

蜂花粉、蜂蜜为基质灵芝液体发酵饮料的研制

张 政, 付彦青, 陈 超, 赵风云*

(昆明理工大学食品安全研究院, 昆明 650500)

摘 要: **目的** 以灵芝(菌种)、油菜蜂花粉(主要氮源)、油菜蜂蜜(主要碳源)三种传统保健食品作为原料, 制备一种营养丰富的发酵型食用菌饮料, 并解决蜂花粉深加工时破壁难的问题。**方法** 将发酵液与柠檬酸、蔗糖和稳定剂进行调配, 经抽滤、罐装、杀菌制得饮料成品, 同时对发酵液中的营养成分和花粉破壁率及饮料中的各项指标进行检测。**结果** 发酵饮料的最佳配方为: 发酵液 35%, 蔗糖 14%, 柠檬酸 0.26%, 羧甲基纤维素钠(CMC)的添加量为 0.15%。发酵液中多糖的含量为 25.74 mg/mL, 蛋白质的含量为 0.79 mg/mL, 花粉破壁率为 72.94%。**结论** 本研究制得的食用菌饮料, 天然美味, 营养丰富, 符合国家的相关标准。

关键词: 灵芝; 油菜蜂花粉; 液体发酵; 营养物质; 食用菌饮料

Development of a *Ganoderma lucidum* fermented liquid beverage using bee pollen and honey as culture medium

ZHANG Zheng, FU Yan-Qing, CHEN Chao, ZHAO Feng-Yun*

(Food Safety Institute, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To prepare a nutritious fermentation edible fungi beverage by using the raw materials composed of three traditional health foods, including *Ganoderma lucidum*, rape bee pollen (mainly nitrogen), and rape honey (mainly carbon), and to solvent the problem encountered with cell wall broken **Methods** The fermentation broth was mixed with citric acid, sucrose and stabilizer, then the beverage product was prepared after filtration, canning, sterilization. Meanwhile, the nutrients and broken-wall ratios were detected in fermentation broth, and each indexes of production were determined. **Results** The best recipes of production were determined as follows: 35% fermentation liquid, 14% cane sugar, 0.26% citric acid, and 0.15% carboxyl methyl cellulose (CMC). The nutritious liquid contained polysaccharides (25.74 mg/mL), proteins (0.79 mg/mL), which was fermented rape pollen and honey by *G. lucidum*, and the broken-wall ratio of rape pollens was 72.94% in the fermentation liquid. **Conclusion** The edible fungi beverage had a nice taste, and was rich in nutrients in line with relevant national standard.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum*; rape bee pollen; liquid fermentation; nutrient; beverage of edible fungi

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560576)、云南省教育厅科学研究基金项目(2014Y080)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560576) and the Department of Education Research Fund of Yunnan Provincial (2014Y080)

*通讯作者: 赵风云, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: zhaofy@kmust.edu.cn

*Corresponding author: ZHAO Feng-Yun, Associate Professor, Food Safety Institute, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China. E-mail: zhaofy@kmust.edu.cn

表 1 发酵型灵芝花粉饮料的感官评分标准
Table 1 Sensory score standard of the production

评价指标	基本要求	分数
风味	口感清甜、适口	20
气味	纯正, 无异味, 具有独特的灵芝花粉独特清香气味	30
色泽	金黄色, 透明度较高	20
浊度	清晰透明, 无杂质, 流动性好, 均匀一致	30
总分		100

2.5.5 过 滤

将调配好的饮料利用循环水式真空泵在 0.06 MPa 进行抽滤处理。

2.5.6 灌装、杀菌

为了防止过高的温度使花粉中的营养成分受到损失, 本产品采用巴氏杀菌的方法, 罐装后 75 °C 下处理 20 min, 然后立即对瓶口进行密封, 冷却至室温。

2.5.7 理化指标的检测

氨基酸含量的测定: 采用茚三酮比色法^[10]。

多糖含量测定: 采用苯酚硫酸法^[11]。

粗蛋白含量测定: 采用考马斯亮蓝 G-250 法^[12]。

总黄酮的测定: 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法^[13]。

灰分、pH、可溶性固形物含量按照常规测定。

2.5.8 微生物检测

参照 GB 4789 - 2010, 检测菌落总数、大肠杆菌和致病菌(沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌)。

2.5.9 花粉破壁检测与破壁率的计算

取 30 μ L 发酵液制玻片, 于显微镜下观察, 平均选取 12 个视野, 统计完整花粉数量, 计算破壁率, 计算公式为: 花粉破壁率(%)=(1-发酵液中完整花粉的数量/发酵前培养基中完整花粉的数量) \times 100%。

2.6 数据处理

实验数据的统计使用 Office Excel 2010 软件; 实验数据的差异性分析使用 SPSS 19.0 软件。

3 结果与分析

3.1 发酵液与花粉溶液中破壁率及各营养成分含量的差异

发酵液中的花粉破壁率为(72.94 \pm 2.04)%, 相同量的花粉经过低温研磨破壁后的花粉溶液的破壁率

为(78.35 \pm 3.22)%, 差异不显著($P>0.05$); 将发酵液与花粉溶液进行营养成分对比, 如表 2 所示, 发酵液中的多糖含量增加极显著($P<0.01$), 含量达到(25.74 \pm 1.14) mg/mL; 黄酮和氨基酸的含量显著降低($P<0.05$), 分别为(40.62 \pm 2.81) μ g/mL 和(101.61 \pm 37.08) μ g/mL; 发酵液中的粗蛋白含量差异不显著($P>0.05$), 含量为 0.79 \pm 0.05 mg/mL。

表 2 发酵液与花粉溶液中破壁率及各营养成分含量的对比
Table 2 Comparisons of broken-wall ratios and nutrients between pollen solution and fermentation broth

	低温研磨花粉溶液	灵芝发酵花粉溶液
花粉破壁率(%)	78.35 \pm 3.22	72.94 \pm 2.04
多糖(mg/mL)	1.25 \pm 0.37	25.74 \pm 1.14**
氨基酸(μ g/mL)	191.80 \pm 38.11*	101.61 \pm 37.08
黄酮(μ g/mL)	48.04 \pm 1.13*	40.62 \pm 2.81
粗蛋白(mg/mL)	0.69 \pm 0.03	0.79 \pm 0.05

注: 1. 表中数值为平均值 \pm SD, $n=3$ 。*代表显著水平($P<0.05$), **代表极显著水平($P<0.01$); 2. 低温花粉溶液指相同量的花粉经过低温研磨破壁后配制成 100 mL 的培养基。

3.2 饮料的调配

将离心后的发酵液进行糖、酸及稳定剂调配, 提高饮料的风味、口感和稳定性。

3.2.1 饮料配方的确定

以发酵液添加量, 蔗糖添加量, 柠檬酸添加量为因素, 进行正交试验, 以感官评分为指标, 在本专业选取 20 人进行感官鉴定(以 100 分计), 试验结果见表 3。

由表 3 可以看出, 油菜花粉保健饮料的最佳配方为 C2A3B3, 即花粉发酵液加入量 35%, 蔗糖添加量为 14%, 柠檬酸添加量为 0.26%, 此组合的感官评分为 92 分。按此组合重新进行试验, 获得的感官评分为 94 分, 与表中出现的评分值相似且为最高分, 因此采用此组合为饮料的最佳配方。

3.2.2 饮料稳定剂的选择

饮料中含有蛋白质等热不稳定成分, 经过杀菌后, 会出现沉淀和悬浮物, 严重影响产品的感官性状。通过添加稳定剂可提高产品的稳定性, 在本实验中, 对比卡拉胶、海藻酸钠、CMC 和黄原胶四种稳定剂对产品的稳定性。如表 4 所示, 对照组与实验组都出现了不同程度的分层沉淀, 其中 CMC 的沉淀最

少,吸光值最小,悬浮稳定性为 $0.15\% > 0.10\% > 0.05\%$ 。可能的原因是 CMC 在水溶液中以阴离子的形式存在的,它与饮料中的蛋白分子形成复合体系,从而阻止蛋白质颗粒的移动,使产品更加稳定^[14]。

表3 饮料配方 $L_9(3^4)$ 正交试验
Table 3 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment table of the production recipes

试验号	A. 发酵液添加量/%	B. 蔗糖添加量/%	C. 柠檬酸添加量/%	感官评分(100分)
1	1(25)	1(12)	1(0.24)	80
2	1	2(13)	2(0.26)	85
3	1	3(14)	3(0.28)	80
4	2(30)	1	2	84
5	2	2	3	77
6	2	3	1	81
7	3(35)	1	3	87
8	3	2	1	81
9	3	3	2	92
均值1	81.667	83.667	80.667	
均值2	80.667	81.000	87.000	
均值3	86.667	84.333	81.333	
极差	6.000	3.333	6.333	

表4 添加不同稳定剂后饮料的稳定效果
Table 4 Stability effect of the production in different stabilizers test

增稠剂种类	添加量/%	悬浮稳定性(OD _{450 nm})	产品沉淀情况
	0	0.184	++++
对照	0	0.185	++++
	0	0.182	++++
	0.05	0.180	+
CMC	0.1	0.179	+
	0.15	0.171	+
	0.05	0.185	++
卡拉胶	0.10	0.186	++++
	0.15	0.282	+++
	0.05	0.198	++
海藻酸钠	0.10	0.192	++
	0.15	0.185	++
	0.05	0.210	+++
黄原胶	0.10	0.214	++++
	0.15	0.221	++++

注:产品的沉淀程度用“+”来表示,“+”——“++++”表示不同的沉淀程度,其中“+”越少沉淀程度越小。

3.3 饮料各项指标的检测

对饮料的各项指标进行检测,结果如下:

感官指标:在色泽上,呈现出清澈的金黄色,透明度高;在气味上,具有独特的灵芝花粉清香味;在口感上,粘稠爽口。

理化指标:饮料中营养物质较为丰富,各种成分含量如表5,其中黄酮的含量在巴氏杀菌后有较明显减少,可能是由于加热对其有一定的破坏作用。

表5 灵芝花粉饮料的各项指标
Table 5 Each indexes of the production

项目	含量
可溶性固形物(%)	14.00±0.20
多糖(mg/mL)	8.69±0.69
氨基酸(μg/mL)	31.26±5.54
粗蛋白(mg/mL)	0.23±0.03
黄酮(μg/mL)	6.21±0.23
灰分(%)	0.35±0.02
pH 值	3.71±0.42

注:表中数值为平均值±SD, n=3。

微生物指标:菌落总数(cfu/mL) 100;大肠杆菌(MPN/100 mL) 3;致病菌未检出。

4 讨论

4.1 发酵对营养成分的影响

在发酵过程中,灵芝利用发酵基质分泌出多种酶作用于花粉壁上,可以有效打破花粉壁,使花粉中的营养物质得到释放并分散在发酵液中^[15]。在本实验中,发酵液中的多糖、蛋白质的含量均得到提高,其中多糖含量增加尤为显著,提高了19.60倍,与前人报道灵芝发酵液中含有丰富的多糖物质相一致^[16]。发酵液中的氨基酸和黄酮含量有所减少,这可能是由于灵芝消耗了部分氨基酸作为氮源供自身生长,而黄酮由于其对热不稳定,在培养基加灭菌期间可能导致其部分降解,还有部分同样被灵芝生长时消耗。另有研究报道,利用发酵方法处理花粉不仅可以破壁、杀菌,还可以脱敏和改善风味;同时,发酵液中营养物质也不会被过多破坏^[17]。

4.2 饮料成分的功能性分析

食用菌饮料是指以食用菌饮料子实体的浸取液或浸取液制品为原料加工制成的饮料, 或以在食用菌及其可食用培养基的发酵液为原料经过加工制成的饮料(GB 10789-2007)。本实验制备的食用菌饮料属于后者。随着大量的城市亚健康人群、三高(高血压、高血脂、高血糖)人群以及特殊需求的人群的增加, 食药同源的功能性饮料消费需求将不断增加。本文以灵芝、蜂花粉、蜂蜜三种传统保健食品作为原料, 通过发酵作用, 既保持三者的功能成分, 又将其中的大分子物质分解为小分子物质, 更利于人体吸收利用; 同时蜂花粉得到了有效破壁, 解决了蜂花粉深加工产品破壁难的问题; 而且, 灵芝的清香和蜂蜜的芳香, 解决一般饮料人工添加香精的缺陷。通过调配后得到产品营养丰富, 含有灵芝多糖、灵芝酸、蛋白质、氨基酸、黄酮等功能成分, 是一种营养美味、天然健康的功能性饮料。

5 结 论

油菜蜂花粉和油菜蜂蜜是中国蜂产品市场上常见的种类, 其经过灵芝发酵后, 能获得营养丰富的发酵液, 其中多糖的含量为 25.74 ± 1.14 mg/mL, 蛋白质的含量为 0.79 ± 0.05 mg/mL, 花粉破壁率为 $72.94 \pm 2.04\%$ 。同时风味和口感也得到改善。

灵芝发酵液经过配方正交实验和感官评定后, 得到最佳配方: 发酵液添加量为 35%, 蔗糖添加量为 14%, 柠檬酸添加量为 0.26%, 稳定剂选择为 CMC, 且添加量为 0.15%。

通过各项指标的检测分析, 该饮料是一种营养丰富、天然美味的功能型食用菌饮料。

参考文献

- [1] Silva TMS, Camara CA, Lins ACDS, *et al.* Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* ducke [J]. *J Food Compos Anal*, 2006, 19(6-7): 507-511.
- [2] Medeiros KC, Figueiredo CA, Figueiredo TB, *et al.* Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(1): 41-46.
- [3] Alvarez-Suarez J, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, *et al.* The composition and biological activity of honey: a focus on manuka honey [J]. *Foods*, 2014, 3(3): 420-432.
- [4] 罗魏, 刘学文, 王永欢, 等. 功能性饮料的发展现状及展望[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(2): 418-432.
Luo W, Liu XW, Wang YH, *et al.* Present situation and prospects of functional drinks [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(2): 418-432.
- [5] 阿依努尔·热西提, 努尔比亚·亚希坤, 阿不都拉·阿巴斯. 蜂花粉破壁及蜂花粉产品研究进展[J]. *中国酿造*, 2014, 33(5): 22-24.
Aynur RIXTT, Nurbiya YALKUN, Abdullah ABBAS. Progress on cell wall-broken of bee pollen and bee pollen products [J]. *China Brewing*, 2014, 33(5): 22-24.
- [6] Liang Z, Yi Y, Guo Y, *et al.* Chemical characterization and anti-tumor activities of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 9103-9116.
- [7] Hu L, Ma Q, Huang S, *et al.* A new nortriterpenoid from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum* [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 7: 11-13.
- [8] 唐晓璇, 王成忠, 李守伟, 等. 灵芝醋饮料制备工艺的研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(8): 141-145.
Tang XX, Wang CZ, Li SW, *et al.* Study on processing technology of *Ganoderma lucidum* vinegar beverage [J]. *Food Ind*, 2015, 36(8): 141-145.
- [9] 张喆, 师俊玲. 燕麦的食用菌液体发酵及其发酵饮料研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(5): 169-174.
Zhang Z, Shi JL. Liquid cultivation of edible mushroom in oat emulsion and development of beverage from the culture [J]. *Food Sci*, 2010, 31(5): 169-174.
- [10] Rienthen M, Romieu C, Gregan R, *et al.* Validation and application of an improved method for the rapid determination of proline in grape berries [J]. *J Agr Food Chem*, 2014, 62(15): 3384-3389.
- [11] 李洪燕, 罗浩, 刘结容, 等. 酶解法提取罗汉果多糖的工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, (2): 689-694.
Li HY, Luo H, Liu JR, *et al.* Study on extraction of polysaccharide from *Siraitia Grosvenorii* by cellulase method [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (2): 689-694.
- [12] Saleemuddin M, Ahmad H, Husain A. A Simple, Rapid, and sensitive procedure for the assay of endoproteases using coomassie brilliant blue G-250 [J]. *Anal Biochem*, 1980, 105(1): 202-206.
- [13] Sava C, Sirbu R. Analytical study of the determination of flavonoids in black sea algae [J]. *Ovidius Univ Annals Chem*, 2010, 21(1): 29-34.
- [14] Capitani CD, Pacheco MTB, Gumerato HF, *et al.* Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide [J]. *Pesqui Agropecu Bras*, 2005, 40(11): 1123-1128.

- [15] 杨冬梅, 李俊年, 田向荣, 等. 不同破壁法对高原油菜花粉挥发性成分的影响[J]. 湖南农业科学, 2011, (7): 88-91.

Yang DM, Li JN, Tian XR, *et al.* Influences of different wall-breaking methods on volatility components in pollen of plateau brassica campestris [J]. Hunan Agric Sci, 2011, (7): 88-91.

- [16] 陶如玉, 郝利民, 陈强, 等. 灵芝菌丝体液态发酵及多糖药理活性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 260-264.

Tao RY, Hao LM, Chen Q, *et al.* Recent progress in pharmacological activities of polysaccharides from themycelia of liquid-cultured *Ganoderma lucidum* [J]. Food Sci, 2015, 36(9): 260-264.

- [17] 任向楠, 张红城, 董捷. 蜂花粉破壁的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(21):380-383.

Ren XN, Zhang HC, Dong J. Research progress in cell disruption

techniques for pollen [J]. Food Sci, 2009, 30(21): 380-383.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张政, 硕士研究生, 主要研究方向为发酵工程。

E-mail: 372794280@qq.com



赵风云, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: zhaofy@kmust.edu.cn