

周林宗,张 伦,杨申明,等. 刺槐花总黄酮超声辅助提取工艺优化及抗氧化性评价[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):146–150.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.13.042

刺槐花总黄酮超声辅助提取工艺优化及抗氧化性评价

周林宗,张 伦,杨申明,王振吉,罗亚仙

(楚雄师范学院化学与生命科学学院,云南楚雄 675000)

摘要:以刺槐花为材料,优化超声波辅助提取总黄酮的工艺,并测定其总黄酮的抗氧化性。在单因素试验的基础上,以总黄酮提取率为指标,通过正交试验优化其总黄酮的提取工艺参数,并通过刺槐花总黄酮对 1,1-苯基-2-苦肟基自由基(DPPH·)、羟基自由基(·OH)、超氧阴离子自由基(O_2^- ·)的清除来评价其抗氧化能力。结果表明,最佳提取工艺参数为:超声温度 45℃、超声时间 70 min、料液比 1 g:30 mL、乙醇体积分数 70%,在该条件下总黄酮平均提取率为 28.69%,RSD 值为 0.72%;总黄酮质量浓度为 0.47 mg/mL 时,对 DPPH·、·OH、 O_2^- ·的清除率分别达到 88.04%、34.41%、59.07%,表明刺槐花总黄酮具有较强的抗氧化性。

关键词:刺槐花;超声辅助提取;总黄酮;抗氧化性

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2017)13–0146–04

刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)别称洋槐,为豆科蝶形花亚科刺槐属多年生落叶乔木或灌木^[1]。刺槐产花量较大,花中含有丰富的蛋白质、氨基酸、微量元素、黄酮类化合物和挥发油等,花可炒食作野菜食用,也可入药使用,具有较高的食用价值和药用价值^[2]。在民间,刺槐花用于治疗大肠下血、咯血、吐血、妇女红崩等病症。我国刺槐花资源丰富,但其利用率低,除少量被食用和药用外,大部分刺槐花落地荒弃。因此,从刺槐花中提取有效成分并对其进行开发利用具有重要意义。

目前,对刺槐花的研究主要集中在成分分析^[2–4]、药理作用^[5–6]、食品加工^[7–9]等方面。近年来,对刺槐花中黄酮类化合物的研究正引起有关学者的高度关注。王岚等采用高效液相色谱-质谱联用技术分析从刺槐花中鉴定出 11 种黄酮苷^[10],李艳艳等采用乙醇回流法对刺槐花总黄酮的提取工艺进行了研究^[11],向昌国等采用响应面法对刺槐花黄酮类化合物的微波提取工艺进行了研究^[12],但采用超声波辅助提取刺槐花总黄酮的工艺优化及抗氧化性研究鲜见报道。本试验以刺槐花为材料,采用超声辅助从刺槐花中提取总黄酮,通过正交试验对提取工艺条件进行优化。同时,以维生素 C 为对照,并对所提取的总黄酮从清除 1,1-苯基-2-苦肟基自由基(DPPH·)、羟基自由基(·OH)、超氧阴离子自由基(O_2^- ·)的能力 3 个方面评价其抗氧化性,旨在为更好地开发和利用刺槐花中黄酮类物质提供科学依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺槐花采自楚雄师范学院校园内,经鉴定为豆科蝶形花亚科刺槐属植物;芸香苷标准品(HPLC > 98%)由中国药品生物制品检定所生产,1,1-苯基-2-苦肟基自由基由上海蓝季科技发展有限公司生产,其他所用化学试剂均为分析纯,由天津市风船化学试剂厂生产。

1.2 仪器与设备

α -1502 紫外可见分光光度计,上海谱元仪器有限公司;SHZ-III A 型循环水真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;SK8210HP 型超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;HWS-26 型电热恒温水浴锅,江苏省金坛市大地自动化仪器厂;CP224C 型电子天平,奥豪斯仪器上海有限公司;DG-111 型电热干燥箱,威瑞科教仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 刺槐花总黄酮的提取 将新鲜刺槐花洗净风干后置于 55℃干燥箱中烘干,粉碎后过 60 目得刺槐花干粉,备用。准确称取 1.0 g 刺槐花干粉,加入一定体积分数的乙醇,设定一定超声温度,水浴一定时间,其间进行超声波(功率 500 W)辅助提取,提取完毕后,将提取液减压抽滤,收集滤液,所得滤渣再次用上述方法提取,合并 2 次滤液定容至 50 mL 容量瓶中,得供试品溶液。

1.3.2 总黄酮含量的测定

1.3.2.1 标准曲线的制备 参考文献[13]的方法,稍作修改。精确吸取 0、1、2、3、4、5 mL 质量浓度为 0.10 mg/mL 芸香苷标准溶液,分别置于 25 mL 比色管中,各加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,摇匀;放置 5 min 后,各加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀;放置 5 min 后,再各加入 4% 氢氧化钠溶液 5.0 mL,最后用体积分数为 70% 的乙醇溶液稀释至 25 mL,摇匀,放置 10 min。以蒸馏水为空白对照,在波长 510 nm 处分别测其吸光度。以吸光度为纵坐标、芸香苷质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程,为 $D = 1.073C + 0.5735$ 。

收稿日期:2017–01–06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300370);云南省高校科技创新团队支持计划(编号:IRTSTYN);云南省应用基础研究项目(编号:2014FD052);楚雄师范学院学术骨干项目(编号:13XJGG03);楚雄师范学院教改项目(编号:1510)。

作者简介:周林宗(1962—),男,云南楚雄人,副教授,从事天然产物化学研究及教学工作。E-mail:ysm@cxte.edu.cn。

通信作者:张 伦,博士,讲师,研究方向为天然产物化学。E-mail:cxzhanglun@cxte.edu.cn。

式中: D 为吸光度; C 为葡萄糖标准溶液浓度,mg/mL;相关系数 $r^2=0.999\ 77$ 。

1.3.2.2 总黄酮提取率的计算 准确吸取 2.0 mL 供试品溶液于 25 mL 的比色管中,按“1.3.2.1”节标准曲线的制备操作方法,在波长 510 nm 处测定吸光度,平行测定 3 次,结果取平均值。刺槐花总黄酮的提取率计算公式为:

$$\text{总黄酮提取率} = \frac{C \times N \times V \times 0.001}{m} \times 100\%。$$

式中: C 为所测溶液的吸光度值带入回归方程计算出的总黄酮类化合物的质量浓度,mg/mL; N 为稀释倍数; V 为提取液定容的体积,mL; m 为刺槐花粉末的质量,g。

1.3.3 单因素试验设计 考察超声温度、时间、液料比和乙醇体积分数等 4 个单因素的影响。(1)超声温度采用 40、45、50、55、60 ℃ 的条件下进行比较,超声时间 60 min,料液比 1 g : 30 mL,乙醇体积分数 70%;(2)超声时间采用 40、50、60、70、80 min 的条件下进行比较,超声温度 50 ℃,料液比 1 g : 30 mL,乙醇体积分数 70%;(3)料液比采用 1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40 (g : mL) 的条件下进行比较,超声温度 50 ℃,超声时间 60 min,乙醇体积分数 70%;(4)乙醇体积分数采用 50%、60%、70%、80%、90% 的条件下进行比较,超声温度 50 ℃,超声时间 60 min,料液比 1 g : 30 mL,从而确定乙醇体积分数的影响作用。

1.3.4 正交试验设计 根据单因素试验结果,选择超声温度、超声时间、料液比、乙醇体积分数进行 4 因素 3 水平做 $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取条件,因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

水平	试验因素			
	A:超声温度 (℃)	B:超声时间 (min)	C:料液比 (g : mL)	D:乙醇体积分数 (%)
1	45	50	1 : 25	60
2	50	60	1 : 30	70
3	55	70	1 : 35	80

1.3.5 刺槐花总黄酮抗氧化活性测定 将超声波辅助提取得到的刺槐花总黄酮溶液分别配制成 0.03、0.14、0.25、0.36、0.47 mg/mL 等 5 种不同质量浓度,研究其抗氧化性。

1.3.5.1 清除 DPPH · 能力测定 参照文献[14]的方法测定刺槐花总黄酮溶液对 DPPH · 的清除能力。向 2.5 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液中分别加 1 mL 不同质量浓度的刺槐花总黄酮溶液,混合反应 30 min,在波长 517 nm 处用分光光度计测吸光度,记为 D_i ;同时测 2.5 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液与 1.0 mL 无水乙醇混合液的吸光度(D_c),及 2.5 mL 无水乙醇与不同质量浓度的 1 mL 刺槐花总黄酮溶液混合液的吸光度(D_b)。以维生素 C 为阳性对照,刺槐花总黄酮对 DPPH · 清除率计算公式为:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (1 - \frac{D_i - D_b}{D_c}) \times 100\%。$$

1.3.5.2 清除 ·OH 能力测定 参照文献[15]的方法测定刺槐花总黄酮对 ·OH 的清除能力。取 1.0 mL 不同质量浓度的刺槐花总黄酮溶液置于 5 支比色管中,分别加入 9 mmol/L FeSO_4 溶液、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇溶液和 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液各 2.0 mL,最后加蒸馏水定容至

10 mL,在 37 ℃ 恒温水浴中反应 30 min 后,在波长 510 nm 处用分光光度计测吸光度。同时,以维生素 C 为阳性对照,刺槐花总黄酮对 ·OH 清除率,计算公式为:

$$\cdot \text{OH 清除率} = \frac{D_0 - (D_x - D_{x0})}{D_0} \times 100\%。$$

式中: D_0 为刺槐花总黄酮溶液的空白对照溶液的吸光度; D_x 为加过氧化氢刺槐花总黄酮溶液的吸光度; D_{x0} 为不加过氧化氢刺槐花总黄酮溶液的吸光度。

1.3.5.3 清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 能力测定 参照文献[13]的方法测定刺槐花总黄酮溶液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除能力。在 5 支 25 mL 比色管中加入不同质量浓度的刺槐花总黄酮溶液 1.0 mL,再依次加入 4.5 mL Tris - HCl 溶液(50 mmol/L, pH 值 = 8.2)、3.2 mL 超纯水,混匀后在 25 ℃ 水浴中恒温反应 20 min,取出后迅速加入 25 ℃ 水浴中预热好的 0.3 mL 邻苯三酚溶液(3 mmol/L),以 0.3 mL 盐酸(10 mmol/L)代替作参比,混匀后迅速在波长 325 nm 处每隔 30 s 测 1 次吸光度,直到 5 min 时停止。计算刺槐花总黄酮溶液的吸光度随时间的变化率,记为 F_x ;取 1 支 25 mL 比色管不加刺槐花总黄酮溶液,按上述加入试剂量后,按上述方法测定吸光度,计算空白液的吸光度随时间的变化率记为 F_0 。同时,以维生素 C 为阳性对照,刺槐花总黄酮对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率计算公式为:

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率} = \frac{F_0 - F_x}{F_x} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 超声温度对刺槐花总黄酮提取效果的影响

由图 1 - a 可知,在超声温度为 40 ~ 50 ℃ 范围内,随着超声温度的升高,总黄酮提取率增大,当超声温度升高到 50 ℃ 时,提取率达到最大,为 27.98%;之后随超声温度的继续升高,刺槐花总黄酮提取率呈下降趋势。这可能是随着超声温度的升高,总黄酮在乙醇溶液中的溶解度增加,同时由于温度升高,分子运动加快,扩散速率增加,促使提取速度加快^[16]。但超声提取温度过高,会破坏部分黄酮类化合物结构并增加其他非黄酮类物质溶出,影响黄酮类物质的活性和提取率。因此,确定适宜的超声温度在 50 ℃ 附近,选择 45、50、55 ℃ 等 3 个水平超声温度进行正交试验。

2.2 超声时间对刺槐花总黄酮提取效果的影响

由图 1 - b 可知,随着超声时间的延长,刺槐花总黄酮提取率逐步增大,当超声时间为 60 min 时,提取率达到最大,为 27.93%;之后再延长超声时间,刺槐花总黄酮提取率呈下降趋势。这说明刺槐花总黄酮的提取过程与超声时间密切相关,超声时间较短,提取不充分,超声时间过长又会造成刺槐花中非黄酮类物质的大量溶出,导致提取率下降。因此,确定适宜的超声时间在 60 min 附近,选取超声时间 50、60、70 min 等 3 个水平进行正交试验。

2.3 料液比对刺槐花总黄酮提取效果的影响

由图 1 - c 可知,随着溶剂用量的增加,刺槐花中总黄酮提取率增大,但随着溶剂用量的进一步增加,对提取率增加的效果逐步减小,同时提取成本进一步增大,当料液比为 1 g : 30 mL 时,提取率达到最大,为 27.48%;之后随着溶剂用量的进一步增大,刺槐花总黄酮提取率呈下降趋势。因此,确

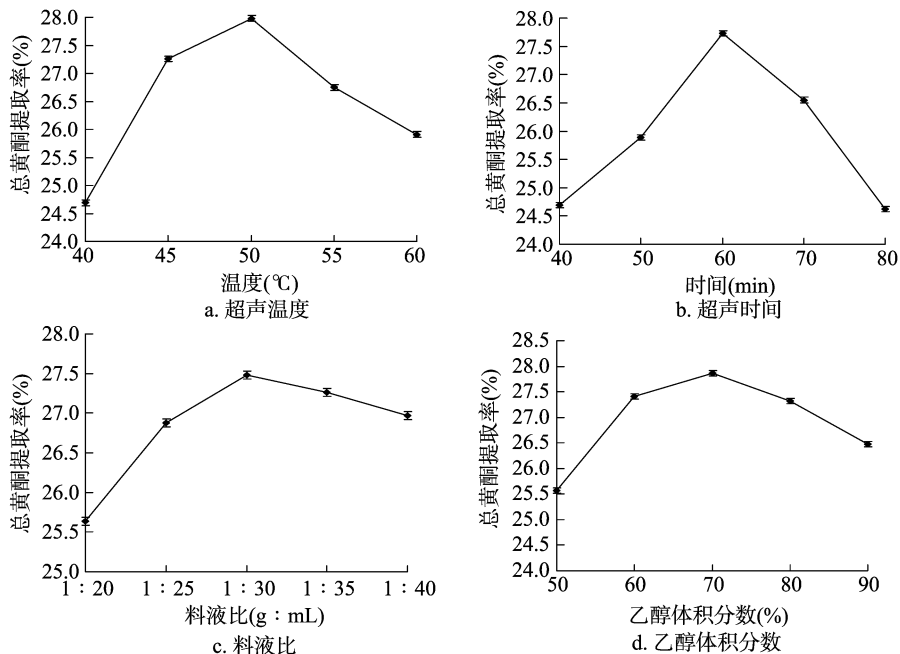


图1 超声温度、超声时间、料液比、乙醇体积分数对刺槐花总黄酮提取效果的影响

定适宜的料液比在 1 g : 30 mL 附近,选取料液比 1 : 25、1 : 30、1 : 35(g : mL) 3 个水平进行正交试验。

2.4 乙醇体积分数对刺槐花总黄酮提取效果的影响

由图 1 - d 分析可知,在乙醇体积分数为 50% ~ 70% 范围内,总黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而增大,当乙醇体积分数为 70% 时,提取率达到最大(27.86%),之后随乙醇体积分数的继续增大,提取率呈下降趋势。这可能是在低浓度乙醇下,随着乙醇体积分数的逐渐增大,醇溶性物质的溶出量增加,提取率开始呈现增大的趋势;但随着乙醇体积分数的进一步增大,刺槐花中的一些醇溶性和脂溶性的杂质溶出量也逐渐增多,这些成分可能会与乙醇-水分子体系结合,与黄酮类化合物形成竞争,影响刺槐花黄酮类物质的溶出,导致总黄酮提取率下降^[17]。因此,确定适宜的乙醇体积分数在 70% 附近,选取乙醇体积分数 60%、70%、80% 等 3 个水平进行正交试验。

2.5 正交试验结果

从表 2 分析可知,对刺槐花总黄酮提取率的影响因素由大到小为超声温度 > 乙醇体积分数 > 料液比 > 超声时间。由极差分析得到最佳提取工艺组合为 A₁B₃C₂D₂,即超声温度 45 °C、超声时间 70 min、料液比 1 g : 30 mL、乙醇体积分数 70%。由于正交试验中没有出现最佳工艺组合,因此在优化后的最佳工艺组合条件下进行验证性试验,重复 5 次,得到刺槐花总黄酮平均提取率为 28.69%,相对标准偏差(RSD)值为 0.72%,大于正交试验中最高提取率 28.15%。结果表明,优化后的提取工艺重复性良好,试验数据可靠。因此,本试验优化后得到的提取工艺可用于刺槐花中总黄酮的提取。

2.6 刺槐花总黄酮清除 DPPH · 的能力评价

DPPH 是一种以氮为中心的稳定自由基,其乙醇溶液在波长 517 nm 处有强吸收峰,当待测溶液中含有抗氧化物时,抗氧化物能使 DPPH 的特征紫色变浅或消失,且 DPPH 特征紫色褪色程度与抗氧化剂的抗氧化能力呈正相关^[18]。因此,

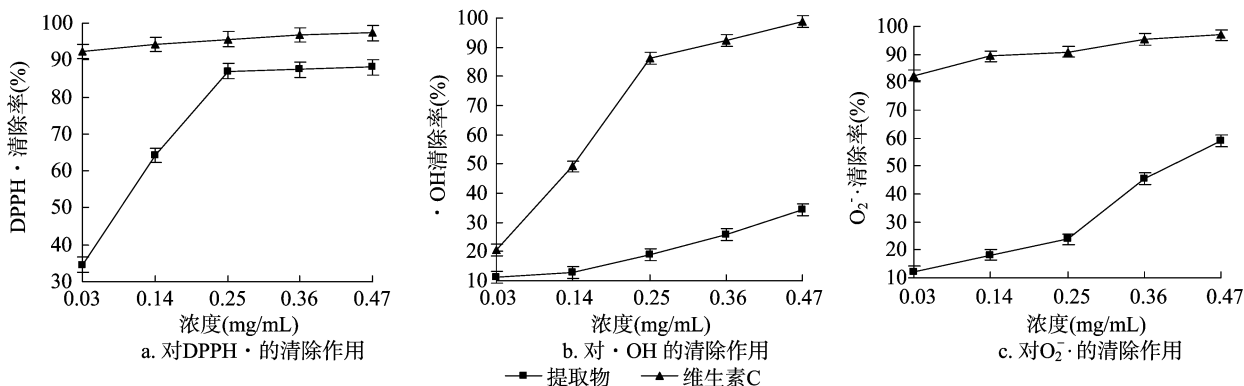
可根据 DPPH 溶液褪色程度来评价其抗氧化剂的抗氧化能力。从图 2 - a 可以看出,随刺槐花总黄酮质量浓度的增大,清除 DPPH · 的能力逐步增强,即清除率与刺槐花总黄酮质量浓度间有量效关系。在所试质量 0.03 ~ 0.47 mg/mL 范围内,当总黄酮质量浓度为 0.47 mg/mL 时,DPPH · 的清除率达到最大(88.04%)。虽然刺槐花总黄酮清除 DPPH · 的能力稍弱于维生素 C 清除 DPPH · 的能力,但刺槐花总黄酮仍然表现出较强的清除 DPPH · 的能力,表明所提取的刺槐花总黄酮具有较好的抗氧化能力。

表 2 对刺槐花总黄酮提取率的影响因素正交试验结果

试验序号	A: 超声温度	B: 超声时间	C: 料液比	D: 乙醇体积分数	总黄酮提取率 (%)
1	1	1	1	1	27.28
2	1	2	2	2	28.15
3	1	3	3	3	27.69
4	2	1	2	3	25.63
5	2	2	3	1	24.49
6	2	3	1	2	26.38
7	3	1	3	2	24.97
8	3	2	1	3	25.23
9	3	3	2	1	24.09
k ₁	27.71	25.96	26.30	25.29	
k ₂	25.50	25.96	26.50	26.50	
k ₃	24.76	26.05	25.72	26.18	
R	2.95	0.09	0.78	1.21	

2.7 刺槐花总黄酮清除 · OH 的能力评价

H₂O₂ 与 FeSO₄ 反应会产生 · OH, · OH 具有较强的氧化能力,通过攻击水杨酸分子中的苯环使其发生氧化反应,生成的有色物质在波长 510 nm 处的吸光度与 · OH 的生成量成正比^[19]。若反应体系中加入抗氧化剂, · OH 受到抑制,使有色物质生成量减少,可用清除 · OH 的能力来评价抗氧化物的抗氧化性。从图 2 - b 可以看出,刺槐花总黄酮对由 H₂O₂/

图2 刺槐花总黄酮对 DPPH·、·OH 和 O₂·⁻ 的清除作用

Fe²⁺ 体系通过 Fenton 反应产生的 ·OH 具有清除作用,且随刺槐花总黄酮质量浓度的增大,其清除 ·OH 的能力逐步增强,即清除率与总黄酮的浓度间有量效关系。在所试质量浓度 0.03 ~ 0.47 mg/mL 范围内,当总黄酮质量浓度为 0.47 mg/mL 时,·OH 的清除率达到最大,为 34.41%。虽然刺槐花总黄酮清除 ·OH 的能力远远弱于维生素 C 清除 ·OH 的能力,但刺槐花总黄酮也表现出一定的清除 ·OH 的能力。

2.8 刺槐花总黄酮清除 O₂·⁻ 的能力评价

O₂·⁻ 可通过邻苯三酚在弱碱介质中自氧化产生,并生成有色中间产物,总黄酮能够抑制 O₂·⁻ 的形成,通过在波长 325 nm 处测定有色中间产物的生成量,可测定总黄酮的清除能力。总黄酮能够与 O₂·⁻ 结合形成稳态自由基,终止自由基链反应,而发挥抗氧化作用^[20]。从图 2-c 可以看出,刺槐花总黄酮在所试质量浓度 0.03 ~ 0.47 mg/mL 范围内,随质量浓度的增大,清除 O₂·⁻ 的能力增强,当总黄酮质量浓度为 0.47 mg/mL 时, O₂·⁻ 的清除率达到最大,为 59.07%。与同质量浓度维生素 C 相比,刺槐花总黄酮清除 O₂·⁻ 的能力弱于维生素 C 清除 O₂·⁻ 的能力,但刺槐花总黄酮依然表现出较强的清除 O₂·⁻ 的能力。

3 结论与讨论

超声波辅助提取刺槐花总黄酮中,影响总黄酮提取效果的因素主次为超声温度 > 乙醇体积分数 > 料液比 > 超声时间。经过正交试验优化后得到的最佳提取工艺参数为:超声温度 45 ℃,超声时间 70 min,料液比 1 g : 30 mL,乙醇体积分数 70%。在该条件下进行验证性试验,重复 5 次,得到刺槐花总黄酮平均提取率为 28.69%,RSD 值为 0.72%。该优化后的提取工艺具有提取率高、重复性好等优点,可用于刺槐花总黄酮的提取。

抗氧化性试验结果表明,刺槐花总黄酮质量浓度在 0.03 ~ 0.47 mg/mL 范围内,随着刺槐花总黄酮质量浓度的增大,清除 DPPH·、·OH、O₂·⁻ 的能力逐步增强,且刺槐花总黄酮质量浓度与清除率呈量效关系。当刺槐花总黄酮质量浓度为 0.47 mg/mL 时,对 DPPH·、·OH、O₂·⁻ 的清除率分别为 88.04%、34.41%、59.07%。虽然与同质量浓度的维生素 C 相比,清除 DPPH·、·OH、O₂·⁻ 的能力弱于维生素 C,但刺槐花总黄酮仍然表现出较强的清除 DPPH·、·OH、O₂·⁻ 的

能力,说明刺槐花总黄酮具有较强的抗氧化活性。

本研究表明,超声辅助提取刺槐花总黄酮具有提取率高、重复性好等优点,是一种较为理想的提取方法。超声辅助提取得到的刺槐花总黄酮具有较强的抗氧化性,相关试验结果为刺槐花总黄酮的提取和抗氧化的研究提供了科学依据和参考。但本试验仅对超声波辅助提取的刺槐花总黄酮进行体外抗氧化活性研究,而对体内抗氧化性未进行相关研究,今后要在本试验的基础上,对超声辅助提取的刺槐花总黄酮进行体内抗氧化性研究,为开发安全无毒的天然抗氧化剂提供科学的依据和参考。

参考文献:

- [1] 云南省药物研究所. 云南天然药物图鉴(1)[M]. 昆明:云南科技出版社,2003:248.
- [2] 鄯长余,初正云,王天敏,等. 刺槐花的化学成分研究[J]. 中草药,2010,41(5):707-709.
- [3] 张素英,何 骞,曾启华,等. 遵义刺槐花挥发油化学成分的研究[J]. 贵州化工,2008,33(4):11-14.
- [4] Xie J C, Sun B G, M Y. Constituents of top fragrance from fresh flowers of *Robinia pseudoacacia* L. occurring in China[J]. Havour and Fragrance Journal,2006,21(5):798-800.
- [5] 周忠泽,李玉成. 洋槐花粉的破壁技术及其口服液的研制[J]. 安徽大学学报(自然科学版),2000,24(1):94-95.
- [6] Tian F, Chang C J, Grutzner J B, et al. Robinlin; a novel bioactive homo-monoterpene from *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae)[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001, 11(19):2603-2606.
- [7] 王 林,章 敏,胡秋辉. 刺槐花营养成分及其开发利用[J]. 食品科学,2006,27(2):274-276.
- [8] 李凤英,李润丰,崔蕊静,等. 槐花保健饮料的研制[J]. 中国食品学报,2007,7(2):70-74.
- [9] 李凤英,郑立红,肖月娟,等. 槐花醋酿制工艺的研究[J]. 中国食品学报,2008,8(1):38-43.
- [10] 王 岚,王雪芹,仲浩. 刺槐花中黄酮类成分的高效液相色谱-质谱联用技术分析[J]. 食品与药品,2013,15(4):240-241,242.
- [11] 李艳艳,初正云,翟延君,等. 刺槐花总黄酮提取工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(5):87-88.
- [12] 向昌国,向 宁,黄成龙,等. 响应面法优化刺槐花黄酮类化合物的微波提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(22):32-36.
- [13] 杨申明,杨红卫,王振吉,等. 微波辅助提取常春油麻藤花总黄

杨宗渠,李长看,雷志华,等. 以小麦为基质的灵芝固体发酵条件研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):150-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.043

以小麦为基质的灵芝固体发酵条件研究

杨宗渠^{1,2}, 李长看^{1,2}, 雷志华¹, 李玉华¹, 曲金柱¹, 高红云¹, 罗 青¹

(1. 郑州师范学院生命科学学院, 河南郑州 450044; 2. 郑州师范学院生物物种资源研究中心, 河南郑州 450044)

摘要:为筛选灵芝菌丝体生长的适宜环境条件和基质,以台湾灵芝和赤芝为材料,观察菌丝体在不同温度、pH 值、氮源、光照条件、基质下的生长情况。结果表明:台湾灵芝的最适生长温度为 25 ℃,培养基最适初始 pH 值为 5.0,最适氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,在黑暗中生长最好;赤芝的最适生长温度为 30 ℃,培养基最适初始 pH 值为 5.5,最适氮源为牛肉膏;台湾灵芝和赤芝菌丝体均在小麦 80%、谷子 10%、荞麦 10% 配方培养基质上生长最旺盛。

关键词:灵芝;菌丝体;培养条件;小麦

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0150-03

灵芝是我国传统的食药兼用真菌,是自然界珍稀的菌类。迄今为止,人们已经从灵芝中分离出 150 种化合物,如多糖、腺苷、有机锗、三萜等^[1]。野生的灵芝子实体资源少,加之不合理采挖,导致药源不足。灵芝子实体栽培要消耗大量木材,破坏森林资源,且灵芝子实体生产周期长、受气候条件影响较大、产量低而不稳。研究证实,发酵菌丝体与子实体成分一致^[2],为利用发酵工程技术生产灵芝菌丝体提供了理论基础。固体发酵生产灵芝菌丝体与子实体栽培相比,具有难度低、生产周期短、次生代谢产物积累时间长、培养料来源广泛等优点。魏龙等研究了接种量、料层厚度、初始酸碱度、发酵时间对灵芝固体发酵产物抗氧化活性的影响^[3]。张平等采用灵芝菌丝固体发酵枇杷叶,分析发酵前后枇杷叶中主要活性成分的变化^[4]。曲墨等报道了以中药渣和莲藕渣为基质的灵芝菌固体发酵条件^[5-6]。杜亚楠等在大豆固体培养基中接种富硒灵芝菌种,探索固体发酵生产游离氨基酸的工艺条件^[7]。付铭等以多糖及赖氨酸含量为指标,研究不同大米加量、装液量、培养基酸碱度和培养温度对灵芝菌丝体生长的影响^[8]。笔者以小麦为发酵基质,以菌丝生长速度为指标,研究不同菌株菌丝的生长特性,探索以小麦为基质的灵芝固体

发酵条件,旨在为将灵芝固体发酵技术应用于小麦深加工提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌株台湾灵芝从中国科学院微生物研究所引进,赤芝由中华供销合作社社昆明食用菌研究所提供。CP313 型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];DH-420 型电热恒温培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);LRH-300-G 型光照培养箱(广东省医疗器械厂);立式高压灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);PHSJ-5 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基 母种采用 PDA 加富培养基。固体培养基以小麦为主要原料,添加辅料制成培养基质。称取一定量的小麦、燕麦、玉米、荞麦、谷子、糙米、高粱,用凉水浸泡,放置冰箱 12 h 后煮沸,煮熟但不裂开,放凉至不黏手,按比例配制培养基质。

1.2.2 试验设计 设置 20、25、30、35、40 ℃ 等 5 个温度处理。将灵芝菌种接种到 PDA 平板加富培养基上,分别置于 5 种温度的恒温培养箱中培养,每个温度处理台湾灵芝、赤芝各接种 4 个培养皿。

设置 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 等 7 个 pH 值。采

收稿日期:2016-08-15

基金项目:河南省重点科技攻关项目(编号:102102110182)。

作者简介:杨宗渠(1964—),男,河南延津人,博士,教授,研究方向为生物资源利用与转化。E-mail: yangzq@163.com。

酮工艺及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):366-369.

[14] Mohsen S M, Ammar A S. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 595-598.

[15] Chen R Z, Liu Z Q, Zhao J M, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 434-440.

[16] 孙 美, 黄艳菲, 赵小燕, 等. 响应曲面法优化荞麦总黄酮的提取工艺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1714-1718, 1742.

[17] 杨 芳, 杨万林, 陈锦玉, 等. 苦荞壳总黄酮超声辅助醇提工艺的优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 234-238.

[18] 张 汇, 鄢 嫣, 聂少平, 等. 黑灵芝不同部位多糖成分分析及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 56-61.

[19] Xiong S L, Li A L, Huang N, et al. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(3): 1273-1280.

[20] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 12[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914.