

文章编号:1009-038X(2003)02-0048-05

富锌培养对姬松茸生长代谢的影响

邹祥, 章克昌

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了锌对食药菌姬松茸生长代谢的影响,考察了姬松茸耐锌能力和富集能力以及锌对姬松茸多糖和氨基酸代谢的影响。结果表明:液体培养姬松茸对锌的最适富集质量浓度为300 mg/L,在锌质量浓度为300 mg/L以内,锌对姬松茸菌丝量、多糖、氨基酸均有促进作用。锌的有机化分析表明82.2%的ZnSO₄在姬松茸菌丝内以有机锌的形式存在,氨基酸分析结果显示,富锌后菌丝体和发酵液必需氨基酸含量与对照相比分别提高了12.3%和3.6%。

关键词: 锌;姬松茸;深层培养

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Effect of Enriched Zn Culture on Growth and Metabolism of *Agaricus blazei* Murill

ZOU Xiang, ZHANG Ke-chang

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

Abstract: The effect of Zn on growth and metabolism in *Agaricus blazei* Murill was studied. The Zn-resisting and Zn-enriching ability of *Agaricus blazei* Murill, as well as the effect of Zn on metabolism of polysaccharide and amino acids were examined. The results showed that 300 mg/L was the maximum endurable concentration of Zn for *Agaricus blazei* Murill. Below 300 mg/L, Zn could improve yields of mycelium, polysaccharide and amino acids. The organic analyse showed that 82.2% ZnSO₄ was in form of organic Zn. After adding Zn to liquid medium, essential amino acids required by mycelium and fermentation liquid increased 12.3% and 3.6%, respectively.

Key words: zinc; *Agaricus blazei* Murill; submerged culture

锌是人体不可缺少的微量元素,是许多金属酶的组成成分或酶的激活剂,参与细胞基因的转录和复制,促进激素与受体的特异结合,能促进生长发育与组织再生,增强智力发育,尤其在有机化之后,形成的金属—有机复合物对人体可产生各种特殊的生理功能和保健功能,人体缺锌将导致食欲不

振、生长停滞以及免疫功能障碍等^[1]。但目前食物中强化锌用的主要是锌的无机盐,不仅吸收率低,而且具有一定的毒性,因此,有必要采取适当的方法在食物中增加锌的含量,促进人体对锌的有效吸收。姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)是目前研究较为热门的一种珍稀食药菌,在抗肿瘤、降血压、治

收稿日期:2002-09-11; 修回日期:2002-11-22.

作者简介:邹祥(1976-),男,湖北仙桃人,发酵工程硕士研究生.

疗糖尿病及维护肝功能等方面具有显著的作用,日本已将其作为传统保健食品,用于防治癌症、糖尿病、高血脂、慢性肝炎等疾病^[2]。据日本东京大学医学部和国立癌症研究中心报道^[3],姬松茸的抗癌作用明显优于其它 11 种已知有抗癌作用的大型真菌,位居抗癌真菌首位。但目前尚未见到有关姬松茸富集锌元素的研究报道。为此,作者研究了姬松茸的耐锌和富锌特性,锌的有机化程度,以及富锌后姬松茸氨基酸营养成分的变化,为研制安全、补锌效率高的优质保健食品或抗癌药物开辟了新的途径。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)由生物工程学院生物资源实验室提供。

1.1.2 培养基

1) 固体培养基: PDA 培养基。

2) 斜面培养基: 马铃薯 20 g/dL, 葡萄糖 2 g/dL, KH_2PO_4 0.2 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dL, VB_{10} 10 mg/dL。

3) 液体培养基: 玉米粉 3 g/dL, 酵母膏 0.3 g/dL, 蔗糖 2 g/dL, KH_2PO_4 0.2 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dL, VB_{10} 10 mg/dL。

1.1.3 主要试剂 ZnSO_4 为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器 SpectrAA 220 型原子吸收光度计, 日立 835 型氨基酸自动分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1) 固体培养: 分别制作锌质量浓度为 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000, 2 000 mg/L 的 PDA 平板(以 ZnSO_4 配制), 接种斜面菌种, 于 25 °C 下培养 12 d, 测菌丝生长速度, 菌丝生长速度 = (菌落直径 - 菌种块直径) / 培养时间, 单位为 mm/d。

2) 液体种子培养: 将已活化的斜面菌种切割成黄豆大小的菌丝块, 接种于液体培养基中, 1 支斜面接 1 瓶, 500 mL 三角瓶装培养基 100 mL 于 25 °C, 160 r/min 培养 7~8 d。

3) 发酵培养: 二级摇瓶, 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL, 液体菌种接种量为 10%, 于 25 °C, 160 r/min 培养 6 d。

1.2.2 姬松茸富锌中的锌有机化程度分析 持续透析法^[4]。将 0.5 g 富锌菌丝体在纯水中连续透析, 直至用茚三酮法检查透析液中无氨基酸为止, 测定菌丝体中含锌量。

1.2.3 菌丝干重测定 取 100 mL 发酵液, 3 000 r/min 离心 20 min, 经自来水洗涤多次后, 将菌丝体在 105 °C 烘干至恒重, 分析天平称重。

1.2.4 胞外粗多糖测定 采用分步乙醇沉淀法^[5]。取 100 mL 发酵液, 3 000 r/min 离心 20 min, 向上清液中加入体积分数为 95% 的乙醇, 至体积分数为 30%, 冰箱过夜, 离心的滤液继续追加体积分数为 95% 的乙醇, 至体积分数为 60%, 离心得粗多糖, 60 °C 烘干至恒重, 分析天平称重。

1.2.5 胞内多糖的测定 将菌丝体按 1:30 的比例加入蒸馏水, 95 °C 下浸提 5 h 共 2 次, 合并滤液浓缩后, 制备菌丝体胞内多糖。

1.2.6 锌质量浓度的测定 火焰原子吸收光谱法^[6]测定。

1.2.7 氨基酸的测定 日立 835 型氨基酸自动分析仪测定^[7]。

1) 分析条件: 离子交换柱柱长 26.50 mm, 树脂 2619#; 柱温 53 °C; 缓冲液流速 0.225 mL/min, 柱压 80~130 kg/cm²; 茚三酮流速 0.3 mL/min, 柱压 15~30 kg/cm²。

2) 分析方法: 称取 200 mg 样品用玻璃棒塞入特制的玻璃水解管中, 加入 6 mol/L HCl 8 mL, 抽真空, 待真空度达到要求后维持 10 min 封口, 110 °C 水解 24 h 后冷却, 将水解液转移至 50 mL 容量瓶中, 用超纯水洗涤水解管 3 次, 用两层滤纸过滤定容, 取滤液 1 mL 于 10 mL 烧杯中, 60 °C 水浴 30 min, 在真空干燥器中蒸干, 根据样品的质量和蛋白质含量加入一定体积的 0.02 mol/L HCl, 在空气中放置 30 min, 用 H835-50 氨基酸分析仪测定氨基酸含量。

2 结果与讨论

2.1 姬松茸在平板培养基中的耐锌能力

将姬松茸菌种到含不同质量浓度锌的固体平板上培养, 考察菌丝生长情况。从图 1 可知, 姬松茸在含锌 50~2 000 mg/L 的培养基上均能生长, 其中在 50~300 mg/L 范围内菌丝生长速度较对照组高, 锌质量浓度超过 400 mg/L 时姬松茸菌丝生长开始受到抑制。

2.2 姬松茸液体培养富锌能力

根据固体平板培养结果, 配制锌质量浓度为 100, 200, 300, 400 mg/L 的液体培养基, 进行液体培养, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, 姬松茸有较强的富锌能力, 培养液中锌质量浓度为 100~300 mg/L 时, 菌丝体

中锌的质量浓度在 2.56~27.49 mg/L 之间,与锌添加量呈正相关,菌丝体干重与平板培养相似,比对照组高。从菌体对锌的富集率来看,以添加 300 mg/L 锌较适宜,此时锌的富集率为 8.41%。

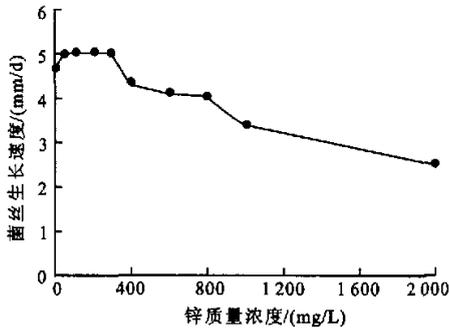


图1 姬松茸菌丝体在含锌固体培养基上的生长

Fig.1 Growth characteristics of mycelium in the solid medium containing Zn

表1 液体培养姬松茸富集能力

Tab.1 Zn enriched ability under submerged culture of AbM

培养基中 Zn 质量浓度/ (mg/L)	菌丝体 干重/ (g/L)	菌丝体中 Zn 质量浓度/ (mg/L)	Zn 富集率/ %
0	6.21	2.26	—
100	6.68	2.56	0.3
200	6.26	13.5	5.62
300	6.47	27.49	8.41
400	5.17	25.11	5.72
500	4.13	24.32	4.41

2.3 锌对姬松茸胞外多糖质量浓度的影响

在培养基中添加 $ZnSO_4$, 使锌质量浓度分别为 50, 100, 200, 300, 400 mg/L, 摇瓶培养 6 d, 提取和制备发酵液胞外多糖, 结果见图 2。

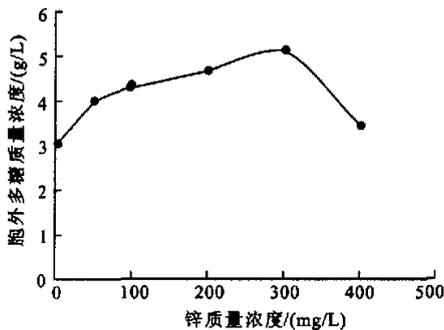


图2 锌质量浓度对姬松茸胞外多糖质量浓度的影响

Fig.2 Effect of Zn concentration on extracellular polysaccharide of AbM

从图 2 可以看出, 低质量浓度的锌有利于胞外多糖的形成, 在 50~300 mg/L 的范围内, 发酵液中胞外多糖的含量明显高于对照组, 锌质量浓度在 300 mg/L 时, 胞外多糖最高可达 5.08 g/L, 比对照组提高了 69.3%, 但在超过 300 mg/L 的情况下, 胞外多糖含量明显下降, 这可能由于过量的锌抑制了胞外多糖合成酶系的活性, 导致胞外多糖的生物合成速率降低。

2.4 锌对姬松茸胞内多糖质量分数的影响

在培养基中加入不同质量浓度的锌, 摇瓶培养 6 d, 提取和制备菌丝体胞内多糖, 结果见图 3。

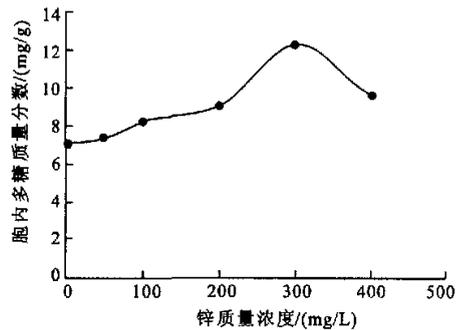


图3 锌质量浓度对姬松茸胞内多糖的影响

Fig.3 Effect of Zn concentration on mycelial polysaccharid of AbM

图 3 表明, 培养液中锌质量浓度对胞内多糖的影响和胞外多糖的情况趋于一致, 在 50~300 mg/L 范围内, 有助于胞内多糖的形成, 锌质量浓度在 300 mg/L 时, 每克菌丝体胞内多糖含量最高可达 12.25 mg。

2.5 锌有机化程度分析

采用持续透析法测定液体培养富集姬松茸后, 测定锌在菌丝体内的有机化程度, 结果见表 2。

表2 锌的有机化程度分析

时间/ h	菌丝体总 Zn 质量分数/ (mg/g)	菌丝体处理后 Zn 质量分数/ (mg/g)	游离锌 质量浓度/ (g/dL)
0	1.89	—	—
12	—	1.75	7.4
24	—	1.62	14.2
36	—	1.56	17.5
48	—	1.55	17.8

从表 2 可以看出, 姬松茸对锌有生物转化能力, 持续透析 36 h 后菌丝体内锌质量分数基本不

变,表明加入的锌与菌体内的物质紧密结合形成有机锌复合物,不易渗透析出,48 h 时游离锌含量为 17.8%,其菌丝体内锌的有机化程度应为 82.2%。

2.6 富锌对姬松茸氨基酸成分的影响

将富锌培养液离心得到的上清液和菌丝体,和对照组分别进行氨基酸分析测定,结果见表 3。

表 3 姬松茸氨基酸组成变化

Tab.3 Amino acid composition changes of AbM

氨基酸	对照上清液		富锌上清液		对照菌丝体		富锌菌丝体	
	质量浓度/ (mg/dL)	相对含量* / %	质量浓度/ (mg/dL)	相对含量/ %	质量分数/ (mg/hg)	相对含量/ %	质量分数/ (mg/hg)	相对含量/ %
天冬氨酸	3.31	14.53	3.21	14.32	103.84	9.53	103.79	9.63
胱氨酸	0.57	2.50	0.59	2.63	15.81	1.45	0.00	0.00
丝氨酸	1.49	6.53	1.21	5.39	52.33	4.80	53.99	5.01
谷氨酸	4.98	21.82	4.71	21.02	204.7	18.78	179.3	16.64
甘氨酸	2.36	10.33	2.46	10.97	82.53	7.57	66.31	6.16
丙氨酸	1.13	4.93	1.15	5.12	79.58	7.30	76.49	7.10
精氨酸	0.91	4.00	1.03	4.59	47.66	4.37	50.57	4.69
脯氨酸	2.19	9.61	2.07	9.27	60.69	5.57	56.26	5.22
组氨酸	0.52	2.27	0.5	2.23	13.40	1.23	13.79	1.28
苏氨酸	1.15	5.06	1.08	4.82	47.78	4.38	48.16	4.47
缬氨酸	1.40	6.13	1.51	6.73	77.32	7.09	76.53	7.10
蛋氨酸	0.18	0.77	0.17	0.74	35.32	3.24	91.50	8.49
异亮氨酸	0.52	2.28	0.52	2.34	52.07	4.78	57.46	5.33
亮氨酸	0.94	4.14	0.91	4.06	97.97	8.99	86.84	8.06
苯丙氨酸	0.84	3.69	0.75	3.36	50.97	4.68	48.71	4.52
赖氨酸	0.84	3.68	1.04	4.63	40.13	3.68	40.90	3.80
酪氨酸	—	—	—	—	27.95	2.56	26.77	2.48
总和	22.82		22.39		1090.08		1077.4	
必需氨基酸 质量分数/%	25.75		26.69		39.40		44.26	

*注:相对含量为单个氨基酸与所测氨基酸总量之比

结果表明,姬松茸富含 17 种氨基酸(色氨酸待测),姬松茸富锌后氨基酸含量变化比较明显,富锌上清液和菌丝体与对照组相比氨基酸总量略有降低,但 8 种必需氨基酸增量较大,富锌上清液必需氨基酸质量浓度为 26.69 mg/dL,比对照组增加 3.6%,富锌菌丝体中必需氨基酸含量为每 100 g 菌丝体为 44.26 mg,比对照组增加了 12.3%,富锌菌丝体中蛋氨酸含量为每 100 g 菌丝体为 91.5 mg,增幅最大,可补充食物中含硫氨基酸的不足。赖氨酸、精氨酸和组氨酸在富锌后含量均有不同程度的增加。

3 结 论

1) 姬松茸富锌培养研究表明,姬松茸具有较强的富锌转化能力,培养基中添加 300 mg/L 的 Zn-SO₄,菌丝体富集率最高,有机化程度为 82.2%。

2) 在一定质量浓度范围内添加锌,对姬松茸菌丝体生长、氨基酸、多糖均有促进作用,可能与改变菌丝体内部酶的活性有关,延缓菌丝老化,促进有效成分的积累^[8]。

3) 姬松茸具有较强的富锌能力,但在发酵液中仍留有大量的无机锌,因此发酵液再利用问题有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘志诚,于守洋.营养与食品卫生学(第二版)[M].北京:人民卫生出版社,1991.37-38.
- [2] Takeshi T, Kawagishi H, Hiromichi O. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei murill* and its mechanism of action[J]. *J Nutr*, 2001, 131(4):1409-1413.
- [3] 近藤贤著.巴西蘑菇与癌症[M].刘雪卿译.台湾:正义出版社,1998.
- [4] 孙希雯,李奇庚.金针菇富锌条件及锌结合形态的研究[J].微生物学报,1997,37(1):40-46.
- [5] 张维杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科技出版社,1987.
- [6] GB/T 500914-1996,中华人民共和国国家标准[S].
- [7] 无锡轻工大学,天津轻工业学院合编.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [8] 尚德静,王关林.富硒深层培养对灵芝生长代谢的影响[J].食品与发酵工业,2000,25(1):29-32.

(责任编辑:李春丽)

江南大学科技服务部简介

江南大学是经教育部批准,由无锡轻工大学等院校于2001年1月4日正式合并新组建的教育部直属的国家“211工程”重点建设大学,涵盖工、理、文、经、教、法、农、医、管等学科门类,其中发酵工程、食品科学为国家重点学科点。学校共有43个本科专业,21个硕士点,8个博士点,2个博士后流动站,6个部省级重点学科点,36个科研院、所,以及和地方政府共建的大学科技园区。

目前有全日制在校生1.8万余人,成人学历教育在籍生7800余人。教职工近3000人,1230名专任教师中,有中国工程院院士、国务院学位委员会工学评议员和教育部科技学部成员4人,研究生导师170多人,具有正、副教授等高级职称的人员700余名。学校现有面积1600亩,图书馆各类藏书130万册。

江南大学科技服务部代表学校推广科技成果,承接技术难题,组织科技开发和技术项目总成。长期以来坚持服务第一,信誉第一的宗旨,与国内科技界、企业界展开了全方位、多渠道的科技协作,获得良好信誉。

江南大学科技服务部业务涉及:技术研发、转让、服务、咨询、培训、项目总成、技术入股、专利和非专利技术的实施,法律咨询代理;承接工程设计、施工,各类轻工产品的分析与检测。真诚欢迎社会各界光临洽谈技术合作项目,开展各种形式的合作。

地址:江苏省无锡市惠河路170号; 邮编:214036

电话:0510-5887668,5805575; FAX:0510-5887668

E-mail: kfzx@wxuli.edu.cn; http://www.wxuli.edu.cn

联系人:江南大学科技服务部吴保承 荆政