

# 天麻、苦荞醇提物对灰树花胞外多糖合成酶类的影响及天麻苦荞醇提物复配发酵液的抗疲劳作用

雷露<sup>1,2</sup>, 余波<sup>1</sup>, 周景瑞<sup>1</sup>, 王川南<sup>2</sup>, 吴天祥<sup>2,3\*</sup>

(1. 贵州省农业科学院畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550005) (2. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025)  
(3. 贵州食品工程职业学院粮油食品工程系, 贵州贵阳 551400)

**摘要:** 该实验探究了天麻 (*Gastrodin elata* Bl.)、苦荞 (Tartary Buckwheat) 醇提物的添加对灰树花 (*Grifola frondosa*) 胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 合成过程中磷酸葡萄糖变位酶 (Phosphogluconate Mutase, PGM)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose Pyrophosphorylase, UGPase) 和磷酸葡萄糖异构酶 (Phosphogluconate Isomerase, GPI) 三种关键酶的影响。并以此为前提, 采用动物实验进一步探究灰树花发酵液的抗疲劳作用。结果表明: 天麻、苦荞醇提物的复配添加可显著增强 PGM 和 UGPase 的活力, 降低 GPI 的活力, 与空白组相比 PGM 和 UGPase 的活力分别增加了 86.98% 和 69.12%, GPI 的活力降低了 65.78%。此外, 其复配发酵液在抗疲劳作用方面表现最佳, 显著高于空白组 ( $p < 0.05$ ) 和实验组 ( $p < 0.05$ )。主要在提高小鼠游泳力竭时间、肝糖原 (Hepatic Glycogen, HG) 和乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 含量, 降低乳酸 (Lactic Acid, LA) 和尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 含量几个方面体现。研究表明复配液的添加可显著改变灰树花 EPS 合成途径中关键酶类的活力, 从而提升发酵液中 EPS 的含量, 使其具有良好的抗疲劳作用。

**关键词:** 灰树花; 天麻; 苦荞; 酶活; 抗疲劳

文章编号: 1673-9078(2022)10-33-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1359

## Effects of Alcoholic Extracts on *Grifola frondosa* Extracellular Polysaccharide Synthases and the Anti-fatigue Effect of Fermentation Broth of *Gastrodin elata*-Tartary Buckwheat Extract Mixture

LEI Lu<sup>1,2</sup>, YU Bo<sup>1</sup>, ZHOU Jingrui<sup>1</sup>, WANG Chuannan<sup>2</sup>, WU Tianxiang<sup>2,3\*</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550005, China) (2. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China) (3. Department of Cereals, Oils and Food Engineering, Guizhou Vocational College of Foodstuff Engineering, Guiyang 551400, China)

**Abstract:** In this study, the effects of the addition of ethanolic extracts of *Gastrodin elata* Bl. and Tartary buckwheat on the key enzymes, phosphogluconate mutase (PGM), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) and phosphogluconate isomerase (GPI) during the synthesis of exopolysaccharide (EPS) from *Grifola frondosa* were investigated. On this premise, animal experiments were conducted to explore further the

引文格式:

雷露,余波,周景瑞,等.天麻、苦荞醇提物对灰树花胞外多糖合成酶类的影响及天麻苦荞醇提物复配发酵液的抗疲劳作用[J].现代食品科技,2022,38(10):33-39

LEI Lu, YU Bo, ZHOU Jingrui, et al. Effects of alcoholic extracts on *Grifola frondosa* extracellular polysaccharide synthases and the anti-fatigue effect of fermentation broth of *Gastrodin elata*-tartary buckwheat extract mixture [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 33-39

收稿日期: 2021-12-02

项目基金: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31460537); 贵州省肉牛现代农业产业技术体系 (GZCYTX2020-0302); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020]4Y116 号)

作者简介: 雷露 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 673311654@qq.com

通讯作者: 吴天祥 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程与生物转化, E-mail: 524072113@qq.com

anti-fatigue effect of *Grifola frondosa*-derived fermentation broth. The results showed that the addition of a mixture of *Gastrodin elata* Bl. and Tartary buckwheat alcoholic extracts compound solution could enhance the activities of PGM and UGPase while reducing GPI activity. Compared with the blank group, the activities of PGM and UGPase were increased by 86.98% and 69.12%, respectively, and the activity of GPI was decreased by 65.78%. In addition, the fermentation broth containing *Gastrodin elata* Bl-Tartary buckwheat alcoholic extract mixture had the greatest anti-fatigue effect, which was significantly higher than that of the blank group ( $p < 0.05$ ) and experimental group ( $p < 0.05$ ). The anti-fatigue effect, was evidenced mainly by the increases in the swimming exhaustion time, hepatic glycogen (HG) content and lactate dehydrogenase (LDH) content, and the decreases in the contents of lactic acid (LA) and blood urea nitrogen (BUN) in mice. The research shows that the addition of the extract mixture could significantly change the activities of key enzymes in the EPS synthesis pathway of *Grifola frondose*, thereby increasing the content of EPS in the fermentation broth and endows the both with a good anti-fatigue effect.

**Key words:** *Grifola frondosa*; *Gastrodin elata* Bl.; Tartary buckwheat; enzyme activity; anti-fatigue

灰树花 (*Grifola frondosa*) 隶属于多孔菌科树花菌属, 又名重菇、莲花菌等, 是一种名贵的食药两用真菌<sup>[1]</sup>。通过液体深层发酵的培养方法可高效、快速的获取灰树花中的多酚、蛋白质、多糖、萜类、氨基酸、甾醇等生物活性物质<sup>[2,3]</sup>, 其中胞外多糖 (EPS) 是灰树花发酵液的重要活性成分之一, 具有抗氧化<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、调节机体免疫力<sup>[6]</sup>、抗 HIV<sup>[7]</sup>等生理功效。在灰树花 EPS 的合成过程中酶起着举足轻重的作用, 灰树花菌体合成 EPS 的途径如图 1 所示<sup>[8]</sup>, 菌体将葡萄糖作为碳源物质, 在激酶 (Glucokinase, GK) 催化

作用下转化成葡萄糖-6-磷酸 (Glucose-6-phosphate, GSP), 进入两条代谢路径, 一条是在磷酸葡萄糖异构酶 (GPI) 的作用下转化为果糖-6-磷酸 (Fructose-6-phosphate, FSP), 经过一系列转化反应后生成乳酸 (LA); 另外一条通路则是在磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (UGPase) 的作用下将 GSP 在转化成 UDP-葡萄糖 (UDP-glucose, UDPG) 参与糖链的连接, 该途径与灵芝 EPS 合成途径相类似<sup>[9,10]</sup>。可看出, GPI、PGM、UGPase 是胞外多糖合成的关键酶<sup>[11]</sup>。

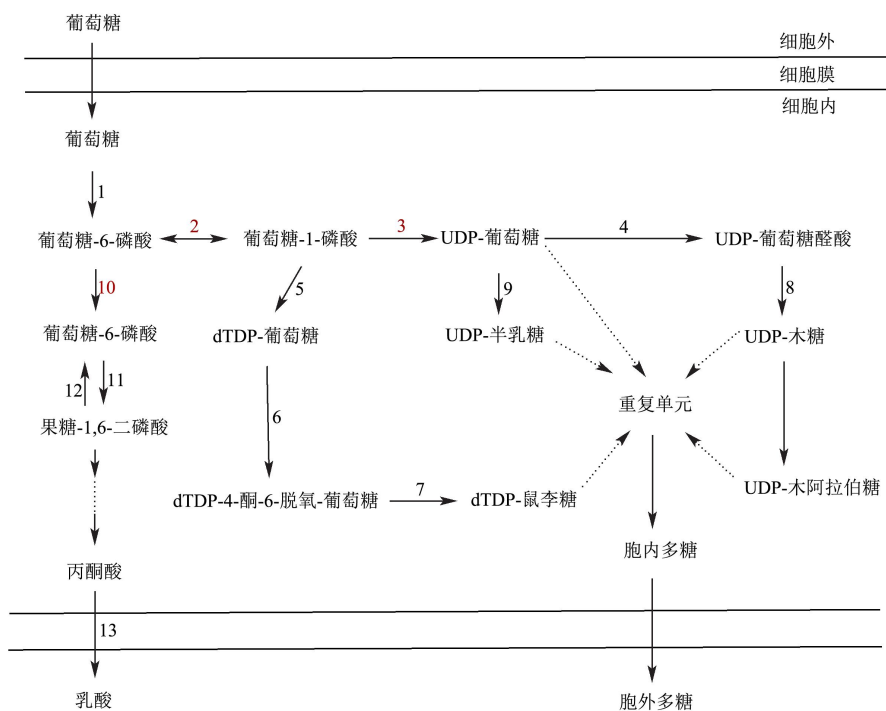


图 1 灰树花 EPS 生物合成途径

Fig.1 The EPS biosynthetic pathway of *Grifola frondosa*

注: 1: 葡萄糖激酶; 2: 磷酸葡萄糖变位酶; 3: UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; 4: UDP-葡萄糖脱氢酶; 5: dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶; 6、7: dTDP-鼠李糖合成酶; 8: UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶/UDP-木糖合成酶; 9: UDP-葡萄糖-4-差向异构酶; 10: 磷酸葡萄糖异构酶; 11: 磷酸果糖激酶; 12: 果糖-1,6-二磷酸酯酶; 13: 乳酸脱氢酶。

随着人们生活品质的提高, 有氧运动成为主流, 但当前的运动饮料多以糖类、盐类为主要成分, 仅起到预防运动后身体中的水盐紊乱作用<sup>[12]</sup>, 因此研究药食用真菌发酵液的抗疲劳功效, 研发新型运动饮料极具开发价值。焦迎春等<sup>[13]</sup>从柴达木大肥菇发酵液中提取的EPS灌胃小鼠35 d后能够显著提高其体内肝糖原(HG)含量和血清中的乳酸脱氢酶(LDH)活性, 降低血清尿素氮(BUN)和LA含量, 表现出良好的抗疲劳功效。胡振宇<sup>[14]</sup>发现用姬松茸发酵液连续灌胃小鼠30 d后, 小鼠的负重游泳与爬杆时间得到明显延长, 同时肝组织中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性也显著提升; 刘洋等<sup>[15]</sup>研究发现, 添加人参水煎液的灵芝发酵液可明显延长小鼠游泳耗竭时间, 并降低血液中LA含量, 从而表现出良好的抗疲劳效果。近年来, 在药食用真菌领域上开发运动保健型饮料逐渐得到重视, 但有关灰树花抗疲劳作用的相关研究鲜见报道。

本课题组前期研究表明在灰树花深层发酵体系中添加7 g/L的天麻醇提取物和5 g/L的苦荞醇提取物, 可显著提升灰树花EPS的产量(与空白组相比提高49.08%)<sup>[16]</sup>。为进一步探明EPS产量的提升与EPS生物合成途径中的酶是否有一定的相关性, 本研究通过向灰树花深层发酵体系中添加7 g/L天麻醇提取物、5 g/L苦荞醇提取物以及这两种醇提取物的复配液, 动态测定PGM、GPI和UGPase三种关键酶活性的变化。用发酵液连续灌胃试验小鼠30 d后, 测定小鼠负重游泳的首次下沉时间、力竭时间, 以及游泳试验结束后肝脏HG含量和血清中LA、LDH、BUN含量。该文旨在为研究酶活的变化以诱导灰树花更高效的发酵给予相应的理论基础数据和试验依据, 以期开发出优质的灰树花发酵液保健品。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与编号

SPF级体质量为 $20\pm 2$  g的雄性昆明小鼠, 长沙天勤生物技术有限公司。动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0013。

### 1.2 菌种与试剂

灰树花5.404菌种, 中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGICC); 天麻和苦荞籽粒, 贵州德江县和威宁县。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 $\alpha$ -葡萄糖-1-磷酸钠盐、D-果糖-6-磷酸二钠、 $\alpha$ -磷酸葡萄糖变位酶、 $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、

UDP-葡萄糖, 美国Sigma公司; Tris-HCl、焦磷酸钾, 北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇、MgCl<sub>2</sub>、NaCl, 国药集团; 血清尿素氮(BUN)、乳酸脱氢酶(LDH)、糖原、血乳酸(LA)测试盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.3 实验仪器

Thermo-17R型离心机, 德国赛默飞仪器公司; BXM-30R型灭菌锅, 上海博讯实业医疗设备厂; SPECTRA MAX 190型酶标仪, 昆明纳瑞科技有限公司; CP114型电子天平, 上海奥豪斯仪器有限公司; SW-CJ-1D型超净工作台, 苏州净化设备有限公司。

### 1.4 灰树花培养

培养温度: 25 ℃。方法: 从母种试管中挑取少量菌体接种至PDA斜面培养基中培养10~14 d, 转移至150 r/min摇床液体种子培养4 d后, 再转移至同转速摇床发酵培养基(实验组加入天麻、苦荞醇提取物)培养7 d。

### 1.5 制备醇提取物

分别取洗净烘干的天麻、苦荞, 用高速磨粉机粉碎后过80目筛, 用 $\varphi=75\%$ 乙醇(天麻常温下浸提48 h, 苦荞60 ℃冷凝回流2 h)提取醇提取物, 80 r/min旋蒸除乙醇, 最后用蒸馏水(1 g天麻或苦荞用10 mL蒸馏水)定容, 既得到醇提液(每10 mL醇提液中含1 g天麻或苦荞)<sup>[8,16]</sup>。将7 g/L天麻醇提取物与5 g/L苦荞醇提取物按体积比1:1混合得试验用天麻苦荞复配液。

### 1.6 酶活力的测定

#### 1.6.1 粗酶液的提取

灰树花发酵液用滤纸过滤, 得到菌丝体, 用4 ℃的细胞提取缓冲液(0.02 mol/L磷酸钾盐pH值6.5)洗涤菌丝体表面残留的发酵液, 转移菌丝体至预冷的研钵中, 加入5 mL细胞提取缓冲液后顺着同一方向研磨至浆状, 在4 ℃, 15 000 r/min条件下离心20 min, 取上清液。上清液中的蛋白浓度测定采用Bradford法<sup>[17]</sup>。

#### 1.6.2 酶活力的测定

参照聂文强<sup>[18]</sup>、李阳<sup>[19]</sup>的方法, 根据PGM、UGPase和GPI三种酶活力测定的反应体系, 添加各反应物于具塞试管中, 加入1 mL粗酶液, 混匀。取200  $\mu$ L放入微孔酶标板中, 在30 ℃, 340 nm处测定NAD(P)H的变化。1个酶活单位(U)定义为每分钟增加或减少的1  $\mu$ mol NAD(P)H所需酶量。计算公式见下。

$$IU = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{10^6 \times V_y}{V_q \times \varepsilon \times d}$$

式中:

$\Delta A/\Delta t$ ——吸光值在 60 s 的变化率;

$V_q$ ——所加酶液体积, mL;

$V_y$ ——反应体系总体积, mL;

$\varepsilon$ —— $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ ;

$d$ ——吸收光径, cm。

## 1.7 动物实验

### 1.7.1 灌胃方法

小鼠适应性喂养 7 d 后, 每组随机选取 8 只分成 6 组, 共 48 只。分别为: 空白组 (生理盐水)、对照组 (灰树花发酵液)、复配液对照组 (天麻苦荞复配液)、三个实验组 (分别灌胃添加天麻醇提取物、添加苦荞醇提取物和添加天麻苦荞复配液的灰树花发酵液)。

灌胃周期 30 d, 根据小鼠体质量按量给药, 每日一次 (灌胃体积: 0.01 mL/g)。

### 1.7.2 指标的测定

第 30 d 灌胃后 0.5 h 称量小鼠体质量→尾巴中下部捆绑质量为小鼠质量 5% 的铅皮→放入水槽中 ( $25 \pm 0.5$ ) °C 游泳 (记录首次下沉的时间与沉入水面 8 s 无法上游时间即为游泳力竭时间)→摘眼球取血→解剖取出肝脏→测定 BUN、LA、LDH、HG 的含量。

## 1.8 数据处理

以平均值 (X) ± 标准差 (SD) 表示数据, 分析显著性用 IBM SPSS Statistics 23 软件, 绘图软件用 Origin 2017。

## 2 结果与讨论

### 2.1 醇提取物对灰树花 EPS 合成酶类的影响

#### 2.1.1 磷酸葡萄糖变位酶

以 7 g/L 的天麻醇提取物 (天麻组)、5 g/L 的苦荞醇提取物 (苦荞组) 和天麻 7 g/L、苦荞 5 g/L 复配液 (复配组) 为三个实验组, 不添加醇提取物的发酵液为空白组进行试验。每 2 d 取一次样, 测定 PGM 活力, 绘制动态变化曲线如图 2 所示, 在发酵前期, 各组 PGM 活力迅速提升, 且复配组的活力最强。发酵的第 7 d, 所有组别的 PGM 活力均达到峰值后开始缓慢下降, 这是由于在发酵的 1~3 d, 菌体处于调整期, 发酵液中菌丝体极少, 使得产 PGM 活力较低; 3~7 d, 菌体处于对数生长期, PGM 活力迅速提高; 7~13 d, 菌体生长处于稳定期并逐渐进入衰亡期, PGM 活力开始降

低。在第 7 天时, 酶活具体表现在: 复配组为最高 0.32 U, 其次是天麻组 0.27 U, 再次是苦荞组 0.26 U, 最后是空白组 0.17 U, 复配组、天麻组、苦荞组的 PGM 活力与空白组相比提高了 88.26%、58.82%、52.94%, 且差异显著 ( $p < 0.05$ )。表明天麻、苦荞醇提取物复配添时能够对 PGM 活力起到最佳效果 ( $p < 0.05$ ), 使得合成 EPS 过程中, 葡萄糖转化成 GSP 之后在 PGM 活力提升的影响下, 合成葡萄糖-1-磷酸 (Glucose-1-phosphate, GOP) 的效率和产量也得到提高, 为灰树花 EPS 的合成提供更充足的糖原物质。

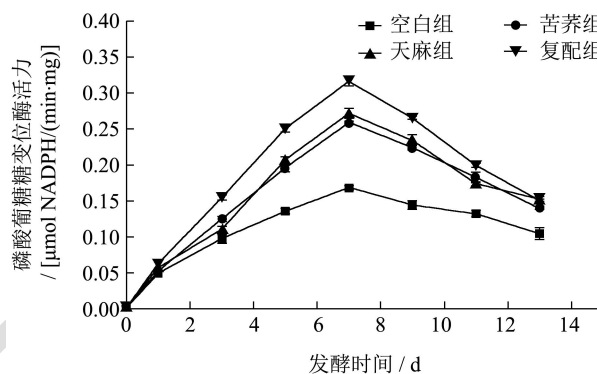


图 2 发酵过程中 PGM 活力的变化

Fig.2 Change of PGM activity during *Grifola frondosa* fermentation

#### 2.1.2 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶

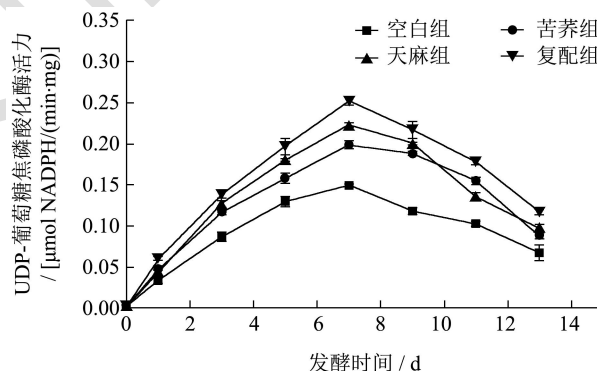


图 3 发酵过程中 UGPase 活力变化

Fig.3 Change of UGPase activity during *Grifola frondosa* fermentation

UGPase 是灰树花菌体合成胞外多糖的途径 (GSP→GOP→UDPG→...→EPS 重复单元) 中重要的关键酶之一, 通过该途径可得出, EPS 产量高低与其活力大小呈正相关。试验期间, 整个发酵周期的 UGPase 活力变化如图 3 所示。从发酵的第 3 天开始, 三个实验组的 UGPase 活力呈明显上升趋势且均显著高于空白组 ( $p < 0.05$ )。在第 7 天, UGPase 活力变化与 PGM 表现一致, 达到最高值, 其中复配组的 UGPase 活力为 0.25 U, 与天麻组 0.22 U、苦荞组 0.20 U 和空白组 0.15 U 相比分别增加了 13.63%、25.00%、66.67%。

Wu 等<sup>[20]</sup>研究发现,PGM 和 UGPase 是影响灰树花 EPS 种类和单糖成分的关键酶。结合上一步试验可得出,天麻和苦荞醇提物中存在某些对 PGM 和 UGPase 活力增效的成分,且这些成分有着协同增效的作用,使得在 EPS 的合成中,通过改变多糖种类和单糖成分,进一步为 EPS 的合成提供更多前体物质,此结论与唐家毅等<sup>[21]</sup>的研究相一致。

### 2.1.3 磷酸葡萄糖异构酶

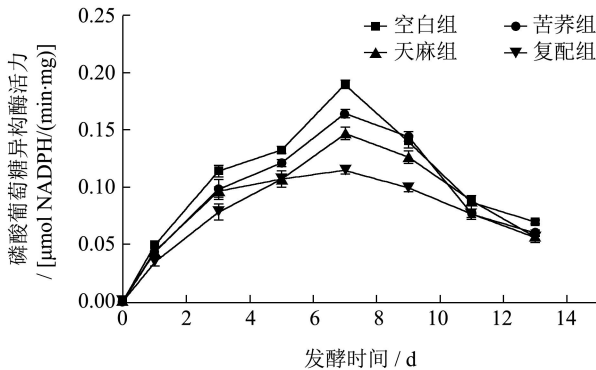


图 4 发酵过程中 GPI 活力的变化

Fig.4 Change of GPI activity during *Grifola frondosa* fermentation

由图 4 可知,GPI 活力的变化与 PGM 和 UGPase 正好相反。从发酵第 5 d 开始,实验组的 GPI 活力均显著低于空白组 ( $p < 0.05$ ),这说明一定浓度醇提物的添加能够让 GPI 活力受到抑制,且抑制作用最为明显的是复配组。各组的 GPI 活力在第 7 d 达到最大,这是由于在灰树花整个发酵阶段,第 7 d 为菌体生长的最旺盛时期<sup>[17]</sup>。与空白组 (0.19 U) 相比,苦荞组 (0.17 U)、天麻组 (0.15 U) 和复配组 (0.11 U) 的 GPI 活力分别降低了 11.76%、26.67%、72.73%。GPI 活力的减弱,会提升糖异生途径 (EPS 合成途径) 的碳通量,提升 GSP 转化为 UDPG 的效率,有利于灰树花菌体合成 EPS,使得实验组发酵液中 EPS 含量增加。

## 2.2 小鼠抗疲劳指标测定结果

### 2.2.1 体质量分析

观测灌胃 30 d 后,小鼠体质量的增长率。结果如表 1 所示,所有试验小鼠体质量在灌胃 30 d 后均增加,空白组虽然增长率稍低一些。但与其他组别比较无统计学意义 ( $p > 0.05$ ),说明发酵液和醇提物均不会加速小鼠体质量的增长,同时也未影响试验小鼠的正常生长发育。

表 1 小鼠体质量的对比分析

Table 1 Comparative analysis of the body weight of mice ( $X \pm SD, n=8$ )

组别	初质量/g	末质量/g	增长率/%
空白组	33.22±2.82 <sup>a</sup>	43.78±2.39 <sup>a</sup>	31.78±3.12 <sup>a</sup>
对照组	33.17±2.77 <sup>a</sup>	46.28±4.60 <sup>a</sup>	39.52±3.34 <sup>a</sup>
复配液对照组	33.26±3.18 <sup>a</sup>	44.81±2.97 <sup>a</sup>	34.73±3.29 <sup>a</sup>
苦荞组	33.59±2.37 <sup>a</sup>	45.13±5.83 <sup>a</sup>	34.36±3.86 <sup>a</sup>
天麻组	33.87±1.73 <sup>a</sup>	47.71±6.30 <sup>a</sup>	40.86±3.63 <sup>a</sup>
复配液组	33.36±1.24 <sup>a</sup>	46.85±3.76 <sup>a</sup>	40.44±2.98 <sup>a</sup>

注:字母不同表示每列两组样品间在  $p < 0.05$  水平差异性显著,下同。

### 2.2.2 负重游泳实验结果

运动耐力试验被普遍用于评估疲劳现象,负重游泳试验是通常被作为检验抗疲劳的试验方法之一<sup>[22]</sup>。通过表 2 对比发现,灌胃了灰树花发酵液的小鼠,首次下沉时间和游泳力竭时间均得到延长,与空白组和复配液对照组比较均有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),复配液对照组与空白组相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ ),表明未与灰树花共同发酵的天麻、苦荞醇提物不能提高小鼠的运动能力,由此可排除醇提物自身所带来的干扰因素。此外,复配组的小鼠游泳耐力效果最好,其作用优于除天麻组以外的其余组别,并分别是空白组和对照组的 2.92 倍和 1.22 倍,结合本实验发现,醇提物的添加使得灰树花发酵液中的 EPS 含量提升,糖类作为主要能源物质在运动中由线粒体通过有氧呼吸分解后合成 ATP,并直接释放能量,提升小鼠游泳耐力。

表 2 小鼠负重游泳时间的对比分析

Table 2 Comparative analysis on the swimming time of mice with loads ( $X \pm SD, n=8$ )

组别	首次下沉时间/s	游泳力竭时间/s
空白组	6.12±1.58 <sup>d</sup>	185.99±19.9 <sup>d</sup>
对照组	11.48±2.07 <sup>c</sup>	443.58±24.67 <sup>c</sup>
复配液对照组	6.79±0.96 <sup>d</sup>	180.20±21.33 <sup>d</sup>
苦荞组	15.96±2.90 <sup>b</sup>	515.54±20.46 <sup>b</sup>
天麻组	16.23±2.74 <sup>ab</sup>	522.33±25.74 <sup>ab</sup>
复配组	20.69±1.77 <sup>a</sup>	542.59±25.54 <sup>a</sup>

### 2.2.3 尿素氮和肝糖原含量的测定结果

由表 3 可知,两个对照组和三个实验组均能不同程度的降低小鼠负重游泳结束后血清中 BUN 含量,而肝脏中 HG 含量得到提升。BUN 是评价机体承受能力的特征指标,当蛋白质开始代谢参与供能时,BUN

含量提升,其含量与运动时间呈正相关,增幅越大表明机体运动负荷能力越差<sup>[23]</sup>。从表3得知,三个实验组BUN含量与空白组和复配对照组相比均显著降低( $p<0.05$ ),空白组和对照组与复配组相比分别降低了52.57%和31.66%,由此说明在灰树花发酵体系中添加天麻苦荞复配液能够使发酵液中抗疲劳因子总量增多,提高机体的运动承受能力,延长运动时间。

表3 尿素氮和肝糖原含量的对比分析

Table 3 Comparative analysis of BUN and HG content

(X±SD, n=8)

组别	BUN 含量/(mmol/L)	HG 含量/(mg/g)
空白组	13.02±0.82 <sup>d</sup>	22.81±2.65 <sup>b</sup>
对照组	8.11±0.58 <sup>c</sup>	25.03±3.87 <sup>b</sup>
复配对照组	10.66±0.71 <sup>d</sup>	24.90±3.51 <sup>b</sup>
苦荞组	7.47±0.63 <sup>b</sup>	29.10±2.46 <sup>a</sup>
天麻组	7.07±0.52 <sup>b</sup>	31.04±4.02 <sup>a</sup>
复配组	6.16±0.35 <sup>a</sup>	32.15±4.03 <sup>a</sup>

随着运动时间的延长,糖原物质的耗尽是产生疲劳的主要原因之一<sup>[24]</sup>,因此,有效的缓解运动疲劳可通过增加机体中的糖原储备量,以此提升运动耐力。从表3可看出,对照组和复配对照组与空白组相比较,HG含量有小范围的提高,但不显著( $p>0.05$ );而三个实验组与空白组相比,均能显著提高小鼠肝脏中HG含量( $p<0.05$ ),说明含有醇提物的灰树花发酵液对小鼠进行一段时间的灌胃后,发酵液中的EPS作为外源性糖分可有效提高其肝脏合成糖原的速度,以此来提高机体内糖原物质的储备量,延缓疲劳发生。

### 2.3.4 血清中乳酸脱氢酶、乳酸含量的测定结果

表4 乳酸脱氢酶和乳酸含量对比分析

Table 4 Comparative analysis of LDH and LA contents

(X±SD, n=8)

组别	LA 含量/(mmol/L)	LDH 含量/(kU/L)
空白组	19.17±1.22 <sup>d</sup>	13.19±4.25 <sup>c</sup>
对照组	15.81±2.58 <sup>c</sup>	15.31±3.76 <sup>b</sup>
复配液对照组	20.15±2.63 <sup>d</sup>	13.11±2.12 <sup>c</sup>
苦荞组	14.70±1.20 <sup>b</sup>	15.88±2.91 <sup>b</sup>
天麻组	14.10±0.99 <sup>b</sup>	16.09±2.72 <sup>b</sup>
复配组	10.35±2.83 <sup>a</sup>	17.04±3.85 <sup>a</sup>

LA含量是评价机体疲劳的指标之一,在剧烈运动时,产生的LA得不到有效分解就会引起肌肉酸痛,从而产生疲劳感<sup>[25]</sup>,此时,LDH可加快清除无氧糖酵解所产生的LA,减少其在机体内的堆积,减缓或加速消除疲劳感<sup>[26]</sup>。由表4可知,与空白组小鼠相比,除复配液对照组外,其余组别小鼠血清中LA的含量均减少,而LDH的含量均在一定程度上得到提高。

效果最为明显的组别为复配组( $p<0.05$ ),其LA含量与空白组和对照组相比,降低了46.01%和34.54%,LDH提升了19.19%和11.30%;复配液对照组的LA和LDH含量与空白组相比均无显著影响( $p>0.05$ )。实验结果表明,添加天麻苦荞复配液的灰树花发酵液可通过提升LDH在小鼠机体内的含量,从而分解长时间运动过程中无氧呼吸产生的LA,缓解肌肉酸痛感而达到抗疲劳效果。

## 3 结论

本研究能够初步证实添加天麻、苦荞醇提物后灰树花EPS含量提升与PGM、UGPase和GPI三种酶密切相关。吴彩云等<sup>[27]</sup>研究发现在灰树花深层发酵中,菌丝体能消耗天麻醇提物中的天麻素、对羟基苯甲醛和对羟基苯甲醇,尤其是对羟基苯甲醛基本完全吸收。Chen等<sup>[28]</sup>在苦荞醇提物中发现其含有丰富的芦丁、槲皮素等活性成分,但具体是哪一种或者哪几种成分对改变EPS合成关键酶活性,提升发酵液中的抗疲劳因子尚不清楚,需做进一步研究。在该研究中,本课题组也首次发现了灰树花发酵液具有良好的抗疲劳作用,且将天麻苦荞复配液与灰树花共同发酵之后,所得发酵液抗疲劳作用起到1+1>2的效果。研究结果表明,灰树花发酵液能够作为一种天然的初级保健产品,可进行下一步的深入研究,为灰树花功能型饮料的研发提供理论支撑。

## 参考文献

- [1] 张宗启,吴天祥,刘力萍.天麻中香草醇对灰树花菌丝体生物量和胞外多糖合成的影响[J].食品科学技术学报,2020,38(6):62-68
- [2] 朱俊杰,吴天祥,吴彩云,等.对羟基苯甲醇对灰树花产胞外多糖的影响及其发酵动力学[J].食品科学,2016,37(19):13-18
- [3] Lu H, Lou H, Hu J, et al. Macrofungi: a review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(5): 2333-2356
- [4] Lin E S. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Grifola frondosa* TFR11073 and their antioxidant and antiproliferative activities [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(3): 555-561
- [5] Mao G H, Ren Y, Li Q, et al. Anti-tumor and immunomodulatory activity of selenium (Se)-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82:

- 607-613
- [6] Ma X L, Meng M, Han L R, et al. Immunomodulatory activity of macromolecular polysaccharide isolated from *Grifola frondose* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2015, 13(12): 906-914
- [7] Nanba H, Kodama N, Douglas S, et al. Effects of maitake (*Grifola frondose*) glucan in HIV-infected patients [J]. Mycoscience, 2000, 41: 293-295
- [8] 吴彩云.对羟基苯甲醛等天麻成分对灰树花多糖代谢的影响及其机理研究[D].贵阳:贵州大学,2016
- [9] Ma Z B, Ye C, Deng W W, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of *Ganoderma lucidum* for improved extracellular polysaccharide production [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3076-3089
- [10] Tang Y J, Zhong J J. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(12): 1023-1026
- [11] Vandamme E J, Baets S D, Steinbuchel A. Biopolymer (the sixth volume), Polysaccharide II-Eukaryotic Polysaccharide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 42-114
- [12] 郑聪,李胜楠.余甘子圣女果复合饮料发酵工艺及对运动耐力的影响[J].食品工业科技,2022,43(4):358-365
- [13] 焦迎春,旷慧,吴嘉南,等.柴达木大肥菇多糖对小鼠的抗疲劳作用[J].现代食品科技,2018,34(8):30-36
- [14] 胡振宇.姬松茸发酵液对小鼠抗运动疲劳及肝组织抗氧化能力的影响[J].食用菌学报,2016,4:44-47
- [15] 刘洋,李磊,咎立峰,等.用灵芝发酵人参水煎液的工艺优化及其产物的抗疲劳活性研究[J].菌物学报, 2012,31(6):924-932
- [16] 雷露,吴天祥,王川南.天麻和苦荞复配液对灰树花胞外多糖合成的影响及其发酵动力学研究[J].食品科学技术学报, 2020,38(1):53-59
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254
- [18] 聂文强.天麻醇提取物对灰树花深层发酵胞外多糖的影响及机理初探[D].贵阳:贵州大学,2018
- [19] 李阳.灵芝多糖合成途径关键酶在大肠杆菌中的异源表达与酶学性质研究[D].无锡:江南大学,2019
- [20] Wu T X, Wang N, Zhang Y, et al. Advances in the study on microbial fermentation and transformation of traditional Chinese medicine [J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(17): 1644-1650
- [21] 唐家毅,蓝东明,王永华,等.胶质芽孢杆菌葡萄糖磷酸变位酶基因的克隆、表达与酶学性质研究[J].现代食品科技, 2015,31(3):38-42
- [22] Huang W C, Chiu W C, Chuang H L, et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice [J]. Nutrients, 2015, 7(2): 905-921
- [23] 程兆宇,房磊.黑米糠抗疲劳运动饮料的研究[J].食品研究与开发,2015,36(22):165-168
- [24] Tan W, Yu K Q, Liu Y Y, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix rehmanniae* Preparata [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(1): 59-62
- [25] Ribeiro G A, Scola R H, Piovesan E J, et al. The importance of lactic acid in migraines and fibromyalgia [J]. Revista Brasileira de Reumatologia, 2015, 55(6): 471-476
- [26] Huang L Z, Huang B K, Ye Q, et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(1): 213-219
- [27] 吴彩云,吴天祥,朱俊杰,等.羟基苯甲醛等3种天麻成分对灰树花胞外多糖生物合成的影响[J].食品科学,2016,37(7): 83-87
- [28] Chen Y, Qin L K, Wen A Y, et al. Three-solvents extracting method comprehensively evaluates phenolics profile and antioxidant activities of Tartary buckwheat [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 14(10): 2-10