

黄金菇生物强化B族维生素的生物合成 及其提取方法优化

王嘉伟¹, 阚绪甜², 袁铭¹, 刘果^{1,3}, 陈立平¹, 周勇², 曹庸¹, 何泽琪^{1*}, 肖苏尧^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665) (3. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510224)

摘要: 为了生物强化食品中的B族维生素, 该研究选用黄金菇作为实验对象, 通过添加氨基酸前体进行培养以获得高含量B族维生素, 并基于HPLC-MS/MS检测技术发展一次性提取黄金菇中多种B族维生素的方法。单独强化实验表明, 在分别使用质量浓度为100 mg·kg⁻¹ L-天冬氨酸、500 mg·kg⁻¹ β-丙氨酸和10 mg·kg⁻¹ L-谷氨酸时, 对应的维生素B₃、维生素B₅和维生素B₉的含量为88.78 mg/100 g、80.92 mg/100 g和85.78 mg/100 g, 相比对照组提高了1.21倍、1.64倍和1.09倍。选择甲酸+蛋白酶组合作为B族维生素的最佳提取方法, 并采用HPLC-MS/MS检测三者氨基酸联合处理的黄金菇中B族维生素的组成及含量, 结果显示强化效果优于单独处理培养, 其总含量为309.31 mg/100 g, 是对照组的2.48倍。综上所述, 通过在黄金菇培养过程中联合加入氨基酸可实现更优的生物强化B族维生素的效果, 且利用甲酸+蛋白酶的方法可提取更多的B族维生素, 这为食用菌生物强化B族维生素提供了理论依据和技术支持。

关键词: 黄金菇; 氨基酸; 生物强化; B族维生素; 提取技术

文章编号: 1673-9078(2026)5-305-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0280

Biofortification of B Vitamins in Golden Oyster Mushrooms and Optimization of Extraction Methods

WANG Jiawei¹, KAN Xutian², YUAN Ming¹, LIU Guo^{1,3}, CHEN Liping¹, ZHOU Yong²,

CAO Yong¹, HE Zeqi^{1*}, XIAO Suyao^{1*}

(1. College of Food Science, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510665, China)

(3. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510224, China)

Abstract: To enhance the biofortification of B vitamins in food, golden oyster mushrooms (*Pleurotus citrinopileatus*) were used as the experimental material. Amino acid precursors were added during mushroom cultivation to increase B-vitamin content. Additionally, a method for the simultaneous quantification of multiple B vitamins in golden oyster mushrooms was developed using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Single-factor fortification experiments

引文格式:

王嘉伟, 阚绪甜, 袁铭, 等. 黄金菇生物强化B族维生素的生物合成及其提取方法优化[J]. 现代食品科技, 2026, 42(5): 305-312.

WANG Jiawei, KAN Xutian, YUAN Ming, et al. Biofortification of B vitamins in golden oyster mushrooms and optimization of extraction methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 305-312.

收稿日期: 2025-02-28; 修回日期: 2025-05-18; 接受日期: 2025-05-23

基金项目: 广东省功能食品活性物重点实验室 (2018B030322010)

作者简介: 王嘉伟 (2000-), 男, 在读研究生, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: 1074274725@qq.com

通讯作者: 肖苏尧 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: xiaosy@scau.edu.cn; 共同通讯作者: 何泽琪 (1996-), 女, 在读博士生, 研究方向: 天然活性物分离纯化, 活性评价及作用机制, E-mail: 2190863578@qq.com

showed that optimal precursor concentrations of L-aspartic acid ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), β -alanine ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and L-glutamic acid ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) increased the contents of vitamins B₃, B₅, and B₉ to 88.78, 80.92, and 85.78 mg/100 g, respectively, corresponding to 1.21-, 1.64-, and 1.09-fold increases compared with those in the control group. A synergistic extraction system combining formic acid and protease was identified as the optimal extraction method. The composition and content of B vitamins in golden oyster mushrooms subjected to combined amino acid fortification were further analyzed using HPLC-MS/MS. The results showed that co-addition of the three amino acids produces a stronger fortification effect than single-factor treatments, resulting in a total B-vitamin content of 309.31 mg/100 g, which was 2.48-fold higher than that of the control group. In conclusion, amino acid co-fortification during cultivation effectively enhanced B-vitamin accumulation in golden oyster mushrooms, and the formic acid + protease method enabled efficient extraction. These findings provide theoretical support and technical guidance for B-vitamin biofortification in edible fungi.

Key words: golden oyster mushroom; amino acids; biofortification; B vitamins; extraction technology

B 族维生素是一类水溶性的小分子化合物，它们主要以辅酶的形式存在，参与人体多种代谢和合成反应^[1]。如果人体缺乏某种 B 族维生素，可能会导致相应的维生素缺乏症。例如，缺乏维生素 B₁ 会导致脚气病^[2]，缺乏维生素 B₃ 会导致糙皮病和痴呆^[3]，缺乏维生素 B₅ 则可能导致神经退行性病变和抑郁^[4]。B 族维生素大多数只能通过食物获取和补充，而现代人们的饮食结构的变化和饮食习惯的差异可能导致日常 B 族维生素的摄入量不足，当无法从食物中获得足够的 B 族维生素时，其常通过服用维生素制剂补充^[5]。目前市面上的 B 族维生素主要来源于人工合成和果蔬提取两类。人工合成成本较高，还可能产生一定的副作用，且对环境造成污染，因此通过生物合成提高膳食中 B 族维生素含量成为研究热点。

B 族维生素的生物强化技术已取得了一定的进展，常用的方法有基因代谢工程策略、育种优化、环境调节、代谢调控等^[6]。此外，研究发现，氨基酸可促进 B 族维生素的合成，提高其在生物体中的表达量。在维生素的生物合成和代谢中，氨基酸扮演着重要的角色，它们在生物强化维生素起到的作用主要是构成了维生素的主干、提供氨基、硫或甲基^[7]，如天冬氨酸被纳入维生素 B₃ 的合成前体之一^[8]，谷氨酸可转化为叶酸^[9]， β -丙氨酸参与 D-泛酸的合成途径^[10]；在脱氮假单胞菌发酵过程中添加谷氨酸、苏氨酸、甘氨酸和甲硫氨酸，可使菌体量和维生素 B₁₂ 含量显著提高^[11]。通过添加氨基酸增加 B 族维生素表达的方法具有操作方便、成本低、民众易于接受等特点，具有较好的应用前景，并得到了一定的发展。但是，通过添加氨基酸同时强化食用菌多种 B 族维生素的研究还鲜见报道。

目前食品中 B 族维生素的检测可参考国家标准^[12-18]，但由于不同样品的特性差异，B 族维生素的前处理方法也各不相同，导致操作繁琐且复杂。此外，现有的检测方法通常一次只能测定一种维生素。相比

之下，高效液相色谱串联质谱法具有快速、同时检测多种 B 族维生素的优势。然而，由于每种 B 族维生素的特性存在差异，样品的提取方法需要进行优化，以确保检测结果的准确性和可靠性。

食用菌作为生长快速、易于培养、具有良好的生物富集能力，作为生物强化对象具有天然优势。该研究前期通过筛选发现黄金菇中维生素 B₃、B₅、B₉ 含量较高，表明这三者在黄金菇中的表达具有优势，因此选用黄金菇作为研究对象，在其培养基中添加对应氨基酸，实现同时强化维生素 B₃、B₅、B₉ 的目的，并对维生素的提取方法进行优化，旨在为通过外源氨基酸实现生物强化 B 族维生素提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 主要实验试剂

B 族维生素标品 (VB₁、VB₂、VB₃、VB₅、VB₆、VB₉、VB₁₂) 和大鼠血清，均购自上海源叶生物科技有限公司；L-天冬氨酸、 β -丙氨酸、L-谷氨酸，均购自汇泉生物科技有限公司；淀粉酶 ($\geq 700 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)、木瓜蛋白酶 ($\geq 800 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)，购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 主要实验材料

黄金菇由中山市大利恒农业科技有限公司栽培。栽培基料配方为（按质量分数），棉籽壳 75%、麸皮 20%、玉米粉 3%、石膏 2%。

1.1.3 主要仪器与设备

JXFSTRP-32 全自动样品快速研磨仪，上海净信实业发展有限公司；AL104 万分之一电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；FD-1A-50 冷冻干燥机，中国北京博医康技术公司；HZQ-B 恒温培养摇床，金坛市精达仪器制造有限公司；LC-15C 高效液相

谱仪, 岛津有限公司; QTRAP 4500 高效液相色谱质谱联用仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄金菇单一强化VB₃、VB₅、VB₉的氨基酸添加量筛选

分别采用 L-天冬氨酸、 β -丙氨酸和 L-谷氨酸强化黄金菇中的 VB₃、VB₅ 和 VB₉, 方法如下: 根据黄金菇基料配方, 制成氨基酸添加量分别为 0、10、100、300、500 mg·kg⁻¹ 的培育基料, 每个浓度 10 个菌袋, 每袋装料约为 1.7 kg, 高压灭菌锅灭菌 1 h, 冷却后在超净工作台上接入黄金菇母种, 置于培养室, 保持温度 20~25 °C、湿度 60%~70% 进行培养。当白色菌丝在菌袋长满、菌袋上端开始有白色瘤状突起时, 将菌袋转移至出菇室, 温度 18~22 °C, 湿度 90%~95% 培养。待黄金菇子实体成熟时采摘, 冷冻干燥处理后研磨粉碎成菌粉, 置于 -20 °C 保存。分别采用国标方法^[14,15]和三酶法^[19]检测实验样品中的 VB₃、VB₅、VB₉ 含量, 筛选氨基酸的最佳强化添加量。

1.2.2 黄金菇联合强化VB₃、VB₅、VB₉实验

根据单独强化维生素的最佳添加量结果, 将最适添加量的 L-天冬氨酸、 β -丙氨酸、L-谷氨酸混合加入到黄金菇培育基料中, 以此强化方法获得的富集多种 B 族维生素的黄金菇简称为富维黄金菇。其余操作同 1.2.1, 待黄金菇子实体成熟时采摘, 冷冻干燥处理后研磨粉碎成菌粉, 置于 -20 °C 保存。

1.2.3 B族维生素提取方法优化

根据 B 族维生素水溶性强, 酸性条件下稳定, 部分 B 族维生素易与蛋白结合等特点, 建立以下 4 种提取方法, 筛选出其中提取效果最好的一种, 其中蛋白酶参考国家标准^[13,14]采用木瓜蛋白酶, 该酶广泛应用于植物源性食品的前处理, 在酸性条件下仍能保持较高活性。

(1) 甲酸提取: 称取复合培养的黄金菇菌粉和黄金菇菌粉各取 1 g 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入体积分数为 0.1% 的甲酸溶液 30 mL, 室温下超声波提取 20 min, 后经 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取出上清液, 继续加入体积分数为 0.1% 的甲酸溶液至 50 mL, 0.22 μ m 过滤器过滤, 进行 HPLC-MS/MS 检测。

(2) 甲酸 + 蛋白酶提取: 称取复合培养的黄金菇菌粉和黄金菇菌粉各取 1 g 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入体积分数为 0.1% 的甲酸溶液 30 mL, 室温下超声波提取 20 min, 加入 2 mg·mL⁻¹ 的蛋白酶溶液 2 mL, 37 °C 酶解 1 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取

出上清液, 继续加入体积分数为 1% 的甲酸溶液定容至 50 mL, 0.22 μ m 过滤器过滤, 进行 HPLC-MS/MS 检测。

(3) 等电点法提取: 称取复合培养的黄金菇菌粉和黄金菇菌粉各 1 g 置于离心管中, 加入约 30 mL 45~50 °C 纯水, 涡旋混匀 1 min, 超声 20 min。冷却后用盐酸调节 pH 值至 1.70, 放置 2 min, 再用 NaOH 调节 pH 值至 4.50, 转移至 50 mL 容量瓶中用水定容。4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 注入 HPLC-MS/MS 检测。整个过程避光。

(4) 等电点法 + 蛋白酶提取: 称取富维黄金菇菌粉和黄金菇菌粉各 1 g 置于离心管中, 加入约 30 mL 45~50 °C 纯水, 涡旋混匀 1 min, 加入 2 mg·mL⁻¹ 蛋白酶溶液 2 mL, 37 °C 酶解 1 h, 超声 20 min。冷却后用盐酸调节 pH 值至 1.70, 放置 2 min, 再用 NaOH 调节 pH 值 4.50, 转移至 50 mL 容量瓶中用水定容。4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 注入 HPLC-MS/MS 检测, 整个过程避光。

1.2.4 HPLC-MS/MS检测B族维生素

1.2.4.1 样品前处理

采用 1.2.3 最佳的提取方法对黄金菇的 B 族维生素进行提取, 然后采用 HPLC-MS/MS 进行检测。

1.2.4.2 标准溶液配置

(1) 维生素 B₁ 标准储备溶液: 称取维生素 B₁ 标准品 1 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中, 并用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容成 0.1 mg·mL⁻¹ 的维生素 B₁ 标准溶液, 4 °C 冰箱中避光贮存。

(2) 维生素 B₂ 标准储备溶液: 称取维生素 B₂ 标准品 1 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入少量水和 0.5 mL 氨水溶解后用水定容, 配成 0.1 mg·mL⁻¹ 的维生素 B₂ 标准溶液, 4 °C 冰箱中避光贮存。

(3) 维生素 B₉ 标准储备溶液: 称取 B₉ 标准品 1 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入体积分数为 10% 的氨水充分溶解后用水定容, 配成 0.1 mg·mL⁻¹ 的维生素 B₉ 标准溶液, 4 °C 冰箱中避光贮存。

(4) 维生素 B₃、B₅、B₆、B₇、B₁₂ 标准储备溶液: 分别称取维生素 B₃、B₅、B₆、B₇、B₁₂ 标准品 1 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用水溶解后定容, 该标准储备溶液质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹, 4 °C 冰箱中避光贮存。

1.2.4.3 仪器条件

(1) 色谱条件: ODS-C18 色谱柱 (4.6×250 mm 5 μ m); 流动相: A 相是体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液, B 相是乙腈, 流速 0.65 mL·min⁻¹。流动相梯度洗脱程序: 0~8 min, 5%~50% B; 8~11.5 min, 50%~60% B; 11.5~13.0 min, 60%~5% B; 13.0~15.0 min, 5%~ 结束。

(2) 质谱条件：离子源为电喷雾电离 (ESI)，离子源温度 550 ℃，喷雾气 60.0 psi，辅助加热气 60.0 psi，气帘气 40 psi，碰撞气 High，离子化电压 4 500 V，扫描方式为正离子多反应监测 MRM 扫描模式。8 种 B 族维生素的质谱参数见表 1。

1.3 富维黄金菇提取物制备及检测

选取 1.2.2 三种氨基酸联合强化处理的富维黄金菇，根据 1.2.3 筛选出的最佳 B 族维生素提取方法，对富维黄金菇 B 族维生素提取液冷冻干燥，参考 1.2.4 检测其 B 族维生素的含量，并以未添加前体氨基酸的黄金菇作为空白对照。

1.4 数据统计分析

所有试验均重复 3 次，使用 Prism 8.4.0 进行数据统计和显著性分析，数据表示平均值 ± 标准差 (SD)， $P < 0.05$ 被认为具有显著差异。并使用 Prism 8.4.0 及 Origin 2021 制作图表。

2 结果与讨论

2.1 黄金菇单独强化VB₃、VB₅、VB₉实验

2.1.1 L-天冬氨酸对黄金菇VB₃含量的影响

L-天冬氨酸强化黄金菇 VB₃ 结果如图 1 所示，L-天冬氨酸添加量为 100 mg·kg⁻¹ 时，维生素 B₃ 含量达到最大值，为 88.78 mg/100 g，是对照组 (78.64 mg/100 g) 的 1.21 倍，有显著性差异 ($P < 0.05$)，故选用 100 mg·kg⁻¹ 作为最佳培养添加量。

维生素 B₃ 的合成途径有两种：天冬氨酸 (Asp) 途径和犬尿氨酸 (Kynurenine) 途径。L-天冬氨酸属

于 Asp 途径的起始氨基酸，其经过 L-Asp 氧化酶氧化后得到 α-亚氨基琥珀酸，再与甘油醛-3-磷酸进行缩合反应后由喹啉酸合成酶 (QS) 环化生成喹啉酸，喹啉酸则与焦磷酸磷酸核糖一起由喹啉酸磷酸核糖转移酶 (QPT) 催化生成成烟酸核苷酸 (NaMN)，NaMN 通过 NAD⁺ 合成途径生 NAD⁺，再经过内源磷酸酶的连续催化后生成烟酰胺核苷，最后再通过核苷酸水解酶和酰胺酶的作用生成烟酸^[20]。喹啉酸作为烟酸的关键前体，由 L-天冬氨酸转化，王雨欣^[21]在大肠杆菌合成烟酸实验中添加烟酸合成途径的前体喹啉酸，可增加烟酸的生成量 (41.53 mg·L⁻¹)。相比之下，本实验则采用了添加维生素 B₃ 与喹啉酸的共同前体 L-天冬氨酸，结果证明对黄金菇维生素 B₃ 含量有一定的提升，推测是由于 L-天冬氨酸的添加导致其转化为喹啉酸，再进一步生物合成维生素 B₃。

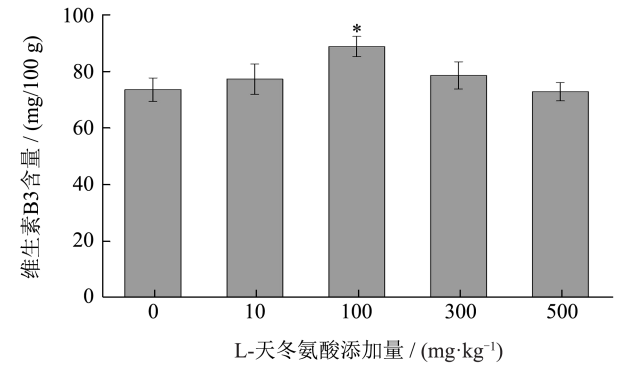


图 1 L-天冬氨酸添加量对黄金菇 VB₃ 含量的影响
Fig.1 Effect of L-aspartic acid concentration on VB₃ content in golden oyster mushrooms

注：数据表示为平均值 ± SD (n=3)，与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。下同。

表 1 8种B族维生素的质谱参数
Table 1 Mass spectrometry parameters of 8 B-vitamins

名称	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	保留时间/ <i>ms</i>	去簇电压 DP	入口电压 EP	碰撞能 CE	碰撞室出口电压 CXP
VB ₁	265.3	121.9	30.0	67.0	7.0	24.0	10.0
VB ₂	376.8	243.2	30.0	142.0	10.0	32.0	7.0
VB ₃	124.2	79.9	30.0	100.0	10.0	28.5	10.0
VB ₅	220.2	90.0	30.0	86.0	8.0	19.0	6.0
VB ₆	170.2	152.0	30.0	80.0	8.0	19.0	10.0
VB ₇	244.5	226.9	30.0	100.0	8.0	23.0	7.0
VB ₉	442.1	295.3	30.0	140.0	10.0	28.0	6.0
VB ₁₂	678.3	147.2	30.0	100	8	28.0	6.0

2.1.2 β -丙氨酸对黄金菇VB₅含量的影响

由图2可见,黄金菇维生素B₅含量随着 β -丙氨酸添加量的增加呈上升的趋势,呈明显的剂量依赖性,当添加剂量大于100 mg·kg⁻¹后,维生素B₅含量快速增长,500 mg·kg⁻¹时达到最大值,为80.92 mg/100 g,是对照组(49.43 mg/100 g)的1.63倍,具有极显著($P<0.01$)的强化效果。由于添加量为300 mg·kg⁻¹时增幅减小,因此选择300 mg·kg⁻¹作为最佳培养添加量。

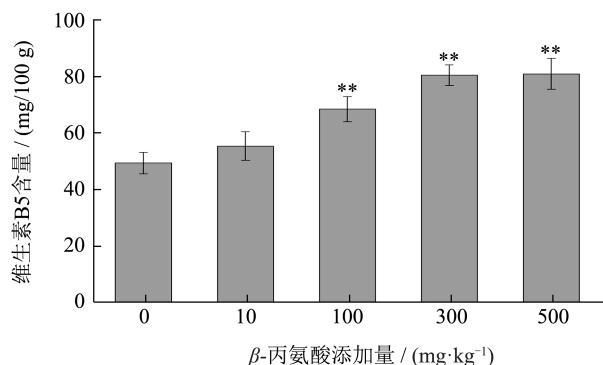


图2 β -丙氨酸添加量对黄金菇VB₅含量的影响

Fig.2 Effect of β -alanine concentration on VB₅ content in golden oyster mushrooms

泛酸(维生素B₅)是由 α -酮异戊酸和L-天冬氨酸经过酮泛解酸羟甲基转移酶(PanB)、酮泛解酸还原酶(PanE)、L-天冬氨酸- α -脱羧酶(PanD)和泛酸合成酶(PanC)这4步酶催化反应生成的,L-天冬氨酸经PanD生成 β -丙氨酸, β -丙氨酸再与 α -酮异戊酸通过其余2步酶促反应生成泛解酸,最后由泛酸合成酶催化生成泛酸^[22]。因此,在黄金菇培养基料中添加的 β -丙氨酸可能通过酶促反应途径转化为维生素B₅。马玉玉^[23]对大肠杆菌重组菌株PS_{B₅}进行补料分批实验,通过在底物添加维生素B₅的前体D-泛解酸和 β -丙氨酸,结果表明D-泛解酸可明显被转化产生。柳志强等^[24]研究了 β -丙氨酸的补料反式和浓度对大肠杆菌DPA21/pBCST3D生成D-泛酸的影响,实验结果同样发现,D-泛酸的产量随着 β -丙氨酸添加量的增加而增高。相较于在大肠杆菌体系中合成维生素B₅,黄金菇天然合成的特性可以更符合食品安全生产需求。

2.1.3 L-谷氨酸对黄金菇VB₉含量的影响

由图3可见,在黄金菇培养基料中添加L-谷氨酸对其维生素B₉含量有一定的强化效果,在L-谷氨酸添加量为10 mg·kg⁻¹时具有显著性差异($P<0.05$),维生素B₉的含量达到最大值,为85.78 mg/100 g,是对照组(78.65 mg/100 g)的1.09倍。

叶酸(维生素B₉)由对氨基苯甲酸(pABA)、2-

氨基-4-羟基蝶啶(蝶呤)和谷氨酸3部分组成。谷氨酸是维生素B₉的合成底物之一,二氢蝶酸在线粒体中合成,谷氨酸与其在二氢叶酸合成酶的作用下可形成单谷氨酸二氢叶酸,再通过二氢叶酸还原酶的还原作用形成单谷氨酸四氢叶酸,最后通过叶酰多谷氨酸合成酶的作用,与谷氨酸结合形成多谷氨酰四氢叶酸^[9]。任文芳等^[25]研究了谷氨酸添加浓度对大豆芽菜中5-甲基四氢叶酸(5-CH₃-THF)富集量的影响,其通过单因素试验筛选出谷氨酸的最适处理浓度,结果发现最适谷氨酸浓度下对比对照族增加了1.24倍,但浓度处理之间不存在显著差异。黄金菇在培养基料中添加L-谷氨酸同样未对强化维生素B₉的效果产生显著影响,可能是因为谷氨酸在黄金菇内的代谢较为旺盛,或是叶酸合成的下游底物的原因。

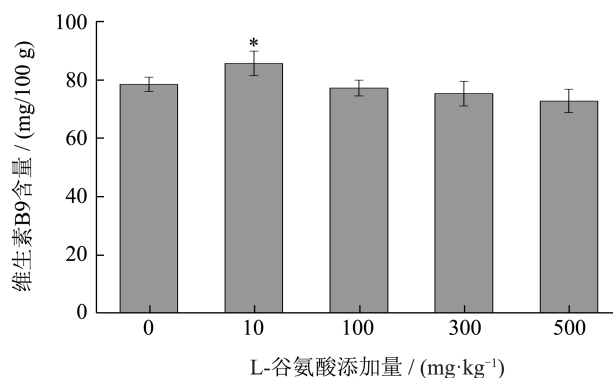


图3 L-谷氨酸量对黄金菇VB₉含量的影响

Fig.3 Effect of L-glutamic acid concentration on VB₉ content in golden oyster mushrooms

2.2 B族维生素提取方法筛选

鉴于B族维生素具有易溶于水、酸性条件下稳定、部分B族维生素与蛋白质结合等特点,本实验对超高效液相色谱串联质谱法的提取条件进行优化,旨在筛选出高效的黄金菇B族维生素提取方法,实验分别比较了甲酸、甲酸+蛋白酶、等电点法、等电点法+蛋白酶四种提取方法对B族维生素的提取效果。结果由图4可见,甲酸+蛋白酶的提取效果最好,其检测出的B族维生素总量达到309.31 mg/100 g,在该方法检测下,富维黄金菇的B族维生素含量是对照组的2.48倍。

余清^[26]在比较水、50%甲醇水、50%乙腈水、0.1%甲酸水(以上%均为体积分数)溶液作为提取奶粉中B族维生素溶剂时发现甲酸的提取效率最高。甲酸的作用在于其能够提高溶液的酸性环境,从而增强对真菌细胞壁的渗透性,使得内部的营养成分更易于释放。同时,由于黄金菇中蛋白质含量较高,且部分维生素易与蛋白质结合,使用蛋白酶处理可以有效分解蛋白

质,降低其对目标化合物的干扰。研究表明,胰蛋白酶适用于高 pH 环境,可能更适用于释放与碱性蛋白结合的维生素(如维生素 B₉)^[27];而木瓜蛋白酶的 pH 适用范围则较广,在 pH 值 3.0~5.0 条件下仍保持高活性,可适应酸性提取体系(如甲酸),避免维生素在碱性环境中的降解^[28]。黄金菇中的蛋白质等电点大多为酸性,因此使用甲酸和木瓜蛋白酶的联合处理能够快速去除大部分蛋白质杂质并避免维生素降解,减少对后续检测的干扰。

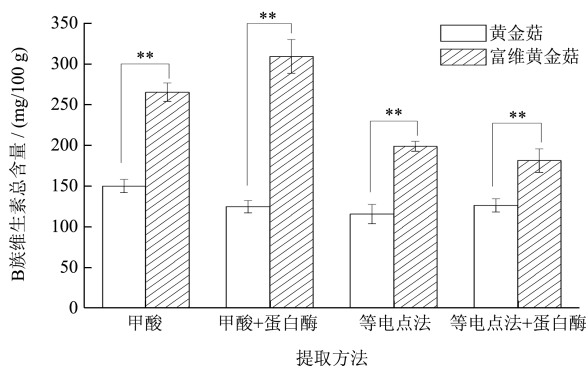


图4 不同提取方法对联合培育的黄金菇 B 族维生素总含量的提取效果

Fig.4 Extraction effects of different extraction method on the total content of B-vitamins in co-cultivation golden oyster mushrooms

2.3 黄金菇复合强化VB₃、VB₅、VB₉实验结果

由图5可以看出,超高效液相色谱串联质谱法分别检测了富维黄金菇和对照组4种提取方法的B族维生素,结果发现维生素B₁、B₂、B₃、B₅、B₆和B₉均有检出。除了维生素B₂含量没有显著性强化效果外($P>0.05$),其余5种维生素含量均有明显的提升,推测是因为维生素B₂的关键合成前体为鸟苷三磷酸(GTP)而非氨基酸,且其可作为辅酶参与烟酸或维生素B₆的合成中,因此并未显著强化^[29]。4种提取方法中,甲酸提取方法对维生素B₁的提取效果最好,富维黄金菇的维生素B₁含量为1.12 mg/100 g,是对照组的1.75倍。甲酸+蛋白酶的提取方法对维生素B₃、B₅、B₆和B₉的提取效果则优于其他3种方法,其检出的含量分别为134.32、92.62、1.46和48.42 mg/100 g,与对照组相比分别提高了4.47倍、2.82倍、6.08倍和1.15倍。因此从结果可得出L-天冬氨酸、β-丙氨酸和L-谷氨酸联合强化B族维生素的效果与单独添加L-天冬氨酸、β-丙氨酸和L-谷氨酸强化的效果相比有显著的提高。研究表明^[30],联合添加氨基酸对维生素强化效果具有一定的叠加效应,在单独添加谷氨酸和苯丙氨酸对大豆芽菜的叶酸进行强化时,其含量最大值分别

为1 652 μg/100 g和1 834 μg/100 g,而在谷氨酸和苯丙氨酸的联合处理下,大豆芽菜的叶酸含量最高可达2 062 μg/100 g。

相关研究发现,植物在高浓度氨基酸的环境生长种,自身的氨基酸浓度可能也会相应的升高^[31],部分氨基酸浓度的升高会使其对应参与合成的维生素含量增加。如在任文芳等^[25]的研究中,苯丙氨酸和谷氨酸对大豆芽菜联合处理,不仅提升了大豆芽菜的苯丙氨酸和谷氨酸含量,也提升了甲硫氨酸、甘氨酸和组氨酸的含量,由于甲硫氨酸、甘氨酸的生物合成作用和组氨酸的分解代谢过程中需要叶酸作为辅酶参与,因此揭示这些过程可能促进了叶酸的合成。L-天冬氨酸不仅作为维生素B₃的前体氨基酸,也可以由L-天冬氨酸-α-脱羧酶催化生成β-丙氨酸,而β-丙氨酸也属于维生素B₅的前体物质之一^[32]。此外,L-天冬氨酸与β-丙氨酸通过竞争性结合PanD酶的变构位点,调节Asp脱羧生成β-丙氨酸的速率,从而平衡VB₃(Asp途径)与VB₅(β-Ala途径)的合成通量^[33]。VB₃作为NAD⁺前体,与VB₅衍生的辅酶A(CoA)共同参与三羧酸循环,二者的协同补充可能通过增强线粒体能量代谢从而间接促进维生素合成^[34]。谷氨酸转化为叶酸的同时,也可作为氨基供体用于从头嘌呤核苷酸途径合成许多维生素前体——AIR、GTP、ATP^[35]。因此联合添加L-天冬氨酸、β-丙氨酸和L-谷氨酸可能在黄金菇代谢生成B族维生素过程中发挥了协同强化作用,从而促进了B族维生素的合成。

2.4 富维黄金菇提取物中B族维生素总量检测

由图6可以看出,富维黄金菇提取液浓缩物的6种B族维生素含量均显著高于对照组($P<0.01$)的B族维生素是维生素B₃和维生素B₅,其含量达到585.14 mg/100 g和466.94 mg/100 g,相比对照组(30.06 mg/100 g, 32.76 mg/100 g)别提高了19.47倍和14.22倍。其余B族维生素也有不同倍数的提升,与对照组相比,富维黄金菇提取液浓缩物维生素B₁含量提高了2.91倍,维生素B₂含量提高了3.41倍,维生素B₆含量提高了16.23倍,维生素B₉含量提高了3.06倍。推测是由于各B族维生素在冷冻干燥时损失的含量不同,导致其提升倍数之间产生差异的结果。

富维黄金菇提取液浓缩物的B族维生素总含量为1 261.69 mg/100 g,达到1% (m/m)以上,经市场调查,该占比处于市面多维产品中的B族维生素含量占比的范围之内(1%~5%, m/m)。相比于人工合成的B族维生素补充剂,该研究可为天然合成B族维生素的补充来源提供理论依据和技术支持。

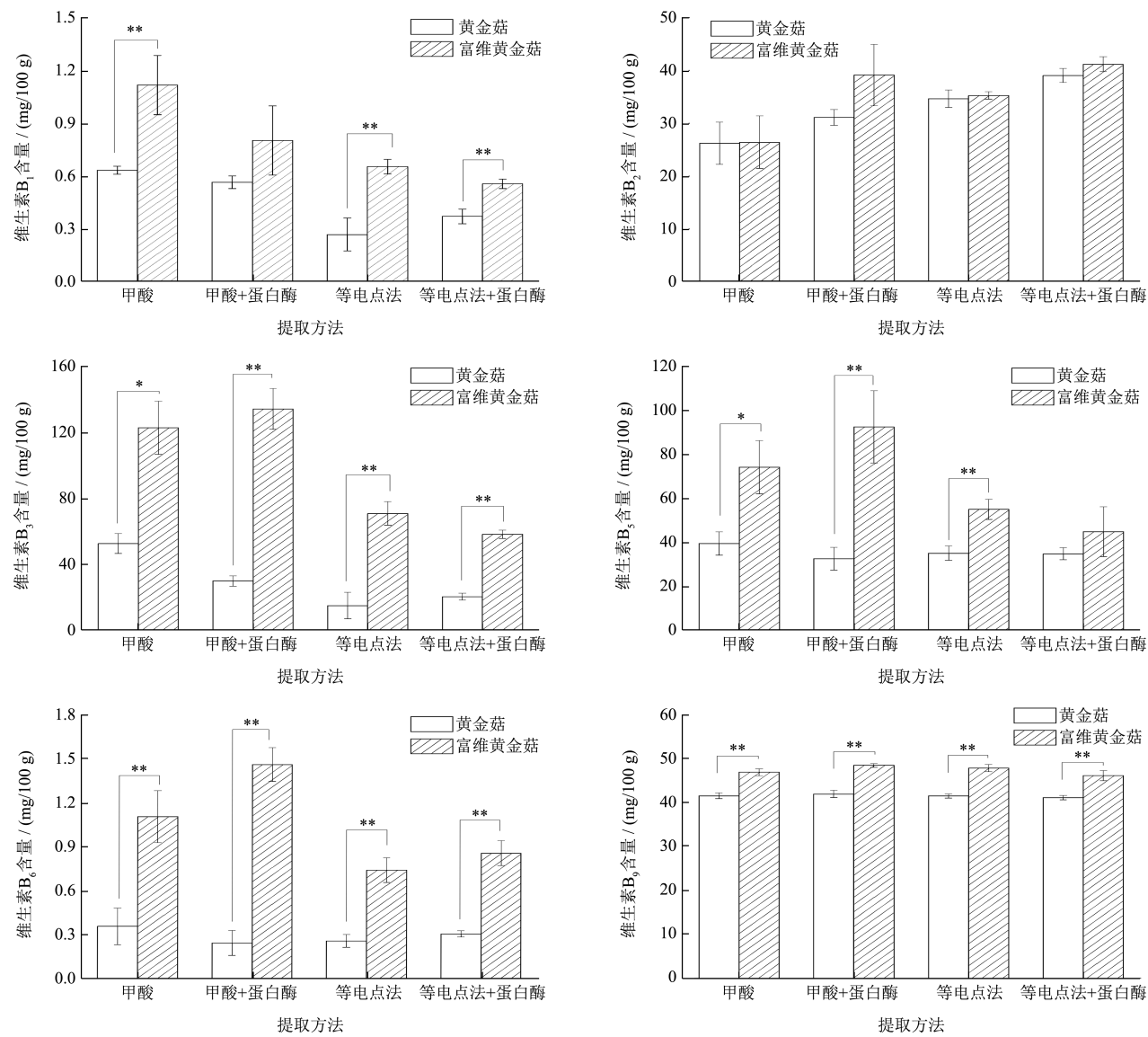


图5 不同提取方法对复合氨基酸联合培育的黄金菇 B 族维生素含量检测

Fig.5 Determination of B vitamins content of golden oyster mushrooms co-cultivated with compound amino acids by different extraction methods

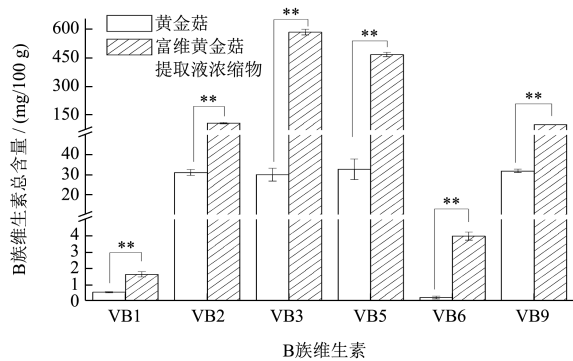


图6 富维黄金菇提取液浓缩物中 6 种 B 族维生素的含量

Fig.6 Content of 6 B-vitamins in the concentrated extract of enriched vitamin gold oyster mushrooms

3 结论

实验针对 B 族维生素的生物强化方式, 利用在黄金菇培养基料中添加了 L-天冬氨酸、 β -丙氨酸和 L-谷氨酸 3 种氨基酸考察对黄金菇 B 族维生素含量的影响。研究表明, β -丙氨酸添加的剂量越高, 黄金菇维生素 B₅ 的含量就越高, 其余两种氨基酸的添加对 B 族维生素效果则不同, 似乎存在一个最适添加剂量。而 3 种氨基酸联合处理的黄金菇 B 族维生素含量均有提升, 结果显示联合添加质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ L-天冬氨酸、 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ β -丙氨酸和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ L-谷氨酸时, 黄金菇 B 族维生素总含量为 $309.31 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 是

对照组的 2.48 倍, 其强化效果比单独添加氨基酸的显著, 同时添加 3 种氨基酸对 B 族维生素强化效果可能存在一定的协同效应。此外还针对超高效液相色谱串联质谱法同时检测黄金菇多种 B 族维生素的提取方法进行优化, 最终选择甲酸 + 蛋白酶提取方法, 该方法过程简单有效, 可快速减少黄金菇的基质干扰, 结果可靠, 可快速、同时检测出黄金菇的 6 种 B 族维生素。经过富集, 黄金菇提取液浓缩物 B 族维生素总含量为 1 261.69 mg/100 g, 处于市面多维产品中的 B 族维生素含量占比的范围, 相较现有的大肠杆菌合成体系或基因工程技术强化 B 族维生素, 该研究方法无需基因修饰的天然合成特性使其更加符合食品安全要求, 未来在进一步提高维生素含量方面可考虑通过动态补料策略或开发更多前体协同强化体系的方法。综上所述, 生物强化黄金菇的 B 族维生素可作为一种优质的天然 B 族维生素补充来源。

参考文献

- [1] GONÇALVES A C, PORTARI G V. The B-complex vitamins related to energy metabolism and their role in exercise performance: A narrative review [J]. *Science & Sports*, 2021, 36(6): 433-440.
- [2] 向仁仲, 郭闻一, 付涛. 硫胺素缺乏症与各系统疾病的研究进展与展望[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2020, 41(2): 332-336.
- [3] ALMEIDA J, COSTA T R, VIVAS M, et al. Vitamin B₃ supplementation for optic neuropathies: a comprehensive review [J]. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2023, 40(2): 111-116.
- [4] XU J S, PATASSINI S, BEGLEY P, et al. Cerebral deficiency of vitamin B₅ (d-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 527(3): 676-681.
- [5] KODENTSOVA V M, RISNIK D V. Vitamin-mineral supplements for correction of multiple micronutrient deficiency [J]. *Meditsinskiy Sovet*, 2020, 2020(11): 192-200.
- [6] ZANETTI L D, STRAETEN D V D. 'From metabolism to metabolism': holistic considerations on B-vitamin interactions, biofortification, and deficiencies [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024, 87: 103132.
- [7] MIRET J A, MUNNÉ-BOSCH S. Plant amino acid-derived vitamins: biosynthesis and function [J]. *Amino Acids*, 2014, 46(4): 809-824.
- [8] ZHU F Y, PEÑA M, BENNETT G N. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for quinolinic acid production by assembling L-aspartate oxidase and quinolinate synthase as an enzyme complex [J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67(Suppl C): 164-172.
- [9] HANSON A D, GREGORY J R. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants (Article) [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62: 105-125.
- [10] PARTHASARATHY A, SAVSK M A, HUDSON A O. The synthesis and role of β -Alanine in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 921.
- [11] 李昆太, 李永亮, 储炬, 等. 甜菜碱促进脱氮假单胞菌合成维生素 B₁₂ [J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 3: 172-175.
- [12] GB5009.84-2016, 食品安全国家标准 食品中维生素B₁的测定[S].
- [13] GB 5009.85-2016, 食品安全国家标准 食品中维生素B₂的测定[S].
- [14] GB5009.89-2023, 食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
- [15] GB5009.210-2023, 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定[S].
- [16] GB5009.154-2023, 食品安全国家标准 食品中维生素B₆的测定[S].
- [17] GB 5009.211-2022, 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].
- [18] GB 5009.285-2022, 食品安全国家标准 食品中维生素B₁₂的测定[S].
- [19] ZHANG H X, JHAA B, WARKENTIN T D, et al. Folate stability and method optimization for folate extraction from seeds of pulse crops using LC-SRM MS [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 71: 44-55.
- [20] KATOH A, UENO HARA K, AKITA M, et al. Early steps in the biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* start with aspartate and occur in the plastid [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 851-857.
- [21] 王雨欣. 大肠杆菌中烟酸的从头合成[D]. 北京: 北京化工大学, 2023.
- [22] ZHANG B, CHEN L, JIN J Y, et al. Strengthening the (R)-pantoate pathway to produce D-pantothenic acid based on systematic metabolic analysis [J]. *Food Bioscience*, 2021, 43(Suppl C): 101283.
- [23] 马玉玉. 酶法催化D-泛解酸和 β -丙氨酸生产D-泛酸[D]. 滁州: 安徽科技学院, 2020.
- [24] 柳志强, 周海岩, 周斌, 等. 补料分批发酵条件优化提高D-泛酸的产量[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(7): 8-13.
- [25] 任文芳, 王沛, 常建伟, 等. 苯丙氨酸和谷氨酸联合处理对大豆芽菜中5-甲基四氢叶酸富集的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(4): 759-766.
- [26] 余清, 蔡林雪, 苏晓明, 等. UPLC-MS/MS法同时测定奶粉中11种B族维生素含量[J]. *福建轻纺*, 2023, 10: 20-24.
- [27] YAMAN M, CATAK J, UĞUR H, et al. The bioaccessibility of water-soluble vitamins: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109: 552-563.
- [28] 黄秋岚, 田程飘, 唐恒伟, 等. 固定化木瓜蛋白酶的应用进展[J]. *农业研究与应用*, 2022, 35(1): 44-48.
- [29] ZHANG J R, GE Y Y, LIU P H, et al. Biotechnological strategies of riboflavin biosynthesis in microbes [J]. *Engineering*, 2022, (Suppl C): 115-127.
- [30] 马云, 王虹. 作物中叶酸合成及生物强化研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2024, 52(6): 10-16.
- [31] HASSAN Z, NADINE F, MIKKO H, et al. Development and validation of HPLC-MS/MS method for simultaneous analysis of B vitamins present naturally or after fortification in fruit juices [J]. *LWT*, 2023, 184(Suppl C): 115103.
- [32] THOMAS K, PILAR H A, FRANCISCO A C. 4'-Phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants [J]. *JBC Papers in Press*, 2003, 23(40): 38229-38237.
- [33] QIAN Y Y, LU C, LIU J, et al. Engineering protonation conformation of L-aspartate- α -decarboxylase to relieve mechanism-based inactivation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1607-1614.
- [34] TERESA B F. B Vitamins: An update on their importance for plant homeostasis [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2024, 75(1): 67-93.
- [35] RITA Z, MARK S, UWE S, et al. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 805-836.