

香菇固态发酵对蓝莓果渣产物活性成分的研究

郭 丽, 王 鹏, 马志婷

(绥化学院 食品与制药工程学院, 黑龙江 绥化 152061)

摘 要:以蓝莓果渣为原料,利用香菇进行固态发酵,以分光光度法、高效液相色谱测定发酵产物中蛋白质、黄酮、花色苷、鞣花酸和没食子酸含量的变化,以研究香菇固态发酵蓝莓果渣过程中生物活性成分的变化。结果表明:蓝莓果渣产物中蛋白质和黄酮含量在第8天达到最高,分别为7.210 mg/g和0.455 mg/g,花色苷含量在发酵第12天时达到最高,为1.878 mg/g;鞣花酸含量呈下降趋势,没食子酸含量呈先增加后下降,第8天达到最高值,为1.755 mg/g。

关键词:香菇;蓝莓果渣;固态发酵;活性成分

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0143-04

蓝莓(*Vaccinium uliginosum*)属杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)多年生落叶或常绿灌木。蓝莓中含有黄酮、花青苷、鞣花酸、没食子酸等生物活性成分,具有防治高血压、疏通毛细血管和缓解视力疲劳等功效,并可增强心脏功能、延缓脑神经衰老、预防老年痴呆、抗前列腺癌和糖尿病,被国际粮农组织列为五大健康食品之一^[1-5]。近年来,随着蓝莓产业的蓬勃发展,蓝莓产品形式多种多样,除了鲜食之外,还可加工成果浆、果汁或浓缩汁。随着加工量的增大,每年都会产生大量的蓝莓果渣。这些果渣长期以来未得到有效利用,造成了资源的浪费。研究人员利用微生物对水果废渣中的营养物质进行发酵培养,发现微生物可促使果渣中酚类、黄酮类等活性成分增加^[6-9]。该试验利用香菇能在含有纤维素、半纤维素和木质素的基质上生长的特性,以蓝莓果

渣为原料,利用香菇进行固态发酵,研究香菇发酵蓝莓果渣代谢过程中生物活性物质的变化,以期为实现活性物质大量提取、蓝莓浆果高附加值加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试速冻蓝莓果渣购于北大荒冰雪食品有限公司;供试香菇菌种由绥化学院食用菌研究所提供。

没食子酸、芦丁、鞣花酸标准品购自Sigma公司;甲醇为进口色谱纯购自德国默克公司;牛血清蛋白质、考马斯亮蓝G-250、二甲亚砜、醋酸、硫酸镁、碳酸钙、硝酸铵、磷酸及其它试剂均为国产分析纯。

GL-16G-II冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);BXM-30R立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);752紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);BPMJ-150F型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-2G型净化工作台(苏州净化设备有限公司);Waters Alliance 2695液相色谱仪(美国沃特斯公司)。

第一作者简介:郭丽(1979-),女,博士,副教授,研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail:guoli2138@163.com.

基金项目:黑龙江省普通高校青年学术骨干支持计划资助项目(1252G001)。

收稿日期:2014-03-13

acidity (TA) of apples treated by 1-MCP were very significantly higher than that of the control at the 18th, 27th, 54th, 63th day of shelf-life ($P < 0.01$), so 1-MCP treatment could significantly inhibit the decreasing of firmness, SSC and TA of apples which were directly stored at room temperature for 108 days after postharvest. For apples which were stored at low temperature for 4, 5 and 6 months first and then were taken in shelf-life for 25 days respectively, the low temperature could effectively help to keep a high physical and chemical quality for apples, while 1-MCP treatment could significantly delay the decreasing of fruit firmness, SSC and TA. There was a better effect of 1-MCP treatment on inhibiting decreasing of firmness and TA of apples which were storage at $(14 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ and inhibiting decreasing of SSC of apples which were storage at low-temperature. In addition, 1-MCP treatment could maintain a high activity of SOD and POD in storage and inhibit the increasing of MDA content.

Key words: apple; 1-MCP treatment; different storage conditions; room temperature; shelf-life; physical and chemical quality

1.2 试验方法

1.2.1 固态发酵培养基的制备 斜面培养基和种子培养基:马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。固态发酵培养基:锯木屑 38%,野生浆果渣 10%,碳酸钙 0.5%,硝酸铵 0.5%,鱼蛋白水解液。鱼蛋白水解液:冻碎鱼 100 g 加上 200 mL 蒸馏水,解冻后加入胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶各 1.5 g,用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7,55℃水浴水解 4~5 h(不时搅拌),95℃灭酶 10 min,冷却备用。

1.2.2 香菇发酵蓝莓果渣 将香菇菌种接种到 PDA 培养基中培养,将固态发酵培养基各成分充分混匀后,每袋装料 0.2 kg 在 0.14 MPa、121℃条件下灭菌 90 min,冷却后将 PDA 培养基所培养的菌种接入到固态发酵培养基内,接种后扎紧袋口。28℃下恒温培养。每 4 d 取出固态培养基用无水乙醇以 1:1.5 比例提取,离心后测定蛋白质、黄酮、花色苷、鞣花酸和没食子酸含量。

1.3 项目测定

1.3.1 蛋白质含量的测定 蛋白质含量采用考马斯亮蓝法^[10]测定。

1.3.2 总黄酮含量的测定 总黄酮含量的测定采用 Chun 等^[11]改良的比色法。取离心后稀释样品液 1 mL 加入 0.2 mL 5 g/100mL 亚硝酸钠溶液混合,6 min 后加 10 g/100mL $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.2 mL,混合摇匀。5 min 后加入 2 mL 1 mol/L 氢氧化钠,充分混匀,15 min 后在 510 nm 波长处测定吸光度。根据芦丁标准曲线计算总黄酮含量,结果以芦丁当量表示(mg 芦丁/g 样品)。

1.3.3 花色苷的测定 果渣用 0.025 mol/L pH 1.0 的氯化钾缓冲液及 pH 4.5 乙酸钠缓冲液按比例混合,分别在 515 nm 和 700 nm 波长处测定吸光度,以蒸馏水为空白比色。花青素的含量公式,总单花青素(mg/100g FW) = $A \times \text{Mw} \times E \times c$,式中, A :吸光率($A_{515} - A_{700}$)pH 1.0 - ($A_{515} - A_{700}$)pH 4.5;式中, Mw :花色苷 3-糖配基的相对分子质量 449.2; E :花色苷 3-糖配基的摩尔吸光率 26 900; c :缓冲溶液的质量浓度(mg/mL);每 100 g 鲜果皮中花色苷的含量用花色苷 3-糖配基的毫克数表示。

1.3.4 鞣花酸含量的测定 鞣花酸对照品溶液制备:称取鞣花酸对照品(纯度大于 96%)0.0070 g,用二甲亚砜溶解并定容至 100 mL,配制成 70 mg/L 标准贮备液,稀释成 58.3、46.7、35.0、7.0 mg/L。发酵液的制备:准确量取 4 mL 发酵液用二甲亚砜定容至 10 mL,0.45 μm 滤头过滤后进样,进样量为 10 μL 。色谱条件:C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流速 0.8 mL/min;柱温 25℃;进样体积 10 μL ;检测波长 254 nm;流动相体积比为 44:2:54 的甲醇-乙酸乙酯- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (5%) 溶液(磷酸 pH 为 2.7)。

1.3.5 没食子酸含量的测定 没食子酸对照品溶液制

备:精密称取没食子酸对照品 20 mg,用甲醇水(1:1)溶解并定容至 100 mL,配制成 200 mg/L 标准贮备液,稀释成 20、40、80、120、160 mg/L。样品溶液的制备:准确量取 4 mL 发酵液用 50% 甲醇水溶液定容至 10 mL,0.45 μm 滤头过滤后进样。色谱条件:C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇水:水(0.1% 磷酸)=10:90;流速 1.0 mL/min;检测波长 273 nm;柱温 35℃;进样量 20 μL 。

2 结果与分析

2.1 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中蛋白质含量的影响

由图 1 可知,随着发酵时间的增加,蛋白质含量变化呈先上升后下降趋势,在发酵第 8 天时蛋白质含量达到最高值,为 7.210 mg/g。在整个发酵过程中,蛋白质总体含量增加,表明利用微生物发酵可以提高其蛋白质含量,微生物发酵可以使果渣中不易被吸收的纤维素、果胶质、淀粉等复杂大分子物质,降解为易被吸收的小分子物质和大量菌体蛋白,杨锦才^[12]研究与该试验结果相近,其利用柑橘渣发酵生产蛋白饲料,发酵产物蛋白质含量显著提高。

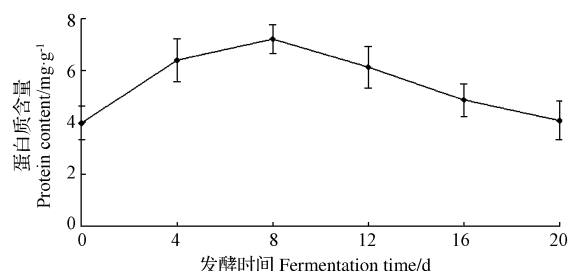


图 1 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effect of protein content of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

2.2 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中黄酮含量的影响

由图 2 可知,随着发酵时间的增加,黄酮含量先增高后降低,在发酵第 8 天时达到最高值,含量为 0.455 mg/g,随后黄酮含量逐渐下降,第 16 天后变化较平稳。

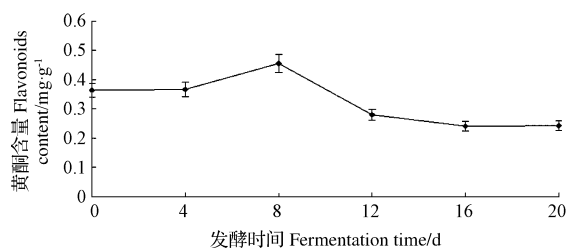


图 2 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中黄酮含量的影响

Fig. 2 Effect of flavonoids content of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

在发酵过程中黄酮含量增加表明利用微生物发酵可以提高黄酮的含量,微生物在生长过程中产生大量酶,通过酶促反应,可将细胞壁上的大分子分解,以利于黄酮的溶出,李艳宾等^[13]研究发现利用微生物发酵处理后的甘草中的黄酮得率也得到了提高。

2.3 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中花色苷含量的影响

由图3可见,随着发酵时间的增加,花色苷含量呈先上升后下降的趋势,发酵前4 d变化较小,在第12天时达到最高,含量为1.878 mg/g,分析花色苷增加的原因可能是在发酵过程中产生纤维素酶和果胶酶,通过酶解纤维素、半纤维素和果胶质的作用,使果渣的细胞壁破坏,使得吸附在纤维素、果胶质及细胞壁上的花色苷得以充分释放,使花色苷含量提高。刘春博^[14]在研究越橘果渣花色苷的提取工艺过程中,也发现利用微生物发酵越橘果渣可以提高花色苷的提取率。固态发酵12 d后花色苷呈现下降趋势可能是因为花色苷不稳定,发生氧化降解导致含量下降。

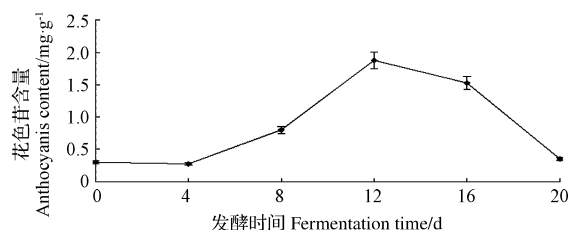


图3 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中花色苷含量的影响

Fig. 3 Effect of anthocyanins content of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

2.4 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中鞣花酸含量的影响

图4为鞣花酸标准品的液相色谱图,由图4可知,鞣花酸的保留时间为9.481 min。经试验配制不同浓度的标准品,建立了浓度与峰面积的线性回归方程为: $y = 1.4E + 5x - 87\ 819$, $R^2 = 0.9999$ 。

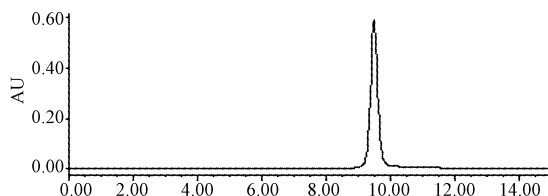


图4 鞣花酸标准品液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of ellagic acid acid of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

对香菇固态发酵蓝莓果渣过程中鞣花酸含量进行液相色谱检测,由图5可知,在整个发酵过程中,鞣花酸的含量逐渐下降。下降原因可能由于鞣花酸中含有许多易被氧化的酚羟基,在发酵过程中,鞣花酸被氧化消耗^[15],也可能是由于蓝莓中单宁含量较低,在固态条件

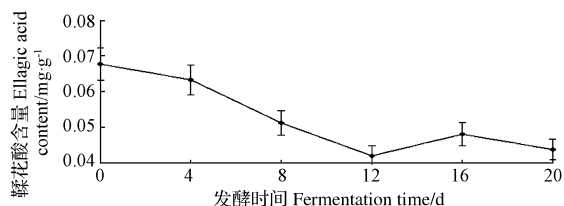


图5 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中鞣花酸含量的影响

Fig. 5 Effect of ellagic acid content of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

下,经过真菌的发酵得到的鞣花酸产量较低,使得最终鞣花酸含量降低^[16]。

2.5 香菇固态发酵对蓝莓果渣产物中没食子酸含量的影响

图6为没食子酸标准品的液相色谱图,由图6可知,没食子酸的保留时间为10.933 min。经试验配制不同浓度的标准品,建立了浓度与峰面积的线性回归方程为: $y = 67\ 707x - 59\ 209$, $R^2 = 0.9994$ 。

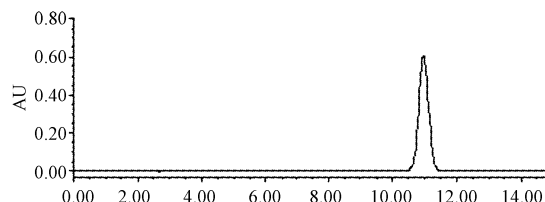


图6 没食子酸标准品液相色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of gallic acid of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

由图7可知,随着发酵时间的增加,总酚的含量先升高后降低,在发酵第8天时总酚含量达到最高值,为1.755 mg/g,随后一直比较稳定,在第16天时含量为1.571 mg/g,之后含量下降。在发酵过程中总酚含量增加的原因可能是由于香菇在固态发酵培养基上产生大量碳水化合物裂解酶β-葡萄糖苷酶,促进了多酚类物质的溶出。范凤玲等^[8]利用微生物发酵菠萝果渣促进多酚的溶出,同样表明在适宜的发酵工艺条件下,微生物发酵可以提高多酚类物质的含量。

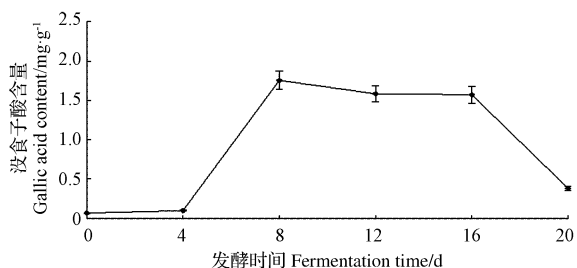


图7 香菇固态发酵蓝莓果渣产物中没食子酸含量的影响

Fig. 7 Effect of gallic acid content of blueberry pomace in fermentation by *Lentinus edodes*

3 结论与讨论

该试验研究了香菇固态发酵过程中蓝莓果渣活性

成分的变化,结果表明,发酵产物中蛋白质、黄酮和花色苷含量均呈现先增加后下降的变化,蛋白质含量和黄酮含量在第8天达到最高,分别为7.210 mg/g和0.455 mg/g,花色苷含量在发酵第12天时达到最高,为1.878 mg/g。高效液相色谱测定发酵产物中鞣花酸和没食子酸含量的变化,鞣花酸含量呈下降趋势,没食子酸含量呈先增加后下降,第8天达到最高值,为1.755 mg/g。可见,利用香菇固态发酵蓝莓果渣能够促进蛋白质、黄酮、花色苷和没食子酸含量的提高,这对研究食用真菌发酵蓝莓果渣代谢进程有所帮助,将会为实现野生浆果高附加值加工开辟新途径。微生物多样性可以影响系统的功能,因此在发酵体系中,可以通过混合菌种培养提高活性成分产量,在以后的研究工作中,还有待进一步对发酵工艺进行优化。

参考文献

- [1] Tian Q G, Gtusti M M, Stoner G D, et al. Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor ion analysis, common-neutral-loss analysis and selected reaction monitoring[J]. J Chromatogr A, 2005, 1091(12): 72-82.
- [2] 李丽敏, 赵春雷, 郝庆升. 中外蓝莓产业比较研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(23): 354-359.
- [3] 杨红澎. 蓝莓的活性成分、吸收代谢及其神经保护作用研究进展[J]. 卫生研究, 2010, 3(4): 525-527.
- [4] Schmidt B M, Erdman Jr J W, Lila M A. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines[J]. Cancer Letters, 2006, 231(2): 240-246.
- [5] Martineau L C, Couture A, Spoor D, et al. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait[J]. Phyto-medicine, 2006, 13(9): 612-623.
- [6] 王振宇, 杨谦. 微生物破壁法提取大花葵花色苷[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(1): 56-57.
- [7] 宋安东, 周利霞, 胡渝, 等. 产木质素降解酶类香菇菌株的筛选[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(3): 307-310.
- [8] 范凤玲, 张金泽, 薛毅. 少孢根霉发酵菠萝果渣促进粗多酚溶出的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 95-98.
- [9] 张琴, 李艳宾, 王文华, 等. 均匀设计优化微生物混合发酵提取甘草渣中黄酮物质工艺[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 229-232.
- [10] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2010: 190.
- [11] Chun O K, Kim D O, Lee C Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(27): 8067-8072.
- [12] 杨锦才. 柑橘渣发酵生产蛋白饲料的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [13] 李艳宾, 张琴, 陶呈宇, 等. 微生物发酵提高甘草渣中黄酮类物质提取率的研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(9): 156-159.
- [14] 刘春博. 越橘果渣花色苷提取工艺研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [15] 郭增军, 谭林, 徐颖, 等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 519-524.
- [16] 陆晶晶, 丁轲, 杨大进. 保健品功能因子鞣花酸研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 451-454.

Study on Active Ingredient of Blueberry Pomace in Solid-state Fermentation by *Lentinus edodes*

GUO Li, WANG Peng, MA Zhi-ting

(College of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua University, Suihua, Heilongjiang 152061)

Abstract: Taking blueberry pomace as raw material, fermented by *Lentinus edodes*, using the spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography determination, the change of fermentation product protein, flavonoids, anthocyanins, ellagic acid and gallic acid content were determined, the effect of solid-state fermentation by *Lentinus edodes* on active ingredient of blueberry pomace were studied. The results showed that the fermentation products using the spectrophotometric determination of protein, flavonoids and anthocyanin content changed, protein and flavonoid content in the first eight days reached the highest level, were 7.210 mg/g and 0.455 mg/g, anthocyanin content in the twelfth day of fermentation was 1.878 mg/g, reached the highest among the treatments. Ellagic acid content decreased, gallic acid content increased first and then decreased, reached the highest value for 1.755 mg/g in the eighth day.

Key words: *Lentinus edodes*; blueberry pomace; solid-state fermentation; active ingredient