

美味牛肝菌(*Boletus edulis*)对镉(Ⅱ)的生物富集特性研究

李金城, 鲍长俊, 孙云, 庄永亮*, 孙丽平

(昆明理工大学云南省食品安全研究院, 云南昆明 650500)

摘要: 本文研究了美味牛肝菌液体发酵对不同浓度镉(Ⅱ)(Cd^{2+} , 0、16、32、48、64、80 mg/L)的生物富集特性。结果表明, Cd^{2+} 处理显著抑制了美味牛肝菌菌丝体的生长($p < 0.05$), 生长抑制率为 50% 的 Cd^{2+} 浓度为 56 mg/L。菌丝体对 Cd^{2+} 的生物富集量可高达 3335.7 mg/kg DW, 富集系数为 52.1 ($p < 0.05$)。菌丝体中可溶性总糖和多糖含量随 Cd^{2+} 浓度的升高呈现先上升后下降的趋势, Cd^{2+} 处理菌丝体中的多糖含量均高于无 Cd^{2+} 组 ($p < 0.05$); 菌丝体中可溶性蛋白含量随 Cd^{2+} 浓度的升高先降低后上升, 80 mg/L Cd^{2+} 处理组显著高于无 Cd^{2+} 组 ($p < 0.05$)。 Cd^{2+} 处理对菌体过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性呈现显著的“低促高抑”的影响趋势($p < 0.05$), 而过氧化物酶(POD)活性被显著抑制($p < 0.05$)。表明美味牛肝菌对 Cd^{2+} 具有很强的生物富集能力, 可能是菌体的特定成分如多糖、蛋白等协同抗氧化酶系增强了菌体对 Cd^{2+} 的耐受性和富集性能。

关键词: 美味牛肝菌, 镉, 生物富集, 食品安全性

Bioconcentration characteristics of Cadmium(Ⅱ) by *Boletus edulis*

LI Jin-cheng, BAO Chang-jun, SUN Yun, ZHUANG Yong-liang*, SUN Li-ping

(Yunnan Institute of Food Safety, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: The bioconcentration characteristics of cadmium(Ⅱ) with different concentrations (Cd^{2+} , 0, 16, 32, 48, 64 and 80 mg/L) by *Boletus edulis* under liquid fermentation were investigated. The results showed that the treatment with increasing Cd^{2+} concentrations significantly inhibited mycelia growth ($p < 0.05$), and 50% inhibitory concentration was 56 mg/L. Mycelia showed significant accumulation capacity for Cd^{2+} , with the highest content of 3335.7 mg Cd per kg mycelia (DW), and the bioconcentration factor was 52.1 ($p < 0.05$). The contents of total soluble sugars and polysaccharides in mycelia were increased firstly and then decreased with increasing Cd^{2+} concentrations. The content of polysaccharides in mycelia treated with Cd^{2+} significantly higher than that of control ($p < 0.05$). Soluble protein contents were decreased firstly and then increased with increasing Cd^{2+} concentrations, with the peak at 80 mg/L Cd^{2+} ($p < 0.05$). The activities of CAT and SOD were significantly increased by lower Cd^{2+} concentrations but inhibited by high Cd^{2+} concentrations ($p < 0.05$). The activities of POD were significantly inhibited by Cd^{2+} treatment ($p < 0.05$).

Key words: *Boletus edulis*; cadmium; bioconcentration; food safety

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)23-0068-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.23.005

美味牛肝菌(*Boletus edulis*), 俗称白牛肝、大脚菇, 属于担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、牛肝菌科, 是一种世界范围内分布的食药兼用的真菌。美味牛肝菌在云南的产量很高, 具有很高的经济价值。据报道, 美味牛肝菌营养价值很高^[1], 富含多糖等功能性物质^[2], 能增强机体免疫力, 具抗肿瘤、抗突变、降血脂、抗病毒等功效。然而, 近年来环境重金属污染日益严重, 美味牛肝菌对镉具有很强的生物富集能力和耐受性^[3]。本项目组对云南省野生食用菌重金属

含量的初步调研, 也发现了很多镉含量超过国家限量标准的美味牛肝菌样本, 个别菌株镉含量达到 7.35 mg/kg DW, 虽然远远低于 Collin-Hansen 等^[4]报道的由挪威锌矿区采集的美味牛肝菌中的 126 mg·kg⁻¹ DM, 但是具有潜在的食品安全隐患。

美味牛肝菌对镉的富集, 一方面影响了其食品安全性, 需要对其进行有效的质量和安全控制; 另一方面, 提示可探索对重金属具有高富集能力和耐受性的蕈菌, 在环境的生物治污方面具有重要意义。

收稿日期: 2015-03-16

作者简介: 李金城(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 340198516@qq.com。

* 通讯作者: 庄永亮(1981-), 男, 博士, 教授, 主要从事食品高值化利用及质量控制研究, E-mail: kmylzhuang@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(21267013)。

因此,需要研究美味牛肝菌对镉的生物富集特性,为上述两点的研究提供理论基础。研究表明,重金属胁迫下,植物和真菌的首要防御系统是胞壁多糖、一些金属结合蛋白、及其抗氧化酶系等^[5]。美味牛肝菌对镉的生物富集机制可能也与菌体内的特定成分及其抗氧化酶系有关。目前尚未见此类的研究报道。本项目在实验室可控培养条件下,针对镉(Cd^{2+})对美味牛肝菌菌丝体液体发酵性能及其主要成分含量的影响,以及菌丝体对 Cd^{2+} 的生物富集性能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

美味牛肝菌(*Boletus edulis*) 购于中科院微生物菌种保藏中心,PDA培养基(马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂2%,pH自然)活化。实验用水为超纯水;镉元素标准溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 购于国家有色金属及电子材料分析测试中心;过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(羟胺法)、过氧化物酶(POD)测定试剂盒(紫外法) 购于南京建成生物工程研究所;琼脂和葡萄糖,生物培养用试剂 购于 sigma;其它为分析纯试剂。

YXQ-LS-30SH型立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司;SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台 江苏净化设备有限公司;QYC-2012C震荡培养箱 宁波江南仪器厂;TU-1901双光束紫外可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;AAS400G型原子吸收光谱仪 德国耶拿;3k15型冷冻离心机 德国 sigma。

1.2 实验方法

1.2.1 美味牛肝菌实验室的可控培养 制备 PDA 液体培养基,灭菌,接活化菌种,27 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 3 d,得种子液。

根据本研究预实验得到的菌丝生长半数抑制率的 Cd^{2+} 浓度,设置培养基中 Cd^{2+} 浓度为0、16、32、48、64、80 mg/L。将制备好的种子液打碎,按3%接种量接种于 Cd^{2+} 浓度为0、16、32、48、64、80 mg/L的250 mL的三角瓶中(每个三角瓶装液量100 mL PDA 液体培养基),重复6次,27 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养5 d,抽滤,大量超纯水冲洗后,每瓶菌丝体发酵生物量以冻干后的重量计。得到的菌丝体分为2组,一组直接用于胞内抗氧化酶系活性分析;另一组真空冷冻干燥,称量菌丝干重,研碎,保存于干燥器备用。

1.2.2 菌丝体中镉元素含量测定 参考 GB/T 5009.15-2003《食品中镉的测定的方法》,测定冻干后菌丝体中镉含量。

1.2.3 菌丝体中可溶性总糖含量测定及菌丝体多糖含量分析 准确称取冻干的菌丝体20 mg,加入5 mL水,90 $^{\circ}\text{C}$ 震荡提取2 h,3500 r/min 离心10 min,取上清;沉淀加5 mL水重复提取一次,离心合并上清液,定容,采用苯酚-硫酸法测定菌体可溶性总糖含量,0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖制作标准曲线^[6]。

准确称取冻干的菌丝体10 g,加入100 mL水,

90 $^{\circ}\text{C}$ 震荡提取2 h,3500 r/min 离心10 min,取上清;沉淀加100 mL水重复提取一次,离心合并上清液,旋转蒸发浓缩至一定体积后加入4倍体积无水乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉过夜,5000 r/min 离心10 min,取沉淀复溶至一定体积后 Savage 法除蛋白,取水层冻干,得到菌丝体多糖提取物,复溶至一定体积后采用苯酚-硫酸法测定菌体多糖含量,0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖制作标准曲线^[6]。

1.2.4 菌丝体中 CAT、SOD、POD 活性及可溶性蛋白含量测定 准确称取3 g新鲜菌丝,按1:3的比例加入0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH7.0),一小勺石英砂,冰浴研磨匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心(3500 r/min,10 min),取上清液作为 CAT、SOD、POD 活性及可溶性蛋白质含量的待测液。

1.2.5 数据统计方法 每个实验至少六次重复,测定结果表达为平均值 \pm 标准偏差。使用 Microsoft Office Excel 2007 和 origin7.5 进行数据处理、作图及回归分析。采用 SPSS11.5 软件对数据进行方差分析,差异显著性水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 Cd^{2+} 对美味牛肝菌菌丝生长的影响

镉(Cd^{2+})对美味牛肝菌菌丝体生长发育的影响如图1所示。在无 Cd^{2+} 培养基中,美味牛肝菌长势很好,滤出的菌丝体色白,呈明显且均匀的丝状。不同浓度 Cd^{2+} 处理显著抑制了美味牛肝菌菌丝体的生长发育($p < 0.05$),且滤出的菌丝体随 Cd^{2+} 浓度的增加颜色呈淡黄至黄褐色。这可能是 Cd^{2+} 胁迫下,美味牛肝菌菌丝产生了黑色素,来螯合菌体中的 Cd^{2+} ,提高菌丝体对 Cd^{2+} 的耐受性^[7]。培养结束后,无 Cd^{2+} 培养基平均每瓶菌丝发酵产量为0.65 g,随着 Cd^{2+} 的加入,菌丝发酵产量逐渐减少,如图1所示,本研究与前期研究结果一致^[8]。将 Cd^{2+} 处理浓度(X)与美味牛肝菌菌丝体发酵产量(Y)进行回归分析得到 $Y = -0.0048X + 0.592$ ($R^2 = 0.9283$),即 Cd^{2+} 对菌丝体生长发育的抑制作用与其浓度线性正相关,生长抑制率为50%的 Cd^{2+} 浓度为56 mg/L,表明美味牛肝菌对 Cd^{2+} 具有较高的耐受性。

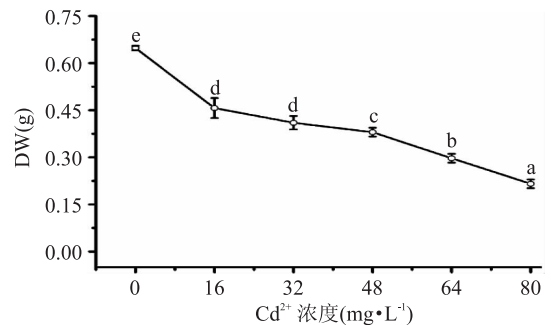


图1 Cd^{2+} 对美味牛肝菌菌丝体生长发育的影响

Fig.1 Effect of Cd^{2+} on the growth of *Boletus edulis*

注:标注不同字母表示差异显著($p < 0.05$),图2~图4同。

2.2 菌丝体对 Cd^{2+} 的生物富集作用

如图2所示,不同浓度 Cd^{2+} 的液体培养基中,美味牛肝菌菌丝体对 Cd^{2+} 的生物富集量呈“S”形曲线

变化。由图2可以看出,随着培养基中 Cd^{2+} 浓度的增加,菌丝体对 Cd^{2+} 的富集量快速上升,其富集系数在 Cd^{2+} 添加较低浓度时(16 mg/L)达到第一个峰值,为48.8,菌丝对 Cd^{2+} 的富集量为780.2 mg/kg DW。在培养基中 Cd^{2+} 浓度为64 mg/L时,菌丝体对 Cd^{2+} 的富集量达到最大值,为3335.7 mg/kg DW,其富集系数也达到最大值,为52.1,其后,随培养基中 Cd^{2+} 浓度的增加,菌丝体对 Cd^{2+} 的吸附量不再显著增加,即达到饱和和吸附,吸附量为3408.9 mg/kg DW。

根据目前的一些研究,大型真菌在活体生长过程中,菌丝体对培养基中重金属的生物吸附性能显著高于子实体^[3,7],但是远远低于将采收后的子实体作为生物吸附剂对基质中重金属的生物吸附能力^[9]。这可能是菌丝体作为子实体的营养体,其与重金属结合的大分子物质,如多糖、蛋白等含量较高;但是活体培养最终会受到重金属损伤而产生体内重金属平衡机制,使其对重金属的生物吸附具有较低的饱和度。但是以采收后子实体作为生物吸附剂,处理基质中的重金属不再受活体的重金属生理平衡机制的影响,从而具有较高的吸附饱和度。

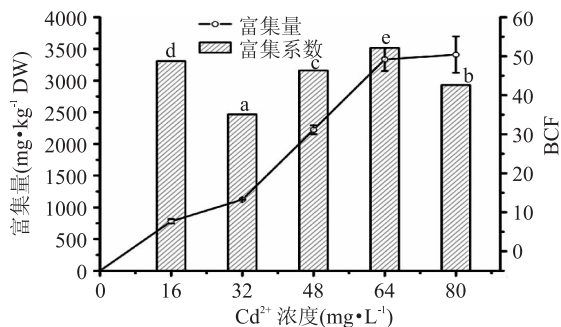


图2 美味牛肝菌菌丝发酵对培养基中 Cd^{2+} 的生物富集性能

Fig.2 Accumulation capacity and

bioconcentration factor (BCF) of Cd^{2+} in *Boletus edulis*

2.3 Cd^{2+} 对菌丝体中可溶性总糖、可溶性蛋白含量及菌体多糖含量的影响

不同浓度 Cd^{2+} 处理显著影响了美味牛肝菌菌丝体中可溶性总糖、可溶性蛋白和菌体多糖的含量($p < 0.05$),如图3所示。美味牛肝菌菌体中可溶性总糖含量较高,无 Cd^{2+} 培养的菌丝体中达到25.3% DW;随着 Cd^{2+} 的加入及其浓度的增加,菌体中可溶性总糖含量呈现先增加后降低的趋势,在 Cd^{2+} 浓度为16 mg/L时,菌体中可溶性总糖含量最高($p < 0.05$),为33.9% DW, Cd^{2+} 浓度为80 mg/L时菌体总糖含量则显著降低为18.4% DW($p < 0.05$)。

Cd^{2+} 处理对菌体中可溶性蛋白含量的影响与总糖完全相反,由图3可以看出,随 Cd^{2+} 浓度的增加,菌体中可溶性蛋白含量呈现先降低后增加的趋势,即 Cd^{2+} 浓度为16 mg/L时菌体中可溶性蛋白含量最低($p < 0.05$),为0.9 mg/g FW; Cd^{2+} 浓度为80 mg/L时菌体可溶性蛋白含量显著增加为1.6 mg/g FW($p < 0.05$),相比较于无 Cd^{2+} 组的1.0 mg/g FW,增加了1.6倍。

Cd^{2+} 处理对菌体中多糖含量的影响也呈现先增加后降低的趋势,相对于可溶性总糖含量,菌体多糖在48 mg/L Cd^{2+} 处理时含量最高,为3.9% DW。无 Cd^{2+} 添加时,菌丝体中多糖含量最低,为2.4% DW,所以培养基中 Cd^{2+} 的存在刺激了美味牛肝菌菌体多糖的合成。

菌体中可溶性糖类主要包括葡萄糖、果糖、麦芽糖以及能够在测定条件下水解为单糖的可溶性低聚糖,是菌体细胞中的主要能量物质和渗透调节物质,可以直接参与菌丝体的新陈代谢,从营养学角度,也是菌体供给人体的主要营养物质和功能性成分;而多糖成分中一部分是菌体的初级代谢产物,一部分是次级代谢产物。重金属对真菌可溶性总糖含量的影响未见报道,程显好等^[10]研究发现锌对蛹虫草菌体中葡萄糖含量的影响呈先增后降的趋势,锌处理量很高时菌体葡萄糖的含量要显著低于无锌组;王松华等^[11]发现高浓度镉处理显著降低了灵芝菌丝体中还原性糖含量。可能在金属毒害作用下,菌体生长发育受到抑制,从而抑制了菌体的新陈代谢进程。对此作用机理还有待进一步研究。

菌体多糖如几丁质、纤维素、纤维素衍生物等细胞成分能结合菌体吸附的重金属,对菌体抗金属胁迫的耐受性具有显著积极作用^[7]。另一方面,菌体多糖一般具有显著的抗氧化活性,可有效清除自由基,维持细胞氧化压力的平衡。重金属存在下,可以刺激胞内产生过多的活性氧,增加细胞氧化压力,对细胞产生毒害。推测, Cd^{2+} 刺激美味牛肝菌菌体多糖的合成有助于平衡胞内氧压。所以,金属离子的存在一般可以刺激菌体多糖的合成。

重金属胁迫下,所有的生命体都存在生物转化来降低重金属的毒性,如诱导产生金属硫蛋白、胁迫蛋白来螯合、稳定进入体内的重金属。本研究中, Cd^{2+} 处理浓度较高,梯度跨度大,没有观察到低剂量的 Cd^{2+} 对可溶性蛋白的诱导效应,所以可溶性蛋白呈现了先降后增的变化趋势。对于很高浓度 Cd^{2+} 处理刺激菌体中可溶性蛋白含量的增加,其机理还有待于进一步研究。

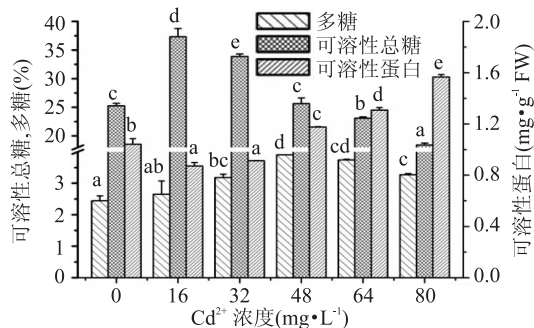


图3 Cd^{2+} 对美味牛肝菌菌丝体中可溶性总糖、可溶性蛋白及菌体多糖含量的影响

Fig.3 Effects of Cd^{2+} on the total soluble saccharides, soluble protein and polysaccharides

2.4 Cd^{2+} 对菌丝体中CAT、SOD、POD活力的影响

不同浓度 Cd^{2+} 处理显著影响了美味牛肝菌菌丝

体中 CAT、SOD 和 POD 的活性 ($p < 0.05$), 如图 4 所示。CAT 和 SOD 活性随 Cd^{2+} 处理浓度的增加呈现显著的“低促高抑”变化 ($p < 0.05$), Cd^{2+} 浓度为 16 mg/L 时 CAT 和 SOD 活性均达到最大值。对于 CAT 活性, Cd^{2+} 处理浓度高于 16 mg/L 以后, 其活性均显著低于无 Cd^{2+} 组 ($p < 0.05$); 对于 SOD 活性, Cd^{2+} 处理浓度高于 32 mg/L 以后, 其活性维持于无 Cd^{2+} 处理组相当; POD 活性被 Cd^{2+} 显著抑制 ($p < 0.05$)。

镉胁迫可使生物细胞活性氧水平升高, 造成活体细胞的氧压损伤。生物细胞内的 CAT、SOD、PPO 等抗氧化酶系可在一定程度上平衡各种环境因子造成的氧化迸发, 降低氧压损伤, 提高生物体抗逆性。重金属作为生物体不利的环境因子之一, 其胁迫下一般可刺激生物体抗氧化酶系活性升高, 清除过量的活性氧, 先前研究^[11-12]先后报道了镉胁迫下灵芝、柱状田头菇等真菌菌丝体中抗氧化酶系的响应, 均可发现较低镉浓度处理时对菌体抗氧化酶系的激活作用。推测, 菌体抗氧化酶系活性升高, 协同可溶性蛋白、菌体多糖等可提高菌体对重金属胁迫的耐受性能。本研究中 POD 活性随 Cd^{2+} 处理的显著降低, 可能是本研究中 Cd^{2+} 处理浓度太大, 没有观察到 Cd^{2+} 处理对 POD 活性的激活作用。

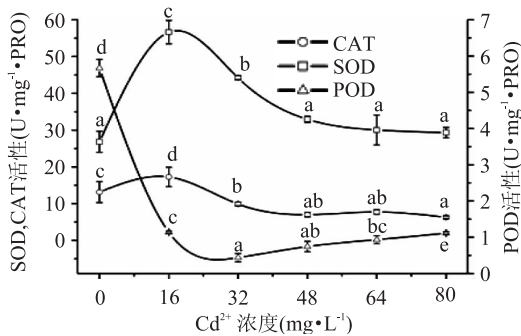


图4 Cd^{2+} 对美味牛肝菌菌丝体中 CAT、SOD 和 POD 活性的影响

Fig.4 Effects of Cd^{2+} on the activities of CAT, SOD and POD

3 结论

目前对于生物的金属离子富集甚至超富集作用机制还不完全了解。从本文和已有研究来看, 大型真菌对重金属具有一定的生物富集作用和耐受性。

(上接第 62 页)

及抑制非酶糖基化活性的研究[J].江西农业大学学报, 2013, 35(3): 593-597.

[11] 申勇立. 羟基自由基破坏 DNA 与 RNA 的碱基、黄酮类化合物清理羟基自由基反应机理的量子化学研究及电子密度拓

(上接第 67 页)

[22] 杨家添, 陈渊, 谭义秋, 等. 乙酰化己二酸交联机械活化木薯淀粉的制备及性能研究[J]. 粮食与饲料工业, 2012(11): 23-29.

[23] 罗发兴, 黄强, 张乐兴, 等. 乙酰化己二酸交联蜡质马铃薯淀粉糊的黏度性质[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),

菌体中特定的物质成分, 如多糖、菌体蛋白等可参与重金属的吸附, 对重金属胁迫造成的氧化压力损伤具有一定的修复作用。菌体中的抗氧化酶系可被重金属胁迫激活, 协同菌体多糖和蛋白等提升菌体对重金属的耐受性能。重金属胁迫下大型真菌抗性机理是十分复杂的, 其耐受性能可能是由多个基因调控, 还需从细胞、分子水平上作进一步研究。

参考文献

[1] 江洁, 李学伟, 金怀刚. 美味牛肝菌菌丝体与子实体蛋白质营养价值的评价[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 253-256.

[2] 唐薇, 鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗 S-180 肿瘤的效应[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1999, 24(4): 478-481.

[3] Kalač P. Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009 [J]. Food Chemistry, 2010, 122: 2-15.

[4] Collin-Hansen C, Yttri K E, Andersen R A, et al. Mushrooms from two metal-contaminated areas in Norway: Occurrence of metals and metallothionein-like proteins [J]. Geochemistry, Exploration, Environment, Analysis, 2002, 2: 121-130.

[5] Vido K, Spector D, Lagniel G, et al. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 8469-8474.

[6] 谢笔钧, 何慧. 食品分析[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 157-158.

[7] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪. 内外生菌根真菌对重金属的耐受性及机理[J]. 土壤, 2003, 35(5): 370-377.

[8] Lima M A B, Franco L O, Souza P M, et al. Cadmium tolerance and removal from *Cunninghamella elegans* related to the polyphosphate metabolism [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14: 7180-7192.

[9] 莫瑜, 潘蓉, 黄海伟, 等. 毛木耳和白木耳子实体对 Cd(II)、Cu(II)、Pb(II) 和 Zn(II) 的吸附特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(7): 1566-1574.

[10] 程显好, 盖宇鹏, 孙慧涌, 等. 蛹虫草对锌的耐性与富集特性[J]. 生态学报, 2010, 30(6): 1449-1455.

[11] 王松华, 张华, 崔元戎, 等. 镉对灵芝菌丝抗氧化系统的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1355-1361.

[12] 王松华, 张华, 傅曼琴, 等. 柱状田头菇菌丝对镉胁迫的抗氧化响应[J]. 应用生态学报, 2007, 18(8): 1813-1818.

扑学分析[D]. 天津: 南开大学, 2009.

[12] 徐雅琴, 李静, 于泽源, 等. 黑穗醋栗总黄酮的抗氧化及抗非酶糖基化活性研究[J]. 东北农业大学学报, 2013, 4(2): 59-63.

2008, 36(3): 45-51.

[24] Kofimoto K. Molecular structure of some shear starches [J]. Carbohydrate Polymers, 1994, 25(2): 111-116.

[25] Tamaki S, Teranishi K, Yamaha T. Inner structure of potato starch granules [J]. Starch/Stärke, 1997, 49(9): 387-389.