

酸枣叶食用菌发酵茶的研制

杨金凤, 李洁*

(河北民族师范学院 生物与食品科学系, 河北 承德 067000)

摘要:以秀珍菇、香菇、雪玉松茸和灵芝4种食用真菌为发酵酸枣叶菌种,通过测定菌丝生长速度和分析发酵茶黄酮、三萜和多糖等生物活性物质含量,确定灵芝为发酵酸枣叶的最佳食用菌。以灵芝发酵酸枣叶,通过单因素试验和正交试验研究酸枣叶发酵茶制备工艺,确定酸枣叶发酵茶黄酮含量最高的制备条件为:5 g 酸枣叶添加 2 g 小麦米、接种量为 5 L、28 ℃发酵 3 d;黄酮含量为 3.50 mg/g。三萜含量最高的制备条件为:5 g 酸枣叶添加 2 g 薏仁、接种量为 15 mL、28 ℃发酵 9 d;三萜含量为 16.90 mg/g。多糖含量最高的制备条件为:5 g 酸枣叶添加 2 g 薏仁、接种量为 10 mL、28 ℃发酵 9 d;多糖含量为 172.99 mg/g。

关键词:酸枣叶;食用菌;发酵茶;生物活性成分;制备工艺

Research and Development on Edible Fungi for Tea Fermentation of *Ziziphus jujuba* Leaves

YANG Jin-feng, LI Jie*

(Department of Biology and Food Science, Hebei Normal University for Nationalities, Chengde 067000, Hebei, China)

Abstract: Four types of fungi, *Pleurotus geesteranus*, *Lentinula edodes*, *Hericium coralloides*, and *Ganoderma lucidum* were used in this study to ferment *Ziziphus jujuba* leaves. By measuring the growth rate of their hyphae and quantitating the levels of flavonoids, triterpene, polysaccharides, and other bioactive substances in the fungi and fermented teas, we found that *Ganoderma lucidum* are the best among the edible fungi for fermenting *Ziziphus jujuba* leaves. After conducting single-factor tests and orthogonal experiments on the tea fermentation processes for *Ziziphus jujuba* leaves using *Ganoderma lucidum*, we found that the optimum

基金项目:2015年河北省科技厅绿山富民科技工程(专项)(15237305);2012年河北民族师范学院科学技术项目(20121114)

作者简介:杨金凤(1996—),女(汉),本科在读,生物科学专业。

*通信作者:李洁(1962—),女(蒙古),教授,硕导,研究方向:生物资源开发利用。

- ysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products[J]. Food Chemistry, 2018, 263: 186-193
- [11] 刘海梅,陈静,安孝宇,等.牡蛎酶解工艺参数优化及其产物分析与评价[J].食品科学,2017,38(14): 240-244
- [12] 代晨曦,程卫东.基于响应面优化杏仁蛋白酶解工艺的研究[J].食品工业,2018,39(7): 141-146
- [13] 王海丹,成亚斌,宋贤良,等.盐鸡卤汁酶解工艺优化及氨基酸组成分析[J].食品工业科技,2018,39(9): 295-300,305
- [14] 王慧林.可控酶解鸡肉蛋白研制寡肽鲜味剂[D].南昌:南昌大学,2012
- [15] 张璇.肉品的感官分析方法[J].肉类研究,2010(11): 57-60
- [16] 高丽娇,刘佳霖,程尚,等.排序检验法在蜂蜜感官评价中的应用[J].黑龙江畜牧兽医,2014(19): 178-179
- [17] 张燕,雷昌贵.食品感官评定[M].北京:中国质检出版社,2012: 102-103
- [18] 张连富,隋伟.以虾壳为原料生产热反应型调味料的研究[J].食品与发酵工业,2006(10): 82-85
- [19] 王凤祥,陈中,林伟锋.罗非鱼酶解液热反应制备鱼味香精的工艺研究[J].中国酿造,2011(7): 97-100
- [20] 赵新淮,冯志彪.蛋白质水解物水解度的测定[J].食品科学,1994(11): 65-67
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 12315-2008 中华人民共和国国家标准 感官分析 方法学 排序法[S].北京:中国标准出版社,2008
- [22] 徐树来,王永华.食品感官分析与实验[M].北京:化学工业出版社,2009: 86-92,183-188

收稿日期:2018-09-17

preparation concentration resulting in the highest flavonoid content in the fermented tea from *Ziziphus jujuba* leaves were as follows: 5 g of *Ziziphus jujuba* leaves, 2 g of pelted wheat, and a fungal inoculation volume of 5 mL. The mixture was fermented at 28 °C for 3 days and the flavonoid content was observed to be 3.50 mg/g. The preparation conditions that results in the highest triterpene content were as follows: 5 g of *Ziziphus jujuba* leaves, 2 g of Job's tears, and an inoculation volume of 15 mL. The mixture was fermented at 28 °C for 9 days and the highest triterpene content observed was 16.90 mg/g. The preparation conditions that resulted in the highest polysaccharide content were as follows: 5 g of *Ziziphus jujuba* leaves, 2 g of Job's tears, and an inoculation volume of 10 mL. The mixture was fermented at 28 °C for 9 days and the polysaccharide content thus obtained was 172.99 mg/g.

Key words: *Ziziphus jujuba* leaves; edible fungi; fermented tea; bioactive substances; preparation processes

引文格式:

杨金凤,李洁.酸枣叶食用菌发酵茶的研制[J].食品研究与开发,2019,40(12):135-140

YANG Jinfeng, LI Jie. Research and Development on Edible Fungi for Tea Fermentation of *Ziziphus jujuba* Leaves[J]. Food Research and Development, 2019, 40(12): 135-140

酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow 是鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物,其浑身是宝,果实营养成分丰富,酸枣仁是传统中药材。现代医学研究表明,酸枣叶在宁心安神,提高睡眠质量等方面具有其独到功效,有“东方睡叶”之美称。此外,王迎进等^[1-2]研究表明,酸枣叶多糖具有明显清除氧自由基作用及还原能力,是一种优良的天然抗氧化剂和自由基清除剂。裴香萍等^[3]发现山西省不同产地的酸枣叶中芦丁含量在5~6月份最高,随后下降,在10月份有所回升。李兰芳^[4]研究发现,河北省邢台地区的酸枣叶中黄酮类成分主要是芦丁,还有3个黄酮类成分,总黄酮含量和芦丁含量以10月份含量最高。这些研究为酸枣叶的开发利用提供了基础。

微生物发酵茶是在以茶叶或其他植物叶片为主的基质中接种特定的微生物,通过其代谢作用使茶叶或叶片发生深度的良性生理生化变化,从而改善茶叶品质^[5]。发酵茶所涉及到的微生物种类很多,如乳酸杆菌、醋酸杆菌、酵母菌、霉菌、食药真菌^[6]。其中用食药真菌发酵叶茶,因真菌的酶解作用,可使植物叶片中的有效成分能更好的析出,口味好,易吸收^[7-9]。同时,兼有茶和所接种药用真菌的营养和生物活性成分,具有保健功能^[10]。

目前,市面上有极少量酸枣叶茶出售,主要是采取的一般绿茶制作工艺制备而成,价格昂贵且只含单一的酸枣叶的活性物质成分,靠浸泡难以保证其功能成分完全浸出。因此,采用现代生物发酵技术,利用食用真菌,开发酸枣叶发酵茶新产品,对提高酸枣叶茶

的技术水平,增加野生酸枣产品的附加值,促进山区经济的发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸枣叶:承德月光之梦农业专业合作社;灵芝菌种:平泉希才食用菌公司;秀珍菇、香菇、雪玉松茸菌种:特色生物资源开发科研室保存;小麦米、玉米、黑米、薏仁:超市;芦丁:苏州天可贸易有限公司;齐墩果酸:上海融禾医药科技有限公司;香草醛:天津市凯通化学试剂有限公司;蒽酮:国药集团化学试剂有限公司;亚硝酸钠、硝酸铝、硫酸、乙醇、葡萄糖等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HS-1300 超净工作台:苏州苏洁净化设备有限公司;SHB-3 循环水多用真空:真空杜甫仪器厂;RE-2000A 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;752N 紫外可见分光光度计:上海精密仪器科学有限公司;TU-1900 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;SHZ-82AB 数显冷冻恒温振荡器:常州荣华仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 食用菌培养基的配制

采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基^[11]。

1.3.2 酸枣叶发酵基质的配制

根据食用菌菌丝生长营养需求,将5g酸枣叶与杂粮按5:2(质量比)的比例加到50mL烧杯中,再加入15mL蒸馏水搅拌均匀,封口。灭菌备用。

1.3.3 固体发酵培养

将接入适量液体菌中的酸枣叶发酵基质封口,放入恒温培养箱中培养。

1.3.4 黄酮含量的测定

黄酮含量的测定采用亚硝酸钠——硝酸铝法^[12]。

1.3.5 三萜含量的测定

三萜含量的测定采用香草醛——冰乙酸法^[13]。

1.3.6 多糖含量的测定

多糖含量的测定采用蒽酮——硫酸法^[14]。

1.3.7 发酵单因素试验

1.3.7.1 发酵菌种的筛选

将雪玉松茸、香菇、秀珍菇、灵芝接入配制好的酸枣叶发酵基质内,每组3个重复试验。放入恒温培养箱内培养,待其中一瓶长满全部取出,烘干后打成粉,备用。

1.3.7.2 接种量的筛选

分别向每瓶酸枣叶发酵基质内接入0、5、10、15、20 mL的菌液,每组设3个重复试验。放入恒温培养箱内培养,待其中一瓶长满全部取出,打成粉,备用。

1.3.7.3 发酵时间的筛选

向每瓶酸枣叶发酵基质内接入等量的菌液,每组设3个重复试验。放入恒温培养箱内培养,分别在0、3、6、9、12、15 d取样,烘干后打成粉备用。

1.3.7.4 杂粮种类的筛选

分别将等量的菌液接入添加不同杂粮的酸枣叶发酵基质内,做好标记,每组设3个重复试验。放入恒温培养箱内培养,待其中一瓶长满全部取出,打成粉,备用。

1.3.8 发酵正交试验

根据单因素试验结果,以添加杂粮种类、发酵时间、接种量,设计三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验,对酸枣叶发酵茶的配方及工艺进行优化。试验因素水平设计见表1。

表1 试验因素水平设计

Table 1 Horizontal design of test factors

水平	试验因素		
	A 杂粮种类	B 发酵时间/d	C 接种量/mL
1	薏仁	3	5
2	小麦米	6	10
3	玉米	9	15

1.3.9 验证试验

在正交试验的最佳条件下,分第1、2、3组,每组3个重复,进行发酵;分别测定酸枣叶发酵物中黄酮、三

萜、多糖的含量。

2 结果与分析

2.1 发酵菌种的筛选

2.1.1 不同菌种在酸枣叶发酵基质中的生长情况

接种不同的菌种在1.3.2酸枣叶发酵基质中,其菌丝生长的情况不同,见表2。

表2 不同菌种在酸枣叶发酵培养基中菌丝生长情况差异

Table 2 Differences of mycelium growth among different strains in jujube leaf fermentation medium

菌种类型	菌丝生长速度/(mm/d)				差异显著性 (0.05)
	1	2	3	平均值	
秀珍菇	25.71	21.43	25.71	24.28	b
香菇	11.43	10.00	14.14	11.86	a
雪玉松茸	10.00	7.14	14.29	10.48	a
灵芝	28.57	28.57	34.29	30.48	c

注:每列中不同字母代表数值间存在显著性差异($P<0.05$)。

通过测量菌丝生长速度,由表2可知,灵芝菌丝在酸枣叶基质中的生长速度最快,显著优于其他的食用菌菌丝生长速度。

2.1.2 不同菌种对酸枣叶发酵物中活性成分含量的影响

对接种不同菌种的酸枣叶发酵物的生物活性物质含量进行测定,见图1。

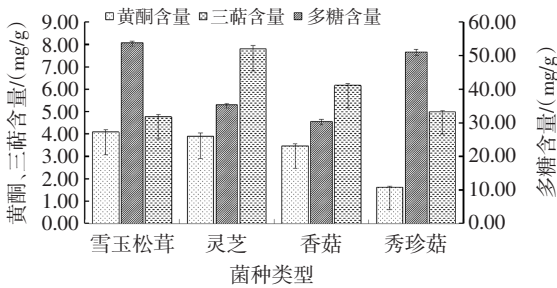


图1 不同菌种对发酵物活性成分含量的影响

Fig.1 Effect of different strains on the content of active components of fermentation

如图1所示,发现接种雪玉松茸的酸枣叶发酵物的黄酮含量最高,其次为接种灵芝、香菇的发酵物,接种秀珍菇的酸枣叶发酵物黄酮含量最低比接种雪玉松茸的低60%;测定发酵物三萜含量,发现三萜含量最高的为酸枣叶灵芝发酵物,比接种雪玉松茸、香菇、秀珍菇的分别高39%、21%和36%,说明接种灵芝有利于提高三萜含量;而酸枣叶发酵物多糖含量最高的为接种雪玉松茸的发酵物,其次为接种秀珍菇的发酵物,香菇发酵物多糖含量最低。

2.2 接种量对酸枣叶发酵物生物活性物质含量的影响
不同接种量对发酵物中活性成分含量的影响,见图2。

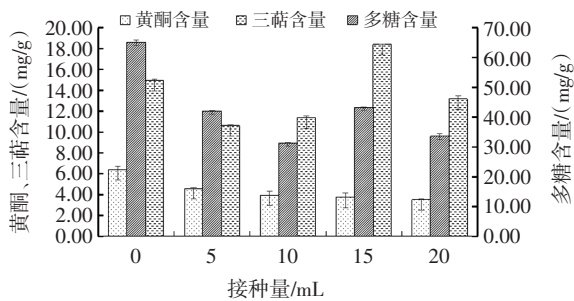


图2 不同接种量对发酵物中活性成分含量的影响

Fig.2 Effect of different inoculation amount on the content of active components in fermentation

如图2所示,未接种灵芝的发酵基质中黄酮的含量远高于接种灵芝的培养基,且随着接种量的增加黄酮含量呈下降趋势,原因可能是灵芝生长过程中消耗了黄酮类物质,导致黄酮含量减少;接种量为15 mL的发酵基质中三萜含量最高,且明显高于接种量为5 mL和10 mL;多糖含量最高的为未接灵芝菌种的试验组,且显著高于其他组,比最低的高52%,可能在发酵的过程中灵芝菌丝的生长需要大量的糖所致。

2.3 发酵时间对酸枣叶发酵物生物活性物质含量的影响

在不同发酵时间取样,测定不同酸枣叶发酵物中黄酮的含量,见图3。

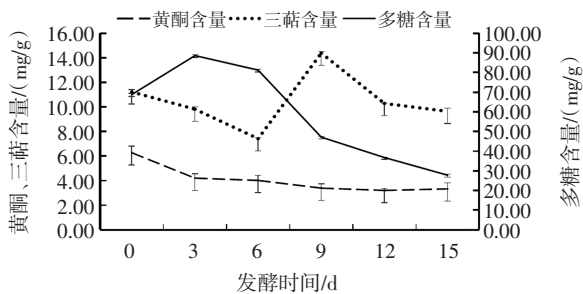


图3 不同发酵时间对发酵物中活性成分含量的影响

Fig.3 Effect of different fermentation time on the content of active components in fermentation products

结果如图3,发酵物中黄酮含量,在0~9 d内随着发酵时间的增加而降低,在9 d~15 d内黄酮含量基本保持不变,可能是在发酵的前期灵芝菌丝生长过程中利用黄酮生成其他新的物质;发酵物中三萜含量,在发酵的1 d~6 d内随着发酵时间的延长而减少,6 d~9 d内三萜含量增加,在9 d达到最高,然后又随发酵时间的增加而减少,到12 d以后基本保持不变。发酵物中多糖含量,在0~3 d内随着发酵时间的增加而增加,并

且在第3天有最大值达88.65 mg/g,之后随着发酵时间的增加而减少。

2.4 不同杂粮对酸枣叶固体发酵的影响

添加不同杂粮对发酵物中活性成分含量的影响,见图4。

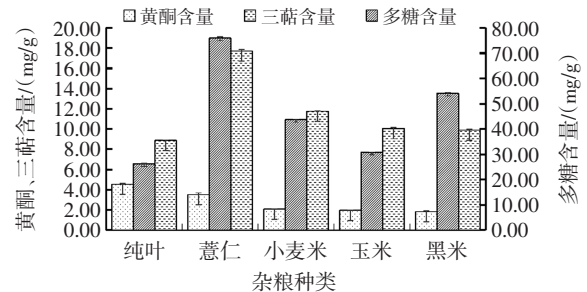


图4 添加不同杂粮对发酵物中活性成分含量的影响

Fig.4 Effect of adding different grains on the content of active components in fermentation

由图4可知,纯酸枣叶发酵物中黄酮含量最高,其次依次为发酵基质中添加薏仁、小麦米、玉米的发酵物,黄酮含量最少的是发酵基质中添加黑米的发酵物;三萜含量最高的是添加薏仁的发酵物,且显著高于其他组,其次依次为添加小麦米、玉米、黑米的发酵物,纯酸枣叶三萜含量最少,比添加薏仁的组少50%。原因可能是薏仁中含有三萜类物质;添加薏仁的发酵物中多糖含量最高,纯酸枣叶发酵物中多糖含量最低,比添加薏仁的降低了65.5%。

2.5 正交试验酸枣叶发酵物中生物活性含量分析

根据单因素的试验结果,选取影响因子合适区间值进行正交试验,正交试验发酵物中黄酮含量、三萜含量和多糖含量分别见表3、表4和表5。

表3 正交试验黄酮含量分析

Table 3 Analysis of flavonoids in orthogonal test

试验 编号	因素			黄酮含量/ (mg/g)
	A 杂粮种类	B 发酵时间	C 接种量	
1	1	2	3	1.80
2	1	3	2	2.00
3	1	1	1	3.30
4	2	3	3	1.70
5	2	2	1	3.00
6	2	1	2	3.50
7	3	3	1	2.50
8	3	1	3	2.30
9	3	2	2	1.30
K ₁	7.10	9.10	8.80	
K ₂	8.20	6.10	6.80	
K ₃	6.10	6.20	5.80	
R	2.10	3.00	3.00	

表4 正交试验发酵物三萜含量分析
Table 4 Analysis of triterpene content in fermentation products by orthogonal test

试验 编号	因素			三萜含量/ (mg/g)
	A 杂粮种类	B 发酵时间	C 接种量	
1	1	2	3	16.897
2	1	3	2	16.584
3	1	1	1	15.027
4	2	3	3	14.734
5	2	2	1	8.885
6	2	1	2	6.428
7	3	3	1	7.423
8	3	1	3	8.593
9	3	2	2	8.534
K ₁	48.508	30.048	31.335	
K ₂	30.047	34.316	31.546	
K ₃	24.550	38.741	40.224	
R	23.958	8.693	8.889	

表5 正交试验发酵物多糖含量分析
Table 5 Analysis of polysaccharides in fermentation products by orthogonal experiment

试验 编号	因素			多糖含量/(mg/g)
	A 杂粮种类	B 发酵时间	C 接种量	
1	1	2	3	146.717
2	1	3	2	172.986
3	1	1	1	95.330
4	2	3	3	27.352
5	2	2	1	26.220
6	2	1	2	30.348
7	3	3	1	46.939
8	3	1	3	19.474
9	3	2	2	45.326
K ₁	415.033	175.152	168.489	
K ₂	83.92	218.263	248.660	
K ₃	141.739	247.277	223.543	
R	331.113	72.125	80.171	

由表3可知,影响发酵物中黄酮含量的主次因素依次为发酵时间>接种量>杂粮种类,得到的最佳发酵条件为A₂B₁C₁,即5g酸枣叶,添加2g小麦米,接种灵芝液体菌液5mL,28℃发酵3d。该组合不在正交试验中,故进行验证试验(图5)。

由表4可知影响酸枣叶发酵物中三萜含量的主次因素依次为杂粮种类>接种量>发酵时间,最佳发酵条件为A₁B₃C₃,即5g酸枣叶,添加2g薏仁,接种灵芝液体菌液15mL,28℃发酵9d。该组合不在正交试验中,故进行验证试验(图6)。

由表5可知,影响发酵物中多糖含量的主次因素

依次为杂粮种类>接种量>发酵时间,最佳发酵条件为A₁B₃C₂,即5g酸枣叶,2g薏仁,灵芝液体菌种接种量10mL,28℃发酵9d。并进行验证试验(图7)。

2.6 验证试验

为了增强正交试验的真实性,对正交试验的结果进行验证。首先在最佳条件下进行发酵,第1组为发酵黄酮的最佳条件A₂B₁C₁;第2组为发酵三萜的最佳条件A₁B₃C₃;第3组为发酵多糖的最佳条件A₁B₃C₂。分别测定发酵物中黄酮、三萜、多糖的含量。验证试验结果图分别见图5、图6和图7。

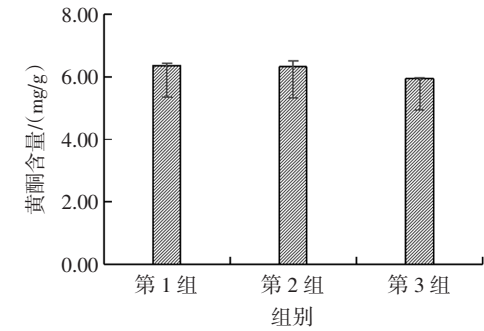


图5 黄酮最佳发酵条件验证结果图
Fig.5 Verification results of the optimal fermentation conditions of flavonoids

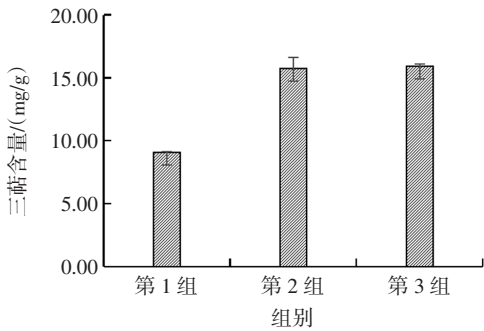


图6 三萜最佳发酵条件验证结果图
Fig.6 Verification results of optimal fermentation conditions of triterpenes

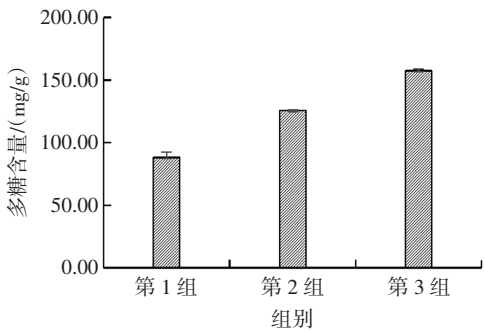


图7 多糖最佳发酵条件验证结果图
Fig.7 Verification results of optimal fermentation conditions of polysaccharides

验证试验的结果符合正交试验的结果。第1组为酸枣叶发酵茶黄酮含量最高,最佳发酵条件为添加杂粮小麦米,接种量灵芝液体菌液5 mL,发酵时间3 d。第2组为酸枣叶发酵茶三萜含量最高,最佳发酵条件为添加杂粮薏仁,接种灵芝液体菌液15 mL,发酵时间9 d。第3组为发酵茶多糖含量最高,最佳发酵条件为添加杂粮薏仁,接种灵芝液体菌种10 mL,发酵时间9 d。

3 结论

发酵能够有效地改善茶的组分,改变茶口感,从而提高茶的经济价值。本试验以酸枣叶和杂粮为原料,采用食用真菌发酵,研究酸枣叶发酵茶及制备工艺。

发酵菌种筛选试验得出,灵芝为酸枣叶固体发酵最佳菌种;以黄酮、三萜和多糖等生物活性物质的含量为考察指标,通过单因素试验和正交试验,确定酸枣叶发酵茶的制备工艺。其中酸枣叶发酵茶黄酮含量最高的制备条件为5 g酸枣叶添加2 g小麦米、接种量为5 mL、28℃发酵3 d;三萜含量最高的制备条件为5 g酸枣叶添加2 g薏仁、接种量为15 mL、28℃发酵9 d;多糖含量最高的制备条件为5 g酸枣叶添加2 g薏仁、接种量为10 mL、28℃发酵9 d。制备的酸枣叶发酵茶具有酸枣叶天然的清香味、呈淡黄色、口感适宜。

灵芝酸枣叶发酵茶,以灵芝发酵酸枣叶,灵芝生长过程中分泌多种酶,分解酸枣叶和杂粮的纤维素,促进有效成分释放,同时还产生多种次生代谢产物,如氨基酸、灵芝多糖、三萜等,提高了酸枣叶发酵茶的营养成分和生物活性成分含量,易于人体吸收,具有保健作用,而且食用方便,是一种新型功能茶,具有实

用价值。

参考文献:

- [1] 王迎进,张书书,芦婧,等.微波辅助提取壶瓶枣多糖及其抗氧化性[J].光谱实验室,2012,29(1): 364-366
- [2] 毕彩虹,杨坚,王立波.茶多糖的保健作用研究进展[J].蚕桑茶叶通讯,2007(2): 18-20
- [3] 裴香萍,张淑蓉,闫艳,等.不同采收时期青翘中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量的测定[J].中国药事,2011(5): 438-440
- [4] 李兰芳,赵淑云,吴树勋.不同生长期酸枣叶中总黄酮和芦丁的含量测定[J].中国中药杂志,2011,25(5): 438-440
- [5] 邹礼根,丁玉庭,陈艳.微生物在发酵茶饮料中的应用[J].食品工业科技,2004(1): 142-144
- [6] 刘巧林,齐桂年.微生物在发酵茶饮料中的应用[J].福建茶叶,2007(1): 23-24
- [7] 张英春,王养军,王静.固态发酵法生产的灵芝面粉的营养成分分析[J].食品与发酵工业,2004,30(8): 44-46
- [8] 陈志杰,顾振新.以糙米为主要原料的灵芝深层发酵培养基优化[J].中国食品学报,2008,8(4): 64-68
- [9] 高文庚.以玉米为基质的灵芝固体发酵条件优化[J].中国农学通报,2007,23(7): 422-422
- [10] 李凤英.桑叶保健袋泡茶的研究[J].食品工业科技,2004(1): 92-93
- [11] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2007: 15-20
- [12] 何书美,刘敬兰.茶叶中总黄酮含量测定方法的研究[J].分析化学,2007,35(9): 1365-1368
- [13] 张方,陈平.超声提取茯苓中三萜类成分的工艺研究[J].武汉食品工业学院学报,2013,32(4): 5-10
- [14] 王宏军,邓旭明,蒋红,等.蒽酮-硫酸比色法检测多糖条件的优化[J].中国饲料,2011(4): 39-41

收稿日期:2018-09-07