

## 有机酸和氨基酸对双孢蘑菇 2796 菌丝生长的影响

刘爱民,陈金凤,张金金,方启,王敏,查琴

(安徽师范大学生命科学学院生态环境与生态安全安徽省高校重点实验室,重要生物资源的保护和利用研究安徽省重点实验室,安徽芜湖 241000)

**摘要:**为了探讨有机酸和氨基酸对双孢蘑菇 2796 菌丝生长的影响情况;此实验利用固体平板和液体摇瓶培养的方法,研究了柠檬酸、酒石酸、琥珀酸 3 种有机酸和丙氨酸、酪氨酸、精氨酸 3 种氨基酸在不同浓度下对双孢蘑菇菌丝生长的影响。通过测定各处理组的菌丝菌落直径、胞外蛋白质量比、菌丝干重、胞内多糖、过氧化物酶活性和还原糖质量比等生长参数;结果发现外源加入 0.04% 的柠檬酸最有利于双孢蘑菇的菌丝生长,可产生更多的菌丝胞内多糖、过氧化物酶、胞外蛋白。琥珀酸、精氨酸和酪氨酸也能够促进双孢蘑菇的生长,其中琥珀酸组的菌丝干重最高,比对照组增加了 131%;精氨酸组的胞外蛋白质量比最高,比对照组增加了 151%;柠檬酸组的胞内多糖质量比和过氧化物酶活性的值最高,分别比对照增加了 21% 和 146%;添加酸组的还原糖质量比均比对照低。但添加过高浓度的有机酸和氨基酸,则抑制双孢蘑菇菌丝的生长。

**关键词:**双孢蘑菇;菌丝;有机酸;氨基酸;发酵指标

中图分类号:Q93

文献标志码:A

论文编号:2009-1845

### Effect of Organic Acid and Amino Acid on the Mycelial Growth of *Agaricus Bisporus* 2796

Liu Aimin, Chen Jinfeng, Zhang Jinjin, Fang Qi, Wang Min, Zha Qin

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Provincial Key Laboratories of Biotic Environment and Ecological Safety and Conservation and Utilization of Biological Resource in Anhui Wuhu, Wuhu Anhui 241000)

**Abstract:** The experiment objective was to study the effect of organic acid and amino acid on the mycelial growth of *Agaricus Bisporus* 2796; In the article, the effects of three kinds of organic acid from citric acid, tartaric acid and succinic acid and three kinds of amino acid from alanine, tyrosine and arginine in different concentration on the growth of *Agaricus bisporus* were studied by the solid and liquid culture methods. The growth parameters of the colony diameter, extracellular protein content, mycelium dry weight, intracellular polysaccharide content, peroxidase activity and reducing sugar content were analyzed in treat groups. The results showed that the growth of *Agaricus bisporus* could be mostly promoted by adding 0.04% citric acid. It would produce higher intracellular polysaccharide content, peroxidase activity and extracellular protein content. The mycelial growth could be also promoted by adding succinic acid, arginine and tyrosine. Compared to the control in the medium, the mycelium dry weight was highest by adding succinic acid, it increased 131%; the extracellular protein content was highest by adding arginine, it increased 151%; intracellular polysaccharide content and peroxidase activity of *Agaricus bisporus* were the highest value by adding citric acid, they increased 21% and 146% respectively. The reducing sugar content was declined by adding acids. But higher concentration organic acid and amino acid would inhibit the growth of *Agaricus bisporus*.

**Key words:** *Agaricus bisporus*; mycelia; organic acid; amino acid; fermentation indexes

**基金项目:**国家农业科技华东(江苏)创新中心——农业废弃物资源化工程技术研究中心开放课题(200801);安徽师范大学大学生创新性实验计划项目资助(cxsy09010)。

**第一作者简介:**刘爱民,女,1968年出生,汉族,安徽太和人,副教授,博士,专业方向为微生物发酵与酶工程。通信地址:241000 安徽芜湖北京东路1号安徽师范大学生命科学学院, E-mail: amlu9393@163.com。

**收稿日期:**2009-09-10, **修回日期:**2009-09-21。

## 0 引言

双孢蘑菇学名 *Agaricus bisporus* Imbach, 英文名为 Button mushroom, White mushroom 或 mushroom, 因其担子上通常仅着生2个担孢子而得名, 在分类上属真菌门担子菌纲无隔担子菌亚纲伞菌目伞菌科蘑菇属<sup>[1]</sup>。双孢蘑菇味道鲜美, 营养丰富, 具有极高的经济价值和潜在的药用价值。从其发酵培养液中所提取的蘑菇多糖, 具有一定的抗癌抗病毒活性, 可抑制肿瘤的发生。双孢蘑菇具有抗溃疡、抗炎症、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、保肝护肝、降血糖、降血脂、降血压、免疫调理、镇静等作用, 经常食用, 能增强机体抵抗力, 调节人体代谢机能, 预防和治疗高血压、冠心病、肝炎和白细胞减少等多种疾病, 是中国目前出口量最大、创汇最高的一种食用真菌<sup>[2-5]</sup>。双孢蘑菇生长所需的碳源、氮源养分和其他微量元素, 只能从培养料中吸收, 所以配制好培养料是双孢菇高产的物质基础。

有机酸(Organic acid)是具有羧基(-COOH)的有机化合物的总称。这类化合物的用途广泛, 在日常生活中食用的有机酸一般是作为食品添加剂, 主要用于酸味剂、调味料、pH调整剂等<sup>[6]</sup>。柠檬酸是最一般的酸味剂, 广泛存在于水果和蔬菜中, 特别含于柑桔类中。酒石酸是从葡萄中发现的酸, 在葡萄中质量比高, 一种较主要的食品酸化剂。琥珀酸, 是从太古时树枝被埋后, 煤化变质, 而成化石的琥珀中发现的, 较多含于贝类中, 其钠盐是鲜味的主要成分。所谓氨基酸是指同一分子内含有氨基(-NH<sub>2</sub>)和羧基(-COOH)的化合物之总称。丙氨酸可用于合成VB6的原料和改良食品香气, 使食品烘烤后具有蜂蜜般香味; 酪氨酸为半必需氨基酸, 可减少蛋氨酸及苯丙氨酸的需求量; 精氨酸对治疗高氨血症、肝功能障碍等疾病颇有效果<sup>[6]</sup>。很多科研人员已经研究了有机酸对动物的作用, 把有机酸作为猪、鸡等的饲料添加剂, 这样能提高饲料的酸度, 同时具有杀菌、抑菌、防止饲料霉变作用, 可促进对铁、铜等微量元素的吸收利用, 从而促进生长<sup>[7-10]</sup>。有机酸对动物生长影响方面的研究比较多, 但就有机酸和氨基酸对食用菌生长影响的研究却很少。因此, 此文初步研究了有机酸和氨基酸对双孢蘑菇2796菌丝生长的影响, 为今后开发双孢蘑菇液体深层发酵有价值的菌丝生产应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验时间、地点

此试验于2008年10月至2009年5月间在安徽师范大学生命科学学院实验室内进行。

### 1.2 试验材料

1.2.1 供试菌种 双孢蘑菇2796由安徽芜湖市食用菌

研究所赠送。

1.2.2 供试有机酸和氨基酸 供试有机酸: 柠檬酸(蚌埠化学试剂厂)、琥珀酸(中国医药集团上海化学试剂公司)、酒石酸(无锡市亚威化工有限公司), 皆为分析纯

供试氨基酸: 精氨酸、酪氨酸、丙氨酸(上海化学试剂分装厂)

1.2.3 培养基 固体培养基: 马铃薯200 g, 葡萄糖10 g, 麦芽糖10 g, 磷酸二氢钾2 g, 硫酸镁1 g, 琼脂20 g, 水1000 mL<sup>[11]</sup>。

在上述基础培养基中加入琥珀酸、柠檬酸、酒石酸、酪氨酸、丙氨酸、精氨酸6种酸, 分别配制为0.04%、0.12%、0.2%和0.28% 4种浓度梯度。对照组不加酸, 各处理组重复3次。

液体培养基: 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 磷酸二氢钾1 g, 硫酸镁0.5 g, 酵母粉1 g, 水1000 mL<sup>[11]</sup>。

在上述基础培养基中加入琥珀酸、柠檬酸、酒石酸、酪氨酸、丙氨酸、精氨酸六种酸, 配制最终浓度为0.04%, 对照组不加酸。各处理组均设3个重复。

### 1.3 试验方法

1.3.1 在固体培养基上菌丝长势的测定 固体培养基配制灭菌后, 分别倒入直径9cm的培养皿中, 每皿20 mL, 制成平板, 于平板中央接一块0.6 cm大小的菌种块, 后置于24℃恒温培养箱中倒置培养6天, 每天定时观察菌丝长势, 记录菌落直径和菌丝密度。每个处理重复3次。

1.3.2 液体培养中菌丝生长各发酵指标的测定 取0.6 cm大小的菌块置于装有液体培养基的三角瓶中, 于24℃静置培养1天, 然后在24℃、130 r/min摇床上振荡培养5天后进行量的测定。

菌丝体干重: 将经过6天培养好的发酵液过60目筛网, 用蒸馏水洗涤3次, 收集菌丝于烘箱中65℃烘干至恒重, 电子天平称量菌丝干重, 求3个重复的均值。

胞内多糖质量比的测定: 苯酚—硫酸分光光度计法<sup>[12]</sup>。

胞外蛋白质量比的测定: 双缩脲法<sup>[13]</sup>测定。用酪蛋白粉末配制标准蛋白质溶液。取1 mL经适当稀释的粗酶液加4 mL双缩脲试剂, 摇匀, 于540 nm处测定OD值, 以加蒸馏水的为对照。

胞外粗酶液样品的制备: 培养6天后将每组处理的三角瓶中的培养基混合取样, 在4℃、4000r/min离心机离心10 min, 取上清液即为胞外粗酶液, 于4℃保存备用。

过氧化物酶活性的测定: 取反应混合液4 mL (0.05M pH6.0磷酸盐缓冲液50 mL, 加入0.028 mL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 愈创木酚 0.019 mL)与 1 mL 粗酶液混合, 28 ℃ 的水浴保温 30 min 后于 470 nm 处测定 OD 值。酶活力

以每毫升样品与底物反应 30 min 内改变 0.01 个光密度值为一个酶活力单位(U)。

表 1 不同浓度的酸对双孢蘑菇菌丝生长的影响

菌落直径(cm) 浓度	有机酸			氨基酸		
	柠檬酸	琥珀酸	酒石酸	精氨酸	酪氨酸	丙氨酸
0.04%	8.3(+++)	8.4(+++)	8.2(+++)	8.2(+++)	8.1(+++)	8.2(+++)
0.12%	8.1(+++)	8.2(+++)	-	7.9(++)	7.6(+)	8.2(+++)
0.2%	7.3(+)	7.4(+)	-	7.5(+)	7.5(+)	7.7(++)
0.28%	-	-	-	5.8(+)	7.3(+)	7.5(+)
对照	8.0					

注:+++表示菌丝生长很浓密,促进菌丝生长; ++表示菌丝生长较浓密,促进菌丝生长; +表示菌丝生长较浓密; -表示抑制菌丝生长

还原糖质量比的测定:斐林快速定糖法<sup>[1]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 固体培养基中不同酸在不同浓度下对双孢蘑菇菌丝生长的影响

由表 1 中可以看出,不同有机酸在同一浓度及不同浓度下,对双孢蘑菇菌丝生长的影响不同。在所测试浓度范围内,基本上是低浓度有机酸促进菌丝生长,高浓度有机酸抑制菌丝生长。试验中所选用的 3 种有机酸和氨基酸在 0.04% 浓度以下均能促进菌丝生长,柠檬酸、琥珀酸、精氨酸、丙氨酸促进效果较好,菌丝洁白旺盛,生长势很强,随着添加有机酸浓度的增加,菌丝生长反而受到了抑制。实验表明在双孢蘑菇培养基中添加 0.04% 柠檬酸、琥珀酸、酒石酸、精氨酸、丙氨酸有利于双孢蘑菇菌丝的生长。

### 2.2 不同酸对双孢蘑菇菌丝干重的影响

在添加 0.04% 同一浓度的不同有机酸的液体培养基中,双孢蘑菇菌丝在发酵培养 6 天时获得的菌丝体的生物量不同。由图 1 可见,双孢蘑菇在处理组的培养基中得到的菌丝重量均高于对照组,有机酸中琥珀酸最能促进菌丝生长,比对照增加了 131%,其次是柠檬酸,比对照增加了 65%,添加酒石酸组的菌丝干重增加的较少。氨基酸中精氨酸最能促进菌丝生长,比对照组增加了 55.9%,其次是酪氨酸,比对照组增加了 29.0%。这与表 1 中固体培养的结果相一致。碳氮源对于双孢蘑菇的生长发育是不可缺少的,它们的主要作用是合成各种关键的细胞组分。作为碳源分解中间代谢物有机酸可直接被机体利用促进菌丝生长;作为氮源的物质主要以较易吸收的蛋白质降解产物形式存

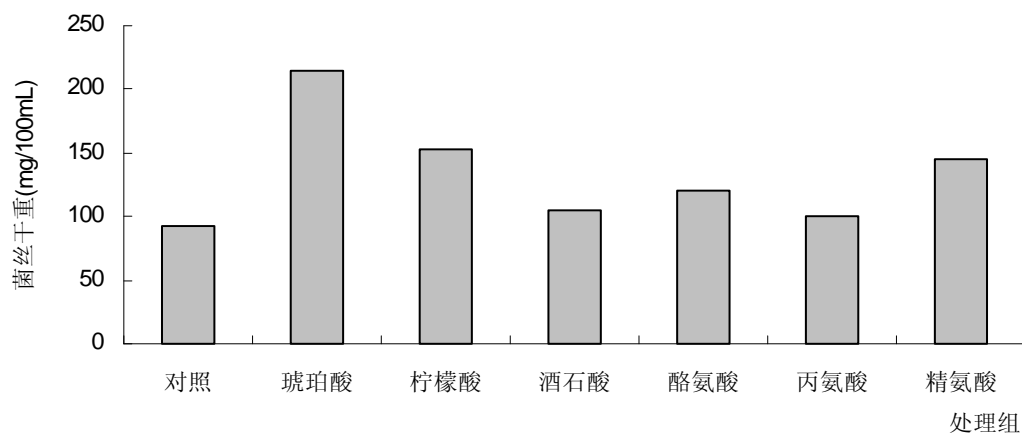


图 1 不同酸对菌丝干重的影响

在,而降解产物尤其是氨基酸可通过转氨作用直接被机体利用从而促进菌丝生长。

### 2.3 不同酸对双孢蘑菇胞内多糖质量比的影响

多糖是一种极具发展前途的成分,大量研究已表明双孢蘑菇多糖不仅能抑制小鼠 S-180 实体肿瘤的生长,而且能干扰体外培养的人肝癌 SMMC-7721 癌细

胞增殖,具有较好的抗肿瘤活性,还具有抗肝炎等作用<sup>[5]</sup>。由图 2 可知,供试 6 种酸中加入酒石酸组得到的胞内多糖质量比略低于对照组,琥珀酸组、柠檬酸、精氨酸、酪氨酸和丙氨酸组胞内多糖质量比略高于对照组。加入柠檬酸的培养液菌丝产生的胞内多糖最多(7.61 mg/100mL),比对照增加了 21%。结合图 1

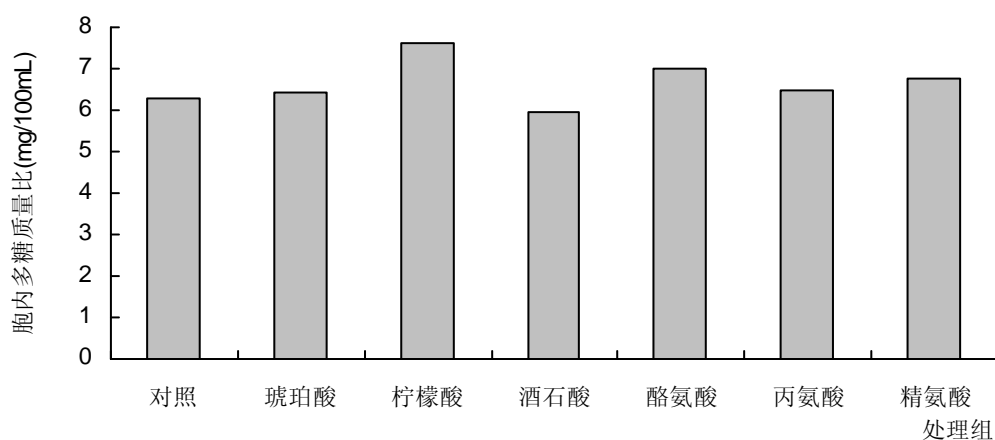


图2 不同酸对胞内多糖质量比的影响

中不同有机酸对菌丝干重的影响,表明胞内多糖质量比的高低与菌丝干重的量之间没有相关性。

#### 2.4 不同酸对双孢蘑菇胞外蛋白质质量比的影响

胞外蛋白质是菌丝体在生长过程中产生并分泌到培养液中的各种水解酶,如淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、木质素降解酶等。双孢蘑菇是草腐真菌,以植物纤维为主要营养源和能源,这些物质主要是依赖分泌胞外酶才能转化成营养物质为菌丝利用。由图3可知,对照组中胞外蛋白质质量比2.56 mg/mL,精氨酸组胞外蛋

白质量比最高,是对照组的151%。其余组的胞外蛋白质质量比则低。

#### 2.5 不同酸对双孢蘑菇过氧化物酶活性的影响

过氧化物酶是真菌体内一种重要酶类之一,它是真菌体内活性氧的清除剂之一,也与体内代谢及木质素降解相关。从图4可以看出,对照组的过氧化物酶活性为25.2U,有机酸中柠檬酸组的过氧化物酶活性最高,比对照组增加了146%,其次是酒石酸组、琥珀酸组。氨基酸中酪氨酸组的过氧化物酶活性最高,比对

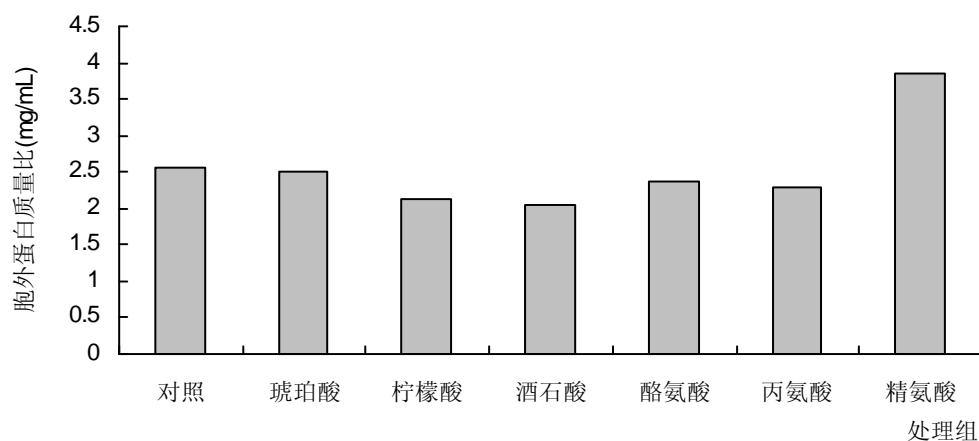


图3 不同有机酸对胞外蛋白质质量比的影响

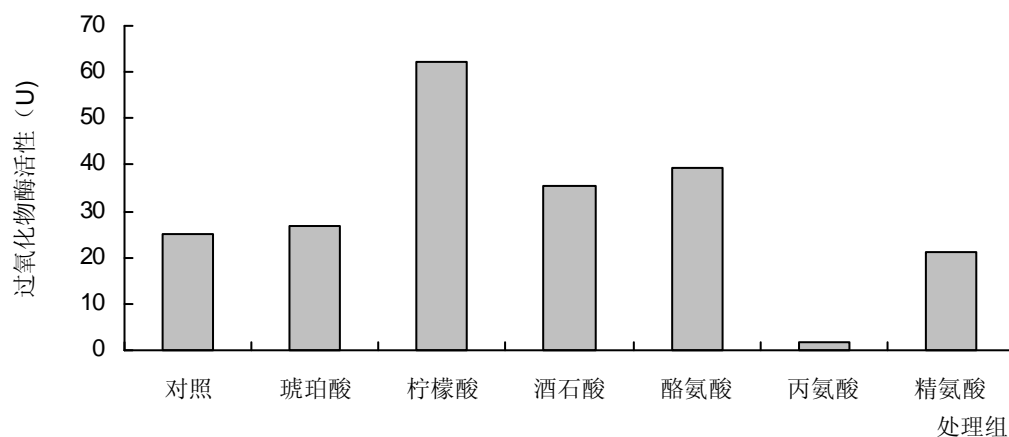


图4 不同有机酸对过氧化物酶活性的影响



照组增加了 55.6%，精氨酸和丙氨酸组低于对照组。

### 2.6 不同酸对双孢蘑菇还原糖质量比的影响

由图 5 可知，6 种酸组的还原糖质量比均比对照组

都低。说明添加酸的培养液中的大量营养物质被菌丝体吸收，转化成自身物质供生长发育所需，从而比对照组产生更多的菌丝生物量。

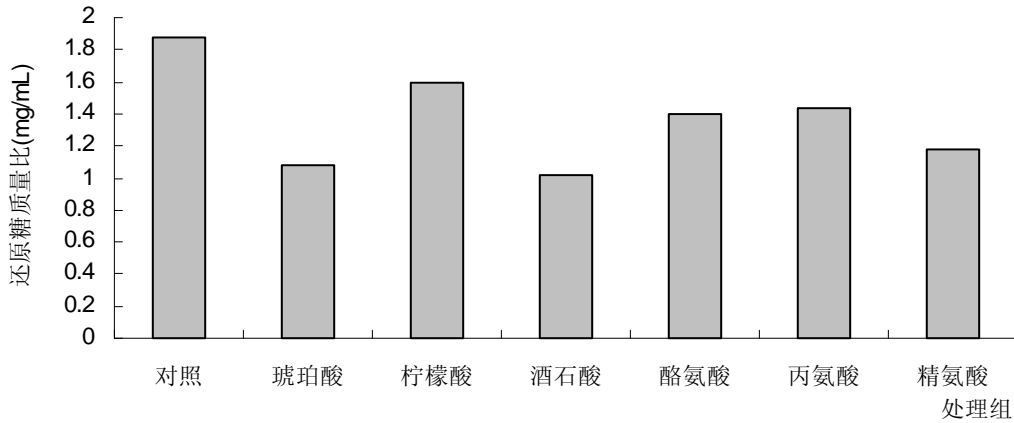


图 5 不同酸对还原糖质量比的影响

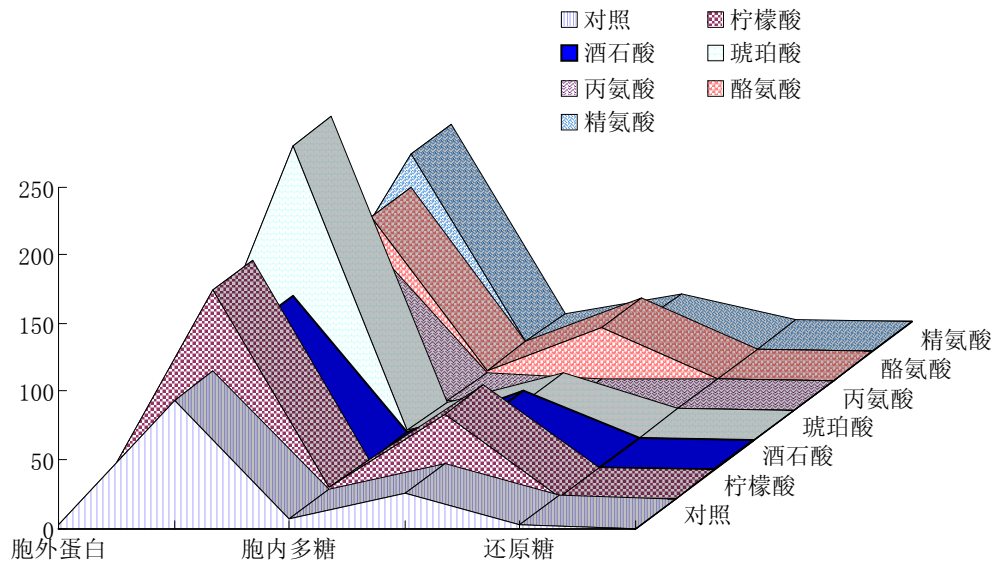


图 6 发酵指标的比较

### 2.7 液体培养基中不同酸对菌丝生长参数的综合分析

由图 6 发酵指标的综合比较表明，双孢蘑菇菌丝在添加有 0.04% 柠檬酸的培养基中生长较好，有利于产生更多的菌丝胞内多糖、过氧化物酶、胞外蛋白。

### 3 结论与讨论

1) 在双孢蘑菇固体培养基中添加 0.04% 柠檬酸、琥珀酸、酒石酸、精氨酸、丙氨酸有利于双孢蘑菇菌丝的生长，但随着添加有机酸和氨基酸浓度的增加，过高的浓度将会抑制菌丝生长。

2) 在添加同一浓度 0.04% 的不同有机酸的液体培养基中，琥珀酸、柠檬酸、精氨酸和酪氨酸都能明显促进菌丝生长，菌丝干重比对照分别增加了 131%、65%、

55.9% 和 29.0%。

3) 各种酸对双孢蘑菇胞内多糖质量比的影响甚微，与对照组差别不大，加入柠檬酸的培养液中菌丝产生的胞内多糖最多为 7.61 mg/100mL，比对照增加了 21%。同时发现双孢蘑菇胞内多糖质量比的高低与菌丝干重的量之间没有必然的相关性。

4) 双孢蘑菇是草腐真菌，胞外蛋白质量比的增加有利于促进栽培料中菌丝的生长。添加精氨酸的培养液中菌丝产生的胞外蛋白质量比最高，比对照组增加了 151%；对照组的过氧化物酶活性为 25.2U，有机酸中添加柠檬酸组的过氧化物酶活性最高，比对照组增加了 146%；氨基酸中添加酪氨酸组的过氧化物酶活性

最高,比对照组增加了55.6%。

5) 添加6种酸组的还原糖质量比均比对照组都低,说明添加酸的培养液中的大量营养物质可被菌丝体吸收,转化成自身物质供生长发育所需,大大地降低还原糖。

发酵指标的综合比较表明,双孢蘑菇菌丝在添加有0.04%柠檬酸的培养基中生长较好,有利于产生更多的菌丝胞内多糖、过氧化物酶、胞外蛋白,可有效改善菌丝发酵液的品质。此实验结果为双孢蘑菇培养基改良和促进液体深层发酵产物的开发奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 吴素玲,孙晓明,王波,等.双孢蘑菇子实体营养成分分析[J].中国野生植物资源,2006,25(2):47-52.
- [2] 常海兰,殷凤.双孢蘑菇的抗氧化及对免疫功能影响的研究[J].山西医科大学学报,2003,4(34):122-123.
- [3] Wisor JP, Nishino S, Sora L, et al. Dopaminergic role in stimulant-induced waken fullness[J]. J Neurosci, 2001, 21 (5): 1787-1794.
- [4] 赵行文.双孢菇的营养价值及栽培技术[J].中国林副特产,2006,6(3):51-52.
- [5] 徐朝辉,姜世明,付培武.双孢蘑菇子实体多糖的提取及其对癌细胞的抑制[J].中国食用菌,1997,16(4):5-7.
- [6] 吴松刚.微生物工程[M].北京:科学出版社,2004,368-370.
- [7] 陈勇,甄莉.有机酸在饲料中的应用[J].中国饲料,2004,9:30-32.
- [8] 宁康健,吕锦芳,彭光明.柠檬酸对肉鸡生产性能及免疫功能影响的研究[J].饲料工业,1995,16(1):39-40.
- [9] 张文举,邓树蕴,张奇波,等.肉仔鸡日粮中添加柠檬酸的效果[J].畜牧兽医杂志,1994,4:10-11.
- [10] 化党领,杜君,刘世亮,等.施用有机酸对不同成熟度烤烟生理代谢和营养代谢的影响[J].干旱地区农业研究,2008,26(4):59-64.
- [11] 杨革.微生物学实验教程[M].北京:科学出版社,2004,119-123.
- [12] 杨梅,王丽雅,庄跃飞,等.杏鲍菇多糖的提取及其分离的研究[J].中国食用菌,2005,4(24):38-39.
- [13] 北京大学生物系生物化学教研室编[M].生物化学实验指导,1986: 71-72.