

广东虫草富硒培养及其粗多糖抗氧化活性的比较

王启明¹, 孙璟然², 龙文君³, 谭悠久³, 王玉芹^{3*}, 王春丽^{1*}

(1. 华东理工大学药学院, 药学院制药工程与过程化学教育部工程研究中心, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237) (2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203) (3. 浙江泛亚生物医药股份有限公司, 浙江泛亚生命科学研究院, 浙江嘉兴 314200)

摘要: 该研究对不同外源硒 (Na_2SeO_3) 质量浓度下培养得到的广东虫草子实体生长状况及腺苷 (Adenosine, AD)、多糖 (Polysaccharide, PS)、虫草酸 (Cordycepic Acid, CA) 等活性成分进行了考察, 确定广东虫草菌株的最佳富硒质量浓度, 同时检测了其子实体在最佳富硒质量浓度下的总硒含量及其存在形态, 并对其粗多糖体外抗氧化活性进行了初步探究。结果表明, 随着培养基中 Na_2SeO_3 质量浓度的增加, 富硒广东虫草子实体的生物学转化率、AD、PS、CA 含量均表现出先升后降的趋势。在 Na_2SeO_3 质量浓度为 30 mg/kg 时, 生物学转化率、AD、PS 均达到最高值, 为最佳富硒质量浓度。此时, 广东虫草子实体中的有机硒占比为 100%, 有 7 种硒形态, 分别为硒代蛋氨酸 (Selenomethionine, SeMet)、硒代胱氨酸 (Selenocystine, SeCys₂)、四价 Se (IV)、硒甲基硒代半胱氨酸 (Se-methylselenocysteine, SeMeCys)、六价 Se (VI) 以及两种未知硒形态。体外抗氧化活性评估表明, 同一质量浓度下, 相比未富硒广东虫草粗多糖 (*Cordyceps guangdongensis* Crude Polysaccharide, CPS), 富硒广东虫草粗多糖 (Se-enriched *Cordyceps guangdongensis* Crude Polysaccharide, CPS-Se) 具有更高的抗氧化活性, 其对 DPPH、ABTS⁺ 和羟基自由基的清除能力、总还原能力以及总抗氧化能力均有不同程度地增强 ($P < 0.01$), 呈现良好的剂量依赖性。这为富硒广东虫草产品开发及其多糖的进一步纯化鉴定和活性验证提供了理论依据。

关键词: 广东虫草; 富硒培养; 粗多糖; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2024)08-178-188

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0480

Selenium-enriched Culture of *Cordyceps guangdongensis* and Comparison of Antioxidant Activity of Its Crude Polysaccharides

WANG Qiming¹, SUN Jingran², LONG Wenjun³, TAN Youjiu³, WANG Yuqin^{3*}, WANG Chunli^{1*}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Engineering Research Center of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Shanghai 200237, China) (2. College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China) (3. Zhejiang Bioasia Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang Bioasia Life Science Research Institute, Jiaxing 314200, China)

引文格式:

王启明, 孙璟然, 龙文君, 等. 广东虫草富硒培养及其粗多糖抗氧化活性的比较 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(8): 178-188.

WANG Qiming, SUN Jingran, LONG Wenjun, et al. Selenium-enriched culture of *Cordyceps guangdongensis* and comparison of antioxidant activity of its crude polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 178-188.

收稿日期: 2023-04-23

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09735002)

作者简介: 王启明 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物筛选和评价, E-mail: wangvenus@163.com

通讯作者: 王玉芹 (1971-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 中药研究开发, E-mail: wyq@bioasia.com.cn; 王春丽 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然抗氧化剂的发现与应用, E-mail: wangchunli@ecust.edu.cn

Abstract: In this study, the growth status and active components such as adenosine (AD), polysaccharide (PS) and cordycepic acid (CA) of *Cordyceps guangdongensis* cultured at different mass concentrations of exogenous selenium (Na_2SeO_3) were investigated. The optimal mass concentration of selenium for enrichment in *Cordyceps guangdongensis* was determined, and the total content of selenium and its existing form in the fruiting body obtained at the optimal selenium mass concentration were examined. Meanwhile, the *in vitro* antioxidant activity of the polysaccharide from the fruit body was preliminarily investigated. The results indicated that, with the increase of the mass concentration of Na_2SeO_3 in the medium, the biological conversion rate, and the contents of AD, PS and CA in the selenium-enriched *Cordyceps guangdongensis* fruit body showed a trend of an initial increase followed by decrease. When the mass concentration of Na_2SeO_3 was 30 mg/kg, the biological conversion rate, AD content, and PS content all reached the highest values, indicating that this was the optimal mass concentration. In this case, the proportion of organic selenium was 100%, and there were 7 forms of selenium, namely SeMet, SeCys₂, Se (IV), SeMeCys, Se (VI), and two unknown forms of selenium. Compared to the *Cordyceps guangdongensis* crude polysaccharide (CPS), the Se-enriched *Cordyceps guangdongensis* crude polysaccharide (CPS-Se) had higher *in vitro* antioxidant activities, i.e. the scavenging abilities towards the DPPH, ABTS⁺ and hydroxyl free radicals, the total reducing ability, and the total antioxidant ability were enhanced to different extents ($P < 0.01$), showing good dose-dependence. This study provides a theoretical basis for the development of selenium-enriched *Cordyceps guangdongensis* products, and for further purification, identification, and activity verification of its polysaccharides.

Key words: *Cordyceps guangdongensis*; selenium-enriched culture; crude polysaccharides; anti-oxidation

硒是人体必需的一种微量元素^[1], 具有抗氧化、抗衰老、保护细胞损伤、提高免疫力、预防癌变等多重生物学功能^[2]。

广东虫草 (*Cordyceps guangdongensis* T.H. Li, Q.Y. Lin & B. Song) 是我国特有的一种虫草类真菌, 其子实体于 2013 年被中国卫生部批准为“新资源食品”^[3]。人工培植的广东虫草子实体不仅安全性高^[4], 还具有抗氧化^[5]、抗炎^[6]、抗疲劳^[7]等药理作用, 在食品、保健等领域具有着良好的应用前景^[8]。

食药菌不仅含有丰富的蛋白质、多糖等其他生理活性物质, 具有很高的营养价值和药用价值, 而且具有较强的富硒能力, 能够通过菌丝细胞内物质代谢的转化将无机硒结合到大分子活性物质如蛋白质和多糖等上转化为蛋白硒或多糖硒等有机形态的硒^[9]。通过发酵培养获得富硒菌丝体或通过人工栽培获得富硒子实体开发新产品, 可弥补天然食用菌中硒含量较低的缺点。因此, 低成本、高质量的富硒食用菌产品研究成为热点。

人体在代谢过程中会产生丰富的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 物质。它们会对 DNA 和细胞造成损伤, 进而导致衰老和一些疾病 (如癌症、阿尔兹海默症等) 的发生^[10]。抗氧化剂能够通过抵消 ROS 的恶化作用以及清除自由基来避免相关损伤, 在保护最精细的细胞功能方面起着至关重要的作用^[11]。天然活性化合物如多糖类, 具有良好的抗氧

化活性。由虫草子实体、菌丝体或发酵液中分离得到的虫草多糖是虫草的主要活性成分之一, 具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等诸多药理作用^[12-14]。

本文以广东虫草为载体, 以亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 为外源硒, 考察培养基中添加不同浓度硒对广东虫草子实体生长及其活性物质的影响规律, 并对硒的存在形态进行初步分析, 最后对富硒前后广东虫草粗多糖的抗氧化活性进行了初步评价, 旨在为富硒广东虫草产品开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

广东虫草菌株由浙江泛亚生物医药股份有限公司提供。

1.1.2 主要试剂

亚硒酸钠, 泰州聚丰源生物科技有限公司; 硒标准品, 珀金埃尔默 (PerkinElmer) 股份有限公司; 硒 (IV) 标准溶液, 北京北方伟业计量技术研究院; 硒酸钠 (HPLC $\geq 98\%$), 北京普天同创生物科技有限公司; 硒代胱氨酸标准品 (HPLC $\geq 98\%$)、硒甲基硒代半胱氨酸标准品 (HPLC $\geq 98\%$)、硒代蛋氨酸标准品 (98%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT, 98%), 上

海源叶生物科技有限公司；维生素 C (Vc)，上海麦克林生物科技有限公司；硝酸 (AR)、无水乙醇 (AR)，国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配备 Eclipse XDB-C18 色谱柱)，安捷伦 (上海) 有限公司；Element XR 型电感耦合等离子体质谱仪，赛默飞世尔科技有限公司；MARS 微波消解仪，美国 CEM 公司；紫外-可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；电子天平，梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 广东虫草富硒工艺的探究

1.2.1.1 Na₂SeO₃对广东虫草子实体生长的影响

采用固体瓶栽的方法，分别向培养基中添加含有不同质量浓度 Na₂SeO₃ 的营养液，研究外源硒 (Na₂SeO₃) 对广东虫草子实体鲜质量、干质量、生物学转化率 (见公式 1) 的影响规律。

$$\alpha = \frac{M_1}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

α —生物学转化率，%；

M_0 —固体培养基质量，g；

M_1 —子实体干质量，g。

1.2.1.2 Na₂SeO₃对广东虫草子实体中活性成分的影响

参照覃丽霞等^[15]的方法，对不同外源硒 (Na₂SeO₃) 质量浓度下培育的子实体中腺苷、虫草多糖、虫草酸 (即甘露醇) 的含量进行测定。

1.2.2 富硒广东虫草子实体中硒含量及存在形态分析

1.2.2.1 总硒测定

参照 GB 5009.268^[16]测总硒含量。精密称取供试品 0.2 g 于微波消解仪内罐中，移加 5 mL 硝酸，放置过夜，消解。放冷，取出，缓慢打开罐盖放气，置于 100 °C 超声脱气 2~5 min，用水定容至 25 mL，混匀，即得供试品溶液。按同一操作方法作空白试验。

ICP-MS 工作条件：射频率 1 500 W，高盐雾化器，等离子体气流量 15 L/min，镍采样锥 / 铂截取锥，辅助气流量 0.4 L/min，载气流量 0.8 L/min，采样深度 8 mm，雾化室温度 2 °C，碰撞反应池分析模式。

将待测溶液注入 ICP-MS 仪中，测定。以硒元素浓度为横坐标，硒元素与内标元素响应信号值的比值为纵坐标，绘制标准曲线。根据标准曲线计算得到消解液中硒元素的浓度，再计算出供试品中总硒含量 (见公式 2)。

$$\omega_0 = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f}{m \times 1000} \quad (2)$$

式中：

ω_0 —总硒含量，mg/kg；

ρ —供试品溶液中硒的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

ρ_0 —空白溶液中硒的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

V —供试品消化液定容体积，mL；

f —供试品稀释倍数；

m —供试品质量，g；

1 000—换算系数。

1.2.2.2 有机硒占比

参照 GB 1903.22-2016^[17]测富硒广东虫草子实体样品中无机硒含量。精密称取 1 g 供试品，加入 25 mL 水，在磁力搅拌器上搅拌 30 min，定容至 100 mL，摇匀，4 °C 静置 1 h，取出，5 000 r/min 离心 30 min。取上清液 10 mL 于 50 mL 容量瓶中，分别依次加入 12.5 mL HCl、2.5 mL K₃[Fe(CN)₆] 溶液，定容至刻度，混匀，即得供试品溶液。按同一操作方法作空白试验。

将待测溶液注入 ICP-MS 仪中，测定，先计算得无机硒含量 (公式 2)，再计算得到样品中有机硒含量 (见公式 3)，得出富硒广东虫草中有机硒占比 (见公式 4)。

$$\omega_1 = \omega_0 - \omega_2 \quad (3)$$

$$X = \frac{\omega_1}{\omega_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

ω_1 —有机硒含量，mg/kg；

ω_0 —总硒含量，mg/kg；

ω_2 —无机硒含量，mg/kg；

X —有机硒占比，%。

1.2.2.3 硒存在形态

参照 GH/T 1135-2017^[18]，对富硒广东虫草子实体中 SeCys₂、SeMeCys、SeMet、Se(IV) 和 Se(VI) 含量进行测定。精确称取 1 g 供试品，加入 5 mL Tris-HCl，摇匀，超声 30 min。分别依次加入 50 mg 纤维素酶、20 mg 蛋白酶 K，摇匀，水平置于气浴恒温振荡器 (50 °C ± 2 °C，250 r/min) 中培养 18 h。

再加入 20 mg 蛋白酶 XIV, 37 °C ±2 °C 培养 18 h。于 4 °C, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 用甲醇-氯仿-水三相萃取剂萃取。取水相, 过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品溶液。按同一操作方法作空白试验。

使用强阴离子交换高效液相色谱联合电感耦合等离子体质谱 (SAX-HPLC-ICP-MS) 进行分析^[19]。HPLC 条件: Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱 (250 mm×4.1 mm, 10 μm), 流动相为 0.04 mol/L 磷酸氢二铵溶液 (pH 值 6.0, 10% 甲酸调节), 流速 1 mL/min, 进样量 20 μL, 以混合标准品的保留时间定性。ICP-MS 条件参照前文 1.2.2.1, 测定各分离组分中硒的含量。

1.2.3 富硒广东虫草粗多糖体外抗氧化活性评价

1.2.3.1 粗多糖的提取

将广东虫草子实体和富硒广东虫草子实体干燥后研磨成粉末, 与蒸馏水 (1:10, *m/V*) 混合, 50 °C 超声 30 min, 回流提取 30 min, 4 000 r/min 离心 15 min。控制温度不超过 65 °C, 将上清液浓缩至原体积的 1/4, 再加入 3 倍体积的无水乙醇, 4 °C 静置 12 h。离心, 收集沉淀物, 真空干燥制成粉末, 即得广东虫草粗多糖 (CPS) 和富硒广东虫草粗多糖 (CPS-Se)。测定粗多糖样品中硒含量、多糖含量和蛋白质含量, 每个样品平行 3 次, 结果取平均值。硒含量测定同前文 1.2.2.1, 多糖含量测定方法同前文 1.2.1.2, 蛋白质含量按照食品安全国家标准 GB 5009.5 《食品中蛋白质的测定》中分光光度法进行测定^[20]。

1.2.3.2 DPPH 自由基清除能力

实验方法参考 Sharma 等^[21], 将 CPS 和 CPS-Se 配制成 (0.5~5.0 mg/mL) 样品溶液。分别量取上述样品溶液 1 mL, 加 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液 4 mL, 混匀后在黑暗室温条件下反应 30 min, 测定 517 nm 处的吸光值。以样品溶液与无水乙醇反应作为空白, 蒸馏水与 DPPH 乙醇溶液反应作为对照, 0.5~5.0 mg/mL Vc 和 BHT 为阳性对照。计算 DPPH 自由基清除率 (按公式 5)。每个样品平行 3 次, 结果取平均值。

$$R_{\text{DPPH}} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

R_{DPPH} —DPPH 清除率, %;

A_1 —样品组吸光值;

A_2 —空白组吸光值;

A_0 —对照组吸光值。

1.2.3.3 ABTS⁺ 自由基清除能力

实验方法参考 Deseo 等^[22], 将 ABTS 配制成 7 mmol/L 溶液, 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 等体积混合, 室温下避光反应 24 h, 得到 ABTS⁺ 储备液。使用前用无水乙醇对 ABTS⁺ 储备液进行适当稀释, 使稀释后溶液 734 nm 处的吸光值为 0.70, 即得 ABTS⁺ 工作液。将 CPS 和 CPS-Se 配制成 (0.5~5.0 mg/mL) 样品溶液。分别移取上述样品溶液 0.1 mL 与 1.9 mL ABTS 工作液混匀, 在黑暗室温条件下反应 10 min, 测定 734 nm 处的吸光值。以样品溶液与蒸馏水反应作为空白, 蒸馏水与 ABTS⁺ 工作液反应作为对照, (0.5~5.0 mg/mL) Vc 和 BHT 为阳性对照。计算 ABTS⁺ 自由基清除率 (按公式 6)。每个样品平行 3 次, 结果取平均值。

$$R_{\text{ABTS}^+} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (6)$$

式中:

R_{ABTS^+} —ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_1 —样品组吸光值;

A_2 —空白组吸光值;

A_0 —对照组吸光值。

1.2.3.4 羟基自由基清除能力

实验方法参考 Smimoff 等^[23], 将 CPS 和 CPS-Se 配制成 (0.5~5.0 mg/mL) 样品溶液。分别移取上述样品溶液 1 mL 与 1 mL 的 6 mmol/L FeSO_4 溶液、1 mL 的 6 mmol/L 水杨酸乙醇溶液和 1 mL 的 6 mmol/L H_2O_2 溶液混匀, 在 37 °C 的水浴条件下反应 1 h, 测定 510 nm 处的吸光值。以蒸馏水代替样品溶液作为空白, 蒸馏水代替 H_2O_2 溶液作为对照, (0.5~5.0 mg/mL) 的 Vc 和 BHT 为阳性对照。计算羟基自由基清除率 (公式 7)。每个样品平行 3 次, 结果取平均值。

$$R_{\text{OH}} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (7)$$

式中:

R_{OH} —羟基自由基清除率, %;

A_1 —样品组吸光值;

A_2 —空白组吸光值;

A_0 —对照组吸光值。

1.2.3.5 总还原能力

实验方法参考 Zhao 等^[24], 将 CPS 和 CPS-Se 配制成 (0.5~5.0 mg/mL) 样品溶液。分别移取 1 mL 上述样品溶液与 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.6)

和 2.5 mL 1% (*m/V*) 铁氰化钾混合, 于 50 °C 应 20 min 后, 迅速添加 2 mL 10% (*m/V*) 的三氯乙酸终止反应。8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2.5 mL 与 2.5 mL 无水乙醇和 0.5 mL 0.1% (*m/V*) FeCl_3 溶液充分混合, 测定 700 nm 处吸光值。以蒸馏水代替样品溶液作为空白, Vc 和 BHT 为阳性对照。计算总还原能力 (按公式 8)。每个样品平行 3 次, 结果取平均值。

$$C_1 = A_1 - A_2 \quad (8)$$

式中:

C_1 ——总还原能力;

A_1 ——样品组吸光值;

A_2 ——空白组吸光值。

1.2.3.6 总抗氧化能力

实验方法参考 Zhu 等^[25], 将 CPS 和 CPS-Se 配制成 (0.5~5.0 mg/mL) 样品溶液, 分别移取 1 mL 上述样品溶液与 3 mL 的溶液体系 (每 100 mL 含磷酸三钠 1.065 g、钼酸铵 0.494 g 和浓硫酸 3.28 mL) 混合, 95 °C 水浴 90 min, 测定 695 nm 处吸光值。以蒸馏水代替样品溶液作为空白, Vc 和 BHT 作阳性对照。计算总抗氧化能力 (按公式 9)。每个样品平行 3 次, 结果取平均值。

$$C_2 = A_1 - A_2 \quad (9)$$

式中:

C_2 ——总抗氧化能力;

A_1 ——样品组吸光值;

A_2 ——空白组吸光值。

1.2.4 数据处理

每组实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 采用 Excel 2016、SPSS Version 26.0 和 Origin 2023 软件对所有数据进行整理、单因素方差分析 (ANOVA) 以及绘图, 得出结论。

2 结果与讨论

2.1 Na_2SeO_3 对广东虫草子实体生长的影响

生物量和生物转化率是评价生长状态的较为直观的量化指标。外源硒对广东虫草子实体鲜质量、干质量和生物学转化率的影响见表 1。当 Na_2SeO_3 的质量浓度在 2~30 mg/kg 范围内, 随着质量浓度的增加, 广东虫草子实体的鲜重、干重及生物学转化率也在增加; 在 Na_2SeO_3 为 30 mg/kg 时, 三项指标分别可达到 32.43 g、5.90 g 和 14.76%, 与阴性对照组均有显著性差异 ($P < 0.05$); 而当 Na_2SeO_3 的质量浓度高于 30 mg/kg 时, 广东虫草子实体的鲜重、干

重及生物学转化率与其余各组相比, 均发生了显著性下降 ($P < 0.05$), 表现出抑制生长的效果。马国良等^[26]发现低质量浓度的亚硒酸钠可以促进蛹虫草菌丝的生长, 而当亚硒酸钠添加量超过 23.0 mg/L (换算值为 23.0 mg/kg) 时有抑制作用, 与本实验结果相近。对金针菇的富硒培养显示, 相比对照组, 0.5~10 $\mu\text{g/g}$ 亚硒酸盐的添加可显著增加其产量 ($P < 0.05$), 且随添加量的增加呈现先升后降的趋势^[27]。但也有研究表明, 0.5~40 $\mu\text{g/g}$ 亚硒酸盐处理显著抑制猴头菇子实体的生长 ($P < 0.05$), 却对黑木耳和灵芝子实体的生长没有显著影响^[28-30]。可能的原因是, 硒的过量暴露可通过产生活性氧, 脂质过氧化, 以及降低机体内硫的代谢来改变生物体的生长^[31]。对于不同水平硒引起的副反应耐受可能与物种及其抗氧化系统有关^[32]。相比其他食用菌, 虫草类真菌对亚硒酸盐的耐受性和代谢能力较为突出。

表1 不同处理下广东虫草子实体生物学指标

Table 1 Bioindicator of fruiting bodies of *Cordyceps guangdongensis* under different treatments ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)

组别	Na_2SeO_3 质量浓度/ (mg/kg)	鲜质量/g	干质量/g	生物学 转化率/%
阴性 对照组	0	28.46 \pm 0.54 ^e	5.09 \pm 0.32 ^d	12.73 \pm 0.08 ^d
1	2	28.96 \pm 0.42 ^e	5.26 \pm 0.25 ^{cd}	13.16 \pm 0.61 ^{cd}
2	4	30.36 \pm 0.44 ^b	5.48 \pm 0.23 ^{bc}	13.70 \pm 0.57 ^{bc}
3	10	30.51 \pm 0.34 ^b	5.47 \pm 0.42 ^{bc}	13.68 \pm 0.11 ^{bc}
4	15	30.77 \pm 0.48 ^b	5.46 \pm 0.19 ^c	13.64 \pm 0.48 ^c
5	20	31.36 \pm 0.28 ^{ab}	5.76 \pm 0.10 ^{ab}	14.40 \pm 0.26 ^{ab}
6	30	32.43 \pm 0.37 ^a	5.90 \pm 0.18 ^a	14.76 \pm 0.45 ^a
7	40	22.81 \pm 1.91 ^d	3.80 \pm 0.25 ^e	9.51 \pm 0.61 ^e
8	50	14.36 \pm 0.46 ^e	2.50 \pm 0.16 ^f	6.26 \pm 0.40 ^f

注: 同一列中, 若上标字母不同, 则 $P < 0.05$, 有显著性差异; 否则无显著性差异。表 2 同。

2.2 Na_2SeO_3 添加对广东虫草子实体中活性成分的影响

随着培养基中 Na_2SeO_3 质量浓度的增加, 富硒广东虫草子实体中腺苷、虫草多糖、虫草酸的含量均表现出先升后降的趋势 (见表 2)。在 Na_2SeO_3 为 30 mg/kg 时, 腺苷和虫草多糖含量均达到最高值, 分别为 1.35 mg/kg 和 88.91 mg/kg, 相比其他组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。当 Na_2SeO_3 为 20 mg/kg 时, 虫草酸含量达到最高值 210.42 mg/kg, 相比其他组

有显著性差异 ($P < 0.05$)。而当 Na_2SeO_3 添加超过 30 mg/kg 时, 三者含量均呈显著性下降 ($P < 0.05$)。可见, 硒可能参与了广东虫草子实体中腺苷、虫草多糖和虫草酸的合成, 与三者协同增效, 但高质量浓度的硒却能抑制该合成通路, 相关机制有待进一步探索。

在张园园等^[33]的研究中, Na_2SeO_3 对蛹虫草子实体中虫草酸的含量影响趋势表现为先升后降, 与本文结论相符; 但其对多糖和腺苷的影响却并不显著, 可能是菌种及其活性物的合成机制差异导致。

综合数据显示, 以 Na_2SeO_3 为外源富硒剂时, 虽然 CA 含量在 Na_2SeO_3 为 20 mg/kg 时达到最高, 而后随质量浓度的增加下降, 但结合生长状态、AD 和 PS 含量均在 Na_2SeO_3 为 30 mg/kg 时达到最高值的结果, 宜选择 30 mg/kg 作为广东虫草富硒培养的理想添加量。

2.3 富硒广东虫草子实体中的硒含量及其存在形态

Na_2SeO_3 添加为 30 mg/kg 时, 富硒广东虫草子实体中总硒含量、各形态硒含量及其在总硒中的占比情况见表 3, 硒混合标准溶液和供试品的检测谱图见图 1 和图 2。测得富硒广东虫草子实体样品总硒含量为 47.49 mg/kg, SeCys_2 含量为 3.56 mg/kg, SeMeCys 含量为 1.74 mg/kg, Se(IV) 含量为 2.27 mg/kg, SeMet 含量为 6.30 mg/kg, Se(VI) 含量为 2.83 mg/kg。检出限为 0.01 mg/kg 条件下, 未能定量无机硒。经计算有机硒占比为 100%。未知物 1、未知物 2 的出峰时间与标准品不符, 因而无法定性。通过 ICP-MS 联机检测得到未知物 1 和未知物 2 组分中硒含量分别为 1.33 mg/kg

和 11.51 mg/kg, 可知其为未知的硒结合形态。田宗旺等^[34]对冬虫夏草进行了耳型菌核的富硒培育, 测得有机硒占比可达 99% 以上, 与本文结果相近; 其硒形态含量、未知硒形态保留时间与本文略有差异, 应是不同物种的活性物合成差异所致。张弛^[35]报道蛋白结合硒是虫草中硒的主要赋存形态, 总可溶性蛋白质硒中所分布的硒占总硒的 51.44%。本文未知物 2 中分布的硒占总硒的 24.24%, 与三种已知硒代氨基酸 (SeCys_2 、 SeMeCys 、 SeMet) 的占比之和相当。由此推测未知物 2 可能为可溶性蛋白质硒形态。

针对蛹虫草的富硒培养, 陈尚龙等^[36]的研究结果显示有机硒占比为 94.1%, 但也有报道有机硒占比高达 99.9%^[33]。二者表现出较大的差异, 这可能与外源硒的添加量相关。研究表明, 在一定范围内 (Na_2SeO_3 质量浓度为 0~200 mg/kg), 有机硒占比与 Na_2SeO_3 添加量呈显著正相关性 ($P < 0.01$)。据报道, 微生物吸收和利用无机硒的途径始于先将其还原为 H_2Se , 然后转化为硒蛋白、甲基硒化物、 Se(0) 和其他硒化合物。还原过程可能是吸收和转化过程的主要限制步骤^[37]。广东虫草对亚硒酸钠的高转化率可能是基于其发达的细胞还原系统和高效的硒代谢途径所致。

实验结果显示, 硒在广东虫草子实体中可与氨基酸结合在一起, 其中在 SeCys_2 、 SeMeCys 、 SeMet 中分布的硒占总硒含量的 24.43%, 猜测其参与了蛋白质的代谢, 影响其合成, 这与之前的研究结果相互印证。大多数情况下, 硒在微生物中的代谢基本上是沿着硫代谢的途径进行, 它往往取代含硫氨基酸中的硫生成硒代氨基酸 (如硒代半胱氨酸), 再被结合于蛋白质中^[38]。

表 2 富硒广东虫草子实体中有效成分

Table 2 Active components of selenium-enriched *Cordyceps guangdongensis* ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)

组别	Na_2SeO_3 质量浓度/(mg/kg)	腺苷含量/(mg/kg)	多糖含量/(mg/kg)	虫草酸含量/(mg/kg)
阴性对照组	0	1.041 ± 0.005 ^g	71.204 ± 0.029 ^f	175.104 ± 0.829 ^f
1	2	1.046 ± 0.004 ^{fg}	70.837 ± 0.095 ^{fg}	175.657 ± 0.568 ^f
2	4	1.062 ± 0.007 ^{efg}	71.113 ± 0.148 ^f	178.612 ± 0.566 ^e
3	10	1.082 ± 0.011 ^c	74.122 ± 0.158 ^c	188.697 ± 1.225 ^d
4	15	1.134 ± 0.007 ^d	78.881 ± 0.181 ^d	195.475 ± 0.794 ^c
5	20	1.224 ± 0.010 ^c	81.955 ± 0.140 ^b	210.416 ± 0.804 ^a
6	30	1.353 ± 0.009 ^a	88.907 ± 0.085 ^a	207.231 ± 0.413 ^b
7	40	1.275 ± 0.012 ^b	80.229 ± 0.441 ^c	189.288 ± 0.945 ^d
8	50	1.073 ± 0.040 ^{ef}	70.542 ± 0.143 ^g	169.481 ± 2.694 ^g

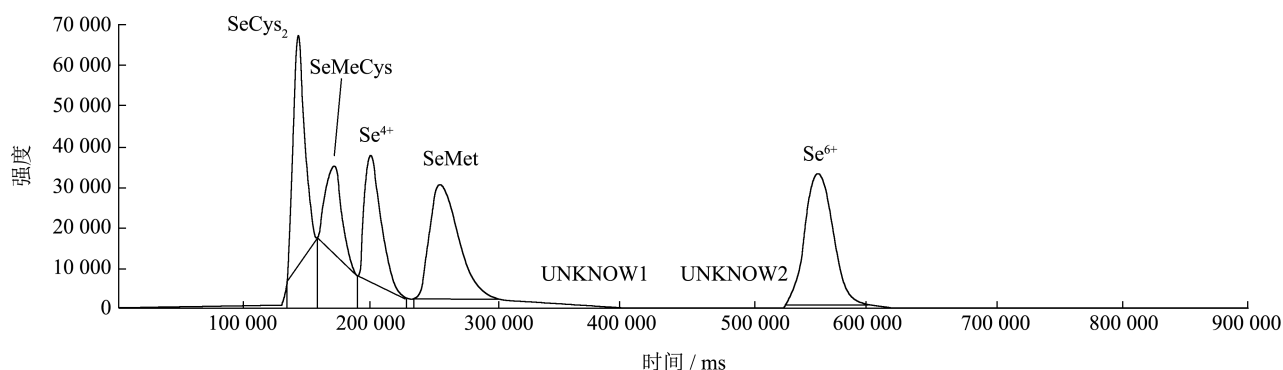


图 1 硒混合标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of selenium mixed standard solution

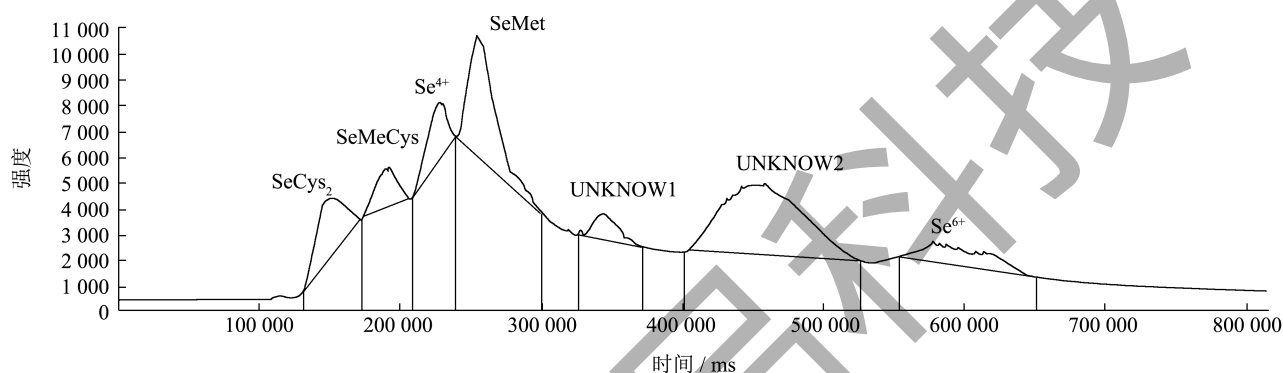


图 2 富硒广东虫草检测谱图

Fig.2 Detection spectrum of selenium-rich *Cordyceps guangdongensis*

表 3 富硒广东虫草中的硒含量

Table 3 Selenium content in selenium-rich *Cordyceps guangdongensis*

名称	硒含量 (mg/kg)	占比 ^a /%
总硒	47.49	—
硒代胱氨酸 (SeCys ₂)	3.56	7.50
硒-甲基硒代半胱氨酸 (SeMeCys)	1.74	3.66
四价硒 Se(IV)	2.27	4.78
硒代蛋氨酸 (SeMet)	6.30	13.27
六价硒 Se(VI)	2.83	5.96
未知物 1	1.33	2.80
未知物 2	11.51	24.24

注: a 为各组分中硒含量占总硒含量的百分比。

富硒广东虫草子实体中还检测到少量的四价硒

和六价硒形态,分别占总硒含量的 4.78% 和 5.96%, 猜测可能是多糖结合硒。研究表明, 硒多糖可占总硒含量的 12.01%^[35]。富硒虫草中分离的硒多糖是一种以半乳糖、葡萄糖、甘露糖为主的杂多糖^[39]。硒倾向于以硒酯的形式取代 C-6 位置的羟基, 从而与真菌细胞壁中含有几丁质的多糖结构结合^[40]。Yang 等^[41]通过红外光谱分析认为硒多糖中的硒可能以硒酸酯形式存在, 此处的硒酯键中硒即为四价硒。尚德静^[42]也认为硒是和氧以双键形式结合的。这种少量的结合只是影响了各单糖的摩尔比^[43], 一般不会破坏多糖的原始结构。有报道称, 硒多糖可显著抑制生物体内重金属(如镉、汞、银、铜和锌等)引起的毒性, 应是受硒与多糖的共价结合影响^[44,45]。

表 4 粗多糖样品的基本指标

Table 4 Basic indicators of the crude polysaccharide ($\bar{x} \pm SD, n=3$)

名称	溶解性	硒含量/(mg/kg)	多糖含量/(mg/kg)	蛋白含量/%
广东虫草粗多糖 (CPS)	全部可溶于水	0.04 ± 0.01	205.65 ± 0.20	29.12 ± 0.34
富硒广东虫草粗多糖 ^a (CPS-Se)	全部可溶于水	34.71 ± 0.91	211.36 ± 0.22	26.55 ± 0.19

注: a. Na₂SeO₃ 质量浓度为 30 mg/kg 时培养的子实体提取得到的粗多糖样品。

2.4 富硒广东虫草粗多糖的体外抗氧化活性比较

2.4.1 粗多糖样品的理化分析

由广东虫草子实体和富硒广东虫草子实体提取得到粗多糖样品,基本理化指标见表4。

2.4.2 对DPPH自由基的清除能力

由图3可见,CPS-Se和CPS在0.5~3.0 mg/mL的梯度范围内清除DPPH自由基能力随质量浓度的增加而上升,同一质量浓度下,CPS-Se的清除率强于CPS,二者差异显著($P<0.01$);当质量浓度超过3.0 mg/mL时,曲线趋于平缓,CPS-Se的清除效果与阳性对照Vc和BHT相当。由粗多糖溶液清除曲线经回归求出CPS-Se和CPS对DPPH自由基的 EC_{50} 值分别为0.9519 mg/mL和1.807 mg/mL。当质量浓度达到5.0 mg/mL时,CPS-Se、CPS的清除率分别为95.70%和82.63%,CPS-Se是CPS的1.16倍。在本研究中,硒的富集使广东虫草子实体粗多糖清除DPPH自由基能力得到了强化,可能是因为硒的存在可以激发阳极区的氢供体与DPPH反应所致^[43]。

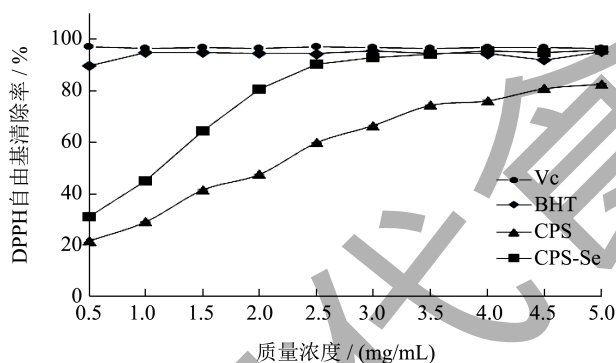


图3 CPS和CPS-Se对DPPH自由基的清除率

Fig.3 Clearance of DPPH free radical by CPS and CPS-Se

2.4.3 对ABTS⁺自由基的清除能力

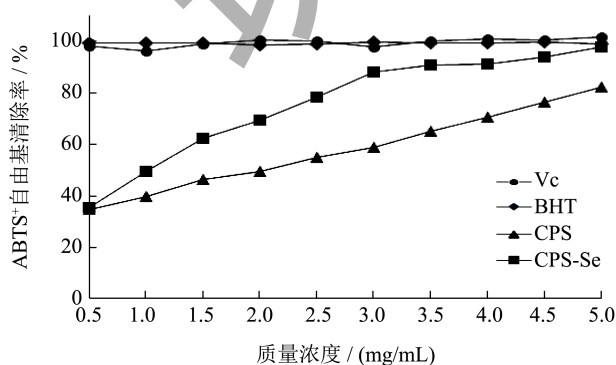


图4 CPS和CPS-Se对ABTS⁺自由基的清除率

Fig.4 Clearance of ABTS⁺ free radical by CPS and CPS-Se

由图4可见,在0.5~5.0 mg/mL质量浓度梯度内,CPS-Se和CPS对ABTS⁺自由基的清除率也随质量浓度的增加而升高,呈剂量依赖性,且同一质量浓度下,CPS-Se的清除效果均显著优于CPS($P<0.01$)。当质量浓度为5.0 mg/mL时,CPS-Se对ABTS⁺自由基清除率为97.28%,与Vc和BHT的清除效果相当,是CPS清除率的1.19倍。由粗多糖溶液清除曲线经回归求出CPS-Se和CPS对ABTS⁺自由基的 EC_{50} 值分别为0.9412 mg/mL和1.598 mg/mL。这与之前的研究结果一致,可能是因为硒基团可以激活异丙基碳的氢原子,增强多糖提供氢原子的能力,将更多的ABTS⁺自由基转化为稳定的产物^[43,46,47]。

2.4.4 对羟基自由基的清除能力

如图5所示,在0.5~5.0 mg/mL质量梯度内,CPS和CPS-Se具有良好的清除羟基自由基的能力,并且也是随着质量浓度的增加其清除能力逐渐增强,呈现良好的剂量依赖性,同一质量浓度下,CPS-Se均显著高于CPS($P<0.01$),且高于阳性对照BHT($P<0.01$)。CPS对于羟基自由基的清除效果较好,在质量浓度超过2.5 mg/mL时,清除率超过了BHT,而硒能进一步强化该清除能力。高质量浓度的CPS-Se对羟基自由基清除能力接近Vc,在质量浓度为5.0 mg/mL时,CPS-Se的清除率为98.97%,是CPS的1.8倍。由粗多糖溶液清除曲线经回归求出CPS-Se和CPS对羟基自由基的 EC_{50} 值分别为0.8094 mg/mL和3.726 mg/mL。张金荣等^[43]也得到相似的结论,他们认为硒通过Se=O或Se-H键与多糖结合而新引入的硒基(-SeH)或亚硒酸酯能与自由基链式反应所必需的自由基离子(如Fe²⁺)共轭,从而终止Fenton反应,抑制羟自由基的生成,因而硒多糖表现出较强的清除羟基自由基能力。

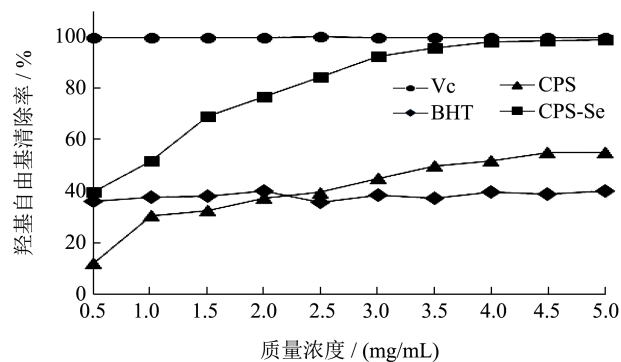


图5 CPS和CPS-Se对羟基自由基的清除率

Fig.5 Clearance of hydroxyl free radical by CPS and CPS-Se

2.4.5 总还原能力

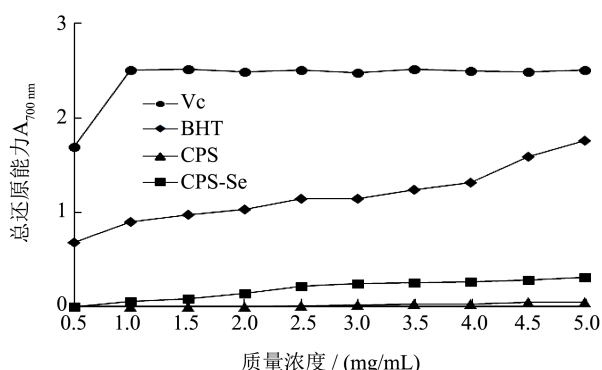


图6 CPS和CPS-Se的总还原能力

Fig.6 Total reduction abilities of CPS and CPS-Se

如图6所示,在0.5~5.0 mg/mL质量浓度范围内,CPS-Se的总还原能力随着质量浓度的增加而缓慢升高,均显著强于CPS ($P<0.01$),但与Vc和BHT仍有较大差距。CPS的总还原力随质量浓度增加提升并不明显,在质量浓度为5.0 mg/mL时,CPS-Se的总还原能力为0.32,是CPS的6.4倍。

2.4.6 总抗氧化能力

如图7所示,在0.5~5.0 mg/mL范围内,CPS和CPS-Se的总抗氧化能力均随着质量浓度的增加而缓慢增加。在相同质量浓度下,CPS-Se的总还原能力显著强于CPS ($P<0.01$)。当质量浓度超过2.5 mg/mL时,CPS-Se的总还原能力强于阳性对照药BHT ($P<0.01$);当质量浓度超过4.5 mg/mL时,曲线趋于平缓;而当质量浓度为5.0 mg/mL时,达到最大值1.83,是CPS的4.58倍。

硒本身具有抗氧化能力,可以在体内与抗氧化酶结合,提高酶的活性。无机硒通过培养的方式在生物体内富集,参与生物大分子的合成代谢,与之结合为有机硒,增强了其生物活性。因此,相比CPS,CPS-Se具有较强的抗氧化能力。

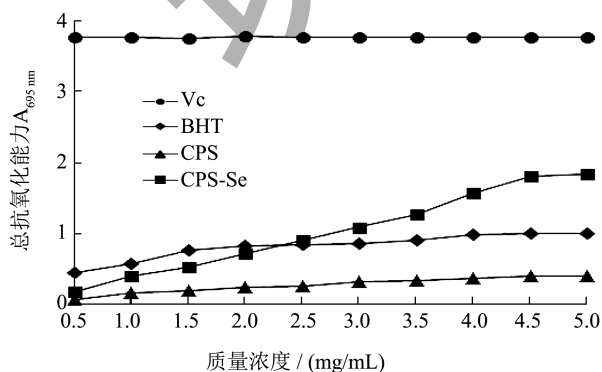


图7 CPS和CPS-Se的总抗氧化能力

Fig.7 Total antioxidant abilities of CPS and CPS-Se

3 结论

本文探讨了 Na_2SeO_3 的不同添加量对广东虫草子实体生长和活性物(腺苷、多糖、虫草酸)合成的影响,确定了最佳的质量浓度为30 mg/kg。此时,子实体中的有机硒占比为100%。SAX-HPLC-ICP-MS测定结果表明,在富硒广东虫草子实体中,硒能够以SeMet、SeCys₂、SeMeCys等形式存在。CPS-Se的体外抗氧化活性显著高于CPS ($P<0.01$),表现为在同一质量浓度下,对DPPH、ABTS⁺和羟基自由基的清除能力、总还原能力以及总抗氧化能力均有显著提高,且呈现良好的剂量依赖性。这为广东虫草今后的开发利用提供了一个方向,也为虫草多糖库又添加了一种珍贵的食用性资源。在本研究中,进行体外抗氧化活性评估的粗多糖样品尚残留部分蛋白质,后续的实验中还需对样品做进一步的提纯,并通过体内抗氧化实验深入探究其抗氧化作用的机制,为临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] HOSSAIN A, SKALICKY M, BRESTIC M, et al. Selenium biofortification: roles, mechanisms, responses and prospects [J]. *Molecules*, 2021, 64(4): 881.
- [2] 张勇胜,李仁兰,刘妍,等.硒对人体健康作用的研究进展[J].*内科*,2018,13(4):623-625,662.
- [3] 闫文娟,李泰辉,姜子德.比色法测定广东虫草虫草酸含量[J].*食用菌*,2010,32(5):73-74,78.
- [4] 黄虹,闫文娟,张成花,等.广东虫草安全性评价及药理学研究进展[J].*菌物研究*,2019,17(2):110-115.
- [5] ZENG H, LI T, SONG B, et al. Study on antioxidant activity of *Cordyceps guangdongensis* [J]. *Natural Product Research*, 2009, 21: 201-204.
- [6] YAN W, LI T, ZHONG Z. Anti-inflammatory effect of a novel food *Cordyceps guangdongensis* on experimental rats with chronic bronchitis induced by tobacco smoking [J]. *Food & Function*, 2014, 5(10): 2552-2557.
- [7] YAN W, LI T, LAO J, et al. Anti-fatigue property of *Cordyceps guangdongensis* and the underlying mechanisms [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51(5): 614-620.
- [8] LIN Q, SONG B, HUANG H, et al. Optimization of selected cultivation parameters for *Cordyceps guangdongensis* [J]. *Letters Applied Microbiology*, 2010, 51(2): 219-225.
- [9] 凌宏通,宋斌,林群英,等.富硒食用菌的研究进展[J].*微生物杂志*,2008,28(4):78-84.
- [10] KIM G, KIM J, RHIE J, et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Experimental Neurobiology*, 2015, 24(4): 325-340.

- [11] KUMARI NEHA, MD RAFI HAIDER, ANKITA PATHAK, et al. Medicinal prospects of antioxidants: a review [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 178: 687-704.
- [12] JING Y, ZHU J, LIU T, et al. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative [J]. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2015, 63(13): 3464-3471.
- [13] ZHU Y, YU X, GE Q, et al. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 394-400.
- [14] LIU R, DAI R, LUO Y, et al. Glucose-lowering and hypolipidemic activities of polysaccharides from *Cordyceps taii* in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *BMC Complement and Alternative Medicine*, 2019, 19(1): 230.
- [15] 覃丽霞,王玉芹,李春如,等.蝉棒束孢菌孢梗束培植过程中主要成分含量的变化规律及其复方对小鼠睡眠的影响[J].*菌物学报*,2020,39(2):362-371.
- [16] GB 5009.268-2016,食品安全国家标准 食品中多元素的测定[S].
- [17] GB 1903.22-2016,食品安全国家标准 食品营养强化剂富硒食用菌粉[S].
- [18] 中华全国供销合作总社.GH/T 1135-2017,富硒农产品[S].北京,2017.
- [19] GARY BAÑUELOS, IRVIN ARROYO, INGRID PICKERING, et al. Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched hyperaccumulator *Stanleya pinnata* [J]. *Food Chemistry*, 2015, 166: 603-608.
- [20] GB 5009.5-2016,食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
- [21] OM P SHARMA, TEJ K B. DPPH antioxidant assay revisited [J]. *Food Chemistry*, 2008, 113(4): 1202-1205.
- [22] MYRNA A DESEO, AARON ELKINS, SIMONE ROCHFORT, et al. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract [J]. *Food Chemistry*, 2020, 314(Jun 1): 126180.1-123180.10.
- [23] SMIRNOFF N, CUMBES J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [24] ZHAO C, LI X, MIAO J, et al. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 847-856.
- [25] ZHU Y, YU X, GE Q, et al. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 394-400.
- [26] 马国良,马琪,看措,等.不同浓度硒对蛹虫草菌丝生长发育的影响[J].*安徽农业科学*,2011,39(30):18539-18541, 18547.
- [27] DONG Z, XIAO Y, WU H. Selenium accumulation, speciation, and its effect on nutritive value of *Flammulina velutipes* (golden needle mushroom) [J]. *Food Chemistry*, 2021, 350(15):128667.
- [28] HU T, HUI G, LI H, et al. Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its *in vitro* bioaccessibility [J]. *Food Chemistry*, 2020, 331(Nov.30): 127287.
- [29] HU T, LI L, HUI G, et al. Selenium biofortification and its effect on multi-element change in *Auricularia auricular* [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295(Oct.15): 206-213.
- [30] ZHAO L, ZHAO G, ZHAO Z, et al. Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma* [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52(12): 3954-3959.
- [31] MAREK KIELISZEK, KATARZYNA BIERLA, JAVIER JIMENEZ-LAMANA, et al. Metabolic response of the yeast *Candida utilis* during enrichment in selenium [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5287.
- [32] MAREK KIELISZEK, STANISLAW BŁAZEJAK, ANNA BZDUCHA-WROBEL, et al. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(2): 1797-1808.
- [33] 张园园,王勇,李悦,等.秦巴山区富硒蛹虫草有效成分及硒存在形态分析[J].*菌物研究*,2020,18(3):189-194.
- [34] 田宗旺,李想,刘彦威.外源硒对冬虫夏草耳型菌核的硒含量及硒形态的影响[J].*食用菌*,2022,44(2):58-61.
- [35] 张驰.富硒虫草中硒的赋存形态及分布特点[J].*食品科学*,2009,30(23):193-195.
- [36] 陈尚龙,刘辉,张建萍,等.富硒蛹虫草中有机硒的分析[J].*食品研究与开发*,2018,39(9):113-117.
- [37] MAREK KIELISZEK, STANISLAW BŁAZEJAK, IWONA GIENKA, et al. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99 (13): 5373-5382.
- [38] M R CALOMME, K VAN DEN BRANDEN, D A VANDEN BERGHE. Selenium and *lactobacillus* species [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(3): 331-340.
- [39] 姚艳婷,杨小兵,陈旭洁,等.富硒蛹虫草多糖的结构表征及体外免疫调节活性[J].*食品科学*,2023,44(22):39-48.

- [40] ZHU J, YU C, HAN Z, et al. Comparative analysis of existence form for selenium and structural characteristics in artificial selenium-enriched and synthetic selenized green tea polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1408-1418.
- [41] YANG M, WANG K. Exploration for a natural selenium supplement-characterization and bioactivities of Se-containing polysaccharide from garlic [J]. *J Chinese Pharmac Sci*, 1992, 1(1): 28-32.
- [42] 尚德静. 灵芝有机硒的生物转化及灵芝硒多糖的硒活性结构分析、抑癌作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 1999.
- [43] 张金荣, 卢士玲, 罗瑞峰, 等. 富硒葡萄中硒多糖的分离纯化及抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 116-124.
- [44] ZHOU NING, LONG HAIRONG, WANG CHENGHUA, et al. Characterization of selenium-containing polysaccharide from *Spirulina platensis* and its protective role against Cd-induced toxicity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 2465-2476.
- [45] T IKEMOTO, T KUNITO, H TANAKA, et al. Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver [J]. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 2004, 47(3): 402-413.
- [46] DONG Z, DONG G, LAI F, et al. Purification and comparative study of bioactivities of a natural selenized polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelia [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 190(6): 101-112.
- [47] MA L, ZHAO Y, YU J, et al. Characterization of Se-enriched *Pleurotus ostreatus* polysaccharides and their antioxidant effects *in vitro* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 421-429.