

胡龙, 范秀芝, 姚芬, 等. 固体发酵降低大米血糖指数的蛹虫草菌株筛选 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 119–124. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090155

HU Long, FAN Xiuzhi, YAO Fen, et al. Screening the *Cordyceps militaris* Strain for Reducing Glycemic Index of Rice Substrate under Solid Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 119–124. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090155

· 生物工程 ·

固体发酵降低大米血糖指数的 蛹虫草菌株筛选

胡 龙¹, 范秀芝^{2,3}, 姚 芬^{2,3}, 殷朝敏^{2,3}, 史德芳^{2,3}, 高 虹^{2,3,*}, 胡中泽^{1,*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023;

2. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064;

3. 国家食用菌加工技术研发分中心, 湖北武汉 430064)

摘 要: 为缩短生产周期, 降低成本, 获得血糖指数 (glycemic Index, GI) 较低且活性物质含量高的蛹虫草发酵菌质。以菌丝生长速度、菌质预估血糖指数 (expected glycemic index, eGI)、多糖及虫草素含量为指标, 筛选固体发酵大米的蛹虫草优势菌株。结果表明, 利用沈农大虫草、皖西虫草、云虫草和全虫草 4 个菌株对大米进行固体发酵后, 快速消化淀粉 (rapidly digestible starch, RDS) 含量均有所减少, 慢速消化淀粉 (slowly digestible starch, SDS) 和抗性淀粉 (resistant starch, RS) 含量增加, 体外消化动力学数据表明发酵菌质的 eGI 值较未发酵前大米基质显著降低 ($P < 0.05$)。综合上述 4 个指标确定全虫草为固体发酵大米的最佳菌株, 经过 25 d 发酵, 发酵菌质的 eGI 值从发酵前 80.33 下降为 65.63, 达到中 GI 值水平, 多糖含量为 5.29%, 虫草素含量为 5185.98 mg/kg, 其两种物质的含量均已高于子实体中的水平。因此, 大米发酵菌质可替代子实体用于营养和功能食品开发, 并为蛹虫草低 GI 产品的开发提供原料。

关键词: 固体发酵, 蛹虫草, 大米血糖指数, 菌株, 虫草多糖

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)12-0119-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090155

Screening the *Cordyceps militaris* Strain for Reducing Glycemic Index of Rice Substrate under Solid Fermentation

HU Long¹, FAN Xiuzhi^{2,3}, YAO Fen^{2,3}, YIN Chaomin^{2,3}, SHI Defang^{2,3}, GAO Hong^{2,3,*}, HU Zhongze^{1,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;

3. National Research and Development Center for Edible Fungi Processing, Wuhan 430064, China)

Abstract: In order to shorten the production cycle, reduce the cost, and obtain the fermentation product with low glycemic index (GI) and high content of active substances, the dominant strains of *Cordyceps militaris* for solid fermentation of rice substrate were screened with mycelial growth rate, expected glycemic index (eGI), contents of polysaccharide and cordycepin as screening indicators. The results showed that the content of rapidly digestible starch (RDS) in all the fungal substances fermented by strains of *C. militaris* (Shennongda, Wanxi, Yun and Quan) decreased after fermentation, while the content of slowly digestible starch (SDS) and resistant starch (RS) increased. Further digestion kinetics *in vitro* showed that the eGI value in fungal substance was significantly lower than that before fermentation ($P < 0.05$). Then combined with the

收稿日期: 2020-09-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31601806); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303080)。

作者简介: 胡龙 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 谷物加工, E-mail: hl32116@163.com。

* 通信作者: 高虹 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食用菌加工, E-mail: highong@163.com。

胡中泽 (1968-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 谷物加工, E-mail: huzz@126.com。

results of four indexes, strain Quan was determined as the best one for solid fermentation of rice. After 25 days fermentation, the eGI value of fermentation product decreased from 80.33 (before fermentation) to 65.63, which reached the level of medium GI value. The polysaccharide content in fungal substance of Quan was 5.29%, and the content of cordycepin was 5185.98 mg/kg, which were higher than those in fruiting body. Therefore, the fermentation substance could be used to replace the fruity body in the development of nutrition and functional food, and would provide raw materials for the development of low GI products of *C.militaris*.

Key words: solid fermentation; *Cordyceps militaris*; rice glycemic index; strain; polysaccharide

血糖指数(Glycemic Index, GI)是衡量碳水化合物对血糖反应的一种有效指标^[1]。根据 GI 值的高低,分为高 GI 食品($GI > 70$)、中 GI 食品($55 \leq GI \leq 70$)和低 GI 食品($GI < 55$)^[2]。低 GI 食品,因在人体在进食后分解为葡萄糖的速率慢,使人体血糖水平升高的速率和幅度变小,可降低胰岛素的分泌量,有利于人体血糖平衡并有效预防糖尿病^[3-4],已得到食品研究人员的关注^[5]。按照国家标准 WS/T 652-2019 食物血糖生成指数测定方法的规定^[6],食品的 GI 值需要通过测定人体餐后血糖变化量后计算而得,检测过程复杂且费用昂贵,目前我国具备检测能力的机构少。因此,研究者们大都通过体外消化试验这一简单有效的方法来测定食品的 GI 值,所得 GI 值用预估血糖指数(expected glycemic Index, eGI)来表示^[7-9]。目前,大多数低 GI 食品是通过低 GI 原料的混合加工达到降低产品 GI 值的目的,如田宝明^[10]通过在小麦面粉中添加谷朊粉、魔芋精粉、微晶纤维素和高直链玉米淀粉制作成低 GI 挂面。舒志成等^[11]通过燕麦、白芸豆、鹰嘴豆、魔芋丁制作出低 GI 八宝粥。此外,也有通过微生物发酵技术降低产品 GI 值的研究报道, Singh 等^[12]利用酵母对生面团发酵,从而降低面包 GI 值, Angelis 等^[13]利用酵母、乳酸菌对生面团发酵降低面包 GI 值。但目前鲜有通过食用菌菌丝发酵降低产品 GI 值的研究报道。

蛹虫草(*Cordyceps militaris*),又名北虫草、北冬虫夏草,与野生冬虫夏草同属异种^[14]。蛹虫草子实体含有丰富的虫草素、虫草多糖、腺苷、虫草酸、超氧化物歧化酶等,具有提高人体免疫力、抑制肿瘤、抗疲劳、降血脂等功效^[15-17],被认为是冬虫夏草的理想替代品。2009 年卫生部发布第 3 号公告,批准蛹虫草为新资源食品,为蛹虫草在食品加工领域中应用奠定了基础。但是,蛹虫草子实体栽培周期长,出草过程受到温度、湿度、光照等诸多因素制约,且环境控制成本较高^[18-19]。有报道指出,经蛹虫草发酵后得到的发酵菌质中含有与蛹虫草子实体中一致的多糖、虫草酸和虫草素等,并且具有与子实体中活性物质相同的抗氧化、抗肿瘤等功效^[20-22]。

因此,本研究以大米为培养基质进行蛹虫草固体发酵,以菌丝生长速度、发酵菌质多糖、虫草素含量,以及大米基质发酵前后 eGI 值降低效果为评价指标,筛选出最优的菌株,以保证在降低大米 GI 值

的同时提高发酵菌质中活性物质含量,为后续直接用发酵菌质开发营养及功能食品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛹虫草菌株 共 4 种,沈农大虫草、皖西虫草、云虫草、全虫草(根据前期研究选择^[23]),华中农业大学菌种试验中心;京山桥米 湖北国宝桥米有限公司;虫草素标准品 上海源叶生物科技有限公司;猪胰 α -淀粉酶、色谱级乙腈 Sigma 公司;可消化淀粉、抗性淀粉试剂盒、淀粉葡萄糖苷酶 爱尔兰 Megazyme 公司;98% 浓硫酸、苯酚、葡萄糖、95% 乙醇、无水乙醇、氢氧化钠、冰醋酸等分析纯 国药集团。

LDZX-75KBS 高压蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;SW-CJ-ID 净化工作台 苏州净化设备有限公司;FD5-3P 真空冷冻干燥机 美国金西盟公司;KQ-5200 DE 超声波清洗器 昆山市超声波仪器公司;3K15 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司;UV-1800 紫外可见分光光度计、LC-20AT 高效液相色谱仪 日本岛津公司;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基制备 马铃薯固体培养基(PDA):土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,加蒸馏水定容至 1 L, pH 自然。液体完全培养基(LCYM):葡萄糖 20 g,蛋白胨 2.0 g,酵母膏 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 0.46 g,加蒸馏水定容至 1 L, 50 mL 分装, 121 °C 灭菌 30 min, 备用。大米固体培养基:大米与 LCYM 以 1:1(m:v)比例配制, 121 °C 灭菌 30 min。其中,菌丝生长速度测定用大米培养基为 25 mm×200 mm 试管中装入 20 g 大米与 20 mL 的 LCYM;固体发酵培养基为 500 mL 罐头瓶中装入 50 g 大米和 50 mL 的 LCYM。

1.2.2 菌种活化 在超净工作台中,将沈农大虫草、皖西虫草、云虫草、全虫草 4 种菌株取一小块转接到固体马铃薯平板培养基上, 25 °C 恒温培养 5 d, 备用。

1.2.3 菌丝生长速度 测定菌株活化后用 8 mm 打孔器打孔,取 1 个接种块接种到大米试管培养基顶部表层中央,垂直放置,在 25 °C 避光培养。待菌丝萌发并长满培养基表面,在试管的 3 个方向划线,到同一批中菌丝生长到试管底部时,结束培养并划线。记

录菌丝生长距离以及培养天数,计算出菌丝生长速度。

$$V = \frac{H}{T} \quad \text{式 (1)}$$

式中: V 表示菌丝生长速度, mm/d; H 表示 2 次划线菌丝生长距离, mm; T 表示培养天数, d。

1.2.4 液体菌种制备 菌株活化后, 8 mm 打孔器打孔, 每瓶液体培养基接入 6~7 块菌块, 25 °C 恒温避光培养 5 d。

1.2.5 固体发酵 培养液体菌种匀浆后按 6 mL/罐接种到固体发酵培养基中, 同时以接入 6 mL 灭菌水的未发酵大米作为对照组, 样品组与对照组同时在 25 °C 避光培养 25 d, 培养结束后收集发酵菌质进行冷冻干燥。

1.2.6 淀粉含量测定 利用可消化淀粉及抗性淀粉试剂盒测定发酵前后菌质中淀粉含量。取 0.5 g α -淀粉酶(40000 U/g)与淀粉葡萄糖苷酶(170000 U/g)粉末混合物溶解于 25 mL 0.05 mol/mL 马来酸缓冲液(pH6.0), 配制后 4 h 内使用。分别取 0.500 g 样品, 用 95% 乙醇浸湿后加入 17.5 mL 马来酸缓冲液, 170 r/min 37 °C 搅拌 5 min。加入 2.5 mL 混合酶液, 在 20、120 和 240 min 分别取 0.2 mL 反应溶液加入到 4 mL 无水乙醇中, 13000 r/min 离心 5 min, 取 0.1 mL 上清液加入 3 mL 氧化酶-过氧化酶(GOPOD)试剂, 50 °C 水浴 20 min, 对照空白样在 510 nm 处测量样品中葡萄糖含量, 计算快消化淀粉(rapidly digestible starch, RDS)和慢消化淀粉(slowly digestible starch, SDS)含量。

$$RDS = \frac{C_{20} \times 0.9}{W} \quad \text{式 (2)}$$

$$SDS = \frac{(C_{120} - G_{20}) \times 0.9}{W} \quad \text{式 (3)}$$

式中: G_{20} 表示酶解 20 min 产生的葡萄糖含量, mg; G_{120} 表示酶解 120 min 产生的葡萄糖含量, mg; W 表示所取样品质量, mg。

同时, 在 240 min 取 4 mL 反应液到装有 4 mL 无水乙醇的离心管中, 混合均匀, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 8 mL 50% 乙醇溶液洗涤 3 次。向沉淀中加入 2 mL 1.7 mol/mL 氢氧化钠, 冰水浴 20 min。加入 8 mL 1.2 mol/L, pH3.8 醋酸钠缓冲液和 0.1 mL 淀粉葡萄糖苷酶(3300 U/mL), 混合均匀, 于 50 °C 振荡水浴 30 min, 13000 r/min 离心 5 min 后以上述相同的方法加入氧化酶-过氧化酶试剂测定样品中葡萄糖含量, 计算抗性淀粉(resistant starch, RS)和总淀粉(total starch, TS)含量。

$$RS = \frac{C_{RS} \times \Delta V \times 0.9}{4 W} \quad \text{式 (4)}$$

$$TS = \frac{G_{240} \times 0.9}{W} + RS \quad \text{式 (5)}$$

式中: G_{RS} 表示所取的 4 mL 反应液进一步酶解

后产生的葡萄糖含量, mg; ΔV 表示反应总体积, mL; G_{240} 表示酶解 240 min 产生的葡萄糖含量, mg。

1.2.7 体外消化动力学 预估血糖指数测定与体外消化动力学测定参考文献 [24] 稍作修改, 取 0.2 g 样品加入 15 mL 0.2 mol/L pH5.2 醋酸钠缓冲液, 170 r/min 37 °C 搅拌 5 min。加入配制好的 α -淀粉酶(290 U/mL)与淀粉葡萄糖苷酶(15 U/mL)混合酶液 5 mL。170 r/min 37 °C 搅拌, 在 10、20、30、45、60、90、120、150、180 min 分别取 0.1 mL 反应液至 1 mL 无水乙醇, 以 13000 r/min 离心 5 min, 取 0.1 mL 上清液加入 3 mL GOPOD 试剂, 50 °C 水浴 20 min, 对照空白样在 510 nm 处测量样品中葡萄糖含量。

$$C = \frac{C_t \times 20 \times 0.9}{200} \quad \text{式 (6)}$$

根据 Goñi 等 [25] 研究指出, 淀粉水解曲线遵循一级反应方程:

$$C = C_{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad \text{式 (7)}$$

式中: C 表示在 t 时刻淀粉酶解百分比, %; G_t 表示在 t 时刻酶解产生的葡萄糖量, mg; C_{∞} 表示 180 min 达到平衡后淀粉酶解百分比, %; k 表示动力学常数。

对所得曲线进行拟合, 得出一级反应方程, 计算拟合曲线 0~180 min 下表面积(AHU)。得出样品的淀粉水解指数(hydrolysis index, HI)。根据 HI 值, 计算出 eGI 值。

$$HI = \frac{AHU_{\text{样品}}}{AHU_{\text{白面包}}} \quad \text{式 (8)}$$

$$eGI = 39.71 + (0.549 \times HI) \quad \text{式 (9)}$$

1.2.8 发酵菌质中多糖含量测定 发酵菌质中粗多糖的提取参照参考文献 [26] 的方法进行。取 25 g 发酵菌质, 以料液比为 1:30(g:mL)加入蒸馏水, 超声提取 1 h, 90 °C 水浴 3 h。离心后取上清液。沉淀加蒸馏水冲洗后离心, 合并上清液。旋转蒸发到一定体积, 加入 0.185 g α -淀粉酶(1850 U), 在 60 °C、pH6 的条件下, 振荡水浴 3 h, 酶解培养基中残留淀粉以去除干扰。加入 5 倍体积的无水乙醇, 4 °C 沉淀过夜。再次离心, 收集沉淀物, 冷冻干燥后进行称重。

按照 NY/T 1676-2008 [27] 的方法测定蛹虫草发酵菌质中多糖含量。分别取 100 mg/mL 葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中, 用去离子水补至 1.0 mL。加入 1 mL 5% 苯酚, 然后快速加入 5 mL 浓硫酸, 静置 10 min。混合均匀, 于 30 °C 水浴反应 20 min, 用紫外分光光度计于 490 nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线。

精确称取样品 0.01 g, 加入蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 精确吸取 1 mL 样液。同上述绘制标准曲线的步骤, 测定吸光度, 计多糖含量计算公式如下:

$$\omega(\%) = \frac{C \times V \times m}{m_0 \times M} \times 100 \quad \text{式 (10)}$$

式中: ω 表示蛹虫草发酵菌质多糖含量, %; C 表示所测得多糖浓度, mg/mL; V 表示粗多糖样品液体体积, mL; m 表示冻干后粗多糖质量, g; m_0 表示粗多糖取样量, g; M 表示发酵菌质的取样量, g。

1.2.9 发酵菌质虫草素含量测定 按照 NY/T 2116-2012^[28] 高效液相色谱法测定蛹虫草发酵菌质中虫草素的含量。

色谱条件为: 色谱柱 Inertsil ODS-SP(C_{18})柱 250 nm×4.6 nm, 5 μ m; 流动相为 V(乙腈):V(水)=5:95; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

1.3 数据处理

每个实验 3 次重复, 数据以平均值±标准表示。采用 SPSS 25 和 Origin 8.5 软件进行数据差异性分析和作图。差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同菌株菌丝生长速度

如图 1 所示, 在固体发酵培养基中, 对 4 个菌株的菌丝生长速度进行比较, 沈农大虫草与皖西虫草的生长速度差异不显著, 沈农大虫草与全虫草的生长速度也不显著, 菌丝生长速度最快的是皖西虫草, 为 1.80 mm/d, 其次是沈农大虫草与全虫草, 且二者差异不显著, 生长速度分别为 1.74、1.71 mm/d, 生长最慢的为云虫草, 为 1.46 mm/d。

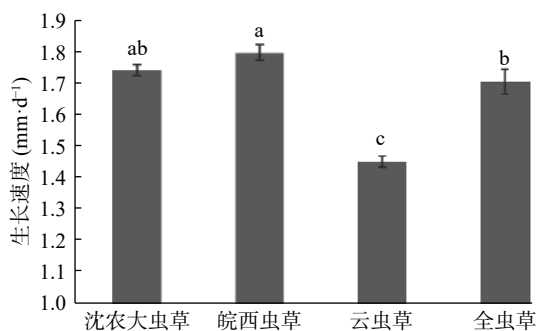


图 1 不同菌株菌丝生长速度

Fig.1 Mycelial growth rates of different strains

注: 不同小写字母表示差异显著性($P < 0.05$)。

2.2 培养基及发酵菌质中淀粉含量测定

根据 Entlyst 等^[29] 对淀粉的分类, 以淀粉在人体小肠中消化速度的差异分为快消化淀粉(RDS)、慢消化淀粉(SDS)和抗性淀粉(RS)。因此, 本研究对固体发酵培养基及发酵菌质中不同种类淀粉含量进行了测定, 结果如表 1 所示。由公式(2)~(5)计算得未发酵的大米固体培养基中 RDS、SDS、RS、TS 含量分别为 68.32%、12.10%、3.00%、83.42%。经过 4 个蛹虫草菌株发酵后, RDS 含量都分别有所降低, 除云虫草外, SDS 都有所增加, RS 含量都显著增加($P < 0.05$), 其中全虫草 SDS 和 RS 含量增加最多, 尤其是 RS 含量, 增加了 21.4%, TS 含量仅有全虫草降

低。田宝明^[10] 研究指出, SDS 与 RS 的含量越高, 在人体内产生葡萄糖的速率越慢, 对于维持餐后血糖稳定具有非常重要的作用。因此, 推测本研究中 4 个蛹虫草菌株对大米进行发酵后, 能减缓大米在人体内的消化速率, 尤其是全虫草菌株。

表 1 4 个菌株发酵菌质及未发酵大米不同种类淀粉含量
Table 1 Contents of starch in fungal substances fermented by four strains and unfermented rice

样品	RDS(%)	SDS(%)	RS(%)	TS(%)
未发酵大米	68.32±0.81 ^a	12.10±0.78 ^b	3.00±0.40 ^d	83.42±1.45 ^a
沈农大虫草发酵菌质	64.48±1.42 ^b	13.33±0.21 ^a	6.04±0.36 ^c	83.85±1.33 ^b
皖西虫草发酵菌质	66.70±0.67 ^a	13.82±0.15 ^a	3.64±0.53 ^d	84.16±1.67 ^a
云虫草发酵菌质	67.01±0.66 ^a	10.17±0.15 ^c	6.85±0.46 ^b	84.03±1.46 ^a
全虫草发酵菌质	58.49±1.12 ^c	14.15±1.02 ^a	9.42±0.32 ^a	82.06±0.77 ^b

注: 同一测定指标, 不同小写字母表示差异显著性($P < 0.05$); 表 2 及图 3、图 4 同。

2.3 体外消化动力学预估发酵菌质 eGI 值

GI 值能更清晰的衡量出碳水化合物在人体内消化的快慢和影响人体餐后血糖波动的大小^[9]。我国已在 2019 年 12 月实施血糖生成指数测定方法, 但检测是通过人体进行测定, 检测成本高, 且我国具备检测能力的机构少。目前, 通过体外消化预估食品 eGI 值是最常用的方法。因此, 本研究以体外消化动力学方法预估蛹虫草固体发酵前后基质 eGI 值。

由图 2 可以看出, 大米基质经过蛹虫草菌株发酵后, 4 个菌株发酵菌质中淀粉酶解率较发酵前均有所降低, 其降低效果从高到低依次为全虫草>沈农大虫草>皖西虫草>云虫草, 由公式(7)得 C_{∞} 分别为 43.22%、53.96%、58.15% 和 60.28%; 与未发酵的大米相比, 酶解 3 h 后, C_{∞} 分别下降 27.69%、16.95%、12.76%、10.63%。以白面包为参照物, 通过计算 HI 值, 进一步得出各发酵菌质的 eGI 值。其中, 未发酵大米培养基的 eGI 值为 80.33, 经过蛹虫草菌种发酵后, 4 个蛹虫草菌株均能有效降低大米培养基的 eGI 值, 说明蛹虫草发酵能有效降低大米 eGI 值。但仅有全虫草达到中 eGI 值水平, 为 65.63, 比未发酵基质其 eGI 值降低了 14.7(表 2)。说明蛹虫草发酵能有效降低大米 eGI 值。推测原因可能是培养基以

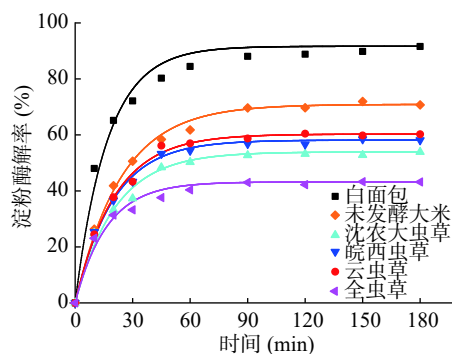


图 2 蛹虫草发酵对大米体外酶解动力学拟合曲线的影响

Fig.2 Effects of *Cordyceps militaris* fermentation on the *in vitro* enzymatic hydrolysis kinetic fitting curve of rice

表 2 4 个菌株发酵菌质及未发酵大米的淀粉体外消化动力学参数、水解指数(HI)和预估血糖指数(eGI)

Table 2 *In vitro* digestion kinetic parameters of starch, hydrolysis index (HI) and estimated glycemic index (eGI) of fungal substances fermented by four strains and unfermented rice

样品	C _∞ (%)	k	HI	eGI
未发酵大米	70.91±1.42 ^a	0.042±0.002 ^c	73.99±1.40 ^a	80.33±1.25 ^a
沈农大虫草	53.96±1.52 ^c	0.048±0.001 ^b	57.37±1.48 ^c	71.21±0.93 ^c
皖西虫草	58.15±1.68 ^b	0.050±0.002 ^b	62.25±4.53 ^b	73.89±1.07 ^b
云虫草	60.28±1.76 ^b	0.049±0.001 ^b	64.27±1.66 ^b	74.99±1.11 ^b
全虫草	43.22±1.12 ^d	0.060±0.002 ^a	47.21±1.20 ^d	65.63±0.89 ^d

纯大米为基质且营养液中含有葡萄糖,发酵菌质的 eGI 值本身较高,加上培养时间有限,蛹虫草菌丝体还未能将基质中淀粉等物质完全转化和利用,导致发酵后菌质 eGI 值仍较高。

2.4 发酵菌质中多糖含量测定

绘制多糖标准曲线,得到回归方程 $y=11.096x-0.0043(R^2=0.9995)$ 。标准曲线线性关系良好。从图 3 中可以看出,经过淀粉水解后测定的蛹虫草发酵菌质中多糖含量均显著高于未发酵大米中的多糖含量 ($P<0.05$),表明蛹虫草利用大米中淀粉作为底物分解合成了虫草多糖^[30]。不同发酵菌质之间,仅有皖西虫草与全虫草发酵后菌质中多糖含量之间差异不显著。其中,沈农大虫草发酵菌质的多糖含量最多,为 5.79%,其次是皖西虫草和全虫草,分别为 5.35% 和 5.29%,云虫草发酵菌质的多糖含量最少,为 4.77%。以上以纯大米为发酵基质,在不出草情况下获得发酵菌质中的多糖含量均略高于子实体收获后发酵菌质中的多糖含量(3.52%)^[26],且与已报道的 17 个蛹虫草菌株子实体中多糖含量相对比(1.81%~4.92%)^[31],沈农大虫草、皖西虫草以及全虫草发酵菌质菌质中多糖含量均超过子实体中的多糖含量,表明本研究所得发酵菌质具有一定的应用价值,可替代子实体或现有发酵菌质开展多糖相关研究。

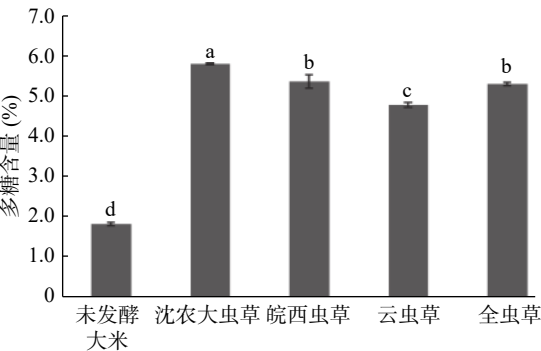


图 3 未发酵大米及不同菌株发酵菌质中多糖含量
Fig.3 Polysaccharide content in unfermented rice and fungal substances fermented by different strains

据已有研究报道,多糖是蛹虫草降血糖的主要成分之一,蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶具有显著的

抑制效果,能有效降低糖尿病小鼠的血糖水平^[32-34]。因此,推测发酵菌质中除 SDS 和 RS 淀粉含量增加对 GI 值的影响外,多糖对发酵菌质 GI 值的降低起到了一定的作用。

2.5 蛹虫草发酵菌质中虫草素测定结果

绘制虫草素溶液的标准曲线,得到回归方程 $y=29316.70x+5011.51(R^2=0.9999)$ 。标准曲线线性关系良好。图 4 为未发酵大米及 4 个蛹虫草发酵菌质虫草素含量的测定结果($P<0.05$),其中未发酵大米中未检测到虫草素,这与虫草素是蛹虫草的主要活性成分这一事实一致^[21]。在 4 个蛹虫草发酵菌质中,虫草素含量从多到少依次为:全虫草发酵菌质>云虫草发酵菌质>沈农大虫草发酵菌质>皖西虫草发酵菌质。其中,全虫草发酵菌质的虫草素含量为皖西虫草发酵菌质的 22 倍,为 5185.98 mg/kg,云虫草发酵菌质的虫草素含量为 3917.60 mg/kg、沈农大虫草发酵菌质的虫草素含量为 2115.35 mg/kg、皖西虫草发酵菌质的虫草素含量为 236.14 mg/kg。不同蛹虫草菌株所产生的虫草素含量差异显著($P<0.05$),与已有报道一致^[31]。以上以纯大米为发酵基质,25 d 培养不出草情况下获得的发酵菌质中虫草素含量除皖西虫草外均略高于子实体收获后发酵菌质中的虫草素含量(1792.97 mg/kg)^[21]。

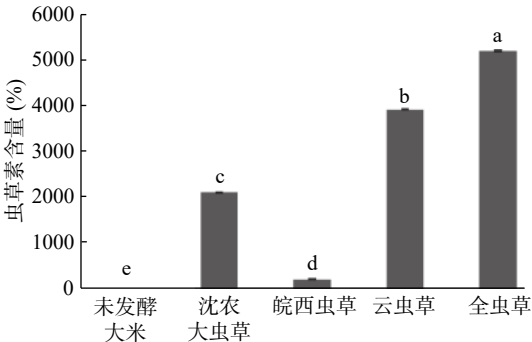


图 4 未发酵大米及不同菌株发酵菌质中虫草素的含量
Fig.4 Cordycepin content in unfermented rice and fungal substances fermented by different strains

3 结论

在前期研究基础上,选择沈农大虫草、皖西虫草、云虫草和全虫草对大米基质进行发酵,筛选能降低大米基质 eGI 值的蛹虫草菌种。综合生长速度、发酵菌质 eGI 值、多糖以及虫草素含量,确定全虫草为最佳菌株。以该菌株对大米基质进行 25 d 发酵后,菌质 RDS 含量由 68.32% 下降到 58.49%,SDS 含量由 12.10% 上升到 14.15%,RS 含量由 3.00% 上升到 9.42%,TS 含量由 83.42% 下降到 82.06%;菌质 eGI 值由 80.33 降低到 65.63,降低了 18.30%;发酵菌质中多糖含量为 5.29%,虫草素含量为 5185.98 mg/kg,其多糖含量已高于子实体,且虫草素含量也已达到较高水平,可以替代子实体用于营养和功能食品开发。

本研究虽然通过发酵降低了基质的 eGI 值,但仍未达到低 GI 水平,可能与本研究仅以大米为主要培养基质本身 GI 值较高有关。因此,后续会对发酵基质及培养时间等进行优化,进一步降低发酵菌质 eGI 值,为蛹虫草发酵菌质的利用以及低 GI 产品的开发奠定基础。此外,还应该对多糖和虫草素对降低 GI 值的效果进行研究。

参考文献

- [1] Schakel S, Schauer R, Himes J, et al. Development of a glycemic index database for dietary assessment[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 21: S50-S55.
- [2] Jenkins D J, Wolever T M, Taylor R H, et al. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, 34(3): 362-366.
- [3] Argiana V, Kanellos P T, Eleftheriadou I, et al. Low-glycemic-index/load desserts decrease glycemic and insulinemic response in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Nutrients*, 2020, 12(7): 2153.
- [4] Ha V, Vigiouliou E, Kendall C W C, et al. Effect of a low glycemic index diet versus a high-cereal fibre diet on markers of subclinical cardiac injury in healthy individuals with type 2 diabetes mellitus: An exploratory analysis of a randomized dietary trial[J]. *Clinical Biochemistry*, 2017, 50(18): 1104-1109.
- [5] 陈静茹, 孟庆佳, 康乐, 等. 低血糖生成指数谷物及其制品研究进展与法规管理现状[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(18): 338-343.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 652-2019 食物血糖生成指数测定方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [7] Shumoy H, Raes K. *In vitro* starch hydrolysis and estimated glycemic index of tef porridge and injera[J]. *Food Chemistry*, 2017, 229: 381-387.
- [8] Salgado-Cruz M D L P, Ramírez-Miranda M, Díaz-Ramírez M, et al. Microstructural characterisation and glycemic index evaluation of pita bread enriched with chia mucilage[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 69: 141-149.
- [9] Shumoy H, Bockstaele F V, Devecioglu D, et al. Effect of sourdough addition and storage time on *in vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of tef bread[J]. *Food Chemistry*, 2018, 264: 34-40.
- [10] 田宝明. 低血糖指数挂面的研制及其对糖尿病大鼠糖脂代谢影响的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [11] 舒志成, 王华, 郭秀峰, 等. 一种具有低血糖生成指数(GI 值)特点的八宝粥研制[J]. *中国食品添加剂*, 2016(1): 127-132.
- [12] Singh S, Sethi S, Gupta S, et al. Fermentation of multigrain dough-an approach to reduce glycemic index for healthy bread[J]. *Eureka: Life Sciences*, 2019, 5: 19-31.
- [13] Angelis M, Damiano N, Rizzello C G, et al. Sourdough fermentation as a tool for the manufacture of low-glycemic index white wheat bread enriched in dietary fibre[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(4): 593-601.
- [14] 张姝, 张永杰, Shrestha Bhushan, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J]. *菌物学报*, 2013, 32(4): 577-597.
- [15] 杜秀菊, 张劲松, 贾薇, 等. 蛹虫草抗肿瘤和免疫活性部位的体外筛选[J]. *食用菌学报*, 2011, 18(1): 41-45.
- [16] Wang M, Meng X Y, Yang R L, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89: 461-466.
- [17] Xu L, Wang F, Zhang Z C, et al. Optimization of polysaccharide production from *Cordyceps militaris* by Solid-State fermentation on rice and its antioxidant activities[J]. *Foods(Basel, Switzerland)*, 2019, 8(11): 590.
- [18] 彭志妮, 郭丽琼, 张新超, 等. 蛹虫草固体发酵大豆基质的成分及抗氧化活性变化研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(2): 338-342.
- [19] 刘洋, 黄芳芳. 蛹虫草固态发酵生产虫草素工艺优化研究[J]. *核农学报*, 2014, 28(11): 2065-2070.
- [20] 朱振元, 贾长英, 孙会轻. 蛹虫草发酵大米的成分分析及体外抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 235-238, 248.
- [21] 陈丽冰, 吴光旭, 程薇, 等. 北虫草培养基残渣中虫草素的提取纯化及抗肿瘤活性[J]. *食品科学技术学报*, 2016, 34(4): 73-79.
- [22] 孙叶, 包建忠, 刘红, 等. 蛹虫草培养基多糖的提取及抗肿瘤活性研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(4): 118-126.
- [23] 潘昌, 范秀芝, 姚芬, 等. 食用菌发酵液对热干面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(5): 170-177.
- [24] Reshmi S K, Sudha M L, Shashirekha M N. Starch digestibility and predicted glycemic index in the bread fortified with pomelo (*Citrus maxima*) fruit segments[J]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 957-965.
- [25] Goñi I, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index[J]. *Nutrition Research*, 1997, 17(3): 427-437.
- [26] 陈丽冰, 程薇, 高虹, 等. 北虫草培养基中多糖的闪式提取工艺研究[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(19): 4670-4674.
- [27] 中华人民共和国农业部. SN/T 4260-2015 食用菌中粗多糖含量的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [28] 中华人民共和国农业部. NY/T 2116-2012 虫草制品中虫草素和腺苷的测定高效液相色谱法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [29] Englyst H N, Hudson G J. The classification and measurement of dietary carbohydrates[J]. *Food Chemistry*, 1996, 57(1): 15-21.
- [30] 方尚瑜, 贾志华, 张霞, 等. 碳氮源对液体培养蛹虫草生物合成虫草多糖的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 165-169.
- [31] 朱丽娜, 刘艳芳, 张红霞, 等. 不同来源的蛹虫草子实体活性成分的比较[J]. *菌物学报*, 2018, 37(12): 1695-1706.
- [32] Shang X L, Pan L C, Tang Y, et al. ¹H NMR-based metabolomics of the hypoglycemic effect of polysaccharides from *Cordyceps militaris* on streptozotocin-induced diabetes in mice[J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(10): 1366-1372.
- [33] 朱振元, 刘晓翠, 郭蓉, 等. 蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(12): 55-60.
- [34] 赵莹. 虫草多糖复合物降糖作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳大