

· 综述 ·

银杏叶发酵研究进展[△]

杨芳¹, 赵崇妍¹, 屈青松¹, 刘自尧¹, 史新元^{2*}

(1. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

[摘要] 银杏叶是我国特有的中药材之一。银杏叶中的黄酮及萜内酯等成分具有多种药效作用, 银杏酸则具有一定的毒性, 利用微生物对银杏叶进行发酵可以达到增效减毒的目的。本综述介绍了银杏叶经发酵后新物质的生成、物质含量的变化、发酵产物的药理学研究以及发酵产品在保健品、食品、饲料方面应用的研究, 为进一步开发利用银杏叶提供参考。

[关键词] 银杏叶; 微生物; 发酵; 增效减毒

Research Progress of Ginkgo Leaf Fermentation

YANG Fang¹, ZHAO Chong-yan¹, QU Qing-song¹, LIU Zi-yao¹, SHI Xin-yuan²

(1. College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] Ginkgo leaf is the dried leaf of *Ginkgo biloba* and one of the unique medicinal herbs in our country. Flavonoids and terpenoid lactones in *Ginkgo biloba* leaves have a variety of pharmacological effects, and ginkgoic acid has a certain toxicity, the use of microorganisms and ginkgo leaf fermentation can achieve the purpose of synergy and attenuation. The present review introduces *G. biloba* and microorganisms in the co-fermentation process of new substances, changes in material content, pharmacological studies of fermentation products and fermented products in health products, food, feed applications for further development and utilization of *G. biloba*.

[Keywords] *Ginkgo biloba* leaf; microorganism; fermentation; increase efficiency and reduce toxicity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180227008

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为银杏科, 银杏属落叶乔木, 有“活化石”的美称^[1]。银杏叶为银杏科植物银杏的干燥叶, 性平, 味甘、苦、涩。归心经、肺经。其主要成分为黄酮类、内酯类、有机酚酸类、聚戊烯醇类、多糖类等, 有效活性成分为黄酮类化合物和萜内酯类物质^[2-3]。研究表明, 银杏叶具有降低血清胆固醇^[4]、抗炎^[5]、抗氧化^[6]等作用, 对高血压、冠心病等心血管疾病有一定的辅助治疗作用^[7-10]。银杏叶含银杏酸, 银杏酸是水溶性酸, 具有一定的毒性, 未经炮制的银杏叶中银杏酸含量高达 20 g·kg⁻¹^[11]。随着银杏叶的用量逐年增加, 银杏叶的传统炮制方式已经不能满足人类的需求, 因其炮制后银杏酸的含量仍较高, 利用微生物与银杏叶共发酵是近年来研究的热点, 微生物可利用和代

谢银杏叶中的成分, 不仅能增加黄酮和内酯等活性成分的含量, 还能对银杏酸进行分解与转化, 达到增效减毒的目的, 且银杏叶中的某些成分还可促进微生物的次生代谢, 产生新的活性物质, 从而开发银杏叶新的药用功能^[12]。银杏叶的发酵研究具有理论和现实意义, 因此, 本综述对近年来国内外对银杏叶和微生物共发酵的研究进行系统的总结, 以期对银杏叶的研究与应用提供参考。

1 银杏叶发酵过程中物质成分的变化研究

1.1 发酵过程中新物质的生成

银杏叶中的某些成分可促进微生物的次生代谢, 产生新的活性物质, 从而扩展银杏叶的用途^[13]。詹欣^[14]利用冠突散囊菌和银杏叶进行共发酵, 通过低

[△] [基金项目] 北京市科委科技新星交叉学科项目(xxhz201210)

* [通信作者] 史新元, 教授, 研究方向: 中药生物技术; Tel: (010)84738621, E-mail: xyshi@126.com

分辨质谱和氢谱检测,发现发酵产物中有增强抗氧化能力的新物质-咖啡因生成,表明发酵可增加银杏叶的抗氧化能力。吴其飞等^[15]利用猴头菌和银杏叶提取物共发酵,以抑制非酶糖基化反应为指标,结果发现对非酶糖基化反应、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用明显增强,推测在发酵过程中产生了一些新物质。董英等^[16]筛选了11种菌株对银杏叶粗提物进行液体发酵,以体外抑制 α -葡萄糖苷酶活为指标,发现用猴头菌发酵所得产物对 α -葡萄糖苷酶活的抑制率最高,为92.1%,预测该发酵体系能产生某种新的活性物质来抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。

1.2 发酵过程中物质含量的变化

银杏叶中含有黄酮、萜内酯等活性成分,同时也含有银杏酸这样的毒性成分,将银杏叶与微生物进行共发酵,利用微生物的代谢活动,可起到增强银杏叶中活性成分,降低毒性成分含量的作用^[12]。

1.2.1 银杏酸 银杏叶经过炮制后可制成银杏叶茶,但长期饮用银杏叶茶可引起阵发性痉挛、神经麻痹、瞳孔放大、过敏等其它副作用,严重时甚至会损害心脏^[17]。因此,去除或降低银杏叶中银杏酸的含量是其被广泛利用的关键。传统的光照法脱毒、超临界CO₂脱毒、中药配伍脱毒法^[18-19]不仅脱毒效率低而且有可能改变银杏叶中的有效成分,用微生物发酵来降低银杏叶制品中的银杏酸,是新的生物脱毒法^[20]。任金玫^[21]利用冠突散囊菌和银杏毛茶进行共发酵,结果发现毒性成分银杏酸下降了44.6%,活性物质黄酮提高了3.14%。李银亮等^[12,22]利用冠突散囊菌发酵银杏叶制作发酵茶,发现发酵16d后发酵茶中的银杏酸比采摘时的银杏叶中减少了74.4%。H Zhou等^[23]以银杏叶渣为底物利用热带假丝酵母和米曲霉进行固态发酵,发酵后基质中银杏酸含量由14.8 mg·g⁻¹降至1.5 mg·g⁻¹。

1.2.2 萜内酯类和黄酮类 银杏叶中的黄酮和萜内酯类具有多种药效作用,一些微生物可利用银杏叶中的物质,经过代谢转化成黄酮或萜内酯类。秦俊哲等^[24]利用冠突散囊菌和银杏叶共发酵,采用HPLC检测银杏萜内酯含量的变化,发现随发酵时间延长银杏总内酯的含量略微下降,发酵10d时其含量下降2.14%,与传统的银杏叶炮制方法相比总内酯损失率大大降低。利用灵芝与银杏叶进行双向液

体发酵,发现与未发酵的银杏叶相比黄酮类物质明显增加^[25]。将银杏叶与黑曲霉进行双向固体发酵,发现银杏叶通过微生物代谢转化后总黄酮含量提高5.77%^[26]。将冠突散囊菌和银杏叶共发酵,结果表明与未发酵的银杏叶相比总黄酮含量增加了3.14%^[21]。Weihua Qiu等^[27]利用漆酶与银杏叶共发酵,发现银杏叶中黄酮含量比未发酵基质提高了24.11%。Jiahong Wang等^[28]利用从古银杏树下的土壤中筛选出的Gyx086菌株与银杏叶共发酵,结果表明发酵菌质中黄酮量比未发酵银杏叶基质中高约170%。

1.2.3 其它 詹欣等^[29]利用冠突散囊菌和银杏叶共发酵的产物进行抑菌活性研究,实验结果表明未发酵的银杏叶水提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑制作用明显高于发酵后的产物,说明发酵后银杏叶中的多羟基类抑菌物质由于微生物的转化而减少。

2 银杏叶发酵产物药理学研究

2.1 抗氧化

银杏内酯可以增强红细胞SOD活性,清除氧自由基,抑制细胞膜脂质过氧化^[30-31]。Ismail AFM等^[32]用黑曲霉发酵银杏叶,将发酵液喂食经 γ -射线辐射过的小鼠,结果发现大鼠脑组织中SOD、谷胱甘肽过氧化物酶活性和钙水平显著升高。詹欣等^[14,33]将银杏叶与冠突散囊菌共发酵,提取发酵物中的乙酸乙酯进行抗氧化研究,以清除DPPH自由基能力、清除ABTS自由基能力和还原Fe³⁺能力为指标,结果发现发酵11d后,发酵液中的抗氧化活性成分积累量最大。

2.2 降血糖

银杏叶中的活性物质黄酮具有降低血清胆固醇的作用,黄达明等^[34]用猴头菌与银杏叶提取物进行共发酵,以四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠为模型进行研究,结果发现与猴头菌单发酵相比,猴头菌与银杏叶提取物共发酵的产物能显著降低糖尿病模型小鼠的血脂、血糖水平。温啸等^[35]以肥胖小鼠为模型,给肥胖小鼠喂食干酪乳杆菌与银杏叶提取物混合液,发现与对照组相比肥胖小鼠的质量降低了13.22%,血清中的总胆固醇降低了24.48%,甘油三酯降低了20.93%,血清中高密度脂蛋白胆固醇增

加了167.85%，这些研究为开发预防和治疗高脂血症药物提供了依据。

2.3 抗衰老、增强免疫力

许多研究表明银杏叶有显著的抗衰老、增强免疫力的功效，这些研究对抗衰老药物、化妆品、保健食品等的开发有积极作用。郭敏等^[36]研究用银杏叶和牛蒡提取物为主要成分的发酵食品对小鼠衰老指标的影响，结果表明喂食了发酵食品的小鼠肝、脑组织中单胺氧化酶的活性比对照组分别降低了36.7%、25.1%，丙二醛含量分别降低了19%、44.6%，而皮肤组织中羟脯氨酸含量和巨噬细胞吞噬活性分别高于对照28.6%和63.2%，有显著的抗衰老作用。X Liu等^[37]每天给肉仔鸡喂食含0.3%凝结芽孢杆菌和银杏叶共发酵产物的基础日粮作为实验组，喂食含0.3%银杏叶的基础日粮作为对照组，定时采集肉鸡血液，结果发现与对照组相比血清IL-18和IFN-g水平明显降低，说明银杏叶的发酵产物能增强肉鸡的免疫力。

2.4 抗菌、抗病毒

银杏叶主要的抑菌物质为多羟基类，包括多酚类、黄酮类、丹宁类等物质，对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌均有一定的抑制作用^[29]。Shruti Shukla等^[38]研究发现银杏叶发酵产物能够抑制黄曲霉产生黄曲霉毒素B₁、赭曲霉产生赭曲霉毒素A，从而抑制了黄曲霉和赭曲霉的生长。林标声等^[39]利用产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌等益生菌发酵银杏叶，发现银杏叶和微生物的共发酵产物对仔猪的腹泻病原菌有中度敏感作用，抑菌圈的平均直径为12.6 mm，并且对猪传染性胃肠炎病毒有一定的抗性。

3 银杏叶发酵产品的开发

随着银杏叶与微生物共发酵的研究越来越多，其相应的银杏叶发酵产品也随之增多。目前银杏叶发酵产品应用于食品、保健品和动物饲料上。

3.1 在保健品和食品方面的应用

李荣同等^[40]利用菌核侧耳东华虎奶-1号与银杏叶粉进行双向固体发酵，发酵菌质经烘干研磨后制成的银杏叶-菌核侧耳复合发酵茶多糖含量高达10.96%。陈今朝等^[41]以灵芝和乳酸杆菌为发酵菌株，银杏叶为发酵基质，研制出具有高营养价值和

保健功能的新型灵芝银杏叶酸奶。秦俊哲等^[42]采用冠突散囊菌发酵银杏叶制作银杏茶，优化其发酵条件，不仅保存了银杏茶中的有效活性成分，降低了银杏酸的含量，而且达到了银杏茶脱苦去涩的目的。袁丹丹等^[43]研究了银杏叶的渥堆发酵工艺对银杏叶茶口感的影响，在渥堆过程中，由多种微生物的共同作用，使银杏叶的色香味都发生了变化，苦涩感消失，滋味醇和，更符合大众的口味。

3.2 在饲料方面的应用

银杏叶富含黄酮类、有机酸、多糖、氨基酸等多种活性物质，这些活性物质不仅可作为动物机体的营养物质还发挥一定的防病抗病作用，被广泛的应用到动物饲料添加剂中。用银杏叶和黑曲霉生产饲料复合饲料，发酵后饲料中粗蛋白、总氨基酸分别提高106.09%、69.26%，纤维素酶和半纤维素酶的活力分别达到11.83、122.17 U·g⁻¹，可作为一种新型绿色安全的饲料添加剂^[26]。高树峰^[44]利用提取黄酮和萜内酯后的银杏叶渣为发酵基质，分别与地衣芽孢杆菌和纳豆芽孢杆菌进行固态发酵，在肉鸡日粮中分别添加0.3%~0.6%的发酵产物，发现两种发酵产物均能改善肉鸡的抗氧化功能，将固态发酵物使用于动物饲料添加剂，有望消除或减少饲料添加剂抗生素的使用。

4 结语

从20世纪80年代庄毅提出“双向发酵”技术^[45]以来，将中草药与微生物结合进行发酵成为现代中草药增效减毒研究的热点。双向发酵技术既能让银杏叶中的营养物质被微生物生长所利用，又能使银杏叶原有的化学成分在微生物体内酶的催化下发生转变，为银杏叶的二次开发及新药的研制等提供了崭新的发展方向。由于银杏叶中的成分比较复杂，且不同地区银杏叶中化学成分的含量不同，和银杏叶配伍的微生物种类也比较多，发酵工艺条件随微生物的不同而异，迄今为止银杏叶和微生物共发酵的研究已经取得一定的成效，但大多集中在将发酵产物作为动物饲料添加剂，医药用品几乎没有涉及，许多问题亟待解决。为了充分利用银杏叶这一中药材，今后的研究工作可从以下方面开展：首先筛选出既能大量降低银杏叶中银杏酸含量，又能提高银杏叶中活性成分含量的微

生物;其次对发酵过程中不同活性物质的合成途径、调控机制及其影响因素进行研究,对发酵条件进行优化,确定银杏叶和微生物发酵的工艺;第三对发酵产物进行药效及毒性评价,保证发酵产品的质量和安全,为银杏叶发酵产物在医药领域的应用提供基础数据。

参考文献

- [1] 罗小芳,覃佐东,袁琦韵,等. 简析银杏研究的相关进展[J]. 科技通报,2016,32(8):36-40.
- [2] 杨扬,周斌,赵文杰. 银杏叶史话:中药/植物药研究开发的典范[J]. 中草药,2016,47(15):2579-2591.
- [3] 邵婷婷. 银杏酮酯的提取分离技术研究进展[J]. 中国现代中药,2016,18(3):396-400.
- [4] Abdelzaher A O, Farghaly H, Elrefaiy A, et al. Protective effect of the standardized extract of ginkgo biloba (EGb761) against hypertension with hypercholesterolemia-induced renal injury in rats: Insights in the underlying mechanisms[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95(10):944-955.
- [5] Wang Y Q, Wang M Y, Fu X R, et al. Neuroprotective effects of ginkgetin against neuroinjury in Parkinson's disease model induced by MPTP via chelating iron[J]. Free Radical Research, 2015, 49(9):1069-1080.
- [6] Li H, Zhou X, Gao P, et al. Inhibition of lipid oxidation in food and feed materials and hydroxyl radical-induced fish erythrocytes: A comparative study of Ginkgo biloba leaves extracts and synthetic antioxidants[J]. Animal Nutrition, 2016, 2(3):234-241.
- [7] 王亚峰,武新安. 银杏叶提取物对大鼠美托洛尔药动学的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(22):2243-2247.
- [8] 徐媛媛,徐康康. 银杏叶片对冠心病心绞痛疗效的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):288-293.
- [9] 项薇,潘速跃,武肖娜,等. 银杏叶黄酮对急性脑梗死模型小鼠凋亡因子的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(8):703-705.
- [10] 吴忠隐,王立军,吴晔,等. 银杏叶提取物股动脉灌注治疗组织坏死期血栓闭塞性脉管炎临床观察[J/OL]. 中国中西医结合杂志(2018-02-25). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20171116.1023.004.html>.
- [11] 黄萍. 不同产地银杏叶中总银杏酸的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12):129-131.
- [12] 李银亮. 发酵银杏茶脱毒效应的研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2014.
- [13] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4):3-6.
- [14] 詹欣. 银杏叶发酵产物的生物活性检测与分离及其发酵条件优化[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [15] 吴其飞,黄达明,管国强,等. 猴头菌转化银杏叶提取物(EGb)条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9):160-163.
- [16] 董英,韩晓明,黄达明,等. 不同菌种转化银杏叶粗提取物对体外活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11):50-53.
- [17] 李力,郭常川,胡海红,等. 银杏酸(17:1)在大鼠原代肝细胞、HepG2和MDCK细胞中的毒性研究[C]//国际issx/cssx联合学术会议. 2012.
- [18] 冯玉康,王文鹏,郝鹏彬,等. 响应曲面法优化银杏叶提取物柱层析精制工艺[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12):1321-1326.
- [19] 朱斌,刘芬,严兆华. 银杏叶提取物中脱除银杏酚酸的工艺研究[J]. 北方药学, 2014, 11(4):62-63.
- [20] 涂霞,潘扬. 双向发酵—毒性中药炮制减毒的新途径[J]. 菌物研究, 2010, 8(1):52-56.
- [21] 任金玫. 发酵法脱除银杏酸效应的研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2015.
- [22] 李银亮,秦俊泽,王青. 人工发酵银杏叶中银杏酸含量的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(9):55-58.
- [23] Zhou H, Wang C Z, Ye J Z, et al. Solid-state fermentation of Ginkgo biloba L. residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of Ginkgo biloba L. residue using Candida tropicalis and Aspergillus oryzae[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(2):379-388.
- [24] 秦俊哲,李银亮,王青. 人工发酵银杏叶中银杏萜内酯含量的研究[J]. 食品工业, 2014, 35(3):199-201.
- [25] 辛燕花,梁彬,王颖霞,等. 灵芝-银杏双向液体发酵条件优化及抗氧化的研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(10):1427-1435.
- [26] 赵林果,曹福亮,喻涛,等. 银杏叶生产饲料复合酶的固态发酵条件及产物分析[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(2):76-80.
- [27] Qiu W, Zhang W, Chen H. Flavonoid-rich plants used as sole substrate to induce the solid-state fermentation of laccase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(7):3583-3592.
- [28] Wang J, Cao F, Su E, et al. Improving flavonoid extraction from Ginkgo biloba leaves by prefermentation processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(24):5783-5791.

- [29] 詹欣,辛敏,王然,等. 银杏叶发酵与未发酵提取物的抑菌活性研究[J]. 中国医药导报,2013,10(35):130-132,137.
- [30] Xiong X J, Liu W, Yang X C, et al. Ginkgo biloba extract for essential hypertension: A systemic review [J]. *Phytotherapy International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 2014, 21(10):1131-1136.
- [31] 郝莉,徐玉英,郭春霞,等. 银杏酮酯抗 H₂O₂ 诱导衰老海马神经元氧化 DNA 损伤的作用研究[J]. 中药药理与临床,2015,31(3):83-88.
- [32] Ismail A F M, El-Sonbaty S M. Fermentation enhances Ginkgo biloba, protective role on gamma-irradiation induced neuroinflammatory gene expression and stress hormones in rat brain [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2016, 158:154-163.
- [33] 詹欣,辛敏,王然,等. 不同天数银杏叶发酵液提取物的体外抗氧化活性比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):118-123.
- [34] 黄达明,连宾,赵杰文,等. 银杏叶提取物的猴头菌转化产物降血糖作用的研究[J]. 食品科学,2006,27(12):718-722.
- [35] 温啸,贺大方,倪学勤,等. 干酪乳杆菌与银杏叶提取物对肥胖小鼠血脂及抗氧化功能的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2014,42(1):8-12.
- [36] 郭敏,吴少云,陈靠山,等. 银杏牛蒡混合发酵食品对小鼠衰老指标的影响[J]. 生物技术,2006,16(5):30-32.
- [37] Liu X, Cao G, Zhou J, et al. The effects of *Bacillus coagulans*-fermented and non-fermented Ginkgo biloba on abdominal fat deposition and meat quality of Peking duck [J]. *Poult Sci*, 2017, 96(5):1517-1517.
- [38] Shukla S, Park J, Park J H, et al. Evaluation of fungal microflora for aflatoxin producing possibility in novel quality Meju fermented with single and/or multiple additions of *Nelumbo nucifera*, *Ginkgo biloba*, and *Allium sativum* extracts [J]. *Journal of Food Safety*, 2017, 37(4):12368.
- [39] 林标声,吴江文,戴爱玲,等. 银杏叶-桑叶中药发酵制剂防治仔猪病毒性胃肠炎的应用效果研究[J]. 中国兽医杂志,2016,52(9):56-58.
- [40] 陈传红,李荣同,余志坚,等. 银杏叶菌核侧耳固态发酵茶的研制[J]. 食品与发酵工业,2010,36(8):213-215.
- [41] 陈今朝,王慧超,谭永忠,等. 灵芝银杏叶保健酸奶的研制[J]. 食品工业,2014,35(3):112-115.
- [42] 秦俊哲,任金玫,李银亮,等. 银杏茶人工接种发酵工艺优化研究[J]. 食品科技,2014,39(6):114-118.
- [43] 袁丹丹,陈晓燕,侯丽君,等. 利用渥堆发酵制备银杏叶茶的研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(7):750-755.
- [44] 高树峰. 发酵银杏叶制备新型生物饲料添加剂的研究[D]. 南京:南京林业大学,2014.
- [45] 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,2007,26(2):3-6.

(收稿日期 2018-02-27)