

汤葆莎, 吴俐, 翁敏劼, 等. 杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的培养基优化 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (6): 728-734.

TANG B S, WU L, WENG M J, et al. Optimization of medium for biosynthesis of ergothioneine by submerged fermentation of *Pleurotus eryngii* 528 [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (6): 728-734.

杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的培养基优化

汤葆莎^{1,2}, 吴俐^{1,2}, 翁敏劼^{1,2}, 赖谱富^{1,2}, 李怡彬^{1,2*}

[1. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农产品(食品)加工重点实验室, 福建 福州 350003]

摘要:【目的】为提高杏鲍菇 528 发酵物的麦角硫因含量, 筛选杏鲍菇 528 培养的营养配方, 以期开发高含量的麦角硫因杏鲍菇深层液体发酵物提供理论基础。【方法】以固体培养菌丝生长速度和菌丝形态探讨杏鲍菇 528 菌丝生长的适宜碳氮源; 采用单因素试验, 以发酵物干重、沉淀物情况和初始 pH 值为指标, 研究杏鲍菇 528 液体深层发酵菌丝生长的营养配方, 探究不同氨基酸对深层液体培养发酵物麦角硫因含量的影响; 最后通过 $L_9(3^4)$ 正交试验分析提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因含量的深层发酵培养基配方。【结果】杏鲍菇 528 固体培养菌丝生长的适宜碳、氮源分别为玉米糝粉和蛋白胨; 在杏鲍菇 528 液体发酵培养中, 玉米糝粉 2.0% 和蛋白胨 2.0% 组合碳氮源培养基液体培养的发酵物干重值达 $33.30 \pm 0.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著高于其他浓度比例的碳氮源组合, 且沉淀物情况和初始 pH 更适宜杏鲍菇 528 液体培养; 天冬氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸这 5 种氨基酸均可明显提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因产率, 其中组氨酸诱导培养的杏鲍菇液体发酵物中麦角硫因含量最高, 是对照组的 3.73 倍, 且明显高于其他氨基酸。【结论】杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的最佳培养基配方为: 玉米糝粉 2.0%、蛋白胨 1.5%、组氨酸 0.15%、麦麸细粉 1.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、谷氨酸 0.1% 和维生素 B_6 0.1%, 在此条件下, 杏鲍菇发酵物麦角硫因含量达 $20.50 \pm 1.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 杏鲍菇 528; 液体发酵; 麦角硫因; 组氨酸

中图分类号: S 646.1+4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 06-0728-07

Optimization of medium for biosynthesis of ergothioneine by submerged fermentation of *Pleurotus eryngii* 528

TANG Baosha^{1,2}, WU Li^{1,2}, WENG Minjie^{1,2}, LAI Pufu^{1,2}, LI Yibin^{1,2*}

[1. Institute of Agri-engineering Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China;

2. Fujian Key Laboratory of Agricultural Product (Food) Processing, Fuzhou, Fujian 350003, China]

Abstract: 【Objective】In order to increase the ergothioneine content of *Pleurotus eryngii* 528 fermented products, the nutritional formula of *Pleurotus eryngii* 528 was screened to provide a theoretical basis for the development of high content of ergothioneine in submerged fermentation of *Pleurotus eryngii*. 【Method】The suitable carbon and nitrogen sources for *Pleurotus eryngii* 528 mycelium growth were discussed based on the solid culture mycelium growth rate and mycelium morphology. A single factor test was conducted to study the nutritional formula of mycelium growth in *Pleurotus eryngii* 528 submerged fermentation, with the indexes of the dry weight of the fermented product, the sedimentation and the initial pH value of the medium. The effects of different amino acids on ergothioneine content in submerged fermentation broth were investigated. Finally, $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to analyze the formula of submerged fermentation medium for increasing ergothioneine content in *Pleurotus eryngii* 528. 【Result】Corn grits and peptone were the suitable carbon and nitrogen sources for the growth of *Pleurotus eryngii* 528. In the liquid fermentation of *Pleurotus eryngii* 528, the dry weight of the fermentation product in the liquid culture medium of corn grits powder 2.0% and peptone 2.0% reached $33.30 \pm 0.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which was significantly higher than that of other carbon and nitrogen source combinations, and the sediment condition and

收稿日期: 2020-05-20 初稿; 2021-06-23 修改稿

作者简介: 汤葆莎 (1971-), 女, 硕士, 高级农艺师, 研究方向: 农产品加工技术及食用菌栽培研究 (E-mail: tbsty@126.com)

* 通信作者: 李怡彬 (1981-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品科学与工程 (E-mail: lyb9951@163.com)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0400200); 福建省科技计划公益类专项 (2019R1032-11); 福建省农业科学院对外合作项目 (DEC201821204); 福建省农业科学院创新团队建设项目 (STIT2017-3-5、STIT2017-1-10)

initial pH value were more suitable for *Pleurotus eryngii* 528 liquid culture. Aspartic acid, cysteine, histidine, arginine and glutamic acid improved significantly the ergothioneine yield of *Pleurotus eryngii* 528 fermented product. The content of ergothioneine in the liquid fermentation of *Pleurotus eryngii* induced by histidine was the highest, which was 3.73 times of the control group, and was significantly higher than other amino acids. 【Conclusion】 The optimum medium formula of ergothioneine biosynthesis by submerged fermentation of *Pleurotus eryngii* 528 was as follows: corn grits 2.0%, peptone 1.5%, histidine 0.15%, wheat bran powder 1.0%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.1%, glutamic acid 0.1% and vitamin B6 0.1%. Under these conditions, the content of ergothioneine in *Pleurotus eryngii* fermentation reached $20.50 \pm 1.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *Pleurotus eryngii* 528; liquid fermentation; ergothioneine; histidine

0 引言

【研究意义】麦角硫因 (L-Ergothioneine, EGT) 是自然界存在的一种小分子含硫化合物, 也是一种结构及功能独特的天然稀有手性氨基酸。该化合物最初在麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 中被发现, 作为细胞生理保护剂在人体内对细胞有高度保护作用, 有清除自由基、解毒、维持 DNA 生物合成和细胞正常生长等多种生理功能^[1-3], 在食品、医药和化妆品等行业具有广泛的应用前景。利用食用菌液体深层发酵生产麦角硫因, 具有生产成本低、易于工业化连续生产、产品安全等优点, 是生物合成麦角硫因的发展方向。【前人研究进展】食用菌中含有 EGT 且可用不同制备方法获取已被学者证实。BAO HND 等^[4]从金针菇 (*Flammulina velutipes*) 子实体中提取到 EGT, NANCY J D^[5]从固态发酵培养的双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 菌丝体中提取到 EGT, TEPWONG P 等^[6]从液体发酵培养的香菇 (*Lentinus edodes*) 菌丝体中提取到 EGT。STAMPFLI A R 等^[7]、刘琦等^[8]和 VALACHOVÁ K 等^[9]通过对 EGT 不同制备方法比较后指出, 生物发酵合成是低成本、规模化生产 EGT 的主要模式, 利用食用菌菌丝体液体发酵制备 EGT 是种较好的产业化生产方式, 但仍有必要进一步研究如何提高食用菌菌丝体深层发酵液中的 EGT 含量。为此, 众多学者尝试通过对食用菌深层发酵过程中的营养代谢调控研究来提高其发酵物 EGT 产率。TEPWONG P 等^[10]研究了香菇菌丝体深层发酵液中添加不同碳源对菌丝体 EGT 含量的影响, 结果表明果糖可显著提高其菌丝体中的 EGT 含量; LEE W Y 等^[11]研究了紫黑灵芝 (*Ganoderma neo-japonicum*) 菌丝体深层发酵液中添加不同氨基酸对菌丝体 EGT 含量的影响, 结果表明蛋氨酸 (Met) 或半胱氨酸 (Cys) 可显著提高其菌丝体 EGT 含量。研究证实, 人们可以通过调控食用菌菌丝体深层发酵液中的碳氮源、氨基酸种类来影响微生物发酵过程中的 EGT 含量。杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*) 是集食用、药用于一体的食用菌, 研究证实通过深层发酵培养获得的菌丝体, 其营养价值与室内菌袋层架栽培的子实体相

当^[12-13], 但其中的 EGT 含量仍处在较低水平^[10]。为有效提高杏鲍菇深层发酵液中的 EGT 含量, 有必要通过碳氮源、氨基酸等营养控制手段来调控微生物发酵过程以提高 EGT 产量。近年来, LINS D 等^[14]在研究杏鲍菇菌丝体深层发酵液的品质特性时发现, 杏鲍菇菌丝体及发酵液中均含有一定量的 EGT, 进而提出需进行发酵产物全利用以提高杏鲍菇深层发酵 EGT 产率。【本研究切入点】但基于提高杏鲍菇深层发酵液中 EGT 产率的培养配方鲜见报道。【拟解决的关键问题】因此, 本文以提高杏鲍菇 528 深层发酵物中 EGT 含量为指标, 研究不同碳氮源对杏鲍菇 528 固体培养平皿菌丝生长的影响, 探讨玉米糝粉和蛋白胨对杏鲍菇 528 深层发酵菌丝生长的影响, 再比较分析不同氨基酸对杏鲍菇 528 液体培养发酵物麦角硫因含量的影响, 最后依据 EGT 含量来设计提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因含量的深层发酵营养配方, 以解决目前杏鲍菇深层发酵菌丝体 EGT 含量偏低的问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杏鲍菇 528 菌种为福建省农业科学院食用菌研究所提供。试验所需的碳氮源、氨基酸以及其他试剂均购于试剂公司, 化学试剂均为分析纯。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 发酵物干重检测 采用真空冷冻干燥法, 设置干燥流程为: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h、 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至样品完成干燥。具体操作方法为: 将试验结束后的样品-发酵物倒于可供冷冻干燥的器皿中, 置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷 5~10 h 后, 于真空冷冻干燥机 (SCIENTZ-30ND, 宁波新芝生物科技股份有限公司) 中冷冻干燥 24 h, 取出已干燥的发酵物置于干燥皿中, 使用电子天平称量并记录后, 分装于样品袋内。

1.2.2 麦角硫因含量检测 参考姜文侠^[15]的方法进行检测, 检测仪器为 Waters e2695 型高效液相色谱仪。

色谱分析条件: Sunfire C18 $150 \times 4.6 \text{ mm}$ $3.5 \mu\text{m}$ 液相色谱柱; 流动相为乙腈-水 (3:97); 流速 1.0

mL·min⁻¹；柱温 30 ℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。

标准品溶液配制：配制不同浓度（0.1 μg·mL⁻¹、1.0 μg·mL⁻¹、5.0 μg·mL⁻¹、10.0 μg·mL⁻¹、15.0 μg·mL⁻¹和 20.0 μg·mL⁻¹）的标准品稀释液，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取滤液进样检测并绘制标准曲线。

供试品溶液配制：称取粉碎后的冻干杏鲍菇 528 发酵物样品 0.5 g，加入甲醇 10 mL，搅拌均匀后用数控超声波清洗器（KQ-600DV，昆山市超声仪器有限公司）超声处理 20 min，中性滤纸过滤后用针筒吸取上清液 1 mL，再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液即为供试品溶液。上机检测麦角硫因含量。

1.3 试验设计

1.3.1 杏鲍菇 528 菌丝生长碳氮源的筛选 为了解杏鲍菇 528 菌丝生长习性，试验以固体平皿培养的方式进行菌丝生长的适宜碳氮源筛选。固体平皿培养的基础培养基为：马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%（PDA 培养基），选取：葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和玉米糝粉作为待筛选碳源，玉米浆、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏作为待筛选氮源，培养基中各筛选碳氮源的比例皆为 2%。培养基配制好后，于 121 ℃ 高压灭菌 20 min，待培养基冷却至 50 ℃ 左右，将培养基倒入 90 mm 平皿中，每个处理设计 3 次重复。培养基冷却凝固后接入直径 4~5 mm 的杏鲍菇 528 菌块，置于 25 ℃ 培养箱内遮光培养 9 d。菌丝萌发 2 d 后，开始观察菌丝生长情况，采用十字交叉法，每天测量菌落直径，以菌丝长满平皿的时间和菌丝形态来综合判断杏鲍菇 528 固体培养菌丝生长的适宜碳氮源。

1.3.2 杏鲍菇 528 深层发酵培养碳氮源比例的筛选 根据 1.3.1 确定的最佳碳氮源，来设计杏鲍菇 528 深层发酵培养配方，碳氮源的比例均定为 1.0%、2.0%、3.0%，配方其他成分为：麦麸细粉 1.0%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.1%、谷氨酸 0.1% 和维生素 B₆ 0.1%，每处理设置 3 次重复。配制后培养液于烧杯中观察沉淀物情况，沉淀物情况以“+”表示（“+”越多表示沉淀物情况越严重），再检测初始 pH 值；将培养液分装于 250 mL 三角瓶中（100 mL/瓶，加玻璃珠 5 粒/瓶），121 ℃ 灭菌 20 min 后待培养基冷却至常温，每个三角瓶接入 5 片直径为 8 mm 的杏鲍菇 528 菌块，置于 25 ℃、180 rpm 恒温振荡培养箱中遮光培养 7 d 停止试验，取出气生菌丝和玻璃珠，按 1.2.1 方法检测其发酵物干重。最终根据发酵物干重、沉淀物情况和初始 pH 值，来筛选适宜杏鲍菇 528 深层发酵培养的初始配方。

1.3.3 不同氨基酸对杏鲍菇 528 液体培养发酵物麦角硫因含量的影响 在 1.3.2 确定的深层发酵培养初始配方中分别添加 0.15% 浓度的待筛选氨基酸：天冬氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸，每个处理 3 次重复。将培养液分装于 250 mL 三角瓶中（100 mL/瓶，加玻璃珠 5 粒/瓶），121 ℃ 灭菌 20 min 后待培养基冷却至常温，每瓶接入 10 mL 的杏鲍菇 528 液体母种，置于 25 ℃、180 rpm 恒温振荡培养箱中遮光培养 7 d 停止试验，取出气生菌丝和玻璃珠，将发酵物按 1.2.1 方法真空冷冻干燥，冻干后按 1.2.2 方法检测每个处理重复的混合样本中的麦角硫因含量，根据发酵物干重和检测出的麦角硫因含量来筛选有助于提高杏鲍菇发酵物麦角硫因含量的氨基酸。

1.3.4 提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因含量发酵配方的正交试验设计 根据固体培养的碳氮源及液体培养的氨基酸筛选试验结果，提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因含量的发酵配方设计采用三因素三水平的正交试验，以麦角硫因含量作为考察指标，按照 L₉（3⁴）正交表安排试验，因素水平如表 1 所示。250 mL 三角瓶装液量为 100 mL，加玻璃珠 5 粒/瓶，121 ℃ 灭菌 20 min 后待培养基冷却至常温。每瓶接入杏鲍菇 528 液体母种 10 mL，置于 25 ℃、180 rpm 恒温振荡培养箱中遮光培养 7 d 停止试验，取出气生菌丝和玻璃珠，按 1.2.1 方法将发酵物真空冷冻干燥，冻干后将每个处理重复样本混匀并按 1.2.2 方法检测其麦角硫因含量。采用正交设计助手 LATIN 3.1 对 L₉（3⁴）正交试验结果进行分析，以确定提高杏鲍菇发酵物麦角硫因含量的发酵配方。

表 1 正交试验设计因素及水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental design

水平 Level	因素 Factor%		
	玉米糝粉 Corngrits A	蛋白胨 Peptone B	组氨酸 Histidine C
1	1.5	1.5	0.10
2	2.0	2.0	0.15
3	2.5	2.5	0.20

2 结果与分析

2.1 不同碳氮源培养基对杏鲍菇 528 菌丝生长的影响

从图 1 菌丝生长态势和图 2-A 菌丝生长速率变化可以看出，杏鲍菇 528 菌丝在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和玉米糝粉这 5 种碳源制作的 PDA 平板培

培养基都可以生长，但菌丝生长情况存在差异，这表明杏鲍菇 528 菌株对碳源的利用有选择性。试验结果表明，在 25 ℃ 培养箱内遮光培养且其他培养条件不变时，玉米糝粉培养基中杏鲍菇菌丝生长态势最强，生长速率最快，菌丝整齐均匀、洁白浓密，到第 9 d 菌丝基本达满皿水平；蔗糖培养基次之，菌丝

长满平皿的 80% (7.2 cm)；麦芽糖和葡萄糖培养基的菌丝也较洁白浓密，菌丝达满皿的 70%~80%；乳糖培养基的菌丝虽浓白，但生长态势最弱，生长速度最慢，到第 9 d 菌丝才达其他处理组一半的水平。因此，其他培养条件不变时，适宜杏鲍菇 528 菌丝生长的碳源为玉米糝粉。

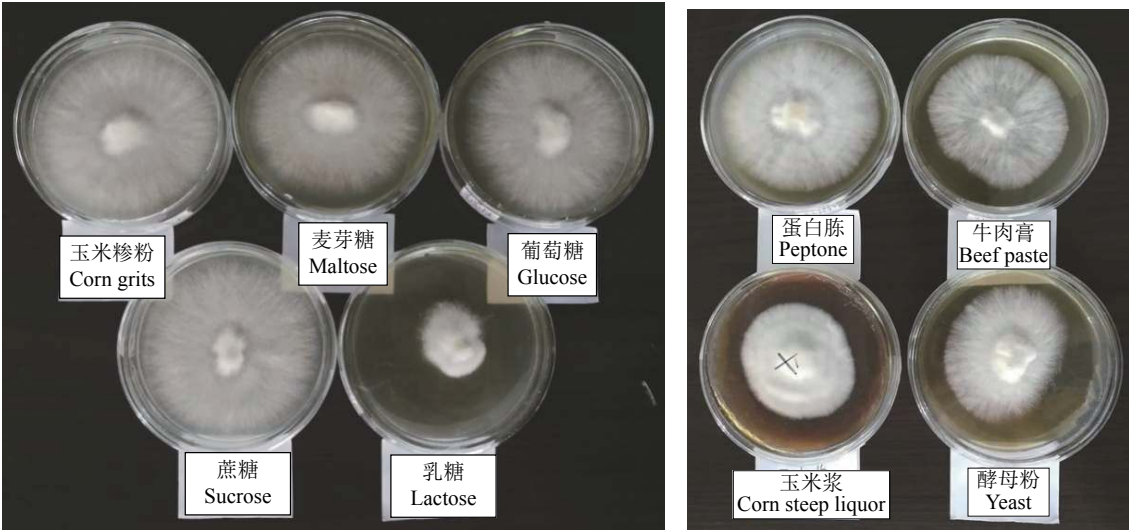


图 1 不同碳、氮源培养基对杏鲍菇 528 菌丝生长的影响 (第 9 d, 左为碳源, 右为氮源)

Fig. 1 Effects of different carbon and nitrogen source culture media on mycelial growth of *Pleurotus eryngii* 528 (At 9th day, left as carbon sources, right as nitrogen sources)

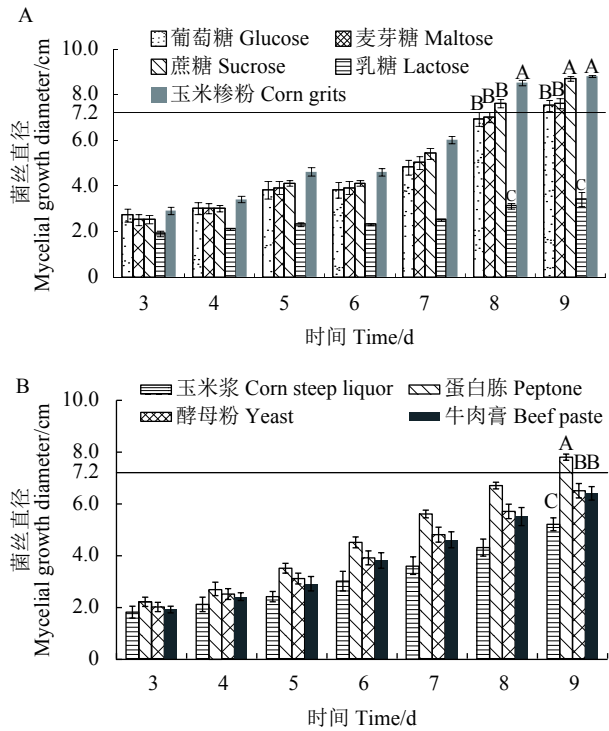


图 2 不同碳、氮源培养基杏鲍菇 528 菌丝生长速率变化 (A 为碳源, B 为氮源)

Fig. 2 Variation of mycelial growth rate of *Pleurotus eryngii* 528 with different carbon and nitrogen sources (A is carbon sources, B is nitrogen sources)

由图 1 和图 2-B 可知，杏鲍菇 528 菌丝在添加不同添加氮源的 PDA 平板培养基上也均能生长，但长势存在差异，按菌丝总体生长态势由好到差排序为：蛋白胨>牛肉膏~酵母粉>玉米浆。蛋白胨培养基上的杏鲍菇菌丝生长最快，且旺盛、整齐均匀，到第 9 d 菌丝接近满皿水平；牛肉膏和酵母粉培养基次之，菌丝达满皿的 70%~80%；而玉米浆培养基的菌丝也可生长，且浓白，但生长最慢，长势才达其他处理组一半左右的水平，明显不如其他氮源的培养基。试验结果表明，蛋白胨为杏鲍菇 528 菌丝生长的适宜氮源。此研究结果与晏爱芬等^[16]和马璐^[17]研究的杏鲍菇菌丝适宜碳氮源结果存在差异，这可能是杏鲍菇菌株不同导致其营养条件需求不一样。

2.2 玉米糝粉和蛋白胨的比例对杏鲍菇 528 深层发酵培养的影响

在其他培养基成分不变的条件下，不同比例玉米糝粉和蛋白胨对杏鲍菇 528 深层发酵培养发酵物干重的影响结果见表 2。试验发现，玉米糝粉比例的加大，会使培养基沉淀物增多，这可能是由于玉米糝粉在蒸煮过程中淀粉糊化，释放于培养液中，导致培养液中存在或多或少的沉淀物，这些淀粉沉淀的溶出增加了培养液的碳源浓度。当玉米糝粉比例

为 2% 时, 发酵物干重显著高于 1% 比例 ($P<0.05$), 但与 3% 比例没有明显变化。从表 2 可知, 蛋白胨可在一定范围内调节培养液的初始 pH 值, 当蛋白胨添加量 $\leq 1.0\%$ 浓度时, 培养液初始 pH 值 <5.00 , 这不利于杏鲍菇 528 深层发酵培养, 其发酵物干重显著低于其他添加量处理组。不同玉米糝粉和蛋白胨浓度对杏鲍菇 528 液体深层发酵的菌丝生长有显著影响,

在其它培养条件不变下, 2.0% 玉米糝粉和 2.0% 蛋白胨培养液制备的杏鲍菇发酵物干重最多, 达 $33.30\pm 0.81\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著高于其他碳氮源配比组合。因此, 杏鲍菇 528 深层发酵培养适宜配方确定为: 玉米糝粉 2.0%、蛋白胨 2.0%、麦麸细粉 1.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、谷氨酸 0.1% 和维生素 B_6 0.1%。

表 2 不同比例玉米糝粉和蛋白胨对杏鲍菇 528 深层发酵培养液的沉淀物情况、初始 pH 及发酵物干重影响
Table 2 Effects of different proportions of corn grits and peptone on the sediment condition, initial pH in culture medium and dry weight of fermentation products of *Pleurotus eryngii* 528 submerged fermentation

配方 Formula	玉米糝粉 Corn grits/%	蛋白胨 Peptone/%	麦麸细粉 Wheat bran powder/%	谷氨酸 Glutamic acid/%	维生素 B_6 Vitamin B_6 /%	KH_2PO_4 /%	MgSO_4 /%	沉淀物情况 Sediment condition	pH	发酵物干重 Dry weight of fermentation/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
A	1.0	1.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+	4.96	$24.60\pm 0.17\text{ D}$
B	1.0	2.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+	5.10	$31.20\pm 0.99\text{ C}$
C	1.0	3.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+	5.11	$31.50\pm 1.19\text{ C}$
D	2.0	1.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	++	4.96	$24.70\pm 0.11\text{ D}$
E	2.0	2.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	++	5.10	$33.30\pm 0.81\text{ A}$
F	2.0	3.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	++	5.11	$32.90\pm 1.10\text{ B}$
G	3.0	1.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+++++	4.95	$24.90\pm 0.25\text{ D}$
H	3.0	2.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+++++	5.11	$33.10\pm 0.70\text{ AB}$
I	3.0	3.0	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	+++++	5.12	$32.80\pm 0.64\text{ B}$

注: 字母不同表示差异显著 ($P<0.05$); +表示沉淀程度: +为沉淀少, ++为沉淀较多, +++++沉淀多。
Note: Different letters indicate significant differences ($P<0.05$); + indicates the degree of precipitation, + means less precipitation, ++ means more precipitation, +++++means the most precipitation.

2.3 氨基酸对杏鲍菇 528 液体培养发酵物麦角硫因的影响

在 2.2 确定的杏鲍菇 528 深层发酵基础培养基上添加天冬氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸, 考察这 5 种氨基酸对杏鲍菇 528 液体培养菌丝体合成麦角硫因的影响, 结果见图 3。

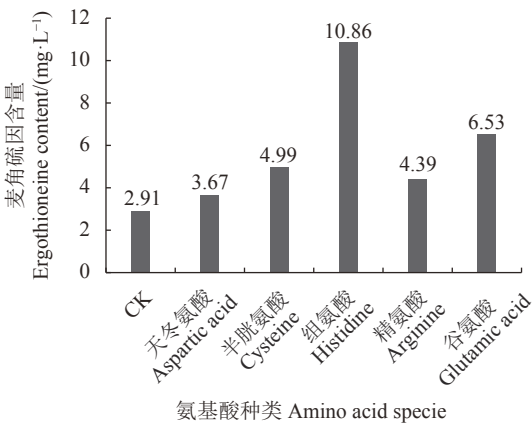


图 3 不同氨基酸对发酵物麦角硫因含量的影响
Fig. 3 Effects of different amino acids on the content of ergothioneine in fermentation product

试验发现, 外源氨基酸对杏鲍菇 528 液体培养发酵物干重没有显著影响, 但图 3 可知, 天冬氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸这 5 种氨基酸均可不同程度提高杏鲍菇 528 液体培养发酵物麦角硫因含量。其中, 组氨酸的效果最明显, 其发酵物麦角硫因含量为 $10.86\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别是对照组 (CK) 的 3.73 倍、天冬氨酸组的 2.96 倍、精氨酸组的 2.47 倍、半胱氨酸组的 2.18 倍和谷氨酸组的 1.66 倍。试验结果表明, 组氨酸的添加有效促进了杏鲍菇 528 菌丝体发酵过程中麦角硫因的合成积累, 杏鲍菇 528 菌丝体麦角硫因含量比对照组增加了 2.73 倍, 推测组氨酸可能是杏鲍菇 528 生物合成麦角硫因的前体, 因此, 选择组氨酸为提高杏鲍菇 528 液体培养发酵物麦角硫因含量的外源氨基酸。不同真菌生物合成麦角硫因的前体不一样。MELVILLE DB^[18]等采用同位素示踪法证明了粗糙链孢霉合成麦角硫因的前体为组氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸; 梅保良^[19]研究表明蛋氨酸和半胱氨酸可提高糙皮侧耳 CGMCC 6232 深层发酵菌丝体麦角硫因含量。本研究发现组氨酸可促进杏鲍菇 528 菌丝体生物合成麦角硫因,

但具体生物合成途径有待进一步研究。

2.4 以麦角硫因为目标产物的正交试验

2.4.1 正交试验结果分析 正交试验对杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因含量的数据分析结果见表 3 和表 4。由表 3 极差分析可知，各因素的影响的主次顺序为：C>A>B，即组氨酸>玉米糝粉>蛋白胨。方差分析结果显示，只有组氨酸呈显著水平（ $P<0.05$ ），其余各因素对发酵物麦角硫因含量的影响均不显著。在 9 个序列组合中，序列 4 组合的麦角硫因含量最高，达 $19.48\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此，确定提高杏鲍菇 528 发酵物麦角硫因产率的最佳发酵培养基配方为：玉米糝粉 2.0%、蛋白胨 1.5%、组氨酸 0.15%、麦麸细粉 1.0%、

KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、谷氨酸 0.1% 和维生素 B_6 0.1%。

2.4.2 正交试验验证 对正交试验结果筛选的配方进行验证试验，重复 6 次，检测出的麦角硫因平均含量为 $20.50\pm 1.80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，验证试验结果与正交试验方案结果相符合，说明该配方能有效提高杏鲍菇发酵物中麦角硫因的含量。

3 讨论与结论

适宜杏鲍菇 528 菌丝生长的碳氮源分别为玉米糝粉和蛋白胨；组氨酸可有效促进杏鲍菇 528 菌丝体深层发酵过程中麦角硫因的合成积累，添加组氨酸组的菌丝体麦角硫因含量比对照组增加了 2.73 倍，推测组氨酸可能是杏鲍菇 528 生物合成麦角硫因的前体；杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的最佳培养基配方为：玉米糝粉 2.0%、蛋白胨 1.5%、组氨酸 0.15%、麦麸细粉 1.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、谷氨酸 0.1% 和维生素 B_6 0.1%，在此条件下，杏鲍菇发酵物麦角硫因含量达 $20.50\pm 1.80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

本文试验表明，通过碳氮源、氨基酸等营养控制手段来调控杏鲍菇 528 深层发酵物中的 EGT 含量是可行且有效的，该方法操作简单，生产成本低，适宜规模化生产，可为开发富含 EGT 的功能食品研发提供安全原料，应用前景大。

杏鲍菇 528 深层发酵不仅与培养液营养因子密切相关，还与培养温度、通气量、搅拌速度等发酵条件密切相关^[20-22]。本研究仅基于营养调控手段来研究提高杏鲍菇 528 发酵物 EGT 含量的方法，后续仍需优化提高发酵物 EGT 含量的杏鲍菇 528 深层发酵的培养条件，进一步探究 EGT 生物合成途径和机理。

参考文献：

[1] LI R W S, YANG C, SIT A S M, et al. Uptake and protective effects of ergothioneine in human endothelial cells [J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014, 350 (3) : 691-700.

[2] IRINA B, LOUISE C, KENNY, CATHAL M M, et al. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical[J]. *Nutrition Research Reviews*, Published online by Cambridge University Press: 13 February 2020: page 1-28.

[3] 胡文. 麦角硫因的生物合成[D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.

HU W. Biosynthesis of ergothioneine[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2015. (in Chinese)

[4] BAO H N D, OCHIAI Y, OHSHIMA T. Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes* [J]. *Bioresource Technology*, 2010,

表 3 $\text{L}_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 3 The results of $\text{L}_9(3^4)$ orthogonal test

序列号 Serial number	因素 Factor/%				麦角硫因含量 Ergothioneine content/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
	玉米糝粉 Corn grits A	蛋白胨 Peptone B	组氨酸 Histidine C	空列 Null column D	
1	1.5	1.5	0.10	1	10.39
2	1.5	2.0	0.15	2	13.60
3	1.5	2.5	0.20	3	16.41
4	2.0	1.5	0.15	3	19.48
5	2.0	2.0	0.20	1	18.49
6	2.0	2.5	0.10	2	11.91
7	2.5	1.5	0.20	2	19.41
8	2.5	2.0	0.10	3	9.98
9	2.5	2.5	0.15	1	16.92
$\bar{K}_1$	13.47	16.43	10.76	15.27	
$\bar{K}_2$	16.63	14.03	16.67	14.97	
$\bar{K}_3$	15.44	15.08	18.11	15.29	
R	3.16	2.40	7.35	0.32	

表 4 正交试验方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源 Source of variation	偏差平方和 Deviation sum of squares	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	显著性 Significance
A	15.29	2	1.90	
B	8.67	2	1.08	
C	90.95	2	11.30	*
空列 Null column	0.19	2	0.02	
误差 Error	24.16	6		

- 101 (15) : 6248–6255.
- [5] NANCY J D. Evaluation of ergothioneine and other antioxidants in cultivated mushrooms and factors affecting ergothioneine in *Agaricus bisporus*[D]. United States: The Pennsylvania State University, 2006.
- [6] TEPWONG P, GIRI A, OHSHIMA T. Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes* [J]. *Mycoscience*, 2012, 53 (2) : 102–112.
- [7] STAMPFLI A R, BLANKENFELDT W, SEEBECK F P. Structural basis of ergothioneine biosynthesis [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 65: 1–8.
- [8] 刘琦, 张维亚, 姜文侠. 麦角硫因的合成与降解代谢 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27 (6) : 1112–1117, 1002.
- LIU Q, ZHANG W Y, JIANG W X. Biosynthesis and catabolism of L-ergothioneine [J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27 (6) : 1112–1117, 1002. (in Chinese)
- [9] VALACHOVÁ K, MACH M, DUBOVICKÝ M, et al. The importance of ergothioneine synthesis in ancient time by organisms living in oxygen free atmosphere [J]. *Medical Hypotheses*, 2019, 123: 72–73.
- [10] TEPWONG P, GIRI A, SASAKI F, et al. Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound [J]. *Food Chemistry*, 2012, 131 (1) : 247–258.
- [11] LEE W Y, PARK E J, AHN J K. Supplementation of methionine enhanced the ergothioneine accumulation in the *Ganoderma neo-japonicum* mycelia [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 158 (1) : 213–221.
- [12] 常青, 阮新, 冯培勇, 等. 杏鲍菇子实体与深层发酵菌丝体营养成分分析 [J]. 烟台教育学院学报, 2005, 11 (4) : 90–92.
- CHANG Q, RUAN X, FENG P Y, et al. Nutrition composition analysis in fruitbodies and submerged cultivated mycelia of *Pleurotus eryngii* [J]. *Journal of Yantai College of Education*, 2005, 11 (4) : 90–92. (in Chinese)
- [13] 尹永刚, 郑雪平, 吴志忠, 等. 杏鲍菇菌丝体与子实体氨基酸的组成分析 [J]. 食药菌, 2014, 22 (6) : 329–330.
- YIN Y G, ZHENG X P, WU Z Z, et al. Amino acid composition analysis of *Pleurotus eryngii* mycelium and fruiting body [J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2014, 22 (6) : 329–330. (in Chinese)
- [14] LIN S D, WU Y T, LO Y C, et al. Quality characteristics of centrifuged broth from blanched *Pleurotus eryngii* and its application as instant drink [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018, 42 (1) : e13356.
- [15] 姜文侠, 刘琦, 周涛. 麦角硫因的检测方法: CN103743825B[P]. 2014-04-23.
- [16] 晏爱芬, 常宏富. 不同营养条件对杏鲍菇菌丝生长量的影响 [J]. 保山学院学报, 2016, 35 (2) : 18–20.
- YAN A F, CHANG H F. Effect of different nutrition conditions on mycelia growth of *Pleurotus eryngii* [J]. *Journal of Baoshan University*, 2016, 35 (2) : 18–20. (in Chinese)
- [17] 马璐. 杏鲍菇工厂化生产关键因素研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- MA L. Studies on key factors of industrialized production for *Pleurotus eryngii*[D]. Yangling, China: Northwest A & F University, 2010. (in Chinese)
- [18] MELVILLE D B, EICH S, LUDWIG M L. The biosynthesis of ergothioneine [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 224 (2) : 871–877.
- [19] 梅保良, 刘琦, 姜文侠, 等. 营养因子强化麦角硫因生物合成的研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36 (15) : 108–112.
- MEI B L, LIU Q, JIANG W X, et al. Study on the biosynthesis of L-ergothioneine by enhancement of nutritional factors [J]. *Food Research and Development*, 2015, 36 (15) : 108–112. (in Chinese)
- [20] 杨桂梅. 杏鲍菇液体菌种培养条件与应用试验 [J]. 食用菌, 2014, 36 (3) : 19–20.
- YANG G M. Culture conditions and application tests on liquid strains of *Pleurotus eryngii* [J]. *Edible Fungi*, 2014, 36 (3) : 19–20. (in Chinese)
- [21] 杨丽维, 王玉, 陈颖, 等. 杏鲍菇液体菌种制备条件的研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36 (7) : 106–109.
- YANG L W, WANG Y, CHEN Y, et al. Study on preparation condition of liquid spawn of *Pleurotus eryngii* [J]. *Food Research and Development*, 2015, 36 (7) : 106–109. (in Chinese)
- [22] 赵俊俊, 马瑞霞. 杏鲍菇液体菌种摇瓶发酵条件的研究 [J]. 中国园艺文摘, 2017, 33 (8) : 27–28, 83.
- ZHAO J J, MA R X. Study on shaking flask fermentation conditions of *Pleurotus eryngii* liquid strain [J]. *Chinese Horticulture Abstracts*, 2017, 33 (8) : 27–28, 83. (in Chinese)

(责任编辑: 吴宇琳)