

# 灵芝菌丝体富硒条件优化及其硒多糖抗氧化活性研究

金鑫<sup>1</sup>,熊川<sup>1</sup>,黄文丽<sup>1</sup>,  
陈祖琴<sup>1</sup>,李萍<sup>1</sup>,张利<sup>2</sup>,朱宇<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>四川省农业科学院生物技术核技术研究所,成都 610061;<sup>2</sup>阿坝州林业科学技术研究所,汶川 623000

**摘要:**利用正交试验对灵芝菌丝体液体发酵富硒条件进行优化,研究培养基中不同碳源、氮源和亚硒酸钠浓度对菌丝体生物量、硒含量、富硒率以及胞外酶活性的影响,此外还对硒多糖的抗氧化活性进行了初步研究。结果表明:当培养基中碳源为20%马铃薯、氮源为2%麸皮、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度为5 mg/L时,培养基中菌丝生物量最高达到3.86 g/L,硒含量最高为0.576 mg/g,富硒率也达到最高为44.47%。 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对菌丝生长的影响大于碳源和氮源;同样的 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对胞外酶活性的影响最大,最优组的POD和PPO酶活性都较其他组高,且随着 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度的升高,其酶活性逐渐降低。富硒灵芝菌丝体粗多糖都具有较强的体外抗氧化活性,通过相关性分析发现,其粗多糖的抗氧化活性与硒含量、富硒率具有显著的正相关。显示硒多糖在食品和药品等领域具有良好的开发利用前景。

**关键词:**灵芝菌丝体;富硒;硒多糖;抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0001-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.001

## Optimization of selenium-enriched conditions of *Ganoderma oregonense* mycelia and antioxidant activity of selenium polysaccharide

JIN Xin<sup>1</sup>, XIONG Chuan<sup>1</sup>, HUANG Wen-li<sup>1</sup>, CHEN Zu-qin<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, ZHU Yu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China;

<sup>2</sup>Aba Prefecture Institute of Forestry Science and Technology, Wenchuan 623000, China

**Abstract:** The conditions of selenium enrichment in liquid fermentation of *Ganoderma oregonense* mycelium were optimized by orthogonal test. In addition to the study of the effects of different carbon sources, nitrogen sources and sodium selenite concentrations on mycelial biomass, selenium content, selenium enrichment rate and extracellular enzyme activity in culture medium, the antioxidant activity of selenosaccharide was also studied initially. The results showed that when the carbon source in the medium was 20% potato, the nitrogen source was 2% bran, and the concentration of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  was 5 mg/L, the mycelial biomass in the medium reached 3.86 g/L, and when the highest selenium content was 0.576 mg/g, the selenium enrichment rate also reached a maximum of 44.47%. The effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  on mycelial growth was greater than that of carbon and nitrogen sources.  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  had the greatest effect on extracellular enzyme activity in the same way, and the optimal group of POD and PPO activities were active. The enzyme activity was higher than other groups, and the enzyme activity decreased gradually with the increase of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  concentration. The crude polysaccharides of selenium-enriched *G. oregonense* mycelium had strong antioxidant activity in vitro, and the resistance of crude polysaccharide was found by correlation analysis. Oxidation activity has a significant positive correlation with selenium content and selenium enrichment rate. It shows that selenium polysaccharide has good prospects for development and utilization in the fields of food and medicine.

**Key words:** *Ganoderma oregonense* mycelium; se-rich; selenium polysaccharide; antioxidant activity

收稿日期:2019-07-25 接受日期:2019-12-20

基金项目:四川省科技支撑计划(2018GZ0378);国际科技交流合作提升行动计划(真菌中神经活性成分分离纯化与结构鉴定);四川省科技支撑计划(2018NFP0058)

\*通信作者 Tel:86-28-84592187; E-mail:zy200458@126.com

灵芝是我国一种重要的传统食药真菌,具有广泛的药理活性,已被大量研究证明其具有调节免疫、降血糖、降血脂、抗氧化、抗衰老等功效<sup>[1-6]</sup>,而发挥这些功效的主要成分为灵芝多糖。硒是人体必需的微量营养元素,能够增强机体的抗氧化能力,抵抗

有关疾病的发生,然而硒不能由机体自主合成,只能从体外摄取,人体摄入的有机硒主要是硒蛋白和硒多糖<sup>[7]</sup>。大量的研究表明灵芝具有较强的富硒能力<sup>[8,9]</sup>,灵芝菌丝体通过富硒发酵培养,将灵芝多糖与人体必需微量元素硒进行一定程度的螯合,进而结合成为灵芝多糖有机硒化合物,从而更容易被人体吸收<sup>[10,11]</sup>,以达到二者共同促进的作用,对人体健康具有重要保健作用。富硒发酵培养是将无机硒转化为有机硒的有效方法之一,从营养学和微生物代谢角度考虑,通过微生物转化作用得到的灵芝富硒多糖,具有生物利用率高、生理药理功效更优、安全、无毒副作用等特点,因此,富硒灵芝的研究具有重要的现实意义。

本研究以美国大灵芝(*Ganoderma oregonense*)作为载体,无机硒亚硒酸钠作为硒源,通过优化培养基碳源、氮源和亚硒酸钠浓度进行微生物富硒发酵,并在富硒发酵过程中初步探析发酵液胞外酶活性变化,最后提取菌丝体硒多糖,研究其抗氧化活性。本研究获得的硒多糖将灵芝与硒功效融合于一体,发挥了硒和灵芝固有的以及协同的生理作用,具有极大的食用价值,为富硒灵芝产品的开发提供了理论依据。

## 2 材料方法

### 2.1 材料

美国大灵芝(*G. oregonense*)菌株由四川省农业科学院生物技术核技术研究所现代农业研究室保存。马铃薯、玉米粉、麸皮,市购;亚硒酸钠、葡萄糖、琼脂粉、 $H_2SO_4$ 、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙醇、Tris-HCl、DPPH、过氧化氢、硫酸亚铁铵、Vc、邻苯三酚、磷酸盐缓冲液、NaOH、水杨酸、HCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 等均为分析纯试剂。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 灵芝菌株的提纯和复壮<sup>[12]</sup>

灵芝提纯培养基:斜面培养,土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、磷酸二氢钾 3 g、硫酸镁 1.5 g、玉米粉 10 g、麸皮 50 g、青冈树皮 100 g。水 1 000 mL, pH 自然。灵芝复壮培养基:土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、磷酸二氢钾 3 g、硫酸镁 1.5 g、玉米粉 10 g、麸皮 50 g、青冈树皮 100 g、干灵芝子实体 50 g。水 1 000 mL, pH 自然,分别制作斜面试管和平板。

将实验室保存的灵芝菌种用接种钩接入提纯培养基中,28 ℃条件下培养,当斜面菌丝生长到一半后,挑选生长快而健壮的试管,取菌丝的尖端部位菌丝体移到复壮培养基中,同样 28 ℃恒温培养,当复壮培养基中斜面菌丝生长到一半后,挑选生长快而健壮的试管,取菌丝的尖端部位菌丝体移到复壮培养基的平板中间,28 ℃恒温培养,菌丝长满待用。

### 1.2.2 发酵条件优化培养正交试验

发酵培养基条件为:温度 28 ℃,摇床转速 180 rpm<sup>[13,14]</sup>。分别以葡萄糖、马铃薯、可溶性淀粉为 A 变量;蛋白胨、玉米粉、麸皮为 B 变量;5、10、15 mg/L 的  $Na_2SeO_3$  为 C 变量。选定适当水平,设计  $L_9(3^3)$  进行正交试验(见表 1),进行正交实验,以生物量、硒含量、富硒率为指标,对富硒灵芝液体发酵培养原料进行优化。每组试验设置 3 个重复,250 mL 容量锥形瓶每瓶装培养基 150 mL,121 ℃高压灭菌 30 min,冷却后,每瓶接种 3 块直径 5 mm 的灵芝菌种,然后置于 28 ℃恒温振荡箱中,以 180 rpm 转速振荡培养 15 天。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	A 20% 碳源 20% carbon source	B 2% 氮源 2% nitrogen source	C $Na_2SeO_3$ (mg/mL)
1	葡萄糖 Glucose	蛋白胨 Peptone	5
2	马铃薯 Potato	玉米粉 Corn flour	10
3	可溶性淀粉 Soluble starch	麸皮 Bran	15

### 1.2.3 生物量测定

参考 Jiang<sup>[15]</sup>,并做适当修改,在培养的第 15 天,将灵芝菌丝发酵液经 5 000 rpm 离心 10 min,去除上清液,菌丝体用去离子水震荡洗涤后再离心去

上清液,重复操作,直至上清液不再带有发酵液颜色为止,收集菌体,置于烘箱内 45 ℃烘干至恒重。以菌丝得率代表生物量,计算公式如下:生物量(g/L) = [(菌丝干重/g)/(发酵液体积/mL)] × 1 000。

### 1.2.4 菌丝体硒含量测定

菌丝体硒含量测定参照 GB 5009.93-2017 中电感耦合等离子体质谱法。富硒率(%)=(菌丝体硒含量×菌丝体干重)/培养基中所添加硒量。

### 1.2.5 菌丝体胞外酶活性测定

在液体培养开始的第3天开始每隔2天吸取发酵液5 mL,在4℃下5 000 rpm离心10 min,得上清液即为粗酶液,连续测定5次。过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)严格按照试剂盒说明书的方法测定酶活性。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2.6 菌丝体粗多糖含量测定

热水浸提法提取菌丝体粗多糖:称取冷冻干燥粉碎后的灵芝菌丝体样品5 g,加入90 mL的去离子水,置于250 mL锥形瓶中,在90℃的水浴锅中恒温水浴180 min,5 000 rpm离心10 min后,留下上清液,残渣重复浸提1次,离心后,合并上清液,用旋转蒸发仪浓缩至20 mL下,加3倍体积的无水乙醇进行醇沉,4℃静置过夜,沉淀物用无水乙醇洗2次后,置于45℃烘箱中烘至恒重,即得粗多糖。粗多糖得率=(粗多糖质量/菌丝体质量)×100%。将粗多糖用无菌蒸馏水配制成1 mg/mL的样品溶液,采用苯酚-硫酸法测定多糖含量<sup>[16]</sup>。

### 1.2.7 粗多糖体外抗氧化活性测定

以9组试验的灵芝菌丝体粗多糖为原料,分别配成浓度为1 mg/mL的粗多糖和Vc溶液,参照Feng<sup>[17]</sup>,进行抗氧化活性研究,分别测定粗多糖对DPPH的清除作用、对超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)清除率作用,对羟自由基(OH<sup>-</sup>·)清除作用。

## 1.3 数据分析

用Microsoft Excel 2007软件计算平均值和标准

偏差。采用SPSS 19.0软件进行单因素方差和相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 灵芝菌丝体富硒培养条件优化的正交实验

生物量是反映灵芝菌丝生长状况的重要指标,硒含量是反映灵芝菌丝对硒的吸收能力,富硒率是反映灵芝菌丝吸收的硒总量与培养基中添加的亚硒酸钠中的硒总量之比,表2是正交试验的结果,并以富硒率计算极值,从表2中可以看出,在碳源因素水平上分析,其(K2与(K1和(K3之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), (K2最优;从氮源因素水平上看,其(K3与(K1和(K2之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), (K3最优;从Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>浓度水平因素上看,其(K1与(K2和(K3之间存在明显显著差异( $P < 0.05$ ), (K1最优。因此,试验优化得到的灵芝菌丝体富硒培养条件方案为:A2B3C1,即培养基中优选20%马铃薯,2%麸皮,浓度为5 mg/L Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>,该试验组生物量最大为3.86 g/L,硒含量也最高为0.576 mg/g,富硒率同样最高为44.47%。

从图1中可以看出,灵芝菌丝体的生长性状存在一定的差异,第1组、第8组、第6组,其Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>浓度为5 mg/L时发酵液菌丝球颜色为白色,菌丝球数量较少,但直径较大;第2组、第4组、第9组,其Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>浓度为10 mg/L时,其菌丝球边缘颜色为白色,里面则带着浅红色,细小菌丝球较多;第3组、第5组、第7组,其Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>浓度为15 mg/L时,其细小菌丝球边缘颜色为白色,但直径较大点的菌丝球变为深红色,可见,随着Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>浓度的增加,菌丝球颜色逐渐加深,Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>对菌丝的影响程度远远大于碳源和氮源的影响。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

组别 Group	因素 Factor			生物量 Biomass (g/L)	硒含量 Selenium content (mg/g)	富硒率 Selenium enrichment rate (%)
	A	B	C			
1	1	1	1	3.16 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.534 ± 0.002 <sup>a</sup>	33.75
2	1	2	2	2.51 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.483 ± 0.001 <sup>b</sup>	12.12
3	1	3	3	2.19 ± 0.09 <sup>cd</sup>	0.433 ± 0.001 <sup>c</sup>	6.32
4	2	1	2	2.53 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.476 ± 0.001 <sup>b</sup>	12.04
5	2	2	3	1.62 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.427 ± 0.001 <sup>c</sup>	4.61
6	2	3	1	3.86 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.576 ± 0.001 <sup>a</sup>	44.47
7	3	1	3	1.69 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.428 ± 0.001 <sup>c</sup>	4.82

续表 2(Continued Tab. 2)

组别 Group	因素 Factor			生物量 Biomass (g/L)	硒含量 Selenium content (mg/g)	富硒率 Selenium enrichment rate (%)
	A	B	C			
8	3	2	1	3.20 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.542 ± 0.001 <sup>a</sup>	34.69
9	3	3	2	2.79 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.465 ± 0.001 <sup>b</sup>	12.97
(K1)	17.40 <sup>b</sup>	16.87 <sup>b</sup>	37.64 <sup>a</sup>			
(K2)	20.37 <sup>a</sup>	17.14 <sup>b</sup>	12.38 <sup>b</sup>			
(K3)	17.49 <sup>b</sup>	21.25 <sup>a</sup>	4.25 <sup>c</sup>			
极差 Range	8.93	13.15	100.16			

注:不同小写字母表示不同组间具有显著差异( $P < 0.05$ ),下同。

Note: Different lowercase letters showed significant differences among different groups ( $P < 0.05$ ), the same below.

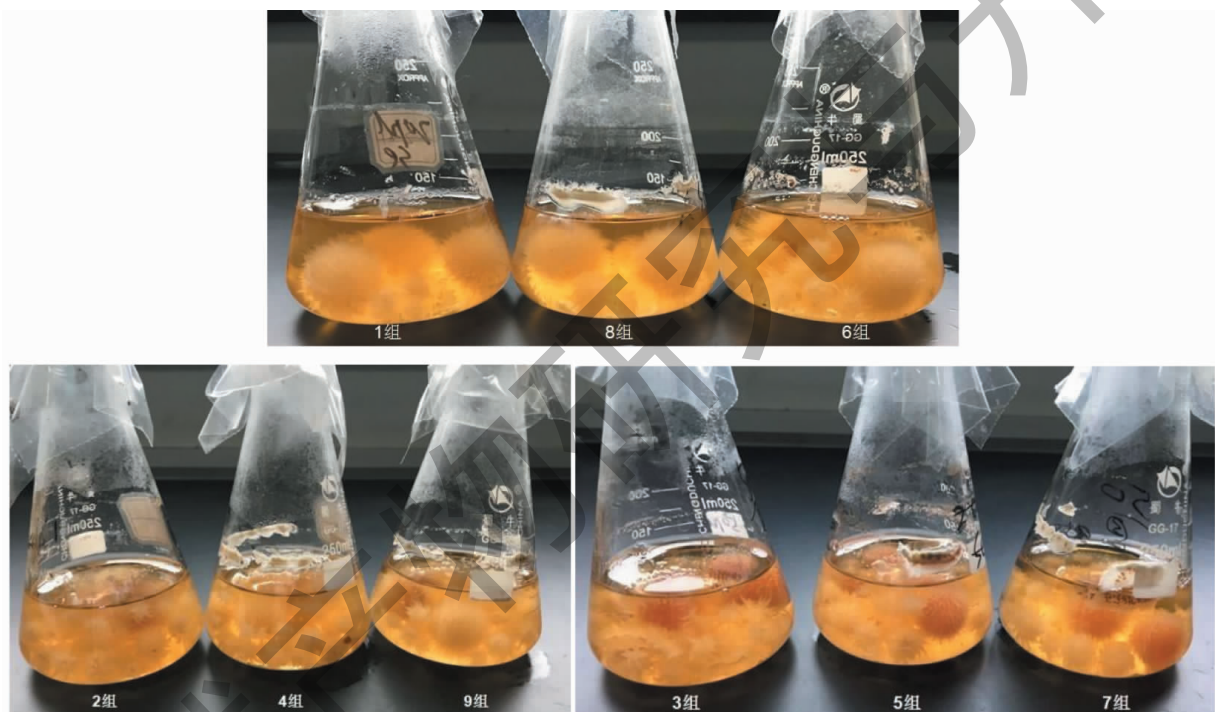


图 1 灵芝菌丝体生长试验

Fig. 1 *G. oregonense* mycelium growth test

## 2.2 胞外过氧化物酶活性分析

过氧化物酶是灵芝体内重要的呼吸酶类,其活性高低与酚类物质代谢和植物抗性密切相关,测定灵芝发酵液内过氧化物酶活性一定程度上能反映其在特定环境下的适应能力。通过对 9 组试验进行过氧化物酶活性测定(见图 2),发现过氧化物酶活性处在 1.26 ~ 12.74 U/mL 之间,其中第 6 组、第 8 组、第 1 组其酶活性显著高于其他组,在培养 9 天之前,其酶活性都是处于显著升高态势,第 9 天到第 12 天处于缓慢上升中,在第 12 天到第 15 天酶活性则处于下降趋势,这三组都为添加 5 mg/L 浓度的

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$  组。第 7 组、第 2 组和第 4 组,其酶活性在培养第 3 天到第 9 天处于缓慢上升中,在第 9 天到第 12 天其上升趋势则变大,在第 12 天到第 15 天,其酶活性又缓慢下降,该三组中,第 7 组为添加 15 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  组,第 2 组和第 4 组为添加 10 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  组;第 9 组、第 3 组和第 5 组在培养第 3 天到第 15 天之间其酶活性整体变化趋势不大,呈现小幅度的先上升后降低,酶活性较明显低于其他组,该三组中,第 9 组为添加 10 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  组,第 3 组和第 5 组为添加 15 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  组。通过过氧化物酶活性的测定,发

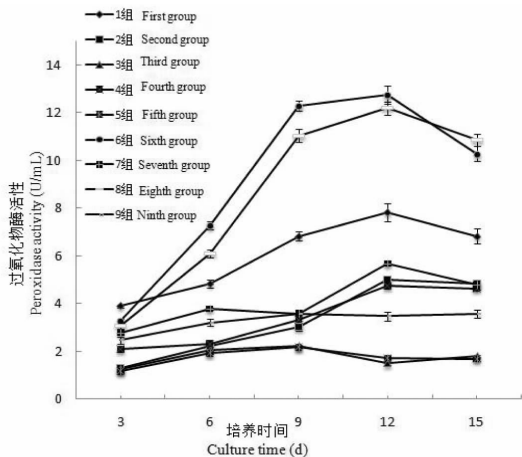


图2 灵芝菌丝体发酵液 POD 酶活性变化

Fig. 2 Changes in POD enzyme activity in *G. oregonense* mycelium fermentation broth

现  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度对酶活性的影响明显大于碳源和氮源,该酶活性变化趋势同菌丝生长量、富硒率相同。

### 2.3 胞外多酚氧化酶活性分析

PPO 是含有铜离子的膜蛋白酶,能导致褐色素的生成,是导致多种食用菌、果蔬损伤后褐变的主要酶类,通过对 9 组试验进行多酚氧化酶活性测定(见图 3),发现多酚氧化酶活性处在 1.57 ~ 13.06 U/mL 之间。第 1 组、第 6 组、第 8 组都为添加 5 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,其酶活性显著高于其他组,在培养 12 天之前,其酶活性都是处于显著升高态势,其中第 6 组呈直线上升,在第 12 天达到最大值 13.06 U/mL,三组试验在第 12 天到第 15 天则处于下降趋势,总体变化趋势同过氧化物酶活性变化趋势相同;第 2 组、第 4 组、第 5 组和第 3 组,其酶活性在培养第 3 天到第 12 天都处于缓慢上升中,在第 12 天到第 15 天,其酶活性又缓慢下降,该四组中,第 4 组和第 2 组为添加 10 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,第 5 组和第 3 组为添加 15 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,可见  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度从 5 mg/L 提高到 10 mg/L 时,其酶活性变化较大,明显受到抑制,在  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度从 10 mg/L 提高到 15 mg/L 时,其酶活性变化较小;第 9 组和第 7 组试验在培养第 3 天到第 9 天之间其酶活性整体变化趋势较小,呈现小幅度的上升,从培养第 9 天到第 15 天,其酶活性变化则逐渐降低,第 9 组为添加 10 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,第 7 组为添加 15 mg/L 浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 。通过多酚氧化酶活性的测定,同样发现  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度对酶活性的影响明显大于碳源和氮源,可见,在富硒条件优化正交试验中,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度起到了主要的控制作用。

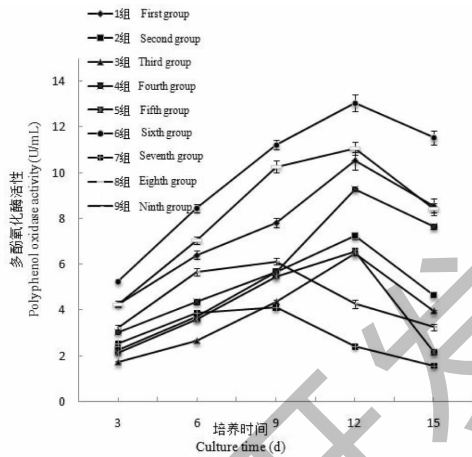


图3 灵芝菌丝体发酵液 PPO 酶活性变化

Fig. 3 Changes in PPO enzyme activity in *G. oregonense* mycelium fermentation broth

### 2.4 多糖含量分析

对 9 组试验灵芝菌丝进行粗多糖提取,结果见图 4,从图中可以看出 9 组试验粗多糖含量位于 2.29% ~ 2.85% 之间,含量最高的为第 6 组,最低的为第 9 组。第 1 组、第 2 组、第 6 组和第 8 组之间多糖含量差异不显著 ( $P > 0.05$ ),第 3 组、4 组、5 组和第 7 组之间多糖含量差异同样不显著 ( $P > 0.05$ ),第 1 ~ 8 组多糖含量同第 9 组存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。可见,在富硒灵芝发酵的条件优化正交试验中,碳源、氮源和  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度对灵芝菌丝体内的粗多糖含量影响不大,仅从粗多糖含量上难以区分 9 组试验的优劣,必须对粗多糖进行进一步研究。

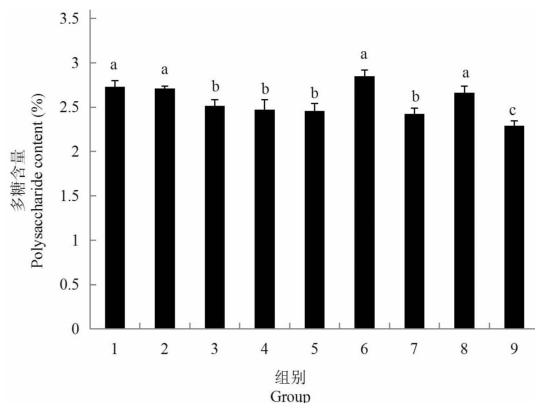


图4 灵芝菌丝体粗多糖含量比较

Fig. 4 Comparison of crude polysaccharide content in *G. oregonense* mycelium

2.5 不同组别灵芝菌丝粗多糖对 DPPH 的清除率  
9 组试验其粗多糖的 DPPH 清除率范围在

69.57% ~ 87.25% 之间,见图 5,而 Vc 的 DPPH 清除率达到 96.93%,Vc 阳性对照与 9 组试验其清除率存在显著差异( $P < 0.05$ )。在 9 组试验的 DPPH 清除率中,第 1 组、4 组、6 组、8 组其清除率要高于其他组,且存在显著差异( $P < 0.05$ ),这 4 组试验中,第 1 组、6 组、8 组分别为不同的碳源和氮源,难以筛选出最优的碳源和氮源,但却存在相同的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度,为 5 mg/L,第 4 组  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 10 mg/L;第 2 组、第 3 组、第 5 组和第 9 组粗多糖对 DPPH 的清除率之间不存在显著差异( $P > 0.05$ ),这四组中,第 2 组和第 9 组  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 10 mg/L,第 3 组和第 5 组  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度 15 mg/L,第 7 组的清除率最低,与其他组都存在显著差异( $P < 0.05$ ),第 7 组  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 15 mg/L。总体上可以看出,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 5 mg/L 时,其试验组粗多糖的 DPPH 清除率明显高于其他组,该结果同发酵液胞外酶活性趋势相同。

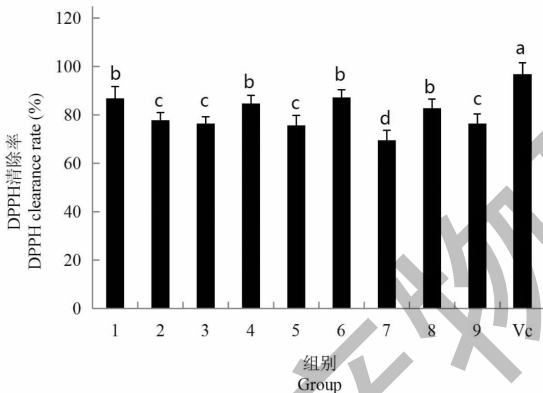


图 5 不同组灵芝菌丝体粗多糖对 DPPH 的清除能力

Fig. 5 DPPH scavenging capacity of crude polysaccharides from different groups of *G. oregonense* mycelia

## 2.6 不同组别灵芝菌丝体粗多糖对超氧自由基清除能力比较

9 组试验其粗多糖的超氧自由基清除率范围在 39.74% ~ 68.58% 之间,见图 6,最高的组别为第 8 组,最低组别为第 3 组,而 Vc 的超氧自由基清除率达到 99.54%,Vc 阳性对照与 9 组试验其清除率存在显著差异( $P < 0.05$ )。在 9 组试验的超氧自由基清除率中,第 1 组、6 组、和 8 组其清除率要高于其他组,与其他组存在显著差异( $P < 0.05$ ),这三组试验中,分别为不同的碳源和氮源,其  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度则相同,均为 5 mg/L;第 2 组、第 4 组、第 5 组、第 7 组和第 9 组其粗多糖对超氧自由基的清除率,其相互

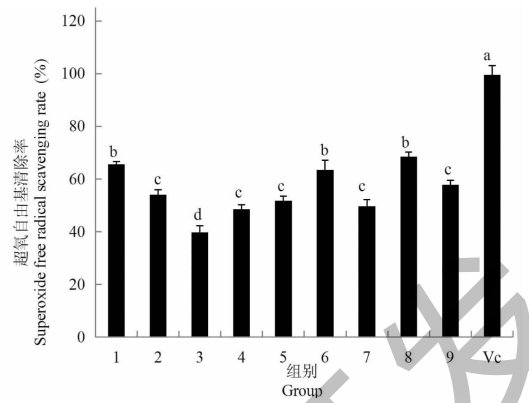


图 6 不同组灵芝菌丝体粗多糖对超氧自由基的清除能力

Fig. 6 Scavenging capacity of crude polysaccharides from different groups of *G. oregonense* mycelia to superoxide free radicals

之间不存在显著差异( $P > 0.05$ ),这五组中,第 2 组、第 4 组和第 9 组其  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 10 mg/L,第 5 组和第 7 组  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度 15 mg/L。从 9 组试验中可以看出,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 5 mg/L 时,其试验组粗多糖的超氧自由基清除率明显高于其他组,高浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对粗多糖的抗氧化活性起到了抑制作用,该结果同 DPPH 清除率趋势相同。

## 2.7 不同组别灵芝菌丝体粗多糖对羟自由基清除能力比较

9 组试验其粗多糖的羟自由基清除率范围在 22.92% ~ 52.62% 之间,见图 7,最高的组别为第 6 组,最低组别为第 3 组,而 Vc 的羟自由基清除率达到 95.28%,Vc 阳性对照与 9 组试验其清除率存在显著差异( $P < 0.05$ )。在 9 组试验的羟自由基清除率中,第 1 组、6 组、和 8 组其清除率要高于其他组,

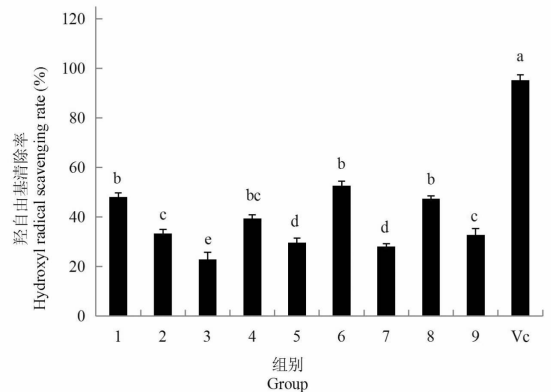


图 7 不同组灵芝菌丝体粗多糖对羟自由基的清除能力

Fig. 7 Scavenging ability of crude polysaccharides from different groups of *G. oregonense* mycelia to hydroxyl radicals

与其他组存在显著差异( $P < 0.05$ ),这三组试验中,分别为不同的碳源和氮源,其 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度则相同,均为为 $5 \text{ mg/L}$ ;第2组、第4组、和第9组其粗多糖对羟自由基的清除率,其相互之间不存在显著差异( $P > 0.05$ ),这三组中,第2组、第4组和第9组其 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度为 $10 \text{ mg/L}$ ;第5组和第7组羟自由基清除率不存在显著差异( $P > 0.05$ ),但与第3组存在显著差异( $P < 0.05$ ),这三组试验其 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度为 $15 \text{ mg/L}$ 。从9组试验中同样可以看出, $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度为 $5 \text{ mg/L}$ 时,其试验组粗多糖的羟自由基清除率明显高于其他组,高浓度的 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对粗多糖的抗氧化活性起到了抑制作用,该结果同DPPH清除率和超氧自由基清除率趋势相同。综合9组试验其菌丝体粗多糖对DPPH清除率、超氧自由基清除率和羟自由基清除率结果可得出, $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度对抗氧化活性的影响远远大于不同的碳源和氮源对其的

影响,第6组试验其抗氧化能力表现最好,该结果同菌丝体生物量、富硒率以及胞外酶活性结果相同。

## 2.8 线性相关性分析

从表3中可以看出,生物量、硒含量、富硒率、粗多糖、胞外酶活性、以及抗氧化活性之间的相关性均为正向相关。其硒含量与生物量存在显著相关性;富硒率与生物量和硒含量存在极显著相关性,相关系数在0.8以上;粗多糖含量与生物量和硒含量以及富硒率存在极显著相关性,同样相关系数均在0.8以上;胞外酶POD和PPO与硒含量和富硒率存在极显著相关性,相关系数均达到0.9以上,与粗多糖存在显著相关性,POD和PPO相互之间也存在极显著相关性;菌丝粗多糖的抗氧化活性与硒含量、富硒率均存在显著相关性,而与生物量的相关系数较低,可见,硒含量和富硒率越高其粗多糖的抗氧化活性就高,而菌丝生物量多其抗氧化活性则不一定高。

表3 灵芝菌丝胞外酶活性、抗氧化活性与菌丝生长之间的线性相关分析

Table 3 Linear correlation analysis between extracellular enzyme activity, antioxidant activity and mycelial growth of *G. oregonense*

成份 Component	生物量 Biomass	硒含量 Selenium content	富硒率 Selenium enrichment rate	粗多糖 Crude polysaccharide	POD	PPO	DPPH	$\text{OH}^- \cdot$	$\text{O}_2^- \cdot$
生物量 Biomass	1	0.782 *	0.842 **	0.821 **	0.661	0.862 **	0.763 *	0.597	0.372
硒含量 Selenium content		1	0.970 **	0.802 **	0.911 **	0.936 **	0.848 **	0.910 **	0.831 **
富硒率 Selenium enrichment rate			1	0.828 **	0.900 **	0.923 **	0.817 **	0.814 **	0.789 *
粗多糖 Polysaccharide				1	0.703 *	0.781 *	0.681 *	0.812 **	0.528
POD					1	0.811 **	0.631	0.812 **	0.822 **
PPO						1	0.942 **	0.821 **	0.626
DPPH							1	0.773 *	0.584
$\text{OH}^- \cdot$								1	0.793 *
$\text{O}_2^- \cdot$									1

注: \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

### 3.1 富硒灵芝发酵条件优化正交试验分析

适合灵芝菌丝体生长的碳源有葡萄糖、乳糖、马铃薯、淀粉等,适合的氮源有硫酸铵、蛋白胨、豆粕粉、玉米粉、麸皮、酵母粉等,富硒源有活化硒矿、亚硒酸钠等。对于富硒灵芝发酵条件筛选,前人做了大量的研究,集中于发酵过程中不同培养条件如温度、pH等和培养基中不同的氮源、碳源以及外源硒等对菌丝体生物量和多糖产量的影响。Guo等<sup>[7]</sup>对

富硒灵芝的碳源、氮源和亚硒酸钠浓度做了筛选,结果表明以4%葡萄糖和20%马铃薯为碳源,以1%蛋白胨为氮源,浓度为0.01%的亚硒酸钠为最优条件;Chen<sup>[18]</sup>通过响应面分析得出灵芝深层培养的最佳培养基组成为葡萄糖2.13%、麸皮汁3.96%,菌丝体中总硒含量在 $150 \mu\text{g/g}$ 以上,富硒率最高达到55%。Chen<sup>[19]</sup>通过正交实验确定两种菌种液态发酵的最佳培养基组成为酒糟80 g/L、麸皮7.5 g/L、豆粕粉10 g/L、葡萄糖5 g/L,该条件下红芝菌生长

较快,长势较好;Xu等<sup>[20]</sup>以灵芝胞内多糖得率为指标,优化了发酵碳源、氮源,结果表明添加20%马铃薯、3.3%葡萄糖、3%麦麸、0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{MgSO}_4$ ,其胞内多糖的得率最高。本文在富硒灵芝发酵条件筛选中,优选的碳源为20%的马铃薯,氮源为2%的麸皮,该研究结果与前人研究结果较相似,灵芝对碳源的利用较为广泛,不仅能利用单糖、双糖,而且也能利用多糖,葡萄糖是灵芝生长较好的碳源,氮源以谷类有机氮源为主。

在富硒灵芝发酵培养的最适亚硒酸钠浓度研究上,本文研究富硒发酵最适添加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  为5 mg/L,这与较多研究者不同,例如 Dou<sup>[21]</sup>和 Yang<sup>[22]</sup>研究认为添加1 000  $\mu\text{g/g}$ 的亚硒酸钠灵芝菌丝体富硒率最高;Wang<sup>[23]</sup>研究认为添加20 mg/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,其富硒胞外多糖的产量可达到2.84 g/L,生物量为32.26 g/L。研究者得出最适灵芝菌丝生长的不同亚硒酸钠浓度,可能是由于所使用的灵芝菌种以及菌种活性的不同所导致的,另外本研究在  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的无菌处理上采用的无菌滤膜过滤,而其他研究者采用的是高压灭菌,这也可能导致研究得出不同的结论。这些研究结果虽然显示的最适亚硒酸钠浓度不同,但都表明在适宜的亚硒酸钠浓度范围内,低浓度亚硒酸钠可促进灵芝菌丝体的生长,而随着硒浓度的升高,则会抑制灵芝菌丝体的生长,硒是细胞内过氧化氢酶等氧化酶活性中心的组成成分,可能正是由于低浓度亚硒酸钠激活了菌丝体细胞的辅酶而促进菌丝体的发育,高浓度的亚硒酸钠则抑制了菌丝体细胞内部分酶的活性<sup>[24,25]</sup>。

### 3.2 富硒灵芝发酵液胞外酶活性分析

灵芝属于木腐性真菌,在菌丝生长阶段和子实体发育阶段,其所需的营养全部由菌丝从外界吸收获得,而菌丝分解到体外的胞外酶对灵芝吸收营养起着至关重要的作用。灵芝可以向培养基中分泌多种胞外酶,这些胞外酶把营养物质分解成简单的小分子物质,从而易被菌丝吸收利用。不同的培养基可以诱导灵芝菌丝分泌不同的胞外酶,其胞外酶活性的大小也不相同。He<sup>[26]</sup>研究了  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对灵芝菌丝生长及菌丝生长期间胞外酶活性的影响,发现一定浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  能促进灵芝菌丝生长和胞外酶活性,高浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可抑制菌丝生长和胞外酶

活性;Chen<sup>[27]</sup>研究发现在灵芝发酵过程中胞外酶活力具有较强的阶段性,酶活性显著升高后到平缓到逐渐下降,这些研究与本文的研究结果类似,本研究中发现胞外酶活性在添加浓度为5 mg/L的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  时活性最高,当  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度提高到10和15 mg/L时,其活性则明显降低,同时发现胞外酶活性在从第3天到第9天时逐渐升高,之后则逐渐降低。

### 3.3 富硒灵芝菌丝粗多糖抗氧化活性分析

灵芝能够从培养基中吸收20%~30%的无机硒,并将其中的绝大部分转化为有机硒,而且,约有40%的有机硒存在于蛋白质中,硒元素可以显著地提高富硒灵芝中蛋白质组分和硒多糖的抗氧化活性<sup>[28]</sup>。Du<sup>[29]</sup>发现灵芝菌丝体蛋白提取物清除自由基的能力较强,且清除能力与硒含量趋势相同,Zhou<sup>[30]</sup>通过富硒灵芝比较体外灵芝硒多糖和普通多糖对自由基的清除率和还原力,发现灵芝硒多糖对自由基的清除率和还原能力明显优于普通的灵芝多糖,本研究结果同样显示灵芝菌丝粗多糖具有较好的抗氧化活性,且随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度的提高其粗多糖的抗氧化活性逐渐降低。有研究表明硒能提高谷胱甘肽过氧化酶的活性,具有加速分解或去除过氧化脂质作用,保护细胞免遭过氧化作用的损伤,硒与多糖结合后可提高灵芝多糖清除自由基的能力。另有研究表明发酵液中适宜的硒浓度促进了菌丝体的生长,无机硒进入菌丝后,经生物转化为有机硒,一方面可促进氨基酸和蛋白质的合成,促使氨基酸结合更多的硒<sup>[31]</sup>,另一方面硒可取代灵芝多糖中甲氧基上的甲基,并以硒氧双键的方式结合,增强了灵芝多糖的活性<sup>[32]</sup>。然而对于硒多糖的具体作用机理以及无机硒结合多糖的途径方式还有待进一步研究和探讨。

## 4 结论

通过正交试验结果显示,培养基中优选主要原料为20%马铃薯、2%麸皮、浓度为5 mg/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,该试验组其菌丝生物量最大为3.86 g/L,硒含量也最高为0.576 mg/g,富硒率同样最高为44.47%。通过发酵液胞外酶活性研究,发现  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对胞外酶活性的影响最大,最优组的POD和PPO酶活性都较其他组高,且随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度



的升高,其酶活性逐渐降低。另外比较了菌丝体粗多糖清除 DPPH、 $O_2^{\cdot -}$ 、 $OH^{\cdot}$  的能力,发现富硒灵芝菌丝体粗多糖具有较强的体外抗氧化活性,通过相关性分析发现,其粗多糖的抗氧化活性与硒含量、富硒率具有显著的正相关性。可见,富硒灵芝菌丝体粗多糖可作为天然抗氧化剂和补硒剂进行食品开发。

## 参考文献

- Shang D, Li Y, Wang C, et al. A novel polysaccharide from Se-enriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells[J]. *Onco Rep*, 2011, 25:267-272.
- Shang D, Zhang J, Wen L, et al. Preparation, characterization, and antiproliferative activities of the Se-containing polysaccharide Se-GLP-2B-1 from Se-enriched *Ganoderma lucidum*[J]. *J Agr Food Chem*, 2009, 57:7737-7742.
- Lin Z, Zhang H. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms[J]. *Acta Pharm Sin*, 2004, 25:1387-1395.
- Chen YS, CHEN QZ. Anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in mice with acute liver injury induced by  $CCl_4$  [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2017, 38:210-215.
- Chen ZQ, Huang WL, Jin X, et al. Research progress on deep processing of *Ganoderma lucidum* in China[J]. *J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报)*, 2016, 7:639-644.
- Yang DY, Jiang T, Zhou J, et al. Study on improvement effect of selenium-enriched *Ganoderma lucidum* crude extract on lipid metabolism, liver function and inflammatory response in type 2 diabetic model rats and its mechanism [J]. *Chin Pharm(中国药房)*, 2019, 30:364-370.
- Zhao L, Hu XS. Research progress of selenium-enriched *Ganoderma*[J]. *Edible Fungi China(中国食用菌)*, 2003, 22(3):35-37.
- Ji QM, Pan XZ, Fu CL, et al. Effect of sodium selenite on growth and selenium enrichment of *Ganoderma lucidum*[J]. *J Shenyang Agr Univ(沈阳农业大学学报)*, 2016, 47:716-721.
- Huang Z, Xiang Z, Wang F, et al. Study on the formula of *Ganoderma lucidum* cultivated by selenium rich tea branch [J]. *Guizhou Sci(贵州科学)*, 2015, 33(5):33-35.
- Reczynski W, Muszynsk B, Opoka W, et al. Comparative study of metals accumulation in cultured *in vitro* mycelium and naturally grown fruiting bodies of *Boletus badius* and *Cantharellus cibarius* [J]. *Bio Trace Elem Res*, 2013, 153:355-362.
- Senka SV, Ibrahim OM, Zorn PZ, et al. Antioxidant properties of selected *Boletus* mushrooms [J]. *Food Bio*, 2010, 5(1):49-58.
- Jin X. Purification and rejuvenation of *Ganoderma lucidum* strain and its culture medium(一种灵芝菌种提纯复壮培养方法及其培养基). CN201510703779.8[P]. 2016-01-20.
- Guo YY, Li F. Optimized culture of selenium-enriched [J]. *Anhui Agr Sci(安徽农业科学)*, 2012, 40:14721-14723.
- Jin T, Wu YX, Wu TX. Research on submerged culture conditions of selenium accumulation in *Ganoderma lucidum*[J]. *Food Sci Tech(食品科技)*, 2007, 8(1):67-69.
- Jiang SY, Yang YN, Li YQ, et al. Study on the enzyme activity of liquid-state fermentation of selenium-enriched soybean by *Ganoderma lucidum* mycelium [J]. *J Shaoyang Univ(邵阳学院学报)*, 2011, 4(12):48-51.
- Feng XZ, Wu SG, Kong J, et al. Optimization of phenolsulfuric acid determination conditions of polysaccharide in *Ulva lactuca* L. by orthogonal test [J]. *Strait Pharm J(海峡药学)*, 2013, 25(12):94-96.
- Feng SZ, Lu YF, Liu NY, et al. Effect of monosaccharide composition on antioxidant activity of algal polysaccharides [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2019, 31:116-121.
- Chen H. Deep-layer culture and nutrient composition analysis of selenium-enriched *Ganoderma lucidum* [D]. Jiangnan: Jiangnan University(江南大学), 2008.
- Chen N. Study on liquid fermentation of *Ganoderma lucidum* and its antioxidant activity [D]. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), 2012.
- Xu H, Zhao SZ, Liu XY, et al. Optimization of liquid fermentation process for producing intracellular polysaccharides from antler *Ganoderma* by response surface methodology [J]. *Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学)*, 2018, 46:215-220.
- Dou CY, Zhang LF, Wang LF, et al. Comparative study on the selenium enrichment of *Ganoderma lucidum* by different selenium sources [J]. *Food Ind Tech(食品工业科技)*, 2007, 28:113-115.
- Yang Y, Wu XY, Zhang Z, et al. Fermentation culture process of selenium-enriched *Ganoderma lucidum* and research on antioxidant capacity of the product [J]. *Mod Food Sci Tech(现代食品科技)*, 2010, 26:1349-1353.

- 23 Wang R. Study on liquid selenium-enriched fermentation of *Ganoderma lucidum* and increase of selenium polysaccharide production[D]. Yangling: Northwest A&F University (西北农林科技大学), 2007.
- 24 Jiang J, Zhang WJ, Ji XY. Optimization of Se-rich culture conditions and antioxidant activities of polysaccharides from *Boletus edulis* mycelium[J]. J Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报), 2015, 15(12):91-98.
- 25 Jiang J, Mai H M, Xie B, et al. Optimization of Se-rich culture conditions and antioxidant activities of polysaccharides from *Morchella esculenta* mycelium[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2016, 42:120-125.
- 26 He DL, Huang LR, Liu MF. Effects of selenium on the growth of *Ganoderma lucidum* mycelium and its extracellular enzyme activity[J]. Edible Fungi China(中国食用菌), 2005, 24:42-43.
- 27 Chen ZJ, Gu ZX, Xie CY. Study on the changes of nutrients and related enzyme activities in *Ganoderma Lucidum* fermentation process[J]. Chin Brew(中国酿造), 2008, 1:26-29.
- 28 Du M, Hu XS, Zhao GH. Antioxidant activity and synergistic effect of different crude proteins in selenium-enriched *Ganoderma lucidum*[J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2006, 27:111-113.
- 29 Du M, Zhao L, Zhao GH, et al. Study on composition characteristics and antioxidant activity of different protein extracts in selenium-enriched *Ganoderma lucidum*[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2006, 32(6):11-15.
- 30 Zhou Q. Preliminary study on the fermentation of selenium-enriched *Ganoderma lucidum* and its antioxidant activity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University(华中农业大学), 2009.
- 31 Chai XY, Ni ZP, Yu SJ. Optimization of Se-rich liquid fermentation conditions and antioxidant activity of polysaccharide from *Auricularia auricula* mycelia[J]. Acta Agr Zhejiangensis(浙江农业学报), 2017, 29:1903-1911.
- 32 Shang DJ. Biotransformation of organic selenium in *Ganoderma lucidum* and analysis of selenium active structure of selenium polysaccharide in *Ganoderma lucidum*[D]. Dalian: Dalian University of Technology(大连理工大学), 2000.