

# 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶主要活性成分的影响

张平<sup>1</sup>, 李晔<sup>2</sup>, 陈婵<sup>1</sup>, 赖腾强<sup>1</sup>, 陈丰<sup>1</sup>, 金凌云<sup>2</sup>, 朱忠敏<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福建农业职业技术学院, 福州 350119; <sup>2</sup>福建仙芝楼生物科技有限公司, 福州 350002

**摘要:** 采用灵芝固体发酵枇杷叶, 筛选出了适合发酵的灵芝菌株并分析了固体发酵前后枇杷叶中主要活性成分的变化。本文选用 8 个灵芝菌株, 根据不同灵芝菌株在枇杷叶基质中的生长情况选出最适合发酵的菌株, 并通过灵芝菌株固体发酵三个品种的枇杷叶, 研究发酵前后三种枇杷叶中多糖、总黄酮、三萜、总蛋白等活性成分的变化。结果表明: 适宜发酵的灵芝菌株为松杉灵芝, 经过灵芝菌株发酵枇杷叶后, 不同品种的枇杷叶中多糖平均增长率为 15.40%、总蛋白平均增长率为 43.60%、三萜含量平均降低 30.08%、黄酮含量大幅度降低视为未检出。

**关键词:** 灵芝; 固体发酵; 多糖; 总黄酮; 三萜; 总蛋白

中图分类号: S567.3 \* 1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.013

## Effects of Solid-State Fermentation of *Ganoderma lucidum* on the Main Active Components in Leaves of *Eriobotrya japonica*

ZHANG Ping<sup>1</sup>, LI Ye<sup>2</sup>, CHEN Chan<sup>1</sup>, LAI Teng-qiang<sup>1</sup>, CHEN Feng<sup>1</sup>, JIN Ling-yun<sup>2</sup>, ZHU Zhong-min<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fujian Vocational College of Agriculture, Fujian Fuzhou 350119, China;

<sup>2</sup>Fujian Xianzhilou Biological Science and Technology Co., Ltd., Fujian Fuzhou 350002, China

**Abstract:** In this study, the effects of solid fermentation of *Ganoderma lucidum* on the main components in the leaves of *Eriobotrya japonica* were analyzed. The optimal *G. lucidum* strain was obtained by comparing the growth situations of 8 *G. lucidum* strains on the leaves of *E. japonica*. The contents of polysaccharides, total flavonoid, triterpenoid and total protein were detected in the leaves of three *E. japonica* cultivars before and after the fermentation. The results showed that *G. tsugae* was suitable for the fermentation of the leaves of *E. japonica*, and the average increase of polysaccharides and total protein were 15.40% and 43.60%, respectively. However, the average content of triterpenoid decreased by 30.08% and the total flavonoid content decreased significantly to undetectable level.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; solid-state fermentation; polysaccharide; flavonoid; triterpenoid; total protein

枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 为蔷薇科植物, 枇杷叶是一味常用中药, 收载于历版《中华人民共和国药典》, 供中医临床使用。其味苦, 性微寒, 归肺胃经, 能清肺止咳、和胃、降逆、止渴, 主治肺热咳嗽、阴虚劳咳、湿疹等症。目前从枇杷叶中分离的化学成分主要有黄酮类、三萜酸类、倍半萜类、多酚类等成分<sup>[1]</sup>。灵芝为多孔菌科真菌灵芝的子实体, 是中华医药宝库中的珍品。灵芝的主要活性成分是多糖和三萜类化合物, 《中华人民共和国药典》(2010年版) 主要是以灵芝子实体多糖和三萜含量高低评价灵芝品质, 且菌丝体中多糖含量

较子实体高<sup>[2-4]</sup>。

以药用真菌为发酵菌株, 以具有活性成分的各种中药材为药性基质, 该基质既提供真菌生长所需的营养, 又因真菌的分解(合成)而产生新的成分, 从而使整个发酵作用具有双向性, 故称为“药用真菌双向固体发酵工程”<sup>[5]</sup>。目前, 以“双向发酵”为理论基础的现代中药研究成为热点, 寄望在提高药效或新药发现、中药减毒等方面有所突破。本研究采用固体发酵方法, 选药用真菌灵芝发酵枇杷叶, 初步探索灵芝菌株发酵枇杷叶中多糖、黄酮、三萜酸及总蛋白含量的变化, 为进一步分离其活性物质与表征及开发保健茶提供理论参考。

收稿日期: 2015-09-14 接受日期: 2015-12-03

基金项目: 福建省产业支撑科技重大项目(201311013)

\* 通讯作者 E-mail: zhangping\_85@163.com

## 1 材料与仪器

### 1.1 发酵基质及培养基

### 1.1.1 发酵基质

枇杷叶均于同一时间采摘于福建福清一都某枇杷果园的枇杷树,枇杷树分别为经福建省农作物品种审定委员会审定的“解放钟”、“早钟6号”、“莆选1号”三个品种(文中以数字符号1、2、3分别代表枇杷树品种“解放钟”、“早钟6号”、“莆选1号”);发酵枇杷叶也以同批三个品种为基质。

### 1.1.2 供试培养基

PDA 斜面培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL、pH 值自然,经 121 °C 高压灭菌 30 min,摆斜面,冷却备用。

PDA 平板培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼

脂 20 g、蒸馏水 1000 mL、pH 值自然,经 121 °C 高压灭菌 30 min,倒平板,冷却备用。

枇杷叶平板培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、枇杷叶 20 g、蒸馏水 1000 mL、pH 值自然,经 121 °C 高压灭菌 30 min,倒平板,冷却备用。

枇杷叶培养基:枇杷叶切成条状,恒温烘干(55 °C),按干叶:水 = 1:1.1 比例加水混合,充分均匀吸收水分后,用 15 cm × 30 cm × 0.05 cm 聚丙烯塑料袋装料,经 121 °C 灭菌 90 min,冷却备用。

## 1.2 发酵菌株

发酵菌株来源如表 1 所示。

表 1 菌株编号与来源

Table 1 Source information of the tested strains

菌株编号 Strain code	名称 Name	来源 Source	菌株编号 Strain code	原来名称 Name	来源 Source
LZ01	相思岭 1 号	福建农业职业技术学院	LZ05	韩芝	福建仙芝楼生物科技有限公司
LZ02	KE 血芝	福建农林大学菌物研究中心	LZ06	紫芝	福建仙芝楼生物科技有限公司
LZ03	无孢灵芝	福建农林大学菌物研究中心	LZ07	赤芝 119	福建仙芝楼生物科技有限公司
LZ04	松杉灵芝	福建仙芝楼生物科技有限公司	LZ08	大红芝	福建仙芝楼生物科技有限公司

## 1.3 主要试剂

芦丁标准品(含量 ≥ 98%,批号:100080-200707):阿拉丁试剂有限公司;熊果酸(批号:110742-200518):中国药品生物制品鉴定所;葡萄糖(批号:110833-201205):中国药品生物制品鉴定所;高氯酸、乙醇、冰醋酸、香草醛、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇等所用试剂均为分析纯。

## 1.4 主要仪器

SK2105 电磁炉:美的电器股份有限公司;LD500-1 电子天平:沈阳龙腾电子有限公司;722s 可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;101-2 型鼓风干燥箱:上海浦东荣丰科学仪器有限公司;BS224S 电子天平:赛多利斯科学仪器有限公司;凯氏定氮仪:上海纤仪有限公司;消化炉:上海纤仪有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 新鲜枇杷叶处理

选用无病虫害的成熟枇杷叶洗净→晾干→恒温烘干(55 °C)→粉碎过 30 目筛→待测样品。

### 2.2 菌株活化

取保藏的灵芝菌株,按照无菌操作要求,将灵芝

菌块转接至 PDA 斜面培养基上,25 °C 下恒温培养一周后再转接于 PDA 平板培养基上,25 °C 下恒温培养,待菌丝长满平板后备用。

## 2.3 菌种筛选

### 2.3.1 初筛

将在 PDA 平板培养基上活化的灵芝菌株,在无菌操作下,用打孔器( $d = 1.5$  cm)打取菌种,转接于枇杷叶平板培养基上,25 °C 下恒温培养,每个灵芝菌株做 5 个平行。观测各菌株的萌发时间、满板时间,以菌丝长势良好并能在一定时间长满平板的菌株作为复筛菌株。

### 2.3.2 复筛

在无菌操作下,将复筛菌株接入枇杷叶培养基,置于 25 °C 恒温培养箱避光培养,每组合接 10 袋。观测各菌株的萌发时间、满袋时间、菌丝长速、菌丝长势等,以能正常发酵、满袋时间短,发酵情况良好的菌株作为发酵菌株。

## 2.4 枇杷叶发酵及处理工艺

选用无病虫害的成熟枇杷叶洗净并切成条状,恒温烘干(55 °C),按干叶:水 = 1:1.1 比例加水混合,充分均匀吸收水分后装入食用菌原种培养瓶,按食用菌原种灭菌程序灭菌。灭菌结束冷却后取出,

在超净工作台按照无菌操作方法,将 1~1.5 cm 大小块状的灵芝菌种接入培养瓶中,盖好瓶盖,在黑暗、通风、22~25 ℃ 条件下培养,等菌丝吃透培养基时终止发酵,取出后恒温(60 ℃)烘干并粉碎过 30 目筛,即为待测样品。

## 2.5 总黄酮的测定<sup>[6]</sup>

枇杷叶黄酮含量测定采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法,以芦丁为对照品,在 510 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线为  $y = 1.1143x + 0.0048$ ,  $R^2 = 0.9998$ ,芦丁在 0.1~0.5 mg 范围内,与吸光度呈良好的线性关系。枇杷叶样品处理按《枇杷叶、枝条及果实总黄酮含量比较及抗氧化分析》<sup>[7]</sup>的方法进行处理并测定,每个样品测定 3 份。

## 2.6 多糖的测定

多糖测定以葡萄糖为对照品采用蒽酮-硫酸法,在 625 nm 进行吸光度测定得出线性回归方程为  $y = 5.9910x + 0.0007$ ,相关系数  $R^2 = 0.999$ ,葡萄糖在 0.02~0.12 mg 范围内,与吸光度呈良好的线性关系。样品处理与测定方法参照《中华人民共和国药典》(2010 年版)<sup>[3]</sup>,不同配方样品重复测定 3 份。

## 2.7 三萜酸的测定<sup>[8]</sup>

枇杷叶三萜测定以熊果酸为对照品,采用香草醛-冰醋酸法,在 546 nm 波长处测定吸光度,得出线性回归方程为  $y = 9.6627x - 0.0217$  ( $R^2 = 0.9995$ ),熊果酸含量在 0.04~0.20 mg 范围内呈良好线性关系。枇杷叶三萜样品处理和测定的方法参照《中华人民共和国药典》(2010 年版)<sup>[3]</sup>,不同配方样品重复测定 3 份。

## 2.8 总蛋白的测定<sup>[9]</sup>

### 2.8.1 样品的处理

精密称取固体试样 2 g,移入消化管中,加入 10 g 加速剂和 20 mL 硫酸,于八孔消化仪中消化。消

化结束后,冷却至室温,向消化管中加入 10 mL 水。在具塞锥形瓶中,加入 15 mL 硼酸溶液,加入 10 滴混合指示剂,照凯氏定氮仪说明书的要求进行处理。不同配方样品重复测定 3 份。

### 2.8.2 滴定

接收液用盐酸滴定液滴定,颜色由丝绿色至紫灰色时,且 0.5 min 内不褪色即为终点。同时做空白试验。按公式计算总蛋白的含量。

$$\text{蛋白质}(\%) = \frac{(\text{样品消耗盐酸体积} - \text{空白消耗盐酸体积}) \times \text{盐酸浓度} \times 0.014 \times 6.25}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

## 2.9 数据分析

应用 DPS 数据处理系统进行数据分析。采用 Duncan 新复极差法对实验数据进行方差分析和多重比较。

## 3 结果与分析

### 3.1 灵芝菌株筛选

初筛共筛选得到 LZ02、LZ04、LZ07、LZ08 四个菌株。这 4 个灵芝菌株能较好地枇杷叶平板上生长,且生长速度快,菌丝洁白,菌丝活力好。

再根据初筛得到的 4 个菌株在枇杷叶培养基上的发酵情况即菌丝生长速度、菌丝满袋时间,菌丝外观等数据选出在枇杷叶培养上最适生长的菌株是 LZ04(松杉灵芝),将该菌株定为发酵枇杷叶的灵芝菌株(见表 2)。

### 3.2 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶总黄酮的影响

灵芝菌株固体发酵对枇杷叶总黄酮的影响见表 3。结果表明,经过灵芝菌株固体发酵后,不同品种的枇杷叶中总黄酮含量可以视为未检出。数据反映了在灵芝菌株发酵过程中分解利用了枇杷叶中的黄酮类物质,并较少或不合成黄酮类化合物;另有研究表明高温对黄酮有一定的降解作用<sup>[10]</sup>。因此,培养基高温灭菌的过程中黄酮类化合物也有部分降解。

表 2 不同灵芝菌株在枇杷叶中的生长情况

Table 2 Growth of four *G. lucidum* strains on the leaves of *E. japonica*

菌株编号 Strain code	萌发天数 Germination days (d)	满袋天数 Days of mycelia filled the bags (d)	长势 Growth vigor	菌丝外观 Mycelium appearance	生长速度 Growth rate (cm/d)
LZ02	1	30	++	洁白密集	0.51 <sup>C</sup>
LZ04	2	27	+++	洁白浓密	0.56 <sup>A</sup>
LZ07	2	32	+	洁白均匀	0.49 <sup>D</sup>
LZ08	1	30.5	++	洁白密集	0.52 <sup>B</sup>
对照 Control	-	-	-	-	-

注:表中“生长速度”一列上标不同字母表示差异显著( $P < 0.01$ )。

Note: Values with different superscript letters indicated significant difference ( $P < 0.01$ ) under the column of “Growth rate”.

表3 发酵前后枇杷叶中总黄酮含量的比较

Table 3 Comparison of flavonoids content in the leaves of *E. japonica* before and after fermentation

编号 No.		平均值 Average (%)	增长率 Rate of increase (%)
样品1 Sample1	发酵前 Before fermentation	0.40 ± 0.03 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	0.044 ± 0.007 <sup>bA</sup>	-89
样品2 Sample2	发酵前 Before fermentation	0.50 ± 0.04 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	0.042 ± 0.004 <sup>bA</sup>	-91.6
样品3 Sample3	发酵前 Before fermentation	0.65 ± 0.04 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	0.043 ± 0.004 <sup>bA</sup>	-93.38

注:表中“平均值”列上标小写字母表示同一个品种枇杷叶发酵前后总黄酮含量的差异显著( $P < 0.01$ ),大写字母表示发酵后不同品种枇杷叶总黄酮含量的差异显著( $P < 0.01$ )。

Note: The superscript lowercase letters showed the differences of flavonoids content before and after fermentation within the same cultivar ( $P < 0.01$ ); the superscript capital letters showed the difference of flavonoids content of different cultivars after fermentation under the column of “Average” ( $P < 0.01$ ).

### 3.3 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶多糖的影响

灵芝菌株固体发酵对枇杷叶中多糖的影响见表4。表中结果表明经过灵芝菌株固体发酵后,不同品种的枇杷叶中多糖均显著增加,三个品种平均增长率为15.40%。其中样品3(“莆选1号”)的多糖含

量最高,其次为样品1(“解放钟”)。其原因在于灵芝菌丝在生长过程中产生了能够分解纤维素、半纤维素和木质素等的酶系<sup>[11]</sup>,枇杷叶中的纤维素、半纤维素等被降解后,被灵芝菌丝体所利用并合成了多糖类物质。

表4 发酵前后枇杷叶中多糖含量的比较

Table 4 Comparison of polysaccharides content in the leaves of *E. japonica* before and after fermentation

编号 Number		平均值 Average (%)	增长率 Rate of increase (%)
样品1 Sample1	发酵前 Before fermentation	2.93 ± 0.05 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	3.38 ± 0.01 <sup>aA</sup>	15.47
样品2 Sample2	发酵前 Before fermentation	2.52 ± 0.04 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	3.06 ± 0.06 <sup>aB</sup>	21.27
样品3 Sample3	发酵前 Before fermentation	3.10 ± 0.05 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	3.39 ± 0.04 <sup>aA</sup>	9.47

注:表中“平均值”列上标小写字母表示同一个品种枇杷叶发酵前后多糖含量的差异( $P < 0.01$ ),大写字母表示发酵后不同品种枇杷叶多糖含量的差异( $P < 0.01$ )。

Note: The superscript lowercase letters showed the differences of polysaccharides content before and after fermentation within the same cultivar ( $P < 0.01$ ); the superscript capital letters showed the difference of polysaccharides content of different cultivars after fermentation under the column of “Average” ( $P < 0.01$ ).

### 3.4 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶三萜酸的影响

灵芝菌株固体发酵对枇杷叶三萜酸的影响见表5。表中结果表明经过灵芝菌株固体发酵后,不同品种的枇杷叶中三萜酸含量均降低,三个品种平均降低30.08%。说明灵芝菌丝在发酵枇杷叶的代谢过程中不仅分解、利用了枇杷叶中所含的三萜酸,而且较少合成灵芝菌丝体自身的三萜酸。

### 3.5 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶中总蛋白的影响

灵芝菌株固体发酵对枇杷叶总蛋白的影响见表6。由表中数据可知经过灵芝菌株固体发酵后,不同品种的枇杷叶中总蛋白含量均有显著增加,其中样

品2“早钟6号”增长最多,三个品种平均增长率为43.60%。灵芝菌丝在发酵枇杷叶的代谢过程中分解利用枇杷叶中的营养物质合成了灵芝菌丝体自身的蛋白质,显然灵芝菌丝体的总蛋白高于枇杷叶的总蛋白。

## 4 结论与讨论

在枇杷叶培养上最适生长的菌株 LZ04(松杉灵芝)。经过灵芝菌株固体发酵后,不同品种的枇杷叶中多糖、总蛋白均呈现显著性增加,其中样品2“早钟6号”增加最多,但三萜酸减少,总黄酮含量

视为未检出。但是固体发酵后产生代谢产物无论是多糖或蛋白质,其生理功效与发酵前的枇杷叶是不同的,整个发酵作用具有双向性<sup>[5]</sup>。

表5 发酵前后枇杷叶中三萜酸的比较

Table 5 Comparison of triterpenoid content in the leaves of *E. japonica* before and after fermentation

编号 Number		平均值 Average (%)	增长率 Rate of increase (%)
样品1 Sample1	发酵前 Before fermentation	3.19 ± 0.06 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	2.31 ± 0.04 <sup>bB</sup>	-27.58
样品2 Sample2	发酵前 Before fermentation	2.51 ± 0.07 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	1.59 ± 0.06 <sup>bC</sup>	-36.65
样品3 Sample3	发酵前 Before fermentation	3.42 ± 0.06 <sup>a</sup>	-
	发酵后 After fermentation	2.53 ± 0.06 <sup>bA</sup>	-26.02

注:表中“平均值”列上标小写字母表示同一个品种枇杷叶发酵前后三萜含量的差异( $P < 0.01$ );大写字母表示发酵后不同品种枇杷叶三萜含量的差异( $P < 0.01$ )。

Note: The superscript lowercase letters showed the differences of triterpenoid content before and after fermentation with the same cultivar ( $P < 0.01$ ) and the superscript capital letters showed the difference of triterpenoid content of different cultivars after fermentation in the column of “Average” ( $P < 0.01$ ).

表6 灵芝菌株固体发酵对枇杷叶总蛋白的影响

Table 6 Comparison of total protein content in the leaves of *E. japonica* before and after fermentation

编号 Number		平均值 Average (%)	增长率 Rate of increase (%)
样品1 Sample1	发酵前 Before fermentation	8.89 ± 0.05 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	11.93 ± 0.10 <sup>aA</sup>	34.20
样品2 Sample2	发酵前 Before fermentation	7.59 ± 0.56 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	11.29 ± 0.03 <sup>aB</sup>	48.75
样品3 Sample3	发酵前 Before fermentation	7.42 ± 0.05 <sup>b</sup>	-
	发酵后 After fermentation	10.97 ± 0.04 <sup>aC</sup>	47.84

注:表中“平均值”列上标小写字母表示同一个品种枇杷叶发酵前后总蛋白含量的差异( $P < 0.01$ ),大写字母表示发酵后不同品种枇杷叶总蛋白含量的差异( $P < 0.01$ )。

Note: The superscript lowercase letters showed the differences of total protein content before and after fermentation within the same cultivar ( $P < 0.01$ ) and the superscript capital letters showed the difference of total protein content of different cultivars after fermentation in the column of “Average” ( $P < 0.01$ ).

有研究表明在灵芝菌丝生长阶段纤维素酶系酶活性是逐渐升高,降解纤维素速率增加,大量的纤维素被降解为小分子的糖类物质<sup>[12]</sup>。灵芝菌株固体发酵枇杷叶后,合成的灵芝菌丝体的多糖类物质含量比未发酵的枇杷叶多。

虽然灵芝菌丝的三萜酸含量低于枇杷叶,但是灵芝三萜酸的生理作用不同于枇杷叶,据福建仙芝楼生物科技有限公司多次实验证实,灵芝三萜酸含量主要在灵芝子实体及灵芝孢子中测得。

目前对灵芝活性物质的研究主要集中在多糖和三萜类化合物,而有研究表明灵芝蛋白有着明显的生物学活性作用,主要表现在调节免疫功能、防癌与抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗病毒等功效<sup>[13]</sup>,而本实验测得灵芝菌株发酵枇杷叶后总蛋白显著增加。通过

灵芝菌株固体发酵途径,对分离、提取灵芝免疫蛋白、探索其生理功效提供了更广阔的空间。

将灵芝菌株固体发酵枇杷叶后,其代谢产物会因不同枇杷叶的品种有差异,也会因不同的灵芝菌株有差异,其活性物质的进一步分离和表征也有待研究。

#### 参考文献

- 1 Sha N (沙娜), Liang JY (梁敬钰). Development of *Eriobotrya Japonica* (Thumb.) Lindl. *Strait Pha J* (海峡药学), 2006, 18(1): 6-11.
- 2 Lin ZB (林志彬). Modern Research of *Ganoderma lucidum* (灵芝的现代研究). Beijing: Beijing Medical University Press, 2001. 225.