

不同脱乙酰度壳聚糖对金针菇菌丝体生长代谢的影响

吴智艳, 闫训友

(河北廊坊师范学院生命科学学院 065000)

摘要: 壳聚糖是甲壳素经脱乙酰基而得到的高分子阳离子聚合物, 具有特殊的分子结构与功能, 在科研及应用领域越来越受到人们的重视。以金针菇为材料, 研究在不同脱乙酰度(80%、90%、95%)、不同浓度(0.125、0.083、0.063、0.05mg/mL)的壳聚糖的条件下对菌丝体生理生化的影响, 结果表明: 3种脱乙酰度壳聚糖分别在不同的浓度下, 对金针菇菌丝体生长量、蛋白质含量、核酸含量都有明显的促进作用, 但随壳聚糖脱乙酰度及稀释倍数不同而有所不同。其中以脱乙酰度为90%, 浓度为0.083mg/mL时, 促进作用最为明显; 但3种不同脱乙酰度不同稀释倍数的壳聚糖对可溶性糖的影响作用表现不明显。

关键词: 壳聚糖; 脱乙酰度; 生长; 代谢

中图分类号: S 482.8; S 646.1⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0232-03

壳聚糖(chitosan)又称脱乙酰几丁质, 聚氨基葡萄糖, 可溶性甲壳素, 化学名称为聚(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-葡聚糖, 分子式为(C₈H₁₃NO₅), 是几丁质脱乙酰化的产物。壳聚糖的生物活性主要取决于分子量和脱乙酰度的大小, 由于其特殊的分子结构与功能使得其在科研及应用领域越来越受到人们的重视^[1,2]。大量研究表明, 壳聚糖作为植物生长调节剂, 具有促进农作物产量提高和改善农产品品质; 作为无公害的土壤改良剂; 还能抑制植物病原微生物的生长、增强作物抗性; 以及广泛应用于农产品的贮藏保鲜等方面^[5,6]。

金针菇(*Flammulina velutipes*)是世界著名的食用菌之一, 在国际市场上产量仅次于白蘑菇和香菇居第三位。金针菇肉质细腻、滑软, 味道宜人, 其蛋白质含量高, 并含有天冬氨酸、组氨酸、谷氨酸、丙氨酸等10余种氨基酸, 其中富含8种人体必需氨基酸, 尤以精氨酸和赖氨酸含量丰富, 可以促进记忆开发智力, 对幼儿增加身高和体重十分有益。此外, 还含有维生素B₁、B₂、C、PP, 可防治和治疗肝脏系统疾病和胃溃疡。金针菇含有的金针菇多糖, 具有抗癌、降低胆固醇的作用^[8]。目前, 金针菇新型开发保健食品有许多品种, 例如金针菇饮料、金针菇蜜饯、金针菇多糖胶囊等。

近年来已有众多生长调节剂应用于食用菌的栽培

中, 并且具有明显的增产效果, 但是壳聚糖应用于食用菌方面的报道还不多见, 尤其是对食用菌生长代谢的研究几乎为空白, 国内仅见盛彦清^[7]等研究壳聚糖能够使草菇生长加快, 并使其产量增加的报道, 但没有进一步的研究。鉴于此, 就不同脱乙酰度壳聚糖对金针菇菌丝体生长代谢的影响进行了一定的研究, 目的在于寻找一种更为经济, 而且可以大量提高金针菇产量和品质, 增加经济效益的生长调节剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 金杂19F₁(中国农业大学食用菌研究室提供)。

1.1.2 供试壳聚糖, 见表1。

表1 供试壳聚糖

编号	脱乙酰度(%)	来源	筛选规格
A	>80(工业级)	济南海得贝海洋生物工程有限公司	80目
B	≥90(食品级)	济南海得贝海洋生物工程有限公司	80目
C	≥95(食品级)	济南海得贝海洋生物工程有限公司	80目

1.1.3 培养基 种子培养基: PDA培养基; 1级摇瓶(液体种子)培养基: 葡萄糖3%, 蛋白胨0.3%, KH₂PO₄0.1%, MgSO₄0.15%, VB₁0.01%, pH自然。2级摇瓶(液体发酵)培养基: 黄豆粉2%(80目), 玉米粉5%(80目) KH₂PO₄0.1%, MgSO₄0.05%, VB₁0.01%, pH自然。

1.2 方法

1.2.1 1级摇瓶菌种的制备 母种经斜面活化之后, 用接种铲取一块1cm²左右的菌块, 定量接种于250mL三角瓶装120mL液体种子培养基中, 于24±1℃, 200rpm培养7d。

第一作者简介: 吴智艳(1962-), 女, 副教授, 主要从事食用菌方面的教学和科研方面的工作, E-mail: lwuzhiyan@126.com。

基金项目: 河北省教育厅资助项目(Z2006312); 廊坊师范学院科学研究资助项目(LSZ200605)。

收稿日期: 2007-01-10

1. 2. 2 壳聚糖溶液的制备 分别取 0. 5g 不同脱乙酰度的壳聚糖, 搅拌溶解于 50mL 0. 5mol/L 的盐酸中, 用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 6. 0, 搅拌使沉淀完全溶解, 最后定容至 100mL, 得 0. 5% 的壳聚糖溶液^[3,4]。

1. 2. 3 金针菇菌丝体的培养 分别取不同脱乙酰度的壳聚糖溶液, 加入到 250mL 三角瓶装有 100mL 液体发酵培养基中, 使壳聚糖溶液的浓度分别为 0. 125、0. 083、0. 063、0. 05mg/mL, 以不添加壳聚糖的液体发酵培养基作为对照组, 每个试验组 3 个重复。然后取一级摇瓶液体菌种, 定量接种到含不同浓度壳聚糖溶液的液体发酵培养基中, 接种量 10%, 于 24±1℃, 150rpm 培养 7d。

1. 2. 4 指标测定 菌丝体生物量的测定: 将发酵结束的发酵液以 4 层纱布过滤, 得菌丝体, 于 80℃ 烘干至恒重, 用电子天平称重。蛋白质含量的测定: 发酵上清液以 Folin - 酚法测定蛋白质的含量^[10]。可溶性糖含量的测定: 以蒽酮比色法测定发酵上清液可溶性糖的含量^[11]。核酸含量测定: 以紫外吸收法测定发酵上清液核酸的含量^[12]。

2 结果与分析

2. 1 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体生长的影响

金针菇在不同脱乙酰度、不同浓度的壳聚糖条件下菌丝体生长量有较大变化(见图 1), 结果表明: 脱乙酰度为 80%、90% 的壳聚糖对金针菇菌丝体有较明显的促生长的作用, 脱乙酰度为 95% 的壳聚糖对金针菇菌丝体几乎没有促进生长, 反而出现轻微的抑制作用。脱乙酰度 80% 的壳聚糖在浓度为 0. 083mg/mL 时, 金针菇菌丝体生长量最大, 脱乙酰度 90% 的壳聚糖在浓度为 0. 083mg/mL 时, 金针菇菌丝体生长量也最大。但二者相比而言, 脱乙酰度 90% 的壳聚糖在浓度为 0. 083mg/mL 时生物量最大。

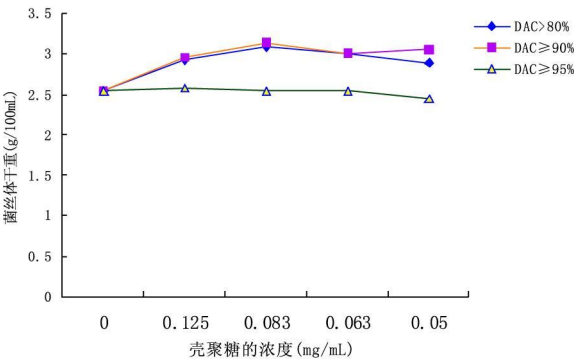


图 1 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体生长的影响

2. 2 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体蛋白质含量的影响 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体蛋白质含量都有一

定影响(见表 2), 结果表明: 脱乙酰度 80%、90% 的壳聚糖都可提高金针菇菌丝体蛋白质含量。尤其二者在浓度为 0. 083mg/mL 时, 提高效果最为明显。而脱乙酰度 95% 的壳聚糖在不同浓度时, 效果均不明显。

表 2 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体蛋白质含量的影响

编号	A					B					C					CK
壳聚糖含量 (mg/mL)	0.125	0.083	0.063	0.05	0.125	0.083	0.063	0.05	0.125	0.083	0.063	0.05	0			
蛋白质含量 (mg/g)	100.2	109.9	89.21	90.27	98.97	110.2	90.61	99.74	83.58	87.05	92.65	94.69	88.89			
平均增幅 (%)	12.7	23.7	0.4	1.6	11.3	23.9	1.9	12.2	-6.0	-2.1	4.2	6.5	100.0			

注: 平均增幅 = (蛋白质增加量 / CK) * 100%

2. 3 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体可溶性糖含量的影响 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体可溶性糖含量的影响(见表 3), 结果表明, 3 种不同脱乙酰度壳聚糖对金针菇菌丝体中可溶性糖含量影响效果不明显。

表 3 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体可溶性糖含量的影响

编号	A				B				C				CK
壳聚糖含量 (mg/mL)	0.125	0.083	0.063	0.05	0.125	0.083	0.063	0.05	0.125	0.083	0.063	0.05	0
可溶性糖含量 (mg/g)	36.80	31.83	29.09	33.56	30.57	37.05	37.79	32.32	39.04	23.59	37.29	38.43	37.55
平均增幅 (%)	-2.0	-5.2	-22.5	-10.6	-18.6	-1.3	0.7	-13.9	3.9	-37.2	-0.7	2.3	100.0

注: 平均增幅 = (可溶性糖增加量 / CK) * 100%

2. 4 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体核酸含量的影响

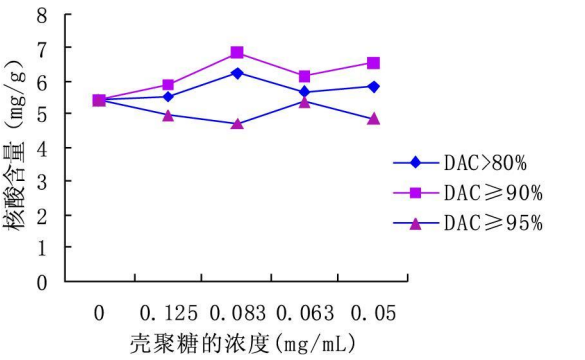


图 2 不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体核酸含量的影响

不同脱乙酰度壳聚糖对菌丝体核酸含量的影响(见图 2), 可以看出脱乙酰度 80% 和 90% 的壳聚糖都可提高金针菇菌丝体核酸含量。尤其二者在 0. 083mg/mL 时, 提高效果最为明显。而脱乙酰度 95% 的壳聚糖在不同浓度时, 对核酸含量表现出一定的抑制作用。

3 结论

壳聚糖是一种天然的阳离子聚合物, 具有植物生长调节剂活性, 能够促进根茎的发育, 调节作物生长, 增加

作物的抗性,提高作物的产量和品质^{5,9}等。作为壳聚糖原料的甲壳质资源十分丰富,和其他生长调节剂相比有巨大的优势。

试验分别在不同脱乙酰度、不同浓度的壳聚糖条件下对金针菇的菌丝体生长代谢情况进行了研究,结果表明:脱乙酰度为80%和90%的壳聚糖浓度分别在0.125mg/mL、0.083mg/mL、0.063mg/mL、0.05mg/mL时,对金针菇菌丝体生长和蛋白质、核酸合成都有一定的促进作用,尤其在脱乙酰度为90%,浓度在0.083mg/mL的壳聚糖对金针菇菌丝体生长和蛋白质、核酸合成促进作用最明显。脱乙酰度为95%的壳聚糖在不同浓度条件下对金针菇菌丝体生长和蛋白质、核酸合成等都表现出一定程度的抑制作用。3种不同脱乙酰度的壳聚糖对金针菇菌丝体中可溶性糖也表现不同程度的抑制作用,尤其以脱乙酰度为95%,浓度在0.083mg/mL抑制效果较明显。

壳聚糖的不同脱乙酰度在金针菇菌丝体生长代谢中表现出一定的影响,这提示乙酰基团在壳聚糖对金针菇菌丝体生长代谢中可能具有重要的作用。但壳聚糖中的乙酰基团的具体浓度对金针菇菌丝体生长代谢中影响还有待进一步深入研究。对于壳聚糖调节食用菌生长发育的机理,通过对金针菇菌丝体中蛋白质含量和核酸含量有明显促进作用的结果说明:壳聚糖促进金针菇生长发育的分子水平上的作用机理可能是通过提高菌丝体中总RNA(包括mRNA和tRNA)的含量,进而影响与金针菇菌丝体生长发育有关的酶或蛋白质的合

成,即壳聚糖对金针菇菌丝体生长发育有关的基因表达具有调节作用。但壳聚糖对金针菇菌丝体生长基因表达的调控在转录和翻译水平上的具体作用的分子机理还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 马鹏鹏. 甲壳素及其衍生物在农业生产中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2001, 10(5): 475-478.
- [2] Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1): 117-120.
- [3] 于明革, 杨洪强, 刘高峰, 等. 壳聚糖对黄瓜萌芽种子及幼苗生理生化特性的影响[J]. 山东农业大学学报, 2004, 35(1): 47-50.
- [4] 廖春燕, 洪文英. 壳聚糖对番茄枯萎病菌菌丝和孢子萌发研究[J]. 浙江大学学报, 2001, 27(6): 619-623.
- [5] 陈惠萍, 徐朗莱. 壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展[J]. 云南植物研究, 2005, 27(6): 613-619.
- [6] 魏新林, 夏文水. 甲壳低聚糖的生理活性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(6): 614-617.
- [7] 盛彦清, 陈繁忠, 傅家谟, 等. 壳聚糖和黄腐酸在草菇栽培中的应用试验[J]. 中国食用菌, 2004, 23(5): 20-21.
- [8] 于荣利, 秦旭升, 宋凤菊. 金针菇研究概况[J]. 食用菌学报, 2004, 4: 198-200.
- [9] 邱昌恩, 江涓. 6-BA对香菇菌丝体生长及新陈代谢的影响[J]. 食用菌, 2002, 5: 4-5.
- [10] 杨桂兰, 郭学平. Lowry法和Bradford法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3): 131-133.
- [11] 唐丽琴, 陈礼明, 刘圣, 等. 萘酚-硫酸比色法测定麦冬多糖的含量[J]. 安徽医药, 2003, 7(1): 39-40.
- [12] 郑理, 朱怀恩, 何倩琼. 保健食品中核酸含量的测定[J]. 食品工业, 2002, 1: 38-40.

Effect of Chitosan with Different Degree of Deacetylation on the Growth and Metabolism of Mycelium of *Flammulina velutipes*

WU Zhi-yan, YAN Xun-you

(College of Life Science Langfang Teacher College Langfang, Hebei 065000)

Abstract: The chitosan is a kind of giant molecule cation polymer that was deacetylated by chitin, and people more and more attention are paid in the research and application area because of its special molecular structure and functions. We took the *Flammulina velutipes* as the material, and studied the physiology and biochemistry effect of the hyphostroma in three kinds of chitosans with different deacetylated degree(80%, 90%, 95%), the different concentration(0.125mg/mL, 0.083mg/mL, 0.063mg/mL, 0.05mg/mL)chitosan. The results indicated: There kinds of chitosan with different degree of deacetylation promoted the *Flammulina velutipes* mycelium growth, protein content, nucleic acid content in different concentration, and the promotion was followed by the degree of deacetylation and the content of chitosan. The most obvious promotion was the chitosan with 90% deacetylation degree and concentration in 0.083mg/mL. But the effect on soluble sugar was indistinct in there kinds of chitosan with different degree of deacetylation and different concentration.

Key words: Chitosan; Deacetylated degree; Growth; Metabolism