

羊肚菌液体发酵培养基的优化及发酵产物抗氧化活性研究

刘倩¹, 李正¹, 欧佳琪¹, 黄文^{1,2}, 王益¹, 刘莹^{1,2*}

(¹华中农业大学食品科学技术学院 武汉 430070

²果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室 武汉 430070)

摘要 为提高羊肚菌液体发酵产物中多酚的含量,探究发酵液的抗氧化活性,通过优化液体发酵培养基的成分及碳源、氮源和无机盐物质的添加量,采用单因素和响应面设计得到羊肚菌发酵液中多酚含量最高的发酵培养基为:0.5%土豆淀粉、4%大豆蛋白、0.3%磷酸二氢钾。在此条件下,羊肚菌发酵液中多酚含量可以达到 1.02 mg/mL。采用体外抗氧化试验评价发酵产物的抗氧化活性,结果表明发酵产物具有较强的自由基清除作用及还原能力,具体表现为发酵液冻干粉对 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 值为 1.83 mg/mL,对 ABTS 自由基清除率的 IC₅₀ 值为 4.81 mg/mL,对羟自由基清除率的 IC₅₀ 值为 0.78 mg/mL,对铁离子的还原能力在发酵液冻干粉浓度为 15 mg/mL 时,FRAP 值为 0.75 mmol/L。研究结果为羊肚菌液体发酵产物的开发提供参考。

关键词 羊肚菌; 液体发酵; 多酚; 响应面设计; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2023)10-0041-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.10.005

羊肚菌(*Morchella esculenta*)作为一种珍贵的药食两用真菌,其性质平和、味甘寒、没有毒性^[1]。羊肚菌中含有多糖、多酚等多种活性成分,具有防止氧化、抵御肿瘤生长、缓解疲劳等作用^[2]。目前对羊肚菌活性成分的研究中,羊肚菌多糖作为含量最为丰富的物质被广泛研究^[3],而对羊肚菌多酚的研究较少,且主要集中在羊肚菌子实体^[4]或菌丝体^[5]中多酚的提取工艺。

液体发酵技术就是在反应器中模拟自然界的环^[6]境,向其中加入供菌种生长繁殖的营养物质,通过搅拌或振荡等手段调节外部条件,使菌体在反应器中生长繁殖,获得目标物质^[7]。这种方法不仅可以提高菌丝体及其发酵产物的产量,还可以保证产品品质的标准化^[8]。优化液体发酵的方法可以从培养基添加物质、发酵条件等方面入手,使目标产物含量提高^[9]。目前有关于羊肚菌液体发酵的相关报道中,有通过优化发酵条件提高发酵液中多糖含量的研究,如 Meng 等^[10]通过优化羊肚菌的液体发酵培养基以及工艺参数,得到发酵液的胞外多糖含量为(2 913±265) mg/L。Li 等^[11]以羊肚菌

胞外多糖含量为指标,利用豆腐渣发酵羊肚菌,最终得到多糖含量为(95.82±1.37)mg/g。此外,也有研究测定发酵产物中的多酚含量,如金红等^[12]测定金针菇等 8 种食用菌发酵液中的总酚含量,结果发现,总酚含量最高的是金针菇,可达 5.07 mg/100 mL,然而目前未见通过优化羊肚菌液体发酵条件提高发酵液中多酚含量的相关报道。

针对羊肚菌发酵液中多酚含量较低的问题,本研究通过单因素实验和 Box-Behnken 响应面法优化液体发酵培养基中的碳源、氮源和无机盐添加量,提高发酵产物中的多酚含量,并测定所得发酵产物的抗氧化活性,为羊肚菌发酵液中多酚的利用提供参考。

1 材料与方^[13]法

1.1 材料与试剂

羊肚菌株为 M4M26 梯棱羊肚菌,保存于 CYM 培养基上,来自华中农业大学应用真菌研究所;土豆淀粉(食品级),河北古松农副产品有限公司;大豆蛋白、乳清粉、蛋黄粉、食品级葡萄糖、蔗糖均为食品级,河南万邦实业有限公司;黄豆粉(食品级),曲靖市晨骏商贸有限公司;紫薯粉(食品级),广州福正东海食品有限公司。

试剂:蛋白胨、酵母浸粉均为分析级,安琪酵母股份有限公司;福林酚(分析级),上海源叶生物

收稿日期: 2022-10-19

基金项目: 湖北省现代农业产业技术体系专项(HBHZDZB-2021-023)

第一作者: 刘倩,女,硕士生

通信作者: 刘莹 E-mail: yingliu@mail.hzau.edu.cn

科技有限公司;琼脂(分析级),广州赛国生物科技有限公司;没食子酸(分析级),阿拉丁生化科技股份有限公司; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖、无水碳酸钠、甲醇均为分析级,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

1550 酶标仪,Thermo scientific 公司;SW-CJ-2FDG 超净工作台,莱特(南通)有限公司;HZQ-F160 全温振荡摇床,苏州培英实验设备有限公司;LGJ-10 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 羊肚菌种子液的制备及处理 CYM 培养基:蛋白胨 2 g、酵母浸粉 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 KH_2PO_4 0.6 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g、葡萄糖 22 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L,pH 自然,121 °C 高温、高压灭菌 30 min。

种子培养基:蛋白胨 2 g、酵母浸粉 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 KH_2PO_4 0.6 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g、葡萄糖 22 g、蒸馏水 1 L,121 °C 高温、高压灭菌 30 min。

发酵培养基:食品级葡萄糖 2 g,大豆蛋白 1 g, KH_2PO_4 0.5 g,加蒸馏水至 100 mL,在高压灭菌锅内 121 °C,30 min 灭菌后备用。

将保存于试管中的 M4M26 梯棱羊肚菌(以下简称羊肚菌)接种至 CYM 平板上,待菌丝体生长 5 d 后,取直径 1 cm 的菌块 24 个,接入种子培养基中,置于全温振荡培养箱中培养 4 d,设置转速为 120 r/min,温度 25 °C。摇瓶振荡 4 d 后取出,在超净工作台上将种子培养基和菌球进行匀浆,制成羊肚菌种子液,按 10%接种量接入发酵培养基中进行发酵。

将发酵完成的羊肚菌发酵液匀浆后,在 80 °C 水浴锅中加热 30 min,使菌丝体中的活性物质浸出后,离心、过滤得到澄清的羊肚菌发酵液,浓缩后冻干获得粉末状样品,用于后续测定。

1.3.2 单因素实验

1) 碳源单因素实验 以土豆淀粉、紫薯粉、蔗糖代替 1.3.1 节中发酵培养基中的葡萄糖,其它添加物质与 1.3.1 节发酵培养基保持一致。试验条件:温度 25 °C、摇床转速 120 r/min、发酵 7 d,以多

酚含量为指标确定最佳碳源。对最佳碳源的添加量进行单因素实验。

2) 氮源单因素实验 在发酵培养基基础上选用黄豆粉、乳清粉、蛋黄粉代替大豆蛋白作为氮源,其它成分保持不变。试验条件与 1.3.2(1)节一致。之后对最佳氮源添加量进行单因素实验。

3) 无机盐单因素实验 赵航轲等^[13]的研究表明,在选取的 8 种无机盐中,以 KH_2PO_4 为唯一无机盐时得到的菌丝体最多。本试验直接选用 KH_2PO_4 作为无机盐供给,对其添加量进行单因素实验,试验条件与 1.3.2(1)节一致,以多酚含量为指标确定最优添加量。

4) 响应面分析法优化发酵培养基 基于单因素实验筛选的各种添加物,用 Design-Expert 12 软件,以发酵后的多酚含量作为优化指标进行条件优化。响应面因素水平见表 1。

表 1 响应面因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	土豆淀粉 添加量/%	大豆蛋白 添加量/%	KH_2PO_4 添加量/%
-1	0.25	2	0.2
0	0.5	4	0.25
1	0.75	6	0.5

1.3.3 多酚含量的测定方法及表示 采用 Folin-Ciocalteus 法测定多酚含量^[14],在 10 mL 离心管中加入 1 mL 待测样品,5 mL 蒸馏水,3 mL 的 7.5% 碳酸钠溶和 1 mL 福林酚试剂,在室温避光处反应 2 h,取 200 μL 加入 96 孔板中,用酶标仪于 765 nm 波长下测定吸光度,以没食子酸(0,5,10,15,25,30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为对照品绘制标准曲线。

本节试验中待测样品为羊肚菌菌丝体发酵液经冷冻干燥后得到的固体粉末,用蒸馏水配制成 0.50 mg/mL 的待测溶液。发酵液中多酚含量计算公式如下:

$$X = \frac{\rho}{c} \times \frac{m}{V} \quad (1)$$

式中, X ——发酵液中的多酚含量(mg/mL); ρ ——以样品反应体系吸光度及没食子酸标准曲线计算得出(mg/mL); c ——待测样品的溶液质量

浓度,0.50 mg/mL; m ——发酵液冻干粉的质量(mg); V ——发酵液体积(mL)。

1.3.4 抗氧化活性的测定方法

1) DPPH 自由基清除率的测定方法 参考 Zeng 等^[15]的方法并加以调整。用甲醇溶解 DPPH 配成 0.2 mmol/L 的溶液(使用时配制),避光放置。以酶标孔为反应容器,取一定浓度的样液 100 μ L 于酶标孔中,加等量的 DPPH 溶液,充分混合,室温下避光静置反应 10 min,在 517 nm 波长处测定吸光值 A_i 。用甲醇代替 DPPH 溶液测得吸光值为 A_j ,用蒸馏水代替样品测得吸光值为 A_0 。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100 \quad (2)$$

2) ABTS 自由基清除率测定方法

① ABTS 溶液的配制 配制 7.0 mmol/L ABTS 溶液和 140.0 mmol/L $K_2S_2O_8$ 溶液,分别取 5 mL 和 88 μ L 完全混匀,避光保存 14 h。试验前用蒸馏水稀释,734 nm 波长处的吸光度在 0.698~0.702 之间即可使用。

② 试验方法 以酶标孔为反应容器,吸取一定浓度的样液 20 μ L 于酶标孔中,加入 180 μ L ABTS 自由基溶液,室温避光反应 10 min,在 734 nm 波长处测定其吸光度值 A_i 。用蒸馏水代替 ABTS 自由基溶液测得吸光度值 A_j ,用蒸馏水代替样品测得吸光度值 A_0 。清除率计算公式同 1.3.4 节。

3) 羟自由基清除率的测定方法 参考 Nicholas 等^[16]的方法并加以调整。以酶标孔为反应容器,吸取一定浓度的样液 50 μ L 于酶标孔中,依次加入 $FeSO_4$ 溶液(9.0 mmol/L)和水杨酸乙醇溶

液(9.0 mmol/L)50 μ L,完全混匀后加入 50 μ L H_2O_2 (8.8 mmol/L)溶液,37 $^{\circ}C$ 反应 60 min。反应结束后在 510 nm 波长处测定其吸光度值 A_i 。用蒸馏水代替 H_2O_2 溶液测得吸光度值 A_j ,用蒸馏水代替样品测得吸光度值 A_0 。清除率计算公式同 1.3.4 节。

4) FRAP 铁离子还原能力的测定

① FRAP 工作液的配制 将 0.3 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=3.6),0.01 mol/L TPTZ 溶液和 0.02 mol/L $FeCl_3$ 溶液分别取 10,1,1 mL,混合均匀,开始使用时配制。其中 TPTZ 用 0.04 mol/L 盐酸溶解,两者充分混合。

② 制作标准曲线 以酶标孔为反应容器,在其中加入 10 μ L 不同浓度的 $FeSO_4$ 溶液,再加入 190 μ L FRAP 工作液,在 37 $^{\circ}C$ 反应 15 min。结束后在 593 nm 波长处测吸光度值 A_i 。用蒸馏水代替 FRAP 工作液测得吸光度值 A_j ,用蒸馏水代替样品测得吸光度值 A_0 。以 $A_i - A_0 - A_j$ 值为纵坐标,对应的 $FeSO_4$ 溶液浓度为横坐标作图。

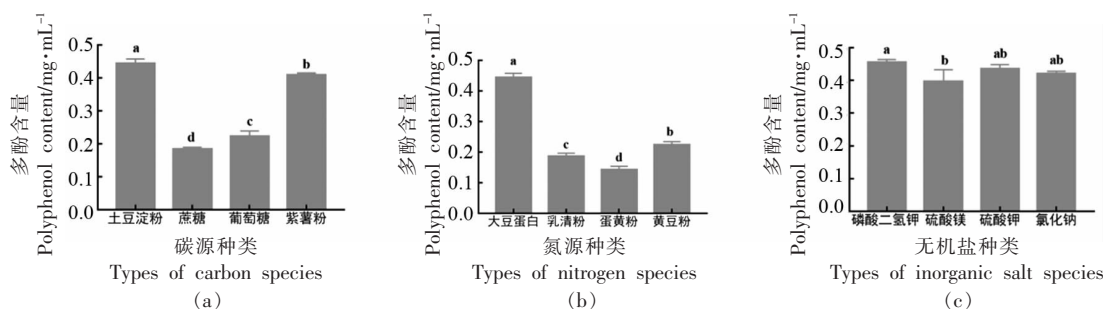
③ 测定 FRAP 值 按照制作标准曲线的方法,将 $FeSO_4$ 溶液换成发酵液样品,其余操作一致,得到 $A_i - A_0 - A_j$ 值,将其带入标准曲线中,确定相应的 $FeSO_4$ 浓度,即 FRAP 值。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 培养基碳源和氮源种类对多酚含量的影响

从图 1 可看出,不同碳源和氮源对发酵液中多酚含量的影响差异显著,其中最佳碳源为土豆淀粉,最佳氮源为大豆蛋白。因此,选取这两种物质



注:图中不同小写字母表示不同添加量之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

图 1 不同碳源(a)、氮源(b)、无机盐(c)种类对发酵液中多酚含量的影响

Fig.1 Effects of different carbon(a), nitrogen(b) and inorganic salt (c) species on polyphenol content in fermentation broth

作为发酵培养基的碳源和氮源。

据王莹^[17]的研究结果,淀粉作为碳源时所得菌丝体生物量最少,仅为葡萄糖的2/3;刘华晶等^[18]的研究也证明了这一点。而本试验以土豆淀粉为碳源时,得到的发酵液中多酚含量最高。推测是菌丝发酵过程中,如果菌丝体的生物量超过一定限度,就会开始利用多酚,从而使发酵产物中多酚含量减少^[19]。

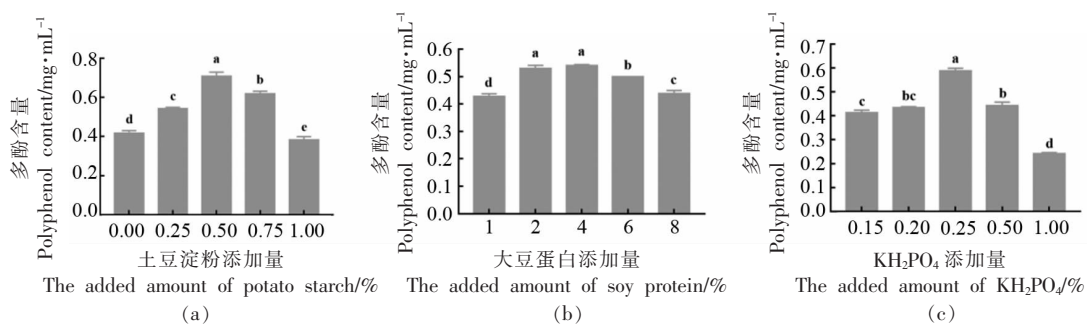
李文静^[20]对羊肚菌深层发酵培养基的研究表明,羊肚菌在无机氮源中的生物量不如在有机氮源中的生物量高。赵航轲等^[13]研究表明将有机氮源黄豆粉添加至发酵培养基时,得到的菌丝体生物量最多。而本试验中,用大豆蛋白作为氮源时,发酵液中多酚含量最高,分析大豆蛋白和黄豆粉的成分,大豆蛋白中蛋白质含量可达90%以上,分解后有利于菌丝体合成蛋白质和核酸^[21-22],可以供给菌丝体生长足够的营养,有利于菌丝体发酵产物的生成。

2.1.2 各物质添加量对多酚含量的影响 由图2a可知,随着土豆淀粉添加量的增加,发酵液中的多酚含量呈先增加后降低的趋势,且土豆淀粉添加量为0.5%时,发酵液中多酚含量达到最大值。土豆淀粉添加量在0~0.25%时,发酵液中多酚含量增长缓慢,而添加量0.25%~0.5%时迅速增加,说明当土豆淀粉添加量小于0.25%时,土豆淀粉作为碳源,不足以提供羊肚菌菌丝体生长发育所需营养,不利于发酵产物的积累。随着土豆淀粉添加量的增大,羊肚菌菌丝体生长发育所需的营养物质逐渐充足,使其发酵产物的多酚含量达到最大

值。然而,当土豆淀粉添加量继续增大时,菌丝体的生长发育迅速增长,当土豆淀粉供给的营养不足以支撑菌丝体生长发育所需时,便开始消耗发酵液中的多酚,使其含量大幅度下降。最终选择土豆淀粉添加量为0.5%。

由图2b可知,随着大豆蛋白添加量的增加,发酵液中的多酚含量呈现先增加后降低的趋势,当大豆蛋白添加量为4%时,发酵液中多酚含量达到最大值。大豆蛋白添加量在1%~4%时,发酵液中多酚含量不断增大,添加量4%~8%时逐渐降低,说明其添加量小于4%时,随着供给羊肚菌菌丝体生长发育的营养的增加,其发酵产物多酚含量达到最大值。而在发酵培养基水溶液保持100 mL不变时,大豆蛋白添加量越多,发酵培养基溶液的黏稠度越大,在同样摇床转速下,培养基的振荡幅度相对减小,不利于气体的流动,溶解氧减少^[23-24],使菌丝体生长缓慢,不利于发酵产物的生成,因此发酵液中多酚含量开始下降。最终选择大豆蛋白添加量为4%。

由图2c可知,增大 KH_2PO_4 的添加量,发酵液中的多酚含量先增多后减少,当 KH_2PO_4 添加量为0.25%时,多酚含量达到最大值。 KH_2PO_4 添加量在0~0.25%时,多酚含量不断增加,这是因为无机盐在液体发酵过程中起到调节渗透压和氧化-还原电位的作用,添加少量的无机盐可促进菌丝体和发酵产物的生成^[25-26]。然而继续增加无机盐浓度,可能使培养基浓度过高,从而抑制菌丝体的生长^[18]。最终选择 KH_2PO_4 的添加量为0.25%。



注:图中不同小写字母表示不同添加量之间存在显著性差异, $P<0.05$ 。

图2 培养基各物质添加量和发酵液中多酚含量的关系

Fig.2 The relationship between the added amount of each substance in the medium and the content of polyphenols

2.2 响应面法分析优化发酵培养基提高发酵液中多酚含量

响应面试验设计是通过对上述单因素实验中

的 3 个因素:土豆淀粉添加量、大豆蛋白添加量和磷酸二氢钾添加量,进行排列组合得出,见表 2。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A(土豆淀粉/%)	B(大豆蛋白/%)	C(KH ₂ PO ₄ /%)	多酚含量/ mg·mL ⁻¹	试验号	A(土豆淀粉/%)	B(大豆蛋白/%)	C(KH ₂ PO ₄ /%)	多酚含量/ mg·mL ⁻¹
1	0.25	2	0.25	0.47	10	0.5	4	0.25	1.13
2	0.25	6	0.25	0.59	11	0.25	4	0.5	0.48
3	0.5	4	0.25	1.11	12	0.5	4	0.25	1.05
4	0.75	4	0.2	0.64	13	0.75	6	0.25	0.54
5	0.5	4	0.25	1.08	14	0.5	2	0.5	0.39
6	0.5	4	0.25	0.69	15	0.5	2	0.2	0.76
7	0.75	4	0.5	0.49	16	0.5	6	0.2	0.66
8	0.75	2	0.25	0.69	17	0.25	4	0.2	0.73
9	0.5	6	0.5	0.52					

2.2.1 模型建立和显著性分析结果 使用软件对表 2 进行拟合,结果见表 3。回归方程为:

$$\text{多酚含量}=1.04+0.0124A+0.0170B-0.1137C-$$

$$0.0675AB+0.0034AC+0.0511BC-0.2185A^2-0.2210B^2-0.2388C^2,$$

回归模型的方差分析见表 3。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.7946	9	0.0883	4.2300	0.0351	显著
A	0.0010	1	0.0010	0.0498	0.8298	
B	0.0020	1	0.0020	0.0943	0.7677	
C	0.1035	1	0.1035	4.9600	0.0611	
AB	0.0182	1	0.0182	0.8742	0.3809	
AC	0.0001	1	0.0001	0.0027	0.9598	
BC	0.0128	1	0.0128	0.6132	0.4593	
A ²	0.2010	1	0.2010	9.6400	0.0172	
B ²	0.2056	1	0.2056	9.8600	0.0164	
C ²	0.0601	1	0.0601	2.8800	0.1335	
残差	0.1459	7	0.0208			
失拟项	0.0127	3	0.0042	0.1266	0.9395	不显著
纯误差	0.1333	4	0.0333			
总误差	0.9406	16				

由表 3 可看出,模型的 $P=0.0351<0.05$ (显著),失拟项检验的 $P=0.9395$ (不显著), $R^2=0.8448$,其中 R^2 用于反映回归方程对响应值的拟合效果^[27],意味着此次模拟可以解释 84.48%的情况,表明模型充分拟合试验数据^[28]。该方程是发酵液中

多酚含量与培养基各物质添加量适合的数学模型,可利用其确定提高发酵液中多酚含量的培养基物质添加量。在试验范围,不同因素对发酵液中多酚含量的影响排序为 $C>B>A$,即 $\text{KH}_2\text{PO}_4>$ 大豆蛋白>土豆淀粉添加量。

2.2.2 响应面结果分析 响应面的3D图形是响应值对各因素所构成的三维空间曲面图,可看出各因素水平的最优解及其之间的影响^[29]。曲面越陡,表明该因素对响应值的影响越大^[30]。从图3可看出, KH_2PO_4 添加量的响应面坡面比较陡峭,说

明其对多酚含量影响较大,而土豆淀粉和大豆蛋白的响应面坡面较平缓,说明其对发酵液中多酚含量的影响不是很大,这与表3的回归分析结果一致。

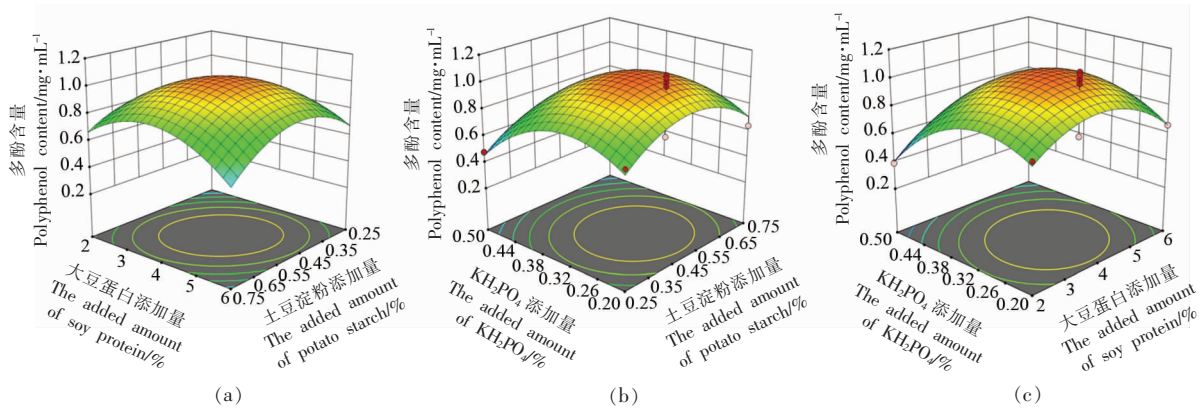
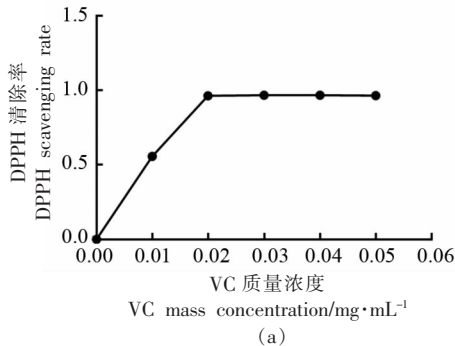


图3 两因素交互作用对多酚含量的响应面

Fig.3 Response surface of two-factor interaction on polyphenol content

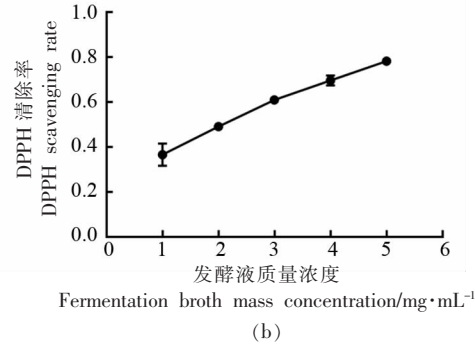
2.2.3 最佳工艺验证 通过软件分析得到最优结果为土豆淀粉0.5%、大豆蛋白4%、磷酸二氢钾0.3%,在此条件下由公式计算出的多酚含量理论值为1.06 mg/mL。以最优结果为基础,进行3组验证试验,3组发酵液中多酚平均含量为1.02 mg/mL,测定结果与理论值的相对误差为3.3%,表明试验结果合理、可靠。

2.3 抗氧化活性分析



(a)

2.3.1 DPPH 自由基清除能力 由图4可看出,在1~5 mg/mL范围内,发酵液对DPPH自由基的清除效果与浓度变化一致,基本呈直线,表明发酵液对DPPH自由基有很好的清除作用。根据拟合得到的线性方程计算发酵液的 $\text{IC}_{50}=1.83$ mg/mL,与李文静^[20]得到的羊肚菌发酵液DPPH自由基清除率的 IC_{50} (约6 mg/mL)相比,本样品的DPPH自由基清除效果更好。



(b)

图4 VC和发酵液样品对DPPH自由基的清除作用

Fig.4 The scavenging effect of VC and fermentation broth samples on DPPH

2.3.2 ABTS 自由基清除能力 由图5可以看出,随着发酵液浓度的增大,对ABTS自由基的清除效果变好,当质量浓度大于10 mg/mL时,清除效

果没有明显变化,维持在60%左右,达到清除极限。根据拟合曲线计算得到的 $\text{IC}_{50}=4.81$ mg/mL,相比于猴头菌发酵液^[31]的 $\text{IC}_{50}=68$ mg/mL,羊肚菌发

酵液的 ABTS 自由基清除率效果优于此猴头菌发酵液。

2.3.3 羟自由基清除能力 从图 6 可以看出,VC 和发酵液质量浓度与其对羟自由基清除能力的变化一致。计算 VC 的 $IC_{50}=0.1 \text{ mg/mL}$, 而发酵液质

量浓度为 3 mg/mL , 对羟自由基的清除能力达 80%左右,且不再有明显升高,达到清除极限。计算其 $IC_{50}=0.78 \text{ mg/mL}$,是维生素 C 的 70%左右,表明羊肚菌发酵液具有较强的羟自由基清除效果。

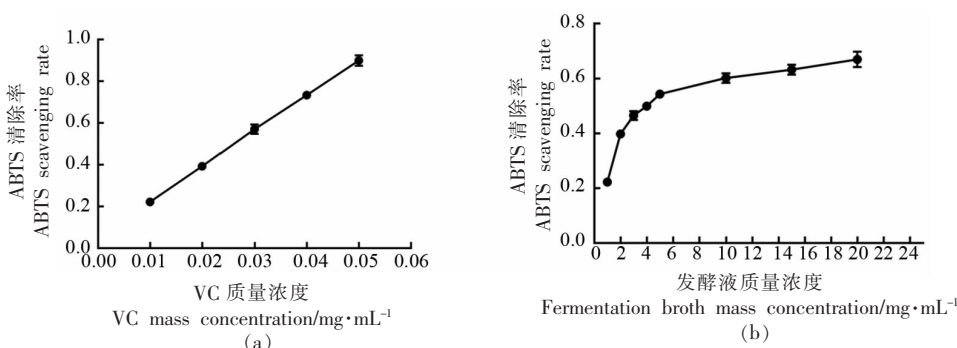


图 5 VC 和发酵液样品对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.5 The scavenging effect of VC and fermentation broth samples on ABTS

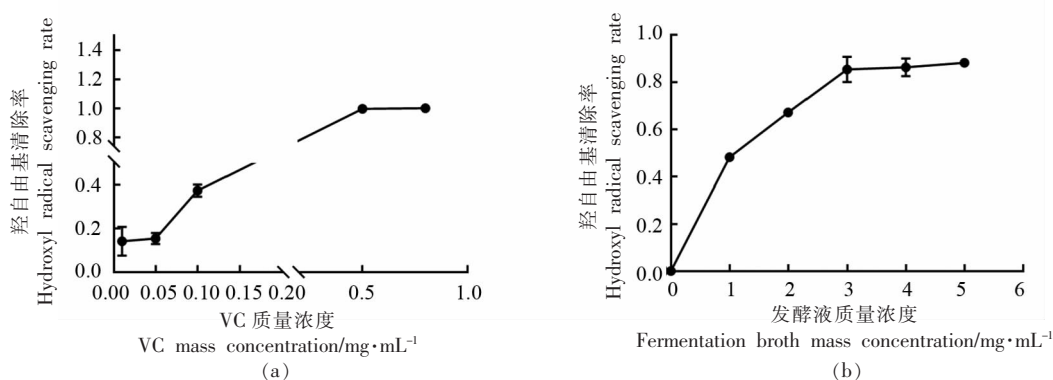


图 6 VC 和发酵液样品对羟自由基的清除能力

Fig.6 The scavenging effect of VC and fermentation broth samples on $\cdot\text{OH}$

2.3.4 FRAP 铁离子还原能力分析 由图 7 可以看出,随着发酵液浓度的升高,对铁离子的还原能力也升高,发酵液质量浓度达 15 mg/mL 时,FRAP

值基本保持在 0.8 左右,到达饱和。相比李文静^[20]的羊肚菌发酵液质量浓度 25 mg/mL 时的 FRAP 值 0.75,本试验得到的发酵液效果更好。

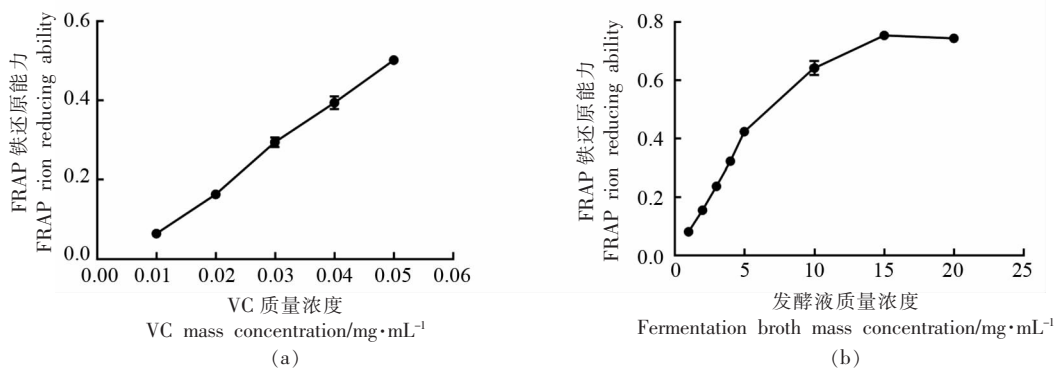


图 7 VC 和发酵液样品对铁离子还原能力的测定

Fig.7 The scavenging effect of VC and fermentation broth samples on FRAP

3 结论

本研究通过改变发酵培养基中的添加物质及其添加量来调控羊肚菌发酵液中的多酚含量,是从发酵源头进行调控,便于工厂生产,且发酵原料来源广泛、价格便宜,无毒性,得到的多酚更加安全。在单因素实验的基础上,通过响应面法分析得出培养基各物质的最佳添加量,其中土豆淀粉0.5%、大豆蛋白4%、磷酸二氢钾0.3%。对最佳条件下得到的羊肚菌发酵液进行活性测定,发现其具有较好的抗氧化活性,符合多酚具有较好抗氧化活性的特征。其多酚结构还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 黄世群, 秦琳, 仲伶俐, 等. 野生黑虎掌菌与羊肚菌营养成分测定及分析比较[J]. 山西农业科学, 2019, 47(12): 2098-2102.
HUANG S Q, QIN L, ZHONG L L, et al. Determination, analysis and comparison of nutrient components of wild *Sagittarius* and *Morchella*[J]. Shanxi Agricultural Science, 2019, 47(12): 2098-2102.
- [2] 何畅, 徐丽婧, 常明昌, 等. 梯棱羊肚菌子实体多糖提取优化及结构初探[J]. 食用菌学报, 2021, 28(2): 77-88.
HE C, XU L J, CHANG M C, et al. Extraction optimization and structure preliminary study of polysaccharide from *Morchella serrata* fruiting body [J]. Journal of Edible Fungi, 2021, 28(2): 77-88.
- [3] 张建军, 贾乐, 李广贤, 等. 羊肚菌生物学特性及生物活性研究进展[J]. 山东农业科学, 2021, 53(10): 149-156.
ZHANG J J, JIA L, LI G X, et al. Research progress on biological characteristics and biological activity of *Morchella*[J]. Shandong Agricultural Science, 2021, 53(10): 149-156.
- [4] 廖霞, 李苇舟, 郑少杰, 等. 黑脉羊肚菌多酚分级制备及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 26-31.
LIAO X, LI W Z, ZHENG S J, et al. Fractionated preparation of polyphenols from *Morchella nigra* and its antioxidant activity[J]. Food Science, 2017, 38(23): 26-31.
- [5] 康宗利, 徐萍, 杨玉红. 羊肚菌发酵菌丝体酚类物质的提取及抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2014, 39(7): 219-224.
KANG Z L, XU P, YANG Y H, et al. Extraction and antioxidant activity of *Morchella* fermented mycelium phenolic substances[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(7): 219-224.
- [6] 李红, 张敏, 李超, 等. 羊肚菌液体培养工艺研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(2): 227-233.
LI H, ZHANG M, LI C, et al. Research on liquid culture technology of *Morchella*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2018, 49(2): 227-233.
- [7] 张楠, 叶晶晶, 廖春华, 等. 羊肚菌菌柄营养成分的分析与评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 335-342.
ZHANG N, YE J J, LIAO C H, et al. Analysis and evaluation of nutrient components of *Morchella stipe* [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(17): 335-342.
- [8] 赵瑞华, 贺晓龙, 田茜. 羊肚菌菌丝体液体发酵及其应用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41: 190-195.
ZHAO R H, HE X L, TIAN Q. Research progress on liquid fermentation of *Morchella* mycelium and its application[J]. Food Research and Development, 2020, 41: 190-195.
- [9] 黄怡雯. 榆黄菇提取液在化妆品中的研究与应用[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2018.
HUANG Y W. Research and application of Yuhuang mushroom extract in cosmetics[D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Sciences, 2018.
- [10] MENG F Y, LIU X N, JIA L, et al. Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities *in vitro*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(3): 700-704.
- [11] LI S H, SANGA Y, ZHU D, et al. Optimization of fermentation conditions for crude polysaccharides by *Morchella esculenta* using soybean curd residue [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 50(6): 666-672.
- [12] 金红, 杨孝丽, 任灿, 等. 食用菌深层发酵物中生物活性物质含量的比较[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3): 93-96.
JIN H, YANG X L, REN C, et al. Comparison of bioactive substances in submerged fermentation of edible mushrooms[J]. Food Research and Development, 2015, 36(3): 93-96.

- [13] 赵航轲, 陈杭, 马薇, 等. 响应面法优化羊肚菌液体发酵营养条件[J]. 食用菌, 2021, 43(2): 11-15.
ZHANG H K, CHEN H, MA W, et al. Optimization of nutritional conditions for liquid fermentation of *Morchella* by response surface methodology [J]. Edible Fungi, 2021, 43(2): 11-15.
- [14] 马双双. 莲子壳多酚的提取、分离纯化、结构鉴定及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
MA S S. Extraction, separation and purification, structure identification and antioxidant activity of polyphenols from lotus seed husk[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [15] ZENG W C, ZHANG Z, GAO H. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 694-700.
- [16] NICHOLAS S, QUINTON J C. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [17] 王莹. 羊肚菌深层发酵及生长动力学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006.
WANG Y. Study on submerged fermentation and growth kinetics of *Morchella*[D]. Changchun: Jilin University, 2006.
- [18] 刘华晶, 赵妍. 羊肚菌液体培养基最适碳源氮源优化研究[J]. 南方农业, 2019, 13 (26): 136-137, 145.
LIU H J, ZHAO Y. Optimization of optimal carbon and nitrogen sources for morel liquid medium [J]. Southern Agriculture, 2019, 13(26): 136-137, 145.
- [19] 刘喜文, 王金胜, 田明, 等. 激素在猴头菌丝体碳源利用过程中的作用[J]. 山西农业大学学报, 1994 (3): 269-271, 334.
LIU X H, WANG J S, TIAN M, et al. The role of hormones in the process of carbon source utilization in *Hericium erinaceus* mycelium[J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 1994(3): 269-271, 334.
- [20] 李文静. 羊肚菌深层发酵培养及抗氧化活性的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
LI W J. Preliminary study on submerged fermentation culture and antioxidant activity of *Morchella*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [21] RUSLANA H, OLEKSANDRA K, DIANA S, et al. Biologically active properties of plant extracts in cosmetic emulsions [J]. Microchem J, 2020, 154 (C): 104543.
- [22] SUN J Z. Fifteen fungicolous ascomycetes on edible and medicinal mushrooms in China and Thailand[J]. Asian Journal of Mycology, 2019, 2(1): 129-169.
- [23] LIU Q Z, MA H S, ZHANG Y, et al. Artificial cultivation of true morels: Current state, issues and perspectives[J]. Crit Rev Biotechnol, 2018, 38(2): 259-271.
- [24] 邢增涛, 孙芳芳, 刘景圣. 尖顶羊肚菌液体培养条件的研究[J]. 食用菌报, 2004, 11(4): 38-43.
XING Z T, SUN F F, LIU J S. Research on the liquid culture conditions of *Morchella spiky*[J]. Journal of Edible Fungi, 2004, 11(4): 38-43.
- [25] 于海洋, 王延锋, 史磊, 等. 黑木耳液体深层发酵培养基的筛选[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(8): 46-48.
YU H Y, WANG Y F, SHI L, et al. Screening of black fungus liquid submerged fermentation medium [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(8): 46-48.
- [26] 豆艳. 青海尖顶羊肚菌液体发酵培养工艺研究[D]. 青海: 青海师范大学, 2018.
DOU Y. Research on liquid fermentation culture process of *Morchella conica* in Qinghai[D]. Qinghai: Qinghai Normal University, 2018.
- [27] 张爱爱, 黄文, 王益, 等. 超声辅助酶法提取香菇柄滋味物质工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41 (12): 133-138, 149.
ZHANG A A, HUANG W, WANG Y, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of flavor substances from mushroom stems[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41 (12): 133-138, 149.
- [28] BEZERRA M A, SANTTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008, 76(5): 965-977.
- [29] 侯学敏, 李林霞, 张直峰, 等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 124-128.
HOU X M, LI L X, ZHANG Z F, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from mint leaves by response surface methodology[J]. Food Science, 2013, 34(6): 124-128.
- [30] 姚秋萍, 姬青松. 响应面优化超声辅助提取油菜花

粉多糖[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(4): 62–65.

YAO Q P, JI Q S. Response surface optimization of ultrasonic-assisted extraction of rape pollen polysaccharides[J]. Cereals, Oils and Food Science and Technology, 2015, 23(4): 62–65.

[31] 万宁威, 雷帮星, 何劲, 等. 猴头菌液体发酵产多糖、核苷、萜类工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工

业科技, 2022, 43(2): 233–240.

WANG N W, LEI B X, HE J, et al. Process optimization and antioxidant activity of polysaccharides, nucleosides and terpenoids produced by *Hericium erinaceus* liquid fermentation[J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(2): 233–240.

Optimization of Liquid Fermentation Medium of *Morchella* and Studies on Antioxidant Activity of Fermentation Products

Liu Qian¹, Li Zheng¹, Ou Jiaqi¹, Huang Wen^{1,2}, Wang Yi¹, Liu Ying^{1,2*}

¹College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

²Hubei Key Laboratory of Fruit and Vegetable Processing and Quality Control, Wuhan 430070)

Abstract In order to improve the content of polyphenols in the liquid fermentation product of *Morchella esculenta* and investigate the antioxidant activity of the fermentation broth, the fermentation medium with the highest polyphenol content in *M. esculenta* fermentation broth was obtained by optimizing the composition and addition of the liquid fermentation medium, using single-factor and response surface experiments: 0.5% potato starch, 4.0% soy protein, and 0.3% potassium phosphate. Under these conditions, the theoretical polyphenol content obtained by software analysis is 1.02 mg/mL. After that, the antioxidant activity of the fermentation broth was evaluated by in-vitro antioxidant assay, and the IC₅₀ value of the fermentation broth for DPPH scavenging rate was 1.83 mg/mL, ABTS scavenging rate was 4.81 mg/mL, hydroxyl radical scavenging rate was 0.78 mg/mL, and the FRAP value for the reduction of Fe³⁺ was 0.75 mmol/L at the fermentation broth lyophilized powder concentration of 15 mg/mL. The fermentation broth had a strong free radical scavenging effect as well as reduction ability. The results of the study increase the possibility for the development of liquid fermentation products of *M. esculenta*.

Keywords *Morchella esculenta*; liquid fermentation; polyphenols; response surface design; antioxidant activity