



富硒条件下蜜环菌菌株硒耐受性及胞外酶生物活性的研究

张彩妮¹, 邓百万^{1,2*}, 柏秋月¹, 解修超^{1,2}, 刘兰兰¹, 袁毓谦¹

1 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000

2 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000

张彩妮, 邓百万, 柏秋月, 解修超, 刘兰兰, 袁毓谦. 富硒条件下蜜环菌菌株硒耐受性及胞外酶生物活性的研究. 微生物学报, 2022, 62(2): 640–649.

Zhang Caini, Deng Baiwan, Bai Qiuyue, Xie Xiuchao, Liu Lanlan, Yuan Yuqian. Biological activity and selenium tolerance of *Armillaria mellea*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 640–649.

摘要:【目的】通过对蜜环菌(*Armillaria mellea*)的富硒驯化, 研究各菌株硒耐受性、有机硒含量及生物活性的变化规律, 从而获得生物活性更强的蜜环菌, 并对富硒蜜环菌的生物学特征进行初步研究。【方法】以 Na_2SeO_3 为无机硒试剂对蜜环菌进行富硒驯化; 采用氢化物原子荧光光谱法测定蜜环菌的硒含量, 热水浴法测定蜜环菌的无机硒含量; 根据形态学、生理生化特征筛选优良的蜜环菌菌株。【结果】蜜环菌对无机硒有较好的富集能力。菌株 J-234 对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 100 mg/L, 菌株 M-H 和 A-10 对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 60 mg/L, 菌株 YN-2 对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 20 mg/L。硒含量测定的结果表明, 菌株 J-234 硒含量为 8.378 1 $\mu\text{g/g}$, 菌株 M-H 硒含量为 7.249 4 $\mu\text{g/g}$, 菌株 A-10 硒含量为 1.926 9 $\mu\text{g/g}$, 菌株 YN-2 硒含量为 3.606 1 $\mu\text{g/g}$ 。富硒菌株 J-234 生物活性最强, 其木聚糖酶活力为 92 522.46 U/L, 淀粉酶活力为 11 951.49 U/L, 纤维素酶活力为 8 439.47 U/L, 漆酶活力为 1.25 U/L, 多肽含量为 0.087 g/L。【结论】外源硒的添加使蜜环菌的生物活性增强, 这为其他食药菌真菌富硒驯化研究提供了参考。

关键词: 蜜环菌; 富硒驯化; 硒含量; 胞外酶活性; 多肽含量

基金项目: 陕西省重点研发计划(2017ZDXM-NY-001)

Supported by the Shaanxi Science and Technology Research Project (2017ZDXM-NY-001)

*Corresponding author. E-mail: 2210309868@qq.com

Received: 15 May 2021; Revised: 20 August 2021; Published online: 9 October 2021

Biological activity and selenium tolerance of *Armillaria mellea*

ZHANG Caini¹, DENG Baiwan^{1,2*}, BAI Qiuyue¹, XIE Xiuchao^{1,2}, LIU Lanlan¹, YUAN Yuqian¹

1 School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, Shaanxi, China

2 Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Hanzhong 723000, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] We studied the selenium tolerance, organic selenium content, and biological characteristics of the domesticated *Armillaria mellea* strains, so as to screen out the strains with strong biological activity. [Methods] Na₂SeO₃ was used as the inorganic selenium reagent to domesticate *A. mellea*. The selenium content and inorganic selenium content of *A. mellea* was determined by hydride atomic fluorescence spectrometry and hot water bath extraction method, respectively. Excellent *A. mellea* strains were identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics. [Results] *A. mellea* showed a good ability to accumulate inorganic selenium. The tolerance thresholds of strains J-234, M-H, A-10, and YN-2 to Na₂SeO₃ were 100, 60, 60, 20 mg/L, respectively. The selenium content in strains J-234, M-H, A-10, and YN-2 was 8.378 1, 7.249 4, 1.926 9, 3.606 1 μg/g, respectively. Strain J-234 had the highest biological activity after domestication, with the xylanase activity of 92 522.46 U/L, amylase activity of 11 951.49 U/L, cellulase activity of 8 439.47 U/L, laccase activity of 1.25 U/L, and polypeptide content of 0.087 g/L. [Conclusion] The addition of exogenous selenium enhances the biological activity of *A. mellea*, and this finding provides reference for the selenium domestication of edible and medicinal fungi.

Keywords: *Armillaria mellea*; selenium domestication; selenium content; extracellular enzyme activity; polypeptide content

硒是人体必需的微量元素之一, 具有抗氧化、拮抗重金属、增强机体免疫力等生物学功能。我国硒资源分布不均, 2/3 的人口严重缺硒^[1], 而缺硒会引起克山病和大骨节病^[2]。近年来, 人们对健康生活的要求不断提高, 对富硒产品的需求也逐渐增加, 食用菌对无机硒有较强的富集能力且本身安全无毒^[3], 已成为目前研究的热点。

蜜环菌(*Armillaria mellea*)属于担子菌门(*Basidiomycota*)小皮伞科(*Marasmiusrotula*)蜜环菌属(*Armillariella*), 又称为榛蘑、蜜环蕈、栎蕈, 是我国珍稀的药食两用菌之一。其味道鲜美, 具有较高的营养价值和药理作用, 可治疗

神经衰弱^[4]、高血压^[5]、关节炎^[6]等疾病。蜜环菌是木腐菌, 其生长与胞外酶活性有着十分密切的关系^[7]。胞外酶可降解半纤维素、纤维素和木质素等来满足蜜环菌自身生长繁殖所需的营养^[8]。多肽是 α-氨基酸以肽链形式连接在一起而形成的化合物, 具有重要的生物学功能, 测定蜜环菌中多肽的含量是判定蜜环菌质量的重要检测标准之一^[9]。目前, 蜜环菌对无机硒的耐受能力、转化能力及生理生化的研究鲜少见报道, 因此有必要研究蜜环菌富硒特征及生物活性的变化, 为富硒蜜环菌的研究提供理论依据。本试验以 4 株生产中常用的蜜环菌为研究对象, 研究无机硒的添加量对蜜环菌生物学

特征的影响, 确定蜜环菌的硒耐受浓度及有机硒含量, 为富硒蜜环菌的研究及富硒食药食用菌食品的开发利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与培养基

供试菌株: 陕西省食药食用菌工程技术研究中心提供。

主要试剂: Na_2SeO_3 , 可溶性淀粉, 木聚糖, 羧甲基纤维素钠, DNS 试剂, 福林酚试剂, 硼氢化钠, 浓硫酸, 浓盐酸均为国产分析纯, 购于天津市盛奥化学试剂有限公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)为优级纯, 购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 硒标准液购于国家有色金属及电子材料分析测试中心。

CPDA 培养基组成成分(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 磷酸二氢钾 5, 硫酸镁 3, 蛋白胨 5, 琼脂 15, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然; 液体培养基组成成分(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 磷酸二氢钾 3, 硫酸镁 3, 蛋白胨 5, V_B 0.01, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 标准曲线的制备

将浓度不同的木聚糖溶液、葡萄糖溶液与 DNS 试剂反应, 在 530 nm 处测量吸光值, 绘制木聚糖、葡萄糖的标准曲线^[10]; 将不同浓度的牛血清白蛋白与碱性铜试剂反应, 在 650 nm 处测量吸光值, 绘制标准曲线^[11]。

1.3 菌株形态特征

无菌条件下活化 4 株蜜环菌, 每组 3 个重复。24 °C 暗培养 10 d, 间隔 2 d 观察记录菌丝、菌索形态特征。菌丝、菌索颜色记录以 5 d 内颜色不变时为准^[12]。

1.4 菌株 ITS 序列测序分析

对富硒驯化后的菌株进行 ITS 分子鉴定, 将 PCR 产物送至上海生工测序, 测序结果整理

后提交 NCBI 数据库, 利用 BLAST 进行序列比对, 下载相似序列后利用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.5 不同菌株的硒耐受性试验

采用浓度梯度法^[13]进行硒耐受性试验。在固体培养基中逐步增加 Na_2SeO_3 的含量, 设置 20、40、60、80、100、120、140、150 mg/L 的 Na_2SeO_3 浓度梯度(用直径为 0.45 μm 的滤膜过滤除菌), 将蜜环菌接种到 Na_2SeO_3 浓度为 20 mg/L 的固体培养基上, 24 °C 恒温培养 8–10 d 后再转接到浓度为 40 mg/L 的固体培养基上。按照此方法逐级驯化, 探究不同菌株对无机硒的耐受能力, 每个梯度重复 3 组。

1.6 硒蜜环菌液体培养

依据不同菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度, 取 1.00 cm^2 的菌索块转接到 150 mL 富硒液体培养基中, 于 24 °C、140 r/min 的恒温摇床暗培养 20 d, 重复 3 组, 以未富硒的蜜环菌作对照组, 每隔 5 d 测量其胞外酶活力。培养结束后用无菌纱布过滤菌丝体, 45 °C 烘干研磨成粉备用, 测定蜜环菌菌粉中硒含量及无机硒含量。

1.7 富硒条件下生物活性测定

1.7.1 胞外酶活性测定

试验选择漆酶、淀粉酶、木聚糖酶和纤维素酶为胞外酶的代表。每隔 5 d 在无菌工作台取 2 mL 发酵液, 取上清液 1 mL 稀释至 10 mL 作为粗酶液, 以灭活的粗酶液为对照组^[14]。

采用 ABTS 法测定漆酶活性^[15], 反应体系为 3.5 mL, 加入 1.0 mL 1 mmol/L ABTS, 1.5 mL 缓冲液, 1.0 mL 粗酶液, 25 °C 水浴 5 min, 记录 1 min 内 420 nm 处吸光度值的变化。一个酶活单位定义为, 反应体系中每分钟催化 1 μmol ABTS 氧化所需要的酶量(U/L)。采用 DNS 法测定纤维素酶活性、木聚糖酶活性和淀粉酶活性^[16–17], 底物浓度为 1%, 反应体系为 4.0 mL,

1.5 mL 1%的底物溶液, 1.0 mL 粗酶液, 50 °C 水浴 30 min, 加入 1.5 mL DNS 试剂, 煮沸 5 min, 于 530 nm 处测量吸光度。一个酶活单位定义为, 每分钟生成 1 μmol 葡萄糖、木聚糖所需要的酶量(U/L)。

1.7.2 酶活力计算

酶活力计算公式如下:

$$U_1 = \frac{10^6}{\varepsilon} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}}} \times \frac{\Delta OD}{\Delta t}, \quad U_2 = \frac{m}{M \times V_{\text{酶}} \times t}$$

公式中, ε 为 ABTS 吸光系数 3 600 L/(mol·cm); $V_{\text{酶}}$ 为加入粗酶液的体积 mL; $V_{\text{总}}$ 为反应体系的总体积; m 为根据标准曲线所得的质量 μg; M 为摩尔质量; t 为反应时间。漆酶活力用公式 (U_1), 其他酶活力用公式 (U_2) 计算。

1.7.3 标准曲线的绘制

葡萄糖标准曲线为: $Y=0.0698X-0.066$ ($R=0.9959$), 用于纤维素酶和淀粉酶的活性测定; 木聚糖标准曲线为: $Y=0.0912X-0.0814$ ($R=0.9932$), 用于木聚糖酶活性测定; 多肽标准曲线: $Y=0.0531X+0.0052$ ($R=0.9979$), 用于发酵液中多肽含量的测定。

1.7.4 多肽含量的测定

采用恒温摇床对富硒蜜环菌进行液体发酵培养。培养至第 10 天时, 取发酵液 1.0 mL, 加入 1.0 mL 的碱性铜试剂, 摇匀后室温放置 10 min,

加入福林酚试剂 4.0 mL (约稀释 16 倍), 摇匀后在 55 °C 水浴中保温 5 min, 冷却至室温后, 在 650 nm 下测定其吸光度^[18]。

2 结果与分析

2.1 富硒蜜环菌 DNA 碱基含量变化

将测定序列提交至 NCBI 数据库中, 对比分析菌株间 DNA 碱基含量的差异。结果显示, 蜜环菌 ITS 序列长度在 750–800 bp, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树。由图 1 可知, 4 株供试菌株聚为 2 类, 菌株 M-H 和 YN-2 属于 *Armillaria gallica*, 菌株 M-H 与参考序列 *Armillaria gallica* (KF032521) 聚为一支, 其自展支持率为 65%, 菌株 YN-2 与参考序列 *Armillaria gallica* (MW404994) 聚为一支, 其自展支持率为 70%; 菌株 J-234 和 A-10 属于 *Armillaria cepistipes*, 菌株 J-234 与参考序列 *Armillaria cepistipes* (AB510862) 聚为一支, 其自展支持率为 81%, 菌株 A-10 与参考序列 *Armillaria cepistipes* (KP162320) 聚为一支, 其自展支持率为 93%。

富硒蜜环菌 DNA 碱基含量与未富硒时相比存在差异(表 1)。菌株 M-H, 碱基 A 含量为 23.35%, 碱基 T 含量为 32.55%, 碱基 G 含量为

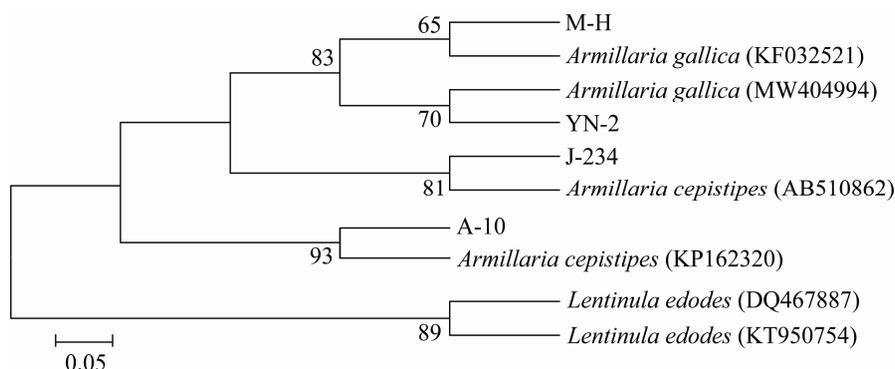


图 1 蜜环菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of *Armillaria mellea*.

表 1 DNA 碱基含量的变化

Table 1 Changes in DNA base content

Base content/%	Strains				Selenium-enriched strains			
	M-H	J-234	A-10	YN-2	M-H	J-234	A-10	YN-2
A	23.14	23.61	23.40	23.01	23.35	23.14	23.25	22.15
T	32.47	32.00	32.78	33.49	32.55	32.47	32.14	33.80
G	23.38	23.26	23.16	22.65	23.11	23.49	23.52	23.16
C	21.02	21.13	20.67	20.84	20.99	20.90	20.99	20.89
GC	44.39	44.39	44.82	43.49	44.10	44.19	44.51	44.05

23.11%，碱基 C 含量为 20.99%，GC 含量为 44.10%；菌株 J-234，碱基 A 含量为 23.14%，碱基 T 含量为 32.47%，碱基 G 含量为 23.49%，碱基 C 含量为 20.90%，GC 含量为 44.19%；菌株 A-10，碱基 A 含量为 23.25%，碱基 T 含量为 32.14%，碱基 G 含量为 23.52%，碱基 C 含量为 20.99%，GC 含量为 44.51%；菌株 YN-2，碱基 A 含量为 22.15%，碱基 T 含量为 33.80%，碱基 G 含量为 23.16%，碱基 C 含量为 20.89%，GC 含量为 44.05%。与未富硒蜜环菌相比，富硒后蜜环菌的 DNA 碱基含量、GC 含量有差异但差异不显著($P>0.05$)，说明无机硒的添加不影响蜜环菌基因的正常表达。

2.2 富硒蜜环菌的形态特征

富硒条件下蜜环菌的形态特征有明显差异。M-H 菌丝透明、浓密，菌索红棕色，呈扁平状，分支多，交织成网状；J-234 菌丝洁白、浓密，菌索红棕色，呈圆柱状，分支多，接菌处有少量色素沉淀；A-10 菌丝洁白、浓密，菌索白色，呈圆柱状，分支多；YN-2 菌丝洁白，稀疏，菌索红棕色，呈扁平状，分支较少。不同菌株在富硒条件下，菌索平均生长速度快慢为 J-234>YN-2>M-H>A-10，根据表 2 可知，J-234 菌株平均生长速度最快。这说明在富硒条件下蜜环菌生长速度快，菌索粗壮，多分枝，长势较好。

2.3 蜜环菌对硒的耐受性研究

图 2 可知，随着 Na_2SeO_3 浓度的升高，蜜

环菌的生长速度呈先增加后降低的趋势。低浓度下菌索生长速度较快，而高浓度下菌索生长速度受到抑制，说明硒浓度在一定程度上影响了蜜环菌的生长且不同菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度有差异。随着硒浓度的增加，蜜环菌生长速度逐渐缓慢下降，综合不同浓度下蜜环菌的生长状况，J-234 菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 100 mg/L，M-H 和 A-10 菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 60 mg/L，YN-2 菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度为 20 mg/L。

2.4 蜜环菌硒含量的测定

以硒标准溶液浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标绘制标准曲线(图 3)。根据各菌株对 Na_2SeO_3 的耐受浓度，液体发酵培养富硒蜜环菌 20 d，用 1.6 所示方法进行硒含量测定，有机硒含量=总硒含量-无机硒含量，结果见表 3。无机硒的添加使蜜环菌硒含量及有机硒含量呈增加趋势，相对于未富硒组而言，富硒蜜环菌的硒含量及有机硒含量均有所提高，说明无机硒的添加经过蜜环菌的生理代谢作用转化为了有机硒。硒含量测定的结果表明，菌株 J-234 硒含量为 8.378 1 $\mu\text{g/g}$ ，有机硒含量为 2.028 6 $\mu\text{g/g}$ ；菌株 M-H 硒含量为 7.249 4 $\mu\text{g/g}$ ，有机硒含量为 1.029 2 $\mu\text{g/g}$ ；菌株 A-10 硒含量为 1.926 9 $\mu\text{g/g}$ ，有机硒含量为 1.095 2 $\mu\text{g/g}$ ；菌株 YN-2 硒含量为 3.606 1 $\mu\text{g/g}$ ，有机硒含量为 0.948 8 $\mu\text{g/g}$ 。

表 2 不同蜜环菌菌株生长速度

Table 2 Growth rate of different *Armillaria mellea* strains

Strains	Germination time of rhizomorph/d	Culture time/d	Average growth rate/(cm/d)
M-H	4-5	10	0.15±0.018
J-234	4-5	10	0.21±0.037
A-10	5-6	11	0.12±0.011
YN-2	5-6	12	0.18±0.023

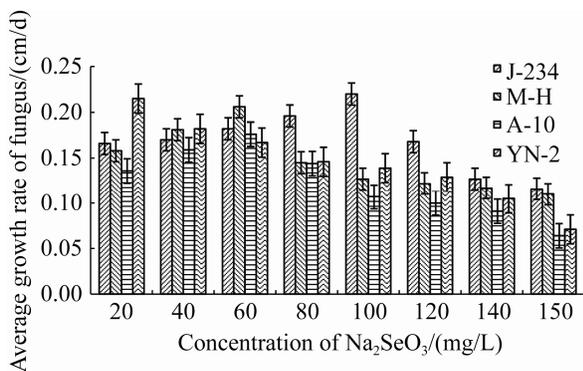
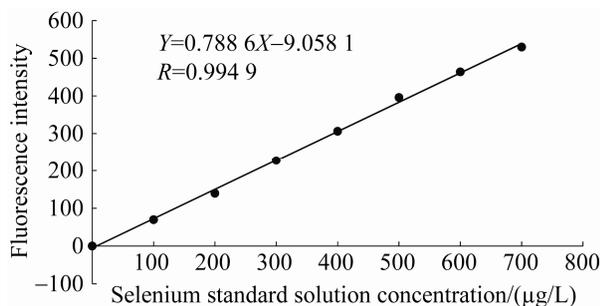
图 2 不同 Na₂SeO₃ 浓度下菌株的平均生长速度Figure 2 The average growth rate of strains under different concentration of Na₂SeO₃.

图 3 硒浓度标准曲线

Figure 3 Standard curve of selenium concentration.

2.5 胞外酶活力试验结果

2.5.1 对木聚糖酶活力的影响

蜜环菌菌株与富硒蜜环菌菌株, 其木聚糖酶活力变化大体一致, 均呈先上升后下降的趋势。但在富硒条件下, 菌株的酶活力均有所增强。整个培养期间, 木聚糖酶活力在第 10 天时

表 3 富硒前、后蜜环菌硒含量变化

Table 3 Changes of selenium content in *Armillaria mellea* before and after selenium enrichment

Strains	Total selenium content/(μg/g)	Inorganic selenium content/(μg/g)	Organic selenium content/(μg/g)
A-10	0.034 0	—	0.034 0
J-234	0.182 4	—	0.182 4
M-H	0.269 0	—	0.269 0
YN-2	0.003 5	—	0.003 5
F(A-10)	1.926 9	0.831 7	1.095 2
F(J-234)	8.378 1	6.349 5	2.028 6
F(M-H)	7.249 4	6.220 2	1.029 2
F(YN-2)	3.606 1	2.657 3	0.948 8

F: selenium-rich strains; —: do not contain inorganic selenium.

达到峰值, J-234 菌株酶活力为 81 411.16 U/L, J'菌株酶活力为 92 522.46 U/L, 菌株 J-234 和 J'酶活力显著高于其他 3 株菌($P<0.05$)。第 20 天时, 菌株 J-234 和 J'的酶活力分别为 33 897.85 U/L 和 35 162.89 U/L, 这表明菌株 J-234 能够表现出优良的性状(图 4)。试验结果证明富硒驯化使蜜环菌木聚糖酶活力升高, 硒的添加有利于蜜环菌对营养物质的吸收利用。

2.5.2 对淀粉酶酶活力的影响

如图 5 所示, 随着培养时间的增加, 淀粉酶活力呈先升高后降低的趋势。第 10 天时, 菌株酶活力达到峰值, 未富硒组酶活力最高的是 M-H 菌株, 酶活力为 8 541.60 U/L, 其次为 J-234 和 A-10 菌株, 酶活力最低的是菌株 YN-2, 为 3 689.34 U/L。富硒组酶活力最高的为 J'菌株, 其酶活力为 11 951.49 U/L, 此时 M'菌株的酶活力为 9 302.4 U/L, 说明未富硒组酶活力低于富硒组, 补硒可以提高蜜环菌的酶活力, 增强其对外界不良环境的抵抗力。

2.5.3 对纤维素酶活力的影响

如图 6 所示, 随着培养时间的增加, 纤维素酶活力的变化同淀粉酶变化规律相似。培养

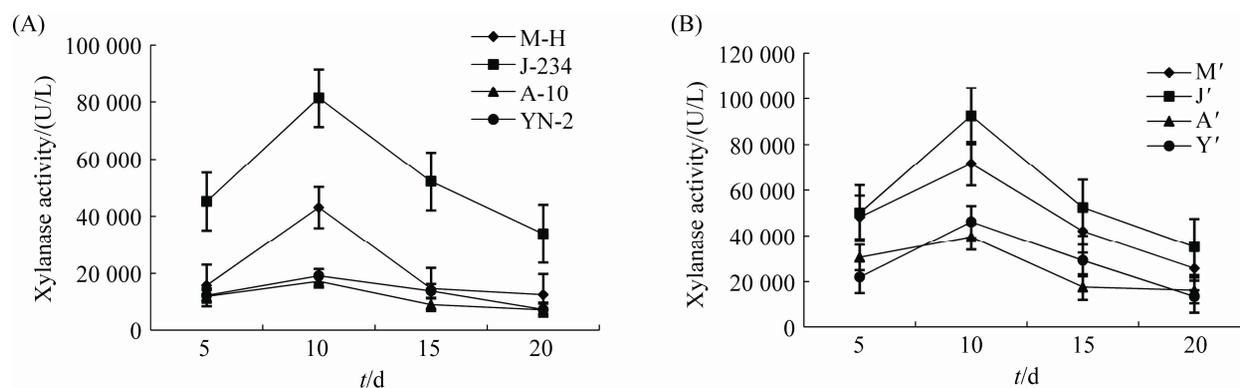


图 4 蜜环菌木聚糖酶活力变化

Figure 4 Changes in xylanase activity of *Armillaria mellea*. A: enzyme activity of *Armillaria mellea* before se-domestication; B: enzyme activity of *Armillaria mellea* after se-domestication. The same below.

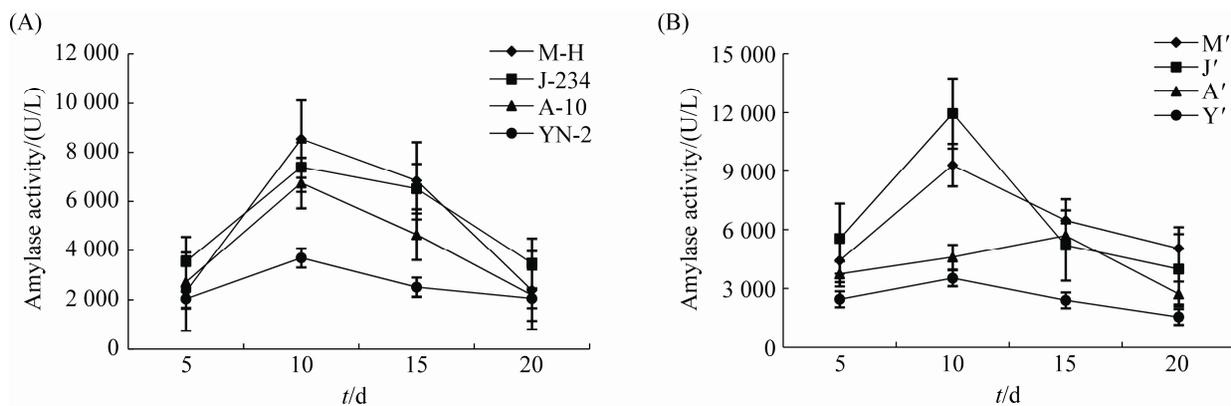


图 5 蜜环菌淀粉酶活力变化

Figure 5 Changes in amylase activity of *Armillaria mellea*.

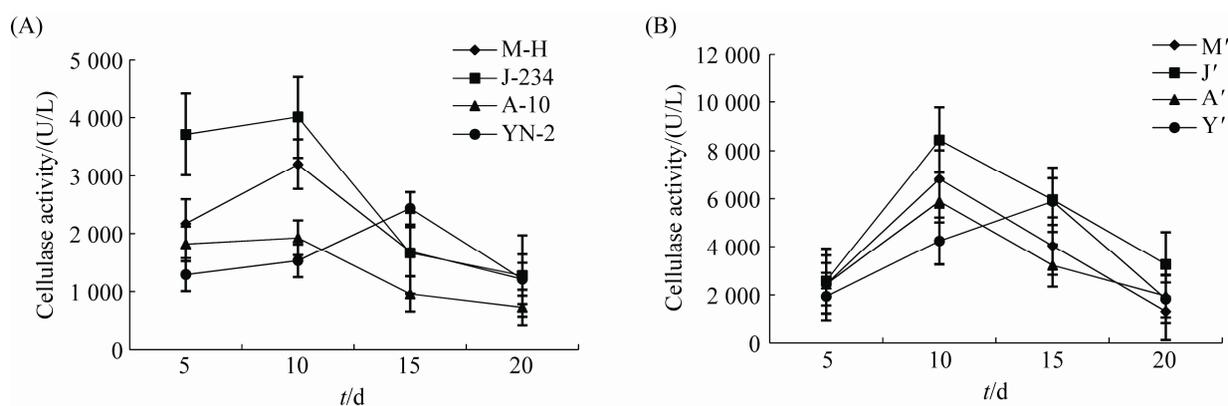


图 6 蜜环菌纤维素酶活力变化

Figure 6 Changes in cellulase activity of *Armillaria mellea*.

至第 10 天时,未富硒组菌株 M-H、J-234 和 A-10 酶活力达到生长时期的最高峰值,其中 J-234 菌株酶活力最高,为 4 012.19 U/L。同一时期富硒组 J'菌株酶活力达到 8 439.47 U/L,是 J-234 菌株酶活力的 2.1 倍。而未富硒组 YN-2 菌株和富硒组 Y'菌株的酶活力则是在第 15 天时达到峰值,其酶活力分别为 2 438.26、5 884.69 U/L, Y'菌株的酶活力是 YN-2 菌株的 2.4 倍,说明硒浓度对酶活力有促进作用,使纤维素酶活力增强。

2.5.4 对漆酶活力的影响

在整个培养过程中,漆酶活力的变化规律同纤维素酶活力的变化规律相似。第 10 天时,未富硒组 M-H、A-10 和 YN-2 菌株酶活力达到最高值,其中 A-10 菌株的酶活力最高,为 0.81 U/L (图 7)。同一时期,菌株 J'、A'和 Y'酶活力也达到最高值,其中 Y'菌株漆酶活力最高,为 1.72 U/L,是未富硒组 YN-2 菌株的 2.1 倍。未富硒组 M-H 和 J'菌株在第 15 天时酶活力达到峰值,其漆酶活力分别为 0.53 U/L 和 1.25 U/L, J'菌株酶活力比未富硒组 A-10 菌株高 64.80%,说明富硒驯化可有效促进菌株对木质素的分解能力。

2.6 富硒蜜环菌多肽含量的测定

采用恒温摇床对富硒蜜环菌进行液体发酵培养,培养至第 10 天时,取发酵液 1.0 mL,按 1.3.4 所示方法测定多肽的含量,结果如图 8 所示。由图 8 可知,未富硒组的菌株多肽含量明显低于富硒组,通过对富硒组数据进行 SPSS 数据分析可得,富硒组多肽含量比未富硒组的多肽含量有显著性差异($P<0.05$)但富硒组之间不存在显著差异,说明富硒条件对多肽含量的增强有一定的促进作用。未富硒组其多肽含量的平均值为 0.046 g/L,富硒组菌株的多肽含量平均值为 0.081 g/L,其中 J-234 菌株所含多肽含量最高,为 0.087 g/L。

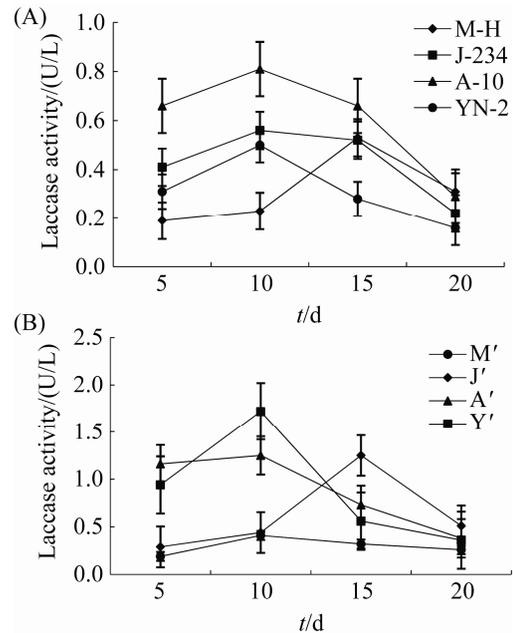


图 7 蜜环菌漆酶活力变化

Figure 7 Changes in laccase activity of *Armillaria mellea*.

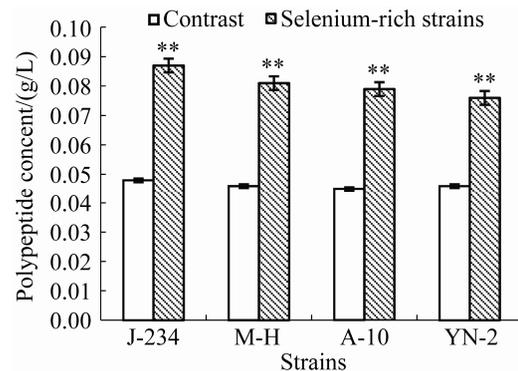


图 8 蜜环菌发酵物中的多肽含量

Figure 8 Polypeptide content in *Armillaria mellea* fermentation. **: selenium-rich *Armillaria mellea* polypeptide content is significant.

3 讨论与结论

刘晓敏等^[19]研究发现,漆酶可降解木质素、酚类物质,其活性可对蜜环菌对木质素的降解能力产生影响,纤维素酶水解纤维素产生葡萄糖为蜜环菌的生长提供碳源,木聚糖酶分解植

物次生壁的多糖结构木聚糖, 淀粉酶水解植物多糖淀粉为蜜环菌生长提供营养, 胞外酶活性与蜜环菌的生长发育密切相关。黄万兵等^[20]研究发现, 酶活力大小在同一时期存在明显差异, 蜜环菌生长速度与酶活力关系重大。本试验研究富硒条件下蜜环菌对硒的耐受性及富硒蜜环菌生物学特征的变化, 结果显示富硒蜜环菌菌索分支多、粗壮, 生长速度加快, 菌株间 GC 含量差异不显著, DNA 碱基含量有差异, 但差异不显著($P>0.05$), 这说明富硒环境可能对蜜环菌生理活性有一定的影响但不影响蜜环菌基因的表达。

富硒蜜环菌胞外酶的活力均高于未富硒组, 胞外酶活力的变化总体呈现“低-高-低”的形式, 其变化规律与曾春函等^[21]的研究相似, 且不同菌株之间的胞外酶活性不同, 存在种间差异。本研究发现硒的添加可促进胞外酶活性的增强, 其中富硒菌株 J-234 胞外酶活力最强, 木聚糖酶活力最高为 92 522.46 U/L, 是 A-10 菌株木聚糖酶活力的 2.3 倍, 淀粉酶活力最高为 11 951.49 U/L, 纤维素酶活力最高为 8 439.47 U/L, 漆酶活力最高为 1.25 U/L, 这说明硒的添加有利于菌株对营养物质的分解速度及营养物质的积累。多肽是人体重要的生理调节物, 可全面调节人体生理功能, 对增强人体生理活性具有重要的生物学功能^[22], 蜜环菌多肽含量的测定结果表明, 富硒组蜜环菌多肽含量显著高于未富硒组, 说明富硒驯化对蜜环菌的生长发育及生物活性的增强有促进作用, 硒的添加在一定程度上增强了蜜环菌的优势。

蜜环菌对无机硒有较好的转化能力, 富硒条件可促进蜜环菌的生长发育, 增强其生理活性。但不同蜜环菌菌株对硒的耐受浓度及有机硒含量不同, 综合实验结果发现, J-234 菌株在富硒条件下对硒的耐受性较强、有机硒含量高

及胞外酶活力较强, 在富硒食用菌的开发和利用上值得进一步研究。

参考文献

- [1] 王立平, 唐德剑, 沈亚美, 曾曼琳. 硒的营养缺乏现状及补充方式. *食品工业*, 2020, 41(1): 339–343.
Wang LP, Tang DJ, Shen YM, Zeng ML. The status quo of nutrient deficiency and supplementation methods of selenium. *The Food Industry*, 2020, 41(1): 339–343. (in Chinese)
- [2] 陈志杰, 袁书林. 食(药)用真菌富硒及产品开发研究进展. *中国食用菌*, 2009, 28(6): 9–11, 22.
Chen ZJ, Yuan SL. Research progress on selenium enrichment and product development of edible and medicinal fungi. *Edible Fungi of China*, 2009, 28(6): 9–11, 22. (in Chinese)
- [3] 刘书畅, 马布平, 周忠发, 杨林雷, 李荣春. 富硒食用菌的研究进展. *食药用菌*, 2018, 26(2): 74–78.
Liu SC, Ma BP, Zhou ZF, Yang LL, Li RC. Research progress of selenium-enriched edible mushrooms. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2018, 26(2): 74–78. (in Chinese)
- [4] 杨淑云, 林远崇, 羿红, 王琛, 杨永彬, 兰家细. 珍稀食药用菌——蜜环菌的开发与应用. *生物学杂志*, 2007, 24(3): 52–54.
Yang SY, Lin YC, Yi H, Wang C, Yang YB, Lan JX. Research progress of *Armillariella mellea*, a rare edible and medicinal fungus. *Journal of Biology*, 2007, 24(3): 52–54. (in Chinese)
- [5] 赵金芬. 复方天麻蜜环糖肽片的临床应用. *湖南中医药大学学报*, 2009, 29(8): 33–34, 76.
Zhao JF. The clinical application of compound *Armillaria Mellea* polysaccharide and polypeptide tablets. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*, 2009, 29(8): 33–34, 76. (in Chinese)
- [6] 鲍佳音, 包海鹰, 杨树东, 王辉. 蜜环菌提取物对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用. *菌物学报*, 2019, 38(7): 1173–1184.
Bao JY, Bao HY, Yang SD, Wang H. Therapeutic effects of *Armillaria mellea* extract on adjuvant arthritis rats. *Mycosystema*, 2019, 38(7): 1173–1184. (in Chinese)
- [7] 余晨晨. 蜜环菌发酵产物有效成分的分离鉴定与活性研究. 河南大学硕士学位论文, 2011.
- [8] 黄敬, 倪方慧. 福林酚法测定软胶囊中肽含量. *江西医学检验*, 2004, 22(3): 260–266.
Huang J, Ni FH. Determination of peptide content in

- soft capsules by folin-phenol method. *Jiangxi Journal of Medical Laboratory Sciences*, 2004, 22(3): 260–266. (in Chinese)
- [9] 刘晓敏, 陈向东, 张薇薇, 王忠巧, 宋明海, 兰进, 马琳. 不同蜜环菌菌株的鉴定及胞外酶活性研究. *中国农学通报*, 2020, 36(24): 99–106.
Liu XM, Chen XD, Zhang WW, Wang ZQ, Song MH, Lan J, Ma L. Identification of different *Armillaria* spp. strains and extracellular enzyme activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(24): 99–106. (in Chinese)
- [10] WS-10001-(HD-1224)-2002, 天麻蜜环菌粉标准. 太原: 山西省药品检验所, 2002.
WS-10001-(HD-1224)-2002. Standard for *Armillaria elata* powder. Shanxi Provincial Institute for Drug Control, in Taiyuan. (in Chinese)
- [11] 杨海旭. 秦巴山区天麻共生蜜环菌遗传多样性研究及优良菌种的选育. 陕西理工学院硕士学位论文, 2016.
- [12] 邹艳, 李俊杰, 夏诗棋, 管斌, 孔青. 高生物量富硒产阮假丝酵母菌株的选育. *中国酿造*, 2017, 36(5): 85–89.
Zou Y, Li JJ, Xia SQ, Guan B, Kong Q. Screening of high-biomass and selenium-enriched *Candida utilis*. *China Brewing*, 2017, 36(5): 85–89. (in Chinese)
- [13] 杨梅, 桂阳, 黄万兵, 杨静, 朱国胜, 刘朝贵. 蜜环菌栽培培养基筛选及胞外酶活性测定. *贵州农业科学*, 2015, 43(4): 20–24.
Yang M, Gui Y, Huang WB, Yang J, Zhu GS, Liu CG. Medium selection for *Armillaria mellea* and extracellular enzyme activity determination. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2015, 43(4): 20–24. (in Chinese)
- [14] 曾荣鉴. 碳源和氮源对平菇菌丝胞外酶的诱导作用. *食用菌*, 1992, 14(1): 17–18.
Zeng RJ. Induction of carbon source and nitrogen source on extracellular enzymes of *Pleurotus ostreatus*. *Edible Fungi*, 1992, 14(1): 17–18. (in Chinese)
- [15] 王玉万, 王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化. *微生物学通报*, 1989, 16(3): 137–140, 187.
Wang YW, Wang Y. Degradation of lignocellulose and changes in the activities of several polysaccharide decomposing enzymes during the cultivation process. *Microbiology China*, 1989, 16(3): 137–140, 187. (in Chinese)
- [16] 任鹏飞, 任海霞, 曲玲, 姚强, 李瑾, 宫志远. 香菇胞外酶活性变化及其与农艺性状的相关性分析. *山东农业科学*, 2010, 42(12): 11–14.
Ren PF, Ren HX, Qu L, Yao Q, Li J, Gong ZY. Activity variation of extracellular enzymes in *Lentinus edodes* and their correlation with agronomy characters. *Shandong Agricultural Sciences*, 2010, 42(12): 11–14. (in Chinese)
- [17] 杨梅. 猪苓三级菌种培养特性研究. 西南大学硕士学位论文, 2015.
- [18] 邵伟, 乐超银, 宋丽艳, 施永华. 大豆多肽发酵液中多肽测定方法的研究. *中国酿造*, 2007, 26(5): 71–73.
Shao W, Yue CY, Song LY, Shi YH. Study on simple detection method for peptide in zymotic fluid. *China Brewing*, 2007, 26(5): 71–73. (in Chinese)
- [19] 刘晓敏. 天麻共生蜜环菌特性及继代培养研究. 天津中医药大学硕士学位论文, 2020.
- [20] 黄万兵, 桂阳, 龚光禄, 杨通静, 刘朝贵, 朱国胜. 七株贵州蜜环菌胞内多糖得率及胞外酶活性研究. *北方园艺*, 2016(2): 134–138.
Huang WB, Gui Y, Gong GL, Yang TJ, Liu CG, Zhu GS. Research on intracellular polysaccharide yield and extracellular enzyme activity change of *Armillaria* strains isolated from Guizhou. *Northern Horticulture*, 2016(2): 134–138. (in Chinese)
- [21] 曾春函, 王传华. 我国主要蜜环菌生物种胞外酶活性对温度的种特异性响应. *菌物学报*, 2019, 38(2): 195–209.
Zeng CH, Wang CH. Specificity response of extracellular enzyme activities to temperature of eight *Armillaria* species in China. *Mycosystema*, 2019, 38(2): 195–209. (in Chinese)
- [22] 唐传核, 彭志英. 功能性食品基料蛋白质及多肽类开发现状. *粮食与油脂*, 2001, 14(1): 39–41.
Tang CH, Peng ZY. The development status of functional food base protein and peptides. *Journal of Cereals & Oils*, 2001, 14(1): 39–41. (in Chinese)

(本文责编 李磊)