富硒平菇菌种筛选、发酵优化及菌丝特性评价

张文婧[1]，刘 欢[2]，李红波[1]，莫海珍[1]，刘振彬[*1]

（1. 陕西科技大学 食品科学与工程学院，陕西 西安 710021；2. 商洛市农业生态和资源保护中心，陕西 商洛 726000）

摘要：为探究平菇中最优耐硒菌株，确定菌株培养条件及菌丝特性，采用固体培养和液态发酵对4种平菇进行筛选，选取红平菇培养富硒菌丝体，测定其酶活性指标以及菌丝体蛋白质、多糖的体外抗氧化活性。结果表明，红平菇是最佳耐硒菌种，最佳培养条件为：摇床转速150 r/min，pH 6.5，温度25 ℃，添加硒质量浓度5.0 mg/L；富硒菌丝体与普通菌丝体相比，提高了PPO、POD及SOD活性，提高了菌丝抗逆性，且富硒菌丝体及其多糖、蛋白质对DPPH、超氧阴离子自由基和羟基自由基清除能力较强。最后研究了红平菇富硒菌丝体对Caco-2细胞存活率的影响，发现红平菇富硒菌丝体可以抑制Caco-2细胞的存活。该研究表明红平菇富硒液体发酵菌丝体具有较高的生理活性，可作为一种补硒保健品。

关键词：富硒；液体培养；平菇；发酵条件；抗氧化

中图分类号：TS 209　**文章编号：**1673-1689(2024)06-0075-11　**DOI：**10.12441/spyswjs.20231015001

Screening, Fermentation Optimization, and Mycelial Characterization of Selenium-Enriched *Pleurotus ostreatus* Strains

ZHANG Wenjing[1]，*LIU Huan*[2]，*LI Hongbo*[1]，*MO Haizhen*[1]，*LIU Zhenbin*[*1]

(1. School of Food Science and Technology, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China; 2. Shangluo City Agroecology and Resource Conservation Centre, Shangluo 726000, China)

Abstract: To explore the optimal selenium-tolerant strains in *Pleurotus ostreatus* and determine the culture conditions and mycelial characteristics, four kinds of *Pleurotus ostreatus* were screened by solid culture and liquid fermentation. *Pleurotus djamor* was selected to culture selenium-enriched mycelium. The enzymatic activity indicators and the *in vitro* antioxidant activities of mycelial proteins and polysaccharides were determined. The results determined *Pleurotus djamor* as the best selenium-tolerant species. The optimal culture conditions were as follows: shaking speed of 150 r/min, pH 6.5, temperature of 25 ℃, and selenium concentration of 5.0 mg/L. Compared with the conventional mycelium, the selenium-enriched mycelium promoted the activities of PPO, POD and SOD, improved the stress resistance of mycelium. The selenium-enriched mycelium and its polysaccharides and proteins had strong scavenging ability to DPPH, superoxide anion radical and

收稿日期：2023-10-15　**修回日期：**2023-11-27

基金项目：国家"十四五"重点研发项目(2021YFD1600400)。

*通信作者：刘振彬(1990—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事蛋白质资源开发、食品3D打印研究。

E-mail：zhenbinliu@sust.edu.cn

hydroxyl radicals. Finally, the effect of selenium-enriched mycelium of *Pleurotus djamor* on the survival rate of Caco-2 cells was investigated, and it was found that the selenium-enriched mycelium could inhibit the survival rate of Caco-2 cells. The selenium-enriched liquid fermented mycelium of *Pleurotus djamor* has been preliminarily determined with high physiological activity, which could be considered as a selenium supplement.

Keywords: selenium enrichment, liquid culture, *Pleurotus ostreatus*, fermentation conditions, antioxidant

硒(Se)是人体正常生理活动所必需的一种微量元素,硒在土壤中分布不均匀,主要以硒化合物的形式存在。研究表明,硒具有提高机体免疫力、抗肿瘤、缓解体内重金属蓄积、抗疲劳、抗氧化和防止心血管疾病等功能[1−2],机体缺硒会导致克山病、大骨节病、肝硬化、慢性类风湿性关节炎等多种疾病的发生[3−6]。目前人体硒的主要来源是通过食物摄入,其中富硒农作物是人体获取有机硒的重要途径之一。此外,大多数国家都存在硒摄入不足的问题,因此研究安全高效的补硒食品具有重要意义[1]。

食用菌本身无毒并且富含丰富的碳水化合物、蛋白质、脂肪营养物质[8],是良好的富硒载体,能够将无机硒转化为有机硒,可以更好地吸收利用[7]。食用菌的培养方式分为子实体培养和深层发酵菌丝体培养,与传统的子实体培养相比,深层发酵具有占地少、成本低、产量高、质量可控、重复性好、环境友好等优点[9]。目前,在液体培养基中添加无机硒,通过深层发酵培养富硒食用菌菌丝体已得到广泛应用。

平菇(*Pleurotus ostreatus*)是侧耳科侧耳属真菌,是我国当前栽培产量最高的四大食用菌种之一,营养丰富,含有 18 种氨基酸,其中人体必需氨基酸和 2 种半必需氨基酸占氨基酸总量的 40%~50%[10−11]。采用平菇作为有机硒富集的微生物载体,能够有效提高平菇中有机硒的含量,且富硒平菇较其他富硒保健品相比,具有成本低、生产工艺简单的优势。曾璇竹等研究发现香菇作为富硒载体,硒的添加不仅促进香菇菌丝的生长及多糖的累积,同时也提高了其抗氧化活性,对 DPPH 自由基有较好的清除作用[12]。Miletic 等研究了云芝在硒强化培养基中浸没栽培过程中生长和积累硒的能力[13],结果表明硒酵母可用于一种潜在的新型食品补充剂。因此,通过利用食用菌深层发酵对无机硒进行富集和吸收转化,获得菌丝提取物,且氨基酸、蛋白质等营养成分明显增加,强化了其营养价值,得到了具有某种特殊保健功能的食品。

作者研究了 4 种平菇的富硒能力,筛选出耐硒菌种;优化深层发酵培养条件,得到红平菇富硒菌丝体,并测定其酶活力以及菌丝蛋白质、多糖的体外抗氧化活性,为红平菇富硒产品的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红平菇、肺形侧耳、平菇 0170、平菇 0203:陕西省微生物研究所;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB):索来宝科技有限公司;Na_2SeO_3、ABTS、氢氧化钠、盐酸、抗坏血酸、三氯化铁、铁氰化钾、DPPH:上海麦克林生化科技有限公司;粗酶提取试剂盒:北京盒子生工科技有限公司。

1.2 仪器

HZQ−F160 全温振荡培养箱:上海精胜科学仪器有限公司;BKQ−Z751 高压蒸汽灭菌锅:博科医疗器械有限公司;pH 计:佑科仪器;数显电子天平:华志福建电子科技有限公司;恒温磁力搅拌器:江苏常州鸿泽仪器有限公司;高速冷冻离心机:湖南安君仪器有限公司;酶标仪:Perkinelmer 公司;OLABO 实验室纯水仪:山东省济南市小鸭工业园。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 将菌种分别接种到超净工作台中的固体培养基里,于 25 ℃恒温箱中培养 7 d。在菌丝边缘取几株发育状况良好、生长速度相同的菌株,接种到装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,同时放入几个钢球,这有利于打破菌丝和增加生长点。将已接种的培养瓶放入振荡培养箱中,转速为 150 r/min,培养温度为 25 ℃。

1.3.2 菌丝生长速度的测定 设计 6 个均匀递增的 Na_2SeO_3 质量浓度,分别为 0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mg/L。为了保证每个菌种的接种量一致,均采用 8 mm 孔径的打孔器,分别取 4 个平板边缘菌丝浓白、活性好的同一菌落,接种于不同质量浓度 Na_2SeO_3 的 PDA 平板中央,于 25 ℃生化培养箱中培养,每个样品做 3 个平行。在培养的第 0、2、4、6、8 天测量菌落直径长度(cm),取平均值计算各菌种的菌落直径日均增长量(cm),于培养的第 8 天对菌丝密度、菌丝外观进行感官评价。

1.3.3 富硒菌种的筛选 将配制好的 PDB 液体培养基添加一定量的 Na_2SeO_3 母液,使 Na_2SeO_3 质量浓度分别为 0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mg/L。以体积分数 5%无菌转接至 100 mL 液体培养基中,然后在摇床中于 25 ℃、150 r/min 振荡培养 7 d,每个处理设 3 个平行。

1.3.4 生物量测定方法 将培养 7 d 的液体培养基于 8 000 r/min 离心 10 min,菌丝体用蒸馏水冲洗 2~3 次,离心收集菌丝体,然后置于真空冷冻干燥机中干燥 2 d 后称质量,每个菌株设 3 个平行,菌丝体生物量见公式(1)[14]:

$$p=\frac{m}{v} \quad (1)$$

式中:p 为红平菇菌丝生物量,g/dL;m 为菌丝体干燥后质量,g;v 为发酵液体积,dL。

1.3.5 硒质量分数的测定 采用氢化物原子荧光法测定富硒菌丝体中的硒质量分数[15]。

1.3.6 液体培养基培养条件优化

1)Na_2SeO_3 对菌丝体生长的影响 参照丁健峰[16]的方法略加修改。按均匀递增法设计 Na_2SeO_3 质量浓度分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mg/L 进行试验,在摇床中于 25 ℃、150 r/min 振荡培养,每个样品设 3 个平行,在培养的第 8 天过滤收集菌丝球,真空冷冻干燥并称质量。

2)培养温度对菌丝体生长的影响 菌丝体生长需要氧气,不同转速会影响发酵过程中的氧气含量,溶氧高适合菌球生长[17-18]。作者分别以 22、24、26、28、30 ℃进行温度梯度试验,在发酵培养基初始液 pH 自然,150 r/min 分别培养 8 d,过滤收集菌丝球,真空冷冻干燥并称质量。

3)发酵 pH 对菌丝体生长的影响 pH 在发酵过程对菌丝吸收营养物质有一定的影响,也影响菌丝体的外在形态[19-20]。采用均匀递增法,设计 6 个pH,分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,在 25 ℃、150 r/min 摇床振荡培养,每个样品设 3 个平行。培养的第 8 天过滤收集菌丝,冷冻干燥后测量菌丝干质量,测定方法同公式(1)。

4)摇床转速对菌丝体生长的影响 温度对真菌菌丝体的生长有着极其重要的作用,其对发酵的影响主要表现在发酵液的性质、细胞生长、产物合成等方面[21-22]。5 个恒温培养摇床转速分别为 90、120、150、180、210 r/min。培养基 pH 自然,Na_2SeO_3 质量浓度为 5.0 mg/L,置于 25 ℃恒温摇床培养,每个样品设 3 个平行,在培养的第 8 天过滤收集菌丝,冷冻干燥后测量菌丝干质量,测定方法同式(1)。

1.3.7 发酵条件优化与设计 根据单因素实验结果对影响较大的 Na_2SeO_3 质量浓度、pH 值、摇床转速和温度进行四因素三水平正交试验设计,对红平菇的富硒液体培养条件进行优化,正交实验设计见表 1。

表 1 正交实验设计表

Table 1 Orthogonal experimental design

水平	因素			
	A pH	*B* 温度/℃	*C* 摇床转速/(r/min)	*D* 硒质量浓度/(mg/L)
1	6.0	25	150	5.0
2	6.5	26	180	6.0
3	7.0	27	210	7.0

1.3.8 酶活测定 发酵培养后的新鲜菌丝体分装到离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,合并菌丝,并用等量蒸馏水清洗 3~4 次。丙二醛(MDA)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD)严格按照试剂盒方法测定。

1.3.9 菌丝蛋白和多糖的提取

1)菌丝蛋白 参照马玲的碱提酸沉法略加修改[23]。红平菇菌丝体冷冻干燥,粉碎,称 1 g 于烧杯中,料液比 1 g:30 mL,用 1 mmol/L 的 NaOH 调至 pH 为 11,于 4 500 r/min 离心 25 min,收集上清液,用 1 mmol/L 的 HCl 调至等电点 3.5,再次离心收集沉淀,冷冻干燥。

2)菌丝多糖 参考孙叶的方法加以修改[24]。将红平菇菌丝冻干粉碎,称 1 g 于烧杯中,加入 50 mL 水混匀,60 ℃水浴 1.5 h,4 000 r/min 离心 5 min,过

滤取沉淀，重复提取 3 次，合并提取液，置于 60 ℃烘箱中浓缩至原体积 1/5，浓缩液加入 5 倍体积的体积分数 95%的乙醇溶液，溶解过夜。4 000 r/min 离心 10 min，过滤取沉淀为粗多糖，60 ℃烘箱烘干。

1.3.10 体外抗氧化活性的测定

1）清除 DPPH 自由基能力的测定　参照孙森霜[25]和杨晶莹[26]的方法稍加修改，将蛋白质、多糖、菌丝体分别制成梯度 0.05、0.10、0.20、0.40 mg/mL 的溶液，取 1 mL 待测液与 1 mL 的 0.1 μmol/L DPPH 溶液充分混匀，避光反应 30 min，于 517 nm 测定吸光度，以抗坏血酸（VC）为阳性对照。DPPH 自由基清除率见式（2）：

$$X=\left(1-\frac{A_2-A_1}{A_0}\right)\times 100\% \quad (2)$$

式中：X 为样品 DPPH 的清除率，%；A_2 为待测液与 DPPH 自由基溶液混合的吸光度；A_1 为待测液与无水乙醇的吸光度；A_0 为无水乙醇与等量 DPPH 溶液的吸光度。

2）清除超氧阴离子（$O_2^{-}\cdot$）自由基能力的测定　取 1 mL 的待测液，加入 3 mL 的 Tris-HCl（pH 8.2），于 30 ℃放置 20 min，在室温下加入 3 mL 的5 mmol/L 的焦性没食子酸，混匀后放置 3 min，然后加入 1 mL 的 HCl，VC 溶液为阳性对照。超氧阴离子自由基清除率见式（3）：

$$Y=\left(1-\frac{A_5-A_4}{A_3}\right)\times 100\% \quad (3)$$

式中：Y 为样品超氧阴离子自由基清除率，%；A_5 为 320 nm 处测量该样品的吸光度；A_4 为蒸馏水替代焦性没食子酸溶液测定的吸光度；A_3 为用蒸馏水代替样品溶液测定的吸光度。

3）清除羟基（·OH）自由基能力的测定　取 1 mL 待测液，加入 9 mmol/L 的 H_2O_2，9 mmo1/L 的 $FeSO_4$、9 mmol/L 的水杨酸-无水乙醇溶液及蒸馏水各 1 mL，涡旋混匀，37 ℃水浴 35 min，样品于 510 nm 处测定吸光度，VC 溶液作为阳性对照。·OH 自由基清除率计算参照公式（4）：

$$Z=\left(1-\frac{A_8-A_7}{A_6}\right)\times 100\% \quad (4)$$

式中：Z 为·OH 自由基清除率，%；A_8 为样品于 510 nm 处测定的吸光度；A_7 为用蒸馏水替代 H_2O_2 溶液测定的吸光度；A_6 为以蒸馏水代替样品测定的吸光度。

1.3.11 CCK-8 法测定红平菇富硒菌丝体对肠癌细胞（Caco-2）活力的影响　采用 CCK-8 法进行测定[27]。取对数生长期的 Caco-2，消化后制成细胞悬液，在显微镜下观察并计数。以每孔 100 μL 细胞悬液（8 000 CFU/mL）接种于 96 孔板中，培养箱中培养 48 h，直至细胞完全贴壁，弃去培养液。取等体积红平菇富硒菌丝体样品与未富硒菌丝体样品，按照质量浓度为 0、50、100 mg/mL 加入各孔中，每个质量浓度做 6 个复孔，设置细胞和样品对照组。待培养 48 h 后，在避光条件下每孔均加入 10 μL 的 CCK-8 溶液，在培养箱中继续孵育 4 h 后，测定 OD_{450} 值，细胞活力见公式（5）：

$$R=\frac{A_{10}-A_9}{A_{11}-A_{10}}\times 100\% \quad (5)$$

式中：R 为细胞存活率，%；A_{10} 为含有细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物的孔隙吸光度；A_9 为含有培养基、CCK-8 溶液，无细胞的孔隙吸光度；A_{11} 为只含有细胞、培养基、CCK-8 溶液的孔隙吸光度。

1.3.12 数据处理　利用 SPSS 20.0 统计分析软件进行数据处理，进行 LSD 法多重比较，均数之间进行比较的显著性标准为 α=0.05，P>0.05 表示差异不显著，P<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 富硒平菇菌株筛选

2.1.1 4 种平菇在固体培养基上菌丝体生长的影响　图 1 为 4 种平菇在不同 Na_2SeO_3 质量浓度（0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mg/L）固体培养基上菌丝体的生长情况。结果表明，培养 7 d 后，红平菇菌丝体生长很好，在不同培养基上均长出浓白色菌丝体。在硒质量浓度为 5.0~15.0 mg/L 时长势最好，与对照无差别；20.0 mg/L 以后菌丝体面积明显减小且比对照组生长情况差很多，生长明显受抑制。可能是因为 Na_2SeO_3 添加量较高时，培养基营养成分过高，菌丝开始负生长，即生长受抑制。

平菇 0170 菌丝体在 5.0 mg/L 的培养基上生长情况最好，质量浓度超过 10.0 mg/L 时菌丝生长受到抑制。平菇 0203 菌丝体与平菇 0170 生长情况类似，但质量浓度为 25.0 mg/L 时菌丝几乎不生长，呈现出细状淡黄状态。肺形侧耳在质量浓度为 5.0、10.0 mg/L 时菌丝体呈正生长，但与对照组相比生长情况稍差，超过 10.0 mg/L 后菌丝体呈负生长状态。

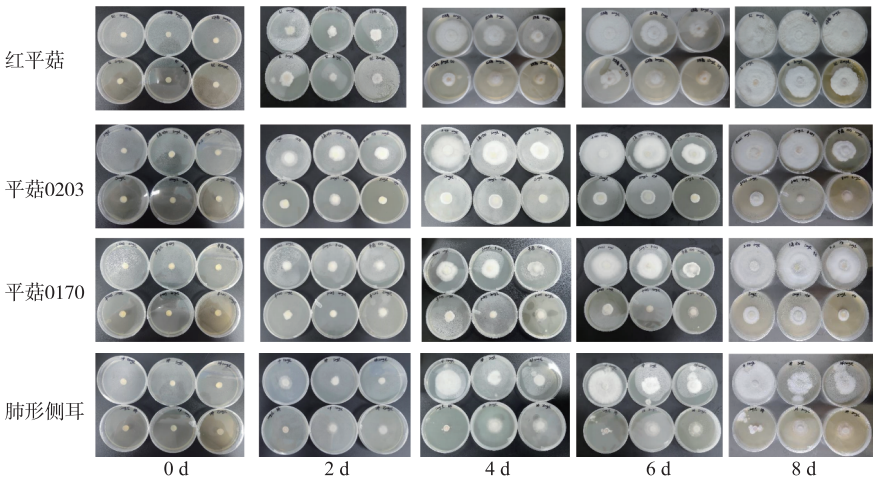


图 1　不同硒质量浓度固体培养基上 4 种平菇的菌丝生长状况

Fig. 1　Mycelial growth of four species of *Pleurotus ostreatus* on solid medium with different selenium concentrations

综上所述，红平菇在 Na_2SeO_3 培养基上生长情况最好，菌丝密度高且粗壮浓白，在 Na_2SeO_3 质量浓度为 5.0 mg/L 时，菌落直径日均增长量最高，达到 1.78 cm，符合富硒培养要求。

2.1.2　Na_2SeO_3 添加量对菌丝体菌落直径和菌丝生长速度的影响　从平菇菌丝体的生长状况和生长速度可以看出，不同菌种对硒元素的适应能力是存在差异的，菌丝生长的特征也存在差异。由于 4 种菌丝从第 2 天才开始生长，因此测量了第 2~8 天的菌落直径，4 种平菇菌丝体的菌落直径变化见图 2。结果显示，4 种平菇的菌落直径均随着发酵时间增加而增加，且均是对照组(0 mg/L)增长最快。红平菇、平菇 0203 和平菇 0170 菌落直径在 5.0 mg/L 时增长速度相差不大，肺形侧耳菌落直径增长最缓

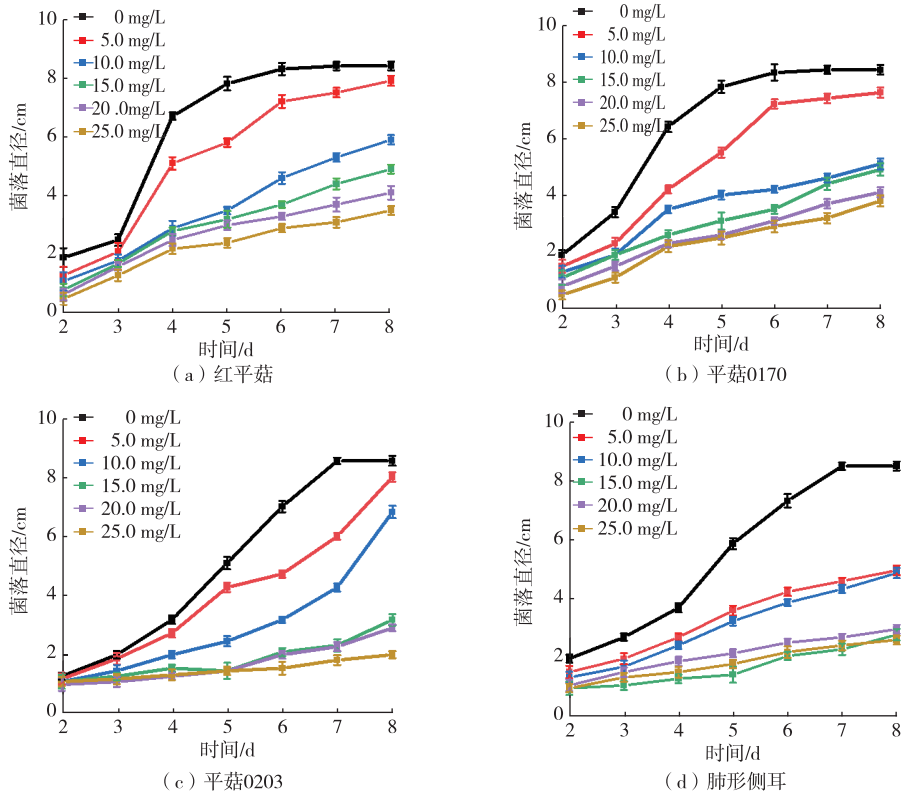


图 2　发酵过程中 4 种食用菌菌丝体的菌落直径变化

Fig. 2　Changes in colony diameters of mycelium of four edible fungi during the fermentation process

慢。但是在培养 8 d 后，红平菇在 5.0 mg/L 时更接近对照组，这说明低质量浓度 Na_2SeO_3 促进菌丝生长而高质量浓度抑制生长。

发酵过程中 4 种平菇菌丝体的菌丝平均生长速度见表 2。添加 5.0 mg/L 的 Na_2SeO_3 的红平菇和平菇 0170 培养基中菌丝最接近 PDA 培养基培养的菌丝，这与前面菌落直径的生长情况一致。其中，红平菇在 5.0 mg/L 的 Na_2SeO_3 培养基上的平菇生长速度可以达到 1.13 cm/d，比在不含 Na_2SeO_3 的 PDA 培养基中的生长速度(1.08 cm/d)还要高。因此，从斜面的菌种活化程度来看，与其他平菇相比，红平菇更适合深层发酵培养。

4 种平菇的深层发酵效果对比见表 3。4 种平菇对硒元素的富集能力差别不大，但是对硒的耐受力有差异。其中肺形侧耳和平菇 0203 耐受力最差，在 Na_2SeO_3 质量浓度为 10.0 mg/L 时已经停止生长，菌丝体出现了硒中毒的现象。通过观察，红平菇对硒元素的耐受力要优于平菇 0170，更适合富硒深层发酵培养。因此，最终选择红平菇作为富硒深层发酵的发酵菌种。

表 2　不同食用菌的菌丝体生长特性

Table 2　Mycelial growth characteristics of different edible fungi

Na_2SeO_3 质量浓度/(mg/L)	红平菇		平菇 0203		平菇 0170		肺形侧耳	
	平均生长速度/(cm/d)	菌丝体外观	平均生长速度/(cm/d)	菌丝体外观	平均生长速度/(cm/d)	菌丝体外观	平均生长速度/(cm/d)	菌丝体外观
0	1.08	非常浓密浓白	1.19	粗壮浓白	1.21	粗壮浓白	1.20	粗壮浓白
5.0	1.13	粗壮浓白	1.14	浓白	1.10	粗壮浓白	0.81	粗壮浓白
10.0	0.98	粗壮浓白	0.69	浓白	0.97	粗壮密白	0.87	粗壮浓白
15.0	0.95	粗壮浓白	0.44	粗壮浓白	0.50	粗壮浓白	0.68	粗壮浓白
20.0	0.61	粗壮浓白	0	无生长	0.43	细状淡黄	0.43	细状淡白
25.0	0.47	粗壮浓白	0	无生长	0.30	细状淡黄	0.29	细状淡白

表 3　不同平菇的富硒效果

Table 3　Selenium enrichment effect of different *Pleurotus ostreatus*

菌种	Na_2SeO_3 添加量/(mg/L)	菌丝生物量/(g/dL)	硒质量分数/(μg/g)
红平菇	0	0.856	<0.006
	5.0	0.893	104.280
	10.0	0.665	152.780
	15.0	0.456	314.030
	20.0	菌丝体不生长	无法测定
	25.0	呈红色	无法测定
平菇 0170	0	0.880	<0.006
	5.0	0.681	121.598
	10.0	0.410	141.460
	15.0	不生长	无法测定
	20.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
	25.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
平菇 0203	0	0.490	<0.006
	5.0	0.353	158.530
	10.0	不生长	无法测定
	15.0	不生长	无法测定
	20.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
	25.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
肺形侧耳	0	0.597	<0.006
	5.0	0.291	118.040
	10.0	不生长	无法测定
	15.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
	20.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定
	25.0	菌丝体不生长，呈红色	无法测定

2.2 红平菇液体发酵条件优化

2.2.1 *发酵条件单因素优化* 由图 3(a)可以看出,红平菇的菌丝干质量随着 Na_2SeO_3 质量浓度的增加而降低,这说明高质量浓度的 Na_2SeO_3 会抑制菌丝生物量,这个结果与罗盈依的结果基本一致[28],该研究表明,在红平菇 P043 富硒培养时,培养基中 Na_2SeO_3 质量浓度为 4.0~8.0 mg/L 时促进菌丝生长,随着质量浓度的增加,菌丝生长逐渐受到抑制。本研究中 Na_2SeO_3 质量浓度为 5.0 mg/L 时菌丝生物量达到最大值,为 0.65 g/dL,筛选质量浓度为 5.0、6.0、7.0 mg/L 的 Na_2SeO_3 进行后续正交试验。图 3(b)是 pH 的单因素试验结果,红平菇在不同 pH 的液体培养基中的菌丝生物量不等,pH 为 5.0 时较少,但 pH 为 5.0~6.0 时生物量增速较快,pH 为 6.0~7.5 时缓慢下降,pH 为 6.0 时生物量达到最大值,为 1.204 g/dL。故筛选 pH 为 6.0、6.5、7.0 这 3 个水平进行正交试验。由图 3(c)可以看出,红平菇菌丝干质量随着摇床转速的提高而增加,较大的转速有利于菌丝的培养,故筛选转速 150、180、210 r/min 这 3 个水平进行正交试验。图 3(d)表明,红平菇富硒菌丝体可以在 22~30 ℃的条件下生长,但菌丝生长的差异性很大。当温度低于 26 ℃时,菌丝体生物量较大,26 ℃以上菌丝的生长受到抑制,不适合红平菇深层发酵培养。故筛选 25、26、27 ℃共 3 个水平进行正交试验。

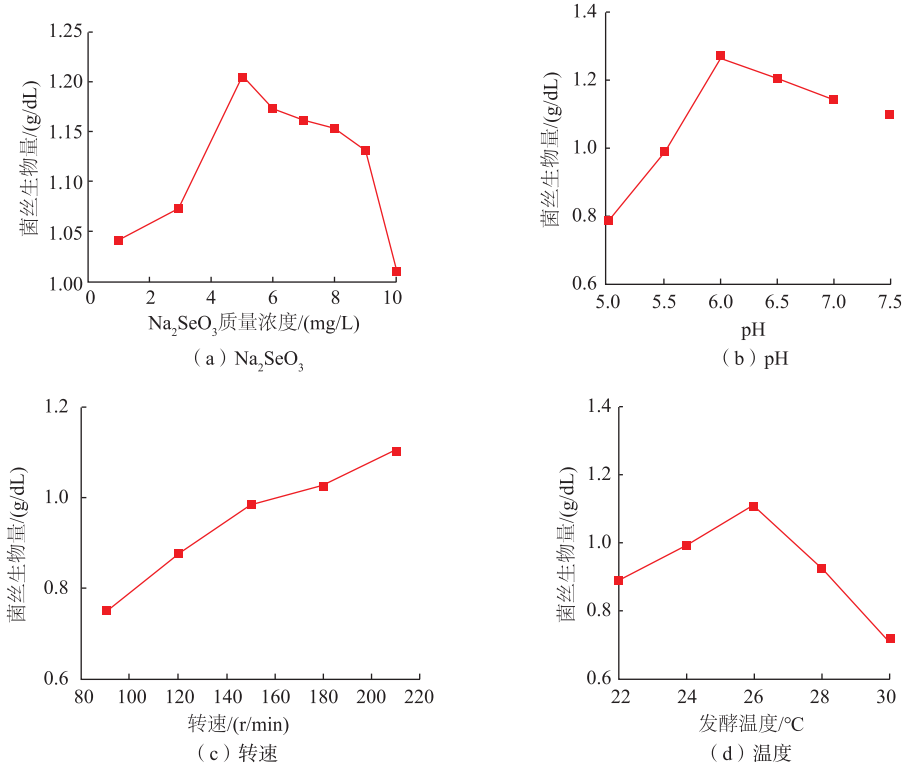


图 3 红平菇液体发酵单因素试验

Fig. 3 Single-factor results of liquid fermentation of *Pleurotus djamor*

2.2.2 *正交试验优化* 为考察不同发酵条件对菌丝体生长和富硒量的影响,选取摇床转速、pH、温度和 Na_2SeO_3 质量浓度 4 个因素进行正交试验,以菌丝体生物量为评价指标。

由表 4~5 可以看出,影响平菇富硒菌丝体生物量的因素为 $C>D>B>A$,即转速>Na_2SeO_3 质量浓度>温度>pH。红平菇富硒液态发酵最优工艺参数为 $A_2B_1C_1D_1$,由于正交表中没有这种组合,按此重新进行试验,获得红平菇富硒菌丝体生物量 1.204 mg/L,总硒质量分数 101.23 μg/g。

2.3 菌丝体特性评价

2.3.1 *酶活的变化* 以优化后的发酵工艺制得红平菇富硒菌丝体的 SOD、PPO、POD 酶活以及 MDA 质量摩尔浓度为指标,以未富硒的红平菇菌丝体为对照,比较富硒处理对红平菇菌丝理化特性的影响,结果见图 4。

表 4　正交试验结果与分析

Table 4　Orthogonal test results and analysis

实验号	*A* pH	*B* 温度	*C* 摇床转速	*D* 硒质量浓度	菌丝生物量/（g/dL）	硒质量分数/（μg/g）
1	1	1	1	1	1.104	104.280
2	1	2	2	2	0.859	31.696
3	1	3	3	3	0.665	87.840
4	2	1	2	3	1.018	92.740
5	2	2	3	2	0.837	57.644
6	2	3	1	2	1.021	24.123
7	3	1	3	2	0.819	28.294
8	3	2	1	3	0.923	94.076
9	3	3	2	1	1.095	44.657
K_1	0.876	0.980	1.016	1.012		
K_2	0.959	0.873	0.991	0.900		
K_3	0.946	0.927	0.774	0.869		
R	0.083	0.107	0.242	0.143		

表 5　正交试验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	*F* 值	*F* 临界值
pH	0.012	2	0.284	4.460
温度	0.017	2	0.402	4.460
转速	0.106	2	2.509	4.460
Na_2SeO_3 质量浓度	0.034	2	0.805	4.460
误差	0.170	8		

硒对红平菇菌丝生理生化特性的影响见图 4。图 4(a)是硒对红平菇菌丝 MDA 质量摩尔浓度的影响，加硒组的 MDA 质量摩尔浓度高于未加硒组，说明在 Na_2SeO_3 质量浓度为 5.0 mg/L 时，菌丝体内有毒物质增加，加剧了膜脂过氧化程度，生物膜结构被破坏。硒对红平菇菌丝 PPO 活性的影响见图 4(b)，加硒组活性高于未加硒组，说明硒的添加有利于提高 PPO 酶活，促进醌类物质的积累。图 4(c)为总

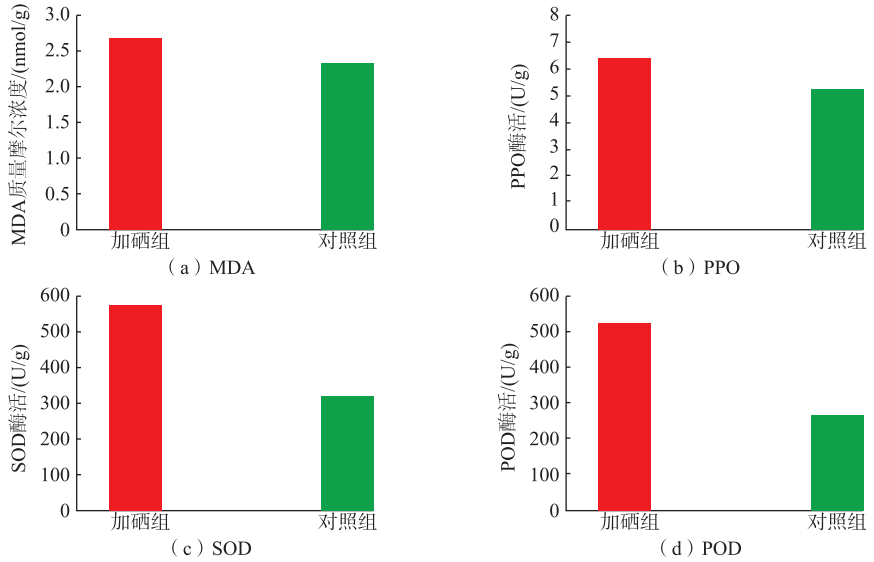


图 4　硒对红平菇菌丝生理生化特性的影响

Fig. 4　Effect of selenium on the physiological and biochemical properties of *Pleurotus djamor*

SOD 活性的变化情况，其中加硒组酶活高于对照组,说明5.0 mg/L Na_2SeO_3 时总SOD 的活性增加;由图 4(d)可知,加硒组 POD 的酶活要高于对照组,在5.0 mg/L Na_2SeO_3 时 POD 的酶活最高。

2.3.2 菌丝蛋白质、多糖的硒质量分数　以硒标准质量浓度(μg/L)为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制硒标准曲线。标准曲线为 y=56.81x+1.72,R^2=0.994,根据标准曲线可得出菌丝多糖、蛋白质中硒的质量分数,见图 5。

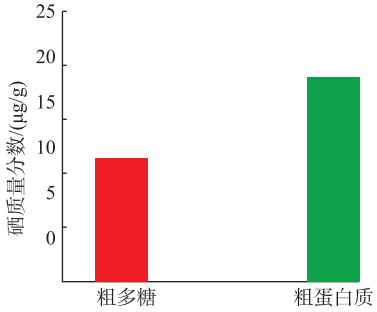
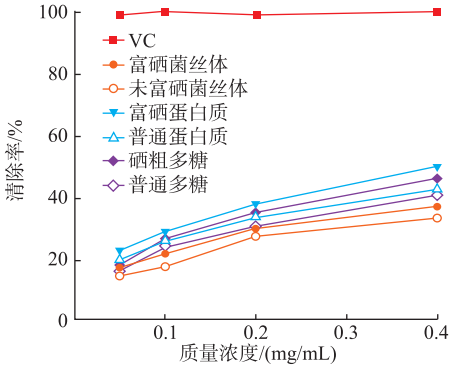


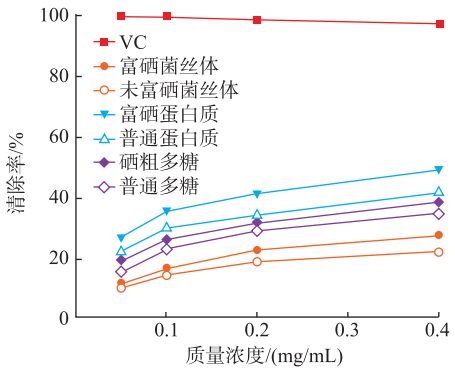
图 5　红平菇富硒菌丝体粗多糖、粗蛋白质中硒的质量分数

Fig. 5　Selenium mass fraction in crude polysaccharide and crude protein of selenium-enriched *Pleurotus djamor* mycelium

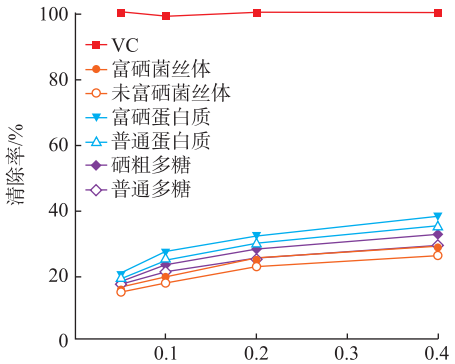
2.3.3 菌丝体、蛋白质和多糖体外抗氧化活性　菌丝体及其多糖、蛋白质的抗氧化活性见图 6。随着样品质量浓度的不断升高,菌丝体、蛋白质和多糖的抗氧化活性也随之增强。在 0~0.4 mg/mL 呈量效关系,当质量浓度为 0.4 mg/mL 时,清除率达 50.21%,说明菌丝蛋白质对 DPPH 自由基具有较好的清除能力。可以看出,菌丝蛋白质呈现较好的抗氧化能力,菌丝多糖次之,其次为菌丝体。但是富硒组比未富硒组抗氧化能力好。



(a) DPPH自由基



(b) 羟基自由基



(c) 超氧阴离子自由基

图 6　菌丝体及其蛋白质、多糖的体外抗氧化活性

Fig. 6　*In vitro* antioxidant activity of mycelial proteins and polysaccharides

2.3.4 富硒菌丝体对 Caco-2 细胞活性的影响　由图 7 可以,看出样品质量浓度为 0 时,对照组与富硒组中 Caco-2 细胞均可正常存活。菌丝体质量浓度增加后,Caco-2 细胞存活率均降低,生长受抑制。与对照组相比，富硒组中 Caco-2 细胞的存活率更低,这说明富硒组菌丝体对 Caco-2 细胞有抑制作用。

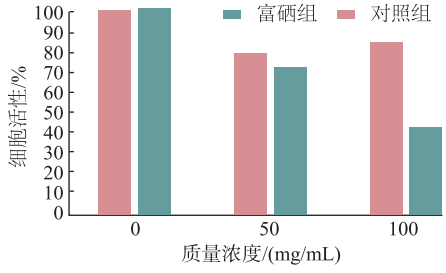


图 7　红平菇富硒菌丝体对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig. 7　Effect of selenium-enriched mycelium of *Pleurotus djamor* on the viability of Caco-2 cells

3 结 语

作者先对红平菇、平菇0170、平菇0203和肺形侧耳等4种平菇菌株以Na_2SeO_3为硒源进行富集，发现红平菇为最佳耐硒菌种。对影响较强的4个因素(Na_2SeO_3添加量、发酵转速、发酵温度、发酵液pH)进行正交试验，得到红平菇最佳培养条件为150 r/min、pH 6.5、25 ℃、Na_2SeO_3质量浓度5.0 mg/L，此时菌丝生物量为1.204 g/dL，总硒质量分数为101.23 μg/g。以优化条件制备红平菇富硒菌丝体，未加硒组为对照，分别研究其对SOD、PPO、POD活性以及MDA质量摩尔浓度的影响。结果表明，在Na_2SeO_3质量浓度为5.0 mg/L时，促进了PPO、POD和SOD活性，提高了菌丝抗逆性。而后对菌丝体及其蛋白质和多糖进行了体外抗氧化活性探究，发现菌丝蛋白质的抗氧化能力较好，菌丝多糖次之，其次为菌丝体。最后研究了红平菇富硒菌丝体对Caco-2细胞存活率的影响，发现红平菇富硒菌丝体可以抑制Caco-2细胞的生长。

深层发酵红平菇富硒菌丝体有开发和利用的价值，红平菇富硒菌丝体的硒形态以及代谢与转化机制需要进一步研究，为红平菇富硒开发利用提供理论和技术支持。

参考文献：

[1] STEINBRENNER H, SPECKMANN B, KLOTZ L O. Selenoproteins: antioxidant selenoenzymes and beyond[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2016, 595: 113-119.

[2] LIU G Y, YANG X, ZHANG J X, et al. Synthesis, stability and anti-fatigue activity of selenium nanoparticles stabilized by *Lycium barbarum* polysaccharides[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 179: 418-428.

[3] REES K, HARTLEY L, DAY C, et al. Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease[J]. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2013, 2013(1): 009671.

[4] 李浩男，谢晓宇，王立平. 硒营养与人体健康[J]. 食品工业，2022，43(3)：325-330.
LI H N, XIE X Y, WANG L P. Selenium Nutrition and human health[J]. **The Food Industry**, 2022, 43(3): 325-330. (in Chinese)

[5] 张勇胜，李仁兰，刘妍，等. 硒对人体健康作用的研究进展[J]. 内科，2018，13(4)：623-625.
ZHANG Y S, LI R L, LIU Y, et al. Research progress on effects of selenium on human health[J]. **Internal Medicine**, 2018, 13(4): 623-625. (in Chinese)

[6] 陈启军，汪家全，于慧. 微量元素与人体健康[J]. 现代职业教育，2016(24)：113.
CHEN Q J, WANG J Q, YU H. Trace elements and human health[J]. **Modern Vocational Education**, 2016(24): 113. (in Chinese)

[7] OLIVEIRA A P, OLIVEIRA L F, NOMURA C S, et al. Elemental imaging by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy to evaluate selenium enrichment effects in edible mushrooms[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9: 10827.

[8] 杨晓慧，倪申宇，梁进. 食用菌营养价值及产品开发利用现状[J]. 农产品加工，2022(19)：100-102.
YANG X H, NI S Y, LIANG J. Research on nutritional value and product development and utilization of edible fungi[J]. **Farm Products Processing**, 2022(19): 100-102. (in Chinese)

[9] 余芸. 食用菌液体培养技术的优势[J]. 北京农业，2012(30)：7.
YU Y. Edible fungus liquid culture technology advantage[J]. **Beijing Agriculture**, 2012(30): 7. (in Chinese)

[10] GONZÁLEZ A, NOBRE C, SIMOES L S, et al. Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom[J]. **Food Chemistry**, 2021, 346: 128884.

[11] 常桂英. 富硒平菇液态深层发酵试验研究[J]. 中国酿造，2010，29(5)：146-148.
CHANG G Y. Submerged fermentation of selenium-enriched oyster mushroom[J]. **China Brewing**, 2010, 29(5): 146-148. (in Chinese)

[12] 曾璇竹，雷于国，胡国元，等. 富硒香菇多糖发酵工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技，2018，39(17)：186-192.
ZENG X Z, LEI Y G, HU G Y, et al. Optimization of fermentation process and antioxidant activity of polysaccharide from Se-enriched *Lentinula edodes*[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2018, 39(17): 186-192. (in Chinese)

[13] MILETIC D, PANTIC M, SKNEPNEK A, et al. Influence of selenium yeast on the growth, selenium uptake and mineral

composition of *Coriolus versicolor* mushroom[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2020,60(4):331-340.
[14] 方玲. 杏鲍菇富硒优良菌株筛选与深层发酵及生物活性研究[D]. 南京:南京农业大学,2016.
[15] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中硒的测定:GB 5009. 93—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
[16] 丁健峰. 羊肚菌富硒深层发酵工艺及产物功能性研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
[17] 王旭彤,方释慧,邹莉,等. 大球盖菇培养基的筛选及培养条件的优化[J]. 现代食品科技,2019,35(9):240-247.
WANG X T,FANG S H,ZOU L,et al. Screening of culture media and optimization of culture conditions for *Stropharia rugoso*-annulata[J]. **Modern Food Science and Technology**,2019,35(9):240-247. (in Chinese)
[18] YANG F C,LIAU C B. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures[J]. **Bioprocess Engineering**,1998,19(3):233-236.
[19] 李增利. pH 值及培养时间对红菇多糖深层发酵的影响[J]. 食品科技,2006,31(12):21-25.
LI Z L. Effect of initial pH and culture time on production of polysaccharide by submerged fermentation of *Russula* sp[J]. **Food Science and Technology**,2006,31(12):21-25. (in Chinese)
[20] FARIA M G I,AVELINO K V,PHILADELPHO B O,et al. Lithium bioaccumulation in *Lentinus crinitus* mycelia grown in media with different lithium sources and pH values[J]. **Environmental Science and Pollution Research**,2022,29(58):87519-87526.
[21] 许晟. 紫芝液态发酵培养及抗氧化功能的研究[D]. 天津:天津科技大学,2014.
[22] ZHANG X P,ZHANG B,MIAO R Y,et al. Influence of temperature on the bacterial community in substrate and extracellular enzyme activity of *Auricularia cornea*[J]. **Mycobiology**,2018,46(3):224-235.
[23] 马玲,赵亚娜,张乐,等. 富硒平菇水溶性蛋白提取及抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2017,38(24):148-151,158.
MA L,ZHAO Y N,ZHANG L,et al. Extraction of water soluble protein from selenium contained *Pleurotus ostreatus* and antioxidant activity *in vitro*[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2017,38(24):148-151,158. (in Chinese)
[24] 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.
SUN Y,BAO J Z,LIU H,et al. Research on extraction and antineoplasmic activity of polysaccharide in culture medium of *Cordyceps militaris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2019,38(4):118-126. (in Chinese)
[25] 王淼霜,仝艳军,蒋雨桥,等. 苦荞对发酵豆乳纳豆激酶活力、风味及抗氧化活性的影响[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(7):62-71.
WANG M S,TONG Y J,JIANG Y Q,et al. Effects of Tartary buckwheat on nattokinase activity,flavor and antioxidant activity of fermented soybean milk[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2023,42(7):62-71. (in Chinese)
[26] 杨晶莹,商龙臣,张驰. 富硒灵芝菌丝多糖、蛋白的提取及其体外抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2023,35(3):453-459.
YANG J Y,SHANG L C,ZHANG C. Extraction of polysaccharides and proteins from selenium-enriched *Ganoderma lucidum* mycelium and their in vitro antioxidant and antitumor activities[J]. **Natural Product Research and Development**,2023,35(3):453-459. (in Chinese)
[27] WU J,HAN Y J,ZOU X Q,et al. Silica nanoparticles as an enhancer in the IL-1β-induced inflammation cycle of A549 cells[J]. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**,2019,41(2):199-206.
[28] 罗盈依. 平菇富硒液体发酵条件优化及其富硒多糖饮品配方设计[D]. 邯郸:河北工程大学,2021.

(责任编辑:李春丽)