

加镧液体培养灰树花富集有机铬的研究

余胜光¹, 沈霞¹, 刘惠娜²

(1. 嘉应学院梅州师范分院, 广东 梅州 514721) (2. 嘉应学院生物系, 广东 梅州 514721)

摘要: 本文在部分文献的基础上研究了稀土元素之一的镧元素(La)对灰树花菌丝体富集有机铬的影响。研究发现镧能有效促进灰树花富集有机铬, 用灰树花菌丝体的优化培养基(以1 L计, 含5 mg CrCl₃·6H₂O、100 mg La(NO₃)₃、300 g 马铃薯、36 g 葡萄糖、35 g 麸皮)培养灰树花菌丝体, 灰树花菌丝体中的有机铬的产量为25.61 μg/g, 比未加镧元素的增加18.33 μg/g。

关键词: 灰树花; 液体培养; 镧; 铬

中图分类号: Q939.5; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)10-0015-03

Organic Chromium Accumulation of *Grifola frondosas* Cultured in Lanthanide-containing Liquid

YU Sheng-guang¹, SHENG Xia¹, LIU Hui-na²

(1. Meizhou Normal College, Jiaying University, Meizhou 514721, China)

(2. Department of Biology, Jiaying University, Meizhou 514721, China)

Abstract: The influence of one of rare earth element lanthanide on the organic chromium accumulation of *grifola frondosas* was investigated. Results showed that using lanthanide-containing medium could efficiently promote the organic chromium accumulation of *grifola frondosas* and the optimal culture medium contained 5 mg/L CrCl₃·6H₂O, 100 g/L La(NO₃)₃, 300 g/L potato, 36 g/L glucose and 35 g/L bran. With this medium, the yield of organic chromium in *grifola frondosas* reached 25.61 μg/g. Compared with that in culture medium without lanthanide, 18.33 μg/g excess amount of organic chromium was obtained.

Key words: *Grifola frondosas*; liquid culture; lanthanide; chromium

铬(Cr)是人体必需的微量元素之一, 主要以Cr³⁺构成葡萄糖耐量因子(GTF), 并通过协同和增强胰岛素的作用而影响糖类的代谢^[1]。人体缺铬会使糖代谢紊乱, 细胞敏感性减弱, 胰岛素受体数目减少, 亲和力降低, 从而引起糖尿病^[2]。人体补铬主要有无机铬和有机铬两种形式。无机铬毒性大, 吸收率低, 仅为0.4%~3%; 相比之下, 有机铬安全性高, 且易被吸收, 其吸收率可达10%~25%^[3]。

灰树花(*Grifola frondosa*)富含多糖、氨基酸和多种矿物元素, 是膳、药兼用的珍稀食用菌^[4]。通过灰树花的生物富集作用, 能将不易吸收的无机铬转化成有机铬, 据文献报导灰树花菌丝体对铬的生物富集量较高, 菌丝中铬的富集度高达6.952 μg/g^[5], 经计算每1 L的培养基含灰树花菌丝11.004 g, 铬的转化率为0.85%, 这为人体补铬提供一条新的有效途径。

稀土元素中的镧(La)具有促进生物体生长发育的生物学效应^[6], 籍此, 本实验研究了镧对灰树花富

集有机铬的能力的影响, 为提高灰树花富集有机铬的产量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

灰树花(*Grifola frondosa*): 华南师范大学微生物研究室提供。

1.1.2 设备

迴转式恒温高速摇瓶柜、电阻炉温度控制器、电热鼓风干燥箱、电子分析天平、分光光度计。

1.1.3 培养基

PDA斜面培养基(以1 L计): 马铃薯200 g、麦麸50 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g、MgSO₄ 1.0 g、KH₂PO₄ 3.0 g。

液体种子培养基(以1 L计)^[5,7]: 马铃薯250 g、麦麸25 g、葡萄糖30 g、KH₂PO₄ 1.0 g、MgSO₄ 0.5 g、CaCl₂ 0.1 g、V_{B1} 0.1 g、V_{B2} 0.04 g、CrCl₃·6H₂O 9 mg。

1.2 菌丝培养方法

收稿日期: 2007-06-13

作者简介: 余胜光(1957-), 男, 梅州师范分院院长

1.2.1 母种斜面增殖培养

将灰树花母种菌丝体接种于 PDA 斜面培养基上, 置于 25 °C 培养箱中培养 4~5 d。

1.2.2 发酵培养

将活化的斜面菌种转接至装 150 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶, 常规灭菌, 接种后于 25 °C、转速 150 r/min 条件下摇床培养 4~5 d, 获得液体种子。配制液体发酵培养基, 加入 CrCl₃·6H₂O 溶液和 La(NO₃)₃ 溶液, 调节 pH 值, 分装到 150 mL 三角瓶中 (每瓶分装量为 25 mL), 灭菌, 按 10% 接种量接种灰树花种子, 振荡培养 14 d, 即可得到富铬的灰树花菌丝体。每组实验设 4 次重复。

1.3 菌丝处理

抽滤发酵液, 菌丝体用去离子水反复冲洗, 直至水洗液中检测不出铬离子为止。菌丝体转移至平皿中,

于 60 °C 下烘干至恒重, 称量干重。粉碎, 备用。

1.4 铬含量测定: 分光光度法。

2 结果与分析

据文献报道^[5], 用 1.1.3 式的液体种子培养基的灰树花的富集度达到 6.952 μg/g, 效果比较理想。对此我们用此培养基对华南师范大学微生物研究室提供的灰树花进行富集有机铬培养, 富集度为 7.275 μg/g。为了使实验具有可比性, 本论文在此基础上考查 La(NO₃)₃ 对灰树花富集有机铬的实验。

2.1 La(NO₃)₃ 含量的大体添加量的确定

在液体培养基中加入浓度分别为 20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L、250 mg/L、300 mg/L 的 La(NO₃)₃ 溶液进行灰树花的富集有机铬的培养, 结果见表 1。

表 1 La(NO₃)₃ 对灰树花富集有机铬的影响

La(NO ₃) ₃ 浓度/(mg/L)	20	50	100	150	200	250	300
菌丝产量/(g/L)	5.952	10.296	18.583	12.647	7.948	6.854	5.795
铬富集度/(μg/g)	8.695	18.173	23.576	19.245	17.012	11.314	7.574
铬富集效率/%	0.58	2.08	4.87	2.71	1.51	0.87	0.49

从表 1 可知, La(NO₃)₃ 对灰树花富集有机铬有促进作用, 且铬富集效率随 La(NO₃)₃ 浓度的增大不断升高。当 La(NO₃)₃ 浓度为 100 mg/L 时, 铬富集度达到最大值 23.576 μg/g, 铬富集效率达 4.87%。其后灰树花对铬的富集量急剧下降。

2.2 培养基的优化

为了使实验结果更具合理性, 有必要考查各因素之间对富集有机铬的影响, 故设计四因素四水平进行的正交试验方案对液体种子培养基进行优化, 因素水平表见表 2, 结果见表 3, 结果的方差分析见表 4。

由表 3 正交实验结果可以得知, 对灰树花富铬量影响最大的是 C (La(NO₃)₃), 其次是 D (CrCl₃) 和 A (混合碳源), 最小的是 B (氮源)。麸皮的加入为灰树花生长提供了更充足的营养成份, 但不能促进无机铬的转化。从 R 值不难看出, A 与 B 的影响作用比较接近。综合考虑灰树花生物量和灰树花富铬量, 最优培养基组成为 A₃B₁C₂D₁, 即 1 L 培养基中含 CrCl₃·6H₂O 5 mg、La (NO₃) 100 mg、马铃薯 300 g、葡萄糖 36 g、麸皮 35 g。

由表 4 可知, 对有机铬产量而言, 因素 C (La(NO₃)) 的影响最显著, 因素 D (CrCl₃) 的影响次之, 因素 A (混合碳源)、因素 B (氮源) 没有显著影响。由于镧的影响最为显著, 其的最优水平包含在 2、5、12、15 号实验中, 这 4 组实验的干菌丝有机铬平均含量为 25.61 μg/g (铬转化率为 9.78%), 最高为 29.49 μg/g (铬转化率为 17.18%, 远高于其他实验组值, 也高于文献报道的 6.952 μg/g^[5])。可见, 加镧液体能促进灰树花富集有机铬。

表 2 因素水平表

水平	因素			
	A(混合碳源 /g:L)	B(氮源麸皮 /g:L)	C(La(NO ₃)/(mg/L))	D(CrCl ₃ /(mg/L))
1	250/30	35	200	5
2	150/18	25	100	9
3	300/36	20	150	3
4	200/24	30	50	7

注: 混合碳源为马铃薯/葡萄糖, 表 3 同。

表3 正交实验结果

实验号	因素				E (空列)	有机铬产量/($\mu\text{g/L}$)	菌丝产量/(g/L)	有机铬含量/($\mu\text{g/g}$)
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	1	201.56	7.94	25.40
2	1	2	2	2	2	323.28	14.72	21.97
3	1	3	3	3	3	320.76	13.87	23.14
4	1	4	4	4	4	257.32	11.46	22.47
5	2	1	2	3	4	515.28	23.39	22.04
6	2	2	1	4	3	123.32	5.76	21.44
7	2	3	4	1	2	229.84	8.66	26.54
8	2	4	3	2	1	133.32	6.36	20.96
9	3	1	3	4	2	340.92	13.63	25.02
10	3	2	4	3	1	270.96	11.86	22.86
11	3	3	1	2	4	159.80	7.59	21.06
12	3	4	2	1	3	623.88	21.56	28.94
13	4	1	4	2	3	183.64	9.17	20.04
14	4	2	3	1	4	318.32	11.50	27.69
15	4	3	2	4	1	431.28	14.63	29.49
16	4	4	1	3	2	129.36	6.48	19.99
K_{1j}	1102.92	1241.40	614.04	1373.60	1040.72			
K_{2j}	1001.76	1035.88	1893.72	800.04	1023.40		T=4562.84	
K_{3j}	1395.56	1141.68	1113.32	1236.36	1251.60		C=1301196.49	
K_{4j}	1062.60	1143.88	941.76	1152.84	1250.72			
R	98.45	51.38	319.92	143.40	58.48			

表4 培养基有机铬产量方差分析表

方差来源	DF	SS	MS	F值	显著性
A	3	22969.04	7656.35	1.06	
B	3	5307.52	1769.18	0.25	
C	3	221206.99	73735.67	10.14	**
D	3	44920.29	14973.43	2.06	
E	3	14115.70	4705.24	0.65	
E'	12	87312.55	7276.05	1	

注: $F_{0.05}=3.49$, $F_{0.01}=5.95$

3 结论

通过数据分析可知, 镧对灰树花富集有机铬有显著影响, 当 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 浓度为 100 mg/L 时, 铬转化率平均达到 9.78% , 最高为 17.18% , 灰树花干菌丝有机铬平均含量为 $25.61 \mu\text{g/g}$, 最高为 $29.49 \mu\text{g/g}$, 高于未加镧的 $18.33 \mu\text{g/g}$ 。

由于食用菌对 $\text{Cr}(\text{III})$ 的生物富集是一个复杂的生物过程, 受到诸多因素如富集时间、加铬量、培养基种类及 pH 值等的影响, 对此还须进行后续试验深入探讨, 以寻找最有效的生物富集途径。

参考文献

- [1] Anderson RA. The role of GTF in human body as nutrition [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1997,26:534-541.
- [2] Metz Walter, Topefer EW, Roginski EE, et al. Present knowledge of the role of chromium[J]. Fedproc,1974, 3:2275-2280.
- [3] 高步先,夏耕田,张乃生. 铬的生物学功能及其在动物体内的代谢[J]. 动物医学进展,2002,23(6):49-51
- [4] Lee. Bum Chun, et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete Grifola frondosa[J]. Enzyme and Technology, 2003,32(5):574-581
- [5] 刘鑫,陈春涛,马庆一,等. 灰树花对铬生物富集作用的探讨[J]. 现代食品科技,2006,22(4):54-56.
- [6] 王怡平,肖亚中. 稀土元素对红酵母的生长及类胡萝卜素合成的影响[J]. 微生物学报,1999, 26 (2):117-119.
- [7] 刘伟民,黄达明,陈庶来,等. 灰树花深层发酵培养基优化研究[J]. 工艺技术,2003,24(3):99-102