

羊肚菌深层发酵条件优化及抗氧化活性的研究

廉涵宇^a, 郑志祺^a, 于晴^a, 王佳慧^a, 沙玉杰^{b*}, 曲杰^b

(德州学院 a. 别尔哥罗德食品科学学院; b. 生物物理研究院 山东省生物物理重点实验室, 山东 德州 253023)

摘要: 为提高羊肚菌发酵液的总抗氧化活性, 采用单因素和响应面法优化羊肚菌发酵培养基组成和培养条件。通过单因素实验, 分别改变发酵培养基中蔗糖、酵母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度以及 pH, 以发酵液的总抗氧化值为指标进行筛选。之后根据单因素实验结果, 选择 3 个主要影响因素进行响应面设计 (Box-Behnken) 实验, 并通过 Design-Expert 软件进行方差分析以及回归分析。结果表明, 发酵培养基成分为酵母粉 4.3 g/L、蔗糖 32 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L、 KH_2PO_4 1.4 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L 和 pH 为 6 时对羊肚菌发酵液抗氧化值的提升显著, 并且培养基配制成本低廉。该研究结果为羊肚菌发酵产业提供理论依据和实践指导, 有助于提高羊肚菌发酵产品的质量和抗氧化性能, 进一步推动羊肚菌在保健品、化妆品等领域的应用。

关键词: 羊肚菌; 抗氧化; 响应面法; 发酵; 培养基优化; 单因素实验

中图分类号: S182 文献标志码: A 文章编号: 1002-4026(2025)06-0069-08

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Research on optimization of deep fermentation conditions for *Morchella* and its antioxidant activity

LIAN Hanyu^a, ZHENG Zhiqi^a, YU Qing^a, WANG Jiahui^a, SHA Yujie^{b*}, QU Jie^b

(a. Belgorod College of Food Sciences; b. Shandong Key Laboratory of Biophysics, Institute of Biophysics, Dezhou University, Dezhou 253023, China)

Abstract: To improve the total antioxidant activity of fermented *Morchella*, single-factor experiments and response surface methodology were used to optimize the composition and culture conditions of the fermentation medium. In the single-factor experiments, the concentrations of sucrose, yeast powder, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, as well as pH value in the fermentation medium were changed, to screen for optimal conditions based on the total antioxidant value of the fermentation broth. Then, based on the results of the single-factor experiments, three main influencing factors were selected for the Box-Behnken response surface design, and variance analysis and regression analysis were carried out using Design-Expert software. The results showed that the optimal composition of the medium was: yeast extract 4.3 g/L,

收稿日期: 2024-12-20 修回日期: 2025-04-22

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31802309)

作者简介: 廉涵宇, 男, 本科生, 研究方向为食品微生物。

* 通信作者: 沙玉杰, 女, 博士, 副教授, 研究方向为应用微生物的开发与利用。

sucrose 32 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 1.4 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L, and a pH of 6. These conditions significantly enhanced the antioxidant activity of the fermentation broth and were cost-effective. The findings of this study provide theoretical and practical guidance for the *Morchella* fermentation industry, help to improve the quality and antioxidant performance of *Morchella* fermentation products, and further promote the applications of *Morchella* in health supplements, cosmetics, and other fields.

Key words : *Morchella*; antioxidant; response surface methodology; fermentation; medium optimization; single-factor experiment

羊肚菌作为一种可食用蘑菇以其独特的口感和良好的保健功效而闻名。它在中医中被用于治疗消化不良、改善肠胃、化痰利气、补脑提神,同时还具有抗疲劳性、胃保护、养肝、护肝等作用^[1-4],常被用于美食和保健品。然而,野生羊肚菌很难培养而且价格昂贵。羊肚菌的发酵液与野生羊肚菌相比具有相似的生物活性化合物,如多糖^[5]、氨基酸^[6]、多酚^[7]、维生素^[8]和微量元素等,但是发酵液具有易获得、成本低的优势,因此用羊肚菌发酵液获得生物活性物质来解决野生羊肚菌生产限量的问题不失为一种较好的选择^[9-10]。羊肚菌因含丰富的多糖而表现出良好的抗氧化特性,目前研究主要集中于该功能在抗肿瘤及免疫调节方面的作用^[11-12],且在其他方面的研究较少。本团队的前期研究结果表明护肤品中羊肚菌发酵液的适量添加对皮肤具有较好的美白舒缓和修复功效^[13],但羊肚菌深层发酵的最优培养基组成成分和培养条件仍需进一步优化以指导生产,因此本文旨在以总抗氧化能力为响应值,探讨羊肚菌液体发酵的最优培养基组成和培养。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

1510 全波长酶标仪, Thermo Fisher 公司; TGL-16M 高速冷冻离心机, 湖南迈克实验仪器有限公司; IHT-SDC超净工作台, 济南杰康净化设备厂; ZHWY-211B 全温度恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司。

1.2 材料、培养基与试剂

实验所用羊肚菌来自德州学院生物物理研究院实验室保存样本。

真菌营养琼脂(综合 PDA)和真菌营养肉汤(综合 PDB); 购买自青岛海博生物科技有限公司。

发酵培养基: 蔗糖 40 g, 酵母粉 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.48 g, H_2O 1 000 mL, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, pH 5.5。酵母粉为生化纯, 英国 Oxoid; 其余试剂为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 实验方法

2.1.1 羊肚菌种子液培养制备及处理

将斜面保存的羊肚菌菌丝接种入综合 PDB 中, 以 25 °C, 160 r/min 培养 6 d 后, 将 PDB 和菌丝球于超净工作台上进行匀浆, 制备成羊肚菌种子液, 按照 1% 的接种量接入发酵培养基进行发酵。

2.1.2 单因素实验

(1) 蔗糖质量浓度单因素实验

将发酵培养基中的蔗糖质量浓度按照 30、35、40、45、50 g/L 进行添加, 发酵培养基其余成分不变, 培养条件同种子液培养条件, 以发酵液总抗氧化值为指标, 探讨蔗糖质量浓度对发酵液总抗氧化值的影响。

(2) 酵母粉质量浓度单因素实验

将发酵培养基中的酵母粉质量浓度按照 3、4、5、6、7 g/L 进行添加, 发酵培养基其余成分不变, 培养条件同种子液培养条件, 以发酵液总抗氧化值为指标, 探讨酵母粉质量浓度对发酵液总抗氧化值的影响。

(3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度单因素实验

将发酵培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度按照 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g/L 进行添加, 发酵培养基其余成分

不变,培养条件同种子液培养条件,以发酵液总抗氧化值为指标,探讨 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度对发酵液总抗氧化值的影响。

(4) KH_2PO_4 质量浓度单因素实验

将发酵培养基中的 KH_2PO_4 质量浓度按照0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L进行添加,发酵培养基其余成分不变,培养条件同种子液培养条件,以发酵液总抗氧化值为指标,探讨 KH_2PO_4 质量浓度对发酵液总抗氧化值的影响。

(5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度单因素实验

将发酵培养基中的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度按照0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L进行添加,发酵培养基其余成分不变,培养条件同种子液培养条件,以发酵液总抗氧化值为指标,探讨 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对发酵液总抗氧化值的影响。

(6) pH单因素实验

发酵培养基成分不变,其pH分别调节为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,培养条件同种子液培养条件,以发酵液总抗氧化值为指标,探讨pH对发酵液总抗氧化值的影响。

2.1.3 总抗氧化值测定

利用总抗氧化能力试剂盒进行发酵上清液抗氧化值的测定,该试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司,其操作方法严格按照试剂盒中的说明书进行。

2.1.4 响应面设计及分析

根据单因素实验结果选择3个主要影响发酵液抗氧化值的因素,通过Design-Expert软件进行实验设计并配制相应的发酵培养基,以发酵前的培养液作为空白对照,发酵完成后测定发酵液的抗氧化值。利用Design-Expert软件的方差分析和比较,选取发酵培养基及培养条件的最适发酵配方和发酵条件。

2.2 结果与分析

2.2.1 培养基不同成分含量对羊肚菌发酵液抗氧化能力的影响

(1) 蔗糖质量浓度对羊肚菌抗氧化能力的影响

从图1可以看出,蔗糖质量浓度在35~45 g/L时,羊肚菌发酵液抗氧化能力较强且相互之间差距不大。表明在这个范围内蔗糖能提供足够的能量支持羊肚菌的生长,同时也不会对其抗氧化能力造成负面影响。而在蔗糖质量浓度30 g/L和50 g/L时发酵液的抗氧化值明显低于其余三个条件。由此可得出无论蔗糖质量浓度过高还是过低都对发酵液的抗氧化能力有较大影响。该研究结果与杨建等^[10]相似,蔗糖为羊肚菌的生长提供必要的碳源,含量过少时无法满足菌体生长需要,但是过量时菌体生长过快会影响代谢产物积累甚至引起菌体自溶^[10]。

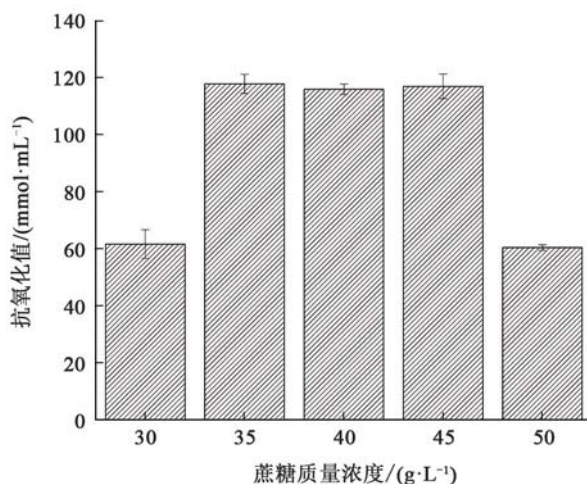


图1 不同发酵培养基中不同质量浓度蔗糖对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.1 Impacts of different concentrations of sucrose in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

(2) 酵母粉质量浓度对于羊肚菌抗氧化能力的影响

酵母粉成分比较复杂,除提供必要的氮源外还可以提供少量的微量元素等。由图2可以得出,当酵母粉质量浓度为7 g/L时其羊肚菌发酵液的抗氧化值为174.657 mmol/mL,是其余酵母粉浓度发酵培养基中羊肚菌抗氧化值的2至3倍。由此可以得出,发酵培养基中酵母粉的质量浓度对羊肚菌的抗氧化能力具有较大影响。

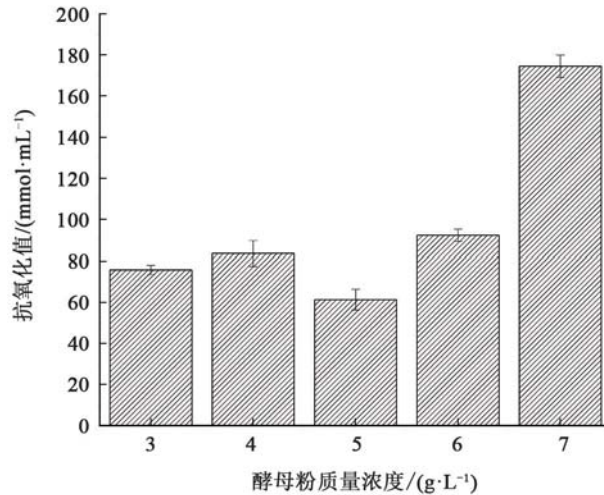


图2 不同发酵培养基中不同质量浓度酵母粉对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.2 Impacts of different concentrations of yeast powder in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

(3) (NH₄)₂SO₄质量浓度对于羊肚菌抗氧化能力的影响

由图3可以看出,发酵培养基中(NH₄)₂SO₄质量浓度在2 g/L和2.5 g/L时的抗氧化值高于127 mmol/mL,比(NH₄)₂SO₄质量浓度在3.0、3.5、4.0 g/L时其抗氧化值高。由此可以看出当发酵培养基中(NH₄)₂SO₄质量浓度较低时发酵液的抗氧化值能力较强,其中发酵培养基中(NH₄)₂SO₄的质量浓度为2.5 g/L时发酵液的抗氧化值最高。这表明在这个质量浓度下,羊肚菌能够更好地利用(NH₄)₂SO₄作为营养源,从而提高发酵液的抗氧化值。

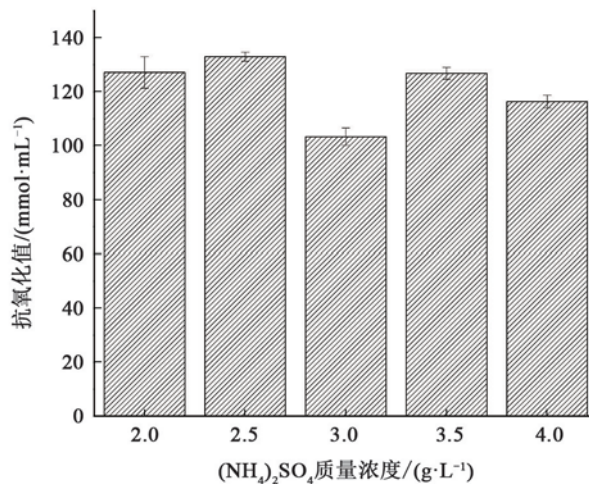


图3 不同发酵培养基中不同质量浓度(NH₄)₂SO₄对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.3 Impacts of different concentrations of (NH₄)₂SO₄ in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

(4) KH₂PO₄质量浓度对于羊肚菌抗氧化能力的影响

由图4可得出结论,发酵培养基中KH₂PO₄质量浓度在0.5、1.5、2.0、2.5 g/L时发酵液的抗氧化值均低于KH₂PO₄质量浓度在1 g/L时的发酵液的抗氧化值,但KH₂PO₄质量浓度在1 g/L时发酵液的抗氧化值仍低于120 mmol trolox/mL,说明KH₂PO₄的质量浓度还具有较大优化空间。国内学者也对羊肚菌液体发酵产物抗

氧化活性进行了研究,如刘倩等^[9]发现当 KH_2PO_4 质量分数在 0.25% 时羊肚菌发酵液多酚含量最高且具有较高的抗氧化活性。虽然选用的 KH_2PO_4 质量浓度不同,但是本研究也发现了相似的实验现象,即 KH_2PO_4 在低质量浓度时随着其质量浓度的增加,羊肚菌发酵液抗氧化活性不断增加,但当超过一定值后羊肚菌发酵液抗氧化活性反而会降低,这主要是因为 KH_2PO_4 在液体发酵过程中起到提高渗透压和调节氧化还原电位的作用,其少量的添加可以促进发酵产物的产生,过量的添加反而会抑制菌丝的生长和产物的产生^[9]。

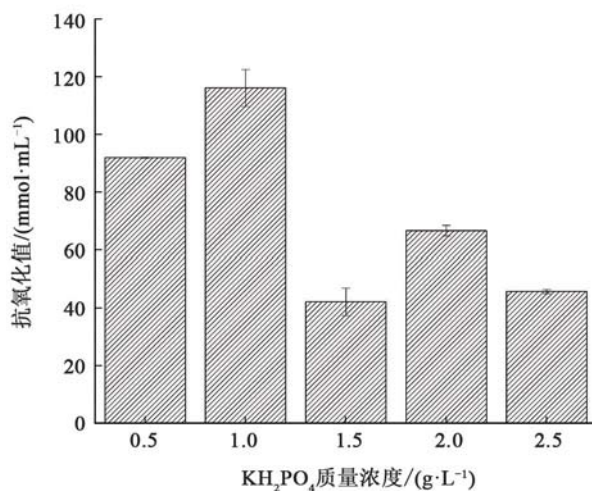


图4 不同发酵培养基中不同质量浓度 KH_2PO_4 对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.4 Impacts of different concentrations of KH_2PO_4 in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

(5) 不同 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量分数对于羊肚菌抗氧化能力的影响

由图5可以看出,发酵培养基中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度在 0.5 g/L 和 1.0 g/L 时发酵液的抗氧化值明显低于 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 1.5、2.0、2.5 g/L 时发酵液的抗氧化值,但当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度高于 1.5 g/L 时,发酵液抗氧化值有所降低但幅度不大,该结果与刘倩等^[9]的研究结果类似, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对羊肚菌发酵液抗氧化活性的影响不及磷酸盐。

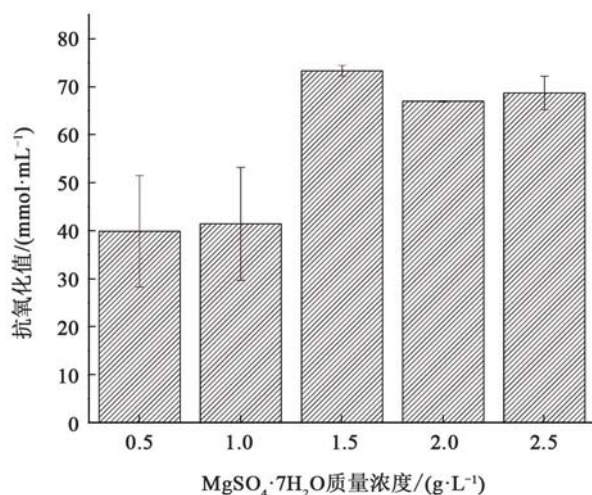


图5 不同发酵培养基中不同质量浓度 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.5 Impacts of different concentrations of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

(6) 不同 pH 对于羊肚菌抗氧化能力的影响

由图6可以看出,发酵培养基初始的 pH 分别为 5 和 6 时发酵液的抗氧化值最低和最高,由于羊肚菌的发酵培养基成分在溶解于水中时其 pH 为 6,综合考虑羊肚菌发酵培养基的制备及发酵液的抗氧化值,选定羊肚菌发酵时其初始 pH 为 6。

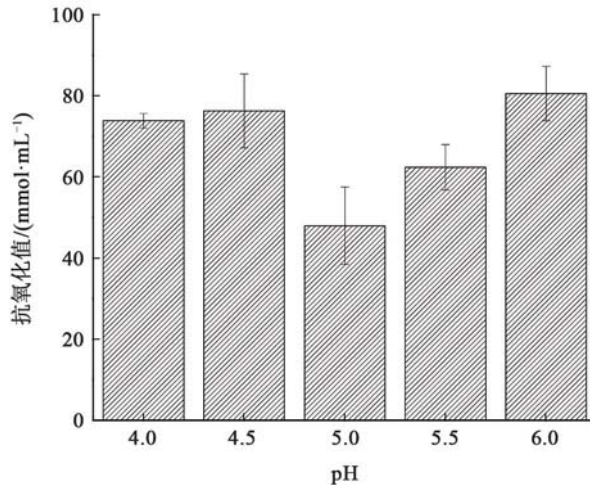


图6 不同发酵培养基中不同 pH 对羊肚菌抗氧化能力的影响

Fig.6 Impacts of different pH values in different fermentation media on the antioxidant performance of *Morchella*

2.2.2 响应面设计 (Box-Behnken) 及结果

(1) 实验设计

根据单因素实验,确定影响羊肚菌发酵液抗氧化值3个主要的因素及各自的取值,设计 Box-Behnken 实验,用来考察这3个因子的交互作用和最佳水平。对这3个显著因子的设定水平及编码见表1,实验设计及结果见表2。

表1 Box-Behnken 实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment

编码水平	实验因素		
	A[m(酵母粉)/g]	B[m(蔗糖)/g]	C[m(KH ₂ PO ₄)/g]
-1	3	30	1.0
0	5	40	1.5
1	7	50	2.0

表2 发酵培养基成分及培养条件回归分析与结果

Table 2 Regression analysis and results of the fermentation medium composition and culture conditions

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	3.157×10 ⁹	6	5.262×10 ⁸	3.91	0.039 8	显著
A	1.591×10 ⁹	1	1.591×10 ⁹	11.83	0.008 8	
B	1.995×10 ⁸	1	1.995×10 ⁸	1.48	0.257 9	
C	6.795×10 ⁶	1	6.795×10 ⁶	0.050 5	0.827 8	
AB	1.034×10 ⁹	1	1.034×10 ⁹	7.69	0.024 2	
AC	2.200×10 ⁸	1	2.200×10 ⁸	1.64	0.236 7	
BC	1.058×10 ⁸	1	1.058×10 ⁸	0.787 2	0.400 8	
残差	1.076×10 ⁹	8	1.345×10 ⁸			
失拟项	6.983×10 ⁸	6	1.164×10 ⁸	0.616 8	0.726 4	不显著
纯误差	3.774×10 ⁸	2	1.887×10 ⁸			显著
总离差	4.233×10 ⁹	14	5.262×10 ⁸			

通过方差分析,可以看出模型 p 值($p=0.039 8<0.05$),达到差异显著水平,因此该响应面模型有意义。失拟项检验的 $p=0.726 4$ (不显著)且该模型的精密度 $7.62>4$,表明实验数据可信,该模型可以用于预测。

利用 Design-Expert 软件进行回归分析,得到二次回归模型(Y 为抗氧化值):

$$Y=65.11+14.10A+4.99B-0.921 6C+16.08AB+7.42AC+5.14BC。 \quad (1)$$

回归模型的 $R^2=89.90\%$,说明该模型可以解释 89.90%实验所得羊肚菌发酵液抗氧化值的变化,从而说明该模型与实际拟合较好,可用于羊肚菌发酵液抗氧化值的分析与预测。

通过回归模型方程构建酵母粉、蔗糖和 KH_2PO_4 质量浓度对羊肚菌发酵液抗氧化值影响的曲面图和等值线图,如图 7~9 所示,从这 3 个图中可以看出三因子两两之间存在着一定的交互作用。由图 7 可知,在所设定的质量浓度范围内,酵母膏和蔗糖质量浓度对发酵液的抗氧化值影响较大,由图 8、图 9 可知,蔗糖与 KH_2PO_4 两因子之间交互作用在一定范围内较为明显。

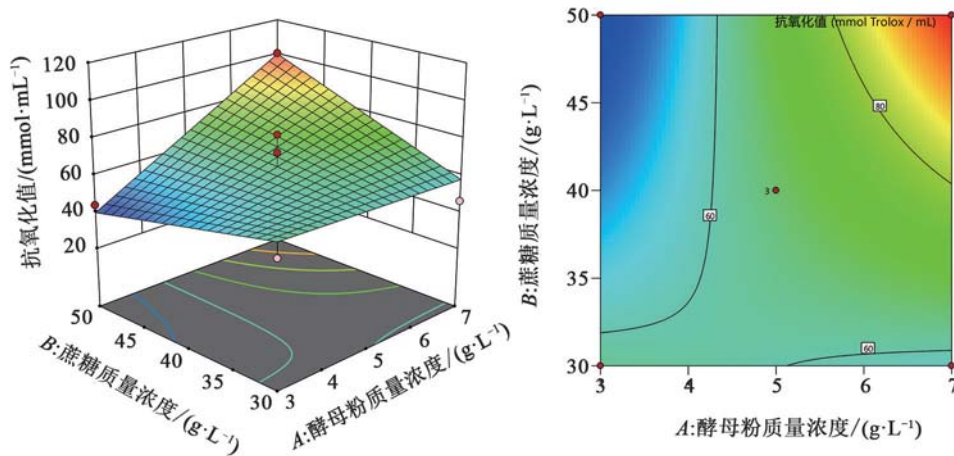


图 7 酵母粉、蔗糖对羊肚菌发酵液抗氧化值影响的曲面图和等值线图

Fig.7 Surface and contour plots of the impacts of yeast powder, sucrose and KH_2PO_4 on the antioxidant performance of *Morchella*

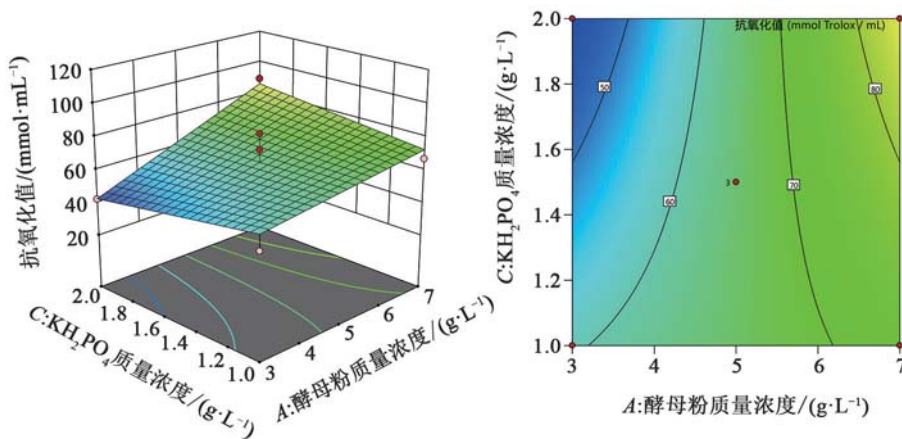


图 8 酵母粉、磷酸二氢钾对羊肚菌发酵液抗氧化值影响的曲面图和等值线图

Fig.8 Surface and contour plots of the impacts of yeast powder and KH_2PO_4 on the antioxidant performance of *Morchella*

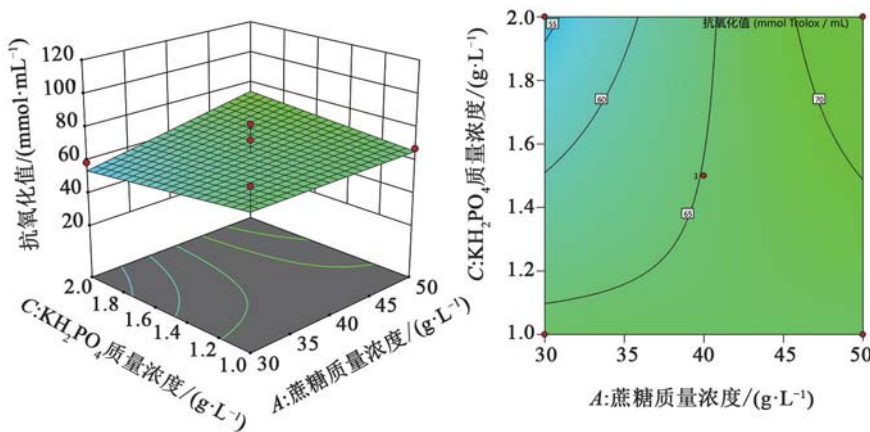


图 9 蔗糖、磷酸二氢钾对羊肚菌发酵液抗氧化值影响的曲面图和等值线图

Fig.9 Surface and contour plots of the impacts of sucrose and KH_2PO_4 on the antioxidant performance of *Morchella*

(2) 模型验证

为验证模型准确性,分别对优化前后的发酵液抗氧化值进行了对比,初始发酵条件下发酵液的抗氧化值为 55.144 mmol/mL,优化后发酵液的抗氧化值为 61.145 mmol/mL 相较优化前增长了6.001 mmol/mL。并且优化后的发酵液抗氧化值与预测值 61.657 mmol/mL 非常接近,说明模型的设计是合理有效的。

3 结论

本研究采用响应面法对羊肚菌的发酵条件进行了优化,优化后发酵上清液的抗氧化值较优化前提高了 6.001 mmol/mL,优化后的培养基组成及条件为酵母粉 4.3 g/L、蔗糖 32 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g/L、 KH_2PO_4 1.4 g/L、pH 为 6。本文的研究结果在羊肚菌大规模深层次发酵方面具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1]李文佳,田野,高昊,等.羊肚菌化学成分及药理活性研究进展[J].菌物研究,2017,15(2):144-150. DOI: 10.13341/j.jfr.2014.1123.
- [2]蔡英丽,马晓龙,刘伟.羊肚菌营养价值与保健功能综述[J].食药用菌,2021,29(1):20-27.
- [3]李华,张运畅,姜伊,等.羊肚菌抗运动疲劳生理功能研究进展[J].赤峰学院学报(自然科学版),2021,37(12):36-39. DOI:10.13398/j.cnki.issn1673-260x.2021.12.009.
- [4]NITHA B, FIJESH P V, JANARDHANAN K K. Hepatoprotective activity of cultured *Mycelium* of Morel mushroom, *Morchella esculenta*[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2013, 65(1/2): 105-112. DOI: 10.1016/j.etp.2011.06.007.
- [5]CAI Z N, LI W, MEHMOOD S, et al. Structural characterization, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of a heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Morchella esculenta*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 195: 29-38. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.069.
- [6]ZHANG Q, WU C E, FAN G J, et al. Characteristics and enhanced antioxidant activity of glycosylated *Morchella esculenta* protein isolate[J]. Food Science and Technology, 2018, 38(1): 126-133. DOI: 10.1590/1678-457x.01917.
- [7]卢可可,谭玉荣,吴素蕊,等.不同产地尖顶羊肚菌多酚组成及抗氧化活性研究[J].食品科学,2015,(7):6-12.
- [8]顾可飞,李亚莉,刘海燕,等.牛肝菌、羊肚菌营养功能特性及利用价值浅析[J].食品工业,2018,39(5):287-291.
- [9]刘倩,李正,欧佳琪,等.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[J].中国食品学报,2023,23(10):41-50. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.005.
- [10]杨建,杨玉红.响应面法优化羊肚菌菌丝体发酵培养基及培养条件[J].包装与食品机械,2024,42(3):1-7.
- [11]CHEN G L, LIANG Y Q, WANG D D, et al. Polysaccharide extracted from *Morchella esculenta* inhibits carrageenan-induced thrombosis in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 97: 105235. DOI: 10.1016/j.jff.2022.105235.
- [12]GUO Q, LIANG S M, XIAO Z C, et al. Research progress on extraction technology and biological activity of polysaccharides from Edible Fungi: A review[J]. Food Reviews International, 2023, 39(8): 4909-4940. DOI: 10.1080/87559129.2022.2039182.
- [13]印辉辉,林圣伟,廉涵宇,等.羊肚菌发酵液的美白及舒缓修复功效研究[J].日用化学品科学,2024,47(7):49-54.

