

灵芝和金针菇混和发酵提高锌产量的工艺研究

苗敬芝, 董玉玮, 耿治飞

(徐州工程学院食品工程学院, 江苏省食品资源开发与质量安全重点实验室, 江苏徐州 221111)

摘要: 本实验采用混菌发酵技术, 以信州灵芝和金针菇为出发株, 探讨灵芝、金针菇混菌发酵高产锌元素的工艺条件, 采用原子吸收分光光度法测定胞内锌元素含量。结果表明: 最佳培养基为 2% 山芋淀粉、2% 马铃薯、1% 蔗糖、2% 玉米粉、1% 黄豆粉; 混菌发酵最佳培养条件为培养温度 27 °C, 转速 150 r/min, 装液量 100 mL/250 mL, 培养时间 8 d; 在最佳条件下, 混菌发酵胞内锌元素含量为 45.6 mg/kg, 比灵芝单独培养提高 15.8%, 比金针菇单独培养提高 63.5%。说明混菌发酵更完全, 对培养基中的营养物质吸收利用率高, 菌丝体长势好, 增加了胞内锌产量。

关键词: 灵芝; 金针菇; 混菌发酵; 锌元素

文章编号: 1673-9078(2013)2-287-290

Mixed Fermentation of *G.lucidum XinZhi* and *Flammulina velutipes* for High-yield Zinc Production

MIAO Jing-zhi, DONG Yu-wei, Geng Zhi-fei

(College of Food (Biology) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Key Construction Laboratory of Food Resource Development, Quality and Safety of Jiangsu Province, Xuzhou 221111, China)

Abstract: *G.lucidum XinZhi* and *Flammulina velutipes* were used as the original strains for mixing fermentation to discuss technology conditions of high-yield zinc. Quality of zinc from mycelium was determined by atomic absorption spectrum method. The results showed that the best medium was 2% starch, 2% potato, 1% sucrose, 2% corn meal, and 1% soybean meal. The optimal fermentation conditions were cultured time 8 days, temperature 27 °C, shaking speed 150 r/min, and medium volume 100 mL/250mL. Quality of intracellular zinc was 45.6 mg/kg at above optimal conditions, 15.8% and 63.5% higher than that by *G.lucidum XinZhi* and *Flammulina velutipes* respectively. Therefore mixed fermentation had a more complete process, higher availability of nutrition, promising growth and more quality of intracellular zinc.

Keywords: *G.lucidum XinZhi*; *Flammulina velutipes*; mixed fermentation; zinc

灵芝被称为仙草、瑞草, 为担子菌纲、多孔菌科灵芝属真菌^[1]。灵芝中含有多糖、三萜、蛋白质、核苷、多种微量元素, 如锌、铜、铁、硼、铜、锗等有效成分^[2-3]。现代医学研究证明, 灵芝具有调节免疫、抗肿瘤、镇痛、镇静、抗 HIV 病毒、抗肝损伤、降血糖、降血脂、抗衰老、止咳化痰平喘、改善记忆等作用^[4-5]。金针菇又名朴菇, 营养丰富, 含有蛋白质和 18 种氨基酸, 尤其赖氨酸和精氨酸含量较高, 赖氨酸能促进儿童生长发育, 增强记忆; 精氨酸被称为“大脑食粮”, 能促进智力提高, 因此金针菇又被称为“增智菇”^[6]; 金针菇锌含量很高, 锌是人体生长发育、神经、生殖遗传、免疫内分泌等重要生理过程中必不可少的物质; 与锌有关的酶大约有上百种之多, 锌是很多酶的组成成分或酶的激活剂; 人体缺乏锌常见临床表现有生长

收稿日期: 2012-10-19

基金项目: 徐州市科技计划项目 (XF110009)

作者简介: 苗敬芝 (1964-), 女, 教授, 研究方向为食品生物技术

发育障碍、性发育障碍与性功能低下、味觉及嗅觉障碍、免疫功能减退等^[7]。

混菌发酵技术又称混合发酵, 指采用两种或多种生物的协同作用共同完成某发酵过程的一种新型发酵技术^[8-9]。灵芝、金针菇单独发酵锌含量较低, 利用灵芝、金针菇混菌发酵的互利共栖协同作用, 一方面可以提升灵芝、金针菇本身已有的药理价值和营养价值, 另一方面可以发挥混菌发酵技术的优势提高锌含量, 为保健食品开发提供新的资源。目前国内外尚缺乏灵芝、金针菇混菌发酵的技术研究。本课题选取灵芝、金针菇优良菌株, 采用混菌发酵技术, 探讨最适培养基、培养温度、培养时间、转速等条件^[10-11], 采用原子吸收分光光度法检测灵芝、金针菇混菌发酵菌丝体中锌含量与单一菌株比较, 为灵芝、金针菇混菌发酵和开发新产品提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种

信州灵芝 (*Glucidum XinZhi*), 北京吉蕈园科技有限公司; 金针菇 (*Flammulina velutipes*), 徐州逸群食品有限公司。

1.1.2 试剂

高氯酸、硫酸镁、可溶性淀粉、浓盐酸、氢氧化钠、浓硝酸、甘油、双氧水、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等为分析纯试剂; 蛋白胨、酵母膏为化学纯试剂; 锌标准溶液。

1.1.3 仪器

TAS-990MFG 型原子吸收分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; XT-9900 型智能微波消解仪: 上海新拓微波溶样测试技术有限公司; SWCJ2F 超净工作台: 北京普析通用仪器有限公司; GHP-9160 恒温培养箱: 广州德昕科技有限公司; HZ150L 恒温培养摇床: 武汉瑞华仪器设备有限责任公司; TGL-16 G 高速台式离心机: 上海安亭科学仪器厂; YXQ-SG46-028A 手提式压力蒸汽灭菌锅: 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; PALL CASCADS LS 型超纯水仪: 北京科创百方科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝、金针菇菌种活化与培养

在超净操作台上, 用剪刀剪取指甲大小灵芝菌种, 用镊子送到新的 PDA 斜面培养基中部, 24 °C 培养, 直至灵芝菌种铺满整个斜面。重复传代培养, 使菌种充分活化, 金针菇菌种活化操作相同。

将活化的灵芝、金针菇菌种分别接种在液体培养基上, 24 °C、110r/min 恒温摇床上培养 7 d, 测定胞内锌含量。

1.2.2 混菌发酵培养基选择

A 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 1.0% 玉米粉, 0.1% 黄豆粉。

B 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 1.0% 玉米粉, 0.5% 黄豆粉。

C 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 1.0% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉。

D 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 1.0% 玉米粉, 1.5% 黄豆粉。

E 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 1.5% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉。

F 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 2.0% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉。

G 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 2.5% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉。

H 培养基: 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 3.0% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉。

在 8 种培养基(250 mL 锥形瓶中放 80 mL 培养基)中分别接入 3 mL 的混菌, 在 24 °C, 110r/min 培养 7 d, 测定各培养基中锌元素含量。

1.2.3 混菌发酵单因素实验

分别改变培养条件中的培养时间、温度、摇床转速、装液量, 考察各因素对灵芝、金针菇混菌发酵胞内锌元素含量影响。

1.2.4 根据单因素实验, 确定最佳培养条件

在最佳条件下, 灵芝、金针菇混菌发酵培养, 测定胞内锌元素含量与灵芝、金针菇单独培养比较。

1.2.5 样品中锌元素的测定^[12]

标准曲线制作: 从锌标准品 (0.1 mg/mL) 中准确量取 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 然后用 0.15 mol/L 硝酸溶液定容至 100 mL 作为锌标准液。分别精确称取标准液 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL 于已编号的 10 mL 的容量瓶中, 补充硝酸缓冲溶液至 10 mL, 用原子吸收分光光度计测定吸光值。结果见图 1。

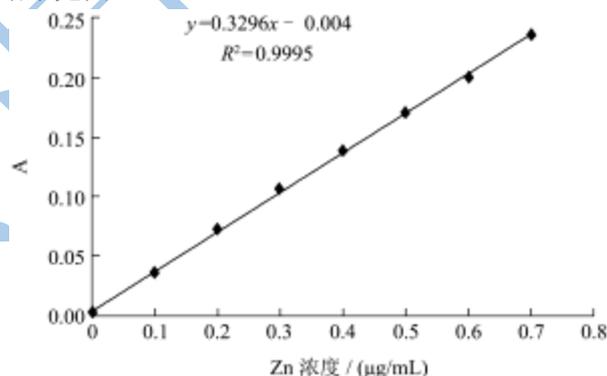


图 1 锌浓度与吸光度值关系

Fig.1 Relationship between zinc concentration and absorbance value

样品预处理: 将发酵液在 4000 r/min 下离心 10 min, 用去离子水洗沉淀物 3 次后, 60 °C 烘干至恒重, 称取 0.3 g 左右干菌体, 经微波消解后, 定容至 25 mL 用原子吸收分光光度计测定锌元素含量。

2 结果与讨论

2.1 混菌发酵培养基选择

选择液体培养长势良好的灵芝、金针菇混菌分别接种于培养基 A、B、C、D、E、F、G、H, 测定胞内蛋白质含量。结果见图 2。

由图 2 可知, F 培养基即含有 2% 淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 2.0% 玉米粉, 1.0% 黄豆粉的培养基中胞内锌元素含量最高为 42.64 mg/kg。说明灵芝、金针

菇混菌长势越好对培养基中的营养物质和微量元素吸收就越多,适宜的碳氮比有利于灵芝、金针菇混菌菌丝体对锌元素的吸收。

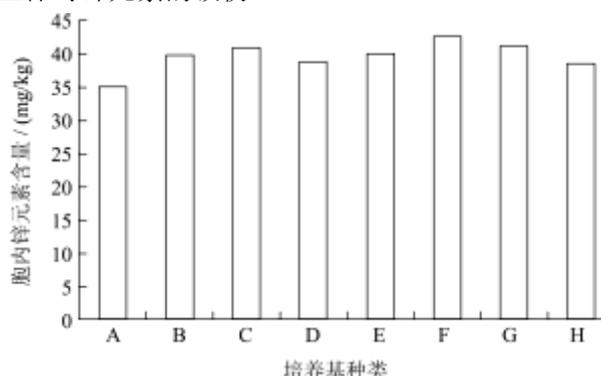


图2 不同培养基中胞内锌元素含量

Fig.2 Quality of intracellular zinc of different culture medium

2.2 混菌发酵单因素条件选择

2.2.1 培养时间对胞内锌元素含量影响

选择长势良好的灵芝,金针菇同时接种于 100 mL 的 F 培养基中,在 24 °C, 110 r/min, 分别培养 5 d、6 d、7 d、8 d、9 d, 测定胞内锌元素含量见图 3。

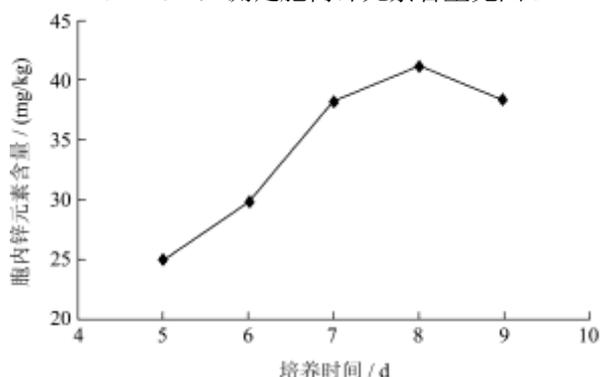


图3 时间对胞内锌元素含量影响

Fig.3 Effect of time on quality of intracellular zinc

由图 3 知,随着时间增加胞内锌元素的含量在逐渐增加,在第 6 d 到第 7 d 时增长的最快,可能是菌落生长的对数期,第 8 d 锌元素含量达到最高值为 41.13 mg/kg,第 9 d 含量有所下降,可能是培养基中的营养物质已消耗完,混菌开始分解体内的物质,而导致锌元素含量下降。

2.2.2 培养温度对胞内锌元素含量的影响

选择长势良好的灵芝、金针菇菌种同时接种在 100 mL F 培养基中,110 r/min,培养 8 d,培养温度分别为 18 °C、21 °C、24 °C、27 °C、30 °C,测定胞内锌元素的含量见图 4。

由图 4 可知,27 °C 是混菌生长的最适温度,锌元素含量达到最大值 44.11 mg/kg。温度对发酵的影响是各种因素综合表现的结果,18 °C 到 21 °C 时由于温度很低,细胞代谢过程中各种关键酶的活性也很低,因

此胞内锌元素的含量也较低。温度升高,一方面加速细胞内生物化学反应速度,使细胞的生长代谢加快,另一方面过高的温度会使细胞内热敏性物质受到破坏,从而对细胞的生长造成不利的影。当温度达到 30 °C 时部分的酶已经失活,因此胞内锌元素的含量下降。

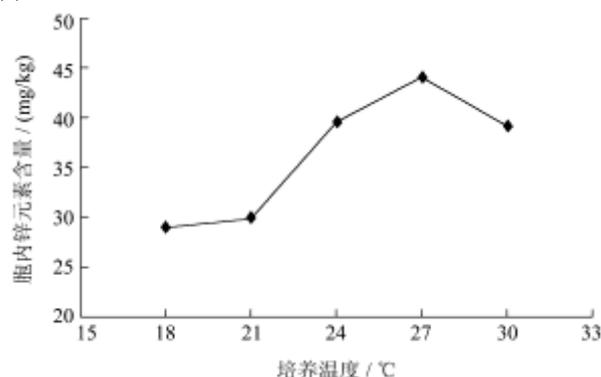


图4 培养温度对锌元素含量的影响

Fig.4 Effect of culture temperature on quality of zinc

2.2.3 摇床转速对胞内锌元素含量影响

选择长势良好的灵芝、金针菇同时接种于 100 mL 的 F 培养基中,27 °C,培养 8 d,控制转速分别为 90 r/min、110 r/min、130 r/min、150 r/min、170 r/min,测定胞内锌元素含量见图 5。

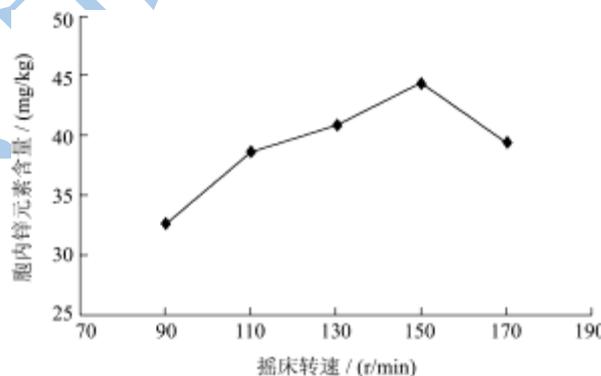


图5 摇床转速对锌元素含量的影响

Fig.5 Effect of rotation rate on quality of zinc

由图 5 可知,随着摇床转速升高,单位培养基的溶氧量水平也会同步升高,当转速达到 150 r/min 时,混菌胞内锌元素含量达到最大值 44.52 mg/kg。当摇床转速 170 r/min 时胞内锌元素含量下降到 39.47 mg/kg,一方面可能是培养基中的溶氧量达到对灵芝、金针菇混菌生长有毒害作用,另一方面可能是摇床转速过高液态培养基的剪切力增大,过高的剪切力会使刚刚生长出的菌丝体大量断裂,致使细胞内含物流失,从而对菌丝体的生长造成不利的影,并影响胞内锌元素的含量。

2.2.4 装液量对胞内锌元素含量影响

选择长势良好的灵芝,金针菇接种同时于 F 培养

基中, 27 °C, 150 r/min, 培养 8 d, 装液量分别为 60 mL、80 mL、100 mL、120 mL、140 mL, 测定胞内锌元素含量见图 6。

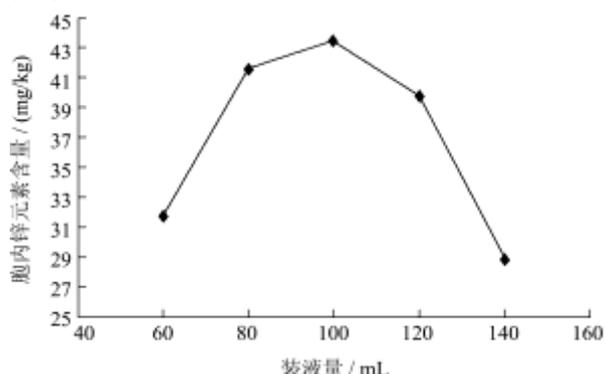


图 6 装液量对锌元素含量影响

Fig.6 Effect of medium volume on quantity of zinc

由图 6 可知, 装液量为 100 mL 时, 混菌生长最好, 锌元素含量也达到最大值 43.05 mg/kg。后随装液量的增加, 锌元素含量明显下降, 这是因为混菌发酵过程属于典型的好氧发酵过程, 而摇瓶的不同装液量可使发酵体系获得不同的溶氧水平, 装液量过多, 致使培养基中的溶氧水平较低, 限制了混菌的生长, 锌元素含量下降。

2.3 在最佳条件下, 混菌与灵芝、金针菇单独培养作比较

2.3.1 混菌与灵芝, 金针菇单独培养菌落形态

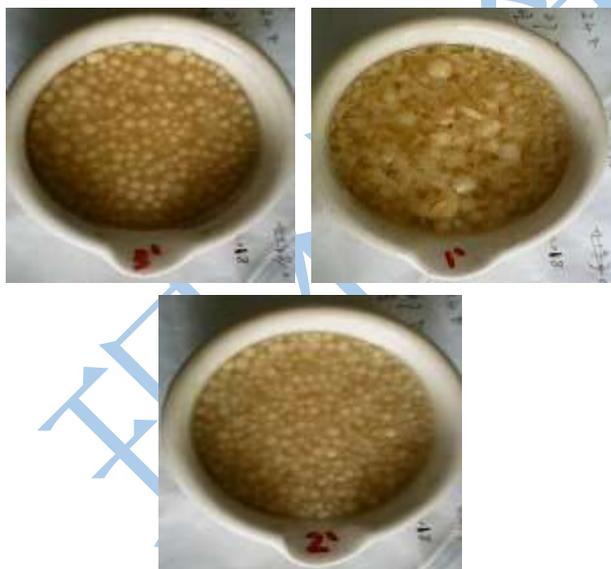


图 7 灵芝菌丝球 (a)、金针菇菌丝球 (b) 和混菌菌丝球 (c) 的形态

Fig.7 Mycelium pellet morphology of *Glucidum XinZhi* (a), *Flammulina velutipes* (b) and mixed strains (c)

由图 7 比较可知, 混菌长势较好, 菌丝球大小均匀, 直径较小, 培养基清亮, 说明混菌对培养基中的营养物质吸收比较充分。

2.3.2 灵芝、金针菇混菌培养与单独培养胞内锌元素的产量

在单因素的基础上, 确定最佳培养条件, 将活化的灵芝、金针菇菌种同时接种在最佳培养基上, 培养温度 27 °C, 转速 150 r/min, 装液量 100 mL, 培养时间 8 d, 测定菌丝体中锌元素含量与灵芝、金针菇单独培养比较。结果见表 1 和图 8。

表 1 灵芝、金针菇混菌与单独培养胞内锌元素含量

Table 1 Quality of zinc of *G.lucidum XinZhi*, *Flammulina velutipes* and mixed strains

样品	灵芝锌含量/(mg/kg)	金针菇锌含量/(mg/kg)	混菌锌含量/(mg/kg)
1	38.22	27.61	45.71
2	38.70	27.00	45.76
3	38.58	27.39	45.43
平均值	38.50±0.44	27.30±0.52	45.60±0.27

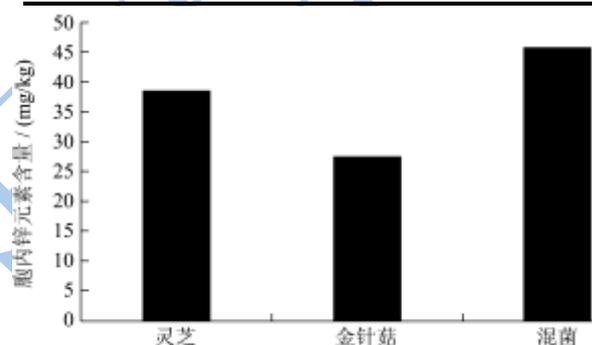


图 8 灵芝、金针菇混菌与单独培养胞内锌元素含量

Fig.8 Quality of zinc of *Glucidum XinZhi*, *Flammulina velutipes* and mixed strains

由表 1 和图 8 可以看出, 混菌胞内锌元素的含量明显高于灵芝、金针菇单独发酵胞内锌元素的含量, 混菌胞内锌元素含量为 45.60 mg/kg, 比灵芝提高 15.8%, 比金针菇提高 63.5%。说明混菌发酵更完全, 对培养基中营养物质吸收利用率更高, 可能是菌种之间有着营养作用或共生作用, 混菌间互利共栖, 使酶系比例协调, 使得混菌发酵产酶能力高于单一菌株, 提高了营养物质的利用率, 增加了胞内锌产量。

3 结论

3.1 混菌发酵最适培养基: F 培养基即 2% 山芋淀粉, 2% 马铃薯, 1% 蔗糖, 2% 玉米粉, 1% 黄豆粉; 用 F 培养基进行混菌发酵, 胞内锌元素含量为 42.64 mg/kg。

3.2 通过单因素实验, 确定混菌发酵最佳条件: 培养温度 27 °C, 摇床转速为 150 r/min, 装液量 100 mL/250mL, 培养时间 8 d。

3.3 在最佳实验条件下,获得菌丝体长势好,菌丝球大小均匀,密度较大、直径较小的优良液体菌种,混菌发酵胞内锌元素含量为45.6 mg/kg,比灵芝单独发酵胞内锌元素含量提高15.8%,比金针菇单独发酵提高63.5%。说明混菌发酵更完全,对培养基中的营养物质吸收利用率高,增加了胞内锌产量。

参考文献

- [1] ZHANJ, TANGQ MARTNZK, et al. Activation of B lymphocytes by GLIS.a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum* [J]. Life Scinces, 2002, 71(6): 623-638
- [2] 陈国良,陈小清.灵芝有效成分研究综述[J].中国食用菌, 2001,14(4):7-9
- [3] 王彦松,顾明,赵杰东.灵芝药用研究进展[J].西南国防医药, 2004,14(6):680-682
- [4] 杨静文,郑洁虹,马乃良.灵芝多糖检测鉴定方法[J].现代食品科技,2010,26(7):739-742
- [5] 郑必胜,李会娜,曾娟.灵芝速溶茶的研制[J].现代食品科技, 2012,28(7):835-839
- [6] 蔡和晖,廖森泰,叶运寿,等.金针菇的化学成分、生物活性及加工研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(11):170-175
- [7] 葛可佑.中国营养科学全书[M].北京:人民卫生出版社,2004
- [8] 王淑珍,白晨,高雁,等.灵芝松茸混菌菌丝体的成分分析[J].上海师范大学学报(自然科学版),2002,31(2):69-73
- [9] 徐颖宣,徐尔尼,冯乃宪,等.微生物混菌发酵应用研究进展[J].中国酿造,2008,186(9):1-4
- [10] 张颂.金针菇和灵芝药用成分获取技术的优化[D].东北师范大学,2010
- [11] 吴漾,李婷婷,李永乐,等.松茸、蛹虫草混菌共酵菌丝体多糖提取工艺的优化研究[J].食品研究与开发,2008,29(5):24-28
- [12] 王代刚.酵母菌富集微量元素锌和酵母锌生物学效价的研究[D].山东农业大学,2004