

铅砷在虫草菌丝体发酵中的迁移规律研究

罗珍¹, 刘元元², 徐晓飞¹, 李志刚³, 王永华²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 考察了重金属铅、砷对蝙蝠蛾拟青霉菌丝体发酵的影响, 结果表明铅对菌丝体的生长以及其有效成分含量的影响较小, 而砷对蝙蝠蛾拟青霉具有较强的细胞毒性, 当培养基砷浓度为100 μg/kg时, 多糖和甘露醇的总产量分别下降了28%和14%。培养基中铅、砷离子浓度在0~100 μg/kg范围内, 菌丝体中铅、砷离子浓度与培养基中铅、砷离子浓度的关系分别满足线性方程和罗杰斯特方程。

关键词: 蝙蝠蛾拟青霉; 砷; 铅; 虫草; 发酵

文章编号: 1673-9078(2012)8-936-939

Migration Behaviour of Plumbum and Arsenic on *Cordyceps Sinensis* Fermentation

LUO Zhen¹, LIU Yuan-yuan², XU Xiao-fei¹, LI Zhi-gang³, WANG Yong-hua²

(1. Infinitus (China) Co., Ltd, Guangzhou 510640, China)

(2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. College of Biology Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The influence of plumbum and arsenic on the submerged fermentation with *paecilomyces hepialid* has been investigated. The results showed that plumbum had little effect on the fermentation with *paecilomyces hepialid*, but arsenic showed high cell toxicity during the fermentation. When the arsenic concentration was 100 μg/kg, the yields of polysaccharide and mannitol decreased by 28% and 14%, respectively. When plumbum and arsenic concentrations were in range of 0~100 μg/kg, the curves described by the lead and arsenic concentration in the mycelia and the culture medium fitted well to linear equation and logistic equation, respectively.

Key words: *Paecilomyces hepialid*, plumbum, arsenic, *Cordyceps sinensis*, fermentation

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 是由真菌寄生在鳞翅目蝙蝠蛾幼虫上而形成的虫菌复合体, 具有抗肿瘤、抗病毒、止血化痰、润肺补肾等功效, 与人参、鹿茸并称为中药三大补品^[1-5]。但是由于天然虫草自然资源稀缺, 人工培养困难等问题, 导致虫草产量有限, 价格昂贵^[5]。从冬虫夏草中分离出的蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* Chen et Dai), 经液态发酵培养获得的虫草菌丝体, 其主要成分、药理作用及临床效果上与天然冬虫夏草基本相似, 并在因此受到了广泛的重视^[6-9]。

经过多年的研究, 经液态发酵培养生产蝙蝠蛾拟青霉菌丝体已经成功应用于工业化。和大部分真菌相似, 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体对硒、锌、锗等多种金属离子均有富集作用, 有利于提高其生理活性^[10,11]。然而, 在生产过程中, 同样可发现其对重金属

铅和砷均有一定的富集作用。而这两种重金属均对生物体具有较高的毒性, 因此在食品卫生和环境保护上都对其有严格规定。因此, 开展铅砷等有毒重金属在蝙蝠蛾拟青霉发酵过程中的迁移规律以及其对虫草菌丝体生长影响的研究, 可为控制菌丝体中两种有毒有害重金属物质提供理论依据, 有望节省大量成本。

本文通过添加定量的铅、砷离子考察铅砷离子对菌丝体生长的影响以及其在菌丝体内的富集情况, 考察不同因子对铅砷离子富集规律的影响, 总结铅、砷有害物质在整个发酵过程中迁移规律, 为有效控制菌体中的重金属积累提供借鉴与理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株

蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepialid*), 购于中国科学院微生物研究所。

收稿日期: 2012-05-02

通讯作者: 王永华教授

1.1.2 菌种培养基

斜面培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 1.5%, 氯霉素 0.01%。

种子培养基: 葡萄糖 2%, 白砂糖 1%, 豆粕粉 1%, 蛋白胨 1%, KH_2PO_4 0.1%。

发酵培养基: 葡萄糖 2%, 白砂糖 1%, 豆粕粉 1%, 蛋白胨 1%, KH_2PO_4 0.1%。

1.1.3 仪器与试剂

电感耦合等离子体质谱仪 7700(G5700A) (Agilent 公司); 微波消解仪 MARS 5 (美国 CEM 公司); 全温振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 722N 型可见分光光度计 (上海静溢科学仪器有限公司); 超净工作台 (苏州华科净化设备有限公司); DZF-6020 型真空冷冻干燥箱 (上海申贤恒温设备厂)。

铅标准溶液, 购于 Agilent 公司; 砷标准液, 购于国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院; 其他试剂均为分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养

种子培养: 种子培养基灭菌后, 接入约 1 cm^3 的斜面菌块, 置于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 和 140 r/min 的摇床下培养 4 d 得一级种子培养液, 将一级种子培养液以 5% 接种量接入种子培养基中, 在与一级种子培养液相同的条件下培养 4 d。

发酵培养: 将二级种子培养液以 10% 接种量接入发酵培养基中, 置于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 和 140 r/min 的摇床内培养 5 d。

1.2.2 铅、砷标准液的配制

10 $\mu\text{g/mL}$ 的铅标准液: 取 1 mL 的铅标准液 (1 mg/mL), 移入 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得 10 $\mu\text{g/mL}$ 的铅标准液。

10 $\mu\text{g/mL}$ 的砷标准液: 取 1 mL 的砷标准液 (1 mg/mL), 移入 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得 10 $\mu\text{g/mL}$ 的砷标准液。

1.2.3 铅、砷离子在虫草菌丝体中积累规律的研究

在 100 mL 发酵培养基中梯度添加 0~1 mL 的铅或砷的标准液。按 1.2.1 方法进行菌丝体发酵, 每隔 24 h 取样, 过滤分离菌丝体与发酵液, 并将菌丝体水洗 3 次后于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥至恒重, 研磨至粉末。

1.2.4 菌丝体干重、菌丝中铅砷离子、多糖、甘露醇含量的检测

1.2.4.1 菌丝体干重

发酵结束后, 用布氏漏斗将菌丝体与发酵液分离, 菌体水洗 3 次, 将菌体同置于真空干燥箱中, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重。

1.2.4.2 菌丝体中铅砷含量的检测

样品前处理: 称取适量试样于消解罐中, 加入 6 mL 浓硝酸 (GR), 再加入 2 mL 双氧水 (GR), 放入微波消解仪中, 设置最佳分析条件, $120\text{ }^\circ\text{C}$ 下维持 3 min, $150\text{ }^\circ\text{C}$ 维持 3 min, $190\text{ }^\circ\text{C}$ 维持 30 min, 至消解完全冷却后用超纯水转移定容至比色管中。

重金属含量采用电感耦合等离子体质谱仪检测, 其检测条件如下: RF 功率: 1550 W; 辅助气: 1.06 L/min; 氦气: 5 mL/min; 采样深度: 8 mm; 反应池: He 气。

1.2.4.3 菌丝体中多糖含量的检测

样品前处理: 取 1 g 菌粉于三角瓶中, 加入 50 mL 水, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 提取 1 h, 定容后离心取 1 mL 上清液, 加入无水乙醇, 至醇浓度为 80%, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下过夜放置 12 h, 离心得样品粗多糖。

菌体多糖含量采用苯酚-硫酸法检测^[12]。

1.2.4.4 菌丝体中甘露醇含量检测

样品前处理: 取 1 g 菌粉于三角瓶中, 加入 50 mL 水, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 提取 1 h, 定容后离心, 取 2 mL 上清液, 定容至 100 mL。

甘露醇含量采用比色法测定^[13]。

2 结果与分析

2.1 菌丝体中铅浓度、生物量及胞内活性成分的变化

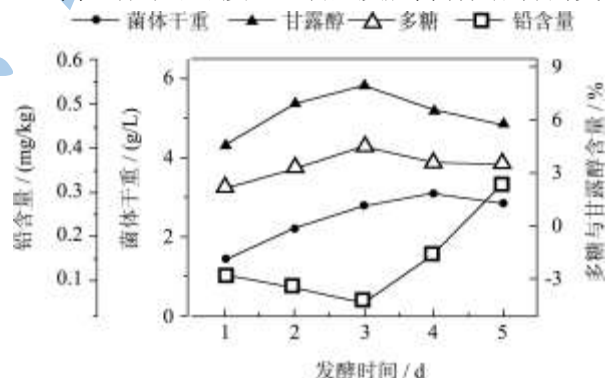


图 1 对照组中虫草菌丝体干重、铅、多糖和甘露醇含量随发酵时间的变化情况

Fig 1. The time course of mycelial dry weight, plumbum, polysaccharide and mannitol content in the control group

图 1 和图 2 分别表示培养基中未添加和添加 50 $\mu\text{g/kg}$ 的铅条件下, 菌丝体干重、铅、多糖和甘露醇含量随发酵时间的变化情况。整体上, 菌丝体在生长进入第 3 d 到第 4 d 之间, 进入稳定期, 随后菌体干重开始下降。菌丝体中多糖和甘露醇等有效成分一般在第 3 d, 即对数生长期末期达到最大, 而菌丝体中铅的浓度亦在此阶段达到最低, 而后上升幅度较大。产生此现象的原因是在对数生长期时, 菌体的各相机能均

较活跃, 菌体多糖和甘露醇等成分的合成以及有害物质的外排机制均较活跃, 而随着菌体进入稳定期后, 生长偶联型产物开始分解, 导致菌体有效成分的下降, 而随着菌体开始衰老死亡, 细胞中有害物质的外排能力开始下降, 导致菌体中铅离子的含量加大。发酵过程中铅浓度增加后, 菌丝体中多糖与甘露醇含量以及菌丝体重总体上相差不大, 只是添加铅后, 菌丝体中铅含量在对数生长期有小幅上升, 产生这一现象的原因可能与发酵初期菌体对铅的排泄机制较弱有关。考虑到第3 d时, 发酵产多糖和甘露醇总量达到最大, 而铅的浓度也接近最佳, 因此选取第三天为发酵终点。

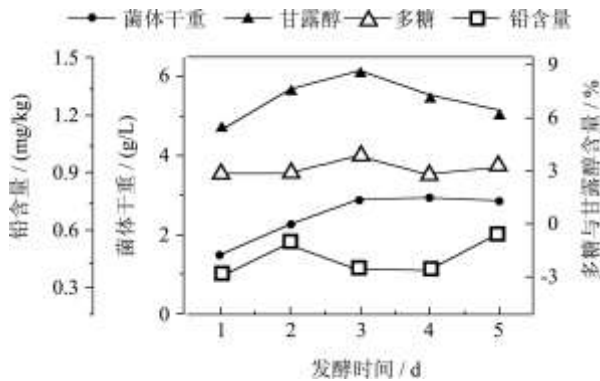


图2 添加 50 μg/kg 铅离子的虫草菌丝体干重、铅、多糖和甘露醇含量随发酵时间的变化情况

Fig 2.The time course of mycelial dry weight, plumbum, polysaccharide and mannitol content in the culture media contained 50μg/kg plumbum

2.2 菌丝体中铅浓度、生物量及胞内活性成分的变化

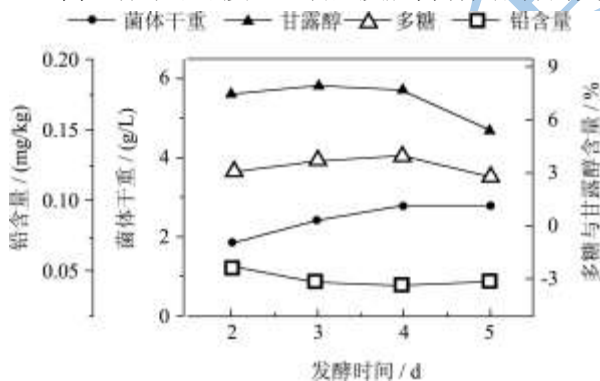


图3 添加 50 μg/kg 砷离子的虫草菌丝体干重、铅、多糖和甘露醇含量随发酵时间的变化情况

Fig 3.The time course of mycelial dry weight, arsenic, polysaccharide and mannitol content in the culture media contained 50 μg/kg arsenic

图3为培养基中添加50 μg/kg的砷条件下, 菌丝体干重、砷、多糖和甘露醇含量随发酵时间的变化情况。在发酵过程中, 砷离子的浓度变化趋势与铅离子相同, 均有先下降后大幅度上升的趋势, 此现象跟菌丝体中

重金属耐受机制的形成与生长末期细胞衰老死亡相关。同时多糖与甘露醇产量也在第3、4 d达到最高。

2.3 铅离子浓度对菌丝体生长及胞内多糖及甘露醇含量的影响

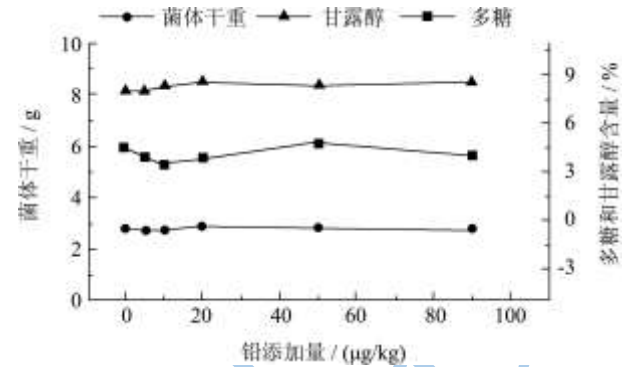


图4 铅对虫草菌丝体干重、多糖和甘露醇含量的影响

Fig.4 Effects of plumbum content on mycelial dry weight ,polysaccharide and mannitol content

图4表示, 菌丝体干重、多糖和甘露醇含量随铅添加量的变化情况。随着培养基中铅离子浓度的增加, 菌丝体干重、多糖和甘露醇含量整体上变化不大, 因此可以确定, 在铅浓度低于 100 μg/kg 的情况下, 铅对发酵的影响较小。

2.4 砷离子浓度对菌丝体生长及胞内多糖及甘露醇含量的影响

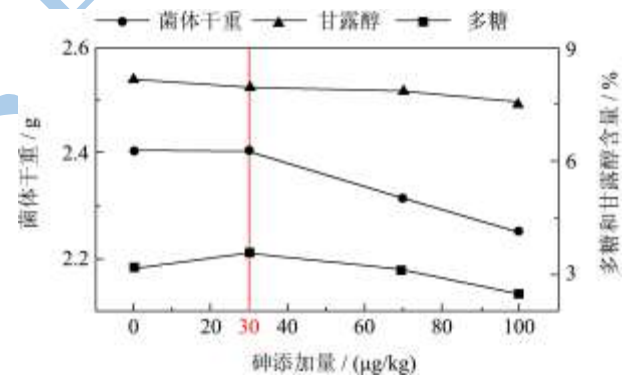


图5 砷对虫草菌丝体干重、多糖和甘露醇含量的影响

Fig.5 Effects of arsenic content on mycelial dry weight, polysaccharide and mannitol content

图5表示, 菌丝体干重、多糖和甘露醇含量随砷添加量的变化情况。当砷含量低于 30 μg/kg 时, 草菌丝体干重、多糖和甘露醇含量整体上没明显的下降趋势, 而随着培养基中砷离子浓度的增加, 菌丝体干重、多糖和甘露醇含量整体上均有较大幅度的下降。可见, 砷离子对从草菌丝体具有较高的毒性, 当砷浓度达到 100 μg/kg 的情况下, 多糖和甘露醇的总产量分别下降了 28%和 14%。

2.5 铅、砷离子在菌丝体生长中的迁移规律

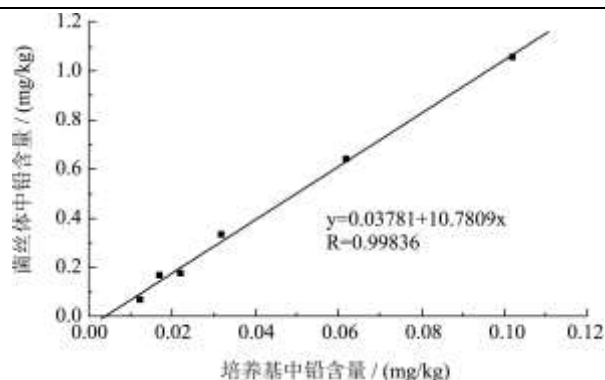


图6 虫草菌丝体中铅的含量随培养基中铅浓度的变化曲线

Fig.6 The curve of,mycelia plumbum concentration cultured at different plumbum concentrations

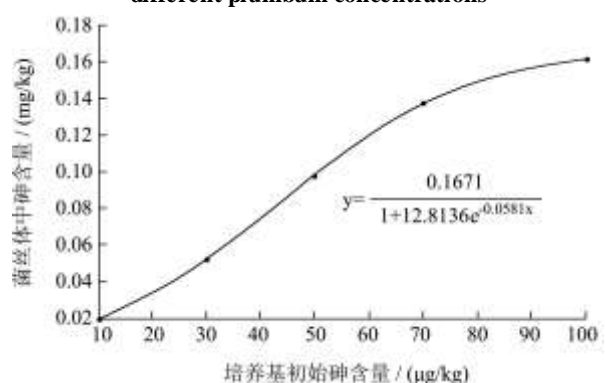


图7 虫草菌丝体中砷的含量随培养基中砷浓度的变化曲线

Fig.7 The curve of,mycelia arsenic concentration cultured at different arsenic concentrations

图6、图7分别表示菌丝体铅、砷含量与培养基中铅、砷浓度的变化情况。虫草菌丝体对两种重金属均有较强的富集作用，尤其是富集倍数达到了10以上。另外，随着培养基中铅浓度的提高，菌丝体中铅含量逐渐上升，并满足线性增长关系。而随着培养基中砷浓度的提高，菌丝体中砷浓度的提高趋势逐渐放缓，并满足罗杰斯特方程。这种差距可能与砷比铅具有更高细胞毒性相关。由于铅、砷均有较强的细胞毒性，因此国际上对虫草菌丝体中两种重金属的含量均有较严格的限制，因此铅、砷离子在虫草菌丝体生长中迁移规律的确定既有利于未来的科学研究，更有利于节省虫草的工业化成本，促进其工业化进程。

3 结论

本实验表明蝙蝠蛾拟青霉对铅、砷均有一定的富集能力。铅对菌丝体的生长以及其有效成分的影响较小，而砷对蝙蝠蛾拟青霉具有较强的细胞毒性，当培养基砷浓度为100 μg/kg时，多糖和甘露醇的总产量分

别下降了28%和14%。当培养基中铅、砷离子浓度在0~100 μg/kg范围内，其菌丝体中铅、砷离子浓度与培养基中铅、砷离子浓度的关系分别满足线性方程和罗杰斯特方程。该铅、砷离子在菌丝体生长中迁移规律的确定既有利于未来的科学研究，更有利于节省虫草的工业化进程。

参考文献

- [1] 姜文侠,孙武岳,马琳,等.蝙蝠蛾拟青霉菌丝体最适发酵条件研究[J].食用菌学报,1999,6(2):38-40
- [2] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(3): 279-291
- [3] Aman S, Anderson DJ, Connolly TJ, et al. From adenosine to 3'-deoxyadenosine: development and scale up [J]. Org Process Res Dev, 2000, 4(6): 601-605
- [4] Yu SJ, Zhang Y, Li CR, et al. Optimization of ultrasonic extraction of mycelial polysaccharides from Paecilomyces hepiali using response surface methodology and its antioxidant activity [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(75): 17241-17250
- [5] 程维蓉,段丽红,郑必胜.冬虫夏草及其多糖的研究与应用进展[J].现代食品科技,2006,28(4):284-289
- [6] 王伟霞,王文锋,李福后,等.食用菌液体发酵及富集微量元素的研究进展[J].北方园艺,2009,10:255-257
- [7] 于洪飞.复合酶法提取蝙蝠蛾拟青霉菌丝体有效成分[J].食用菌学报,2010,17(4):44-47
- [8] 巩伯梁,董冰雪,李长杰,等.响应面法优化蝙蝠蛾拟青霉发酵培养基配方[J].微生物学免疫学进展,2011,39(4):17-23
- [9] 刘安军,祝长美,朱振元,等.古尼虫草多糖对衰老模型小鼠的影响[J].现代食品科技,2008,24(3):201-204
- [10] 陈宏伟,朱蕴兰,邵颖,等.蛹虫草深层发酵富集微量元素锌的研究[J].安徽农业科学,2007,35(26):8193-8194
- [11] 陈宏伟,陈安徽,朱蕴兰,等.原生质体诱变选育高富硒量冬虫夏草菌株的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(3):15-19
- [12] Jian Hui Xiao, Dai Xiong Chen. Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in Cordyceps pnuinosa [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 2241-2247
- [13] 杨晓东,崔勤敏.发酵虫草菌粉中甘露醇含量的比色法测定[J].中国现代应用药学杂志,2006,23(6):504-506