

# 金针菇富锌条件及锌结合形态的研究

孙希雯 李奇庚

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

**摘 要** 对金针菇深层发酵富锌培养条件进行了研究, 并对 Zn 的生物有机化程度进行了初步探讨。结果表明, 金针菇富锌的深层培养较好的 Zn 源为  $\text{ZnAc}_2$ , 初始 pH 值为 6.5, 加入 0.1% 柠檬酸和 0.4% 的 CMC-Na 利于富锌和提高生物量。金针菇富锌过程中, 93% 以上的  $\text{ZnAc}_2$  以有机锌态存在, 其中 50% 以上结合为 Zn-蛋白, 34% 与糖及脂肪类物质结合。

**关键词** 金针菇, 富锌, 结合形态

锌为人体所必需的微量元素, 被公认为 14 种微量元素中的第二位。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高度的生化效应。因此, 在人类生命科学研究中, 微量元素锌的有机化具有重要意义。

当今, 追求健康长寿的新途径不断被开拓, 而富含蛋白质、氨基酸及多糖的食用、药用真菌不但营养全面, 而且具有提高人体免疫力、抗肿瘤、防衰老等的保健功能。实验证明, 金针菇菌丝体较子实体的营养组成和含量都高。作者对富锌生物转化深层培养和锌源有机化方面进行了研究与探讨, 提出了金针菇富锌的有机化及深层发酵合理工艺与条件, 现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: 金针菇 (*Flammulina velutipes*) TQ1 及白木耳 (*Tremella fuciformis*) TQ2, 系本实验室保存的菌种。

### 1.1.2 培养基:

斜面培养基 (%): 马铃薯 20, 葡萄糖 2, 琼脂 2。

摇瓶培养基 I (%): 玉米粉 4, 葡萄糖 1, 酵母粉 0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15。

摇瓶培养基 II (%): 马铃薯 20, 葡萄糖 2, 蛋白胨 0.2,  $\text{MgSO}_4$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15。

摇瓶培养基 III (%): 玉米粉 4, 葡萄糖 1, 酵母粉 0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15, 醋酸锌按实验要求加入, CMC-Na 0.4, 柠檬酸 0.1。

### 1.2 方法

1.2.1 原材料处理: 按需要量称取马铃薯、胡萝卜, 去皮后切碎, 加入适量水煮沸 30 min, 纱布过滤补足至所需体积。

本文于 1995 年 5 月 8 日收到。

玉米粉: 按要求称取 40 目过筛玉米粉。

**1.2.2 菌种选择:** 取金针菇及白木耳菌株分别在培养基 I 及培养基 II 中添加锌盐, 摇瓶培养 6 d, 每 24 h 取样一次测定生物量和富锌能力 (25 ℃ 培养)。

**1.2.3 锌盐的确定:** 取醋酸锌、硫酸锌、氧化锌, 分别加入金针菇培养基 I 中, 摇瓶培养 6 d, 每 24 h 取样一次, 测定生物量及菌体中含锌量。

**1.2.4 富锌条件 (25 ℃ 培养):** 选择初始 pH 值为 6.0、6.5、7.0 进行培养, 最后测定生物量, 以确定适宜的初始 pH 值。

培养基添加增粘剂: 粘度对富锌金针菇的生长也较为重要, 故在培养基 I 中添加不同量的 CMC-Na 并于 25 ℃ 培养, 以确定其添加量。

柠檬酸的添加: 在培养基 I 中添加不同量的柠檬酸, 测定其生物量和菌丝体含锌量, 以期柠檬酸在金针菇与锌络合时起到协同作用。再以原培养基 I 为基础, 以初始 pH 值及添加 CMC-Na、柠檬酸为实验因子进行正交试验, 根据生物转化率及富锌转化率确定培养基的最佳水平组合。

金针菇耐锌极限浓度的确定: 在最佳培养基中, 分别加入不同量的醋酸锌, 测定生物量及菌丝体中含锌量, 以确定富锌极限量。

### 1.2.5 金针菇富锌中锌的形态分析:

锌生物转化形态分析参照有关资料<sup>[1]</sup>进行实验。首先测定金针菇富锌的有机化程度:

持续透析法: 将 1 g 富锌金针菇粉末在蒸馏水中透析, 至用茚三酮法检查透析液中无氨基酸, 测定菌丝体中含锌量。

静置浸出法: 将 1 g 富锌金针菇粉末, 加入 2 ml 水, 分别浸取不同时间, 过滤, 测定菌丝体中锌含量。

最后进行富锌菌丝体的电镜观察 (以戊二醛、锇酸固定, 超薄切片)。

### 1.2.6 分析检测方法:

锌的测定: 双硫脲法<sup>[2]</sup>。菌丝体生物量的测定<sup>[3]</sup>: 取 50 ml 发酵液, 离心分离 (3000 r/min) 10 min, 倾出清液, 洗涤沉淀, 将菌丝体于 60 ~ 65 ℃ 下烘干 3 h, 然后升温至 105 ℃ 至恒重。

$$\text{生物量 (g/L)} = \frac{\text{菌丝体干重}}{50} \times 1000$$

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌种的确定

金针菇和白木耳加锌后生长情况见表 1。

由表 1 看出, 作为富锌菌种, 金针菇比白木耳好。这是由于 Zn 与蛋白质结合时主要是与柠檬酸基、半胱氨酸基、组氨酸基相络合, 而含有这三种基团的氨基酸前者比后者要高。所以金针菇比白木耳的富锌能力强。另外, 富锌时在相同的生长期金针菇比白木耳生物量高, 从菌丝体收获量看, 选用金针菇比白木耳更为适宜。

表 1 不同菌种加锌后生长及富锌能力  
Table 1 Capacity of growing and bioconcentration Zn with different edible fungi after adding Zn

菌 种 Fungi	菌 球 量 Quantity of hypha	菌球生长期 Growing period t /d	生物量 Biomass /g · L <sup>-1</sup>	富锌量 Quantity of bioconcentration Zn /mg · g <sup>-1</sup>
金 针 菇 <i>Flammulina velutipes</i>	多 more	6	17.36	8.12
白 木 耳 <i>Tremella fuciformis</i>	少 little	6	5.13	1.02

2.2 锌源的确定

锌源对金针菇菌丝体富锌有直接影响。表 2 结果表明，在加锌量相同条件下，金针菇对不同锌源的富集能力不同，而且可溶性锌盐优于不溶性的 ZnO。不同 Zn 源对金针菇的菌丝生长也有不同影响，其中以醋酸锌为最好，硫酸锌次之，氧化锌最差。这是由于醋酸锌是弱酸弱碱的盐，能使菌丝与锌在适宜的稳定的环境中络合和生长。Zn 的配位数是 4，其空轨可与蛋白质链上的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、COO<sup>-</sup> 配位形成结构牢固的螯合物，提高 Zn 的有机化程度。而 ZnSO<sub>4</sub> 由于其离解作用使培养基的 pH 降低以致影响菌丝体的生长。而 ZnO 本身就具碱性，也会阻碍菌丝繁殖，故选择 ZnAc<sub>2</sub> 为锌源是适宜的。

表 2 不同锌源的比较  
Table 2 Comparison of adding different sources of Zn

锌 源 Source of Zn	生 物 量 Biomass /g · L <sup>-1</sup>	富 锌 量 Quantity of bioconcentration Zn /mg · g <sup>-1</sup>
硫酸锌 ZnSO <sub>4</sub>	17.36	8.20
醋酸锌 ZnAc <sub>2</sub>	17.84	8.90
氧化锌 ZnO	14.48	6.10

注：菌液加锌量为 200 mg /L。  
Consistency of Zn is 200mg /L.

2.3 金针菇富锌的培养条件

2.3.1 初始 pH 对富锌的影响：锌在参与生物转化时，作为中心原子与配位体络合，而且络合条件与 pH 值有直接关系，结果见表 3。

由表 3 结果可以看出，当 pH 6.5 时，生物量和富锌量均高于 pH 6.0 和 7.0，而且在加锌后的生物量又都较高。故应在 pH 6.5 条件下进行金针菇的富锌培养。

2.3.2 增粘剂对富锌的影响：培养基的粘度直接影响着菌球的大小和多少，当添加不同量的 CMC-Na 时，菌丝体悬浮液的流变特性发生了不同程度的变化，使其生物量也随之而不同。从富锌的历程看，锌首先粘在菌体的表面<sup>[4]</sup>，有一部分与菌丝膜表面结合，并有大部分进入菌丝体内部与蛋白质络合。因此，培养基的粘度无疑首先影响到锌的表

面吸收。

表 3 初始 pH 和添加增粘剂及柠檬酸对富锌量的影响

Table 3 Influence of different initial pH and adding binding agent and citric acid on quantity of bioconcentration Zn

实验类别 Classification of trial		生物量 Biomass /g · L <sup>-1</sup>	富 锌 量 Quantity of bioconcentration Zn /mg · L <sup>-1</sup>
初始 pH	6.0	11.03	8.72
Initial pH	6.5	11.71	11.20
(ZnAc <sub>2</sub> 200 mg / L)	7.0	11.11	6.30
	空白	10.08	0.00
CMC-Na 添加量/(%)	0.2	16.40	9.05
Adding quantity	0.3	17.85	10.86
of CMC-Na	0.4	16.65	9.90
(ZnAc <sub>2</sub> 250 mg / L)	0.0	15.78	0.00
柠檬酸添加量/(%)	0.1	17.2	14.58
Adding quantily	0.3	16.3	16.52
of citric acid	0.5	16.1	13.45
(ZnAc <sub>2</sub> 300 mg / L)	0.0	17.4	14.21

表 3 结果表明，添加 CMC-Na 为 0.3% 时得到的生物量和富锌量均最高。这说明加入增粘剂有利于菌丝生长和富锌，但添加量有一个最适值。在一定范围内，生物量和富锌量随添加量的增加而升高，而超过最适添加值时二者又都降低。这是由于增粘剂过多粘着在菌体表面而阻碍了 Zn 与菌丝的接触和向菌丝体内的输入，造成物理表面吸附。

2.3.3 添加柠檬酸对富锌的影响：由表 3 还可看出，添加柠檬酸对富锌有利，但生物量却稍有降低。这是由于加入柠檬酸后改变了培养基的生物合成的最适 pH 值，从而阻碍了菌丝体的生长发育。而金针菇的富锌能力却由于柠檬酸的加入而提高了，可认为是柠檬酸与锌首先形成小分子络合物，随之进入菌丝体形成 Zn 与大分子蛋白质的络合物，故锌的富集量比不加柠檬酸时要高。由表 3 明显看出柠檬添加量不能高于 0.5%，因酸度过大，超出 Zn 与柠檬酸络合的 pH 范围，反而使菌丝体内的 Zn 溶出，造成空白比添加柠檬酸 0.5 % 的含锌量还高。

2.3.4 正交试验：金针菇的富锌结果主要受 pH、培养基中的 CMC-Na 浓度和柠檬酸的添加量的影响，正交试验的结果表明，影响生物转化率及富锌效果的显著因素是 pH 值，其次是柠檬酸，CMC-Na 影响最小。故最佳培养基为 pH 6.5，柠檬酸 0.1%，CMC-Na 0.4%，这种组合也确证了前述单因素实验结果的可靠程度。

2.3.5 金针菇的富锌极限：加锌量为 200 ~ 3000 mg / L，实验结果如表 4。

表 4 不同加锌量对生物量及富锌量的影响

Table 4 Influence of adding different quantity of Zn on biomass and quantity of bioconcentration Zn

项 目 Item	加锌量 Quantity of Zn / mg · L <sup>-1</sup>							
	200	400	600	800	1000	2500	3000	0
生物量 / g · L <sup>-1</sup> Biomass	18.70	20.10	20.90	22.10	20.10	13.40	9.50	17.30
富锌量 / mg · L <sup>-1</sup> Quantity of bioconcentration Zn	9.56	20.07	27.28	28.22	45.84	108.33	106.82	0.00

注：培养基 III。  
Medium is III.

从表 4 结果看出，加锌量由 200 mg / L 逐渐增加到 800 mg / L 时，生物量随之而增加，超过 800 mg / L 时虽然富锌量增加但生物量相应减少，这与锌浓度过高，形成菌丝体表面吸附，而阻碍菌丝对培养基营养的吸收有关。确定金针菇的加锌极限量为 800 mg / L。

2.4 富锌金针菇的形态分析

2.4.1 锌的生物转化形态：有报道<sup>[5]</sup>指出，微量元素的络合可能主要以金属蛋白的形式存在，作者对金针菇锌的存在形态进行了初步分析。

蛋白质的分离：各种蛋白质在不同的介质中溶解度不同，而使菌丝体中蛋白质得以分离，进而测定与各种蛋白质结合的 Zn 量（其中沉淀 I 为清蛋白和球蛋白，II 为醇溶蛋白，III 为谷蛋白），并对分离过程中的其他残余物进行 Zn 的测定，结果见表 5。

表 5 锌与各种蛋白质的结合率  
Table 5 Binding ratio of Zn and protein

沉 淀 分 布 Distribution of sediment	富 锌 量 Quantity of bioconcentration Zn /mg · g <sup>-1</sup>	占 总 锌 Percentage of total Zn / (%)
I	0.26	51.02
II	1.11	
III	0.63	
残余物 Sediment	1.35	34.40

从表 5 结果看出，菌丝体中的锌与清蛋白、球蛋白和谷蛋白等均有结合，其结合总量占锌的 50% 以上。可认为锌与大分子蛋白质以结合形态存在于菌丝体中，醋酸锌经生物富集形成了有机态锌。另外，所分离的残余物中除含有大量糖类还有少量的脂肪等其他有机化合物，与这部分相结合的锌占总锌的 34.4%，这正说明当糖类与蛋白质同时存在时，蛋白质是锌的主要结合对象。这从生物化学角度验证了锌在金针菇富集过程中

发生了生物学的转化。

**2.4.2 有机化程度的测定结果:** 以常用而准确的持续透析和静置浸出法测定金针菇富锌有机化程度, 结果见表 6。

表 6 锌的有机化程度  
Table 6 Degree of organized--Zn

方 法 Method	透 析 法 Dialysis method	浸 出 法 Leaching method		
处理前菌丝总 Zn Quantity of total Zn before treatment /mg · g <sup>-1</sup>	4.71		4.71	
处理后菌丝总 Zn Quantity of total Zn after treatment /mg · g <sup>-1</sup>	4.47	5 h 4.48	10 h 4.40	20 h 4.39
有机化程度 / (%) Degree of organizing	94.91	95.1	93.40	94.2

表 6 结果说明, 金针菇对锌有生物转化能力, 加入的锌并非机械地物理吸附在菌体表面, 而是发生了有机的生物转化, 形成了结合牢固的复杂的有机锌, 其有机化程度在 93% 以上。

**2.4.3 富锌金针菇的电镜观察<sup>[6]</sup>:** 由图版 I 看出, 富锌的细胞内由于锌与酶的结合促进了新陈代谢, 比不加锌的代谢活跃。从第 2 天开始, 加锌的比不加锌的胞内大颗粒合成物质增多了。第 4 天不加锌细胞内念珠状类核糖体和贮藏颗粒均多, 这是发酵的旺盛期, 而加锌的胞内类核糖体相对略少, 但大颗粒贮藏物明显增多, 这也是发酵旺盛期的表现。到了第 6 天, 不加锌的胞内营养物已被分解利用, 内含物明显减少, 而加锌的类核糖体和贮藏颗粒都很多, 看出发酵仍很旺盛。以上从细胞内部看出, 加锌后锌参与了细胞的生物合成, 促进了生物转化, 活跃了代谢, 这对提高金针菇的营养价值极为有利。

## 参 考 文 献

- [1] 徐瑞兴, 周云芝, 肖 平. 食品工业科技, 1989, 4: 7~9.
- [2] 无锡轻工业学院、天津轻工业学院合编. 食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 313~318.
- [3] 洪 震, 卯晓岚编著. 食用药用菌实验技术及发酵生产. 北京: 中国农业出版社, 1992. 229~231.
- [4] Fleming T P. *Comp Physiol*, 1982, 71 (C): 69~75.
- [5] Prasad A S. Trace Element in Human and Disease. New York: Acad Pree, 1972. 105.
- [6] 武汉大学、复旦大学合编. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1987. 16~27.

## STUDIES ON THE CONDITIONS OF QUANTITY OF BIOCONCENTRATION Zn AND THE COMBINED STATE OF Zn BY *FLAMMULINA VELUTIPES*

Sun Xiwen Li Qigeng

(Food Department, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin 300222)

**Abstract** The presented paper analysed and studied the conditions of submerged fermentation of quantity of bioconcentration Zn by *Flammulina velutipes*. The result showed that the  $\text{ZnAc}_2$  was the better Zn source of submerged fermentation of *Flammulina velutipes*. Initial pH 6.5, 0.1% citric acid and 0.4% CMC-Na were the better conditions for bioconcentration of Zn and increase the biomass. During the transforming process of organized Zn by *Flammulina velutipes*, about 93%  $\text{ZnAc}_2$  was organic-Zn, 50% was protein-Zn, and 34% was Zn binding hydrocarbonate and lipid material.

**Key words** *Flammulina velutipes*, Bioconcentration Zn, Combined state

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

1. 发酵第2天的菌丝 (不加锌) (20000 $\times$ ); 2. 发酵第2天的菌丝 (加锌) (20000 $\times$ ); 3. 发酵第4天的菌丝 (不加锌) (20000 $\times$ ); 4. 发酵第4天的菌丝 (加锌) (20000 $\times$ ); 5. 发酵第6天的菌丝 (不加锌) (20000 $\times$ ); 6. 发酵第6天的菌丝 (加锌) (20000 $\times$ ).

1. Fermentation hypha on the second day without Zn; 2. Fermentation hypha on the second day by adding Zn; 3. Fermentation hypha on the fourth day without Zn; 4. Fermentation hypha on the fourth day by adding Zn; 5. Fermentation hypha on the sixth day without Zn; 6. Fermentation hypha on the sixth day by adding Zn.