

芝芪菌质中化学成分的动态变化

阮鸣, 张李阳, 陈玉胜, 饶玉鹏 (南京晓庄学院生命科学系药用菌物研究所, 江苏南京211171)

摘要 [目的] 探讨不同发酵工艺下芝芪菌质中化学成分的动态变化, 验证芝芪菌质的最佳发酵工艺。[方法] 对不同发酵天数下芝芪菌质的有效成分多糖、蛋白质及总皂苷进行动态变化研究, 绘制动态变化曲线。[结果] 第20~25天是发生次生代谢最旺盛的时候。

[结论] 结合动物免疫学试验结果, 确定第20~25天为发酵终点。

关键词 芝芪菌质; 多糖; 蛋白质; 总皂苷; 含量变化; 双向固体发酵

中图分类号 S567.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)28-12313-02

Study on Content Change of Chemical Constituents in Zhi Qi Fungal Substance

RUAN Ming et al (Institute of Medicinal Fungi, Department of Life Science, Nanjing Xiao Zhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract [Objective] The research aimed to study the content change of chemical constituents in Zhi Qi fungal substance and verify optimal fermentation technology. [Methods] The contents of polysaccharide, protein and total saponins were determined in Zhi Qi fungal substance under different fermentation days and the changing curves of content were rendered. [Results] It was found that the 20th to 25th fermentation day was the period when secondary metabolism was the most active. [Conclusion] The 20th to 25th fermentation day should be the fermented terminal point with the experimental results of animal immune.

Key words Zhi Qi fungal substance; Polysaccharide; Protein; Total saponins; Content change; Bilateral solid fermentation

芝芪菌质是应用药用真菌新型固体发酵工程技术——中药生物技术研制而成的新型饲料添加剂, 是将灵芝接种于由药性基质(黄芪药渣)和营养基质(农副产品)组成的“全性基质”中, 在一定条件下进行固体双向发酵得到的产物。大量研究表明, 芝芪菌质作为饲料添加剂不仅可明显促进鸡体生长, 而且具有预防禽流感的作用^[1]。

中草药作为饲料添加剂具有悠久的历史。从公元前3世纪时的《神农本草经》到后来的《淮南万毕术》、《齐民要术》、《农政全书》等书中都有关于中草药作为饲料添加剂的记载。国内外关于中草药作为饲料添加剂的研究取得了一定的进展, 在生产中产生了较好的经济效益。这主要与中草药饲料添加剂的营养作用和提高免疫作用有关^[2]。近年来, 由于天然植物(包括中草药)饲料添加剂既能防病治病, 又能促进生长, 提高生产性能, 防止产生耐药性和药物残留, 已成为研究的一大热点。芝芪菌质将中草药药渣变废为宝, 是中草药应用于饲料添加剂的突破性研究成果。笔者就不同发酵工艺下芝芪菌质中各类化学成分含量变化作一研究, 以进一步确定发酵的终点。

1 材料与方 法

1.1 仪器 756PC型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司生产), HH4数显恒温水浴锅(国华电器有限公司生产), RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂生产), SHZ-D()循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂生产), 16000 r/min TGL16G型台式离心机(上海安亭离心机厂生产), KQ250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产)。

1.2 材料 不同发酵天数的芝芪菌质由南京晓庄学院生命科学系药用菌物研究所张李阳教授提供。所用试剂均为分析纯。

1.3 多糖动态变化的研究方法^[3]

1.3.1 标准曲线的绘制。 分别精密吸取0.106 ng/ml葡萄

糖溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml, 置于10 ml具塞试管中, 加水至2.0 ml, 精密加入浓度0.05%硫酸蒽酮溶液6 ml, 摇匀, 置于水浴中加热20 min, 取出, 放入冰浴中冷却20 min。以相应的试剂为空白, 在625 nm波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 以对照品溶液质量为横坐标, 绘制标准曲线, 得 $y = 4.2638x + 0.0196 (r = 0.9996)$ 。

1.3.2 多糖含量的测定。 取不同发酵天数的芝芪菌质, 分别以20、15倍沸水提取2次, 每次提取1.0 h, 合并提取液, 过滤, 滤液经旋转蒸发仪浓缩至1倍体积, 用浓度95%乙醇沉淀溶液至乙醇浓度为85%, 放置过夜, 离心过滤, 弃去上清液, 所得沉淀相继用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 得多糖粗制品。取多糖粗制品, 超声溶解, 转移至100 ml容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 离心, 精密量取离心液2.5~5.0 ml于25 ml容量瓶中, 加水定容, 摇匀。取溶液0.4~0.5 ml, 按标准曲线绘制方法进行测定, 并根据标准曲线, 计算多糖含量。

1.4 蛋白质动态变化的研究方法^[4]

1.4.1 标准曲线的绘制。 分别精密吸取0.314 ng/ml牛血清白蛋白(纯度99.8%, 批号:0619S02)对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml, 置10 ml具塞试管中, 加水至1.0 ml, 精密加入Folin酚甲试剂5 ml, 摇匀, 20~25℃放置10 min, 精密加入Folin酚乙试剂0.5 ml, 迅速摇匀, 置30℃水浴保温30 min, 以相应的试剂为空白, 在750 nm波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 以浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得 $y = 0.5408x - 0.0729 (r = 0.9998)$ 。

1.4.2 蛋白质含量的测定。 取不同发酵天数的芝芪菌质, 分别以20、15倍沸水提取2次, 每次提取1.0 h, 合并提取液, 过滤, 滤液经旋转蒸发仪浓缩, 转移至100 ml容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取5 ml于25 ml容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 离心, 精密量取离心液0.20~0.25 ml, 按标准曲线绘制方法进行测定, 并根据标准曲线, 计算蛋白质含量。

1.5 总皂苷动态变化的研究方法^[5]

1.5.1 标准曲线的绘制。 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 ml, 置10 ml具塞试管中, 放入105℃烘箱中烘干, 取出冷却至室温, 加0.2 ml浓度5%香荚

基金项目 南京晓庄学院青年专项自然科学基金项目(2006NXY30)。

作者简介 阮鸣(1979-), 女, 安徽六安人, 硕士, 助教, 从事中药化学方面的研究。

收稿日期 2007-09-07

兰醛冰醋酸溶液,加入1.2 ml 高氯酸,摇匀,放入80 ℃水浴中加热25 min,取出,快速冷却至室温,加5 ml 冰醋酸,迅速摇匀,以相应的试剂为空白,在540 nm 波长处测吸光度。以吸光度为纵坐标,以浓度为横坐标,绘制标准曲线,得 $y = 0.2333x - 0.0082 (r = 0.9998)$ 。

1.5.2 总皂苷含量的测定。取不同发酵天数的芝芪菌质,分别以20、15 倍沸水提取2 次,每次提取1.0 h,合并提取液,过滤,滤液经旋转蒸发仪浓缩至1 倍体积,加水饱和正丁醇萃取6 次,每次20 ml,合并正丁醇层,加浓度1% NaOH 水溶液萃取2 次,每次60 ml,弃去水层,加正丁醇饱和的水60 ml 萃取1 次,正丁醇层蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至25 ml,精密量取样品液4 ml 定容至10 ml。稀释的样品液离心,精密量取离心液0.2 ml,按标准曲线绘制方法进行测定,并根据标准曲线,计算总皂苷含量。

2 结果与分析

由图1~3 可知,发酵0~20 d 多糖、蛋白质含量呈下降趋势,发酵0~5 d 总皂苷含量逐渐减少。这说明起初灵芝消

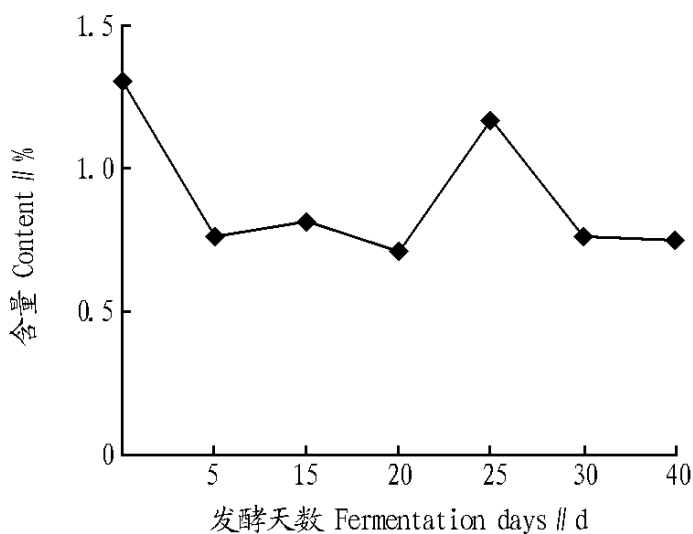


图1 不同发酵工艺样品的多糖含量

Fig.1 The content of polysaccharide in samples by different fermentation technology

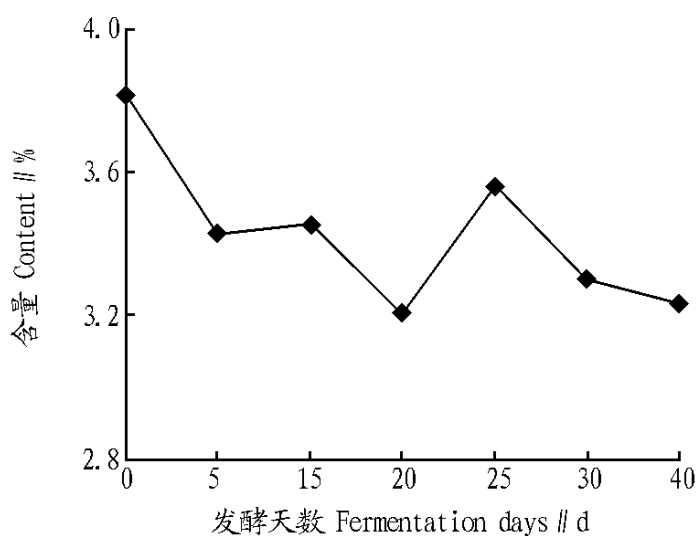


图2 不同发酵工艺样品的蛋白质含量

Fig.2 Protein content in samples by different fermentation technology

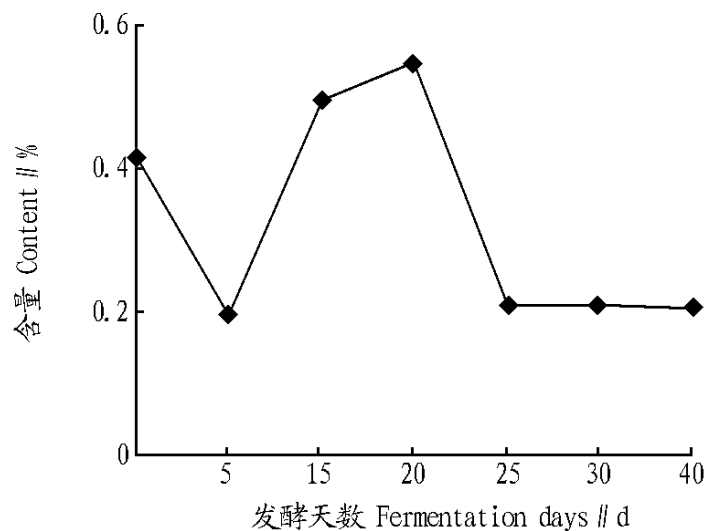


图3 不同发酵工艺样品的总皂苷含量

Fig.3 The content of total saponin in samples by different fermentation technology

化吸收全性基质中的多糖、蛋白质和总皂苷。发酵20~25 d,随着发酵天数的增加,多糖、蛋白质含量又逐渐增多,且在第25 天达发酵高峰;发酵5~20 d,随着发酵天数的增加,总皂苷含量亦逐渐增多,且在第20 天达发酵高峰。已有的动物免疫试验结果表明,经过20~25 d 发酵的芝芪菌质能明显增强AA 肉鸡对新城疫、禽流感 H₉、H₅ 的免疫力^[1]。由此可知,该文的试验结果与动物免疫试验结果相符。这说明多糖、蛋白质和总皂苷很可能就是芝芪菌质的有效成分,并且确定第20~25 天为发酵终点。

3 讨论

药用真菌新型固体发酵工程技术最早应用于国家一类新药槐耳颗粒的研制。药用真菌新型固体发酵的根本特点是在发酵基质中采用由中药材组成的药性基质。基质既提供药用真菌生长所需的营养,又因药用真菌的分解(合成)而产生新的成分,从而使得性质发生变化,成为新型菌质。目前研究的新型菌质有效成分主要为多糖、蛋白质和总皂苷^[6-7]。该文仅做了初步研究,今后将进一步分离纯化芝芪菌质,并进行活性成分的筛选和新药的研制工作。

参考文献

- [1] 张李阳,周业飞,张敦林. 药用真菌发酵及其产物对AA 肉鸡免疫功能及生长的影响[J]. 畜牧与兽医,2005,37(6):9-12.
- [2] 王颖,周明. 中草药饲料添加剂的研究和应用[J]. 安徽农业科学,2005,33(4):701-703.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [4] 傅应华,王金观. 槐耳颗粒蛋白含量测定方法的改进[J]. 中国药物应用与监测,2005(6):21-23.
- [5] 张娟,路金才. 皂苷的提取方法及含量测定研究进展[J]. 中国现代中药,2006,8(3):26-28.
- [6] 庄毅,池玉梅,陈慎宝,等. 药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质的研制[J]. 中国药学杂志,2004,39(3):175-178.
- [7] 陈华珍,陈建伟. 灵芝菌质发酵工艺初报[J]. 中西医结合学报,2004,2(3):216-218.