150 r/min 条件下培养 3 d。

**1.5 灵芝菌固态发酵中药渣的单因素实验** 分别考察药渣粒径(A)、药渣含量(B)、固液比(C)及培养时间(D)四个主要因素对灵芝菌-感冒清热颗粒药渣双向发酵体系的影响,以发酵产物中多糖、灵芝酸及总黄酮的含量变化作为评价指标。本研究选择固液比发酵培养基,发酵结束后分别测定多糖及灵芝酸的含量。从发酵开始,测定每阶段菌质多糖含量。

**1.6 发酵条件正交优化实验** 在单因素实验的基础上,采用正交实验表  $L_9(3^4)$  对药渣粒径、药渣浓度、固液比和培养时间进行 4 因素 3 水平的正交实验,每个实验处理 3 个重复。通过对结果的极差和方差进行分析,确定发酵产多糖和灵芝酸的组合为最佳条件。

**1.7 发酵菌质中主要成分的提取** 待发酵结束后,将发酵培养物置于烘箱中烘干置恒重,烘干温度为 50 °C,进而粉碎,过 60 目筛,分装保存备用。

**1.7.1 多糖的提取** 称取粉碎样品 10 g,加水 200 mL,于 95 °C,回流提取 2 h。旋蒸浓缩至一定体积后加入乙醇,至乙醇终浓度达到 85%,静置过夜,离心。沉淀加适量水复溶,用 20% 的三氯乙酸溶液调 pH 至 3,静置 4 h 除蛋白,离心去沉淀,pH 调回中性,乙醇沉淀后获得多糖样品<sup>[8]</sup>。

**1.7.2 灵芝酸的提取** 称取粉碎样品 10 g,置于 100 mL 的 95% 乙醇溶液中,回流提取 2 h,过滤,弃掉滤渣。上清液置于旋转蒸发器中,旋蒸干。用 100 mL 氯仿溶解,60 mL 饱和碳酸氢钠分 3 次萃取,合并所得的上层液。调 pH 至 2~3,用 50 mL 氯仿分 2 次萃取,经减压浓缩干燥得灵芝酸粗品<sup>[9]</sup>。

**1.7.3 总黄酮物质的提取** 称取粉碎样品 10 g,置于 300 mL 的 70% 乙醇溶液中,回流提取 2 h,过滤收取滤液,将滤液置于旋转蒸发器中,旋蒸干获得总黄酮物质<sup>[10]</sup>。

**1.8 分析方法** 多糖的测定方法:苯酚-硫酸法<sup>[11]</sup>;蛋白的测定方法:考马斯亮蓝法<sup>[12]</sup>;灵芝酸的测定方法:草醛冰醋酸-高氯酸显色法<sup>[13]</sup>;黄酮类物质的测定方法: $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法<sup>[10]</sup>。粗纤维根据相应的国标检测(GB 5009.88-2014)。

## 2 结果

**2.1 药渣粒径对灵芝菌-药渣发酵的影响** 当药渣粒径为 40 目、50 目时,多糖发酵产量较好,其中 40 目时,多糖产量最高,达到了 32.4 mg/g 菌质。粒径

为 20 目、30 目时多糖的产量较低,可能是基质间空隙过大,造成基质失水所致。粒径为 70 目时,多糖降低,可能是基质粒径过小,透气性差,氧供给率、散热率低所致。见图 1。药渣粒径为 20 目时灵芝酸的产量较低,为 0.48 mg/g 菌质。药渣粒径为 70 目时灵芝酸产量较 50 目、60 目偏低,可能是因培养基过于紧密、透气性差所致。灵芝酸产量最高为 40 目过筛,为 0.96 mg/g 菌质。药渣粒径对总黄酮含量的影响与多糖和灵芝酸相反,在 20 目和 60 目时,黄酮类物质含量为 8.9 mg/g 菌质和 9.7 mg/g,而 40 目时仅为 1.2 mg/g,该结果表明,生长良好的灵芝菌能代谢黄酮类物质,但合成黄酮类物质的能力可能较弱。

**2.2 药渣浓度对灵芝菌-药渣发酵的影响** 随着药渣浓度的增加,多糖的产量逐步增加,当药渣添加量为 10% 时,多糖产量达到最大(25.7 mg/g 菌质)。当药渣浓度低于 10% 时,灵芝酸的产量略有下降,但当药渣浓度高于 10% 时,灵芝酸的产量大幅度下降,当添加的药渣浓度为 50% 时,几乎无灵芝酸生成。见图 2。黄酮类化合物则随着药渣浓度的增加逐步增加,在药渣浓度为 50% 时最高(数据未列出)。因此

此选取药渣的添加量为 10%。

**2.3 固液比对灵芝菌-药渣发酵的影响** 随着含水量的增加,多糖产量逐步增加,在固液比为 2 时达到最大。而进一步增加含水量,多糖产量显著降低。见图 3。当固液比为 1:2.5 时,灵芝酸的产量达到最高。本研究表明,含水量较少时,固体基质无法满足灵芝菌丝生长所需湿度,主要活性成分产量较少;而当固液比为 1:3.0 即培养基含水量过大时,湿度过大,造成培养基的通气、散热差,不利于产糖。因此选择固液比为 1:2。

**2.4 发酵时间对灵芝菌-药渣发酵的影响** 发酵 0 d(全性基质)多糖含量最高,但发酵 10 d 时已下降近一半,说明灵芝消耗了固体培养基中较多的多糖,而 15 d 开始多糖含量逐步增加,而在 25 d 时达到最高,30 d 开始菌质多糖开始减少,可能随着菌丝体自溶或酶的分解作用,多糖含量又有所降低。灵芝酸含量变化与多糖不一致,菌质中一开始并不含有灵芝酸,随着发酵的进行逐渐增加,在 30 d 达到最大,随后也开始减少,说明菌体对灵芝酸进行了转化;而黄酮类物质随着发酵的进行逐步减少,说明菌体对黄酮类物质进行了转化。见图 4。

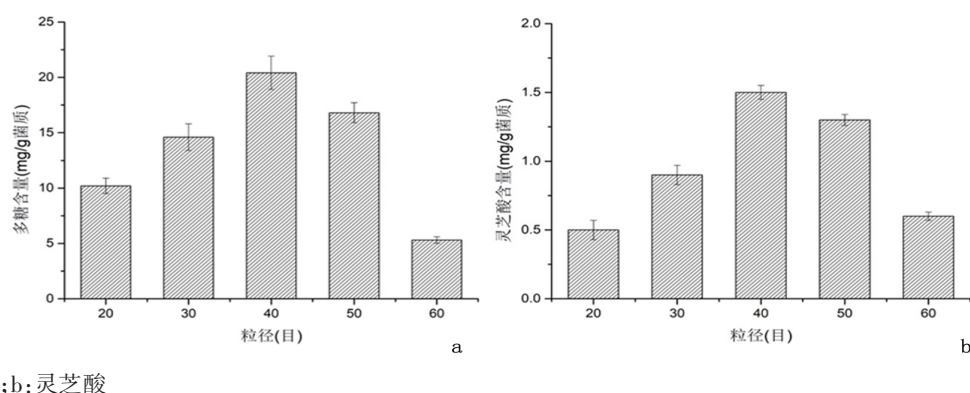


图 1 药渣粒径对灵芝菌药渣发酵产多糖及灵芝酸的影响

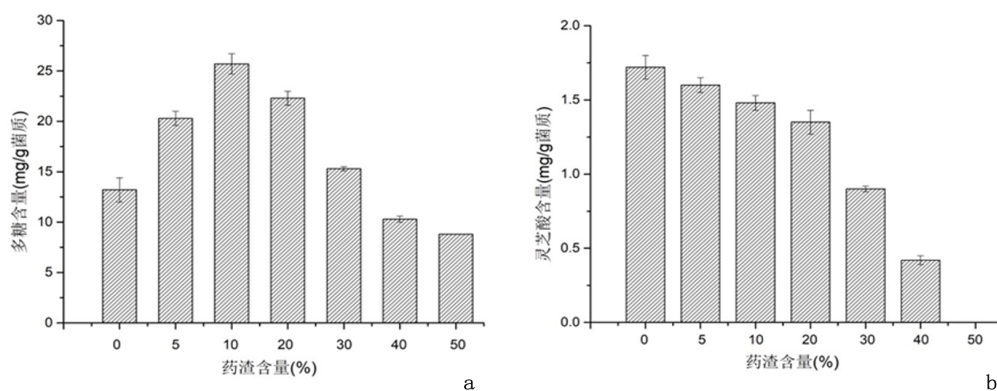


图 2 药渣浓度对灵芝菌药渣发酵产多糖及灵芝酸的影响



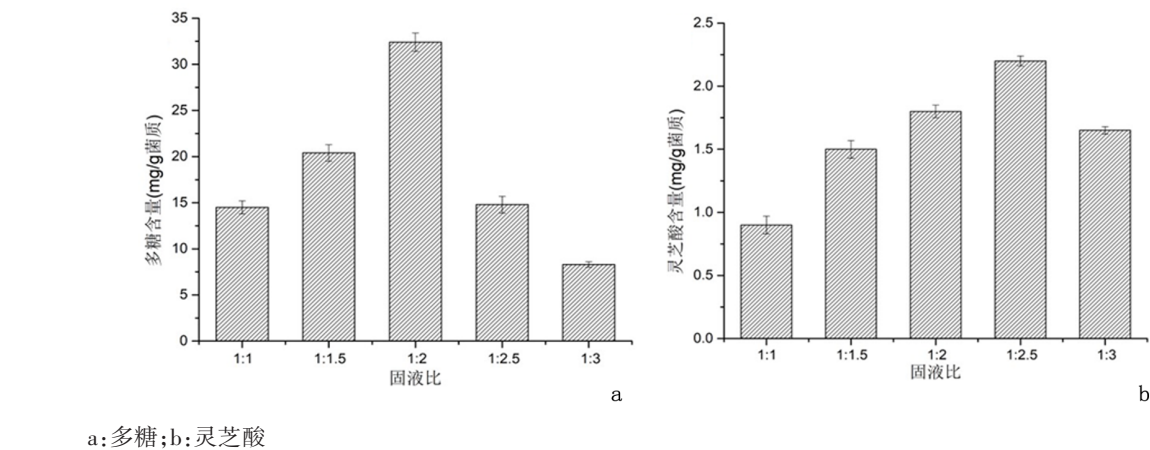


图3 固液比对灵芝菌药渣发酵产多糖及灵芝酸的影响

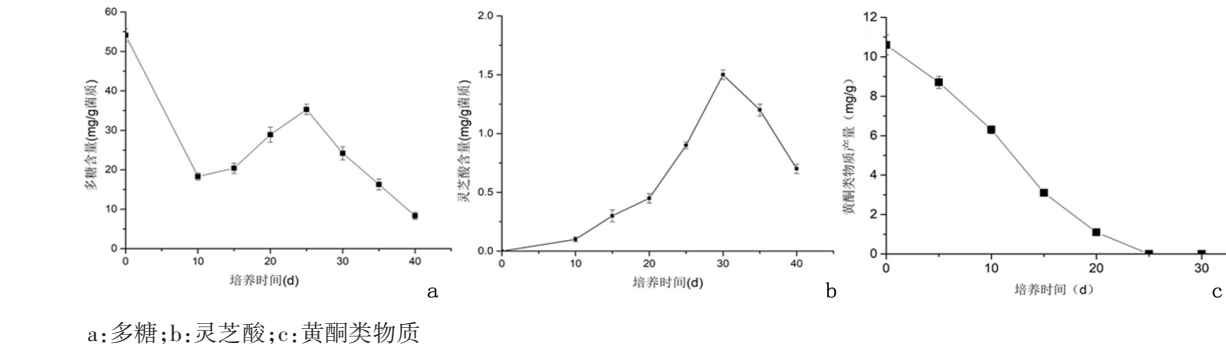


图4 灵芝菌-药渣发酵进程曲线

**2.5 正交分析药渣对灵芝发酵的影响** 由极差分析结果可知:在试验取值范围内,影响因素对灵芝菌产多糖和灵芝酸的影响不一致,见表1。对多糖影响最为显著的是固液比,其次是药渣粒径,再次是药渣含量,而影响最小的是发酵时间,见表2。从极差分析表中得出最优组合是C2>A1>B2>D3,即在固液比1:2,粒径30目、10%药渣,发酵30 d时,获得的多糖含量最高。另一方面,对于灵芝酸影响最为显著的是发酵时间,其次是固液比,再次是药渣粒径,而影响最小的是药渣含量。从极差分析表中得出最优组合是D3>C2>A1>B2,此时获得的灵芝酸最高。

表1 灵芝菌-感冒清热颗粒药渣固体发酵参数的正交试验设计

水平	因素			
	药渣粒径(A)	药渣含量(B)	固液比(C)	培养时间(D)
1	30	5	1:1.5	20
2	40	10	1:2	25
3	50	20	1:2.5	30

表2 灵芝菌-感冒清热颗粒药渣固体发酵参数的正交试验结果

试验号	药渣粒径(A)	药渣含量(B)	固液比(C)	培养时间(D)	多糖(mg/g)	灵芝酸(mg/g)
1	1	1	1	1	19.3	0.42
2	1	2	2	2	37.2	1.43
3	1	3	3	3	10.7	0.93
4	2	1	2	2	26.3	1.65
5	2	2	3	1	12.3	0.49
6	2	3	1	2	7.5	0.21
7	3	1	3	2	4.2	0.15
8	3	2	1	3	13.9	0.81
9	3	3	2	1	6.73	0.17
$K_1$	22.400	16.600	13.567	12.777		
$K_2$	15.367	21.133	23.410	16.300		
$K_3$	8.277	8.310	9.067	16.967		
$R$	14.123	12.823	14.343	4.190		
$\bar{K}_1$	0.927	0.740	0.480	0.360		
$\bar{K}_2$	0.783	0.910	1.083	0.597		
$\bar{K}_3$	0.377	0.437	0.523	1.130		
$\bar{R}$	0.550	0.473	0.603	0.770		

### 3 讨 论

随着我国中医中药产业的快速发展,中药渣的排放量日益增加<sup>[14]</sup>。中药渣含有较多的营养成分,利用微生物转化中药渣对提升其资源化利用价值,延伸经济产业链有重要意义。与传统的培养方式相比,中药渣的一些特有的成分会和灵芝发生复杂的生化反应,呈现双向性<sup>[15]</sup>。近年来,研究者利用灵芝菌、蝉拟青霉等对三七药渣、甘草渣等进行了双向发酵研究<sup>[8,10]</sup>。感冒清热颗粒药渣组份复杂,其中往往存在影响灵芝菌生长代谢的物质。本研究以多糖、灵芝酸和黄酮类物质为检测指标,考察了药渣粒径、药渣浓度、固液比以及培养时间对灵芝菌生长的影响,研究结果为药渣粒径 30 目、10% 药渣、固液比 1:2、发酵 30 d 时,多糖、灵芝酸产量最高。本研究为感冒清热颗粒药渣的资源化再利用提供了新的思路和方法。

#### [参考文献]

- [1] 李 玲,孙元章,李 刚. 灵芝生物活性成分及其药理作用研究进展[J]. 南方农业, 2019, 13(4): 50-55.
- [2] 雨 田,郭晓恒,杨 杭,等. 椴木制灵芝培养基与妇科千金片药渣灵芝培养基发酵过程中营养成分动态变化[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(6): 12-15.
- [3] 张庆明,徐云燕,顾宁宁,等. 灵芝菌-玄七痛痹胶囊药渣双向发酵工艺的研究[J]. 东南国防医药, 2016, 18(6): 585-590.
- [4] 张庆明,顾 宁,张兴德. 灵芝菌-玄七通痹胶囊药渣双向发酵路线的设计与构建[J]. 医药卫生, 2016, 5(8): 171.
- [5] 王明威,周 林,刘顺会,等. 中药渣资源化利用探讨[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 140-143.
- [6] 段金廛,张伯礼,宿树兰,等. 基于循环经济理论的中药资源循环利用策略与模式探讨[J]. 中草药, 2015, 46(12): 1715-1722.
- [7] 庄 毅,洪 净. 药用真菌双向发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1918-1919.
- [8] 曲 墨,邱智东,王伟楠. 灵芝菌固体发酵三七药渣工艺研究[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(2): 263-265.
- [9] 胡琼方,董建生,高文庚. 灵芝发酵粉中三萜化合物提取与测定[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 104-109.
- [10] 张艳聪,玛维维,张洪梅,等. 蝉拟青霉-甘草渣双向发酵过程中成分含量变化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1902-1904.
- [11] 丁 妍,周向毅,崔 莉,等. 灵芝多糖对辐射损伤小鼠的保护作用[J]. 医药研究生学报, 2014, 27(11): 1152-1155.
- [12] 申春莉,李 曼,沙见宇,等. 灵芝菌丝体固态发酵豆渣的营养成分变化研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 114-119.
- [13] 陈 红,方 磊,余晓斌. 培养方式对灵芝酸合成的影响及固态发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(11): 167-172.
- [14] 袁 琪,李伟东,郑艳萍,等. 中药渣的深加工及其资源化利用[J]. 生物加工过程, 2019, 17(2): 171-176.
- [15] 江 曙,刘 培,段金廛,等. 基于微生物转化的中药废弃物利用价值提升策略探讨[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2014, 16(6): 1210-1216.

(收稿日期:2019-05-20; 修回日期:2019-07-24)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一起)