

灵芝-刺梨双向发酵工艺及发酵产物抗氧化活性评价

刘潇婕, 黄青巧, 刘秀宇, 李丹妮*, 黄钦*

(广西民族大学化学化工学院, 林产化学与工程国家民委重点实验室, 广西林产化学与工程重点实验室/协同创新中心, 林木生物质低碳高质利用广西高校工程研究中心, 广西南宁 530006)

摘要: 该研究采用单因素结合正交试验对灵芝-刺梨双向发酵条件进行优化, 对灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液的活性成分含量和体外抗氧化活性进行测定。在初始 pH 值为 5.50, 灵芝接种量为 4% (V/V)、刺梨粉添加量为 20 g/L 时, 发酵体系多糖含量较高, 且各因素的影响顺序为灵芝接种量 > 刺梨粉添加量 > 初始 pH 值; 在单因素实验最适条件下, 与灵芝发酵液相比, 加入刺梨粉后, 活性成分多糖、黄酮、多酚以及三萜化合物的含量显著增加 ($P < 0.05$), 质量浓度分别为 25.20 mg/mL、41.47 $\mu\text{g/mL}$ 、93.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 254.55 $\mu\text{g/mL}$, 灵芝-刺梨发酵产物 (3.00 mg/mL) 对羟自由基清除率、DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率及还原力达到 51.54%、84.87%、94.79%、0.60, 明显高于未加入刺梨粉的发酵产物 (45.16%、74.55%、73.34%、0.43)。以灵芝为发酵菌株, 以刺梨为培养基质, 双向发酵产物的抗氧化活性得到提高, 表明了灵芝-刺梨双向液体发酵工艺相比于传统发酵工艺具有一定的优越性, 为灵芝-刺梨发酵体系的药食同源产品开发提供依据。

关键词: 灵芝; 刺梨; 双向发酵; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2025)07-125-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.7.0661

Bi-directional Fermentation Process of *Ganoderma lucidum* and *Rosa roxburghii* Tratt and Evaluation of Antioxidant Activity of the Fermentation Products

LIU Xiaojie, HUANG Qingqiao, LIU Xiuyu, LI Danni*, HUANG Qin*

(Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, State Ethnic Affairs Commission; Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products/Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Minzu University, Engineering Research Center of Low-carbon and High-quality Utilization of Forest Biomass, University of Guangxi, Nanning 530006, China)

Abstract: In this study, the bi-directional fermentation conditions of *Ganoderma lucidum* and *Rosa roxburghii* Tratt were optimized by single-factor combined with orthogonal experiments. The content of active ingredients and *in vitro*

引文格式:

刘潇婕, 黄青巧, 刘秀宇, 等. 灵芝-刺梨双向发酵工艺及发酵产物抗氧化活性评价[J]. 现代食品科技, 2025, 41(7): 125-132.

LIU Xiaojie, HUANG Qingqiao, LIU Xiuyu, et al. Bi-directional fermentation process of *Ganoderma lucidum* and *Rosa roxburghii* Tratt and evaluation of antioxidant activity of the fermentation products [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 125-132.

收稿日期: 2024-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860192; 32360361); 广西自然科学基金项目 (2018GXNSFAA138126); 广西民族大学科研基金资助项目 (引进人才科研启动项目, 2022KJQD15); 广西研究生教育创新项目 (YCBZ2023116)

作者简介: 刘潇婕 (1997-), 女, 在读硕士, 研究方向: 制药与精细化工, E-mail: 202220856001482@stu.gxmzu.edu.cn

通讯作者: 李丹妮 (1979-), 女, 博士, 主管药师, 研究方向: 中药新制剂制备及药理学活性研究, E-mail: lidanni@gxmzu.edu.cn; 共同通

讯作者: 黄钦 (1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 环境净化材料设计及性能研究, 分子模拟热动力学机理, 中药作用机理和药物分离方法的研究, E-mail: huangqin@gxmzu.edu.cn

antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* fermentation broth and *Ganoderma lucidum*-*Rosa roxburghii* Tratt fermentation broth were determined. When the initial pH was 5.50, the *Ganoderma lucidum* inoculum amount was 4% (V/V) and the addition amount of *Rosa roxburghii* Tratt was 20 g/L, the polysaccharide content of the fermentation system was high, and the order of influence of the factors was *Ganoderma lucidum* inoculum amount>addition amount of *Rosa roxburghii* Tratt>initial pH. Under the optimum conditions of the single factor experiments, compared with the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* alone, the addition of *Rosa roxburghii* Tratt powder significantly increased the contents of active ingredients such as polysaccharides, flavonoids, polyphenols, and triterpenoids ($P<0.05$), and their mass concentrations were 25.20 mg/mL, 41.47 $\mu\text{g/mL}$, 93.00 $\mu\text{g/mL}$ and 254.55 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The hydroxyl radical scavenging rate, DPPH radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate and reducing power of the *Ganoderma lucidum*-*Rosa roxburghii* Tratt fermentation product (3.00 mg/mL) were 51.54%, 84.87%, 94.79% and 0.60, which were significantly higher than those of the fermentation products without *Rosa roxburghii* Tratt (45.16%, 74.55%, 73.34%, 0.43). With *Ganoderma lucidum* strain as the fermentation strain and *Rosa roxburghii* Tratt as the culture medium, the antioxidant properties of the bi-directional fermentation products increased, indicating that the bi-directional liquid fermentation process of *Ganoderma lucidum*-*Rosa roxburghii* Tratt had certain advantages over the traditional fermentation process. The finding of this research provides a basis for the development of medicine and food homologous products based on *Ganoderma lucidum*-*Rosa roxburghii* Tratt fermentation system.

Key words: *Ganoderma lucidum*; *Rosa roxburghii* Tratt; bi-directional fermentation; antioxidant activity

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 属于灵芝菌科、灵芝属^[1], 又被称为仙草、灵芝草、瑞草^[2], 是一种有名的药食两用型真菌。现代药理研究表明, 灵芝在抗衰老^[3]、保肝^[4]、抗肿瘤^[5]、抗氧化、免疫调节^[6]等方面具有良好的生理功能。刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 学名为缙丝花^[7], 蔷薇科蔷薇属植物^[8], 是一种主要产自我国西南地区的野生水果^[9], 是我国营养价值丰富的野生资源之一, 富含多糖、黄酮、超氧化物歧化酶等活性成分, 具有降血糖、抗肿瘤、降血脂^[10]、抗氧化等多种功效。

灵芝人工栽培子实体栽培方式主要包括仿野生环境栽培、袋料栽培、椴木栽培等^[11], 耗费周期长, 需要的成本高, 且可能会产生虫蚁危害等问题, 研究表明相比于人工栽培, 利用液体发酵方法生产灵芝菌丝体具有生长状况良好、所需时间短^[12]、容易实现规模发酵、成本低廉等优点, 并且可以通过对发酵条件的调控实现对特定产物的富集。

以药用真菌为发酵菌株, 以具有活性成分的中药材作为发酵基质, 中药材为真菌提供生长所需的营养物质, 又在真菌的作用下产生活性成分, 从而使整个发酵过程具有双向性^[13]。近年来, 灵芝与其他中药材双向发酵有了更进一步的发展^[14], 何伟等^[15]利用黄芪、当归、山药和薏米仁与灵芝菌进行液体发酵, 四种中药材特别是

黄芪对灵芝的液体发酵具有一定的促进作用, 推动了灵芝发酵产物在化妆品和保健品等领域的应用^[16]。目前, 缺乏灵芝菌与刺梨的双向液体发酵工艺及发酵产物抗氧化活性评价的研究, 将灵芝和刺梨进行双向液体发酵, 有望提高发酵水平和抗氧化物质含量。

该研究以灵芝为出发菌株, 以刺梨为基质成分, 进行灵芝-刺梨双向液体发酵, 并对灵芝发酵液与灵芝-刺梨发酵液的抗氧化活性进行对比, 旨在探究刺梨对灵芝液体发酵的影响, 为以灵芝和刺梨为原料的相关新产品的多元化开发利用和技术创新提供一定的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺梨, 产自贵州; 赤灵芝菌种、赤灵芝栽培种, 购自岷源菌种; 蛋白胨、酵母浸粉, 北京索莱宝有限公司; 福林酚, 上海麦克林科技有限公司; 盐酸硫胺、七水硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、三氯化铁、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、芦丁、齐墩果酸、亚硝酸钠、抗坏血酸、苯酚、亚硫酸钠、硫酸亚铁、葡萄糖、铁氰化钾、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、三氯乙酸, 分析纯, 上海阿拉丁股份有限公司。

1.2 仪器和设备

SW-CJ-1F 超净工作台, 苏州安泰有限公司; MQD-S3HR 震荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯医疗股份有限公司; Alpha 1-4 LSC B 冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司; UV-1800PC 紫外可见分光光度计, 上海翊翔仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 刺梨粉的制备

刺梨用去离子水清洗, 置于烘箱中 60 °C 烘干至质量恒定, 取出后用高速粉碎机破碎, 过 40 目筛, 保存备用。

1.3.2 灵芝液体种子液的制备

挑取 5 块 0.50 cm×0.50 cm 大小的菌种, 接种到 250 mL 锥形瓶中, 锥形瓶中装有 100 mL 种子培养基, 震荡培养器设置转速 150 r/min, 温度 28 °C, 振荡培养 7 d, 培养结束后, 4 °C 保存备用。

种子培养基: 葡萄糖 35 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 维生素 B_1 0.10 g/L, 蛋白胨 5 g/L。

1.3.3 灵芝液体发酵、灵芝-刺梨双向发酵工艺

发酵使用 250 mL 锥形瓶, 每瓶装入 100 mL 发酵培养基, 加入一定量的刺梨粉, 121 °C、25 min 高温高压灭菌, 灭菌完成后, 向锥形瓶中加入一定量的灵芝液体种子液, 震荡培养箱 28 °C, 150 r/min 培养 7 d。

发酵培养基: 葡萄糖 35 g/L, 蛋白胨 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 维生素 B_1 0.10 g/L。

1.3.4 生物量的测定

将锥形瓶中的发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入去离子水充分混匀后再次离心, 收集沉淀得到湿菌体, 将其置于 60 °C 烘箱中烘干至质量恒定, 对干菌体进行称重, 得到生物量。

1.3.5 活性成分的测定

灵芝具有较高的抗氧活性, 主要作用的物质为多糖和三萜等, 刺梨中含有多糖、多酚、黄酮等多种活性成分, 同样具有良好的抗氧化活性。为了探究加入刺梨粉后发酵的产物活性成分含量是否会增加, 对同等发酵条件下的灵芝发酵液和灵芝-刺梨

发酵液的总多糖、黄酮、三萜及多酚含量进行测定。

总多糖含量测定: 采用苯酚-硫酸法^[17], 葡萄糖为标准品, 回归方程为 $Y=10.483\ 3X-0.052$, $R^2=0.999\ 25$ 。

黄酮含量测定: 实验方法参考孟歌等^[18], 以芦丁作为标准品, 回归方程为 $Y=2.905\ 74X-0.001$, $R^2=0.999\ 75$ 。

多酚含量测定: 实验方法参考文献^[19], 采用福林酚比色法进行多酚含量测定, 以邻苯三酚为标准品, 得到回归方程为 $Y=0.015\ 58X-0.065$, $R^2=0.999\ 62$ 。

三萜含量测定: 采用香草醛-冰醋酸显色反应进行三萜含量的测定, 参照赵小瑞^[20]方法, 齐墩果酸作为标准品, 回归方程为 $Y=4.642\ 86X-0.023\ 86$, $R^2=0.999\ 68$ 。

1.3.6 灵芝-刺梨双向发酵工艺优化

1.3.6.1 单因素实验

以发酵体系多糖含量及生物量为指标, 分别设置初始 pH 值为 4.50、5.00、5.50、6.00、6.50、7.00, 刺梨粉添加量 4、8、12、16、20 g/L, 灵芝接种量为 2%、4%、6%、8%、10% (V/V), 探究不同初始 pH 值、刺梨粉添加量以及灵芝接种量对灵芝-刺梨双向发酵体系的影响。

1.3.6.2 正交实验设计

在单因素实验结果的基础上, 以多糖含量为主要指标, 选取初始 pH 值、刺梨粉添加量、接种量三个因素及 $L_9(3^4)$ 正交实验表设计进行 3 因素 3 水平正交实验。

1.3.7 抗氧化活性的测定

1.3.7.1 样品制备

灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液: 两种发酵液均在初始 pH 值为 5.50, 刺梨粉添加量为 16 g/L, 灵芝接种量为 6% (V/V) 的发酵条件下得到, 发酵产物离心取上清液, 50 °C 旋蒸浓缩, 低温冷冻干燥, 得到灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液冻干粉末。

1.3.7.2 羟自由基清除能力测定

实验方法参考文献^[21], 取 2.00 mL 不同质量浓度的样品溶液, 加入 2.00 mL 0.009 0 mol/L FeSO_4 溶液, 加入 2.00 mL 0.008 8 mol/L H_2O_2 溶液、2.00 mL 0.009 0 mol/L 水杨酸溶液, 置于水浴锅中, 37 °C 反应 30 min, 维生素 C (Vc) 作为阳性对照, 在 510 nm 处检测吸光度。

按照公式 (1) 计算:

$$C_1 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C_1 ——羟自由基清除率, %;

A_0 ——用去离子水代替样品的吸光度;

A_1 ——样品溶液吸光度;

A_2 ——去离子水代替 H_2O_2 溶液的吸光度。

1.3.7.3 ABTS⁺自由基清除能力测定

实验方法参考文献^[22], 将 0.002 6 mol/L $K_2S_2O_8$ 与 0.007 4 mol/L ABTS 溶液 1:1 混合摇匀, 避光环境保存 12~16 h, 上述混合溶液放置过夜, 将其与无水乙醇以一定比例混合, 使混合液吸光度在 734 nm 处达到 0.70 左右, 即得到 ABTS 工作液, 使用时现配。将 3.00 mL ABTS 工作液与 0.50 mL 不同质量浓度的样品溶液混合均匀, 室温条件下避光反应 6 min, Vc 组作为阳性对照, 在 734 nm 处检测吸光度。

按照公式 (2) 计算:

$$C_2 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C_2 ——ABTS⁺自由基清除率, %;

A_0 ——ABTS 与去离子水工作液混合后吸光度;

A_1 ——样品溶液与 ABTS 工作液混合后吸光度;

A_2 ——样品溶液与去离子水混合后吸光度。

1.3.7.4 DPPH自由基清除能力测定

实验方法参考文献^[23], 将 2.00 mL 0.000 20 mol/L DPPH 溶液与 2.00 mL 不同质量浓度的样品溶液混合, 摇匀, 避光环境下静置 30 min, Vc 组为阳性对照, 在 510 nm 处检测吸光度。

按照公式 (3) 计算:

$$C_3 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C_3 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——无水乙醇和 DPPH 溶液混合的吸光度;

A_1 ——样品溶液和 DPPH 溶液混合的吸光度;

A_2 ——样品溶液和无水乙醇混合后的吸光度。

1.3.7.5 还原力测定

实验方法参考文献^[24], 取 1.00 mL 不同质量浓度的样品溶液, 加入 2.50 mL 0.20 mol/L PBS 溶液、2.50 mL 铁氰化钾溶液, 置于水浴锅中, 50 °C 反应 20 min, 取出后, 加入 2.50 mL 10% (m/V) 三氯乙

酸溶液, 摇匀, 离心, 取反应上清液 2.50 mL 于离心管中, 再加入 2.50 mL H_2O 和 0.50 mL 三氯化铁溶液, 混匀静置 10 min, 在 734 nm 处检测吸光度值。

按照公式 (4) 计算:

$$C_4 = A_1 - A_0 \quad (4)$$

式中:

C_4 ——总还原力;

A_0 ——去离子水代替铁氰化钾溶液吸光度;

A_1 ——样品溶液吸光度。

1.4 数据处理

数据采用平均值 ± 标准差表示, 采用 Excel 2019 进行数据处理及显著性分析, 采用 Origin 2024 软件进行作图。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 初始pH值对多糖含量及生物量的影响

培养基的初始 pH 值会影响真菌生长过程中菌丝体的形态以及活性成分含量变化, 目标产物不同, 初始 pH 值不同。培养基初始 pH 值为 4.50、5.00、5.50、6.00、6.50 时, 实验结果见图 1, 当培养基的初始 pH 值小于 5.50 时, 发酵体系多糖含量及生物量均随着 pH 值的增大而增高, 当培养基初始 pH 值大于 5.50 时, 发酵体系多糖含量及生物量随着 pH 值的增大而降低, 当 pH 值为 5.50 时, 发酵体系多糖含量及生物量达到峰值, 分别为 27.48 g/L 和 3.14 g/L, 符合灵芝在 pH 值为 5.00~6.50 条件下最适宜生长的条件, 在臧晋等^[25]的研究中, 培养基初始值为 6.0 时, 最有利于菌体的生长和多糖的合成。

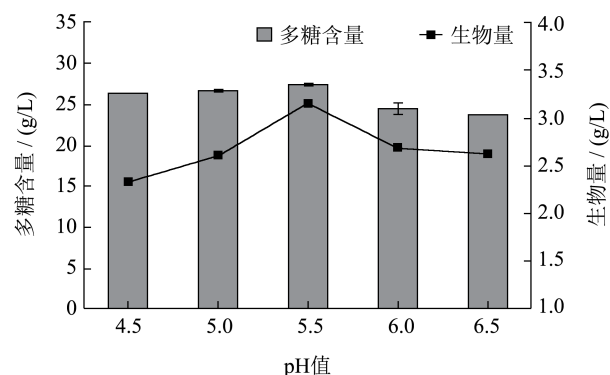


图 1 初始 pH 值对多糖含量及生物量的影响

Fig.1 Effects of initial pH on the content of polysaccharides and biomass

2.1.2 刺梨粉添加量对多糖含量及生物量的影响

由于刺梨粉含有大量的黄酮、SOD、多糖、Vc等多种活性成分，适当添加刺梨粉可以提高培养基活性成分含量，并且在摇床发酵过程中对菌丝体起到物理剪切的效果，但是加入过量的刺梨粉会影响发酵体系的溶氧量^[26]从而阻碍灵芝菌的生长。当刺梨粉添加量为4、8、12、16、20 g/L时，实验结果见图2，当刺梨粉添加量小于16 g/L时，发酵体系多糖含量及生物量均随着刺梨粉添加量的增加而增高，当刺梨粉添加量大于16 g/L时，发酵体系多糖含量及生物量随着刺梨粉添加量的增加而下降，当刺梨粉添加量为16 g/L时，发酵体系多糖含量及生物量达到峰值，分别为23.44 g/L和2.45 g/L，因此选择发酵体系适宜的刺梨粉添加量为16 g/L。

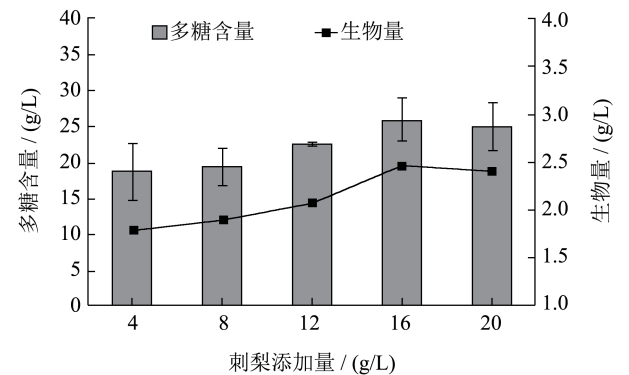


图2 刺梨粉添加量对多糖含量及生物量的影响
Fig.2 Effects of addition amount of *Rosa roxburghii* Tratt on the content of polysaccharides and biomass

2.1.3 灵芝接种量对多糖含量及生物量的影响

灵芝菌的接种量过低时，菌体的生长速度缓慢，因此达到发酵终点需要较长的时间；灵芝菌的接种量比较大时，会引起菌体生长过于旺盛，造成培养基的营养成分不足，导致发酵体系活性成分含量下降^[27]。灵芝接种量为2%、4%、6%、8%（V/V）时，实验结果见图3，随着接种量逐渐增加，发酵体系生物量和多糖含量都呈现出先上升后下降的趋势，可能与菌丝球的大小和数量有关，接种量对发酵体系的生物量影响较小，对活性成分含量影响比较大。研究表明接种量较大时，发酵体系的多糖产量较高；接种量较小时，菌丝球直径较大，发酵体系中灵芝酸产量较高^[28]。当接种量为4%（V/V）时，生物量达到峰值2.70 g/L，当接种量为6%（V/V）时，发酵体系多糖含量达到最大，为25.70 g/L，以多糖的含量为主要指标，因此选择6%（V/V）作为发酵体系适宜的灵芝接种量。

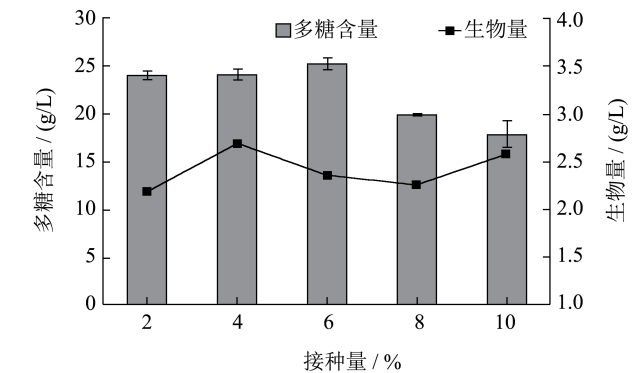


图3 灵芝接种量对多糖含量及生物量的影响
Fig.3 Effects of *Ganoderma lucidum* inoculum size on the content of polysaccharides and biomass

2.2 正交实验

表 1 正交实验因素水平表			
Table 1 The table of factors and levels of orthogonal experiment			
水平	因素		
	A (初始 pH 值)	B(刺梨粉添加量)/(g/L)	C (接种量)/%
1	5.00	12	4
2	5.50	16	6
3	6.00	20	8

表 2 正交试验设计和结果					
Table 2 The orthogonal experiment design and results					
试验号	因素			D	多糖含量/(g/L)
	A(初始 pH 值)	B(刺梨粉添加量)/(g/L)	C(灵芝接种量)/%		
1	1	1	1	1	22.70
2	1	2	2	2	22.48
3	1	3	3	3	24.20
4	2	1	2	3	21.45
5	2	2	3	1	21.34
6	2	3	1	2	29.81
7	3	1	3	2	22.39
8	3	2	1	3	26.30
9	3	3	2	1	23.25
均值 1	23.13	22.18	26.27	22.43	
均值 2	24.20	23.37	22.39	24.89	
均值 3	23.98	25.75	22.65	23.99	
极差	1.07	3.58	3.88	2.46	

在单因素实验的基础上，选取初始 pH 值、刺梨粉添加量、接种量三个因素设计 3 因素 3 水平正

交实验水平表（表 1），使用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行正交试验并对结果进行极差分析（表 2）。由表 2 可知，三个实验因素对多糖含量的影响由大到小依次为灵芝接种量（C）>刺梨粉添加量（B）>初始 pH 值（A），最佳组合为 $A_2B_3C_1$ ，即初始 pH 值 5.50，刺梨粉添加量 20 g/L，灵芝接种量为 4%，在此发酵条件下，灵芝-刺梨发酵液多糖含量为 29.81 g/L。

2.3 活性成分的含量

灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液均在初始 pH 值为 5.50，刺梨粉添加量为 16 g/L，灵芝接种量为 6%（V/V）的发酵条件下得到。从表 3 可以看出，与灵芝发酵液相比，加入刺梨形成灵芝-刺梨双向发酵体系后，活性成分多糖、黄酮等的含量显著增加（ $P<0.05$ ），说明在发酵过程中，刺梨有效地促进了灵芝菌丝体生长过程中产生多糖等活性成分。罗灿等^[29]利用灵芝菌发酵玉竹，发现其水溶性活性多糖含量和抗氧化活性均有不同程度的提高。推测引起发酵体系活性成分含量显著增高（ $P<0.05$ ）的原因可能是多方面的，一方面，在发酵体系中加入刺梨后，刺梨中的某些物质促进了发酵过程中灵芝菌丝生长过程中多糖、三萜等一些活性成分的生成^[30]；另一方面，灵芝菌种在发酵的过程中会产生大量酶^[31]，产生的酶可能对分解刺梨组织和细胞壁中的纤维素和木质素等大分子物质有一定的促进作用，使有效成分得到更充分的释放，有利于刺梨中的多酚等成分的析出，其次，在液体发酵过程中，某些微生物的转化作用^[32]也可能会把刺梨中的多糖、黄酮等或其他成分转化成具有抗氧化活性的物质，具体的机制需要进行进一步的探索。该研究中灵芝与刺梨共同发酵后灵芝菌丝体生长状况良好，表明刺梨可以为灵芝菌丝体的生长以及活性成分的生成提供物质基础。

表 3 发酵液活性成分含量对比

Table 3 Comparison of active ingredient content in fermentation liquids

活性成分 (质量浓度)	多糖 (mg/mL)	黄酮 (μg/mL)	多酚 (μg/mL)	三萜 (μg/mL)
灵芝 发酵液	17.47±0.42 ^a	6.37±0.24 ^a	54.88±0 ^a	88.06±29.55 ^a
灵芝-刺 梨发酵液	25.20±0.71 ^b	41.47±0.24 ^b	93.00±2.81 ^b	254.55±13.4 ^b

注：不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

2.4 双向发酵产物抗氧化活性评价

2.4.1 对羟自由基清除能力

羟自由基是一种氧化能力很强的自由基，氧化效率高，对生物体具有一定的危害。 Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应产生羟自由基，再与水杨酸反应生成有色物质，可根据吸光度值的变化来判断样品的羟自由基清除能力。由图 4 可知，在 0.50~3.00 mg/mL 范围内，随着样品质量浓度逐渐增大，灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液的羟自由基清除率均逐渐增强，质量浓度为 3.00 mg/mL 时，灵芝发酵液清除率为 45.16%，灵芝-刺梨发酵液的清除率为 51.55%。而 Vc 对羟自由基清除率在 0.50~1.00 mg/mL 逐渐增大，在 1.00 mg/mL 达到 99.93%，此后基本维持在这个水平。灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液对羟自由基的 IC_{50} 值分别为 3.34 和 2.74 mg/mL。由此可知，灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液对羟自由基均具有一定的清除能力，加入刺梨对发酵体系的羟自由基清除率有所提高，但与 Vc 相比清除能力较弱。

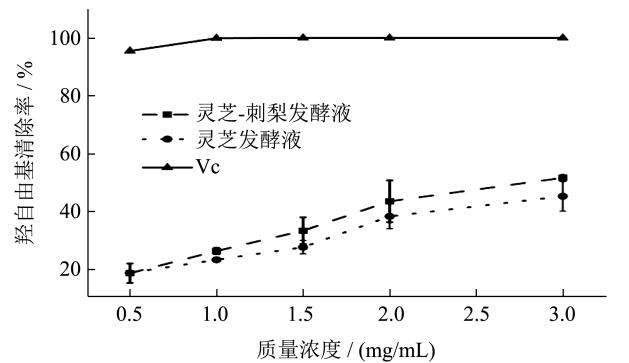


图 4 羟自由基清除能力比较

Fig.4 Comparison of hydroxyl radical scavenging ability

2.4.2 对ABTS⁺自由基清除能力

ABTS 是一种水溶性的自由基引发剂，经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $ABTS^+$ ，遇到具有抗氧化活性的物质时颜色会变浅，吸光度值降低，可根据吸光度值的变化来判断样品的羟自由基清除能力。由图 5 可知，在 0.50~3.00 mg/mL 范围内，灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液的 $ABTS^+$ 自由基清除率均随质量浓度的增大而逐渐增强，在样品质量浓度为 3.00 mg/mL 时，灵芝发酵液的清除率为 73.34%，灵芝-刺梨发酵液的清除率为 94.79%。而 Vc 对 $ABTS^+$ 自由基清除率在 0.50 mg/mL 达到 100%，此后维持在这个水平，在样品质量浓度

为 3.00 mg/mL 时, 灵芝-刺梨双向发酵液对 ABTS^+ 自由基的清除力与 Vc 相当。灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液对 ABTS^+ 自由基的 IC_{50} 值分别为 1.84 和 1.08 mg/mL。由此可知, 灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液对 ABTS^+ 自由基均具有一定的清除能力, 加入刺梨使发酵体系的 ABTS^+ 自由基清除率得到提高。

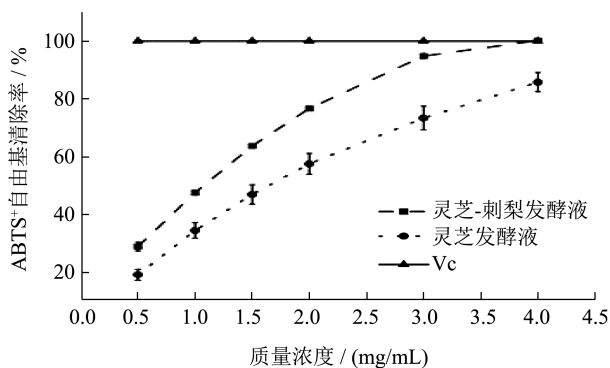


图 5 ABTS^+ 自由基清除能力比较

Fig.5 Comparison of ABTS^+ free radical scavenging ability

2.4.3 对 DPPH 自由基清除能力

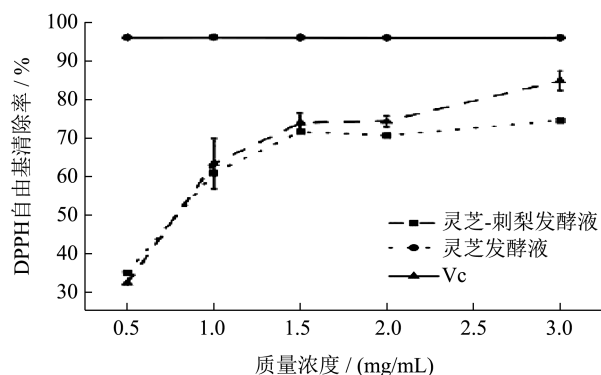


图 6 DPPH 自由基清除能力比较

Fig.6 Comparison of DPPH free radical scavenging ability

DPPH 是一种稳定的人工合成的自由基, 其溶液呈紫色, 在 517 nm 处有最大吸收峰, 当它与能够提供一个电子的抗氧化物质产生作用时可生成无色产物, 紫色变浅。由图 6, 在 0.50~3.00 mg/mL 范围内, 随着样品质量浓度的增大, 灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液的 DPPH 自由基清除能力均逐渐增强, 在样品质量浓度为 3.00 mg/mL 时, 灵芝发酵液的清除率为 74.55%, 灵芝-刺梨发酵液的清除率为 84.87%, 而 Vc 在 0.50 mg/mL 达到 96.09%, 此后基本维持在这个水平。灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 0.76 和 0.78 mg/mL。由此可知, 灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液对 DPPH 自由基具有一定的清除能力, 加入刺梨对发酵体系的 DPPH 自由基清除率有一定

程度的提高, 在样品质量浓度达到 3.00 mg/mL 时, 灵芝-刺梨发酵液对 DPPH 自由基的清除率开始与 Vc 接近。

2.4.4 总还原能力

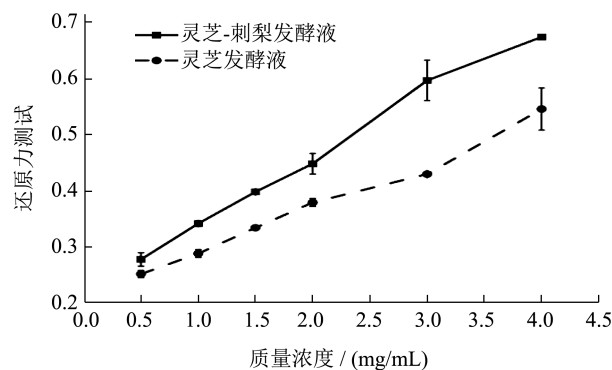


图 7 总还原能力比较

Fig.7 Comparison of reducing power

赤血盐 $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 在抗氧化剂存在时可被还原成黄血盐 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 黄血盐再与 Fe^{3+} 反应生成普鲁士蓝, 普鲁士蓝在 700 nm 处有最大吸收峰。由图 7 可知, 在 0.50~4.00 mg/mL 范围内, 随着样品质量浓度的增大, 灵芝发酵液和灵芝-刺梨发酵液的还原能力都逐渐增大, 质量浓度为 3.00 mg/mL 时, 灵芝发酵液的还原力为 0.43, 灵芝-刺梨发酵液的还原能力为 0.60。由此可知, 灵芝发酵液、灵芝-刺梨发酵液都具有一定的还原能力, 并且加入刺梨使发酵体系的还原能力得到提高。

3 结论

该研究以灵芝为出发菌株, 以刺梨为培养基质, 进行灵芝-刺梨双向液体发酵工艺优化及其发酵产物的抗氧化活性测定, 确定了在 pH 值为 5.50, 灵芝接种量为 4% (V/V)、刺梨粉添加量为 20 g/L 时, 发酵体系多糖含量较高。在单因素实验的最适条件下, 与灵芝发酵液相比, 加入刺梨形成灵芝-刺梨双向发酵体系后, 发酵水平有所提高, 活性成分多糖、黄酮、多酚及三萜化合物的含量明显增加; 灵芝发酵产物和灵芝-刺梨双向发酵产物对 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率、 ABTS^+ 自由基清除率及还原力均随着质量浓度的增大而增强, 质量浓度为 3.00 mg/mL 时, 灵芝发酵产物的羟自由基清除率、 ABTS^+ 自由基清除率、DPPH 自由基清除率和还原力分别为 45.16%、73.34%、74.55%、0.43, 灵芝-刺梨双向发酵产物的分别为 51.55%、94.79%、84.87%、0.60, 双向液体发酵产物明显高于灵芝发

醇产物,表明加入刺梨促进了发酵体系抗氧化活性的提高,自由基清除率和还原力提升的原因可能与发酵产物中多糖、多酚等含量的增加有关。该研究以灵芝为发酵真菌,以刺梨为培养成分,双向发酵产物的抗氧化性及一些有抗氧化性的物质含量明显上升,发酵水平有所提高,表明了灵芝-刺梨双向液体发酵工艺具有一定的优越性,为以灵芝和刺梨为原料的相关新产品的多元化开发利用和技术创新提供一定的思路。

参考文献

- [1] 李希政,朱琳,夏宏志,等.灵芝液体培养基配方筛选[J].农业与技术,2024,44(5):74-77.
- [2] 辛燕花,杨丹,刘阳,等.灵芝-银杏双向固体发酵抗氧化性优化及活性物质的研究[J].安徽农学通报,2018,24(10):14-17,34.
- [3] XU Y, ZHANG X, YAN X H, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706-716.
- [4] 路子佳,谢瑶.灵芝及其制品保肝作用研究进展[J].食用菌学报,2023,30(4):108-118.
- [5] 马欣宇,徐蓓蕾,宋辉,等.灵芝化学成分及防治肿瘤的研究进展[J].中国药学杂志,2023,58(16):1437-1446.
- [6] WANG H, LIU Y M, QI Z M, et al. An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties [J]. Current Medicinal Chemistry, 2013, 20(23): 2899-2913.
- [7] 宁豫昌,高俊杰,袁艺萌.复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁的影响[J].食品与生物技术学报,2023,42(8):87-94.
- [8] WANG Y, GUO X, ZHANG L, et al. Effects of deproteinization on rheological properties of polysaccharides from *Rosa acicularis* 'Lu He' and *Rosa acicularis* Lindl fruits [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15: 2500-2515.
- [9] WANG L, CHEN C, ZHANG B, et al. Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and its α -glucosidase inhibitory activity [J]. Food & Function, 2018, 9(7): 3974-3985.
- [10] HE J Y, ZHANG Y H, MA N, et al. Comparative analysis of multiple ingredients in *Rosa roxburghii* and *R. sterilis* fruits and their antioxidant activities [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 29-41.
- [11] 覃炎锋.利用桑枝、药渣等废弃物在灵芝栽培及灵芝提取物在化妆品开发中的应用研究[D].广州:广东药科大学,2017.
- [12] 魏滔,张长生,陈琼华,等.灵芝真菌液体发酵及其产物应用的研究进展[J].微生物学通报,2022,49(1):336-351.
- [13] 庄毅,潘扬,谢小梅,等.药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J].中国食用菌,2007,2:3-6.
- [14] 郭芳钰,韩婷婷,王晓娜,等.中药双向发酵液制备及其抗衰老、保湿、美白功效研究[J].日用化学工业,2023,53(5):523-531.
- [15] 何伟,于淼,彭超,等.灵芝深层发酵工艺优化及中药双向发酵[J].生物化工,2022,8(3):45-49,62.
- [16] 曾婷,黄文琪,赵立娜,等.灵芝精深加工技术与产品研发进展[J].菌物研究,2024,22(1):103-112.
- [17] CHEN S, HUANG H, HUANG G. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1047-1053.
- [18] 孟歌,崔宝凯,李春道,等.药用真菌灵芝液体培养过程中的抗氧化活性研究[J].菌物学报,2018,37(4):486-501.
- [19] DENG Y, HUANG Q, HU L, et al. Enhanced exopolysaccharide yield and antioxidant activities of *Schizophyllum commune* fermented products by the addition of *Radix Puerariae* [J]. RSC Advances, 2021, 11(60): 38219-38234.
- [20] 赵小瑞.灵归菌质双向发酵过程中抗氧化活性及抑菌活性动态变化的研究[D].甘肃:甘肃农业大学,2016.
- [21] CHEN F, HUANG G. Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter melon polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 14-20.
- [22] CHANG C K, HO W J, CHANG S L, et al. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharide from fermentation broth of a *Xylaria nigripes* [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2018, 16: 37-42.
- [23] LI Z, XUE Y, LI M, et al. The antioxidation of different fractions of Dill (*Anethum graveolens*) and their influences on cytokines in macrophages RAW264.7 [J]. Journal of Oleo Science, 2018, 67(12): 1535-1541.
- [24] SU W Y, GAO S Y, ZHAN S J, et al. Evaluation of volatile profile and *in vitro* antioxidant activity of fermented green tea infusion with *Pleurotus sajor-caju* (oyster mushroom) [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 865-991.
- [25] 臧晋,罗建成,黄开勋.灵芝液体培养菌株的选择及其发酵条件优化[J].现代食品科技,2007,9:39-41.
- [26] 张文意.中药与灵芝双向深层发酵体系降脂作用研究[D].北京:北京中医药大学,2017.
- [27] 杨英歌,李荣,宋凯,等.灵芝-黄芪药渣固体双向发酵工艺优化及菌质多糖对肠癌HCT116的抑制作用研究[J].中国食品添加剂,2023,34(11):110-118.
- [28] 宋莉.燕麦液体培养灵芝多糖的组分构成与抗氧化活性分析[D].咸阳:西北农林科技大学,2012.
- [29] 罗灿,刘玉洁,陈劲舒,等.灵芝菌液体发酵玉竹产水溶性多糖的工艺优化和抗氧化性研究[J].中国酿造,2022,41(11):180-186.
- [30] 杨海龙,吴天祥,章克昌.中药提取液对灵芝深层发酵的影响[J].微生物学报,2003,4:519-522.
- [31] 魏龙.灵芝-当归双向发酵条件优化及其抗氧化性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2015.
- [32] 邓永飞.裂褶菌-葛根双向发酵条件优化及发酵产物抗衰老活性研究[D].南宁:广西大学,2023.