

姬松茸深层发酵富集锌的研究

刘 坤 沈 卫 章克昌

(江南大学生物资源研究室工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘 要 对姬松茸菌丝进行了富集锌的研究。首先对姬松茸的耐锌和富锌特性进行了研究, 结果表明, 姬松茸的耐锌能力和富锌能力都很强, 在锌浓度为 $50 \sim 2\,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的固体培养基上, 菌丝均能生长, 当锌浓度超过 $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌丝生长受到一定影响; 采用液体深层培养, 当锌浓度为 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 富锌率最高。实验中还对比培养条件进行了优化, 在培养温度 25°C , pH 5.1, 振荡速度 $150\ \text{r}/\text{min}$, $250\ \text{mL}$ 三角瓶装液 $50\ \text{mL}$, 接种量 15% (v/v), 培养基中锌添加量为 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 姬松茸菌丝的生物转化量及菌丝体富锌率最高, 达到 12.64% 。最后对锌的有机化进行了研究, 结果表明, 姬松茸对锌有生物转化能力, 加入的锌并非机械地物理吸附在菌体表面, 而是发生了有机的生物转化, 形成了牢固结合的复杂的有机锌, 其有机化程度在 57% 左右。

关键词 姬松茸, 富锌

锌是生命必需的微量元素之一, 是人体许多活化酶的催化因子, 锌参与体内 300 余种酸和功能蛋白的组成, 具有广泛的生理生化功能^[1]。据资料显示, 我国约有 60% 的儿童每天锌的摄入量为标准量的 50% , 影响了儿童的正常发育。对老年人的锌营养状况研究表明, 锌摄入不足, 易致免疫功能的减退, 易患肿瘤和感染性疾病^[3]。以无机盐形式补锌, 其缺点是难以吸收, 且一般游离态金属均具有一定的毒性^[4]。倘若通过摄入药用菌菌丝细胞内物质代谢转化, 将无机锌结合到大分子活性物质(如多糖和蛋白质)上, 成为有机锌多糖和锌蛋白, 则可以避免无机锌的缺点, 并更有利于有机锌的免疫功能和食药用菌的抗病功能的发挥^[5]。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

姬松茸 (*Agaricus blazei* Murill) 作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基

斜面培养基(质量分数, %): 土豆 20, 葡萄糖 2, 麸皮 5, 琼脂 2, 蛋白胨 0.4, KH_2PO_4 0.2, MgSO_4 0.1, $V_{B_1} 3 \times 10^{-3}$; 种子培养基(质量分数, %): 玉米粉 2, 蔗糖 2, 麸皮 1, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.1, V_{B_1} $10\ \text{mg}/100\ \text{mL}$; 发酵培养基(质量分数, %): 玉米粉 2, 蔗糖 1, 麸皮 1, 棕榈酸 0.2, KH_2PO_4 0.3, MgSO_4 0.2, V_{B_1}

$10\ \text{mg}/100\ \text{mL}$ 。

1.1.3 主要试剂和仪器设备

ZnSO_4 、 CCl_4 、双硫脲。回转式恒温调速摇床柜、721 可见光分光光度剂。

1.2 方 法

1.2.1 固体平板培养

将姬松茸接种到锌含量分别为 0、50、100、200、300、400、600、800、1 000 和 $2\,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板上, 于 25°C 下培养 15 d, 测定菌落直径和萌发时间。

1.2.2 液体培养

液体种子培养: 将斜面菌种切割成黄豆大小的小块, 接种于液体种子培养基中, 每 $100\ \text{mL}$ 培养基接种半只斜面。500 mL 三角瓶装液量 $100\ \text{mL}$, 于 25°C , $150\ \text{r}/\text{min}$ 摇瓶培养 9 d; 富锌发酵培养: 15% (体积分数) 接种量, 摇瓶转速 $150\ \text{r}/\text{min}$, $250\ \text{mL}$ 三角瓶装液量 $50\ \text{mL}$, 发酵温度 25°C 。

1.2.3 生物量测定

取 $150\ \text{mL}$ 发酵液, $3\,000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 20 min, 经自来水洗涤多次, 然后将菌丝体在 60°C 烘至恒重, 称重。

1.2.4 胞外多糖的测定^[6]

1.2.5 有机锌的测定

双硫脲分光光度法^[7]。

1.2.6 锌有机化测定^[8]

2 结果与讨论

2.1 姬松茸在平板培养基中的耐锌特性

不同的生物对锌的耐受力不同, 为探讨姬松茸对锌的耐受特性, 进行了在含不同质量分数锌的固体平

第一作者: 硕士研究生。

收稿时间: 2004-10-08, 改回时间: 2004-12-07

板上培养,考察菌丝生长情况。从图 1 可知,当培养基中锌含量在 100~300 $\mu\text{g/mL}$ 时,锌对姬松茸菌丝的生长有明显的促进作用,当锌浓度大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,对姬松茸菌丝生长有明显的抑制作用。

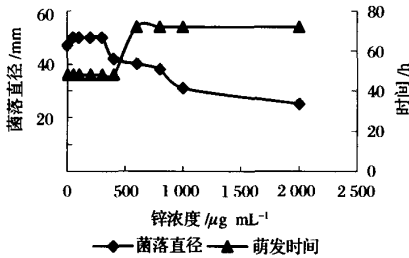


图 1 姬松茸在平板上的耐锌特性

2.2 姬松茸液体培养的富锌能力

根据固体平板培养的结果,分别选择 0、50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 进行液体培养试验,结果见表 1。

表 1 液体培养姬松茸的富锌能力

Zn/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	含锌量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	富锌率/%
0	8.88	0.172	—
50	10.43	0.387	4.49
100	10.84	0.834	7.72
200	9.05	2.632	11.13
300	7.72	2.297	5.47
400	4.32	3.135	3.20

培养基中锌浓度在 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,菌丝锌含量几乎不变,但对菌体生长有明显的促进作用;培养基中锌浓度达 300 $\mu\text{g/mL}$ 后,菌丝体富集作用趋缓,添加量为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,富集率最大,达 11.13%。

2.3 锌对姬松茸胞外多糖含量的影响

配置含锌 0、50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 的液体培养基,进行液体培养实验,考察在液体培养条件下富集锌后对胞外多糖的影响,实验结果见图 2。

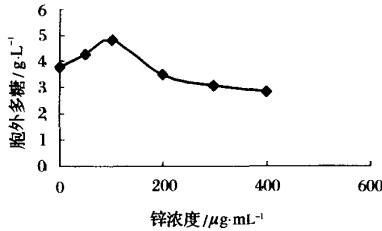


图 2 富锌浓度对姬松茸胞外多糖的影响

从图 2 可以看出,低浓度的锌有利于胞外多糖的形成,锌浓度在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,胞外多糖最高可达 4.81 g/L ,比对照组提高了 26.6%。

2.4 培养条件对姬松茸富锌的影响

2.4.1 通气量的影响

姬松茸是好氧菌,培养基的溶氧对姬松茸的生长及代谢至关重要^[9]。采用不同装液量进行实验,结果表明,过高或过低的溶氧都不利于姬松茸富锌,当 250 mL 三角瓶装液体积为 50 mL 时,富锌率最高,所以装液 50 mL 时为最佳。

表 2 不同装液量对姬松茸富锌的影响

装液量(mL/mL)	干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	含锌量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	富锌率/%
50/250	11.14	1.974	11.00
75/250	12.68	1.541	9.77
50/500	7.62	2.441	9.30
100/500	9.62	2.237	10.76
150/500	12.13	0.950	5.76

2.4.2 pH 的影响

培养基的 pH 不仅影响姬松茸的生长而且影响其代谢途径,配制不同起始 pH 的培养基进行摇瓶实验,结果表明 pH 对姬松茸富锌影响较大,pH 太低,影响姬松茸菌丝的正常生长,生物量低,富锌率相应也低;pH 较高时,虽然生物量较高,但富锌率却降低,说明高 pH 不利于姬松茸对锌的富集或者说高 pH 不利于锌与多糖、蛋白质、肽等有机大分子的结合。只有在 pH 5.1 左右时富锌率最高。

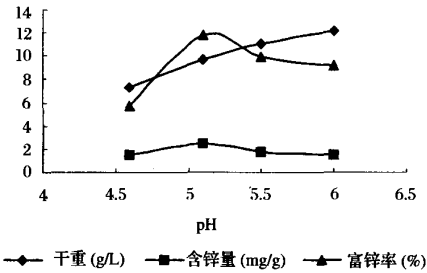


图 3 不同 pH 值对姬松茸富锌的影响

2.4.3 不同培养温度的影响

温度也是影响姬松茸生长的重要因素之一,温度过高或过低都将影响姬松茸的生长和代谢,实验中分别考察了 20℃、25℃、30℃ 进行实验。实验结果见图 4。

图 4 不同温度对姬松茸富锌的影响

从图 4 可看出,较高的温度不利于姬松茸生长,较低的温度虽不影响姬松茸生长,但不利于姬松茸对锌的富集。25℃时姬松茸生长旺盛并有较高的富锌率。

2.4.4 接种量的影响

选择 5%、10%、15%、20%、30% 几种不同的接种量,25℃培养姬松茸菌丝,测定富锌姬松茸菌丝干重、菌丝内有机锌含量并计算锌生物转化率。结果见图 5。结果表明,当接种量在 15% 时,富锌率最高,达到 12.64%。

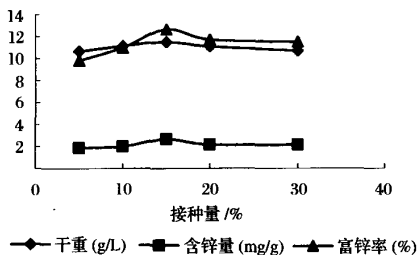


图 5 不同接种量对姬松茸富锌的影响

2.5 锌的有机化程度的测定

采用静置浸出法测定姬松茸富锌的有机化程度,实验结果见表。

表 3 锌的有机化程度分析

方法	静置浸出法		
处理前菌丝总锌/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	0.701		
处理后菌丝总锌/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	6 h, 0.587	12 h, 0.401	24 h, 0.399
有机化程度/%	83.7	58.3	56.9

由表 3 可知,姬松茸对锌有生物转化能力,加入的锌并非机械地物理吸附在菌体表面,而是发生了有机的生物转化,形成了结合牢固的复杂的有机锌,其有机化程度在 57% 左右。

3 小 结

通过实验确定了培养基中的最适加锌量和最适发酵条件为:培养温度 25℃, pH 5.1, 振荡速度 150 r/min, 250 mL 三角瓶装液 50 mL, 接种量 15% (体积分数), 培养基中锌添加量为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,姬松茸菌丝的生物转化量及菌丝体富锌率最高。

参 考 文 献

1 张建辉.冬虫夏草、蛹虫草、姬松茸的液体培养条件及其富锌、硒的研究[D].东北农业大学理学硕士学位论文,2002
2 雷泓志,张进武,万益琴.金针菇富锌深层培养的研究[J].食用菌,2001,23(5):11
3 魏 华,谢俊杰,戴明辉等.金针菇富锌研究[J].中国食用菌,1993,12(2):8~10
4 梁 峙,吕文斌,张文林.金针菇发酵培养液的富锌能力探讨[J].食用菌,2001,23(2):7~9
5 邓百万,陈文强.猪苓菌丝液体培养及富锌研究[J].中国食用菌,2003,22(1):33~34
6 邹 祥.姬松茸深层培养及富锌工艺的研究[D].江南大学硕士学位论文,2003.3
7 GB/T 500914-1996,中华人民共和国国家标准
8 孙希雯,李奇庚.金针菇富锌培养及锌结合形态的研究[J].微生物学报,1997,37(1):40~46
9 活 泼,徐柔,章克昌.酒精糟液香菇深层发酵富集微量元素的研究(续)[J].中国食用菌,2003,22(5):36~37

Zn Accumulation of Agarics blazei Murill

Liu Kun Shen Wei Zhang Kechang

(The key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, South Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT Accumulation of Zn in *Agarics blazei* Murill was determined and the Zn-resisting and Zn-accumulating characters of submerged culture *Agarics blazei* Murill were studied in this paper. The results showed that the capacity of both Zn-resisting and Zn-accumulating of *Agarics blazei* Murill was very high. The strain can grow in the solid medium with zine from 50 to 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, the zine content above 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hampered its growth. When zine added to the liquid medium is up to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the hyphae have the most zine absorbance. It is also found that the Zn-recovery and the biomass of *Agarics blazei* Murill were the highest under the liquid culture conditions, that is, fermentation temperature 25℃, stirring speed 150 r/min, inoculation size 15%, 250 mL shake flash containing 50 mL medium containing Zinc, pH5.1. In our study, the degree of organized-Zn was up to 57%.

Key words *Agarics blazei* Murill, Zn accumulation