

### 3 种诱导因子对发酵法生产猪苓甙体的影响

钟慧敏<sup>1</sup>, 王俊儒<sup>2\*</sup>, 李同臣<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以 3 种甾醇作为诱导因子, 通过单因素试验, 利用紫外分光光度法测定液体悬浮发酵培养猪苓中甾体含量的变化, 从而筛选出最佳诱导因子及其最佳添加浓度。结果表明: 最佳诱导物质为胆固醇, 最佳添加浓度为 0.020%, 此时猪苓菌丝体干重 2.38 g, 猪苓甾体净增长量 53.224 mg。

**关键词:**猪苓甾体; 诱导因子; 紫外分光光度法

**中图分类号:**Q946.8      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2011)03-0132-04

### Effects of Three Inducible Factors on the Formation of Steroids in the Fermentation of *Polyporus umbellatus*

ZHONG Hui-min<sup>1</sup>, WANG Jun-ru<sup>2</sup>, LI Tong-chen<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Three steroids were used as inducible factors in the fermentation of *Polyporus umbellatus*. The results showed that cholesterol was the best inducible factor, when concentration of cholesterol was 0.020%, dry weight of mycelia of *P. umbellatus* was 2.38 g, and net increase in the amount of steroidal was 53.224 mg.

**Key words:** *Polyporus umbellatus* steroid; inducible factor; UV spectrophotometry

猪苓(*Polyporus umbellatus*), 别名豕苓、猪茯苓、野猪屎、野猪粪、地乌桃、野猪苓, 在分类学上属于无隔担子菌亚纲、无褶菌目、多孔菌科、多孔菌属的药用真菌<sup>[1]</sup>, 它的干燥菌核即为猪苓, 属于常用中药。随着我国医疗事业的发展, 以猪苓为原料的成品药也不断开发, 有关猪苓的研究以及人工栽培越来越受到关注。猪苓含有多种化学成分, 目前, 已分离报道的猪苓化学成分主要包括多糖类、甾体类、非甾体类(除多糖类外)、氨基酸类、维生素类和微量无机元素类<sup>[2]</sup>。猪苓甾体具有利尿、抗癌、抗菌抗炎<sup>[2]</sup>、增进头发生长<sup>[3]</sup>、细胞毒活性作用<sup>[4-6]</sup>等生物活性。本课题组已探明  $\beta$ -谷甾醇对猪苓菌丝体的生长量以及猪苓甾体积累具有促进作用。在此基础上, 本文以  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇和胆固醇 3 种甾醇作为诱导因子, 设置 3 个浓度梯度, 研究产生猪苓的最佳诱导因子和最佳添加浓度。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试猪苓菌种由西北农林科技大学微生物实验室提供。

主要仪器有: 紫外分光光度计、旋转蒸发仪、超声波清洗仪。主要试剂有:  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、胆固醇、葡萄糖、L-B 试剂(醋酸酐: 浓硫酸 = 19:1, 随配随用)。实验试剂均为分析纯, 实验用水为蒸馏水。

#### 1.2 方法

1.2.1 液体发酵培养 取出原始菌种, 转接到斜面培养基中, 置于培养箱中活化 10 d, 然后接种到 PDA 平面培养基上, 作为猪苓菌种种子培养基, 7 d 后, 从扩大培养的母种中挑选无杂菌、长势旺的菌丝, 沿菌落边缘切下 0.5 cm<sup>2</sup> 菌丝活化的菌块, 分别

收稿日期: 2010-06-02    修回日期: 2010-11-03

基金项目: 西北农林科技大学青年学术骨干计划(01140301)

作者简介: 钟慧敏, 女, 硕士研究生, 主要从事植物化学研究。

\* 通讯作者: 王俊儒, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事植物化学与环境生物学教学与研究。

接种到各液体培养基中(每组培养基设置 3 个重复),使菌丝悬浮于液面,置于 23℃ 的恒温振荡培养箱中,在振荡速度为  $147\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、通风暗培养的条件下培养 10 d<sup>[7]</sup>,每处理 3 个重复。 $\beta$ -环糊精<sup>[13]</sup>与甾醇摩尔比为 1:1<sup>[14]</sup>,每组处理设置 1 个对照组,

对照组培养基不添加诱导物,其他成分不变。培养基配好后,分装在 500 mL 三角瓶内,每瓶 250 mL,添加  $\beta$ -谷甾醇后超声 20 min<sup>[15]</sup>。置于高压灭菌锅内 121℃ 灭菌 20 min,取出后静置 24 h,备用。

表 1 为 3 种猪苓液体发酵培养基配方。

表 1 培养基的组成成分  
Table 1 Ingredients of the media

| 培养基编号 | 培养基组成成分 |     |              |         |         |              |         |
|-------|---------|-----|--------------|---------|---------|--------------|---------|
|       | 马铃薯     | 葡萄糖 | $\beta$ -谷甾醇 | 豆甾醇     | 胆固醇     | $\beta$ -环糊精 | 羧甲基纤维素钠 |
| A1    | 50      | 5   | 0.012 5      | —       | —       | 1.37         | 0.4     |
| A2    | 50      | 5   | 0.031 3      | —       | —       | 1.37         | 0.4     |
| A3    | 50      | 5   | 0.050 0      | —       | —       | 1.37         | 0.4     |
| B1    | 50      | 5   | —            | 0.012 5 | —       | 1.37         | 0.4     |
| B2    | 50      | 5   | —            | 0.031 3 | —       | 1.37         | 0.4     |
| B3    | 50      | 5   | —            | 0.050 0 | —       | 1.37         | 0.4     |
| C1    | 50      | 5   | —            | —       | 0.012 5 | 2.07         | 0.4     |
| C2    | 50      | 5   | —            | —       | 0.031 3 | 2.07         | 0.4     |
| C3    | 50      | 5   | —            | —       | 0.050 0 | 2.07         | 0.4     |

1.2.2 菌丝体和发酵液的预处理 培养 10 d 后,用纱布过滤发酵液,测定所得发酵液总量。用无水乙醇冲洗菌丝体上的培养基,冲洗液并入各发酵液中。过滤后发酵液置旋转蒸发仪上减压浓缩完全,用真空冷冻干燥器充分干燥后用电子天平称重,备用;过滤后的猪苓菌丝体置于培养皿中真空冷冻干燥后,用电子天平称重,备用。

1.3.3 甾体含量的测定 (1)绘制标准曲线。以  $\beta$ -谷甾醇做标准溶液,L-B 显色剂显色,测定 460 nm 波长处的吸光度,绘制标准曲线图(图 1)。

分别吸取定容后滤液 3 mL 至 3 支刻度试管中,置冰水浴中,沿试管壁缓缓加入 L-B 试剂 2 mL,于 50℃ 水浴中加热 40 min,取出后迅速流水冷却至室温。另取一支试管,吸取 3 mL 氯仿至刻度试管中,重复上述操作,作为空白对照溶液,测定 460 nm 波长处的吸光度。记录各处理的吸光度值,并计算平均值(若其中一组数据偏差较大则应舍去)。利用标准方程计算平均吸光度所对应的溶液浓度。

2 结果与分析

2.1 不同发酵培养基菌丝体生长状况

研究结果表明,添加胆固醇的猪苓菌丝体长势最好,最佳浓度为 0.020%,此时菌球数量最多,菌丝体平均干重为 2.156 g;其次为  $\beta$ -谷甾醇,浓度为 0.015%时,菌丝体长势最好,菌球数量较多,菌丝体平均干重为 2.035 g;豆甾醇长势最差,最佳浓度为 0.005%,菌丝体平均干重 0.753 g。

2.2 甾体含量测定结果

3 种诱导因子对猪苓甾体含量的影响存在显著的差异,且同一诱导物质不同浓度梯度之间有明显的区别。 $\beta$ -谷甾醇组(表 2)最佳添加浓度为 0.015%(A<sub>3</sub> 处理);豆甾醇组(表 3)猪苓甾体净增长量为 3 个处理中最小,净增长量小于不添加任何诱导物质的对照组,最佳添加浓度为 0.005%;胆固醇组(表 4)猪苓甾体净增长量为 3 个处理中最高,最佳添加浓度为 0.020%。因此,从甾体的净增长量来分析,胆固醇是最佳的诱导物质,其次为  $\beta$ -谷甾醇,豆甾醇最差,豆甾醇可能对猪苓甾体的合成有抑制作用。

图 2 表明, $\beta$ -谷甾醇组(A 组)和胆固醇组(C

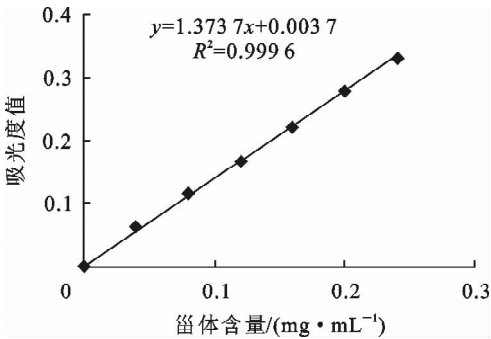


图 1 甾体化合物标准曲线图

Fig.1 Standard curve of the content of steroids against absorption

(2)样液制备和样品测定。取干燥后猪苓菌丝粉末或发酵液干燥研碎后粉末 0.5 g 左右至 50 mL 圆底烧瓶,加入 30 mL 甲醇回流提取 1 h,抽滤,重复此操作一次,合并滤液,减压浓缩至干;加入 30 mL 12%稀盐酸,置水浴上 80℃ 回流 30 min,冷却后加入氯仿 15 mL,重新置水浴上 80℃ 回流 4 h;冷却后萃取氯仿,并于旋转蒸发仪上蒸干,用氯仿溶出,定容至 10 mL,得待测液<sup>[8-11]</sup>。

组)猪苓甾醇的净增长量明显高于豆甾醇组(B组); 组(A组),胆固醇组(C组)其他两个浓度都高于β-除浓度为0.005%时,甾体净增长量低于β-谷甾醇 谷甾醇组(A组)。

表 2 添加β-谷甾醇的培养基中发酵液和菌丝体中总甾体的含量

Table 2 Total content of steroids in mycelium and fermentation broth on the media with β-sitosterol

| 培养基<br>编号 | 吸光度   |       | 甾体含量                           |           | 甾体总量<br>/mg | 诱导物质<br>加入量/mg | 甾体净增长量<br>/mg |
|-----------|-------|-------|--------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------------|
|           | 发酵液   | 菌丝体   | 发酵液<br>/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 菌丝体<br>/% |             |                |               |
| A1(对照)    | 0.104 | 0.105 | 0.072                          | 0.07      | 26.12       | 0              | 26.13         |
| A2        | 0.127 | 0.240 | 0.900                          | 1.72      | 49.85       | 12.50          | 37.35         |
| A3        | 0.161 | 0.369 | 0.114                          | 2.66      | 75.12       | 31.25          | 43.87         |
| A4        | 0.211 | 0.386 | 0.151                          | 2.79      | 89.64       | 50.00          | 39.64         |

表 3 添加豆甾醇的培养基中发酵液和菌丝体中总甾体的含量

Table 3 Total content of steroids in mycelium and fermentation broth on the media with stigmasterol

| 培养基<br>编号 | 吸光度   |       | 甾体含量                           |           | 甾体总量<br>/mg | 诱导物质<br>加入量/mg | 甾体净增长量<br>/mg |
|-----------|-------|-------|--------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------------|
|           | 发酵液   | 菌丝体   | 发酵液<br>/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 菌丝体<br>/% |             |                |               |
| B1(对照)    | 0.104 | 0.105 | 0.072                          | 0.070     | 26.12       | 0              | 26.12         |
| B2        | 0.129 | 0.265 | 0.091                          | 1.901     | 36.00       | 12.50          | 23.50         |
| B3        | 0.135 | 0.452 | 0.095                          | 3.263     | 51.67       | 31.25          | 20.42         |
| B4        | 0.157 | 0.859 | 0.112                          | 6.232     | 69.18       | 50.00          | 19.18         |

表 4 添加胆固醇的培养基中发酵液和菌丝体中总甾体的含量

Table 4 Total content of steroids in mycelium and fermentation broth on the media with cholesterol

| 培养基<br>编号 | 吸光度   |       | 甾体含量                           |           | 甾体总量<br>/mg | 诱导物质<br>加入量/mg | 甾体净增长量<br>/mg |
|-----------|-------|-------|--------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------------|
|           | 发酵液   | 菌丝体   | 发酵液<br>/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 菌丝体<br>/% |             |                |               |
| C1(对照)    | 0.104 | 0.105 | 0.072                          | 0.070     | 26.120      | 0              | 26.120        |
| C2        | 0.205 | 0.175 | 0.146                          | 1.247     | 47.185      | 12.5           | 34.685        |
| C3        | 0.388 | 0.211 | 0.279                          | 1.509     | 75.543      | 31.25          | 44.293        |
| C4        | 0.265 | 0.413 | 0.190                          | 2.979     | 103.224     | 50.00          | 53.224        |

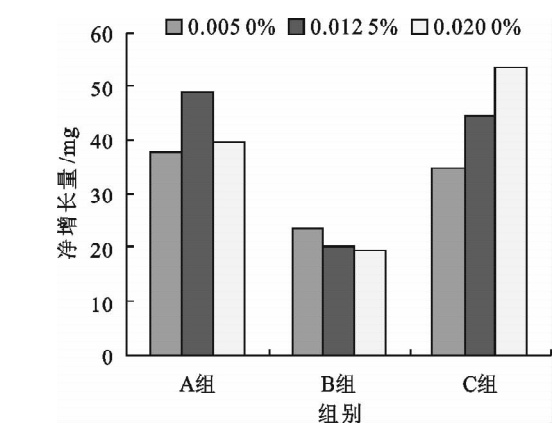


图 2 单一诱导物间甾体净增长量

Fig. 2 Single inducer net increase in steroid content between the control

3 结论与讨论

胆固醇的诱导效果最佳,最佳添加浓度为0.020%,此时甾体的净增量在3组中最高,为53.224 mg;其次是β-谷甾醇,最佳添加浓度为0.015%,甾体净增量为43.87 mg;豆甾醇的诱导效果最差,菌丝体干重和甾体净增量均低于对照组,最

佳添加浓度为0.005%,甾体净增量为23.50 mg。

由于胆固醇大量存在于动物体内,也是真菌中的重要组成部分,属于真菌甾醇<sup>[12]</sup>,结构更接近真菌甾体生物合成过程中的中间产物,比较容易诱导猪苓甾体产生。同时,胆固醇的水溶性高于其他两种甾醇,由于底物的溶解度是决定甾体生物转化的重要因素,因此较β-谷甾醇和豆甾醇的诱导效果好。

本实验研究了3种甾醇对猪苓甾体积累的诱导作用,通过实验,表明通过添加诱导因子,增加猪苓甾体的积累是可行的。

参考文献:

[1] 赵英勇,崔秀明,张文斌,等.猪苓的化学成分与药理作用研究进展[J].中药材,2009,32(11):1785-1787.  
[2] 江苏新医学院.中草药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1986.2191-2192.  
[3] 中医研究院中药研究所药理室肿瘤组.猪苓提取物毒性实验观察[J].新医学杂志,1979(5):315-317.  
[4] NOBUYASU S,HIROAKI H,YOICHIRO N,*et al.* Inhibitory effects of triterpenes isolated from chuling on free radical-in-

duced lysis of red blood cells[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(5):817-821.

[5] OHSAWA T, YUKAWA M, TAKAO C, *et al.* Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity[J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40(1): 143-147.

[6] LEE W Y, PARK Y, AHN J K, *et al.* Cytotoxic activity of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus* [J]. Bull Korean Chem Soc, 2005, 26(9): 1464-1466.

[7] 郭顺星,徐锦堂. 猪苓菌核的营养来源及与蜜环菌的关系[J]. 植物学报, 1992, 34(8): 576-580.

[8] 顾若卿. 复方丹参片中三七总皂甙的含量测定[J]. 中成药研究, 1987(8): 10-11.

[9] 梁生旺, , 刘伟. 中药制剂定量分析[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 409.

[10] 马敬中, 张友德. 甾体化合物的分光光度法测定[J]. 分析化学, 2000, 28(3): 390.

[11] 张新, 王志伟, 马琳. 娑罗子中总皂甙的比色测定[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 281.

ZHANG X, WANG Z W, MA L. A colorimetric estimation of total saponins in semen aesculi[J]. Natural Product Research and Development, 2000, 12(5): 281.

[12] 李静, 周立刚, 文成敬. 真菌甾体化合物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 165.

LI J, ZHOU L G, WEN C J. Research progress on the fungal steroids[J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20(1): 165.

[13] 张娟聪, 潘秋月, 孟祥河, 等.  $\beta$ -环糊精改善植物甾醇水溶性的研究[J]. 中国粮食学报, 2008, 24(4): 111-112.

ZHANG J C, PAN Q Y, MENG X H, *et al.* Improving water-solubility of phytosterol by  $\beta$ -cyclodextrin[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008, 24(4): 111-112.

[14] 李秀秀, 温竹, 肖克胜, 等.  $\beta$ -环糊精对甾体微生物转化菌种生长特性的影响[J]. 天津科技大学学报, 2006, 21(3): 1-4.

LI X X, WEN Z, XIAO K S, *et al.* Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin on the growing characteristic of steroid-biotransformation micro-organism [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2006, 21(3): 1-4.

[15] 阴葵, 王福东, 冯霞, 等. 超声处理在甾体微生物转化过程中的效应[J]. 化工学报, 1999, 50(3): 417-419.

YANG K, WANG F D, FENG X, *et al.* Effects of ultrasonic irradiation on microbial transformation of steroid[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 1999, 50(3): 417-419.

(上接第 123 页)

[9] 张涛, 郝双红, 田喧, 等. 苹果蠹蛾性信息素 E, E-8, 10-十二碳二烯-1-醇的立体选择性合成[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(1): 150-152.

ZHANG T, HAO S H, TIAN X, *et al.* Stereoselective synthesis of the sex pheromone of *Laspeyresia pomonella*, E, E-8, 10-dodecadienol-1[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(1): 150-152.

[10] EBERLE K E, JEHLE J A. Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2006, 93: 201-206.

[11] SABINE A K, DAVID G H. Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* L. [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 103: 59-64.