

不同金属离子对竹黄液体发酵的影响

项小燕, 郑爱芳, 谢 翎

安庆师范学院生命科学学院, 安徽 安庆 246011

摘要: 目的 研究不同质量分数的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 和 Ca^{2+} 对竹黄菌液体发酵产竹红菌素量和菌丝体生物量的影响。方法 向培养基中添加不同质量分数的金属离子, 在 27 °C、130 r/min 下培养 96 h。结果 Cr^{3+} 的质量分数为 0.005% 时竹红菌素及菌丝体生物量最大; Fe^{3+} 的质量分数为 0.003% 时菌丝体生物量最高, 0.005% 时竹红菌素量最高; Ca^{2+} 的质量分数为 0.03% 时最有利于菌丝体生长, 0.05% 时最能促进竹红菌素的分泌; Cu^{2+} 的质量分数为 0.03% 时生物量及竹红菌素量均达到最大值。

结论 添加金属离子后, 菌丝体干质量最高达 15.28 g/L, 竹红菌素量最高达 8.12 mg/g。

关键词: 竹黄; 竹红菌素; 生物量; 菌丝体; 金属离子

中图分类号: R282.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)01-0164-03

Effect of different metal ions for submerged culture of *Shiraia bambusicola*

XIANG Xiao-yan, ZHENG Ai-fang, XIE Ling

School of Life Science, Anqing Teachers College, Anqing 246011, China

Abstract: Objective To study the effect of different levels of Cu^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , and Ca^{2+} on mycelia biomass and the hypocrellin yield by submerged culture of *Shiraia bambusicola*. **Methods** The fungus were cultured under 27 °C and 130 r/min for 96 h with each level of metal ions. **Results** The biomass and the hypocrellin yield were the highest with Cr^{3+} of 0.005%; Fe^{3+} of 0.003% and 0.005% contents were favorable to the biomass and the hypocrellin yield, respectively; Ca^{2+} content of 0.03% was suitable for the mycelia growth and the hypocrellin yield benefited from the concentration of 0.005%; Cu^{2+} content of 0.03% was added, both the biomass and the hypocrellin yield reached the best. **Conclusion** The highest mycelia dry weight and the hypocrellin yield could reach 15.28 g/L and 8.12 mg/g, respectively in addition of metal ion.

Key words: *Shiraia bambusicola* P. Henn.; hypocrellin; biomass; mycelia; metal ions

竹黄 *Shiraia bambusicola* P. Henn. 又名竹花、天竹花、淡竹花、竹茧、赤团子、竹赤团子、竹赤斑菌、竹参、竹三七、血三七等, 属于真菌界子囊菌亚门核菌纲肉座菌目肉座菌科竹黄属真菌^[1]。研究表明, 竹黄具有抗炎、镇痛、抗菌、抗肿瘤等功效。该菌中含有的竹红菌素具有止咳、祛疤、祛痛舒筋、祛风利湿及治疗多种皮肤顽症的效用, 并具有抗癌和抗艾滋病的作用^[2-9]。由于该菌野生资源分布有限, 易受地域和季节等因素的限制, 野外人工栽培又易引起竹林的衰败, 因而大大限制了该菌的开发利用。而液体发酵具有周期短、产量高, 且不受场地和季节限制等优点, 因此, 利用液体发酵生产竹黄具有重要的意义。

李加友等^[10]从该菌的发酵液中得到了抗菌活性成分; 石贵阳等^[11]对该菌液体发酵, 从中得到竹红菌素的优化生长条件, 而对于金属离子对液体发酵的影响方面未见报道。由于金属离子可以改变真菌细胞膜的通透性或改变发酵途径中关键酶的活性, 从而改变发酵产物的量^[12]。因此, 本实验探究了不同质量分数的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 和 Ca^{2+} 对液体发酵产竹红菌素和菌丝体生物量的影响, 从而得出适合菌丝体生长以及竹红菌素分泌的各金属离子质量分数, 为大规模发酵该菌提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

菌株分离自安徽休宁采集的竹黄子座, 由安庆

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (KJ2007B107); 安徽省高校青年教师资助计划项目 (2007jp1123); 安庆师范学院科研启动项目 (044-k05000000131)

作者简介: 项小燕 (1981—), 女, 安徽桐城人, 讲师, 硕士研究生, 主要从事药用真菌研究。Tel: 13855641519 E-mail: xiaoyanxiang@aqtc.edu.cn

师范学院魏和平博士鉴定。竹红菌素标准品购自 Sigma 公司。斜面母种培养基为 PAD 培养基。液体种子培养基: 2% 葡萄糖, 0.3% 牛肉膏, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , 蒸馏水定容。液体摇瓶基本培养基: 2% 葡萄糖, 0.3% NaNO_3 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , pH 7.5。离子培养基: 在液体摇瓶基本培养基中加入不同浓度的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 FeCl_3 、 CrCl_3 和 CaCl_2 。

恒温培养箱 (EHSY LAB), 摇床 (THZ—03M2), 冷冻干燥机 (FD—1), 分光光度计 (721)。

1.2 菌种的获得

将采集的竹黄子座用 75% 酒精表面消毒, 在无茵条件下切成黄豆粒大小, 27 °C 恒温培养, 待试管长满菌丝后, 挑选优势菌株置冰箱保存。

1.3 液体种子培养

将斜面菌株活化后用无菌水冲洗, 在全温震荡培养箱 27 °C、130 r/min 培养 72 h, 再用匀浆器将菌丝打碎, 即获得种子液。

1.4 液体摇瓶培养基

用 0、0.03%、0.05%、0.1% 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 CaCl_2 ; 0、0.003%、0.005%、0.01% 的 FeCl_3 和 CrCl_3 加入各摇瓶培养, 每一浓度做 3 个平行对照, 27 °C、130 r/min, 培养 96 h。

1.5 生物量 (细胞干质量) 测定

发酵液经 200 目筛滤过, 倾去滤液, 收集菌丝体用蒸馏水洗涤后, 将菌丝体放入冷冻干燥机中冷冻干燥至恒重后称质量。

1.6 竹红菌素标准曲线的绘制

精确称取竹红菌素对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶, 用丙酮溶解并定容至刻度, 得对照品溶液 1 mg/mL。用丙酮稀释成一系列质量浓度 (10、20、30、40、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的对照品溶液。取系列对照品溶液在 465 nm 处测吸光度^[13], 以竹红菌素质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 进行回归计算, 得回归方程为 $Y=0.020\ 3\ X+0.284\ 2$, $r=0.999\ 2$ 。

1.7 竹红菌素的测定

将一定量的菌丝与一定比例的丙酮混合, 浸提过夜, 滤过后得到澄清提取液, 用丙酮适当稀释后测定吸光度, 根据回归方程计算竹红菌素的量。

2 结果与分析

2.1 Cr^{3+} 对竹红菌素及生物量的影响

从图 1 可以看出, 培养基中添加 Cr^{3+} 后, 无论是竹红菌素量还是生物量, 均比无 Cr^{3+} 组高。且当

该金属离子的质量分数增加时, 两种物质的量也随之增加, 当质量分数增至 0.005% 时, 两者的量均达到最大值。其中, 菌丝体干质量达到 13.28 g/L, 竹红菌素量高达 7.56 mg/g。当 Cr^{3+} 的质量分数继续增加时, 两者的量均开始下降, 当增至 0.01% 时, 菌丝体干质量降至 11.59 g/L, 竹红菌素降至 6.07 mg/g。

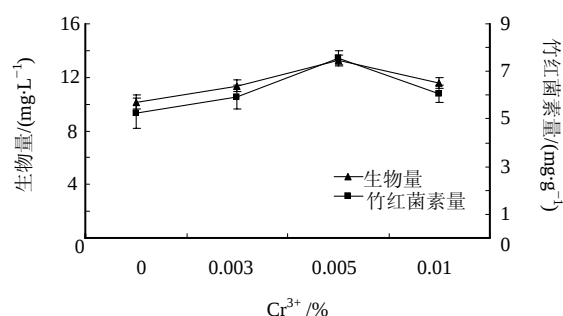


图 1 Cr^{3+} 对竹红菌素产量及生物量的影响

Fig. 1 Effect of Cr^{3+} on the hypocrellin yield and biomass

2.2 Fe^{3+} 对竹红菌素及生物量的影响

图 2 结果显示, 在所选的 Fe^{3+} 浓度范围内, 当质量分数为 0.003% 时生物量达到最大值 (12.57 g/L), 而当质量分数继续增加时, 生物量逐渐降低, 当增至 0.01% 时, 菌丝体干质量减至 7.39 g/L。竹红菌素随着质量分数的增加量不断提高, 0.005% 时达到最大值 7.79 mg/g, 当大于 0.005% 时, 该色素的量又呈下降趋势。

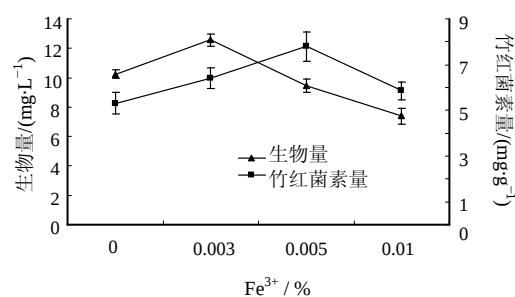
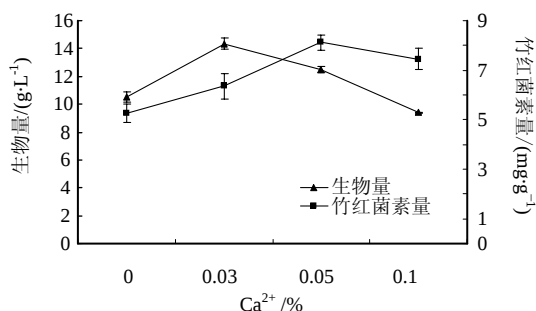


图 2 Fe^{3+} 对竹红菌素产量及生物量的影响

Fig. 2 Effect of Fe^{3+} on hypocrellin yield and biomass

2.3 Ca^{2+} 对竹红菌素及生物量的影响

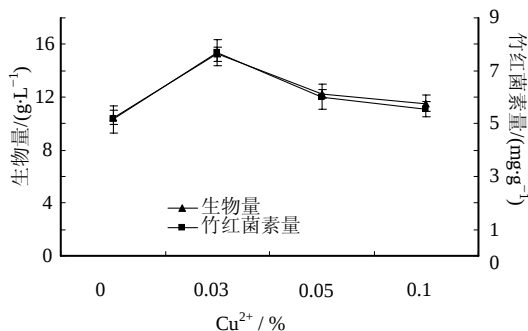
Ca^{2+} 试验结果 (图 3) 表明, 0.03% 的 Ca^{2+} 最有利于菌丝体生长, 在此质量分数下菌丝体干质量为 14.34 g/L, 过高或过低皆不利于该菌发酵。竹红菌素量随着该离子质量分数的增加呈上升趋势, 当增至 0.05% 时, 该色素达到最大值, 为 8.12 mg/g, 大

图3 Ca^{2+} 对竹红菌素及生物量的影响Fig. 3 Effect of Ca^{2+} on hypocrellin yield and biomass

于此质量分数时竹红菌素量开始降低。

2.4 Cu^{2+} 对竹红菌素及生物量的影响

Cu^{2+} 对竹红菌素量及生物量的影响见图4,可以看出,生物量随 Cu^{2+} 浓度的上升急剧增加,在质量分数为0.03%时高达15.28g/L,继续增加浓度,生物量不断下降。竹红菌素变化趋势与生物量相同,在质量分数为0.03%时达到最大值(7.68 mg/g),高于或低于此浓度皆不利于该色素的生成。

图4 Cu^{2+} 对竹红菌素产量及生物量的影响Fig. 4 Effect of Cu^{2+} on hypocrellin yield and biomass

3 讨论

本实验研究了 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对竹黄菌液体发酵过程中竹红菌素量及生物量的影响。结果表明,不同的金属离子及质量分数对该菌发酵指标的影响有差异。其中, Cr^{3+} 为0.005%时,竹红菌素的分泌和菌丝体的生长均处于最佳状态;0.003%的 Fe^{3+} 最有利于菌丝体的生长,而当质量分数为0.005%时竹红菌素量达到最大值; Ca^{2+} 在质量分数为0.03%时生物量达到最大值,在质量分数为0.05%时竹红菌素量最高;0.03%的 Cu^{2+} 皆最适合竹红菌素的生成和菌丝体的生长。在所选的离子中, Cu^{2+} 最能促进菌丝体的生长,当添加0.03% Cu^{2+} 时,菌丝体干质量达到15.28 g/L。而向培养基中添加适当

的 Ca^{2+} 能显著地提高竹红菌素的形成,在质量分数为0.05%时竹红菌素量高达8.12 mg/g。胡飞等^[14]和石贵阳等^[11]从优化培养基方面来提高竹红菌素量,此方法虽对目标产物有一定的促进作用,但效果不显著。而该实验从发酵途径着手,分别得到了适合菌丝体生长和竹红菌素分泌的各离子浓度。实验结果表明,目标产物在此改良条件下得到了显著提高。但对于如何进一步提高代谢途径中关键酶的活性还有待更深入的研究,以期更好地提高该菌的发酵质量。

参考文献

- [1] 赵丹, 梁宗琦. 竹黄的分离培养研究进展 [J]. 菌物研究, 2005, 3(1): 53-57.
- [2] 肖仔君, 陈惠音, 杨汝德. 竹红菌素 [J]. 中国食品添加剂, 2003, 2(4): 74-76.
- [3] 王景祥. 竹黄的研究概况 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 477-479.
- [4] Huderson J B, Imperial V, Haugland R P, et al. Antiviral activities of photoactive perylenequinones [J]. Photochem Photobiol, 1997, 65(2): 352-354.
- [5] Miller G, Brown K, Ballangrud A M, et al. Preclinical assessment to hypocrellin B and hypocrellin B derivatives as sensitizers for photodynamic therapy of cancer: progress update [J]. Photochem Photobiol, 1997, 65(4): 714-722.
- [6] Hirayama J, WonKwon K I. Photoinactivation of virus infectivity by hypocrellin A [J]. Photochem Photobiol, 1997, 65(5): 697-700.
- [7] Huderson J B, Zhov J, Chen J. Hypocrellin from hypocrellin A bambusaes phototoxic to human immunodeficiency virus [J]. Photochem Photobiol, 1994, 60(3): 253-255.
- [8] 杨国红. 药用真菌竹黄的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 91-92.
- [9] 林海萍, 殷红福, 黄小波, 等. 不同来源竹黄中多糖量的分析与比较 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1549-1552.
- [10] 李加友, 李兆兰, 焦庆才, 等. 竹黄菌发酵液萃取物的抗菌活性研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(3): 159-160.
- [11] 石贵阳, 张大兵, 楼志华, 等. 竹黄菌液体培养条件下生成竹红菌素的研究 [J]. 药物生物技术, 2004, 11(5): 299-301.
- [12] 郑维发, 项小燕, 陈才法, 等. 不同培养基和三种金属离子对华褐孔菌培养菌丝体的羊毛甾醇和麦角甾醇积累的影响 [J]. 2008, 27(1): 126-139.
- [13] 林海萍, 陈声明, 陈超龙. 一种值得开发利用的药用真菌——竹黄 [J]. 浙江林业科技, 2002, 22(1): 77-80.
- [14] 胡飞, 李瑞雪, 李春如, 等. 一株竹黄无性型菌株液态发酵产竹红菌素的初步研究 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(2): 44-47.