

樟芝深层发酵多糖促进乳酸菌生长及增殖

叶青雅, 赵灵慧, 陆春雷, 吉 丹, 袁 磊, 高亚军*, 李华祥*

(扬州大学食品科学与工程学院, 扬州 225127)

摘 要: 目的 研究樟芝深层发酵胞内多糖(*Antrodia cinnamomea* intracellular polysaccharide, AIPS)及胞外多糖(*Antrodia cinnamomea* extracellular polysaccharide, AEPS)对乳酸菌体外发酵生长及增殖的影响。**方法** 采用水提醇沉法提取樟芝深层发酵 AIPS 及 AEPS, 采用 96 孔板法考察不同浓度 AIPS 及 AEPS 对 4 株乳酸菌生长或增殖的影响, 采用平板菌落计数法考察 AIPS 及 AEPS 不同单糖组分对乳酸菌生长的影响。**结果** AIPS 对干酪乳杆菌 LBC1-1 菌株(LBC1-1)、植物乳杆菌 LBP3-2 菌株(LBP3-2)及鼠李糖乳杆菌 LGG 菌株(LGG)的生长均有明显促进作用, 且主要表现为缩短迟滞期及增加最大生长量; AEPS 对 LBP3-2、LGG 及鼠李糖乳杆菌 LV-1 菌株(LV-1)的生长有显著促进作用, 且主要表现为提高最大生长速率及最大生长量; AIPS 及 AEPS 促进乳酸菌生长不是因为提供了碳源营养物质, 而是其中的某一种或几种多糖成分发挥了促进作用。**结论** 樟芝深层发酵多糖能显著促进乳酸生长和/或增殖, 本研究为开发新型多功能益生元提供新思路及理论依据。

关键词: 樟芝; 深层发酵; 多糖; 乳酸菌; 生长; 增殖

Polysaccharide from *Antrodia cinnamomea* in submerged fermentation promoting the growth and proliferation of *Lactobacillus*

YE Qing-Ya, ZHAO Ling-Hui, LU Chun-Lei, JI Dan, YUAN Lei, GAO Ya-Jun*, LI Hua-Xiang*

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of *Antrodia cinnamomea* intracellular polysaccharide (AIPS) and *Antrodia cinnamomea* extracellular polysaccharide (AEPS) by submerged fermentation on the growth and proliferation of *Lactobacillus in vitro*. **Methods** The water extraction combined with alcohol precipitation method was used to extract the AIPS and AEPS; the 96-well plate method was used to investigate the effects of different concentrations of AIPS and AEPS on the growth and proliferation of 4 strains of *Lactobacillus*; the colony counting method was used to study the effects of different components of AIPS and AEPS on the growth of the *Lactobacillus*. **Results** The AIPS remarkably promoted the growth of *Lactobacillus casei* LBC1-1 (LBC1-1), *Lactobacillus plantarum* LBP3-2 (LBP3-2), and *Lactobacillus rhamnosus* LGG (LGG), and worked in the way of shortening the lag period and increasing the maximum biomass; AEPS also greatly promoted the growth of LBP3-2, LGG, and *Lactobacillus rhamnosus* LV-1

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001661)、江苏省自然科学基金青项目(BK20190890)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32001661), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20190890)

***通信作者:** 高亚军, 讲师, 主要研究方向为电化学检测。E-mail: gaoyajun@yzu.edu.cn

李华祥, 讲师, 主要研究方向为发酵工程及食品安全。E-mail: lihuaxiangyu@126.com

***Corresponding author:** GAO Ya-Jun, Lecturer, College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, No.196 West Huayang Road, Yangzhou 225127, China. E-mail: gaoyajun@yzu.edu.cn

LI Hua-Xiang, Lecturer, College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, No.196 West Huayang Road, Yangzhou 225127, China. E-mail: lihuaxiangyu@126.com

(LV-1) and worked in the way of increasing the maximum growth rate and biomass; the promotion of AIPS and AEPS on the growth of *Lactobacillus* was not due to the provision of carbon source nutrients, but one or several polysaccharide components played the promoting role. **Conclusion** The polysaccharides from *A. cinnamomea* by submerged fermentation can dramatically promote the growth and/or proliferation of *Lactobacillus*. This study provides a new ideas and theoretical basis for the development of novel multifunctional prebiotics.

KEY WORDS: *Antrodia cinnamomea*; submerged fermentation; polysaccharide; *Lactobacillus*; growth; proliferation

0 引言

樟芝(*Antrodia cinnamomea/camphorata*或*Taiwanofungus camphoratus*), 又名牛樟芝, 是一种珍稀药食两用真菌, 具有抗肝纤维化、抗氧化、抗癌、抗炎、降血糖及调节免疫等功效^[1-6]。樟芝因为生物活性多样且效果显著而具有较大的市场需求。野生樟芝子实体生长缓慢, 数量稀少, 价格昂贵^[7]。为了弥补樟芝资源的不足, 人们对樟芝的人工培养方式进行了大量研究。目前, 樟芝人工培养技术主要有椴木栽培、皿式培养、固态发酵及液态发酵(又叫深层发酵)^[8-9]。其中, 樟芝深层发酵具有发酵周期短、生产效率高、易于规模化等优点^[10-11]。因此, 通过深层发酵获得樟芝菌丝体或发酵液已成为目前樟芝最高效、最普遍的生产方式^[12]。此外, 欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)及临床实验也已证实, 樟芝菌丝体安全无毒, 可以放心食用^[13-14]。

食用菌多糖中一些不能被消化的多糖被认为具有良好的益生元作用, 它通过刺激特定肠道菌群的生长或活性而使宿主受益, 并在治疗抗生素引起的腹泻症状中具有显著的效果^[15]。例如, 金针菇多糖可调节肠道菌群失调, 具体表现为提升拟杆菌(*Bacteroides*) S24-7 和丹毒丝菌(*Erysipelothrix*)的相对丰度, 并最终改善由葡聚糖硫酸钠引发的结肠炎症状^[16]; 猴头菇多糖可逆转葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)炎症 C57BL/6 小鼠肠道菌群紊乱, 维持肠道屏障的完整性, 并降低相关细胞炎症因子 mRNA 的表达^[17]; 双孢蘑菇多糖可调节宿主肠道菌群变化和细菌代谢, 包括提升在肠道中生产丙酸和琥珀酸的普雷沃氏杆菌(*Prevotella*)的相对丰度, 从而起到益生元的作用^[18]。

樟芝深层发酵的主要产物是多糖^[7]。作为一种新兴的食用菌多糖, 樟芝多糖具有治疗酒精、脂多糖及 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤^[19-21]、在体外抗癌活性中抑制肺癌细胞的增殖^[22]、改善 6-羟基多巴胺诱导的帕金森小鼠症状及抑制由脂多糖引起的炎症因子表达^[23]等功效。此外, 课题组前期研究发现, 樟芝深层发酵多糖可明显改善由盐酸林可霉素引起的小鼠腹泻等不良症状, 并显著增加小鼠肠道菌群中乳酸菌的相对丰度^[24]。乳酸菌是一种可以促进营养吸收及治疗慢性疾病的益生菌^[25]。但是, 前期未对樟芝多糖对乳酸菌体外发酵生长的影响做进一步研究。因此, 本研究系统探究了樟芝深层发酵胞内多糖(*Antrodia cinnamomea* intracellular polysaccharide, AIPS)及胞外多糖(*Antrodia cinnamomea* extracellular polysaccharide, AEPS)对干酪乳杆菌、植物乳杆菌及鼠李糖乳杆菌体外发酵生长的影响, 以对前期研究结果进行补充和验证, 也为开发新型多功能

益生元提供理论依据及实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

樟芝菌株购自美国菌种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC), 编号为 ATCC 200183; 4 株乳酸菌菌株均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)。其中, 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) LBC1-1 菌株编号为 CICC 20241; 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* LBP3-2 菌株编号为 CICC 24810; 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) LGG 菌株编号为 CICC 6141; 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) LV-1 菌株编号为 CICC 20257。

1.1.2 试剂

MRS (man rogosa sharpe)培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 琼脂粉(分析纯, 杭州微生物试剂有限公司); 阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸及葡萄糖醛酸标准品(色谱纯)、葡糖糖、半乳糖、甘露糖、无水乙醇、氯化钠等常规试剂(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

BS210S 电子天平(精度 0.0001 g, 北京赛多利斯天平有限公司); TG-16WS 高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司); DKS-14 恒温水浴锅(嘉兴市中新医疗仪器有限公司); RE-52B 旋转蒸发仪(上海雅蓉生化仪器设备有限公司); DGX-9053B-2 烘箱(上海福玛实验设备有限公司); 无菌操作台(无锡格纯净化设备有限公司); PHS-2F 酸度计(上海雷磁仪器厂); 5 L 发酵罐(无锡汇森生物设备有限公司); QT-3 多功能摇床(上海琪特分析仪器有限公司); SH2-DIII 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司); Infinite F50 酶标仪(上海勒菲生物科技有限公司); ICS-5000 离子色谱仪(美国戴安公司); CarboPac PA20 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 6 μm, 美国赛默飞世尔科技公司); Alpha1-2LDPolus 冷冻干燥机(北京博励行仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 樟芝 5 L 罐深层发酵

将 5 L 玻璃发酵罐空消(121℃、30 min)后, 装入 3 L 发酵培养基(葡萄糖 20 g/L, 酵母浸出粉 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 3 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, pH 4.5)并进行消化(121℃、20 min)。冷却后, 按 1×10⁶ 孢子/mL 的接种量进行接种, 在 26℃、150 r/min 及 0.3 m³/h 通气量的条件下发酵 10 d。

1.3.2 樟芝深层发酵多糖的提取与纯化

(1)樟芝胞内多糖的提取

参考 LI 等^[9]的方法, 并稍做修改。将 5 L 罐樟芝发酵液用 4 层纱布过滤, 收集滤渣(樟芝菌丝体)并 75℃烘干。称取 10 g 干燥并粉碎的樟芝菌丝体粉末, 加入 100 mL 去离子水, 95℃水浴提取 2 h, 重复提取 2 次, 合并上清液并蒸发浓缩至 20 mL, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 4℃静置过夜后, 离心(8000 r/min, 10 min, 4℃)弃上清, 沉淀用超纯水复溶后真空冷冻干燥, 即得樟芝胞内粗多糖粉末。为获得足够量的樟芝 AIPS, 上述操作可重复多次。

(2)樟芝胞外多糖的提取

参考许艺娴等^[26]的方法, 并稍做修改。将 5 L 罐樟芝发酵液用 4 层纱布过滤, 收集滤液, 离心(6000 r/min, 10 min, 4℃)去沉淀, 收集上清并蒸发浓缩至 20 mL, 再加入 3 倍体积的无水乙醇, 4℃静置过夜后, 离心(8000 r/min, 10 min, 4℃)弃上清液, 沉淀用超纯水复溶后真空冷冻干燥, 即得樟芝胞外粗多糖粉末。为获得足够量的樟芝 AEPS, 上述操作可重复多次。

(3)樟芝多糖的纯化

采用 Sevag 法除去多糖(AIPS 及 AEPS)中的蛋白质^[27]。将正丁醇和三氯甲烷按照 1:4 (V:V)混合配制溶液, 将混合液加入至 5 倍体积的樟芝多糖水溶液中, 剧烈振荡 1 min 后, 4000 r/min 离心 10 min, 取上层水相, 重复多次后, 蒸发浓缩去除有机溶剂即可。

1.3.3 樟芝多糖的单糖组成分析

参考 GAO 等^[28]的方法, 并稍做修改。样品前处理: 用 2 mol/L 的 HCl 于 96℃水解多糖样品 4 h, 再用 2 mol/L 的 NaOH 溶液中和; 检测条件: 仪器为 ICS-5000 离子色谱仪, 色谱柱为 CarboPac PA20 (150 mm×4.6 mm, 6 μm), 柱温为 45℃, 流动相为 98.2%的水(A)和 1.8%的浓度为 250 mmol/L 的 NaOH 溶液(B), 流速为 0.5 mL/min, 洗脱 30 min。

1.3.4 乳酸菌的活化及稀释

在无菌条件下按 2% (V:V, 下同)的接种量将乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中, 再放入 37℃培养箱中静置培养 20 h。重复转接两次以获得活性较强的菌种。将培养好的菌液用无菌生理盐水以 10 倍梯度稀释涂布法进行平板菌落计数, 并根据菌落计数结果将各菌液稀释至浓度为 1×10^5 CFU/mL 后备用。

1.3.5 樟芝多糖对乳酸菌生长的影响

(1)乳酸菌生长曲线的绘制

将活化并稀释好的乳酸菌按 2%的接种量接种于 MRS 培养基中, 然后分装到 96 孔板中, 每孔装液量为 200 μL, 每株菌设置 12 个复孔; 将 96 孔板放入 37℃培养箱中静置培养, 并分别在 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 及 33 h 时用酶标仪测定其 600 nm 处吸光度(OD_{600} 值); 最后, 以培养时间为横坐标, 以 OD_{600} 值为纵坐标绘制各乳酸菌菌株的生长曲线。

(2)不同质量浓度樟芝多糖对乳酸菌生长的影响

参照李华祥等^[29]的方法并稍作修改。96 孔板中每孔总装液量为 200 μL, 接种量为 2%, 培养基中含有 0.625~20.000 mg/mL 的 AIPS 或 AEPS, 以添加相同体积的

无菌生理盐水为空白对照, 每组设 6 个复孔, 然后将 96 孔板置于 37℃培养箱中静置培养, 每隔 3 h 取样检测 OD_{600} 值。

(3)模型拟合分析

采用 Gompertz 函数模型^[30]对每条生长曲线的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值进行拟合, 拟合公式(1)为:

$$y = ae^{-e^{-k(x-x_c)}} \quad (1)$$

其中, a 为生长曲线中 OD_{600} 值最高点; e 为自然常数; k 为生长曲线在 Gompertz 函数模型中对应的系数; x_c 为生长曲线在 Gompertz 函数模型中 X 轴上对应的截距。

根据公式(1)及 Gompertz 函数中各参数的定义^[30]可知, 乳酸菌生长曲线中的最大生长量 $A=a$; 最大生长速率

$$\mu_{\max} = \frac{a \times k}{e}, \text{ 单位为 } h^{-1}; \text{ 迟滞期 } \lambda = \frac{(k \times x_c) - 1}{k}, \text{ 单位为 } h。$$

通过比较不同浓度 AIPS 或 AEPS 下, 各曲线的 A 、 $\mu_{\max}$ 及 λ 参数大小来比较 AIPS 或 AEPS 对乳酸菌生长及增殖的影响。

1.3.6 樟芝多糖影响乳酸菌生长的效应成分分析(平板菌落计数法)

参考 OGIDI 等^[31]的方法, 并稍作修改。采用试管(外径 15 mm, 长度 150 mm)培养, 装液量为 10 mL, 接种量为 2%; 以不额外添加任何糖类物质的 MRS 培养基为空白对照组, 以在 MRS 培养基中添加任 20 mg/mL 的 AIPS 或 AEPS 为阳性对照, 比较在 MRS 培养基中添加相应浓度的不同单糖组合对乳酸菌生长的影响; 试管置于 37℃培养箱中静置培养, 分别在 0、3、6、9、12、15、18 及 21 h 取样进行 10 倍梯度稀释涂布, 并根据菌落计数结果绘制各乳酸菌生长曲线。

1.3.7 数据处理

每组实验均设置至少 3 个生物重复。所有数据均以平均值±标准差的形式表示, 采用 Origin 2021 绘图, 采用单因素方差分析和 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学比较差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 樟芝多糖组成分析

樟芝多糖(AIPS 及 AEPS)经 8 次 Sevag 法除蛋白处理后, 其总中性多糖含量均在 80%以上, 蛋白质含量均小于 1.5%(表 1), 纯度较高。此外, AIPS 及 AEPS 在组成单糖种类及含量上均存在差异, 但主要组成单糖均为葡萄糖, 其次为半乳糖和甘露糖(表 1)。

2.2 乳酸菌的生长曲线

按 1.3.5 中的方法测定干酪乳杆菌 LBC1-1 菌株(LBC1-1)、植物乳杆菌 LBP3-2 菌株(LBP3-2)、鼠李糖乳杆菌 LGG 菌株(LGG)及鼠李糖乳杆菌 LV-1 菌株(LV-1)的生长曲线如图 1。结果表明, 4 株乳酸菌的生长曲线均呈“S”型, 符合乳酸菌生长规律, 说明本研究所用 96 孔板培养体系及通过分光光度计检测 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值可以真实地反映乳酸菌的生长状况, 该方法可用于后续考察樟芝多糖对乳酸菌生长影响的相关实验。同时, 该生长曲线也为后续实验乳酸菌的培养时间(33 h)及检测间隔时长(3 h)提供了参考和依据。

表 1 AEPS 和 AIPS 的组分测定		
Table 1 Determination of the composition of AEPS and AIPS		
组分	含量/%	
	AEPS	AIPS
中性糖	82.74±0.63	88.74±0.53
蛋白质	1.32±0.11	1.21±0.14
单糖组成	半乳糖	7.84
	葡萄糖	28.52
	甘露糖	84.73
	葡萄糖醛酸	55.31
	半乳糖醛酸	14.34
	氨基半乳糖	0.76
		-
	1.40	-
	-	1.83

注: -表示未检测到; 中性多糖及蛋白含量数据以平均值±标准差的形式表示; 单糖组成数据以平均值的形式表示, $n=3$ 。

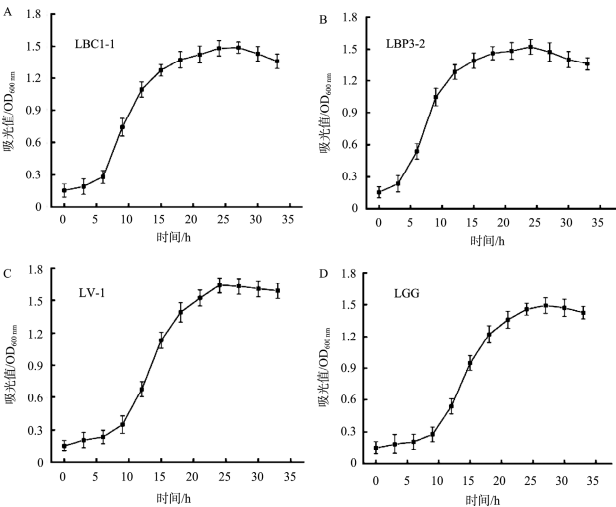


图 1 4 株乳酸菌菌株的生长曲线
Fig.1 Growth curves of the 4 strains of *Lactobacillus*

表 2 不同质量浓度 AIPS 下 4 株乳酸菌生长曲线的 Gompertz 函数拟合参数		樟芝胞内多糖的添加质量浓度/(mg/mL)						
Table 2 Gompertz function fitting parameters of growth curves for 4 strains of <i>Lactobacillus</i> under different mass concentrations of AIPS		樟芝胞内多糖的添加质量浓度/(mg/mL)						
拟合参数		20.000	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	CK
LBC1-1	A	1.578	1.283	1.227	1.079	0.979	0.826	1.387
	$\mu_{\max}/h^{-1}$	0.127	0.102	0.095	0.086	0.085	0.070	0.124
	λ/h	1.582	1.653	1.674	1.789	1.841	1.905	2.135
LGG	A	1.475	1.426	1.384	1.384	1.342	1.233	1.352
	$\mu_{\max}/h^{-1}$	0.103	0.101	0.098	0.097	0.095	0.092	0.096
	λ/h	2.596	2.569	2.547	2.630	2.783	2.553	2.979
LV-1	A	1.497	1.409	1.431	1.341	1.327	1.319	1.596
	$\mu_{\max}/h^{-1}$	0.101	0.088	0.091	0.087	0.075	0.071	0.129
	λ/h	2.546	2.898	2.846	2.793	3.202	3.245	2.943
LBP3-2	A	1.442	1.408	1.355	1.321	1.339	1.320	1.361
	$\mu_{\max}/h^{-1}$	0.141	0.128	0.119	0.116	0.112	0.104	0.124
	λ/h	1.479	1.587	1.667	1.715	1.776	1.826	1.843

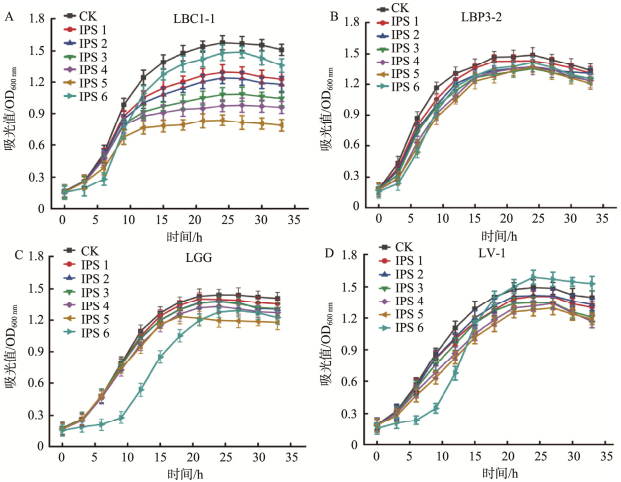
注: CK: 不添加任何樟芝多糖的空白对照组, 即在培养基中添加相同体积的生理盐水; 下同。

由图 2 和表 2 可以看出, AIPS 对 LGG 菌株生长的促进作用最为明显。添加 0.625~20.000 mg/mL 的 AIPS 均可促进 LGG 的生长, 主要表现为缩短迟滞期、提高最大生

2.3 樟芝多糖对乳酸菌生长的影响

2.3.1 不同浓度的 AIPS 对乳酸菌生长的影响

按 1.3.5 中的方法考察了 0.625~20.000 mg/mL 质量浓度范围内 AIPS 对 4 株乳酸菌生长的影响。在培养基中添加不同质量浓度的 AIPS 时, 各乳酸菌的生长曲线如图 2 所示, 各曲线的 Gompertz 函数拟合参数如表 2 所示。



注: CK: 不添加任何樟芝多糖的空白对照组, 即在培养基中添加相同体积的生理盐水; IPS 1: 在培养基中添加 0.625 mg/mL 的 AIPS; IPS 2: 在培养基中添加 1.250 mg/mL 的 AIPS; IPS 3: 在培养基中添加 2.500 mg/mL 的 AIPS; IPS 4: 在培养基中添加 5.000 mg/mL 的 AIPS; IPS 5: 在培养基中添加 10.000 mg/mL 的 AIPS; IPS 6: 在培养基中添加 20.000 mg/mL 的 AIPS, 下同。

图 2 不同质量浓度的 AIPS 对 4 株乳酸菌生长的影响

Fig.2 Effects of different mass concentrations of AIPS on the growth of 4 strains of *Lactobacillus*

长速率及最大生长量; 而增加最大生长量(或生物量)即促进增殖, 当作用于肠道菌群时则表现为增加相对丰度; 其次, 低质量浓度(0.625~10.000 mg/mL)的 AIPS 对

LBC-1 菌 32 株的生长有抑制作用, 且浓度越低, 抑制作用越强; 但 20.000 mg/mL 的 AIPS 则对 LBC-1 的生长有促进作用, 主要表现为增加最大生长量; 同时, 20.000 mg/mL 的 AIPS 也能增加 LBP3-2 的最大生长量; 此外, AIPS 能增加 LV-1 菌株的最大生长速率并缩短迟滞期, 但最大生长量反而较对照组低。

2.3.2 不同质量浓度的 AEPS 对乳酸菌生长的影响

按 1.3.5 中的方法考察了 0.625~20.000 mg/mL 质量浓度范围内 AEPS 对 4 株乳酸菌菌株生长的影响。在培养基中添加不同质量浓度的 AEPS 时, 各乳酸菌的生长曲线如图 3 所示, 各曲线的 Gompertz 函数拟合参数如表 3 所示。

由图 3 和表 3 可以看出, 添加 0.625~20.000 mg/mL 的 AEPS 可明显促进 LGG 及 LV-1 菌株的增殖, 主要表现为增加最大生长量; 其次, AEPS 可缩短 LBP3-2 菌株的迟滞期, 并增加其最大生长量; 此外, AEPS 可缩短 LBC1-菌株的迟滞期, 但却抑制 LBC1-1 的增殖, 且浓度越低抑制作用越强, 主要表现为最大生长量降低。

2.4 樟芝多糖促进乳酸菌生长的效应成分

为了明确樟芝多糖促进乳酸菌生长的效应成分, 以初步探究其作用机制, 采用平板菌落计数法, 以 LBP3-2 及 LGG 菌株为代表, 进一步考察 AIPS 及 AEPS 不同单糖组分对乳酸菌生长的影响。由前期的实验结果(图 2 和图 3)可知, 当培养基中 AIPS 或 AEPS 的添加量为 20.000 mg/mL 时, 对 LBP3-2 及 LGG 菌株增殖的促进效果最强; 而由表 1 的单糖组成分析结果可知, 添加 20.000 mg/mL 的 AIPS 所提供的碳源营养成分相当于 11.060 mg/mL 的葡萄糖(含量 55.31%)+5.700 mg/mL 的半乳糖(含量 28.52%)+2.870 mg/mL 的甘露糖(含量 14.34%); 添加 20.000 mg/mL 的 AEPS 所提供的碳源营养成分相当于 16.950 mg/mL 的葡萄糖(含量 84.73%)+ 1.570 mg/mL 的半乳糖(含量 7.84%)+ 1.050 mg/mL 的甘露糖(含量 5.27%)。因此, 按照 1.3.6 中的培养条件, 以菌落数(CFU/mL)为检测指标, 以不额外添加任何糖类

的 MRS 培养基为阴性对照组, 以在 MRS 培养基中添加 20.000 mg/mL 的 AIPS 或 AEPS 为阳性对照, 与单独添加相应量的葡萄糖及同时添加相应量的“葡萄糖+半乳糖+甘露糖”混合物对乳酸菌增殖的促进效果做比较, 明确樟芝多糖中促进乳酸菌生长或增殖的效应成分, 结果如图 4 所示。

由图 4 可知, 在 MRS 培养基中单独添加 20.000 mg/mL 的 AIPS 或 AEPS 对 LBP3-2 及 LGG 菌的增殖或生长均有明显促进作用; 在 MRS 培养基中单独添加与 AIPS 或 AEPS 相应量的葡萄糖或同时添加相应量的“葡萄糖+半乳糖+甘露糖”混合物对 LBP3-2 及 LGG 菌株的增殖均没有明显促进作用, 甚至表现出一定抑制作用。这个结果表明, AIPS 及 AEPS 对乳酸菌生长或增殖的促进作用并不是因为提供了碳源营养成分, 而是 AIPS 及 AEPS 中的某一种或几种多糖组分发挥了促进作用。

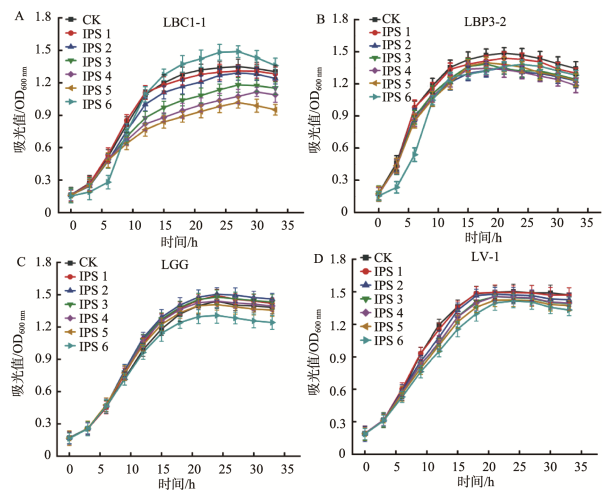
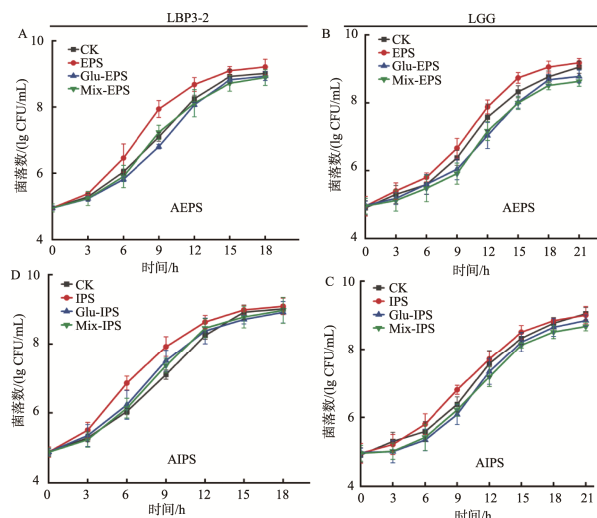


图 3 不同质量浓度的 AEPS 对 4 株乳酸菌生长的影响
Fig.3 Effects of different mass concentrations of AEPS on the growth of 4 strains of *Lactobacillus*

表 3 不同质量浓度 AEPS 下 4 株乳酸菌生长曲线的 Gompertz 函数拟合参数			樟芝胞外多糖添加质量浓度/(mg/mL)						
拟合参数			20.000	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	CK
LBC1-1	A		1.361	1.319	1.294	1.188	1.109	1.002	1.516
	$\mu_{\max}/h^{-1}$		0.100	0.103	0.088	0.071	0.068	0.065	0.139
	λ/h		1.628	1.733	1.812	1.883	1.939	1.984	2.124
LGG	A		1.460	1.501	1.530	1.500	1.464	1.426	1.387
	$\mu_{\max}/h^{-1}$		0.097	0.103	0.106	0.104	0.103	0.099	0.084
	λ/h		4.012	3.988	4.102	4.139	4.224	4.142	4.261
LV-1	A		1.532	1.527	1.505	1.477	1.481	1.457	1.439
	$\mu_{\max}/h^{-1}$		0.113	0.110	0.103	0.096	0.095	0.091	0.085
	λ/h		4.795	4.586	4.681	4.769	4.876	4.662	4.647
LBP3-2	A		1.442	1.398	1.305	1.331	1.298	1.341	1.353
	$\mu_{\max}/h^{-1}$		0.156	0.158	0.138	0.146	0.143	0.137	0.169
	λ/h		1.626	1.706	1.787	1.826	1.841	1.8724	2.179



注: CK: 阴性对照, 即 MRS 培养中不额外添加任何糖类物质; AEPS: 在 MRS 培养基中添加 20.000 mg/mL 的 AEPS; Glu-EPS: 在 MRS 培养基中添加 16.950 mg/mL 的葡萄糖; Mix-EPS: 在 MRS 培养基中同时添加 16.950 mg/mL 的葡萄糖+1.570 mg/mL 的半乳糖+1.050 mg/mL 的甘露糖; AIPS: 在 MRS 培养基中添加 20.000 mg/mL 的 AIPS; Glu-IPS: 在 MRS 培养基中添加 11.060 mg/mL 的葡萄糖; Mix-IPS: 在 MRS 培养基中同时添加 11.060 mg/mL 的葡萄糖+5.700 mg/mL 的半乳糖+2.870 mg/mL 的甘露糖。

图4 AIPS及AEPS单糖组分对乳酸菌生长的影响

Fig.4 Effects of monosaccharides of AIPS and AEPS on the growth of *Lactobacillus*

3 讨论与结论

NOWAK 等^[32]研究了 53 种真菌多糖对嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌生长的影响, 发现其中 42 种真菌多糖比市售的菊粉和低聚果糖等益生元对乳酸杆菌生长的促进效果更好; 此外, 研究表明, 从灵芝、平菇、香菇、金针菇、杏鲍菇、姬松茸及肺形侧耳等食药真菌中提取的多糖能够显著促进双歧杆菌、德氏乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌等乳酸菌的生长、产酸及极端条件下的存活率^[31,33-36], 表明食药真菌多糖是一种重要的益生元来源。关于多糖促进乳酸菌生长的作用机制, ZHOU 等^[37]认为是因为多糖促进了乳酸菌的代谢过程、基因表达、转录及跨膜转运。如促进乳酸菌中丙酮酸代谢、碳代谢过程及磷酸转移酶系统、糖酵解/糖异生相关基因的表达。上述研究结果为本研究樟芝多糖(AEPS 及 AIPS)能够显著促进乳酸菌生长或增殖提供了理论支撑。

由于前期研究已证实樟芝深层发酵多糖可显著增加抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群中乳酸菌属的相对丰度^[24]。本研究进一步在体外发酵实验中证实添加适宜浓度的樟芝深层发酵多糖能促进乳酸菌的生长及增殖, 进一步补充和完善了樟芝多糖促进乳酸菌生长的数据支撑, 表明樟芝深层发酵多糖具有开发新型多功能益生元的巨大潜力及良好的应用前景。

参考文献

- [1] YANG X, WANG X, LIN JC, *et al.* Structure and anti-inflammatory activity relationship of ergostanes and lanostanes in *Antrodia cinnamomea* [J]. *Foods*, 2022, 11(13): 1831.
- [2] XU XY, GENG Y, XU HX, *et al.* *Antrodia camphorata*-derived antrodin c inhibits liver fibrosis by blocking tgf-beta and pdgf signaling pathways [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 835508.
- [3] KUANG Y, CHAI Y, SU HF, *et al.* A network pharmacology-based strategy to explore the pharmacological mechanisms of *Antrodia camphorata* and antcin K for treating type II diabetes mellitus [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153851.
- [4] HUANG TF, WANG SW, LAI YW, *et al.* 4-Acetylanthroquinol B suppresses prostate cancer growth and angiogenesis via a vegf/pi3k/erk/mtor-dependent signaling pathway in subcutaneous xenograft and *in vivo* angiogenesis models [J]. *Int J Mol Sci*, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111504
- [5] CHU JZ, MING YF, CUI Q, *et al.* Efficient extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Antrodia cinnamomea* [J]. *Bmc Biotechnol*, 2022, 22(1): 9-21.
- [6] ZHAO HJ, LIU HY, YANG YH, *et al.* The protective role of 4-acetylanthroquinol B in different pathological processes [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(5): 2362-2373.
- [7] 李华祥. 樟芝无性孢子介导的高效循环发酵策略及其产孢分子机制解析[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- LI HX. *Arthroconidia-mediated repeated batch fermentation strategy for Antrodia camphorata and underlying mechanism of asexual sporulation* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [8] ZOU XG, XU MT, DONG XL, *et al.* Solid-state-cultured mycelium of *Antrodia camphorata* exerts potential neuroprotective activities against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in PC12 cells [J]. *J Food Biochem*, 2022. DOI: 10.1111/jfbc.14208, e14208
- [9] LI HX, LU ZM, GENG Y, *et al.* Efficient production of bioactive metabolites from *Antrodia camphorata* ATCC 200183 by asexual reproduction-based repeated batch fermentation [J]. *Biores Technol*, 2015, 194: 334-343.
- [10] LEE MH, LU WB, LU MK, *et al.* A hybrid of response surface methodology and artificial neural network in optimization of culture conditions of mycelia growth of *Antrodia cinnamomea* [J]. *Biomass Bioenerg*, 2022, 158: 106349.
- [11] LI HX, LU ZM, ZHU Q, *et al.* Comparative transcriptomic and proteomic analyses reveal a flug-mediated signaling pathway relating to asexual sporulation of *Antrodia camphorata* [J]. *Proteomics*, 2017, 17(17-18): 1700256.
- [12] ZHANG BB, GUAN YY, HU PF, *et al.* Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: Recent advances and future development [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(4): 541-554.
- [13] TURCK D, BOHN T, CASTENMILLER J, *et al.* Safety of freeze-dried mycelia of *Antrodia camphorata* as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA J*, 2022, 20(6): e07380.
- [14] LIAO YT, HUANG KW, CHEN WJ, *et al.* A botanical drug extracted from *Antrodia cinnamomea*: A first-in-human phase I study in healthy volunteers [J]. *J Am Nutr Associ*, 2022. DOI: 10.1080/07315724.2022.2032868
- [15] BIE NN, DUAN SQ, MENG M, *et al.* Regulatory effect of non-starch

- polysaccharides from purple sweet potato on intestinal microbiota of mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. Food Funct, 2021, 12(12): 5563–5575.
- [16] ZHANG RJ, YUAN SJ, YE JF, *et al.* Polysaccharide from flammulina velutipes improves colitis via regulation of colonic microbial dysbiosis and inflammatory responses [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 149: 1252–1261.
- [17] REN YL, GENG Y, DU Y, *et al.* Polysaccharide of *Hericium erinaceus* attenuates colitis in C57BL/6 mice via regulation of oxidative stress, inflammation-related signaling pathways and modulating the composition of the gut microbiota [J]. J Nutr Biochem, 2018, 57: 67–76.
- [18] TIAN Y, NICHOLS RG, ROY P, *et al.* Prebiotic effects of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) feeding on succinate and intestinal gluconeogenesis in C57BL/6 mice [J]. J Funct Foods, 2018, 45: 223–232.
- [19] YEN YT, PARK JH, KANG SH, *et al.* Clinical benefits of golden-*Antrodia camphorata* containing antroquinonol in liver protection and liver fat reduction after alcoholic hepatitis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 757494.
- [20] YANG Y, HAN CY, SHENG YJ, *et al.* *Antrodia camphorata* polysaccharide improves inflammatory response in liver injury via the ROS/TLR4/ NF- κ B signal [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(9): 2706–2716.
- [21] LEE MH, CHAO CH, HSU YC, *et al.* Production, characterization, and functions of sulfated polysaccharides from zinc sulfate enriched cultivation of *Antrodia cinnamomea* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 159: 1013–1021.
- [22] LIN TY, LU MK, TSENG AJ, *et al.* Effects of sterol-type elicitors on biochemical characterization of polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 162: 1476–1483.
- [23] ZOU XG, XU MT, DONG XL, *et al.* Solid-state-cultured mycelium of *Antrodia camphorata* exerts potential neuroprotective activities against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in PC12 cells [J]. J Food Biochem, 2022. DOI: 10.1111/jfbc.14208, e14208
- [24] LU CL, LI HX, ZHU XY, *et al.* Regulatory effect of intracellular polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* on the intestinal microbiota of mice with antibiotic-associated diarrhea [J]. Qual Assur Saf Crop, 2022, 14(3): 124–134.
- [25] OBERG TS, MCMAHON DJ, CULUMBER MD, *et al.* Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related *Lactobacilli* [J]. J Dairy Sci, 2022, 105(4): 2750–2770.
- [26] 许艺娴, 周禹慧, 马小清, 等. 提取方法对真菌多糖得率及结构特征影响研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 289–301.
- XU YX, ZHOU YH, MA XQ, *et al.* Research on the influence of extraction methods on the yield and structural characteristics of fungal polysaccharides [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(5): 289–301.
- [27] LI X, ZHAO R, ZHOU HL, *et al.* Deproteinization of polysaccharide from the stigma maydis by sevag method [J]. Adv Mater Res, 2012, 340: 416–420.
- [28] GAO H, ZHANG WC, WU ZY, *et al.* Preparation, characterization and improvement in intestinal function of polysaccharide fractions from okra [J]. J Funct Foods, 2018, 50: 147–157.
- [29] 李华祥, 石瑛, 蒋文浩, 等. 樟芝深层发酵菌丝体提取物对食源性致病菌的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 47–52.
- LI HX, SHI Y, JIANG WH, *et al.* Inhibition of foodborne pathogenic bacteria by deep-fermented mycelium extracts from *Antrodia camphorata* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2022, 22(3): 47–52.
- [30] KOZUSKO F, BOURDEAU M. The *trans*-Gompertz function: An alternative to the logistic growth function with faster growth [J]. Acta Biotheor, 2015, 63: 397–405.
- [31] OGIDI CO, UBARU AM, LADI-LAWAL T, *et al.* Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues [J]. Heliyon, 2020, 6(12): e05685.
- [32] NOWAK R, NOWACKA-JECHALKE N, JUDA M, *et al.* The preliminary study of prebiotic potential of polish wild mushroom polysaccharides: The stimulation effect on *Lactobacillus* strains growth [J]. Eur J Nutr, 2018, 57(4): 1511–1521.
- [33] SYNITSYA A, MÍČKOVÁ K, SYNITSYA A, *et al.* Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity [J]. Carbohydr Polym, 2009, 76(4): 548–556.
- [34] YAN LL, HAN JC. Effect of *Agaricus blazei murill* polysaccharides on lactic acid bacteria [J]. China Dairy Ind, 2008, 36(12): 7–10.
- [35] YAMIN S, SHUHAIMI M, ARBAKARIYA A, *et al.* Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *bifidobacterium* spp. as assessed using real-time PCR [J]. Int Food Res J, 2012, 19(3): 1199–1205.
- [36] CHOU WT, SHEIH IC, FANG TJ. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems [J]. J Food Sci, 2013, 78(7): M1041–M1048.
- [37] ZHOU F, JIANG XY, WANG T, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide (lbp): A novel prebiotics candidate for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1034.
- (责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介

叶青雅, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 2336903923@qq.com

高亚军, 讲师, 主要研究方向为电化学检测。
E-mail: gaoyajun@yzu.edu.cn

李华祥, 讲师, 主要研究方向为发酵工程及食品安全。
E-mail: lihuaxiangyu@126.com