

富锌培养对转金属硫蛋白侧耳菌丝生长和锌有机化程度的影响

生吉萍^{1,2}, 申琳^{1*}, 茹炳根²

1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083
2. 北京大学生命科学学院, 北京 100857

摘要 金属硫蛋白(MT)是一种低分子量、高巯基含量、能结合金属离子的功能性蛋白,将MT基因转入蘑菇,可以获得具有重要生理功能的蘑菇以便为保健食品生产提供原料,但对MT蘑菇的富锌能力缺乏系统研究。文章报道了用电感耦合等离子体-原子发射光谱(ICP-AES)法对富锌培养中的MT侧耳(*Pleurotus ostreatus*)菌丝和未转化的侧耳菌丝(对照)锌含量进行了测定,分析了MT侧耳菌丝的耐锌能力、富锌特性和锌有机化程度。结果发现转MT侧耳在锌浓度0~1.2 mmol·L⁻¹范围内菌丝生长速度最高,超过1.6 mmol·L⁻¹时菌丝生长开始受到抑制;转MT侧耳有较强的富锌能力,当培养液中锌质量浓度为0.6~1.2 mmol·L⁻¹时,菌丝体中锌含量在2.56~27.49 mg·kg⁻¹之间,与锌添加量呈正相关,且此浓度范围内菌丝体的生长情况良好;在锌浓度为0.6 mmol·L⁻¹的液体培养基中,第7 d转MT侧耳菌丝锌有机化程度为88.7%,比对照(82.1%)显著提高($P=0.05$),说明转入侧耳的MT有利于无机锌向有机锌转化;对在不同浓度下培养7 d的两种菌丝测定发现,其有机化程度差异不显著,说明锌与菌体内的物质已经紧密结合形成有机锌复合物,锌浓度对锌的吸收量有影响但对锌的有机化程度影响不大。

关键词 金属硫蛋白; 锌; 蘑菇; 转基因食品; 保健食品; 电感耦合等离子体-原子发射光谱

中图分类号: S567.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0812-03

引言

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量、高巯基含量、能结合金属离子的性能独特的蛋白质,具有多种生理功能^[1,2]。MT对Cu和Zn等金属离子具有较强的亲和力,因而MT可充当这些金属的贮存蛋白^[3]。锌是人体不可缺少的微量元素,是许多金属酶的组成成分或酶的激活因子,它参与细胞基因的转录和复制,促进激素与受体的特异结合,能促进生长发育与组织再生,增强智力发育,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保健功能^[4-6]。但目前食物中强化锌的方法主要是添加锌的无机盐,不仅吸收率低而且具有一定的毒性^[7],因此,有必要研究更适宜的补锌方法。

侧耳(*Pleurotus ostreatus*)是目前食用广泛的可食性真菌,它除了含有丰富的营养物质之外还含有多种药用成分,许多国家已将其作为传统保健食品^[8]。我们实验室曾经以侧耳为材料,将金属硫蛋白基因转入侧耳细胞,得到MT高效

表达的菌株^[9]。本研究以此菌株和未转化菌株为材料,用ICP-AES法精确地测定了锌的含量,研究转MT侧耳的耐锌能力和富锌特性、锌的有机化程度,为进一步利用转MT侧耳研制安全、补锌效率高的优质保健食品奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

转MT侧耳,未转化的野生型(Wild type)侧耳(*Pleurotus ostreatus*)作为对照,均由本实验室提供。

1.2 培养方法

固体培养: 分别配制不同锌质量浓度的PDA培养基平板由马铃薯20 g·L⁻¹,葡萄糖2 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 0.2 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹,VB₁ 10 mg·L⁻¹,琼脂以及ZnSO₄配制,接种于平皿进行平面培养,于25℃下培养7 d,以菌落半径作为菌丝生长速度指标。

液体培养: 将已活化的斜面菌种切割成黄豆大小的菌丝块,接种于液体培养基(成分同固体培养基,不加琼脂),500

收稿日期: 2007-11-02, 修订日期: 2008-02-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671471, 30571291)资助

作者简介: 生吉萍,女,1967年生,中国农业大学食品科学与营养工程学院副教授

*通讯联系人 e-mail: pingshen@cau.edu.cn, shen5000@gmail.com

mL 三角瓶培养液 200 mL, 25 °C 下 160 r · min⁻¹ 培养 7 d。

1.3 锌含量的测定

采用 ICP-AES(电感耦合等离子体-原子发射光谱)法测定。分析仪器为 PeKir-Elmer 公司的 5300DV 设备。样品测定采用湿法消化^[10]。仪器的主要工作参数为功率 1 300 W, 冷却气流量(Ar) 15.0 L · min⁻¹, 辅助气流量(Ar) 0.02 L · min⁻¹, 载气流量(Ar) 0.08 L · min⁻¹, 蠕动泵流量 1.5 mL · min⁻¹, 观测方式为轴向观测, 测定波长 213.86 nm。

1.4 侧耳锌有机化程度分析

采用持续透析法^[11], 将 0.5 g 菌丝体在纯水中连续透析, 直至用茚三酮法检查透析液中无氨基酸为止, 测定菌丝体中含锌量。

1.5 菌丝干重测定

取 100 mL 发酵液, 3 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 经自来水洗涤多次后, 将菌丝体在 105 °C 烘干至恒重, 分析天平称重。

2 结果与分析

2.1 转 MT 侧耳和普通侧耳在平板培养基中的耐锌能力

将两种在含不同质量浓度的锌的固体平板上培养, 考察菌丝生长情况(图 1), 发现转 MT 侧耳在含锌 0 ~ 2.2 mmol · L⁻¹ 的培养基上均能生长, 其中普通侧耳在 0 ~ 0.6 mmol · L⁻¹ 范围内菌丝生长速度较高, 锌浓度超过 1.0 mmol · L⁻¹ 时菌丝生长开始受到抑制。而转 MT 侧耳在 0 ~ 1.2 mmol · L⁻¹ 范围内菌丝生长速度最高, 锌浓度超过 1.6 mmol · L⁻¹ 时菌丝生长开始受到抑制。

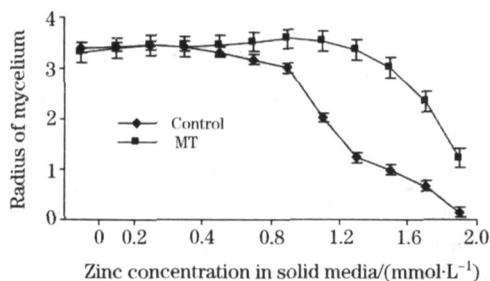


Fig 1 Different growth status of transgenic MT and wild type mycelia at different zinc concentration

2.2 转 MT 侧耳和普通侧耳在液体培养基中的富锌能力

转 MT 侧耳有较强的富锌能力(图 2), 培养液中锌质量浓度为 0.6 ~ 1.2 mmol · L⁻¹ 时, 菌丝体中锌的质量浓度在 2.56 ~ 27.49 mg · kg⁻¹ 之间, 与锌添加量呈正相关, 且此浓度范围内菌丝体的生长情况良好。普通侧耳菌丝体中锌的质量浓度比转 MT 菌丝低, 差异呈显著水平($P = 0.05$)。

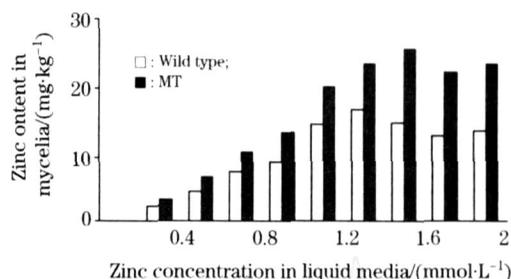


Fig 2 Zinc enriched ability under submerged culture of transgenic MT mycelia and wild type mycelia

2.3 锌有机化程度分析

采用持续透析法处理液体培养的转 MT 侧耳和野生型侧耳菌丝, 测定透析液中的锌含量, 待透析液中的锌含量不再变化时, 确定为透析的终点时间, 然后测定液体培养的转 MT 侧耳和普通侧耳菌丝中的锌含量, 计算出锌在菌丝体内的有机化程度。在锌浓度为 0.6 mmol · L⁻¹ 的培养液中培养, 第 5d MT 侧耳菌丝锌的有机化程度为 82.1%, 野生型的为 78.9%, 差异显著($P = 0.05$); 第 7d 转 MT 侧耳菌丝锌有机化程度为 88.7%, 比野生型(82.1%)显著提高($P = 0.01$), 说明转入侧耳的 MT 有利于无机锌向有机锌转化。

对在不同浓度下培养 7 d 的两种菌丝测定发现, 其有机化程度差异不显著, 说明锌与菌体内的物质已经紧密结合形成有机锌复合物, 锌浓度对锌的吸收量有影响但对锌的有机化程度影响不大(图 3)。

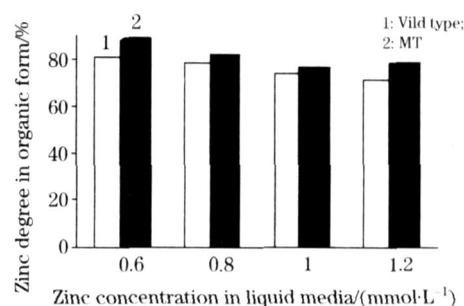


Fig 3 Degree of zinc organic form at different zinc concentration in transgenic MT and wild type mycelia

3 讨论

微量元素与人体健康地关系研究日渐引起人们的重视^[12]。通过富锌培养研究表明, 转 MT 侧耳菌丝具有较好的生长状态、较强的锌耐受力和富锌转化能力, 培养基中添加 1.6 mmol · L⁻¹ 的硫酸锌, 菌丝体富集转化状态最佳。本研究可作为富锌侧耳开发的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sheng Jiping, Shen Lin, Yuan Yan, et al. Hort Science, 2002, 37(3) : 710.
- [2] Kagi J H R, Schaffer A. Biochemistry, 1988, 27(23) : 8509.
- [3] Vasak M. Methods in Enzymology, 1991, 205 : 452.
- [4] WANG Ying, XIN Shi-gang (王莹, 辛士刚). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1) : 226.
- [5] LI Hai-long, WANG Li-zhen, WANG Wu-yi (李海龙, 王丽珍, 王五一). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8) : 1344.
- [6] HAN Li-xin, LI Ran (韩立新, 李冉). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(2) : 304.
- [7] LIU Kai-lang, SHENG Ji-ping, SHEN Lin, et al (刘开朗, 生吉萍, 申琳, 等). Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (Supplement) (中国食品学报), 2003, (增刊) : 448.
- [8] Takeshi T, Kawagish H, Hiromichi O. Journal of Nutrition, 2001, 131(4) : 1409.
- [9] Zhang Jing, Nie Siwei, Shan Long, Ru Binggen. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(12) : 1445.
- [10] HOU Man-ling (侯曼玲). Food Analysis(食品分析). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2004. 23, 151.
- [11] SUN Xi-wen, LI Qi-geng (孙希雯, 李奇庚). Acta Microbiologica Sinica(微生物学报), 1997, 37(1) : 40.
- [12] WANG Yuan-zhong, LI Shu-bin, GUO Hua-chun, et al (王元忠, 李淑斌, 郭华春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(9) : 1854.

Effect of Cultivation in Zinc Media on the Growth of and the Degree of Zinc in Organic Form in Transgenic Metallothionein Mushroom

SHENG Ji-ping^{1,2}, SHEN Lin^{1*}, RU Bing-gen²

1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100857, China

Abstract Metallothioneins (MTs) are a family of low molecular weight, cysteine-rich and metal-binding functional proteins. Transgenic MT mushroom can be used as functional food additives, but its zinc-enriching ability has not been studied systematically until now. The zinc contents in mycelia of transgenic MT mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and wild type mushroom mycelia cultivated in different zinc concentration media were analyzed by ICP-OES. The growth status, zinc-enriching ability and degree of zinc in organic form (DZOF) were also analyzed. Results showed that MT mushroom mycelia grew rapidly, but the growth was inhibited when the zinc content in solid media was higher than $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. MT mushroom mycelia could enrich more zinc than that of wild type, and the zinc content in MT mushroom mycelia could be $2.56\text{--}27.49 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ when it was cultivated in a liquid media with $0.6\text{--}1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zinc. DZOF of MT mushroom mycelia in a liquid media with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zinc at 7 d was significantly higher (88.7%) than that in the wild type (82.1%, $P = 0.05$), but there was no significant difference in DZOF when the MT mushroom mycelia was cultivated in a liquid media with different zinc content at 7 d.

Keywords Metallothionein; Zinc; Mushroom; Transgenic food; Functional food; ICP-AES

(Received Nov. 2, 2007; accepted Feb. 12, 2008)

*Corresponding author