

不同培养条件下杏鲍菇对硒的耐受性与硒形态分析

杜 芳, 邹亚杰, 张海军, 胡清秀

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘 要: 为了明确不同培养条件下杏鲍菇对外源硒的耐受性, 分别在固体培养基、液体发酵培养基和栽培基质中添加不同量的亚硒酸钠, 并检测杏鲍菇子实体中富集硒的存在形态。结果表明: 固体培养条件下, 硒浓度低于 160 mg/L 时, 对菌丝的生长没有显著影响; 液体培养条件下, 4 mg/L 的硒元素即可对杏鲍菇菌丝体的生长产生显著抑制; 栽培模式下, 基质中补充 10 ~ 600 mg/kg 的硒元素, 不会影响杏鲍菇菌丝体的生长, 且子实体中的硒含量会随基质中硒浓度的增加而增加。子实体硒形态分析表明, 富集硒以硒代蛋氨酸、甲基硒代半胱氨酸、硒代胱氨酸和亚硒酸盐 [Se (IV)] 四种形式存在, 其中硒代蛋氨酸是硒与氨基酸的主要结合形式。

关键词: 杏鲍菇; 硒耐受力; 硒形态; 硒代氨基酸

DOI:10.19870/j.cnki.11-3716/ts.2020.09.002

硒是人与动物正常生理活动所必需的一种重要微量元素, 在体内参与谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白还原酶以及碘化甲腺原氨酸脱碘酶等多种蛋白组和酶的合成, 在抗突变、防衰老、抗癌、增强机体免疫力等方面发挥重要生物学功能^[1-2]。1988 年, 中国营养学会将硒列为 15 种每日膳食营养元素之一, 每人每日必需摄入 50 ~ 250 μg 的硒。我国是一个严重缺硒的国家, 有 72% 的地区缺硒、30% 的地区严重缺硒, 人体硒摄入不足会

引起大骨节病及克山病等一系列病症的发生^[3]。自然界中的硒元素以无机硒和有机硒两种形态存在, 无机硒一般指从金属矿藏的副产品中获得的亚硒酸钠和硒酸钠; 有机硒一般以硒蛋白 (功能蛋白及酶类)、硒多糖、硒核酸等形式存在^[4]。毒理实验表明, 无机硒酸盐对人体毒性大, 要满足人体对硒元素的需求, 需要将无机硒转化为更易被人体吸收且安全性更高的有机硒^[5]。食用菌是良好的硒生物转化载体, 能够将环境中的无机硒转化

基金项目: 现代食用菌产业技术体系建设专项资金 (项目编号: CARS-20)。

作者简介: 杜 芳 (1987—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食用菌栽培技术。

通信作者: 胡清秀 (1963—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食用菌栽培技术。

[38] Bendall CL, Mayr HL, Opie RS, et al. Central obesity and the Mediterranean diet: A systematic review of intervention trials [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018 58(18): 3070-3084.

[39] Esposito K, Kastorini C-M, Panagiotakos DB, et al. Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Metabolic Syndrome and Related Disorders, 2011 9(1): 1-12.

Effects of Dietary Fiber on Intestinal Microecology Related to Obesity

YANG Hai-yan, GE Sheng

(Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

Abstract: Some researches have found that the changes of intestinal microecology are connected with metabolic diseases such as obesity. As a part of diet, dietary fiber can affect obesity by changing the proportion and richness of intestinal flora, improving inflammatory reaction, regulating intestinal hormones and lipid metabolism. However, the recommended intake and types of dietary fiber and the mechanism of action with intestinal flora need to be further studied. This article reviewed the research progress on the effects of dietary fiber on intestinal microecology related to obesity.

Keywords: dietary fiber; obesity; intestinal microecology

为低毒、高效的有机硒，且自身含有丰富的蛋白质和多种营养元素，是开发富硒产品的研究热点^[6]。杏鲍菇菇质脆嫩，风味独特，营养丰富，是已实现工厂化栽培的一种大型真菌。根据中国食用菌协会统计，2017 年杏鲍菇总产量已达 159.7 万 t，产品遍及各大小超市、菜市场，是饭桌上常见的食用菌品种。杏鲍菇生产周期快、市场需求量大使之成为开发食用菌富硒制品的优选品种。研究表明，杏鲍菇菌丝体和子实体具有良好的富集、吸收和转化硒的能力^[7-8]，因此，杏鲍菇可作为一种硒补充的重要来源。虽然前人对杏鲍菇的富硒能力进行了研究，但尚未系统地研究杏鲍菇对硒的耐受性，硒浓度过高会对杏鲍菇的生长发育产生毒害作用。本研究将对液体发酵、PDA 平板培养、栽培条件下杏鲍菇菌丝体对硒的耐受状况进行比较，并对杏鲍菇子实体中富集硒的含量和形态进行全面分析，为富硒杏鲍菇产品开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 杏鲍菇 ACCC52611，由农业农村部微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 培养基 平板基本培养基配方（g/L）：土豆（去皮）200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g，pH 7.33（灭菌前）。液体基本培养基配方（g/L）：土豆（去皮）200 g、葡萄糖 20 g，pH 7.33（灭菌前）。栽培基质基本配方：木屑 21%、甘蔗渣 21%、麦麸 18.4%、玉米芯 18.4%、豆粕 8.4%、玉米粉 6.6%、棉籽壳 4.2%、石灰 1%、石膏 1%。

1.2 试验设计

1.2.1 杏鲍菇的富硒平板培养 配制平板基本培养基，按表 1 的方案添加亚硒酸钠，使各处理中的硒浓度依次为 4、8、12、16、20、40、80、120、160、200 mg/L。灭菌后倒板，每个处理 4 个重复，待培养基凝固后接种菌块，于 22 ℃暗培养，菌丝萌发后，每 2 d 测量 1 次菌丝生长半径，直至菌丝长满平板。

表 1 平板培养基中硒的浓度

处理	CK	Se1	Se2	Se3	Se4	Se5	Se6	Se7	Se8	Se9	Se10
Se (mg/L)	0	4	8	12	16	20	40	80	120	160	200
Na ₂ SeO ₃ (mg/L)	0	8.76	17.52	26.28	35.04	43.80	87.6	175.2	262.8	350.4	438.0

1.2.2 杏鲍菇的富硒液体发酵 配制液体培养基，于 250 mL 三角瓶中分装 100 mL。准确称取亚硒酸钠于各三角瓶中，使液体培养基中的硒浓度依次为 4、8、12、16、20、50、100 mg/L，每个浓度 3 个重复。灭菌后接

入 3 个菌块，于 22 ℃、130 r/min 条件下暗培养 14 d。收集菌丝球，清洗、过滤并烘干（45 ℃），测定菌球干重（表 2）。

表 2 液体培养基中硒的浓度

处理	CK	Se1	Se2	Se3	Se4	Se5	Se6	Se7
Se (mg/L)	0	4	8	12	16	20	50	100
Na ₂ SeO ₃ (mg/L)	0	8.8	17.5	26.3	35	43.8	109.5	219.0

1.2.3 栽培基质中添加亚硒酸钠实验 在杏鲍菇栽培配方中按表 3 的方案添加亚硒酸钠，使栽培基质中的硒浓度分别为 10、50、100、150、200、300、600 mg/kg（表 3）。充分拌匀，每个处理 110 包，平均每袋干料重

550 g，含水量为 65% ~ 68%。装袋后按常规方式进行灭菌、接种、发菌和出菇管理。记录菌丝生长速度、子实体农艺性状和产量等。将杏鲍菇子实体于 60 ℃烘干，粉碎研磨后为待测样品。

表 3 栽培基质中硒的浓度

处理	CK	Se1	Se2	Se3	Se4	Se5	Se6	Se7
Se (mg/kg)	0	10	50	100	150	200	300	600
Na ₂ SeO ₃ (mg/kg)	0	21.9	109.5	219.0	328.5	438.0	657.1	1315.1

1.2.4 蛋白质含量分析 按照国家标准 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中的方法，采用凯氏定氮法测定杏鲍菇子实体中粗蛋白的

含量。

1.2.5 杏鲍菇子实体中硒含量测定与富集系数分析 按照国家标准 GB 5009.93—2017《食品安全国家标准食

品中硒的测定》中的方法,采用微波消解-电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测定样品中总硒含量^[9]。富集系数(BCF):食用菌子实体中某种元素的含量与相应栽培料中该元素含量之比。BCF越大,则说明富集能力越强。

1.2.6 杏鲍菇子实体中硒代氨基酸形态分析 杏鲍菇产品风干样品研磨处理后,称取定量样品溶于水中,加足量蛋白酶水解后利用液相色谱-原子荧光光谱仪联用(LC-UV-AFS,北京)进行硒代氨基酸形态的测定,可检测甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代胱氨酸(Se-Cys₂)、硒代蛋氨酸(SeMet)等3种硒代氨基酸和4价硒[Se(IV)]含量^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 平板培养条件下硒元素对杏鲍菇菌丝生长的影响

平板培养条件下,杏鲍菇菌丝体对硒的耐受性较强,硒浓度低于160 mg/L时,对菌丝的生长没有显著影响;硒浓度大于200 mg/L时,菌丝生长速度呈现显著下降趋势(图1)。在固体培养条件下,杏鲍菇菌丝体生长在培养基表面,与硒的接触有限,且基质中的硒浓度会随着菌丝的富集作用而逐渐下降,不会对菌丝体的生长产生毒害作用。此外,PDA培养基中含有的琼脂等大分子物质可能会与硒元素紧密整合,也可以降低硒的毒性作用。由此可见,在固体培养条件下进行菌丝对硒的富集,培养基中硒的适宜添加浓度为40~80 mg/L。

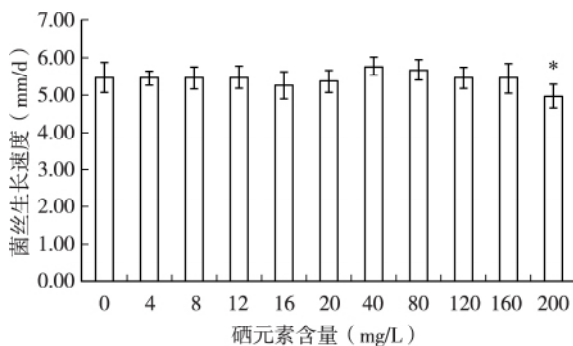


图1 平板培养中硒元素对菌丝生长的影响

2.2 液体发酵条件下硒的添加对杏鲍菇菌丝生物量的影响

液体发酵条件下,硒浓度为4 mg/L时,即可对杏鲍菇菌丝体的生长产生显著抑制(图2);当发酵液中的硒浓度达到50 mg/L时,菌丝生长受到强烈抑制,生物量仅为1 g/L;硒浓度达到100 mg/L时,杏鲍菇菌丝停止生长,生物量为0 g/L。液体发酵条件下,振荡中的菌丝球全方位地接触硒元素,导致杏鲍菇菌丝体对硒元素非常敏感,菌丝生长速度受到强烈抑制。

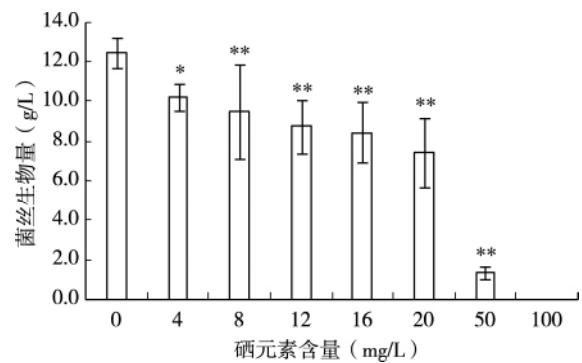


图2 液体培养中硒元素对菌丝生长的影响

2.3 硒元素对杏鲍菇子实体生长发育的影响

栽培基质中添加10~600 mg/kg的硒元素时,杏鲍菇菌丝生长的速度不受影响,菌丝长满菌袋的时间相近。当基质中硒元素的添加量为10 mg/kg时,杏鲍菇的单位产量[(328.6±24.2)g]与对照组[(308.3±29.3)g]相比显著提高,之后,随着硒添加量的增加,产量未发生显著变化,说明在试验设计的添加浓度范围内,微量元素硒对杏鲍菇的产量影响不明显。此外,与对照相比,各添加配方之间杏鲍菇的农艺性状并没有显著差别,说明亚硒酸钠的添加对杏鲍菇的农艺性状无显著影响(表4)。

2.4 杏鲍菇子实体对硒的富集作用

栽培基质中添加亚硒酸钠时,杏鲍菇子实体中的硒含量明显高于对照,且提高程度随外源硒添加量的升高而增加(表5)。栽培基质中硒元素添加浓度为10 mg/kg时,BCF最高(0.528),富集效果最好;硒添加量为100~200 mg/kg时,子实体硒含量维持在35~40 mg/kg,未呈现明显提高趋势。硒添加浓度在300~600 mg/kg时,子实体中的硒含量随添加浓度的升高相应提高,但BCF基本保持不变。上述结果表明,杏鲍菇具有较强的富硒能力,低浓度时,富集作用较强;高浓度时,富集作用较弱。

2.5 子实体中的硒形态分析及蛋白质含量

LC-UV-AFS测定结果表明,不同硒添加浓度处理中,杏鲍菇子实体中富集到的硒元素主要以SeMet和亚硒酸盐[Se(IV)]的形式存在,分别占总硒含量的28.76%~71.38%和25%~61.96%。而硒代胱氨酸(SeCys₂)含量和甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)含量占总硒含量的10%以下。采用凯氏定氮法测定杏鲍菇子实体中粗蛋白的含量,发现在栽培基质中补充亚硒酸钠,可以提高子实体中的蛋白质含量(表6),但蛋白质含量不随基质中硒添加量的增加而增加,各添加配方之间蛋白质含量差异较小。

表4 栽培基质中亚硒酸钠的补充对杏鲍菇产量、农艺性状的影响

编号	添加量 (mg/kg)	入库-采菇天数 (d)	接种-采菇天数 (d)	单位产量 [*] (g)	柄长 (cm)	柄粗 (cm)	菌盖直径 (cm)
CK	0	20	54	308.3 ± 29.3ab	12.08	6.54	10.41
Se1	10	21	55	328.6 ± 24.2c	12.73	6.83	11.15
Se2	50	21	55	313.2 ± 26.6bc	11.12	6.81	10.24
Se3	100	21	55	323.7 ± 25.8bc	11.74	6.92	10.92
Se4	150	21	55	291.2 ± 29.8a	10.81	6.40	10.39
Se5	200	21	55	309.6 ± 25.0b	11.17	6.74	10.57
Se6	300	21	55	308.2 ± 36.4ab	10.77	6.69	10.37
Se7	600	22	56	319.5 ± 29.1bc	10.42	6.40	12.20

注：^{*} 每袋商品菇产量

表5 杏鲍菇子实体中的硒富集量

实验处理	添加量 (mg/kg)	基质中硒含量 (mg/kg)	子实体中硒含量 (mg/kg)	富集系数
CK	0	23.0	2.019	0.088
Se1	10	33.0	11.823	0.528
Se2	50	83.0	40.061	0.260
Se3	100	123.0	35.955	0.119
Se4	150	173.0	35.462	0.077
Se5	200	223.0	35.429	0.072
Se6	300	323.0	77.474	0.099
Se7	600	623.0	117.698	0.066

表6 杏鲍菇子实体中的硒形态分析

样品	硒代胱氨酸 (mg/kg)	甲基硒代半胱氨酸 (mg/kg)	亚硒酸盐 (mg/kg)	硒代蛋氨酸 (mg/kg)	蛋白质含量 (g/100g)
CK	0.6	0.2	—	1.2	17.9
Se1	0.8	0.3	7.323	3.4	20.6
Se2	2.8	1.6	16.360	19.3	17.4
Se3	2.6	1.1	14.127	18.1	22.7
Se4	2.2	1.1	13.425	19.4	19.6
Se5	1.5	1.1	12.365	20.4	20.8
Se6	1.4	1.5	19.370	55.3	20.2
Se7	8.2	2.6	60.733	46.1	18.4

3 讨论

食用菌菌丝体和子实体中富含蛋白质和多糖，利用食用菌作为富硒载体，可以将无机硒转化为蛋白硒和多糖硒。食用菌进行硒的生物转化主要通过向栽培基质或发酵液中添加外源硒（硒酸钠、亚硒酸钠、SeMet等）进行人工培养的方式实现的。培养条件不同，食用菌对硒元素的耐受能力不同。本研究表明，杏鲍菇菌丝体在PDA平板培养、液体发酵培养和人工栽培模式下对硒的耐受性存在很大差异。平板培养条件下，加入适量的硒（40~80 mg/kg），可促进杏鲍菇菌丝的生长，但浓度高

于160 mg/kg，菌丝生长速度会受到抑制；液体摇瓶培养条件下，杏鲍菇菌丝对硒元素非常敏感，4 mg/L的浓度即可以抑制菌丝的生长，这与孙中涛等^[11]报道的低浓度硒即可对香菇菌丝体（液体发酵）产生强烈抑制的结果一致。栽培模式下，菌丝对硒的耐受性非常高，基质中补充600 mg/kg的硒元素，菌丝仍然可以正常生长，且产量与对照相比差异不显著。基质中补充低浓度（10 mg/kg）硒时，杏鲍菇的单位产量最高，相比对照提高6.6%。由此可见，培养方式不同，杏鲍菇对硒元素的耐受性完全不同。

硒在生物体内富集转化的同时，SeMet和硒代半胱氨酸取代蛋氨酸和半胱氨酸，参与谷胱甘肽过氧化物酶、碘化甲腺原氨酸脱碘酶等多种蛋白质的合成，具有重要的生理功能^[12]。本研究中，栽培基质中添加的硒元素被大量富集至杏鲍菇子实体中，通过生物转化，主要以4种硒形态存在：即SeMet、SeCys₂、MeSeCys和Se（IV）。现有研究表明，富硒食用菌中的有机硒形态主要是SeMet，同时还存在SeCys₂、MeSeCys等有机硒形态，部分富硒食用菌中还存在Se（IV）和Se（VI），如富硒香菇子实体中硒主要以SeMet和MeSeCys2种形态存在^[13]；硒酸钠处理的蛹虫草子实体中主要以SeCys₂和SeMet形态存在，还存在少量Se（VI）；硒代蛋氨酸处理下蛹虫草子实体中硒主要以SeCys₂和SeMet形态存在，还存在一种未知的硒形态^[14]，这与食用菌种类、外源硒类型和添加量有关。本研究中，富硒杏鲍菇子实体中的硒主要以SeMet和Se（IV）2种形态存在。

目前对富硒食用菌的研究主要集中在培养条件及方式、硒含量和形态，以及营养品质等方面，而食用菌对不同形态硒的吸收通道和转化过程尚不明确，是未来需要努力攻克的方向。◇

参考文献

[1] Wang C M, Wang H J, Luo J, et al. Selenium deficiency

- impairs host innate immune response and induces susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection [J]. BMC Immunology , 2009(10) : 55.
- [2] Diwakar B T , Korwar A M , Paulson R F , et al. The regulation of pathways of inflammation and resolution in immune cells and cancer stem cells by selenium [J]. Advances in Cancer Research , 2017(136) : 153-172.
- [3] Fryer M J. Selenium and human health [J]. Lancet , 2000 , 356(9233) : 943.
- [4] 黄开勋, 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社 2009.
- [5] 朱善良. 硒的生物学作用及其研究进展 [J]. 生物学通报, 2004 39(6) : 6-8.
- [6] 胡婷, 惠改芳, 赵桂慎, 等. 富硒食用菌研究进展 [J]. 食用菌学报, 2019 26(1) : 68-76.
- [7] 方玲, 汤强. 富硒杏鲍菇优良菌株筛选 [J]. 芜湖职业技术学院学报, 2016 18(1) : 64-66.
- [8] Gąsecka M , Mleczek M , Siwulski M , et al. The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi [J]. LWT – Food Science and Technology , 2015 , 63(1) : L726-731.
- [9] Mazej D , Osvald J , Stibilj V. Selenium species in leaves of chicory , dandelion , lamb’ s lettuce and parsley [J]. Food Chemistry , 2008 107(1) : 75-83.
- [10] Wróbel K , Wróbel K , Kannamkumarath S S , et al. HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves –a potential dietary source of Se-methylselenocysteine [J]. Food Chemistry , 2004 86(4) : 617-623.
- [11] 孙中涛, 王汉忠, 孙凤鸣, 等. 硒在香菇体内的生物转化及硒蛋白的生物活性 [J]. 食品与发酵工业, 2003 29(8) : 57-60.
- [12] Rayman M P , Goenaga I H , Mike S. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation [J]. British Journal of Nutrition , 2008 100(2) : 238-253.
- [13] Klimaszewska M , Górka S , Dawidowski M , et al. Bio-synthesis of Se-methyl-seleno-L-cysteine in basidiomycetes fungus *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [J]. Springer Plus , 2016 5(1) : 733.
- [14] Hu T , Liang Y , Zhao G S , et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in *Cordyceps militaris* supplied with selenate , selenite , or selenomethionine [J]. Biological Trace Element Research , 2019 187(2) : 553-561.

Selenium Tolerance of *Pleurotus eryngii* Under Different Culture Conditions and Selenium Morphology Analysis

DU Fang , ZOU Ya-jie , ZHANG Hai-jun , HU Qing-xiu

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China)

Abstract: To clarify the tolerance of exogenous selenium to *Pleurotus eryngii* under different culture conditions , different concentrations of sodium selenite were added to the solid medium , liquid fermentation medium and cultivation substrate , respectively. The tolerance to selenium under different culture conditions were compared , and selenium species in *P. eryngii* fruiting bodies were also detected. The results showed that selenium concentration , which was less than 160 mg/L , had no significant effect on the growth of mycelia under solid culture condition , while under the condition of liquid culture , 4 mg/L of selenium could significantly inhibit the growth of mycelium. In the cultivation mode , 10 ~ 600 mg/kg of selenium in the cultivation substrate did not affect the growth of mycelia , and the selenium content in the fruiting body increased with the increase of selenium concentration in the cultivation substrate. Selenium speciation analysis of fruiting bodies showed that selenium enriched was in the form of selenomethionine , methylselenocysteine , selenocystine and selenite , among which , selenomethionine was the main form of combination of selenium and amino acids.

Keywords: *Pleurotus eryngii*; selenium tolerance; selenium species; selenium amino acid