

榆黄菇菌丝体产麦角硫因发酵与提取工艺优化

顾仪, 王杰*, 连玲丹, 郑紫柔, 程瑞, 钟武杰

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 麦角硫因 (Ergothioneine, EGT) 是一种富含于食用菌的天然抗氧化剂, 但天然来源 EGT 存在产量低和提取效率不高等问题, 其规模化生产受限。为提高榆黄菇 (*Pleurotus citrinopileatus*) 菌丝体 EGT 的合成与提取效率, 本研究采用单因素试验与正交试验相结合的方法, 以 EGT 合成量为指标, 系统考察培养环境及培养基组分对发酵工艺的影响; 以 EGT 提取量为指标, 对提取工艺的料液比、提取温度、提取时间等关键参数进行优化。结果表明, 优化后榆黄菇菌丝在含质量分数 2%甘露糖醇、0.3%酪蛋白胨、0.1% KH_2PO_4 、0.03% VB_2 及 Phe 浓度 3 mmol L^{-1} 培养基中于温度 27 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 210 r min^{-1} 、装液量 100 mL/250 mL、初始 pH 值 8.5 条件下培养, EGT 合成量最高达 16.89 mg g^{-1} dw。基于基础培养基, 在料液比 1:30 (g:mL)、提取时间 1.5 h、提取温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇体积分数 60%提取条件下, EGT 提取量达 1.64 mg g^{-1} dw, 且料液比是影响提取效率的最关键因素。此外, 本研究首次发现 VB_2 与 KH_2PO_4 对 EGT 合成具有潜在调控价值。综上, 本研究建立了一套高效协同的发酵与提取工艺, 其参数稳定可靠, 为榆黄菇菌丝体 EGT 的高效制备提供了参考依据。

关键词: 榆黄菇; 麦角硫因; 发酵工艺; 提取工艺; 单因素试验; 正交试验

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0313

Optimization of Fermentation and Extraction Processes for Ergothioneine

Production from *Pleurotus Citrinopileatus* Mycelium

GU Yi, WANG Jie*, LIAN Lingdan, ZHENG Zirou, CHENG Rui, ZHONG Wujie

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Ergothioneine (EGT) is a natural antioxidant abundant in edible fungi. However, the low yield and extraction efficiency from natural sources of EGT limit its large-scale production. To improve the synthesis and extraction efficiency of EGT from *Pleurotus citrinopileatus* mycelium, a combination of single-factor tests and orthogonal experiments was employed in this study, using EGT biosynthesis yield as the index, the effects of culture environment and medium components on the fermentation process were systematically investigated. Meanwhile, key parameters of the extraction process such as solid-liquid ratio, extraction temperature, and extraction time were optimized with EGT extraction yield as the index. The results showed that the highest EGT yield of 16.89 mg g^{-1} dw was achieved when *Pleurotus citrinopileatus* mycelium was cultured under the conditions of temperature 27 $^{\circ}\text{C}$, rotation speed 210 r min^{-1} , liquid volume 100 mL/250 mL, initial pH value of 8.5, and the medium containing 2% mannitol, 0.3% casein peptone, 0.1% KH_2PO_4 , 0.03% VB_2 and 3 mmol L^{-1} phenylalanine. Based on basic medium, under the conditions of solid-liquid ratio 1:30 (g:mL), extraction time 1.5 h, extraction temperature 60 $^{\circ}\text{C}$, and ethanol concentration 60%, the EGT extraction yield reached 1.64 mg g^{-1} dw, and the solid-liquid ratio was identified as the most critical factor affecting extraction efficiency. Furthermore, this study first discovered that VB_2 and KH_2PO_4 exert potential regulatory value on EGT biosynthesis. In conclusion, a highly efficient and synergistic fermentation and extraction process was established with stable and reliable parameters, which can provide a reference basis for the efficient preparation of EGT from *Pleurotus citrinopileatus* mycelium.

Key words: *Pleurotus citrinopileatus*; ergothioneine; fermentation process; extraction process; single factor test; orthogonal test

麦角硫因 (Ergothioneine, EGT) 是一种安全、无毒的天然含硫咪唑类氨基酸衍生物, 主要由真菌、细菌等微生物合成^[1], 动植物自身无法合成但可通过饮食摄取^[2,3]。EGT 作为一种高效的天然抗氧化剂, 可通过清除体内

收稿日期: 2026-03-04; 修回日期: 2026-04-19; 接受日期: 2026-04-20

基金项目: 广东省财政专项种业振兴行动项目 (2025-WBH-00-001); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (农业微生物) (2026CXTD04)

作者简介: 顾仪 (2001-), 女, 硕士, 研究方向: 食用菌育种与加工, E-mail: 917696904@qq.com

通讯作者: 王杰 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食药菌遗传育种、贮藏保鲜与加工, E-mail: wjcasey@scau.edu.cn

活性氧自由基、抑制脂质过氧化反应及保护细胞免受氧化应激损伤等机制发挥抗炎、抗凋亡等作用^[4-6]，在延缓衰老及预防慢性疾病等方面发挥重要生理功能^[7,8]，因此在功能性食品、医药保健、化妆品等领域具有极高的应用价值和广阔的市场前景^[9]。

榆黄菇 (*Pleurotus citrinopileatus*) 是我国常见的一种食药两用真菌^[10]，具有生长周期短、适应性强、培养成本较低等优势。研究发现，榆黄菇体内可高效合成并积累 EGT，相较于金针菇、平菇和香菇等常见食用菌，榆黄菇是更为经济、环保且可持续的 EGT 生物合成原料，具有重要的开发利用潜力^[11]。目前，有关提升榆黄菇 EGT 产量的研究多侧重于培养基组分筛选和前体物质添加，该方法下可使 EGT 产量获得初步提升^[12]。近年来，研究者还采用诱变育种^[13]与代谢工程^[14]等技术，在 EGT 产量方面取得了更为明显的突破。在 EGT 提取工艺方面，相关研究开始向绿色化方向发展，其中，低共熔溶剂 (DES) 法的应用为 EGT 的高效、环保提取提供了新思路^[15]。然而，现有研究尚未围绕榆黄菇菌丝体 EGT 的发酵与提取工艺协同优化，其发酵工艺不完善导致的产量低、提取工艺不合理造成 EGT 损失严重等问题，使得其规模化生产与工业化应用受限。

基于此，本研究以榆黄菇菌丝体为研究对象，以提高 EGT 合成量与提取效率为目标，系统开展 EGT 发酵与提取工艺优化研究。通过单因素试验探究发酵培养基各组分、提取关键参数对 EGT 产量及提取效果的影响，再结合正交试验进一步优化工艺参数，明确最优发酵与提取条件组合，旨在提高榆黄菇菌丝体 EGT 的合成量与提取效率，为榆黄菇菌丝体 EGT 的高效制备提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

供试菌株：榆黄菇斜面培养基菌种（由华南农业大学食品学院食用菌实验室保藏）。

供试培养基 (g L^{-1})：PDA 固体培养基（去皮马铃薯 200、葡萄糖 20、琼脂 20）；种子液培养基（去皮马铃薯 200、葡萄糖 20）；基础培养基（去皮马铃薯 200、葡萄糖 20），121 °C 灭菌 20 min 后，冷却备用。

供试试剂：麦角硫因标准品，美国 Sigma 公司；甲醇 (HPLC 级)，天津星马克科技发展有限公司； MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 及培养基组分等常规试剂均购自国药集团化学试剂有限公司，纯度均为分析纯 (AR)。

1.2 仪器与设备

KLCZ-880A 型超洁净工作台，江苏苏州净化设备有限公司；THZ-98A 恒温摇床，上海一恒科学仪器有限公司；SPX-150B-Z 型生化培养箱，上海博迅实业有限公司；H3-18KR 台式高速冷冻离心机，湖南可成仪器设备有限公司；HH-2 数显恒温水浴锅，郑州长城科工贸有限公司；DSX-18L-1 手提式高压蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械有限公司；FSH-2A 可调高速匀浆仪，上海旌派仪器有限公司；VCX800 超声波细胞破碎仪，上海珂淮仪器有限公司；LC-20A 高效液相色谱仪，沃特世科技（上海）有限公司 (waters)。

1.3 试验方法

1.3.1 保藏菌种的复壮

将保藏的榆黄菇菌种用菌种铲切取 0.5~1 cm 菌块从斜面培养基取出，无菌接种至 PDA 固体培养基中，置于 25 °C 恒温培养箱中培养至菌丝满板，挑选菌丝粗壮、洁白、菌丝较多且没有污染的 PDA 平板作为后续试验的发酵菌种。

1.3.2 种子液的制备

用直径 5 mm 打孔器打取 PDA 固体培养基上的菌丝块，接种 10 块菌丝块至 100 mL 种子液体培养基中（含 8 颗玻璃珠），置于 28 °C、180 r min^{-1} 恒温摇床培养 3 d。

1.3.3 液体发酵培养

将培养好的榆黄菇种子液按 5% 接种量 (V/V) 接种到 200 mL PDB 发酵液体培养基中，置于 28 °C、180 r min^{-1} 恒温摇床连续发酵培养 14 d。

1.3.4 麦角硫因的提取

参考 Cremades 等^[16]的方法，并略作修改。发酵培养结束后，榆黄菇菌丝体过滤除去培养基，收集菌丝体，

经冷冻干燥后向菌丝体中加入 80%乙醇溶液,采用高速均质机于 20 000 r min⁻¹ 条件下均质 1 min,后用超声细胞破碎仪于功率 200 W 条件下破碎 20 min,10 000 r min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后,置于 4 ℃ 保存备用。

1.3.5 麦角硫因含量的测定及标准曲线的绘制

参考鄂恒超等^[17]的方法,并略作修改。EGT 标准储备液的配制:将 1 mg 麦角硫因标准品用 1 mL 去离子水溶解,制成质量浓度为 1 g/L 的标准品储备液,于 -20 ℃ 保存备用。麦角硫因标准溶液的配制:将储备液用体积分数为 50% 的甲醇分别配置成质量浓度为 0、5、25、50、100 和 200 mg L⁻¹ 的麦角硫因标准品溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,于 4 ℃ 保存,待检。标准品与待测样液均采用高效液相色谱(HPLC)法测定;以麦角硫因标准溶液的质量浓度(mg L⁻¹)为横坐标,以峰面积(μAU·s)为纵坐标,绘制麦角硫因标准曲线,并进行线性回归分析,得线性回归方程为 $y=35\ 670x+6\ 762.7$, 相关系数 $R^2=0.999\ 6$, 说明该方程在 0~200 mg L⁻¹ 范围内线性关系良好,可用于待测样液中麦角硫因浓度的计算。

检测条件:色谱柱:Shimadzu AQ-C18 (250 mm×4.60 mm, 5 μm),柱温:30 ℃;流动相:水:甲醇=90:10 (V/V),流量:1 mL min⁻¹,检测波长:254 nm,进样量:20 μL。

1.3.6 榆黄菇菌丝产麦角硫因发酵工艺优化

1.3.6.1 培养环境单因素试验

在基础发酵培养基的基础上,按上述 1.3.3 节的方法培养榆黄菇菌丝体,采用单因素试验验证方法分别考察发酵培养基不同摇床温度(23、25、27、29、31 ℃)、摇床转速(150、170、190、210、230 r min⁻¹)、装液量(250 mL 具塞锥形瓶)(60、80、100、120、140 mL)与 pH 值(6、7、8、9、10)4 个因素对 EGT 产量的影响,每组试验重复 3 次。

1.3.6.2 培养基组分单因素试验

在基础发酵培养基的基础上,按上述 1.3.3 节的方法培养榆黄菇菌丝体,采用单因素试验验证方法分别考察不同碳源(蔗糖、可溶性淀粉、甘油、麦芽浸粉、果糖、麦芽糖、甘露糖醇、环糊精、山梨糖醇、马铃薯葡萄糖水)、氮源(蛋白胨、酵母浸膏、黄豆饼粉、玉米浆干粉、胰蛋白胨、酪蛋白胨、尿素、硫酸铵)、无机盐(MgSO₄、NaCl、KH₂PO₄、MgCl₂、CaCO₃)、维生素(VB₁、VB₂、VB₃、VB₇、VB₁₂、VC)及氨基酸(天冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)、精氨酸(Arg)、羟脯氨酸(Hyp)、苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、半胱氨酸(Cys))5 个因素对 EGT 产量的影响,每组试验重复 3 次。

1.3.6.3 培养基组分添加浓度单因素试验

基于发酵培养基条件优化配方,设置发酵条件优化的单因素试验。考察不同质量分数的碳源(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、氮源(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)、无机盐(0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%)、维生素(0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%)及不同添加浓度的氨基酸(1、2、3、4、5 mmol L⁻¹)对 EGT 产量的影响,每组试验重复 3 次。

1.3.6.4 发酵工艺正交试验设计

根据单因素试验结果,选取发酵条件对生产 EGT 及菌丝体生长影响最大的五个因素,设计 L₁₆(4⁵)拟水平正交试验,确定最优发酵条件组合,每组试验组重复 3 次。试验因素及水平见表 1:

表 1 L₁₆(4⁵)拟水平正交试验因素水平表

Table 1 L ₁₆ (4 ⁵) orthogonal experimental design with dummy levels					
水平	因素				
	A 甘露糖醇/%	B 酪蛋白胨/%	C Phe/(mmol L ⁻¹)	D KH ₂ PO ₄ /%	E VB ₂ /%
1	1.5	0.1	3	0.1	0.01
2	2	0.2	4	0.15	0.02
3	2.5	0.3	5	0.2	0.03
4	1.5	0.1	3	0.1	0.01

注:水平 4 为各因素水平 1 的拟水平重复。

1.3.7 榆黄菇菌丝麦角硫因提取工艺优化

1.3.7.1 提取工艺单因素试验

在基础发酵培养基的基础上,按上述 1.3.3 节的方法培养榆黄菇菌丝体,采用单因素试验验证方法分别考察不同乙醇体积分数(0、20%、40%、60%、80%、100%)、提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5、3 h)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g:mL)、提取温度(50、60、70、80、90、100 ℃)、超声时间(5、10、15、20、25、30 min)及 pH 值(4、5、6、7、8、9) 6 个因素对榆黄菇菌丝体内 EGT 提取量的影响,每组试验重复 3 次。

1.3.7.2 提取工艺正交试验设计

在单因素试验的基础上选取 4 个对榆黄菇菌丝体 EGT 提取影响较大的因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,获取最佳工艺参数。试验因素及水平见表 2:

表 2 正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平表

水平	因素			
	A 料液比/(g:mL)	B 提取时间/h	C 提取温度/℃	D 乙醇体积分数/%
1	1:20	0.5	50	60
2	1:25	1	60	70
3	1:30	1.5	70	80

1.4 数据统计与分析

所有实验数据均以均值±标准差(mean±SD)表示。组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合最小显著差异(LSD) t 检验进行评估,其中 $P<0.05$ 视为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 培养环境对 EGT 合成的影响

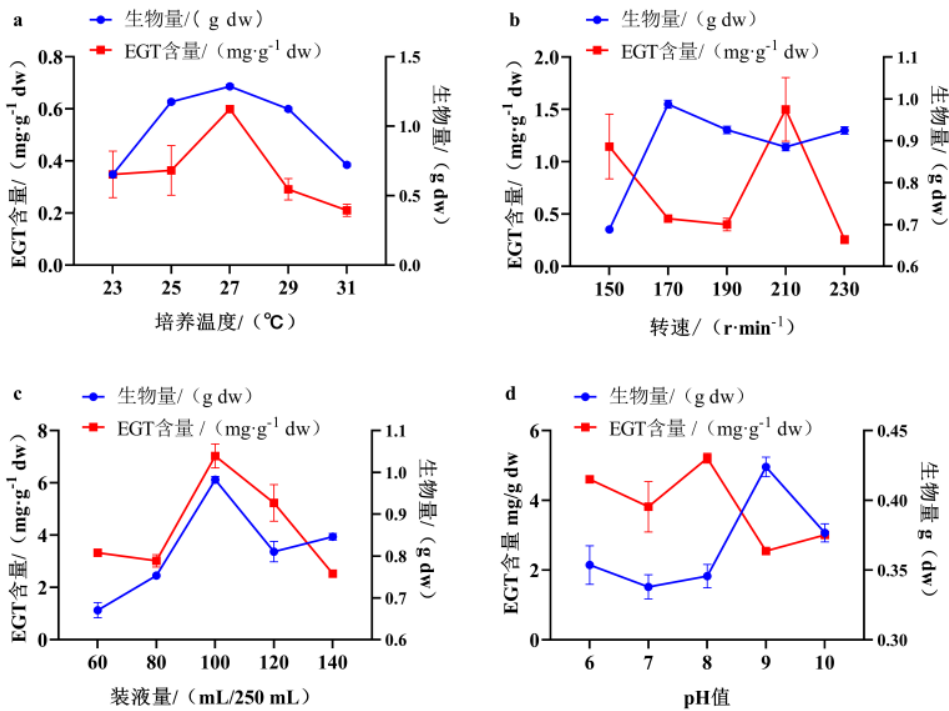


图 1 培养环境对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及麦角硫因含量的影响

Fig.1 Effect of culture environment on mycelium biomass and ergothioneine content of *Pleurotus Citrinopileatus* in liquid fermentation

注: a~d 分别为培养温度、转速、装液量、pH 值对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及 EGT 含量的影响。

由图 1 可知,不同培养条件下榆黄菇菌丝 EGT 产量存在明显差异。其中,培养温度对菌丝生长与 EGT 积累

的影响具有协同作用, 27 °C时菌丝生物量与 EGT 含量均达到最高。这与 Lin 等^[18]报道的榆黄菇深层发酵培养最适温度为 25 °C 结果略有差异, 可能与菌株特性或培养基组分不同有关, 但该温度仍在 25~27 °C 间, 说明该温度范围有利于榆黄菇菌丝生长及 EGT 合成, 实际生产中可将培养温度控制在此范围内。EGT 合成与氧化应激响应相关, 培养基内溶氧浓度较高时有利于 EGT 积累^[19]。摇床转速 170 r min⁻¹ 下菌丝生物量最高但 EGT 积累较少, 仅为 0.46 mg g⁻¹ dw; 而 210 r min⁻¹ 时 EGT 积累量增加, 达 1.50 mg g⁻¹ dw, 且菌丝生物量保持中等水平。装液量为 100 mL/250 mL 时, 菌丝生物量与 EGT 积累量均表现最优。此外, 由于 EGT 生物合成途径中合成相关酶的最适 pH 值不同, 其合成对不同 pH 值的响应存在差异性^[20]。初始 pH 值为 8 时 EGT 积累量最高, 为 5.21 mg g⁻¹ dw, 但生物量较低; pH 值为 9 时有利于菌丝生长但 EGT 合成能力下降, 为 2.43 mg g⁻¹ dw。微生物生长发育过程中, 菌丝生长与次级代谢产物合成常存在代谢竞争^[21]。为实现菌丝生长与 EGT 积累量的协同优化, 提高 EGT 整体生产效率, 本研究在 pH 值 8~9 范围内选取 pH 值 8.5 作为后续发酵工艺优化的基准值。综上, 榆黄菇菌丝液体发酵最优条件为: 培养温度 27 °C、转速 210 r min⁻¹、装液量 100 mL/250 mL、初始 pH 值 8.5。

2.2 培养基组分对 EGT 合成的影响

2.2.1 培养基组分的单因素试验结果

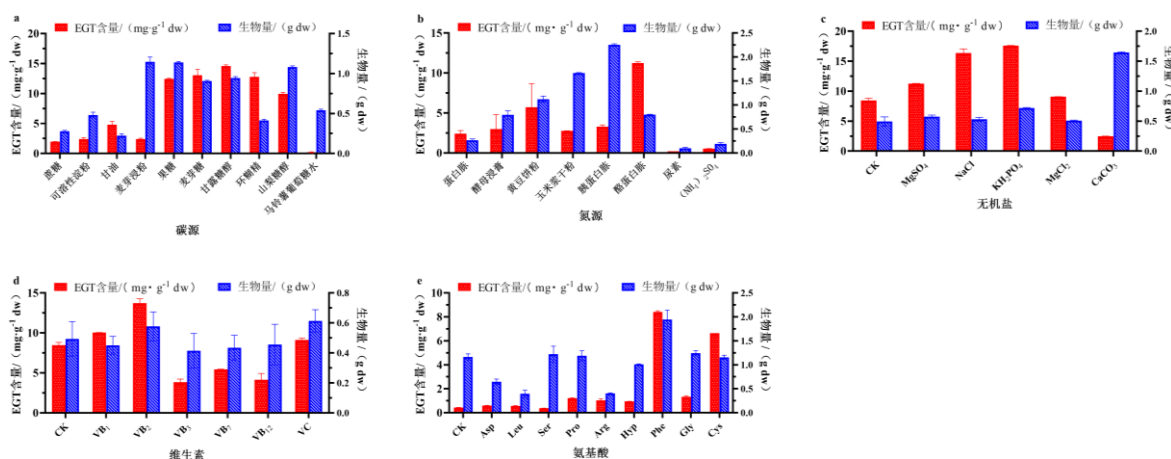


图 2 不同培养基组分对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及麦角硫因含量的影响

Fig.2 Effects of different medium components on mycelium biomass and ergothioneine content of *Pleurotus Citrinopileatus* in liquid fermentation

注: a~e 分别为不同碳源、氮源、无机盐、维生素、氨基酸种类对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及 EGT 含量的影响。

由图 2 可知, 不同碳源对菌丝生物量和 EGT 含量影响显著。碳源为甘露糖醇时, 菌丝生物量 (0.94 g dw) 与 EGT 含量 (14.59 mg g⁻¹ dw) 均保持较高水平。与 Chen 等^[22]在虎奶菇深层发酵研究中发现甘露糖醇作为唯一碳源对其菌丝生长及 EGT 积累具有协同作用结果一致。氮源中, 酪蛋白胨可显著提高 EGT 积累, 达 11.26 mg g⁻¹ dw。酪蛋白胨作为复合有机氮源, 富含组氨酸、半胱氨酸等 EGT 前体氨基酸及生长因子, 既为 EGT 合成提供直接前体物质, 又能促进 EGT 合成关键酶 (如 EgtB、EgtD) 的表达, 从而显著提升 EGT 含量^[23]。无机盐筛选中, CaCO₃ 可促进菌丝生长, 却对 EGT 合成产生显著抑制。这可能由于 CaCO₃ 作为缓冲盐可维持发酵体系 pH 稳定, 为菌丝生长提供适宜环境, 但过量 Ca²⁺ 可能通过钙-钙调蛋白复合物抑制 EGT 合成关键酶活性, 导致碳代谢优先保证菌丝生长而非次级代谢产物积累^[24]。此外, MgSO₄ 和 KH₂PO₄ 可提高 EGT 积累。这一现象可能源于 KH₂PO₄ 作为磷源和缓冲成分及 Mg²⁺ 作为多种酶的辅助因子, 可通过调节能量代谢, 从而促进植物生长^[25]。维生素筛选中, VB₂ 对 EGT 积累的促进作用显著高于对照组及其他维生素组, EGT 含量达 13.73 mg g⁻¹ dw。VB₂ 作为黄素辅酶的前体, 参与氧化还原反应, 可通过调控胞内氧化还原状态间接促进 EGT 积累。前体氨基酸的添加 (如组氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸等) 对榆黄菇 EGT 合成具有显著影响^[26]。该研究对氨基酸筛选中, Phe 与 Cys 对 EGT 的积累同样具有较强促进作用, EGT 含量分别为 8.42 mg g⁻¹ dw 和 6.65 mg g⁻¹ dw, 且 Phe 更利于菌丝生长 (1.94 g dw)。综上, 后续选用甘露糖醇、酪蛋白胨、KH₂PO₄、VB₂ 和 Phe 作为发酵培养基的主要成分。

2.2.2 培养基组分添加量的单因素试验结果

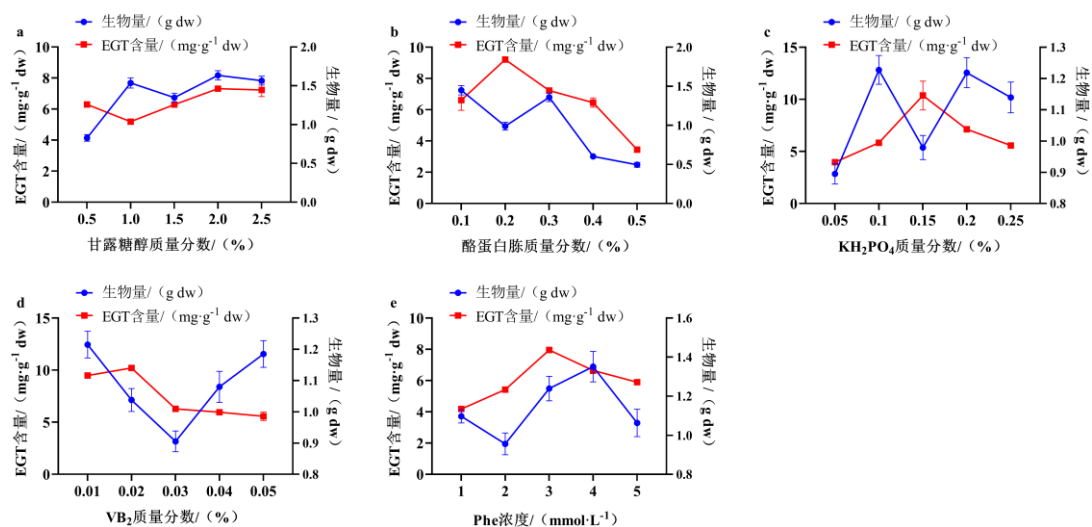


图 3 不同培养基组分添加量对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及麦角硫因含量的影响

Fig.3 Effects of different medium additions concentrations on mycelium biomass and ergothioneine content of *Pleurotus Citrinopileatus* in liquid fermentation

注：a~e 分别为甘露糖醇、酪蛋白胨、KH₂PO₄、VB₂、Phe 不同添加量对液态发酵榆黄菇菌丝生物量及 EGT 含量的影响。

适宜的碳氮比可为微生物生长提供充足营养，过量时则易引起 C/N 比失衡，影响次级代谢产物合成^[27,28]。单因素试验结果表明（图 3），各营养因子对榆黄菇菌丝生长与 EGT 积累均呈现典型的浓度依赖效应。其中，甘露糖醇为 2% 时 EGT 积累量最高，达 7.32 mg g⁻¹ dw，过低则碳源供给不足，过高则抑制 EGT 合成；酪蛋白胨为 0.2% 时 EGT 产量达到峰值 9.21 mg g⁻¹ dw，超过该浓度时 C/N 比降低，氮代谢流优先保证菌丝生长，EGT 合成因底物竞争及反馈抑制而受限。此外，KH₂PO₄ 为 0.15% 时可满足菌丝磷代谢需求并维持胞内适宜离子强度，供给不足易引起能量代谢受阻，浓度过高则易引发胁迫抑制次级产物代谢^[29]；VB₂ 和 Phe 作为 EGT 合成的营养因子及调节因子，其浓度失衡均可通过反馈抑制限制 EGT 合成^[30]。综上，选取上述各因素最适添加水平（2% 甘露糖醇、0.2% 酪蛋白胨、0.15% KH₂PO₄、0.02% VB₂ 及 3 mmol L⁻¹ Phe）作为后续正交试验设计的基准水平。

2.2.3 发酵工艺的正交试验结果与方差分析

基于单因素试验结果，采用拟水平正交试验系统考察了 5 个关键因素对 EGT 合成的影响。由表 3 与图 4 可见，不同试验组间 EGT 含量差异显著。当培养基组成含质量分数为 2% 甘露糖醇、0.3% 酪蛋白胨、0.1% KH₂PO₄、0.03% VB₂ 及 Phe 浓度 3 mmol L⁻¹ 时（第 11 组），EGT 含量达到所有试验组中的最高值（16.89 mg g⁻¹ dw）。对其培养基组分分析发现，适宜的 C/N 比、充足的磷源及前体供应是 EGT 高效积累的重要条件。以第 11 组与第 15 组为例，后者碳源浓度较高但 EGT 含量仅达 1.34 mg g⁻¹ dw，提示 C/N 比失衡可能引起代谢竞争，从而限制 EGT 合成。此外，对比第 11 组与第 6 组发现，第 6 组中较高浓度的 Phe 和 KH₂PO₄ 并未能显著提高 EGT 产量，提示前体物质及磷源的过量供给可能通过反馈抑制或干扰能量代谢，使 EGT 合成受限。上述组间差异表明，EGT 的合成可能与菌丝体内氧化还原平衡、硫代谢及 EGT 合成前体供应密切相关，营养供给不足或配比失衡时均可导致次级代谢产物合成受限^[31]。方差分析结果进一步显示（表 4），在试验设定的浓度范围内，各因素对 EGT 含量的影响均未达到统计学上的显著水平（P>0.05）。但主体间效应检验中 VB₂（E，F=2.197）、KH₂PO₄（D，F=1.648）及酪蛋白胨（B，F=1.435）的 F 值相对较高，提示这三个因素对 EGT 合成可能存在的潜在调控作用，其作用机制有待后续进一步探究。

表 3 麦角硫因发酵工艺正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test on fermentation process of ergothioneine

实验 顺序	因素					
	A 甘露糖醇/%	B 酪蛋白胨/%	C Phe/(mmol L ⁻¹)	D KH ₂ PO ₄ /%	E VB ₂ /%	EGT 含量/(mg g ⁻¹ dw)
1	1.5	0.1	4	0.2	0.03	3.33±0.17 ^{def}
2	2.5	0.1	4	0.1	0.01	11.99±2.03 ^b

3	1.5	0.2	3	0.2	0.01	3.67±0.48 ^{def}
4	2	0.1	5	0.1	0.01	8.19±0.31 ^c
5	1.5	0.3	4	0.1	0.02	3.07±0.14 ^{ef}
6	1.5	0.1	5	0.15	0.03	1.90±0.19 ^{ef}
7	2.5	0.3	5	0.2	0.01	6.34±0.25 ^{cd}
8	1.5	0.3	3	0.15	0.01	7.92±0.30 ^c
9	1.5	0.2	5	0.1	0.02	3.12±0.00 ^{ef}
10	2	0.2	4	0.15	0.01	6.29±0.35 ^{cd}
11	2	0.3	3	0.1	0.03	16.89±1.42 ^a
12	2	0.1	3	0.2	0.02	2.51±0.18 ^{ef}
13	1.5	0.1	3	0.1	0.01	7.74±0.02 ^c
14	2.5	0.1	3	0.15	0.02	4.50±0.52 ^{de}
15	2.5	0.2	3	0.1	0.03	1.34±0.09 ^f
16	1.5	0.1	3	0.1	0.01	13.28±0.29 ^a

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异（ $P<0.05$ ）。

表 4 主体间效应检验

Table 4 Between-subjects effect test

源	III 类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	191.085 ^a	10	19.109	1.253	0.425
截距	251.578	1	251.578	16.492	0.010
A	17.755	2	8.877	0.582	0.593
B	43.779	2	21.890	1.435	0.322
C	12.260	2	6.130	.402	0.689
D	50.265	2	25.132	1.648	0.282
E	67.027	2	33.513	2.197	0.207
误差	76.274	5	15.255		
总计	898.006	16			
修正后总计	267.359	15			

a. $R^2=0.715$ ($R^2_{\text{adj}}=0.144$)

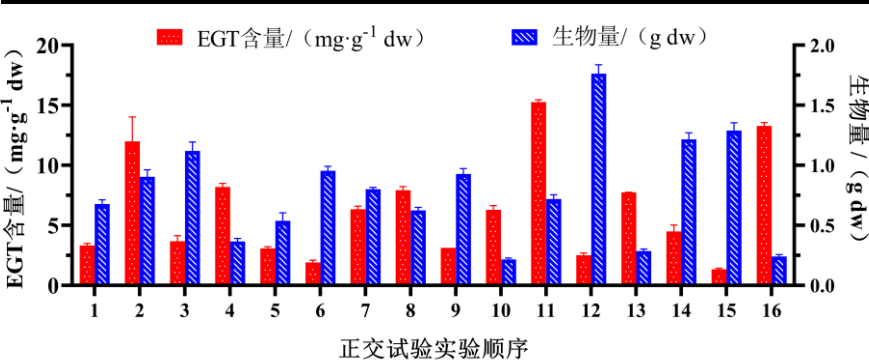


图 4 不同发酵工艺对榆黄菇菌丝生物量及麦角硫因含量的影响

Fig.4 Effects of different fermentation process on mycelium biomass and ergothioneine content in *Pleurotus Citrinopileatus*

2.3 提取条件对 EGT 提取量的影响

2.3.1 提取条件的单因素试验结果

基于基础培养基发酵获得的榆黄菇菌丝体，采用单因素试验考察不同提取条件对 EGT 提取效率的影响。由图 5 可知，料液比为 1:25 (g:mL) 时，EGT 提取量最高，达 0.87 mg g⁻¹ dw，但料液比继续增大至 1:30 时，EGT 提

取量无显著性提高。提取时间在 0.5~3 h 范围内对 EGT 的提取量影响不大 ($P>0.05$)。提取温度为 60 ℃ 时, EGT 提取量 ($0.88\text{ mg g}^{-1}\text{ dw}$) 显著高于其他温度 ($P<0.05$), 且温度超过 60 ℃ 时, EGT 提取量显著下降 ($P<0.05$)。提取溶剂体积分数在 0~80% 范围内, EGT 提取量随乙醇体积分数的提高而提高, 且在 80% 时 EGT 提取量达到最大值 ($1.07\text{ mg g}^{-1}\text{ dw}$), 而纯乙醇 EGT 提取量最低, 仅为 $0.68\text{ mg g}^{-1}\text{ dw}$, 提示可能过高的乙醇浓度会导致蛋白质变性或杂质共溶, 反而降低 EGT 提取率。超声辅助提取时间在 5~30 min 范围内, 对 EGT 提取量无显著性差异 ($P>0.05$)。中性 pH 条件下 (pH 值 6~7) EGT 提取效果较好, 过酸性 (pH 值 4~5) 或过碱性 (pH 值 8~9) 环境均导致 EGT 提取量下降。王艳辉等^[32]在大球盖菇麦角硫因的提取工艺研究中发现料液比、温度、提取溶剂对 EGT 提取效率具有显著影响, 且提取温度过高易导致其提取率下降。综上, 后续选用料液比、提取温度、提取溶剂及提取时间为提取工艺正交试验设计基准。

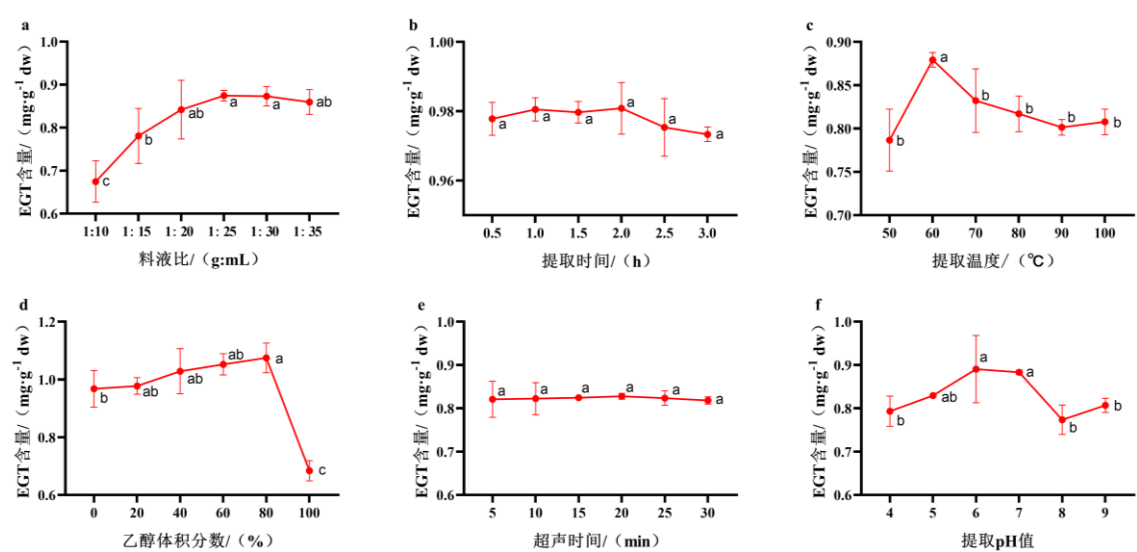


图 5 不同提取条件对液态发酵榆黄菇菌丝麦角硫因提取量的影响

Fig.5 Effects of different extraction conditions on ergothioneine content in *Pleurotus Citrinopileatus* mycelium in liquid fermentation

注: a~f 分别为料液比、提取时间、提取温度、乙醇体积分数、超声时间、提取 pH 值对液态发酵榆黄菇菌丝 EGT 提取量的影响。不同小写字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.3.2 提取工艺的正交试验结果与方差分析

由表 5 可知, 各因素对 EGT 提取效果影响的大小顺序为: (A) 料液比>(B) 提取时间>(C) 提取温度>(D) 乙醇体积分数, 其中料液比为主要影响因素 (极差 1.63)。结合 K 值分析, 确定最优提取组合为 $A_3 B_3 C_2 D_1$, 即料液比 1:30 (g:mL)、提取时间 1.5 h、提取温度 60 ℃、乙醇体积分数 60%, 该条件下 EGT 提取量可达 $1.64\text{ mg g}^{-1}\text{ dw}$, 较第 1 组 ($0.54\text{ mg g}^{-1}\text{ dw}$) 提高 203.7%。值得注意的是, 优化组合中体积分数为 60% 的乙醇时提取效果优于单因素试验结果中体积分数为 80% 的乙醇处理组。胡晶晶等^[33]在金针菇 EGT 的提取研究中同样发现, 体积分数 62% 乙醇为最适提取溶剂, 说明 EGT 在适当含水溶剂中溶解度更高。综上, 该提取参数不仅为基础培养基来源的 EGT 制备提供了高效方案, 更为后续高 EGT 菌丝体的规模化制备提供工艺基础。

表 5 麦角硫因提取工艺正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal test on extraction process of ergothioneine					
实验顺序	因素				
	A 料液比/(g:mL)	B 时间/h	C 提取温度/℃	D 乙醇体积分数/%	EGT 含量/(mg g ⁻¹ dw)
1	1:20	0.5	50	60	0.54±0.03
2	1:20	1	60	70	0.79±0.05
3	1:20	1.5	70	80	0.81±0.02
4	1:25	0.5	60	80	1.08±0.13
5	1:25	1	70	60	1.51±0.07

现代食品科技		Modern Food Science and Technology			2027, Vol.43, No.5
6	1:25	1.5	50	70	1.08±0.25
7	1:30	0.5	70	70	1.04±0.29
8	1:30	1	50	80	1.09±0.09
9	1:30	1.5	60	60	1.64±0.08
K1	2.14	2.66	2.71	3.69	
K2	3.67	3.39	3.51	2.91	
K3	3.77	3.53	3.36	2.98	
极差 (R)	1.63	0.87	0.8	0.78	
主次因素	A>B>C>D				
最优组合	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁				

3 结论

本研究采用不同培养环境及培养基组分, 利用单因素和正交试验系统优化了榆黄菇菌丝体液态发酵产麦角硫因的发酵工艺。结果表明, 榆黄菇菌丝体液态发酵产 EGT 的最佳培养环境为温度 27 ℃、转速 210 r min⁻¹、装液量 100 mL/250 mL、初始 pH 值 8.5; 最佳培养基组成为质量分数 2%甘露糖醇、0.3%酪蛋白胨、0.1% KH₂PO₄、0.03% VB₂ 及 Phe 浓度为 3 mmol L⁻¹, 在此优化条件下, EGT 产量最高可达 16.89 mg g⁻¹ dw。同时, 正交试验方差分析显示, VB₂、KH₂PO₄ 及酪蛋白胨的 *F* 值最高, 分别为 2.197、1.648 及 1.435, 说明该三个因素对 EGT 合成具有一定影响作用, 具体机制有待进一步探究。此外, 以基础培养基培养获得的榆黄菇菌丝体为原料, 优化并确定了 EGT 的最佳提取工艺为料液比 1:30 (g:mL)、提取时间 1.5 h、提取温度 60 ℃、乙醇体积分数 60%, 在此条件下, EGT 提取量达 1.64 mg g⁻¹ dw, 其中料液比是影响提取效率的最关键因素。该提取条件仅基于基础培养基菌丝体建立, 后续仍需进一步验证其对发酵优化后高 EGT 含量菌丝体的适用性, 以完善 EGT 高效制备的工艺体系。综上, 本研究成功建立了一套高效协同的榆黄菇菌丝体 EGT 发酵与提取工艺, 并首次发现 VB₂ 与 KH₂PO₄ 对 EGT 合成具有一定的促进作用和潜在调控价值, 为其后续的机制研究和进一步规模化生产与高效提取提供了参考依据。

参考文献

- [1] MARTINEZ-MEDINA G A, CHÁVEZ-GONZÁLEZ M L, VERMA D K, et al. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: ergothioneine and huitlacoche as recent trends [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 77: 104326.
- [2] EY J, SCHÖMIG E, TAUBERT D. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 55(16): 6466-6474.
- [3] ITO T, KATO M, TSUCHIDA H, et al. Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms [J]. Food Science and Technology Research, 2011, 17(2): 103-110.
- [4] STOFFELS C, OUMARI M, PERROU A, et al. Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2017, 113: 385-394.
- [5] PAHILA J, KANEDA H, NAGASAKA R, et al. Effects of ergothioneine-rich mushroom extracts on lipid oxidation and discoloration in salmon muscle stored at low temperatures [J]. Food Chemistry, 2017, 233: 273-281.
- [6] SAKATA S, KUNIMATSU R, TANIMOTO K. Protective effect of ergothioneine against oxidative stress-induced chondrocyte death [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2024, 13(7): 800.
- [7] APPAROO Y, PHAN C W, KUPPUSAMY U R, et al. Potential role of ergothioneine rich mushroom as anti-aging candidate through elimination of neuronal senescent cells [J]. Brain Research, 2024, 1824: 148693.
- [8] GAO W, WANG Y, WANG F H, et al. Ergothioneine exerts neuroprotective effects in parkinson's disease: targeting α -synuclein aggregation and oxidative stress [J]. Food Research International, 2025, 201: 115590.
- [9] LEI Z T, ZHONG W, ZHANG H J, et al. Ergothioneine as a promising natural antioxidant: bioactivities, therapeutic potential, and industrial applications [J]. Food & function, 2025, 16(19): 7473-7490.
- [10] 杨蒙.榆黄蘑研究进展[J].现代农业科技,2013,19:83-86.

- [11] KALARAS M D, RICHIE J P, CALCAGNOTTO A, et al. Mushrooms: a rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione [J]. Food Chemistry, 2017, 233: 429-433.
- [12] 杨林雷,沈真辉,罗祥英,等.食用菌麦角硫因的研究进展[J].生物工程学报,2025,41(2):574-587.
- [13] 冉思婷,张嘉琪,王杰.诱变技术选育高产麦角硫因的榆黄菇菌株[J].核农学报,2025,39(2):204-213.
- [14] LIU K, XIANG G D, LI L K, et al. Engineering non-conventional yeast *Rhodotorula toruloides* for ergothioneine production [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1): 65.
- [15] 夏张晨,孟晓慧,程俊文,等.金顶侧耳麦角硫因低共熔法提取工艺的优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2025,46(13):79-87.
- [16] CREMADES O, DIAZ-HERRERO M M, CARBONERO-AGUILAR P, et al. White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology [J]. Food Bioscience, 2015, 10: 42-47.
- [17] 鄂恒超,冯路路,赵晓燕,等.超高效液相色谱法测定食用菌中 L-麦角硫因及质谱确证[J].分析实验室,2022,41(5):529-534.
- [18] LIN S Y, CHIEN S C, WANG S Y, et al. Submerged cultivation of mycelium with high ergothioneine content from the Culinary-medicinal golden oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (Higher Basidiomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2015, 17(8): 749-761.
- [19] LI W Y, WENG Y W, MA H G, et al. Improving ergothioneine content in *Pleurotus citrinopileatus* through two-stage oxidative stimulus strategy [J]. Bioresource Technology, 2025, 431: 132630.
- [20] XIONG K X, GUO H, XUE S Y, et al. Production optimization of food functional factor ergothioneine in wild-type red yeast *Rhodotorula mucilaginosa* DL-X01 [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(7): 1.
- [21] LIU L X, DING D Q, WANG H Y, et al. Balancing cell growth and product synthesis for efficient microbial cell factories [J]. Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 2025, 12(40): e10649.
- [22] CHEN L, ZHANG Z M, GUAN Z H, et al. Enhanced ergothioneine production in *Pleurotus tuber-regium* through submerged fermentation optimization and selenium-driven mechanistic insights [J]. Food Bioscience, 2025, 66: 106146.
- [23] GHAREMANI-MAJID H, MUMIVAND H, KHANIZADEH P, et al. Optimizing ergothioneine biosynthesis and antioxidant activity in *Agaricus* spp. through amino acid supplementation and yeast-peptone mixtures [J]. Horticulturae, 2025, 11(4): 348.
- [24] MARTÍN J F. Interaction of calcium responsive proteins and transcriptional factors with the PHO regulon in yeasts and fungi [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2023, 11: 1225774.
- [25] 卜文宣,贾立国,樊明寿.镁元素营养研究现状及其在马铃薯生产上的展望[J].北方农业学报,2020,48(3):92-96.
- [26] 朱敏,郭迅,严川,等.不同硫源对榆黄菇深层发酵产麦角硫因的影响[J].生物加工过程,2025,23(3):279-285.
- [27] 黄健航.真姬菇菌丝培养的有机氮源筛选与添加量优化[J].食药菌,2026,34(1):65-70.
- [28] MASEKO K H, REGNIER T, WOKADALA O C, et al. Effect of Culture Media on the Yield and Protein Content of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm Mycelia [J]. International Journal of Food Science, 2024, 2024(1): 5562732.
- [29] TAN Y A, NING Y D, WANG S Y, et al. Multilayered Regulation of Fungal Phosphate Metabolism: From Molecular Mechanisms to Ecological Roles in the Global Phosphorus Cycle [J]. Life, 2025, 15(11): 1676.
- [30] 陈佳敏,王阳,堵国成,等.优化前体供给与细胞膜通透性强化大肠杆菌合成麦角硫因[J].食品与生物技术学报,2022,41(8):43-52.
- [31] 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.
- [32] 王艳辉,闫林林,李俊仁,等.响应面法优化大球盖菇麦角硫因的提取工艺及其体外抗氧化能力稳定性的考察[J].食品安全质量检测学报,2023,14(16):293-302.
- [33] 胡晶晶,张怡馨,王艳,等.响应面法优化金针菇麦角硫因的提取工艺[J].食品工业科技,2019,40(9):171-177.