

文章编号 :1009-038X(2000)03-0248-04

灰树花富锗培养研究*

陈石良¹, 许正宏¹, 陶文沂¹, 谷文英²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 :对食药真菌灰树花的耐锗和富锗特性进行了研究. 结果表明, 灰树花的耐锗能力和富锗能力都很强. 在锗质量分数为 100~3 000 mg/kg 的固体培养基上, 菌丝均能生长, 当锗质量分数超过 2 500 mg/kg 时, 菌丝生长受到一定影响. 采用液体深层培养, 在锗质量分数为 100~1 500 mg/kg 范围内, 菌丝体富集锗的范围为 296~3 746 mg/kg(以干菌丝计), 当锗质量分数为 500 mg/kg 时, 菌丝体对锗的吸收率最高, 达 3.58%. 适当的锗还能促进菌丝体对培养液中还原糖的利用并提高菌丝干收率及胞外多糖分泌量, 但对发酵液 pH 值、发酵周期及菌丝体胞内多糖产量没有明显影响.

关键词 :灰树花, 液体深层培养, 富锗

中图分类号 : O614.431 **文献标识码 :** A

Germanium Accumulation of *Grifola frondosa*

CHEN Shi-liang¹, XU Zhen-hong¹, TAO Wen-yi¹, GU Wen-ying²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : The Ge-resisting and Ge-accumulating characters of submerged culture *Grifola frondosa* GrUV05 were studied in this paper. The results showed that the capacity of both Ge-resisting and Ge-accumulating of *Grifola frondosa* GrUV05 was very strong. The strain can grow in the solid medium adding the germanium from 100 to 3 000 mg/kg. However, the germanium content above 2 500 mg/kg hampered its growth. When the germanium added to the liquid medium is in the range from 100 to 1 500 mg/kg, the germanium absorbed in the hyphae is from 196 to 3 746 mg/kg. When the germanium added to the liquid medium is up to 500 mg/kg, the hyphae have the most germanium absorbance, which is up to 3.58%. The germanium can improve the utilization rate of reducing sugar, hyphae yield and extracellular polysaccharides yield, which has no effects on the fermentation cycle, pH value of the culture medium and polysaccharide yield of the hyphae.

Key words : *Grifola frondosa*; submerged culture; germanium accumulation

锗元素的一些化合物具有一定的生理活性和医疗保健功能, 尤其是天然有机锗化合物具有较好的抗肿瘤、抗衰老和提高机体免疫功能等功效, 因而引起了国内外医学界和营养学界特别关注^[1].

* 收稿日期: 1999-10-19, 修订日期: 2000-03-19.
作者简介: 陈石良(1969年9月生), 男, 湖南邵阳人, 发酵工程博士研究生.

食用菌具有较强的富锗能力,目前有关富锗菌类保健食品和药品的研究开发正在广泛进行^[2],灰树花(*Grifola frondosa*)是近几年开发出来的一种珍稀食药两用菌,其子实体、菌丝体和发酵液中含有丰富的多糖、蛋白质和维生素等。据报道,其活性多糖对肿瘤和爱滋病毒有一定的疗效,活性蛋白能抑制血管紧张素转化酶的活性,具有明显的降压作用^[3,4]。目前尚未见到有关灰树花富集锗元素的研究报道。为此,作者分别采用固体培养和液体深层发酵技术,研究了灰树花 GrUV05 菌株的耐锗和富锗特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 灰树花(*Grifola frondosa*)GrUV05 作者所在实验室筛选保藏。

1.1.2 培养基 固体培养基 综合 PDA 液体培养基(g/L) 玉米粉 30,豆饼粉 10,麸皮 10,葡萄糖 10,KH₂PO₄ 2,MgSO₄ 1。

1.1.3 主要试剂 GeO₂ 国产分析纯。

1.1.4 主要仪器设备 回转式恒温调速摇瓶柜, Spectrofluorophotometer 960,pHB-4 酸度计。

1.2 方法

1.2.1 固体平板培养 分别制作含锗 0,100,500,1 000,1 500,2 000,2 500,3 000 的 PDA 平板(以 GeO₂ 配制),接种斜面菌种,于 25℃ 下培养 15 d,测菌丝生长速度。每组实验设 5 次重复。菌丝生长速度=(菌落直径-菌种块直径)/培养时间,单位为 mm/d。

1.2.2 液体培养 将活化的斜面菌种转接至装 100 mL 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,置回转式恒温调速摇瓶柜中,25℃,150 r/min 培养 7 d,获得液体种子。再按 10% 接种量接种,同样条件下进行发酵培养。每组实验设 3 次重复。

1.2.3 液体培养物的处理 培养物经离心,分别收集菌丝体和发酵清液。清液置冰箱中保存备用,菌丝体用去离子水反复冲洗,直至水洗液中检测不出锗为止。菌丝体在 60℃ 下烘干至恒重,粉碎,过 40 目筛。

1.2.4 多糖的提取 将干菌粉按 1:20 的比例加入蒸馏水,95℃ 下浸提 2 h 共 3 次,合并 3 次提取液,经过滤浓缩后,用 Sevag 法^[5]脱蛋白 5 次,加入 3 倍体积的 95% 乙醇,低温静置 1 d 后离心,并依次用 75% 乙醇、无水乙醇和丙酮洗涤,真空干燥,得菌丝体胞内粗多糖。将发酵液减压浓缩,Sevag 法脱蛋

白后,同上法醇析、洗涤、干燥得发酵液胞外粗多糖。

1.2.5 还原糖含量测定 DNS 法^[6]。

1.2.6 锗含量测定 荧光光度法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 灰树花的耐锗能力

不同的生物对锗的耐受力不同。为探讨灰树花 GrUV05 对锗的耐受特性,进行了在含不同质量分数锗的固体平板上培养,考察菌丝生长情况。从图 1 可知,灰树花 GrUV05 在 7 种培养基上均能生长。其中在 100~1 000 mg/kg 范围内,菌丝生长速度较对照组明显提高。在 1 500~2 000 mg/kg 范围内,与对照组十分接近。当锗质量分数达到 2 500~3 000 mg/kg 时,菌丝生长受到一定抑制。因此,与紫孢侧耳、灵芝等^[8,9]其它食用菌相比,灰树花具有很强的耐锗能力。

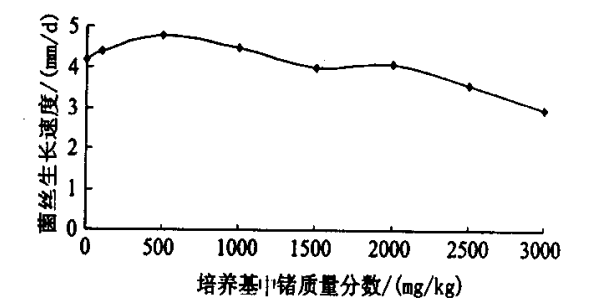


图 1 灰树花菌丝体在含锗固体培养基上的生长
Fig.1 Growth vigour of mycelium in the solid medium added with Ge

2.2 灰树花的富锗作用

根据固体平板培养的结果,分别选择 100、500、1 000、1 500 mg/kg 进行液体培养试验,见表 1。

表 1 液体培养灰树花富锗作用结果
Tab.1 Ge accumulation of *Grifola frondosa* under submerged culture

培养基中 Ge 质量分数/(mg/kg)	菌丝体干重/(g/L)	菌丝体中 Ge 质量分数/(mg/kg)	锗吸收率/% *
0	6.91	0	—
100	7.65	296	2.26
500	9.12	1 960	3.58
1 000	8.36	3 324	2.78
1 500	7.05	3 746	1.76

注:锗吸收率(%)为发酵液所得菌丝体含锗总量与发酵液锗总量之百分比。

灰树花 GrUV05 具有很强的富集锗的能力。当

培养液中锗为 100~1 500 mg/kg 时,菌丝体富集锗的总量在 296~3 746 mg/kg 之间,与添加量呈正相关.但从菌体对锗的吸收率来看,以添加 500~1 000 mg/kg 锗较适宜,此时吸收率为 3.58%~2.78%.

2.3 锗对灰树花液体培养过程的影响

根据富锗试验结果,选择锗质量分数 500 mg/kg 进行摇瓶培养试验.培养 10 d,每隔 24 h 测定菌丝干重、残糖及 pH 值变化.结果见图 2.添加锗对菌丝生长发育有较大的促进作用,菌丝干收率比对照明显提高,最大值在第六天,为对照组的 1.35 倍.锗还可促进菌体对发酵液中还原糖的利用,使降糖速度增加,发酵终点残糖较低,为 0.95%,而对照组为 1.32%.添加锗对灰树花 GrUV05 液体培养过程中体系的 pH 值变化及发酵周期的影响不明显.

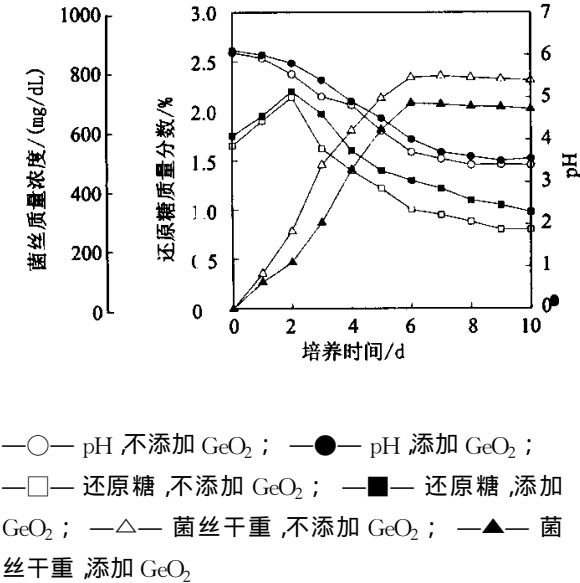


图 2 锗对灰树花液体培养过程的影响
Fig.2 Effect of Ge on the submerged culture of *Grifola frondosa*

2.4 锗对发酵液中胞外多糖含量的影响

在培养基中添加 GeO₂,使锗质量分数分别为 100 500 1 000 1 500 mg/kg.摇瓶培养 6 d,离心分离菌丝体与发酵液,按 1.2.4 方法提取和制备发酵液胞外多糖.结果表明(见图 3),低质量分数的锗有利于胞外多糖的形成,在 100~1 000 mg/kg 范围内,发酵液中胞外多糖的含量明显高于对照组,但在 1 500 mg/kg 时,胞外多糖得率反而下降.这可能是由于无机锗经菌丝细胞内物质转化为有机锗,参与体内酶的转化,从而促进胞外多糖的合成与分泌.

为探讨锗在生物大分子中的分布,进一步分析了胞外多糖中锗的含量,结果发现多糖中含有锗,

且其含量与培养基中添加锗质量分数有关,即在 100~500 mg/kg 锗质量分数范围内,多糖锗含量随着培养基中锗添加量的增大而提高,达 143~239 mg/kg,当锗质量分数大于 500 mg/kg 时,多糖中锗含量不再随之增加.日本学者 Mizuno T 等^[10]曾推测,食药菌中的锗可能是通过与多糖、蛋白质等相结合的形态存在,作者研究证实了锗能与多糖结合在一起形成有机锗多糖复合物.

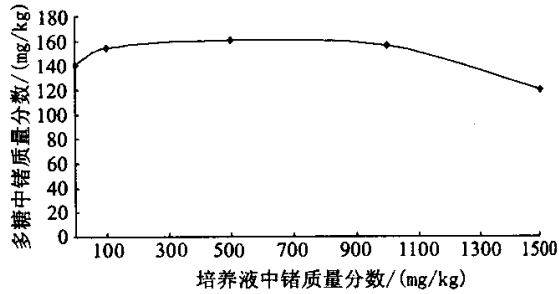


图 3 不同质量分数锗对胞外多糖及其含锗量的影响
Fig.3 Effect of different concentration of Ge on the contents of extracellular polysaccharide and Ge in polysaccharide

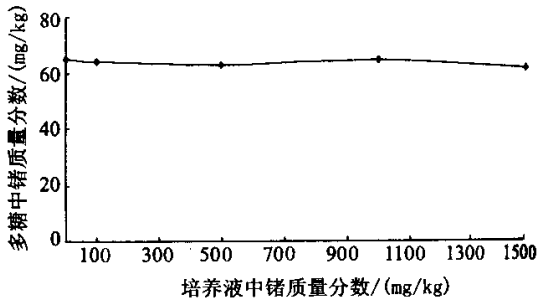


图 4 不同质量分数锗对胞内多糖及其锗含量的影响
Fig.4 Effect of different concentration of Ge on the contents of mycelial polysaccharide and Ge in polysaccharide

2.5 锗对菌丝体胞内多糖含量的影响

按 1.2.4 方法提取和制备菌丝体胞内多糖.图 4 表明,在 100~1 500 mg/kg 范围内,灰树花发酵菌丝体胞内多糖的含量没有差异.这表明,尽管锗可促进菌丝体的生长发育,但不影响菌丝体胞内多糖的合成;同时也提示,灰树花 GrUV05 胞外多糖与胞内多糖的生物合成可能受不同的酶系或代谢途径所调控.培养液中锗质量分数对胞内多糖锗质量分数的影响与胞外多糖的情况一致,在 100~1 500 mg/kg 范围内,胞内多糖锗质量分数在 94~139 mg/kg 之间,比胞外多糖含锗量低.

(下转第 254 页)

参考文献

- [1] 王洪存, 孙树英. 食用菌中的有益元素——锗[J]. 食用菌, 1992(1): 41~43
- [2] 陈士瑜. 菌类保健食品生产现状和发展策略[J]. 中国食用菌, 1995(2): 7~9
- [3] MIZUNO T. Fractionation and Characterization of Antitumor Polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*[J]. **Agric, Biol Chem**, 1986, 50(7): 1679~1688
- [4] ADACHI K. Blood Pressure - Lowering Activity Present in the Fruit Body of *Grifola frondosa*[J]. **Chem Pharm Bull**, 1988, 36(3): 1000~1006
- [5] STAUB A M. Methods in Carbohydr[J]. **Chem**, 1965(5): 5~6
- [6] 张龙翔主编. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [7] 魏华. 灵芝富锗培养研究[J]. 中国食用菌, 1996(1): 12~14
- [8] 钟卫鸿. 紫孢侧耳的富锗研究[J]. 中国食用菌, 1994(3): 11~12
- [9] 陆龙根. 富锗灵芝栽培试验[J]. 中国食用菌, 1993(2): 20~21
- [10] MIZUNO T. Development and utilization of bioactive substances from mushroom fung[J]. **Food and Development**, 1995, 23(2): 41~45

(责任编辑 朱 明)