

绣球菌富硒发酵工艺的研究

张磊^{1,2} 徐丽丽¹ 赵子瞳¹ 郭立忠¹

(1 青岛农业大学山东省应用真菌省级重点实验室, 山东青岛 266109; 2 上海荷仙菇生物科技股份有限公司, 上海 201418)

摘要: 硒是人体必需的微量元素之一。该实验研究了富硒过程中硒对绣球菌生长的影响, 以邻苯二胺为显色剂, 采用紫外分光光度法, 在 25℃ 下, 用甲苯作为萃取剂萃取硒和邻苯二胺的作用产物, 在波长 335nm 下测定其吸光度。实验主要考察了绣球菌(荷仙菇-H)在琼脂固态培养基中对硒的耐受能力, 以及其在液态培养过程中生物量以及硒的富集率的动态变化。结果表明, 培养基中的硒浓度在 40mg/L 以下时能够促进菌丝生长, 高于 40mg/L 时硒对菌丝生长有抑制作用, 最适的硒浓度为 20mg/L, 此时富硒率为 30.71%。

关键词: 绣球菌; 富硒; 发酵

中图分类号 S646.2

文献标识码 A

文章编号 1007-7731(2018)06-0123-04

Study on the Selenium Enrichment Fermentation Technology of *Sparassiacrispa*

Zhang Lei^{1,2} et al.

(1 Shandong Province Key Laboratory of Agricultural Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2 Shanghai Sun Avenue Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201418, China)

Abstract: Selenium is one of the essential trace elements. The test studied effects of Selenium of the process of the growth and selenium enriched of *Sparassiacrispa*, with o-phenylenediamine as the chromogenic reagent, the absorbance of the formation of reaction between Se with o-phenylenediamine was determined at the wavelength of 335nm by the UV spectrophotometry. The tolerance of selenium in agar solid medium and the dynamic changes of the accumulation rate of selenium in liquid culture were studied. The test results showed that in the culture medium selenium concentration in below 40mg/L could promote the growth of mycelium, higher than 40mg/L selenium on mycelial growth inhibition, the optimum concentration of selenium is 20mg/L, the accumulation is rate of 30.71%.

Key words: *Sparassiacrispa*; Se-enrichment; Fermentation

DOI:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2018.06.048

绣球菌 [*Sparassiacrispa* (Wulf.) Fr.] 又名荷仙菇、绣球蕈、椰菜菌等, 属于担子菌亚门、异隔担子菌纲、无隔担子菌亚纲、非褶孔菌目、绣球菌科、绣球菌属^[1]。绣球菌含有多人体必需的营养成分, 如蛋白质、多种维生素、多种氨基酸、碳水化合物及膳食纤维等, 特别是其子实体中最主要的活性成分β-葡聚糖, 对人体具有补肾、润肺、健脑、抗疲劳等多种功能, 经常食用能够提高人体的免疫力, 促进人体的造血机制, 并且对于癌症、肿瘤等疾病的预防和改善有非常大的有益作用, 具有丰富的营养和药用价值。

硒是人体中重要的微量元素之一, 硒介入某些致癌物质的代谢, 抑制致癌中间物的产生; 增强了体内抑癌物的产生, 形成克制了癌细胞分裂的内环境。定量的硒的摄入会对人体抗癌防癌有一定功效。食用菌的富集功能可以把硒从无机状态转化为有机状态, 增强人体对硒的吸收, 研究发现, 食用菌所富集的有机状态下的硒具有很好的稳定性而且易于吸收效果。本课题对绣球菌对硒的富集进行了研究, 为绣球菌产品的开发提供参考。

1 材料与仪器

1.1 供试菌种 绣球菌品种荷仙菇-H, 由上海荷仙菇生物科技股份有限公司提供。

1.2 试剂和培养基 酵母粉(青岛青药生物工程有限公司); 蛋白胨(青岛青药生物工程有限公司); 大豆粉(陕西森弗天然制品有限公司); KH_2PO_4 (青岛青药生物工程有限公司); 亚硒酸钠(青岛青药生物工程有限公司); 邻苯二胺(山东佰仟化工有限公司); 浓硝酸(淄博库仑分析仪器有限公司); 高氯酸(山东佰仟化工有限公司); 盐酸(6mol/L, 青岛青药生物工程有限公司); 氢氧化钠(青岛青药生物工程有限公司); 5% EDTA-2Na 溶液、1mg/mL 硒标准溶液、1% 邻苯二胺溶液(现配现用)、甲苯; 绣球菌固体培养基(玉米粉 1.5%, 麸皮粉 0.5%, 酵母 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 大豆粉 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, 琼脂粉 2%, pH5.5); 绣球菌液体培养基(玉米粉 1.5%, 麸皮粉 0.5%, 酵母 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 大豆粉 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, pH5.5); PDA 培养基。

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系遗传育种岗位专家, 项目编号: SDAIT-11-011-02; 青岛市科技惠民专项农业科技项目, 项目编号: 16-6-2-32-NSH。

作者简介: 张磊(1986—), 男, 山东威海人, 从事珍稀菌菇栽培与功能产品开发工作。

收稿日期: 2017-01-26

1.3 主要仪器 生化培养箱(广东医疗机械厂);双层恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司);医用离心机(长沙仪器仪表有限公司);755紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);SW-CJ-2D超净工作台(苏洁净化);MLS-3750高压蒸汽灭菌器(三洋电机株式会社)。

2 实验方法

2.1 菌种的活化 用打孔器将绣球菌斜面母种接入绣球菌培养基中,于25℃下活化培养20d,得活化菌种。

2.2 固体培养 按表1配制含不同浓度硒的绣球菌固体培养基,用打孔器将活化的10%绣球菌接种到培养基中,于25℃,恒温培养20d。培养结束后,测定菌丝生物量和硒含量。每个平行3个重复。

表1 固体培养硒浓度

实验编号	1	2	3	4	5	6
Na ₂ SeO ₃ (mg/L)	0	20	40	60	80	100

2.3 液体菌种制备 用打孔器取10个绣球菌菌块接种到盛有100mL种子培养液的250mL的三角瓶中,25℃,于摇床中120r/min震荡培养10d得到液体菌种。

2.4 液体培养 按表2配制含不同浓度硒的绣球菌液体培养基,以10%的接种量把种子液接到不同硒浓度的培养基中,于25℃,120r/min,培养15~20d,培养结束后,测定菌丝生物量和硒含量、富硒率。

表2 液体培养硒浓度(mg/L)

实验编号	1	2	3	4	5
Na ₂ SeO ₃	0	10	15	20	25

2.5 测试项目

2.5.1 菌丝生物量的测定 (1)液体发酵菌丝生物量的测定:发酵液经5000r/min离心,去掉上清液,菌丝体用去离子水洗涤5次离心,置于烘箱中,60℃烘至衡重。(2)固体培养菌丝生物量的测定:培养基表面刮取菌丝,置于烘箱,60℃烘至衡重。

2.5.2 硒标准曲线的绘制 首先用1mg/mL的硒标准溶液配制浓度为4μg/mL的硒标准工作溶液。分别取0,1,2,3,4,5,6mL硒标准工作溶液于50mL的比色管中,分别加蒸馏水定容至25mL,再加入5% EDTA-2Na溶液2mL,摇匀。用10M NaOH或乙酸调节溶液pH至2~2.5,再于黑暗处加入1%邻苯二胺溶液(现配现用)2mL,摇匀后于黑暗处静置反应2h。反应所得溶液中加入甲苯10mL,剧烈振荡混匀后,静置15min,再于OD₃₃₅处测定溶液的吸光度,以不含硒的水溶液作为空白对照。以吸光度OD₃₃₅为纵坐标,含硒(μg)为横坐标,绘制硒标准曲线。

2.5.3 样品消化和测定 邻苯二胺紫外分光光度法:准确称取0.1g样品于250mL烧杯中,加入硝酸—高氯酸(4:1, v/v)混合酸5mL,盖上表面皿冷消化过夜。次日,于通风

橱内,用可调档电炉加热消化样品,先用中火加热,避免消化液中的酸与过多的有机物剧烈反应而飞溅出来,待烧杯中的有机物基本溶解时,调高火加热,使那些在低温下不能被氧化分解的有机物彻底分解。等到溶液冒白烟时立即取下(此时溶液澄清或呈淡黄绿色)。稍冷后,于烧杯中加入6M HCl溶液4mL,再加热至消化原点即可(冒白烟时立即取下)。用蒸馏水冲洗表面皿底部和烧杯壁,所得消化液过滤后,定容至25mL。再于所得溶液中加入5% EDTA-2Na 2mL,用10M NaOH调节pH至2~2.5。在黑暗条件下,加入1%邻苯二胺溶液2mL,摇匀,黑暗条件下静置反应2h。最后,反应溶液加甲苯10mL萃取,剧烈振荡使溶液混匀,静置15min,再于335nm处测定萃取液的吸光度。结果以每1g菌丝(菌丝干重质量)所含总硒的微克数来表示^[14]。

2.5.4 富硒率的计算 计算公式如下:

富硒率=[富硒菌丝体的硒含量(μg/g)-空白菌丝体的硒含量(μg/g)]×富硒菌丝体干重(g/50mL)/培养基内硒的含量(g/50mL)

3 结果与分析

3.1 硒标准曲线 详见图1。

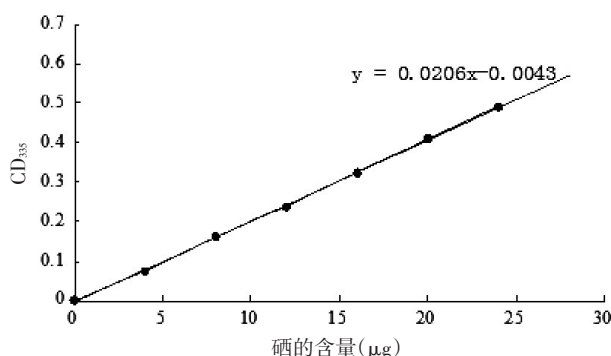


图1 硒标准曲线

3.2 菌丝体生物量的变化 从图2可知,当培养基中加的亚硒酸钠浓度低于40mg/L,硒元素可以促进绣球菌菌丝的生长,在20mg/L时达到最高值0.1026g;超过40mg/L的亚硒酸钠浓度对其菌丝体的生长有显著的被压制现象,从而可以推出绣球菌的菌丝硒耐受为40mg/L。

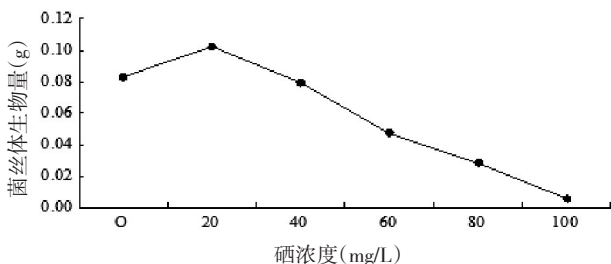


图2 固体培养基富硒菌丝生物量

从图3可知,液体培养的菌丝体生长比较缓慢,但是可以看出在0~20mg/L的浓度下,其菌丝生长呈增长趋势。

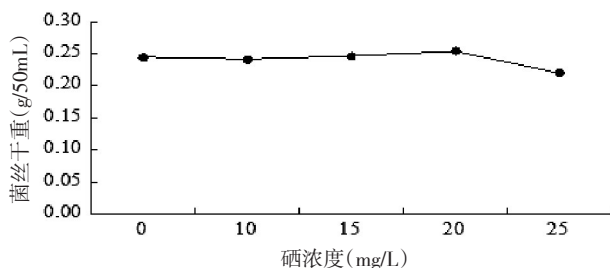


图3 液体培养基富硒菌丝生物量

3.3 菌丝体富硒量变化 由图4可知,固体培养的时候,不加硒的对照组含硒量为19.4mg/kg(干重),当培养基含量为20mg/L时,菌丝体中硒的含量达到了最高24.17mg/kg;当培养基中硒的浓度为40mg/L的时候,菌丝体中硒的含量为20.87mg/kg,而且随着硒浓度的增加,菌丝体中硒元素的含量也随之降低。

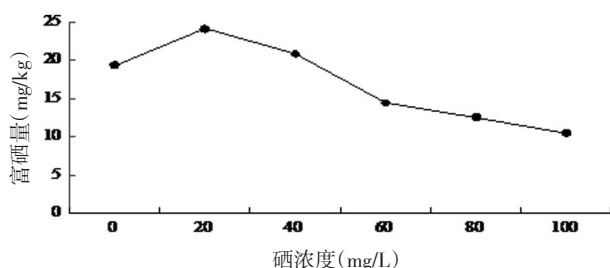


图4 固体培养基中富硒量

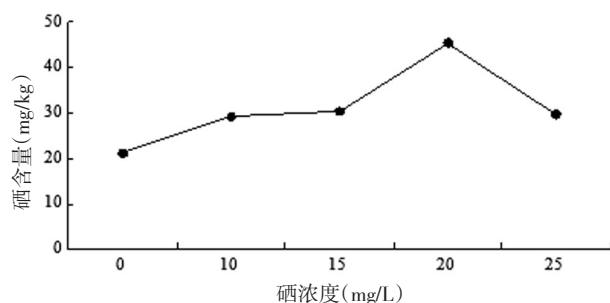


图5 液体培养基中的富硒量

从图5可知,液体培养的时候,当培养基的含量为20mg/L时,绣球菌菌丝体的富硒量达到最高值45.5mg/kg。

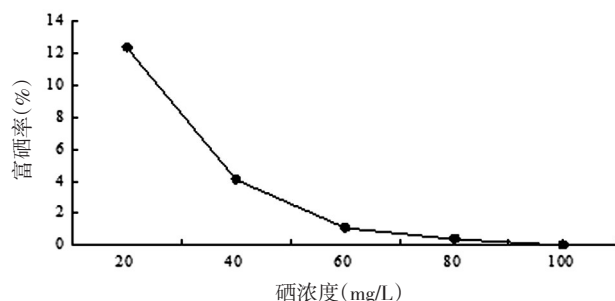


图6 固体培养的富硒率

3.4 富硒率 结合图6、7可以看出,菌丝体的富硒率在20mg/L时最大为30.71%,当培养基中硒的浓度高于40mg/L时,菌丝体的生长受到抑制,与不加硒元素培养基生长的绣球菌菌丝体相比,富硒能力也受到影响。

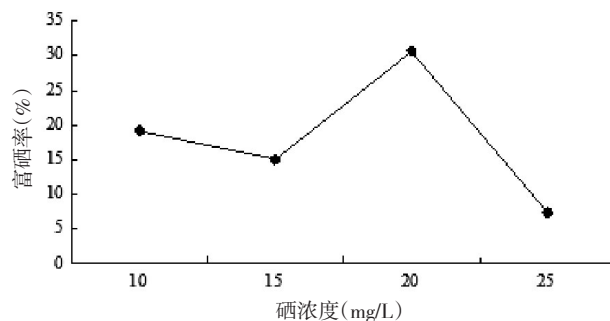


图7 液体培养的富硒率

4 讨论

作为人体内必不可少的微量元素之一,硒元素是组成机体中磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶和红细胞谷胱甘肽过氧化物酶的必不可少的一部分,其主要的功能是参与酶的合成和保护细胞膜功能和结构不受到过度的干扰和氧化,除此之外,硒元素对于人体来说还有很多不可少的生理功能,对于保持机体的正常生命活动有重大意义。

目前对绣球菌富集硒元素的研究尚没有太多的报道,对其他食用菌的富硒研究报道中最为常见的就是对富硒灵芝的研究,除了对食用菌的富硒研究外,还有对酵母、茶叶等的富硒研究。为此本研究以绣球菌为研究对象对其进行了固体培养和液体培养富集硒元素的研究。

硒元素对绣球菌的菌丝体生长有着双重作用,即促进生长作用和抑制生长作用,在适宜的低浓度值内硒元素有助于绣球菌菌丝体的生长,当硒浓度值大于某一临界值就会对绣球菌菌丝体的生长产生抑制作用。在本实验中,加入亚硒酸钠后,亚硒酸钠作为无机硒被菌丝体吸收在机体内转化为有机状态下的硒,参加机体酶的转化,加强绣球菌菌丝体内的新陈代谢,使得体内的蛋白质量增加与硒元素结合。本实验研究表明,绣球菌菌丝生长的耐受浓度为硒浓度为40mg/L的时候,此浓度相对于灵芝的富硒能力来说,绣球菌的硒元素的耐受能力相对较低。当培养基中亚硒酸钠的含量达到20mg/L时,其富硒率达到最大值30.71%。当硒浓度的含量超过40mg/L时,相对于正常培养的菌丝体来说,其富硒能力经受到了抑制。

本次实验过程中用到了绣球菌生长的最佳培养基,但绣球菌菌丝体的生长速度比较慢。由于其培养基对液体培养的观察有妨碍作用,最后在其液体培养的时候采用了PDA培养基以便于观察绣球菌菌丝的生长状态。

消化的时候注意pH值的问题,需要在pH1.5~2.0的酸性条件下,用甲苯作为萃取剂,萃取邻苯二胺与亚硒酸钠发生化学反应生成的络合物,所以对实验中pH的把握由为关键。调整pH时如果用10M的NaOH调值添加的量会比较多,实验发现先加入3.5gNaOH颗粒,(下转151页)

校领导层要重视实验室建设和管理工作,加大经费投入,积极推动现代信息时代背景下实验室管理模式的建设;实验管理部门在具体的实验教学中加强与相关系部的合作与沟通;实验技术人员要善于发现实验室信息化管理系统需要逐渐完善的部分,充分考虑到系统实现的各种问题,避免因信息技术故障影响实验室的正常管理和开放。

3.2 加强实验信息化人才队伍建设 实验室信息化建设离不开专业的信息化人才队伍,队伍不仅要熟悉实验室基本情况,了解相关管理知识,还要能熟练操作计算机,能根据实验室的需求完善信息化系统。引进有实验室信息化建设和管理经验的技术人员参与实验室信息化建设;建立实验室专职工作人员的培训和奖惩制度,鼓励实验工作人员和实验教师参加实验室信息化建设研讨会,激发工作积极性。目前,国内大部分地方本科高校的实验室信息技术人员无论是人员层次还是队伍规模都比较薄弱,与国外同类院校相比差距很大。

3.3 注重信息化平台及虚拟/仿真实验室建设 利用计算机和网络技术,依托校园网,将各实验室、教研室、精密仪器室等布设缆线,构建一个信息畅通的网络共享环境,开发集成“自主式学习信息管理系统”、“实验仪器设备信息管理系统”、“学生成绩考核管理系统”等实验信息管理平台,对平台进行科学、规范的信息化管理和维护,采用远程维护更新的方式确保信息管理系统安全稳定地运

行。虚拟或仿真实验室建设是高校实验室信息化建设的一个重要方面,具有激发学生想象力、虚拟和实际相结合、方便测试评价等优点,对于有效解决转型发展下地方本科高校实验(践)教学成本高、理论与实践相脱节、实验环境条件恶劣等问题,对于提高实验(践)教学质量和学生动手操作能力都具有积极意义。

4 结语

实验室信息化建设和管理是高校实验室发展的必然趋势,以信息化管理平台为纽带,能很好地实现实验室资源共享、宏观监控以及总体规划;能有效地缓解实验室管理的一些矛盾和压力,提高实验室管理水平及资源利用率;也能很好地将理论、实践和网络教学等有机结合起来。做好此项工作,对地方本科高校转型发展下应用型人才的培养、教师科研以及服务地方经济发展意义重大。

参考文献

- [1]李珍珍.新建本科院校开放性实验室建设研究[D].临汾:山西师范大学,2015.
- [2]孔苏.地方本科高校转型发展背景下应用型人才培养模式研究[D].桂林:广西师范大学,2015.
- [3]张红梅.地方高校转型发展及应用型人才培养模式探究[J].教育视点,2015(2):8-9.
- [4]新华社.通过教育信息化大力促进教育公平——习近平致信祝贺国际教育信息化大会开幕[N].新华每日电讯,2015-05-24.
- [5]任永权.地方高校转型中实验室建设的思考[J].当代教育理论与实践,2016,8(10):119-121. (责编:张宏民)

(上接125页)然后再进行调节。这样会减少滴定工作的工作量,减小误差,使溶液量基本保持一致。

该实验精准性的影响因素还有外来金属离子的影响,如:铜、铁等,这种情况只要加掩蔽剂EDTA-2Na即可消除,研究表明没有加EDTA-2Na的样品其吸光值比加了EDTA-2Na的高,证明EDTA确实对铁等金属干扰离子有屏蔽作用。但因为处理样品时用的试剂环境有所差异,加入掩蔽剂的量就会有差异,要根据实际情况来决定加入EDTA的量。

5 结论

本实验研究证明,亚硒酸钠的浓度对绣球菌的生长有双重作用,在40mg/L的亚硒酸钠浓度以下对绣球菌生长有促进作用,超过这个值就会有碍其正常生长。绣球菌对硒元素具有有效的富集能力,确定了培养基中的最佳硒添加浓度为20mg/L。此浓度下的绣球菌菌丝体的富硒量为45.5mg/kg,富硒率达到30.17%。

参考文献

- [1]裘维蕃,余永年.菌物学大全[M].北京:科学出版社,1998.
- [2]贾培培,卢伟东,郭立忠,等.绣球菌驯化栽培[J].食用菌学报,2010,03:33-36.
- [3]刘成荣,冯旭平.绣球菌深层发酵工艺条件的研究[J].莆田学院学报,2008(5):167-172.

- [4]Petrova, Roumyana D. Wasser, Solomon P., et al. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2005, 7(1&2): 141-155.
- [5]THarada, S Masuda, M Arai, et al. Soy isoflavone aglycone modulates hematopoietic response in combination with soluble B-glucan: SCG [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(12): 2342-2345.
- [6]Yoshitomi H, Iwaoka E, Kubo M, et al. Beneficial effect of Sparassis crispa on stroke through activation of Akt/eNOS pathway in brain of SHRS [J]. Journal of Natural Medicines, 2011, 65(1): 135-141.
- [7]姚莉,段玉峰.微量元素硒与人体健康[J].中国食品与营养, 2004(7): 32-35.
- [8]陈亮,李桃.元素硒与人体健康[J].微量元素与健康研究, 2004(3): 37-41.
- [9]王洛叔,雷道年,吴炳辅.微量元素对黄曲霉素B诱发大鼠肝癌的影响[J].中国病理学杂志, 1990(1): 137-139.
- [10]全卫丰,何静霞,汪洁,等.不同灵芝菌株富硒能力的比较研究[J].食用菌, 2012(1): 86-91.
- [11]汪洁,全卫丰,刘广建,等.硒化灵芝液体发酵的初步研究[J].食用菌, 2010(2): 44-47.
- [12]凌宏通,宋斌,林群英,等.富硒食用菌的研究进展[J].微生物学杂志, 2008, (4): 78-83.
- [13]陈宏伟,陈小莉,朱蕴兰.虫草液体深层发酵富硒的研究[J].食用菌, 2005(5): 36-40.
- [14]徐暄.紫外分光光度法测定樱桃番茄中微量元素硒[J].安徽农业科学, 2009(22): 128-132.
- [15]许峰.大蒜盖菇富硒液体培养条件优化及抗氧化能力初步研究[D].泰安:山东农业大学, 2006. (责编:张宏民)