

黄小忠, 谢春芹, 张雪松, 等. 蝉花真菌液体发酵及活性成分测定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(2): 197–201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.036

蝉花真菌液体发酵及活性成分测定

黄小忠, 谢春芹, 张雪松, 凡军民, 许俊齐, 陈松玲

(江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400)

摘要:利用蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae*)菌株进行液体发酵,并进行单因素和正交试验,以实现蝉花真菌液态发酵条件包括 pH 值、温度、摇床转速、培养基装液量的优化。结果表明,蝉花液体发酵的最优条件为 pH 值 7.4、摇床转速 150 r/min、温度 28 ℃、装液量 40%;在此条件下,测得的真菌多糖含量为 107.45 mg/g,虫草酸含量为 95.82 mg/g,真菌多糖、虫草酸含量皆高于天然蝉花。

关键词:蝉花;液体发酵;活性成分;测定

中图分类号: S567.3⁺50.1;S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)02-0197-04

蝉花(*Cordyceps cicadae*),别称大虫草,属虫生真菌,与冬虫夏草有非常接近的亲缘关系,属麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps*),在我国,蝉花主要分布在四川省、江苏省、浙江省、福建省等地^[1]。

国内外多项研究成果表明,蝉花具有多种保健作用,包括提高人体自身免疫力、抗疲劳、养肾、养肝、改善睡眠、抗肿瘤、抗辐射和明目等,是一味具有神奇效果的古老中草药^[2]。李时珍在《本草纲目》中记载的药效为:“蝉花可治疗惊痫,夜啼心悸,功同蝉蜕”。蝉花的天然成分与冬虫夏草类似,具有相同的药用价值,且尚未检测出有毒重金属如碘、汞、铅等,在安全性方面蝉花显然优于冬虫夏草,同时蝉花的价格相对于冬虫夏草而言较低,因此蝉花常作为冬虫夏草的替代品。

蝉花对生长条件要求比较严格,需要特定的生态环境和寄主昆虫(金蝉)^[3],这是蝉花资源稀少的主要原因。近几年随着生态环境的破坏,蝉花的生长区域大范围缩小;同时人们开始认识到蝉花的价值,使蝉花遭到了疯狂的采摘,导致蝉花资源迅速减少。本试验的目的是利用蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae*),在经优化的液态培养条件下生产蝉花菌丝

体,并对菌丝体的生物活性物质进行提取及测定分析,以期通过菌丝体发酵来获得天然蝉花含有的药用活性物质,为规模化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 蝉花菌种来源

蝉花(*Cordyceps cicadae*)菌株来自江苏省食用菌研究所。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 甘露醇标准品、乙酸铵、冰醋酸、乙酰丙酮、高碘酸钠、L-鼠李糖、葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母膏、琼脂、孟加拉红染色剂、氯霉素、K₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、高碘酸钾、苯酚、浓硫酸、无水乙醇。

1.2.2 仪器 水浴恒温振荡器;电子天平;立式压力蒸汽灭菌器;数显恒温水浴锅;可见分光光度计;冷冻真空干燥机。

1.3 培养基

1.3.1 菌种保藏培养基 PDA 斜面试管培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g,加水至 1 L, pH 值自然,在 121 ℃下灭菌 30 min 备用。

1.3.2 种子培养基 土豆 200 g、蔗糖 50 g、豆粕 5 g、KH₂PO₄ 5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g,加水至 1 L, pH 值自然,在 121 ℃下灭菌 30 min 备用。

1.3.3 发酵培养基 蔗糖 40 g、蛋白胨 15 g、KH₂PO₄ 1.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g,加水至 1 L,在 121 ℃下灭菌 30 min 备用。

1.4 发酵种子的制备

1.4.1 菌种活化 将试验分离所得到的在低温保

收稿日期:2018-10-29

基金项目:江苏省句容市农业课题(编号:JRNW[2018]06);江苏农林职业技术学院科研项目(编号:2016kj013)。

作者简介:黄小忠(1981—),男,江苏海安人,硕士,讲师,主要从事发酵工程研究。E-mail:huangxiaozhong@jsafc.edu.cn。

通信作者:谢春芹,副教授,主要从事食药菌研究。E-mail:xiechunqin@jsafc.edu.cn。

藏的蝉花菌种通过无菌操作接种于 PDA 平板培养基上,在温度为 28 ℃ 条件下培养 2~3 d 进行活化,当菌丝长满整个培养皿时,即可使用^[4]。

1.4.2 孢子悬浮液的制备 在无菌条件下,用接种钩从培养基上取大小约 0.3 cm×0.3 cm 的母种块,接种于盛有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中(菌块稍带培养基且要薄,以能浮在培养液表面为最佳),在温度为 28 ℃,转速为 180 r/min 的恒温摇床中培养 72 h^[5]。

1.5 液体发酵条件的确定

1.5.1 发酵温度的优化 取 5 mL 菌悬液,接入装液(发酵培养基)量为 40% 的 250 mL 三角瓶中,将恒温摇床的温度分别设为 22、25、28、31、34 ℃,摇床转速设为 150 r/min,培养 5 d 后测其生物量。

1.5.2 发酵 pH 值的优化 取 5 mL 菌悬液,接入初始 pH 值分别为 6.5、6.8、7.1、7.4,培养基装液量为 40% 的 250 mL 三角瓶中,置于温度为 28 ℃ 的摇床中以转速为 150 r/min 的速率进行培养,培养 5 d 后测其生物量。

1.5.3 发酵摇床转速的优化 取 5 mL 菌悬液,接入装液量为三角瓶中,将摇床的转速分别设为 110、130、150、170、190 r/min,在温度为 28 ℃ 条件下恒温培养 5 d 后测其生物量。

1.5.4 发酵装液量的优化 在装液量分别为 20%、40%、60%、80% 的三角瓶中接入 5 mL 菌悬液,置于温度为 28 ℃ 的恒温摇床中以转速为 150 r/min 的速度培养 5 d 后测其生物量。

1.5.5 正交试验的确定 选择温度、摇床转速、pH 值和装液量为试验因素,进行 4 个因素 3 个水平 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对发酵结果进行极差和方差分析,探讨各种培养条件对蝉花液态发酵所获得的生物量和虫草酸含量的影响程度。

1.6 测定方法

1.6.1 生物量测定方法 采用细胞干质量法^[6]测定蝉在液态发酵所获生物量,具体操作为在发酵液培养完成后,用 100 目筛过滤得到菌丝体和胞外液,用蒸馏水反复冲洗菌丝体直至所出滤液澄清为止,将所收集的菌丝体置于玻璃纸上,放入烘箱中,在温度为 60 ℃ 条件下烘干至恒质量,称质量得生物量。

1.6.2 虫草酸含量测定 通过微波提取法^[7]提取菌丝体中的虫草酸。利用高碘酸钠比色法^[8]测定虫草酸含量。

1.6.2.1 微波提取法 取 0.05 g 干燥液体发酵菌丝体加入 10 mL 蒸馏水中在微波炉中通过中火加热 2 min 进行微波处理。处理完毕后在 3 000 r/min 下离心 25 min,取上清液加入到 50 mL 容量瓶中,并用蒸馏水定容。

1.6.2.2 高碘酸钠比色法 取 50 mg 甘露醇加入到 50 mL 蒸馏水中配置成 1 mg/mL 甘露醇溶液,分别取 1、2、3、4、5 mL 甘露醇溶液于 100 mL 容量瓶中,并用蒸馏水定容,得到 10、20、30、40、50 μg/mL 样液,取样液各 1 mL,加 1 mL 高锰酸钾溶液(加 0.15 mol 高锰酸钾于 100 mL 0.12 mol/L 盐酸溶液中混匀)。室温放置 10 min,加入 2 mL 0.1% L-鼠李糖溶液除去过多的高碘酸盐。混合后加 4 mL 新配 NaSH 试剂(150 g 乙酸铵,2 mL 冰乙酸,2 mL 乙酰丙酮,用蒸馏水稀释至 1 000 mL),53 ℃ 水浴加热 15 min 使其呈色,冷却,用蒸馏水代替甘露醇标准液。在波长为 412 nm 处测吸光度($D_{412\text{ nm}}$),将测得的吸光度通过回归方程进行计算,然后通过下式计算菌丝体中虫草酸的含量^[8]。

$$R = \frac{C \times V \times 10}{1\,000 \times m}$$

式中: R 为菌丝体中虫草酸含量,mg/g; C 为提取液中虫草酸含量,μg/g;10 为试样浸提后定容体积,mL; V 为提取液体积,mL; m 为试样的准确质量,g。

1.6.3 真菌多糖含量的测定 将干燥后的菌丝体进行前处理。步骤:热水提取、乙醇沉淀、脱色、去蛋白、低温干燥。采用硫酸-苯酚法^[9]测定真菌多糖含量。

1.6.3.1 前处理 取 2 g 干燥液体发酵菌丝研磨成粉末,用水提醇法提取,即加 10 倍量的蒸馏水,100 ℃ 水浴煎煮 1 h,重复 3 次,过滤提取液,浓缩至 1 g:1 mL,加 3 倍量的 95% 乙醇进行沉淀,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,继续加 95% 乙醇放置,倾出上清液,沉淀依次用 95% 乙醇、无水乙醇洗涤、过滤,低温干燥 24 h,即得多糖粗品。

1.6.3.2 硫酸-苯酚法测定真菌多糖 将提取的多糖样品置于 10 mL 容量瓶中,加双蒸水溶解,并稀释到刻度线位置,摇匀,备用。标准曲线的制作:吸取葡萄糖标准液(100 μg/mL)0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别加入到各试管中,用双蒸水补足至每管 2 mL,使各管葡萄糖含量分别为 0、10、20、30、40、60、80、100 μg。向各管中分别加入 0.05 mL 80% 苯酚溶液,再加入 5 mL 浓硫酸(勿沿管壁加

入,以便使样品与硫酸快速混匀),静置 10 min, 30 ℃ 水浴 15 min。在 490 nm 波长处测各管的吸光度,以糖浓度为横坐标,各管的吸光度为纵坐标作标准曲线,作回归方程曲线,通过以下公式计算真菌多糖含量。

$$R' = \frac{C' \times V'}{1\,000 \times \omega}$$

式中: R' 为菌丝体中真菌多糖含量,mg/g; C' 为提取液中真菌多糖含量, $\mu\text{g/g}$; V' 为提取液体积,mL; ω 为干菌丝体质量,g。

2 结果与分析

2.1 蝉花生物量的获得

2.1.1 发酵温度对生物量的影响 蝉花真菌在不同温度下进行液态发酵培养的结果见图 1。对于微生物液态发酵培养来说,温度的影响是双方面的:随着温度升高,可以加速微生物的生长代谢,但是温度过高不仅会导致微生物体内的酶失活还容易使菌体老化,从而影响微生物的正常生长以及代谢产物的积累;温度过低则导致菌体生长缓慢,因而积累的代谢产物较少。蝉花真菌菌株在温度为 22~34 ℃ 条件下均能生长,在温度为 28 ℃ 条件下所获得的生物量最大,为 5.63 g/L。

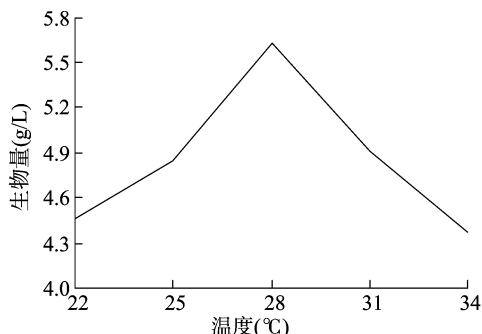


图1 发酵温度的优化

2.1.2 发酵 pH 值对生物量的影响 不同 pH 值对生物量的影响见图 2。在正常条件下,pH 值过低菌体容易衰老,而 pH 值过高则会导致菌体自溶。本试验通过设置不同的 pH 值来考察蝉花液体发酵培养的最佳 pH 值。蝉花真菌在 pH 值为 6.5~7.7 条件下均能生长,生物量随着 pH 值的上升出现了先增加后减少的现象,在 pH 值为 7.1 时所获生物量最大,为 4.68 g/L。

2.1.3 发酵摇床转速对生物量的影响 蝉花真菌属于好氧微生物,菌丝的生长需要消耗氧气,提高

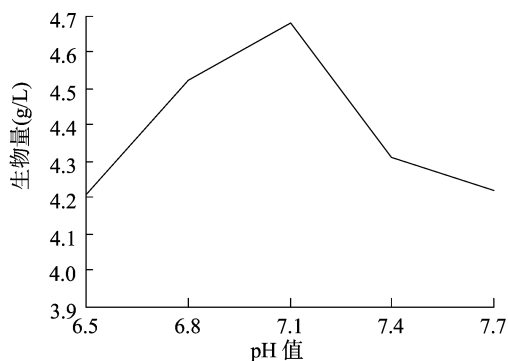


图2 pH 值对蝉花发酵的影响

摇床的转速,不仅可以增大液体接触空气的面积,还对蝉花真菌的生长有促进作用;转速太小影响通气量,从而影响溶氧量,不利于菌丝生长;摇床转速超过最佳转速时,由于剪切力增加,菌丝被切断导致菌丝体难以成形,因此难以维持正常的生长,导致获得的生物量减少(图 3)。在摇床转速为 150 r/min 时所获生物量最大,为 4.68 g/L。

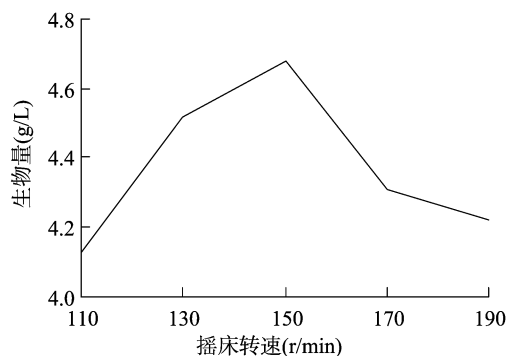


图3 摇床转速对蝉花发酵的影响

2.1.4 发酵装液量对生物量的影响 不同装液量对生物量的影响结果见图 4。装液量主要影响发酵过程中的通气情况,从而影响菌丝体的生长,装液量过小导致培养基水分蒸发较快,代谢物浓度较大,溶氧量下降;装液量过大会使振荡效果减弱,溶氧量降低。蝉花真菌液态发酵最佳装液量为 40%,此时生物量为 5.37 g/L。

2.2 蝉花真菌最佳液态发酵培养条件

选择温度、装液量、摇床转速、pH 值为试验因素,因素水平见表 1。

正交试验优化结果见表 2,影响蝉花真菌液态发酵生物量的各因素主次为 $A > C > D > B$,即温度对蝉花真菌液态发酵过程中生物量的影响最大,摇床转速次之,pH 值再次之,装液量对生物量的影响最小。根据表 2 直观分析最佳发酵条件为 $A_2B_1C_2D_3$,该条件下发酵液中的生物量为 6.13 g/L。

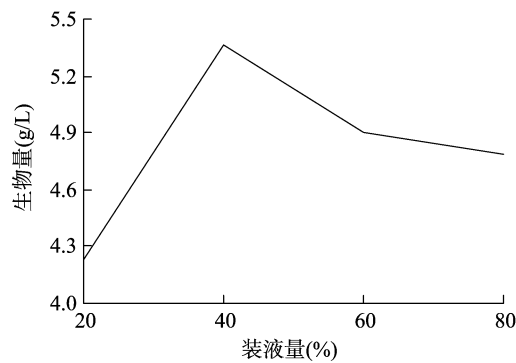


图4 装液量对蝉花发酵的影响

表 1 蝉花真菌发酵培养条件正交试验因子水平

水平	A: 温度 (℃)	B: 装液量 (%)	C: 摇床转速 (r/min)	D: pH 值
1	25	40	130	6.8
2	28	60	150	7.1
3	31	80	170	7.4

表 2 正交试验结果的极差分析

试验号	A: 温度	B: 装液量	C: 摇床转速	D: pH 值	生物量 (g/L)
1	1	1	1	1	4.79
2	1	2	2	2	4.85
3	1	3	3	3	5.11
4	2	1	2	2	6.13
5	2	2	3	1	5.67
6	2	3	1	2	5.26
7	3	1	3	2	5.43
8	3	2	1	3	5.09
9	3	3	2	1	5.32
k ₁	4.917	5.450	5.047	5.260	
k ₂	5.687	5.203	5.433	5.180	
k ₃	5.280	5.230	5.403	5.443	
R	0.770	0.247	0.386	0.263	

蝉花真菌液体发酵培养的最佳条件:温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r/min, pH 值为 7.4,装液量为 40%。

2.3 蝉花菌丝体中的活性成分测定

2.3.1 虫草酸含量标准曲线的制备 根据高碘酸钠比色法,作虫草酸(*D*-甘露醇)含量的标准曲线(图 5)。虫草酸含量的回归方程: $y = 0.004\ 0x + 0.003\ 2$ 。根据“1.6.2”节中的方法得到的样品吸光度为 0.572,虫草酸含量为 95.82 mg/g。

2.3.2 蝉花真菌多糖含量标准曲线的制备 根据硫酸-苯酚法,作真菌多糖标准曲线(图 6)。真菌多糖含量的回归方程: $y = 0.067\ 5x - 0.014\ 0$ 。根据“1.6.3”节中的方法得到的样品吸光度是 0.497,真菌多糖含量为 107.45 mg/g。

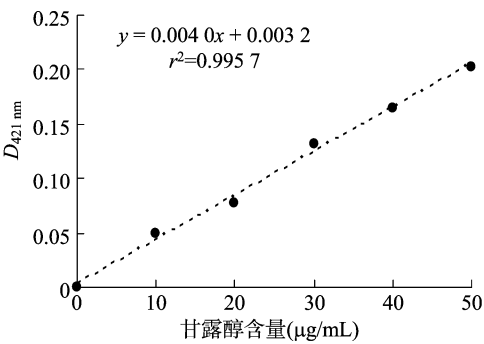


图5 虫草酸(*D*-甘露醇)含量标准曲线

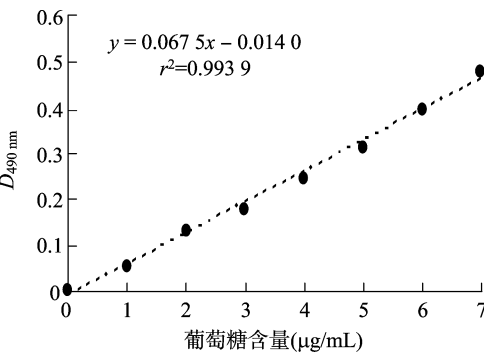


图6 葡萄糖含量标准曲线

3 结论与讨论

本研究通过对蝉花真菌进行液体发酵工艺优化试验发现,蝉花真菌液体发酵培养的最佳条件是温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r/min, pH 值为 7.4,装液量为 40%。

文欣等发现,在改良的液体发酵条件下得到的蝉花菌丝生物量为 5.72 g/L,真菌多糖含量为 86.71 mg/g,虫草酸含量为 90.13 mg/g^[10]。黄小忠等在改良的液体发酵培养基条件下,得到的蝉花菌丝生物量为 5.63 g/L,真菌多糖含量为 88.73 mg/g,虫草酸含量为 82.58 mg/g^[2]。本研究在使用改良液体发酵培养基的基础上,优化了发酵工艺,所获得的生物量为 6.13 g/L,真菌多糖含量为 107.45 mg/g,虫草酸含量为 95.82 mg/g。3 项指标皆明显提高,在发酵中所获得的蝉花菌丝体活性物质与天然蝉花中活性物质相同,但蝉花菌丝体中的天然有益物质真菌多糖和虫草酸的含量均高于天然蝉花,天然蝉花真菌多糖含量为 33.2 mg/g,虫草酸含量为 53.6 mg/g^[11]。因此将蝉花液体发酵菌丝体用于保健用品开发,以替代天然蝉花的使用不无可能,此方法不仅可以降低生产成本,也可减少对天然蝉花资源的破坏。

任 凯,陈 通,陆道礼,等. 基于微型可见光谱仪的茶汤色差的研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):201-206.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.037

基于微型可见光谱仪的茶汤色差的研究

任 凯,陈 通,陆道礼,陈 斌

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:旨在基于可见光谱技术建立 1 种茶汤色差的快速分析检测方法。以大闽食品(漳州)有限公司提供的速溶绿茶样品为研究对象,采用微型可见光谱仪采集样品原始光谱数据,分别使用 CIE(Commission Internationale de l'Eclairage,国际照明委员会)1976Lab、CMC($l:c$)、CIE DE2000 共 3 种色差计算方法,对被测样品的色差进行测定和分析。结果表明:(1)不同浓度茶汤之间的原始光谱在波长 400 nm 处有较为明显的吸收差异,该点对应黄绿色溶液的特征吸收波长点,表明可应用于茶汤浓度的区分;(2)对茶汤原始透射率使用上述 3 种色差方法进行色差分析,经过对比发现,CIE 1976Lab 色差标准较适用于分析评判绿茶汤的色差值。利用可见光谱分析技术结合 CIE 1976Lab 色差标准方法可实现快速、准确评判速溶绿茶汤的颜色差异。

关键词:速溶绿茶;可见光谱分析;色差分析;茶叶

中图分类号:TS272.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)02-0201-06

我国是茶叶的故乡,茶道亦是我国悠久文化的代表项目之一,从古至今在人们的日常生活中都扮演着重要角色,茶叶也是我国对外贸易的大宗饮料原料之一^[1]。随着现代医学与科学的发展,越来越多的研究表明,茶叶中含有的多酚类物质(如茶多酚、儿茶素、类黄酮等)对人体具有抗氧化、抗癌、抑

制心血管疾病等功效^[2-3]。因此,日常饮茶受到越来越多人的重视。在继承传统茶业的同时,随着人们口感要求的提升和保健功效要求的提出,促进了茶饮料产业的快速发展。

与传统的茶业不同,茶饮料更多是以经过茶叶浸泡的提取液浓缩液或速溶茶粉为原料,经加工、调配等工序制成茶汤饮料或调味茶饮料^[4-5]。随着现代工业的进步和市场需求的提高,如何保证不同批次产品品质相近或相同,特别是茶汤色泽一致性的控制,是目前企业生产中普遍存在的一个难题。而实际生产过程中使用的检测方法仍然停留在感官评定上,即将待测产品与企业标准品相对比,进

收稿日期:2018-11-12

基金项目:国家重大科学仪器开发专项(编号:2014YQ491015)。

作者简介:任 凯(1994—),男,山西忻州人,硕士研究生,主要从事食品、农产品快速无损检测研究。E-mail:rkkg233@163.com。

通信作者:陈 斌,博士,教授,主要从事食品与农产品快速无损检测方法和应用机制的研究。E-mail:ncp@ujs.edu.cn。

本研究对蝉花液体发酵条件进行了考察,优化了蝉花液体发酵工艺条件。后续还将会对蝉拟青霉菌种进行选育考察,同时将继续研究和改良发酵培养基的配方,在打破传统配方的基础上,寻找更适合蝉花发酵的碳源、氮源等材料,从而进一步优化蝉花发酵工艺。

参考文献:

- [1]陈显群,羊 悦,杨胜利. 中药蝉花菌株筛选及发酵条件优化研究[J]. 浙江化工,2015,46(2):18-21.
- [2]黄小忠,谢正林,许俊齐,等. 蝉花真菌的分离及液体发酵培养基优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):153-155.
- [3]程爱芳,邓政东,陈 文,等. 多粘类芽孢杆菌 HD-1 产纤维素酶的条件优化[J]. 食品工业科技,2015,36(10):173-177.

- [4]程东庆,丁志山,林美爱,等. 蝉花真菌的分离及液体发酵培养[J]. 中药材,2006,29(2):99-101.
- [5]曾凡清,刘德云,宋小亚,等. 蝉花的分离和培养研究[J]. 浙江食用菌,2008(4):28-29.
- [6]官宗华,宋玉良,滕 晔,等. 金蝉花菌种的分离和培养[J]. 内蒙古中医药,2012,31(18):34.
- [7]夏 敏,温 鲁. 微波法提取虫草素研究[J]. 食品科学,2006,27(10):248-251.
- [8]来永斌,王 琦,孙 月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药,2001,23(7):517-518.
- [9]邵 颖,李 文,王 陶. 蛹拟青霉发酵菌丝体中虫草酸的提取与测定[J]. 食品工业科技,2012,33(1):262-264,267.
- [10]文 欣,刘素纯,黄晓晗. 蝉花菌株的筛选及菌丝体成分分析[J]. 食品与机械,2013,29(3):61-65.
- [11]董钰明,刘 晖,张 军,等. 比色法测定复方虫草颗粒中甘露醇的含量[J]. 中草药,2001,32(8):697-699.