

药用昆虫蜣螂对灵芝多糖生物合成的影响

刘高强¹, 丁重阳², 章克昌², 王晓玲¹, 韩文军¹

1 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 采用液体深层发酵方式, 研究了药用昆虫对灵芝多糖生物合成的影响。结果表明, 药用昆虫蜣螂在添加量为 5 g/L 时能显著促进灵芝胞内多糖(IPS)和胞外多糖(EPS)的形成($P < 0.05$)。胞内多糖和胞外多糖的产量分别由对照的 (1.93 ± 0.09) g/L 和 (520.3 ± 20.2) mg/L 提高到 (2.41 ± 0.12) g/L 和 (608.9 ± 20.2) mg/L。灵芝胞内多糖和胞外多糖在 DEAE 纤维素柱上都分离得到 5 种主要组分, 其中 IPS-1 和 EPS-1 分别为 2 类多糖的主要组分。进一步用凝胶柱分离显示, IPS-1 由 3 个单个的组分组成, EPS-1 由 2 个单个的组分组成。添加蜣螂发酵后, 灵芝胞内多糖和胞外多糖中没有出现新的组分, 且各组分的相对含量也没有显著变化($P > 0.05$), 提示添加蜣螂发酵后, 灵芝胞内多糖和胞外多糖主要组分的合成途径并未改变。

关键词: 灵芝, 液体发酵, 胞内多糖, 胞外多糖, 药用昆虫

Effects of medicinal insect, *Catharsius molossus* on biosynthesis of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* in submerged culture

Gaoqiang Liu¹, Chongyang Ding², Kechang Zhang², Xiaoling Wang¹, and Wenjun Han¹

1 College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: We studied the effects of several medicinal insects on biosynthesis of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* in submerged culture. The results showed that the medicinal insect, *Catharsius molossus* at 5 g/L significantly promoted the biosynthesis of intracellular polysaccharides (IPS) and extracellular polysaccharides (EPS) of *G. lucidum*, and compared with control, IPS and EPS yields markedly enhanced from (1.93 ± 0.09) g/L to (2.41 ± 0.12) g/L and (520.3 ± 20.2) mg/L to (608.9 ± 20.2) mg/L, respectively ($P < 0.05$). Both IPS and EPS consisted of five kinds of components, and IPS-1 and EPS-1 were the major components of IPS and EPS, respectively. Further separation studies showed that IPS-1 was made up of three single compounds, while EPS-1 was made up of two single compounds. There were no new components in both IPS and EPS obtained from *G. lucidum* in submerged culture by the addition of the insect, *C. molossus*, suggesting the biosynthetic pathways of the major components of IPS and EPS had not been changed.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, submerged fermentation, intracellular polysaccharides, extracellular polysaccharides, medicinal insects

Received: March 29, 2009; **Accepted:** April 29, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30700552).

Corresponding author: Gaoqiang Liu. Tel: +86-731-5623392; E-mail: gaoliuedu@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 30700552)资助。

灵芝[*Ganoderma lucidum* (W. Curtis.: Fr.) P. Karst.] 是我国著名的药用真菌。由于它能预防和治疗许多疾病, 在古代曾被称为“仙草”。近年来包括我国在内的东南亚国家以及美国和加拿大的许多学者对灵芝进行了深入的研究^[1]。现代药理和营养学研究证明, 灵芝含有多种生物活性成分, 如多糖、灵芝三萜、甾醇、核酸、蛋白质、多肽、脂肪酸等^[1,2], 其中多糖和三萜是灵芝中关键的药效成分^[1-5]。

由于传统的栽培方法周期长, 产量远不能满足市场需要, 而通过液体深层发酵技术生产灵芝具有生产周期短、活性物质和野生灵芝基本一致等特点, 现已成为获取灵芝和其生物活性物质的有效方法之一^[6-12]。

近年来, 灵芝的液体发酵技术取得了很大进展, 但如何进一步促进灵芝细胞生长和提高活性物质的产量仍是人们希望解决的课题^[6-12]。

药用昆虫如地鳖虫、蛻螂、九香虫、斑蝥等是我国中药的重要组成部分, 其所含的化学成分多种多样, 与普通昆虫相比, 含有多种预防和治疗人类疾病的药效成分; 而且昆虫类药物所含的药效成分往往与植物类药物的成分不同^[13]。另一方面, 对于药物的研究, 人们的常规思路是研究药物对人体/动物生理的影响(即防治疾病), 但药物对有价值的微生物代谢产物的合成有无影响呢? 基于此设想, 本实验分析了一些典型的药用昆虫对灵芝多糖合成的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

HYG2 型回转式恒温调速摇柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司; UNICO2100 紫外-可见分光光度计, 上海仪器有限公司; CR22G 日立高速冷冻离心机, 日本日立公司; BUCHI-R200 旋转蒸发仪, 德国 BUCHI 公司。ÄKTA Explorer(瑞士)分离纯化系统。

1.2 药用昆虫

地鳖虫(*Eupolyphaga sinensis* Walker)、九香虫(*Aspongopus chinensis* Dallas)、斑蝥(*Mylabris phalerata* Pall.)、蛻螂(*Catharsius molossus*)由安徽省药材公司赠送; 松毛虫(*Dendrolimus houi*)由本实验室采集。所有样品风干, 经适当处理, 粉碎过 80 目后备用。

1.3 灵芝培养

1.3.1 菌种

灵芝 *Ganoderma lucidum*, 由江南大学工业生物技术教育部重点实验室生物资源研究室保存。

1.3.2 培养基

培养基组成(g/L): 葡萄糖 30, 玉米粉 10, 麸皮粉 10, 蛋白胨 3, KH_2PO_4 1.5, MgSO_4 0.75, VB_1 0.05。

1.3.3 液体发酵

采用摇瓶发酵, 在液体发酵过程中, 采用补料方式添加经灭菌的受试昆虫粉状悬浮物[80 目昆虫粉: 水=1: 3(W/V)]。补料时间: 发酵起始 24 h 后; 装液量: 500 mL 摇瓶中控制装液量为 140 mL。培养条件: 30 ℃、170 r/min, 培养时间 7 d。

1.4 生物量的测定

菌体用 40 目的滤网反复分离, 分离后的菌体离心, 用水洗 2 次后, 再离心, 沉淀的菌体在 60 ℃ 下烘至恒重, 称重得生物量。

1.5 灵芝多糖的测定

胞内和胞外多糖的测定: 按参考文献[8]进行。菌体粉碎后, 用 1 mol/L NaOH 稀碱液在 60 ℃ 下提取 1 h, 重复提取 3 次, 提取后的多糖用苯酚-硫酸法定量测定。

胞外多糖的测定^[8,10]: 发酵液经离心所得的上清液合并, 减压浓缩到发酵液体积的 2/5~3/5, 加 4 倍体积 95%酒精后, 在冰箱中静置 24 h。离心, 沉淀后多糖的测定方法同胞内多糖的方法。

1.6 多糖的组成分析

多糖中所有组分的分离: DEAE 纤维素柱法^[14]。采用 ÄKTA Explorer(瑞士)分离纯化系统。柱型号: HiPrep 16/10 DEAE。洗脱液: 以超纯水、0.06、0.12、0.25、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 即前面溶剂洗至无多糖检出时(苯酚-硫酸法检测多糖), 换用后面的溶剂继续洗脱^[14]; 流速: 2 mL/min; 分部收集: 5 mL/管; 每个样品上样量均为 2 mL(控制多糖量为 9~10 mg 左右)。

多糖主要组分的进一步分离: 经 DEAE 纤维素柱分离后, 获得灵芝多糖的主要组分。再对主要组分采用 Superdex 200 HR 10/30 凝胶柱进一步进行分离, 以考察其是否有未分离的组分^[14]。洗脱液: 0.1 mol/L NaCl; 流速: 0.25 mL/min; 分部收集: 1 mL/管^[14]。多糖的定量分析: 苯酚-硫酸法。

1.7 统计分析

液体发酵每个样品设 3 个重复。数据处理采用 Excel 2000 和 SAS 8.1 软件。显著性分析采用 t 检验。

2 结果和讨论

2.1 不同昆虫粉对细胞生长的影响

图 1 为几种昆虫的添加对灵芝细胞生长的影响。可见, 在添加量为 4 g/L 时, 斑蝥对灵芝细胞的生长具有极显著的抑制作用($P < 0.01$); 九香虫对灵芝的生长也有一定的抑制作用; 而地鳖虫、蜚蠊和松毛虫的添加对灵芝的细胞生长并无显著影响。

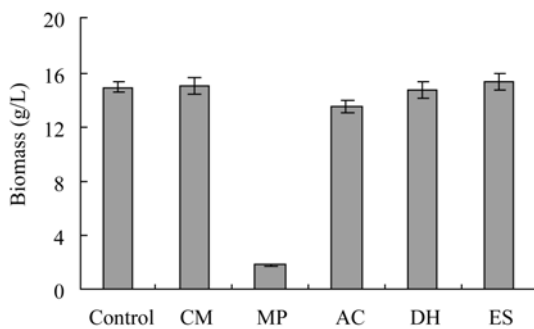


图 1 几种昆虫(4 g/L)对灵芝细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of various insects (4 g/L) on cell growth of *Ganoderma lucidum*. CM: *Catharsius molossus*; MP: *Mylabris phalerata*; AC: *Aspongopus chinensis*; DH: *Dendrolimus houi*; ES: *Eupolyphaga sinensis*.

2.2 对灵芝多糖产物形成的影响

考虑到斑蝥昆虫有毒^[13], 因此, 进一步只研究了地鳖虫、松毛虫、蜚蠊和九香虫在各种浓度下对灵芝多糖形成的影响。

2.2.1 对灵芝胞内多糖的影响

各昆虫对灵芝胞内多糖 (Intracellular polysaccharides, IPS) 的影响见图 2。由图可见, 蜚蠊(*C. molossus*)的添加对灵芝胞内多糖的生成有显著影响。当添加量为 5 g/L 时, 可显著提高胞内多糖的产量[从对照的(1.93 ± 0.09) g/L 提高到(2.41 ± 0.12) g/L] ($P < 0.05$)。其他昆虫的添加对灵芝胞内多糖的形成无显著促进作用, 且随着添加量的增加, 所有昆虫都表现出一定的抑制作用。

2.2.2 对灵芝胞外多糖的影响

图 3 为不同昆虫的添加对灵芝胞外多糖 (Extracellular polysaccharides, EPS) 的影响。由图可

见, 蜚蠊(CM)和地鳖虫(ES)在添加量为 5 g/L 时, 可促进灵芝胞外多糖的生成, 产量分别由对照的(520.3 ± 20.2) mg/L 提高到(608.9 ± 20.2) mg/L 和(581.3 ± 19.1) mg/L。两者与对照相比均差异显著($P < 0.05$)。但 2 种昆虫在其他添加量下并无促进作用。

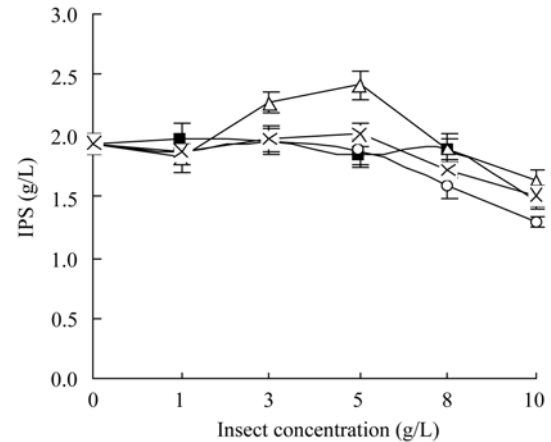


图 2 各虫不同添加量对灵芝胞内多糖的影响

Fig. 2 Effects of insect concentration on production of IPS production. IPS: intracellular polysaccharides; ■: *E. sinensis*; ×: *D. houi*; △: *C. molossus*; ○: *A. chinensi*.

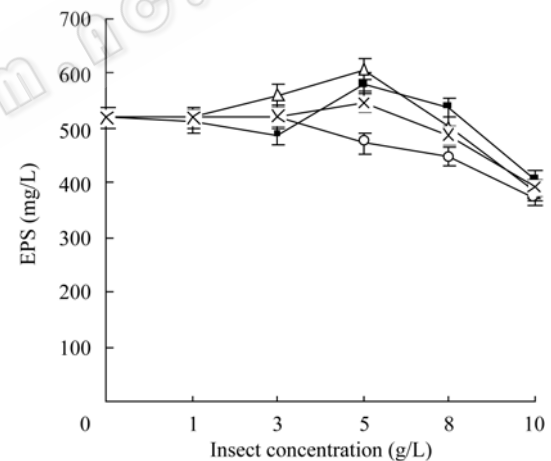


图 3 各虫不同添加量对灵芝胞外多糖的影响

Fig. 3 Effects of insect concentration on production of EPS production. EPS: extracellular polysaccharides; ■: *E. sinensis*; ×: *D. houi*; △: *C. molossus*; ○: *A. chinensi*.

2.3 蜚蠊对灵芝胞内和胞外多糖组成的影响

DEAE-柱是分离多糖和精制分离时常用的分离介质。图 4 为添加和不添加蜚蠊(5 g/L)所得灵芝胞内多糖在 ÄKTA Explorer 分离纯化系统的 DEAE-柱上的分离曲线。

由图 4 可以看出, 灵芝的胞内多糖共有 5 种主要组分, 分别命名为 IPS-1、IPS-2、IPS-3、IPS-4 和

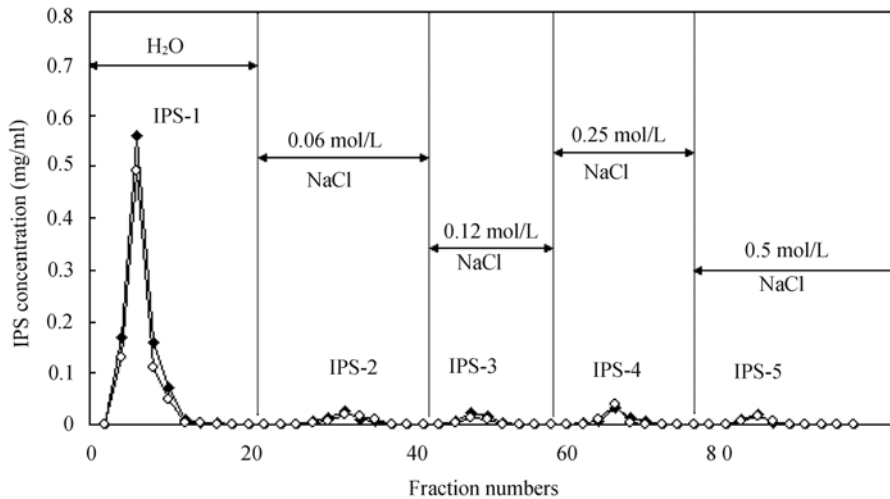


图4 灵芝胞内多糖在DEAE柱上的洗脱曲线

Fig. 4 HiPrepTM 16/10 DEAE elution profile of IPS. ◆: sample of containing *C. molossus* in medium; ○: control.

IPS-5, 依次由超纯水及 0.06 mol/L、0.12 mol/L、0.25 mol/L 和 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱所得。主要组分为超纯水洗脱所得的 IPS-1, 添加蛻螂组样品的 IPS-1 含量占其多糖总量的 83.12%, 对照组的 IPS-1 含量占其多糖总量的 82.47%。二者之间无显著差异。

为考察 IPS-1 是否有未分离的组分, 采用 Superdex 200 HR 10/30 凝胶柱对其进行进一步进行了分离(用 0.1 mol/L NaCl 进行洗脱)。结果表明, 2 个样品的 IPS-1 均含有 3 个单组份, 但两样品间 3 组分完全一致, 含量没有显著差异(图 5)。

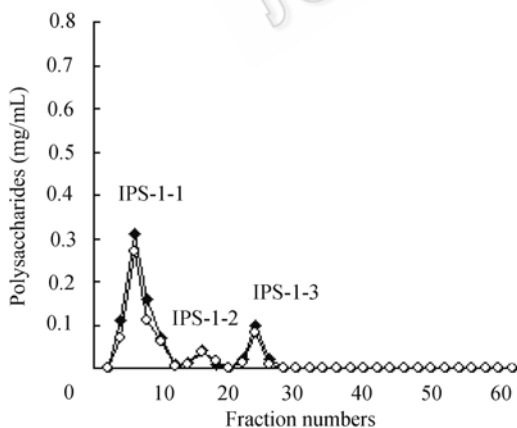


图5 IPS-1 在 Superdex 200 HR 10/30 凝胶柱上的洗脱曲线

Fig. 5 Superdex 200 HR 10/30 elution profile of IPS-1. ◆: sample of containing *C. molossus* in medium; ○: control.

图 6 为添加和不添加蛻螂所得灵芝胞外多糖在 ÄKTA Explorer 分离纯化系统的 DEAE-柱上的分离

曲线。灵芝的胞外多糖也有 5 种主要组分, 依次由超纯水及 0.06、0.12、0.25 和 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱所得, 分别命名为 EPS-1、EPS-2、EPS-3、EPS-4 和 EPS-5。主要组分为超纯水洗脱所得的 EPS-1。添加蛻螂组样品的 EPS-1 含量占其多糖总量的 66.00%, 对照组的 EPS-1 含量占其多糖总量的 64.80%。二者之间无显著差异。

为进一步考察 EPS-1 是否是单一组分, 采用 Superdex 200 HR 10/30 凝胶柱又对其进行分离(用 0.1 mol/L NaCl 进行洗脱)。结果发现, 2 个样品的 EPS-1 均含有 2 个组分, 但两样品间两组分完全一致, 其相对含量也没有显著差异(图 7)。

图 2 和图 3 的结果表明, 添加蛻螂后, 灵芝胞内和胞外多糖的产量显著提高, 但图 4~7 的结果提示, 添加蛻螂发酵后, 灵芝胞内和胞外多糖的主要组分和其相对含量未发生变化, 提示灵芝胞内外多糖主要组分的合成途径并未改变。蛻螂提高灵芝多糖的产量可能与其直接促进灵芝多糖的合成代谢有关。

3 讨论

目前提高灵芝活性物质产量的研究主要集中在灵芝发酵基质和发酵过程的优化, 如优化发酵参数溶氧和 pH 等, 或采用两阶段培养或补料-分批发酵等策略^[6-8, 12]。这些传统的发酵优化手段对于提高细胞生物量和代谢物的产量是可行的。但本研究则从另外的角度研究了几种虫类药物对灵芝深层培养过程中多糖物质生物合成的影响。

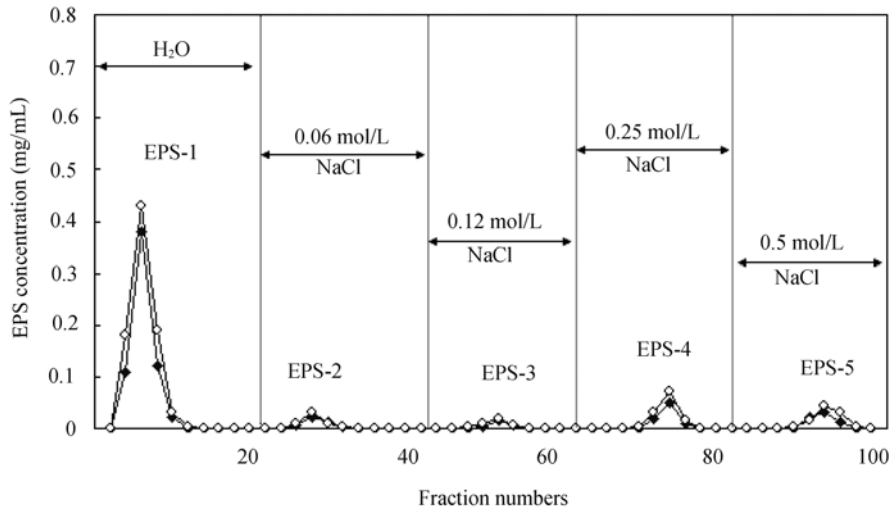


图6 灵芝胞外多糖在DEAE柱上的洗脱曲线

Fig. 6 HiPrepTM 16/10 DEAE elution profile of EPS. ◆: sample of containing *C. molossus* in medium; ○: control.

Tang & Zhong 研究了灵芝在乳糖培养基上灵芝胞外多糖的积累和生物合成的相关酶。补加乳糖可提高 α -磷酸葡萄糖变位酶的酶活,同时降低了磷酸葡萄糖异构酶的活性。但未涉及到灵芝胞外多糖的组分及补加乳糖对灵芝胞外多糖组分的影响^[15]。Yang 等报道,在灵芝发酵起始添加 1.5%乙醇可显著促进灵芝细胞的生长,而添加 2.0%乙醇可显著提高灵芝胞外多糖的产量。本研究结果表明,添加虫类药物蜣螂并不能促进灵芝细胞生长,但都能促进灵芝胞内和胞外多糖的生物合成^[14]。

其营养成分较为全面,能够满足灵芝菌体的生长需要。在发酵结束后,灵芝培养液中的菌球密度较大。在这种较高密度的摇瓶培养过程中,要进一步提高菌体细胞的产量是比较困难的^[11]。但这些昆虫粉的添加是否对灵芝在发酵罐中的生长有较大影响,有待进一步试验。

药用昆虫蜣螂的添加,不能促进灵芝细胞的生长,但却能显著促进灵芝多糖的形成,提示蜣螂虫粉中含有促进灵芝多糖形成的功能因子,有必要进一步对其进行分离、纯化和鉴定。

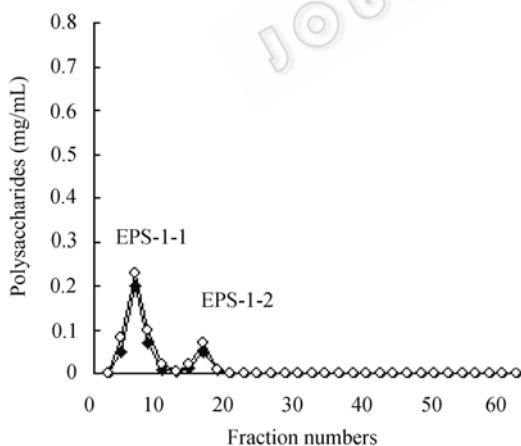


图7 EPS-1 在 Superdex 200 HR 10/30 凝胶柱上的洗脱曲线

Fig. 7 Superdex 200 HR 10/30 elution profile of EPS-1. ◆: sample of containing *C. molossus* in medium; ○: control.

本研究中几种昆虫对灵芝的细胞生长无显著促进作用,这可能是由于所试培养基是加富培养基,

REFERENCES

- [1] Lin ZB. Modern Research of *Ganoderma*. 2nd Ed. Beijing: Beijing Medical University Press, 2001.
林志彬. 灵芝的现代研究. 第二版. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [2] Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem Record*, 2003, **3**: 172-180.
- [3] Baek S, Kim Y, Yong H, *et al*. Antitumor activities of the proteoglycans from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. *Yakhak Hoechi*, 2001, **45** (6): 641-649.
- [4] Lee S, Lee P, Chen C. Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (*Aphyllophoromycetideae*). *Int J Med Mushrooms*, 2003, **5**(1): 1-16.
- [5] Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: Mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*, 2002, **22**:

