

猴头菌菌丝富硒特性及富硒深层发酵的研究

姜 宁^{1,2}, 朱淑彤¹, 苏浩雨¹, 黄 洋¹, 王道才¹, 方 庆¹, 陈莉莉¹, 刘晓鹏^{1,2*}¹湖北民族大学生物科学与技术学院; ²生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 恩施 445000

摘要:为获得高产的富硒猴头菌菌丝体, 采用平板法, 通过 Na₂SeO₃ 浓度梯度实验, 从 H2、H99、NK 3 种猴头菌中筛选出耐硒品种; 以猴头菌菌丝干重为指标, 采用单因素试验结合正交试验优化培养基的碳源、氮源、无机盐和维生素, 并进一步通过均匀设计试验确定各营养元素的配比; 以菌丝干重和有机硒含量为指标, 确定深层发酵培养基中 Na₂SeO₃ 的浓度。结果表明: 3 种猴头菌中 H2 最耐硒, 在含 6 μg/mL 的 Na₂SeO₃ 平板培养基中培养的菌丝适合作为后续研究的菌种; 优化的液体培养基成分为 5.8% 可溶性淀粉、5.8% 黄豆粉、0.04% CaCl₂、0.024% VB₁ + VB₂ + VB₆, 此时菌丝干重理论值可达 2.37 g/100 mL; 当液体培养基含 12 μg/mL 的 Na₂SeO₃ 时, 菌丝生长不受抑制, 有机硒含量最高, 达 136.8 mg/kg 菌丝。该研究为富硒猴头菌产品的开发和利用奠定了基础。

关键词:猴头菌; 富硒; 深层发酵; 培养基; 优化

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)5-0810-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.5.013

Selenium enrichment characteristics and selenium-enriched submerged fermentation of *Hericium erinaceus*

JIANG Ning^{1,2}, ZHU Shu-tong¹, SU Hao-yu¹,
HUANG Yang¹, WANG Dao-cai¹, FANG Qing¹, CHEN Li-li¹, LIU Xiao-peng^{1,2*}

¹ College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University;

² Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Enshi 445000, China

Abstract: To obtain high yield of selenium enriched *Hericium erinaceus* mycelium, a selenium tolerant variety from H2, H99 and NK was selected by the plate method via the Na₂SeO₃ concentration gradient experiment. Then the medium components including carbon source, nitrogen source, inorganic salt and vitamin were optimized with orthogonal test based on single factor test, followed by the proportion of nutrient elements determined via uniform design. And the Na₂SeO₃ concentration in deep fermentation medium was determined based on dry weight of mycelium, content of total selenium and organic selenium. The results showed that: among the three *H. erinaceus* strains, H2 was the most selenium tolerant, and the mycelium cultured in plate medium containing Na₂SeO₃ 6 μg/mL was suitable for the subsequent research. The optimized liquid medium composition was as follows: 5.8% soluble starch, 5.8% soybean powder, 0.04% CaCl₂, 0.024% VB₁ + VB₂ + VB₆, and the theoretical value of mycelium dry weight could reach 2.37 g/100 mL. The mycelial growth in liquid medium containing 12 μg/mL Na₂SeO₃ was not inhibited and content of organic selenium was the highest of 136.8 mg/kg. This study laid a foundation for the development and utilization of selenium enriched *H. erinaceus*.

Key words: *Hericium erinaceus*; selenium-enriched; submerged fermentation; medium; optimization

硒是人体的必须微量元素, 在体内主要参与形成谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase,

TrxR)、硒蛋白 P (selenoprotein P, Selp), 调节氧化应激、氧化还原状态及关键细胞活动^[1]。硒在自然界中主要以无机硒和有机硒存在, 其中无机硒的安全范围很小, 食用菌具有较强的富硒能力, 能将无机硒转化为人体吸收和利用的有机硒^[2]。食用菌常用于实体培养或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、成本小、产量高、

收稿日期: 2020-07-13

接受日期: 2021-03-17

基金项目: 湖北省技术创新专项 (2016AKB058, 2017AKB077); 国家自然科学基金 (81460573); 2019 湖北产业教授人才项目 (2019029)

* 通信作者 Tel: 86-015671896031; E-mail: liuxp999@163.com

质量可控、重复性好、环境友好等优点。目前,通过在液体培养基中添加无机硒,深层发酵培养富硒食用菌菌丝体,从中提取富硒产品(如富硒多糖),已得到广泛应用^[3]。

猴头菌(*Hericium erinaceus* (Rull ex F.) Pers) 属担子菌门、伞菌纲、红菇目、齿菌科^[4],它除了味道鲜美、营养丰富外,还具有降血糖^[5]、抗氧化^[6]和抗衰老^[7]、促进周围神经再生^[8],抑制肿瘤细胞生长^[9]、增强免疫调节能力^[10]等功效,尤其对治疗胃溃疡及胃肠癌有显著作用^[11]。猴头菌作为味道、营养、功效俱佳的食用菌,是用来富硒培养的优质材料,但目前对猴头菌的富硒培养大多仅限于子实体的培养,有关深层发酵培养富硒猴头菌的报道还很少。

本文研究了3种猴头菌的富硒能力,筛选出耐硒菌种;优化深层发酵培养碳源、氮源、无机盐和维生素的种类和配比;确定无机硒培养液中的添加量,得到猴头菌富硒菌丝体,为富硒猴头菌产品的开发利用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:猴头菌 H2、猴头菌 H99 由华中农业大学提供,猴头菌 NK 由南京农业大学提供。

试剂:Na₂SeO₃ (山东西亚化学工业有限公司,纯度 > 98%,批号:20160703);葡萄糖(天津市光复科技发展有限公司,纯度 > 99%,批号:20181201);麦芽糖(国药集团化学试剂有限公司,纯度 ≥ 99%,批号:20160920);可溶性淀粉(天津市天力化学试剂有限公司,纯度 > 99%,批号:20160920);琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,纯度 > 95%,批号:20180517);其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

SPX-250B 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);HZQ-F100 全温振荡培养箱(太仓市实验设备厂);TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂);AFS-230E 原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 培养基的配制

固体培养基:PDA 培养基。

液体种子培养基:马铃薯 20%,葡萄糖 1%,麦芽糖 1%,MgSO₄·0.15%,K₂HPO₄·0.1%,pH 自然。

深层发酵培养基基本配方^[12]:4.6% 可溶性淀粉,4.6% 黄豆粉,0.02% KH₂PO₄,0.018% 维生素

B₁。黄豆粉需加适量水浸没,煮沸 30 min,过滤取滤液;可溶性淀粉需加热使其充分溶解。

1.3.2 耐硒菌种及其耐硒浓度的筛选

将 H2、H99、NK 菌种放入 28 °C 培养箱里活化,30 min 后,用接种铲从平板上切取 1 cm² 菌丝浓密适当、生长良好的菌种分别接入含 Na₂SeO₃ 浓度为 0、2、4、6、8、10、20、50 μg/mL 的 PDA 平板培养基中,28 °C 倒置培养至空白平板菌丝长满,观察其生长状况和菌丝颜色,比较 3 个菌种的耐硒能力,筛选耐硒菌种及其耐硒浓度。

1.3.3 猴头菌液体种子的制备及生长曲线的测定

用接种铲从平板上切取生长旺盛的 1 cm² 菌块,接入液体种子液培养基中,并在 25.8 °C,摇瓶转速为 150 rpm 条件下进行震荡培养,每 24 h 取样 1 次,每次取 3 瓶。四层纱布过滤种子液,用蒸馏水冲洗菌丝上的杂质,105 °C 烘干至恒重(105 °C 烘 2 h,冷却后称重,再放入 105 °C 中烘 30 min 再称重,两次称重的重量差不超过 2 mg 即为恒重)。以时间为横坐标,菌丝干重为纵坐标,绘制种子液的生长曲线。根据种子液的生长曲线确定种子液的培养时间。

1.3.4 猴头菌的深层发酵

每 250 mL 三角瓶装量 100 mL 培养基,接种量 11%、发酵温度 25.8 °C、摇瓶转速 137 rpm,摇瓶培养 7 天^[12]。

1.3.5 液体培养基成分的优化

1.3.5.1 单因素试验

(1) 碳源对菌丝体生长的影响

分别以葡萄糖(glucose, Glc)、蔗糖(sucrose, Suc)、麦芽糖(maltose, Mal)、可溶性淀粉(Soluble starch, SS)、乳糖(lactose, Lac)、玉米淀粉(corn starch, CS)为碳源,浓度均为 4.6%,其它成分为基本培养基配方,培养条件按照“1.3.4”进行。培养结束后,将发酵液四层纱布过滤,用蒸馏水冲洗菌丝上的杂质,105 °C 烘干至恒重。

(2) 氮源对菌丝体生长的影响

分别以(NH₄)₂NO₃、(NH₄)₂SO₄、NaNO₃、酵母膏(yeast extract, YE)、麸皮(bran, Bra)、豆饼粉(bean cake powder, BCP)、黄豆粉(soybean powder, SP)、尿素(urea, Ure)、蛋白胨(peptone, Pep)为氮源,浓度均为 4.6%。其余成分同基本培养基配方。具体操作同“(1)”。

(3) 无机盐对菌丝体生长的影响

CaCl₂、KCl、KH₂PO₄、FeSO₄、MgSO₄、K₂HPO₄, 浓

度均为 0.02%。其余成分同基本培养基配方。具体操作同“(1)”。

(4) 维生素 B 对菌丝体生长的影响

VB 分别为 VB₁、VB₂、VB₆、VB₁ + VB₂、VB₁ + VB₆、VB₂ + VB₆、VB₁ + VB₂ + VB₆，浓度均为

0.018%。其余成分同基本培养基配方。具体操作同“(1)”。

1.3.5.2 正交试验

根据单因素结果,采用四因素三水平正交表 L₉(3⁴)设计正交试验,具体因素与水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A:碳源 Carbon source	B:氮源 Nitrogen source	C:无机盐 Inorganic salt	D:维生素 B Vitamin B
1	葡萄糖 Glucose	酵母膏 Yeast extract	CaCl ₂	VB ₁ + VB ₆
2	蔗糖 Sucrose	蛋白胨 Peptone	FeSO ₄	VB ₂ + VB ₆
3	可溶性淀粉 Soluble starch	黄豆粉 Soybean powder	MgSO ₄	VB ₁ + VB ₂ + VB ₆

1.3.5.3 正交试验的验证

采用正交试验的优选培养基培养猴头菌。称量菌丝体干重,以验证优化培养基的适用性和稳定性。

1.3.6 培养基不同营养元素配比的优化

1.3.6.1 均匀设计试验

根据单因素、正交实验结果选取最佳碳源、氮源、无机盐、维生素,采用 U₇⁴ 均匀设计表,每一因素取 7 水平,根据菌丝体干重确定其培养基的最佳配比。因素及水平如表 2 所示。

表 2 均匀设计试验因素与水平

Table 2 Factors and levels of uniform design test

因素 Level	1	2	3	4	5	6	7
X ₁ :可溶性淀粉 Soluble starch (%)	3.4	3.8	4.2	4.6	5.0	5.4	5.8
X ₂ :黄豆粉 Soybean powder (%)	3.4	3.8	4.2	4.6	5.0	5.4	5.8
X ₃ :CaCl ₂ (%)	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
X ₄ :VB ₁ + VB ₂ + VB ₆ (%)	0.012	0.014	0.016	0.018	0.020	0.022	0.024

1.3.6.2 均匀设计试验的验证

采用均匀设计优化的培养基培养猴头菌,称量菌丝干重,与理论产量比较,对优化的培养基进行验证。

1.3.7 猴头菌液体培养最适硒浓度的确定

在预试验的基础上,在优化的深层培养基中加入 Na₂SeO₃,使其浓度分别为 0、2、4、6、8、10、12 μg/mL,培养条件同上。测定菌丝干重、总硒含量和有机硒含量。

1.3.8 硒含量的测定

根据 GB5009.93—2017《食品中硒的测定》,采用原子荧光光谱法测定样品中的总硒和无机硒含量。有机硒含量为总硒含量与无机硒含量的差值。

1.3.9 数据处理

用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,数据以平均数 ± 标准误 (standard error, SE),组间多重比较用

最小显著差异 (least significant difference, LSD) 法,所有实验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 耐硒菌种的筛选及其耐硒浓度的确定

猴头菌 H2 在含 0 ~ 50 μg/mL Na₂SeO₃ 平板上的生长状况如图 1 所示。在含 Na₂SeO₃ 2 μg/mL 平板 (见图 1B) 上, H2 的长势与空白对照 (见图 1A) 相比无明显差异,当 Na₂SeO₃ 浓度升至 4 μg/mL 时,菌丝半径开始减小,且随着硒浓度的增大,菌丝半径逐渐减小 (见图 1C)。当硒浓度为 8、10 μg/mL 时 (见图 1E、F),尽管气生菌丝长势仍较茂密,但菌丝半径与 6 μg/mL 的平板 (见图 1D) 相比已明显减小,说明菌丝的延伸已受到抑制。当 Na₂SeO₃ 浓度达到 50 μg/mL 时菌丝颜色变深,菌丝长势极弱 (见图 1H)。

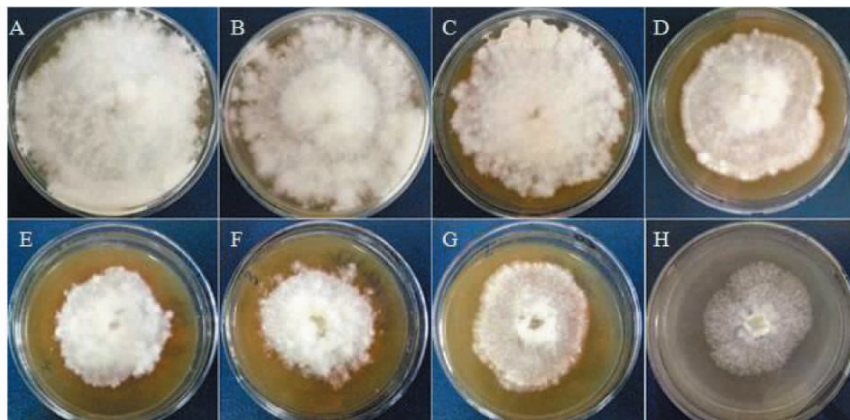


图1 硒浓度对猴头菌 H2 生长的影响

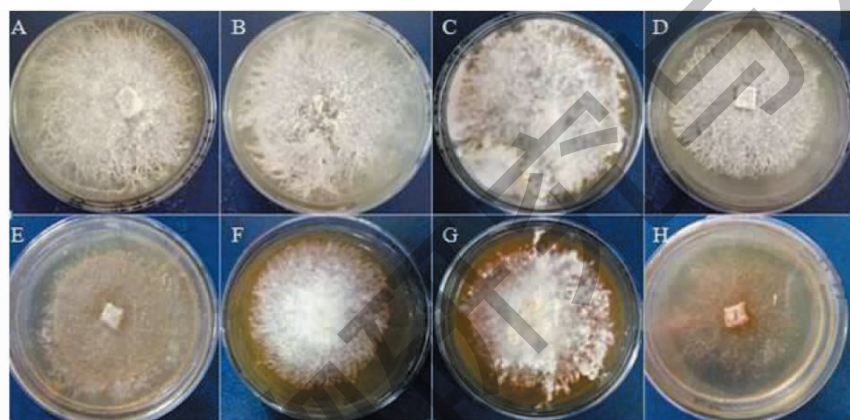
Fig. 1 Effects of selenium concentration on the growth of *H. erinaceus* H2

图2 硒浓度对猴头菌 H99 生长的影响

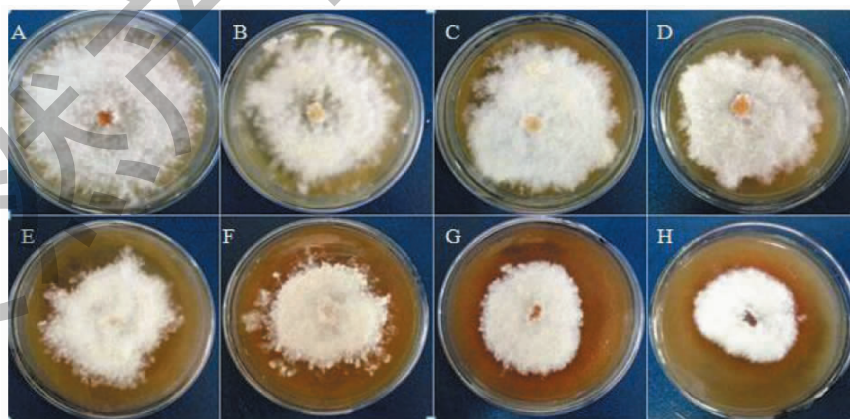
Fig. 2 Effects of selenium concentration on the growth of *H. erinaceus* H99

图3 硒浓度对猴头菌 NK 生长的影响

Fig. 3 Effects of selenium concentration on the growth of *H. erinaceus* NK

图2为猴头菌H99在含0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Na_2SeO_3 平板上培养相同时间后的生长情况。由图可知:当平板上不含 Na_2SeO_3 时(见图2A),H99长势旺盛,

气生菌丝较长,随着 Na_2SeO_3 浓度的不断提高,菌丝长势逐渐减弱,基内菌丝开始变成红色,当 Na_2SeO_3 浓度超过4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,气生菌丝的生长就受到显著

抑制,当 Na_2SeO_3 浓度达 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,菌丝生长受到极大抑制,且菌丝颜色变深。

图 3 为猴头菌 NK 培养相同时间后在含 $0 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Na_2SeO_3 平板上的长势。与空白平板(见图 3A)上生长情况比较,当 Na_2SeO_3 含量为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NK 菌丝的长势就受到抑制,菌丝半径显著减小(见图 3B),随着硒浓度的增加,这种抑制作用不断加强,基内菌丝也逐渐变红,同时培养基也变红(见图 3C-H)。

比较以上 3 种猴头菌菌种在富硒平板的长势和菌丝半径,可以看出 H2 的耐硒能力最强,且在含 Na_2SeO_3 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板上,长势较旺盛,菌丝延伸速度也较快,所以作为后续富硒培养的菌种。

2.2 猴头菌液体种子的制备及生长曲线的测定

以时间为横坐标,菌丝干重为纵坐标,绘制种子液的生长曲线(见图 4)。猴头菌种子液的生长曲线呈典型的 S 型,从第 7 天起进入对数生长期,12 天后进入平台期,因此选取培养 10 天的种子液作为后续的发酵种子。种子液生长曲线的测定是为了选择

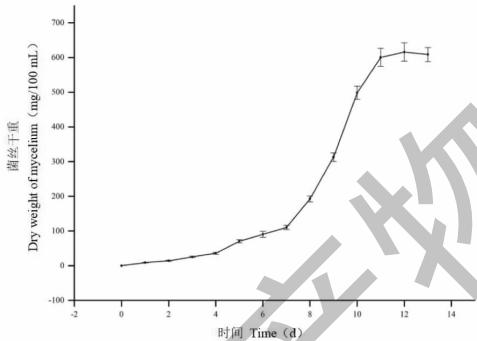


图 4 猴头菌种子液生长曲线

Fig. 4 The growth curve of *H. erinaceus*

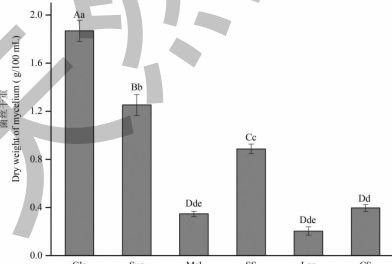


图 5 碳源对猴头菌菌丝干重的影响

Fig. 5 Effects of carbon sources on the dry mycelial weight of *H. erinaceus*

注:大、小写英文字母分别表示 $\alpha = 0.01, 0.05$ 水平上的差异,下同。Note: Upper and lower case letters indicate the difference at the levels of $\alpha = 0.01$ and 0.05 , the same below.

对数生长期的菌丝,因为此期菌丝生长旺盛,作为液体种子能很快适应发酵环境,迅速生长,更易在短时间内获得较高产量^[13]。

2.3 液体培养基成分的优化结果

2.3.1 单因素试验结果

2.3.1.1 碳源对菌丝体生长的影响

不同碳源对菌丝体生长影响结果见图 5。碳源对猴头菌的生长具有显著影响。葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉为碳源时,菌丝体生长量较大,与其它碳源相比,菌丝干重有极显著差异($P < 0.01$),因此选取葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉这 3 种碳源作为后续正交试验的 3 个水平。

碳源是微生物六大营养要素之一,在食用菌的生长中既是碳源也是能源,碳源是否适宜将直接影响菌丝产量。从图 5 可以得知猴头菌对单糖葡萄糖、二糖蔗糖、多糖可溶性淀粉利用较好,而对二糖麦芽糖、乳糖以及多糖玉米淀粉的利用较差,这可能和猴头菌体内利用糖的酶系统有关,具体的原因还有待进一步研究。

2.3.1.2 氮源对菌丝体生长的影响

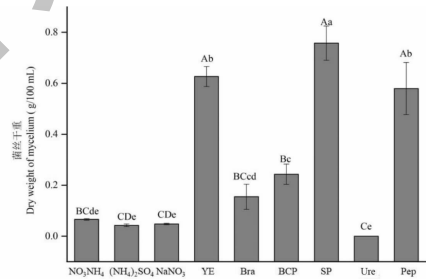


图 6 氮源对猴头菌菌丝干重的影响

Fig. 6 Effects of nitrogen sources on the dry mycelial weight of *H. erinaceus*

不同氮源对菌丝体生长的影响结果如图 6 所示。由图可知:氮源能显著影响菌丝产量,慢速利用的氮源有利于猴头菌的生长,这是因为快速利用氮源(尿素和无机氮)不能提供猴头菌的必需氨基酸,而慢速利用氮源成分复杂,富含合种氨基酸,能满足氨基酸异养型食用菌生长^[14],因此通过优化得到的食用菌最佳氮源大都是慢速利用氮源。Ding 等^[15]研究了金针菇液体发酵的最佳氮源为黄豆粉,但也有例外,如 Tang 等^[16]优化了桑黄液体发酵培养基,发现最适氮源是氯化铵。根据菌丝干重,选取酵母膏、黄豆粉、蛋白胨 3 种氮源作为后续正交试验的水平。

2.3.1.3 不同无机盐对菌丝体生长的影响

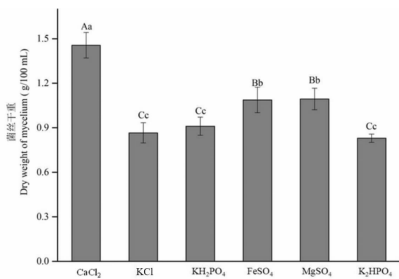


图7 无机盐对猴头菌菌丝干重的影响
Fig.7 Effects of inorganic salts on the dry mycelial weight of *H. erinaceus*

不同无机盐对菌丝体生长的影响结果见图7。无机盐对菌丝干重的影响达显著水平($P < 0.05$),当无机盐分别为 $CaCl_2$ 、 $FeSO_4$ 、 $MgSO_4$ 时菌丝产量最高,所以作为后续正交试验的水平。

无机盐对不同食用菌菌丝生长的影响较为复杂,这不仅与食用菌的种类有关,也与培养基中其它成分有关,如培养基中含有天然成分,这些天然成分一般含量一定的无机盐,使得无机盐对菌丝生长的影响变得复杂。

2.3.1.4 不同维生素B对菌丝体生长的影响

图8为不同维生素B对菌丝体生长的影响。

复合维生素B对猴头菌生长的效果要好于单一维生素B的效果。复合维生素B中含有 VB_6 的效果最好,但在培养基中只添加 VB_6 效果不及含 VB_6 的复合维生素B。说明猴头菌利用维生素B族的多条生化途径不是独立的,而是相互作用、相互协同。因此选 $VB_1 + VB_6$ 、 $VB_2 + VB_6$ 、 $VB_1 + VB_2 + VB_6$ 3种维生素为后续正交试验的水平。

生长因子种类繁多,难以将所有生长因子进行筛选,通过查阅文献,发现VB族维生素对食用菌菌丝生长影响较大^[15],因此,本研究选取 VB_1 、 VB_2 、 VB_6 作为候选的生长因子。

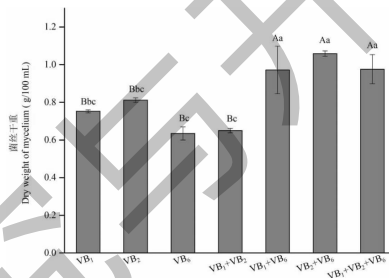


图8 VB对猴头菌菌丝干重的影响
Fig.8 Effects of vitamin B on the dry mycelial weight of *H. erinaceus*

2.3.2 正交试验结果

表3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test

试验号 Test No.	因素 Factor				菌丝干重 Dry weight of mycelium (g/100 mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.37 ± 0.02
2	1	2	2	2	0.69 ± 0.06
3	1	3	3	3	1.20 ± 0.12
4	2	1	2	3	0.75 ± 0.06
5	2	2	3	1	0.48 ± 0.02
6	2	3	1	2	1.32 ± 0.04
7	3	1	3	2	1.05 ± 0.06
8	3	2	1	3	1.94 ± 0.08
9	3	3	2	1	0.69 ± 0.02
K1	3.26	3.17	4.63	2.54	
K2	2.54	3.10	2.12	3.06	
K3	3.68	3.21	2.73	3.89	
R	1.14	0.11	2.51	1.35	

因素主次

Primary and secondary factors

C > D > A > B

最优条件 Optimal condition

A₃B₃C₁D₃

根据正交试验结果(表3),对正交试验结果进行方差分析,结果如表4所示。比较各因素R值,可以得知四种因素对菌丝干重的影响程度,分别为C无机盐>D维生素B>A碳源>B氮源。通过计算K值,得到最佳碳源、氮源、无机盐、维生素分别为:可溶性淀粉,黄豆粉, CaCl_2 , $\text{VB}_1 + \text{VB}_2 + \text{VB}_6$ 。根据F值,四个因素对菌丝干重的影响程度顺序为C无机盐>D维生素B>A碳源>B氮源,与根据

R值判断的结果一致。对四个因素进行显著性分析,得知碳源、无机盐及维生素B对结果有显著影响,氮源则影响不显著,比较3种氮源,根据工业化生产对成本以及是否易得的要求,选择黄豆粉为猴头菌后续培养用的氮源,与正交试验结果一致。因此,最优培养基组成为可溶性淀粉、黄豆粉、 CaCl_2 、 $\text{VB}_1 + \text{VB}_2 + \text{VB}_6$ 。

表4 正交试验方差分析
Table 4 ANOVA of orthogonal test

差异源 Source of difference	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	显著性 Significance
A:碳源 Carbon source	0.67	2	0.33	89.62	**
B:氮源 Nitrogen source	0.006	2	0.003	0.85	
C:无机盐 Inorganic salt	3.43	2	1.71	459.19	**
D:维生素 B Vitamin B	0.93	2	0.47	124.88	**
误差 Error	0.07	18	0.004		
总和 Total	5.10	26			

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.3.3 正交试验验证结果

按4.6%可溶性淀粉、4.6%黄豆粉、0.02% CaCl_2 、0.018% $\text{VB}_1 + \text{VB}_2 + \text{VB}_6$ 配制培养基,实验重复9次,菌丝体的平均产量达1.98 g/100 mL,与正交试验中的最优组合 $\text{A}_3\text{B}_2\text{C}_1\text{D}_3$ (第8号试验)产量基本持平,说明该优化培养基具有稳定性。

食用菌液体培养基优化的研究大多采用单因素试验得到最佳组分,正交试验^[17]或响应面法确定最优配比^[18],但仅凭单因素试验得到最优组分没有考虑各组分相互作用对菌丝产量的影响。为了研究各组分对猴头菌菌丝干重的影响,本研究在单因素试验基础上增加了正交试验。研究结果也证明正交试验得到的最佳组分并不完全与单因素试验结果相符,如单因素中碳源为葡萄糖时菌丝产量最高,正交试验后得到的最优碳源是可溶性淀粉。

2.4 培养基配比的优化

2.4.1 均匀设计试验结果

均匀设计试验结果如表5所示。以菌丝干重(g/100 mL)为因变量y,以可溶性淀粉(X_1 ,%)黄豆粉(X_2)、 CaCl_2 (X_3)、 $\text{VB}_1 + \text{VB}_2 + \text{VB}_6$ (X_4)为自变量,利用SPSS16.0软件建立线性方程模型,得出如下回归方程:

$$y = -0.098 + 0.190X_1 + 0.191X_2 + 4.776X_3 - 59.696X_3^2 + 0.007X_4$$

$R = 1.000$, $R^2 = 1.000$, $F = 9.64 \times 10^6 > F_{0.01}(4,3) = 28.71$, $P < 0.01$,说明建立的回归方程具有显著的线性关系。对各因素的偏回归系数进行t检验(表6),可以得知各因素对菌丝体产量存在极显著影响($P < 0.01$),主次顺序为 $X_2 > X_1 > X_4 > X_3^2 > X_3$ 。

根据该回归方程可以得出,菌丝体干重在试验范围内,分别与 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 成正相关,与 X_3^2 成负相关,说明在试验范围内,菌丝体干重与碳源、氮源、维生素浓度成正比,与无机盐浓度呈二次函数关系。经计算,当 X_1 取5.8%、 X_2 取5.8%、 X_3 取0.04%、 X_4 取0.024%时,即可溶性淀粉5.8%、黄豆粉5.8%、 CaCl_2 0.04%、 $\text{VB}_1 + \text{VB}_2 + \text{VB}_6$ 0.024%时,菌丝体产量最高,理论值可达2.37 g/100 mL。

2.4.2 均匀设计试验验证结果

采用优化的培养基配方进行验证试验,所得菌丝体干重平均达2.66 g/100 mL,与预测值相符,优于均匀设计试验的所有组合实验值。

均匀设计具有水平多、试验次数少、能够建模等优点,适用于培养基成分配比的优化。前期我们曾采用均匀设计试验对猴头菌液体培养基的配方进行了优化,得到的菌丝产量约为2.1 g/100 mL^[12]。本研究以前期优化的培养基为基本培养基,采用正交和均匀设计试验对培养基的配方进行了进一步优

表 5 均匀设计试验结果
Table 5 Results of uniform design test

试验号 Test number	1	2	3	4	5	6	7
X ₁ :可溶性淀粉 Soluble starch	1	2	3	4	5	6	7
X ₂ :黄豆粉 Soybean powder	2	4	6	1	3	5	7
X ₃ :CaCl ₂	3	6	2	5	1	4	7
X ₄ :VB ₁ + VB ₂ + VB ₆	6	5	4	3	2	1	7
y:菌丝干重 Dry weight of mycelium(g/100 mL)	1.52 ± 0.02	1.68 ± 0.05	1.94 ± 0.06	1.61 ± 0.05	1.82 ± 0.08	2.06 ± 0.03	2.28 ± 0.07

表 6 各偏回归系数的显著性检验
Table 6 Significance test of partial regression coefficients

模型 Model	偏回归系数 Partial regression coefficient	t 值 t value	P 值 P value
常数 Constant	-0.098	-131.790	0.005
X ₁	0.190	2.300E3	0.000
X ₂	0.191	3.273E3	0.000
X ₃	4.776	338.422	0.002
X ₃ ²	-59.696	-386.016	0.002
X ₄	0.007	407.423	0.002

化,培养基组分中碳源、氮源依然是可溶性淀粉和黄豆粉,而无机盐、维生素 B 则由 KH₂PO₄ 和 VB₁ 变为 CaCl₂ 和 VB₁ + VB₂ + VB₆,这可能与菌种和培养基营养成分浓度有关,菌丝产量也提高到 2.66 g/100 mL,高于其它文献报导的产量^[19]。

2.5 最适硒浓度的确定

不同硒浓度对菌丝体干重和有机硒含量的影响

表 7 硒浓度对猴头菌菌丝体干重和有机硒含量的影响

Table 7 Effects of selenium concentration on dry weight and organic selenium content of mycelium

硒浓度 Selenium concentration(μg/mL)	0	2	4	6	8	10	12
菌丝干重 Dry weight of mycelium(g/100 mL)	2.76 ± 0.10	2.58 ± 0.13	2.60 ± 0.03	2.72 ± 0.05	2.65 ± 0.03	2.71 ± 0.17	2.79 ± 0.12
总硒含量 Total selenium content(mg/kg mycelium)	0.38	38.7	62.0	80.7	102.3	122.3	139.1
有机硒含量 Organic selenium content(mg/kg mycelium)	0.33	38.4	61.6	80.0	101.4	111.4	136.8

在前期的预试验中,将硒浓度设为 0、5、15、20、25 μg/mL,结果发现当硒浓度达到 15 μg/mL 时菌丝生长受到显著抑制(1.65 ± 0.13 g/100 mL)。因此在正式试验中将浓度梯度设成 0、2、4、6、8、10、12

见表 7。由表 7 得知:硒浓度对菌丝体干重影响不显著,而菌丝体中有机硒的含量则随着硒浓度的增加而提高。所以确定发酵时 Na₂SeO₃ 的浓度为 12 μg/mL。

μg/mL。

由于硒元素不是食用菌菌丝生长的必须元素,且测量菌丝中的硒含量费时费力,因此,在进行培养基优化时本研究并未考虑硒对菌丝干重的影响,而

是在优化后在液体培养基中添加不同浓度的硒,测量菌丝干重以研究硒浓度对菌丝生长的影响。虽然有研究表明低浓度的硒会促进菌丝的生长^[20],但本研究结果并未显现相似的结果。虽然硒浓度对菌丝干重没有显著影响,但硒的掺入也许会使菌丝中的营养成分发生变化,具体结果还有待进一步研究。

从表7可以看出猴头菌菌丝体中的硒含量大多是有有机硒,说明猴头菌将培养液的无机硒转化成有机硒的效率很高。由于猴头菌极高的食用、药用价值,所以对猴头菌进行富硒液体培养有很好的应用前景。

3 结论

3种猴头菌中H2的耐硒能力最强,菌丝在含6 μg/mL的Na₂SeO₃固体培养基中培养,可以作为后续深层发酵用的菌种;猴头菌深层发酵培养基成分为:可溶性淀粉5.8%、黄豆粉5.8%、CaCl₂0.04%、VB₁+VB₂+VB₆0.024%,在此培养基中添加12 μg/mL的Na₂SeO₃,菌丝生长良好且总硒含量和有机硒含量最高。综上所述,深层发酵猴头菌菌丝体能获得较高产量且具有较强的富硒能力,具备开发和利用的潜力。

致谢:感谢华中农业大学姜道宏教授、南京农业大学赵明文教授为本研究提供菌种。

参考文献

- 1 Fernandes AP, Gandin V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850: 1642-1660.
- 2 Gao Z, Zhang C, Tian C, et al. Characterization, antioxidation, anti-inflammation and renoprotection effects of selenized mycelia polysaccharides from *Oudemansiella radicata* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 181: 1224-1234.
- 3 Jin X, Xiong C, Huang WL, et al. Optimization of selenium-enriched conditions of *Ganoderma oregonense* mycelia and antioxidant activity of selenium polysaccharide [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1-10.
- 4 Wang J, Bau T, Gao XX. The molecular systematics research of *Hericium* in China [J]. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2011, 30: 51-53.
- 5 Zhang W. Study on the hypoglycemic material from the powder of *Hericium erinaceus* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2012.
- 6 Pan W, Liu RN, Zhang LJ, et al. Antioxidant activity of *Hericium erinaceus* fruit body extracts [J]. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2012, 19: 95-99.

- 7 Legrain Y, Touat-Hamiciz Z, Chavatte L. Interplay between selenium levels, selenoprotein expression, and replicative senescence in WI-38 human fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 62996-6310.
- 8 Wong KH, Kanagasabapathy G, Naidu M, et al. *Hericium erinaceus* (Bull. : Fr.) Pers. , a medicinal mushroom, activates peripheral nerve regeneration [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22: 758-759.
- 9 Kim SP, Kang MY, Kim JH, et al. Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59: 9861-9869.
- 10 Kim SP, Moon E, Nam SH, et al. *Hericium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella typhimurium*-induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60: 5590-5596.
- 11 Wang Q, Xie JJ, Zhang YH, et al. The protective effects of *Hericium* tablets on acute alcoholic gastric mucosal injury in rats and its mechanism [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2017, 39: 2454-2461.
- 12 Liu XP, Jiang N, Xia DD, et al. Liquid fermentation culture medium and process optimization for *Hericium erinaceus* [J]. *J Guangdong Agr Sci* (广东农业科学), 2014, 41: 79-82.
- 13 Yang GL, Zhang H, Liang S. The determination of the optimum cultivation time for seed broth during the batch culture in the fermenter [C]. *Proceedings of the First Symposium on Veterinary Bioproducts and Veterinary Microbiology of the Third China Veterinary Drug Congress* (中国畜牧兽医学会生物制品学分会中国微生物学会兽医微生物学专业委员会2010年学术年会(第三届中国兽药大会学术论坛)论文集), 2010.
- 14 Tan YL, Su WY, Wang ZH, et al. Selection and optimization of liquid culture medium for industrialized *Flammulina filiformis* strain [J]. *Food Ferment Sci Technol* (食品与发酵科技), 2019, 55: 35-37.
- 15 Ding XX, Li FW, Shang YL, et al. Preliminary study on liquid fermentation of *Flammulina velutipes* [J]. *China Brew* (中国酿造), 2018, 37: 124-129.
- 16 Tang SY, Zhao YP, Wu D, et al. Study on optimal culture medium of submerged fermentation of *Phellinus linteus* [J]. *J Zhengjiang Univ Sci Technol* (浙江科技学院学报), 2018, 30: 193-198.
- 17 Me L, Song CQ, Wu BJ, et al. Optimization of fermentation medium for liquid spawn of *Pleurotus djamor* [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2018, 39: 169-171.