

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2025.01.005

引用格式: 李玉婷, 陈梦, 李安妮, 等. 细脚虫草多糖发酵条件优化及抗氧化活性[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(1): 31-40.

细脚虫草多糖发酵条件优化及抗氧化活性

李玉婷¹, 陈梦², 李安妮¹, 陈志豪¹, 夏艳秋¹, 朱强¹

(1. 江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005;

2. 连云港市食品药品检验检测中心, 江苏连云港 222000)

摘要: 采用水提醇沉工艺提取细脚虫草多糖 (*Cordyceps tenuipes* polysaccharides, CTP), 以多糖含量为响应值, 在单因素试验基础上, 利用 Box-Behnken 中心组合进行四因素三水平试验设计优化细脚虫草多糖发酵培养工艺, 并考察分级醇沉后多糖的体外抗氧化活性。最佳培养基组成为: 蔗糖 4%, 蛋白胨 1.5%, 磷酸二氢钾 0.12% 和水蛭 0.46%; 同时接种量 7.3%、装液量 36%, 初始 pH 4.2, 发酵温度 25 °C 和发酵时间 9 d, 在此条件下菌丝体粗多糖含量为 62.08 mg/g, 比优化前提高了 16.58%。多糖体外抗氧化试验显示, 分级醇沉后的 CTP70 组分的抗氧化效果最佳, 且相较于优化前的 CTP0 组分, 在 5 mg/mL 的浓度下对 DPPH 自由基清除率提高了 22.54%、·OH 自由基清除率提高了 22.38%, 铁离子还原能力提高了 51.78%。实验表明, 添加水蛭优化后的细脚虫草发酵培养条件有效提高细脚虫草菌丝体多糖产量, 同时, CTP70 组分表现出良好的抗氧化活性。

关键词: 细脚虫草; 多糖; 抗氧化活性; 响应面

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248 (2025) 01-0031-10

Optimization of fermentation conditions and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps tenuipes*

LI Yuting¹, CHEN Meng², LI Anni¹, CHEN Zhihao¹, XIA Yanqiu¹, ZHU Qiang¹

(1. School of Marine Food and Biological Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang, 222000, China)

Abstract: *Cordyceps tenuipes* polysaccharides (CTP) were extracted by water abstraction and alcohol precipitation, the polysaccharide content was used as the response value, and the fermentation process of *Cordyceps tenuipes* polysaccharides was optimized by Box-Behnken central combination on the basis of single factor test, and the antioxidant activity of polysaccharides after graded alcohol precipitation was investigated. The optimal medium composition was: 4% of sucrose, 1.5% of protein, 0.12% of KH_2PO_4 and 0.46% of leech. While the inoculum was 7.3%, liquid filling volume was 36%, initial pH was 4.2, 25 °C and time of 9 d, the mycelia polysaccharides content was 62.08 mg/g, which was 16.58% higher than before. The in vitro antioxidant test of polysaccharides showed that the CTP70 component after graded alcohol precipitation had the best antioxidant effect. Compared with the CTP0 component before optimization, at a concentration of 5 mg/mL, the DPPH radical scavenging rate increased by 22.54%, the ·OH radical scavenging rate increased by 22.38%, and the iron ion reduction ability increased by 51.78%. The experiments

收稿日期: 2024-04-22; 修订日期: 2024-05-16

作者简介: 李玉婷 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术, (E-mail) 2021221235@jou.edu.cn。

通信作者: 朱强 (1979—), 男, 高级实验师, 硕士, 研究方向为食品生物技术, (E-mail) zq7685@163.com。

showed that the optimized fermentation culture conditions with leech addition effectively improved the mycelia polysaccharides production, and CTP70 exhibited good antioxidant activity.

Key words: *Cordyceps tenuipes*; polysaccharides; antioxidant activity; response surface

0 引言

细脚虫草 (*Cordyceps tenuipes* (Peck) Kepler, B.Shrestha & Spatafora) 是一种分布广泛的药用虫生真菌, 其同物异名为高雄山虫草 (*Cordyceps takaomontana*)、细脚棒束孢 (*Isaria tenuipes*) 和细脚拟青霉 (*Paecilomyces tenuipes*)^[1]。细脚虫草有富含多糖、多肽、核苷酸、有机酸等生物活性成分^[2], 其中虫草多糖具有抗肿瘤、抗抑郁、抗氧化、调节免疫等生物活性^[3]。国外对细脚虫草的开发利用较早, 东亚一些国家已将其作为冬虫夏草的替代品, 广泛应用于新兴的保健食品生产领域^[4]。

王清^[5]利用芦笋制作液体培养基, 可促进细脚虫草菌丝体多糖、皂苷和黄酮等活性成分含量的提高; Turk 等^[6]研究表明, 使用高蛋白的昆虫作为虫草菌培养基, 可提高虫草素产量及其他目标产物的含量。水蛭作为传统的中药材, 其体内富含蛋白质和多肽等大分子类化合物, 及氨基酸、甾体和糖脂等小分子化合物^[7], 可作为液体发酵虫草真菌的优质营养来源。在前期试验中发现, 适量添加水蛭粉用于细脚虫草的液体培养, 有利于提高菌丝体和多糖的产量。多糖作为天然的抗氧化剂, 在食品、化妆品和保健品领域备受关注^[8-9], 因此, 从细脚虫草中开发天然的抗氧化剂具有重要的社会意义和经济价值。

目前, 国内外对于细脚虫草多糖的报道多集中于化学结构、活性成分和药理机制等领域^[10-12], 而针对菌丝体发酵培养与多糖的抗氧化活性方面研究较少。本研究拟采用单因素试验和响应面优化确定细脚虫草产多糖的最适发酵工艺, 并考察分级醇沉多糖组分的 DPPH 自由基清除率、·OH 自由基清除率和铁离子还原能力, 以期对细脚虫草多糖的药理作用和理论研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种和材料

细脚虫草 ZXC-18: 课题组从连云港豆丹养殖基

地的豆丹中分离获得, 经形态学、分子生物学鉴定为细脚虫草, 基因登录号为 OP159391, 现保藏于江苏海洋大学海洋食品与生物工程实验室。

水蛭: 购于江苏省连云港市药店。

1.1.2 主要试剂

葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖、果糖、蛋白胨、酵母粉、尿素、氯化铵、硫酸铵、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁、氯化钠等均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

DPPH (纯度 96%, 上海麦克林生化科技有限公司)、TPTZ 溶液 (10 mmol/L, 江苏连云港伊势久生物科技有限公司有限公司)。三氯化铁、抗坏血酸、水杨酸、苯酚、硫酸、石油醚、无水乙醇、盐酸、过氧化氢、氯仿和正丁醇等均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器

Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司); T600 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); RV10 旋转薄膜蒸发仪 (艾卡仪器设备有限公司)。

1.2 菌丝体培养及多糖提取工艺

1.2.1 培养基

(1) 菌种活化培养基: PDA 培养基。

(2) 种子培养基: PD 培养基, 在 250 mL 摇瓶中装液量为 40%, 于 121 °C 灭菌 30 min。

(3) 基础培养基: 葡萄糖 4%, 蛋白胨 1%, 酵母粉 1%, 磷酸二氢钾 0.15%, 硫酸镁 0.15%, 初始 pH, 于 115 °C 灭菌 30 min 得基础培养基。

(4) 发酵培养基: 水蛭干燥粉碎, 80 目过筛备用。以基础培养基为基准, 通过改变培养体系中单一营养底物 (碳源、氮源、无机盐或水蛭的添加量), 或改变单一发酵条件 (接种量、装液量、初始 pH、发酵温度或发酵时间), 于 121 °C 灭菌 30 min 得若干发酵培养基。

1.2.2 接种与培养

取细脚虫草斜面保藏菌种, 转接至 PDA 平板, 25 °C 培养 7 d, 活化后的菌种切 5 个 0.5 cm² 的菌块, 转至 150 mL 的种子培养基, 于 25 °C、150 r/min

条件下培养 4 d, 制成种子液。

基础发酵条件: 250 mL 摇瓶中装液量 40%, 接种量 8%, 初始 pH, 发酵温度 25 °C, 摇床转速 150 r/min, 发酵时间 7 d, 得细脚虫草发酵液。

1.2.3 生物量测定

细脚虫草发酵液于 10 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀, 50 °C 烘干至恒质量, 得细脚虫草菌丝体生物量。

1.2.4 多糖提取与测定

(1) 粗多糖提取^[13]: 菌丝体与超纯水料液比为 1:40 (g/mL), 80 °C 水浴 90 min, 浸提 3 次, 离心取上清, 合并滤液, 浓缩至 1/5, 加入约 3 倍体积无水乙醇, 于 4 °C 静置醇沉 12 h, 收集沉淀干燥, 制得细脚虫草菌丝体粗多糖 (以下简称多糖)。将基础培养基得到的多糖定义为 CTP0, 经响应面优化多糖预测值和实际值分别为 CTPB 和 CTPA。

(2) 多糖分级醇沉^[14]: 采用索氏提取法将上述响应面优化得到的多糖去除多余脂肪, 多糖自然风干; 利用 Sevag 法去蛋白, 多糖加超纯水复溶, 于多糖溶液中加入其体积约 1/3 的氯仿-正丁醇 (体积比为 4:1) 混合液, 震荡 10 min, 5 000 r/min 离心, 去除沉淀, 取上清液, 重复操作 3 次至无絮状沉淀, 离心, 取上清液; 上清液中加入无水乙醇, 使得溶液中的乙醇体积分数达到 20%, 4 °C 静置醇沉 24 h, 离心 (5 000 r/min, 15 min, 4 °C), 收集沉淀, 定义为 CTP20。在上步骤的上清液中继续加入无水乙醇, 使乙醇的体积分数达到 30%, 同法制得 CTP30; 同理制得 CTP40, CTP50, CTP60, CTP70 和 CTP80。将分级醇沉的 7 个组分多糖依次用无水乙醇洗涤、丙酮洗涤, 离心去上清, 干燥得精制多糖。

(3) 多糖含量测定: 采用苯酚硫酸法^[15]。利用葡萄糖标准品绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y_1 = 0.006 1X - 0.012 6$, 相关系数 $R^2 = 0.999 2$ 。根据葡萄糖标准曲线计算得到样品多糖含量。

1.3 培养基优化

1.3.1 单因素试验

以多糖含量为响应值, 以“1.2.1”基础培养基和“1.2.2”基础发酵条件为基准, 通过单因素试验的单一变量比较方法, 分别研究最适碳源种类及添加量、氮源种类及添加量、无机盐种类及添加量、水蛭添加量、装液量、接种量、初始 pH、发酵温度和发酵时间对细脚虫草多糖合成的影响, 并对所得 9 个因素进行单因素方差分析, 确定各因素对响应值的影响程度。

1.3.2 响应面试验设计

根据单因素试验方差分析结果, 筛选对响应值影响较大的因素, 采用四因素三水平的 Box-Behnken 中心组合试验设计, 进行 29 个试验点的二次回归组合试验, 确定最佳发酵工艺, 并验证响应面理论最佳数据, 对比 3 次重复试验实际获得的多糖含量平均值与模型预测值, 验证回归方程的准确性。

1.4 体外抗氧化活性评价

1.4.1 DPPH 自由基清除率的测定

参照符群等^[16]的方法, CTP0 为对照组, Vc 为阳性对照。DPPH 自由基清除率计算公式为

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为待测样液与 DPPH 反应试剂混合后的吸光度; A_2 为待测样液与无水乙醇混合的吸光度; A_0 为蒸馏水与 DPPH 反应试剂混合的吸光度。

1.4.2 ·OH 自由基清除率的测定

参照蒋玉珍等^[17]的方法, CTP0 为对照组, Vc 为阳性对照。·OH 自由基清除率计算公式为

$$\cdot\text{OH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 为待测样液与反应试剂混合后溶液的吸光度; A_2 为 (A_1) 反应体系中蒸馏水替换过氧化氢溶液的吸光度; A_0 为 (A_1) 反应体系中蒸馏水替换样品溶液的吸光度。

1.4.3 铁离子还原能力的测定

参照张杉杉等^[18]的方法, CTP0 为对照组, Vc 为阳性对照。经试验得到 FeSO_4 标准曲线为 $Y_2 = 0.003 7X + 0.052 3$, $R^2 = 0.999 1$ 。经试验得到 FeSO_4 标准曲线为 $Y_2 = 0.003 7X + 0.052 3$, $R^2 = 0.999 1$ 。试样含量计算公式为

$$X_1 = V \times \frac{c}{m} \quad (3)$$

式中: X_1 为样品中 FeSO_4 的含量, $\mu\text{mol/g}$; V 为待测样液定容后的体积, L; c 为待测样液中 FeSO_4 的浓度, $\mu\text{mol/L}$; m 为样品的质量, g。

1.5 数据统计与分析

每组试验平行测定 3 次。利用 Design-Expert 13.0.1 和 SPSS 27.0.1 进行实验设计和数据分析, Origin 9.8 软件作图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

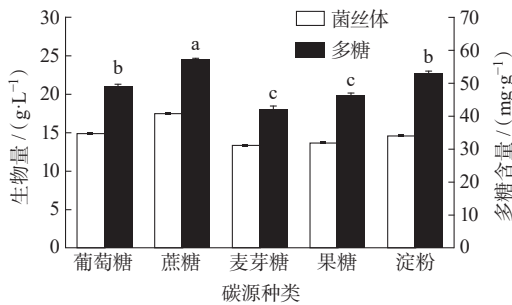
2.1.1 单因素试验

经前期试验发现, 仅从生物量不能直观反应出培

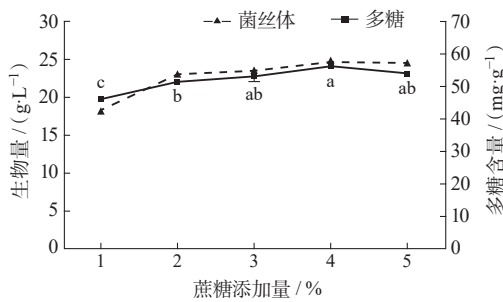
培养基对菌丝体多糖的影响。因此,本试验以生物量为参考,多糖含量为目的指标,试验结果见图1~图9。

由图1~图4可知,最佳培养基条件为:碳源为蔗糖,添加量为4%;氮源为蛋白胨,添加量为2.5%;无机盐为磷酸二氢钾,添加量为0.15%;水蛭添加量为0.5%。由试验结果可知,培养基营养底物直接影响细脚虫草多糖的合成效果,其中影响较大的因素为磷酸二氢钾和水蛭添加量,由于无机盐是菌丝体生长的限制性因素,而水蛭则作为营养基质为细脚虫草补充生长因子等重要营养底物,应进一步开展浓度试验以考察其最适用量^[19]。

由图5~图9可知,细脚虫草发酵工艺单因素试验最佳结果为:接种量8%、装液量36%、初始pH4.5、发酵温度25℃以及发酵时间为9d。由试验结果可知,发酵条件试验中对细脚虫草多糖合成影响较大的因素为接种量和初始pH。适当的接种量有利于真菌的生长和代谢,从而产生更多的发酵产物^[20]。然而,接种量过大或过小都会导致多糖的产量下降或质量不佳。真菌细胞在不同的pH下展现出不同的生长速率,通常在中性至微酸性的pH是最适合真菌生长环境。因此,pH过高或过低,可能会导致菌丝体生长受到抑制或死亡,从而影响多糖的合成。



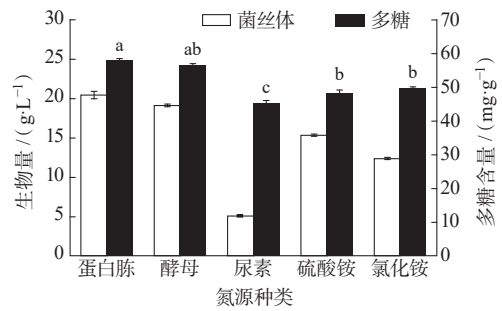
a 碳源种类对细脚虫草菌丝体及多糖的影响



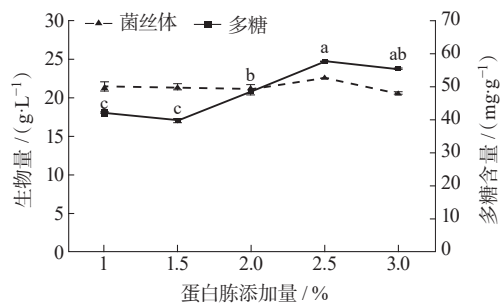
b 蔗糖浓度对细脚虫草菌丝体及多糖的影响

图1 碳源种类和浓度对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.1 Effect of carbon source species and concentration on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*



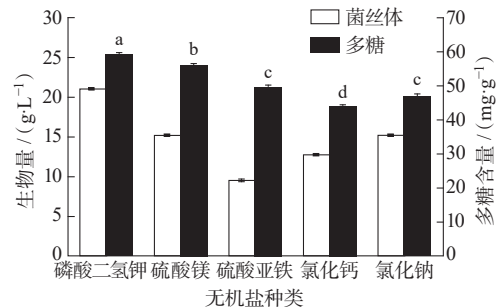
a 氮源种类对细脚虫草菌丝体及多糖的影响



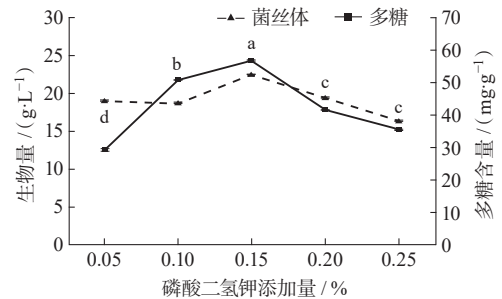
b 蛋白胨浓度对细脚虫草菌丝体及多糖的影响

图2 氮源种类和浓度对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.2 Effect of nitrogen source species and concentration on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*



a 无机盐种类对细脚虫草菌丝体及多糖的影响



b 磷酸二氢钾浓度对细脚虫草菌丝体及多糖的影响

图3 无机盐种类和浓度对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.3 Effect of inorganic salt species and concentration on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

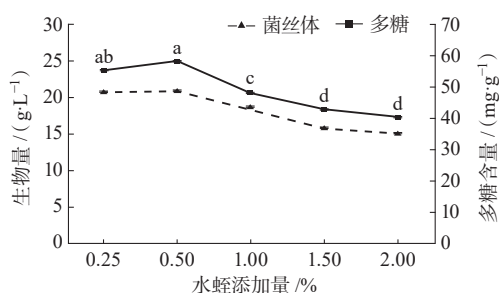


图 4 水蛭添加量对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.4 Effect of leeches addition on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

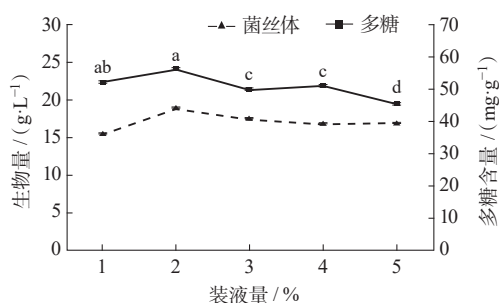


图 5 装液量对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.5 Effect of liquid volume on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

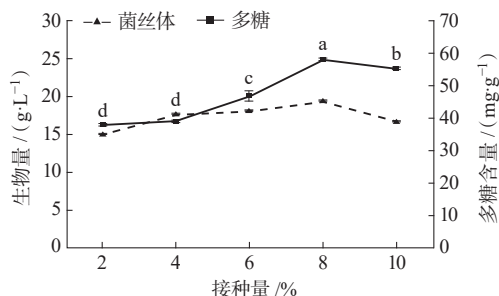


图 6 接种量对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.6 Effect of inoculum amount on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

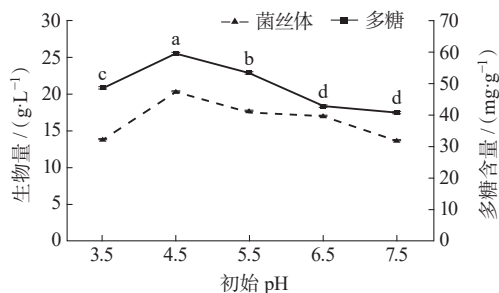


图 7 初始 pH 添加量对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.7 Effect of initial pH on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

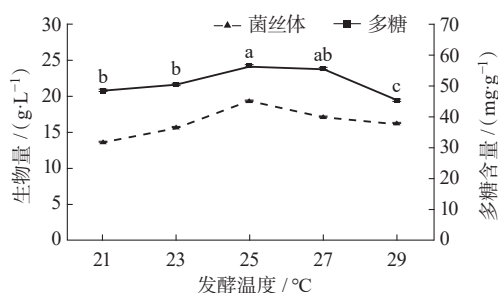


图 8 发酵温度对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.8 Effect of incubation temperature on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

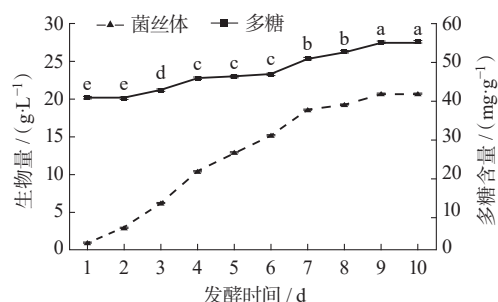


图 9 发酵时间对细脚虫草菌丝体生物量及多糖含量的影响

Fig.9 Effect of incubation time on mycelium biomass and polysaccharide content of *Cordyceps tenuipes*

2.1.2 单因素试验方差分析

各因素对细脚虫草多糖合成的影响(见表 1)。由表 1 可知, 各因素对结果细脚虫草多糖合成的影响程度的大小依次为: 磷酸二氢钾添加量 > 接种量 > 水蛭添加量 > 初始 pH > 蛋白胨添加量 > 发酵温度 > 发酵时间 > 装液量 > 蔗糖添加量。通常, 方差数值越低, 表明该因素对结果的影响越不显著。故在后续的响应面设计中, 选取磷酸二氢钾添加量、水蛭添加量、接种量和初始 pH 因素进一步优化试验。

表 1 单因素试验的方差分析
Table 1 Analysis of variance for single factor trials

因素	观测数	多糖含量 / (mg·g ⁻¹)		
		求和	平均	方差
LA-D	3.65±0.18	3.75±0.06	0.38±0.06	0.99±0.10
Abemaciclib	94.08±2.00	6.80±0.41	0.49±0.06	0.93±0.29
蔗糖添加量	5	261.78	52.36	11.37
蛋白胨添加量	5	251.83	50.37	32.31
磷酸二氢钾添加量	5	212.13	42.43	97.34
水蛭添加量	5	244.90	48.98	49.57
接种量	5	236.03	47.21	67.34
装液量	5	253.74	50.75	12.06
初始 pH	5	243.83	48.77	49.02
发酵温度	5	256.27	51.25	17.52
发酵时间	5	256.32	51.26	12.08

2.2 响应面优化

2.2.1 响应面设计与结果

将响应值和各因素进行多元回归拟合,因素水平见表2,试验所得多糖含量数据见表3。以自变量编码水蛭添加量(A)、磷酸二氢钾添加量(B)、接种量(C)和初始pH(D)进行多项式回归分析,并得到多糖含量(Y_3)的回归模拟方程为 $Y_3=63.540 0-0.481 6A+0.299 0B+0.209 7C+0.483 1D-0.621 0AB-0.567 0AC+0.294 7AD+0.245 0BC-0.805 0BD-0.575 0CD-1.970 0A^2-1.470 0B^2-1.420 0C^2-1.690 0D^2$ 。

表2 响应面优化因素和水平

Table 2 Optimization factors and levels of response surface

水平	A—水蛭添加量/%	B—磷酸二氢钾添加量/%	C—接种量/%	D—初始pH
-1	0.25	0.10	6	3.5
0	0.50	0.15	8	4.5
1	0.75	0.20	10	5.5

表3 试验设计与结果

Table 3 Experimental design and results

试验号	A	B	C	D	CTP 含量/(mg·g ⁻¹)
1	0.25	0.15	8	4.5	59.54
2	0.75	0.15	8	4.5	59.23
3	0.25	0.15	8	4.5	61.52
4	0.75	0.15	8	4.5	58.45
5	0.50	0.20	6	3.5	59.18
6	0.50	0.10	10	3.5	60.76
7	0.50	0.15	6	5.5	61.34
8	0.50	0.20	10	5.5	60.62
9	0.25	0.15	8	3.5	60.16
10	0.75	0.20	8	3.5	57.56
11	0.25	0.15	8	5.5	60.25
12	0.75	0.15	8	5.5	58.96
13	0.50	0.15	6	4.5	60.40
14	0.50	0.20	6	4.5	60.21
15	0.50	0.15	10	4.5	60.26
16	0.50	0.10	10	4.5	61.05
17	0.25	0.15	6	4.5	60.16
18	0.75	0.15	6	4.5	58.92
19	0.25	0.20	10	4.5	61.52
20	0.75	0.10	10	4.5	57.76
21	0.50	0.15	8	3.5	58.57
22	0.50	0.20	8	3.5	60.66
23	0.50	0.10	8	5.5	61.52
24	0.50	0.15	8	5.5	60.39
25	0.50	0.15	8	4.5	63.51
26	0.50	0.15	8	4.5	63.35
27	0.50	0.15	8	4.5	63.67
28	0.50	0.10	8	4.5	63.42
29	0.50	0.10	8	4.5	63.38

注: A 为水蛭(%); B 为磷酸二氢钾(%); C 为接种量(%); D 为初始pH。

2.2.2 响应面方差分析

由表4方差分析可知,该试验的模型 F 值为90.21($P<0.001$),表明该模型极显著,各因素及其交互项、二次项均有显著或极显著效果。失拟项 P 值为0.067 4 >0.05 ,不显著,说明该模型试验结果与预测值差异较小,该方法能够较好地拟合出试验的实际状况,可模拟出细脚虫草产多糖的最佳培养条件。校正决定系数 R^2 为0.989 0 >0.8 , R^2_{Adj} 与 R^2_{Pred} 之间的差值小于0.2,说明实际值与预测值差异较小; $CV\%<10\%$,表明模型在变量范围内可行,试验可靠性、精密度较高,拟合方程可以作为预测和分析试验因素对多糖含量的模型。

表4 响应面方差分析

Table 4 Variance analysis of response surface

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	80.960 0	14	5.780 0	90.21	< 0.000 1	***
A	3.200 0	1	3.200 0	49.90	< 0.000 1	***
B	1.040 0	1	1.040 0	16.25	0.001 2	**
C	0.512 2	1	0.512 2	7.99	0.013 5	*
D	2.720 0	1	2.720 0	42.42	< 0.000 1	***
AB	1.900 0	1	1.900 0	29.71	< 0.000 1	***
AC	1.590 0	1	1.590 0	24.77	0.000 2	***
AD	0.429 0	1	0.429 0	6.69	0.021 5	*
BC	0.240 1	1	0.240 1	3.75	0.073 4	
BD	2.590 0	1	2.590 0	40.44	< 0.000 1	***
CD	1.320 0	1	1.320 0	20.63	0.000 5	**
A ²	38.530 0	1	38.53	601.06	< 0.000 1	***
B ²	13.940 0	1	13.94	217.45	< 0.000 1	***
C ²	13.050 0	1	13.05	203.59	< 0.000 1	***
D ²	18.630 0	1	18.63	290.61	< 0.000 1	***
残差	0.897 4	14	0.064 1	—	—	
失拟项	0.830 9	10	0.083 1	5.00	0.067 4	
误差项	0.066 5	4	0.016 6	—	—	
总离差	81.860 0	28	—	—	—	
$R^2=0.989 0$ $R^2_{Adj}=0.978 1$ $CV\%=0.418 0$ $R^2_{Pred}=0.940 3$						

注: A 为水蛭(%); B 为磷酸二氢钾(%); C 为接种量(%); D 为初始pH; ***表示差异极其显著, $P<0.001$; **表示差异极显著, $P<0.01$; *表示差异显著, $P<0.05$ 。

2.2.3 响应面图分析

水蛭添加量、磷酸二氢钾添加量、接种量和初始pH这4个因素与响应值多糖含量之间的三维曲面图(见图10)。等高线分布密集,且呈椭圆形,对应的曲面较为陡峭,说明水蛭添加量与磷酸二氢钾添加量,水蛭添加量与接种量,水蛭添加量与初始pH,磷酸二氢钾添加量与初始pH,接种量与初始pH之间的交互作用明显,且对响应值的影响较为显著,与表4的方差分析数据存在较好的一致性。

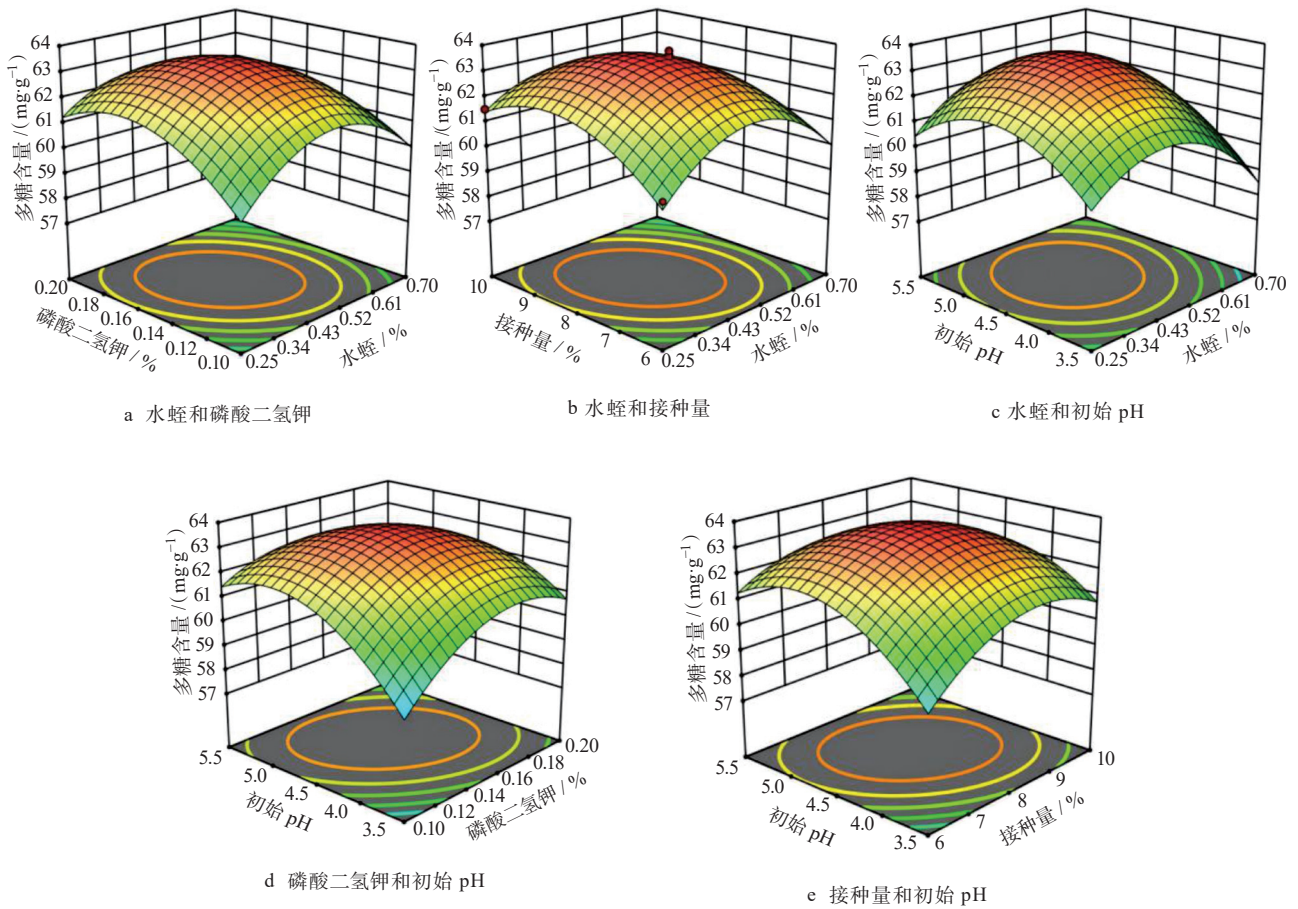


图 10 各因素交互作用对细脚虫草多糖的影响

Fig.10 Effect of the interaction of various factors on the content of *Cordyceps tenuipes* polysaccharides

2.2.4 模型验证

通过 Design-Expert 软件预测多糖含量最高的发酵工艺条件为水蛭 0.463%、磷酸二氢钾 0.118%、接种量 7.276% 和初始 pH 4.235, 预测 CTPB 含量为 62.115 mg/g。结合实际操作情况, 将最佳发酵工艺修正为水蛭 0.46%、磷酸二氢钾 0.12%、接种量 7.3% 和初始 pH 4.2, 经 3 次重复试验得到 CTPA 含量平均为 62.08 mg/g, 与预测值相对误差小于 5%, 表明该方程与实际情况拟合良好, 优化模型真实可行。与基础培养基的 CTP0 相比, 优化后的 CTPA 多糖含量提高了 16.58%, 说明添加水蛭优化后的培养基有效促进多糖产量, 试验结果具有指导生产的实用价值。

2.3 体外抗氧化活性分析

本试验分别对 CTP0, CTP20, CTP30, CTP40, CTP50, CTP60, CTP70 和 CTP80 共 8 个组分的细脚虫草多糖进行抗氧化活性测定 (见图 11)。由图可知, 各多糖组分具有一定的抗氧化特性, 且抗氧化活性随

着浓度的增加而逐渐增大 (回归方程 $R^2 > 0.900$), 其中 CTP60, CTP70 和 CTP80 表现出较好的抗氧化活性, 而 CTP70 组分的抗氧化活性表现最佳。各组分多糖的抗氧化能力低于 Vc 阳性对照。

各组分多糖的抗氧化活性比较如图 11a~c 所示, CTP70 组分的 3 个抗氧化活性指标都高于优化前的 CTP0 组分。在 5 mg/mL 的浓度下 CTP70 组分的 DPPH 自由基清除率最高达 70.45%, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率为 66.26%, 铁离子还原能力为 307.43 $\mu\text{mol/g}$; 相较于优化前的 CTP0 组分, CTP70 组分的 DPPH 自由基清除率提高了 22.54%, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率提高了 22.38%, 铁离子还原能力提高了 51.78%, 说明添加水蛭优化的多糖较好地保留了其抗氧化活性。各组分多糖的抗氧化活性在 1~5 mg/mL 具有一定的浓度依赖性。虫草多糖相关研究表明, 在 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下蛹虫草多糖抗氧化效果呈递增趋势^[21], 多糖的抗氧化活性随试样浓度的增大而增大, 与本试验结果相符。

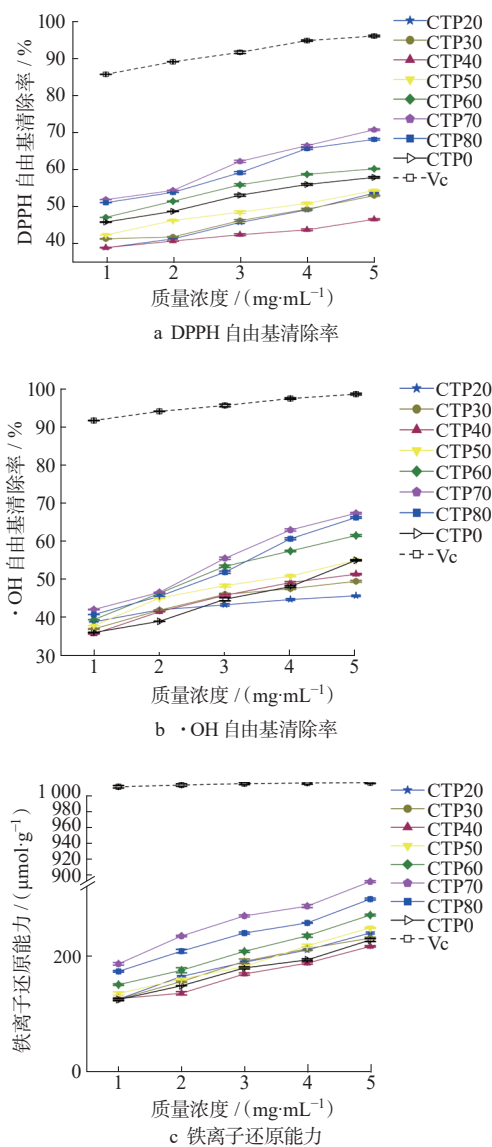


图 11 各组分多糖的抗氧化活性比较
Fig.11 Comparison of the antioxidant activity of polysaccharides of each component

3 讨论

多糖可以作为高效的自由基清除剂^[22],是评价细脚虫草营养价值的重要指标之一。响应面优化结果表明,水蛭、磷酸二氢钾、装液量和初始 pH 是多糖发酵培养的关键性因素。微生物代谢过程中需要从外界不断摄取各种营养物及能量等来维持生命和增殖,适宜的营养补给体系可促进目标产物的合成,因此培养过程中选择适宜的养分尤为重要。细脚虫草多糖的合成过程受多种因素的影响,试验表明,适量添加水蛭能有效提高其多糖含量。水蛭体富含蛋白质、多肽、嘌呤类、糖脂类、羧酸酯类、游离氨基酸和微量元素等活性成分^[23-25],为细脚虫草发酵

培养提供了充足的生长因子。由于多糖为生长偶联型产物,在发酵过程中水蛭体内活性成分可以被其高效利用,可促进多糖的累积,在营养代谢过程中起到正向作用。当磷酸二氢钾为无机盐时,细脚虫草多糖含量较高。由于磷酸盐是细脚虫草发酵生产中极为重要的限制性营养成分,其构成了菌体核酸、核蛋白细胞结构,又是氧化磷酸化反应的必需元素,能够促进细脚虫草的基础代谢,并刺激多糖等初级代谢产物的合成^[19]。

发酵工艺试验结果显示,接种量过多不利于细脚虫草的生长,揭示了细脚虫草作为好氧菌对发酵底物、溶氧量等条件因素具有高度依赖性^[20]。pH 直接影响着菌丝体的发育状况,细脚虫草在偏酸性环境下更利于多糖的合成,碱性过大多糖含量降低,说明了细脚虫草对生长环境的选择较为严苛,是培养过程中关键性控制因素。菌丝体的生长与代谢是缓慢递进的过程,因此培养时间方差分析选择的 5 个观测点为 6~10 d,相较于其他因素对响应值影响不显著,不列入后期的响应面考察指标中。在单因素试验培养第 9 d 时,多糖含量达到峰值,此时的菌丝体发育到对数后期,由于工业生产上兼顾效率和成本,即可停止发酵。

体外抗氧化活测试结果表明,CTP70 组分的抗氧化活性最强,且优于培养基优化前的 CTP0 组分,表明细脚虫草多糖的化学组成和结构特性与药理作用有着密切的关系,不同分子量多糖的抗氧化效果具有差异性,而 CTP70 组分较好地保留了其抗氧化活性。陈安徽等^[26]研究显示,细脚拟青霉菌丝体和发酵液的甲醇-乙酸乙酯混合液提取物对 DPPH 自由基具有一定的抗氧化活性,在浓度为 5.0 mg/mL, 37 °C 保温 10 min 条件下,对 0.4 mg/mL 的 DPPH 自由基的清除率达到了 61.28%。桂琳等^[27]研究则揭示了细脚拟青霉菌丝体中羟自由基清除率的变化趋势,清除率在培养第 6 d 时达到最高值为 47.95%,且指标基本不随培养时间改变。金丽琴等^[28]研究表明,细脚拟青霉菌丝体水煎剂能有效减少脂质过氧化物生成,维持还原型谷胱甘肽含量,增强体内清除自由基的能力。李春如等^[29]研究表明,高雄山虫草的超氧化物歧化酶活力为 537.6 U/g,仅次于蝉花。诸多研究揭示了细脚虫草的代谢产物和提取物具有一定的抗氧化活性,对深入探究细脚虫草的抗氧化作用机理具有重要意义,同时为细脚虫草多糖在保健食

品领域的开发利用提供一定的理论依据。

4 结论

在单因素试验基础上, 通过响应面对细脚虫草多糖的发酵培养进行优化, 得到最佳发酵工艺条件: 蔗糖 4%, 蛋白胨 1.5%, 磷酸二氢钾 0.12%, 水蛭 0.46%, 接种量为 7.3%, 装液量为 36%, 初始 pH 为 4.2, 发酵温度为 25 °C 和发酵时间为 9 d, 多糖含量为 62.08 mg/g, 试验结果与模型预测值相近, 且比优化前提高了 16.58%。

对分级醇沉细脚虫草多糖组分进行 DPPH 自由基清除率、·OH 自由基清除率和铁离子还原能力测试。结果表明, 多糖的抗氧化能力随浓度的增加而增加, CTP70 组分的抗氧化能力表现最佳, 相较于优化前的 CTP0 组分, 其 DPPH 自由基清除率提高了 22.54%, ·OH 自由基清除率提高了 22.38%, 铁离子还原能力提高了 51.78%。由此说明分级醇沉筛选的细脚虫草 CTP70 多糖组分具有良好的抗氧化活性潜质, 作为天然的抗氧化剂在保健品和药品领域应用前景广阔。

综上所述, 细脚虫草作为一种营养价值较高的天然抗氧化剂, 在医药保健领域有巨大的开发潜质, 可改观天然虫草的资源匮乏现状。本研究为人工培育细脚虫草资源合理利用提供理论依据, 也为细脚虫草活性物质的深入研究和开发利用提供参考。

参考文献:

- [1] KEPLER R, LUANGSA-ARD J, HYWEL-JONES N. A phylogenetic-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*) [J]. *IMA Fungus*, 2017, 8 (2): 335-353.
- [2] 韩燕峰, 梁建东, 邹晓, 等. 高雄山虫草无性型研究进展 [J]. *食用菌学报*, 2011, 18 (4): 89-94.
- [3] 杨双双, 林群英, 朱丽娜, 等. 高雄山虫草生物学特性及人工驯化条件优化 [J]. *菌物学报*, 2021, 40 (6): 1480-1497.
- [4] TAKANO F, YAHAGI R, TAKADA S. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llod) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo [J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5 (5): 903-916.
- [5] 王清. 以芦笋为培养基的细脚虫草和蝙蝠蛾拟青霉菌丝体的化学成分变化研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2020.
- [6] TURK A, ABDELHAMID M, YEON S, et al. *Cordyceps* mushroom with increased cordycepin content by the cultivation on edible insects [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022 (13): 1017576.
- [7] 顾念念. 中药水蛭的质量标准及抗血栓物质基础的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [8] 左锦辉, 贡晓燕, 董银卯, 等. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展 [J]. *食品科学*, 2018, 39 (21): 330-339.
- [9] 杜国丰, 陈红漫, 刘凤翊, 等. 海藻多糖的提取、生物活性及其应用研究进展 [J]. *食品科技*, 2023 (2): 188-195.
- [10] 刘春刚. 细脚拟青霉菌丝体水提物对氧化应激诱发疾病的药效学研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [11] LEES H, HWANG H, YUN J. Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* and their apoptotic effect on human neuroblastoma cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2009, 26 (4): 1075-1083.
- [12] SHIN K, LIM S, LEE S, et al. Anti-tumour and immunostimulatory activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* spp [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 17 (7): 830-833.
- [13] 王小爱, 梁建东, 高小娇, 等. 细脚虫草多糖液体发酵及分离纯化工艺研究 [J]. *食品与机械*, 2020, 36 (11): 158-164.
- [14] 白丽丹, 段懿涵, 谭超杰, 等. 蛹、米虫草多糖含量及抗氧化活性比较研究 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41 (20): 22-29.
- [15] 马明昊, 韩鹏飞, 迟乃玉, 等. 中华白僵菌产胞内粗多糖提取及发酵条件优化 [J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34 (9): 89-97.
- [16] 符群, 吴桐, 王梦丽. 负压超声法提取刺玫果黄酮及其抗氧化性研究 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35 (1): 165-172.
- [17] 蒋玉珍, 袁晚晴, 杨淑婷, 等. 响应面优化蛹虫草粗多糖提取工艺及抗氧化能力研究 [J]. *食品科技*, 2023, 48 (7): 149-156.
- [18] 张杉杉, 涂传海, 肖愈, 等. 蛹虫草固态发酵豆渣的功能性成分与抗氧化活性 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38

- (24): 69-74.
- [19] 徐岩. 发酵工程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2022.
- [20] 熊薇, 黄美霞, 魏林婕, 等. 基于响应面的蛹虫草菌质固体发酵工艺条件优化[J]. 中国食用菌, 2022, 41(11): 52-59.
- [21] ZHAO Huajie, LAI Qiangqiang, ZHANG Jianjun, et al. Antioxidant and hypoglycemic effects of acidic-extractable polysaccharides from *Cordyceps militaris* type 2 diabetes mice [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 (2/3/4): 9150807.
- [22] WANG Junqiao, HU Shuzhen, NIE Shaoping, et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016 (64): 1-13.
- [23] DONG Han, REN Jixiang, WANG Jingjing, et al. Chinese medicinal leech: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. *Evid Based Complement Alternat Medicine*, 2016: 7895935.
- [24] ZHANG Ziyue, MA Nan, Tao Lijun, et al. Linear peptides containing D-leucine with neuroprotective activities from the leech *Whitmania pigra* Whitman [J]. *Natural Product Reports*, 2019, 82 (8): 2349-2353.
- [25] 姜秋, 王玲娜, 刘谦, 等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5806-5816.
- [26] 陈安徽, 陈宏伟, 邵颖, 等. 细脚拟青霉活性成分分析及清除自由基活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30 (13): 25-28.
- [27] 桂琳, 葛飞, 黄寅. 比色法测定细脚拟青霉胞内甘露醇及羟自由基清除率 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8818-8819.
- [28] 金丽琴, 吕建新, 胡云良, 等. 细脚拟青霉对大鼠脂质过氧化物和还原型谷胱甘肽水平的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13 (4): 379-382.
- [29] 李春如, 吴茜茜, 严景华, 等. 几种虫草无性型及其相关真菌 SOD 比较研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33 (1): 90-93.

(责任编辑: 李琴)

郑重声明

为了适应我国信息化建设发展的需要, 有力地促进科研学术信息交流和信息资源开发利用的有效性, 严肃科学研究成果发布的科学化和规范化, 从根本上杜绝和防范学术不端行为发生, 打击学术成果造假和学术剽窃, 本刊根据已先后加入《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》《中国学术期刊综合评价数据库》“万方数据网”和“万方数据——数字化期刊群”, 以及《中文科技期刊数据库》《教育阅读网》全文收录期刊序列的实际情况, 从2011年6月30日起, 正式签约并执行“《中国学术期刊网络出版总库》删除学术不端文献暂行办法”(简称《暂行办法》)。同时在此郑重声明, 本刊根据《暂行办法》的规定, 要求投稿本刊的所有作者应自觉查阅和遵守相关规定要求, 并按照文责自负的原则对所投稿件承担相应学术责任, 一经“学术不端文献检测系统”(简称 AMLC)检测发现有严重抄袭、一稿多投, 或不当署名、伪造、篡改等学术不端行为者, 均在本刊所加入的文献收录数据库和文献资料信息存储单位中自动删除该文献, 并在此基础上由作者承担因学术不端行为所造成的其他后果。

特此声明, 望所有投稿本刊的作者充分理解和自觉遵守, 同时知会其他同行和好友悉知。

《江苏海洋大学学报(自然科学版)》编辑部