

红树林植物阔苞菊 内生真菌硒富集工艺优化

廖日权¹, 钟书明², 尹艳镇^{2,*}, 郑韵英², 张瑞瑞², 谢灵霞¹

(1. 钦州学院海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西钦州 535000;

2. 钦州学院石油与化工学院, 广西高校北部湾石油天然气资源有效利用重点实验室, 广西钦州 535000)

摘要:为了获得有机硒的来源新途径,以菌丝体的富硒总量为指标,采用单因素、正交实验法研究了一株阔苞菊内生真菌的硒富集能力,对培养基中硒溶液添加量、盐浓度、碳源浓度、培养时间、碳源种类等影响因素进行了优化。结果表明,适合的培养条件为硒溶液添加量为 30 mL、盐浓度 5 g/L、碳源(葡萄糖)浓度 15 g/L、培养时间 24 h;代谢产物中硒含量为 181.6 $\mu\text{g/g}$,菌丝体富硒总量为 1941.7 $\mu\text{g/L}$,其有机硒转化率偏低,仅为 16.2%。为进一步筛选开发滨海红树林中内生富硒微生物资源提供理论依据。

关键词:阔苞菊,内生真菌,硒富集,条件优化

Optimized process of selenium enrichment for endophytic fungi from mangrove plant *Pluchea indica* (L.) Less

LIAO RI-quan¹, ZHONG Shu-ming², YIN YAN-zhen^{2,*},
ZHENG Yun-ying², ZHANG Rui-rui², XIE Ling-xia¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation,
Qinzhou University, Qinzhou 535000, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Beibu Gulf oil
and Natural Gas Resource Effective Utilization, Qinzhou Universities, Qinzhou 535000, China)

Abstract: Study of the selenium enrichment ability for an mangrove plant *Pluchea indica* endophytic fungus by means of single factor and orthogonal experiments, in order to obtain organic selenium. The influence factors such as selenium solution added amount, salt concentration, carbon source concentration, culture time and carbon source were optimized with the total selenium accumulation as the index in the experiment. The results showed that when the enriched culture medium was contained salt concentration 5 g/L, selenium solution added volume 30 mL, carbon source (glucose) concentration 15 g/L, culture time 24 h, the total selenium accumulation was 1941.7 g/L, the mycelium Se content of up to 181.6 $\mu\text{g/g}$ and the lower organic selenium transformation rate was 16.2%. It is expected to provide theoretical basis for further researching selenium rich microbial resources in coastal mangrove plants.

Key words: *Pluchea indica* (L.) Less.; endophytic fungi; selenium enrichment; condition optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)01-0112-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.021

硒是植物、动物包括人类必需的微量营养元素,是硒代半胱氨酸(Sec)和含硒过氧化物酶,如谷胱甘肽过氧化物酶 GPx 等的重要成分,具有提高人体免疫力、抗氧化、抗肿瘤、拮抗重金属、延缓衰老、保护心肌和肝脏健康和提高生殖机能等多种功效^[1]。缺硒是导致大骨节病、克山病、糖尿病等一系列疾病的重要原因^[2-3]。因此,科学补硒已成为当前人们防

止疾病、增进健康和延缓衰老的重要举措之一^[4-5]。研究表明,有机硒不仅毒性低,与无机硒相比,摄入有机硒对提高实验大鼠组织中 GSH-Px(肝脏:有机硒组/无机硒组: $265.13 \pm 8.62/250.39 \pm 6.32$ U/mg pro)、SOD(心脏:有机硒组/无机硒组: $96.16 \pm 1.42/93.30 \pm 4.01$ U/mg pro)、GSH(肾脏:有机硒组/无机硒组: $34.65 \pm 1.06/30.18 \pm 1.44$ U/mg pro)活力水平

收稿日期: 2017-05-25

作者简介: 廖日权(1982-),男,硕士研究生,实验师,研究方向: 海洋环境化学及海洋药物, E-mail: magwitch@163.com。

* 通讯作者: 尹艳镇(1982-),男,博士研究生,教授,研究方向: 生物质资源富硒机制研究与富硒资源功能化利用, E-mail: yinyanzhen2009@163.com。

基金项目: 广西高校化学工艺重点学科开放课题基金资助(2015KLOG19);广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室基金资助(2016ZB03)。

更为显著^[6]。由于微生物具有繁殖快、适应力强、代谢产物丰富等优势。因此,微生物转化无机硒获得安全有效的有机硒源,成为了开展研究的焦点^[7-9]。

海洋是世界上公认的最大的微生物生存的宝库,利用微生物发酵生产活性有机硒物质,不但周期短,而且可实现大规模培养,也是丰富有机硒的来源的有效途径^[10-11]。但是,同时也面临着菌体硒的耐受能力差异大、有机硒的转化率低等一些列问题。因此,对富硒地区的微生物的硒富集能力进行筛选、驯化以及发酵工艺优化,才能有望获得富硒能力强的菌株。

本文采用单因素实验、正交实验法对广西北部湾富硒地区^[12]半生红树林植物阔苞菊内生真菌的硒耐受能力、生长条件及硒富集能力进行了初步的研究,旨在探索阔苞菊内生真菌富集硒的最优化条件,筛选驯化富硒菌种。并为进一步开发海洋植物内生富硒真菌及其有机硒的代谢产物在食品、医药应用等方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究菌种为实验室保藏的一株自阔苞菊叶片中纯化分离得到绿色真菌,阔苞菊采样地点为广西钦州市茅尾海;硒粉(分析纯) 天津市光复精细化工研究所、高氯酸(质量分数为70%,优级纯) 天津市鑫源化工有限公司;浓硝酸(质量分数为65%,优级纯) 国药集团化学试剂有限公司;碘化钾 天津大茂化学试剂厂;阿拉伯树胶 山东西亚化学股份有限公司;葡萄糖(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;乳糖(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;蔗糖(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;麦芽糖(分析纯) 上海埃彼化学试剂有限公司;马铃薯 市售;等。

UV.2802H 型紫外可见分光光度计 上海优浦科学仪器有限公司(进口);FA1104N 型电子分析天平 上海明桥精密科学仪器有限公司;ZHWY-211B 型恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;LHR-250-H 型恒温培养箱 韶关市泰宏医疗器械有限公司;LDZX-75KB 型立式压力蒸汽灭菌器 上海申医疗器械厂;HS-G-2A 型双人超净工作台 无锡云洁净化设备有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基与培养方法

1.2.1.1 培养基硒溶液的制备 称取0.10 g 硒粉,按照1.2.2.2的方法对硒粉进行消解处理,并用NaOH溶液调至pH为7,然后定容至1000 mL,此溶液作为硒储备液(100 $\mu\text{g/mL}$);取400 mL 硒储备液定容至1000 mL,配成浓度为40 $\mu\text{g/mL}$ 的硒溶液,备用。

1.2.1.2 培养基的制备 种活化培养基:去皮马铃薯200 g/L、葡萄糖15 g/L、海盐5 g/L、琼脂15 g/L,分装规格为100 mL/瓶,于121 $^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌30 min,备用;种子培养基:去皮马铃薯200 g/L、葡萄糖15 g/L、海盐5 g/L,分装规格为100 mL/瓶,于121 $^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌30 min,备用。

富硒培养基:去皮马铃薯200 g/L,按照单因素、正交实验要求加入碳源(葡萄糖、乳糖、麦芽糖及蔗糖);碳源浓度为10~30 g/L,海盐浓度为0~7 g/L;培养基中不同的硒含量通过添加不同体积的1.2.1.1中硒溶液实现,每100 mL 培养基添加范围为10~50 mL,其中,硒溶液浓度为40 $\mu\text{g/mL}$ 。其中,以精制海盐配比培养基的盐浓度,模拟潮间生长环境^[13]。

1.2.1.3 培养方法 菌种的活化:在无菌条件下,将菌种接种到斜面培养基(菌种活化培养基)后,置于26 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中恒温培养72 h,菌种长满平板时待用;液体种子的制备:在长满菌种的斜面培养基中加入5~8 mL无菌水,刮取菌丝,采用胶头滴管吸取适量的混合液体(菌丝+无菌水)于种子培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养48 h,菌丝体长满摇瓶后待用^[14];富硒培养:往长满菌体的摇瓶中分别加入不同体积(10、20、30、40、50 mL)的1.2.1.1中硒溶液,以达到控制硒浓度的目的,培养条件为26 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中培养12、24、36、48、60 h。

1.2.2 硒含量测定方法

1.2.2.1 菌丝体生物量的测定 菌丝体收集:硒元素富集时间结束后,用滤纸过滤菌丝,并用蒸馏水洗涤3~5次,刮取菌丝体于烘干至恒重的培养皿中,60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,称量其质量即可得生物量,以g/L表示。

1.2.2.2 样品消解 样品消解方法参照GB5009.93-2010,具体方法为:称取0.1 g 经干燥粉碎的均匀试样于25 mL的比色管中,加入消解液5 mL(浓硝酸与高氯酸混合比例为4:1)后盖上玻璃塞并进行24 h 冷消化处理。水浴加热消化处理,加热期间可定时振荡比色管以促进样品粉末的完全溶解^[15-16]。待样品溶液呈现透亮、清澈状态时,则表明样品消化完毕,样品消解过程耗时大致为3~5 h。于澄清溶液中加入5 mL 6 mol/L 盐酸,沸水浴环境中进行30 min 驱赶硝酸操作,消解液冷却,备用。

1.2.2.3 硒含量的计算方法 硒标准曲线的测定:硒标准溶液准确称取0.10 g 硒粉,按照1.2.2.2的方法对硒粉进行消解处理后,定容至1000 mL,取400 mL 硒储备液定容至1000 mL,配成浓度为40 $\mu\text{g/mL}$ 的硒标准溶液,备用。于25 mL 比色管中,分别吸取0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 硒标准溶液,加入1.0 mL 1 mol/L HCl溶液、1.0 mL 2 g/L KI 溶液、1.5 mL 2 mol/L NaF 溶液、1.5 mL 10.0 g/L 阿拉伯树胶溶液,用二次蒸馏水定容混匀,以试剂空白为参比,于352 nm 波长下测定溶液的吸光值,并绘制标准工作曲线^[17-18]。

样品的测定:将1.2.2.2样品消解液,于25 mL 比色管中加入1.0 mL 1 mol/L HCl 溶液、1.0 mL 2 g/L KI 溶液、1.5 mL 2 mol/L NaF 溶液、1.5 mL 10.0 g/L 阿拉伯树胶溶液,定容混匀,以试剂空白为参比,于352 nm 波长下测定溶液的吸光值。

$$\text{硒含量计算公式}^{[17]}: X = \frac{C_x V}{m}$$

式中, C_x -于校准曲线查得的硒含量,单位为 $\mu\text{g/mL}$;V-样品消解液的定容体积,单位为mL;m-测量的样品质量,单位为g;X-单位硒含量,单位

为 $\mu\text{g/g}$ 干菌体。

富硒总量计算方法:富硒总量($\mu\text{g/L}$) = 生物量(g/L) $\times$ 单位硒含量($\mu\text{g/g}$ 干菌体)。

有机硒转化率计算方法:转化率(%) = (富硒总量/硒元素添加总量) $\times 100$ 。其中,硒元素添加总量(μg) = 硒溶液添加量(mL) $\times 40 \mu\text{g/mL}$ (1.2.1.1 中硒溶液浓度)。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 硒标准溶液添加量的确定 固定碳源为葡萄糖、碳源浓度 20 g/L 、盐浓度 5 g/L 、培养时间 36 h , 考察不同的硒标准溶液添加量 (10 、 20 、 30 、 40 、 50 mL) 对菌体硒富集能力的影响。

1.2.3.2 盐浓度的确定 固定碳源为葡萄糖、碳源浓度 20 g/L 、培养时间 36 h 、硒标准溶液添加量 30 mL , 考察不同的盐浓度 (0 、 1.5 、 3 、 5 、 7 g/L) 对菌体硒富集能力的影响。

1.2.3.3 碳源浓度的确定 固定碳源为葡萄糖、盐浓度 5 g/L 、培养时间 36 h 、硒标准溶液添加量 30 mL , 考察不同的碳源浓度 (10 、 15 、 20 、 25 、 30 g/L) 对菌体硒富集能力的影响。

1.2.3.4 培养时间的确定 固定碳源为葡萄糖、碳源浓度 20 g/L 、盐浓度 5 g/L 、硒标准溶液添加量 30 mL , 考察不同的培养时间 (12 、 24 、 36 、 48 、 60 h) 对菌体硒富集能力的影响。

1.2.3.5 碳源种类的确定 固定碳源浓度 20 g/L 、盐浓度 5 g/L 、培养时间 36 h 、硒标准溶液添加量 30 mL , 考察不同的碳源 (葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖) 对菌体硒富集能力的影响。

1.2.4 正交实验 根据单因素实验结果,选择对菌种富硒能力影响较大的硒标准液添加量、培养时间、碳源浓度和盐浓度四个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,因素水平表如表 1 所示。以每组菌丝体的富硒总量($\mu\text{g/L}$) 为指标,确定最佳培养条件。

表 1 正交实验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 硒溶液添加量(mL)	B 培养时间(h)	C 碳源(葡萄糖)浓度(g/L)	D 盐浓度(g/L)
1	20	12	10	3
2	30	24	15	5
3	40	36	20	7

1.2.5 数据统计分析 所有实验数据应用 Excel 2010 软件进行数据的分析及作图。

2 结果与分析

2.1 硒标准曲线的绘制

以试剂空白为参比,于 352 nm 波长下测定各梯度标准浓度溶液的吸光值,并绘制标准工作曲线。测得其溶液吸光度 A 与溶液硒浓度间线性关系良好,标准曲线为: $A = 0.6939 Cx + 0.0094$, $R^2 = 0.9967$ 。

2.2 单因素实验

2.2.1 硒溶液添加量对菌株富集硒的影响 由图 3

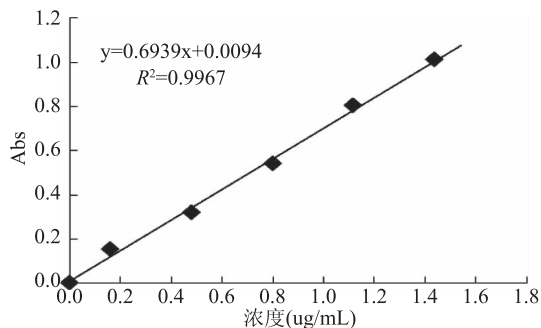


图 1 标准曲线

Fig.1 Standard Curve

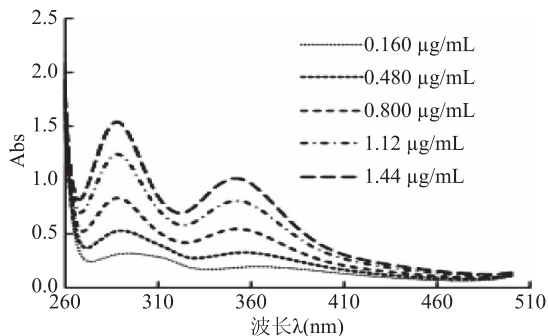


图 2 吸收曲线

Fig.2 Absorption Curve

可知,硒溶液添加量对富集硒元素的能力存在较大影响。随着培养基内硒浓度的增大,菌丝体的单位硒含量由 $43.9 \mu\text{g/g}$ 增加至 $179.8 \mu\text{g/g}$ 、富硒总量最大值为 $1923.8 \mu\text{g/L}$;当硒液添加量为 30 mL 时,有机硒的转化率为 16.18% 。然而,随着硒溶液添加量的依次增加,菌丝体的生物量由 7.7 g/L 增至 10.7 g/L ,然后降至 8.9 g/L ,总体变化趋势为先升高后降低。因为菌丝体对硒有一定的耐受限度浓度,低浓度的硒浓度能促进菌丝体生长,进而提高菌株富集硒元素的能力;由于硒元素的毒性,高浓度的硒浓度抑制菌丝体的生长,使富集硒元素的能力下降。

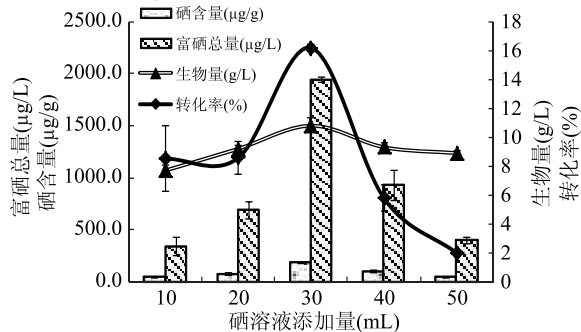


图 3 不同硒溶液添加量对菌株富集硒的影响

Fig.3 Effect of different selenium concentration on the enrichment of selenium

2.2.2 盐浓度对菌株富集硒的影响 由图 4 可知,以添加 NaCl 调节培养基的盐浓度,模拟潮间带生长的环境对菌体的富集硒的能力有促进效果。在培养基盐浓度 $0 \sim 5 \text{ g/L}$ 时,菌株的生物量由 8.7 增至 10.7 g/L 、单位硒含量由 $16.9 \mu\text{g/g}$ 增加至 $180.6 \mu\text{g/g}$,增大 10 倍;而富硒总量最大值为 $1932.4 \mu\text{g/L}$,比不增加

NaCl 时增大了 13 倍。在盐浓度为 5 g/L 条件下,有机硒的转化率为 16.21%。培养基中的盐浓度在 0~5 g/L 范围内能促进菌丝体生长,一般认为 Cl⁻ 的浓度直接影响菌体的酶活力^[19],从而提升菌株富集硒元素的能力。

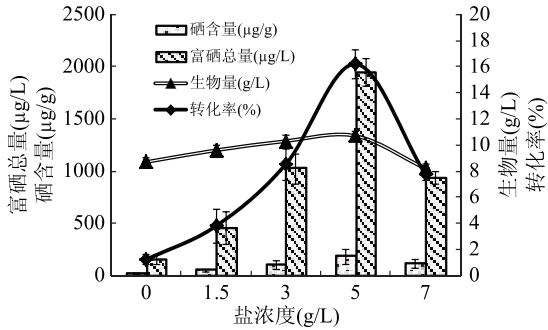


图4 不同盐浓度对菌株富集硒的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of salt on selenium enrichment

2.2.3 碳源浓度对菌株富集硒的影响 以葡萄糖作为碳源,探讨了不同的碳源浓度对菌株富硒总量的影响,结果如图 5 所示。在 10~30 g/L 的碳源浓度范围内增加碳源浓度,菌丝体的生物量曲线趋于平稳,生物量平均值约为 10.6 g/L;然而碳源浓度的增大,对菌株的富硒能力有明显的抑制,富硒总量由最高值 1792.1 μg/L 降至 446.5 μg/L,即 15 g/L 的碳源浓度最适于菌体产生有机硒代谢产物,有机硒的转化率仅为 14.93%,低于或高于此浓度转化率逐渐降低,其代谢机制尚未明确。这在真菌发酵代谢其他活性物质,如黄酮等有类似的实验结果^[20]。

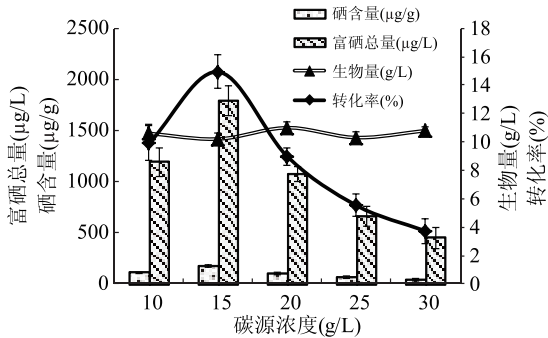


图5 不同碳源浓度对菌株富集硒的影响

Fig.5 Effect of different carbon source concentrations on the enrichment of selenium

2.2.4 培养时间对菌株富集硒的影响 培养时间为 24 h 时,最适于菌丝体内有机硒产物的积累,富硒总量到达最高值 1940.9 μg/L,单位硒含量增加了 1.9 倍;超过 24 h 后,菌丝体的生物量缓慢降低,即菌株的生长受到抑制,甚至出现了菌丝自溶现象。推断可能的原因是培养基内的营养物质被消耗殆尽,无法为菌株的生长、富集硒提供必需的条件。因此,选择 12、24、36 h 的 3 个因素水平进行正交实验。

2.2.5 碳源种类对菌株富集硒的影响 葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖四种碳源条件下,所得的菌丝体生物量分别为 10.3、10.8、10.8、9.8 g/L,生长曲线趋于平稳,以葡萄糖、乳糖作为培养碳源时,有机硒的转化

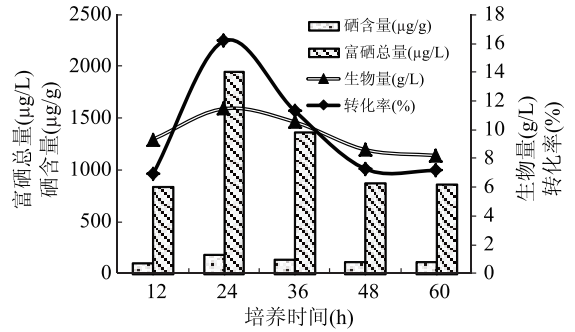


图6 不同培养时间对菌株富集硒的影响

Fig.6 Effect of different incubation time on the enrichment of selenium

率约为 14.0%,富硒总量分别为 1634.4 μg/L 和 1740.1 μg/L,明显优于麦芽糖、蔗糖,当使用蔗糖作为碳源时,富硒总量仅为 609.9 μg/L。由此可见,不同的碳源直接影响菌株的硒富集能力。蔗糖属于大分子物质非还原性糖类,不具有游离的醛基与酮基,不利于菌体直接吸收利用,因而引起硒富集低^[21-22]。

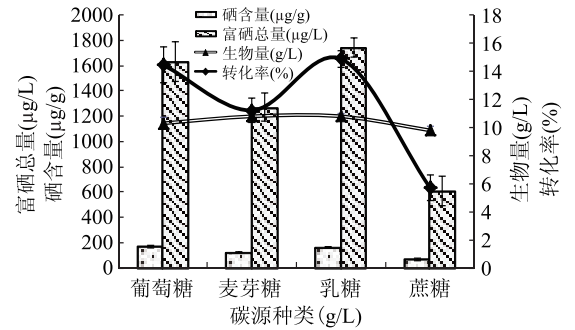


图7 不同碳源种类对菌株富集硒的影响

Fig.7 Effects of different carbon sources on the enrichment of selenium in strains

2.3 正交实验

实验结果见表 2,4 种因素主次顺序为 D > A > B > C,表明培养基的盐浓度、硒含量是菌株的富集硒主要影响因素,富硒培养基最佳的组合水平为 A₂B₂C₂D₂,即盐浓度 5 g/L,硒溶液添加量 30 mL,培养时间 24 h,碳源(葡萄糖)浓度 15 g/L。在最优水平验证实验结果,富硒总量为 1941.7 μg/L,菌丝体生物量为 10.7 g/L,有机硒转化率为 16.2%。

3 结论

在自然条件下,特别是在缺硒地区,适量的补硒可以防治动物因体内硒含量过低而引发疾病^[2-3]。因此,获得安全有效的硒源是关键。本文采用单因素实验、正交实验法对红树林植物阔苞菊内生真菌的硒富集能力及培养条件进行研究,确定了最适于的发酵条件:硒溶液添加量为 30 mL,盐浓度 5 g/L,碳源(葡萄糖)浓度 15 g/L,培养时间 24 h。发酵得到菌丝体富硒总量为 1941.7 μg/L,有机硒转化率仅为 16.2%,实验中发现菌丝体在加入硒溶液后培养初期出现了自溶现象,以致结果与文献值^[22]相比偏低。海洋是地球上最大的微生物生存的宝库,因此进一步筛选有机硒转化能力强的海洋红树林植物内生菌

表2 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	富硒总量 ($\mu\text{g/L}$)
1	1	1	1	1	679.7
2	1	2	2	2	1709.8
3	1	3	3	3	867.9
4	2	1	2	3	1519.2
5	2	2	3	1	1375.3
6	2	3	1	2	1906.5
7	3	1	3	2	1486.6
8	3	2	1	3	1404.6
9	3	3	2	1	1157.4
K_1	1085.8	1228.5	1330.3	1070.8	
K_2	1600.3	1496.6	1462.1	1701.0	
K_3	1349.5	1310.6	1243.2	1263.9	
极差 R	514.5	268.1	218.9	630.2	
主次顺序	D > A > B > C				
优化水平	A_2	B_2	C_2	D_2	
优化组合	$A_2B_2C_2D_2$				

种,对开发利用海洋真菌,同时丰富有机硒来源途径,具有较大的科研意义。

参考文献

- [1] Margaret P.R. The importance of selenium to human health [J]. Lancet, 2000, 356(9225): 233-241.
- [2] 秦俊法. 中国硒研究历史回顾(上) [J]. 广东微量元素科学, 2014, 21(11): 44-57.
- [3] 秦俊法. 中国硒研究历史回顾(下) [J]. 广东微量元素科学, 2014, 21(12): 36-51.
- [4] Tan J A, Zhu W Y, Wang W Y, et al. Selenium in soil and endemic diseases in China [J]. The Science of the Total Environment, 2002, 284(1): 227-235.
- [5] Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, et al. Chemical forms of selenium for cancer prevention [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 19(2): 141-150.
- [6] 姚昭, 李红艳, 张云龙, 等. 有机硒、无机硒、VE 单独使用及有机硒与 VE 联用对大鼠体内抗氧化能力的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34(15): 272-276.

(上接第 111 页)

- [21] Taehwan, Lim, Hana, Jung, Keum Taek, Hwang. Bioconversion of Cyanidin-3-Rutinoside to Cyanidin-3-Glucoside in Black Raspberry by Crude α -L-Rhamnosidase from Aspergillus Species [J]. Journal of Microbiology sbiotechnology, 2015, 25(11): 1842-1848.
- [22] Vinita Yadav, Saroj Yadav, Sarita Yadav, et al. α -L-rhamnosidase from Aspergillus clavatus - nanicus MTCC - 9611 active at alkaline pH [J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2012, 48(3): 295-301.
- [23] Ge L, Chen A, Pei J, et al. Enhancing the thermostability of α -L-rhamnosidase from Aspergillus terreus and the enzymatic conversion of rutin to isoquercitrin by adding sorbitol [J]. Bmc

[7] 高慧娟, 杨霞霞, 杜学基, 等. 荷叶离褶伞菌丝体富硒条件的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 146-149.

[8] Marek K, Stanislaw B, Iwona G. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5373-5382.

[9] 梁金钟, 王翼雪, 梅剑秋. 植物乳杆菌富硒培养条件的优化 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 137-142.

[10] 李祎, 郑伟, 郑天凌. 海洋微生物多样性及其分子生态学研究进展 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 655-668.

[11] 张偲, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋生物多样性研究 [J]. 中国科学院院刊, 2010, 25(6): 651-658.

[12] 杨志强, 李杰, 郑国东, 等. 广西北部湾沿海经济区富硒土壤地球化学特征 [J]. 物探与化探, 2014, 38(6): 1260-1264.

[13] 徐树兰, 程中山, 陈其津, 等. 不同培养条件下红树林真菌 1893 菌株代谢产物的杀虫活性 [J]. 环境昆虫学报, 2009, 31(1): 58-62.

[14] 杨革. 灵芝菌丝体深层培养及多糖提取工艺研究 [J]. 生物学杂志, 1997, 14(2): 16-17.

[15] 蒋步云, 柴振林, 吕爱华, 等. 杨梅中硒含量测定的消化方法 [J]. 浙江农业科学, 2012, 8(14): 1175-1176.

[16] 郝素娥, 滕冰. 硒酵母中硒含量测定方法的研究 [J]. 理化检验, 2012, 4(8): 151-153.

[17] 刘娟, 焦华. 分光光度法测定大米中硒含量 [J]. 光谱实验室, 2012, 4(4): 2376-2379.

[18] 杨永锋, 姚耀柱, 梁嘉梨, 等. 两种干海产品中硒含量的紫外-可见分光光度间接测定 [J]. 化学研究与应用, 2016, 28(6): 837-841.

[19] Michael O.G., Robert C.E. Fungal Nutrition and Physiology [M]. USA: A Wiley-Interscience Publication, 1984: 71-96.

[20] 李艳宾, 张琴. 产黄酮甘草内生真菌 YF-A 的发酵工艺优化 [J]. 食品科技, 2016, 41(11): 25-30.

[21] Schubert A, Allara P, Morte A. Cleavage of sucrose in roots of soybean (Glycine max) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus [J]. New Phytologist, 2004, 161: 495-501.

[22] 邹英宁, 吴强盛, 李艳, 等. 丛枝菌根真菌对枳根系形态和蔗糖、葡萄糖含量的影响 [J]. 应用生态学报, 2014, 25(4): 1125-1129.

[23] 陈志杰, 袁书林. 食(药)用真菌富硒及产品开发研究进展 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(6): 9-11.

Biotechnology, 2017, 17(1): 21-28.

[24] You H J, Ahn H J, Ji G E. Transformation of rutin to antiproliferative quercetin-3-glucoside by Aspergillus niger [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(20): 10886-10892.

[25] Guan C J, Ji Y J, Hu J L, et al. Biotransformation of Rutin Using Crude Enzyme from Rhodopseudomonas palustris [J]. Current Microbiology, 2017, 74(4): 431-436.

[26] Kim D Y, Yeom S J, Park C S, et al. Effect of high hydrostatic pressure treatment on isoquercetin production from rutin by commercial α -L-rhamnosidase [J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(10): 1-6.