

蝉花子实体对几种微量营养素的富集筛选

沈佳奇^{1,2}, 徐振栋^{1,2}, 崔俏俏^{1,2}, 钟剑国^{1,2}

¹浙江泛亚生命科学研究院, 浙江 平湖

²浙江泛亚生物医药股份有限公司, 浙江 平湖

收稿日期: 2021年11月22日; 录用日期: 2022年1月7日; 发布日期: 2022年1月18日

摘要

本实验通过固体发酵, 比较锌、锰、叶黄素、维生素D3、 β -胡萝卜素、叶酸等几种微量营养素在蝉花子实体中的富集效果及其对生长的影响。在罐头瓶的小麦培养基中直接添加锌、锰、铬、叶黄素、维生素D3、 β -胡萝卜素、叶酸等原料, 发现最后培养所得蝉花子实体中, 锌、锰、叶酸均有较好的富集效果, 在0.25%添加量下, 蝉花子实体中的锌含量由3.44 mg/100g升高至13.2 mg/100g, 锰含量由0.91 mg/100g升高至10.3 mg/100g, 叶酸含量由107 μ g/100g升高至493 μ g/100g, 但锰原料组蝉花子实体生物量显著降低。进一步将固体培养扩大至培养盒, 对锌、叶酸的添加浓度进行筛选, 随着浓度上升, 锌添加量0.9%时, 在蝉花子实体中的富集量增加最快, 超过0.9%, 富集量的增速减缓, 添加量达到1.5%, 子实体生物量显著降低; 叶酸添加量1.2%时, 在蝉花子实体中富集量增加最快, 而添加量达到1.5%, 子实体生物量同样显著降低。

关键词

蝉花子实体, 富集, 锌, 叶酸

Enrichment and Screening of Several Micronutrients in Cicada Flower Fruiting Body

Jiaqi Shen^{1,2}, Zhendong Xu^{1,2}, Qiaoqiao Cui^{1,2}, Jianguo Zhong^{1,2}

¹Zhejiang Bioasia Life Science Research Institute, Pinghu Zhejiang

²Zhejiang Bioasia Pharmaceutical Co., Ltd., Pinghu Zhejiang

Received: Nov. 22nd, 2021; accepted: Jan. 7th, 2022; published: Jan. 18th, 2022

Abstract

This article compares Zinc, manganese, lutein, vitamin D3 β -Enrichment effects of carotene, folic acid and other micronutrients in cicada flower fruiting body and their effects on growth, by solid fermentation. When the culturing started in cans, we found that Zinc, Manganese and Folic acid were well enriched in the cicada flower fruiting body, after we directly added Zinc, Manganese, Chromium, Lutein, Vitamin D3, β -Carotene and Folic acid raw materials. With the addition of 0.25%, the content of Zinc in cicada flower fruiting body increased from 3.44 mg/100g to 13.2 mg/100g, the content of Manganese increased from 0.91 mg/100g to 10.3 mg/100g, and the content of Folic acid increased from 107 μ g/100g to 493 μ g/100g, but the biomass of cicada flower fruit body in Manganese raw material group decreased significantly. Then we further expanded the solid culture to the culture box to screen the added concentrations of zinc and folic acid. With the increase of Zinc concentration, the enrichment in cicada flower fruiting body increased fastest when the addition of zinc was 0.9%, more than 0.9%, the growth rate of enrichment slowed down, the addition reached 1.5%, and the biomass of cicada flower fruiting body decreased significantly; when the amount of folic acid was 1.2%, the enrichment increased the fastest in cicada flower fruiting body, and when the amount of folic acid was 1.5%, the biomass of cicada flower fruiting body also decreased significantly.

Keywords

Cicada Flower Fruiting Body, Enrichment, Zinc, Folic Acid

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蝉花又名金蝉花、蝉棒束孢，是指蝉花菌侵染蝉形成的无性子实体(孢梗束) [1]。微量营养素，即为矿物质与维生素，它们在人体存在微少，但是一旦缺乏，就会引起各种疾病[2]。很多文章都有谈到食用菌对微量元素具有很好的富集作用，但大多数研究均集中在菌丝体方面的液体培养富集，而对于子实体直接从固体培养基中富集微量元素的研究较为少见。作为刚加入新食品原料的蝉花子实体而言，探索其对各种微量元素的富集能力也有利于蝉花子实体在食品不同领域中的应用。

2. 材料与方法

2.1. 供试菌株

蝉花菌株单 A17-7-1 由浙江泛亚生命科学研究院提供。

2.2. 试剂与仪器

食品级硫酸锌($ZnSO_4$)、食品级硫酸锰($MnSO_4$)均购自北京清源食品添加剂有限公司；食品级叶黄素(90%, $C_{40}H_{56}O_2$)、 β -胡萝卜素(10%, $C_{40}H_{56}$)购自湖北楚米生物科技有限公司；食品级维生素 D3 (10w IU/G, $C_{27}H_{44}O$)购自新昌新和成维生素有限公司；食品级叶酸(98%, $C_{19}H_{19}N_7O_6$)购自浙江威仕生物有限公司；酵母抽提物(FM802)、大豆浓缩蛋白、白砂糖均购自杭州南海食品配料有限公司；ZHJH-C1214B 超净台、

ZWYR-2HD 卧式加高彩屏全温振荡器均购自上海智诚分析仪器制造有限公司。

2.3. 试验方法

2.3.1. 液体培养扩增

取上述 2.1 所述蝉花菌株斜面, 加入至液体培养基中扩增。所用液体培养基原料为酵母抽提物(FM802) 1%、大豆浓缩蛋白 0.02%、白砂糖 3.5%。在全温振荡器中 25℃, 150 r/min 条件下培养 48 h。

2.3.2. 固体培养

固体培养分为罐头瓶与培养盒两种, 前期对锌、锰、叶黄素、维生素 D₃、 β -胡萝卜素、叶酸富集的初筛采用罐头瓶培养, 后期对锌、叶酸富集的进一步筛选采用培养盒培养。

罐头瓶培养试验: 培养基为 40 g 小麦加 60 g 蒸馏水, 分别添加 0%、0.01%、0.25% 的硫酸锌、硫酸锰、叶黄素、维生素 D₃、 β -胡萝卜素、叶酸(以有效元素含量计算), 分别计为对照处理、处理 1、处理 2, 每个处理 3 个重复, 灭菌后于无菌超净台接种 10% 上述 2.3.1 所述扩增后的液体菌种, 于培养室内培养 25 天后采收子实体。

培养盒培养试验: 培养基 600 g 小麦加 840 g 水, 分别添加 0%、0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% 的硫酸锌、叶酸(以有效元素含量计算), 分别计为对照处理、处理 1、处理 2、处理 3、处理 4、处理 5, 每个处理 3 个重复, 灭菌后于无菌超净台接种 10% 上述 2.3.1 所述扩增后的液体菌种, 于培养室内培养 25 天后采收子实体。

培养条件均为 22℃ 温度, 65% 相对湿度, 150 lux 散射光(前 5 天暗培养, 温度 24℃), 保持室内空气流通新鲜。

2.3.3. 微量元素含量检测及计算

将上述 1.3.2 所述采收后的蝉花子实体样品, 经过除湿、干燥、粉碎等工艺步骤后, 称重计算各样品子实体生物量并记录。样品送华测检测技术股份有限公司检测锌、锰、叶黄素、维生素 D₃、 β -胡萝卜素、叶酸含量。

2.4. 数据分析

本文章数据均采用 SPSS 19.0 for Windows 软件进行分析。

3. 结果与分析

3.1. 几种微量营养素在罐头瓶培养下蝉花子实体中的富集结果筛选

通过在罐头瓶中添加锌、锰、叶酸原料, 最终得到的蝉花子实体对这三种微量元素的富集情况以及生长情况如表 1 所示。

在罐头瓶固体培养中, 锌组的处理 1 (0.01%) 与处理 2 (0.25%) 均与对照组有显著差异, 而同时锌组的处理 1 与处理 2 蝉花子实体生物量与对照组相比均没有显著差异。这表明蝉花子实体对锌有一定的富集效果, 并且在添加量 0.25% 以下时, 不会对生长有抑制。

而从锰组的结果来看, 处理 1 (0.01%) 与对照组没有显著差异, 处理 2 (0.25%) 与对照组有显著差异。而从子实体生物量指标看, 发现锰组的处理 1、处理 2 均与对照组产生显著差异。虽然在相对高浓度下蝉花子实体具有一定的锰元素富集效果, 但其生长则因锰元素的添加而受到抑制, 因此在后续试验中不再对锰元素进行研究。

叶黄素组、维生素 D₃ 组、 β -胡萝卜素组的结果可知, 蝉花子实体对这三种微量营养素均没有富集效

果, 因此后续试验中不再对这三种微量营养素进行研究。

再分析叶酸组的数据, 处理 1 (0.01%) 与对照组同样没有显著差异, 而处理 2 (0.25%) 则与对照组产生显著差异, 同时从子实体生物量指标看, 处理 1、处理 2 与对照组均没有显著差异。可见, 在相对高浓度下, 蝉花子实体对叶酸有一定的富集效果, 并且其生长在试验的添加浓度下(0.25%)不会受到抑制。

从罐头瓶培养的初步筛选试验中, 选定了锌与叶酸进行后续试验, 同样以含量及子实体生物量为指标, 以求找到两者最佳添加浓度, 提高蝉花子实体的经济收益, 扩大其应用范围。

Table 1. Enrichment effect of Cicada flower fruiting body on several micronutrients

表 1. 蝉花子实体对几种微量营养素的富集效果

微量元素	处理	含量(mg/100 g)	子实体生物量(g)
锌	对照	3.44 ± 0.26 a	4.24 ± 0.36 a
	1	4.51 ± 0.31 b	4.26 ± 0.52 a
	2	13.22 ± 0.42 c	4.54 ± 0.41 a
锰	对照	0.91 ± 0.27 a	4.86 ± 0.35 b
	1	1.27 ± 0.32 a	3.96 ± 0.32 a
	2	10.34 ± 0.56 b	3.88 ± 0.44 a
叶黄素	对照	0	4.20 ± 0.31 a
	1	0	4.63 ± 0.26 a
	2	0	4.66 ± 0.40 a
维生素 D3	对照	0	4.04 ± 0.35 a
	1	0	4.06 ± 0.41 a
	2	0	3.62 ± 0.38 a
β-胡萝卜素	对照	(45.20 ± 3.48) × 10 ⁻³ a	4.66 ± 0.30 b
	1	(42.22 ± 2.67) × 10 ⁻³ a	4.84 ± 0.27 b
	2	(42.24 ± 4.24) × 10 ⁻³ a	3.56 ± 0.34 a
叶酸	对照	0.107 ± 0.019 a	3.76 ± 0.35 a
	1	0.099 ± 0.015 a	3.67 ± 0.41 a
	2	0.493 ± 0.023 b	3.87 ± 0.48 a

注: 数据为 3 次重复的平均值 ± 标准偏差, 不同字母代表 0.05 水平的差异显著。

3.2. 锌、叶酸在培养盒培养下蝉花子实体中的富集结果

不同浓度处理下的锌、叶酸通过直接添加到培养盒固体培养基中, 在蝉花子实体中的富集效果如表 2 所示。

从表 2 分析, 随着培养基中锌的添加量上升, 培养得到的蝉花子实体中的锌元素含量也随之上升。从处理 3 (0.9%) 开始, 相邻处理之间没有显著性差异, 上升的趋势减缓。并且子实体生物量在处理 5 的条件下(1.5%), 显著降低, 蝉花子实体的生长受到抑制。因此, 锌元素最为合适的添加比例是 0.9%, 此时蝉花子实体的锌元素含量为 17.5 ± 1.25 mg/100g, 高于锌的 NRV 值 15 mg/100g。

同样, 如表 2 所示, 随着培养基中叶酸的添加比例上升, 培养得到的蝉花子实体中的叶酸含量也同时升高。叶酸在蝉花子实体中的含量上升幅度没有锌元素含量上升幅度大。处理 1 (0.3%) 与处理 2 (0.6%) 及对照组都没有显著变化, 处理 2 与对照组有显著变化, 但差异不大, 处理 4 (1.2%) 与前面几个处理有

非常显著的差异，但处理 5 (1.5%)与处理 4 又没有显著变化。再分析各个处理的蝉花子实体生物量，从高到低，我们发现从处理 2 开始，生物量出现显著降低，处理 3 (0.9%)与处理 4 与处理 2 保持相同的显著差异水平，而处理 5 相比处理 2、3、4，蝉花的子实体生物量又一次显著降低。综合分析，我们选择了叶酸的最佳添加比例为 1.2%，此时蝉花子实体生物量相对降低不大，且叶酸含量较高，达到 0.54 ± 0.04 mg/100g，高于叶酸的 NRV 值 0.4 mg/100g。

Table 2. Enrichment effect of Cicada flower fruiting body on different concentrations Zinc and folic acid
表 2. 蝉花子实体对不同浓度的锌与叶酸的富集效果

微量元素	处理	含量(mg/100g)	子实体生物量(g)
锌	对照	3.32 ± 0.52 a	87.41 ± 2.56 b
	1	7.62 ± 1.42 b	85.25 ± 1.98 b
	2	11.25 ± 1.78 c	85.10 ± 2.34 b
	3	17.5 ± 1.25 d	85.10 ± 1.76 b
	4	19.6 ± 1.43 de	86.11 ± 2.41 b
	5	21.3 ± 1.65 e	82.08 ± 1.53 a
叶酸	对照	0.32 ± 0.05 a	96.48 ± 2.43 c
	1	0.36 ± 0.08 ab	99.36 ± 3.12 c
	2	0.41 ± 0.03 b	91.01 ± 1.97 b
	3	0.44 ± 0.05 b	90.42 ± 2.35 b
	4	0.54 ± 0.06 c	89.83 ± 2.04 b
	5	0.58 ± 0.04 c	84.53 ± 2.65 a

注：同表 1。

4. 讨论

食用菌对锌的富集在国内有很多研究，而在维生素富集方面则研究较少。早在上个世纪，魏华等[3]在筛选出的金针菇菌株 WJ 的培养中添加 1000 mg/L 的 $ZnSO_4$ ，得到有机锌含量为 4.78 的菌丝体。王艳等[4]通过对各种食用菌筛选，选出富锌能力最强的羊肚菌进行液体发酵，得到在 600 mg/L 富集浓度下，其富集锌的有机化程度为 37.71%，总富锌率可到 23.20%。锌在人体内无法合成，必须通过食物获取。锌是众多酶的激活剂及其组成成分，能够协助葡萄糖在细胞膜上进行转运。一旦缺锌，会出现生长迟缓、发育不良等现象，孕妇缺锌甚至会出现胎儿畸形[5]。

叶酸，也叫维生素 M、维生素 B9，是一组化学结构相似、生化特征相近的化合物的统称，由蝶啶、对氨基苯甲酸和 1 个或多个谷氨酸结合而成[6]。叶酸缺乏将导致畸形儿发生率升高、巨红细胞贫血，引起心血管、神经系统、消化系统等多种疾病[7]。

本研究发现，蝉花子实体对锌、锰、叶酸具有一定的富集效果，而对叶黄素、维生素 D3、 β -胡萝卜素则没有明显的富集效果。在罐头瓶固体培养中，0.25%的添加量内，锌、叶酸的对蝉花子实体的生长没有产生影响，而锰的添加则会抑制蝉花子实体的生长。

在培养盒固体培养中，蝉花子实体对锌、叶酸的富集作用随着其添加浓度的升高而增加，增加趋势先上升再下降。锌元素最合适添加比例为 0.9%，此时蝉花子实体锌元素含量 17.5 ± 1.25 mg/100g，高于锌的 NRV 值，并且不影响蝉花子实体的生长。叶酸的最合适添加比例为 1.2%，此时蝉花子实体叶酸含量 0.54 ± 0.04 mg/100g，高于叶酸的 NRV 值，且不影响蝉花子实体的生长。

相较于其他文献的液体发酵中食用菌富集锌所添加的微量元素比例,直接在固体发酵的培养基中添加锌元素所需要的浓度更高。从食用菌富集的机理看,金属离子可以通过被动运输穿过质膜,进入到菌丝体中。同时,金属离子也可以通过主动运输,依靠于相应的金属离子蛋白质载体结合,转移到细胞内。食用菌中存在大量这种蛋白质,统称为金属硫蛋白,通过巯基与金属离子结合,降低其活性与毒害作用[8]。

叶酸同样可以通过主动运输与被动运输吸收到食用菌菌丝体中,目前国内对叶酸富集的研究主要为在培养基中添加富含叶酸的原料而不是直接添加叶酸。程俊文等[9]通过桑黄、接种于添加有富含叶酸的胡萝卜、大麦的固体培养基中,将制得的培养物和甘蓝酶解物为原料对灵芝与乳酸菌先后进行液体发酵,最后得到了富含叶酸的发酵产物。

蝉花子实体在抗肾衰竭[10]、抗疲劳[11]、免疫调节[12]等功能方面都有大量研究报道。本研究筛选了几种能够富集于蝉花子实体中的微量营养素,通过直接将微量营养素原料添加于蝉花固体培养基中,对比其他研究的食用菌富集方法,大大简化了操作流程,拓宽了蝉花子实体的应用领域。

参考文献

- [1] 董彩虹,李文佳,李增智,等.我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言[J].菌物学报,2016,35(1):1-15.
- [2] 王夔.生命科学中的微量元素(第二版)[M].北京:中国计量出版社,1996:34-35.
- [3] 魏华,谢俊杰.金针菇富锌培养及产品研制[J].南昌大学学报(理科版),1995,19(4):385-389+394.
- [4] 王艳,江洁,金李玲,等.羊肚菌菌丝体液体培养富锌条件的优化[J].食品工业科技,2013,34(3):281-283+287.
- [5] 陈必链,黄键.我国富锌和富硒功能食品研究现状[J].食品研究与开发,1999(1):33-37.
- [6] 郝玲,唐仪,李竹.叶酸检测方法研究进展[J].中华预防医学杂志,1999,33(3):177.
- [7] 杨玉柱,王储炎,焦必宁.叶酸的研究进展[J].农产品加工(下),2006(5),31-35+39.
- [8] 赵婧,江洁.食用菌富集微量元素的研究进展[J].食品工业科技,2015,36(17):396-399.
- [9] 程俊文,贺亮,魏海龙,等.一种富含芪类化合物食药真菌发酵产物的制备方法[P].中国专利,CN108103113A.2018-06-01.
- [10] 邵佳蔚,于瑞莲,喻振,等.人工蝉花子实体对庆大霉素所致小鼠急性肾衰竭的影响及机制研究[J].中国药房,2018,29(19):2648-2652.
- [11] 孙长胜,陈桃宝,龙文君,等.蝉花子实体抗疲劳作用研究[J].药物评价研究,2020,43(4):642-647.
- [12] 杜金沙,吕中明,王民生.蝉花子实体对小鼠免疫功能的影响[J].江苏医药,2013,39(18):2117-2119.